

Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor-Ingenieurin (Dr.-Ing.)

eingereicht am

Zentrum für Ingenieurwissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
als organisatorische Grundeinheit für Forschung und Lehre im Range einer Fakultät
(§75 Abs. 1 HSG LSA, §19 Abs. 1 Grundordnung)

von

Frau Dipl.-Ing. Katja Patzsch
geboren am 06. März 1981 in Karl-Marx-Stadt, Deutschland

Geschäftsführender Direktor des Zentrums für Ingenieurwissenschaften:

Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. Holm Altenbach

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. rer. nat. Christoph Syldatk

Tag der mündlichen Verteidigung: 22.02.2010

Halle (Saale), den 01.03.2010

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Katja Patzsch, dass ich die vorliegende Arbeit - mit Ausnahme der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel - selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Halle (Saale), den 01.03.2010

Katja Patzsch

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Arbeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die zum Vollenden der Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Markus Pietzsch für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die sehr interessante Aufgabenstellung und Betreuung der Arbeit. Für die wertvollen und anregenden Diskussionen, seine volle Unterstützung, für das Vertrauen sowie die Förderung meiner Person möchte ich mich recht herzlich bedanken. Bei Herrn Prof. Christoph Syldatk möchte ich mich für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit bedanken.

Ich bedanke mich bei der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe (FNR) und der BioService GmbH in Halle (Saale) für die finanzielle Unterstützung während der Promotion. Der Firma Emsland-Stärke GmbH, Cerestar Deutschland GmbH und Gelita AG danke ich für die Bereitstellung der Proteine und die Zusammenarbeit bezüglich deren Verwertung. Bei der Firma AMYkor GmbH möchte ich mich für die durchgeführten Untersuchungen zur Abbaubarkeit und Pflanzenverträglichkeit der von uns entwickelten Materialien bedanken.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Joachim Ulrich für seine Unterstützung und die Möglichkeit zur Nutzung verschiedener Geräte und bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Wolfgang Grellmann für die Durchführung und Hilfe bei der mechanischen Charakterisierung (Weiterreiß- und Durchstoßversuch) bedanken. Für ihre hilfreichen Hinweise und Erklärungen danke ich besonders Frau Dr. Katrin Reincke.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit sowie offene und freundschaftliche Atmosphäre. Insbesondere Herrn Dr. Thomas Hertel danke ich für seine stets kompetenten Ratschläge und wertvollen Hinweise. Meinen früheren und aktuellen Mitdokoranden Dr. Christian Marx, Hany Hassounah, Christian Sommer, Matthias Jacob, Karin Büttner und Andreas Migge danke ich für die Hilfsbereitschaft bei Problemlösungen, die fachlichen Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit. Besonders hervorheben möchte ich Patrick Frohberg, der mir bei der Aufgabenstellung hilfreich zur Seite stand, und Kristin Riedel, die meine Arbeiten am Lehrstuhl fortführen wird.

Zu Dank bin ich natürlich auch meinen Praktikanten, studentischen Hilfskräften sowie Studien-, Diplom- und Masterarbeitern (insbesondere Sarada Devi, Carolin Prechtel, Katja Weiss, Anika Wachsmuth, Andreas Migge, Kristin Riedel, Tim Willems, Agnes Lorenz, Viviana Díaz, Matthias Jacob) verpflichtet.

Einen besonderen Dank möchte ich meinem Lebensgefährten Ronny, meinem Bruder Martin und vor allem meinen Eltern für ihre moralische Unterstützung, Zuversicht und Geduld mit mir aussprechen. Mein Dank gilt ebenfalls meiner gesamten Familie sowie meinen lieben Freunden.

„Wer die Erkenntnis der Sache nicht hat,
dem wird die Erkenntnis der Worte nichts helfen.“

(Martin Luther, Tischreden)

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	2
Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungen	8
1 Einleitung	11
1.1 Stand des Wissens	13
1.1.1 Filme in der Landwirtschaft	13
1.1.2 Transglutaminase	15
1.1.3 Proteine	16
1.1.4 Proteinfilme	17
1.1.4.1 Weichmacher	17
1.1.4.2 Vernetzung der Proteine	18
1.1.4.3 Eigenschaften	18
1.2 Zielsetzung	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Geräte	23
2.1.3 Proteine	23
2.1.4 Puffer	25
2.2 Analytik	26
2.2.1 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität	26
2.2.1.1 Durchführung in 1,5 mL Reaktionsgefäßen	27
2.2.1.2 Durchführung in Mikrotiterplatten	27
2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.2.3.1 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mittels Coomassie	29
2.2.3.2 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mittels Silber	30
2.2.4 Mechanische Prüfung	30
2.2.4.1 Zugversuch	30
2.2.4.2 Weiterreißversuch	32
2.2.4.3 Durchstoßversuch	32
2.2.5 Löslichkeit	33
2.2.5.1 Löslichkeit von Proteinfilmen in Wasser	33
2.2.5.2 Bestimmung des löslichen Proteins	34
2.2.5.3 Bewitterungstest zur Untersuchung der Regenbeständigkeit	35
2.2.6 Biologische Charakterisierung	37
2.2.6.1 Abbaubarkeit im Boden	37
2.2.6.2 Pflanzenverträglichkeit und Düngeeffekt	37
2.3 Methoden	39
2.3.1 Charakterisierung der MTG (TG Activa [®] WM)	39
2.3.1.1 Temperaturoptimum und Lagerstabilität	39
2.3.1.2 Einfluss von Weichmachern auf die MTG-Aktivität	39

2.3.2	Filmherstellung	40
2.3.2.1	Standardverfahren.....	40
2.3.2.2	Untersuchungen zu Puffer und pH-Wert	42
2.3.2.3	Untersuchungen zu Vernetzungszeit und -temperatur	42
2.3.2.4	Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration.....	43
2.3.2.5	Beschichtung mit Bienenwachs.....	43
2.3.2.6	Untersuchungen zu innerer Weichmachung	43
2.3.2.7	Untersuchungen zur Enzymkonzentration.....	43
2.3.3	Einfluss von Schneidetechnik und Probandimensionen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen	44
2.3.4	Untersuchung der Vernetzbarkeit mittels MTG (TG Activa®WM)	44
2.3.5	Untersuchungen zur PEGylierung von Proteinen mittels MTG (TG Activa®WM)	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Grundlagen	46
3.1.1	Charakterisierung der MTG (TG Activa®WM)	46
3.1.1.1	Temperaturoptimum und Lagerstabilität.....	46
3.1.1.2	Einfluss der Weichmacher Glycerin und PEG 300 auf die MTG-Aktivität ..	47
3.1.1.3	Nachweis der Vernetzung	48
3.1.2	Untersuchungen zu Puffer und pH-Wert.....	49
3.1.3	Einfluss von Schneidetechnik und Probandimensionen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen	51
3.1.4	Untersuchungen zu Vernetzungszeit und -temperatur	54
3.2	Charakterisierung von Filmen aus pflanzlichen Proteinen im Vergleich zu Na-Caseinat und Gelatine.....	58
3.2.1	Einsatz pflanzlicher Proteine	58
3.2.1.1	Vernetzbarkeit mittels MTG (TG Activa®WM).....	58
3.2.1.2	Filmherstellung	60
3.2.2	Mechanische Charakterisierung	62
3.2.2.1	Zugversuch.....	62
3.2.2.2	Weiterreißversuch	63
3.2.2.3	Durchstoßversuch	64
3.2.3	Löslichkeit in Wasser	66
3.2.4	Regenbeständigkeit.....	68
3.2.5	Biologische Charakterisierung	70
3.2.5.1	Abbaubarkeit im Boden	70
3.2.5.2	Pflanzenverträglichkeit und Düngeeffekt.....	70
3.3	Variation der Ausgangsstoffe / Additive zur Optimierung der Filmeigenschaften	72
3.3.1	Verschiedene Weichmacher und Beschichtung	72
3.3.1.1	Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration.....	72
3.3.1.2	Untersuchungen zu innerer Weichmachung	78
3.3.1.3	Beschichtung mit Bienenwachs.....	82
3.3.2	Untersuchungen zu Proteingemischen.....	84
3.3.3	Proteine unterschiedlicher Gewinnung	86
3.3.3.1	Gelatine mit verschiedenen Geliertgraden	86
3.3.3.2	Erbsenprotein aus unterschiedlicher Gewinnung	88
3.3.4	Variation der MTG-Konzentration	93

4 Diskussion	95
4.1 Eignen sich pflanzliche Proteine aus Nebenströmen zur Herstellung von Biokunststoffen?.....	96
4.2 Eine enzymatische Quervernetzung – ist sie von Vorteil?	99
4.3 Lassen sich aus Proteinen konkurrenzfähige Materialien herstellen?	104
4.4 Fehlerbetrachtung	109
4.5 Ausblick.....	110
5 Zusammenfassung	112
6 Literatur	114
7 Anhang	120
7.1 Aktivitätsmessungen	120
7.2 Mechanische Charakterisierung.....	121
7.3 Löslichkeit	124
7.4 Biologische Charakterisierung.....	124
8 Lebenslauf	128
9 Publikationsliste	129

Abkürzungen

A-PEG	Amino-Polyethylenglykol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Na-Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
BD	Bruchdehnung
BSA	Rinderserum Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
Cas	Na-Caseinat
ddH ₂ O	mehrfach deionisiertes Wasser
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
Di-A-PEG	Diamino-Polyethylenglykol
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMC	N,N-Dimethylcasein
Eco	Ecoflex [®]
EG	Ethylenglykol
EN	Europäische Norm
Er	Erbse
FNR	Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe
FS	Feststoff
Gel	Gelatine
ges	gesamt
GI	Glycerin
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
Glx	Glutamin und Glutaminsäure
HDPE	High Density Polyethylen
IR	Infrarot
ISO	International Organization for Standardization
K	Kontrolle
K _v	Variable Kosten
k.A.	keine Angabe
Ka	Kartoffel
kDa	Kilodalton
KW	Kennwert
k.V.	kein Vergleich
LDPE	Low Density Polyethylen
lösl	löslich
Lys	Lysin
M	Molekulargewichtsmarker
Ma-Bi	Mater-Bi [®]
MTG	mikrobielle Transglutaminase
M _w	Molekulargewicht
Na	Natrium
n.a.	nicht auswertbar
n.m.	nicht messbar
P	Pellet

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PLA	Polylactid (auch Polymilchsäure)
PP	Polypropylen
PS	Petrischale
PTFE	Polytetrafluoroethylen
rLF	relative Luftfeuchte
rpm	Umdrehungen pro min (engl.: rotation per minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SDS-PP	SDS-Probenpuffer
TEEG	Tetra-Ethylenglykol
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TG	Transglutaminase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
YS	Fließen mit stabiler Rissbildung (Schädigungsart)
YU	Fließen mit instabiler Rissbildung (Schädigungsart)
ZF	Zugfestigkeit

Deutsche Symbole

\bar{x}	Mittelwert
s	Standardabweichung
n	Anzahl der Werte
A	Querschnittsfläche [mm ²]
c	Konzentration [mg/mL]
E	Extinktion [-]
E _M	Energie bis zur Höchstkraft [J]
F _M	Maximal- bzw. Höchstkraft [N]
L ₀	Einspannlänge [mm]
l _M	Verformung bei Höchstkraft [mm]
m	Menge [g]
t	Zeit [s], [min], [h], [d] bzw. [a]
T [°C]	Temperatur [°C]
T [%]	Totalacrylamidkonzentration [%]
U	Unit (μmol/min)
V	Volumen [μL], [mL] bzw. [L]
W _R	Weiterreißwiderstand [N/mm]
ΔGewicht	Gewichtsverlust [%]

ΔL	Längenänderung [mm]
$\Delta \text{Protein}$	Proteinverlust [%]

Griechische Symbole

ε	Extinktionskoeffizient [mL/ μmol]
ε_B	Bruchdehnung [%]
σ_M	Zugfestigkeit [N/mm ²]

1 Einleitung

Kunststoffe sind wichtige Materialien in der heutigen Zeit. Durch ihre sehr guten mechanischen Eigenschaften, hohe Widerstandsfähigkeit und geringen Kosten begleiten sie uns nahezu überall im täglichen Leben. Sie spielen eine große Rolle in technologischen Anwendungen. Die meisten Kunststoffe basieren auf Erdöl und sind durch ihre Beständigkeit in der Umwelt eine Gefahr für das Ökosystem. Das zunehmende Wirtschaftswachstum führt zu immer mehr Abfall, so dass Plastikmüll zu einem Umweltproblem mit wachsender Bedeutung in der ganzen Welt wird. Allein in Europa (25 Länder) wurden im Jahr 1995 etwa 204 Millionen Tonnen (457 kg/Person) und 2003 bereits 243 Millionen Tonnen (534 kg/Person) Abfall produziert – das entspricht einem Anstieg von 2 % pro Jahr. Etwa die Hälfte landet dabei auf Mülldeponien (48,8 %, Daten 2003) und annähernd ein Fünftel (17,3 %, Daten 2003) in Verbrennungsanlagen, wodurch große Mengen an CO_2 in die Atmosphäre gelangen. Der Rest wird recycelt oder auf andere Weise behandelt [Rudnik, 2008]. Der Verbrauch an Kunststoffen wird weiter kontinuierlich steigen – weltweit von 60 Millionen Tonnen im Jahr 1980 auf voraussichtlich 260 Millionen Tonnen im Jahr 2010 [Lörks and Wenig, 2006]. Alternativen, die den endlichen Rohstoff Erdöl schonen und gleichzeitig das Umweltproblem vermindern, sind so genannte Biokunststoffe. Sie werden aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt, sind biologisch abbaubar und zerfallen in natürlich vorkommende, ungiftige Ausgangsprodukte. Durch Mikroorganismen und Enzyme bleiben nur Wasser, Kohlendioxid und Biomasse zurück, die von der Natur weiter verwertet werden (Abbildung 1-1). Wird nur das Material berücksichtigt (ohne u.a. Herstellung, Transport, Lagerung) sind Biokunststoffe im Gegensatz zu fossilen Rohstoffen weitgehend CO_2 -neutral, da sie nach Gebrauch nur soviel CO_2 freisetzen, wie die Pflanzen während ihres Wachstums von der Atmosphäre aufgenommen haben. Weiterhin kann durch eine thermische Verwertung der Biokunststoffe CO_2 -neutrale Energie gewonnen werden. Neben den ökologischen Vorteilen werden zudem auch fossile Rohstoffe geschont und die Abhängigkeit vom Erdöl verringert.

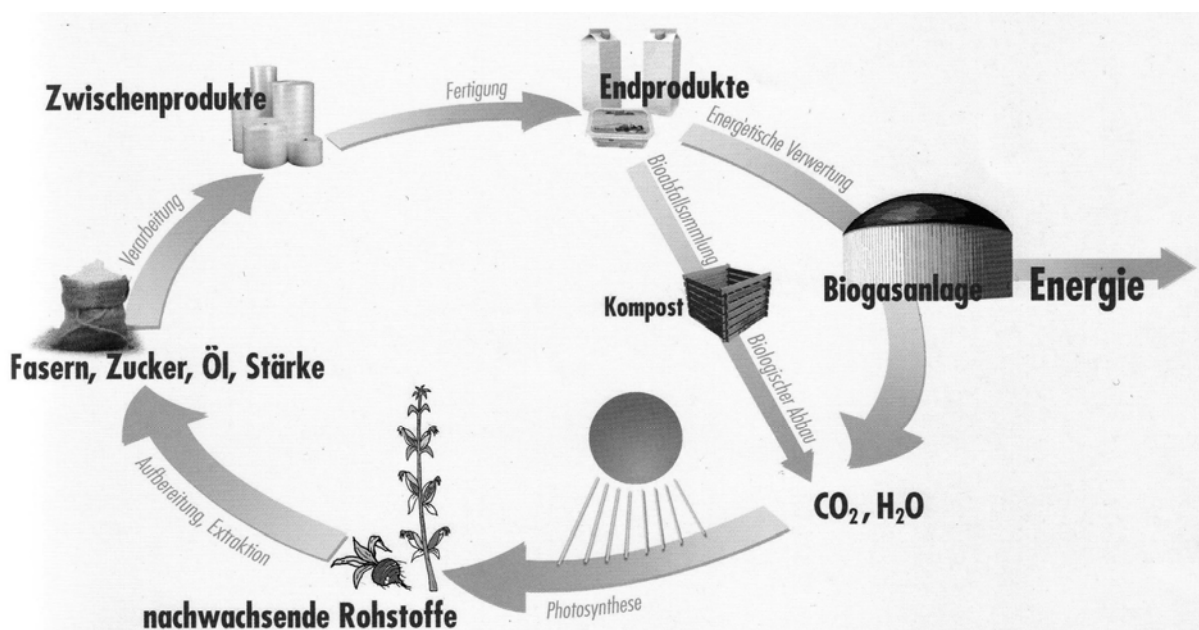


Abbildung 1-1: Geschlossener Stoffkreislauf [Fachagentur Nachwachsender Rohstoffe].

Prinzipiell lassen sich Biokunststoffe aus einer Vielzahl pflanzlicher Rohstoffe herstellen. Einige davon werden bereits zunehmend verwendet, wie z.B. Stärke, Cellulose und Zucker. Mit Hilfe von Mikroorganismen lassen sich aus Stärke oder Zucker biologisch abbaubare Polymere bzw. Vorstufen herstellen: Polymilchsäure (auch Polylactid, PLA), die durch chemische Polymerisation der fermentativ hergestellten Milchsäure gewonnen wird, und Polyhydroxybuttersäure (PHB). Beide Polymere eignen sich zur Herstellung von transparenten Biokunststoffen mit guten mechanischen Eigenschaften, die bereits vielseitig u.a. für Tragetaschen und verschiedene Verpackungen angewendet werden. Thermoplastische Stärke, eine Mischung aus geschmolzener Stärke und Plastifizierungsmitteln, findet ebenfalls Anwendung. Jedoch besitzt sie einen hydrophilen Charakter, wodurch die Oberfläche klebrig wird und sich die physikalischen Eigenschaften ändern. Deshalb wird sie meist zur Verbesserung der Materialeigenschaften mit anderen biologisch abbaubaren Polymeren zu Kunststoffblends verarbeitet. Thermoplastische Stärke wird beispielsweise zur Herstellung von Verpackungschips, Tragetaschen sowie Landwirtschaftsfilmen eingesetzt. Cellulose ist aufgrund der langkettigen Struktur unlöslich in Wasser und organischen Lösungsmitteln. Daher wird sie durch Veresterung (z.B. mittels Essigsäure) zu thermoplastisch verarbeitbaren Cellulosederivaten umgewandelt, die u.a. als Beschichtungen eine breite Anwendung in Pharmazie und Kosmetik finden.

Proteine als Grundlage für Biokunststoffe wurden bereits im 19. Jahrhundert angewandt. So erfolgte 1897 die Anmeldung eines Patents zur Herstellung von Knöpfen aus mittels Formaldehyd kovalent vernetztem Casein [Krische and Spitteler, 1897]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde Zein (Maisprotein) zur Erzeugung von Beschichtungen, Wachsen und textilen Fasern eingesetzt. Außerdem war Gelatine in Anwendungen der Pharmazie als Medikamentenkapseln, in der Fotografie und in der Lebensmittelindustrie zu finden. In den 1960ern wurden die Proteine von den synthetisch hergestellten Kunststoffen, wie u.a. Polyethylen (PE) und Polypropylen (PP), weitestgehend verdrängt (ausgenommen Gelatine). Heutzutage erfreuen sich Proteine, insbesondere aus Pflanzen, erneut eines wachsenden Interesses für non-food Anwendungen [Guilbert and Cuq, 2005]. Bei der Herstellung von Stärke aus Mais, Erbsen, Weizen und Kartoffel fallen proteinhaltige Lösungen als Nebenprodukt an, die nach Konzentrierung und Sprühtrocknung bisher überwiegend als Tierfuttermittel vermarktet werden. Besonders interessant könnten Anwendungen im Bereich der Landwirtschaft sein. Zur Erzeugung einer Gewächshausatmosphäre auf Feldern werden bisher Filme aus fossilen Rohstoffen zur Abdeckung verwendet. Diese Materialien könnten durch Biokunststoffe auf Basis von Proteinen ersetzt werden, deren Vorteil ihre biologische Abbaubarkeit ist. Entsorgungsprobleme, die bei den bisherigen Filmen auftreten, werden dadurch gelöst. Die beim Abbau von Proteinen entstehenden Aminosäuren könnten darüber hinaus als Stickstoffdünger dienen. Jedoch sind Anwendungen von Proteinfilmen bisher durch ihre schlechtere Resistenz gegen Wasserdampf und niedrigeren mechanischen Eigenschaften im Vergleich zu synthetischen Kunststoffen limitiert [Bourtoom, 2009; Chambi and Grosso, 2006].






1.1 Stand des Wissens

1.1.1 Filme in der Landwirtschaft

Einige Beispiele für Landwirtschaftsfilme sind Gewächshausüberzüge, Tunnelfilme, so genannte Ernteverfrühungsfilme (auch Mulchfilme), Siloabdeckfilme sowie Stretchfilme für Rundballensilagen. In erster Linie dienen sie als Schutz der Pflanzen oder des Getreides vor extremen Wetterbedingungen. Zusätzlich führen sie ein künstliches Klima – den so genannten Gewächshaus-Effekt – herbei, um das Pflanzenwachstum zu fördern. Des Weiteren werden Dichtungsbahnen für z.B. künstliche Teiche und Kanäle sowie Gülle- oder Schadstoffsammelbecken verwendet. Im Allgemeinen bestehen Landwirtschaftsfilme aus Polyethylen (PE) und werden als Blasfolien hergestellt, die aufgrund der biaxialen Orientierung während des Prozesses über exzellente mechanische Eigenschaften verfügen. Etwa die Hälfte davon wird durch Coextrusion erzeugt, um dicke Filme oder Filme mit Beschichtungen bzw. Additiven herzustellen. Für eine Optimierung der Filme hinsichtlich ihrer Anwendung werden u.a. Anti-Tau-, Infrarot-, Anti-UV- und antistatische Additive bzw. Pigmente hinzugefügt [Laverde, 2002]. Eine Übersicht über Landwirtschaftsfilme, deren Anwendung und Eigenschaften ist in Tabelle 1-1 zusammengefasst.

Landwirtschaftsfilme spielen eine große Rolle für die Kunststoffindustrie. Im Jahre 1998 wurden allein in Nordamerika 180 000 Tonnen verkauft, wovon 37 % Mulchfilme, 35 % Filme für Getreidelagerung und Silageherstellung, 19 % Filme für Gewächshausbespannung und 5 % Filme für Wasserbecken zum Einsatz kamen. In China hingegen wurde 1999 sogar die 5-fache Menge (930 000 Tonnen) an Landwirtschaftsfilmen genutzt. Die Fläche von China (> 9,5 Millionen km²) entspricht etwa 85 % der weltweit mit Mulchfilmen bedeckten Agrarflächen [Laverde, 2002]. Demzufolge besteht ein großes Potential für Anwendungen von Proteinfilmen in der Landwirtschaft.

Tabelle 1-1: Übersicht einiger Filme in der Landwirtschaft. PE...Polyethylen, LDPE...Low Density Polyethylen, HDPE...High Density Polyethylen, PP...Polypropylen, k.A...keine Angaben, ZF...Zugfestigkeit, BD...Bruchdehnung, UV...Ultraviolett, IR...Infrarot.

	Ernteverfrühungsfilm (Mulchfilm)	Gewächshausüberzug	Siloabdeckfilm	Stretchfilm für Rundballensilage	Dichtungsbahnen
					
Anwendung ¹	<ul style="list-style-type: none"> - zur Reduktion der Sonneneinstrahlung → Erhöhung der Bodentemperatur → verhindert Wachstum von Unkraut, fördert Pflanzenwachstum und Effizienz von Düngern, verhindert Wildbiss, schützt vor Witterung - u.a. für Erdbeeren 	<ul style="list-style-type: none"> - zum Schutz der Pflanzen vor Regen, Hagel - verhindert den Austritt von Infrarotstrahlung - durchlässig für wichtige Strahlung zur Photosynthese - undurchlässig für schädliche Strahlung 	<ul style="list-style-type: none"> - zur Lagerung von Getreide und Heu - für Getreidetrocknung und Silageproduktion (Tierfutter) 	<ul style="list-style-type: none"> - zur Silageproduktion (Tierfutter) - zum Transport von Heuballen 	<ul style="list-style-type: none"> - für Erdwasser-, Gülle-, Schadstoffsammelbecken, Deponien, Teiche - zum Schutz des Bodens vor Abwasser, Chemikalien, verunreinigten Flüssigkeiten - zur Vermeidung des Wasserverlustes in künstlichen Becken
Material	² LDPE schwarz, weiß, transparent	¹ PE	² LDPE weiß, grün, schwarz	¹ PE weiß	³ HDPE, LDPE, PP (flexibles)
Kosten	⁴ 0,03 €/m ²	k.A.	⁵ 0,20-0,40 €/m ²	k.A.	k.A.
Filmdicke ¹	20-75 µm	100-200 µm	100-200 µm	15-38 µm	0,5-2,5 mm
Mechanische Eigenschaften ³	² ZF: 22 N/mm ² ² BD: > 400 %	ZF: 22 N/mm ² BD: 400-500 %	ZF: > 17 N/mm ² BD: > 400 %	ZF: 20 N/mm ² BD: > 400 %	ZF: 18-29 N/mm ² BD: > 500 %
Weitere Eigenschaften ¹	<ul style="list-style-type: none"> - gute Resistenz gegenüber Zerreißen und Durchstoßen, niedriges Weiterreißvermögen - mögliche Zusatzberegnung durch Lochung - witterungsbeständig 	<ul style="list-style-type: none"> - Additive für UV-Schutz (UV-Absorber), zur Einstellung der Lichtdurchlässigkeit (TiO₂), IR-Schutz (CaCO₃), Anti-Tau Effekt - antistatisch - witterungsbeständig 	<ul style="list-style-type: none"> - gute Resistenz gegenüber Zerreißen und Durchstoßen - witterungsbeständig - säurebeständig 	<ul style="list-style-type: none"> - gute Resistenz gegenüber Zerreißen und Durchstoßen - sehr gute Haftung - witterungsbeständig 	<ul style="list-style-type: none"> - gute Resistenz gegenüber Durchstoßen - chemikalienbeständig - witterungsbeständig

¹Laverde 2002, ²AFG Agrofol GmbH (Unseburg), ³Werra Plastic GmbH (Philippsthal), ⁴Folienvertrieb Lücke GmbH (Stadtlohn), ⁵Landwirtschaftsverwaltung Baden-Württemberg

1.1.2 Transglutaminase

Transglutaminasen (Protein-Glutamin γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TG) sind Enzyme, die Proteine und Peptide kovalent verknüpfen [Zhu et al., 1995]. Sie katalysieren einen Acyltransfer zwischen einer γ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests, welcher zur Entstehung einer ϵ -(γ -Glutamyl) Lysin-Isopeptidbindung führt (Abbildung 1-2) [Seguro, 1999]. Neben Lysin können auch andere primäre Amine als Lysin-Komponente fungieren [Ohtsuka et al., 2000].

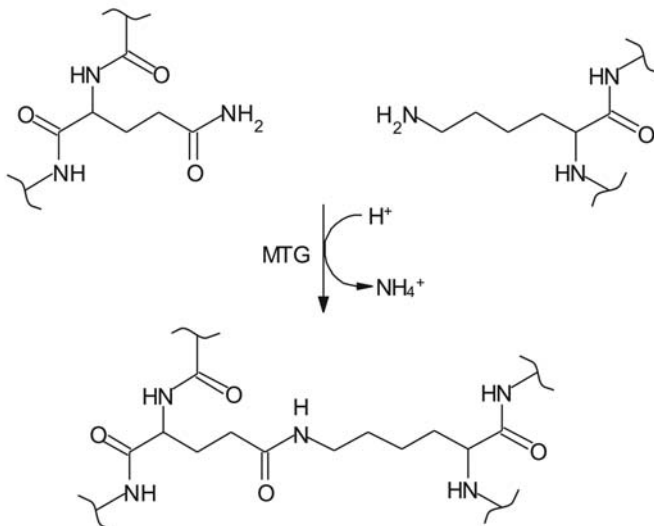


Abbildung 1-2: Durch mikrobielle Transglutaminase katalysierte Verknüpfungsreaktion der Seitenketten von proteingebundenem Glutamin und Lysin. Bildung einer ϵ -(γ -Glutamyl) Lysin-Isopeptidbindung zwischen einer γ -Carboxyamid-Gruppe eines Glutaminrests und einer Peptid- bzw. ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests.

Transglutaminasen sind weit verbreitet und kommen in den verschiedensten Organismen vor. Eukaryotische Transglutaminasen, wie die TG aus der Meerschweinchenleber, die Fisch-TG oder der Blutgerinnungsfaktor XIIIa, sind Calcium-abhängig [Folk and Cole, 1966a]. Einige der genannten TGs sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. 1989 wurde die erste mikrobielle Transglutaminase (MTG) in *Streptomyces mobaraensis* entdeckt, die gegenüber Transglutaminasen aus anderen Quellen entscheidende Vorteile bietet. Die MTG besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 38 kDa, ist Ca²⁺-unabhängig [Ando et al., 1989] und besitzt eine geringere Substratspezifität [Zhu et al., 1995]. Aufgrund der mikrobiellen Fermentation und einer Sekretion in das umgebende Medium durch den Originalstamm fallen wesentlich geringere Kosten bei der MTG-Herstellung an [Lu et al., 2003]. Mikrobielle Transglutaminase ist über einen weiten pH- und Temperaturbereich stabil (pH 3 – 9, 20 °C - 60 °C) [Lu et al., 2003]. Das Temperaturoptimum liegt bei 55 °C und das pH-Wert-Optimum bei 5 bis 8 [Yokoyama et al., 2004].

Die natürliche Funktion der MTG ist weitgehend unbekannt, jedoch wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Sporulation spielt [Kobayashi et al., 1996]. Die industriellen Anwendungsgebiete sind hingegen sehr vielfältig. In der Nahrungsmittelindustrie wird die MTG zur Restrukturierung von Fleisch und Fisch verwendet. Außerdem wird sie zur Verbesserung der Textur von Joghurt und Käse eingesetzt [Zhu et al., 1995]. Für eine Immobilisierung von Enzymen z.B. an Ionenaustauscher [Kamata et al., 1992] oder Silicagel [Synowiecki and Wolosowska, 2006] findet mikrobielle Transglutaminase ebenfalls Einsatz.

Des Weiteren kann die Stabilität von Pharmaprodukten gegenüber Proteasen bzw. ihre Zirkulationsdauer im Blut durch Bildung von Polyethylenglykol-Pharmaka-Konjugaten mittels MTG positiv beeinflusst werden [Zotzel, 2002]. Die MTG aus *Streptomyces mobaraensis* ist derzeit als „TG Activa[®]WM“ bei Ajinomoto kommerziell erhältlich.

Zur Quervernetzung von Proteinen sind deshalb reaktive Glutamine (Gln) und Lysine (Lys) erforderlich. In Tabelle 1-2 sind deren Anteile in Proteinen aus verschiedenen Quellen zusammengefasst.

Tabelle 1-2: Übersicht der Glutamin- und Lysingehalte in Proteinen aus verschiedenen Quellen. Gemessen nach Totalhydrolyse. Lys...Lysin, Gln...Glutamin, Glx...Glutamin und Glutaminsäure.

Amino- säure	Gehalt im Protein [%]							
	Erbse	Kartoffel	Weizen	Mais	Raps	Roggen	Casein	Gelatine
Lys	8,96	8,2	1,8	1,4	6,9	3,1	9-24	2,7
Gln						23,6	12-25	4,8
Glx	17,03	10,9	31,1	17,7	18,3			
Referenz	[Tömösközi et al., 2001]	[Darwish, 2002]	[Guerrieri, 2004]	[Guerrieri, 2004]	[Janicki et al., 1973]	[Guerrieri, 2004]	[Gennadios, 2002]	[Babel, 1996]

1.1.3 Proteine

Proteine sind Makromoleküle bestehend aus 20 in der Natur vorkommenden Aminosäuren. Diese besitzen eine Aminogruppe (-NH₂) und eine Carboxylgruppe (-COOH), welche an ein zentrales Kohlenstoffatom gebunden sind. Die Seitengruppe ist für jede Aminosäure unterschiedlich, womit deren Charakter festgelegt wird. Diese Seitengruppe kann unpolar (hydrophob), polar und ungeladen bzw. hydrophil sowie positiv oder negativ geladen (pH-Wert 7) sein. Die meisten Proteine sind aus 100-500 Aminosäuren aufgebaut. Abhängig von deren Sequenz (Primärstruktur) formt sich eine bestimmte Struktur des Proteins (Sekundärstruktur) aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen und hydrophoben Anziehungskräften sowie Disulfidbrücken entlang der Aminosäurekette. Diese können ebenfalls zu einer weiteren globulären Faltung des Proteins führen (Tertiärstruktur). Die Quartärstruktur bildet sich durch Wechselwirkungen von Proteinmolekülen untereinander. Jede dieser Proteinstrukturen kann durch verschiedene Prozesse modifiziert werden – z.B. durch Denaturierung mittels Temperatur, Druck, Bestrahlung und Säuren sowie mechanische Behandlung, Quervernetzung oder Zugabe von Salzen [Damodaran, 1997]. Diese Behandlungen werden häufig zur Herstellung von Proteinfilmen eingesetzt und ermöglichen eine Kontrolle der physikalischen und mechanischen Filmeigenschaften.

Zur Herstellung von Filmen eignen sich Proteine aus verschiedenen tierischen und pflanzlichen Quellen [Krochta, 2002].

Pflanzliche Proteine aus Getreide bestehen aus vier verschiedenen Fraktionen, den so genannten Osborne-Fraktionen [Osborne, 1909], die durch sequenzielle Extraktion des Getreidemehls in unterschiedlichen Lösungsmitteln gewonnen werden können. Albumine sind in salzfreiem Wasser leicht löslich und reich an negativ geladenen Aminosäuren. Globuline sind wasserunlöslich, jedoch in verdünnten Salzlösungen (z.B. NaCl) löslich und besitzen eine sphärische Gestalt. Prolamine, die dritte Fraktion, sind hauptsächlich die Reserveproteine aus dem Getreide und in wässrigem Alkohol löslich. Der Rückstand nach

Extraktion in Wasser, Salzlösung und wässrigem Alkohol wird Glutelin genannt. Eine Übersicht über die Verteilung der vier Fraktionen in Pflanzenproteinen ist in Tabelle 1-3 dargestellt. Weizengluten und Maiszein sind bekannte Vertreter wasserunlöslicher Proteine.

Tabelle 1-3: Übersicht der Proteinfractionen in Getreidemehlen. ¹[Owusu-Ansah and McCurdy, 1991], ²[Belitz et al., 2009]; ^a Kalkulation aus Aminosäure-Analyse, ^b Proteinrest nach Extraktion der Prolamine.

Proteinfraction	Extraktionsmittel	Gehalt im Getreidemehl [%] ^a			
		Erbse ¹	Weizen ²	Mais ²	Roggen ²
Albumine	Wasser	20-35	14,7	4,0	44,4
Globuline	Salzlösung	65-80	7,0	2,8	10,2
Prolamine	wässriger Alkohol	-	32,6	47,9	20,9
Gluteline ^b	-	-	45,7	45,3	24,5

1.1.4 Proteinfilme

Als (Protein-)Filme werden in der vorliegenden Arbeit folienähnliche Werkstoffe (Material von sehr geringer Dicke und großer Fläche) auf Basis von Proteinen bezeichnet.

Proteinfilme können bisher nur durch ein Gießverfahren hergestellt werden, bei dem das Lösungsmittel (Wasser oder wässriges Ethanol) aus der Proteinlösung verdunstet. Zunächst wird dafür das Protein im Lösungsmittel gelöst. Darauf folgen Temperaturschritte oder pH-Einstellungen, die für die verwendeten Proteine oder erwünschten Filmeigenschaften nötig sind. Eine Entgasung der Proteinlösung ist wichtig, um Blasenbildung im Endprodukt zu vermeiden. Abschließend wird die filmbildende Lösung in eine geeignete Form gegossen und das Lösungsmittel verdunstet. Die Oberfläche der Form sollte so beschaffen sein, dass ein Ablösen des Films nach der Trocknung möglich ist [Krochta, 2002].

Es wurde bereits eine Vielzahl an Proteinen, wie z.B. Kollagen, Gelatine, Molkeproteine, Maiszein, Weizengluten oder Sojaprotein, zur Herstellung von Filmen eingesetzt [Gennadios, 2004; Hernandez-Izquierdo and Krochta, 2008; Krochta and De Mulder-Johnston, 1997]. Die Filmeigenschaften sind dabei abhängig von der Zusammensetzung des verwendeten Proteins und Weichmachers sowie einer möglichen Vernetzung.

1.1.4.1 Weichmacher

Proteinfilme sind oft steif und brüchig. Die Ursache dafür liegt in den verschiedenen Wechselwirkungen der Proteinketten – elektrostatische und hydrophobe Anziehungskräfte sowie Wasserstoff- und Disulfidbrücken. Niedermolekulare Weichmacher mit hydrophilem Charakter können sich zwischen die Proteinmoleküle schieben und konkurrieren mit den Proteinketten um elektrostatische Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen. Dadurch werden die Ketten-Wechselwirkungen reduziert. Das Ergebnis der Weichmacherzugabe ist die Erhöhung des freien Volumens und einer damit verbundenen höheren Beweglichkeit der Proteinmoleküle, das Herabsetzen der Glasübergangstemperatur der Proteine und eine Erhöhung der Filmflexibilität – gekennzeichnet durch zunehmende Bruchdehnung und abnehmende Zugfestigkeit der Filme. Häufig eingesetzte Weichmacher sind dabei Glycerin, Propylenglykol, Sorbitol, Sucrose, Polyethylenglykol und Fettsäuren [Krochta, 2002].

Es wird zwischen zwei Arten von Weichmachern unterschieden: Internen und Externen. Interne Weichmacher sind kovalent mit dem Polymer verbunden und besitzen üblicherweise eine sperrige Struktur. Dadurch könnten die Proteine an der Ausbildung intermolekularer Anziehungskräfte gehindert werden. Beispiele für interne Weichmacher bei Proteinen gibt es bisher nicht. Im Gegensatz dazu sind externe Weichmacher nicht chemisch an das Protein gebunden, interagieren hingegen mit den Proteinmolekülen. Der Vorteil gegenüber inneren Weichmachern ist die große Auswahl an externen Weichmachern – je nach verlangten Filmeigenschaften [Sothornvit and Krochta, 2005].

1.1.4.2 Vernetzung der Proteine

Eine Möglichkeit zur Vernetzung von Proteinen ist die Bestrahlung. Dabei werden UV-Strahlen durch aromatische Aminosäuren, wie Tyrosin und Phenylalanin, absorbiert und die entstehenden Radikale für eine kovalente Verknüpfung in Proteinen genutzt. Mit dieser Methode konnte u.a. isoliertes Sojaprotein [Gennadios et al., 1998] und Casein [Lacroix, 1998] polymerisiert werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die chemische Quervernetzung von Proteinen mit niedermolekularen Aldehyden, wie z.B. Formaldehyd. Dabei reagiert Formaldehyd mit jeweils zwei ϵ -Aminogruppen im Protein und bildet eine Methylenbrücke [Audic and Chaufer, 2005]. Diese Methode führte u.a. bei Na-Caseinat [Audic and Chaufer, 2005] und Erbsenprotein [Gueguen et al., 1998] erfolgreich zu einer Polymerisation. Formaldehyd ist jedoch toxisch und für eine Herstellung von Proteinfilmen für den Nahrungsbereich nicht geeignet.

Die enzymatische Quervernetzung mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG, vgl. Abschnitt 1.1.2) als dritte Möglichkeit wurde u.a. für Caseinat [Bruno et al., 2008; Chambi and Grosso, 2006; Oh et al., 2004], Gelatine [Chambi and Grosso, 2006; Taylor et al., 2002], isoliertes Sojaprotein [Yildirim and Hettiarachchy, 1998] und Erbsenprotein [Marco et al., 2007] verwendet. Jedoch sind die Ergebnisse der veröffentlichten Arbeiten kritisch zu betrachten, da für die Enzymbehandlung unterschiedliche Parameter verwendet wurden. Beispielsweise variiert die Reaktionstemperatur (RT oder 50 °C) und –zeit (15 min, 4 h, über Nacht oder länger). Zum Teil wurde eine definierte MTG-Reaktion mit anschließender Inaktivierung des Enzyms bei 80 °C für 10 min durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Verfahren ist ein Vergleich der Quervernetzungseffekte nur bedingt möglich. Ein standardisiertes Verfahren ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Eine Quervernetzung von Kartoffelprotein mittels MTG konnte bisher nicht nachgewiesen werden [Darwish, 2002].

1.1.4.3 Eigenschaften

Für die mechanische Charakterisierung von Proteinfilmen werden im Allgemeinen Zugfestigkeit (ZF, maximale Zugkraft pro Film-Querschnittsfläche) und Bruchdehnung (BD, maximale Längenänderung) gemessen. Dabei existieren in der Literatur keine einheitlichen Messbedingungen – Probenbreite und Einspannlänge (= Messlänge) für den Zugversuch sind unterschiedlich. So wurden Probendimensionen (Breite x Messlänge) von beispielsweise 20 x 20 mm [Oh et al., 2004], 25,4 x 50 mm [Chambi and Grosso, 2006] oder 10 x 90 mm [Di Pierro et al., 2006; Mariniello et al., 2003] verwendet, was einen Vergleich

der Ergebnisse untereinander erschwert. In jedem Fall jedoch wurde eine Konditionierung der Proben bei Normklima (23 ± 2 °C und 50 ± 3 % relative Luftfeuchte) vor der mechanischen Untersuchung durchgeführt.

Gewöhnlich besitzen Proteinfilme im Vergleich zu synthetischen Filmen eine geringere ZF und BD [Krochta, 2002]. Weichmacher haben einen bedeutenden Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Proteinfilme. Eine zunehmende Weichmacherkonzentration führt zu einer Reduktion der ZF und einer Erhöhung der BD [Audic and Chaufer, 2005; Sánchez et al., 1998]. Zudem reagieren Proteinfilme sehr sensitiv auf Feuchtigkeit. Bei hoher relativer Luftfeuchte (rLF) ist die ZF der Filme niedriger als bei geringer rLF, da absorbierte Feuchtigkeit im Film wie ein Weichmacher wirkt [Audic and Chaufer, 2005]. Die Temperatur ist ein weiterer Einflussfaktor auf die mechanischen Eigenschaften. Mit zunehmender Temperatur sinkt die ZF der Filme drastisch [Kim et al., 2002; Miller et al., 1997].

Die Kinetik des biologischen Abbaus ist abhängig vom Protein (Molekulargewicht, Struktur, Reinheit) und den verwendeten Additiven (z.B. Weichmacher, Füllstoffe). Auf Protein basierende Materialien sind vollständig biologisch abbaubar und nicht umweltschädlich [Guilbert and Gontard, 2005]. Dies wurde u.a. am Beispiel von mittels Strahlung vernetzten Caseinat-Filmen nachgewiesen [Mezgheni et al., 1998]. Eine Einstellung der Abbaurate in Bezug auf bestimmte Anwendungen durch Änderung der Zusammensetzungen oder chemische Modifikationen wurde bisher ebenso wenig untersucht wie eine mögliche Düngewirkung.

1.2 Zielsetzung

Aufgrund steigender Rohölpreise und fortschreitender Umweltverschmutzung gewinnen nachwachsende Rohstoffe und deren Anwendung u.a. zur Herstellung von Biokunststoffen immer mehr an Bedeutung. Ihre weitgehende CO₂-Neutralität und biologische Abbaubarkeit sowie die thermische Verwertung zu klimafreundlicher Energie sind wesentliche Vorteile gegenüber fossilen Rohstoffen. Biokunststofffilme könnten in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden. Beispielsweise in der Landwirtschaft (u.a. als Mulchfilme) oder als Lebensmittelverpackungen wäre ihre biologische Abbaubarkeit von großem Nutzen.

Einige nachwachsende Rohstoffe, wie Stärke und Zucker, werden bereits vielseitig eingesetzt. Proteine, die bei der Stärke- und Biodieselherstellung als Koppelprodukte anfallen, werden bisher nicht als Ausgangsmaterialien für Biokunststoffe genutzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Potential dieser Proteine auf pflanzlicher Basis für eine Filmherstellung zu untersuchen. Die tierischen Proteine Na-Caseinat und Gelatine wurden ebenfalls verwendet, da deren Ergebnisse aus der Literatur aufgrund verschiedener Zusammensetzungen, Herstellungsverfahren sowie Messbedingungen nur begrenzt vergleichbar sind. Zudem bestehen sie im Gegensatz zu pflanzlichen Proteinen nicht aus einem komplexen Proteingemisch und wurden daher zum Vergleich herangezogen.

Die Proteinfilm sollten hinsichtlich einer Anwendung in der Landwirtschaft z.B. als Mulchfilme charakterisiert werden:

- Mechanische Stabilität gegenüber einachsiger und biaxialer Beanspruchung und nach Schädigung
- Abbaubarkeit im Boden
- Pflanzenverträglichkeit und Düngeeffekt
- Löslichkeit in Wasser
- Beständigkeit gegenüber Bewitterung

Im Vordergrund stand dabei eine enzymatische Quervernetzung der verwendeten Proteine mit Hilfe der mikrobiellen Transglutaminase, deren Einfluss auf die Filmeigenschaften untersucht werden sollte. Zur Herstellung sollte ein DIN-gerechtes Verfahren entwickelt und ein Vergleich mit Literaturdaten durchgeführt werden. Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Filmeigenschaften durch Additive oder veränderte Ausgangsstoffe für spätere Anwendungen zu optimieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr. / Lot.-Nr.	Reinheit [%]	M _w [g/mol]
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6752.5	99,7 p.a.	60,10
Ammoniumperoxo- disulfat (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	98	228,20
A-PEG (Methoxypoly- ethylenglykolamin)	Sigma Aldrich (Steinheim)	07964 06679		750 5000
Bienenwachs	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5825.2		
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A512.1		691,90
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P740.2	99 p.a.	236,15
Coomassie Brillant Blau G 250	Merck KGaA (Darmstadt)	1.15444.0025		854,02
Di-A-PEG (O,O'-Bis(3- aminopropyl)polyethylene glycol)	Sigma Aldrich (Steinheim)	14535		1500
Di-Glycerin	SOLVAY Chemical GmbH (Rheinberg)	PDS-2820-0007 / RBA071022A	90,75	M _w 169
di-Natriumhydrogen- phosphat-2-hydrat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4984.3	99,5 p.a.	177,99
Dipeptid Glutaminylglycin (Z-Gln-Gly)	Bachem Distribution Service GmbH (Weil am Rhein)	C-1635		337,33
Eisen(III)-chlorid (FeCl ₃)	Merck KGaA (Darmstadt)	803945		162,21
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3738.5	100	60,05
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5054.6	95	46,07
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4979.1	37	30,03
Glutathion (reduziert)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04090.0005	98 %	307,33
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3783.2	99,5 p.a.	92,10

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr. / Lot.-Nr.	Reinheit [%]	M _w [g/mol]
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T873.2	98,5	75,07
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2317.1	99,5 p.a.	60,06
Kaliumnatriumtartrat-4-hydrat (C ₄ H ₄ O ₆ NaK)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8087.1	99 p.a.	282,22
Maltodextrin (aus Maisstärke)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	31410		
Methanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7342.1	HPLC Grade	32,04
Mikrobielle Transglutaminase (TG Activa [®] WM)	Ajinomoto Co., Inc. (Hamburg)			38000
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K305.1	99	65,01
Na-Bicinchoninsäure (BCA)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	14339	99	388,29
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A135.2	99,8 p.a.	105,99
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën (Seelze)	4269 / 23220		156,01
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.06329.0500		84,01
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6771.1	99 p.a.	39,997
Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P034.2	99,5 p.a.	248,18
PEG 300	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	90878		285-315
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6366.2	85	98,00
Poly-Glycerin	SOLVAY Chemical GmbH (Rheinberg)	PDS-2810-0006 / RBA071113A	di: 25,7 tri: 47,8 tetra: 18,3 penta: 5,4 hexa: 2,7	M _w 250
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4625.2	37 p.a.	36,46
SDS-Lösung	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	1057.1	20	288,40
Silbernitrat (AgNO ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7908.1	99,9 p.a.	169,88
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8789.2	99 p.a.	163,39
Tris	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4855.4	99,9 p.a.	121,14

2.1.2 Geräte

Sämtliche verwendete Geräte sind in Tabelle 2-2 zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Bügelmessschraube		Vogel Germany (Kevelaer)
Elektrophorese-Apparatur	Hoefler SE 250	Hoefler, Inc. (Holliston, MA/USA)
Exsikkator	BOLA-Maxi	Rettberg GmbH (Göttingen)
Fluorimeter	Fluostar Galaxy	BMG Labtech GmbH (Offenburg)
Inkubationsschüttler	Innova 4230	New Brunswick Scientific Co., Inc. (Edison, NJ/USA)
Lichtmikroskop	Axioskop	Zeiss
Magnetrührer		Heidolph (Kelheim)
Materialprüfmaschine	BDO-FB0.5TH	Zwick GmbH & Co.KG (Ulm)
Materialprüfmaschine	Zwicki 1120	Zwick GmbH & Co.KG (Ulm)
Materialprüfmaschine	Fallwerk Fractovis	Ceast GmbH (Martinsried)
pH-Meter	Inolab pH-730	WTW (Weilheim)
Photometer		Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Pipetten		Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock mit	Thermostat plus	Eppendorf AG (Hamburg)
Trockenschrank		Memmert GmbH (Schwabach)
Waagen		Sartorius (Göttingen)
Zentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge	Hermle ZK 630	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifuge	Avanti™ J-30I	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)
Zentrifugenrotor	F45-24-11	Eppendorf AG (Hamburg)
Zentrifugenrotor	JA-30.50 Ti	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

2.1.3 Proteine

Sämtliche verwendete Proteine sind in Tabelle 2-3 zusammengestellt.

Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Proteine.

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr.	Charge	Reinheit	Notiz
Natrium-Caseinat	Rovita GmbH (Engelsberg)	0222	L161 107 001	>88 %	
N,N-Dimethylcasein	Fluka Chemie GmbH (Buchs, CH)	39890	424040/2 33702		
Gelatine (300 Bloom)	Gelita AG (Eberbach)		325 407		
Gelatine (280 Bloom)	Gelita AG (Eberbach)		623 589		
Gelatine (mittlerer Geliergrad)	Gelita AG (Eberbach)		319 279		
Gelatine (niedriger Geliergrad)	Gelita AG (Eberbach)		319 272		
Gelatineplatten	Gelita AG (Eberbach)		319 342		

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr.	Charge	Reinheit	Notiz
Erbсенprotein (Fraktion N°1)	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)		013634	80 %	Löslichkeit: ~70 %
Erbсенprotein (Fraktion N°2)	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)		013635	85 %	
Erbсенprotein F8192 (Fraktion N°3)	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)		8787	k.A.	Löslichkeit: ~40 %
Kartoffelprotein	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)		013633	60 %	
Rapsprotein	Valuepacer GmbH, Dr. Jensen			k.A.	
Roggenprotein	Valuepacer GmbH, Dr. Jensen			k.A.	
Weizenprotein (Glutival 21040)	Cerestar Deutschland GmbH (Barby)	21040		75 %	
Maisprotein (Concentra® P 13882)	Cerestar Deutschland GmbH (Barby)	13882		58 %	

Die Erbсенproteine wurden von der Firma Emsland-Stärke GmbH zur Verfügung gestellt und lagen in Form von weißem - leicht gelblichem Pulver vor. Zur Gewinnung der Proteine wurde Erbсенmehl in Wasser quellen gelassen und anschließend zentrifugiert. Der Überstand (Ü1) wurde entnommen. Das Pellet wurde erneut in Wasser extrahiert und noch einmal zentrifugiert. Der Überstand (Ü2) wurde entnommen und mit Ü1 vereinigt. Die Weiterbehandlung des Überstandes war unterschiedlich und führte zu drei verschiedenen Fraktionen [Lotz, M. (2008) Fa. Emsland-Stärke GmbH, persönliche Information].

Für Fraktion N°1 wurde der Überstand auf einen pH-Wert von 5 titriert und anschließend durch eine Membran (Poren-Ø = 50 kDa) ultrafiltriert und aufkonzentriert. Das Permeat wurde durch Sprühtrocknung pulverisiert. Dieses Protein stand nur in geringen Mengen zur Verfügung.

Für Fraktion N°2 wurde der Überstand bei 60 °C mit Säure auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt (isoelektrischer Punkt). Dabei koagulierte und präzipitierte das Protein. Die Löslichkeit des koagulierten Proteins lag laut Hersteller bei maximal 45 %. Dieses Protein stand in hohen Mengen zur Verfügung.

