

# **Untersuchungen zum Ersatz von Duroplasten durch enzymatisch quervernetzte Proteine**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktoringenieur (Dr.-Ing.)

vorgelegt dem

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

Herrn Matthias Jacob, M.Sc.  
geboren am 12. Mai 1981 in Leipzig, Deutschland

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.05.2012

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Halle (Saale), 28.11.2011

Matthias Jacob

---

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Lehrstuhl für Aufarbeitung biotechnischer Produkte, Institutsbereich Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Markus Pietzsch für die interessante Aufgabenstellung und die sehr gute Betreuung sowie die anregenden, konstruktiven Gespräche während der gesamten Promotionsdauer. Die richtigen Fragen und neue Ideen halfen dabei, die Entwicklung der Arbeit zielorientiert voranzubringen, ermöglichten aber auch den Blick nach „links und rechts“. Nicht nur die hohe fachliche Kompetenz sondern auch der freundliche und respektvolle Umgang mit allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe haben mich tief beeindruckt.

Herrn Dr. Thomas Hertel danke ich insbesondere für die zahlreichen Anregungen, Diskussionen und die Unterstützung während der Promotion. Nicht nur fachlich, sondern auch menschlich konnte ich viel aus den gemeinsamen Gesprächen dazulernen. Ohne seine äußerst hilfsbereite, fleißige und kreative Art wären zudem viele fachliche Problemstellungen innerhalb der Arbeitsgruppe nicht lösbar gewesen.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich für das angenehme Arbeitsklima und die sehr gute Zusammenarbeit danken. Für fachliche Fragen fand man immer ein offenes Ohr und bekam kreative Vorschläge insbesondere durch die unterschiedlichen vertretenen Fachrichtungen - wobei auch der Spaß nicht zu kurz kam. Die Stammtischtreffen und gemeinsame Unternehmungen trugen dabei zusätzlich zu einer guten Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe bei.

Bei allen anderen Mitarbeitern der Universität und angehöriger Institute (Hr. Ullmann, Hr. Syrowatka, Prof. Roggendorf, und hier nicht genannte) möchte ich mich ebenfalls für die gebotene Unterstützung bedanken.

Herrn Dr. Erik van Herwijnen (Fa. DYNEA) danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die gute Betreuung der Arbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern des Instituts für Holztechnologie Dresden (IHD), die die Untersuchung von Proteinen als Bindemittel für Spanplatten ermöglichten.

Der Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) danke ich für die finanzielle Förderung meiner Promotion.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Lebensgefährtin Anja aussprechen, die mich mit viel Geduld und Rücksicht während der gesamten Promotionszeit unterstützt hat.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mir die bisherige Ausbildung ermöglicht haben und mich während dieser Zeit stets voll unterstützt haben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>	<b>2</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>3</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
Abkürzungen.....	7
Symbole.....	7
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>8</b>
1.1 Stand des Wissens .....	10
1.1.1 Konventionelle Bindemittel.....	10
1.1.2 Bindemittel in der Gießerei.....	11
1.1.3 Bindemittel für Holzwerkstoffe.....	14
1.1.4 Proteine als Werkstoff.....	16
1.1.5 Transglutaminase als enzymatischer Quervernetzer .....	18
1.2 Zielsetzung .....	20
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
2.1 Material .....	21
2.1.1 Chemikalien .....	21
2.1.2 Puffer.....	23
2.1.3 Proteine.....	23
2.1.4 Transglutaminasen.....	24
2.1.5 Grundwerkstoffe.....	24
2.1.6 Geräte .....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Herstellung von Prüfkörpern für Sandbindemittel.....	26
2.2.1.1 Herstellung des Formstoffgemisches .....	26
2.2.1.2 Prüfkörperherstellung für den Biegeversuch .....	28
2.2.1.3 Prüfkörperherstellung für den Druckversuch.....	28
2.2.2 Extraktion von löslichem Erbsenprotein .....	30
2.2.3 Herstellung von Spanplatten .....	30
2.3 Analytik.....	32
2.3.1 Prüfung der mechanischen Eigenschaften.....	32
2.3.1.1 Druckversuch für proteingebundenen Sand.....	32
2.3.1.2 Biegeversuch für proteingebundenen Sand .....	32
2.3.1.3 Glühverlustbestimmung.....	33
2.3.1.4 Quersugfestigkeit von Spanplatten .....	33
2.3.1.5 Biegeversuch für Spanplatten .....	34
2.3.1.6 Dickenquellung von Spanplatten.....	34

2.3.2	Elektronenmikroskopie .....	34
2.3.3	Bestimmung der Transglutaminase - Aktivität.....	35
2.3.4	Bestimmung der BLAP- Aktivität .....	37
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Proteine als Bindemittel für Sand .....	39
3.1.1	Voruntersuchungen .....	39
3.1.1.1	Mischverfahren für die Formstoffherstellung .....	39
3.1.1.2	Auswahl des geeigneten mechanischen Prüfverfahrens.....	40
3.1.1.3	Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Festigkeit .....	41
3.1.1.4	Einfluss der Lagerungsbedingungen .....	42
3.1.2	Vergleich verschiedener Proteine als Bindemittel .....	45
3.1.3	Untersuchungen zum Einfluss der Protein- und Puffermenge .....	46
3.1.4	Einfluss der enzymatischen Quervernetzung bei Casein.....	48
3.1.4.1	Einfluss der Enzymkonzentration/enzymatischen Aktivität.....	48
3.1.4.2	Einfluss der Vernetzungsdauer .....	50
3.1.4.3	Untersuchung der Druckfestigkeit getrockneter Prüfkörper nach enzymatischer Quervernetzung .....	51
3.1.5	Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie .....	52
3.1.6	Enzymatische Quervernetzung anderer Proteine .....	56
3.1.7	Verwendung einer genetisch optimierten Transglutaminase .....	61
3.1.8	Einfluss von Salzen auf die Festigkeit.....	63
3.1.9	Temperaturstabilität und Recycling von Sand mit Caseinat als Bindemittel ..	67
3.1.9.1	Temperaturstabilität von Caseinat-gebundenem Sand .....	67
3.1.9.2	Glühverlustbestimmung.....	68
3.1.9.3	Thermische Formstoffaufbereitung .....	69
3.1.9.4	Nassrecycling des Formstoffes .....	70
3.2	Proteine als Bindemittel für Holzwerkstoffe.....	74
3.2.1	Einfluss der Spanfeuchte auf die Spanplattenherstellung.....	74
3.2.2	Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins.....	76
3.2.2.1	Enzymatische Quervernetzung vor der Spantrocknung .....	76
3.2.2.2	Enzymatische Quervernetzung im Spanvlies .....	78
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>80</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>108</b>

<b>9 Glossar .....</b>	<b>114</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>115</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>116</b>

## Abkürzungen

atro	absolute Trockenmasse
b.o.s.	bezogen auf das Sandgewicht (based on sand)
BLAP	Bacillus lentus alkalische Protease
BM	Bindemittel
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
Dtl.	Deutschland
EN	Europäische Norm
FNR	Fachagentur für Nachwachsende Rohstoffe
Gln	Glutamin
i.Tr.	im Trockenen
kDa	Kilodalton
Lys	Lysin
MF	Melamin-Formaldehyd (-Harz)
m/m	Masse pro Masse
m/V	Masse pro Volumen
MTG	Mikrobielle Transglutaminase
MUF	Melamin-Harnstoff-Formaldehyd (-Harz)
MUPF	Melamin-Harnstoff-Phenol-Formaldehyd (-Harz)
M <sub>w</sub>	Molekulargewicht
n.b.	nicht bestimmt
OSB	Oriented Strand Board (Grobspanplatte)
OZ	Ordnungszahl des chemischen Elements
PF	Phenol-Formaldehyd (-Harz)
QV	Quervernetzung
r.F.	Relative Feuchte
rMTG	rekombinante mikrobielle Transglutaminase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SPI	Soja-Protein Isolat (soy protein isolate)
TEA	Triethylamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UF	Harnstoff – Formaldehyd (-Harz)

## Symbole

A	Fläche
F	Kraft
$\sigma_{bB}$	Biegebruchspannung
$\sigma_{dB}$	Druckspannung bei Bruch
U	Enzymatische Einheit
U <sub>Cas</sub>	Caseinolytische Einheiten

# 1 Einleitung

Bindemittel kommen im Alltag in den verschiedensten technischen Anwendungen zum Einsatz (Tabelle 1-1) und müssen je nach Verwendungszweck sehr unterschiedlichen Anforderungsprofilen genügen, so z.B. hohe Hitzebeständigkeit, hohe Festigkeit, Beständigkeit gegen Wasser, Öl oder andere Chemikalien. Das Recycling von Materialien, die Bindemittel enthalten, gestaltet sich meist schwierig, da es sich fast ausschließlich um Materialkombinationen von Bindemittel und Grundwerkstoff mit sehr unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften handelt. In einigen Bereichen, wie z.B. der Spanplattenherstellung für die Möbelindustrie, wird das mechanisch aufgearbeitete Altmaterial unter erneuter Zugabe von Bindemitteln wiederverwendet, was zur Akkumulation des Bindemittels und dadurch teilweise zur Verschlechterung der Eigenschaften der Spanplatten führt. In anderen Fällen müssen aber auch die Bindemittel mit mechanischen, thermischen oder chemischen Verfahren vom Grundwerkstoff getrennt werden, um diesen wiederverwenden zu können, wie es beispielsweise bei Bindemitteln für Gießereisand üblich ist [Harris und Lafarge, 2006]. Häufig verwendete Bindemittel sind Duromere, die durch die chemische Vernetzung der Ausgangsprodukte mittels Wärme, Katalysatoren oder Strahlung (UV-Licht) hergestellt werden [Gotro und Prime, 2004]. Dabei kommt es aufgrund mehrerer reaktiver Gruppen der Ausgangsstoffe zu dreidimensional vernetzten Molekülstrukturen, die nicht schmelzbar sind und sich bei Erhitzen zersetzen [Yorkgitis, 2002]. Bindemittel und Klebstoff sind häufig verwandt benutzte Begriffe, doch während Bindemittel eine meist homogene Mischung (durch Beschichtung) mit dem Grundwerkstoff ergeben, sind Klebstoff und Grundwerkstoff meist nur in partiellem Kontakt zueinander. Eine klare Abgrenzung zwischen beiden Begriffen ist jedoch nicht immer möglich.

Tabelle 1-1: Verwendung von Bindemitteln in unterschiedlichen technischen Anwendungen [Dynea, 2011]

Konstruktion/Bau	Inneneinrichtung	Automobilbereich/Technik
Beschichtungen/Lacke	Imprägnierungen	Schleifmittel
Isolierungen	Furniere	Bremsbeläge
Stein-/Glaswolle	MDF-Platten	Schäume
OSB-Platten	Spanplatten	Filter
Fingerverklebungen	Sperrholz	Gießereisand

Die Verwendung von biologisch abbaubaren Materialien auf Basis nachwachsender Rohstoffe wird in Bezug auf die Preissteigerungen und die Verknappung von Erdöl in vielen Bereichen interessanter. Zudem wird die Umweltverträglichkeit von Produkten und deren Herstellungsprozessen zunehmend hinterfragt bzw. die gesetzlichen Rahmenbedingungen für nicht umweltgerechte Produkte und Verfahren werden kontinuierlich verschärft. Allerdings wirkt sich der im Vergleich meist höhere Preis umweltfreundlicherer Werkstoffe gegenüber konventionellen Werkstoffen oft nachteilig aus [Khait, 2003]. Biologisch abbaubare Werkstoffe stellen u.a. eine interessante Alternative in Anwendungen dar, bei denen Artikel nur für kurze Zeit genutzt werden oder deren fachgerechte Entsorgung nicht immer sichergestellt werden kann. Eine der Grundvoraussetzungen für die Umweltfreundlichkeit solcher Stoffe ist die energetische oder emissionsbezogene Gesamtbilanz, welche in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert wird.

So können biologisch abbaubare Werkstoffe einen Beitrag zum Umweltschutz aufgrund einer Verbesserung der CO<sub>2</sub>-Bilanz liefern. Bei der Betrachtung der Gesamtumweltbilanz können aber auch Mehrwegsysteme (z.B. Getränkebecher) oder gut recyclingfähige konventionelle Werkstoffe diesen überlegen sein [Beier, 2009; Narayan und Patel, 2004].

## 1.1 Stand des Wissens

### 1.1.1 Konventionelle Bindemittel

Im Jahre 1907 wurde die Herstellung von Phenol-Formaldehyd (PF) durch Leo Hendrik Baekeland patentiert und die Vermarktung des Kunststoffes unter dem Handelsnamen BAKELIT vorangetrieben [Baekeland, 1907]. Bereits zuvor hatte es experimentelle Arbeiten Anderer an Phenol-Formaldehyden gegeben, jedoch meist mit nicht zufriedenstellenden Ergebnissen. Unter Anwendung von Druck und Hitze gelang es schließlich Baekeland erstmals aus bereits polymerisierten niedermolekularen Vorstufen (Novolake oder Resole) feste Kunststoffe zu erzeugen [Kopf, 2002]. In Deutschland wurde die erste Fabrik für die kommerzielle Herstellung von Phenol-Formaldehyd 1910 in Betrieb genommen. In den 20er und 30er Jahren des 20. Jahrhunderts folgten dann weitere Aldehyd-vernetzte Materialien wie z.B. Harnstoff-Formaldehyd (UF) und Melamin-Formaldehyd (MF). Die gute elektrische Isolation sowie hohe thermische Stabilität von PF wurde zunächst insbesondere im Bereich der Elektrotechnik genutzt, später kamen jedoch immer mehr Anwendungen z.B. für Gehäuse von Haushaltsgeräten oder Elektronik hinzu. Die Vielseitigkeit dieses Werkstoffes förderte die Entwicklung einer völlig neuen Materialklasse, die der Polymerwerkstoffe. In der Folgezeit ersetzten andere synthetische Polymere systematisch PF in vielen Anwendungen, so dass es heute nur noch im Bereich der Isolation, für feuerresistente Werkstoffe oder als Bindemittel benutzt wird. Harnstoff-Formaldehyd-Harze und Melamin-Formaldehyd-Harze finden auch heute noch eine breite Verwendung bei der Herstellung von Holzwerkstoffen. Harnstoff-Formaldehyd-Harze sind im Vergleich zu MF oder PF preiswerte Bindemittel, jedoch sind sie nicht witterungsbeständig, weshalb bei Holzwerkstoffen für den Außenbereich MF bzw. MUF-Harze verwendet werden [Williams, 2002]. Als Bindemittel für Gießereisand werden ebenso (neben vielen anderen Bindemitteltypen) PF- und UF- Harze verwendet [IPPC, 2004]. Neben den Aldehyd-basierten Bindemitteln existieren viele verschiedene Harz- und Bindemittelsysteme, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

## 1.1.2 Bindemittel in der Gießerei

Das Gießen von Metallen ist eines der ältesten Formgebungsverfahren. Bereits vor mehr als 4000 Jahren wurde Bronze verwendet, um Schmuckstücke und Werkzeuge herzustellen [Probst, 1996]. Für die Herstellung eines Gussstückes wird stets eine Form benötigt, in die das flüssige Metall gegeben wird. Dabei kann es sich um wiederverwendbare Dauerformen oder sogenannte verlorene Formen handeln. Verlorene Formen werden bei der Entnahme des Gussstückes zerstört. Welche Art von Form verwendet wird, hängt neben anderen Faktoren von der Kontur und Masse des herzustellenden Werkstückes bzw. der Gießtemperatur ab. Auch gegenwärtig werden noch häufig in der industriellen Serienfertigung (sowie in der Einzelteilerfertigung) verlorene Modelle benutzt. Der für verlorene Modelle benutzte Formstoff kann neben dem Formgrundstoff und dem Bindemittel noch weitere Zusätze zur Verbesserung der Formstoffeigenschaften und der Oberflächengüte enthalten [IFG, 1996].

Zur Abbildung von Hohlräumen oder geometrisch komplexen Formen (z.B. bei Hinterschneidungen) werden sogenannte Gusskerne verwendet (Abbildung 1-1). Das Bindemittel wird während des Gusses durch die hohen Temperaturen zerstört, so dass nach Erstarren des Metalls das Gussstück entnommen und der Formsand entfernt werden kann. Problematisch sind hierbei hohe Restfestigkeiten der Kerne z.B. beim Leichtmetallguss aufgrund der geringeren Schmelzetemperaturen, da erheblicher Aufwand notwendig ist, um Formstoffreste vom oder aus dem Werkstück zu entfernen. Teilweise kommt es beim Entfernen der Kernreste zu Ausschuss, der die Fertigungskosten erhöht.

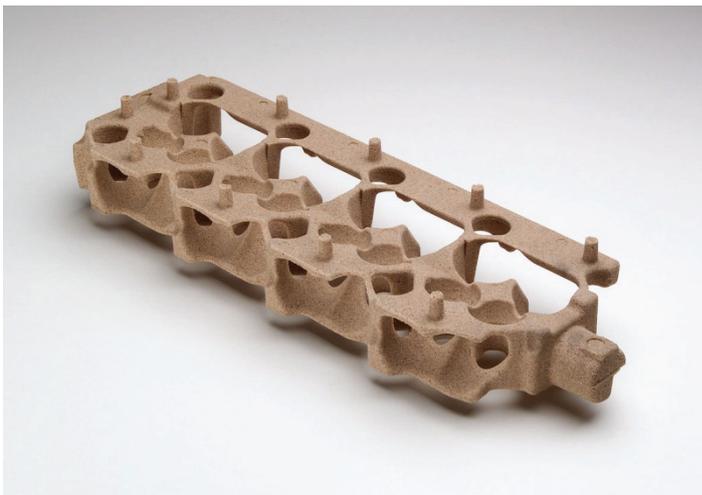


Abbildung 1-1: Gusskern für den Wassermantel eines PKW-Zylinderkopfes [Wolff und Steinhäuser, 2004]. Der Sand bildet die Hohlräume ab, in denen im fertigen Gussteil das Kühlwasser fließt.

Neben wirtschaftlichen und umweltrelevanten Aspekten werden folgende technologische Anforderungen an Gusskerne gesetzt:

- Keine Beschädigung der Oberfläche durch hydrodynamische Kräfte (beim Eingießen der Schmelze), kein Ablösen von Sand
- Geringe Gasentwicklung zur Vermeidung von Oberflächendefekten am Gussteil
- kein Verzug, Verformung oder Abbrechen von Stücken des Kerns
- ausreichende Stabilität gegen thermische Spannungen, Schrumpfspannungen und Auftriebskräfte [Glaß, 2004]
- i.d.R. geringe Oberflächenrauheit, kein Anhaften von Schmelze an der Oberfläche, keine chemische Reaktion mit dem Metall
- Einfache und rückstandsfreie Entformung des Gussteils bzw. Entfernung des Kernmaterials

Neben den chemischen Verfahren können physikalische und mechanische Verfahren zur Kernherstellung verwendet werden, wobei die chemischen Verfahren heute meist den anderen beiden vorgezogen werden [IPPC, 2005].

Im Bereich der chemischen Sandbindemittel kann prinzipiell in organische und anorganische Systeme unterschieden werden. Da jedes Verfahren eigene Vor- und Nachteile hat, existieren parallel mehrere Bindemittelsysteme, ohne dass sich Eines vollständig durchsetzen konnte. Das derzeit am häufigsten verwendete Bindemittelsystem findet Verwendung im Cold-Box-Prozess, bei dem der mit Harz benetzte Formstoff in der Form von einem Trägergas durchspült wird, in dem der Katalysator für die Vernetzungsreaktion mitgetragen wird. Problematisch dabei sind jedoch die verwendeten Katalysatoren (tertiäre Amine wie z.B. Triethylamin), die gesundheitlich bedenklich sind und teilweise beim Abguss bzw. bei der Entformung des Gussteils entweichen.