Für Fraktion N°3 wurde der Überstand bei 60 °C mit Säure auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt (isoelektrischer Punkt). Dabei koagulierte und präzipitierte das Protein. Nach der Koagulation wurde der pH-Wert auf 7 titriert und das Protein mittels Sprühtrocknung pulverisiert. Die Löslichkeit des Proteins lag laut Hersteller bei ca. 70 %. Dieses Protein stand in höheren Mengen zur Verfügung.

Weizen- und Maisprotein wurden von der Firma Cerestar Deutschland GmbH zur Verfügung gestellt. Das Weizenprotein bestand dabei aus der vom Weizenmehl nassmüllerisch abgetrennten wasserunlöslichen Proteinfraction und lag in Form eines cremefarbenen Pulvers vor. Das Maisprotein bestand aus der bei der Maisstärkegewinnung abgetrennten Maiskleberfraction und lag als gelbes - orangefarbenes Granulat vor.

2.1.4 Puffer

Sämtliche verwendete Puffer sind in Tabelle 2-4 zusammengestellt.

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Molarität [mM]	pH	Einwaage für 1 L [g]	Bemerkungen zur Herstellung
Tris/HCl-Puffer	5	6, 7, 8	0,606	Jeweilige Menge an Tris wurde in 800 mL dH ₂ O gelöst, der pH mit 4 M HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
	10	6, 7, 8	1,211	
	20	6, 7, 8	2,422	
	50	6, 7, 8, 9	6,055	
	100	6, 7, 8	12,110	
Na-Phosphatpuffer (*NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, **Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	5	6, 7, 8	0,78* / 0,89**	Jeweilige Salzmenge wurde separat in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt. Mit **-Lösung wurde der pH-Wert der *-Lösung eingestellt.
	10	6, 7, 8	1,56* / 1,78**	
	20	6, 7, 8	3,12* / 3,56**	
	50	6, 7, 8	7,8* / 8,9**	
	100	6, 7, 8	15,6* / 17,8**	

2.2 Analytik

2.2.1 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

Ein schneller und zuverlässiger Test zur Bestimmung der MTG-Aktivität ist der colorimetrische Hydroxamat-Test [Folk and Cole, 1966b]. Z-Gln-Gly dient hierbei als Glutamin-Substrat, das von der MTG mit Hydroxylamin zu Z- γ -Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisen bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann (Abbildung 2-1).

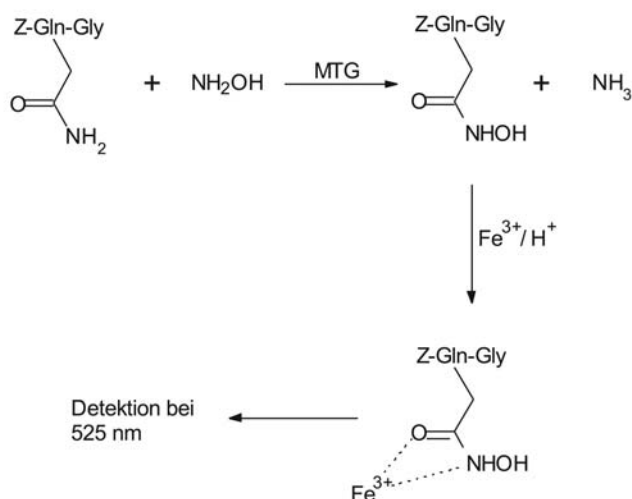


Abbildung 2-1: Prinzip des Hydroxamat-Tests zur Bestimmung der MTG-Aktivität.

Für den Test wurden die Substrat- und Stopplösung mit den wie in Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6 beschriebenen Konzentrationen hergestellt. Für die Substratlösung wurden 5 g dH₂O vorgelegt. Nach Tris-Zugabe wurden 400 μ L 1 M Essigsäure zugesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren Bestandteile, die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M Essigsäure auf 6 und das Auffüllen mit dH₂O auf 10 g.

Tabelle 2-5: Zusammensetzung der Substratlösung für den Hydroxamat-Test.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage für 10 g [g]
0,20 M Tris-Acetat	121,14	0,3028
0,10 M Hydroxylamin	69,50	0,0869
0,01 M reduziertes Glutathion	307,33	0,0384
0,03 M Z-Gln-Gly	337,30	0,1265

Tabelle 2-6: Zusammensetzung der Stopplösung für den Hydroxamat-Test. Die drei Lösungen wurden zu gleichen Teilen und in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Reihenfolge
12 % Trichloressigsäure	163,46	1
5 % FeCl ₃ x 6 H ₂ O (in 0,1 M HCl)	270,32	2
3 M HCl	36,46	3

Die MTG-Aktivität lässt sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnen (vgl. Formel 1). Dabei ist eine Unit definiert als Bildung von 1 μmol γ -Glutaminyl-Hydroxamat pro Minute bei 37 °C und einem pH-Wert von 6.

$$\text{MTG – Aktivität} \left[\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right] = \frac{(E \cdot V_{\text{test}})}{(\epsilon \cdot t_{\text{reakt}} \cdot d \cdot V_{\text{MTG}})} \quad (1)$$

mit	E	Extinktion [-]
	V_{test}	Gesamtvolumen [mL]
	V_{MTG}	Enzymvolumen [mL]
	ϵ	Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$]
	t_{reakt}	Reaktionszeit [min]
	d	Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit in der Küvette [cm]

2.2.1.1 Durchführung in 1,5 mL Reaktionsgefäßen

600 μL Substratlösung und 50 μL Additive wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Wurden keine Additive verwendet, wurden stattdessen 50 μL dH_2O zugesetzt. Mit Zugabe von 100 μL Enzymlösung wurde die Reaktion gestartet und nach 10 min bei 37 °C mit 750 μL Stopplösung abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wurde danach 2 min bei 16100xg zentrifugiert und vom Überstand die Extinktion bei 525 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Der Blindwert enthielt 100 μL des jeweiligen Puffers ohne Enzym.

Für die Messung der MTG-Aktivität in 1,5 mL Reaktionsgefäßen wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichem γ -Glutaminyl-Hydroxamat (0-10 mM) bei einer Wellenlänge von 525 nm und einem Volumen von 1,5 mL ein molarer Extinktionskoeffizient von 0,4995 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ermittelt.

2.2.1.2 Durchführung in Mikrotiterplatten

Die Bestimmung der MTG-Aktivität in Mikrotiterplatten ermöglicht die Einsparung von Reagenzien und eine Messung von bis zu 96 Proben parallel. 130 μL Substratlösung und 10 μL Additive wurden je Well pipettiert und 3 min bei 37 °C vorinkubiert. Wurden keine Additive verwendet, wurden stattdessen 10 μL dH_2O zugesetzt. Das Enzymvolumen betrug 10 μL . Die Reaktion wurde nach 10 min bei 37 °C mit 150 μL Stopplösung abgebrochen. Nach Zentrifugation der Mikrotiterplatte für 2 min bei 2050xg wurden 200 μL des Überstandes in eine zweite Mikrotiterplatte übertragen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 525 nm je Well in einem Fluorimeter (Fluostar Galaxy, BMG Labtech GmbH, Offenburg). Als Blindwert diente ein Reaktionsansatz mit 10 μL des jeweiligen Puffers ohne Enzym.

Für die Messung der MTG-Aktivität in Mikrotiterplatten wurde mit Hilfe von kommerziell erhältlichem γ -Glutaminyl-Hydroxamat (0-15 mM) bei einer Wellenlänge von 525 nm und einem Volumen von 200 μL ein molarer Extinktionskoeffizient von 0,1368 $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ermittelt.

2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem BCA-Test nach Smith et al. gemessen [Smith et al., 1985]. Protein bildet mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+} -Ionen des Komplexes werden zu Cu^+ -Ionen reduziert, die mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bilden. Der lineare Bereich für den BCA-Test liegt zwischen 5 und 500 μg Protein / mL. Für den Test wurden 50 μL Proteinlösung mit 1 mL Reagenz C (Zusammensetzung und Herstellung siehe Tabelle 2-7) versetzt, gut gemischt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung in Eiswasser und Konditionierung aller Proben auf RT wurde die Extinktion bei 562 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde Rinderserum Albumin (BSA) eingesetzt.

Tabelle 2-7: Reagenzien zur Durchführung des BCA-Tests.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Reagenz A	1 g/L Na-Bicinchoninsäure (BCA) 17 g/L Na_2CO_3 1,96 g/L $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{NaK} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ 4 g/L NaOH 9,5 g/L NaHCO_3 pH 11,25	Substanzen in 800 mL dH_2O gelöst, pH-Wert eingestellt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
Reagenz B	40 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	Substanz in 800 mL dH_2O gelöst und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
Reagenz C	20 mL Reagenz A 0,4 mL Reagenz B	Lösung wurde täglich frisch angesetzt.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für einen Nachweis der Quervernetzungsreaktion durch MTG und zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die SDS-PAGE nach Laemmli eingesetzt [Laemmli, 1970]. Alle verwendeten Lösungen für die SDS-PAGE sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.

Die Gele für die SDS-PAGE bestanden aus je einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2-8 dargestellt. Die zu trennenden Proben wurden, falls nicht anders angegeben, 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Es wurden 10 μL Probe und 5 μL Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in zwei Stufen durchgeführt (1. Stufe: 300 V, 80 mA, 6 min; 2. Stufe: 300 V, 60 mA, 40 min).

Tabelle 2-8: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele (1 mm Dicke).

	2 Trenngele 12,5 % T	2 Sammelgele 4,5 % T
Gelpuffer	2,5 mL	1,25 mL
Acrylamid/ Bisacrylamid	4,2 mL	0,75 mL
dH_2O	3,3 mL	3,00 mL
TEMED	10 μL	10 μL
gesättigtes APS	20 μL	8 μL

Tabelle 2-9: Reagenzien zur Durchführung der SDS-PAGE.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Trenngelpuffer	181,8 g/L Tris, 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung, pH 8,8	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Sammelgelpuffer	60,6 g/L Tris, 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung, pH 6,8	Substanzen in 700 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Acryl/Bisacrylamid-Lösung (30 %ig)	291 g/L Acrylamid, 9 g/L Bisacrylamid	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
APS-Lösung (gesättigt)	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	In einem Reaktionsgefäß dH ₂ O vorgelegt und eine entsprechende Menge APS hinzugefügt bis sich keine Kristalle mehr lösten.
Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g/L Tris, 144 g/L Glycin, 50 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 1 mL 10 % (w/v) NaN ₃ -Lösung	Substanzen in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
SDS-Probenpuffer	27,2 g/L Tris, 30 mL HCl (3 M), 250 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung, 500 mg Bromphenolblau, 500 g Glycerin, pH 6,8	Substanzen in etwas dH ₂ O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurden 10 µL Mercaptoethanol pro mL SDS-Probenpuffer zugesetzt.

2.2.3.1 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mittels Coomassie

Die SDS-PAGE-Gele wurden über Nacht in Färbelösung auf dem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt (Wechsel der Lösung nach 30 min). Nach 30 min Spülen mit dH₂O wurden die Gele für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert. Die Gele wurden luftblasenfrei zwischen zwei benetzte Cellophanfolien eingespannt und für 2 d bei RT getrocknet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-10 zusammengefasst.

Tabelle 2-10: Reagenzien zur Durchführung der Coomassie-Färbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Färbelösung	1 g Coomassie Brillant Blau G 250, 20 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie Brillant Blau in 700 mL dH ₂ O unter Rühren gelöst, danach Zugabe der Lösungen.
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol, 10 % (v/v) Essigsäure	Lösungen gemischt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Geltrocknerlösung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Glycerin	Substanzen in 500 mL dH ₂ O gemischt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.

2.2.3.2 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mittels Silber

Um eine sensitivere Färbung der SDS-PAGE-Gele zu erlangen, wurde die Silberfärbung nach Blum eingesetzt [Blum et al., 1987]. Die Sensitivität dieser Färbemethode ist gegenüber der Coomassie-Färbung um den Faktor 100-1000 erhöht. Nachteilig wirken sich die lange Dauer, die zahlreichen Inkubationsschritte und die hohen Anforderungen an die Sauberkeit aus. Die genaue Durchführung ist zur besseren Übersicht in Tabelle 2-11 dargestellt.

Tabelle 2-11: Protokoll zur Durchführung der Silberfärbung nach Blum [Blum et al., 1987]. Pro Gel wurden 100 mL Lösung verwendet. Lösungen zum Sensitivieren, Färben und Entwickeln wurden kurz vor Verwendung frisch hergestellt.

Schritt	Lösung	Zeit / Dauer
1. Fixieren	500 mL Methanol 120 mL Essigsäure (100 %) 0,5 mL Formaldehyd (37 %) mit dH ₂ O auf 1000 mL aufgefüllt	über Nacht
2. Waschen	50 % (v/v) Ethanol	3 x 20 min
3. Sensitivieren	0,2 g/L Na ₂ S ₂ O ₃	1 min
4. Waschen	ddH ₂ O	3 x 20 s
5. Färben	0,4 g AgNO ₃ 150 µL Formaldehyd (37 %) mit dH ₂ O auf 200 mL aufgefüllt	30 min
6. Waschen	ddH ₂ O	2 x 20 s
7. Entwickeln	12 g Na ₂ CO ₃ 100 µL Formaldehyd (37 %) 4 mL Na ₂ S ₂ O ₃ -Lösung [0,2 g/L] mit dH ₂ O auf 200 mL aufgefüllt	Bis gewünschte Färbung erreicht wurde. (3-5 min)
8. Stoppen	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	10 min
9. Waschen	50 % (v/v) Methanol	kurz (~1 min)

Um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden, erfolgte die Herstellung aller Lösungen mit mehrfach deionisiertem Wasser und Methanol in HPLC Qualität. Alu- und Glasplatten, Spacer sowie Käbme wurden zur Herstellung der Gele vor Verwendung mit Ethanol gereinigt. Des Weiteren wurden die Lösungen zum Sensitivieren, Färben und Entwickeln frisch hergestellt, um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Nach den genannten Schritten wurden die Gele in 50 % (v/v) Methanol aufbewahrt oder wie die Gele der Coomassie-Färbung getrocknet (vgl. Abschnitt 2.2.3.1).

2.2.4 Mechanische Prüfung

2.2.4.1 Zugversuch

Die Messung der Zugeigenschaften von Proteinfilmern erfolgte an einer Zwick Materialprüfmaschine des Typs BDO-FB0.5TH (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm) angelehnt an die Norm DIN EN ISO 527-3. Dafür wurden Probestreifen (15 x 150 mm, Abbildung 2-2) mit Hilfe eines Rollenschneiders aus einem Proteinfilm herausgeschnitten und zwischen pneumatischen Einspannklemmen fixiert. Die Einspannlänge wurde dabei auf 100 mm eingestellt. Die Vorkraft zur Ausrichtung der Probe betrug 0,1 N. Die Prüfgeschwindigkeit zur

Bestimmung des Zugmoduls betrug 1 mm/min. Der Zugmodul wurde im Dehnungsbereich von 0,05-0,25 % gemessen. Bei Erreichen von 0,25 % Dehnung wurde die Prüfgeschwindigkeit auf 50 mm/min erhöht. Die Prüfung wurde bis zum Bruch des Probestreifens durchgeführt und es erfolgte dabei die Aufzeichnung der Spannungs-Dehnungs-Kurve. Zur Auswertung des Zugversuches wurde die Software TestXpert II Version 1.42 verwendet. Es wurden die Zugfestigkeit σ_M (vgl. Formel 2) und die Bruchdehnung ϵ_B (vgl. Formel 3) ermittelt.

$$\sigma_M = \frac{F_M}{A} \quad (2)$$

mit σ_M Zugfestigkeit [N/mm²]
 F_M Maximalkraft [N]
 A Querschnittsfläche der Probe [mm²]

$$\epsilon_B = \frac{\Delta L}{L_0} \cdot 100 \quad (3)$$

mit ϵ_B Bruchdehnung [%]
 ΔL Längenänderung bis Bruch [mm]
 L_0 Einspannlänge = Anfangsabstand der Einspannklemmen [mm]

Die Bruchdehnung ist ein relativer Wert – 100 % entsprechen dabei einer Verdopplung der Länge des Probekörpers (von 100 mm Einspannlänge auf 200 mm) bevor er reißt.

In der vorliegenden Arbeit bedeutet für Proteinfilme eine hohe Zugfestigkeit mindestens 5 N/mm² und eine hohe Bruchdehnung mindestens 100 %.

Der Zugversuch wurde bei 23±2 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) in einem Exsikkator konditioniert. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus mindestens fünf Probestreifen ± Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Standardabweichung betrug 2-10 %.

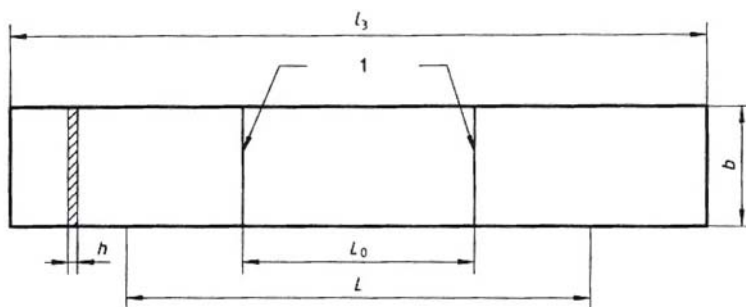


Abbildung 2-2: Probekörper Typ 2 zur Bestimmung der Zugeigenschaften von Folien. Aus DIN EN ISO 527-3 [DIN, 1995]. 1...Messmarken; b...Probenbreite 10-25 mm; h...Probekörperdicke ≤ 1 mm; L₀...Messlänge 50±0,5 mm; L...Anfangsabstand der Einspannklemmen 100±5 mm; l₃...Gesamtlänge ≥ 150 mm.

2.2.4.2 Weiterreißversuch

Der Weiterreißversuch wurde an einer Zwick Materialprüfmaschine des Typs Zwicki 1120 (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm) angelehnt an DIN 53363 durchgeführt. Dafür wurden die Proben aus einem Proteinfilm mit Hilfe einer Schablone analog zu Abbildung 2-3 herausgeschnitten und mit einem definierten Einschnitt versehen. Es wurde eine Einspannlänge von 50 mm und eine Prüfgeschwindigkeit von 100 mm/min verwendet. Die Backeneinsätze bestanden aus einem Vulkolanbelag. Die Vorkraft zur Ausrichtung der Probe betrug 0,1 N. Die Prüfung wurde bis zum vollständigen Durchreißen der Probe durchgeführt, es erfolgte dabei die Aufzeichnung der Kraft-Weg-Kurve. Zur Auswertung des Zugversuches wurde die Software TestXpert I verwendet. Die Höchstkraft F_M [N] wurde ermittelt und daraus der Weiterreißwiderstand W_R [N/mm] berechnet (Quotient aus Höchstkraft F_M und Probendicke).

Der Weiterreißversuch wurde bei 23 ± 2 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung 48 h bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) in einem Exsikkator konditioniert. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus fünf Proben \pm Standardabweichung als Fehlerbalken.

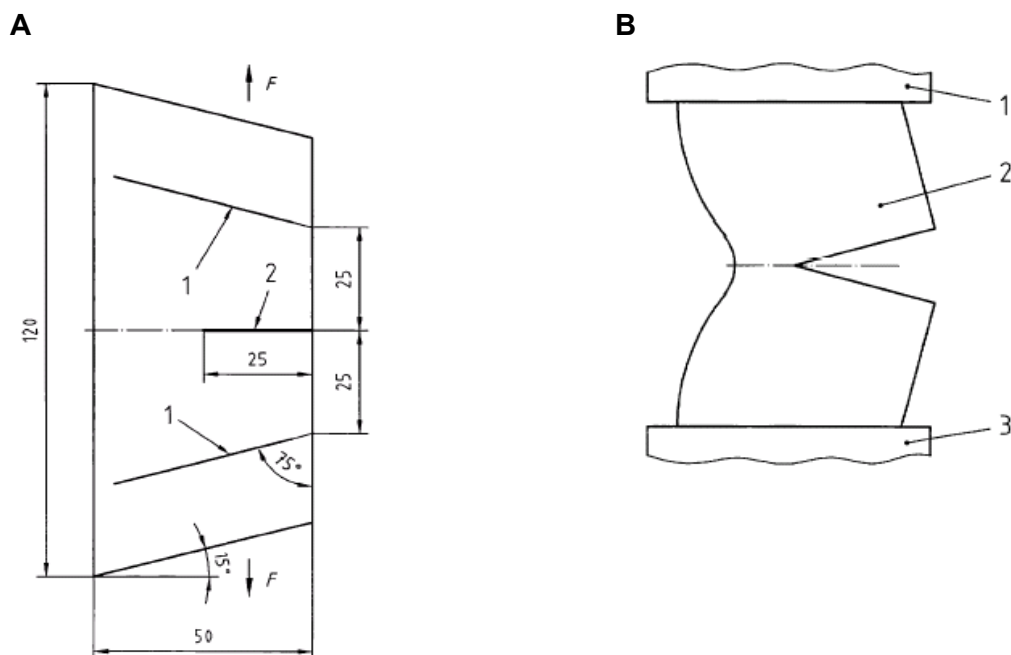


Abbildung 2-3: Probekörper zur Bestimmung des Weiterreißwiderstandes. A, Dimensionen der Probe. 1...Marken für Einspannklemmen, 2...Einschnitt, F...Zugkraft. Alle Längenangaben in mm. B, Eingespannte Probe vor dem Versuch. 1...Obere Einspannklemme, 2...Probe, 3...Untere Einspannklemme. Aus DIN 53363 [DIN, 2003a].

2.2.4.3 Durchstoßversuch

Der Durchstoßversuch wurde an einem Fallwerk Fractovis (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm) angelehnt an DIN EN ISO 6603-2 durchgeführt. Dafür wurden 60 x 60 mm Proben aus einem Proteinfilm herausgeschnitten, in einer Einspannvorrichtung fixiert und mit einem Fallbolzen durchstoßen (Abbildung 2-4). Das Gewicht des Fallbolzens betrug 1,89 kg. Es wurden eine Fallhöhe von 0,99 m und eine Fallgeschwindigkeit von 4,4 m/s verwendet. Die potentielle Energie des Fallbolzens betrug 18,3 J. Auf eine Schmierung des Fallbolzens wurde

verzichtet, da eine mögliche Auswirkung des Schmiermittels auf die Proteinfilme bisher nicht untersucht wurde. Aufgrund eines geringen Widerstandes ist für Proteinfilme eine Schmierung nicht erforderlich, wohingegen dies bei dicken Platten und Material mit erheblicher plastischer Verformung wichtig ist.

Während der Prüfung erfolgte die Aufzeichnung der Kraft-Verformungs-Kurve. Zur Auswertung des Durchstoßversuches wurde die Software Das4Win verwendet. Es wurden die Schädigungskraft F_M [N] und die Schädigungsverformung l_M [mm] ermittelt, die den ersten Anriss der Probe repräsentieren. Die Fläche unterhalb der Kraft-Verformungs-Kurve bis zu F_M entspricht dabei der bis zum ersten Anriss verbrauchten Energie E_M [J] und wird Schädigungsenergie genannt. Des Weiteren wurde die Schädigungsart (zu entnehmen aus DIN EN ISO 6603-2) der Probe nach Durchstoß bewertet.

Der Durchstoßversuch wurde bei 23 ± 2 °C durchgeführt, die Proben vor der Messung 48 h bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) in einem Exsikkator konditioniert. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus fünf Proben \pm Standardabweichung als Fehlerbalken.

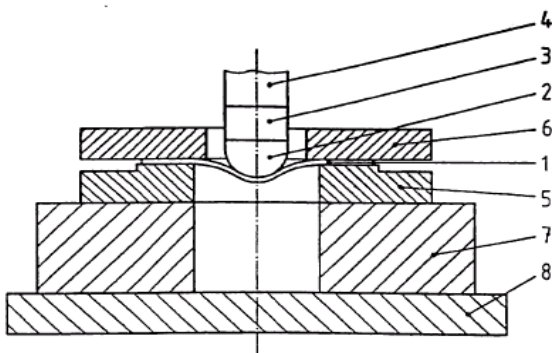


Abbildung 2-4: Beispiel einer Prüfeinrichtung. 1...Probekörper, 2...Stoßkörper mit halb-kugelförmiger Spitze, 3...Kraftmessdose, 4...Schaft, 5...Probekörperauflage, 6...Einspannung, 7...Grundplatte, 8...Schalldämmung. Aus DIN EN ISO 6603-2 [DIN, 2002].

2.2.5 Löslichkeit

2.2.5.1 Löslichkeit von Proteinfilmen in Wasser

Die Durchführung zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit der Proteinfilme ist in Abbildung 2-5 dargestellt. Dafür wurde eine Filmprobe (10 x 50 mm) in einem Reaktionsgefäß mit 10 mL dH₂O (30 °C) für 10 min bei 30 °C geschüttelt und anschließend die Lösung vom Filmrest durch Zentrifugation (5 min, 2000xg, RT) getrennt. Lösung und Filmrest wurden bei 70 °C getrocknet. Zuvor wurde von der Lösung die Proteinkonzentration (vgl. Abschnitt 2.2.2) bestimmt. Der Proteinverlust (Δ Protein, vgl. Formel 4) des Films errechnete sich aus der Proteinmenge in der Lösung. Die Gewichtsdiﬀerenz zwischen dem trockenen Filmrest nach dem Löslichkeitstest und dem Trockengewicht der Ausgangsprobe entspricht dem Gewichtsverlust (Δ Gewicht, vgl. Formel 5) des Films.

$$\Delta\text{Protein} = \frac{c_{\text{Lsg.}} \cdot V_{\text{Lsg.}}}{m_{\text{Protein}}} \cdot 100 \quad (4)$$

mit	$\Delta\text{Protein}$	Proteinverlust des Films [%]
	$c_{\text{Lsg.}}$	Proteinkonzentration der Lösung (nach Test) [mg/mL]
	$V_{\text{Lsg.}}$	Volumen der Lösung (nach Test) [mL]
	m_{Protein}	Proteinmenge in Ausgangsprobe [mg]

$$\Delta\text{Gewicht} = \frac{m_{\text{Film}} - m_{\text{Rest}}}{m_{\text{Film}}} \cdot 100 \quad (5)$$

mit	$\Delta\text{Gewicht}$	Gewichtsverlust des Films [%]
	m_{Film}	Trockengewicht der Ausgangsprobe [mg]
	m_{Rest}	Trockengewicht des Filmrestes (nach Test) [mg]

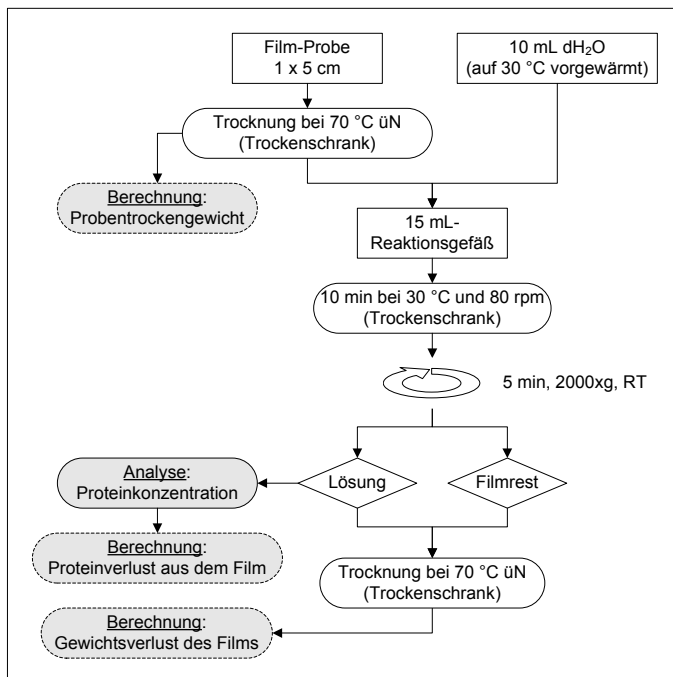


Abbildung 2-5: Durchführung zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Proteinfilmen. üN...über Nacht, dH₂O...deionisiertes Wasser, RT...Raumtemperatur.

2.2.5.2 Bestimmung des löslichen Proteins

Die Durchführung zur Bestimmung des löslichen Proteinanteils ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Dafür wurden 6 g Proteinpulver in 110,4 g Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei 90 °C gelöst, auf RT heruntergekühlt und auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 16100xg (RT) wurde das Pellet vom Überstand abgetrennt, beides bei 70 °C für 48 h getrocknet und anschließend das Gewicht bestimmt. Der Gewichtsanteil im Pellet repräsentiert den unlöslichen und das Gewicht des Überstandes den löslichen Proteinanteil des Ausgangspulvers.

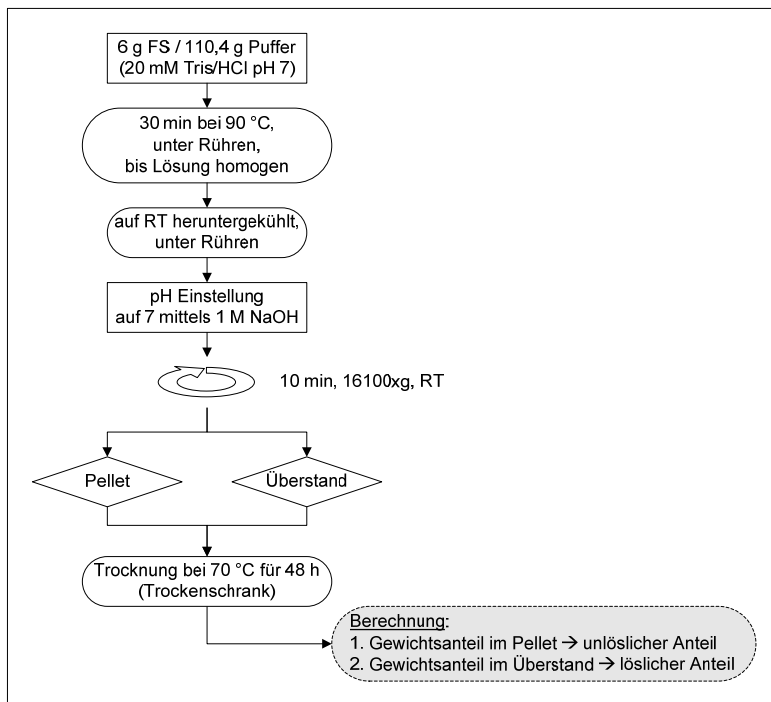


Abbildung 2-6: Durchführung zur Bestimmung des löslichen Proteinanteils. FS...Feststoff, RT...Raumtemperatur.

2.2.5.3 Bewitterungstest zur Untersuchung der Regenbeständigkeit

Zur Untersuchung der Regenwasserbeständigkeit von Proteinfilmen wurde ein Bewitterungstest im Gewächshaus etabliert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 2-7 A dargestellt. Auf einem Tisch wurden zwei parallele Reihen von insgesamt 22 Wasserspinnen mit je vier Tropfern (Abbildung 2-7 B) montiert. Die Tropfer jeder Wasserspinne wurden so ausgerichtet, dass sie die darunter platzierten Proteinfilme (zwei Tropfer je Filmprobe) gleichmäßig über die Filmfläche verteilt beregneten. Die Distanz zwischen Tropfer und Probenoberfläche betrug 30 cm. Die Tropfer waren durch Kapillarschläuche an ein Hauptrohr angeschlossen – somit konnte eine über alle Tropfer gleichmäßige Flussrate eingestellt werden. Das Abwasser wurde in einem Becken gesammelt und zu einem Abfluss geleitet.

Die Temperatur im Gewächshaus betrug 12 °C (Nacht) bzw. 22 °C (Tag) – dies entspricht dem mittleren Temperaturminimum bzw. -maximum in Deutschland im Monat Juni (Statistik des Deutschen Wetterdienstes, Mittel von 1961-1990). Die relative Luftfeuchte wurde auf 70 % (Nacht) bzw. 60 % (Tag) nach DIN EN 13655 eingestellt [DIN, 2003b]. Die Lichtverhältnisse unterlagen dem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus.

Die Beregnungsmenge orientierte sich am durchschnittlichen Niederschlag in Deutschland im Monat Juni von 86,2 mm (Statistik des Deutschen Wetterdienstes, Mittel von 1961-1990) – daraus ergibt sich eine Regenmenge von 2,9 mm pro Tag. Die Filmproben wurden aller 12 h für 1 min beregnet. Die Flussrate je Tropfer betrug 9,875 mL/min. Daraus ergab sich eine Wassermenge von 39,5 mL je Tag und Filmprobe (zwei Tropfer), was bei einer Fläche von 150 x 90 mm einem Niederschlag von 2,9 mm entspricht.

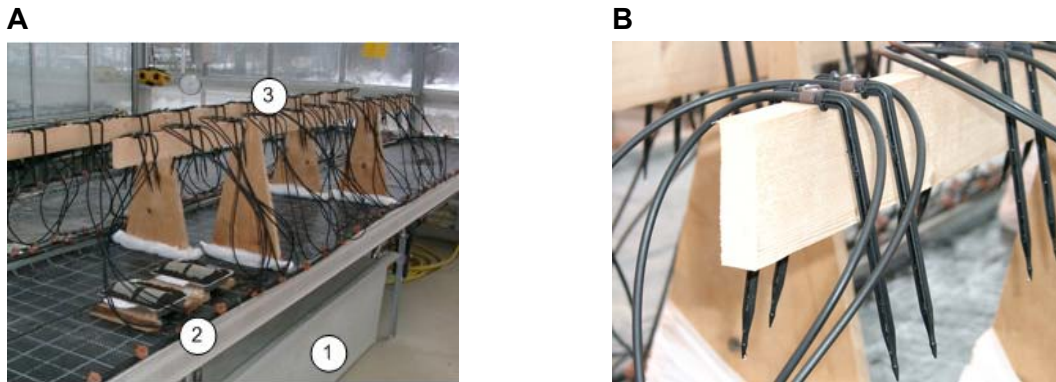


Abbildung 2-7: Versuchsaufbau des Bewitterungstests in einem Gewächshaus zur Untersuchung der Regenbeständigkeit von Proteinfilmen. **A**, Übersicht über den Aufbau: 1...Wasserbehälter mit Tauchpumpe zur Beregnung mit dH_2O , 2...unter den Tropfern platzierte Proteinfilm-Proben, 3...zwei parallel angeordnete Reihen mit je elf Wasserspinnen; **B**, Nahaufnahme einer Wasserspinne mit vier Tropfern, die Kapillarschläuche wurden an ein Hauptrohr angeschlossen.

Für den Bewitterungsversuch wurden Aluminiumschalen mit 1 L handelsüblicher Blumenerde befüllt und zu einem länglichen Wall aufgehäuft. In den Schalenböden befanden sich vier Entwässerungslöcher, um eine Staunässe während des Versuches zu verhindern. Gegossene Proteinfilme (vgl. Abschnitt 2.3.2) wurden in zwei Teile zu je 190 x 90 mm Proben geschnitten. Die Hälften wurden jeweils auf eine Aluminiumschale gelegt und mit weiteren 0,2 L Erde an den kürzeren Filmrändern in der Schale fixiert. Pro Aluminiumschale konnten parallel zwei Proteinfilme untersucht werden. Die erste Filmhälfte wurde exakt unter zwei Tropfern für die Beregnung platziert. Durch eine erhöhte Lagerung der Schalen war ein freier Abfluss des Wassers durch die Entwässerungslöcher der Aluminiumschalen gewährleistet. Die zweite Filmhälfte wurde im Gewächshaus ohne Beregnung gelagert und diente als Kontrolle. Die Auswertung fand durch fotografische Dokumentation und visuelle Beobachtung (täglich) statt. Nach sieben Tagen wurde die Bewitterung beendet, die Filmproben den Aluminiumschalen entnommen und für 48 h bei RT und 50 ± 2 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) in einem Exsikkator konditioniert. Danach wurden wenn möglich die Zugeigenschaften der Filme gemessen (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Als Maß für die Stabilität der Proteinfilme während der Bewitterung galt der Zeitraum (in Tagen) bis zur ersten Schädigung der Proben (Bildung von Löchern).

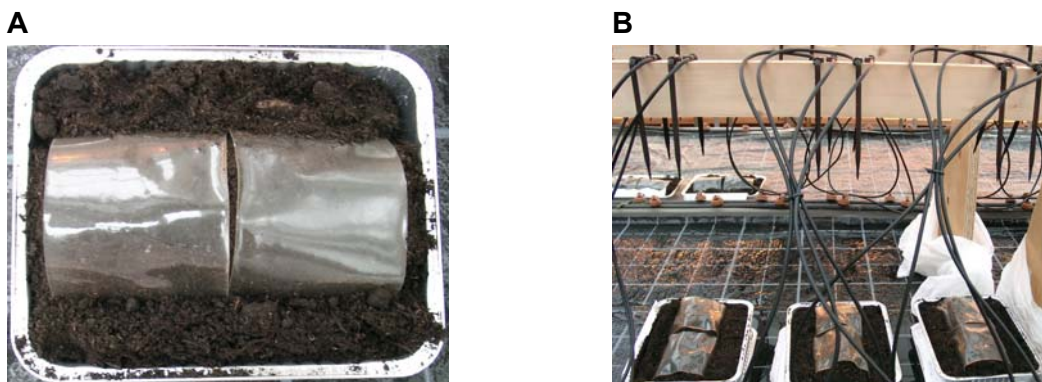


Abbildung 2-8: Vorbereitung der Proteinfilme zur Untersuchung der Regenbeständigkeit. **A**, Aluminiumschale mit Filmproben, mit 1 L handelsüblicher Blumenerde befüllt und zu einem länglichen Wall aufgeschüttet, je zwei Filmproben (190 x 90 mm) auf der Erde platziert und mit weiteren 0,2 L Erde an den kürzeren Probenrändern in der Schale fixiert; **B**, Ausrichtung der Proben unterhalb der Tropfer, jede Filmprobe wurde von zwei Tropfern gleichmäßig beregnet.

2.2.6 Biologische Charakterisierung

Anhand von Filmen aus Na-Caseinat, Gelatine und Erbsenprotein (Herstellung vgl. Kapitel 2.3.2) wurde die Abbaubarkeit im Boden, Pflanzenverträglichkeit sowie Düngeeffekt untersucht.

2.2.6.1 Abbaubarkeit im Boden

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens der Proteinfilme im Boden wurden Kunststofftöpfe (60 x 60 x 70 mm) bis zur Hälfte mit biologisch aktivem Mutterboden gefüllt. Darauf wurde eine Probe von 40 x 40 mm aus einem Proteinfilm gelegt und der Topf mit weiterer Muttererde aufgefüllt. Gelagert wurden die präparierten Töpfe in einer Klimakammer bei 25 °C (ohne Licht, Luftfeuchtigkeit nicht eingestellt). Pro Versuchstag erfolgte eine Doppelbestimmung. Die Versuchsdauer betrug sieben Tage, so dass für jede Filmprobe 14 Töpfe zur Verfügung standen. Um Verdunstung zu verringern, wurden die Töpfe mit einer kommerziellen Frischhaltefolie abgedeckt. Jeden Tag wurden zwei Töpfe ausgewählt, aus denen vorsichtig die Filmprobe wenn möglich entnommen, das Abbauverhalten fotografisch dokumentiert und bewertet. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 2-12 zusammengefasst.

Tabelle 2-12: Übersicht der Versuchsbedingungen für die Untersuchung der Abbaubarkeit im Boden.

Bedingung	Beschreibung
Topfgröße	Kunststofftöpfe 60 x 60 x 70 mm
Substrat	Mutterboden
Dauer	7 Tage
Probengröße	40 x 40 mm
Probenzahl	2 Proben je Tag, insgesamt 14 Proben je Proteinfilm
Standort	Klimakammer (25 °C, ohne Licht)
Untersuchte Proteinfilme	<ul style="list-style-type: none"> • Na-Caseinat (\pm MTG) • Gelatine - 300 Bloom (\pm MTG) • Erbsenprotein - Fraktion N^o1 (\pm MTG) Zusammensetzung: 110,4 g Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7); 3 g Glycerin; 6 g Proteinpulver; 1,5 g Maltodextrin und 6 mL Puffer (- MTG) oder 1,5 g TG Activa [®] WM in 6 mL Puffer (+ MTG)

2.2.6.2 Pflanzenverträglichkeit und Düngeeffekt

Zur Untersuchung der Verträglichkeit sowie des Düngeeffektes der Proteinfilme auf Pflanzen kamen zum einen der schnell wachsende Mais und zum anderen die langsam wachsende Tagetes (Studentenblume) zum Einsatz. Als Kontrollen dienten je eine Variante ohne Düngung und eine handelsübliche, kompostierbare Folie. Es wurden Kunststofftöpfe (60 x 60 x 70 mm) bis zur Hälfte mit Substrat gefüllt. Darauf wurde eine Probe von 40 x 40 mm aus einem Proteinfilm gelegt und der Topf mit weiterem Substrat aufgefüllt. Die vorgekeimten Maiskörner bzw. vorkultivierten Tagetes-Jungpflanzen wurden in die obere Substratschicht eingepflanzt, ohne in eine direkte Berührung mit den Filmen zu kommen. Die präparierten Töpfe wurden in einem Gewächshaus bei natürlichem Tag/Nacht-Rhythmus gelagert. Die Versuchsdauer betrug vier Wochen und je Proteinfilm wurden fünf

Wiederholungen durchgeführt. Bei Versuchsende wurde die Pflanzenhöhe sowie die oberirdische Frischmasse gemessen und die Pflanzen fotografisch dokumentiert. Die Versuchsbedingungen sind in Tabelle 2-13 zusammengefasst.

Tabelle 2-13: Übersicht der Versuchsbedingungen für die Untersuchung der Pflanzenverträglichkeit und des Düngereffektes.

Bedingung	Beschreibung
Topfgröße	Kunststofftöpfe 60 x 60 x 70 mm
Substrat	Gemisch aus Sand und Aussaaterde (1:1)
Testpflanzen	<ul style="list-style-type: none"> • Mais „Amadeo“ (vorgekeimt), pro Topf eine Pflanze • Tagetes Hybride (vorkultivierte Pflanzen), pro Topf eine Pflanze
Dauer	4 Wochen
Probengröße	40 x 40 mm
Probenzahl	5 je Proteinfilm
Standort	Gewächshaus, natürlicher Tag/Nacht-Rhythmus
Bonitur	<ul style="list-style-type: none"> • Messung der Pflanzenhöhe • Bestimmung der Frischmasse (oberirdisch) bei Versuchsende
Pflanzenschutz	biologischer Pflanzenschutz gegen Weiße Fliege und Spinnmilben mit natürlichen Antagonisten (Schlupfwespen, Raubmilben)
Düngung	keine über den gesamten Versuchszeitraum
Untersuchte Proteinfilme	<ul style="list-style-type: none"> • Na-Caseinat (\pm MTG) • Gelatine - 300 Bloom (\pm MTG) • Erbsenprotein - Fraktion N^o1 (\pm MTG) Zusammensetzung: 110,4 g Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7); 3 g Glycerin; 6 g Proteinpulver; 1,5 g Maltodextrin und 6 mL Puffer (- MTG) oder 1,5 g TG Activa [®] WM in 6 mL Puffer (+ MTG)

2.3 Methoden

2.3.1 Charakterisierung der MTG (TG Activa[®]WM)

2.3.1.1 Temperaturoptimum und Lagerstabilität

Die MTG-Aktivität wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben in 1,5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Zur Analyse des Temperaturoptimums wurde der Hydroxamat-Test bei Temperaturen von 4-99 °C (Reaktionszeit 10 min) durchgeführt. Für die Untersuchung der Lagerstabilität wurden MTG-Lösungen für 2 h bei Temperaturen von 4-80 °C gelagert und die Restaktivität anschließend im Hydroxamat-Test (37 °C, 10 min) gemessen. Die eingesetzte MTG-Konzentration betrug immer 10 mg TG Activa[®]WM / mL Puffer (50 mM Na-Phosphat, pH 8).

2.3.1.2 Einfluss von Weichmachern auf die MTG-Aktivität

Die MTG-Aktivität wurde wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben in Mikrotiterplatten in Gegenwart der Weichmacher Glycerin und PEG 300 bestimmt. Dabei wurden die Weichmacher als Additiv in Konzentrationen von 0-3,33 % (w/w) dem Hydroxamat-Test zugesetzt (130 µL Substrat- + 10 µL Weichmacherlösung), um den Einfluss auf den Test selbst und die MTG-Aktivität zu untersuchen (Abbildung 2-9 A). Das dazugehörige Pipettierschema ist in Tabelle 2-14 dargestellt.

In einem weiteren Experiment wurde zur Untersuchung der Stabilität die MTG in Weichmacher-Puffer-Lösungen bei RT für 3,5 h gelagert und anschließend die Aktivität mit dem Hydroxamat-Test bestimmt (Abbildung 2-9 B). Das dazugehörige Pipettierschema befindet sich in Tabelle 2-15. Die MTG-Konzentration wurde jeweils auf 20 mg/mL Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7) eingestellt.

Tabelle 2-14: Pipettierschema zur Untersuchung des Einflusses der Weichmacher (Glycerin, PEG 300) auf den Hydroxamat-Test selbst und die MTG-Aktivität. Puffer...20 mM Tris/HCl pH 7.

Weichmacherkonz. in Stammlösung [% (w/w)]	Weichmacher [g]	Puffer [g]		Weichmacherkonz. im Test [% (w/w)]
0	0	10	→ 10 µL zur Substrat-Lsg. (15 x Verdünnung)	0
1	0,1	9,9		0,07
5	0,5	9,5		0,33
10	1	9		0,67
20	2	8		1,33
30	3	7		2
40	4	6		2,67
50	5	5		3,33

Tabelle 2-15: Pipettierschema zur Untersuchung der Stabilität von MTG in Gegenwart der Weichmacher (Glycerin, PEG 300). Puffer...20 mM Tris/HCl pH 7, MTG...TG Activa[®]WM Stammlösung (40 mg/mL).

Weichmacherkonz. in Stammlösung [% (w/w)]	Weichmacher [g]	Puffer [g]	MTG [g]		Weichmacherkonz. im Test [% (w/w)]
Kontrolle	0	10	0	→ 10 µL zur Substrat-Lsg. (15 x Verdünnung)	0
0	0	5	5		0
1	0,1	4,9	5		0,07
5	0,5	4,5	5		0,33
10	1	4	5		0,67
20	2	3	5		1,33
30	3	2	5		2
40	4	1	5		2,67
50	5	0	5		3,33

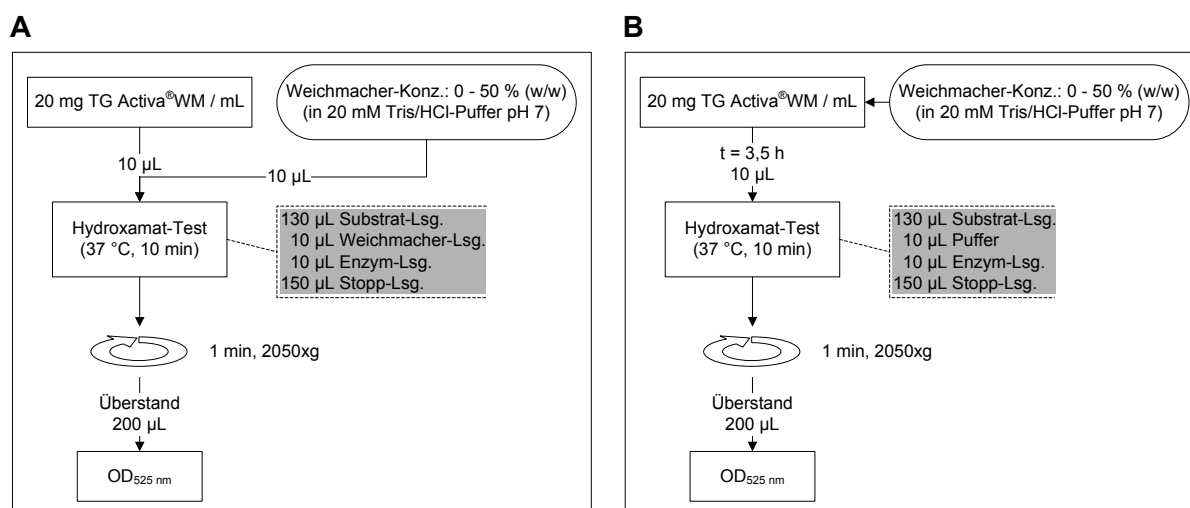


Abbildung 2-9: Durchführung zur Bestimmung der MTG-Aktivität in Gegenwart der Weichmacher Glycerin und PEG 300. A, Zugabe der Weichmacher direkt zum Testansatz zur Untersuchung des Einflusses auf den Test selbst und die MTG-Aktivität. B, Lagerung der MTG in Weichmacher-Puffer-Lösungen zur Untersuchung der Stabilität.

2.3.2 Filmherstellung

2.3.2.1 Standardverfahren

Proteinfilme wurden angelehnt an das Verfahren nach Oh et al. mit einigen Veränderungen hergestellt [Oh et al., 2004]. Die Durchführung ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Für eine enzymatische Quervernetzung (+ MTG) wurde TG Activa[®]WM, die aus 1 % MTG und 99 % Maltodextrin besteht, eingesetzt. Aus diesem Grund wurde als Äquivalent zu TG Activa[®]WM für unvernetzte Filme (- MTG) die gleiche Menge an Maltodextrin verwendet, um dessen möglichen Einfluss auszuschließen.

Wenn nicht anders angegeben wurden für die Herstellung der Filme 3 g Weichmacher in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7) gelöst, insgesamt 6 g Protein und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) hinzugefügt und bei 90 °C für 30 min homogenisiert. Der Erhitzungsschritt wurde auf 30 min verlängert, da ein größerer Lösungsansatz als bei Oh et al. verwendet wurde. Bei Herstellung von Gelatine-Filmen wurde die Proteinsuspension vor dem Erhitzen

für 1 h bei RT quellen gelassen, da dadurch eine bessere Löslichkeit der Gelatine gegeben war. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert der Proteinlösung mittels 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Bei Verwendung von Gelatine wurde der pH-Wert bei etwa 40 °C eingestellt, da die Proteinlösung bei geringeren Temperaturen gelierte. Danach wurde die Proteinlösung auf 50 °C erwärmt. 1,5 g TG Activa® WM wurden in 6 ml vorgewärmten Puffer (50 °C) gelöst und der Proteinlösung unter Rühren hinzugefügt (für Filme ohne MTG wurden 6 mL vorgewärmter Puffer verwendet). Für Na-Caseinat-Filme erfolgte dann eine Entgasung mittels Zentrifugation (40 °C, 1 min, 177xg). Für andere Proteine wurde auf eine Zentrifugation verzichtet, wegen möglicher Gelierung vor dem Gießen (Gelatine) bzw. Sedimentation bei Verwendung der gesamten Proteinsuspension (pflanzliche Proteine). Nach Entfernung von Schaum und Gasblasen wurde die Lösung in eine 200 x 200 mm große PTFE-Form gegossen (Abbildung 2-11) und für 48 h bei Raumtemperatur in einem Abzug getrocknet. Zur Lagerung wurden die Proteinfilme in einem Exsikkator bei 23±2 °C und 50±3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) konditioniert.

Alle Erwärmungs- sowie Abkühlungsschritte wurden in Wasserbädern und unter Rühren durchgeführt.

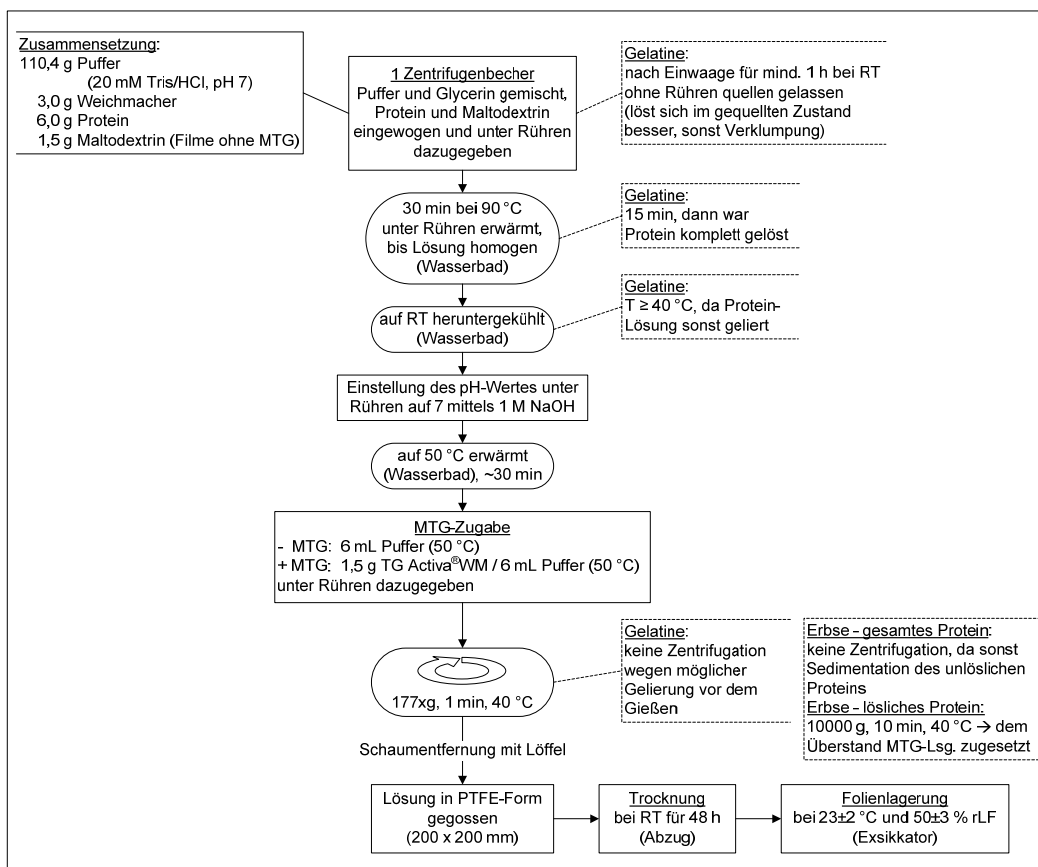


Abbildung 2-10: Standardverfahren zur Herstellung von Proteinfilmen. RT...Raumtemperatur, MTG...mikrobielle Transglutaminase, rLF...relative Luftfeuchte, T...Temperatur.

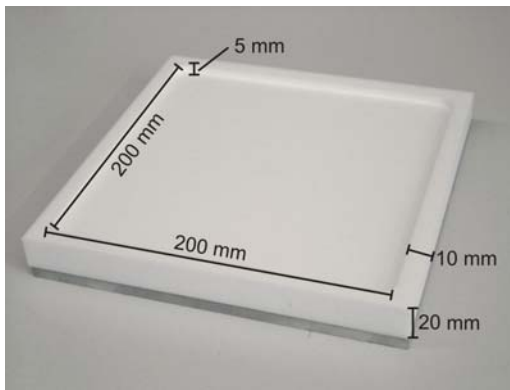


Abbildung 2-11: Gussform zur Herstellung von Proteinfilmen. Bestehend aus einer 20 mm dicken PTFE-Platte, zur Verhinderung von Deformationen auf einer Aluminium-Platte (Dicke: 8 mm) fixiert, ausgefräste Tasche von 200 x 200 mm, Oberfläche mit Schleifpapier (Korngröße 1200) geglättet und mit rauem Papier poliert.

2.3.2.2 Untersuchungen zu Puffer und pH-Wert

Na-Caseinat-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Puffer auf Proteinfilme wurden insgesamt 36 Filme hergestellt. Ein Viertel des Standard-Ansatzes wurde verwendet und in kleinere Rahmen (Plexiglas, 90 x 100 mm, PTFE-Folie als Unterlage) gegossen, da eine mechanische Testung der Filme nicht vorgesehen war. Der Puffer zur Filmherstellung wurde in Typ (Na-Phosphat, Tris/HCl), Konzentration (0, 5, 10, 20, 50, 100 mM) und pH-Wert (6, 7, 8) variiert. Die Filme wurden nach ihren optischen Eigenschaften, Transparenz und Kristallisation, analysiert.

Zusätzlich wurde die Pufferkapazität gemessen, indem MTG (0,375 g TG Activa[®]WM in 1,5 mL Puffer) der Proteinlösung hinzugefügt und nach 16 h bei RT der pH-Wert gemessen wurde. Die Differenz zwischen dem eingestellten pH-Wert vor und dem gemessenen pH-Wert nach der Enzym-Reaktion (pH-Shift) wurde zur Bewertung der Kapazität des Puffers herangezogen.

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Quervernetzung von Na-Caseinat wurde mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.3). Dafür wurde ein Filmansatz (+ MTG) mit 50 mM Tris/HCl-Puffer und verschiedenen pH-Werten (6, 7, 8, 9) hergestellt. Nach 30 min wurden 100 µL Proben entnommen, 1:100 mit SDS-PP versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

2.3.2.3 Untersuchungen zu Vernetzungszeit und -temperatur

Na-Caseinat-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Zur Untersuchung des Einflusses der Enzym-Reaktionsbedingungen auf die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen wurden drei verschiedene Verfahren verwendet. (1) In Anlehnung an die Arbeiten von Oh et al. wurde die MTG bei 50 °C der Protein-Filmlösung beigemischt und der Film bei RT für 48 h getrocknet [Oh et al., 2004]. (2) Die MTG wurde bei 50 °C der Protein-Filmlösung hinzugefügt und der Film für 24 h bei 50 °C getrocknet [Di Pierro et al., 2006]. (3) Die MTG wurde der Proteinlösung bei 50 °C zugeführt und die Lösung für 15 min bei 50 °C inkubiert. Das Enzym wurde dann inaktiviert, indem die Filmlösung 10 min bei 90 °C erhitzt wurde. Der Film wurde bei RT für 48 h getrocknet [Chambi and Grosso, 2006]. Die Zugeigenschaften der Proteinfilme wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen.

Die Quervernetzungsreaktion von Na-Caseinat bei 50 °C wurde mittels SDS-PAGE analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.3). Dafür wurde ein Filmansatz nach Methode (2) hergestellt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, 1:100 mit SDS-PP versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Weitere 50 µL Probe wurden zur Bestimmung der MTG-Aktivität für den Hydroxamat-Test entnommen (vgl. Abschnitt 2.2.1).

2.3.2.4 Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration

Gelatine-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Als Weichmacher wurden Polyethylenglykole mit einem M_w von 300-2000 g/mol eingesetzt. Die Weichmacherkonzentration betrug 50 % (w/w Protein). Na-Caseinat-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Als Weichmacher wurden TEEG, Di-Glycerin, Poly-Glycerin und Harnstoff eingesetzt und mit Glycerin plastifizierten Filmen verglichen. Die Weichmacherkonzentration wurde im Verhältnis zum Protein variiert (0, 25, 50, 75, 100 % (w/w Protein)). Die Zugeigenschaften der Proteinfilme wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen. Löslichkeit der Filme in Wasser und Regenbeständigkeit wurden wie in Abschnitt 2.2.5.1 bzw. 2.2.5.3 beschrieben untersucht.

2.3.2.5 Beschichtung mit Bienenwachs

Na-Caseinat-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Bienenwachs wurde bei 80 °C in einer Aluminiumschale geschmolzen. Der Na-Caseinat-Film wurde vorsichtig in das flüssige Bienenwachs getaucht und wieder entfernt. Um eine gleichmäßige Wachsschicht auf dem Proteinfilm zu gewährleisten, erfolgte die Entfernung des Films aus dem Wachsbad langsam und gleichförmig. Anschließend wurde der beschichtete Na-Caseinat-Film zum Trocknen aufgehängt. Von dem Proteinfilm wurden die Zugeigenschaften (vgl. Abschnitt 2.2.4.1) gemessen und die Regenbeständigkeit (vgl. Abschnitt 2.2.5.3) untersucht.

2.3.2.6 Untersuchungen zu innerer Weichmachung

Na-Caseinat-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Anstatt Glycerin wurde ein Mono-Amino-PEG (A-PEG, NH_2 -PEG) mit einem $M_w = 750$ g/mol sowie ein Di-Amino-PEG (Di-A-PEG, NH_2 -PEG- NH_2) mit einem $M_w = 1500$ g/mol als Weichmacher eingesetzt. Von den Proteinfilmen wurden die Zugeigenschaften (vgl. Abschnitt 2.2.4.1) gemessen und die Löslichkeit in Wasser (vgl. Abschnitt 2.2.5.1) untersucht.

2.3.2.7 Untersuchungen zur Enzymkonzentration

Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Dabei wurde die Enzymkonzentration von 0-25 U/g Protein variiert. Die eingesetzten Mengen an TG Activa[®]WM und Maltodextrin sind in Tabelle 2-16 zusammengefasst. Von den Proteinfilmen wurden die Zugeigenschaften wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen.

Tabelle 2-16: Übersicht der verwendeten Enzymkonzentrationen in Proteinfilmen. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

MTG-Konzentration [U/g Protein]	Eingesetzte Menge an TG Activa®WM [g]	Eingesetzte Menge an Maltodextrin [g]
0	0	1,5
2	0,12	1,38
8	0,5	1
16	1	0,5
25	1,5	0

2.3.3 Einfluss von Schneidetechnik und Probendimensionen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen

Die Zugeigenschaften wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen. Zur Untersuchung des Einflusses der Probendimensionen auf die Zugeigenschaften der Proteinfilme wurde die Breite (10 und 15 mm) und Länge (60, 80 und 150 mm) der Probestreifen variiert. Die Einspannlänge wurde entsprechend auf 32, 50 und 100 mm eingestellt. Um den Einfluss der Schneidetechnik zu untersuchen wurden die Probestreifen mit einem Cuttermesser, einer Schere und dem Rollenschneider präpariert. Dabei wurden die Schneidekanten mit einem Lichtmikroskop analysiert und die Probestreifen im Zugversuch verglichen.

2.3.4 Untersuchung der Vernetzbarkeit mittels MTG (TG Activa®WM)

Alle verwendeten Proteine wurden auf ihre Vernetzbarkeit durch MTG untersucht. Die Durchführung ist in Abbildung 2-12 dargestellt. Wenn nicht anders angegeben bestand der Reaktionsansatz aus 10 mg/mL Protein sowie 13 mg/mL TG Activa®WM in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 und wurde bei 50 °C für 2 h in einem Thermoblock inkubiert. Die Analyse der Quervernetzungsreaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.3). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten 50 µL dem Reaktionsansatz entnommen, mit 50 µL SDS-PP versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Eine Kontroll-Probe der MTG-Lösung (TG Activa®WM, 13 mg/mL) wurde ebenfalls angefertigt.

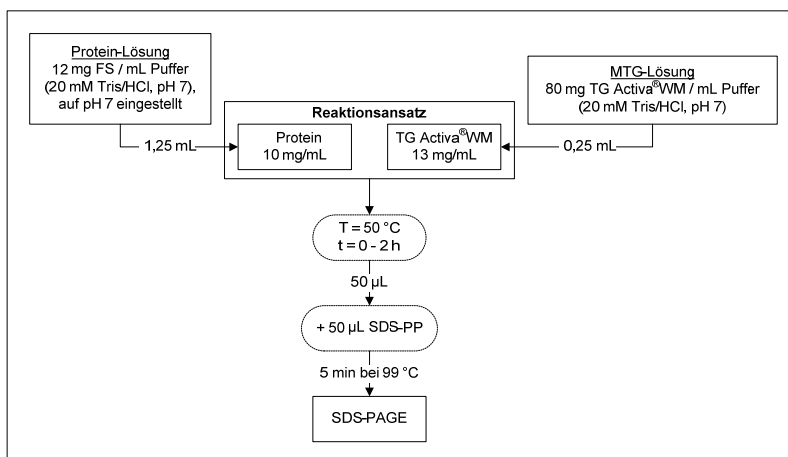


Abbildung 2-12: Durchführung zur Untersuchung der Vernetzbarkeit von Proteinen mittels MTG. FS...Feststoff, SDS-PP...SDS-Probenpuffer, MTG...mikrobielle Transglutaminase.

2.3.5 Untersuchungen zur PEGylierung von Proteinen mittels MTG (TG Activa[®]WM)

Die Durchführung ist in Abbildung 2-13 dargestellt. Wenn nicht anders angegeben bestand der Reaktionsansatz aus 1 mg/mL Protein, 1,8 mg/mL Additiv-Lösung sowie 20 mg/mL TG Activa[®]WM in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 und wurde bei RT für 2 h inkubiert. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.3). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten 50 μ L dem Reaktionsansatz entnommen, mit 50 μ L SDS-PP versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Eine Kontroll-Probe der MTG-Lösung (TG Activa[®]WM, 20 mg/mL) wurde ebenfalls angefertigt.

Zur Untersuchung der PEGylierung wurden als Additive ein A-PEG mit einem $M_w = 5000$ g/mol und ein Di-A-PEG mit einem $M_w = 1500$ g/mol verwendet. Es wurde die PEGylierung von N,N-Dimethylcasein (DMC) und Na-Caseinat analysiert.

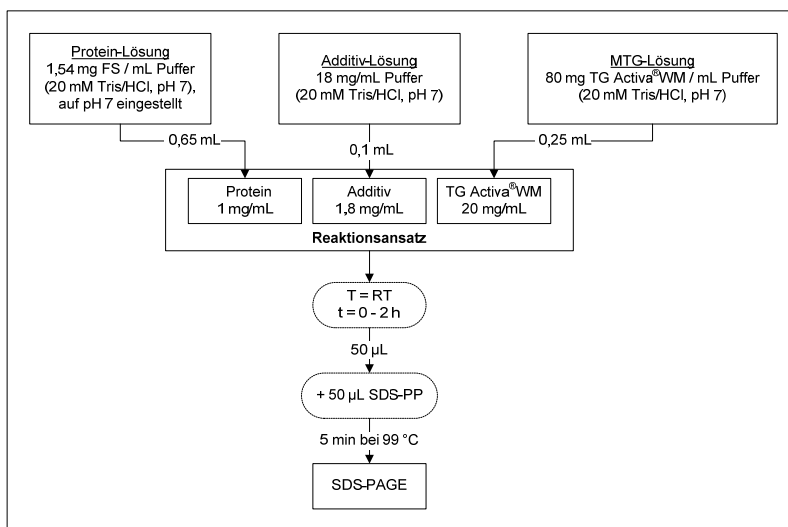


Abbildung 2-13: Durchführung zur Untersuchung der PEGylierung von Proteinen mittels MTG. Additiv...verschiedene Amino-PEGs, FS...Feststoff, RT...Raumtemperatur, SDS-PP...SDS-Probenpuffer, MTG...mikrobielle Transglutaminase.

3 Ergebnisse

3.1 Grundlagen

3.1.1 Charakterisierung der MTG (TG Activa®WM)

Zur enzymatischen Vernetzung von Proteinen wurde die kommerzielle mikrobielle Transglutaminase (TG Activa®WM) eingesetzt. Für optimale Reaktionsbedingungen während der Filmherstellung wurde die MTG auf Temperaturoptimum, Lager- und Weichmacherstabilität untersucht. Die Vernetzungsreaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert.

3.1.1.1 Temperaturoptimum und Lagerstabilität

Die Untersuchung von Temperaturoptimum und Lagerstabilität der MTG wurde wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Die verwendete MTG besaß ihre höchste Aktivität bei 50 °C (Abbildung 3-1 A). Bei RT wurde eine Aktivität von 20 % gemessen. Bei Temperaturen ≥ 80 °C war das Enzym vollständig inaktiv, wobei eine starke Aktivitätsabnahme in einem Temperaturbereich von 50-70 °C gemessen wurde. Um einen möglichst hohen Vernetzungsgrad innerhalb der Proteinfilme zu gewährleisten, erfolgte die MTG-Zugabe zur Filmherstellung bei einer Temperatur von 50 °C. Die Stabilität des Enzyms wurde anhand einer Lagerung in Lösung über 2 h bei verschiedenen Temperaturen ermittelt (Abbildung 3-1 B). Die Untersuchung zeigte, dass das Enzym sehr temperatursensibel ist. Bis zu einer Temperatur von 37 °C sank die Aktivität der MTG um 10 %. Eine weitere Erhöhung der Lagertemperatur führte zu einer rapiden Abnahme der Aktivität – nach 2 h bei 50 °C betrug die Restaktivität nur 5 %, d.h. das Enzym war in Lösung nahezu inaktiv.

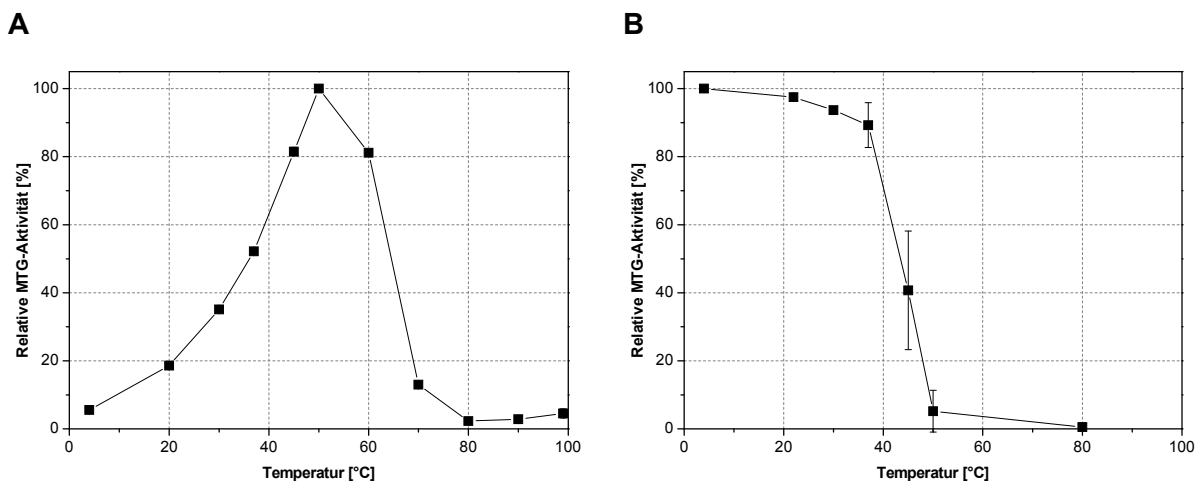


Abbildung 3-1: Relative Aktivität von MTG (TG Activa®WM) in Abhängigkeit der Temperatur. A, im Hydroxamat-Test; B, nach Lagerung über 2 h. Die MTG-Aktivität wurde direkt nach Probenahme unter Verwendung des Hydroxamat-Tests gemessen. Die MTG-Konzentration in der Ausgangslösung betrug 10 mg/mL. $\bar{x} \pm s, n = 2$. Werte in Tabelle 7-1.

3.1.1.2 Einfluss der Weichmacher Glycerin und PEG 300 auf die MTG-Aktivität

Glycerin wird in Proteinfilmen häufig als Weichmacher eingesetzt [Chambi and Grosso, 2006; Di Pierro et al., 2006; Oh et al., 2004; Taylor et al., 2006]. Bisher wurde jedoch nicht publiziert, ob Glycerin einen Einfluss auf die Aktivität der MTG hat. Deshalb wurde die Aktivität in Abhängigkeit von Glycerin und zusätzlich von PEG 300 wie in Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben untersucht. Abbildung 3-2 zeigt den Einfluss der Weichmacherkonzentration auf die MTG-Aktivität. Bis zu einer Glycerinkonzentration von 3,33 % (w/w) in der Substratlösung des Hydroxamat-Tests änderte sich die Aktivität der MTG nicht. Im Gegensatz dazu wurde mit zunehmender PEG-Konzentration in der Substratlösung des Hydroxamat-Tests eine Erhöhung der MTG-Aktivität von bis zu 20 % gemessen. Beide Weichmacher hatten keinen Einfluss auf den Hydroxamat-Test selbst (□ - ohne MTG) und beeinflussten die MTG-Aktivität nicht negativ.

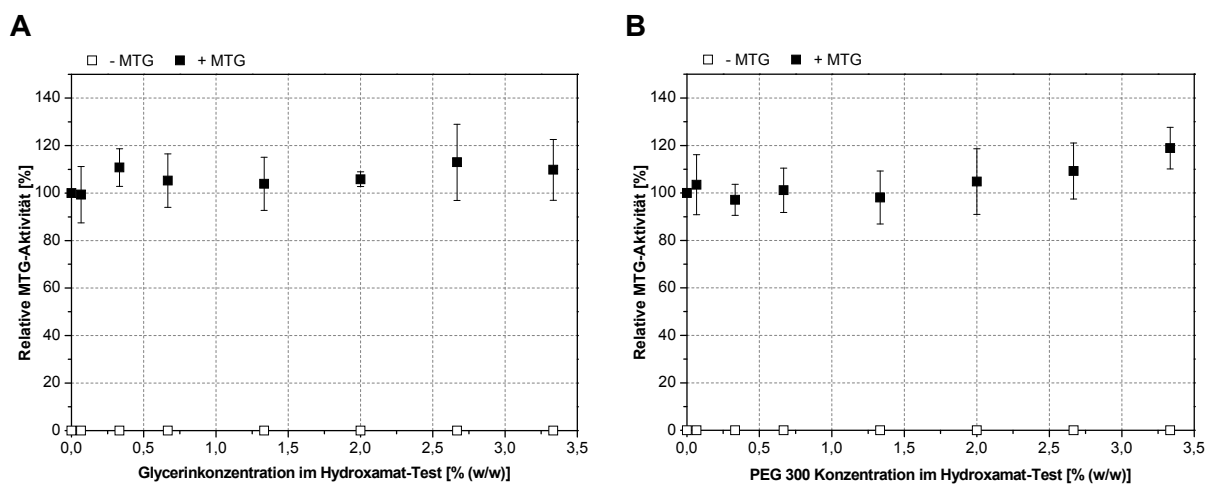


Abbildung 3-2: Relative Aktivität von MTG (TG Activa® WM) in Abhängigkeit der Weichmacherkonzentration in der Substratlösung für den Aktivitätstest. A, Glycerin; B, PEG 300. Die MTG-Aktivität wurde direkt nach Probenahme unter Verwendung des Hydroxamat-Tests gemessen. Die MTG-Konzentration in der Ausgangslösung betrug 20 mg/mL. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. Werte in Tabelle 7-2.

In Abbildung 3-3 ist der Einfluss der Weichmacherkonzentration auf die MTG-Aktivität bei einer Lagerung von 3,5 h bei RT dargestellt. Mit steigender Glycerinkonzentration nahm die MTG-Aktivität zu – bis 30 % im Vergleich zur Aktivität ohne Additiv. Glycerin scheint als Stabilisator für die MTG zu wirken, wie es schon z.B. für Aldehyd-Dehydrogenase gezeigt wurde [Bradbury and Jakoby, 1972], und ist damit ein geeigneter Weichmacher für enzymatisch vernetzte Proteinfilme. Die hohen Standardabweichungen von bis zu 24 % waren begründet durch eine zunehmende Viskosität der Glycerin-Enzym-Lösung mit steigender Glycerinkonzentration und daraus resultierenden Pipettierfehlern.

Bei einer PEG-Konzentration > 10 % (w/w) sank die Aktivität bis auf 40 % Restaktivität bei 50 % (w/w) PEG. Die Ursache dafür lag in einer Ausfällung des Enzyms begründet. PEG als hydrophiles, ungeladenes Polymer konkurriert mit dem Enzym in wässriger Lösung um das Hydratationswasser und führt dabei ab einer bestimmten Konzentration zu einer reversiblen Fällung des Proteins [Polson et al., 1964]. Die Enzymbehandlung der Proteinlösung zur Filmherstellung erfolgte bei einer Weichmacherkonzentration von 2,5 % (w/w) – damit fand keine Beeinträchtigung der MTG-Aktivität statt.

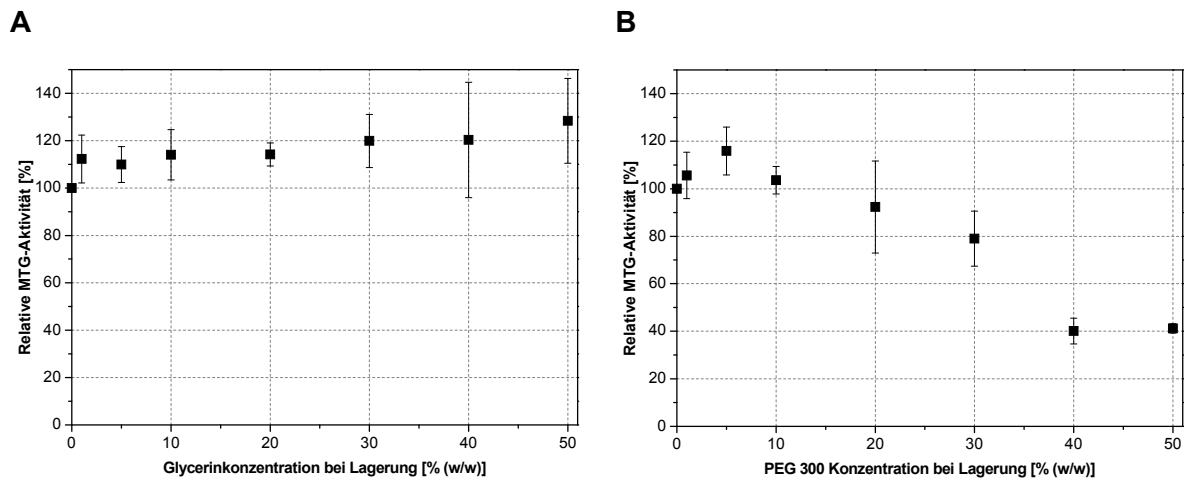


Abbildung 3-3: Relative Aktivität von MTG (TG Activa® WM) in Abhängigkeit der Weichmacherkonzentration bei einer Lagerung von 3,5 h bei RT. A, Glycerin; B, PEG 300. Die MTG-Aktivität wurde direkt nach Probenahme unter Verwendung des Hydroxamat-Tests gemessen. Die MTG-Konzentration in der Ausgangslösung betrug 20 mg/mL. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. Werte in Tabelle 7-2.

3.1.1.3 Nachweis der Vernetzung

Die Vernetzungsreaktion wurde am Beispiel von Na-Caseinat wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben durchgeführt und mit Hilfe der SDS-PAGE analysiert (vgl. Abschnitt 2.2.3).

Das Ergebnis ist in Abbildung 3-4 dargestellt. In Lane 1 sind die Casein-Monomere mit einem M_w von 25-32 kDa sichtbar. Nach Zugabe von MTG (Lane 2 bis 8) nahm die Konzentration der Monomere ab und es entstanden Polymere mit einem $M_w > 116$ kDa, die wegen ihrem hohen Molekulargewicht zuerst nicht ins Trenngel eindringen und später das Sammelgel nicht mehr passieren konnten. Dies sind Merkmale für eine erfolgreiche Quervernetzung eines Proteins mittels MTG.

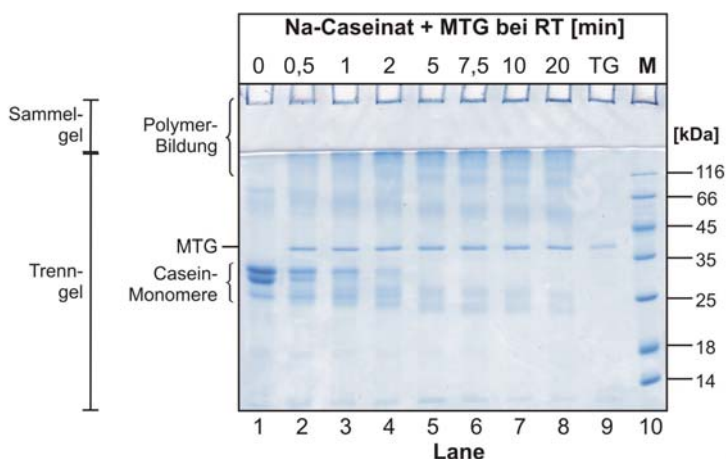


Abbildung 3-4: SDS-PAGE Analyse der Vernetzung von Na-Caseinat mittels MTG (TG Activa® WM) in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei RT. Reaktionsansatz mit 1 mg/mL Na-Caseinat und 13 mg/mL TG Activa® WM. Die Proben (50 µL) wurden dem Reaktionsansatz zum jeweiligen Zeitpunkt entnommen, mit 50 µL SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Coomassie-Färbung. M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, TG...TG Activa® WM (13 mg/mL).

3.1.2 Untersuchungen zu Puffer und pH-Wert

Zur Herstellung von Na-Caseinat-Filmen wurde zunächst 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 nach Oh et al. verwendet [Oh et al., 2004]. Nach einer Lagerung der getrockneten Filme bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF wurde in einigen Fällen eine unerwartete Bildung von Kristallen in den Filmen beobachtet (Abbildung 3-5). Diese Kristallisation stellte Inhomogenitäten dar, welche die mechanischen Eigenschaften der Filme veränderte bzw. eine korrekte Messung der mechanischen Kennwerte erschwerte. Um eine Kristallisation zu vermeiden, wurde daraufhin nach einem geeigneteren Puffer gesucht.

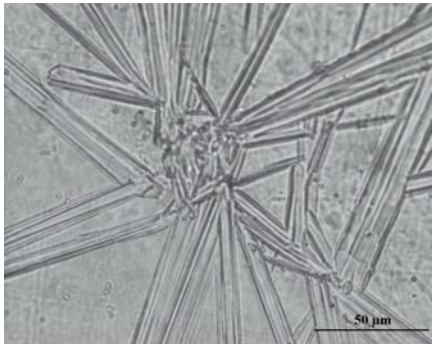


Abbildung 3-5: Lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 134x) eines Na-Caseinat-Films mit Kristallbildung. Verwendeter Puffer...50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8.

Die Optimierung des Puffersystems wurde wie in Abschnitt 2.3.2.2 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden die optischen Eigenschaften der Filme (Transparenz, Kristallisation) und die Pufferkapazität analysiert. Eine Bildung von Kristallen wurde nur bei 50 und 100 mM Na-Phosphatpuffer pH 7 und 8 beobachtet (Tabelle 3-1). Daraus schlussfolgerte sich, dass das Salz des Phosphatpuffers bei einer Pufferkonzentration ≥ 50 mM in den Na-Caseinat-Filmen auskristallisierte. Eine beginnende Kristallisation wurde erst nach 96 h nach dem Filmgießen sichtbar. Bei Oh et al. wurden die Proteinfilme jedoch bereits nach 48 h mechanisch vermessen, so dass sich in diesem Zeitraum keine Kristalle bilden konnten. Ein Phosphatpuffer zur Herstellung von Proteinfilmen ist aufgrund unerwünschter Kristallisation nicht geeignet. Bei allen Filmen mit Tris/HCl-Puffer wurde keine Kristallisation beobachtet.

Tabelle 3-1: Kristallisation der gegossenen Na-Caseinat-Filme ohne MTG in Abhängigkeit der Pufferkonzentration und des pH-Wertes.

Konzentration [mM]	Na-Phosphat-Puffer			Tris/HCl-Puffer		
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
0	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
50	-	Kristalle	Kristalle	-	-	-
100	-	Kristalle	Kristalle	-	-	-

Die gegossenen Na-Caseinat-Filme waren optisch sehr verschieden (siehe Tabelle 3-2 links). Mit zunehmender Salzkonzentration des Tris/HCl-Puffers wurden die Filme mehr und mehr opak (lichtundurchlässig). Bei pH 6 waren die Filme überwiegend uneben und weiß. Der Grund dafür war vermutlich ausgefälltes Protein, denn bei Zugabe von HCl zur Einstellung des pH-Wertes auf 6 bildeten sich weiße Flocken in der Proteinlösung.

Alle Puffer mit pH 6 wurden deshalb für die Proteinfilmherstellung ausgeschlossen. Bei Verwendung von reinem Wasser gestaltete sich die Einstellung des pH-Wertes schwierig, da bei unvorsichtigem Pipettieren von NaOH und unzureichender Vermischung ebenfalls eine Ausflockung beobachtet werden konnte. Demnach ist reines Wasser zur Herstellung von Proteinfilmen ebenfalls nicht geeignet. Für transparente und glatte Filme sollte ein Tris/HCl-Puffer mit geringer Salzkonzentration (≤ 20 mM, pH 7 oder ≤ 50 mM, pH 8) verwendet werden.

Tabelle 3-2: Optische Eigenschaften der gegossenen Na-Caseinat-Filme (ohne MTG) und pH-Shift während der MTG-Reaktion (TG Activa[®] WM, t=16 h) in Abhängigkeit von Konzentration und pH-Wert eines Tris/HCl-Puffers.

Konz. [mM]	Optische Eigenschaften			pH-Shift nach MTG-Reaktion [pH-Einheit]		
	pH 6	pH 7	pH 8	pH 6	pH 7	pH 8
0	transparent, glatt	transparent, glatt	transparent, glatt	0	-0,4	-0,8
5	transparent, glatt	transparent, glatt	transparent, glatt	0	-0,4	-0,7
10	opak, glatt	transparent, glatt	transparent, glatt	0	-0,3	-0,5
20	opak, uneben	transparent, glatt	transparent, glatt	0	-0,2	-0,5
50	opak, glatt	opak, glatt	transparent, glatt	0	-0,2	-0,3
100	opak, uneben	opak, uneben	opak, glatt	0	-0,1	-0,2

Zur Reproduktion der mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen ist eine konstante enzymatische Reaktion nötig. Dabei ist es wichtig, den pH-Wert der Proteinlösung über den Reaktionszeitraum konstant zu halten. In Tabelle 3-2 (rechts) sind die Differenzen zwischen eingestelltem pH-Wert und des pH-Wertes nach der MTG-Reaktion (16 h) in Abhängigkeit der Konzentration und des pH-Wertes eines Tris/HCl-Puffers dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit steigender Pufferkonzentration die Verschiebung des pH-Wertes abnahm (bei pH 6 blieb der pH-Wert konstant). Bei pH 7 sank der pH-Wert lediglich um maximal 0,4 pH-Einheiten. Bei pH 8 war eine Pufferkonzentration von ≥ 50 mM nötig, um den pH-Wert während der MTG-Reaktion stabil zu halten (pH-Shift < 0,5 pH-Einheiten).

Für eine Herstellung von transparenten Proteinfilmen ohne Kristallisation und mit höchstmöglicher Pufferkapazität, sollte ein Tris/HCl-Puffer mit 20 mM (pH 7) oder 50 mM (pH 8) gewählt werden. Zur Entscheidung zwischen pH 7 und 8 wurde eine Vernetzung von Na-Caseinat mittels MTG bei unterschiedlichen pH-Werten (6, 7, 8, 9) durchgeführt und mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-6 dargestellt. In Lane 1 ist als Kontrolle eine unbehandelte Na-Caseinat-Probe aufgetragen. Sie zeigt die Banden der Casein-Monomere. Mit zunehmendem pH-Wert von 6 bis 9 und einer Reaktionszeit von 30 min wurde eine abnehmende Quervernetzung des Proteins beobachtet – die Konzentration der Monomer-Banden nahm zu und die Konzentration der Polymere, deren Molekulargewicht für ein Passieren des Sammelgels bzw. Eintreten in das Trenngel zu hoch war, nahm ab. Bei pH 7 (Lane 4) wurde im Gegensatz zu pH 8 (Lane 5) eine höhere Menge an Polymeren im Sammelgel als im Trenngel detektiert – dabei ist das Molekulargewicht der

Polymere im Sammelgel höher als das der Polymere im Trenngel. Demnach war die Quervernetzung bei pH 7 höher als bei pH 8. Für die folgenden Filmherstellungen wurde der 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gewählt.

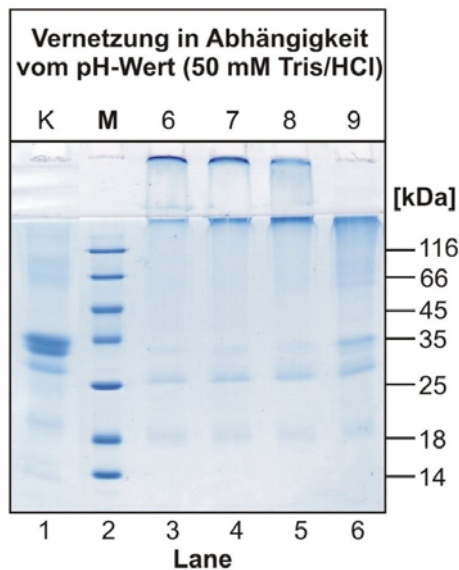


Abbildung 3-6: SDS-PAGE Analyse der Vernetzung von Na-Caseinat mittels MTG (TG Activa®WM) in Abhängigkeit vom pH-Wert (6, 7, 8, 9) des Tris/HCl-Puffers (50 mM). Die Proben (100 µL) wurden dem Reaktionsansatz nach 30 min Inkubation entnommen, 1:100 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Coomassie-Färbung. K...Kontrolle – Na-Caseinat ohne MTG, M...Molekulargewichtsmarker.

3.1.3 Einfluss von Schneidetechnik und Probendimensionen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen

In der Literatur existiert bedauerlicherweise keine Standard-Methode zur mechanischen Charakterisierung von Proteinfilmen. Probenbreite und Einspannlänge bzw. Probenvorbereitung für den Zugversuch unterscheiden sich. Lediglich die Konditionierung der Proben bei Normklima (23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF) nach DIN EN ISO 291 [DIN, 1997] vor der Messung wurde bei allen Autoren der jüngsten Veröffentlichungen verwendet. Aus diesem Grund wurden einige in der Literatur verwendete Methoden verglichen, um den Einfluss verschiedener Schneidetechniken und Testparameter auf die Zugeigenschaften von Proteinfilmen zu prüfen.

Bisher wurden Proteinfilme hauptsächlich in Petrischalen hergestellt und daraus Prüfkörper mit einer Maximallänge von 50-100 mm präpariert. Dafür wurden Einspannlängen von 20 mm [Oh et al., 2004] und 50 mm [Chambi and Grosso, 2006] für die Messung von Proteinfilmen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden hingegen 200 x 200 mm Proteinfilme erzeugt – damit war es möglich, Probestreifen mit einer Länge ≥ 150 mm herzustellen. Daraufhin wurde eine Einspannlänge von 100 mm angelehnt an die Norm DIN EN ISO 527-3 verwendet. Die unterschiedlichen Einspannlängen und zwei verschiedene Probenbreiten wurden miteinander verglichen. Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Prüfmaschinen-Typ war eine minimale Einspannlänge von 32 mm möglich, die ersatzweise für 20 mm nach Oh et al. angewendet wurde.

Die Untersuchungen wurden wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben mit Na-Caseinat-Filmen durchgeführt.

In Abbildung 3-7 sind die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen in Abhängigkeit der Probindimensionen (Probenbreite und Einspannlänge) dargestellt. Ein einheitlicher Einfluss der Probenbreite bzw. Einspannlänge auf die Zugeigenschaften wurde nicht beobachtet. Bei einer Probenbreite von 15 mm sanken die Zugfestigkeit (ZF) und Bruchdehnung (BD) mit zunehmender Einspannlänge um 9,5 % (von 2,46 auf 2,25 N/mm²) bzw. um 7,8 % (von 156 auf 147 %). Mit steigender Einspannlänge vergrößerte sich die Fläche des Messbereiches, womit die Wahrscheinlichkeit von Inhomogenitäten und eines damit verbundenen früheren Versagens des Prüfkörpers zunahm. Bei Proben mit 10 mm Breite wurde für die BD ein vergleichbarer Trend festgestellt, wobei die Standardabweichungen der Messwerte mit bis zu 10 % wesentlich höher waren als bei 15 mm Probenbreite (< 3,5 %). Mit 2,44 N/mm² wurde bei einer Einspannlänge von 100 mm eine höhere ZF als bei 32 mm Einspannlänge (2,31 N/mm²) gemessen. Der Grund dafür ist nicht bekannt, könnte jedoch durch die vergleichsweise höhere Standardabweichung bei 100 mm erklärt werden. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Probenbreiten war nicht erkennbar – lediglich die Standardabweichungen waren bei 15 mm Breite geringer.

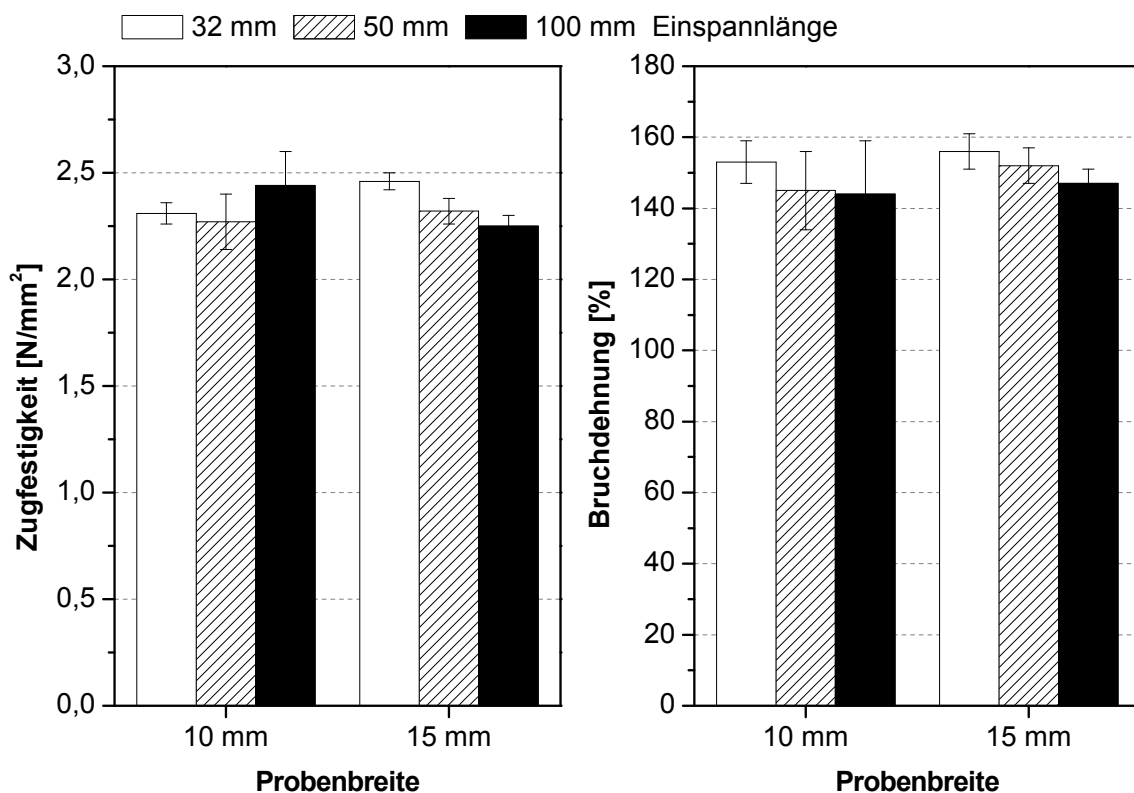


Abbildung 3-7: Einfluss von Probenbreite und Einspannlänge auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen (ohne MTG). 6 g Na-Caseinat, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert, 6 mL Puffer (50 °C) hinzugefügt und anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s$, n ≥ 5. Werte in Tabelle 7-4.

Die Durchführung des Zugversuches soll angelehnt an DIN EN ISO 527-3 erfolgen. Diese Norm schreibt für die Verwendung des Prüfkörpers Typ 2 (vgl. Abbildung 2-2) eine Einspannlänge von 100 ± 5 mm vor. Da für die vorliegende Arbeit kein optisches Dehnungsmessgerät zur Verfügung stand, wurde die Dehnung über den Traversenweg bestimmt (Abstandsänderung der Einspannklemmen, vgl. Formel 3). Zu diesem Zweck wurde für alle folgenden Messungen eine Einspannlänge von 100 mm verwendet. Wegen der geringeren Standardabweichungen wurde eine Probenbreite von 15 mm gewählt, was im vorgeschriebenen Bereich (10-25 mm) der Norm liegt.

Ein weiterer Unterschied in der Literatur ist die Probenvorbereitung. In einigen Publikationen wurde ein Cuttermesser zum Schneiden der Probestreifen aus den Proteinfilm verwendet [Mariniello et al., 2003], in anderen wurde die Schneidetechnik nicht angegeben [Chambi and Grosso, 2006; Oh et al., 2004]. Zur Vereinfachung der Präparation der Probestreifen wurde ein Rollenschneider entwickelt (Abbildung 3-8 B). Sein Vorteil ist die Doppelklinge mit definiertem Abstand, welche eine einheitliche Breite über den gesamten Probestreifen erlaubt und sowohl einfach als auch schnell zu bedienen ist. Diese Schneidetechnik wurde mit anderen Methoden (Schere, Cuttermesser) verglichen.

Die Zugeigenschaften der durch verschiedene Schneidetechniken präparierten Probestreifen aus Na-Caseinat-Filmen sind in Abbildung 3-8 A dargestellt. Proben, die mit Schere bzw. Rollenschneider hergestellt wurden, zeigten mit einer ZF von 2,3-2,4 N/mm² und einer BD von 125-132 % vergleichbare Kennwerte (KW). Im Vergleich dazu resultierte die Herstellung der Probestreifen durch ein Cuttermesser in eine etwas niedrigere Zugfestigkeit ($\downarrow \leq 16$ %) und Bruchdehnung ($\downarrow \leq 25$ %) mit wesentlich höheren Standardabweichungen (11,4 und 23,23 %). Der Grund dafür sind die gezahnten Schnittkanten, die beim Schneiden mit einem Cuttermesser auftreten (Abbildung 3-8 C) und kleine Defekte darstellen. Dadurch erfolgte ein verfrühtes Versagen des Probekörpers. Schere und Rollenschneider hingegen erzeugten glatte Schnittkanten (Abbildung 3-8 D und E). Die Standardabweichungen der mit einem Rollenschneider hergestellten Proben waren mit 3-4 % akzeptabel.

Somit stellt der Rollenschneider durch seine glatten Schnittkanten und reproduzierbaren mechanischen Eigenschaften der Probestreifen sowie durch die einfache und schnelle Handhabung eine nützliche Schneidemethode dar.

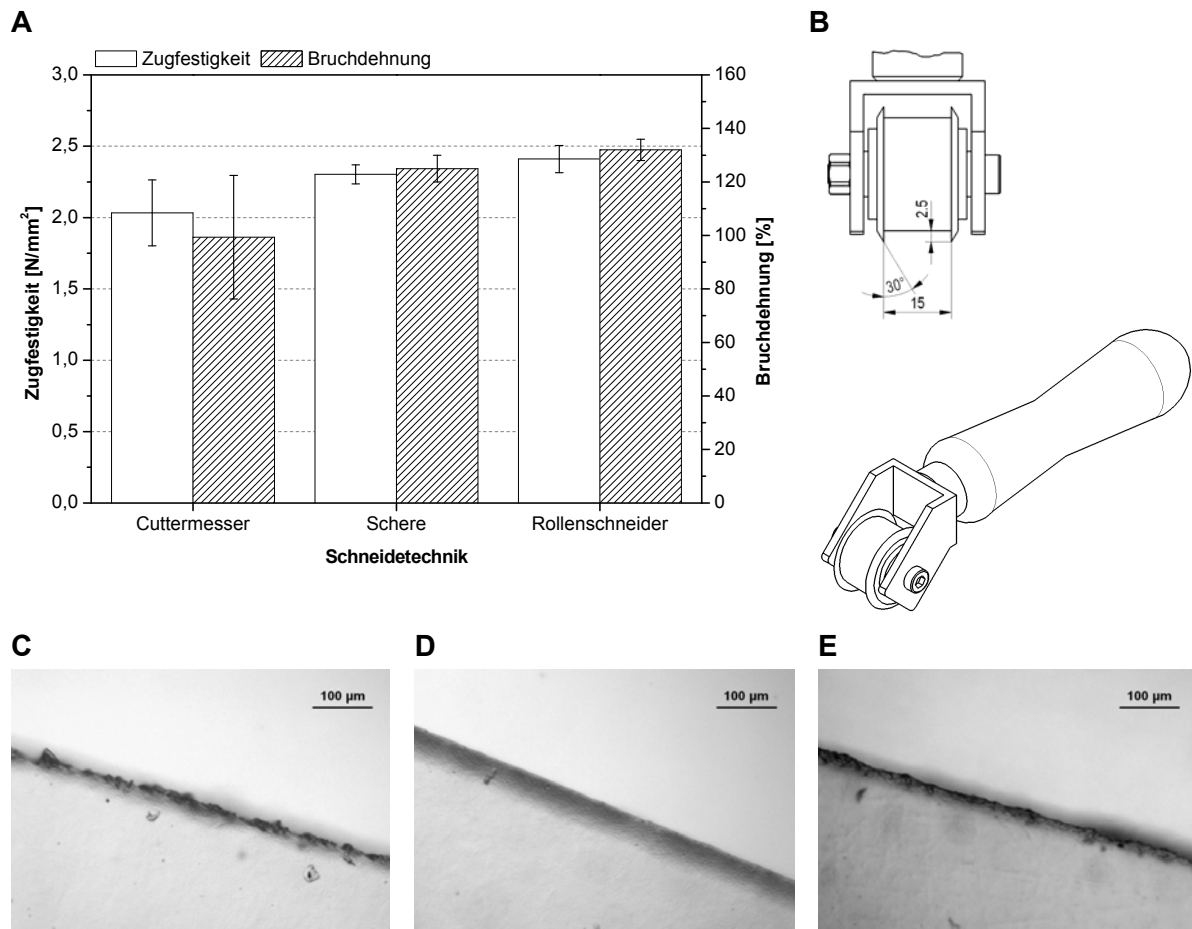


Abbildung 3-8: Einfluss der Schneidetechnik auf Schnittkanten und Zugeigenschaften von Probestreifen eines Na-Caseinat-Films (ohne MTG). **A**, Zugeigenschaften des Na-Caseinat-Films in Abhängigkeit der Probenschneidetechnik. 6 g Na-Caseinat, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert, 6 mL Puffer (50 °C) hinzugefügt und anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s$, n = 3. Werte in Tabelle 7-5. **D**, Technische Zeichnung eines Rollenschneiders; **C-D**, Lichtmikroskopaufnahmen (Vergrößerung 10x) von Probestreifen eines Na-Caseinat-Films hergestellt mit **C**, Cuttermesser; **D**, Schere; **E**, Rollenschneider.

3.1.4 Untersuchungen zu Vernetzungszeit und -temperatur

In der Literatur wurden verschiedene Enzymreaktionsbedingungen bezüglich Temperatur, Reaktionszeit und Filmtrocknung verwendet, was einen Vergleich der Filme untereinander schwierig gestaltet. Ein Einfluss der Temperatur während der Enzymreaktion wurde für Sojaprotein-Filme untersucht [Jiang et al., 2007] – dabei sank die Zugfestigkeit und Bruchdehnung der Filme mit zunehmender Trocknungstemperatur (18-50 °C). Als Grund wurde der schnellere Verlust der Enzymaktivität bei höheren Temperaturen genannt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für eine bei 50 °C gelagerte MTG-Lösung nachgewiesen, in der sich jedoch kein Substrat befand (vgl. Abschnitt 3.1.1.1). Ein möglicher Einfluss von Temperatur und Inkubationszeit auf die Enzymreaktion wurde für Casein-Filme bisher nicht veröffentlicht.

Deshalb wurde zunächst die MTG-Aktivität bei 50 °C in Anwesenheit des Substrates Na-Caseinat untersucht und die Quervernetzungsreaktion mittels SDS-PAGE analysiert (in Abschnitt 2.3.2.3 beschrieben). In Abbildung 3-9 sind die Ergebnisse dargestellt.

Es wurde nachgewiesen, dass das Enzym bei 50 °C stabil war und auch nach 90 min noch seine vollständige Aktivität besaß (Abbildung 3-9 A). Damit bleibt vermutlich MTG in Anwesenheit eines Substrates (in diesem Fall Na-Caseinat) wesentlich länger stabil als ohne, denn bei einer Lagerung der Enzym-Puffer-Lösung bei 50 °C war MTG nach 2 h nahezu inaktiv (vgl. Abbildung 3-1 B). Folglich wurde die Abnahme von ZF und BD bei Sojaprotein-Filmen [Jiang et al., 2007] mit zunehmender Reaktionstemperatur nicht durch eine schnellere Inaktivierung der MTG bei 50 °C verursacht.

Die Analyse mittel SDS-PAGE zeigte (Abbildung 3-9 B), dass schon nach 15 min eine deutliche Quervernetzung der Casein-Moleküle stattfand. Die Konzentration der Monomer-Banden des Caseins nahm sichtbar ab und Polymere entstanden, welche durch ihr hohes Molekulargewicht nicht mehr in das Trenngel eintraten. Mit zunehmender Reaktionszeit verschwanden die Monomer-Banden des Caseins nahezu vollständig und die Quervernetzungsprodukte waren so hochmolekular, dass sie das Sammelgel nicht mehr passieren konnten. Nach 120 min war die Gelierung der filmbildenden Proteinlösung schon so weit fortgeschritten, dass keine weiteren Proben entnommen und untersucht werden konnten. Bei Chambi und Grosso war demnach nach 15 min bei 50 °C und anschließender Inaktivierung für 10 min bei 90 °C das Casein zwar stark, aber nicht vollständig vernetzt [Chambi and Grosso, 2006].