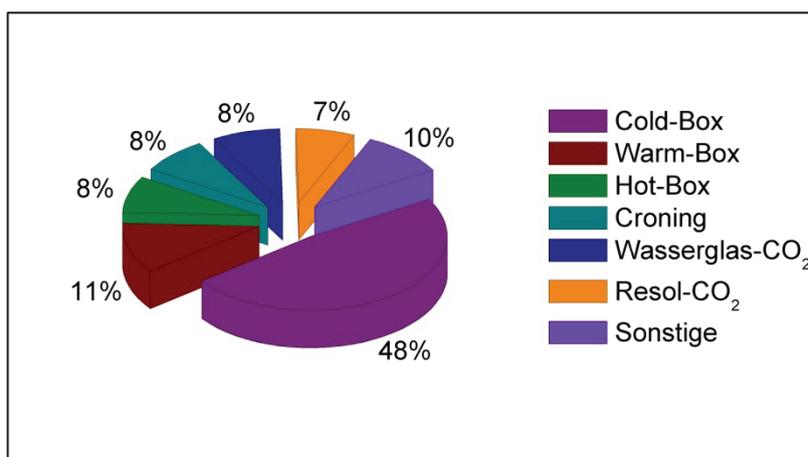


Abbildung 1-2: Marktanteile der verschiedenen Kernherstellungsverfahren im Sandformguss [Psimenos et al., 2006]. Der Coldbox-Prozess ist das meistverwendete Verfahren.

In Abbildung 1-2 sind die verschiedenen BM-Systeme nach deren Anteil und verwendeter Menge dargestellt. Trotz intensiver Forschung konnten sich die anorganischen Bindemittel,

die generell emissionsarm sind, aufgrund geringerer Produktivität und Prozessstabilität bisher nicht gegen die organischen Bindemittel durchsetzen [Polzin, 2007].

Bereits 1920 wurde ein Patent in den USA auf die Verwendung von „Caseinen“ als Bindemittel für Sand zur Herstellung von Gussformen erteilt. Sinngemäß handelte es sich um Proteine pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die als Bindemittel eingesetzt werden sollten [Outerbridge, 1920]. Aufgrund der hohen Verfügbarkeit und geringer Kosten konventioneller Bindemittel konnten sich jedoch Proteine bisher nicht gegen diese durchsetzen. Über die Verwendung eines auf Gelatine basierenden Bindemittels, welches von der Fa. Hormel (Hormel Foods Corporation, USA) unter dem Namen GMBond vermarktet wird, ist nichts bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass die technologischen Anforderungen durch diesen Proteinbinder erfüllt werden können [Mus et al., 2001]. Die Vor- und Nachteile konventioneller Bindemittel bestehen in:

- Verhältnismäßig geringer Preis gegenüber Protein (ca. 900 €/t für PF - Harze)
- gut einstellbare Eigenschaften [Trinowski et al., 1999]
- gute Rieselfähigkeit des Sandes
- schnellhärtende Systeme verfügbar
- Einsatz gesundheitsgefährdender Chemikalien (z.B. Phenol, Formaldehyd, Amine)
- Hohe Restfestigkeiten (besonders bei Aluminium-Guss) erschweren das Entformen/Entfernung von Formstoffresten
- Keine direkte Wiederverwendung ungenutzten Formstoffs ohne Aufarbeitung
- Thermische Aufbereitung des Sandes sehr energieintensiv, giftige Pyrolyseprodukte beim Guss [Helber et al., 2009]

Bei der Herstellung von verlorenen Formen aus Sand mit organischen Bindemitteln wird das Bindemittel teilweise durch die eingebrachte thermische Energie verbrannt bzw. pyrolysiert. Nach der Verwendung der Gusskerne wird der Sand regeneriert, dabei wird meist eine Kombination von mechanischen und thermischen Verfahren (Abbrennen des Bindemittels) angewandt [Vogt et al., 2006]. Trotz hoher Recyclingraten von etwa 90-95 % bei harzgebundenen Formsanden und verbesserter Technologien fällt eine erhebliche Menge Altsand an. Die jährliche Abfallmenge Altsand beträgt in Deutschland ca. 1.000.000 t (2003), von denen etwa 10 % aus kaltharzgebundenen Verfahren stammen [Vogt et al., 2006]. Neben der Deponierung finden diese Abfallstoffe beispielsweise Weiterverwendung im Straßenbau oder bei der Zementherstellung [Vogt et al., 2006]. Bei einer jährlichen Umlaufmenge von ca. 1.600.000 t Sand für kaltharzgebundene Formstoffe ergibt sich ein erhebliches Potenzial für alternative Bindemittel, wenn dadurch der Altsand einfacher zu recyceln ist oder weniger Emissionen entstehen.

### 1.1.3 Bindemittel für Holzwerkstoffe

Natürliches Holz zeigt ein orthotropes Verhalten, d.h. die mechanischen Festigkeiten hängen in hohem Maße von der Belastungsrichtung ab. In Faserrichtung des Holzes werden der höchste E-Modul und die höchste Zugfestigkeit erreicht. Außerdem können bei größeren Werkstücken fehlerhafte Stellen wie Astlöcher oder Verwachsungen kaum vermieden werden, was konstruktiv nachteilig ist. Da jedoch oftmals isotropes Werkstoffverhalten sowie die Fertigung größerer Bauteile gewünscht sind, verwendet man verschiedene Holzwerkstoffe. Diese können in fünf Gruppen eingeteilt werden: Vollholz-, Furnier-, Span-, Faser- und Verbundwerkstoffe. Bei all diesen Werkstoffen wird zunächst die Struktur des natürlichen Holzes aufgelöst, um Einzelelemente unterschiedlicher geometrischer Form und Größe herzustellen. Anschließend werden diese Einzelelemente anwendungsbezogen wieder zu einem Werkstoff zusammengefügt [Dunky und Niemz, 2002].

Ein weiterer Vorteil neben der Eigenschaftsverbesserung besteht in der Möglichkeit zur Verwendung von Holzresten wie Sägespäne, Äste usw., so dass ein wesentlich höherer Masseanteil von Holz werkstofflich genutzt werden kann [Matuana, 2004]. Die Bedeutung solcher Holzwerkstoffe lässt sich am Beispiel von Spanplatten ermessen. Im Jahr 2008 wurden  $8,6 \times 10^6 \text{ m}^3$  Spanplatten allein in Deutschland produziert [Destatis, 2009].

Für die Herstellung von Holzwerkstoffen werden Bindemittel bzw. Klebstoffe benötigt, um die Formelemente (Späne, Schnitzel, Fasern) wieder zu einem massiven Werkstoff zusammenfügen zu können.

Für Holzwerkstoffe typischerweise verwendete Bindemittel bestehen meist aus Aminoharzen [Krug, 2007b], von denen Harnstoff-Formaldehyd (UF) am weitest häufigsten verwendet wird [Matuana, 2004; VHI, 2011]. Daneben werden für witterungsbeständige Holzwerkstoffe UF-Harze in Kombination mit Melamin (MUF) eingesetzt [Binder und Dunky, 2004]. Der Vorteil dieser Bindemittel liegt in der Wasserlöslichkeit vor der Verwendung, was ein einfaches Mischen mit Farbstoffen und eine einfache Verarbeitung des sonst farblosen Binders ermöglicht. Weiterhin zeichnen sich diese Bindemittel durch eine hohe Festigkeit und relativ gute chemische Stabilität im gehärteten Zustand aus [Williams, 2002]. Ein Nachteil von UF- und MUF-Harzen ist die beständige Formaldehydemission, verursacht durch Restmonomere sowie teilweise Rückreaktion der Kondensationsreaktion. Neben diesen genannten gibt es weitere Bindemitteltypen, z.B. auf Isocyanat-Basis (Polymeres Diphenylmethandiisocyanat, (PDMI)), das wegen seiner hohen Hydrolysebeständigkeit für u.a. feuchtebeständige Platten genutzt wird. Ebenso vorteilhaft ist, dass kein Formaldehyd von damit produzierten Holzwerkstoffen emittiert wird. Problematisch ist jedoch neben dem höheren Preis gegenüber den Standardharzen die Freisetzung von Blausäure bei der Verbrennung.

Die Grenzwerte für die Emission von Formaldehyd aus Holzwerkstoffen wurden in den letzten Jahrzehnten stetig herabgesetzt [Oberdorfer, 2008]. Zwar wurden von Seite der Hersteller durch verbesserte Verfahren die Emissionswerte gesenkt, aber dennoch besteht weiterhin großer Bedarf nach alternativen Bindemitteln, die kein Formaldehyd abgeben.

#### Formaldehyd – Problematik am Beispiel von Harnstoff-Formaldehyd-Harzen

Harnstoff-Formaldehyd (UF) ist ein Polymer welches in einer Kondensationsreaktion unter Abspaltung von Wasser entsteht. Da das Gleichgewicht dieser Reaktion aber nicht vollständig auf der Produktseite liegt, ist die Umkehrreaktion bei Vorhandensein von Feuchtigkeit (Kontakt mit Nässe oder Luftfeuchtigkeit) möglich. Aus diesem Grund entsteht praktisch während der gesamten Nutzungsdauer von UF – gebundenen Spanplatten freies Formaldehyd, welches in die Raumluft abgegeben wird. Der E1-Grenzwert des Deutschen Bundesinstitutes für Bautechnik gibt eine maximale Raumluftkonzentration von 0,1 ppm Formaldehyd als zulässig an [DIBt-RL-100, 1994]. Dieser Wert wird mittels Prüfverfahren (1 m<sup>2</sup> Platte pro 1 m<sup>3</sup> Raumluft) mit einem vorgeschriebenen Luftaustausch als Ausgleichskonzentration ermittelt. Trotz der niedrigen vorgeschriebenen Emissionsgrenzwerte kann es durchaus zu hohen Raumbelastungen führen, wenn Holzwerkstoffoberfläche und Raumgröße in einem ungünstigen Verhältnis zueinander stehen (z.B. Fußboden aus verleimtem Holz, Wandverkleidungen und zusätzliche Möbel). Um die Emissionswerte und die Beständigkeit in feuchter Umgebung bzw. im Außenbereich zu senken, wird teilweise der Harnstoff durch Phenol oder Melamin substituiert, was zu verbesserter Hydrolysebeständigkeit, aber auch zu einer Kostensteigerung führt. Ein häufig angeführtes Gegenargument bei der Diskussion um die Reduktion von Formaldehydemissionen ist, dass natürliches Holz ebenfalls Formaldehyd emittiert [Meyer und Boehme, 1995]. Insbesondere bei der industriellen Trocknung des Holzes entsteht Formaldehyd [Tjeerdsma et al., 1998], welches jedoch mit der Zeit ausgast. Generell sind die emittierten Formaldehyd-Mengen von Holz jedoch sehr gering (Buche: 0,002 ppm) und stellen damit keinen wesentlichen Beitrag zur Formaldehydbelastung in Innenräumen dar [Münzenberg und Thumulla, 2002].

### 1.1.4 Proteine als Werkstoff

Proteine sind Makromoleküle, die aus bis zu 20 verschiedenen (sog. proteinogenen) Aminosäuren aufgebaut sind und kommen in allen lebenden Organismen vor. Proteine übernehmen viele verschiedene lebenswichtige Funktionen im Organismus. Neben dem Stoffumsatz und dem Aufbau von festen Strukturen können sie als Transporter, Katalysatoren (Enzyme) oder Speicher fungieren.

Bei der Beschreibung des Aufbaus von Proteinen wird zwischen verschiedenen Strukturen unterschieden. Die Primärstruktur beschreibt die Abfolge der Aminosäuren im Molekül, d.h. die Aminosäuresequenz. Sekundärstrukturen sind räumliche Strukturen innerhalb des Moleküls, die durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, so z.B.  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblätter. Die Tertiärstruktur ist der räumliche Aufbau des gesamten Moleküls und wird unter physiologischen Bedingungen durch die Primär- und Sekundärstruktur bestimmt. Abhängig von den genannten Strukturen kann dabei hauptsächlich zwischen globulären und fibrillären Proteinen unterschieden werden. Durch Erhitzen, die Zugabe von Chemikalien, unter hohen Drücken oder anderen nichtphysiologischen Bedingungen kann die Tertiärstruktur zerstört werden, so dass das Proteinmolekül in denaturierter Form vorliegt.

#### Proteine als Werkstoffe

Proteine wurden vermutlich bereits seit Jahrtausenden als Bindemittel verwendet. Neben den Glutinleimen werden auch Caseinleime (Hauptproteinbestandteil der Milch) z.B. im Möbelbau verwendet. Auch heute noch wird Glutinleim (hergestellt aus Kollagen durch Auskochen von Knochen und Haut) bei der Herstellung von Musikinstrumenten verwendet, da solche (durch Befeuchten) wieder lösbaren Klebeverbindungen zu Reparaturzwecken von Vorteil sind. Als Bindemittel für Pigmentfarben findet Casein heute noch Anwendung für Wandfarben, sowie früher in Malereifarben [Kuckova et al., 2007]. Neben diesen beiden Proteinen sollen bei der Herstellung von Mörtel auch Blut (Serumalbumin) oder Hühnereier (Ovalbumin) verwendet worden sein [Scheidegger, 1994].

Bei der Verarbeitung von pflanzlichen und tierischen Produkten werden oftmals Proteine als Stoffnebenstrom ausgeschleust. Teilweise werden Proteine aufwändig extrahiert, da sie einer großen Wertschöpfung dienen (z.B. Gelatine für photographische Schichten [Keenan, 2003]) oder sie fallen als Nebenprodukt bei der eigentlichen Produktgewinnung an. Bei der Herstellung von Stärke oder Pflanzenölen (hauptsächlich aus Weizen, Mais, Raps, Sonnenblume, Soja) fallen z.B. erhebliche Mengen von Proteinen mit bisher geringem Wertschöpfungspotential an. Die weltweite Produktion von Weizengluten beträgt beispielsweise ca. 400.000 t/a [de Graaf und Kolster, 1998].

Neben Gelatine findet auch Casein technische Verwendung in der Industrie, so z.B. als wasserlöslicher Etikettenklebstoff [Pude und Wenig, 2005]. Die Weltjahresproduktion von reinem Casein liegt bei etwa 250.000 t, dies entspricht etwa 2 % des in der weltweit produzierten Milch enthaltenen Caseins [Fox, 2001]. Bereits seit 1897 wurde Casein als Werkstoff verwendet, indem gefälltes Casein zu einer festen Masse verarbeitet wurde und anschließend in einer Formaldehydlösung aushärtete [Krische und Spitteler, 1897]. Der unter dem Namen Galalith gehandelte Kunststoff fand weite Verbreitung, obwohl seine Herstellung zeitintensiv war [Krätz, 2004], so wurden in 1913 etwa 1.500 t Galalith in Deutschland hergestellt, in 1920 bereits 5.000-15.000 t [Schrieke und Winter, 2011]. Mit der Entwicklung synthetischer Kunststoffe gegen Mitte des 20. Jahrhunderts (z.B. Polystyrol, PVC u.a.) wurde dieser Kunststoff weitgehend verdrängt.

In den letzten beiden Jahrzehnten wurde die Forschung im Bereich nachwachsender Rohstoffe (NaWaRo) in vielen Industriezweigen intensiviert, um Alternativen für bestehende Materialien zu schaffen. So wurden verstärkt Naturfasern und Füllstoffe auf Basis von NaWaRo in konventionelle Polymere, z.B. für Teile im Fahrzeugbau, eingearbeitet und werden zunehmend in industriellen Maßstäben eingesetzt [Carus et al., 2008].

Proteine unterschiedlicher Herkunft wurden aufgrund ihrer guten „Klebeeigenschaften“ in neuerer Zeit mehrfach auf ihre Eignung als Bindemittel für Holzwerkstoffe untersucht [Kalapathy et al., 1995; Khosravi et al., 2010; Krug und Tobisch, 2010]. Die Verwendung von Proteinen als Bindemittel für Gießereisand wurde ebenso vorgeschlagen [Grabowska, 2008; Wool und Sun, 2005] bzw. die Eignung von Gelatine als Bindemittel für Gießereisand wurde bereits nachgewiesen [Mus et al., 2001].

### 1.1.5 Transglutaminase als enzymatischer Quervernetzer

Transglutaminasen (Protein-Glutamin  $\gamma$ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13) sind Enzyme aus der Klasse der Transferasen und katalysieren den Acyl-Transfer von proteingebundenen Glutaminresten auf die Aminogruppen von primären Aminen. Ist das primäre Amin ebenfalls proteingebunden, entsteht eine Iso-Peptidbindung [Zhu et al., 1995], welche intra- oder intermolekular vorliegen kann (Abbildung 1-3). Des Weiteren können auch primäre Amine oder Peptide, die Lysin enthalten, an Glutamin gebunden werden [Ohtsuka et al., 2000].

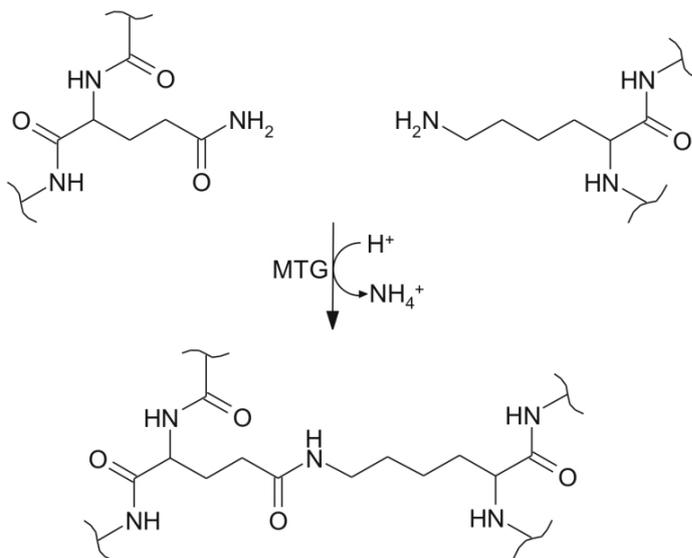


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der durch mikrobielle Transglutaminase katalysierten Vernetzungsreaktion von proteingebundenem Glutamin und Lysin. Die beiden proteingebundenen Aminosäuren bilden unter Abspaltung von Ammoniak eine Isopeptidbindung.

Grundsätzlich können calciumabhängige und calciumunabhängige Transglutaminasen unterschieden werden. In Eukaryoten gefundene Transglutaminasen sind meist calciumabhängig [Ikura et al., 1988]. In höheren Organismen findet man verschiedene Typen von Transglutaminasen, die keinen gemeinsamen Ursprung mit den bakteriellen TGs haben. Der menschliche Organismus verfügt über mehrere Transglutaminasen, beispielsweise kommen TGs als Blutgerinnungsfaktor in der Blutgerinnungskaskade sowie beim Aufbau von Gewebe vor [Greenberg et al., 1991; Takahashi et al., 1986].

Ebenso sind bakterielle Transglutaminasen bekannt, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Womöglich spielen sie eine Rolle bei der Sporenbildung, um widerstandsfähige Zellwände aufzubauen [Kobayashi et al., 1996].

Eine mikrobielle Transglutaminase wurde 1989 in Kulturüberständen von *Streptomyces mobaraensis* gefunden [Ando et al., 1989] und wird kommerziell in der Lebensmittelindustrie zur Strukturänderung von proteinhaltigen Nahrungsmitteln eingesetzt [Motoki und Nio, 1983].