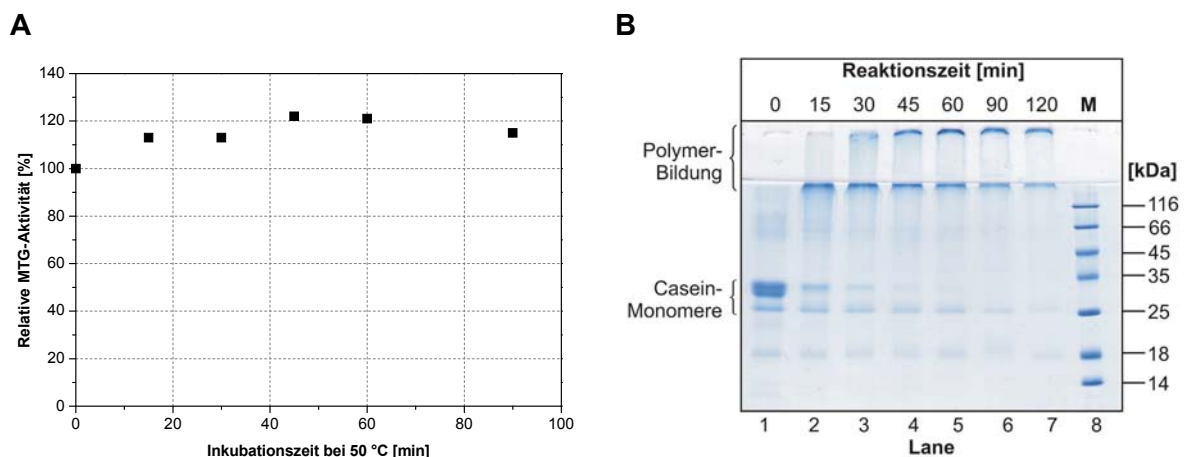


Abbildung 3-9: Untersuchung der MTG-Aktivität und Vernetzungsreaktion von Na-Caseinat mittels MTG im Filmansatz bei 50 °C. **A**, Relative Aktivität von MTG (TG Activa[®]WM) in Abhängigkeit der Inkubationszeit in einer Na-Caseinat Filmlösung bei 50 °C. Die MTG-Aktivität wurde direkt nach Probenahme unter Verwendung des Hydroxamat-Tests gemessen. Werte in Tabelle 7-3. **B**, SDS-PAGE Analyse einer Na-Caseinat Filmlösung in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit MTG (TG Activa[®]WM) bei 50 °C. Proben (100 µL) wurden der filmbildenden Lösung entnommen, 1:50 mit 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 verdünnt, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Coomassie-Färbung. M...Molekulargewichtsmarker.

Die Untersuchung des Einflusses von einigen in der Literatur verwendeten Enzym-Reaktionsbedingungen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen wurde wie in Abschnitt 2.3.2.3 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden folgende Reaktionsparameter gewählt: (1) MTG-Zugabe bei 50 °C, Filmtrocknung bei RT für 48 h, in Anlehnung an [Oh et al., 2004]. (2) MTG-Zugabe und Filmtrocknung für 24 h bei 50 °C [Di Pierro et al., 2006]. (3) MTG-Reaktion bei 50 °C für 15 min, Inaktivierung bei 90 °C für 10 min, Filmtrocknung bei RT für 48 h, in Anlehnung an [Chambi and Grosso, 2006]. Die Zugeigenschaften der verschiedenen Proteinfilme sind in Abbildung 3-10 dargestellt.

Temperatur und Zeit der Vernetzungsreaktion beeinflussten die Zugeigenschaften der Na-Caseinat-Filme entscheidend. Die Filme, welche mit den Reaktionsparametern (1) hergestellt wurden, besaßen mit einer ZF von 4 N/mm² und einer BD von 184 % die höchsten mechanischen Kennwerte. Die Filmtrocknung bei RT führte dabei zu festen und elastischen Proteinfilmen. Nach Trocknung der Na-Caseinat-Filme bei 50 °C, Reaktionsparameter (2), wurde ebenfalls eine ZF von 4 N/mm² erreicht. Jedoch waren die Filme im Vergleich zu einer Trocknung bei RT mit einer BD von nur 124 % wesentlich unelastischer. Offenbar resultierte die Enzymbehandlung des Na-Caseinats bei 50 °C in einen höheren Quervernetzungsgrad als bei RT, wobei ein festes Proteinnetzwerk mit schwindender Elastizität entstand. Damit führte eine Erhöhung der Reaktionstemperatur bei Na-Caseinat-Filmen von RT auf 50 °C zu einer konstanten ZF und einer Abnahme der BD. Na-Caseinat reagiert scheinbar anders auf die Enzymreaktionsparameter als z.B. isoliertes Sojaprotein, bei dem eine Temperaturerhöhung zu einer Abnahme von ZF und BD führte [Jiang et al., 2007]. Im Vergleich zu unvernetzten Filmen (ohne MTG, vgl. Abbildung 3-8) konnte mit der Enzym-Behandlung die ZF um 66 % erhöht werden. Mit einer Trocknung bei RT (1) wurde ebenfalls die BD der Filme um 40 % verbessert, wohingegen bei 50 °C (2) eine niedrigere BD (- 6 %) gemessen wurde. Damit konnten durch die Quervernetzung mittels MTG bei RT und das dadurch entstandene Proteinnetzwerk stärkere und elastischere Na-Caseinat-Filme hergestellt werden.

Eine definierte MTG-Reaktion für 15 min bei 50 °C, Reaktionsparameter (3), führte zu Na-Caseinat-Filmen mit einer ZF von 2,46 N/mm² und einer BD von 154 %. Im Vergleich zu Reaktion (1) und (2) waren diese Filme nur etwa halb so zugfest, besaßen jedoch eine höhere Elastizität als die Filme bei 50 °C. Im Vergleich zu unvernetzten Filmen (vgl. Abbildung 3-8) wurde durch die definierte MTG-Reaktion die ZF unbedeutend um 2 % und die BD um 17 % erhöht. Die Ursache dafür liegt in der unvollständigen Vernetzung durch MTG nach 15 min bei 50 °C (vgl. Abbildung 3-9 B). Das gebildete Proteinnetzwerk war für eine Erhöhung der ZF nicht ausgeprägt genug, jedoch ausreichend, um die BD positiv zu beeinflussen.

Der Vorteil einer definierten MTG-Reaktion ist die Reproduzierbarkeit der Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen. Jedoch reichte eine Reaktionszeit von 15 min bei 50 °C für eine vollständige Vernetzung des Proteins nicht aus und führte zu niedrigen mechanischen Kennwerten. Die Trocknung der Na-Caseinat-Filme bei 50 °C war mit 24 h zwar wesentlich schneller als bei RT (48 h), erzielte jedoch unelastischere Filme. Somit wurde wegen der besten mechanischen Eigenschaften für die folgenden Filmherstellungen die Enzymreaktionsbedingungen (1) – MTG-Zugabe bei 50 °C und Filmtrocknung bei RT für 48 h – gewählt (Standardverfahren, vgl. Abschnitt 2.3.2.1).

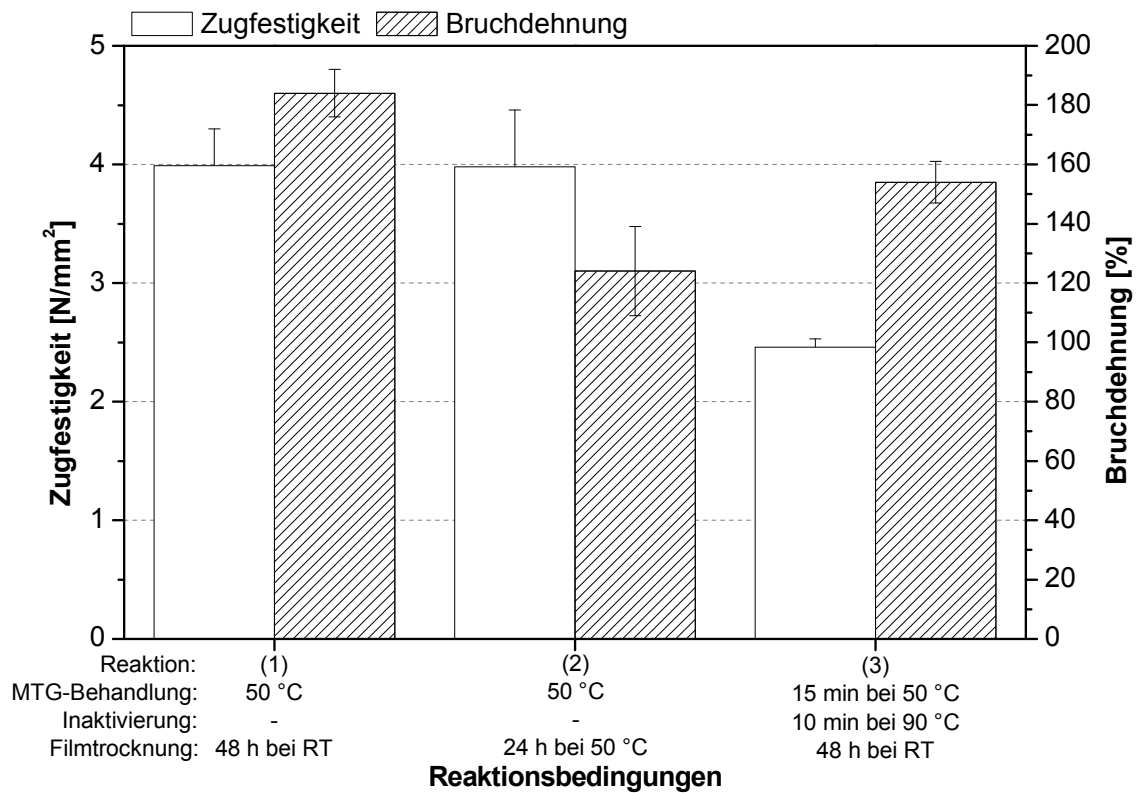


Abbildung 3-10: Einfluss der MTG-Reaktionsbedingungen auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen. 6 g Na-Caseinat und 3 g Glycerin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben, anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, Zeiten und Temperaturen der MTG-Reaktion und Filmtrocknung sind im Graph angegeben, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-6. MTG...mikrobielle Transglutaminase, RT...Raumtemperatur.

3.2 Charakterisierung von Filmen aus pflanzlichen Proteinen im Vergleich zu Na-Caseinat und Gelatine

In Kapitel 3.1 konnte gezeigt werden, dass sich aus Na-Caseinat stabile und elastische Filme herstellen lassen, deren mechanische Eigenschaften durch eine Quervernetzung mittels MTG noch verbessert werden konnten. Als zweites Protein tierischen Ursprungs kam Gelatine zum Einsatz. Im Vergleich dazu sollte der Einsatz von pflanzlichen Proteinen, wie z.B. aus Erbse, Kartoffel oder Raps, zur Herstellung von Filmen untersucht und diese bezüglich mechanischer Eigenschaften, Bioabbaubarkeit und Löslichkeit charakterisiert werden.

3.2.1 Einsatz pflanzlicher Proteine

Für diese Arbeit wurden verschiedene Proteine pflanzlichen Ursprungs, welche z.B. in der Stärkeherstellung als Seitenströme anfallen, von verschiedenen Firmen zur Verfügung gestellt. Diese Proteine durchliefen Prozesse mit z.T. extremen Temperaturen und pH-Werten. Deshalb sollte zuerst geklärt werden, welche pflanzlichen Proteine zur Herstellung von Filmen geeignet sind.

3.2.1.1 Vernetzbarkeit mittels MTG (TG Activa[®]WM)

Zunächst wurde die Vernetzbarkeit der Proteine aus verschiedenen pflanzlichen Quellen mittels MTG wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-11 dargestellt.

Das untersuchte Erbsenprotein (Abbildung 3-11 A) wies fünf Haupt-Proteinbanden mit mittlerem M_w von 25-66 kDa und einige niedermolekulare ($M_w < 25$ kDa) Proteinbanden (Lane 3) auf. Durch MTG-Zugabe konnte schon nach 2 min (Lane 4) eine deutliche Quervernetzung des Erbsenproteins durch eine Verschiebung der Proteinbanden zu einem höheren M_w detektiert werden. Nach 5 min (Lane 5) waren annähernd alle Haupt- und der größte Teil der niedermolekularen Proteinbanden nicht mehr im Gel sichtbar. Nach 120 min (Lane 10) war lediglich eine Erbsenprotein-Bande im Gel erkennbar – bei 18 kDa. Das restliche Protein wurde mittels MTG quervernetzt und konnte durch das hohe M_w z.T. nicht mehr in Trenn- bzw. Sammelgel eindringen. Die Bande bei 38 kDa entspricht der MTG-Kontroll-Bande (Lane 2).

In dem Kartoffelprotein (Abbildung 3-11 B) befanden sich hauptsächlich Proteinbanden mit einem M_w von 14-18 kDa und einige Proteinbanden ($M_w = 25-45$ kDa) mit geringeren Konzentrationen (Lane 3) im Vergleich zu Erbsenprotein. Mit eingesetzten 10 mg Feststoff pro mL Puffer war nur ein geringer Teil an Protein auf dem Gel sichtbar. Die Ursache dafür war eine geringe Löslichkeit des Proteins in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (Feststoff hatte sich nicht komplett gelöst) oder könnte aufgrund eines niedrigen Proteinanteils im Ausgangsmaterial sein. Durch Zugabe von MTG konnte eine Quervernetzung detektiert werden – die Konzentration der einzelnen Proteinbanden nahm ab und es entstanden Polymere, deren M_w zu groß für das Passieren des Trenngels waren (> 116 kDa). Dabei lief die Vernetzungsreaktion wesentlich langsamer ab als bei dem Erbsenprotein – über den gesamten Zeitraum von 120 min nahm die Konzentration der Proteinbanden stetig ab und

die Konzentration der Produkte stieg beständig. Die Quervernetzungsreaktion war nach 120 min nicht abgeschlossen, wohingegen das Erbsenprotein nach nur 5 min nahezu vollständig quervernetzt war.

Bei Rapsprotein (Abbildung 3-11 C) war eine Konzentration von 100 mg Feststoff / mL Puffer nötig, um das Protein im Gel sichtbar zu machen. Erkennbar waren einige niedermolekulare Proteinbanden ($M_w < 35$ kDa, Lane 3). Nach Zugabe von MTG war über einen Zeitraum von 120 min keine Veränderung in Konzentration oder Molekulargewicht der Proteinbanden feststellbar – unter den verwendeten Bedingungen ließ sich Rapsprotein nicht mittels MTG quervernetzen.

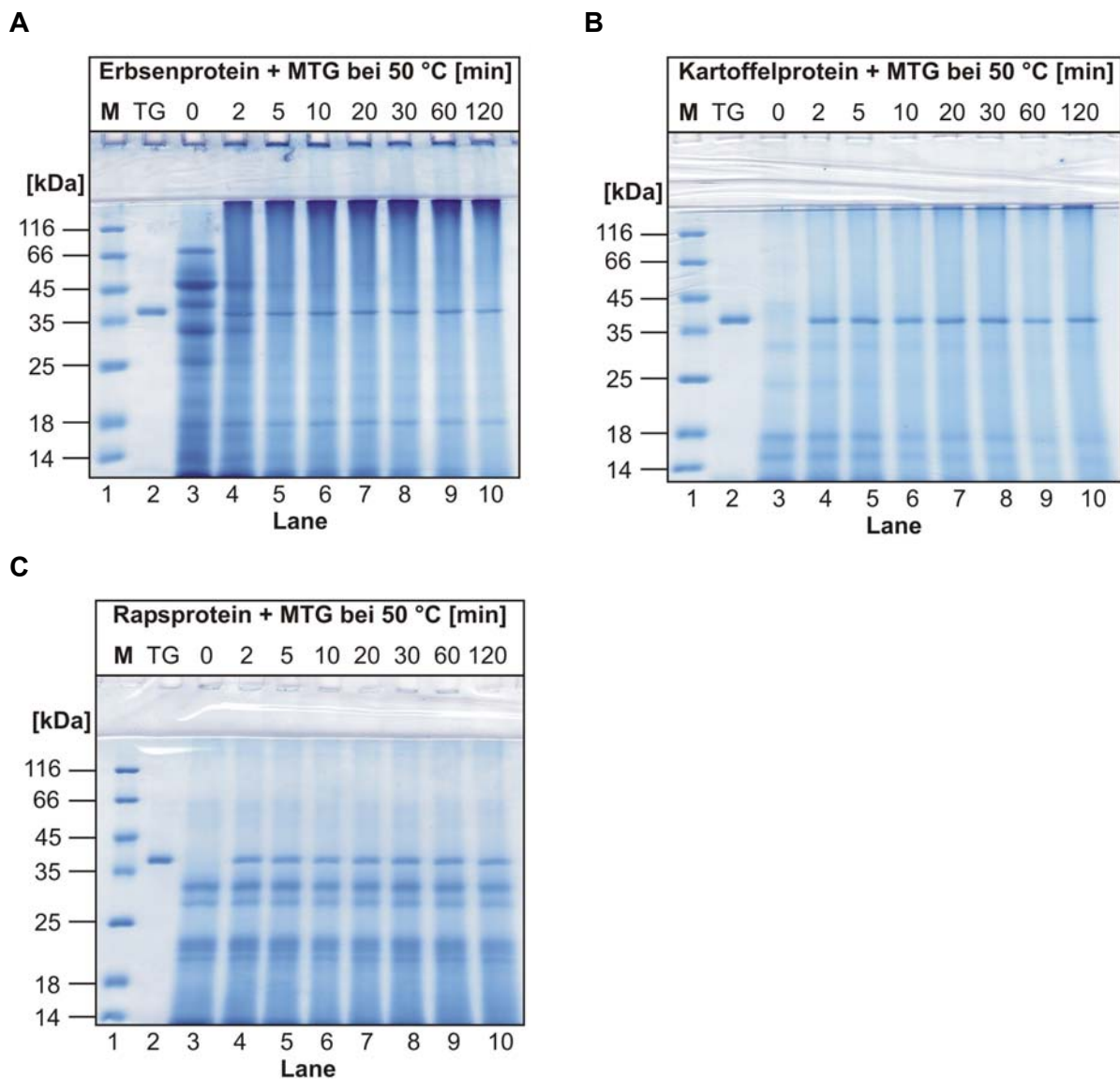


Abbildung 3-11: SDS-PAGE Analyse der Vernetzbarkeit von pflanzlichen Proteinen in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit MTG (TG Activa[®]WM) bei 50 °C. **A**, Erbsenprotein (Fraktion N^o1); **B**, Kartoffelprotein; **C**, Rapsprotein. Reaktionsansatz mit 10 mg/mL Proteinpulver (Erbsen und Kartoffel) bzw. 100 mg/mL Proteinpulver (Raps) und 13 mg/mL TG Activa[®]WM. Proben (50 µL) wurden dem Reaktionsansatz entnommen, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 µL Probe und 5 µL Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Coomassie-Färbung. M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, TG...TG Activa[®]WM (13 mg/mL).

Ebenfalls untersucht wurde Protein aus Roggen, Mais und Weizen. Bei einer Konzentration von bis zu 100 mg Feststoff / mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) konnten in allen drei Fällen keine Proteinbanden im Gel der SDS-PAGE detektiert werden, weshalb an dieser Stelle auf eine Abbildung der Gele verzichtet wurde. Die Ursache dafür lag in der sehr geringen Löslichkeit der Proteine in dem verwendeten Puffer begründet.

3.2.1.2 Filmherstellung

Die Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben mit dem Standardverfahren hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-12 dargestellt.

Erbsen- und Kartoffelprotein erwiesen sich durch ihre Vernetzbarkeit mittels MTG als ein geeignetes Material für die Herstellung von Filmen (vgl. Abschnitt 3.2.1.1). Unter Verwendung des Weichmachers Glycerin konnten mit dem Standardverfahren erfolgreich Proteinfilme hergestellt werden (Abbildung 3-12 A-D). Diese waren jedoch nach Trocknung und Konditionierung (bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF) klebrig und weich. Die Filme aus Erbsenprotein wiesen eine leichte Gelbfärbung auf, wohingegen die Filme aus Kartoffelprotein eine bräunliche Färbung zeigten. Im Vergleich dazu zeigten sich die Filme aus Na-Caseinat und Gelatine stabiler und nicht klebrig. Na-Caseinat-Filme waren leicht gelblich und Gelatine-Filme transparent. Alle Filme besaßen eine Dicke von 200-250 µm.

Wegen mangelnder Vernetzbarkeit mittels MTG oder Unlöslichkeit in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (vgl. Abschnitt 3.2.1.1) erschienen die verfügbaren Proteine aus Raps, Roggen, Mais und Weizen nicht für eine Filmherstellung geeignet. Dennoch wurden diese Proteine dem Standardverfahren zur Herstellung von Filmen unter Verwendung des Weichmachers Glycerin unterzogen. Aus allen vier Quellen war die Herstellung von Proteinfilmen nicht möglich (Abbildung 3-12 E-H). Die Proteine waren unter den Herstellungsbedingungen nur geringfügig löslich – nach dem Entgasen durch Zentrifugation trennte sich ein deutliches Sediment ab, welches vor dem Gießprozess vorsichtig wieder zu einer Suspension verrührt wurde. Mit Raps- und Weizenprotein bildeten sich zusammenhängende Schichten, die partiell eine sehr klebrige bzw. pulvrige Konsistenz aufwiesen, jedoch nicht aus den Gießformen entfernt werden konnten (Abbildung 3-12 E und H). Nach dem Trocknen des Roggenproteins entstand eine pulvrige Schicht, die keinen zusammenhängenden Film bildete (Abbildung 3-12 F). Das Maisprotein bestand aus einem feinen Granulat, welches sich unverändert nach dem Trocknen in der Gießform wiederfand (Abbildung 3-12 G).

Bei dem Protein aus Mais bzw. Weizen handelte es sich laut Erzeuger um wasserunlösliche Proteinfractionen. Zein und Gluten sind die Haupt-Proteinfractionen aus Mais bzw. Weizen, welche in Alkohol (z.B. 70 % Ethanol) löslich sind. Eine Filmherstellung aus diesen Proteinen wurde bereits in einigen Publikationen beschrieben [Lai and Chiang, 2006; Lawton, 2004; Oh et al., 2004; Wang et al., 2005]. Da MTG in Alkohol jedoch nicht stabil ist sondern ausfällt [Zotzel, 2002], wurden diese Proteine nicht weiter verwendet.

Von den in dieser Arbeit verfügbaren Proteinen aus der Industrie konnten lediglich aus Erbsen- und Kartoffelprotein erfolgreich Filme hergestellt und die Proteine enzymatisch mittels MTG quervernetzt werden.

A, Erbsenprotein Fraktion N°1



B, Kartoffelprotein



C, Na-Caseinat



D, Gelatine 300 Bloom



E, Rapsprotein



F, Roggenprotein



G, Maisprotein



H, Weizenprotein



Abbildung 3-12: Filmherstellung aus pflanzlichen Protein im Vergleich zu tierischen Proteinen, ohne MTG-Behandlung. 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert, 6 mL vorgewärmter Puffer hinzugefügt und anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert (nur für Na-Caseinat), Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Für Gelatine: Protein zusammen mit Maltodextrin in Puffer-Glycerin-Mischung für 1 h bei RT quellen gelassen, dann erst bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung bei 40 °C, da Gelatine sonst gelierte.

3.2.2 Mechanische Charakterisierung

Die mechanische Charakterisierung ist für Kunststofffolien sehr bedeutend. Dabei nimmt der Zugversuch in der Kunststoffprüfung eine Vorrangstellung ein [Grellmann and Seidler, 2005]. Die aus Erbsen- und Kartoffelprotein hergestellten Filme (vgl. Abschnitt 3.2.1.2) wurden mit Hilfe des Zug-, Weiterreiß- und Durchstoßversuches charakterisiert und mit den mechanischen Kennwerten der Filme aus tierischen Proteinen verglichen.

Aufgrund sehr hoher Klebrigkeit waren die Kartoffelprotein-Filme schlecht handhabbar und konnten nur eingeschränkt charakterisiert werden. Bei unvernetzten Filmen (-MTG) war nur der Zugversuch möglich, bei vernetzten Filmen (+MTG) konnten die Zug- und Weiterreiß-eigenschaften bestimmt werden. Der Durchstoßversuch war mit Kartoffelprotein-Filmen nicht möglich.

3.2.2.1 Zugversuch

Die Zugeigenschaften der Proteinfilme wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-13 dargestellt.

Filme aus Erbsen- bzw. Kartoffelprotein waren mechanisch sehr instabil – ZF und BD betragen 0,34-0,82 N/mm² bzw. 17-79 %. Für Na-Caseinat-Filme wurden ZF von 2,41-3,99 N/mm² und BD von 132-184 % gemessen. Gelatine-Filme besaßen mit 6,61-7,86 N/mm² die höchste ZF, waren mit einer BD von 72-122 % jedoch weniger elastisch im Vergleich zu Na-Caseinat-Filmen. Damit waren die tierischen Proteine den pflanzlichen Proteinen bezogen auf die mechanischen KW der Filme weit überlegen. Die ZF und BD der Filme aus pflanzlichen Proteinen betrug lediglich 4-14 % bzw. 9-23,6 % der KW von Filmen aus tierischen Proteinen. Eine Behandlung mit MTG und damit verbundene Quervernetzung der Proteine führte generell zu einer Erhöhung der Zugeigenschaften – die ZF stieg um 66 % für Na-Caseinat bzw. 141 % für Erbsenprotein und die BD wurde um 39-172 % erhöht. Im Falle von Gelatine resultierte die Quervernetzung in eine niedrigere ZF (um 16 %). Bei Verwendung von Kartoffelprotein wurde eine konstante ZF und annähernd halbierte BD gemessen.

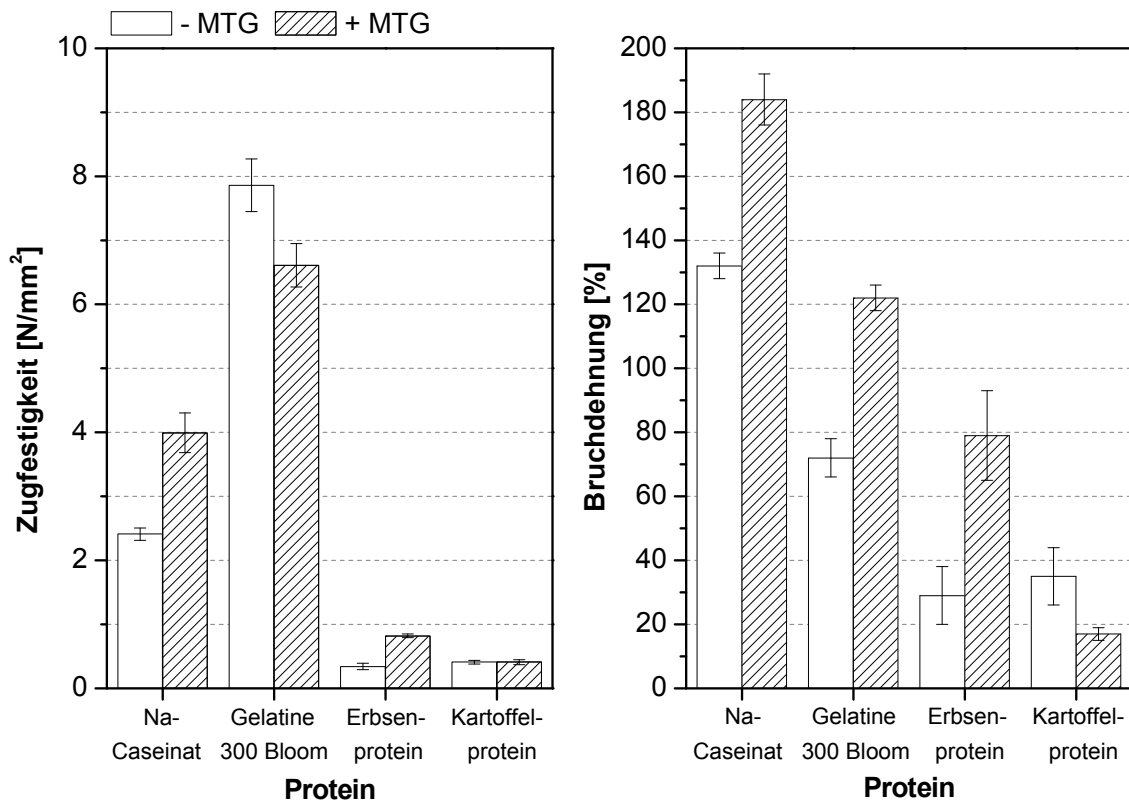


Abbildung 3-13: Einfluss der Quervernetzung auf die Zugeigenschaften von Filmen aus verschiedenen Proteinen. 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert (nur für Na-Caseinat), Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Für Gelatine: Protein zusammen mit Maltodextrin (Filme ohne MTG) in Puffer-Glycerin-Mischung für 1 h bei RT quellen gelassen, dann erst bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung bei 40 °C, da Gelatine sonst gelierte. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-7. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

3.2.2.2 Weiterreißversuch

Der Weiterreißversuch wurde als zweite mechanische Prüfmethode verwendet. Dabei wird die Zugbeanspruchung einer bereits geschädigten Probe (definierter Schnitt) simuliert, wie es z.B. beim Ver- oder Entpacken von Filmrollen bzw. Auslegen eines Landwirtschaftsfilms auf dem Feld auftreten kann. Dabei wird der Widerstand des Films gegen ein Weiterreißen gemessen. Der Versuch wurde wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

Vergleichbar zu den Zugeigenschaften wurde beim Weiterreißversuch ebenfalls eine höhere mechanische Stabilität der Filme aus tierischen Proteinen als bei Filmen aus pflanzlichen Proteinen beobachtet. Für unvernetzte Na-Caseinat- und Gelatine-Filme wurden Weiterreißwiderstände von 30,4 bzw. 32,4 N/mm gemessen. Der Weiterreißwiderstand des Erbsenprotein-Films war mit 6,9 N/mm um 21-23 % kleiner. Unvernetzte Kartoffelprotein-Filme konnten nicht vermessen werden, da die Proben bereits bei der Dickenmessung aufgrund hoher Klebrigkeit beschädigt wurden.

Eine Quervernetzung der Proteine mittels MTG führte bei den Filmen aus Erbsen- bzw. Kartoffelprotein zu einer Erhöhung des Weiterreißwiderstandes, wohingegen bei Na-Caseinat und Gelatine eine Abnahme des Widerstandes gemessen wurde. Für Gelatine betrug diese Abnahme 67 %. Im Falle von Na-Caseinat war die Standardabweichung der Messungen mit 32 % sehr hoch, womit die Abnahme des Weiterreißwiderstandes nicht genügend aussagekräftig ist.

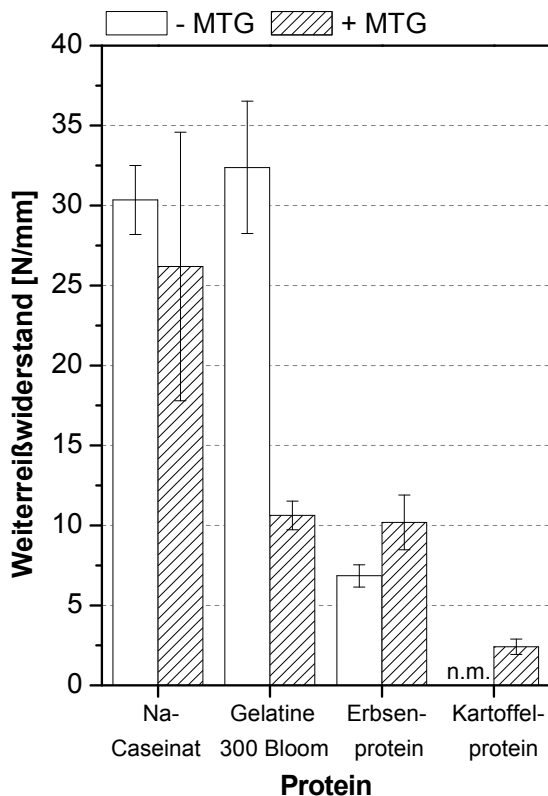


Abbildung 3-14: Einfluss der Quervernetzung auf den Weiterreißwiderstand von Filmen aus verschiedenen Proteinen. 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert (nur für Na-Caseinat), Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Für Gelatine: Protein zusammen mit Maltodextrin (Filme ohne MTG) in Puffer-Glycerin-Mischung für 1 h bei RT quellen gelassen, dann erst bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung bei 40 °C, da Gelatine sonst gelierte. Einspannlänge 50 mm, Prüfgeschwindigkeit 100 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-7. MTG...mikrobielle Transglutaminase, n.m...nicht messbar.

3.2.2.3 Durchstoßversuch

Als dritte Methode zur mechanischen Charakterisierung wurde der Durchstoßversuch gewählt. Dabei wird der Probekörper mit einem Fallbolzen durchstoßen und unterliegt einer biaxialen Beanspruchung – dies simuliert z.B. die Schädigung eines Landwirtschaftsfilms durch Hagelkörner. Das Durchstoßverhalten der Proteinfilme wurde wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-15 dargestellt.

Die Kennwerte des Durchstoßversuches sind die Schädigungskraft, die Schädigungsverformung und die Schädigungsenergie. Für Gelatine-Filme musste mit 534-665 N die

höchste Kraft zum Durchstoßen des Films aufgebracht werden. Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme wurden schon mit 182-193 N bzw. 84-101 N beschädigt – dies entspricht etwa 30 bzw. 15 % der für Gelatine-Filme benötigten Kraft.

Die Quervernetzung mittels MTG führte dabei zu keiner wesentlichen Änderung der Schädigungskraft – lediglich für Gelatine resultierte die MTG-Behandlung, wie zuvor bei ZF und Weiterreißwiderstand, in eine Abnahme der Schädigungskraft.

Die Schädigungsverformung gibt Auskunft über die Dehnbarkeit des Materials bei Belastung, vergleichbar mit der Bruchdehnung beim Zugversuch. Jedoch im Gegensatz zur BD war die Schädigungsverformung für alle Proteinfilme mit 18,2-21,2 mm ähnlich. Hierbei konnte die Verformung für Gelatine- und Erbsenprotein-Filme durch eine MTG-Behandlung erhöht werden. Dies entspricht den Ergebnissen des Zugversuches, wobei die Bruchdehnung ebenfalls durch eine Vernetzung der Proteine verbessert werden konnte (vgl. Abschnitt 3.2.2.1).

Die Schädigungsenergie verhielt sich proportional zur Kraft – für Gelatine-Filme wurde mit 4,5-4,8 J die höchste Energie zur Schädigung der Probe benötigt, wohingegen bei Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filmen lediglich ein Drittel (1,5-1,7 J) bzw. Fünftel (0,8-1 J) der Energie zur Schädigung führte. Auf die Schädigungsenergie hatte die Quervernetzung der Proteine mittels MTG einen unwesentlichen Einfluss.

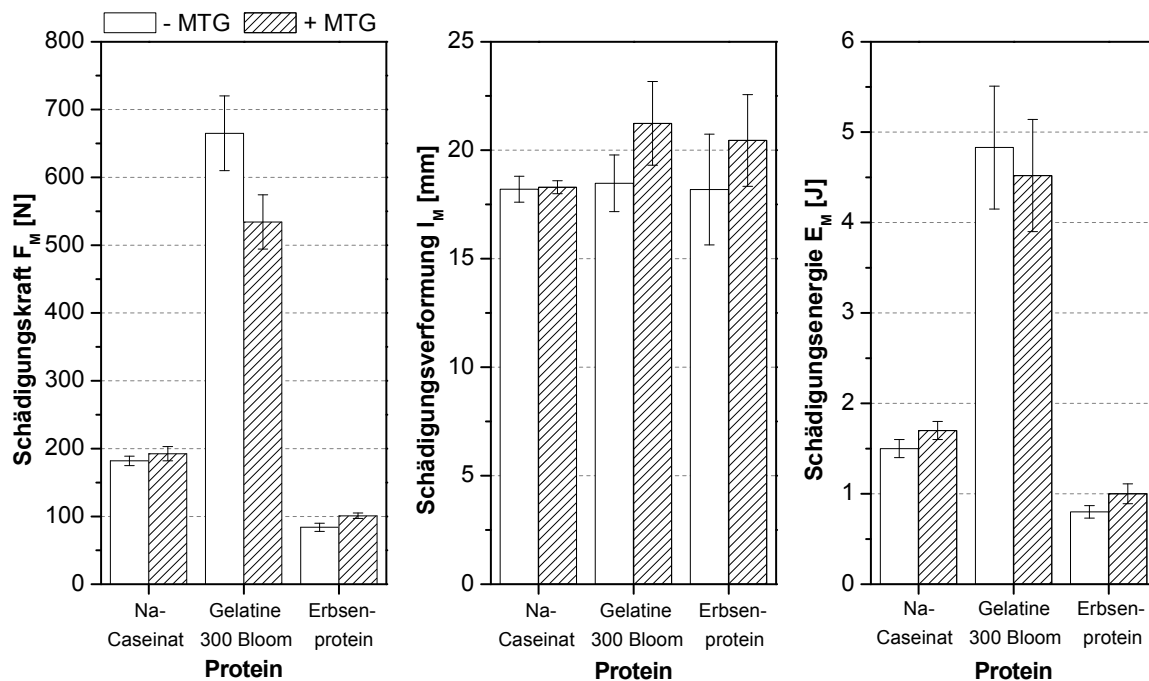


Abbildung 3-15: Einfluss der Quervernetzung auf die Kennwerte des Durchstoßversuches von Filmen aus verschiedenen Proteinen.

6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert (nur für Na-Caseinat), Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Für Gelatine: Protein zusammen mit Maltodextrin (Filme ohne MTG) in Puffer-Glycerin-Mischung für 1 h bei RT quellen gelassen, dann erst bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung bei 40 °C, da Gelatine sonst gelierte. Probendimensionen 60 x 60 mm, Fallhöhe des Bolzens 0,99 m, Fallgeschwindigkeit des Bolzens 4,4 m/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-8. MTG...mikrobielle Transglutaminase, n.m...nicht messbar.

Ein weiteres Merkmal zur Auswertung des Durchstoßversuches ist die Schädigungsart. Dabei wird die Rissausbreitung betrachtet. In Abbildung 3-16 ist jeweils ein Probekörper der Proteinfilme nach dem Durchstoßversuch abgebildet. Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme wurden glatt vom Fallbolzen durchstoßen, was auf ein weiches Material hinweist. Im Gegensatz dazu wurde bei Gelatine-Filmen eine instabile Rissbildung beobachtet, die auf ein spröderes Material schließen lässt. Dies steht im Zusammenhang mit der höheren Kraft, die für Gelatine-Filme zur Schädigung aufgebracht werden muss.

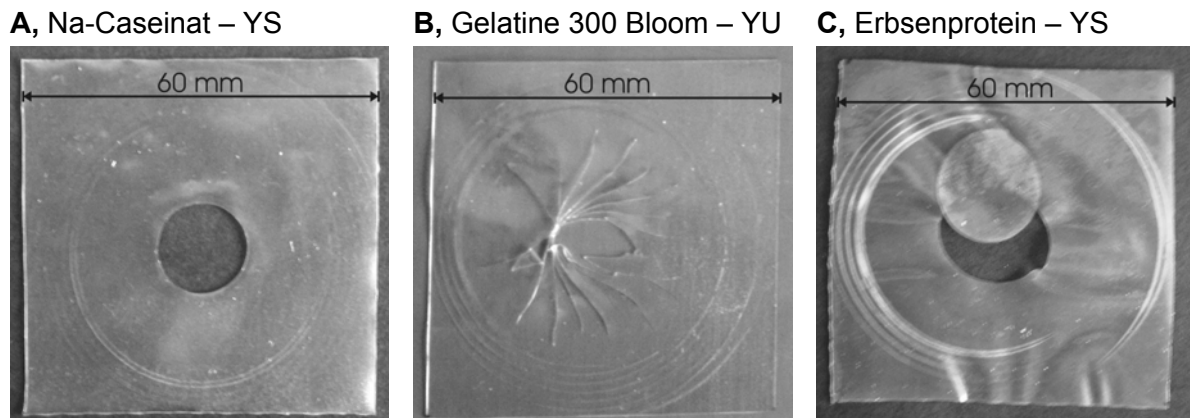


Abbildung 3-16: Schädigungsarten der Proteinfilme infolge des Durchstoßversuchs. YS...Fließen mit stabiler Rissbildung, YU...Fließen mit instabiler Rissbildung.

3.2.3 Löslichkeit in Wasser

Neben der mechanischen Stabilität von Proteinfilmen ist die Löslichkeit der Filme ebenfalls von Bedeutung – z.B. Landwirtschaftsfilme sind den verschiedensten Witterungsbedingungen wie Regen ausgesetzt. Dafür wurde ein Löslichkeitstest durchgeführt, bei dem eine Filmprobe bei 30 °C in Wasser getaucht wurde – dies simulierte einen starken Niederschlag bei sommerlichen Temperaturen. Die Untersuchung der Löslichkeit von Proteinfilmen in Wasser wurde wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-17 dargestellt.

Die unvernetzten Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme lösten sich während des Versuches fast vollständig auf – der Gewichts- und Proteinverlust lag bei 79-95 % bzw. 51-56 %. Gelatine zeigte mit 17 % Gewichtsverlust eine deutlich geringere Löslichkeit. Prinzipiell schmelzen Gelatinen je nach Geliergrad erst zwischen 25 und 35 °C [Babel, 1996]. Für die Herstellung der Filme wurde eine Gelatine mit einem hohen Geliergrad (300 Bloom) verwendet, welche offensichtlich bei 30 °C nur geringfügig schmolz – dies spiegelte sich in dem geringen Proteinverlust von 6 % wider. Der unvernetzte Kartoffelprotein-Film war für eine Präparation von Proben zu klebrig, deshalb wurde der Löslichkeitstest für diesen Film nicht durchgeführt.

Durch eine Quervernetzung mittels MTG konnte die Löslichkeit der Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme erheblich verringert werden – der Gewichts- und Proteinverlust sank auf 39 % bzw. 6-23 %. Für den MTG behandelten Kartoffelprotein-Film wurde ein wesentlich höherer Gewichts- und Proteinverlust von 71 bzw. 40 % gemessen. Die Ursache dafür lag vermutlich in der geringeren Vernetzbarkeit von Kartoffelprotein im Vergleich zu Erbsen-

protein (vgl. Abschnitt 3.2.1.1) – durch weniger Quervernetzungen konnte noch ein erheblicher Proteinanteil aus dem Film herausgelöst werden. Die MTG-Behandlung führte bei Gelatine-Filmen zu einer höheren Löslichkeit von 35 bzw. 14 % für Gewichts- und Proteinverlust.

Der Proteinverlust der vernetzten Filme war deutlich kleiner als der Gewichtsverlust – es hat sich demnach nicht nur Protein aus den Filmen herausgelöst. Mit 28,6 % (w/w) bestanden die Proteinfilme annähernd zu einem Drittel aus dem Weichmacher Glycerin, welcher gut wasserlöslich ist. Die Filmrückstände waren nach dem Löslichkeitstest sehr spröde – der größte Anteil der Gewichtsverluste war demnach gelöstes Glycerin.

Des Weiteren betragen die Proteinverluste der unvernetzten Filme weniger als 60 % obwohl Gewichtsverluste von bis zu 95 % gemessen wurden. Eine mögliche Ursache dafür könnte in der Methode zur Messung der Proteinkonzentration liegen. Der verwendete BCA-Test (vgl. Abschnitt 2.2.2) wurde standardmäßig mit Rinderserum Albumin (BSA) kalibriert. Jedoch reagieren Proteine unterschiedlich auf diesen Test [Smith et al., 1985]. Da das verwendete Erbsen- und Kartoffelproteinpulver aus einem Gemisch von Proteinen bestand (vgl. Abschnitt 3.2.1.1), wurden wahrscheinlich keine exakten Proteinkonzentrationen gemessen. Für Gelatine z.B. wurde eine vergleichsweise niedrigere Extinktion im Test gemessen als für BSA [Smith et al., 1985].

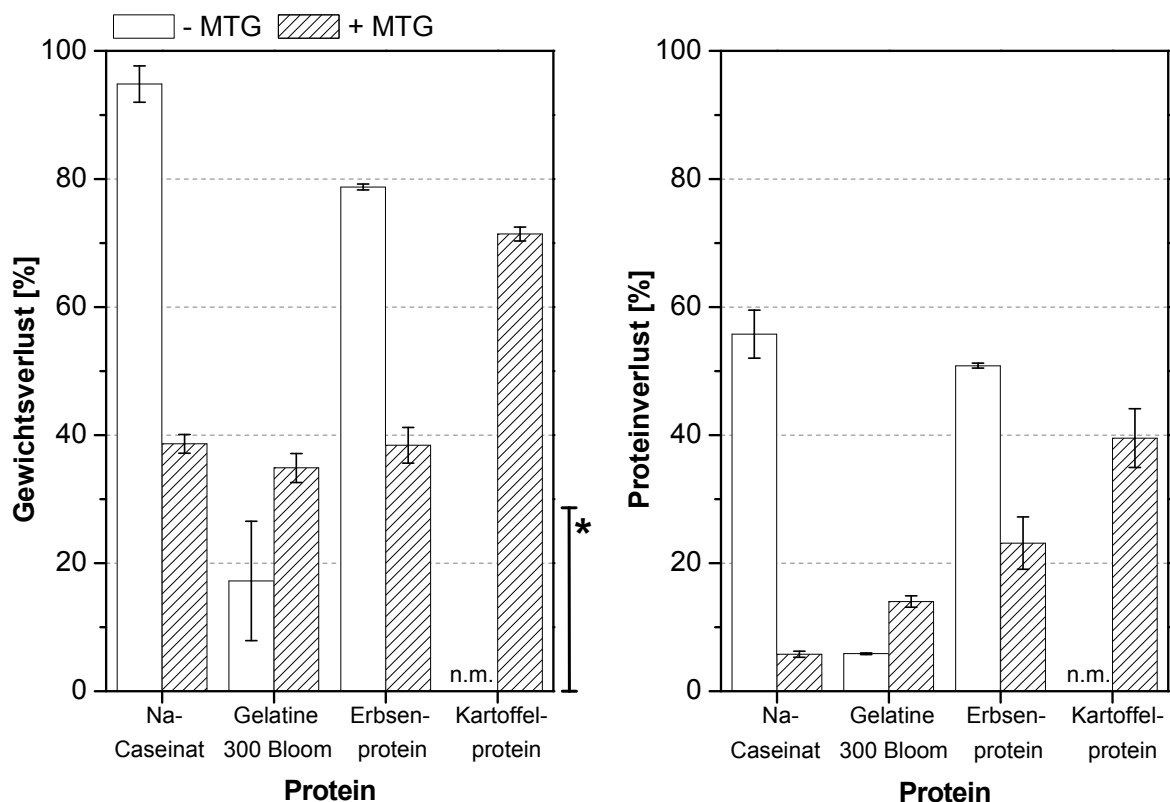


Abbildung 3-17: Einfluss der Quervernetzung auf die Löslichkeit von Proteinfilmen in Wasser. 10 x 50 mm Filmproben in 10 mL dH₂O für 10 min bei 30 °C und 80 rpm geschüttelt, Zentrifugation für 5 min bei 2000xg und RT, Pellet (Filmrückstand) und Überstand (gelöster Anteil) bei 70 °C getrocknet, zuvor von Überstand Proteinkonzentration bestimmt. $\bar{x} \pm s, n=3$. Werte in Tabelle 7-19. (*) Anteil Glycerin = 28,6 % (w/w). MTG...mikrobielle Transglutaminase, n.m...nicht messbar.

3.2.4 Regenbeständigkeit

Im zuvor durchgeführten Löslichkeitstest (vgl. Abschnitt 3.2.3) wurden die Proteinfilme extremen Bedingungen ausgesetzt – sie waren bei 30 °C vollständig in Wasser getaucht. Für realistischere Bedingungen wurde ein Bewitterungstest mit Beregnung in einem Gewächshaus etabliert. Dabei wurden die Filme bei Temperaturen (Tag: 22 °C, Nacht: 12 °C), Lichtverhältnissen (natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus) und Luftfeuchtigkeiten (Tag: 60 %, Nacht: 70 %) gelagert, die mit den Freilandverhältnissen in einem durchschnittlichen Juni in Deutschland vergleichbar waren. Zusätzlich wurden die Proteinfilme einer Beregnung unterzogen, wobei die Wassermenge einem durchschnittlichen Niederschlag in Deutschland im Monat Juni (2,9 mm pro Tag) entsprach [Statistik des Deutschen Wetterdienstes, Mittel von 1961-1990; DIN EN 13655]. Die Regenbeständigkeit von Proteinfilmen wurde wie in Abschnitt 2.2.5.3 beschrieben durch eine Bewitterung in einem Gewächshaus untersucht.

Das Ergebnis der Bewitterung am Beispiel eines unvernetzten Na-Caseinat-Films mit Glycerin als Weichmacher ist in Abbildung 3-18 dargestellt. Vor Bewitterung war der Film glatt und flexibel (Abbildung 3-18 A). Direkt nach der ersten Beregnung an Tag 1 (Abbildung 3-18 B) bildete sich ein Loch im Film und schon nach drei Tagen waren von dem unvernetzten Na-Caseinat-Film nur noch wenige Rückstände sichtbar (Abbildung 3-18 C) – damit betrug die Stabilität des Films null Tage.

A, Tag 1 (vor Bewitterung)



B, Tag 1 (nach 1. Beregnung)



C, Tag 3



Abbildung 3-18: Bewitterung eines Na-Caseinat-Films (ohne MTG) mit Glycerin als Weichmacher in einem Gewächshaus. 6 g Na-Caseinat, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 6 mL vorgewärmten Puffer zugegeben, anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet. Proben: 190 x 90 mm Film auf 1 L Blumenerde, Bewitterungsdauer: 7 d, Temperatur: 12-22 °C, relative Luftfeuchte: 60-70 %, Licht: natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus, Beregnung: aller 12 h für 1 min mit 19,75 mL je Filmprobe, nach Entnahme für 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert.

Das Ergebnis der Bewitterung eines mittels MTG vernetzten Na-Caseinat-Films mit Glycerin als Weichmacher ist in Abbildung 3-19 dargestellt. Vor Bewitterung war der Film glatt, flexibel und transparent (Abbildung 3-19 A). Schon nach einem Tag Beregnung war der Film teilweise gequollen und verfärbte sich weiß. Es waren mehrere Taschen sichtbar, die durch die Wassertropfen verursacht wurden und in denen sich das Beregnungswasser sammelte (Abbildung 3-19 B). An Tag 4 konnten am Boden dieser Taschen erste Löcher im Film beobachtet werden (Abbildung 3-19 D), die sich mit jedem weiteren Tag der Bewitterung ausbreiteten. Während der Bewitterung färbte sich der Film gelb bis braun und es bildete sich Schimmel auf Film und Erde.

Nach der Bewitterungsdauer von sieben Tagen wurde der Film von der Erde befreit – im Gegensatz zu dem unvernetzten Na-Caseinat-Film blieb ein zusammenhängendes Filmstück zurück (Abbildung 3-19 H). Nach einer Konditionierung bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem

Exsikkator war der Filmrest teilweise transparent, braun und aufgrund von herausgelöstem Glycerin brüchig. Mechanische Eigenschaften des bewitterten Films konnten deshalb nicht bestimmt werden. Die Stabilität des vernetzten Na-Caseinat-Films mit Glycerin betrug drei Tage – durch die MTG-Vernetzung konnte das Auflösen bzw. der Abbau des Films um drei Tage verzögert werden.

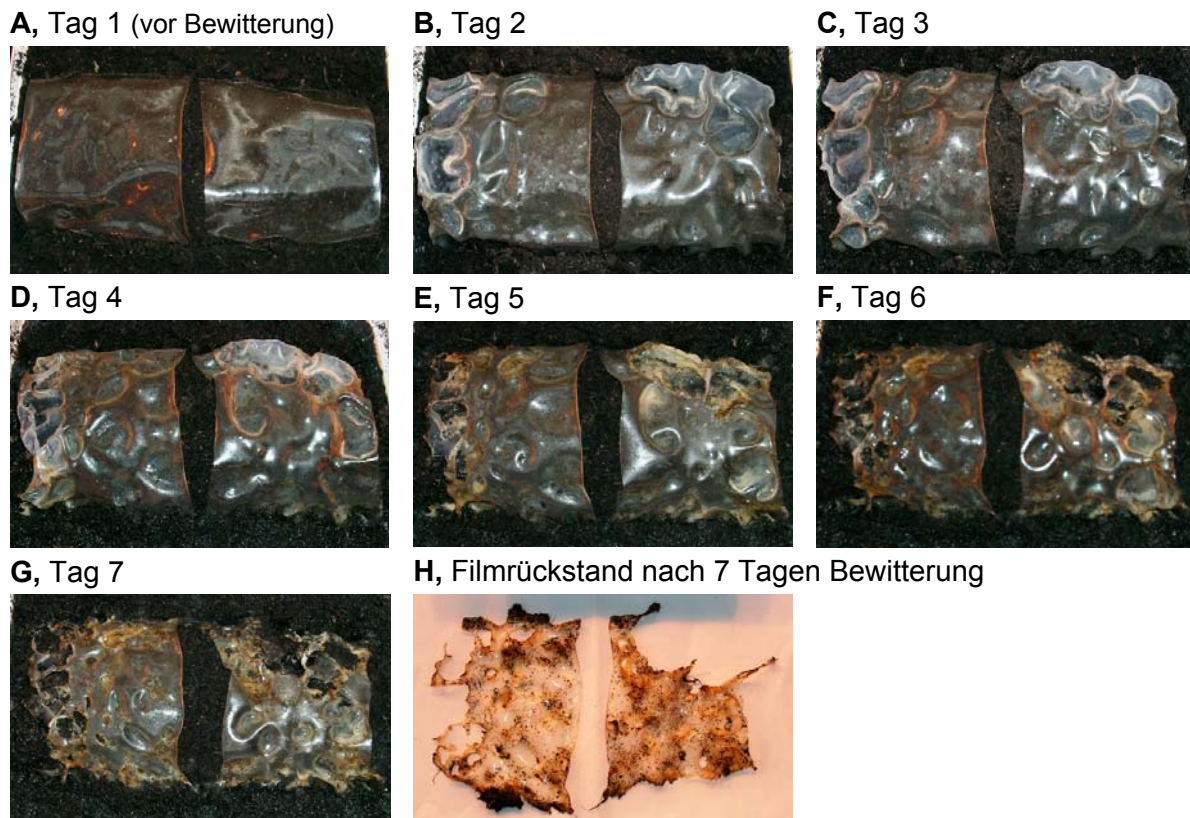


Abbildung 3-19: Bewitterung eines Na-Caseinat-Films (mit MTG) mit Glycerin als Weichmacher in einem Gewächshaus. 6 g Na-Caseinat und 3 g Glycerin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben, anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet. Proben: 190 x 90 mm Film auf 1 L Blumenerde, Bewitterungsdauer: 7 d, Temperatur: 12-22 °C, relative Luftfeuchte: 60-70 %, Licht: natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus, Beregnung: alle 12 h für 1 min mit 19,75 mL je Filmprobe, nach Entnahme für 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert.

Gelatine-Filme (300 Bloom) mit Glycerin als Weichmacher zeigten eine Regenbeständigkeit von fünf Tagen (ohne Abbildung). Dabei wurde kein Unterschied zwischen unvernetzten und vernetzten Filmen festgestellt. Nach drei bis vier Tagen konnte ein Schimmelbewuchs beobachtet werden und die zuvor transparenten Filme wurden trüb, weiß und grün. Nach der Bewitterungsdauer von sieben Tagen wurden die Filme entfernt. Nach der Konditionierung bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator waren die Filmreste ebenfalls aufgrund von herausgelöstem Glycerin brüchig. Mechanische Eigenschaften der bewitterten Filme konnten deshalb nicht bestimmt werden.

3.2.5 Biologische Charakterisierung

Für Anwendungen von Proteinfilmen in der Landwirtschaft als z.B. Ernteverfrühungsfilme ist neben der Löslichkeit deren Abbaubarkeit im Boden und Verträglichkeit auf Pflanzen von Bedeutung. Dies wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben.

3.2.5.1 Abbaubarkeit im Boden

Die Untersuchung der Abbaubarkeit von Proteinfilmen im Boden wurde wie in Abschnitt 2.2.6.1 beschrieben durchgeführt. Eine Übersicht der fotografischen Dokumentation befindet sich in Kapitel 7 (Tabelle 7-22).

Alle unvernetzten Proteinfilme waren schon nach einem Tag vollständig aufgelöst – es waren keine Filmreste in den Töpfen sichtbar. Die mittels MTG vernetzten Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme waren erst nach vier Tagen nicht mehr sichtbar. Die Quervernetzung resultierte somit in eine deutlich höhere Stabilität der Proteinfilme. Die Gelatine-Filme waren auch nach der Versuchsdauer von sieben Tagen noch sichtbar. Sie besaßen damit die höchste Beständigkeit gegen einen biologischen Abbau. Als Kontrolle wurde eine handelsübliche kompostierbare Folie (Einkaufstüte, vermutlich auf Basis von Stärke) verwendet. Sie zeigte keinerlei Abbauverhalten innerhalb des Versuchszeitraumes.

3.2.5.2 Pflanzenverträglichkeit und Düngeeffekt

Die Untersuchung der Pflanzenverträglichkeit und des Düngeeffektes von Proteinfilmen wurde wie in Abschnitt 2.2.6.2 beschrieben durchgeführt. Eine Übersicht der fotografischen Dokumentation der Versuchspflanzen nach Wachstum auf Proteinfilmen im Boden befindet sich in Kapitel 7 (Tabelle 7-23).

Alle Pflanzen wiesen durch den Kontakt zu Proteinfilmen keinerlei Mangelerscheinungen in Färbung, Größe oder Wuchsverhalten auf. Die oberirdische Frischmasse der Pflanzen, die auf den Proteinfilmen für 32 Tage kultiviert wurden, war höher als die der Kontrollpflanzen (ohne Film). Bei Mais betrug die Zunahme 3-18 % (Abbildung 3-20 A), bei Verwendung der langsam wachsenden Tagetes-Pflanzen 3-9 % (Abbildung 3-20 B). Die handelsübliche kompostierbare Folie zeigte keinen positiven Einfluss auf die Frischmasse der Pflanzen. Ein signifikanter Unterschied zwischen verwendeten Na-Caseinat-, Gelatine- oder Erbsenprotein-Filmen konnte nicht beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Wuchshöhe wurde deutlich, dass die Proteinfilme einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Maispflanzen ausübten (Abbildung 3-21 A) – sie waren 5-6 cm (6-8 %) höher als die Kontrollpflanzen. Auch dabei gab es keinen Unterschied zwischen den verwendeten Proteinfilmen. Die Tagetes-Pflanzen hingegen erlangten nur geringe Wuchshöhen, wobei mit Standardabweichungen von bis zu 20 % keine Aussagen über einen Einfluss der Proteinfilme getroffen werden können (Abbildung 3-21 B). Durch ihr langsames Wachstum eignen sich Tagetes-Pflanzen nicht für diese Untersuchungen, da die Ergebnisse nur geringe Aussagekraft besaßen. Ein Einfluss auf das Wachstumsverhalten nach 32 Tagen konnte hingegen gut bei Maispflanzen beobachtet werden, da diese relativ schnell wachsen.

Für statistische Aussagen sind allerdings mehr als fünf Wiederholungen je Pflanze und Variante nötig.

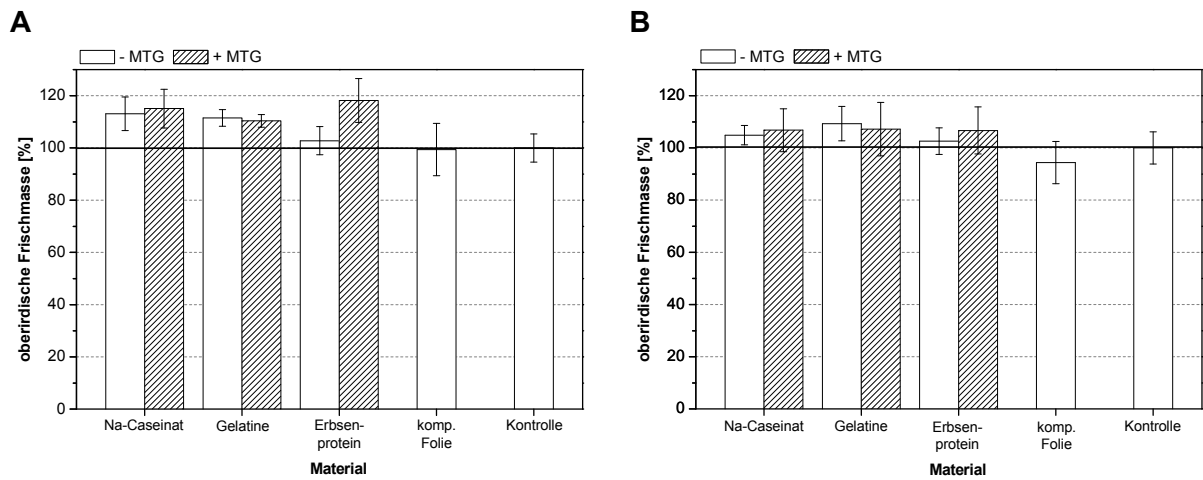


Abbildung 3-20: Einfluss der Proteinfilme (\pm MTG) auf den oberirdischen Frischmasse-Ertrag von Pflanzen. A, Mais; B, Tagetes (Studentenblume). Kultivierungsdauer 32 d, komp. Folie...eine handelsübliche kompostierbare Tragetasche, Kontrolle...Kultivierung ohne Film. $\bar{x} \pm s, n=3$. Werte in Tabelle 7-20. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

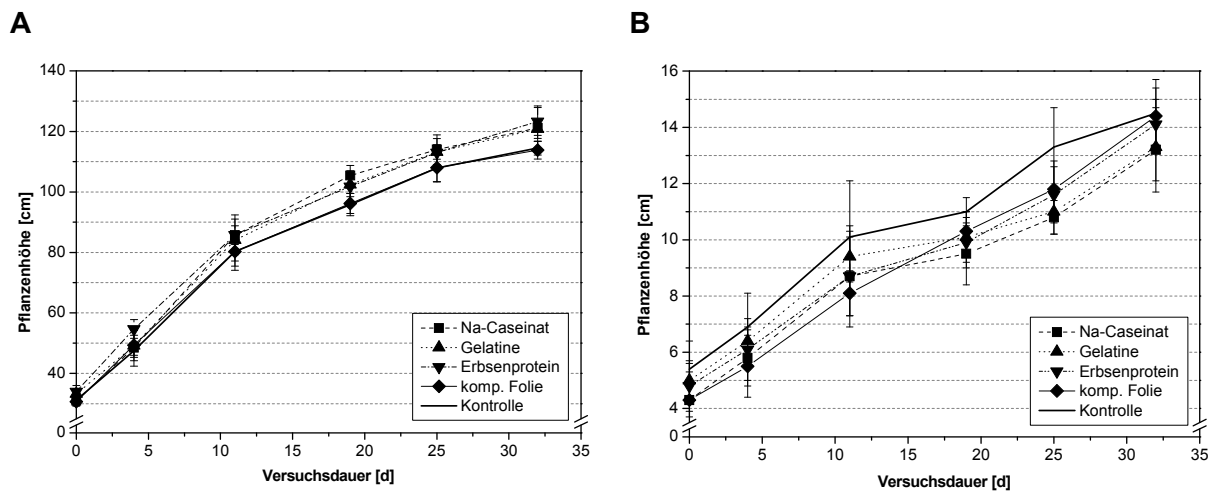


Abbildung 3-21: Einfluss der vernetzten Proteinfilme auf die Wachstumshöhe von Pflanzen. A, Mais; B, Tagetes (Studentenblume). Kultivierungsdauer 32 d, komp. Folie...eine handelsübliche kompostierbare Tragetasche, Kontrolle...Kultivierung ohne Film. $\bar{x} \pm s, n=3$. Werte in Tabelle 7-21.

3.3 Variation der Ausgangsstoffe / Additive zur Optimierung der Filmeigenschaften

Aus verschiedenen Proteinen konnten erfolgreich Filme hergestellt werden (vgl. Kapitel 3.2), die jedoch einige Defizite in ihren mechanischen Eigenschaften und in ihrer Wasserlöslichkeit zeigten. Diese Filmeigenschaften sollten durch Einsatz von Additiven bzw. veränderten Ausgangsstoffen optimiert werden.

3.3.1 Verschiedene Weichmacher und Beschichtung

Reine Proteinfilme sind wegen ihrer Wechselwirkungen zwischen den Proteinketten (Wasserstoff- und Disulfidbrücken, elektrostatische und hydrophobe Kräfte) häufig steif und brüchig. Weichmacher reduzieren diese Ketten-Wechselwirkungen, setzen die Glasübergangstemperatur der Proteine herab und erhöhen damit die Flexibilität der Filme. Ein häufig angewandeter Weichmacher ist Glycerin, der sich jedoch bei Kontakt mit Wasser aus dem Film herauslöst und der Film dadurch brüchig sowie instabil wird (vgl. Abschnitt 3.2.3 und 3.2.4). Durch Einsatz anderer Weichmacher bzw. einer Beschichtung der Proteinfilme soll ein Herauslösen und Verspröden verhindert werden. Alternativen wären z.B. verschiedene externe Weichmacher, die sich in Zusammensetzung und Molekulargewicht unterscheiden – sie gehen keine chemische Reaktion mit den Proteinen ein. Denkbar wären jedoch auch interne Weichmacher, welche kovalent an die Proteine gebunden werden und das Herauslösen aus dem Film demzufolge erschwert wäre.

3.3.1.1 Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration

Glycerin ist mit einem M_w von 92 g/mol ein kleines Molekül, weshalb es vermutlich zusätzlich zu seinem hydrophilen Charakter bei Kontakt mit Wasser leicht aus den Proteinfilmen herauslösbar ist. D.h. es liegt keine Diffusionslimitierung vor. Ethylenglykol ist neben Glycerin ein weiterer häufig eingesetzter Weichmacher für Proteinfilme [Audic and Chaufer, 2005; Sánchez et al., 1998], dessen Molekulargewicht durch Polymerisation vergrößert werden kann. Die erhöhte Kettenlänge und die damit gesteigerte Molekülmasse könnten möglicherweise den Weichmacher am Herauslösen aus dem Proteinfilm hindern. Deshalb wurde zunächst der Einfluss des Molekulargewichtes von PEG auf die mechanischen Eigenschaften von Gelatine-Filmen (ohne MTG) untersucht. Die Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.4 beschrieben hergestellt und deren Zugeigenschaften bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-22 dargestellt.

Mit zunehmendem Molekulargewicht von 300-2000 g/mol sank der Weichmachereffekt des PEGs auf Gelatine-Filme – die ZF verdoppelte sich von 23,6 auf 46,6 N/mm², wohingegen die BD von 58 auf 10 % sank. Durch die Erhöhung der Kettenlänge war das PEG bei der Filmherstellung weniger frei beweglich und verfestigte die Proteinfilme. PEG mit einem M_w von 300 g/mol erzielte die höchste BD von 58 % und besaß damit die größte Weichmacherwirkung. Die ZF war mit 23,6 N/mm² deutlich höher als bei Proteinfilmen mit Glycerin (vgl. Abschnitt 3.2.2.1). Somit ist PEG 300 ein alternativer Weichmacher zu Glycerin, jedoch ist ein Einsatz höhermolekularer PEGs für Proteinfilme nicht sinnvoll.

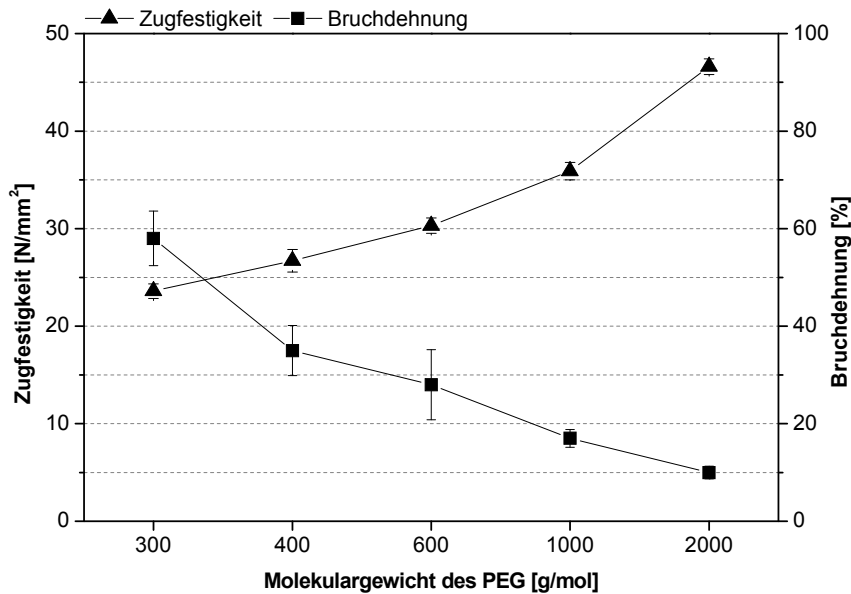


Abbildung 3-22: Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen (ohne MTG) in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Weichmachers PEG. 6 g Gelatine, 3 g PEG ($M_w=300-2000$ g/mol) und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 1 h bei RT quellen gelassen, für 15 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 zugegeben, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm (bei 15 mm wurde Maximalkraft der Prüfmaschine von 100 N überschritten), Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s$, $n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-9.

Des Weiteren wurden verschiedene externe Weichmacher (Di- und Polyglycerin, TEEG, Harnstoff) anhand von Na-Caseinat-Filmen untersucht und mit Glycerin verglichen. Die Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.4 beschrieben hergestellt und deren Zugeigenschaften bestimmt.

In Abbildung 3-23 ist ein Vergleich der eingesetzten Weichmacher mit 50 % (w/w) Protein dargestellt. Es zeigten sich teilweise große Unterschiede zwischen den Weichmachern, wobei die Differenzen bei vernetzten Proteinfilmen im Allgemeinen geringer waren als bei unvernetzten Filmen. Die Weichmacher haben scheinbar einen größeren Einfluss auf die Wechselwirkungen der Proteinketten als auf ein stabiles Proteinnetzwerk. Die höchsten Zugfestigkeiten von 3,93 N/mm² (-MTG) und 4,97 N/mm² (+MTG) wurden für Na-Caseinat-Filme mit Polyglycerin gemessen. Dies entsprach einer Erhöhung der ZF um 63 % bzw. 25 % gegenüber einem Film mit Glycerin. Hingegen lieferten die Na-Caseinat-Filme mit Glycerin als Weichmacher die höchsten Bruchdehnungen. Somit bewirkt die Zunahme des Molekulargewichtes von Glycerin zu Polyglycerin eine Zunahme der ZF und Abnahme der BD, wie es bereits am Beispiel von Gelatine-Filmen und PEG gezeigt wurde (vgl. Abbildung 3-22).

TEEG als Weichmacher führte zu mit Di-Glycerin vergleichbaren KW. Harnstoff hingegen resultierte in die niedrigsten Zugfestigkeiten (↓ bis zu 80 % im Vergleich zu Polyglycerin) und Bruchdehnungen (↓ bis zu 50 % im Vergleich zu Glycerin). Die Ursache hierfür war eine partielle Kristallisation des Harnstoffes innerhalb der Proteinfilme. Während des Zugversuchs brachen die Filme bevorzugt an diesen Stellen.

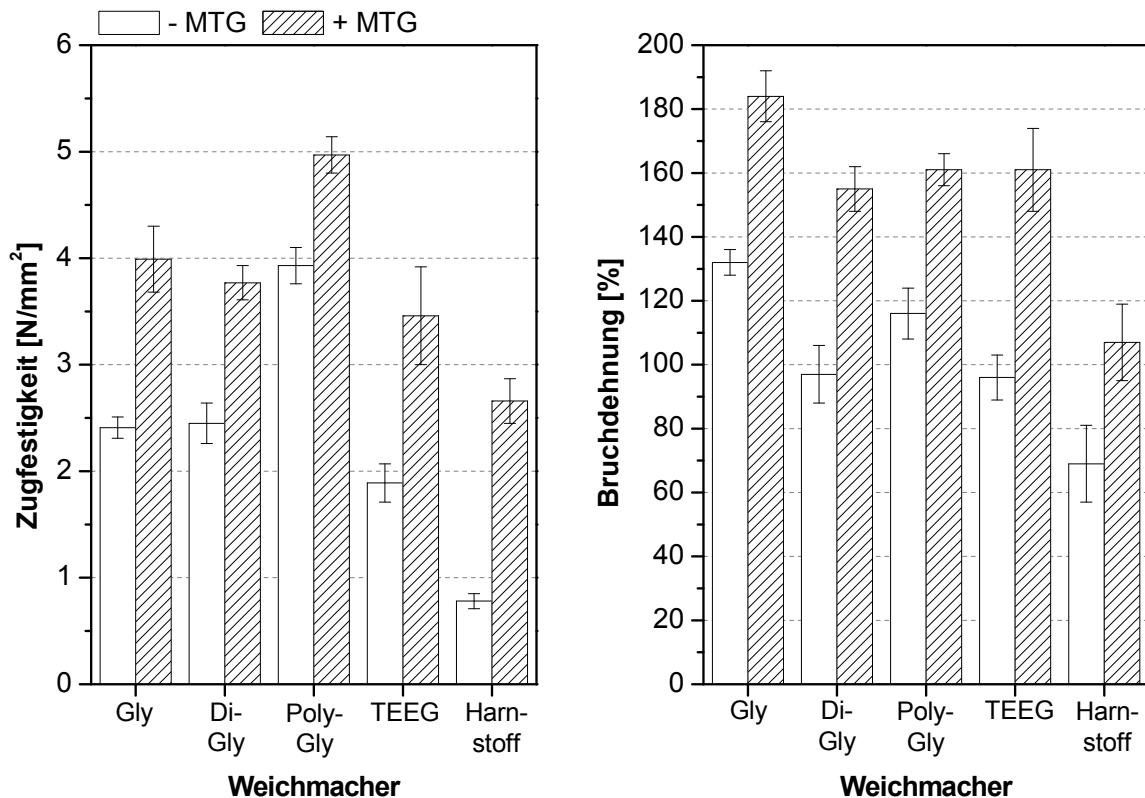


Abbildung 3-23: Einfluss des Weichmachertyps auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen (\pm MTG). 6 g Na-Caseinat, 3 g Weichmacher (50 % w/w Protein) und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-10. MTG...mikrobielle Transglutaminase, Gly...Glycerin, TEEG...Tetra-Ethylenglykol.

In einem weiteren Experiment wurde die Konzentration der Weichmacher variiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25 dargestellt.

Alle Filme ohne Weichmacher waren brüchig, weshalb eine Messung der Zugeigenschaften nicht möglich war. Die Verwendung von Weichmacher führte zu transparenten Filmen mit einer glatten Oberfläche. Eine Ausnahme bildeten die Na-Caseinat-Filme mit Harnstoff – bei ihnen wurde eine Kristallbildung beobachtet. Dies verursachte opake Filme und ein Zusammenrollen der Filme bei 50 \pm 3 % rLF im Exsikkator. Ab einer Weichmacherkonzentration \geq 75 % (w/w Protein) erwiesen sich alle Proteinfilme als klebrig.

Durch Erhöhung der Weichmacherkonzentration von 25 auf 100 % (w/w Protein) sank grundsätzlich die ZF der Na-Caseinat-Filme stetig bis zu 98 % (Abbildung 3-24 \rightarrow). Bei der BD der Na-Caseinat-Filme wurden Maxima beobachtet (Abbildung 3-25 \rightarrow) – bei 50 bzw. 75 % (w/w Protein) wurden die höchsten Werte für die BD gemessen, bei weiterer Erhöhung der Weichmacherkonzentration sank die BD aber wieder. Damit wurden die Filme durch zunehmende Weichmachermengen erweicht (ZF \downarrow), besaßen jedoch nur bei einem bestimmten Anteil an Weichmacher eine maximale Dehnbarkeit. Darüber hinaus wurden vermutlich die Ketten-Wechselwirkungen der Proteine zu stark reduziert, wodurch die Dehnung der Filme herabgesetzt wurde. Der Einfluss der Weichmacherkonzentration war bei unvernetzten (ohne MTG) und vernetzten (mit MTG) Proteinfilmen gleich.

Die höchsten Zugfestigkeiten von bis zu 14 N/mm² wurden bei einer Weichmacherkonzentration von 25 % (w/w Protein) gemessen. Dies entspricht einer 2-10-fachen Steigerung im Vergleich zu 50 % (w/w Protein) Weichmacher. Die geringere Weichmachermenge führte jedoch zu leicht brüchigen Proteinfilmen, wodurch die Probenentnahme erschwert und die Standardabweichung der KW vergrößert wurde. Der Einfluss einer Molekulargewichtsvergrößerung von Glycerin zu Polyglycerin war bei 25 % (w/w Protein) größer als bei 50 % (w/w Protein) – die ZF wurde etwa verdoppelt.

Durch eine MTG-Behandlung wurden bei annähernd allen Na-Caseinat-Filmen die ZF und BD erhöht. Die Quervernetzung beeinflusste somit die mechanischen Eigenschaften positiv, was bereits in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wurde.

Der Weichmacher Harnstoff bildete eine Ausnahme, denn bei dessen Verwendung sank die ZF bis zu einer Konzentration von 50 % (w/w Protein) und stieg bei weiterer Konzentrationserhöhung wieder an. Dabei zeigten die Na-Caseinat-Filme mit 100 % (w/w Protein) Harnstoff deutlich höhere Zugfestigkeiten (bis zu 4,4 N/mm²) als die restlichen Proteinfilme (ZF <1,5 N/mm²). Bei unvernetzten Na-Caseinat-Filmen wurde eine stetige Abnahme der BD beobachtet, wohingegen bei vernetzten Filmen kein einheitlicher Trend erkennbar war. Die Ursache dafür lag vermutlich in der Bildung von Kristallen. Bis zu einer Konzentration von 50 % (w/w Protein) wirkte Harnstoff als Weichmacher (ZF ↓ und BD ↑), dabei waren lediglich partiell kleine Harnstoffkristalle vorhanden. Mit höherer Konzentration nahm die Kristallbildung zu (größere Kristalle, über gesamten Proteinfilm verteilt) und bewirkte eine Zunahme der ZF, aber Abnahme der BD. Die Harnstoffkristalle wirkten dabei vermutlich als Füllstoff. Neben der zum Teil positiven Auswirkungen von Harnstoff auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen, führte die Kristallbildung jedoch auch zu einer Abnahme der Filmtransparenz – die Proteinfilme waren zum Teil weiß und völlig undurchsichtig. Daher ist Harnstoff zur Herstellung von transparenten Filmen ungeeignet.

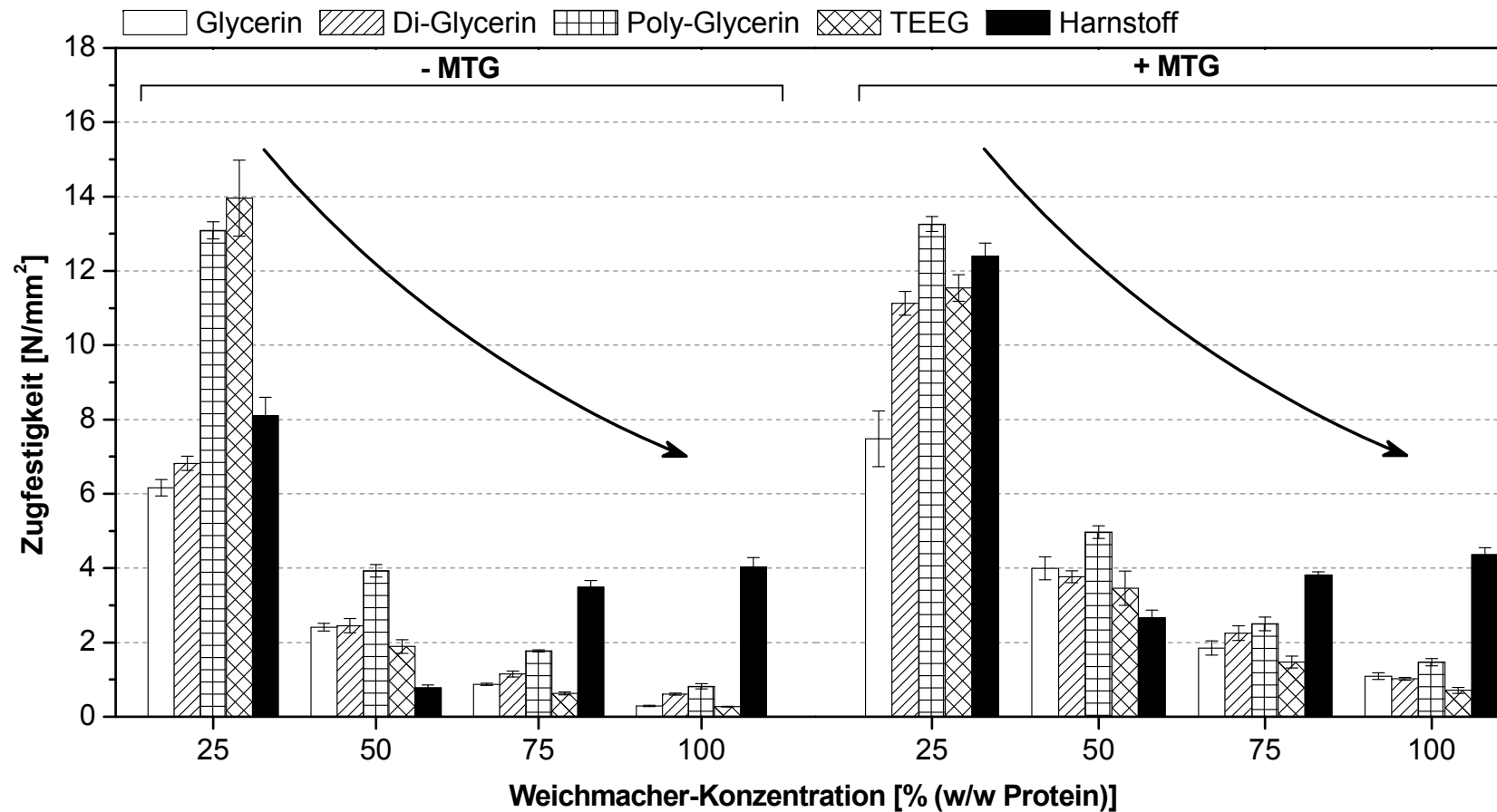


Abbildung 3-24: Einfluss des Weichmachertyps und -konzentration auf die Zugfestigkeiten von Na-Caseinat-Filmen (\pm MTG). 6 g Na-Caseinat, Weichmacher (1,5 / 3 / 4,5 / 6 g) und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®] WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-10. MTG...mikrobielle Transglutaminase, TEEG...Tetra-Ethylenglykol.

↪ genereller Trend.

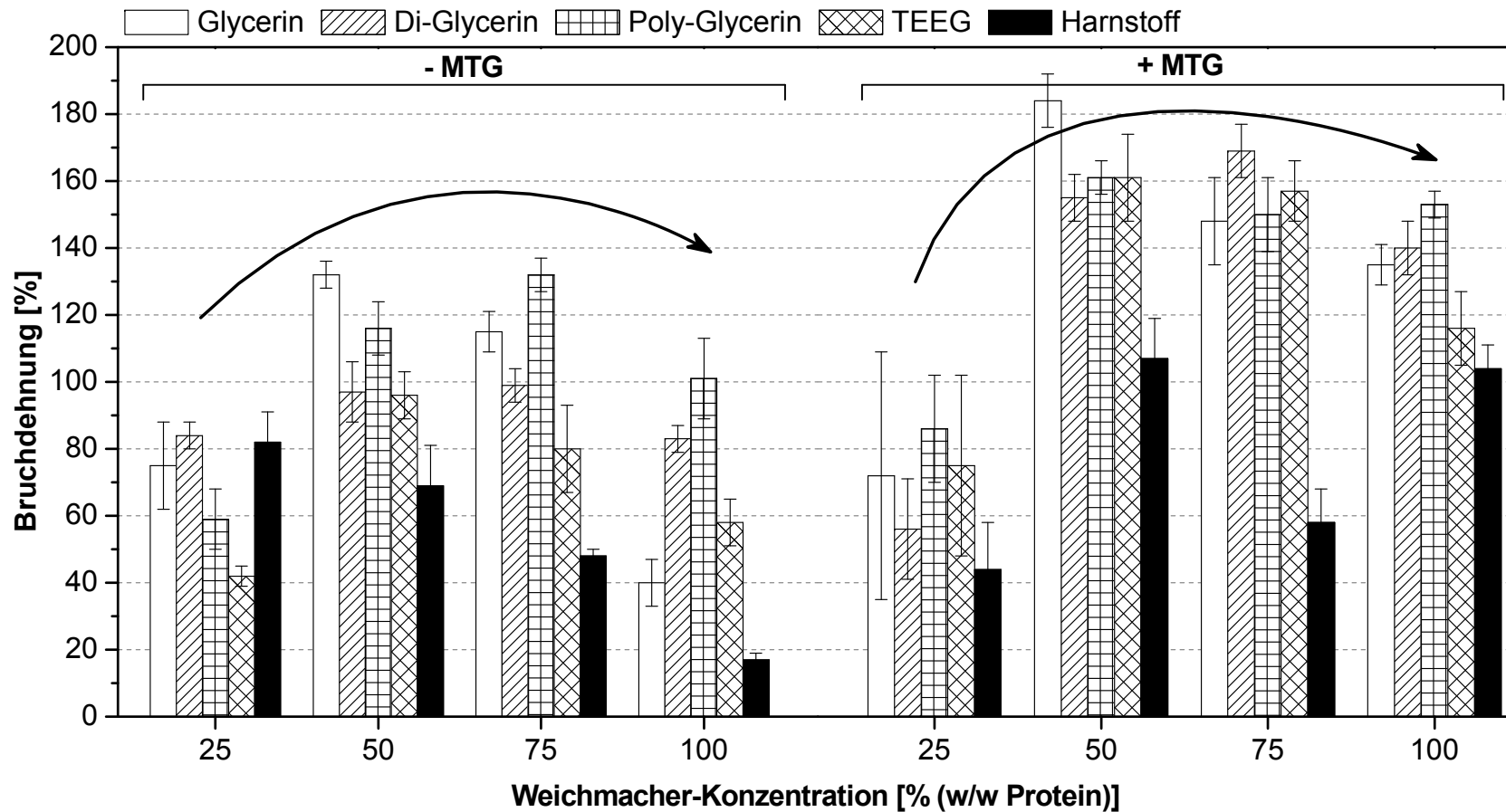


Abbildung 3-25: Einfluss des Weichmachertyps und -konzentration auf die Bruchdehnungen von Na-Caseinat-Filmen (\pm MTG). 6 g Na-Caseinat, Weichmacher (1,5 / 3 / 4,5 / 6 g) und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-10. MTG...mikrobielle Transglutaminase, TEEG...Tetra-Ethylenglykol.

↪ genereller Trend.

Neben den mechanischen Eigenschaften wurden auch der Einfluss von Weichmachern auf die Regenbeständigkeit bei Bewitterung und die Löslichkeit in Wasser untersucht (vgl. Abschnitte 2.2.5.3 bzw. 2.2.5.1). Alle vernetzten Na-Caseinat-Filme zeigten unabhängig vom verwendeten Weichmacher nach 3-4 Tagen Bewitterung mit Beregnung erste Beschädigungen (vgl. Abschnitt 3.2.4). Zudem lösten sich die Weichmacher während der Untersuchung zur Löslichkeit in Wasser aus den Filmen heraus (vgl. Abschnitt 3.2.3). Somit wurde für alle Weichmacher keine Verbesserung der Na-Caseinat-Filme bezüglich Regenbeständigkeit und Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Glycerin beobachtet, trotz unterschiedlichen Einflusses auf die mechanischen Eigenschaften der Proteinfilme.

3.3.1.2 Untersuchungen zu innerer Weichmachung

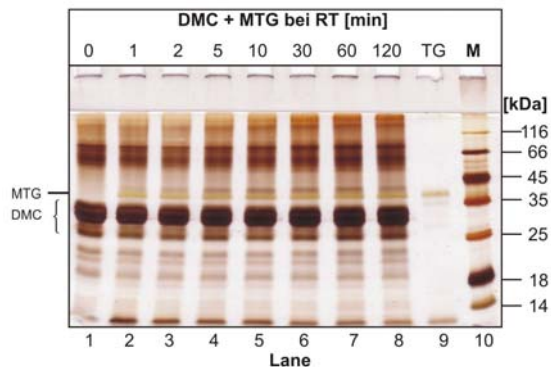
Bisher wurden in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von Filmen externe Weichmacher verwendet, wie z.B. Glycerin, PEG oder Harnstoff. Diese Weichmacher liegen ohne chemische Bindung in den Filmen vor. Interne Weichmacher dagegen werden kovalent an die Filmmatrix gebunden und sind somit in den Film integriert. Der Vorteil eines internen gegenüber einem externen Weichmacher liegt darin, dass er sich bei Wasserkontakt nicht aus dem Film herauslöst. Da PEG als Weichmacher für Proteinfilme geeignet ist, wurden verschiedene Amino-PEGs untersucht. Sie verfügen über eine funktionelle Aminogruppe, die als Substrat für die MTG wirken und somit zu einer Quervernetzung zwischen Amino-PEG und Protein führen kann. Die Untersuchungen zur inneren Weichmachung anhand von Na-Caseinat-Filmen wurde wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben durchgeführt.

Zunächst wurde untersucht, ob Amino-PEGs (Mono- und Di-) mittels MTG an Casein gebunden werden können. Die Aminogruppe fungiert dabei in der Vernetzungsreaktion als Lysin-Komponente. Um eine Quervernetzung des Proteins vorerst auszuschließen, wurde Dimethylcasein (DMC) verwendet. Es enthält keine reaktiven Lysine aufgrund einer Methylierung und verfügt damit nur über freie Glutamine. Die Analyse der enzymatischen Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26 dargestellt. Zur besseren Darstellung der Ergebnisse wurden die Gele der SDS-PAGE mittels Silber gefärbt. Diese Methode ist sensitiver als die Coomassie-Färbung und zeigt auch Banden mit 100-fach geringerer Proteinkonzentration [Holtzhauer, 1996]. Daher sind in einem Silbergel (vgl. Abbildung 3-26 A, Lane 1) im Gegensatz zu einem mit Coomassie gefärbten Gel (vgl. Abbildung 3-4, Lane 1) neben den Casein-Monomer-Banden weitere Banden (u.a. Verunreinigungen) sichtbar.

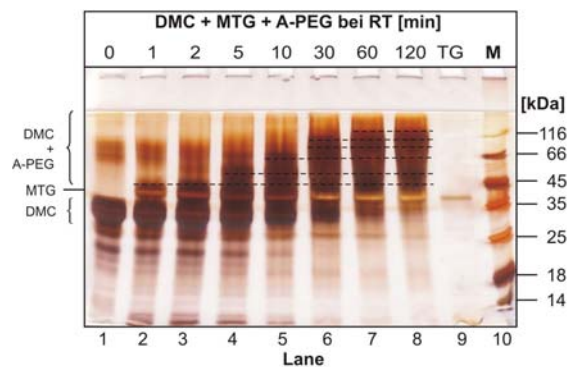
Als Nachweis der unterbundenen Quervernetzung von DMC bei MTG-Behandlung wurde eine Kontrollreaktion ohne Amino-PEG durchgeführt (Abbildung 3-26 A). Über einen Zeitraum von 2 h bei RT ergaben sich keine Veränderungen der Proteinbanden in Konzentration oder Molekulargewicht – es fand keine Quervernetzung von DMC mittels MTG statt. Nach Beimischung eines Mono-Amino-PEGs (A-PEG) mit einem M_w von 5000 g/mol zu dem DMC-MTG-Ansatz und einer Reaktion für 2 h bei RT wurde ein deutlicher Unterschied zu der Kontrollreaktion beobachtet (Abbildung 3-26 B). Die Konzentration der Casein-Monomer-Banden nahm deutlich ab (nach 1 h nahezu nicht mehr sichtbar) und es bildeten sich stufenweise Banden mit einem höheren Molekulargewicht (mit Linien markiert). Diese Banden entsprachen einem Casein-Molekül und einem bzw. mehreren daran gebundenen A-PEG-Molekülen, da sich das Molekulargewicht um ein Vielfaches von 5 kDa vergrößerte.

Damit wurde nachgewiesen, dass Amino-PEG durch die MTG kovalent an DMC gebunden werden kann.

A



B



C

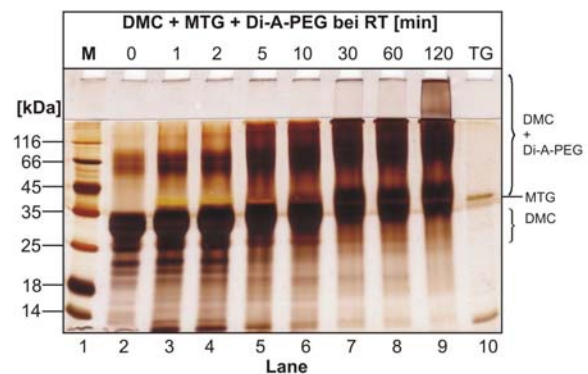


Abbildung 3-26: SDS-PAGE Analyse der Reaktionen von DMC und MTG mit funktionellen PEGs. A, Kontrolle (DMC+MTG), Silberfärbung; **B,** DMC+MTG+A-PEG, Silberfärbung; **C,** DMC+MTG+Di-A-PEG, Silberfärbung. Proben (50 μ L) wurden dem Reaktionsansatz entnommen, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 μ L Probe und 5 μ L Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. DMC...Dimethylcasein, MTG...mikrobielle Transglutaminase, RT...Raumtemperatur, A-PEG...Mono-Amino-PEG $M_w=5000$ g/mol, Di-A-PEG...Di-Amino-PEG $M_w=1500$ g/mol.

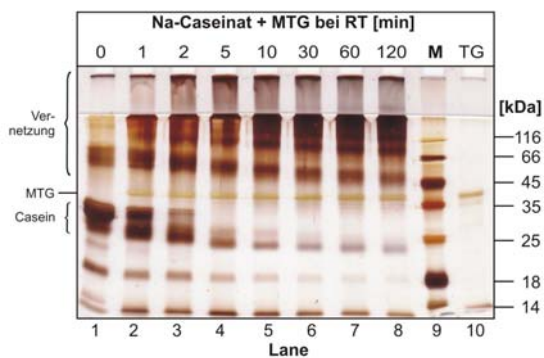
Die Verwendung eines Mono-Amino-PEGs führte zu einer Anknüpfung an das Protein (PEGylierung), jedoch nicht zu einer Quervernetzung zwischen den Proteinmolekülen – das Merkmal dafür ist die Bildung von Polymeren, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes am Passieren von Trenn- bzw. Sammelgel gehindert wurden (vgl. Abbildung 3-4, Lane 8). Um eine Quervernetzung des Caseins zu erreichen, wurde ein Di-Amino-PEG (Di-A-PEG) mit einem M_w von 1500 g/mol eingesetzt, welches als Linker zwischen den DMC-Molekülen fungieren soll (Abbildung 3-26 C). Dabei wurde zunächst eine leichte Zunahme des Molekulargewichtes von Casein-Monomer-Banden von 25-35 zu 35-45 kDa beobachtet. Die Ursache dafür war vermutlich eine Quervernetzung innerhalb eines Casein-Moleküls – die beiden Amino-Gruppen des Di-A-PEGs können mit zwei freien Glutamin-Resten eines Casein-Moleküls reagieren. Da das Molekulargewicht der Proteinbanden im Durchschnitt um etwa 10 kDa zunahm (Abbildung 3-26 C, Lane 9 im Vergleich zu Lane 2), könnte ein Casein-Molekül mit bis zu sechs Di-A-PEG-Molekülen vernetzt worden sein. Diese innere Quervernetzung ist begrenzt durch die Anzahl der verfügbaren Glutamin-Reste. Daneben wurde eine Bildung von Polymeren beobachtet. Deren Molekulargewicht betrug zunächst etwa 66 kDa – dies entspricht zwei miteinander quervernetzten Casein-Molekülen. Durch eine fortschreitende Quervernetzung mit weiteren Casein-Molekülen wurde das

Molekulargewicht zu hoch, so dass die gebildeten Polymere nach 2 h nicht mehr das Sammelgel passieren konnten. Somit konnte DMC mit Di-A-PEG erfolgreich enzymatisch quervernetzt werden.

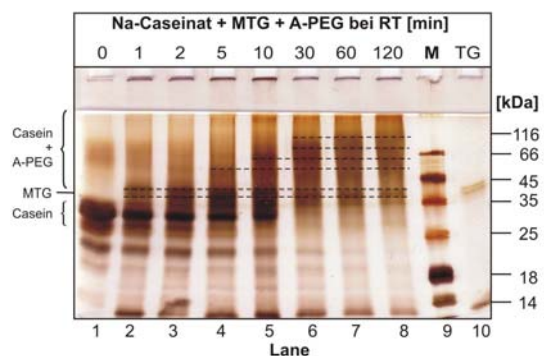
Die erfolgreiche Einbindung von Amino-PEGs in DMC sollte als nächstes auf Na-Caseinat übertragen werden. Na-Caseinat wurde zur Filmherstellung verwendet und war mittels MTG quervernetzbar (vgl. Abschnitt 3.1.1.3). Es wurde untersucht, ob die Anbindung der Amino-PEGs an Na-Caseinat trotz Quervernetzung erfolgen kann. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-27 dargestellt.

Es wurde erneut eine Kontrollreaktion mit Na-Caseinat und MTG durchgeführt (Abbildung 3-27 A), bei der deutlich die Quervernetzung der Casein-Moleküle zu hochmolekularen Polymeren nachgewiesen wurde. Danach wurde A-PEG mit einem M_W von 5000 g/mol hinzugefügt und 2 h bei RT inkubiert (Abbildung 3-27 B). Dabei war ein deutlicher Unterschied zu der Kontrollreaktion erkennbar – die Quervernetzung der Casein-Moleküle wurde verzögert, da eine Bildung von hochmolekularen Polymeren nach 1 min nur in sehr geringem Maße beobachtet wurde (vgl. Abbildung 3-27 A und B, Lane 2). Wie bereits bei der Untersuchung mit DMC bildeten sich auch bei Na-Caseinat mit zunehmender Reaktionszeit Proteinbanden mit stufenweiser Molekulargewichtserhöhung um ein Vielfaches von 5 kDa (durch Linien markiert). Damit war der Einbau von A-PEG in Na-Caseinat (PEGylierung) erfolgreich.

A



B



C

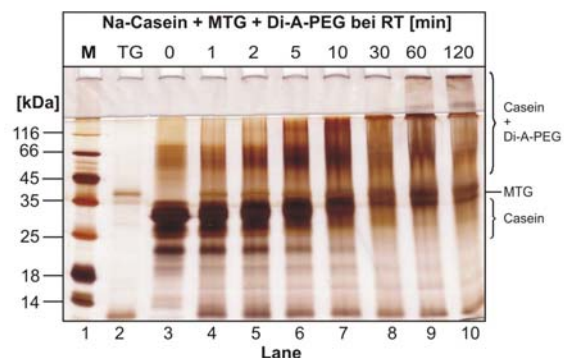


Abbildung 3-27: SDS-PAGE Analyse der Reaktionen von Na-Caseinat und MTG mit funktionellen PEGs. A, Kontrolle (Na-Caseinat+MTG), Silberfärbung; **B,** Na-Caseinat+MTG+A-PEG, Silberfärbung; **C,** Na-Caseinat+MTG+Di-A-PEG, Silberfärbung. Proben (50 μ L) wurden dem Reaktionsansatz entnommen, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. 10 μ L Probe und 5 μ L Marker wurden auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen. MTG...mikrobielle Transglutaminase, RT...Raumtemperatur, A-PEG...Mono-Amino-PEG $M_W=5000$ g/mol, Di-A-PEG...Di-Amino-PEG $M_W=1500$ g/mol.

Bei Verwendung eines Di-A-PEG mit einem M_w von 1500 g/mol wurde im Vergleich zur Kontrollreaktion erneut eine verzögerte Quervernetzung der Casein-Moleküle durch die MTG beobachtet (Abbildung 3-27 C). Wie bereits bei DMC erhöhte sich das Molekulargewicht der Casein-Monomere zunächst um etwa 10 kDa, wobei eine Quervernetzung von Di-A-PEG mit Glutamin-Resten eines Casein-Moleküls untereinander zugrunde liegen könnte. Gleichzeitig bildeten sich Proteinbanden mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa – entsprechend der Quervernetzung von zwei Casein-Molekülen. Erst ab 60 min Reaktionszeit wurde eine Quervernetzung zu hochmolekularen Polymeren detektiert. Im Gegensatz dazu befanden sich bei der Kontrollreaktion (vgl. Abbildung 3-27 A) schon nach 1 min Reaktionszeit Polymere im Sammelgel. Demnach war die Reaktionsgeschwindigkeit für den Amino-PEG-Einbau größer als die Quervernetzungsreaktion. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der guten Erreichbarkeit von nieder-molekularen Substraten für die MTG, wohingegen bei hochmolekularen Substraten (Protein) z.B. durch Faltungen die Verfügbarkeit eingeschränkt wird.

Es wurde gezeigt, dass Amino-PEGs an Na-Caseinat gekoppelt werden können. Daher wurden A-PEG und Di-A-PEG (50 % w/w Protein) anstelle von Glycerin eingesetzt und der tatsächliche Weichmachungseffekt auf Na-Caseinat-Filme untersucht. Da bei Verwendung von PEG mit zunehmendem Molekulargewicht die Weichmachere Wirkung abnahm – resultierend in höhere ZF und niedrigere BD (vgl. Abbildung 3-22) – wurde ein A-PEG mit einem M_w von 750 g/mol (anstatt 5000 g/mol) eingesetzt. Für Di-A-PEG wurde erneut ein M_w von 1500 g/mol gewählt. Die Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.6 beschrieben hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-28 zusammengefasst.

Alle Filme mit Amino-PEGs waren nach der Trocknung zu brüchig und konnten der Gussform nicht schadensfrei entnommen werden. Daher wurden keine mechanischen Eigenschaften und Wasserlöslichkeiten der Filme bestimmt. Obwohl mit PEG 300 eine geringere Weichmachung an Na-Caseinat-Filmen beobachtet wurde als bei Verwendung von Glycerin (vgl. Abschnitt 3.3.1.1), waren diese Proteinfilme dennoch flexibel und gut aus der PTFE-Form entfernbar (analog zu Filmen mit Glycerin, vgl. Abbildung 3-12 C). Möglicherweise waren die Molekulargewichte der verwendeten Amino-PEGs zu hoch und besaßen deshalb keine oder nur geringfügige Weichmachereigenschaften. Denkbar wäre auch eine Einschränkung der Beweglichkeit der Amino-PEGs durch deren kovalente Bindung an das Protein. Für eine genauere Untersuchung wäre ein Einsatz von Amino-PEGs mit einem $M_w < 300$ g/mol sinnvoll, wurde jedoch in der vorliegenden Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr durchgeführt.

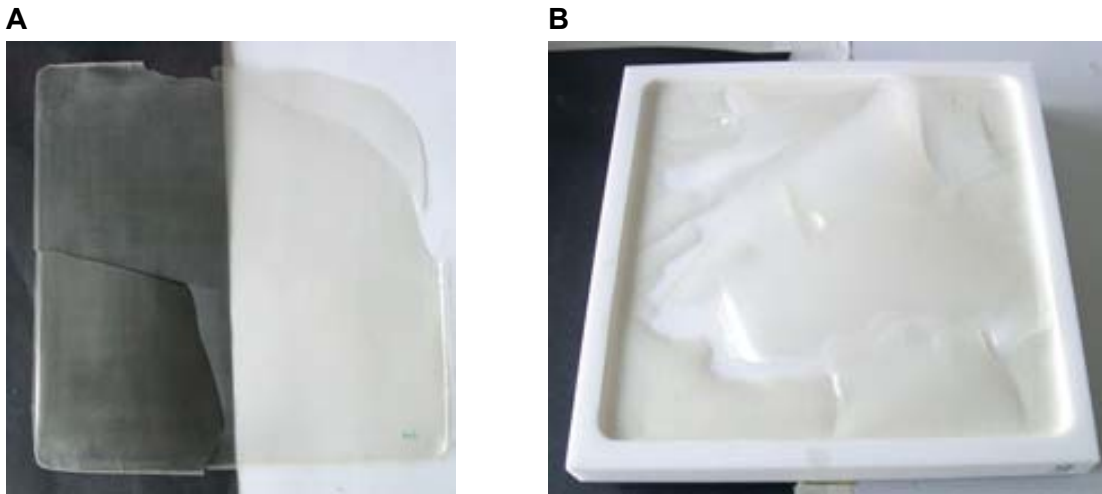


Abbildung 3-28: Na-Caseinat-Filme mit Amino-PEG als Weichmacher. A, ohne MTG; **B**, mit MTG. 5 g Na-Caseinat, 2,5 g A-PEG ($M_w=750$ g/mol) und 1,25 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 92 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,25 g TG Activa[®]WM (in 5 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 5 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert.

3.3.1.3 Beschichtung mit Bienenwachs

Durch Verwendung verschiedener externer Weichmacher konnte zwar ein Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen nachgewiesen werden, jedoch wurde keine verbesserte Wasserbeständigkeit erzielt (vgl. Abschnitt 3.3.1.1). Interne Weichmacher wurden erfolgreich kovalent an Protein gebunden, resultierten allerdings in brüchige Filme (vgl. Abschnitt 3.3.1.2). Mittels einer Kombination aus Glycerin als Weichmacher und einer hydrophoben Wachsbeschichtung der Proteinfilme sollte die Wasserbeständigkeit optimiert werden. Die Untersuchungen zur Beschichtung mit Bienenwachs anhand von Na-Caseinat-Filmen wurde wie in Abschnitt 2.3.2.5 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse der Bewitterung im Gewächshaus sind in Abbildung 3-29 dargestellt. Der mit Glycerin weichgemachte und mit Bienenwachs beschichtete Na-Caseinat-Film war flexibel und aufgrund des Wachses weiß (Abbildung 3-29 A). Während der Beregnung im Gewächshaus wurde keine Beeinträchtigung der Proteinoberfläche beobachtet. Durch Kondenswasser bildeten sich Tropfen an den Filmunterseiten (Abbildung 3-29 B). Nach sieben Tagen Bewitterung konnte ein vollständiger Proteinfilm entnommen werden, der lediglich an den von der Erde bedeckten Filmflächen erste Anzeichen für ein Auflösen bzw. einen Abbau zeigte (Abbildung 3-29 C).