Die Restrukturierung von Fleisch, die Verbesserung von Teigeigenschaften sowie die Viskositätserhöhung von Joghurt sind damit möglich [Dube et al., 2006; Singh, 1991].

Diese Transglutaminase bakteriellen Ursprungs besitzt ein Molekulargewicht von 38 kDa, besteht aus nur einer Polypeptidkette und weist zudem eine relativ geringe Substratspezifität auf [Zhu et al., 1995].

Die Vernetzbarkeit von Proteinen hängt allerdings nicht allein von der Menge der vorhandenen Aminosäuren Glutamin und Lysin ab, sondern auch die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins, sowie die Glutamin-umgebenden Aminosäuren spielen eine Rolle bei der Vernetzbarkeit durch MTG [Coussons et al., 1992].

Der Aufbau makromolekularer Stoffe wie Protein, DNA oder Polysaccharide ist essentiell für jede Art von Leben und geschieht in der Natur ausschließlich über enzymatische Reaktionen [Kobayashi und Uyama, 2001]. Mithilfe der Transglutaminase können Makromoleküle (Proteine) mit niedermolekularen Stoffen (z.B. primäre Amine) oder Makromolekülen (gleichartige oder andere Proteinmoleküle) kovalente Bindungen eingehen. Dabei entstehen in Abhängigkeit von den Edukten modifizierte Proteine oder molekulare Netzwerke. Die enzymatische Vernetzung von Proteinen mittels Transglutaminase stellt eine neue Möglichkeit für die Entwicklung biologisch abbaubarer Werkstoffe dar. Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Quervernetzung besteht in den relativ milden Reaktionsbedingungen. So erreicht die mikrobielle Transglutaminase ihre höchste Aktivität bereits bei 50 °C [Patzsch, 2010] und ist in einem pH-Bereich von 5-8 aktiv [Yokoyama et al., 2004].

## 1.2 Zielsetzung

Aufgrund der steigenden Nachfrage nach ökologisch verträglichen und gesundheitlich unbedenklichen Werkstoffen wird in vielen Bereichen des Alltages nach Alternativen zu vorhandenen Werkstoffen gesucht. Die heute meist petrochemisch basierten konventionellen Klebstoffe und Bindemittel entsprechen in Bezug auf Gesundheitsgefährdung und Umweltschutz meist nicht vollständig diesen Anforderungen. Durch gesetzliche Regelungen bereits beschränkte Emissionswerte von Werkstoffen wie z.B. Formaldehydemissionen von Spanplatten versucht man den Menschen dem Stand der Technik entsprechend zu schützen. Dass in Zukunft die Grenzwerte für die Emission von gefährlichen Substanzen verringert werden bzw. Stoffe bezüglich ihrer Gefährdung für den Menschen neu bewertet werden, ist absehbar. So wurde Formaldehyd vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) im Jahr 2006 als krebserregend eingestuft [Schulte et al., 2006].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Eignung von Protein als Bindemittel in zwei voneinander unabhängigen Stoffsystemen. Zunächst sollte die Verwendbarkeit als Bindemittel für Sand (Formstoffe für die Gießerei) untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Eignung als Bindemittel für Holz (Herstellung von Holzwerkstoffen) untersucht werden.

Im Vordergrund der Untersuchungen stand dabei die mechanische Charakterisierung der Werkstoffe. Insbesondere der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins durch ein Enzym (mikrobielle Transglutaminase) auf die Festigkeiten sollte dabei untersucht werden.

Das Protein Caseinat sollte als Modellprotein verwendet werden, da es aus anderen Anwendungen für seine guten Klebeeigenschaften bekannt ist, außerdem wurde die gute enzymatische Vernetzbarkeit von Casein durch MTG in der Literatur bereits mehrfach bestätigt. Ein weiterer Teil der Arbeit sollte die Untersuchung anderer Proteine auf ihre Eignung als Bindemittel einschließen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Lieferant	Art.- Nr./ Lot-Nr.	Reinheit	M <sub>w</sub> [g/mol]
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6752.5	99,7 p.a.	60,10
Aceton	Conti GmbH (Leipzig)	-	techn.	58,08
Ammoniumperoxo- disulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ )	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	98	228,20
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A512.1		691,90
Calciumchlorid- Hexahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T886.2	98 p.a.	219,08
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
Dipeptid Glutaminylglycin (Z-Gln- Gly)	Bachem Distribution Service GmbH (Weil am Rhein)	C-1635		337,33
Eisen(III)-chlorid ( $\text{FeCl}_3$ )	Merck KGaA (Darmstadt)	803945		162,21
Eisen(III)-oxid (Eisen- oxidrot)				159,7
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3738.5	100	60,05
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5054.6	95	46,07
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
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	T873.2	98,5	75,07
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6781.1	99,5 p.a.	74,56
Maltodextrin (aus Maisstärke)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)	31410		
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K305.1	99	65,01

Bezeichnung	Lieferant	Art.- Nr./ Lot-Nr.	Reinheit	M <sub>w</sub> [g/mol]
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3957.2	99,5 p.a.	58,44
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6771.1	99 p.a.	39,997
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6366.2	85	98,00
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
Silica Gel Orange	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P077.1		
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

Für die Einstellung von Atmosphären mit definierter Luftfeuchte wurden die in Tabelle 2-2 aufgeführten Substanzen verwendet. Die relative Luftfeuchte in den Exsikkatoren wurde mittels Thermohygrometer gemessen und lag im Bereich ( $\pm 3\%$ ) der angegebenen Literaturwerte.

Tabelle 2-2: Substanzen für die Einstellung der relativen Luftfeuchte in Exsikkatoren. Die Salze wurden als übersättigte Lösungen (mit Wasser als Lösungsmittel) verwendet

relative Feuchte bei 20 °C [% r.F.]	relative Feuchte bei 25 °C [% r.F.]	Salz / Substanz	Formel
0-2*	0-2*	Silica-Gel	SiO <sub>2</sub> (amorph)
32,5 <sup>1</sup>	29,5 <sup>1</sup>	Calciumchlorid	Ca(Cl) <sub>2</sub>
55,5 <sup>1</sup>	50,5 <sup>1</sup>	Calciumnitrat	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
76 <sup>1</sup>	75,5 <sup>1</sup>	Natriumchlorid	NaCl
85 <sup>1</sup>	85 <sup>1</sup>	Kaliumchlorid	KCl
100	100	destilliertes Wasser	H <sub>2</sub> O

\*= gemessen: 2 %, untere Grenze des Messbereichs

<sup>1</sup> [Winston und Bates, 1960]

### 2.1.2 Puffer

Für die Herstellung der verwendeten Puffer (Tabelle 2-4) wurde die jeweilige Menge Tris in 80 % der benötigten Wassermenge (demineralisiertes Wasser) aufgelöst, der pH-Wert mit HCl eingestellt und anschließend das Volumen auf 100 % aufgefüllt.

Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Molarität [mM]	pH-Wert	Einwaage Tris [g/L]	Bemerkungen
Tris/HCl 20 mM pH 7	20	7,0	2,422	-
Tris/HCl 50 mM pH 8 300 mM NaCl	50	8,0	6,057	-

### 2.1.3 Proteine

Sämtliche verwendeten Proteine sind in Tabelle 2-4 dargestellt.

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten Proteine

Bezeichnung	Lieferant	Art.- Nr. / Charge	Reinheit	Bemerkungen
Caseinat	BMI eG Landshut	322103/ 01708126	97 % (i.Tr.)	sprühgetrocknet, staubförmig
Erbsenprotein	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)	E7 LNH231		sprühgetrocknet, staubförmig
Erbsenprotein lösliche Fraktion	extrahiert aus E7 LNH231			siehe Abschnitt 2.2.2
Gelatine (niedrige Gelierkraft)	Gelita AG (Eberbach)	319 272		Granulat
Kartoffelprotein	Emsland-Stärke GmbH (Emlichheim)	013633	60 %	sprühgetrocknet, staubförmig
Sojaprotein	DuPont, (Missouri, USA)	E115702-6/ L160008756	>97,5 %	sprühgetrocknet, staubförmig
Solpro 508	Nouriche Nutrition Ltd. (Lake St. Louis, USA)		80,4 %	sprühgetrocknet, staubförmig
Weizenprotein	Food Retail and Pro- duction CS GmbH (El- steraue)			sprühgetrocknet, staubförmig
Pepton	Sigma Aldrich, Stein- heim	82303-1KG-F/ 1337664		sprühgetrocknet, staubförmig

## 2.1.4 Transglutaminasen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Transglutaminasen sind in Tabelle 2-5 dargestellt.

Tabelle 2-5: Übersicht der verwendeten Transglutaminasen

Bezeichnung	Beschreibung
Activa-MTG Produktname: Activa® WM*	Kommerziell erhältliche MTG – Präparation (1,0 % Enzym in Dextrin) von Ajinomoto Foods Deutschland GmbH (Hamburg) Expressionsstamm: <i>Streptomyces moabarensis</i>
rMTG	(Wildtyp -) rMTG, rekombinante MTG [Marx et al., 2007] Expressionsstamm: <i>E. coli</i> (BL21 Gold DE3)
MTG-S2P	Genetisch optimierte rMTG mit Aminosäureaustausch an 2. Position (Serin gegen Prolin ausgetauscht), beschrieben in [Marx et al., 2008] Expressionsstamm: <i>E. coli</i> (BL21 Gold DE3) hohe spezifische Aktivität [Sommer et al., 2011]

\*= Für die kommerzielle MTG – Präparation Activa® WM wurde nachfolgend die Bezeichnung „Activa-MTG“ verwendet. Wurden andere Transglutaminasen verwendet, wurden diese entsprechend voranstehender Tabelle als „rMTG“ oder „MTG-S2P“ bezeichnet.

## 2.1.5 Grundwerkstoffe

Bei dem verwendeten Sand (H 32, Quarzwerke Frechen, Dtl.) handelte es sich um einen in der Gießerei üblichen Quarzsand (99 % SiO<sub>2</sub>) mit einer mittleren Korngröße von 0,32 mm (kantengerundet). Der pH – Wert in Wasser wurde laut Sicherheitsdatenblatt mit pH 7 bei 400 g/L angegeben. Da der Formgrundstoff einen wesentlichen Einfluss auf die erzielbaren mechanischen Kennwerte hat, sind wesentliche Kenndaten im Anhang aufgeführt (Tabelle 8-1, siehe Anhang).

Bei den für die Spanplattenherstellung verwendeten Spänen handelte es sich um Fichtenholzspäne der Klassierung B und C ohne Recyclinganteil. Die verwendeten Fichtenspäne wiesen eine Ausgangsfeuchte von 2 % auf, die Siebanalyse ist ebenfalls im Anhang aufgeführt (Abbildung 8-7, siehe Anhang).

## 2.1.6 Geräte

Sämtliche verwendete Geräte sind in der Tabelle 2-6 zusammengestellt.

Tabelle 2-6: Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Analysenwaage max. 100 g	APX-100	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Analysensiebe		Retsch, Haan, Deutschland
Elektronenmikroskop	ESEM XL30 FEG	FEI, Oregon, USA
Elektrophorese-Apparatur	Hoefer SE 250	Hoefer, Inc. (Holliston, MA/USA)
Exsikkator	Bola-Maxi	Gebr. Rettberg GmbH, Göttingen, Deutschland
Getreidemühle	Fidibus 21	KoMo GmbH, Otzberg, Deutschland
Hydraulikpressen	HLOP 350 KT-Pressen	Höfer, Taiskirchen, Österreich -
Lyophilisator	Lyovac GT 2-E	Steris GmbH, Hürth, Deutschland
Magnetrührer		Heidolph, Kelheim, Deutschland
Mischaggregat	Pflugscharmischer	Draiswerke GmbH, Mannheim, Dtl.
Mischer (Sand)	AKM 3110	AEG – Electrolux, Nürnberg, Deutschland
Muffelofen	Hobbytherm	Nabertherm, Deutschland
pH - Meter	Inolab pH-730	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipetten		Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Probenformen, zylindrisch, teilbar, Durchmesser: 50 mm	21-SST	Ridsdale & Company Ltd., Middlesbrough, England
Prüfmaschine	Proline Z020	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland.
Rammgerät	15-LSR ,Type N'	Ridsdale & Company Ltd., Middlesbrough, England
Thermohygrometer	Testo 608-H2	Testo AG, Lenzkirch, Deutschland
Trockenschrank	UFE 500	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waage max. 3200 g	CP 3202P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage max. 5000 g	MXX - 5001	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge, 17000 g	Cepa 41	Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH, Lahr, Deutschland

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Herstellung von Prüfkörpern für Sandbindemittel

Für die mechanische Prüfung des Formstoffes wurden zwei verschiedene Prüfkörpertypen benutzt. Zylindrische Prüfkörper für den Druckversuch wurden in Anlehnung an die DIN 52401 mit einem Durchmesser von 50 mm und einer Höhe von 50 mm (Abschnitt 2.2.1.3). hergestellt. Stäbe für den Biegeversuch mit quadratischem Querschnitt, sogenannte Biegeriegel (Länge: 172 mm, Breite: 22,4 mm, Höhe: 22,4 mm) (Abschnitt 2.2.1.2), wurden in Anlehnung an die Norm P 72 (1999) des VDG (Verein Deutscher Giessereifachleute) hergestellt.

#### 2.2.1.1 Herstellung des Formstoffgemisches

##### Mischvarianten

Für sämtliche Formstoffansätze wurde Sand, Protein und ein Lösungsmittel (Pufferlösung) verwendet. Bei der Herstellung des Formstoffgemisches waren verschiedene Reihenfolgen der Zugabe der Einzelkomponenten möglich. Wurden Zusätze (z.B. Enzym, Maltodextrin oder Salze) zum Formstoff gegeben, waren diese in der Pufferlösung zuvor gelöst worden. In Abbildung 2-1 sind die verschiedenen Mischvarianten dargestellt.

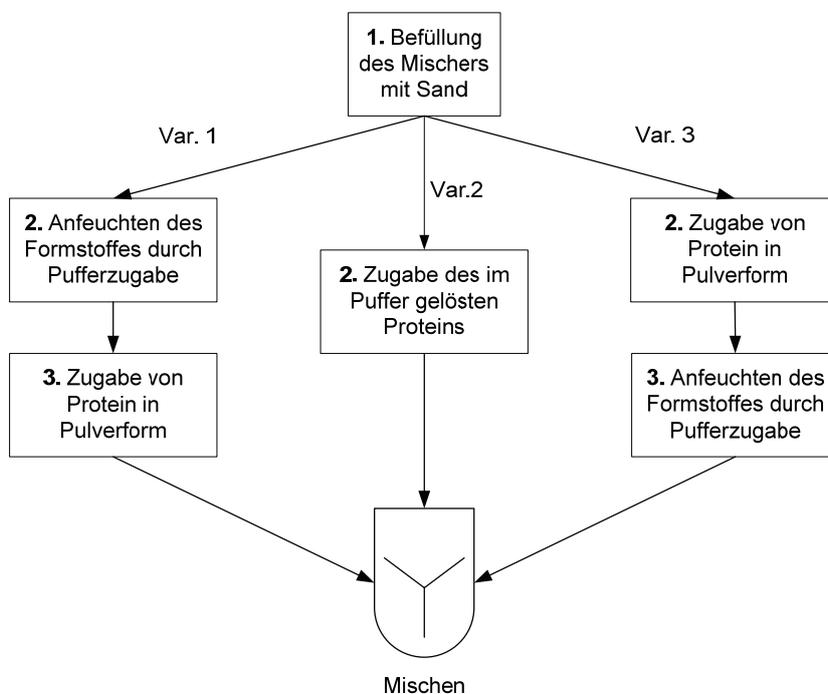


Abbildung 2-1: Mischvarianten für Formstoff für die Prüfkörperherstellung. Protein (in Pulverform), Pufferlösung (mit oder ohne Enzym) und Sand wurden in unterschiedlicher Reihenfolge gemischt. Als Mischer wurde ein Teigmischer (AKM 3110, AEG – Electrolux) verwendet. Die Mischzeit betrug 2 min bei halber Leistungsstufe.

Die folgende Beschreibung galt als Standardmethode für alle hergestellten Sandprüfkörper, sofern Abweichungen von dieser Vorschrift vorlagen, wurde dies gesondert ausgewiesen.

Als Mischer wurde ein Trommelmischer mit vertikaler Rotationsachse und feststehenden Mischelementen verwendet. Dem im Mischer befindlichen (auf 4 °C vorgekühlten) trockenen Sand wurde während des Mischbetriebs das in sprühgetrockneter / feingemahlener Form vorliegende Proteinpulver (Proteinmenge jeweils gesondert angeführt) zugesetzt und etwa eine Minute intensiv gemischt. Anschließend wurde der ebenfalls auf 4 °C vorgekühlte Puffer (siehe Abschnitt 2.1.2) zugegeben und für weitere 2 Minuten intensiv gemischt.

Der Puffer (5 % b.o.s. Tris/HCl pH 7, 20 mM, wenn nicht anders angegeben) wurde ohne weitere Zusätze verwendet. Bei Verwendung von Zusatzstoffen wie Maltodextrin oder MTG wurden diese zuvor im Puffer vollständig gelöst. Bei Verwendung inaktivierter MTG-Lösungen wurde das Enzym (bzw. die Enzympräparation) im Puffer gelöst und dieser zweimal in einer Mikrowelle (im Abstand von einer Minute) zum Kochen gebracht. Verdampfungsverluste wurden nach Abkühlung des Puffers auf RT durch die Zugabe der entsprechenden Menge dH<sub>2</sub>O kompensiert. Denaturiertes (ausgefallenes) Enzym wurde, wenn nicht anders angegeben, mittels Löffel von der Flüssigkeitsoberfläche entfernt.

Um die vollständige Rehydrierung des Proteins sicherzustellen, wurde der Formstoff nach der Pufferzugabe für fünf Minuten ruhen gelassen. Unmittelbar im Anschluss daran wurde der Formstoff für die Prüfkörperherstellung verwendet. Da die Aktivität der MTG stark temperaturabhängig ist, sollte die Kühlung der Komponenten bei Verwendung von Pufferlösungen mit aktiver Transglutaminase die vorzeitige Vernetzung des Proteins während des Mischvorgangs minimieren. Für sämtliche Formstoffgemische (ohne MTG / inaktivierte MTG / Maltodextrin) wurde gleich verfahren, um mögliche Einflüsse der Temperatur des Formstoffes auf die Probenherstellung auszuschließen.

Herstellung von Formstoffgemisch mit Sojaprotein:

Entgegen der Standardmethode musste bei Sojaprotein eine geringe Menge Natriumhydroxid zugegeben werden, um den pH-Wert zusätzlich einzustellen und das Protein löslich zu machen. Es wurden 3,6 % m/m bezogen auf Sojaprotein trocken/NaOH trocken verwendet. Dazu wurde zu in einem Teil des verwendeten Puffers (ca. 2/3 des Volumens) die entsprechende Menge 5 M Natriumhydroxidlösung gegeben. In dem verbleibenden Pufferanteil wurde die Transglutaminase gelöst. Während der Formstoffzubereitung wurde nach der Proteinzugabe zuerst der Puffer mit NaOH zugegeben. Nach gründlichem Vermischen wurde die verbleibende Puffermenge mit der aktiven bzw. inaktivierten Transglutaminase zugegeben. Der pH – Wert des Formstoffes betrug  $6,9 \pm 0,3$  (mit Indikatorpapier bestimmt).

### 2.2.1.2 Prüfkörperherstellung für den Biegeversuch

Das Formstoffgemisch wurde nach dem Mischvorgang aufgelockert und möglichst gleichmäßig verteilt in die dafür vorgesehenen, zusammengesetzten Formen gegeben. Diese Form bestand aus einer oberen Formhälfte, die zur Befüllung und Führung des Stempels diente, und einer unteren teilbaren Formhälfte. Die Verdichtung des Formstoffes wurde mit einer Ramme und einem dafür vorgesehenen, an der Ramme befestigten Stempel durchgeführt. Nach drei Rammschlägen im Abstand von je etwa einer Sekunde wurde ein als Messer fungierendes Blech zwischen obere und untere Formhälfte (Abbildung 2-2, A und B) geschoben. Der in der Form befindliche Formstoff wurde geteilt und somit die Höhe des Prüfkörpers festgelegt. Der Prüfkörper wurde in der unteren (ebenfalls teilbaren) Formhälfte (Abbildung 2-2, B) belassen und unmittelbar danach mit einem Aluminiumblech abgedeckt, so dass der Formstoff nicht austrocknen konnte. Die verschlossene Form wurde in den auf 50 °C vorgeheizten Wärmeschrank verbracht und für eine Stunde inkubiert. Anschließend daran wurde die Temperatur des Trockenschanks auf 95 °C erhöht und die obere Abdeckung entfernt, so dass das Wasser über die obere Planseite verdampfen konnte. Der Prüfkörper (Abbildung 2-3) wurde in der Form für 3,5 h getrocknet. Die notwendige Trocknungszeit der Prüfkörper wurde in Vorversuchen bestimmt, bei denen die Proben bis zu Gesichtskonstanz getrocknet wurden. Dies war nach 2,5 h der Fall.

Nach der Abkühlung auf RT wurden die Prüfkörper durch Teilung der unteren Formhälfte entformt und im Exsikkator bei RT und 50 % r.F. bis zur mechanischen Prüfung gelagert.



Abbildung 2-2: Mehrfach teilbare Prüfkörperform für die Herstellung von Biegeiegeln aus Aluminium (obere Formhälfte (A) und untere, ebenfalls teilbare Formhälfte (B)).



Abbildung 2-3: Prüfkörper für den Biegeversuch. Zusammensetzung: Quarzsand mit Caseinat (1,0 % b.o.s.) als Bindemittel

### 2.2.1.3 Prüfkörperherstellung für den Druckversuch

Im Druckversuch wurden feuchte und getrocknete Prüfkörper getestet. Folgende Schritte der Herstellung von Formkörpern waren bei beiden Varianten gleich:

Von dem Formstoffgemisch wurden 163 g (falls nicht anders angegeben) in die auf der Waage platzierten teilbaren Zylinderformen gegeben (Abbildung 2-4). Die Zylinderformen

waren auf der Unterseite durch einen abnehmbaren Unterboden verschlossen. Anschließend erfolgte das Verdichten des Formstoffes durch drei Rammschläge des um 50 mm ausgelenkten Gewichtes (6.666 g) in Abständen von je einer Sekunde. Die an der Ramme angebrachte Markierung zeigte nach dem Verdichten die Höhe der Probe mit zulässigen Toleranzen an. Die Masse des einzufüllenden Formstoffes musste somit jeweils in Vorversuchen ermittelt werden. Prüfkörper, deren Höhe nicht im zulässigen Toleranzbereich ( $50 \pm 0,3$  mm) lag, wurden verworfen. Nach dem Verdichten wurden die Zylinderformen mit Aluminiumfolie auf der Oberseite verschlossen, um das Verdunsten des Wassers zu verhindern. Es erfolgte die Inkubation im vorgeheizten Wärmeschrank bei  $50\text{ °C}$  für eine Stunde.

**Variante I:** feuchte Prüfkörper

Die mechanische Prüfung (Abschnitt 2.3.1.1) erfolgte direkt nach Entnahme der Prüfkörper aus dem Wärmeschrank.

**Variante II:** trockene Prüfkörper

Die untere und obere Abdeckung der Form wurden nach der Inkubation entfernt. Auf der Mantelfläche liegend wurden die Formen für 3,5 Stunden bei  $95\text{ °C}$  im Wärmeschrank erhitzt, was ein vollständiges Verdampfen des Wassers aus den beiden Planseiten des Prüfkörpers ermöglichte. Die getrockneten Prüfkörper wurden aus der Form entnommen und kühlten auf Raumtemperatur ab. Anschließend wurden die Prüfkörper bei Raumtemperatur und 50 % r.F. bis zur mechanischen Prüfung im Exsikkator gelagert.



Abbildung 2-4: Teilbare zylindrische Form für die (Druck-) Prüfkörperherstellung aus Messing; rechts unten: Prüfkörper aus proteingebundenem Sand für den Druckversuch (Höhe: 50 mm, Durchmesser 50 mm)

**Trocknung von Prüfkörpern durch Lyophilisation**

Die Herstellung der Prüfkörper in den Formen wurde analog wie zuvor beschrieben durchgeführt. Nach einer Stunde Inkubation bei  $50\text{ °C}$  wurden die Prüfkörper jedoch nicht bei  $95\text{ °C}$  weitergetrocknet, sondern schrittweise auf  $+4\text{ °C}$  (1 h) bzw. anschließend auf  $-80\text{ °C}$  (2 h) gekühlt. Bevor die Prüfkörper gefriergetrocknet wurden, wurde deren Temperatur zusätzlich

durch flüssigen Stickstoff herabgesetzt. Nach 43 h Gefriertrocknung (bis zur Gewichtskonstanz) wurden die Proben vor der Bestimmung der Druckfestigkeit für weitere 72 h bei 50 % r.F. und RT gelagert.

### 2.2.2 Extraktion von löslichem Erbsenprotein

Die Gewinnung einer löslichen Erbsenproteinfraktion aus kommerziellen Erbsenprotein (E 7, siehe Abschnitt 2.1.3) erfolgte durch Suspendieren von 7 kg Erbsenprotein in 93 L Wasser (Leitungswasser) ohne Einstellung des pH-Wertes. Diese Proteinsuspension wurde für 30 min gerührt und anschließend in ein 120 L - Fass gefüllt. Nach 16 h Lagerung bei RT war ein Großteil der unlöslichen Bestandteile sedimentiert. Die über dem Sediment stehende Proteinlösung (ca. 54 L) wurde mittels Rohrzentrifuge (Cepa 41) von noch vorhandenen Schwebstoffen befreit. Die so erhaltene Proteinlösung (raumtemperiert) wurde anschließend mit dem gleichem Volumen Aceton (auf 4 °C vorgekühlt) versetzt, wobei das gelöste Erbsenprotein ausfiel. Diese Suspension wurde erneut zentrifugiert, um das Proteinpräzipitat abzutrennen. Das Proteinpräzipitat wurde anschließend zweimal mit 95 % igem Aceton gewaschen, um einen Großteil des enthaltenen Wassers zu verdrängen. Nach der anschließenden Trocknung bei 30 °C im Trockenschrank wurde das Protein in einer Getreidemühle (Fidibus 21, KoMo GmbH, Dtl.) fein gemahlen. Das gewonnene Proteinpulver (650 g) wurde von Hand gesiebt (Analysensieb, Retsch GmbH, Dtl., Maschenweite 150 µm) und bei RT trocken gelagert.

### 2.2.3 Herstellung von Spanplatten

Holzspanplatten wurden im Technikumsmaßstab in der Größe 320 x 380 x 11 mm einschichtig hergestellt. Für jeden Versuchsansatz wurde je eine Spanplatte hergestellt, aus der nach entsprechender Lagerung und Konditionierung Prüfkörper für die einzelnen Werkstoffkennwerte entnommen wurden. Die Versuche wurden in Versuchsreihen (A – C) zusammengefasst. Die Prozessablaufpläne sind in den Abbildungen 2-4 - 2-6 dargestellt. Feuchtegehalte der Späne bezogen sich stets auf die Trockenmasse des Holzes (absolute Trockenmasse des Holzes, "atro"). Bei den verwendeten Lösungen wurde der Masseanteil in der Lösung angegeben (z.B. 10 % ige Caseinatlösung entsprach 10 g Caseinat in 100 g Lösung).

Folgende Schritte waren für alle hergestellten Spanplatten gleich: Nach erfolgter Beschichtung der Holzspäne mit Protein (und ggf. Zugabe von Enzym) wurden diese von Hand in Formkästen gestreut und anschließend bei Raumtemperatur zu einem „Spanvlies“ vorgepresst. Der Rahmen wurde nach dem Vorpressen entfernt und das Spanvlies wurde für 10 min bei der jeweils angegebenen Pressplattentemperatur zu Spanplatten gepresst. Der

entstehende Wasserdampf entwich an den Plattenrändern, damit erfolgte während des Pressens die Trocknung der Spanplatte. Unmittelbar nach dem Pressen wurde die Plattendicke mittels Bügelmessschraube bestimmt (Durchschnittswert aus 3 Messungen).

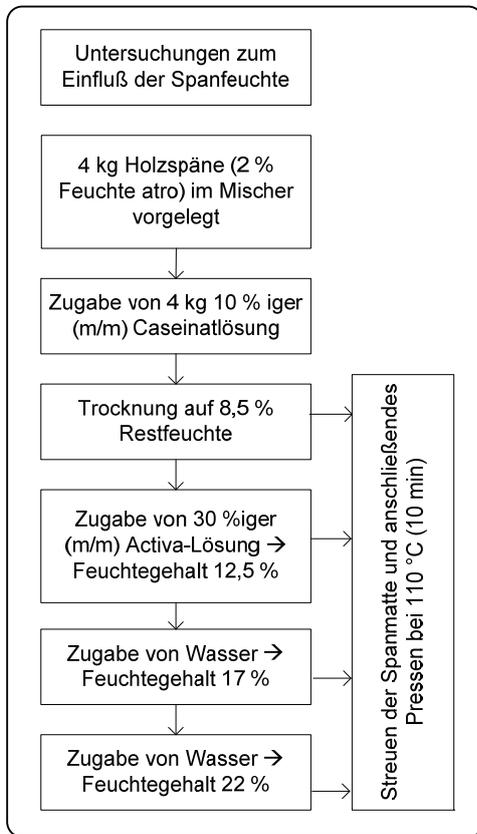


Abbildung 2-5: Ablaufschema für Versuche zur Herstellung von Caseinat-gebundenen Spanplatten zur Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Spanfeuchten auf die mechanischen Eigenschaften

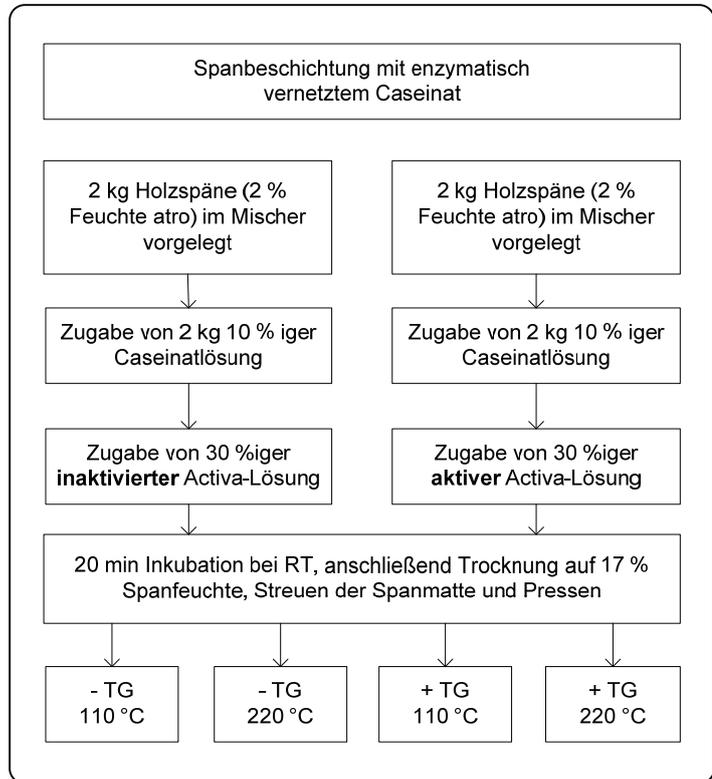


Abbildung 2-6: Ablaufschema für Versuche zur Herstellung von Caseinat-gebundenen Spanplatten zur Untersuchung des Einflusses der enzymatischen Quervernetzung des Proteins auf den Holzspänen vor der Trocknung der Holzspäne.

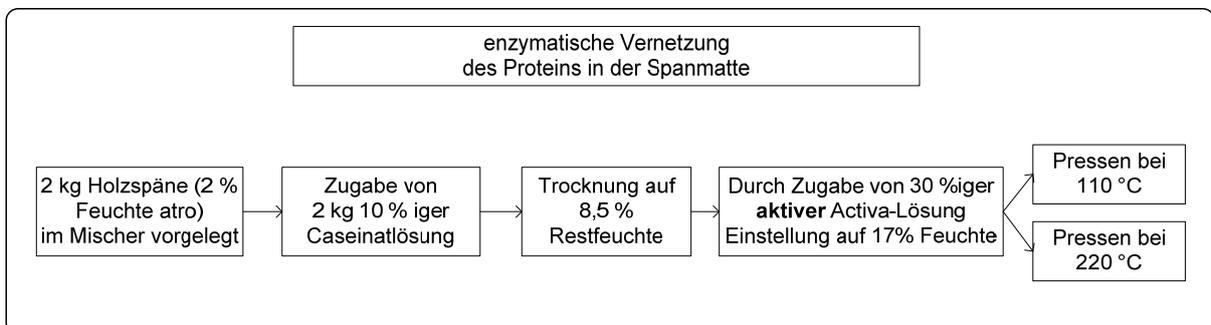


Abbildung 2-7: Ablaufschema für Versuche zur Herstellung Caseinat-gebundener Spanplatten mit enzymatischer Vernetzung des Proteins im Spanvlies vor dem Pressen.

## 2.3 Analytik

### 2.3.1 Prüfung der mechanischen Eigenschaften

#### 2.3.1.1 Druckversuch für proteingebundenen Sand

Der Druckversuch wurde an zylindrischen Proben aus proteingebundenem Sand (wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben hergestellt) durchgeführt. Die Messung der Druckfestigkeit erfolgte an einer Zwick Universalprüfmaschine (Z020 Proline, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm). Die Prüfkörper wurden vor der Prüfung für 48 h bei 50 % r.F. im Exsikkator konditioniert. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Proben in der Prüfmaschine wie folgt geprüft: Die Proben wurden mit der bei der Herstellung unteren Planseite auf die Druckplatte gestellt. Nachdem die Probe mit einer zweiten Druckplatte von oben bei einer Geschwindigkeit von 1 mm/min und einer Vorkraft von 10 N belastet wurde, erfolgte anschließend die Belastung der Probe bis zum Bruch. Die Prüfgeschwindigkeit betrug dabei 50 mm/min. Soweit nicht anders angegeben, wurden je 5 Prüfkörper geprüft und der arithmetische Mittelwert angegeben. Fehlerbalken in den Diagrammen zeigen die aus den 5 Proben ermittelte Standardabweichung. Die Bruchspannung wurde aus der im Versuch ermittelten Bruchkraft in Bezug auf den Querschnitt der Probe berechnet (vgl. Formel (1)). Die Druckfestigkeit wurde in MPa (1MPa = 1 N/mm<sup>2</sup>) bzw. in kPa (bei feuchten Prüfkörpern) angegeben.

$$\sigma_{dB} = \frac{F_{\max}}{A} \quad \text{mit} \quad (1)$$

$\sigma_{dB}$  = Druckfestigkeit [N/mm<sup>2</sup>]

$F_B$  = Bruchkraft [N]

$A$  = Querschnittsfläche der Probe [mm<sup>2</sup>]

#### 2.3.1.2 Biegeversuch für proteingebundenen Sand

Die Messung der Biegefestigkeit erfolgte im 3-Punkt-Biegeversuch an der gleichen Prüfmaschine wie beim Druckversuch (Zwick Z020 Proline). Die Prüfkörper (Abschnitt 2.2.1.2) wurden vor der Prüfung für 48 h bei 50 % r.F. im Exsikkator konditioniert. Die Biegestäbe wurden auf der Seite, bezogen auf die Verdichtungsfläche, auf zwei Punktlager mit einem Radius von 5 mm aufgelegt. Der Abstand der Punktlager betrug 150 mm. Nachdem der Prüfstempel mit einer Geschwindigkeit von 1mm/min mittig eine Last von 10 N auf den Biegeriegel aufgebracht hatte, wurde die Prüfgeschwindigkeit auf 50 mm/min erhöht und bis zum Bruch des Prüfkörpers konstant gehalten. Aus der Bruchkraft wurde die Biegespannung beim Bruch ermittelt (vgl. Formel (2)).

$$\sigma_{bB} = \frac{3 \cdot F_{\max} \cdot l}{2 \cdot b \cdot h^2} \quad (2)$$

$\sigma_{bB}$  = Biegefestigkeit [N/cm<sup>2</sup>]

$F_{\max}$  = Bruchkraft [N]

$b$  = Breite der Probe [mm]

$h$  = Höhe der Probe [mm]

$l$  = Abstand der Auflager

### 2.3.1.3 Glühverlustbestimmung

Der Glühverlust von proteingebundenen Sandprüfkörpern wurde gravimetrisch bestimmt. Für die Massenbestimmung wurden Terrakotta-Schalen benutzt, die zuvor bei 900 °C für 3 h ausgeglüht wurden. Für die Glühverlustbestimmung bei unterschiedlichen Temperaturen (350 °C – 500 °C) wurden je etwa 1500 g Prüfkörperbruch benutzt. Dieser stammte von Prüfkörpern, die mit 1 % b.o.s. Caseinat und 5 % b.o.s. Tris/HCl – Puffer (20 mM, pH 7) ohne enzymatische QV hergestellt wurden. Die Proben wurden mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 10 K/min auf die jeweilige Temperatur erhitzt, nach 3 h erfolgte die unregelmäßige Abkühlung der Proben im Ofen. Nach der Entnahme der Proben wurden sowohl der Sand als auch die Terrakotta-Schalen erneut gewogen und aus der Massendifferenz der Proben der Glühverlust berechnet (1000 g Formstoff enthielten 989,98 g Sand, 9,9 g Caseinat und 0,12 g Tris). Der Glühverlust wurde auf das im Formstoff enthaltene Caseinat und Tris bezogen. Parallel dazu wurde jeweils der Glühverlust von 500 g reinem Sand bestimmt und ebenfalls bei der Berechnung berücksichtigt.

### 2.3.1.4 Querkzugfestigkeit von Spanplatten

Die Querkzugfestigkeit ist einer der wichtigsten Parameter bei der Charakterisierung von Holzwerkstoffen. Die Ermittlung der Querkzugfestigkeit erfolgte für Spanplatten nach EN 319. Nach dem Beschleifen der Spanplatten wurden 50 x 50 mm große Proben aus der Spanplatte gesägt und für 5 Tage bei 65 % r.F. gelagert. Nach der Konditionierung wurden die Proben auf Probenhalter geklebt und senkrecht zur Plattenebene geprüft (n=5). Die notwendige Kraft, die zum Versagen der Probe führt (in der Regel in der Probenmitte) wird auf den Querschnitt bezogen (vgl. Formel 3).

$$\sigma_{zB\perp} = \frac{F_{\max}}{A} \quad (3)$$

mit

$\sigma_{zB\perp}$  = Querkzugfestigkeit [N/mm<sup>2</sup>]

$F_{\max}$  = Bruchkraft [N]

$A$  = Querschnittsfläche der Probe [mm<sup>2</sup>]

### 2.3.1.5 Biegeversuch für Spanplatten

Die Ermittlung der Biegebruchspannung und des Biege – E-Moduls erfolgten nach EN 310. Der 3-Punkt-Biegeversuch wurde an Proben (n=5) mit einer Breite von 50 mm nach entsprechender Konditionierung (bei 23 °C und 65 % r.F.) durchgeführt, der Abstand der Auflager berechnet sich laut Norm aus der Probendicke (d):  $l = 20 \times d$ . Die Gesamtlänge der Probe betrug  $50 \text{ mm} + 20 \times d$ . Die Bruchspannung wurde wiederum nach Formel (2) in Abschnitt 2.3.1.2 berechnet.