Die Zugeigenschaften der mit Bienenwachs beschichteten Na-Caseinat-Filme im Vergleich zu einem unbeschichteten Na-Caseinat-Film sind in Abbildung 3-30 dargestellt. Die beschichteten Filme besaßen eine geringere ZF (3,25 N/mm², ↓18 %) und eine höhere BD (202 %, ↑10 %) als die unbeschichteten Filme mit 50 % (w/w Protein) Glycerin (vgl. Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25). Der Zugfestigkeitsverlust wurde vermutlich durch das Bienenwachs verursacht, da dieses einen erheblichen Anteil im Film besaß. Im Vergleich zu unbeschichteten Filmen waren die beschichteten Na-Caseinat-Filme mit etwa 400 µm doppelt so dick.

Schon die Bewitterung über sieben Tage ohne Beregnung (Kontrolle) hatte einen großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften – die ZF und BD sanken um 50 % auf 1,64 N/mm² bzw. 101 %. Die Bewitterung mit Beregnung resultierte in eine unveränderte BD von 102 % im Vergleich zur Kontrolle. Die ZF sank jedoch um insgesamt 66 % auf 1,10 N/mm².



Abbildung 3-29: Bewitterung eines vernetzten Na-Caseinat-Films mit Glycerin als Weichmacher und mit Bienenwachs-Beschichtung. A, vor der Bewitterung; B, während der Bewitterung; C, nach sieben Tagen Bewitterung.

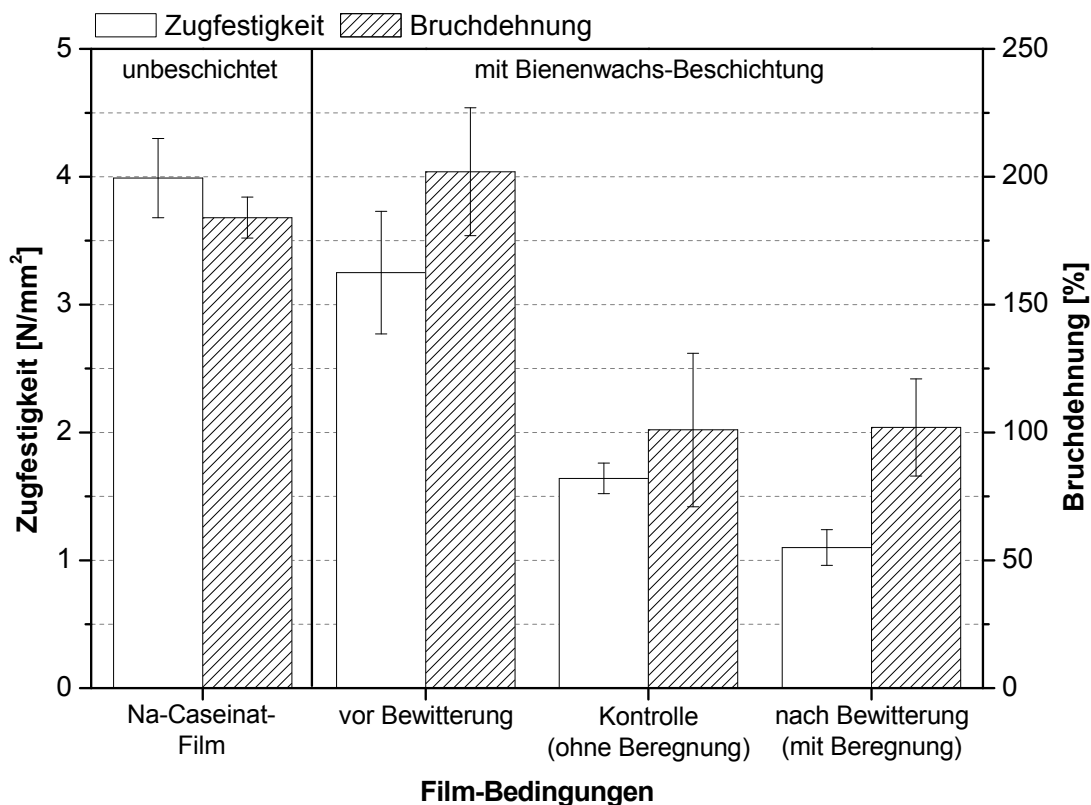


Abbildung 3-30: Einfluss der Bewitterung auf die Zugeigenschaften eines vernetzten Na-Caseinat-Films mit Glycerin als Weichmacher und Bienenwachs-Beschichtung. 6 g Na-Caseinat und 3 g Glycerin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben, anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, in Bienenwachs getaucht (bei 80 °C geschmolzen), für 24 h bei RT im Hängen getrocknet. Proben: 190 x 90 mm Film auf 1 L Blumenerde, Bewitterungsdauer: 7 d, Temperatur: 12-22 °C, relative Luftfeuchte: 60-70 %, Licht: natürlicher Tag-Nacht-Rhythmus, Beregnung: aller 12 h für 1 min mit 19,75 mL je Filmprobe, nach Entnahme für 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-11.

Durch eine Beschichtung mit Bienenwachs wurde die Wasserbeständigkeit von Proteinfilmen erfolgreich verbessert – sie waren mehr als sieben Tage stabil und zeigten keine Beschädigungen durch eine Beregnung. Jedoch bewirkte die Bewitterung durch Licht, wechselnde Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeit eine erhebliche Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften der Filme. Eine zusätzliche Beregnung senkte die ZF der Filme weiter herab, beeinflusste jedoch nicht die BD.

3.3.2 Untersuchungen zu Proteingemischen

Protein aus Kartoffel oder Erbse (Fraktion N^o1) ließ sich zu Filmen verarbeiten. Dabei waren die Filme jedoch klebrig und mechanisch instabiler als Filme aus tierischen Proteinen wie Na-Caseinat und Gelatine (vgl. Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.2). Deshalb sollte untersucht werden, ob eine Beimischung von tierischen Proteinen zu den pflanzlichen Proteinen die Zugeigenschaften der Filme verbessern kann. Dabei wurde Na-Caseinat bzw. Gelatine zu den Filmansätzen aus Kartoffel- oder Erbsenprotein (Fraktion N^o1) zugegeben. Als Weichmacher kam Glycerin zum Einsatz. Die Filme wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. In Abbildung 3-31 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Zunächst wurde der Einfluss von Na-Caseinat bzw. Gelatine auf die Zugeigenschaften untersucht. Dafür wurde eine 50 % Mischung aus Na-Caseinat und Gelatine hergestellt. Diese Mischung führte zu Materialien mit einer ZF von 4,6 N/mm² und einer BD von 99-113 %. Damit wurde die ZF im Falle unvernetzter Filme (-MTG) im Vergleich zu reinen Na-Caseinat-Filmen um 91 % erhöht und im Vergleich zu reinen Gelatine-Filmen um 41 % gesenkt. Bei der BD verhielt es sich entgegengesetzt – sie war um 25 % kleiner als bei Na-Caseinat-Filmen und bis zu 38 % größer als bei Gelatine-Filmen. Bei vernetzten Filmen (+MTG) verhielt es sich grundsätzlich genauso, jedoch mit geringeren Unterschieden. Eine zunehmende Na-Caseinat-Konzentration führte demnach zu elastischeren Filmen und eine höhere Gelatine-Konzentration zu zugfesteren Proteinfilmen. Dieser Effekt sollte zur Herstellung von Filmen aus pflanzlichen Proteinen ausgenutzt werden.

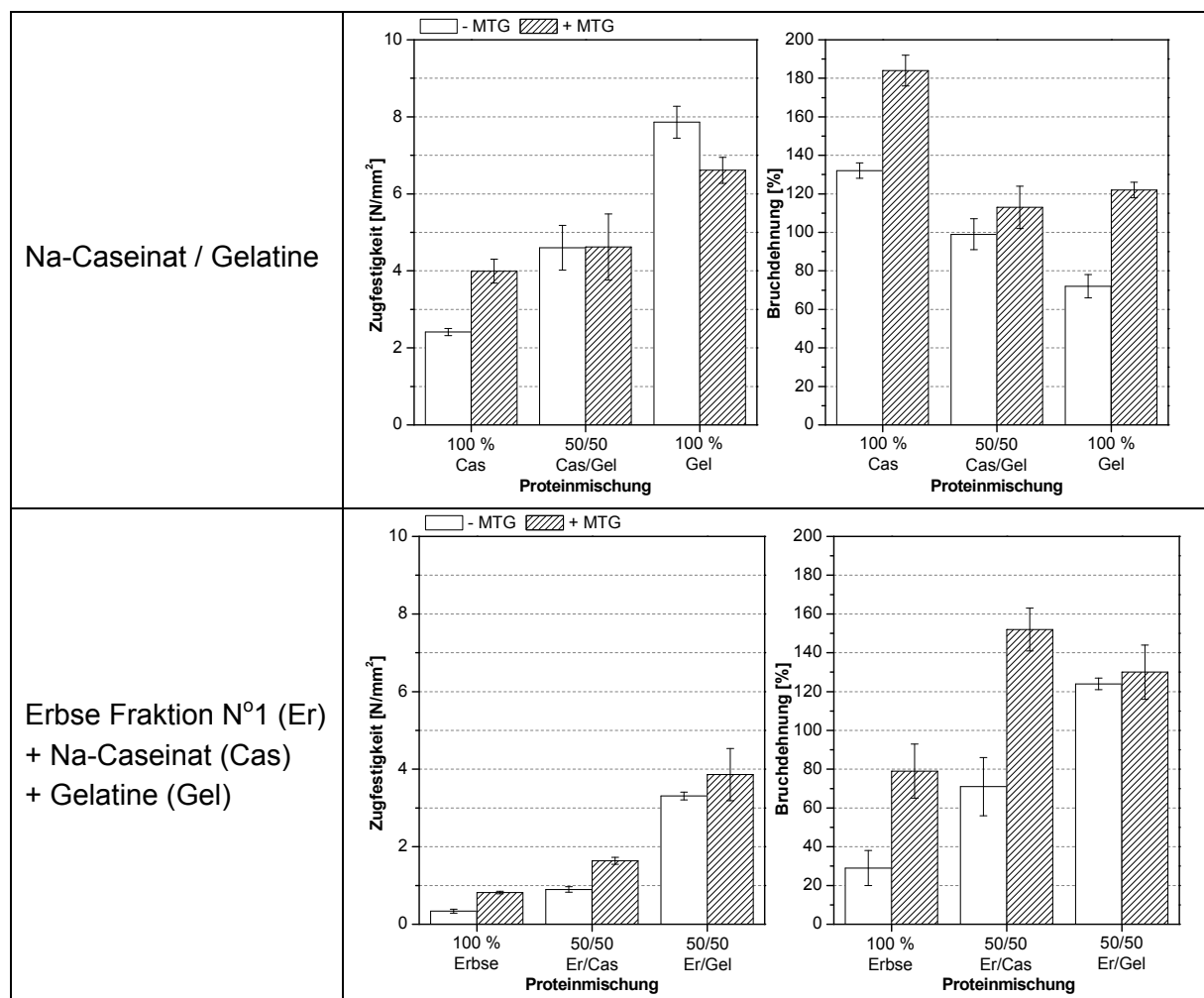
Filme aus reinem Erbsenprotein besaßen mit einer ZF von 0,3-0,8 N/mm² und einer BD von 29-79 % sehr geringe mechanische Eigenschaften im Vergleich zu Filmen aus tierischen Proteinen. Durch Beimischung von Na-Caseinat konnte die ZF und BD um einen Faktor von 2-2,7 erhöht werden – die mechanischen KW wurden also mehr als verdoppelt. Durch Beimischung von Gelatine wurde ZF und BD sogar um einen Faktor von 4,3-9,7 vergrößert (für den vernetzten Erbsenprotein/Gelatine-Film betrug die Erhöhung der BD 65 %). Gelatine bewirkte damit 5-10-fach zugfestere und bis zu 4-fach elastischere Proteinfilme. Mit 152 % besaß der Erbsenprotein/Na-Caseinat-Film die höchste BD und mit 3,86 N/mm² wies der Erbsenprotein/Gelatine-Film die höchste ZF auf.

Im Vergleich zu den reinen Erbsenprotein-Filmen besaßen die Filme aus Kartoffelprotein mit 0,4 N/mm² eine ähnliche ZF, mit 17-35 % jedoch eine geringere BD. Die Beimischung von Na-Caseinat führte erneut zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften – um 80-124 % für die ZF und um einen Faktor bis 5,4 für die BD. Eine Mischung aus Kartoffelprotein und Gelatine erzielte sogar eine 4-8-fach höhere ZF und BD. Mit maximalen Kennwerten von 2,63 N/mm² (ZF) bzw. 139 % (BD) waren die mechanischen Eigenschaften der modifizierten Kartoffelprotein-Filme niedriger als bei Erbsenprotein-Filmen.

Der Blickwinkel von den tierischen Proteinen aus zeigt, dass Na-Caseinat-Filme durch Beimischung von Gelatine (50/50 Cas/Gel) an ZF gewannen und BD verloren. Wurden stattdessen jedoch pflanzliche Proteine hinzugefügt (50/50 Er/Cas und Ka/Cas), reduzierte sich die ZF um mehr als die Hälfte und die BD lag in den meisten Fällen unterhalb der Na-Caseinat/Gelatine-Mischung.

Im Falle von Gelatine-Filmen führte die Beimischung von Na-Caseinat (50/50 Cas/Gel) zu einer Abnahme der ZF und geringfügigen Zunahme der BD. Wurden stattdessen pflanzliche Proteine verwendet (50/50 Er/Gel und Ka/Gel), lieferten diese Proteinmischungen ebenfalls kleiner Zugfestigkeiten im Vergleich zur Na-Caseinat/Gelatine-Mischung. Die BD von Gelatine-Filmen hingegen konnte durch Beimischung von Erbsen- oder Kartoffelprotein verbessert werden (von 120 % auf bis zu 140 %).

Schlussfolgernd wurden die Zugeigenschaften der Filme aus pflanzlichen Proteinen durch eine Beimischung von tierischen Proteinen positiv beeinflusst – die ZF wurde bis zu 10-fach und die BD bis zu 8-fach erhöht. Damit ist eine Verwendung von Blends aus verschiedenen Proteinen eine viel versprechende Methode zur Optimierung der mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen. Denkbar wären auch weitere Blends aus beispielsweise Protein/Stärke oder Protein/Fasern bzw. Fibrillen.



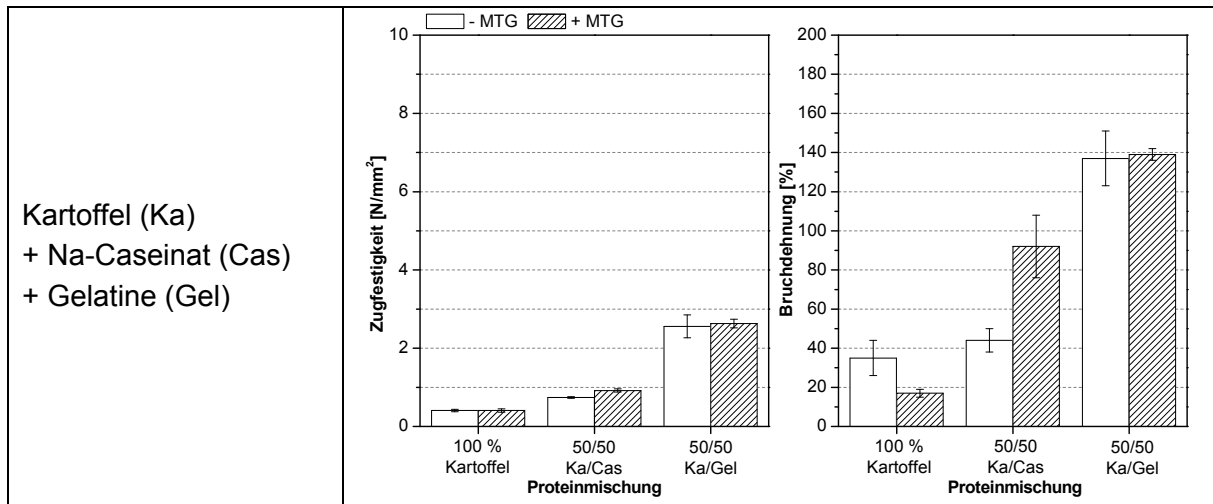


Abbildung 3-31: Zügeigenschaften von Filmen (± MTG) aus Proteinmischungen mit Glycerin als Weichmacher. 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-12. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

3.3.3 Proteine unterschiedlicher Gewinnung

Der Einsatz verschiedener Proteine zur Filmherstellung resultierte in unterschiedlichen mechanischen Kennwerten der Filme (vgl. Abschnitt 3.2). Proteine beeinflussen somit die Filmeigenschaften stark, wobei Art, Struktur und Gewinnung eine Rolle spielen. Es wurden Proteine der gleichen Art mit verschiedener Gewinnung verwendet, um diesen Einfluss zu untersuchen.

3.3.3.1 Gelatine mit verschiedenen Geliergraden

Aus Gelatine wurden erfolgreich Filme mit hoher mechanischer Stabilität hergestellt (vgl. Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.2). Jedoch gibt es verschiedene Gelatinen, die sich in ihrer Gelierfähigkeit (bzw. Geliergrad) unterscheiden. Es wurde untersucht, ob die Gelierfähigkeit die Filmeigenschaften beeinflusst.

Filme aus Gelatine wurden wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben hergestellt. Dabei wurden vier verschiedene Gelatinesorten mit unterschiedlichem Geliergrad verwendet – niedrig, mittel, 280 und 300 Bloom. Dabei steht 280 bzw. 300 Bloom für einen hohen Geliergrad. Alle Gelatine-Filme wiesen Transparenz und eine glatte Oberfläche auf. Die Filme aus Gelatine des geringsten Geliergrades waren leicht gelblich, alle anderen farblos. Die Proteinfilme wurden mit dem Zugversuch mechanisch charakterisiert (vgl. Abschnitt 2.2.4.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-32 dargestellt.

Bei unvernetzten Gelatine-Filmen stieg mit zunehmendem Geliergrad die ZF um 91 % von 4,11 auf 7,86 N/mm². Die BD hingegen sank um 17 % von 87 auf 72 %. Die Filme waren durch eine höhere Gelierfähigkeit der Gelatine mechanisch stabiler. Mit MTG-Behandlung

und zunehmendem Geliergrad stieg ebenfalls die ZF, jedoch lediglich um 21 % von 5,47 auf 6,61 N/mm². Auf die BD der Filme hatte ein höherer Geliergrad einen geringfügig positiven Einfluss – sie stieg um 6 % von 115 auf 122 %. Damit waren die mittels MTG quervernetzten Proteinfilme durch eine höhere Gelierfähigkeit der Gelatine zugfester und leicht elastischer. Bei Vergleich der unvernetzten mit den enzymatisch behandelten Filmen wurde ein interessanter Effekt beobachtet. Während bei Verwendung einer Gelatine mit niedrigem Geliergrad die Vernetzung zu einem Anstieg der ZF um 33 % (4,11 → 5,47 N/mm²) führte, wurde bei einem Film aus Gelatine mit mittlerem Geliergrad nur noch eine Zunahme der ZF um 15 % (5,11 → 5,87 N/mm²) gemessen. Die Verwendung von Gelatinen mit 280 bzw. 300 Bloom (hoher Geliergrad) resultierte sogar in eine Abnahme der ZF um 1 % (6,82 → 6,78 N/mm²) bzw. 16 % (7,86 → 6,61 N/mm²). Somit bewirkte die Erhöhung der Gelierfähigkeit der Gelatine eine Umkehrung des MTG-Einflusses – von einer Verfestigung (ZF↑) zu einer Erweichung (ZF↓). Die BD wurde bei allen Gelatine-Filmen durch eine Quervernetzung erhöht, wobei ebenfalls ein Einfluss der Gelierfähigkeit der Gelatine festgestellt wurde – bei niedrigem Geliergrad betrug die Zunahme der BD 32 % (87 → 115 %) und stieg bis zu 69 % (72 → 122 %) bei der 300 Bloom Gelatine. Folglich stieg der MTG-Einfluss auf die BD der Filme mit zunehmendem Geliergrad der Gelatine.

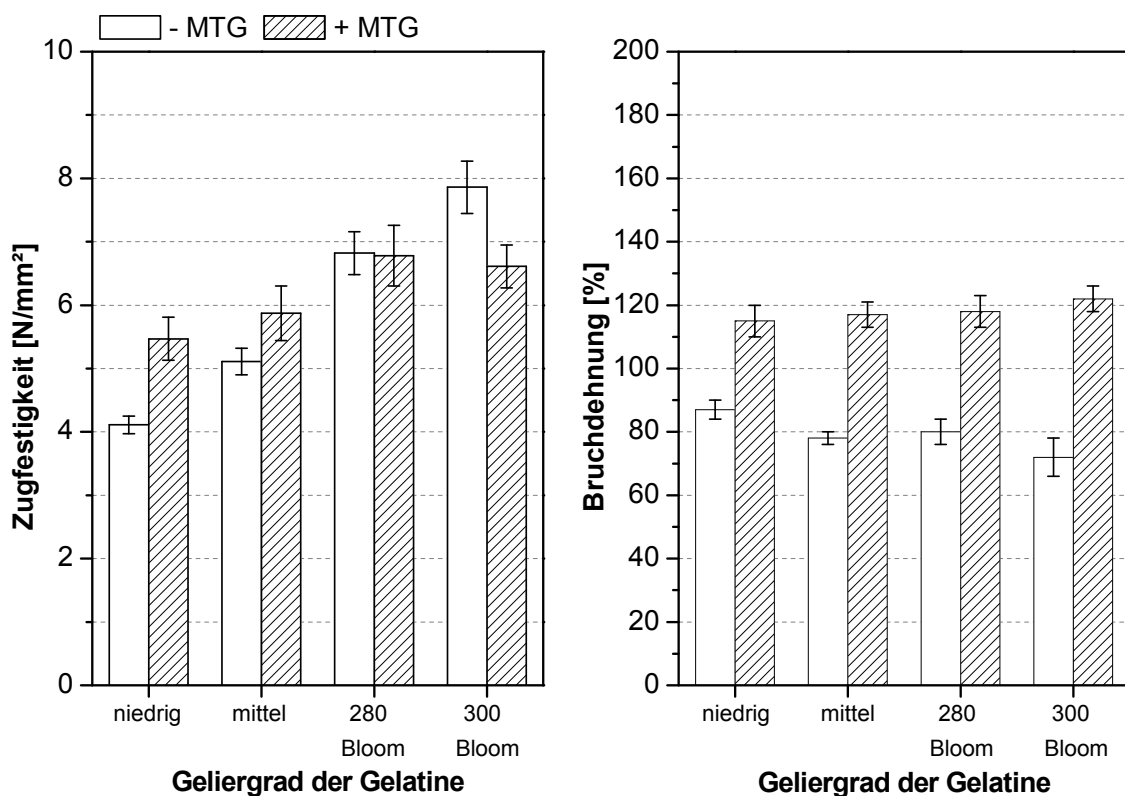


Abbildung 3-32: Einfluss des Geliergrades der Gelatine und Quervernetzung auf die Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen. 6 g Gelatine, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 1 h bei RT quellen gelassen, für 15 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (≥ 40 °C), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s$, n ≥ 5 . Werte in Tabelle 7-13. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkungsweise der Quervernetzung mittels MTG liegt in der Gewinnung und somit in der Struktur der verschiedenen Gelatintypen. Gelatine wird durch Thermohydrolyse mit schrittweiser Erhöhung der Temperatur extrahiert. In der ersten Stufe bei 55-60 °C wird Gelatine mit der besten Qualität gewonnen – sie besitzt die höchste Molekülmasse und den höchsten Geliergrad. Mit Zunahme der Temperatur bis fast zum Siedepunkt sinkt die Qualität der Gelatinen, Geliergrad sowie Molekülmasse nehmen ab [Babel, 1996]. Daraus folgt, dass die eingesetzten 280 und 300 Bloom Gelatinen bei relativ geringer Temperatur und die Gelatinen mit mittlerem bis niedrigem Geliergrad bei hohen Temperaturen extrahiert wurden. Vermutlich verliert die Gelatine mit abnehmender Gelierfähigkeit das Vermögen der Renaturierung zur Tripelhelix-Struktur (Abbildung 3-33). Das erklärt die Zunahme der Zugfestigkeit bei unvernetzten Gelatine-Filmen mit steigendem Geliergrad der Gelatine – die Tripelhelix besitzt durch Wasserstoffbrückenbindungen eine höhere mechanische Stabilität als einzelne Helices oder α -Ketten, welche vermutlich gehäuft bei Gelatinen mit niedrigem Geliergrad vorliegen. Die Vernetzungsreaktion mittels MTG wurde bei 50 °C durchgeführt, wobei die Gelatine als Gelatinesol vorlag (Abbildung 3-33). Dabei wurden die einzelnen α -Ketten miteinander quervernetzt, wobei beim Abkühlen eine erneute Ausbildung der Tripelhelix-Struktur verhindert wurde. Das gebildete Proteinnetzwerk war elastischer und weniger stabil als die Tripelhelix-Struktur. Damit verursachte die MTG-Behandlung bei Gelatinen mit hohem Geliergrad (280 und 300 Bloom) im Vergleich zu unvernetzten Filmen eine Zunahme der Bruchdehnung und Abnahme der Zugfestigkeit. Im Gegensatz dazu führte die Quervernetzung mittels MTG bei Gelatinen mit niedrigem - mittlerem Geliergrad zu einer Erhöhung in Zugfestigkeit und Bruchdehnung, da das gebildete Proteinnetzwerk mechanisch stabiler war als unvernetzte α -Ketten oder Helices. Folglich können die mechanischen Eigenschaften von Gelatine-Filmen entscheidend mit der Wahl des Geliertes der Gelatine beeinflusst werden.

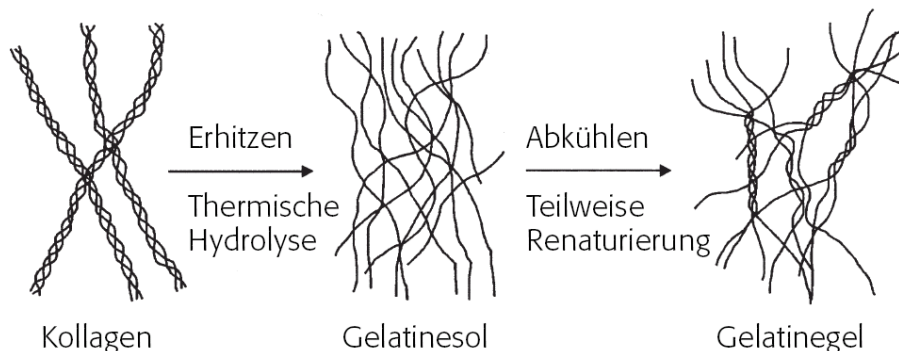


Abbildung 3-33: Schematische Darstellung des Überganges von Kollagen zu Gelatinesol und -gel durch Erhitzen bzw. Erkalten. [Babel, 1996]

3.3.3.2 Erbsenprotein aus unterschiedlicher Gewinnung

Erbsenprotein konnte mittels MTG quervernetzt (vgl. Abschnitt 3.2.1.1) werden und eignete sich für eine Filmherstellung (vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Dieses Protein (Fraktion N°1) wurde von der Firma Emsland-Stärke GmbH ebenso wie zwei weitere Erbsenprotein-Fraktionen (N°2 und N°3, vgl. Abschnitt 2.1.3) zur Verfügung gestellt. Die drei Proteinfractionen wurden anhand ihrer Löslichkeit, Eignung zur Filmherstellung und Filmeigenschaften untersucht und miteinander verglichen.

Zunächst wurden Filme wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben nach dem Standardverfahren hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-34 dargestellt. Aus Erbsenprotein-Fraktion N°1 und N°3 konnten Filme hergestellt werden. Diese Filme hatten eine gelbliche, glatte und klebrige Beschaffenheit. Im Gegensatz dazu entstand bei Fraktion N°2 kein zusammenhängender Film sondern eine bröselige, pulvrige Schicht. Die Ursache dafür lag in der geringen Löslichkeit des Proteins, welche sich bei einer in Ruhe befindlichen Filmsuspension in einem schnell absetzenden Sediment äußerte. Deshalb folgte die Untersuchung zur Löslichkeit der drei Erbsenprotein-Fraktionen.

Die Bestimmung der Löslichkeit der Protein-Fraktionen wurde wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben durchgeführt und basierte auf der Messung von Trockengewichten (Annahme: Ausgangsmaterial zu 100 % Protein). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-3 zusammengefasst. Bei eingesetzten 6 g Feststoff in 110,4 g Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7) – vergleichbar mit Standard-Filmansatz – besaß Fraktion N°1 etwa 60 % lösliches Protein. Im Gegensatz dazu wurde bei Fraktion N°2 nur etwa 7 % und bei Fraktion N°3 etwa 38 % lösliches Protein gemessen. Die Behandlung während der Proteingewinnung verfügte damit über einen großen Einfluss auf die Löslichkeit der Produkte. Während die Proteine in Fraktion N°1 relativ milden Bedingungen bei der Gewinnung unterlagen (pH 5, in Lösung), wurden bei Fraktion N°2 und N°3 die Proteine bei 60 °C an ihrem isoelektrischen Punkt gefällt (pH 4,5), was in einer sehr niedrigen Löslichkeit resultierte. Dabei konnte die Löslichkeit durch eine Neutralisierung auf pH 7 (Fraktion N°3) erhöht werden (7 → 38 %). Für eine wiederholte Herstellung von Proteinfilmen wurde der einzusetzende Feststoff so kalkuliert, dass etwa 6 g lösliches Protein zur Verfügung standen.

A, Fraktion N°1



B, Fraktion N°2



C, Fraktion N°3



Abbildung 3-34: Filmherstellung aus Erbsenprotein in Abhängigkeit der Gewinnung, ohne MTG. 6 g Proteinpulver, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert, 6 mL vorgewärmten Puffer hinzugefügt, anschließend Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert.

Tabelle 3-3: Bestimmung des löslichen Anteils an Erbsenprotein in Ausgangsmaterialien mit unterschiedlicher Gewinnung. FS...Feststoff.

Erbsenprotein	Löslicher Anteil des Ausgangsmaterials	Einwaage FS für 6 g gelöstes Protein im Film
Fraktion N°1	59,1 %	10 g
Fraktion N°2	7,4 %	86 g
Fraktion N°3	37,8 %	16 g

Erneut wurden Filme wie in Abschnitt 2.3.2.1 beschrieben nach dem Standardverfahren hergestellt. Dabei kamen zusätzlich die neu kalkulierten Feststoffmengen an Erbsenprotein zum Einsatz und lediglich der Überstand wurde nach einer Zentrifugation für 10 min bei 10000xg in die PTFE-Form gegossen (lösliches Protein). Eine Übersicht über die optischen Beobachtungen der Erbsenprotein-Filme befindet sich in Tabelle 3-4. Aus dem Erbsenprotein der Fraktion N°2 konnten keine Filme hergestellt werden, da sich abermals kein zusammenhängender Film sondern eine pulvrige Schicht bildete. Aus den beiden anderen Erbsenprotein-Fractionen konnten gelbliche und transparente Filme hergestellt werden. Die Filme aus Fraktion N°1 (gesamtes Protein) besaßen ungelöste Partikel, welche sich in einer unebenen Oberfläche der Filme zeigte. Bei Verwendung des löslichen Proteins waren die Filme glatt und homogen. Eine Weichmachung mit Glycerin führte zu klebrigen Filmen, wohingegen aus PEG 300 feste und stabile Filme entstanden.

Tabelle 3-4: Optische Beobachtungen der hergestellten Filme aus Erbsenprotein in Abhängigkeit der Gewinnung und dem verwendeten Proteinanteil.

Erbsenprotein	Glycerin als Weichmacher	PEG 300 als Weichmacher
Fraktion N°1	<u>gesamtes Protein:</u> - gelblich - ungelöste Partikel → Oberfläche uneben - sehr klebrig <u>lösliches Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - zu klebrig → Messung mechanischer Kennwerte nicht möglich	<u>gesamtes Protein:</u> - gelblich, milchig - ungelöste Partikel → Oberfläche uneben - relativ fest bis brüchig <u>lösliches Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - sehr fest, teilweise sehr brüchig
Fraktion N°2	bildete keinen Film, pulvrige Masse	bildete keinen Film, pulvrige Masse
Fraktion N°3	<u>gesamtes Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - flexibel und wenig klebrig <u>lösliches Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - weich, klebrig	<u>gesamtes Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - relativ fest bis brüchig, nicht klebrig <u>lösliches Protein:</u> - gelblich, transparent - glatt und homogen - sehr fest, teilweise sehr brüchig

Die Zugeigenschaften der Erbsenprotein-Filme wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben gemessen und sind in Abbildung 3-35 dargestellt.

Die Filme aus löslichem Erbsenprotein der Fraktion N°1 mit Glycerin waren für eine Messung der Zugeigenschaften zu klebrig. Deshalb war kein Vergleich zu den Filmen aus dem gesamten Protein möglich. Für annähernd alle anderen Filme galt: durch die Verwendung des löslichen Anteils aus Erbsenprotein konnten im Gegensatz zu dem Gesamtprotein glatte und homogene Filme mit verbesserten mechanischen Eigenschaften hergestellt werden. Die ZF wurde dabei um bis zu 161 % und die BD um bis zu einen Faktor von 7,8 erhöht. Neben dem löslichen Anteil hatte ebenfalls die Gewinnung des Proteins einen Einfluss auf die Zugeigenschaften der Filme. Die Verwendung des Proteins (gesamtes und lösliches) aus Fraktion N°3 resultierte in eine höhere ZF und BD als bei Filmen mit Protein aus Fraktion N°1. Eine Ausnahme bildeten die Filme mit PEG 300 als Weichmacher – dabei führte das Protein der Fraktion N°1 zu Filmen mit einer höheren BD von bis zu 117 %. Bei Verwendung

von Erbsenprotein aus Fraktion N°1 resultierte die Quervernetzung mittels MTG in eine Erhöhung von ZF und BD. Im Gegensatz dazu wurden bei vernetzten Filmen aus Erbsenprotein der Fraktion N°3 zum Teil höhere ZF jedoch geringere BD gemessen – die Enzymbehandlung führte für dieses Protein zu einem Verlust der Dehnbarkeit.

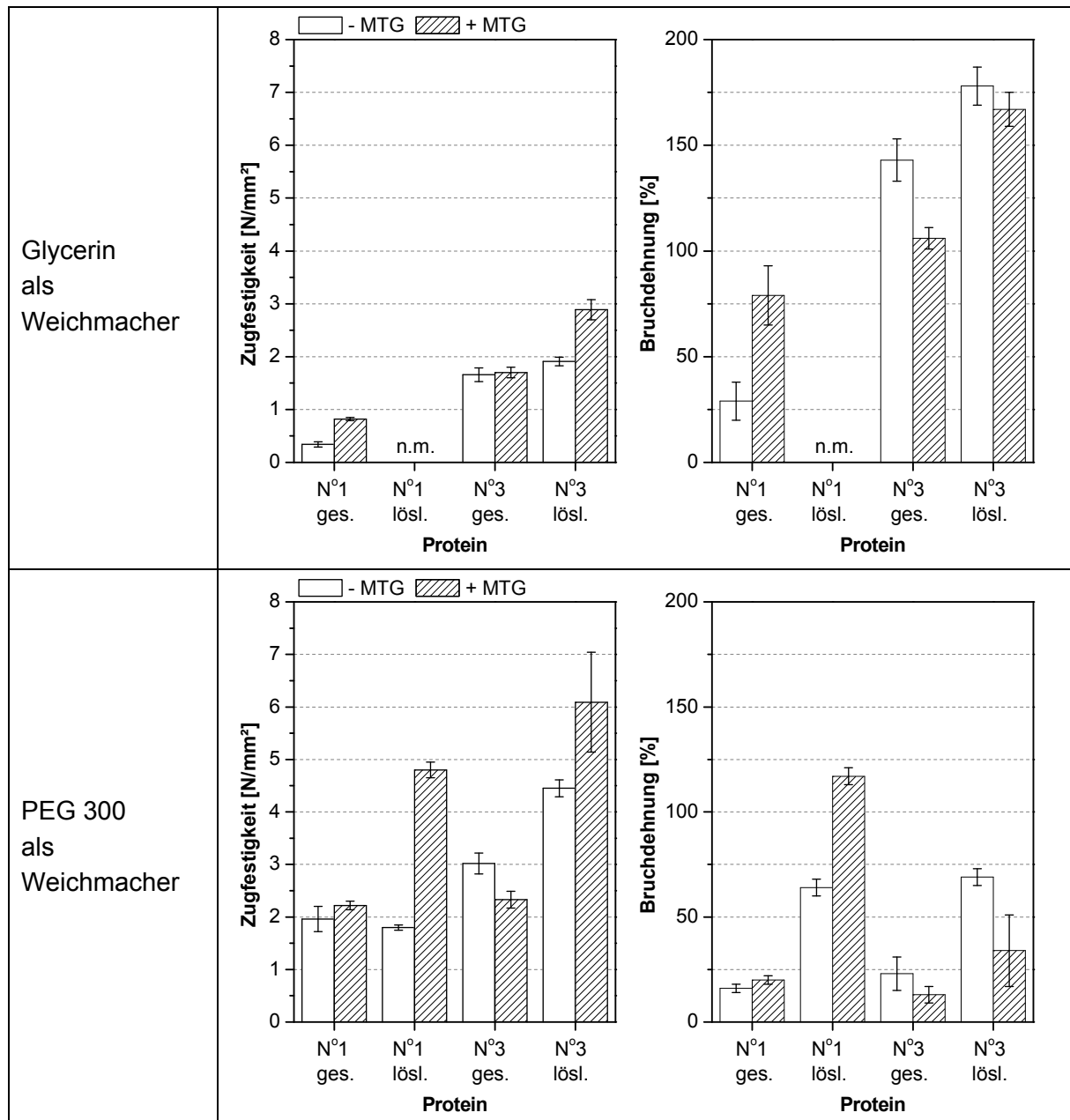


Abbildung 3-35: Einfluss der Gewinnung und verwendetem Weichmacher auf die Zugeigenschaften von Filmen aus Erbsenprotein (± MTG). Erbsenproteinpulver (für ges.: 6 g, für N°1 lösl.: 10 g, für N°3 lösl.: 16 g), 3 g Weichmacher und 1,5 Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT) und 30 min bei 50 °C inkubiert. Für ges.: 1,5 g TG Activa® WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen. Für lösl.: bei 40 °C und 10000xg für 10 min zentrifugiert, dem Überstand 1,5 g TG Activa® WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), Luftblasen entfernt und den Überstand in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen. Filme für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-14. MTG...mikrobielle Transglutaminase, n.m... nicht messbar, ges...gesamtes Protein, lösl...lösliches Protein.

Ein Vergleich zwischen den beiden Weichmachern zeigte, dass mit Glycerin weichere und elastischere Filme erzeugt wurden – die Filme besaßen mit bis zu 178 % eine 2-8-fach höhere BD, was der BD von quervernetzten Na-Caseinat-Filmen entsprach (vgl. Abbildung 3-13). PEG 300 hingegen führte zu festeren Filmen – die ZF der Filme war mit bis zu 6,09 N/mm² um 1,5-6,5-fach höher als bei Filmen mit Glycerin und war mit der ZF von Gelatine-Filmen vergleichbar (vgl. Abbildung 3-13).

Das lösliche Erbsenprotein der Fraktion N^o3 ist aufgrund der besseren Handhabbarkeit der Filme (geringere Klebrigkeit) und überwiegend höheren Zugeigenschaften im Vergleich zu dem Protein aus Fraktion N^o1 geeigneter für die Filmherstellung. Aus diesem Grund wurden Filme aus löslichem Erbsenprotein der Fraktion N^o3 zusätzlich anhand des Weiterreiß- und Durchstoßversuches charakterisiert und mit den Filmen aus Protein der Fraktion N^o1 (gesamtes Protein) verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-5 zusammengefasst.

Tabelle 3-5: Weitere mechanische Eigenschaften von Filmen aus Erbsenprotein (\pm MTG) in Abhängigkeit der Gewinnung und verwendetem Weichmacher. W_R...Weiterreißwiderstand; Durchstoßeigenschaften: F_M...Schädigungskraft, I_M...Schädigungsverformung, E_M...Schädigungsenergie; MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Protein	- MTG				+ MTG			
	W _R [N/mm]	F _M [N]	I _M [mm]	E _M [J]	W _R [N/mm]	F _M [N]	I _M [mm]	E _M [J]
Fraktion N ^o 1 gesamt, Glycerin	6,85 ± 0,7	84 ± 6	18,2 ± 2,5	0,8 ± 0,07	10,19 ± 1,7	101 ± 4	20,5 ± 2,1	1,0 ± 0,1
Fraktion N ^o 3 löslich, Glycerin	25,02 ± 2,5	131 ± 6	17,1 ± 1,4	1,1 ± 0,1	22,81 ± 2,3	183 ± 11	17,6 ± 0,7	1,6 ± 0,1
Fraktion N ^o 3 löslich, PEG 300	1,97 ± 0,3	23 ± 5	3,8 ± 0,7	0,02 ± 0,01	0,94 ± 0,1	16 ± 3	2,2 ± 0,4	0,01 ± 0,0

Im Vergleich zu Fraktion N^o1 (gesamtes Protein) führte die Verwendung des löslichen Proteins der Fraktion N^o3 mit Glycerin zu einer deutlichen Erhöhung des Weiterreißwiderstandes der Filme um den Faktor 2,2-3,7. PEG 300 hingegen senkte den Widerstand drastisch von 22,81-25,02 auf 0,94-1,97 N/mm. Bei den Durchstoßeigenschaften der Filme verhielt es sich analog – lösliches Protein der Fraktion N^o3 mit Glycerin resultierte in einen Anstieg der Kennwerte (mit Ausnahme der Verformung), wohingegen mit PEG 300 ausnahmslos geringere Werte gemessen wurden.

Es wurde gezeigt, dass die Behandlungen zur Gewinnung der Proteine pflanzlichen Ursprungs einen großen Einfluss auf die Herstellung von Filmen und deren Eigenschaften besaßen. Dabei spielte die Löslichkeit der Proteine eine entscheidende Rolle – je löslicher die Proteine waren desto weniger Ausgangsmaterial musste eingesetzt werden, um optisch schöne sowie mechanisch stabile Filme zu erhalten. Erneut wurde gezeigt, dass durch Einsatz verschiedener Weichmacher die mechanischen Eigenschaften der Erbsenprotein-Filme beeinflusst wurden. In Abhängigkeit späterer Anwendungen bestehen bestimmte Anforderungen einerseits an eine hohe Zugfestigkeit, was z.B. mit PEG 300 erreicht werden kann, andererseits an hohe Elastizitäten, wofür Glycerin geeigneter wäre.

3.3.4 Variation der MTG-Konzentration

Es wurde gezeigt, dass durch eine enzymatische Quervernetzung der Proteine mittels MTG die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen beeinflusst werden können (vgl. Abschnitte 3.2.2, 3.3.2 und 3.3.3). Dabei wurde eine hohe MTG-Konzentration von 25 U/g Protein eingesetzt (bezogen auf Angabe des Herstellers: 100 U/g TG Activa[®]WM). Für eine mögliche Reduzierung der Materialkosten wurde der Einfluss der Enzymkonzentration auf die Zugeigenschaften anhand von Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filmen wie in Abschnitt 2.3.2.7 beschrieben untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-36 dargestellt.

Ein zunehmender Vernetzungsgrad bewirkte bei Na-Caseinat mechanisch stabilere und dehnbarere Filme – ZF und BD nahmen mit steigender MTG-Konzentration zu. Der höchste Einfluss der Vernetzung wurde bei geringer MTG-Konzentration beobachtet (2 U/g Protein). Dabei stieg ZF und BD um 40 % bzw. 24 % – dies entspricht etwa zwei Drittel des Gesamteinflusses. Der Na-Caseinat-Film mit 16 U/g Protein wies etwas abweichende KW auf. Diese beruhen vermutlich auf schwankenden Umgebungsbedingungen, da die Filme nicht zeitgleich hergestellt und gemessen wurden.

Im Gegensatz zu Na-Caseinat-Filmen wurden mit zunehmender MTG-Konzentration in Erbsenprotein-Filmen lokale Maxima beobachtet. Die höchste ZF von 3,21 N/mm² wurde bei 16 U/g Protein gemessen, lag jedoch im Fehlerbereich der Werte bei 25 U/g Protein und ist somit nicht signifikant. Die höchste BD von 198 % wurde bei 2 U/g Protein gemessen – dies entspricht einer Steigerung um 11 % im Vergleich zum unvernetzten Film (-MTG). Bei weiterer Erhöhung der MTG-Konzentration sank die BD um 16 % im Vergleich zum Maximalwert.

Die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen lassen sich demnach mit ausgewählten MTG-Konzentrationen und somit bestimmten Vernetzungsgraden beeinflussen. Dennoch sollten die Versuche wiederholt werden.

Neben den mechanischen Eigenschaften wurde auch die Optik der Filme durch eine Quervernetzung mittels MTG beeinflusst (Abbildung 3-37). Die Filme wiesen durch MTG-Behandlung mehr Transparenz und Glanz auf. Die Ursache dafür lag vermutlich in der Ausbildung eines Proteinnetzwerkes durch Quervernetzung und einer damit verbundenen Ausrichtung der Proteine – dies resultierte in einem lichtdurchlässigeren Film. Für eine Anwendung beispielsweise als Lebensmittelverpackung ist ein transparenter Film von Vorteil.

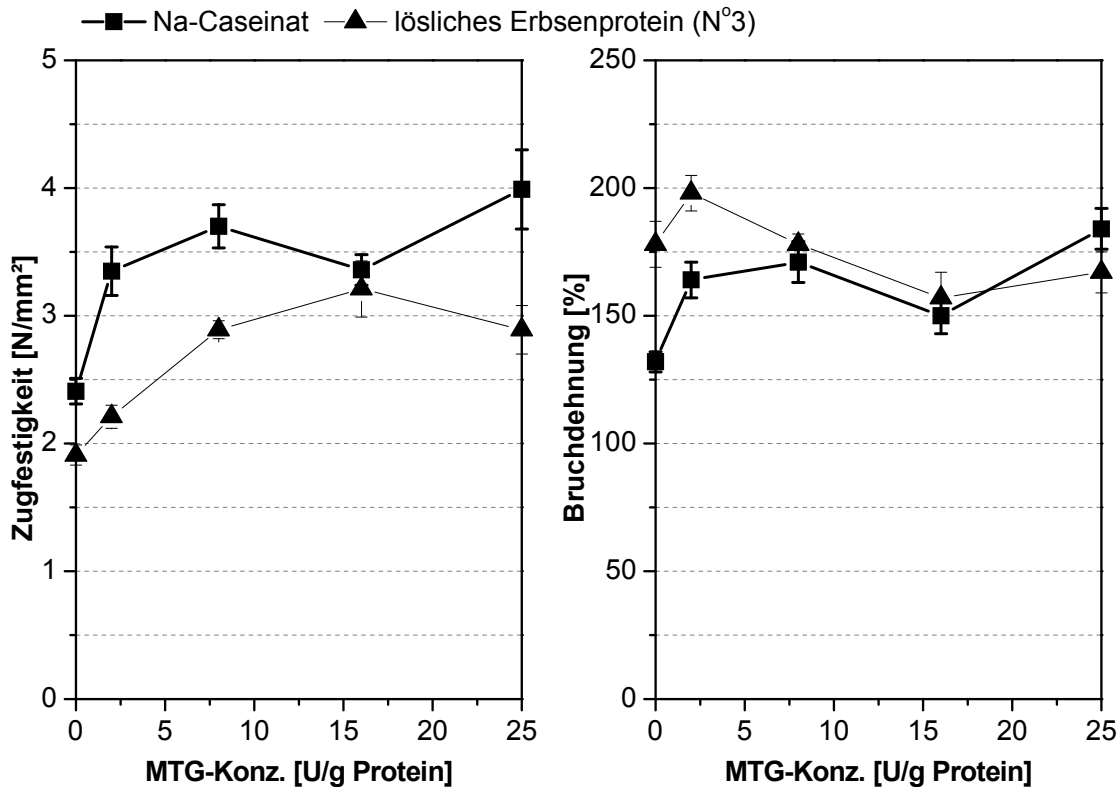
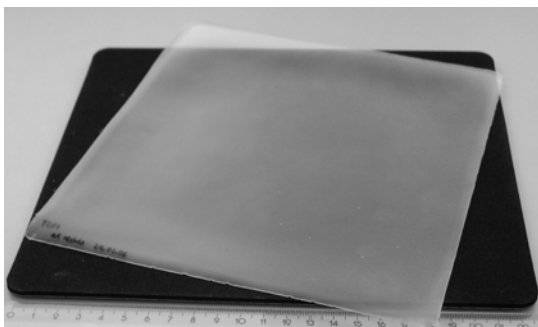


Abbildung 3-36: Zugeigenschaften von Proteinfilmen in Abhängigkeit der MTG-Konzentration (bezogen auf Hersteller-Angabe: 100 U/g TG Activa[®]WM). Proteinpulver (6 g Na-Caseinat, 16 g Erbsenprotein), 3 g Glycerin und Maltodextrin (1,5 / 1,38 / 1 / 0,5 / 0 g; insgesamt mit TG Activa[®]WM = 1,5 g) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert. Für Na-Caseinat: TG Activa[®]WM (0 / 0,12 / 0,5 / 1 / 1,5 g in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben, anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen. Für Erbsenprotein: bei 40 °C und 10000xg für 10 min zentrifugiert, dem Überstand TG Activa[®]WM (0 / 0,12 / 0,5 / 1 / 1,5 g in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen. Filme für 48 h bei RT getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/s, $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Werte in Tabelle 7-15. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

A



B

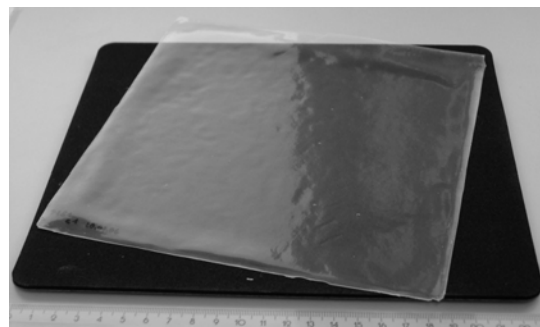


Abbildung 3-37: Na-Caseinat-Filme in Abhängigkeit der Quervernetzung. A, ohne MTG; B, mit MTG. 6 g Na-Caseinat, 3 g Glycerin und 1,5 g Maltodextrin (Filme ohne MTG) in 110,4 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, für 30 min bei 90 °C gelöst, pH-Einstellung auf pH 7 (bei RT), 30 min bei 50 °C inkubiert und 1,5 g TG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmtem 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) zugegeben (Filme ohne MTG: 6 mL Puffer), anschließend bei 40 °C und 177xg für 1 min zentrifugiert, Luftblasen entfernt und in 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen, bei RT für 48 h getrocknet, 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF in einem Exsikkator konditioniert.

4 Diskussion

Die Untersuchung des Potentials von Proteinen zur Herstellung von Biomaterialien war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Dabei wurden pflanzliche Proteine, die als Nebenprodukte bei der industriellen Stärkeherstellung gewonnen werden, mit zwei tierischen Proteinen (Na-Caseinat, Gelatine) verglichen. Der Schwerpunkt lag in der enzymatischen Quervernetzung der verwendeten Proteine mit Hilfe der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) und der Charakterisierung der Filme hinsichtlich einer Anwendung in der Landwirtschaft. Ein zweiter Schwerpunkt bezog sich auf die Optimierung der Filmeigenschaften.

Ein wichtiges Bewertungskriterium von Kunststofffilmen sind die mechanischen Eigenschaften. Hierfür wird hauptsächlich der konventionelle Zugversuch zur Bestimmung von Zugfestigkeit (ZF) und Bruchdehnung (BD) verwendet. In der Literatur existieren für eine Prüfung an Proteinfilmen verschiedene Bedingungen, die teilweise nicht der Norm entsprechen – u.a. variieren Probenbreite und Einspannlänge. Für eine Bewertung der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu Literaturwerten war es notwendig, den Einfluss der Probenabmessungen auf die Zugeigenschaften von Proteinfilmen zu untersuchen (vgl. Abschnitt 3.1.3). Unter Verwendung von Na-Caseinat-Filmen wurde dabei kein signifikanter Unterschied zwischen 10 und 15 mm Probenbreite festgestellt. Eine Vergrößerung der Einspannlänge von 32 auf 100 mm resultierte erwartungsgemäß in einer Abnahme der ZF und BD – aufgrund des zunehmenden Messbereiches der Probe steigt die Wahrscheinlichkeit von Inhomogenitäten, welche potentielle Fehlstellen darstellen und zu einem vorzeitigen Versagen des Prüfkörpers führen können. Jedoch betrug die Differenz weniger als 10 % und lag damit im Bereich des maximalen Fehlers. Ein signifikanter Einfluss der Einspannlänge auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen kann somit ausgeschlossen werden. Zur Einhaltung der Norm DIN EN ISO 527-3 [DIN, 1995] wurde eine Probenbreite von 15 mm (aufgrund geringerer Standardabweichungen) und eine Einspannlänge von 100 mm gewählt. Die amerikanische Norm ASTM D 882 schreibt für eine erwartete BD von 20-100 % ebenfalls eine Einspannlänge von 100 mm vor, für eine BD > 100 % werden hingegen 50 mm vorgeschlagen. In Bezug darauf wurden die Messungen von z.B. Oh et al. aufgrund einer Einspannlänge von 20 mm nicht nach Norm durchgeführt [Oh et al., 2004]. Dessen Ergebnisse können wegen dem geringen Einfluss der Einspannlänge auf die Zugeigenschaften von Proteinfilmen dennoch für einen Vergleich mit den eigenen Werten herangezogen werden. Zur Vereinfachung der Probenpräparation für den Zugversuch wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues Schneidegerät entwickelt. Der Rollenschneider basiert auf zwei parallel angeordneten Klingen mit definiertem Abstand, die eine einheitliche Breite des Probestreifens gewährleisten, glatte Schnittkanten erzeugen und reproduzierbare Messungen liefern. Seine einfache und schnelle Handhabung ist ein weiterer Vorteil.

4.1 Eignen sich pflanzliche Proteine aus Nebenströmen zur Herstellung von Biokunststoffen?

Filme aus den tierischen Proteinen Na-Caseinat und Gelatine sind bereits in der Literatur beschrieben [Chambi and Grosso, 2006; Oh et al., 2004; Taylor et al., 2002]. Aufgrund uneinheitlicher Zusammensetzungen, Verfahren zur Herstellung bzw. Charakterisierung wurden diese in der vorliegenden Arbeit erneut untersucht und als Standardmaterialien zum Vergleich für Filme aus pflanzlichen Proteinen herangezogen. Die Filme aus tierischen Proteinen waren transparent, glatt und im Fall von Na-Caseinat leicht gelblich. Gelatine-Filme wiesen je nach Zusammensetzung und verwendetem Weichmacher hohe Zugfestigkeiten (bis zu 50 N/mm²) auf. Bei einer Glycerinkonzentration von 50 % (w/w Protein) betrug die ZF von Gelatine-Filmen 4-8 N/mm² und die BD 70-120 %. In den Arbeiten von Taylor et al. hingegen besaßen die Gelatine-Filme wesentlich geringere Zugfestigkeiten (1,8-2,7 N/mm²) jedoch höhere Bruchdehnungen (200 %) [Taylor et al., 2002], obwohl die Glycerinkonzentration nur etwa 33 % (w/w Protein) betrug und zu festeren Filmen führen müsste. Bei Chambi und Grosso wurde ebenfalls eine geringere Glycerinkonzentration (25 % w/w Protein) verwendet [Chambi and Grosso, 2006]. Diese resultierte in sehr festen (36 N/mm²) doch unelastischen (15 %) Gelatine-Filmen. Die Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen werden erheblich von Filmzusammensetzung, Herstellungsbedingungen und Weichmacherkonzentration beeinflusst und sind somit nur schwierig vergleichbar.

Na-Caseinat-Filme besaßen im Vergleich zu Gelatine-Filmen geringere Zugfestigkeiten, waren mit einer BD bis zu 200 % jedoch erheblich dehnbarer (vgl. Abschnitt 3.2.2.1). Bei gleicher Glycerinkonzentration (50 % w/w Protein) erreichte Oh et al. mit Casein-Filmen eine höhere ZF (3,5 N/mm², eigene Filme: 2,4 N/mm²) und BD (220 %, eigene Filme: 132 %). Er verwendete jedoch im Vergleich zur vorliegenden Arbeit einen anderen Puffer (50 mM Na-Phosphat, pH 8), eine geringere Trocknungs- bzw. Konditionierungszeit sowie Casein eines anderen Herstellers [Oh et al., 2004]. Chambi und Grosse verwendeten neben Gelatine auch Casein zur Filmherstellung [Chambi and Grosso, 2006]. Eine Glycerinkonzentration von 25 % (w/w Protein) führte zu Filmen mit einer ZF von 12 N/mm² und einer BD von 10 %. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden bei gleicher Glycerinkonzentration eine geringere ZF von 6,2 N/mm² jedoch eine höhere BD von 75 % gemessen. In der Arbeit von Chambi und Grosso wurden die Proteinfilme (ohne enzymatische Behandlung) im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit nicht konditioniert, was zu Filmen mit geringerer Feuchtigkeit und somit höheren Festigkeit führen kann.

Bisher als Futtermittel vermarktete pflanzliche Proteine aus Erbse, Kartoffel, Mais, Weizen, Roggen und Raps wurden mit dem in dieser Arbeit verwendeten Standard-Gießverfahren zur Herstellung von Proteinfilmen untersucht. Eine Filmbildung war lediglich mit Erbsen- bzw. Kartoffelprotein möglich. Alle anderen Ausgangsmaterialien waren aufgrund einer geringen Löslichkeit in Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7) für eine Filmherstellung nicht geeignet – sie resultierten in partiell klebrigen bzw. pulvrigen und inhomogenen Schichten, die nicht aus den Gussformen entfernbar waren (vgl. Abschnitt 3.2.1.2). Proteine aus Mais und Weizen bestehen zu 79-93 % aus wasser- bzw. pufferunlöslichen Fraktionen (Prolamine und Gluteline, vgl. Abschnitt 1.1.3) und können nur mit wässrigen Alkohol- oder Säurelösungen extrahiert werden. In der Literatur wurde u.a. 70 % Ethanol zum Lösen von Weizengluten [Hernandez-Munoz et al., 2004] und 90 % Ethanol zum Lösen von Maiszein verwendet

[Lawton, 2004]. Roggenproteine bestehen zur Hälfte aus wasser- bzw. pufferlöslichen Proteinfractionen (Albumine und Globuline), waren dennoch für eine Filmherstellung nicht anwendbar. Vermutlich lagen die Proteine aufgrund extremer Temperaturen oder pH-Werte während der Gewinnung in koagulierter und unlöslicher Form vor.

Die Filme aus Erbsen- und Kartoffelprotein wiesen eine gelbe bzw. braune Färbung auf, waren klebrig, nicht transparent und besaßen teilweise raue Oberflächen aufgrund von unlöslichen Partikeln. Für Erbsenprotein-Filme wurden bereits einige Untersuchungen zu Protein- und Weichmacherkonzentration [Viroben et al., 2000] sowie verschiedener Weichmacher [Gueguen et al., 1998] durchgeführt. Eine Filmherstellung aus Kartoffelprotein ist bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die Filme (ohne MTG Behandlung) waren mit einer ZF < 0,5 N/mm² und einer BD < 50 % wesentlich instabiler als Filme aus tierischen Proteinen (ZF von 2,4-7,7 N/mm², BD von 72-132 %). Gueguen et al. erreichte bei vergleichbarer Zusammensetzung für Erbsenprotein-Filme ähnliche Kennwerte (KW) [Gueguen et al., 1998]. Neben dem Zugversuch wurden erstmals weitere mechanische Untersuchungen an Proteinfilmen durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.2.2). Der Weiterreißversuch simuliert die Zugbeanspruchung eines bereits geschädigten Films, wobei der Widerstand gegen ein Weiterreißen gemessen wird. Beim Durchstoßversuch wird der Film mit einem Fallbolzen durchstoßen und unterliegt einer biaxialen Beanspruchung – dies simuliert z.B. eine Schädigung durch Hagelkörner.

Für Na-Caseinat- und Gelatine-Filme wurden Weiterreißwiderstände von 30-32 N/mm gemessen, die Filme aus pflanzlichen Proteinen waren mit bis zu 7 N/mm deutlich weniger widerstandsfähig. Die Auswertung des Durchstoßversuches ergab ähnliche Tendenzen – für Filme aus tierischen Proteinen mussten Kräfte bis 670 N und Energien bis 4,8 J aufgebracht werden, um die Filme zu durchstoßen. Bei Erbsenprotein-Filmen ergaben sich lediglich Höchstkräfte bis 84 N und Energien bis 0,8 J. Die Schädigungsverformung ist ähnlich wie die BD im Zugversuch ein Maß für die Dehnbarkeit des Materials. Im Gegensatz zur BD (für jedes Protein unterschiedlich) war sie für alle Proteinfilme gleich. Vermutlich hat die Proteinstruktur einen großen Einfluss auf die Dehnbarkeit der Filme bei einachsiger Beanspruchung quer zur Filmdicke. Beim Durchstoßversuch trifft der Fallbolzen hingegen längst zur Filmdicke auf den Proteinfilm (biaxiale Beanspruchung). Dieser Energieeintrag wird möglicherweise von allen Proteinen ähnlich absorbiert, was zu einer gleichen Verformung führt.

Die Kartoffelprotein-Filme waren aufgrund hoher Klebrigkeit schwer handhabbar und konnten nur im Zugversuch untersucht werden.

Generell waren die Filmen aus pflanzlichen Proteinen im Vergleich zu Filmen aus tierischen Proteinen weniger stabil gegenüber mechanischer Belastung. Die Ursache dafür liegt in der Zusammensetzung der Proteine – im Gegensatz zu Na-Caseinat und Gelatine bestehen Erbsen- und Kartoffelproteinpulver aus einem Gemisch von Proteinen verschiedener Struktur, Molekulargewicht und Löslichkeit. Insbesondere durch die Unterschiede in der Löslichkeit ist vermutlich keine homogene Filmbildung gegeben, aufgrund dessen ein Verlust der mechanischen Stabilität möglich ist. Zum Nachweis dieser These wurden Erbsenproteine untersucht, die sich in ihrer Gewinnung unterschieden (Bereitstellung durch Emsland-Stärke GmbH). Deren Löslichkeit in Puffer (20 mM Tris/HCl, pH 7) variierte von 7-60 %, obwohl Erbsenprotein nahezu vollständig aus wasser- bzw. pufferlöslichen Proteinen besteht (Albumine und Globuline, vgl. Abschnitt 1.1.3). Die Proteine wurden während der Gewinnung zum Teil koaguliert und verloren dadurch ihr Lösungsvermögen. Durch Verwendung des rein

löslichen Proteins konnten Filme mit einer verbesserten Optik (transparent, glatte Oberfläche) und mechanischen Stabilität erzeugt werden – Zug-, Weiterreiß- und Durchstoßeigenschaften wurden erhöht und waren vergleichbar mit den KW der Na-Caseinat-Filme. Folglich ist eine hohe Löslichkeit der Proteine notwendig, um eine erfolgreiche Filmherstellung nach der Standardmethode verbunden mit einer besseren mechanischen Stabilität zu gewährleisten.

In Bezug auf eine Anwendung in der Landwirtschaft wurden die Proteinfilme erstmals einem praxisnahen Bewitterungstest in einem Gewächshaus mit Beregnung unterzogen (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die verwendeten Umgebungsbedingungen (Temperatur, relative Luftfeuchte) und Regenmengen orientierten sich an Durchschnittswerten für Deutschland im Monat Juni (Statistik des Deutschen Wetterdienstes, Mittel von 1961-1990). In einem zuvor durchgeführten Löslichkeitstest, bei dem Filmproben für 10 min bei 30 °C in Wasser getaucht wurden, war ein nahezu vollständiges Auflösen der Proteinfilme (ohne MTG Behandlung) beobachtet worden. Gelatine bildete aufgrund seiner Unlöslichkeit bei Temperaturen < 35 °C eine Ausnahme. Dieser Test simulierte jedoch unrealistische Bedingungen. Während des Bewitterungstests im Gewächshaus wurden die Proteinfilme zweimal pro Tag über eine Gesamtdauer von sieben Tagen beregnet. Na-Caseinat-Filme (ohne MTG) waren bereits am ersten Tag durch Regentropfen beschädigt und lösten sich auf. Gelatine-Filme (ohne MTG) hingegen begannen sich trotz Unlöslichkeit bei geringen Temperaturen (< 35 °C) nach fünf Tagen aufzulösen. Bei allen Materialien wurde ein Pilzwachstum auf den Oberflächen beobachtet, das ebenfalls zum Abbau des Films führte. In zusätzlichen Versuchen wurde die Abbaubarkeit der Proteinfilme im Boden untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.5.1), wobei sowohl für Na-Caseinat-, Erbsenprotein- als auch für Gelatine-Filme ein Abbau nach nur einem Tag beobachtet wurde. Folglich sind reine Proteinfilme zu sensitiv gegenüber Feuchtigkeit und für eine Anwendung in der Landwirtschaft zu unbeständig.

Neben der biologischen Abbaubarkeit besitzen Proteine einen weiteren Vorteil gegenüber konventionellen Kunststoffen – sie bestehen aus Aminosäuren, die beim Abbau Stickstoff freisetzen und so als Dünger für Pflanzen eingesetzt werden könnten. Dies wurde bisher jedoch nicht nachgewiesen. Ein möglicher Düngeeffekt wurde anhand von zwei Versuchspflanzen (Mais, Tagetes) untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.5.2). Die Platzierung der Proteinfilme erfolgte hier unterhalb der vorgekeimten Maiskörner bzw. vorkultivierten Tagetes-Jungpflanzen. Die Pflanzen zeigten nach vier Wochen keinerlei Mangelerscheinungen in Färbung, Größe und Wuchsverhalten – die Proteinfilme bewiesen Pflanzenverträglichkeit. Bei der Analyse der oberirdischen Frischmasse konnte eine signifikante Erhöhung des Ertrags bei Verwendung von Proteinfilmen im Vergleich zur Kontrolle (ohne Film) gemessen werden, die bei Mais deutlicher sichtbar war als bei Tagetes. Die Proteinfilme führten bei den Maispflanzen zusätzlich zu einem Anstieg der Wuchshöhen. Folglich konnte u.a. der Stickstoff aus den abgebauten Proteinen von den Pflanzen genutzt und gleichzeitig die Düngewirkung von Proteinfilmen nachgewiesen werden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass Proteine zur Herstellung von Filmen generell geeignet sind. Jedoch ist in Bezug auf die späteren Anwendungen noch eine gezielte Optimierung der Filmeigenschaften nötig.

4.2 Eine enzymatische Quervernetzung – ist sie von Vorteil?

Die mikrobielle Transglutaminase (MTG) ist ein industriell genutztes Enzym zur Quervernetzung von Proteinen. Für eine erfolgreiche Reaktion sind Glutamin- und Lysinreste im Protein notwendig. Dies traf für die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsstoffe zu (Na-Caseinat, Gelatine, Erbsen- und Kartoffelprotein, vgl. Abschnitt 1.1.2). Bei der Untersuchung der Vernetzbarkeit wurde jedoch festgestellt, dass sich nicht alle pflanzlichen Proteine als Substrat der MTG eigneten. Während bei Erbsen- und Kartoffelprotein eine Quervernetzung detektiert wurde, war bei MTG-behandeltem Rapsprotein keine Bildung von Polymeren erkennbar. Offensichtlich waren die Glutamin- und Lysinreste des Rapsproteins für die MTG nicht erreichbar, was vermutlich durch eine ausgeprägte Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Proteine verursacht wird. Andere pflanzliche Proteine aus Mais, Weizen und Roggen konnten aufgrund ihrer Unlöslichkeit nicht im Gel der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Da eine Filmherstellung lediglich für Erbsen- und Kartoffelprotein möglich war, wurde auf eine Verbesserung der Vernetzbarkeit von beispielsweise Rapsprotein verzichtet.

Zur Quervernetzung der Proteine innerhalb eines Films existieren in der Literatur verschiedene Verfahren, die einen Vergleich der Ergebnisse untereinander erschweren. Daher wurden für eine standardisierte Filmherstellung zunächst einige Enzymreaktionsbedingungen aus der Literatur miteinander verglichen und hinsichtlich der Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen bewertet (vgl. Abschnitt 3.1.4). Dabei konnte grundsätzlich festgestellt werden, dass die Ausbildung eines Proteinnetzwerkes durch Quervernetzung mittels MTG einen Einfluss auf die Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen hat. Bei Raumtemperatur (RT) erhöhte sich die ZF und BD der Filme um 66 (auf 4 N/mm²) bzw. 40 % (auf 184 %), bei 50 °C hingegen wurde eine Zunahme der ZF ebenfalls um 66 %, aber eine Abnahme der BD um 6 % gemessen. Das Temperaturoptimum für MTG liegt bei 50 °C. Es konnte nachgewiesen werden, dass MTG in Anwesenheit von Na-Caseinat bei dieser Temperatur mindestens 90 min stabil ist. Deshalb ist das Netzwerk nach Filmtrocknung bei 50 °C vermutlich ausgeprägter als nach Trocknung bei RT und führt zu einem Verlust der Dehnbarkeit. Jiang et al. hingegen beobachtete bei steigender Trocknungstemperatur von Filmen aus isoliertem Sojaprotein (18 → 50 °C) eine Abnahme in ZF und BD [Jiang et al., 2007]. Jedoch wurde im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit (Standardkonzentration = 25 U/g Protein) eine geringere MTG-Konzentration von 4 U/g Protein verwendet. Eine unvollständige Vernetzung, wie sie nach 15 min bei 50 °C vorlag, beeinflusste die ZF der Filme nicht und die BD nur geringfügig (Erhöhung um 17 %).

Die Zunahme von ZF und BD aufgrund einer Quervernetzung bei RT steht im Widerspruch zu den Arbeiten von Oh et al., bei denen die MTG-Behandlung neben einer Erhöhung der BD (220 → 250 %) zu einer Abnahme der ZF (3,3 → 2,5 N/mm²) in Casein-Filmen führte [Oh et al., 2004]. Die Ursache dafür ist unklar und kann nicht diskutiert werden, da in der Publikation von Oh et al. keine genauen Angaben über die verwendete MTG-Konzentration zu finden sind. Dennoch liegen die KW von Oh et al. annähernd im Bereich der Na-Caseinat-Filme aus der vorliegenden Arbeit. Eine Trocknungstemperatur von 50 °C wurde bei der Herstellung von Chitosan-Molkeprotein-Filmen verwendet [Di Pierro et al., 2006]. Dabei wurde durch die Vernetzung mittels MTG ebenfalls ein signifikanter Anstieg der ZF (9,5 → 26,2 N/mm²) jedoch eine deutlichere Verringerung der BD (14,1 → 3,1 %) beobachtet. Die definierte Enzymreaktion für 15 min bei 50 °C (mit anschließender

Inaktivierung) nutzten Chambi und Grosso zur Herstellung von Casein-Filmen. Sie stellten eine vergleichbare Wirkung der MTG auf die KW fest – die ZF blieb konstant und die BD wurde annähernd verdoppelt [Chambi and Grosso, 2006]. Im Vergleich zu den eigenen KW besaßen die Casein-Filme von Chambi und Grosse wesentlich höhere Zugfestigkeiten von etwa 12 N/mm² jedoch geringere Bruchdehnungen von 9-18 %. Die Ursache dafür ist die geringere Glycerinkonzentration. Bei Chambi und Grosso betrug sie 25 % (w/w Protein), wohingegen in der vorliegenden Arbeit für diesen Versuch 50 % (w/w Protein) verwendet wurden.

Aufgrund bester Zugeigenschaften wurde eine Filmtrocknung bei RT als Standardverfahren zur Filmherstellung gewählt.

Die Einflüsse der MTG-Behandlung auf Proteinfilme sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst. In der Regel nahm die Transparenz der Filme zu. Die Ursache dafür könnte eine Verringerung der Lichtstreuung durch die Quervernetzung der Proteine sein und damit die Lichtdurchlässigkeit der Proteinfilme erhöhen.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Einflüsse einer MTG-Behandlung. ZF...Zugfestigkeit, BD...Bruchdehnung, W_R...Weiterreißwiderstand, F_M...Höchstkraft, I_M...Verformung bei Höchstkraft, E_M...Energie bis Höchstkraft, k.V...kein Vergleich, n.m...nicht messbar.

	Tierische Proteine		Pflanzliche Proteine	
	Na-Caseinat	Gelatine	aus Erbse	aus Kartoffel
Vernetzbarkeit	gegeben	gegeben	gegeben	gegeben (jedoch langsamer)
Filmoptik	Transparenz nahm zu	kein Einfluss	Transparenz nahm zu	kein Einfluss
Mechanische Eigenschaften	überwiegend erhöht	überwiegend reduziert		
- Zug-	ZF ↑ BD ↑	ZF ↓ BD ↑	ZF ↑ BD ↓	ZF → BD ↓
- Weiterreiß-	W _R ↓	W _R ↓	W _R ↓	k.V.
- Durchstoß-	F _M → I _M → E _M ↑	F _M ↓ I _M ↑ E _M →	F _M ↑ I _M ↓ E _M ↑	n.m.
Löslichkeit	reduziert	erhöht	reduziert	kein Vergleich möglich, da unvernetzte Filme aufgrund hoher Klebrigkeit nicht messbar waren
Abbaubarkeit im Boden	von 0 auf 4 d verzögert	von 0 auf > 7 d verzögert	von 0 auf 4 d verzögert	nicht untersucht
Regenbeständigkeit	von 0 auf 4 d erhöht	kein Einfluss	nicht untersucht	nicht untersucht

Die mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Proteinfilme wurden durch die enzymatische Quervernetzung unterschiedlich beeinflusst (vgl. Abschnitt 3.2.2). Während die MTG-Behandlung bei Na-Caseinat-Filmen die Zugeigenschaften positiv beeinflusste, führte sie bei Gelatine-Filmen zu einer Abnahme der ZF, aber Zunahme der BD. Dieser Effekt wird durch die Struktur der Gelatine verursacht. Diese besteht aus Peptid-Einzelsträngen, von denen je drei durch Wasserstoffbrückenbindungen zu einer stabilen Tripelhelix verbunden sind. Bei 50 °C wurde diese Tripelhelix aufgelöst und die Gelatine lag in Einzelsträngen vor. Nach Zugabe von MTG wurden die Einzelstränge miteinander quervernetzt und an einer

Renaturierung bei Abkühlung zu einer Tripelhelix gehindert. Das so entstandene Proteinnetzwerk war weniger stabil, aber elastischer als die Tripelhelix-Struktur.

Im Gegensatz dazu resultierte die MTG-Behandlung bei Erbsenprotein-Filmen in eine erhöhte ZF, aber abnehmende BD. Vermutlich war der Vernetzungsgrad sehr hoch (vergleichbar mit 50 °C getrockneten Na-Caseinat-Filmen), wodurch die Dehnbarkeit verloren ging.

Der Weiterreißwiderstand wurde bei allen Proteinfilmen reduziert. Während dieser Effekt bei Gelatine-Filmen durch die MTG verhinderte Tripelhelix-Struktur erklärt werden kann, ist die Ursache bei Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filmen nicht bekannt. Die Durchstoßeigenschaften der Proteinfilme wiesen nach MTG-Behandlung zu dem Zugversuch ähnliche Einflüsse auf. In der Literatur existieren keine vergleichbaren Untersuchungen.

Eine enzymatische Quervernetzung bewirkte die Verzögerung der Abbaubarkeit im Boden um mindestens vier Tage (bei Gelatine-Filmen > 7 d, vgl. Abschnitt 3.2.5.1). Einen wesentlichen Einfluss besaß sie zudem auf die Löslichkeit der Proteinfilme – Gewichts- und Proteinverlust konnten signifikant reduziert werden (ausgenommen für Gelatine-Filme, vgl. Abschnitt 3.2.3). Jedoch wurde in jedem Fall ein Gewichtsverlust von etwa 40 % gemessen, der u.a. den Verlust an Glycerin widerspiegelt. Durch das hohe Wasserbindevermögen der Proteine befand sich während des Löslichkeitstests eine große Menge an Wasser innerhalb des Films, löste das hydrophile Glycerin und löste es heraus. Die Filme waren nach einer erneuten Trocknung hart und brüchig. Der gleiche Effekt wurde bei der Bewitterung im Gewächshaus mit Beregnung festgestellt (vgl. Abschnitt 3.2.4). Aufgrund des durch MTG gebildeten Netzwerkes konnte die Regenbeständigkeit der Na-Caseinat-Filme auf vier Tage erhöht werden (kein Einfluss bei Gelatine-Filmen). Dabei wurde eine Regenmenge von 2,9 mm pro Tag verwendet, was dem durchschnittlichen Niederschlag in Deutschland von 86,2 mm im Monat Juni entspricht. In Sachsen-Anhalt hingegen regnet es durchschnittlich nur 63 mm. Demzufolge würde sich eine Regenmenge von 2,1 mm ergeben, wodurch möglicherweise eine höhere Beständigkeit der Proteinfilme gegeben ist. Nach sieben Tagen wurden die Filmreste entnommen und getrocknet – sie wiesen ebenfalls eine hohe Sprödigkeit durch Verlust des Weichmachers auf. Dies stellt ein Problem für eine Anwendung der Filme beispielsweise als Mulchfilme dar – nach einem Regenschauer und nachfolgender Trocknung der Filme durch Sonneneinstrahlung wären die Filme mechanisch instabil und würden darunter befindliche Erde und Pflanzen nicht mehr schützen können.

Für eine Optimierung der mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen nach Beregnung wurden zunächst verschiedene externe Weichmacher (nicht kovalent gebunden) untersucht (vgl. Abschnitt 3.3.1.1). Sie zeigten zum Teil einen großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften. Dabei wurde festgestellt, dass mit zunehmendem Molekulargewicht des Weichmachers die Plastifiziereigenschaften abnahmen (ZF↑ und BD↓) und zu brüchigeren Filmen führten. Dies wurde bei Glycerinen (M_w 92-250 g/mol) und Polyethylenglykolen (PEG, M_w 300-2000 g/mol) nachgewiesen. Ein niedermolekularer Weichmacher schiebt sich zwischen die Proteinketten, reduziert die Ketten-Wechselwirkungen und erhöht somit die Flexibilität. Mit zunehmendem Molekulargewicht des Weichmachers scheint dieser jedoch immer mehr die Funktion eines Füllstoffes zu übernehmen. Der langkettige Weichmacher lagert sich zwischen die Proteinketten, führt zur Senkung der Beweglichkeit (BD↓) und verstärkt somit die Proteinfilme (ZF↑).

Die Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Untersuchungen in der Literatur. Audic und Chaufer dokumentierten mit Erhöhung des Polymerisationsgrades von Ethylenglykol (EG, M_w 62-194 g/mol) in Na-Caseinat-Filmen eine Abnahme der ZF (\downarrow 20 %), aber Zunahme der BD (\uparrow 4,8-fach) und begründeten dies mit einer Steigerung der Weichmachung durch ausgedehnte Kettenlängen des EGs [Audic and Chaufer, 2005]. Gueguen et al. erhielt bei Verwendung der gleichen EGs in Erbsenprotein-Filmen einen negativen Einfluss auf ZF (\downarrow 68 %) und BD (\downarrow 34 %) [Gueguen et al., 1998]. Sie begründeten die Abnahme der Zugeigenschaften mit einem steigenden Verlust der Wasserstoffbrücken zwischen Proteinen aufgrund größerer Kettenlängen des EGs. Möglicherweise beeinflussen niedermolekulare PEGs (M_w bis 194 g/mol) die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen auf andere Weise als hochmolekulare PEGs (M_w ab 300 g/mol), wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Zudem scheint das Protein selbst ebenfalls die Wirkungsweise der Weichmacher zu beeinflussen.

Bei Bestimmung der Wasserlöslichkeit von Proteinfilmen lösten sich alle verwendeten Weichmacher aus den Filmen heraus und es konnte keine Verbesserung der Regenbeständigkeit festgestellt werden.

Deshalb wurden in einem weiteren Optimierungsversuch Amino-Polyethylenglykole (Amino-PEG) als interne Weichmacher (kovalent an Protein gebunden) eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.3.1.2). Dies wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Das Amino-PEG sollte dabei als freie Lysin-Komponente mittels MTG an die proteineigenen Glutamin-Reste gebunden werden. Mit Hilfe der SDS-PAGE konnte die Verknüpfungsreaktion zwischen Protein und Amino-PEG mittels MTG nachgewiesen werden. Jedoch wurde nach Verwendung in Na-Caseinat-Filmen kein Weichmachereffekt festgestellt, obwohl PEG selbst ein gebräuchlicher Weichmacher für Proteinfilme ist. Vermutlich besaßen die verwendeten Amino-PEGs mit 750-1500 g/mol ein zu hohes Molekulargewicht und wirkten daher als Füllstoff. Möglicherweise war aber auch deren Beweglichkeit durch die kovalente Verknüpfung mit dem Protein eingeschränkt.

Als dritter Versuch zur Optimierung der mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen nach Beregnung wurde erstmals eine Beschichtung von enzymatisch quervernetzten Na-Caseinat-Filmen mit Bienenwachs durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.1.3). Bisher wurde Bienenwachs lediglich als Emulsion in Filmen aus Na-Caseinat [Fabra et al., 2009] und Molkeprotein [Talens and Krochta, 2005] eingesetzt, wobei die BD verringert und die ZF nicht bzw. negativ beeinflusst wurde. Die Wasserdampfdurchlässigkeit wurde lediglich geringfügig gesenkt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte durch Eintauchen des mit Glycerin weichgemachten Films in ein warmes Wachsbad ($T > 60$ °C) eine Beschichtung mit einer Dicke von etwa 200 μm . Diese Filme wiesen während der Beregnung keine Löcher oder sonstige Beschädigungen auf und konnten unversehrt nach sieben Tagen Bewitterung entnommen werden. Eine Wachsbeschichtung ist demnach eine viel versprechende Alternative zur Erhöhung der Hydrophobizität des Proteinfilms. Allerdings bewirkte die Bewitterung eine Halbierung der Zugeigenschaften aufgrund des Einflusses von Licht, relativer Luftfeuchtigkeit und Temperatur.

Bisher wurde in der vorliegenden Arbeit eine MTG-Konzentration von 25 U/g Protein (basierend auf Angaben des Herstellers: 100 U/g TG Activa[®]WM) eingesetzt. Für Filme aus isoliertem Sojaprotein wurde jedoch festgestellt, dass bei einer MTG-Konzentration ≤ 10 U/g die ZF erhöht wird, hingegen eine MTG-Konzentration > 10 U/g Protein zu einem Verlust der ZF führte [Jiang et al., 2007]. Aufgrund dessen wurde für Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme eine Variation der MTG-Konzentration (0, 2, 8, 16, 25 U/g Protein) durchgeführt und deren Einfluss auf die Zugeigenschaften der Filme untersucht. Während bei Na-Caseinat eine nahezu kontinuierliche Steigerung von ZF und BD beobachtet wurde, konnten bei Erbsenprotein-Filmen ein Optimum in ZF (bei 16 U/g Protein) und BD (2 U/g Protein) festgestellt werden. Dieser Effekt wird vermutlich durch die Proteinstruktur verursacht. Na-Caseinat besitzt keine ausgeprägte Sekundär- und Tertiärstruktur [Fox and Kelly, 2004], was bei Quervernetzung der Proteinketten in ein zugfesteres und elastischeres Netzwerk resultiert.

Im Gegensatz dazu sind in Erbsen Speicherproteine, wie z.B. Legumin und Vicelin, vorhanden, die durch eine ausgeprägte Tertiär- bzw. Quartärstruktur gekennzeichnet sind [Owusu-Ansah and McCurdy, 1991]. Werden diese Proteinstrukturen lediglich teilweise untereinander quervernetzt (geringe MTG-Konzentration), könnte das zu einer Zunahme der ZF aufgrund des ausgebildeten Netzwerkes führen. Gleichzeitig steigt die BD, da vermutlich miteinander vernetzte Proteinmoleküle durch die globuläre Struktur eine hohe proteineigene Elastizität aufweisen. Mit zunehmender MTG-Konzentration werden die Proteine möglicherweise zusätzlich intramolekular quervernetzt, was zu einer Senkung der proteineigenen Dehnbarkeit und folglich der BD der Filme führt. Die Abnahme der ZF bei einer MTG-Konzentration > 16 U/g Protein könnte mit einer Polymerbildung und damit verbundenen Aggregation der Proteine erklärt werden. Diese stellen im Film Inhomogenitäten und somit bevorzugte Bruchstellen dar, weshalb geringere Zugfestigkeiten gemessen werden.

Ein gleicher Effekt wurde bereits bei Na-Caseinat-Filmen beobachtet [Bruno et al., 2008]. Dabei stieg die ZF bis zu einer MTG-Konzentration von 2 mg MTG je g Protein. Für die verwendete TG Activa[®]WM (1 % MTG) entspricht dies 20 U/g Protein. Bei weiterer Erhöhung der MTG (bis auf 50 U/g Protein) sank die ZF wieder. Das Maximum für die BD lag bei 1 mg MTG je Protein (entspricht 10 U/g Protein). In der vorliegenden Arbeit wurde eine maximale MTG-Konzentration von 25 U/g Protein eingesetzt und eine Abnahme der ZF von Na-Caseinat-Filmen nicht beobachtet. Bei der BD von Na-Caseinat-Filmen konnte im Gegensatz zu Bruno et al. kein Optimum festgestellt werden.

Bei Jiang et al. hingegen führte eine Zunahme des Vernetzungsgrades in den Sojaprotein-Filmen zu einem kontinuierlichen Verlust der BD [Jiang et al., 2007]. Ähnlich verhielt sich das Erbsenprotein, für das bei einer MTG-Konzentration > 2 U/g Protein ebenfalls eine Abnahme der BD gemessen wurde. Lediglich ein geringer Vernetzungsgrad führte zur Steigerung der BD. Proteine reagieren demnach unterschiedlich auf den Grad der enzymatischen Quervernetzung. Folglich können die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen mit ausgewählten MTG-Konzentrationen und somit bestimmten Vernetzungsgraden beeinflusst werden.

Eine Quervernetzung von Proteinen mit Formaldehyd wurde bereits für beispielsweise Gelatine [de Carvalho and Grosso, 2004] und Erbsenprotein [Gueguen et al., 1998] beschrieben. Diese chemische Modifikation führte ebenfalls zu einer Erhöhung der ZF, die BD hingegen sank bei zu starker Vernetzung. Jedoch ist Formaldehyd eine toxische Substanz und für einen Einsatz in der Natur (Landwirtschaftsfilme) oder im Ernährungsbereich (Lebensmittelverpackungen) nicht geeignet. Bei einer Quervernetzung mittels der lebensmittelzugelassenen MTG sind im Vergleich dazu weder das Enzym selbst noch die gebildeten Polymere umweltschädlich. Zudem besitzt das Enzym eine höhere Spezifität gegenüber seinen Substraten. Die enzymatische Quervernetzung ist demnach einer chemischen Behandlung vorzuziehen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die enzymatische Quervernetzung mittels mikrobieller Transglutaminase bei Proteinfilmen überwiegend zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, einer Verringerung der Wasserlöslichkeit und einer Erhöhung der Resistenz gegenüber Beregnung sowie Abbau im Boden führte. Sie ist demzufolge eine geeignete Methode zur Optimierung der Eigenschaften von Proteinfilmen.

4.3 Lassen sich aus Proteinen konkurrenzfähige Materialien herstellen?

In der vorliegenden Arbeit wurden Proteine aus nachwachsenden Rohstoffen zur Herstellung von Filmen verwendet. Diese Filme sind je nach Zusammensetzung stabil, lassen sich schnell abbauen bzw. sind wasserlöslich und können als Pflanzenverstärker dienen. Solche Eigenschaften wären beispielsweise für Saatbänder, Blumentöpfe, Verpackungen für Spülmaschinentabs und als künstlicher Darm zur Wurstverpackung vorteilhaft. Weitere Anwendungen der Proteinfilme wären in der Landwirtschaft denkbar. Dafür benötigen sie jedoch eine hohe mechanische Stabilität gegenüber Zug-, Weiterreiß- und Durchstoßbeanspruchung. Zudem müssen sie über eine Witterungsbeständigkeit von mehreren Monaten verfügen.

Landwirtschaftsfilme werden bisher hauptsächlich aus Polyethylen (High Density oder Low Density) hergestellt. Erste Filme auf Basis nachwachsender Rohstoffe werden z.B. als Mulchfilme zur Abdeckung von Pflanzen und Boden (Schutz vor Witterung) vermarktet. Mater-Bi[®] der Firma Novamont wird aus Stärke (Mais-, Weizen-, Kartoffelstärke), verstärkt durch biologisch abbaubare Polymere natürlichen oder synthetischen Ursprungs (u.a. Polycaprolacton), hergestellt. Ecoflex[®] der Firma BASF besteht aus biologisch abbaubaren aliphatisch-aromatischen Copolyestern. Beide Materialien wurden als Vergleich zur Bewertung der mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen herangezogen.

In Abbildung 4-1 ist eine Übersicht der Zugeigenschaften von einigen Proteinfilmen dargestellt. Diese wurden den Werten kommerzieller Kunststofffilme auf Basis von Erdöl bzw. nachwachsender Rohstoffe gegenübergestellt.

Die Proteinfilme wiesen je nach Zusammensetzung einen breiten Bereich der mechanischen KW auf – die ZF variierte von 1,9 bis 23,6 N/mm² und die BD von 34 bis 184 %. Dabei wurden die höchsten Zugfestigkeiten für Gelatine-Filme (mit PEG, 50 % w/w Protein) gemessen und sind vergleichbar mit den Zugeigenschaften von Filmen aus LDPE (10 N/mm²), Mater-Bi[®] (13 N/mm²) und Ecoflex[®] (22 N/mm²). Na-Caseinat-Filme mit

Polyglycerin (25 % w/w Protein) liegen mit bis zu 13,3 N/mm² ebenfalls im Bereich von LDPE und Mater-Bi®. Die Filme aus Na-Caseinat mit Glycerin und Erbsenprotein lagen mit maximal 6 N/mm² unter den ZF-Werten der kommerziellen Filme und müssen in dieser Hinsicht noch verbessert werden, um konkurrenzfähig zu sein. Hingegen besaßen sie mit 167-184 % die höchsten Bruchdehnungen und waren vergleichbar mit Filmen aus HDPE und PP (150 %). Die Filme aus LDPE bzw. anderen nachwachsenden Rohstoffen besaßen jedoch mit ca. 400 % die doppelte BD der Proteinfilme.

Trotz teilweise sehr guter KW eignen sich die Proteinfilme bisher noch nicht für einen Einsatz als Landwirtschaftsfilme, da sie entweder eine hohe ZF oder eine gute BD besaßen. Jedoch benötigen sie eine Kombination aus beidem. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die ZF durch Einsatz von PEG 300 als Weichmacher nahezu verdoppelt bzw. durch Verringerung der Weichmacherkonzentration auf 25 % (w/w Protein) verdreifacht wurde. Die BD konnte durch enzymatische Quervernetzung mittels MTG erhöht werden (ausgenommen Erbsenprotein). Darauf aufbauend könnte eine Optimierung der Zugeigenschaften durchgeführt werden.

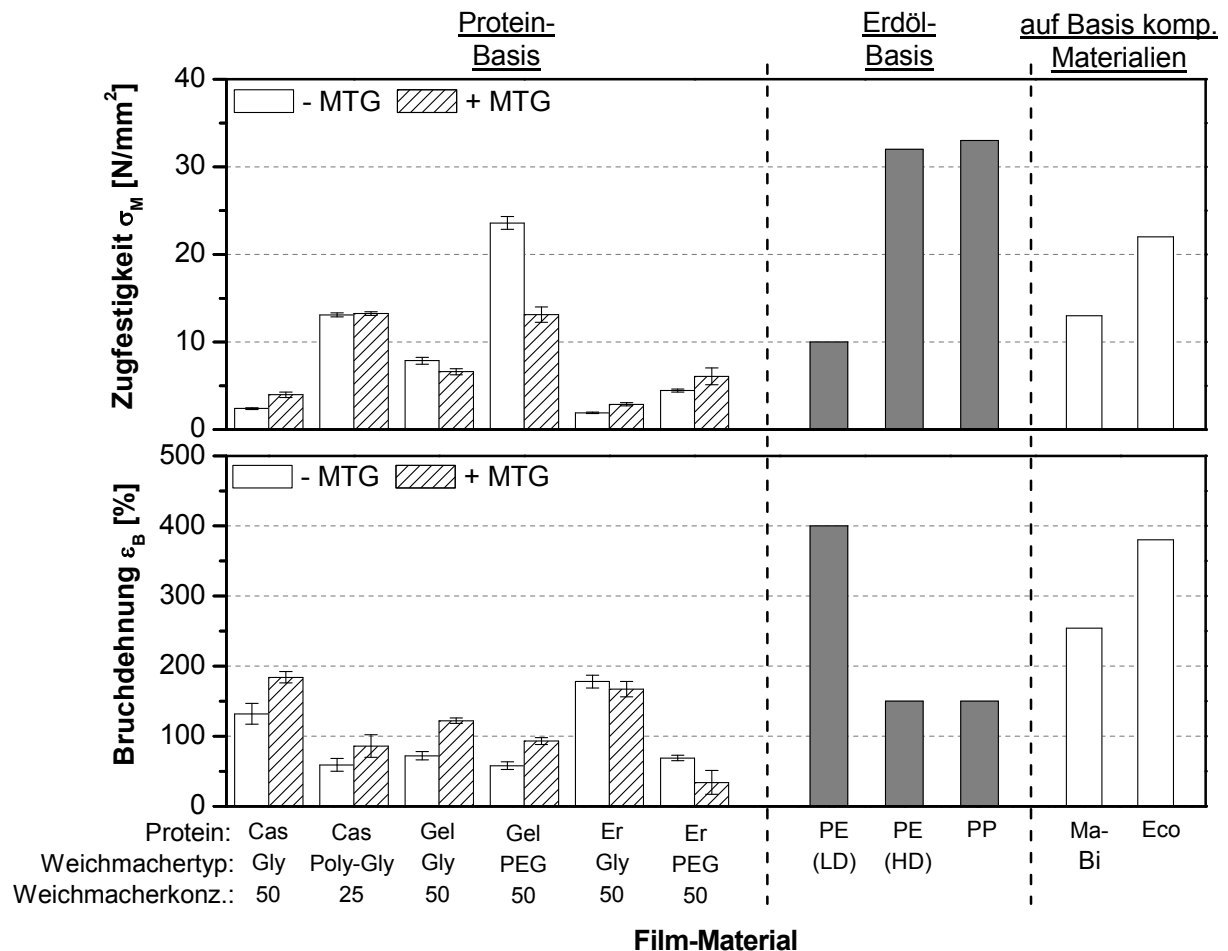


Abbildung 4-1: Zugeigenschaften ausgewählter Proteinfilme (\pm MTG) im Vergleich zu kommerziellen Filmen auf Basis von Erdöl und kompostierbaren Materialien. Werte für erdölbasierte Kunststoffe [Crawford, 1998], Werte für Mater-Bi und Ecoflex [Otto, 2004], Cas...Na-Caseinat, Gel...Gelatine, Er...Erbsenprotein, LDPE...Low Density Polyethylen, HDPE...High Density Polyethylen, PP...Polypropylen, Ma-Bi...Mater-Bi, Eco...Ecoflex, Gl...Glycerin, PEG...Polyethylenglykol, MTG...mikrobielle Transglutaminase. Werte in Tabelle 7-16.

Ein Vergleich der Weiterreißigenschaften von Proteinfilmen mit kommerziellen Filmen ist in Abbildung 4-2 dargestellt. Alle Proteinfilme besaßen bei Vorschädigung (definierter Schnitt) einen sehr geringen Weiterreißwiderstand von < 35 N/mm. Im Vergleich dazu sind aber mit 270-510 N/mm die Kunststofffilme auf Erdölbasis wesentlich widerstandsfähiger. Der Weiterreißwiderstand eines Films aus Mater-Bi[®] von 120 N/mm ist ebenfalls wesentlich höher als bei Proteinfilmen, jedoch geringer im Vergleich zu Filmen aus LDPE und HDPE.

Die kommerziellen Filme erhalten bei der Herstellung durch Extrusion eine Ausrichtung in Extrusionsrichtung und sind dadurch mechanisch stabiler. Hingegen liegen die Proteine nach dem Gießverfahren vermutlich in einer ungeordneten Form in den Filmen vor und verfügen damit über eine deutlich geringere Schadenstoleranz als die kommerziellen Filme. Folglich könnte eine Herstellung der Proteinfilme durch Extrusion zu einer deutlichen Steigerung der Weiterreißwiderstände führen.

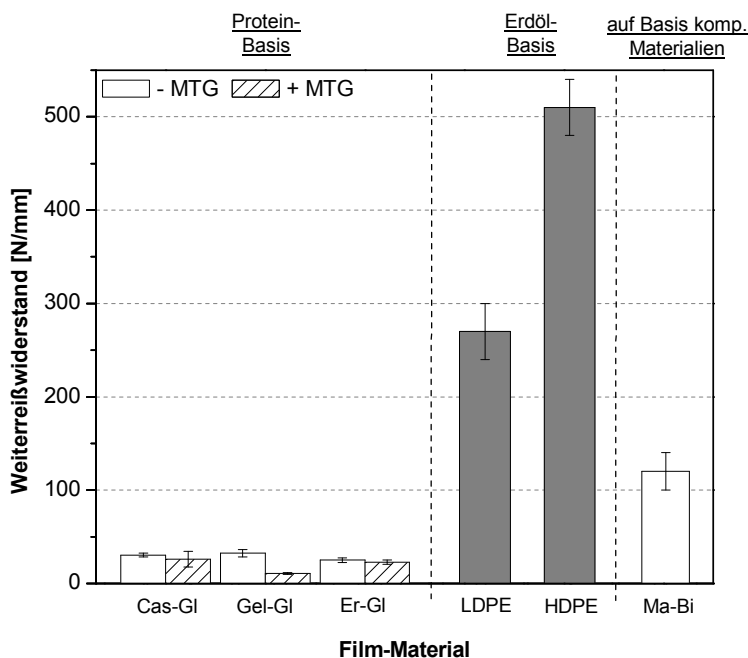


Abbildung 4-2: Weiterreißigenschaften von Proteinfilmen (\pm MTG) im Vergleich zu kommerziellen Filmen auf Basis von Erdöl und kompostierbaren Materialien. Werte für kommerzielle Filme [Bühler, 2001]. Cas...Na-Caseinat, Gel...Gelatine, Er...Erbsenprotein, LDPE...Low Density Polyethylen, HDPE...High Density Polyethylen, Ma-Bi...Mater-Bi, Gl...Glycerin, MTG...mikrobielle Transglutaminase. Werte in Tabelle 7-17.

Die Durchstoßeigenschaften verschiedener Filme sind in Abbildung 4-3 dargestellt. Na-Caseinat- und Erbsenprotein-Filme besaßen mit einer Schädigungskraft von 762-952 N/mm und einer Schädigungsarbeit von 6,4-8,4 J/mm einen vergleichbaren Widerstand gegenüber Stoßbeanspruchung, der nur geringfügig von dem eines LDPE-Films (1333 N/mm bzw. 8,2 J/mm) abweicht. Die Filme aus Mater-Bi[®] und Ecoflex[®] hingegen waren erheblich weniger widerstandsfähig (325-367 N/mm bzw. 0,7 J/mm).

Gelatine-Filme hingegen wiesen den höchsten Widerstand gegenüber Stoßbeanspruchung auf. Für eine Durchstoßschädigung wurden eine Kraft von 3261 N/mm und eine Arbeit von 23,8 J/mm benötigt – das 2,5-3-fache im Vergleich zu LDPE. Proteine, insbesondere Gelatine, scheinen gegenüber einer biaxialen Beanspruchung wesentlich widerstandsfähiger zu sein als gegen einachsige Zugbeanspruchung. Die Ursache dafür liegt vermutlich in ihrer zum Teil sehr ausgeprägten dreidimensionalen Struktur, die durch Zugkraft in eine Richtung

einfacher geschädigt werden kann als gleichzeitig in zwei Richtungen. Hinsichtlich ihrer Durchstoßeigenschaften sind Proteinfilme folglich konkurrenzfähige Materialien.

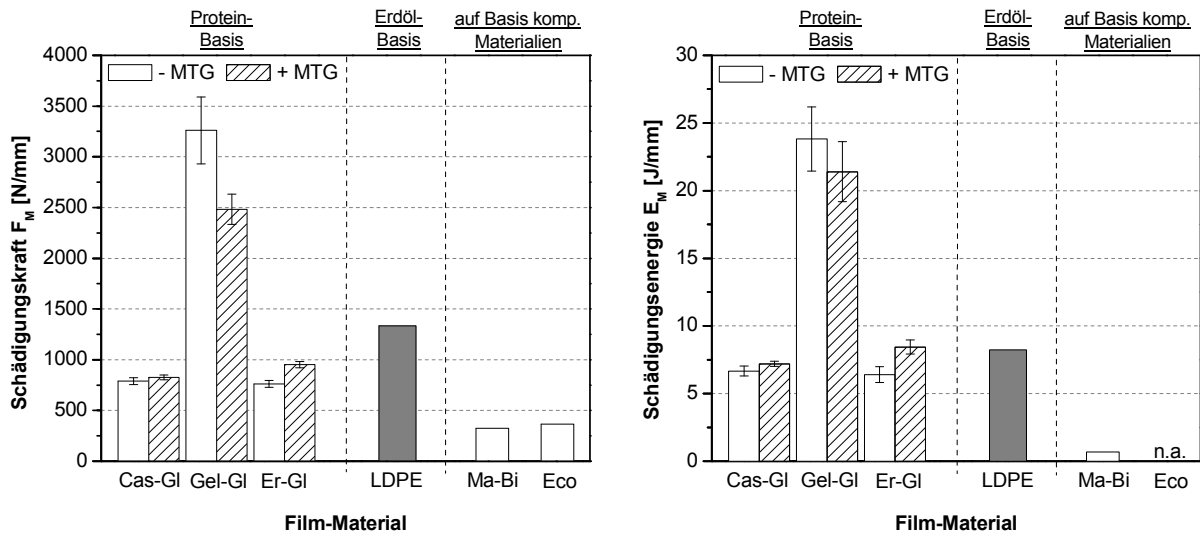


Abbildung 4-3: Durchstoßeigenschaften von Proteinfilmen (\pm MTG) im Vergleich zu kommerziellen Filmen auf Basis von Erdöl und kompostierbaren Materialien. Werte für kommerzielle Filme [Otto, 2004]. Cas...Na-Caseinat, Gel...Gelatine, Er...Erbseprotein, LDPE...Low Density Polyethylen, Ma-Bi...Mater-Bi, Eco...Ecoflex, Gl...Glycerin, MTG...mikrobielle Transglutaminase, n.a...nicht auswertbar (aufgrund fehlendem Kraftabfall nach Schädigung [Otto, 2004]). Werte in Tabelle 7-18.

Für eine Kostenbilanzierung der Filmherstellung wird die Summe aus fixen und variablen Kosten betrachtet. Die Fixkosten setzen sich aus den Anschaffungskosten für Geräte und Materialien zur Filmherstellung zusammen. Da die Proteinfilme künftig nicht im Gießprozess hergestellt werden sondern ein Extruderbasiertes Verfahren entwickelt werden soll, wird auf die Betrachtung der Fixkosten verzichtet.

Die Kosten für die in dieser Arbeit hergestellten Proteinfilme beziehen sich daher lediglich auf die Rohstoffpreise (Variable Kosten, Tabelle 4-2). Das Protein stellt hierbei mit angenommenen 1,00 €/kg die kleinste Position dar. Mit 71,40 €/kg hingegen ist das Enzym das teuerste Ausgangsmaterial. Eine Optimierung der MTG-Konzentration im Proteinfilm ist daher sinnvoll – es sollte immer die kleinstmögliche Enzymmenge eingesetzt werden. Insgesamt belaufen sich die momentanen variablen Kosten für vernetzte Proteinfilme auf 0,19 € je 400 cm²-Film – entsprechend 4,75 €/m² (200 μ m Filmdicke) bzw. 1,19 €/m² (50 μ m Filmdicke).

Zur Vereinfachung sind in dieser Berechnung keine Energie- und Personalkosten berücksichtigt.

Tabelle 4-2: Übersicht über Variable Kosten zur Herstellung von Erbsenprotein-Filmen. K_v ...Variable Kosten, MTG...mikrobielle Transglutaminase.

	Beschreibung	Materialkosten pro kg	Materialkosten pro Film	$K_v/400 \text{ cm}^2$ (1 Film)	K_v/m^2
Variable Kosten	Erbseprotein	1,00 €	0,01 €	0,19 €	4,75 €
	Glycerin	19,05 €	0,06 €		
	Puffer	23,30 €	0,01 €		
	MTG	71,40 €	0,11 €		

Die Kosten für PE-Filme liegen zwischen 0,20-0,40 €/m² (200 µm Filmdicke) bzw. bei 0,03 €/m² (50 µm Filmdicke) und für Filme auf Basis anderer nachwachsender Rohstoffe, beispielsweise Mater-Bi[®], bei etwa 1,50 € (15 µm Filmdicke). Proteinfilme wären unter den angenommenen Bedingungen teurer als erdölbasierte Materialien jedoch preiswerter als bisherige Filme auf Basis nachwachsender Rohstoffe (Tabelle 4-3). Im Vergleich zu Preisen für PE und PP (< 1,00 €/kg) und anderen Biopolymeren (3-5,00 €/kg) [Lörks and Wenig, 2003] sind die Materialkosten von 0,52-0,77 €/kg für Protein [Daccord, 2004] jedoch sehr gering.