### 2.3.1.6 Dickenquellung von Spanplatten

Für die Bestimmung der Dickenquellung von proteingebundenen Spanplatten (nach EN 317) wurden Proben mit 50 mm x 50 mm (Breite x Länge) ausgesägt und bei 20 °C und 65 % r.F. konditioniert. Nach der Dickenmessung wurden die Proben für 2 h in 20 °C kaltem Wasser gelagert und die Dicke nach Entnahme bestimmt. Der arithmetische Mittelwert aus 5 Messungen wurde für die Berechnung der Dickenquellung nach Formel 4 verwendet.

$$q = \frac{a_w - a_0}{a_0} \cdot 100 \quad (4)$$

mit

$a_0$  = Probendicke vor Wasserlagerung

$a_w$  = Probendicke nach Wasserlagerung

$q$  = Quellung [%]

## 2.3.2 Elektronenmikroskopie

Die Untersuchungen von Bruchflächen proteingebundener Sandformkörper wurden mittels Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM) von Herrn Syrowatka am Interdisziplinären Zentrum für Materialwissenschaften (IZM), Halle, durchgeführt.

Der Vorteil von ESEM gegenüber der üblichen Rasterelektronenmikroskopie liegt darin, dass biologische Proben bei nur leichtem Vakuum untersucht werden können und durch die eingestellte Atmosphäre (Stickstoff oder Wasserdampf) eine Veränderung der Proben vermieden oder verringert werden kann. Zudem war das Bedampfen oder Metallisieren der Oberfläche (wie sonst bei nicht leitfähigen Materialien üblich) nicht notwendig. Die Proben wurden wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben hergestellt und für 48 h bei 50 % r.F. gelagert. Anschließend wurde eine quaderförmige Probe mit einer Metallsäge ausgesägt. Diese Probequader (Abbildung 2-8) wurde unmittelbar vor der Elektronenmikroskopie mittig zerbrochen und auf den Probenhalter geklebt, um mögliche Einflüsse durch Transport oder Lagerung auf die Probenoberfläche zu vermeiden.

Die Untersuchung der Proben wurde an einem ESEM (XL30 FEG, FEI, Oregon, USA) bei einem Druck von 80 Pa mit einer Beschleunigungsspannung von 12 kV durchgeführt. Die

Bilder wurden mit einem Rückstreuelektronendetektor aufgenommen, um den Materialkontrast zwischen Sandkörnern und Bindematerial für die Abbildung auszunutzen. Der Materialkontrast entsteht durch die unterschiedliche Element-Zusammensetzung der verschiedenen Stoffe, die eine hellere Darstellung schwerer Elemente bewirkt. Da in Proteinen vornehmlich Atome mit einer kleinen Massenzahl vorkommen (Kohlenstoff (OZ: 6), Stickstoff (OZ:7)) sind diese dunkler dargestellt als der Sand, der größtenteils aus Silizium (OZ: 14) und Sauerstoff (OZ: 8) besteht.

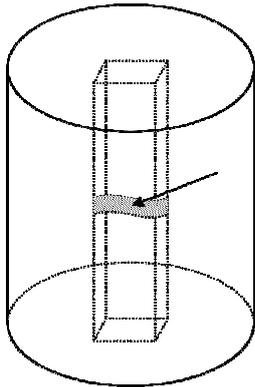


Abbildung 2-8: Darstellung der Bruchfläche (schraffiert) von Sandformkörpern für Untersuchungen mittels ESEM. Die rechteckige Probe wurde durch Zersägen eines zylindrischen Druckprüfkörpers erhalten und unmittelbar vor der Elektronenmikroskopie zerbrochen.

### 2.3.3 Bestimmung der Transglutaminase - Aktivität

Zur Bestimmung der MTG-Aktivität wurde der Hydroxamat-Test eingesetzt [Folk und Cole, 1966]. Z-Gln-Gly dient hierbei als Glutamin-Substrat, das von der MTG mit Hydroxylamin zu Z-γ-Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisenionen bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann (Abbildung 2-9).

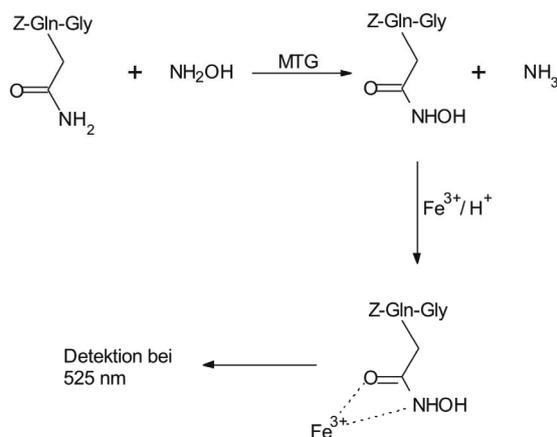


Abbildung 2-9: Schematischer Ablauf der durch Transglutaminase katalysierten chemischen Reaktion im Hydroxamat-Test zur Bestimmung der MTG – Aktivität. Die Konzentration des Farbkomplexes wurde photometrisch bestimmt.

Für den Test wurden die Substrat- und Stopplösung mit den in Tabelle 2-7 und Tabelle 2-8 beschriebenen Konzentrationen hergestellt. Für die Substratlösung wurden 5 g dH<sub>2</sub>O vorgelegt. Nach Tris-Zugabe wurden 400 µL 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 dH<sub>2</sub>O auf 10 g.

**Tabelle 2-7: 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 2-8: 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 <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (in 0,1 M HCl)	270,32	2
3 M HCl	36,46	3

Die MTG-Aktivität ließ sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnen (vgl. Formel 5). Dabei ist eine Unit definiert als Bildung von 1 µmol γ-Glutaminyl-Hydroxamat pro Minute bei 37 °C und einem pH-Wert von 6.

$$\text{MTG-Aktivität} \left[ \frac{U}{\text{mL}} \right] = \frac{E \cdot V_{\text{test}}}{\varepsilon \cdot t_{\text{reakt}} \cdot d \cdot V_{\text{MTG}}} \quad (5)$$

mit	E	Extinktion
	V <sub>test</sub>	Gesamtvolumen [mL]
	V <sub>MTG</sub>	Enzymvolumen [mL]
	ε	Extinktionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /µmol]
	t <sub>reakt</sub>	Reaktionszeit [min]
	d	Schichtdicke der durchstrahlten Flüssigkeit in der Küvette [cm]

600 µL Substratlösung und 50 µL Additive wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und 3 min bei 37 °C vorinkubiert. 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 16100 g zentrifugiert und vom Überstand die Extinktion bei

525 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Der Blindwert enthielt 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Puffers ohne Enzym.

Für die Messung der MTG-Aktivität wurde mit Hilfe von  $\gamma$ -Glutaminyl-Hydroxamat (0-10 mM) ein molarer Extinktionskoeffizient von  $0,4995 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$  bei einer Wellenlänge von 525 nm ermittelt.

### 2.3.4 Bestimmung der BLAP- Aktivität

Versuche zur enzymatischen Spaltung von enzymatisch quervernetztem Protein wurde mittels einer kommerziell erhältlichen Protease (BLAP = *Bacillus lentus* alkaline protease) durchgeführt. Die Bestimmung der proteolytischen Aktivität der BLAP erfolgte über den Verdau von Casein. Diese photometrische Methode basiert auf dem Anstieg der Menge der säurelöslichen Peptide als Maß für den Fortschritt der Proteolyse [Anson, 1969].

Zunächst wurde eine homogene Caseinlösung (1 % w/v Casein in Tris/HCl 50 mM pH 8) durch Erhitzen für 15 min im siedenden Wasserbad hergestellt [Kunitz, 1947]. Für den Reaktionsansatz wurden 6,6 mL der 1 % w/v Casein-Lösung 5 min bei 50 °C vorinkubiert und zum Start der Reaktion 600  $\mu\text{L}$  BLAP hinzugegeben, die zuvor mit Puffer (Tris/HCl 50 mM pH 8) zu 0,1 mg/mL bzw. 1 mg/mL vorverdünnt worden war.

Zu definierten Zeiten wurde aus dem Reaktionsansatz ein Aliquot von 600  $\mu\text{L}$  entnommen und zu 900  $\mu\text{L}$  5 % w/v Trichloressigsäure (auf Eis gekühlt) gegeben. Das so gefällte Restprotein wurde herunterzentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 280 nm bestimmt. Als Blank wurden zu 550  $\mu\text{L}$  der Casein-Lösung 50  $\mu\text{L}$  Pufferlösung (50 mM Tris/HCl pH 8) anstatt Protease zugesetzt, das Protein ebenfalls mit 900  $\mu\text{L}$  5 % w/v TCA gefällt und 10 min bei 16100 x g zentrifugiert.

Im linearen Bereich der ermittelten Kurve ergab sich der Anstieg  $a$  (Formel 6), mit dem die caseinolytischen Einheiten (Units) der BLAP mittels Formel 7 berechnet werden konnten.

$$a = \frac{\Delta\text{OD}_{280}}{\Delta t} \quad (6)$$

$$EA_{\text{BLAP}} \left[ \frac{U_{\text{Cas}}}{\text{mL}} \right] = \frac{a \cdot V_t}{V_e} \quad U_{\text{cas}}/\text{mL} \text{ für die unverdünnte BLAP-Lösung} \quad (7)$$

mit

$V_t$  = Volumen der Gesamtlösung

$V_e$  = Volumen der Enzymlösung

### 2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den Nachweis der Quervernetzungsreaktion durch MTG in den Proteinen wurde die SDS-PAGE nach Laemmli eingesetzt [Laemmli, 1970].

Das Gel für die SDS-PAGE bestand aus einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Proben wurden auf etwa 2 mg Protein pro mL SDS-Probenpuffer eingestellt und 10 min bei 99 °C unter reduzierenden Bedingungen (Mercaptoethanol) inkubiert. Je 10 µL Probe (5 µL für Molekulargewichtsmarker) wurden im Sammelgel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in zwei Stufen durchgeführt (1. Stufe: 300 V, 80 mA, 6 min; 2. Stufe: 300 V, 60 mA, 40 min).

Nach der Trennung der Proteine wurde das Gel über Nacht in Färbelösung auf dem Wipptisch bewegt. Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt (Wechsel der Lösung nach 30 min). Nach 30 min Spülen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Gele für weitere 30 min in Geltrocknerlösung gelagert. Anschließend wurde das Gel blasenfrei zwischen zwei benetzten Cellophanfolien eingespannt und für 2 d bei RT getrocknet.

#### SDS-PAGE von Proben aus Prüfkörpern

200 mg Sand wurden (mit je 1 % b.o.s. Protein aus Prüfkörpern für den Druckversuch; entspricht etwa 2 mg Protein als Bindemittel) mit je 1 mL SDS-PAGE – Probenpuffer unter Zugabe von Mercaptoethanol (10 µL/mL Probenpuffer) inkubiert (10 min, 99 °C). Dadurch wurde eine Anfangskonzentration von etwa 2 mg / mL erhalten. Bei Proben mit unvernetztem Protein wurde die Konzentration durch erneute Zugabe von Probenpuffer halbiert (auf etwa 1 mg/mL). Die Proben kühlten auf Raumtemperatur ab, wurden kurz geschüttelt und 3 min ruhen gelassen, so dass der Sand sedimentieren konnte. Danach erfolgte der Auftrag der Proben auf das Trenngel.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Proteine als Bindemittel für Sand

Im Rahmen dieser Arbeit sollten untersucht werden, ob Proteine als Bindemittel für Gießereisand eingesetzt werden können. Insbesondere wird Sand, der durch entsprechende Bindemittel verfestigt ist, für die Herstellung von Gusskernen verwendet. Die Auswahl geeigneter Proteine sowie die Untersuchung festigkeitsbestimmender Parameter (z.B. Bindemittelanteil) stand dabei im Vordergrund. Insbesondere der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins im Formstoff durch das Enzym Transglutaminase sollte untersucht werden. Um die Festigkeit proteingebundenen Sandes verlässlich bestimmen zu können, wurden zunächst verschiedene Voruntersuchungen durchgeführt. Die Voruntersuchungen beinhalteten die Untersuchung des geeigneten Mischverfahrens für den Formstoff, den Einfluss der Trocknungs- und Lagerungsbedingungen für Prüfkörper und die Wahl des geeigneten Prüfverfahrens.

#### 3.1.1 Voruntersuchungen

##### 3.1.1.1 Mischverfahren für die Formstoffherstellung

Das Ziel der Versuche bestand darin, ein homogenes Formstoffgemisch herzustellen, bei dem Lösungsmittel und Protein im Sand gleichmäßig verteilt sind. Zuverlässige Aussagen zur Festigkeit des Formstoffes lassen sich nur treffen, wenn das Bindemittel gleichmäßig im Formstoff verteilt vorliegt. Für die Herstellung des Formstoffgemisches wurden zunächst drei mögliche Mischvarianten (Abschnitt 2.2.1.1) untersucht, bei denen die Reihenfolge der Zugabe der Komponenten variiert wurde.

Die verwendeten Proteinpulver waren farblich kaum von Sand zu unterscheiden. Die Verteilung des Proteins im fertig gemischten Formstoff sollte dennoch optisch beurteilt werden. Deshalb wurde dem trockenen Proteinpulver (Caseinat) vor der Zugabe in den Mischer rotes Eisenoxid-Pigment beigemischt. Bei den Mischvarianten 1 + 2 (Abbildung 2-1, Seite 26) wurden Aggregate von Sand mit sehr hohem Proteinanteil durch eine inhomogene Färbung des Sandes optisch festgestellt. Zwar fand sich das Farbpigment auch im restlichen Formstoff, jedoch in geringeren Konzentrationen als in diesen Aggregaten. Durch weiteres Mischen konnten die Aggregate nicht im restlichen Formstoff dispergiert werden. Bei der Zugabe von Proteinpulver zu trockenem Sand und anschließender Zugabe des Lösungsmittels (Variante 3) konnten solche Inhomogenitäten optisch nicht festgestellt werden. Es wurde eine homogene, feuchte Formstoffmischung erhalten, die keine Aggregate enthielt. Für sämtliche Versuche der vorliegenden Arbeit wurde deshalb diese Mischvariante verwendet.

### 3.1.1.2 Auswahl des geeigneten mechanischen Prüfverfahrens

Für die Beurteilung der mechanischen Festigkeit von Formstoffen in der Gießerei kommen verschiedene Prüfverfahren zum Einsatz. Häufig angewandte Methoden messen dabei anhand von Probekörpern die Biege- oder Druckfestigkeit. Beide Werkstoffparameter geben Aufschluss über die Festigkeit bei entsprechenden unterschiedlichen Beanspruchungsarten. Beispielsweise führt das Einfüllen der Schmelze zu einem hohen hydrostatischen Druck. Die Druckfestigkeit der Form muss entsprechend hoch sein, um Verformungen oder Beschädigungen der Oberfläche des Gusskernes zu vermeiden. Weiterhin können hohe Biegekräfte auf Gusskerne durch Auftriebskräfte auftreten, auch hier muss eine ausreichende Festigkeit gewährleistet werden.

Der Vergleich beider Prüfverfahren, wie in den Abschnitten 2.3.1.1 und 2.3.1.2 beschrieben, sollte zeigen, welches Prüfverfahren für die Prüfung von feuchten sowie getrockneten Proben geeignet ist. Gleichzeitig sollte untersucht werden, bei welchem Prüfverfahren (in Verbindung mit der Prüfkörperherstellung) die geringeren Standardabweichungen auftreten, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen.

Biegeriegel und Druckprüfkörper wurden wie in den Abschnitten 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, mit jeweils 1,0 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel sowie 5,0 % b.o.s. Standardpuffer hergestellt und die mechanische Festigkeit nach entsprechender Konditionierung gemessen.

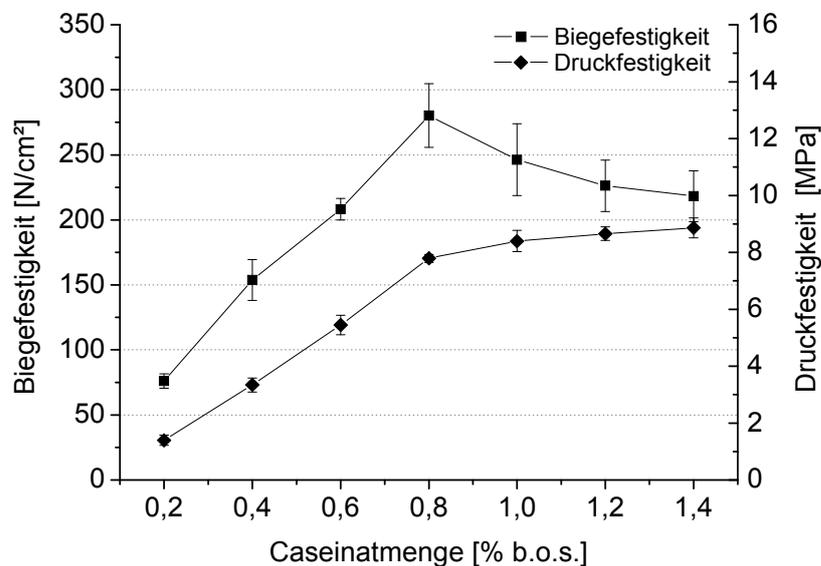


Abbildung 3-1: Vergleich des Verlaufs der Druck- und Biegefestigkeit von trockenem, proteingebundenem Sand bei Variation des Caseinatanteils. Die Puffermenge (Tris/HCl pH 7, 20 mM) im Formstoff betrug jeweils 5,0 % b.o.s. bei der Probenherstellung.

Wie in Abbildung 3-1 zu sehen ist, traten bei der Prüfung von Biegeriegeln höhere Standardabweichungen als bei Druckprüfkörpern auf. Bei der Bestimmung der Biegefestigkeit fiel auf,

dass ab einem Caseinatanteil von 0,8 % b.o.s. die Festigkeit bei steigendem Bindemittelgehalt abfiel, während sie bei Druckprüfkörpern weiter anstieg.

Ein Nachteil bei der Herstellung der Biegeriegel bestand darin, dass eine homogene Verdichtung des Formstoffgemisches innerhalb des Prüfkörpers trotz der Verwendung dafür vorgesehener Formwerkzeuge nicht sichergestellt werden konnte. Die Verdichtung des Sandes hing stark von der gleichmäßigen Befüllung der Form ab (siehe Abschnitt 2.2.1.2, Seite 28). Eine definierte Masse konnte bei der Biegeriegelherstellung nicht verwendet werden, da die Prüfkörperform mit Formstoffüberschuss befüllt wurde. Die endgültige Formgebung erfolgte dann durch ein als Messer fungierendes Blech. Die erhöhten Standardabweichungen sind vermutlich auf Zonen höherer und niedrigerer Verdichtung (in der Längsseite des Prüfkörpers) zurückzuführen. Nach VDG-Merkblatt P 72 (1999) muss bei der Prüfung von Biegeriegeln die Masse der einzelnen Prüfkörper notiert werden. Damit sollen verfälschte Messergebnisse durch Dichte-Unterschiede zwischen einzelnen Prüfkörpern vermieden werden. Allerdings lässt sich aus unterschiedlichen Probenmassen nicht auf einen massebereinigten Wert für die Biegefestigkeit schließen. Bei Druckprüfkörpern konnten solche Effekte durch die Einwaage des Formstoffes, den rotationssymmetrischen Querschnitt sowie die Möglichkeit der Kontrolle der Verdichtung durch Toleranzmarken weitgehend vermieden werden. Weiterhin wurde in späteren Versuchen festgestellt, dass Biegeriegel im feuchten Zustand zu wenig Festigkeit aufweisen, um die Biegefestigkeit zu ermitteln. Aus diesen Gründen wurde für die weiteren Versuche der Druckversuch bevorzugt.

### **3.1.1.3 Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Festigkeit**

Um den Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Festigkeit von Prüfkörpern zu untersuchen, wurden Druckprüfkörper entsprechend Abschnitt 2.2.1.3 mit je 1,0 % b.o.s. Caseinat und 5,0 % b.o.s. Standardpuffer hergestellt. Die Trocknung erfolgte jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen (50, 65, 80 und 95 °C). Bei geringeren Temperaturen waren längere Trocknungszeiten durch den geringeren Dampfdruck des Wassers notwendig. Höhere Trocknungstemperaturen wurden nicht untersucht, um eine Schädigung der Prüfkörper durch zu hohen Dampfdruck zu vermeiden. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die vollständige Trocknung der Prüfkörper bei 50 °C 22 h dauerte, während die Trocknung bei 95 °C bereits nach 2,5 h vollständig abgeschlossen war. Die jeweilige Trocknungsdauer wurde durch Trocknung bis zur Gewichtskonstanz der Proben sowie durch die Bestimmung des Masseverlustes der Probekörper ermittelt. Zusätzliche Versuche wurden durchgeführt, bei denen Probekörper, die zunächst bei 95 °C getrocknet wurden, zusätzlich bei 110 °C getrocknet wurden. Die Festigkeiten der bei 110 °C getrockneten Prüfkörper unterschieden sich nicht von denen bei 95 °C getrockneter Prüfkörper (Ergebnisse nicht dargestellt).

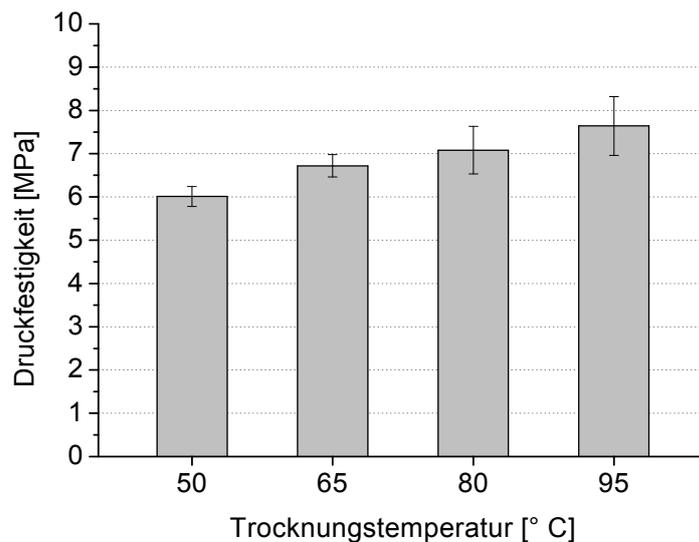


Abbildung 3-2: Einfluss der Trocknungstemperatur auf die Festigkeit von getrockneten Druckprüfkörpern. Herstellung mit je 1,0 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel bei unterschiedlichen Trocknungstemperaturen. Die Puffermenge (Tris/HCl pH 7 20 mM) im Formstoff betrug jeweils 5 % b.o.s. bei der Probenherstellung.

Wie in Abbildung 3-2 dargestellt, stieg mit höheren Trocknungstemperaturen die Druckfestigkeit der Prüfkörper im Bereich von 50 – 95 °C nahezu linear an. Gegenüber Proben, die bei 50 °C getrocknet wurden, wurde bei einer Trocknungstemperatur von 95 °C ein Festigkeitsanstieg um ca. 26 % gemessen. Da bei 95 °C Trocknungstemperatur die höchste Druckfestigkeit erreicht wurde und die Trocknung der Probekörper am schnellsten verlief, wurde die Trocknung sämtlicher Prüfkörper bei 95 °C durchgeführt.

Es war bekannt, dass bei höheren Temperaturen die Viskosität von Caseinatlösungen sinkt [Phillips und Williams, 2000]. Möglicherweise kann die Proteinlösung aufgrund der geringeren Viskosität bei höheren Temperaturen besser zu den Kontaktpunkten zwischen den Sandkörnern migrieren, wo sie sich durch die Kapillarkräfte sammelt.

Wie später festgestellt wurde (Abschnitt 3.1.5), verbleibt das Protein an den Kontaktpunkten und bildet eine feste Bindemittelbrücke, so dass der Sand nach der Trocknung verfestigt ist.

#### 3.1.1.4 Einfluss der Lagerungsbedingungen

Um zu überprüfen, ob die Lagerbedingungen einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften proteingebundener Sandprüfkörper haben, wurden die Lagerdauer und die relative Luftfeuchte bei der Lagerung variiert. Dies ist insbesondere für eine mögliche industrielle Anwendung interessant, bei der die Verwendung von Gusskernen nicht immer sofort erfolgt. Des Weiteren sollte die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse durch gleiche Lagerungsbedingungen sichergestellt werden. Der Einfluss der Lagertemperatur wurde nicht untersucht, alle Prüfkörper wurden bei RT ( $23 \pm 1$  °C) gelagert.

Um zunächst den Einfluss der Lagerdauer bei gleichbleibender relativer Feuchte zu untersuchen, wurden Druckprüfkörper mit 0,7 % b.o.s. Caseinat (ohne Vernetzung) nach Standardverfahren (Abschnitt 2.2.1.3) hergestellt. Die Lagerung von Proben (alle Proben aus einem Versuchsansatz) erfolgte für je 24, 48 bzw. 120 h.

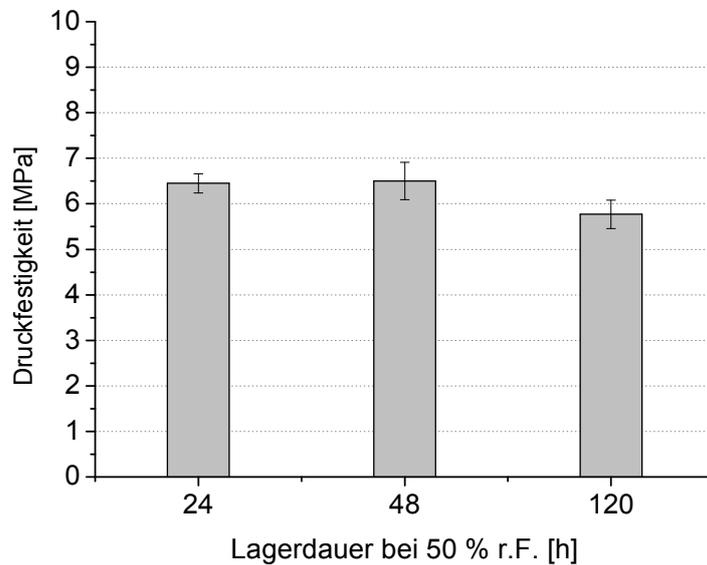


Abbildung 3-3: Einfluss der Lagerdauer auf die Festigkeit von Druckprüfkörpern, die je mit 0,7 % b.o.s. Caseinat und 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM) hergestellt wurden. Alle Formkörper wurden aus dem gleichen Formstoffansatz hergestellt (n=3).

Die Lagerung für 24 h bzw. 48 h bei 50 % r.F. hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit der Prüfkörper. Lediglich nach 120 h Lagerung war eine geringfügige Verringerung der Festigkeit zu beobachten (Abbildung 3-3). In allen folgenden Experimenten erfolgte deshalb die Lagerung der trockenen Prüfkörper vor dem Druckversuch (bei Raumtemperatur) für 48 h in einem Exsikkator mit einer relativen Luftfeuchte von 50 %.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Glasübergangstemperatur und damit die mechanische Festigkeit von Proteinen stark vom Wassergehalt abhängt [Guilbert und Cuq, 2005].

Es wurde vermutet, dass das in den Prüfkörpern enthaltene Caseinat bei hoher Luftfeuchte Wasser aus der umgebenden Atmosphäre aufnehmen kann und damit die Festigkeit sinkt. Um diese These zu überprüfen, sollten weitere Versuche zur Lagerstabilität durchgeführt werden.

Für diese Untersuchung wurden sowohl Prüfkörper mit enzymatisch vernetztem (+ MTG) und nicht vernetztem Protein (- MTG) verwendet. Die Lagerung der Prüfkörper erfolgte über Silica (0 % r.F.), dH<sub>2</sub>O (100 % r.F.) sowie über gesättigten Salzlösungen (Tabelle 2-2, Seite 21) um definierte Luftfeuchten von 30, 50, 75, 85 % r.F. einzustellen. Die Messung der Druckfestigkeit erfolgte nach der Lagerung für 48 h bei angegebener Luftfeuchte.

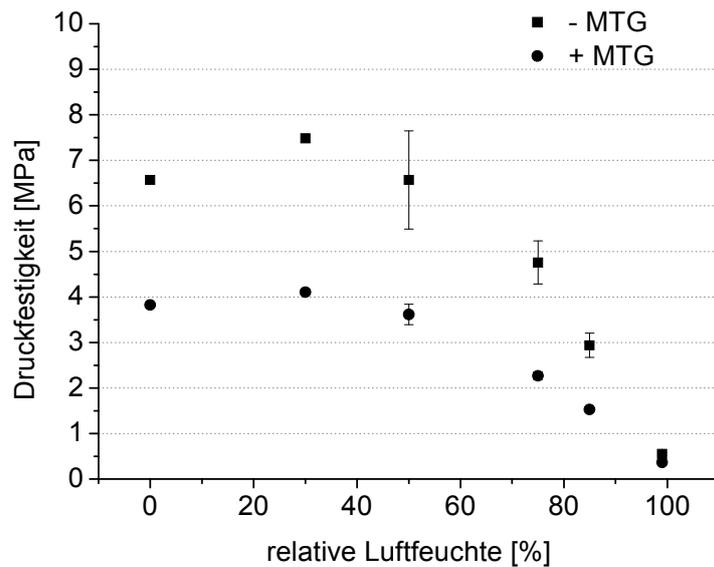


Abbildung 3-4: Einfluss der relativen Luftfeuchte auf die Druckfestigkeit von proteingebundenem Sand, der mit je 0,7 % b.o.s. Caseinat hergestellt wurde. Die Prüfkörper wurden mit aktiver MTG (36 U/g<sub>Caseinat</sub>) bzw. thermisch inaktivierter MTG (mit – MTG bezeichnet) hergestellt.

Die Lagerung der Prüfkörper bei unterschiedlichen relativen Luftfeuchten hatte tatsächlich einen erheblichen Einfluss auf die Druckfestigkeit (Abbildung 3-4).

Es konnte sowohl bei vernetztem als auch bei unvernetztem Protein als Bindemittel eine starke Abhängigkeit der Festigkeit bei relativen Feuchten > 50 % beobachtet werden. Zwischen 0 % r.F. und 50 % r.F. wurden nur geringe Unterschiede in der Druckfestigkeit festgestellt. Bei beiden Probenansätzen ( $\pm$  MTG) zeigte sich, dass die Lagerung bei 30 % r.F. zu geringfügig höheren Festigkeiten führte. Möglicherweise führt eine sehr geringe Luftfeuchte (0 %) zu einem starken Austrocknen des Proteins, so dass hohe Festigkeiten erreicht werden, aber die Bindemittelbrücken spröde brechen. Bei 50 % r.F. könnte wiederum das Protein etwas Wasser enthalten, welches als Weichmacher in den Binderbrücken wirkt und somit trotz hoher Festigkeit zu einem etwas duktileren Bruchverhalten führt. Ein Festigkeitsmaximum bei 30 % r.F. wäre somit eine Kombination beider Zustände, bei der die höchste Festigkeit resultiert. Bei relativen Luftfeuchten > 50 % sank die Festigkeit beider Prüfkörpertypen (+MTG/-MTG) stark mit steigender Luftfeuchte. Die Wasseraufnahme des Caseinats aus der umgebenden Luft führte zu einem starken Weichmacher - Effekt, was auch anhand der wesentlich geringeren (Druck-) E-Moduln dieser Proben erkennbar war (hier nicht dargestellt). Zudem verformten sich die Proben wesentlich stärker, bevor eine Rissbildung am Prüfkörper eintrat. Ob der weichmachende Effekt bei Lagerung in trockener Atmosphäre reversibel ist, wurde nicht untersucht. Dieser Effekt könnte durch Wiegen der Prüfkörper nach Lagerung bei hoher Luftfeuchte sowie nach anschließender erneuter Trocknung in Kombination mit der Ermittlung der jeweiligen Druckfestigkeit untersucht werden.

### 3.1.2 Vergleich verschiedener Proteine als Bindemittel

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Einfluss des Protein- und Pufferanteils sowie der Herstellungs- und Lagerungsbedingungen unter Verwendung von Caseinat ermittelt. Neben Caseinat sollten weitere Proteine sowie Proteinhydrolysate auf ihre Eignung als Bindemittel für Sand untersucht werden. Typische Bindemittelanteile konventioneller Bindemittel liegen im Bereich von 0,8 – 2,5 % b.o.s. [IPPC, 2004]. Ein Vergleich mit konventionellen Bindemitteln war nicht direkt möglich, da unterschiedliche Bindemittel unterschiedliche Verfahren erfordern und daraus eine sehr große Spannweite an erreichbaren Festigkeiten resultiert. Um jedoch innerhalb der Gruppe der hier verwendeten proteinogenen Stoffe vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde jeweils 1 % b.o.s. des jeweiligen Proteins bzw. Proteinhydrolysates ohne Verwendung von MTG eingesetzt. Für sämtliche Formstoffe wurden 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM) als Lösungsmittel für das Protein eingesetzt. Da die verwendete kommerzielle MTG-Präparation zu 99 % aus Dextrin besteht, wurden zusätzlich jeweils 0,25 % b.o.s. Maltodextrin zugesetzt. Die verwendete Menge Maltodextrin bezog sich auf die voraussichtlich maximal einzusetzende Menge der MTG-Präparation (Activa<sup>®</sup> WM) von 0,25 g<sub>MTG</sub> /g<sub>Zielprotein</sub>, wie sie bereits bei Untersuchungen zu Proteinfohlen verwendet wurde [Patzsch et al., 2010].

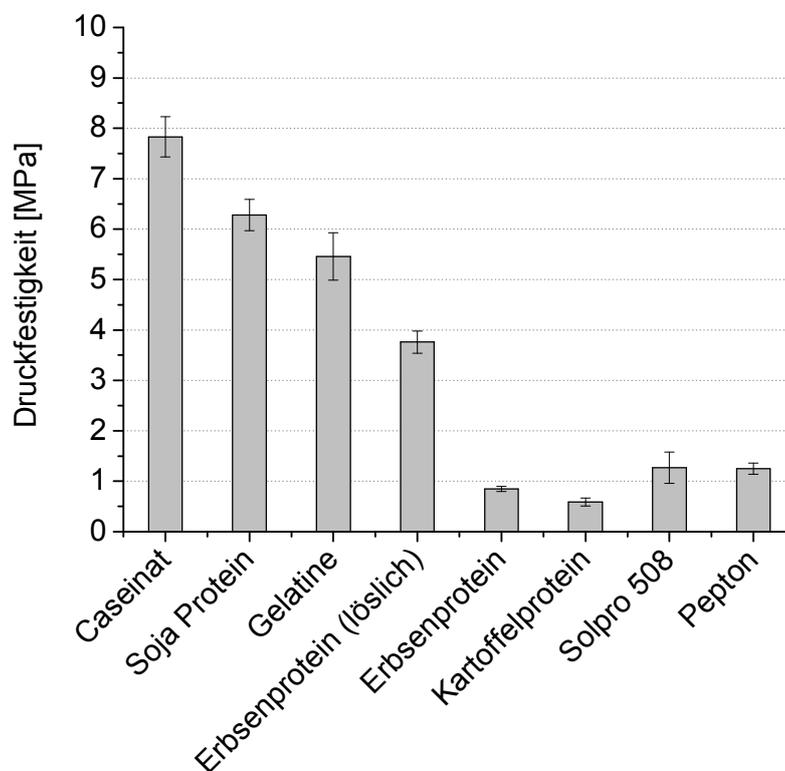


Abbildung 3-5: Vergleich der Druckfestigkeit von Prüfkörpern (n=5), die mit je 1 % b.o.s. Protein bzw. Proteinhydrolysat und 0,25 % Maltodextrin nach Standardmethode hergestellt wurden. Der Puffergehalt des verwendeten Formstoffs betrug vor der Trocknung je 5,0 % b.o.s.. Solpro 508 besteht aus säurehydrolysiertem Weizenprotein, Pepton aus enzymatisch verdaulichem Caseinat.

In Abbildung 3-5 sind die mit verschiedenen Proteinen (bzw. Proteinhydrolysaten) erreichten Druckfestigkeiten dargestellt. Mit Caseinat als Bindemittel wurden die höchsten Festigkeiten (ca. 7,8 MPa) erreicht. Sojaprotein, Gelatine und eine lösliche Fraktion von Erbsenprotein zeigten ebenso hohe Festigkeiten (im Bereich von etwa 3,8 - 6,3 MPa). Das unlösliche Erbsenprotein (Emvital E7) sowie das Kartoffelprotein zeigten hingegen geringe Festigkeiten (ca. 0,9 bzw. 0,6 MPa). Die gut löslichen Proteinhydrolysate Solpro 508 und Pepton zeigten zwar eine höhere Festigkeit als unlösliche Proteine, jedoch waren auch diese aufgrund der geringen Festigkeit (je ca. 1,3 MPa) als Bindemittel ungeeignet. Mit 0,25 % Maltodextrin als Bindemittel (ohne Protein) ließen sich keine Druckfestigkeiten bestimmen, die Probekörper zerfielen nach Entnahme aus der Form. In weiteren Versuchen wurde bei Verwendung von 1,0 % b.o.s. Caseinat ohne Maltodextrin eine Festigkeitsabnahme von ca. 1,0 MPa festgestellt. Das heißt, Maltodextrin hatte als Additiv zum Protein eine leicht festigkeitssteigernde Wirkung. Die Bedingungen für den oben dargestellten Versuch waren gleich, da bei allen verwendeten Proteinen jeweils die gleiche Menge Maltodextrin verwendet wurde.

Da mit Caseinat die höchste Festigkeit erzielt wurde, erschien es für weitere Versuche als am besten geeignet und wurde als „Modellprotein“ vornehmlich eingesetzt. Ebenso erschien Caseinat gut geeignet, da im Verlauf der Arbeit der Einfluss der enzymatischen Vernetzung von Proteinen untersucht werden sollte. Die gute enzymatische Vernetzbarkeit von Caseinat mittels Transglutaminase war bereits aus der Literatur bekannt [Krochta, 2002; Patzsch, 2010].