Tabelle 4-3: Vergleich der Kosten für Erbsenprotein-Filme mit kommerziellen Filmen. LDPE...Low Density Polyethylen. ¹Landwirtschaftsverwaltung Baden-Württemberg, ²Folienvertrieb Lücke GmbH (Stadtlohn), ³www.papierschnur.com (07.09.2009).

	Kosten/400 cm ² (200 µm Film)	Kosten/m ² (200 µm Film)	Kosten/m ² (50 µm Film)
Erbsenprotein-Film	0,19 €	4,75 €	1,19 €
vgl. LDPE-Film		0,20 – 0,40 € ¹	0,03 € ²
vgl. Mater-Bi [®] -Film			etwa 1,50 € (15 µm) ³

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Proteine prinzipiell für eine Filmherstellung geeignet sind. Ihre mechanischen Eigenschaften sind teilweise vergleichbar mit denen von kommerziellen Filmen. Proteinfilme sind zudem für spezielle Anwendungen denkbar. Sie könnten beispielsweise als Düngefilme eingesetzt werden, die durch relativ schnellen Abbau (Tage-Wochen) Düngemittel freisetzen. Neben dem proteingebundenen Stickstoff könnten zusätzliche Düngemittel (z.B. Harnstoff) in die Filme eingebracht werden. Für eine Anwendung als beispielsweise Mulchfilme besteht hinsichtlich der mechanischen Stabilität und der Witterungsbeständigkeit Optimierungsbedarf.

Tierische Proteine, wie Na-Caseinat und Gelatine, sind für eine Filmherstellung zu teuer und werden bereits für andere Produkte verwendet. Pflanzliche Proteine hingegen, die als Nebenprodukte in der Industrie anfallen, stellen ein großes Potential zur Herstellung biologisch abbaubarer Filme dar. Das eingesetzte Erbsenprotein ist aufgrund seiner hohen Löslichkeit im Vergleich zu anderen pflanzlichen Proteinen und seiner guten filmbildenden Eigenschaften besonders interessant. Momentan wird der Hauptteil (etwa 5000-6000 Tonnen pro Jahr) des Erbsenproteins für eine Tierfuttermittelherstellung verwendet [Lotz, M. (2009) Fa. Emsland-Stärke GmbH, persönliche Information] – mit dieser Menge könnten allerdings auch bis zu 40 km² biologisch abbaubarer Film hergestellt werden.

4.4 Fehlerbetrachtung

Grobe Fehler können durch sorgfältiges Arbeiten ausgeschlossen werden. Neben groben Fehlern sind auch zufällige und systematische Fehler (z.B. Fehler der Messgeräte) möglich. Die Verlässlichkeit der Messwerte wird durch mehrfache Wiederholung der Experimente und anschließender Mittelwertberechnung (mit Standardabweichung) erhöht.

Die Fehler bei der Messung der Zugeigenschaften von Proteinfilmen betragen 2-19 % (Zugfestigkeit) bzw. 2-51 % (Bruchdehnung). Diese werden durch Schwankungen in Temperatur und relativer Luftfeuchte während der Messungen verursacht. Bei höheren Temperaturen neigen Proteinfilme zum Erweichen und sind dadurch dehnbarer. Bei niedrigen relativen Luftfeuchten wird den Filmen Wasser entzogen und damit die Zugfestigkeit erhöht, jedoch die Dehnbarkeit gesenkt. Eine Regelung der Temperatur und relativen Luftfeuchte während der Messung war nicht möglich. Zudem sind die Standardabweichungen bei brüchigen Proteinfilmen höher, wie sie bei geringer Weichmacherkonzentrationen von 25 % (w/w Protein) oder einer Beschichtung mit Bienenwachs auftraten. Den Fehlern der Weiterreißigenschaften von 7-32 % und Durchstoßeigenschaften von 2-14 % liegen ebenfalls die Schwankungen der äußeren Bedingungen (Temperatur und relative Luftfeuchte) während der Messungen zugrunde. Trotz horizontal austarierter Gießformen wiesen die Proteinfilme Dickendifferenzen von bis zu 50 µm innerhalb eines Films bzw. Prüfkörpers auf. Dies könnte die Messung der mechanischen Eigenschaften ebenfalls beeinflusst haben, da die Proben an dünnen Stellen bevorzugt reißen.

Bei der Messung der MTG-Aktivität mit dem colorimetrischen Hydroxamat-Test wurden Standardabweichungen von 0,1-7,4 % gemessen. Bei höherer Inkubationstemperatur sowie Glycerin- und PEG-Konzentration betrug die Fehler bis zu 43 %. Die Ursache dafür ist die Temperaturempfindlichkeit des Enzyms bei mehr als 60 °C und die hohe Viskosität bei mehr als 40 % (w/w) Glycerin bzw. PEG, die Ungenauigkeiten beim Pipettieren nach sich ziehen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration im Löslichkeitsversuch der Proteinfilme war stark fehlerbehaftet. Zum einen betrug die Standardabweichungen 1-18 %. Zum anderen wurden beispielsweise bei 95 % Gewichtsverlust lediglich 56 % Proteinverlust gemessen. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte mit dem colorimetrischen BCA-Test und wurde standardmäßig mit Rinderserum Albumin kalibriert. Jedoch reagieren Proteine unterschiedlich auf diesen Test [Smith et al., 1985], wodurch die Farbentwicklung weniger stark ausgeprägt sein kann. Dies wird zusätzlich verstärkt, da bei Erbsen- und Kartoffelprotein ein Gemisch aus verschiedenen Proteinen vorliegt.

Der Fehler bei Abbauverhalten und Regenbeständigkeit unterlag subjektiven Betrachtungen. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist dennoch gegeben, da die Versuche jeweils von einer Person durchgeführt und bewertet wurden.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Charakterisierung der Proteinfilme trotz der Fehler als genau anzusehen ist. Die erzielten Aussagen werden dadurch nicht beeinträchtigt.

4.5 Ausblick

Für einen Einsatz von Proteinfilmen speziell in der Landwirtschaft sind in der vorliegenden Arbeit grundlegende Untersuchungen durchgeführt und umfangreiche Erkenntnisse gewonnen worden. Es eignen sich besonders lösliche Proteine für eine Filmherstellung. Jedoch unterlagen die Proteine bei der Gewinnung als Nebenprodukte in der Stärkeproduktion zum Teil extremen pH-Werten oder Temperaturen und koagulierten dabei. Dies führte in dem verwendeten Gießverfahren zu einer sehr geringen Löslichkeit der Proteine und somit erfolglosen Filmherstellung. Aus diesem Grund sollte in Zusammenarbeit mit einer Stärke herstellenden Firma eine Gewinnungsmethode erarbeitet werden, die schonender für die Proteine ist und gleichzeitig deren Löslichkeit erhöht. Für Pflanzenproteine, die überwiegend aus wasser- bzw. pufferunlöslichen Fraktionen (Prolamine und Gluteline) bestehen, wäre eine Optimierung des Lösungsmittels unter Berücksichtigung der Enzymverträglichkeit sinnvoll.

Die Eigenschaften der hergestellten Proteinfilme müssen noch optimiert werden. Eine Beimischung von Füllstoffen oder Integration und Ausrichtung von Fasern bzw. Fibrillen könnte zu einer Verstärkung der Filme führen und deren mechanische Eigenschaften verbessern. Die Verwendung von Proteinmischungen erzielte dabei erste positive Ergebnisse, die jedoch weiter untersucht werden sollten. Für die gezielte Bildung von Kristallen in Proteinfilmen zur Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften wurde bereits ein Patent angemeldet [Frohberg et al., 2009].

Durch die enzymatische Quervernetzung konnte die Löslichkeit der Proteinfilme gesenkt, die Regenbeständigkeit erhöht und die Abbaubarkeit im Boden verzögert werden. Dennoch waren die Filme nach drei bis sieben Tagen abgebaut bzw. durch Beregnung aufgelöst worden. Ein Mulchfilm sollte jedoch über mehrere Monate stabil sein.

Eine Erhöhung der Hydrophobizität gelang in ersten Untersuchungen durch Beschichtung von Na-Caseinat-Filmen mit Bienenwachs – die Bewitterungsbeständigkeit betrug mehr als sieben Tage, allerdings unter Verlust der mechanischen Stabilität. Hierbei sind weiterführende Untersuchungen zur Optimierung der Wasserresistenz notwendig. Durch ein verbessertes Verfahren könnte die Schichtdicke des Wachses zudem verringert werden, um Material einzusparen.

Hinsichtlich der Filmeigenschaften ist eine Optimierung der Enzymkonzentration notwendig. Da das Enzym momentan der preisintensivste Rohstoff ist, könnte durch eine Reduktion der MTG-Konzentration wesentlich an den Filmherstellungskosten gespart werden.

Zur Optimierung der Filmeigenschaften ist ein besseres Verständnis der Vorgänge innerhalb des Proteinnetzwerkes notwendig. Ein Sichtbarmachen der einzelnen Ausgangsmaterialien im hergestellten Proteinfilm wäre dabei von Vorteil. Durch eine Anfärbung des Proteins könnten diese und mögliche Phasentrennungen in den Filmen lokalisiert werden. Zudem wären verschiedene mikroskopische Methoden (u.a. Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie) zur Darstellung der Filmstruktur denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proteinfilme durch Gießen einer wässrigen Protein-Weichmacher-Lösung und Verdampfen der flüchtigen Bestandteile hergestellt. Dieses Verfahren eignet sich nur bedingt für einen industriellen Maßstab. Eine Produktion von Kunststofffilmen findet großtechnisch hauptsächlich durch Extrusion statt – dieses Verfahren ist energie-, kosten- sowie zeitsparender. Aus diesem Grund ist die Übertragung des Gießverfahrens auf einen Extruder unerlässlich. Erste Untersuchungen befinden sich in der Patentierungsphase.

5 Zusammenfassung

Biologisch abbaubare Materialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe besitzen ein großes Potential für verschiedenste Anwendungen, da sie fossile Rohstoffe schonen und Entsorgungsprobleme beheben. Kommerziell werden bereits einige Polymere beispielsweise als Tragetaschen oder Verpackungen verwendet. Polymilchsäure, die auf Basis von Stärke bzw. Zucker gewonnen wird, nimmt dabei eine Vorrangstellung ein.

Bei der Stärkeherstellung fallen mehrere Tausend Tonnen Proteine im Jahr als Nebenprodukte an, die bisher überwiegend als Futtermittel vermarktet wurden. Ziel dieser Arbeit war es, diese Pflanzenproteine hinsichtlich ihrer Eignung zur Herstellung von Proteinfilmen zu bewerten. Die Proteinfilme wurden dabei mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG) quervernetzt und bezüglich einer Anwendung in der Landwirtschaft als beispielsweise Mulchfilme mit praxisnahen Untersuchungen charakterisiert.

Proteine aus Erbse und Kartoffel ließen sich durch ein Gießverfahren zu Filmen verarbeiten und waren mittels MTG quervernetzbar. Aufgrund geringer Löslichkeit in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 war eine Filmbildung mit Proteinen aus Mais, Weizen, Raps sowie Roggen nicht möglich. Die tierischen Proteine Na-Caseinat und Gelatine dienten als Vergleichsmaterialien. Eine enzymatische Quervernetzung mittels MTG führte zur Erhöhung der Filmtransparenz. Neben den Zugeigenschaften wurden erstmalig von den Proteinfilmen die Widerstände gegen ein Weiterreißen und Durchstoßen gemessen. Die Zugeigenschaften der besten Filme aus pflanzlichen Proteinen waren zum Teil vergleichbar mit den Werten tierischer Proteine und kommerzieller Filmen. Die Weiterreißeigenschaften lagen 80-95 % unter denen von kommerziellen Filmen. Durch Einsatz von Polyethylenglykol (M_w 300 g/mol) als Weichmacher und einer enzymatischen Quervernetzung mittels MTG erfolgte eine erste Optimierung. Zudem wurde festgestellt, dass die Filmherstellung mit ausschließlich löslichen Proteinen eine positive Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften hatte. Proteinfilme besaßen hingegen im Vergleich zu kommerziellen Kunststoffen einen höheren Widerstand gegen biaxiale Durchstoßbeanspruchung.

Durch die enzymatische Quervernetzung konnte die Wasserlöslichkeit der Proteinfilme erheblich reduziert werden. Wie mit einem erstmalig durchgeführten Bewitterungstest im Gewächshaus mit Beregnung gezeigt werden konnte, wurde die Beständigkeit der Filme gegen Beschädigung durch Regen von null auf vier Tage erhöht. Dabei wurde allerdings ein Herauslösen des Weichmachers Glycerin beobachtet, das zu einer Versprödung der Filme führte. Zur Erhöhung der Hydrophobizität konnte erfolgreich eine Beschichtung mit Bienenwachs angewendet werden. Aufgrund der enzymatischen Quervernetzung erfolgte ebenfalls eine Verzögerung der Abbaubarkeit im Boden von null auf vier Tage. Im Falle von Gelatine-Filmen konnte sie sogar auf mehr als sieben Tage verlängert werden. Bei der Untersuchung der Pflanzenverträglichkeit von Proteinfilmen konnte ein Düngeneffekt beobachtet werden – Mais und Tagetes zeigten eine Erhöhung der Frischmasse nach vier Wochen Kultivierung auf Proteinfilmen. Die Pflanzen konnten vermutlich den beim Abbau von Protein freiwerdenden Stickstoff zum Wachstum nutzen.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass tierische sowie pflanzliche Proteine prinzipiell für eine Filmherstellung geeignet sind. Die enzymatische Quervernetzung mittels MTG ist dabei aufgrund der überwiegend positiven Einflüsse auf die Eigenschaften von Proteinfilmen eine geeignete Methode zur Optimierung der Filmeigenschaften. Zudem eignen sich die Proteinfilme beispielsweise als Düngefilme, dessen relativ schneller Abbau (Tage-Wochen) Düngemittel freisetzt. Neben dem proteingebundenen Stickstoff können zusätzlich in die Filme eingebrachte Düngemittel (z.B. Harnstoff) verwendet werden. Für die spezielle Anwendung als Mulchfilm besteht hinsichtlich der mechanischen Stabilität sowie der Witterungsbeständigkeit Optimierungsbedarf.

Das eingesetzte Erbsenprotein ist aufgrund seiner hohen Löslichkeit im Vergleich zu anderen pflanzlichen Proteinen und seiner guten filmbildenden Eigenschaften besonders interessant zur Herstellung biologisch abbaubarer Filme. Bei einer anfallenden Jahresmenge von mindestens 6000 Tonnen Erbsenprotein könnten 40 km² Film hergestellt werden.

Trotz vieler erzielter positiver Ergebnisse müssen die Eigenschaften von Proteinfilmen bezüglich ihrer späteren Anwendung beispielsweise in der Landwirtschaft weiter optimiert werden.

6 Literatur

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. and Motoki, M. (1989). "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms." *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2613-17.
- Audic, J.-L. and Chaufer, B. (2005). "Influence of plasticizer and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate." *European Polymer Journal*, **41**, 1934-1942.
- Babel, W. (1996). "Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer." *Chemie in unserer Zeit*, **30**, 86-95.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. and Schieberle, P. (2009). "Food Chemistry." 4th revised and extended ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis*, **8**, 93 - 99.
- Bourtoom, T. (2009). "Review Article - Edible protein films: properties enhancement." *International Food Research Journal*, **16**, 1-9.
- Bradbury, S. L. and Jakoby, W. B. (1972). "Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: Effects on aldehyde dehydrogenase." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **69**, 2373-2376.
- Bruno, M., Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P. and Moresi, M. (2008). "Engineering properties of edible transglutaminase cross-linked caseinate-based films." *Food Bioprocess Technology*, **1**, 393-404.
- Bühler, K., Nahlinger S., Chwastek, M. (2001). "Untersuchungen zum Gebrauchsverhalten von Tragetaschen mit vorgesehener Zweitnutzung als Bioabfallbeutel aus biologisch abbaubaren Werkstoffen." (*Zwischenbericht, Juni*), Fachhochschule Münster, Lehrgebiet Technologie der Werkstoffe.
- Chambi, H. and Grosso, C. (2006). "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase." *Food Research International*, **39**, 458-466.
- Crawford, R. J. (1998). "Plastics Engineering." Third ed., Butterworth-Heinemann, Oxford.
- Daccord, R. (2004). "Fütterung der Milchkuh - 2. Die Rohproteinquellen." *ALP aktuell (Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP)*, **14**.
- Damodaran, S. (1997). "Amino Acids, Peptides, and Proteins." In: *Food Chemistry* (Fennema, O. R., ed.), Third ed., Marcel Dekker, New York, 322-430.

- Darwish, S. M. I. (2002). "Characterization of protein fractions from potato fruit juice and their use for the production of protein gels by means of a microbial transglutaminase." (*Dissertation*), Universität Bielefeld, Technische Fakultät.
- de Carvalho, R. A. and Grosso, C. R. F. (2004). "Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde." *Food Hydrocolloids*, **18**, 717-726.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P. and Porta, R. (2006). "Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties." *Biomacromolecules*, **7**, 744-749.
- DIN. (1995). "DIN EN ISO 527-3: Kunststoffe - Bestimmung der Zugeigenschaften - Prüfbedingungen für Folien und Tafeln."
- DIN. (1997). "DIN EN ISO 291: Kunststoffe - Normalklimate für Konditionierung und Prüfung."
- DIN. (2002). "DIN EN ISO 6603-2: Bestimmung des Durchstoßverhaltens von festen Kunststoffen, Teil 2: Instrumentierter Schlagversuch."
- DIN. (2003a). "DIN 53363: Weiterreißversuch an trapezförmigen Proben mit Einschnitt."
- DIN. (2003b). "DIN EN 13655: Thermoplastische Mulchfolien für den Einsatz in der Landwirtschaft und im Gartenbau."
- Fabra, M. J., Jimenez, A., Atares, L., Talens, P. and Chiralt, A. (2009). "Effect of Fatty Acids and Beeswax Addition on Properties of Sodium Caseinate Dispersions and Films." *Biomacromolecules*, **10**, 1500-1507.
- Folk, J. E. and Cole, P. W. (1966a). "Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity." *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5518-5525.
- Folk, J. E. and Cole, P. W. (1966b). "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies." *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 244-264.
- Fox, P. F. and Kelly, A. L. (2004). "The caseins." In: *Proteins in Food Processing* (Yada, R. Y., ed.), CRC Press, Cambridge, 29-71.
- Frohberg, P., Patzsch, K., Ulrich, J. and Pietzsch, M. (2009). "Verfahren zur Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften bioabbaubarer Werkstoffe." PCT/DE 2009/000790 (05.06.2009), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Gennadios, A. (2002). "Protein-based films and coatings." CRC Press, Boca Raton.

- Gennadios, A. (2004). "Edible films and coatings from proteins." In: *Proteins in food processing* (Yada, R. Y., ed.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 442-467.
- Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L. and Hanna, M. A. (1998). "Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films." *Journal of Food Science*, **63**, 225-228.
- Grellmann, W. and Seidler, S. (2005). "Kunststoffprüfung." Carl Hanser Verlag, München Wien.
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P. and Subirade, M. (1998). "Influence of plasticizers and treatment on the properties of films from pea proteins." *Industrial Crops and Products*, **7**, 149-157.
- Guerrieri, N. (2004). "Cereal proteins." In: *Proteins in food processing* (Yada, R. Y., ed.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 176-196.
- Guilbert, S. and Cuq, B. (2005). "Material formed from proteins." In: *Handbook of biodegradable polymers* (Bastioli, C., ed.), Rapra Technology Ltd., Shawbury, 339-384.
- Guilbert, S. and Gontard, N. (2005). "Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics." In: *Innovations in Food Packaging* (Han, J., ed.), Elsevier, Amsterdam, 263-276.
- Hernandez-Izquierdo, V. M. and Krochta, J. M. (2008). "Thermoplastic processing of proteins for film formation--a review." *Journal of Food Science*, **73**, R30-39.
- Hernandez-Munoz, P., Lopez-Rubio, A., Del-Valle, V., Almenar, E. and Gavara, R. (2004). "Mechanical and water barrier properties of glutenin films influenced by storage time." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 79-83.
- Holtzhauer, M. (1996). "Methoden in der Proteinanalytik." Springer, Berlin Heidelberg.
- Janicki, J., Sobkowska, E., Warchalewski, J., Nowakowska, K., Chelkowski, J. and Stasinska, B. (1973). "Amino acid composition of cereal and oilseed." *Die Nahrung*, **17**, 359-365.
- Jiang, Y., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., Li, L. and Yang, X.-Q. (2007). "Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films." *Innovative Food Sciences and Emerging Technologies*, **8**, 218-225.
- Kamata, Y., Ishikawa, E. and Motoki, M. (1992). "Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1323-1324.
- Kim, K. M., Weller, C. L., Hanna, M. A. and Gennadios, A. (2002). "Heat curing of soy protein films at atmospheric and sub-atmospheric conditions." *Journal of Food Science*, **67**, 708-713.

- Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K. and Yamanaka, S. (1996). "epsilon-(gamma-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiol. Lett.*, **144**, 157-160.
- Krische, W. and Spitteler, A. (1897). "A New or Improved Product Derived from Casein or other Albuminous Substances, and Processes for Producing the same." GB 189724742 A (11.12.1897), EN.
- Krochta, J. M. (2002). "Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities." In: *Protein-based Films and Coatings* (Gennadios, A., ed.), CRC Press, New York, 1-41.
- Krochta, J. M. and De Mulder-Johnston, C. (1997). "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities." *Food Technology*, **51**, 61-73.
- Lacroix, M. (1998). "Polymerization of calcium caseinates solutions induced by gamma irradiation." *Radiation Physics and Chemistry*, **52**, 223-227.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, H.-M. and Chiang, I. C. (2006). "Properties of MTGase treated gluten film." *European Food Research and Technology*, **222**, 291-297.
- Laverde, G. (2002). "Agricultural films: types and applications." *Journal of Plastic Film & Sheeting*, **18**, 269-277.
- Lawton, J. W. (2004). "Plasticizer for zein: their effect on tensile properties and water absorption of zein films." *Cereal Chemistry*, **81**, 1-5.
- Lörks, J. and Wenig, B. (2003). "Biologisch abbaubare Werkstoffe." (*Broschüre*), Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), <http://www.fnr.de/veroff/BAW-Broschuere.pdf>.
- Lörks, J. and Wenig, B. (2006). "Biokunststoffe." (*Broschüre*), Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (FNR), <http://www.biowerkstoffe.info/>.
- Lu, S., Zhou, N., Tian, Y., Li, H. and Chen, J. (2003). "Purification and properties of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*." *Journal of Food Biochemistry*, **27**, 109-125.
- Marco, C., Pérez, G., Ribotta, P. and Rosell, C. M. (2007). "Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 2576-2582.
- Mariniello, L., Di Pierro, P., Esposito, C., Sorrentino, A., Masi, P. and Porta, R. (2003). "Preparation and mechanical properties of edible pectin-soy flour films obtained in the absence or presence of transglutaminase." *Journal of Biotechnology*, **102**, 191-198.

- Mezgheni, E., Vachon, C. and Lacroix, M. (1998). "Biodegradability Behavior of Cross-Linked Calcium Caseinate Films." *Biotechnol. Prog.*, **14**, 534-536.
- Miller, K. S., Chiang, M. T. and Krochta, J. M. (1997). "Heat curing of whey protein films." *Journal of Food Science*, **62**, 1189-1193.
- Oh, J.-H., Wang, B., Field, P. D. and Aglan, H. A. (2004). "Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase." *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 287-294.
- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. and Motoki, M. (2000). "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines." *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6230-6233.
- Osborne, T. B. (1909). "Vegetable Proteins.", Longmans, Green and Co., New York.
- Otto, S. (2004). "Bewertung von Maßnahmen zur Reduzierung von Kunststoffen in Bioabfällen." (*Dissertation*), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Ingenieurwissenschaften.
- Owusu-Ansah, Y. J. and McCurdy, S. M. (1991). "Pea proteins: a review of chemistry, technology of production, and utilization." *Food Reviews International*, **7**, 103-134.
- Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E. F. and Joubert, F. J. (1964). "The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight." *Biochimica et Biophysica Acta*, **82**, 463-475
- Rudnik, E. (2008). "Compostable polymer materials." Elsevier, Amsterdam.
- Sánchez, A. C., Popineau, Y., Mangavel, C., Larré, C. and Guéguen, J. (1998). "Effect of different plasticizers on the mechanical and surface properties of wheat gliadin films." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 4539-4544.
- Seguro, K. (1999). "Transglutaminase." In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* (Flickinger, M. C. and Drew, S. W., eds.), John Wiley & Sons, New York, Vol. 5, 2568-2580.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry*, **150**, 76-85.
- Sothornvit, R. and Krochta, J. M. (2005). "Plasticizers in edible films and coatings." In: *Innovations in Food Packaging* (Han, J., ed.), Elsevier, Amsterdam, 403-433.
- Synowiecki, J. and Wolosowska, S. (2006). "Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by crosslinking with transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1417-1422.

- Talens, P. and Krochta, J. M. (2005). "Plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films." *Journal of Food Science*, **70**, E239-E243.
- Taylor, M. M., Liu, C. K., Latona, N., Marmer, W. N. and Brown, E. M. (2002). "Enzymatic modification of hydrolysis products from collagen using a microbial transglutaminase. II. Preparation of films." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **97**, 225-234.
- Taylor, M. M., Marmer, W. N. and Brown, E. M. (2006). "Preparation and characterization of biopolymers derived from enzymatically modified gelatin and whey." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **101**, 235 - 248.
- Tömösközi, S., Lásztity, R., Haraszi, R. and Baticz, O. (2001). "Isolation and study of the functional properties of pea proteins." *Nahrung/Food*, **45**, 399-401.
- Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z. and Guéguen, J. (2000). "Preparation and characterization of films from pea protein." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 1064-1069.
- Wang, J., Zeng, Y., and Zhao, M. (2005). "Development and physical properties of film of wheat gluten cross-linked by transglutaminase." *Journal of Wuhan University of Technology, Materials Science Edition*, **20**, 78-82.
- Yildirim, M. and Hettiarachchy, N. S. (1998). "Properties of films produced by crosslinking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase." *Journal of Food Science*, **63**, 248-252.
- Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y. (2004). "Properties and applications of microbial transglutaminase." *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 447-454.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. and Bol, J. (1995). "Microbial transglutaminase. A review of its production and application in food processing." *Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 277-282.
- Zotzel, J. (2002). "Aktivierung von Transglutaminase von *Streptomyces mobaraensis* und ihre Regulation." (*Dissertation*), Technische Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie.

7 Anhang

7.1 Aktivitätsmessungen

Tabelle 7-1: Relative Aktivität von MTG (TG Activa®WM) in Abhängigkeit der Temperatur im Hydroxamat-Test bzw. während einer Lagerung von 2 h in Puffer (50 Na-Phosphat, pH 8). $\bar{x} \pm s, n = 2$.

Temperatur im Test [°C]	Relative Aktivität [%]	Lagertemperatur [°C]	Relative Aktivität [%]
4	5,58 ± 0,12	4	100
20	18,62 ± 0,12	22	97,49 ± 0,08
30	35,09 ± 0,61	30	93,66
37	52,17 ± 0,73	37	89,26 ± 6,59
45	81,51 ± 1,21	45	40,71 ± 17,43
50	100	50	5,22 ± 6,17
60	81,17 ± 0,00	80	0,56 ± 0,11
70	13,04 ± 0,73		
80	2,32 ± 0,36		
90	2,83 ± 1,09		
99	4,55 ± 1,33		

Tabelle 7-2: Relative Aktivität von MTG (TG Activa®WM) in Abhängigkeit der Weichmacherkonzentration in der Substratlösung für den Aktivitätstest bzw. nach Lagerung für 3,5 h bei RT (in 20 Tris/HCl-Puffer pH 7). Zur Untersuchung des Einflusses von Weichmacher auf den Hydroxamat-Test wurde der Aktivitätstest ohne Enzym durchgeführt (Kontrolle), $\bar{x} \pm s, n = 4$.

Weichm. konz. [% (w/w)]	Relative Aktivität - MTG im Test [%]		Relative Aktivität + MTG im Test [%]		Weichm.-Konz. [% (w/w)]	Relative Aktivität nach Lagerung [%]	
	Glycerin	PEG 300	Glycerin	PEG 300		Glycerin	PEG 300
0	0	0	100	100	0	100	100
0,067	0	0	99,33 ± 11,87	103,46 ± 12,66	1	112,29 ± 10,08	105,54 ± 9,78
0,333	0	0	110,73 ± 7,92	97,13 ± 6,55	5	109,88 ± 7,58	115,91 ± 10,08
0,667	0	0	105,26 ± 11,28	101,12 ± 9,35	10	114,05 ± 10,60	103,56 ± 5,78
1,333	0	0	103,90 ± 11,18	98,07 ± 11,20	20	114,19 ± 4,81	92,30 ± 19,35
2	0	0	105,83 ± 3,13	104,80 ± 13,82	30	119,90 ± 11,23	79,05 ± 11,58
2,667	0	0	112,94 ± 16,02	109,25 ± 11,78	40	120,31 ± 24,36	40,09 ± 5,41
3,333	0	0	109,80 ± 12,80	118,89 ± 8,74	50	128,37 ± 17,92	41,23 ± 1,96

Tabelle 7-3: Relative Aktivität von MTG (TG Activa®WM) im Filmsatz bei 50 °C.

Inkubationszeit [min]	Relative Aktivität [%]
0	100
15	113
30	113
45	122
60	121
90	115

7.2 Mechanische Charakterisierung

Tabelle 7-4: Zugeigenschaften unvernetzter Na-Caseinat-Filme in Abhängigkeit der Probenbreite und Einspannlänge. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Proben-Breite	σ_M [N/mm ²]			ϵ_B [%]		
	32 mm	50 mm	100 mm	32 mm	50 mm	100 mm
10 mm	2,31 ± 0,05	2,27 ± 0,13	2,44 ± 0,16	153 ± 6	145 ± 11	144 ± 15
15 mm	2,46 ± 0,04	2,32 ± 0,06	2,25 ± 0,05	156 ± 5	152 ± 5	147 ± 4

Tabelle 7-5: Zugeigenschaften eines unvernetzten Na-Caseinat-Films in Abhängigkeit der Schneidetechnik. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n = 3$.

Schneidetechnik	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Cuttermesser	2,03 ± 0,23	99 ± 23
Schere	2,30 ± 0,07	125 ± 5
Rollenschneider	2,41 ± 0,10	132 ± 4

Tabelle 7-6: Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen in Abhängigkeit der Enzymreaktionsbedingungen. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Enzymreaktionsbedingungen			σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
MTG-Behandlung	Inaktivierung	Filmtrocknung		
50 °C	-	48 h bei RT	3,99 ± 0,31	184 ± 8
50 °C	-	24 h bei 50 °C	3,98 ± 0,48	124 ± 15
15 min bei 50 °C	10 min bei 90 °C	48 h bei RT	2,46 ± 0,07	154 ± 7

Tabelle 7-7: Zugeigenschaften und Weiterreißwiderstand von Filmen aus verschiedenen Proteinen. Zugversuch: Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. Weiterreißversuch: Prüfgeschwindigkeit 100 mm/min, Einspannlänge 50 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. n.m....nicht messbar.

Protein	- MTG		+ MTG		- MTG	+ MTG
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	W_R [N/mm]	W_R [N/mm]
Na-Caseinat	2,41 ± 0,10	132 ± 4	3,99 ± 0,31	184 ± 8	30,35 ± 2,16	26,19 ± 8,40
Gelatine 300 Bloom	7,86 ± 0,41	72 ± 6	6,61 ± 0,34	122 ± 4	32,38 ± 4,14	10,63 ± 0,90
Erbsenprotein	0,34 ± 0,05	29 ± 9	0,82 ± 0,03	79 ± 14	6,85 ± 0,70	10,19 ± 1,71
Kartoffelprotein	0,41 ± 0,03	35 ± 9	0,41 ± 0,04	17 ± 2	n.m.	2,41 ± 0,48

Tabelle 7-8: Kennwerte des Durchstoßversuches von Filmen aus verschiedenen Proteinen. Probendimensionen 60 x 60 mm, Fallhöhe des Bolzens 0,99 m, Fallgeschwindigkeit des Bolzens 4,4 m/s. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. n.m....nicht messbar.

Protein	- MTG			+ MTG		
	F_M [N]	l_M [mm]	E_M [J]	F_M [N]	l_M [mm]	E_M [J]
Na-Caseinat	181,9 ± 7	18,2 ± 0,6	1,5 ± 0,1	192,5 ± 10,6	18,3 ± 0,3	1,7 ± 0,1
Gelatine 300 Bloom	665 ± 55	18,48 ± 1,3	4,83 ± 0,68	534 ± 40	21,24 ± 1,93	4,52 ± 0,62
Erbsenprotein	84 ± 6	18,19 ± 2,55	0,8 ± 0,07	101 ± 4	20,45 ± 2,12	1 ± 0,11
Kartoffelprotein	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.

Tabelle 7-9: Zugeigenschaften von unvernetzten Gelatine-Filmen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Weichmachers PEG. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Molekulargewicht [g/mol]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
300	23,6 ± 0,74	58 ± 5,6
400	26,7 ± 1,16	35 ± 5,1
600	30,3 ± 0,79	28 ± 7,2
1000	35,9 ± 0,90	17 ± 1,8
2000	46,6 ± 0,79	10 ± 1,3

Tabelle 7-10: Zugeigenschaften von Na-Caseinat-Filmen in Abhängigkeit von Weichmachertyp und -konzentration. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Weichmacher Typ	Konz. [% (w/w Protein)]	- MTG		+ MTG	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Glycerin	25	6,16 ± 0,22	75 ± 13	7,48 ± 0,75	72 ± 37
	50	2,41 ± 0,10	132 ± 4	3,99 ± 0,31	184 ± 8
	75	0,87 ± 0,03	115 ± 6	1,85 ± 0,19	148 ± 13
	100	0,29 ± 0,02	40 ± 7	1,09 ± 0,09	135 ± 6
Di-Glycerin	25	6,82 ± 0,19	84 ± 4	11,13 ± 0,32	56 ± 15
	50	2,45 ± 0,19	97 ± 9	3,77 ± 0,16	155 ± 7
	75	1,15 ± 0,08	99 ± 5	2,25 ± 0,20	169 ± 8
	100	0,61 ± 0,03	83 ± 4	1,02 ± 0,04	140 ± 8
Poly-Glycerin	25	13,09 ± 0,23	59 ± 9	13,26 ± 0,20	86 ± 16
	50	3,93 ± 0,17	116 ± 8	4,97 ± 0,17	161 ± 5
	75	1,77 ± 0,03	132 ± 5	2,50 ± 0,18	150 ± 11
	100	0,82 ± 0,07	101 ± 12	1,47 ± 0,10	153 ± 4
TEEG	25	13,96 ± 1,02	42 ± 3	11,54 ± 0,36	75 ± 27
	50	1,89 ± 0,18	96 ± 7	3,46 ± 0,46	161 ± 13
	75	0,63 ± 0,04	80 ± 13	1,47 ± 0,16	157 ± 9
	100	0,27 ± 0,01	58 ± 7	0,71 ± 0,08	116 ± 11
Harnstoff	25	8,10 ± 0,50	82 ± 9	12,39 ± 0,36	44 ± 14
	50	0,78 ± 0,07	69 ± 12	2,66 ± 0,21	107 ± 12
	75	3,49 ± 0,18	48 ± 2	3,82 ± 0,08	58 ± 10
	100	4,03 ± 0,25	17 ± 2	4,36 ± 0,19	104 ± 7

Tabelle 7-11: Zugeigenschaften von unvernetzten Na-Caseinat-Filmen mit Glycerin als Weichmacher und mit Bienenwachs-Beschichtung in Abhängigkeit einer Bewitterung. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Film-Bedingungen	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
vor Bewitterung	3,25 ± 0,48	202 ± 25
nach Bewitterung ohne Beregnung (Kontrolle)	1,64 ± 0,12	101 ± 30
nach Bewitterung mit Beregnung	1,10 ± 0,14	102 ± 19

Tabelle 7-12: Zugeigenschaften von Filmen aus Proteinmischungen mit Glycerin als Weichmacher. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. Cas...Na-Caseinat, Gel...Gelatine, Er...Erbsenprotein, Ka...Kartoffelprotein.

Protein	Verhältnis	- MTG		+ MTG	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Cas / Gel	1:0	2,41 ± 0,10	132 ± 4	3,99 ± 0,31	184 ± 8
Cas / Gel	1:1	4,60 ± 0,58	99 ± 8	4,62 ± 0,86	113 ± 11
Cas / Gel	0:1	7,86 ± 0,41	72 ± 6	6,61 ± 0,34	122 ± 4
Er		0,34 ± 0,05	29 ± 9	0,82 ± 0,03	79 ± 14
Er / Cas	1:1	0,90 ± 0,07	71 ± 15	1,64 ± 0,09	152 ± 11
Er / Gel	1:1	3,31 ± 0,10	124 ± 3	3,86 ± 0,67	130 ± 14
Ka		0,41 ± 0,03	35 ± 9	0,41 ± 0,04	17 ± 2
Ka / Cas	1:1	0,74 ± 0,02	44 ± 6	0,92 ± 0,04	92 ± 16
Ka / Gel	1:1	2,56 ± 0,29	137 ± 14	2,63 ± 0,11	139 ± 3

Tabelle 7-13: Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen in Abhängigkeit des Geliergrades der Gelatine. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Geliergrad	- MTG		+ MTG	
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
niedrig	4,11 ± 0,14	87 ± 3	5,47 ± 0,34	115 ± 5
mittel	5,11 ± 0,21	78 ± 2	5,87 ± 0,43	117 ± 4
280 Bloom	6,82 ± 0,34	80 ± 4	6,78 ± 0,48	118 ± 5
300 Bloom	7,86 ± 0,41	72 ± 6	6,61 ± 0,34	122 ± 4

Tabelle 7-14: Zugeigenschaften von Filmen aus Erbsenprotein in Abhängigkeit der Gewinnung und des verwendeten Weichmachers. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Erbsenprotein		Glycerin als Weichmacher				PEG 300 als Weichmacher			
		- MTG		+ MTG		- MTG		+ MTG	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Fraktion N°1	gesamt	0,34 ± 0,05	29 ± 9	0,82 ± 0,03	79 ± 14	1,96 ± 0,24	16 ± 2	2,22 ± 0,08	20 ± 2
	löslich	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.	1,80 ± 0,05	64 ± 4	4,80 ± 0,15	117 ± 4
Fraktion N°3	gesamt	1,66 ± 0,13	143 ± 10	1,70 ± 0,10	106 ± 5	3,02 ± 0,20	23 ± 8	2,33 ± 0,16	13 ± 4
	löslich	1,91 ± 0,08	178 ± 9	2,89 ± 0,19	167 ± 8	4,45 ± 0,16	69 ± 4	6,09 ± 0,95	34 ± 17

Tabelle 7-15: Zugeigenschaften von Proteinfilmen in Abhängigkeit der MTG-Konzentration. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

MTG-Konzentration [U/g Protein]	Na-Caseinat		Erbsenprotein	
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
0	2,41 ± 0,10	132 ± 4	1,91 ± 0,08	178 ± 9
2	3,35 ± 0,19	164 ± 7	2,21 ± 0,09	198 ± 7
8	3,70 ± 0,17	171 ± 8	2,89 ± 0,07	178 ± 4
16	3,36 ± 0,12	150 ± 7	3,21 ± 0,22	157 ± 10
25	3,99 ± 0,31	184 ± 8	2,89 ± 0,19	167 ± 8

Tabelle 7-16: Zugeigenschaften von Proteinfilmen im Vergleich zu kommerziellen Kunststofffilmen. Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min, Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Material	- MTG		+ MTG	
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Na-Caseinat mit Glycerin (50 % w/w Protein)	2,41 ± 0,10	132 ± 15	3,99 ± 0,31	184 ± 8
Na-Caseinat mit Polyglycerin (25 % w/w Protein)	13,09 ± 0,23	59 ± 9	13,26 ± 0,20	86 ± 16
Gelatine mit Glycerin (50 % w/w Protein)	7,86 ± 0,41	72 ± 6	6,61 ± 0,34	122 ± 4
Gelatine mit PEG300 (50 % w/w Protein)	23,60 ± 0,74	58 ± 6	13,13 ± 0,88	93 ± 5
lösliches Erbsenprotein Fraktion N°3 mit Glycerin (50 % w/w Protein)	1,91 ± 0,08	178 ± 9	2,89 ± 0,19	167 ± 11
lösliches Erbsenprotein Fraktion N°3 mit PEG300 (50 % w/w Protein)	4,45 ± 0,16	69 ± 4	6,09 ± 0,95	34 ± 17
LDPE	10	400	-	-
HDPE	32	150	-	-
PP	33	150	-	-
Mater-Bi®	13	254	-	-
Ecoflex®	22	380	-	-

Tabelle 7-17: Weiterreißigenschaften von Proteinfilmen im Vergleich zu kommerziellen Kunststofffilmen. Prüfgeschwindigkeit 100 mm/min, Einspannlänge 50 mm. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$.

Material	- MTG	+ MTG
	W_R [N/mm]	W_R [N/mm]
Na-Caseinat mit Glycerin	30,35 ± 2,16	26,19 ± 8,40
Gelatine mit Glycerin	32,38 ± 4,14	10,63 ± 0,90
lösliches Erbsenprotein Fraktion N°3 mit Glycerin	25,02 ± 2,48	22,81 ± 2,31
LDPE	270 ± 30	-
HDPE	510 ± 30	-
Mater-Bi®	120 ± 20	-

Tabelle 7-18: Durchstoßeigenschaften von Proteinfilmen im Vergleich zu kommerziellen Kunststofffilmen. Probendimensionen 60 x 60 mm, Fallhöhe des Bolzens 0,99 m, Fallgeschwindigkeit des Bolzens 4,4 m/s. $\bar{x} \pm s, n \geq 5$. n.m....nicht messbar.

Material	- MTG		+ MTG	
	F _M [N/mm]	E _M [J/mm]	F _M [N/mm]	E _M [J/mm]
Na-Caseinat mit Glycerin	790 ± 34	6,66 ± 0,37	825 ± 24	7,20 ± 0,19
Gelatine mit Glycerin	3261 ± 330	23,82 ± 2,37	2483 ± 149	21,40 ± 2,23
lösliches Erbsenprotein Fraktion N ^o 3 mit Glycerin	762 ± 35	6,40 ± 0,58	952 ± 30	8,44 ± 0,52
LDPE	1333	8,24	-	-
Mater-Bi [®]	325	0,68	-	-
Ecoflex [®]	367	n.m.	-	-

7.3 Löslichkeit

Tabelle 7-19: Löslichkeit der Proteinfilme in Wasser. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 10 min bei 30 °C gerührt. $\bar{x} \pm s, n = 3$. n.m....nicht messbar.

Protein	- MTG		+ MTG	
	Gewichtsverlust [%]	Proteinverlust [%]	Gewichtsverlust [%]	Proteinverlust [%]
Na-Caseinat	94,82 ± 2,84	55,78 ± 3,74	38,64 ± 1,45	5,79 ± 0,47
Gelatine 300 Bloom	17,25 ± 9,33	5,87 ± 0,14	34,88 ± 2,27	13,99 ± 0,89
Erbsenprotein	78,75 ± 0,48	50,85 ± 0,39	38,43 ± 2,79	23,15 ± 4,08
Kartoffelprotein	n.m.	n.m.	71,41 ± 1,10	39,53 ± 4,57

7.4 Biologische Charakterisierung

Tabelle 7-20: Einfluss der Proteinfilme auf den oberirdische Frischmasse-Ertrag von Pflanzen. Kultivierungsdauer 32 Tage. $\bar{x} \pm s, n \geq 3$.

Film	Frischmasse [%]			
	Mais-Pflanzen		Tagetes-Pflanzen	
	- MTG	+ MTG	- MTG	+ MTG
Na-Caseinat	113,1 ± 6,4	115,1 ± 7,4	104,9 ± 3,7	106,8 ± 8,2
Gelatine 300 Bloom	111,5 ± 3,2	110,4 ± 2,4	109,3 ± 6,6	107,2 ± 10,2
Erbsenprotein	102,8 ± 5,4	118,2 ± 8,4	102,6 ± 5,1	106,7 ± 9,0
Kompostierbare Folie	99,4 ± 10,0	-	94,4 ± 8,1	-
Kontrolle (ohne Film)	100,0 ± 5,4	-	100,0 ± 6,2	-

Tabelle 7-21: Einfluss der Proteinfilme auf die Wachstumshöhe von Pflanzen. Kultivierungsdauer 32 Tage.
 $\bar{x} \pm s, n \geq 3$.

Film	Versuchsdauer [d]	Wachstumshöhe [cm]			
		Mais-Pflanzen		Tagetes-Pflanzen	
		- MTG	+ MTG	- MTG	+ MTG
Na-Caseinat	0	33,2 ± 2,0	31,0 ± 1,8	4,8 ± 0,9	4,3 ± 1,0
	4	53,3 ± 3,8	48,5 ± 6,1	5,6 ± 1,0	5,8 ± 1,0
	11	83,1 ± 6,7	85,7 ± 3,1	8,0 ± 1,0	8,7 ± 1,8
	19	100,7 ± 3,6	105,4 ± 3,4	9,8 ± 0,8	9,5 ± 1,1
	25	109,0 ± 1,5	114,0 ± 4,9	11,0 ± 0,6	10,8 ± 0,6
	32	114,3 ± 3,1	121,2 ± 7,2	12,7 ± 0,6	13,2 ± 1,5
Gelatine 300 Bloom	0	32,5 ± 1,5	33,2 ± 1,8	4,6 ± 0,5	5,0 ± 0,6
	4	50,5 ± 2,0	49,2 ± 5,0	6,1 ± 0,3	6,4 ± 0,5
	11	83,1 ± 2,8	84,1 ± 6,9	9,2 ± 0,9	9,4 ± 0,9
	19	100,7 ± 1,9	102,4 ± 4,0	10,5 ± 1,0	10,1 ± 0,9
	25	113,8 ± 6,6	113,2 ± 2,4	11,2 ± 1,4	11,0 ± 0,8
	32	121,0 ± 5,2	120,8 ± 3,1	14,2 ± 1,2	13,3 ± 1,2
Erbsenprotein	0	28,0 ± 3,1	34,0 ± 2,0	4,8 ± 0,3	4,8 ± 0,9
	4	43,7 ± 6,2	54,7 ± 3,1	5,6 ± 0,6	6,1 ± 1,1
	11	79,1 ± 4,8	85,8 ± 6,6	8,6 ± 0,8	8,7 ± 1,4
	19	98,6 ± 3,0	101,8 ± 5,2	10,3 ± 1,0	9,9 ± 0,9
	25	109,5 ± 4,8	113,0 ± 4,6	12,5 ± 0,7	11,6 ± 1,0
	32	119,5 ± 2,3	123,3 ± 4,6	14,0 ± 0,6	14,1 ± 0,9
Kompostierbare Folie	0	30,7 ± 0,8	-	4,3 ± 0,6	-
	4	49,3 ± 3,3	-	5,5 ± 1,1	-
	11	80,3 ± 6,2	-	8,1 ± 0,8	-
	19	96,2 ± 3,3	-	10,3 ± 0,7	-
	25	108,0 ± 4,6	-	11,8 ± 1,0	-
	32	113,8 ± 2,9	-	14,4 ± 1,0	-
Kontrolle (ohne Film)	0	31,2 ± 1,8	-	5,4 ± 1,0	-
	4	47,5 ± 2,2	-	6,9 ± 1,2	-
	11	80,3 ± 4,8	-	10,1 ± 2,0	-
	19	95,8 ± 3,7	-	11,0 ± 0,5	-
	25	107,9 ± 4,6	-	13,3 ± 1,4	-
	32	114,5 ± 2,3	-	14,5 ± 1,2	-

Tabelle 7-22: Fotografische Dokumentation der Abbaubarkeit von Proteinfilmen im Boden.

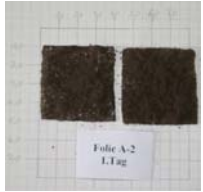
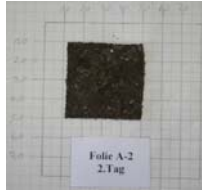
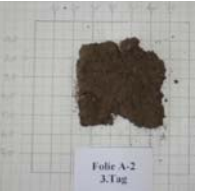
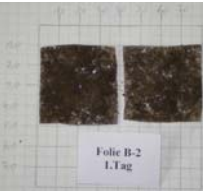
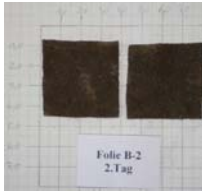
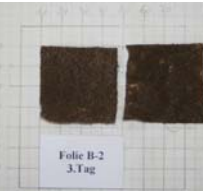
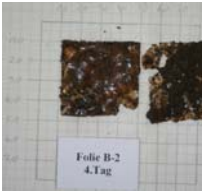



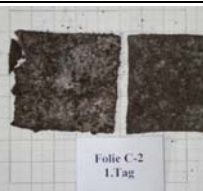

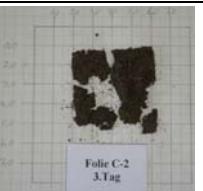









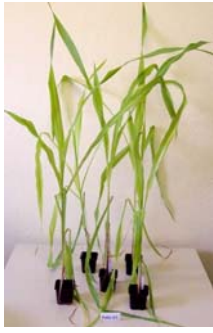







Na-Caseinat + MTG	1 d	2 d	3 d	4 d
				-
	1 d	2 d	3 d	4 d
				
5 d	6 d	7 d		
				
Erbsenprotein (Fraktion N°1) + MTG	1 d	2 d	3 d	4 d
				-
	5 d	6 d	7 d	
	-		-	

Tabelle 7-23: Fotografische Dokumentation der Versuchspflanzen nach Wachstum auf Proteinfilmern im Boden.

	Na-Caseinat - MTG	Na-Caseinat + MTG	Gelatine (hoher Geliergrad) - MTG	Gelatine (300 Bloom) + MTG
Mais				
Tagetes				
	Erbseprotein (Fraktion N°1) - MTG	Erbseprotein (Fraktion N°1) + MTG	Kompostierbare Folie	Kontrolle
Mais				
Tagetes				

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Katja I. Patzsch
 Geburtsdatum/-ort: 06.03.1981 in Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig
 Schulabschluss: allg. Hochschulreife
 Berufsabschluss: Dipl.-Ing. Bioverfahrenstechnik

Schulischer und Beruflicher Werdegang

09/1992 – 07/1999 Johannes-Kepler-Gymnasium in Chemnitz

10/1999 – 12/2004 **Studium der Bioverfahrenstechnik** an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

10/2003 – 12/2003 **Forschungsaufenthalt** an der Universität in Wageningen (Niederlande), Laboratory of Physical Chemistry and Colloid Science (Prof. W. Norde)

01/2004 – 04/2004 **Fachpraktikum** im Bereich Life Science Products R & D bei der Merck KGaA, Darmstadt

06/2002 – 07/2003 **Studentische Hilfskraft** am Institut für mechanische Verfahrenstechnik

04/2004 – 12/2004 **Diplomarbeit** „Produktion und Reinigung eines stark geladenen rekombinanten Proteins in bzw. aus *E.coli*“

03/2005 – 02/2010 **Promotion** am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, zum Thema: „Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen“

seit 10/2009 Promovierte **wissenschaftliche Mitarbeiterin** am Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik

9 Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Patzsch, K., Riedel, K., Pietzsch, M. (2009). "Parameter optimization of protein film production using microbial transglutaminase." *Biomacromolecules*, in press.

Patzsch, K., Riedel, K., Pietzsch, M. (2009). „Herstellung von Folien aus nachwachsenden Rohstoffen durch enzymkatalysierte Vernetzung von Proteinen.“ *Chemie Ingenieur Technik*, 82 (1-2), 87-92.

Bosker, W. T. E., Patzsch, K., Stuart, M. A. C., Norde, W. (2007). "Sweet brushes and dirty proteins." *Soft Matter*, 3 (6), 754-762.

Koutsopoulos, S., Patzsch, K., Bosker, W. T. E., Norde, W. (2007). "Adsorption of Trypsin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces." *Langmuir*, 23 (4), 2000-2006.

Konferenzbeiträge

Patzsch, K., Riedel, K. and Pietzsch, M. "Bioplastics by enzymatic cross-linking of proteins from renewable resources." DEHEMA-Tagung Biokatalyse: Neue Verfahren, neue Produkte, May 18 to 20, 2009, Bad Schandau, Germany. (Poster)

Patzsch, K., Wiemann, A., Schnabel, R. and Pietzsch, M. "New Materials by Enzymatical Cross-linking of Proteins from Renewable Resources." 8th International Conference on Protein Crosslinking and Transglutaminases (PCL8), September 01 to 04, 2005, Lübeck, Germany. (Vortrag und Poster)

Patent

Frohberg, P., Patzsch, K., Pietzsch, M. und Ulrich, J. „Verfahren zur Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften bioabbaubarer Werkstoffe.“ PCT/DE 2009/000790 (05.06.2009), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Deutschland. In Anmeldephase.