### 3.1.3 Untersuchungen zum Einfluss der Protein- und Puffermenge

Der Proteinanteil im trockenen Formstoff sowie die Lösungsmittelmenge bei der Formgebung spielen eine maßgebliche Rolle für die Anwendbarkeit von proteingebundenem Sand als Formstoff. Unerwünschte Emissionen, die bei der Pyrolyse des Formstoffes durch den Kontakt mit der Metallschmelze bzw. in den Wärmeeinflusszonen entstehen, ebenso wie die Kosten für Bindemittel steigen mit dem Bindemittelanteil. Deshalb wird versucht, so wenig Bindemittel wie möglich, unter Beachtung der technologischen Mindestanforderungen, zu verwenden. Ein hoher Wasseranteil im Formstoffgemisch verringert zudem die Rieselfähigkeit (und damit das Formfüllvermögen), verlängert die Trocknungszeit und erhöht den Energiebedarf zur Trocknung des Formstoffes. Anhand von Caseinat sollte zunächst untersucht werden, in welchem Bereich eine Änderung der Bindemittelmenge und der verwendeten Puffermenge zu einer signifikanten Änderung der mechanischen Festigkeit führt. Die Vermutung lag nahe, dass höhere Bindemittelanteile auch zu höheren Festigkeiten führen, allerdings war ebenso anzunehmen, dass die Festigkeit nicht linear mit der Bindemittelmenge steigt (siehe auch Abbildung 3-1 zuvor).

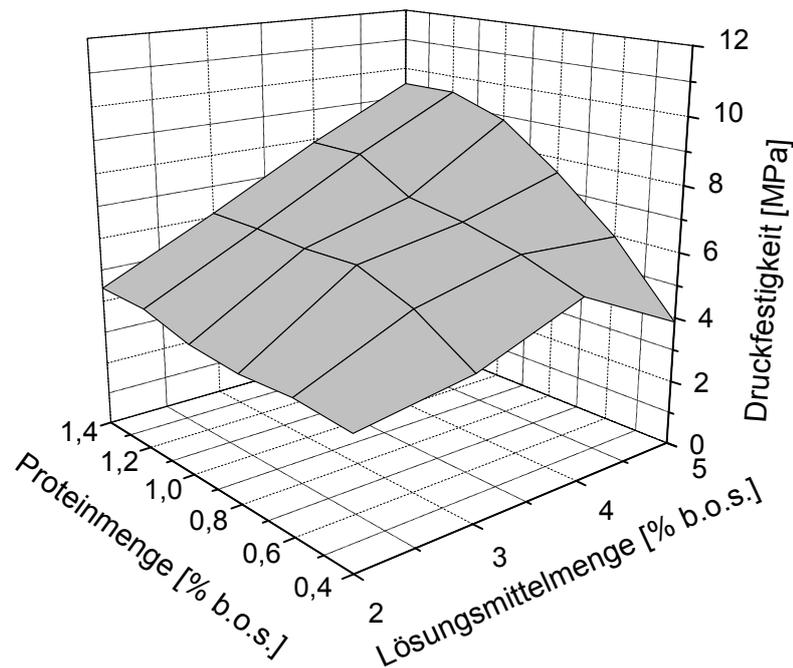


Abbildung 3-6: Abhängigkeit der Druckfestigkeit proteingebundenen Sandes, hergestellt mit unterschiedlichen Caseinat- und Puffermengen. Die Proteinmenge wurde im Bereich von 0,4 - 1,4 % b.o.s. in 0,2 % - Schritten variiert, die Puffermenge (Tris/HCl pH 7 20 mM) im Bereich von 2 - 5 % b.o.s. (in 1 % - Schritten). Die Standardabweichungen sind nicht dargestellt (n=5 je Messpunkt).

In Abbildung 3-6 ist der Einfluss beider Parameter auf die Festigkeit von Caseinatgebundenem Sand dargestellt. Wie darin zu sehen ist, stieg die Druckfestigkeit wie erwartet mit der Proteinmenge insbesondere bei einer Puffermenge von 5 % b.o.s.. Bei einer geringeren Puffermenge sank der Einfluss der Caseinatanteils, bei 2 % b.o.s. Puffer stieg die Druckfestigkeit kaum noch mit zunehmendem Bindemittelgehalt an.

Ebenso stieg mit zunehmender Puffermenge die Festigkeit, insbesondere bei hohen Bindemittelanteilen. Bei 1,2 und 1,4 % b.o.s. Proteinanteil stieg die Festigkeit fast linear mit der Puffermenge, bei geringeren Proteinanteilen sank auch der Einfluss der Puffermenge. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die Festigkeit von proteingebundenem Sand von beiden Parametern stark abhängig ist. Eine Puffermenge von 5 % b.o.s. wurde für weitere Experimente benutzt. Weitere Versuchsergebnisse zeigten, dass eine weitere Erhöhung des Puffergehaltes auf mehr als 5 % b.o.s. zu einem sehr feuchten, fließfähigen Gemisch führte, was die Herstellung von Prüfkörpern definierter Geometrie mit der verwendeten Methode nicht erlaubte. Durch die Variation der beiden Parameter konnten Formstoffe in einem weiten Festigkeitsbereich (ca. 4-9 MPa) hergestellt werden.

### 3.1.4 Einfluss der enzymatischen Quervernetzung bei Casein

#### 3.1.4.1 Einfluss der Enzymkonzentration/enzymatischen Aktivität

Ziel des Versuches war es, den Einfluss der enzymatischen Quervernetzung auf die Festigkeit von proteingebundenem Sand zu untersuchen. Aus der Literatur war bekannt, dass die Quervernetzung von Caseinat zu einem gelartigen Zustand führt [Schorsch et al., 2000]. Die Vernetzung des Proteins innerhalb der Sandmatrix sollte durch die Bildung von Isopetidbindungen die Festigkeit erhöhen. Eine Verringerung der Bindemittelmenge bei gleicher Festigkeit oder die Erhöhung der Stabilität bei gleicher Bindemittelmenge wäre in Bezug auf Emissionen und die Kosten wünschenswert. Um den Einfluss unterschiedlicher enzymatischer Aktivität und damit verschiedener Vernetzungsgrade des Proteins auf die Festigkeit zu untersuchen, wurden zunächst unterschiedliche Enzymmengen bei konstanter Proteinmenge eingesetzt. In allen Pufferlösungen wurde der gleiche Dextringehalt eingestellt (durch Zugabe von Maltodextrin). Der Gesamt-Dextringehalt betrug bei allen Formstoffmischungen 0,25 % b.o.s.. Die MTG (Activa-MTG) wurde unmittelbar vor der Verwendung im Puffer gelöst, die fertige MTG-Lösung wurde im Kühlraum gelagert und nach ca. 15 min verwendet. Es wurden Prüfkörper mit 1 % b.o.s. Caseinat und einer Puffermenge von 5 % b.o.s. hergestellt und im feuchten Zustand (siehe Abschnitt 2.2.1.3) geprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

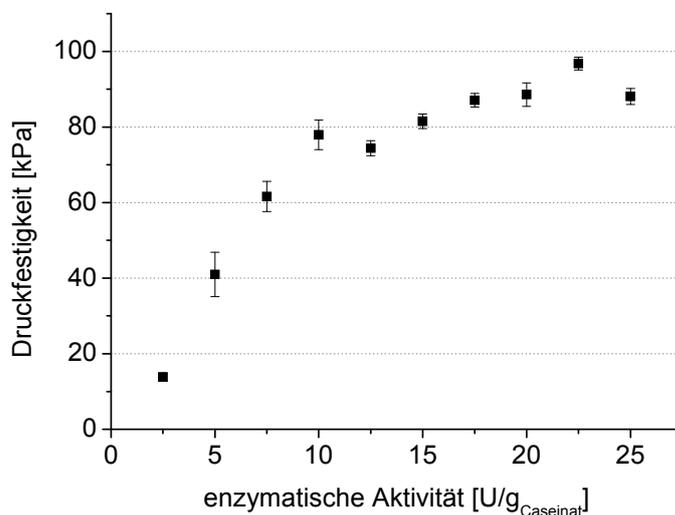


Abbildung 3-7: Einfluss der enzymatischen Aktivität auf die Festigkeit von feuchten proteingebundenen Druckprüfkörpern. Der Formstoff enthielt 1 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel und 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM), die enzymatische Aktivität wurde im Bereich von 2,5 – 25 U/g<sub>Caseinat</sub> variiert.

Von Prüfkörpern ohne enzymatische Vernetzung (thermisch inaktivierte MTG, Herstellung siehe Abschnitt 2.2.1.1, Seite 26) konnten keine mechanischen Kennwerte gemessen werden, da der feuchte Sand nicht formstabil war. Wie in Abbildung 3-7 zu sehen ist, bewirkten

jedoch schon kleine Enzymkonzentrationen eine Verfestigung des Formstoffes durch Quervernetzung des Proteins. Bis zu einer Aktivität von  $10 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$  stieg die Festigkeit stark mit höherer enzymatischer Aktivität. Eine Erhöhung der Enzymkonzentration von  $10 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$  auf  $25 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$  bewirkte nur noch eine geringe Zunahme der Druckfestigkeit. Die erreichten Festigkeiten lagen im feuchten Zustand um etwa zwei Zehnerpotenzen unter denen von trockenen Prüfkörpern ohne Quervernetzung (vgl. Abbildung 3-6).

Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 gezeigt, hing die Festigkeit von trockenem Formstoff ohne Quervernetzung im Wesentlichen von der Proteinmenge im Sand ab. Um zu überprüfen, ob dies in gleichem Maße für enzymatisch quervernetzten Sand galt und welchen Einfluss die enzymatische Quervernetzung hat, wurden Prüfkörper mit unterschiedlichem Proteinanteil hergestellt. Für die enzymatische Quervernetzung des Proteins wurden je 20 bzw. 25  $\text{U/g}_{\text{Caseinat}}$  eingesetzt. Die Prüfkörper wurden wiederum im feuchten Zustand geprüft (Abbildung 3-8).

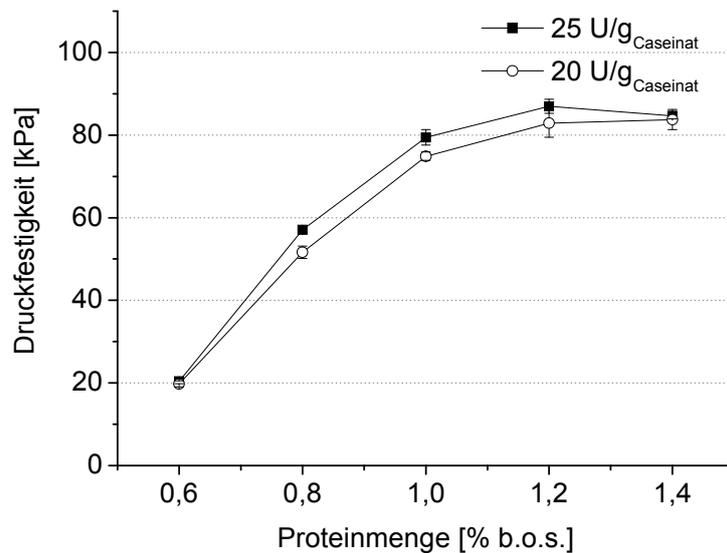


Abbildung 3-8: Einfluss der Proteinmenge (Caseinat) auf die Druckfestigkeit von feuchten Prüfkörpern bei enzymatischer Quervernetzung des Proteins. Die Puffermenge (Tris/HCl pH 7 20 mM) im Formstoff betrug je 5 % b.o.s., die enzymatische Aktivität 20 bzw. 25  $\text{U/g}_{\text{Caseinat}}$ .

Wie bereits zuvor festgestellt, führte eine Erhöhung der Enzymaktivität von  $20 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$  auf  $25 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$  nicht zu signifikant höheren Festigkeiten. Vermutlich wurden alle verfügbaren Quervernetzungspunkte vom Enzym katalytisch umgesetzt und eine weitere Erhöhung der Enzymaktivität bewirkte nur minimale Änderungen in der Proteinstruktur. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Proteingehalt zwischen 0,6 und 1,0 % b.o.s. auch die Festigkeit der Prüfkörper stieg (Abbildung 3-8). Die Festigkeit stieg jedoch bei der Erhöhung des Proteinanteils von 1,0 auf 1,4 % b.o.s. Caseinat nicht mehr wesentlich, zwischen 1,2 % und 1,4 % b.o.s. Caseinat konnte kein Unterschied mehr festgestellt werden. Eine weitere Erhö-

hung des Proteinanteils über 1,4 % b.o.s. würde vermutlich keine weitere Verfestigung bewirken. Es wurde vermutet, dass neben der Proteinmenge vor allem auch die Gelfestigkeit (resultierend aus der Quervernetzung) einen wesentlichen Einfluss auf die Festigkeit des Formstoffs im feuchten Zustand hat. Diese kann vermutlich durch einen höheren Quervernetzungsgrad des Proteins (z.B. Proteine mit höherem Anteil an zugänglichen Lysin- und Glutaminresten) oder einen geringeren Wasseranteil im Gel erzielt werden.

### 3.1.4.2 Einfluss der Vernetzungsdauer

Die Geschwindigkeit der Bildung der Isopetidbindungen in der kolloidalen Proteindispersion (und damit der Übergang in den Gel-Zustand) hängt von der enzymatischen Aktivität des Enzyms und damit auch von der Temperatur ab. Die höchste Reaktionsgeschwindigkeit der MTG wird bei 50 °C erreicht, bei höheren Temperaturen sinkt die Aktivität durch thermische Inaktivierung des Enzyms [Patzsch, 2010]. Um zu untersuchen, in welchem Zeitraum die Vernetzung abgeschlossen ist, wurden feuchte Prüfkörper wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben mit jeweils 1,0 % b.o.s. Caseinat und 1,0 % bzw. 1,3 % b.o.s. löslichem Erbsenprotein hergestellt. Die Prüfkörper wurden bei 50 °C verschlossen im Wärmeschrank inkubiert, d.h. die Feuchtigkeit im Formstoff blieb konstant. Die enzymatische Aktivität, bezogen auf das zu vernetzende Protein, betrug je 25 U/g<sub>Protein</sub>. Nach 20 min Inkubationszeit wurde in Zeitabständen von je 10 min jeweils ein Prüfkörper entnommen und unmittelbar im Druckversuch geprüft.

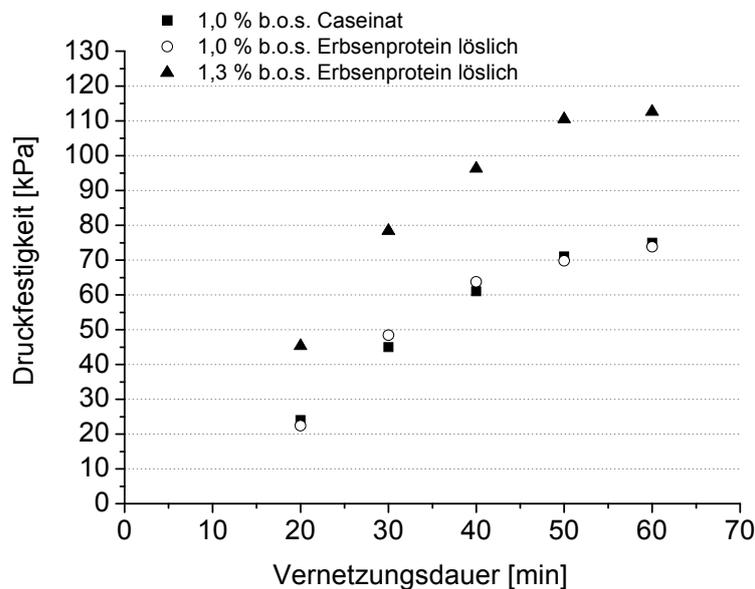


Abbildung 3-9: Einfluss der Vernetzungsdauer auf die Druckfestigkeit feuchter Prüfkörper bei enzymatischer Quervernetzung des Proteins. Vernetzung bei 50 °C (n=1). Der Formstoff enthielt je 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM) und 1,0 % b.o.s. Caseinat bzw. 1,0 / 1,3 % b.o.s. lösliches Erbsenprotein. Für die Vernetzung wurden je 25 U/g<sub>Protein</sub> eingesetzt.

Wie in Abbildung 3-9 dargestellt, stieg die Festigkeit bei beiden Proteinen im Zeitraum von 60 min an. Die relativ lange Vernetzungsdauer wurde der Art des Versuchsaufbaus zugeschrieben, da sich die Prüfkörperform mit dem darin enthaltenen Formstoffgemisch in der umgebenden Luft von 50 °C nur langsam erwärmte.

Bei Verwendung von löslichem Erbsenprotein wurden Druckfestigkeiten von 74 kPa (1,0 % b.o.s.) bzw. 112 kPa (1,3 % b.o.s.) erreicht. Mit Caseinat wurden max. 75 kPa erreicht. Wie bereits in Abbildung 3-8 dargestellt, hätte eine weitere Erhöhung des Proteinanteils bei Caseinat zu keiner weiteren Festigkeitssteigerung geführt. Bei Erbsenprotein konnte jedoch eine Erhöhung der Festigkeit von 51 % bei Erhöhung der Proteinmenge um 30 % gemessen werden. Dass die Festigkeit bei beiden Proteintypen nach 60 min nicht weiter stieg, konnte mehrere Ursachen haben:

- Das Substrat wurde verbraucht, d.h. alle zugänglichen Lysin- und Glutaminreste wurden vernetzt
- Das Enzym wurde thermisch inaktiviert
- Durch die Gelierung wurde das Enzym im Proteinnetzwerk immobilisiert und konnte trotz vorhandener Aktivität die Reaktion nicht weiter katalysieren

Anhand von Caseinat wurde gezeigt, dass eine weitere Erhöhung der Enzymmenge nicht zu höheren Festigkeiten führte (siehe Abbildung 3-7, Seite 48), was dafür spricht, dass alle zugänglichen Lysin- und Glutaminreste vernetzt wurden. Die thermische Inaktivierung des Enzyms bei 50° C findet ebenfalls statt, jedoch wurde vermutet, dass dies aufgrund der langsamen Probenerwärmung nicht der dominierende Effekt war. Weiterführende Versuche zur Vernetzung im feuchten Zustand wurden nicht durchgeführt, da primär der Einfluss der Quervernetzung auf die Festigkeit des Formstoffs im trockenen Zustand untersucht werden sollte. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass eine Vernetzungsdauer von 60 min (bei 50° C) mit einer enzymatischen Aktivität von 25 U/g<sub>Protein</sub> für die Herstellung von (im feuchten Zustand) festen Prüfkörpern ausreichend war.

#### **3.1.4.3 Untersuchung der Druckfestigkeit getrockneter Prüfkörper nach enzymatischer Quervernetzung**

Nachdem die Vernetzung des Proteins in feuchten Prüfkörpern eine Verfestigung durch Gelbildung an den Bindemittelbrücken bewirkte, sollte der Einfluss auf die Festigkeit im getrockneten Zustand untersucht werden. Um den Einfluss unterschiedlicher Quervernetzungsgrade auf die Festigkeit von trockenen Prüfkörpern zu untersuchen, wurden Druckprüfkörper mit je 1,0 % b.o.s. Caseinat mit Variation der Enzymaktivität hergestellt und die Druckfestigkeit ermittelt (siehe Abschnitt 2.3.1.1, Seite 32).

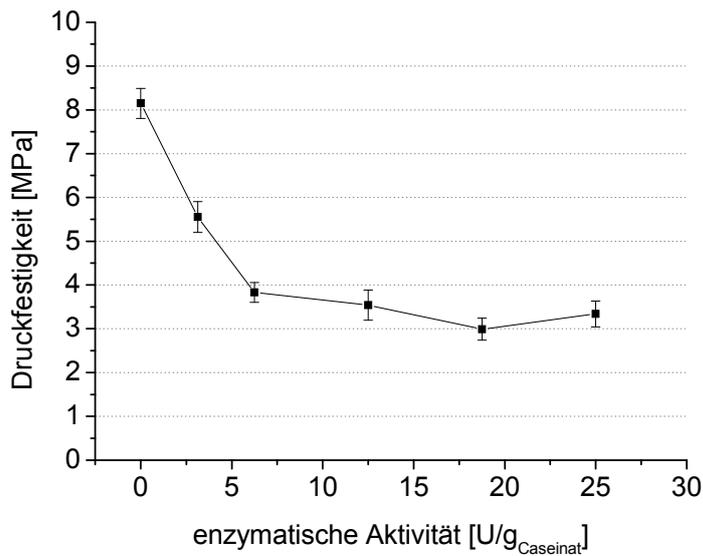


Abbildung 3-10: Einfluss der enzymatischen Aktivität auf die Druckfestigkeit von trockenem proteingebundenem Sand (1,0 % b.o.s. Caseinat). Die enzymatische Aktivität wurde in einem Bereich von 0 - 25 U/g<sub>Caseinat</sub> variiert. Die Puffermenge (Tris/HCl pH 7 20 mM) betrug vor der Trocknung 5 % b.o.s..

Wie in Abbildung 3-10 zu sehen, hatte die Enzymmenge und die damit verbundene unterschiedlich starke enzymatische Vernetzung einen großen Einfluss auf die resultierende Festigkeit.

Die Verwendung des Enzyms reduzierte die Festigkeit im trockenen Zustand bereits bei relativ kleinen Enzymmengen (3,13 U/g<sub>Caseinat</sub>) erheblich. Bei einer enzymatischen Aktivität von etwa 12 U/g<sub>Caseinat</sub> blieb die Festigkeit auf einem konstant niedrigeren Niveau von etwa 3,5 MPa, der Festigkeitsverlust betrug damit gegenüber nicht vernetzten Proben ca. 60 %.

Proben, die mit inaktiviertem Enzym hergestellt wurden, zeigten diesen Effekt nicht. Der Grund für die Abnahme der Festigkeit lag vermutlich in einer Strukturänderung des Proteins durch die enzymatische Quervernetzung. Diese Strukturänderung sollte mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen der Binderbrücken im Formstoff untersucht werden.

### 3.1.5 Untersuchungen mittels Elektronenmikroskopie

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die enzymatische Quervernetzung des Proteins im Formstoff einen unerwarteten Festigkeitsverlust verursachte. Um zu untersuchen, ob strukturelle Unterschiede zwischen dem Formstoff mit enzymatisch nichtvernetztem bzw. vernetztem Caseinat bestehen, wurden Proben mittels Elektronenmikroskopie untersucht (Abschnitt 2.3.2, Seite 34).

Für die Untersuchungen wurde trockene Prüfkörper mit 1,0 % b.o.s. Caseinat und 0,25 % b.o.s. Activa-MTG hergestellt. Für unvernetzte Prüfkörper wurde die Enzymlösung wie in

Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, inaktiviert. Die Bruchflächen der Prüfkörper wurden, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben (Seite 35), mittels Elektronenmikroskopie untersucht.

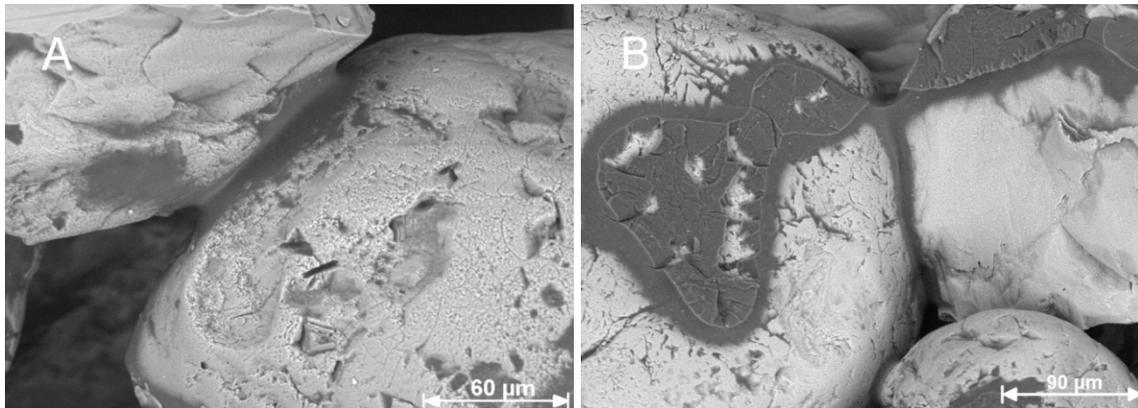


Abbildung 3-11: (ESEM-) Aufnahmen der Bruchflächen von Sandformkörpern, mit 1,0 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel ohne enzymatische Quervernetzung hergestellt wurden (hell: Sand, dunkel: Protein). Das Protein lagert sich sehr eng an den Kontaktstellen der Sandkörner an, auf freier Sandkornoberfläche wurde nahezu kein Protein gefunden.

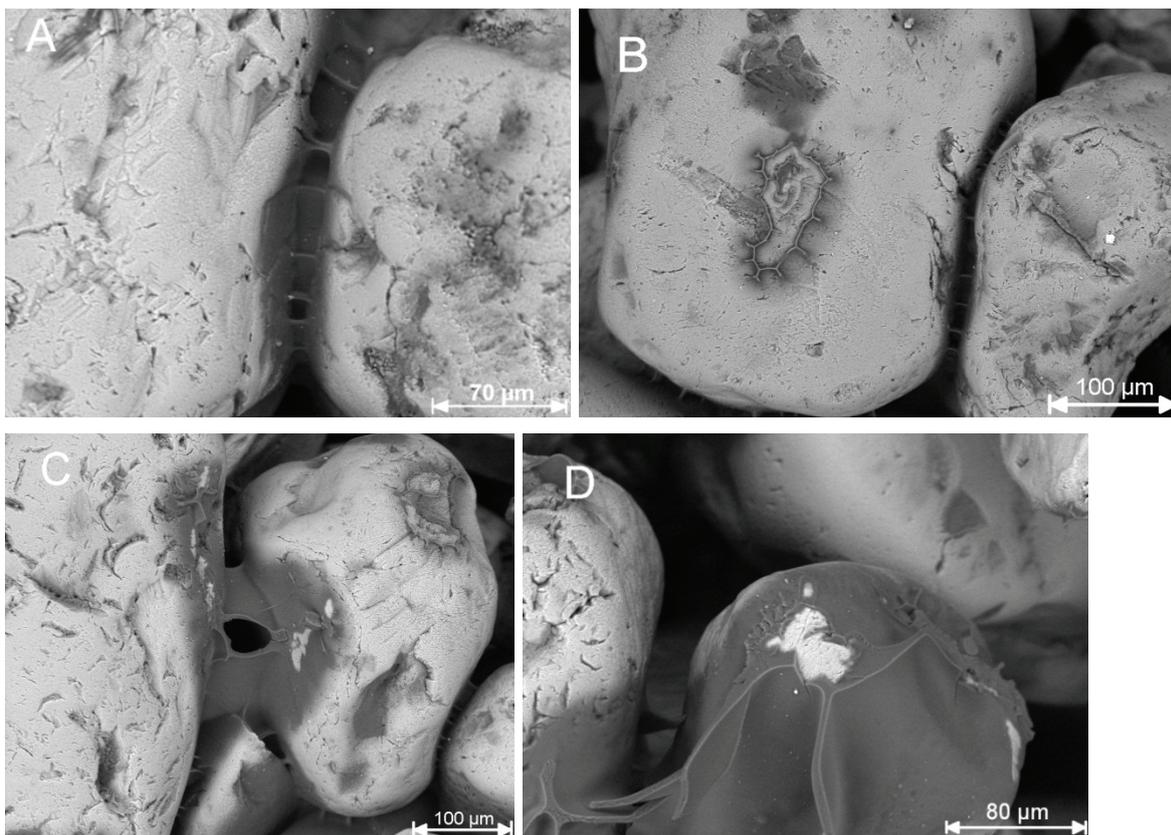


Abbildung 3-12: (ESEM-) Aufnahmen der Bruchflächen von Sandformkörpern, mit 1,0 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel mit enzymatischer Quervernetzung ( $25 \text{ U/g}_{\text{Caseinat}}$ ) hergestellt wurden. Die Proteinbrücken zeigen eine ausgeprägte Rippenstruktur (A+B) und überbrücken größere Distanzen zwischen den Sandkörnern (C). Teilweise wurden Sandkörner von Protein umhüllt (D).

Die Untersuchung der Bruchfläche bei nicht vernetztem Protein (Abbildung 3-11) zeigte, dass nahezu kein Protein auf der freien Sandoberfläche zu finden war. Das Protein wurde

lediglich an den Kontaktpunkten der Sandkörner („Zwickel“) konzentriert gefunden. Die Bruchflächen zeigten, dass es zu einem Mischbruch (Kombination von Adhäsiv- und Kohäsivbruch) der Binderbrücken kam. Dabei wurde teilweise das Bindemittel von der Sandkornoberfläche abgetrennt (Adhäsivbruch), aber es gab auch Bruchstellen innerhalb der Binderbrücke (Kohäsivbruch). An Stellen, wo die Sandkörner nicht in unmittelbarem Kontakt waren, wurde nahezu kein Protein gefunden, d.h. es wurden keine größeren Abstände ( $< 30 \mu\text{m}$ ) überbrückt. Die Oberfläche von Proben, bei denen das Protein enzymatisch vernetzt wurde, gestaltete sich ähnlich, das Protein wurde größtenteils an den Zwickeln zwischen den Sandkörnern gefunden (Abbildung 3-12 A+B). Allerdings unterschieden sich die intakten Binderbrücken optisch von denen nicht vernetzter Proben und es konnten auch teilweise mit Protein vollständig umhüllte Sandkörner gefunden werden (Abbildung 3-12 D). An den Binderbrücken war das Protein nicht gleichermaßen eng an den Zwickeln angelagert, vielmehr gab es Stellen, wo auch größere Distanzen ( $> 100 \mu\text{m}$ ) zwischen den Sandkörnern überbrückt wurden (Abbildung 3-12 C). Die Kontur der zerstörten Binderbrücken bei vernetztem Protein unterschied sich durch einen gezackten Verlauf, es war eine Art Rippenstruktur zu erkennen, die bei unvernetztem Protein nicht zu finden war. Bei unvernetztem Protein wurde dagegen eine relativ geradlinige (umlaufende) Kammlinie der zerstörten Binderbrücke beobachtet.

Anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden strukturelle Unterschiede bei unvernetztem und vernetztem Caseinat gefunden. Es wurde gezeigt, dass die Gelierung des Proteins zu einer veränderten Anlagerung des Proteins an die Kontaktflächen zwischen den Sandkörnern führte: aufgrund der Kapillarkräfte in den Zwickeln (Spaltzone an den Kontaktflächen der Sandkörner) akkumulierte sich die unvernetzte Proteinlösung an den Berührungspunkten der Sandkörner. Bei der Trocknung der Prüfkörper wurde die Lösung immer weiter eingeengt, bis schließlich das Wasser vollständig verdunstet war und das Protein als Feststoff an den Kontaktpunkten zurückblieb. Diese Proteinbrücken verhindern das Abgleiten der Sandkörner unter Kraftereinwirkung und wirken damit als Bindemittel.

Es wurde vermutet, dass durch die enzymatische Quervernetzung (und damit die Gelierung) des Proteins der Vorgang der Konzentrierung des Proteins unterbunden wird, dadurch würde an den Bindebrücken nicht die gesamte Menge Protein zur Verfügung stehen. Außerdem wurde vermutet, dass an den Kontaktpunkten ein ausgetrocknetes Gel mit geringerer Stabilität zurück bleibt (siehe Abbildung 3-13). Dies konnte jedoch nicht mittels Elektronenmikroskopie untersucht werden. Eine weitere Untersuchung der Proteinstrukturen könnte beispielsweise mittels Röntgenstreuung durchgeführt werden.

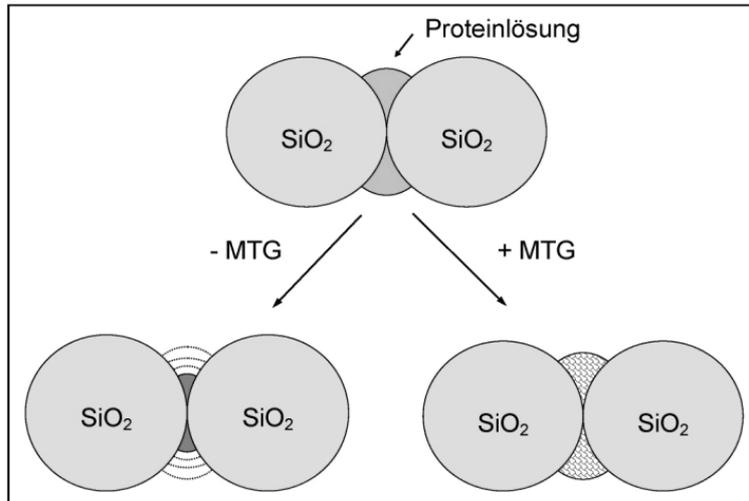


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung der Anlagerung von Protein an den Kontaktflächen der Sandkörner im Formstoff. Dargestellt ist der Unterschied zwischen unvernetzter Proteinlösung (links unten), die durch Verdampfen des Lösungsmittels eingeengt wird. Im Bild rechts unten: das gelierte Protein trocknet aus, ohne eine dichte Struktur auszubilden.

Die enzymatische Quervernetzung führte bei Caseinat-gebundenem Sand zu einer Reduktion der Druckfestigkeit. Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich dieser Effekt aus der verringerten Mobilität der Proteinlösung und damit schlechterer Anreicherung des Proteins an den Zwickeln erklären lässt.

Um diesen Effekt zu simulieren, wurden Prüfkörper (mit und ohne enzymatische QV) nicht wie üblich im Trockenschrank getrocknet, sondern das im Formstoff enthaltene Wasser durch Gefriertrocknung entfernt.

Dafür wurden feuchte Druckprüfkörper mit 1,0 % b.o.s. Caseinat und 5 % b.o.s. Pufferlösung (Tris/HCl pH 7 20 mM) hergestellt und bei 50 °C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, gefriergetrocknet. Für die enzymatische Vernetzung wurde in beiden Versuchen jeweils 25 U/g<sub>Caseinat</sub> verwendet.

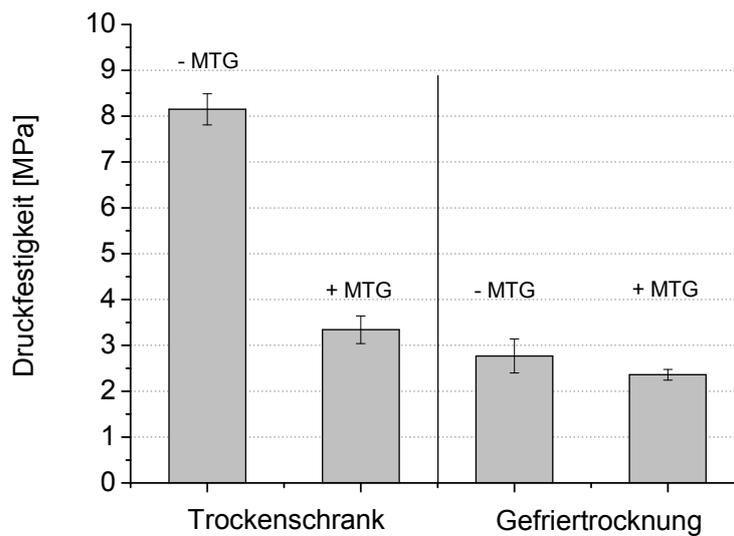


Abbildung 3-14: Einfluss der enzymatischen Quervernetzung und der Trocknungsmethode auf die Druckfestigkeit von proteingebundenem Sand. Prüfkörper wurden je mit 5 % b.o.s. Pufferlösung (Tris/HCl pH 7 20 mM) und 1,0 % b.o.s. Caseinat hergestellt. Bei Prüfkörpern mit vernetztem Protein wurden 25 U/g<sub>Caseinat</sub> verwendet. Die Trocknung erfolgte bei 95 °C im Trockenschrank bzw. durch Gefriertrocknung.

Wie in Abbildung 3-14 dargestellt, wurde durch die Gefriertrocknung die Druckfestigkeit von Prüfkörpern sowohl mit enzymatisch vernetztem als auch nicht vernetztem Protein gegenüber Prüfkörpern, die im Wärmeschrank (bei 95 °C) getrocknet wurden, reduziert.

Die Druckfestigkeit der gefriergetrockneten Proben mit enzymatischer QV lag nur leicht unter der von gefriergetrockneten Prüfkörpern ohne Quervernetzung. Es wurde gezeigt, dass die Immobilisierung der Proteinlösung durch Einfrieren zu ähnlichen (reduzierten) Druckfestigkeiten wie bei vernetztem und thermisch getrocknetem Protein führte.

Die Verringerung der Druckfestigkeit von gefriergetrockneten Prüfkörpern könnte allerdings auch andere Ursachen haben. So könnte die Tieftemperaturbehandlung der Prüfkörper durch Ausdehnungs-/ oder Schrumpfungseffekte auch zu (festigkeitsreduzierenden) Spannungen im Prüfkörper geführt haben. Zusätzliche Untersuchungen mittels ESEM wären deshalb notwendig, um mögliche Strukturunterschiede aufzuklären.

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob der gleiche festigkeitsreduzierende Effekt durch die Quervernetzung auch bei Prüfkörpern beobachtet werden kann, die mit anderen Proteinen als Bindemittel hergestellt wurden.

### 3.1.6 Enzymatische Quervernetzung anderer Proteine

Da Transglutaminase verschiedene Proteine enzymatisch vernetzen kann, sollte untersucht werden, ob der gleiche festigkeitsreduzierende Einfluss der Quervernetzung auch bei ande-

ren als Substrat fähigen Proteinen zu finden ist. Getrocknete Druckprüfkörper wurden jeweils mit Caseinat, Sojaprotein, Gelatine und der löslichen Erbsenproteinfraktion (siehe Abschnitt 2.2.2) hergestellt. Die Herstellung der Prüfkörper mit Caseinat, Gelatine und der löslichen Erbsenproteinfraktion erfolgte mit jeweils 1 % b.o.s. Protein und 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM) im Formstoffansatz (Abschnitt 2.2.1.3, Seite 28). Der pH-Wert des Formstoffs lag bei allen verwendeten Proteinen im leicht sauren Bereich (Caseinat pH  $6,3 \pm 0,3$ ; Gelatine pH  $5,2 \pm 0,3$  und Erbsenprotein pH  $6,6 \pm 0,3$ ). Caseinat, Gelatine und Erbsenprotein konnten bei diesen pH-Werten gut im Puffer gelöst werden. Bei der Verwendung von Sojaprotein wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben, dem Puffer NaOH zugesetzt (1 % b.o.s. Protein, 5 % b.o.s. Tris/HCl pH 7 20 mM). Durch die Zugabe von NaOH wurde das Sojaprotein ebenfalls löslich, der pH – Wert betrug  $6,9 \pm 0,3$ . Für die Einstellung der pH-Werte der Proteinlösungen reichte die Pufferkapazität des 20 mM Tris/HCl – Puffers (pH 7) nicht aus. Auf höhere Pufferanteile wurde verzichtet, um Einflüsse der im Prüfkörper zurückbleibenden Puffersubstanzen (Tris) zu vermeiden. Die Pufferlösung wurde lediglich dazu eingesetzt, um für das Auflösen des Enzyms definierte Bedingungen zu schaffen. Die Vernetzbarkeit der Proteine wurde in Vorversuchen anhand von Proteinlösungen überprüft. Bei Verwendung aktiver Enzymlösung (gleiches Protein-Puffer-Verhältnis, gleiche enzymatische Aktivität von  $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ ) trat eine Gelbildung ein. Für die enzymatische Quervernetzung der Proteine in den Prüfkörpern wurden jeweils  $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$  (Activa-MTG) eingesetzt.

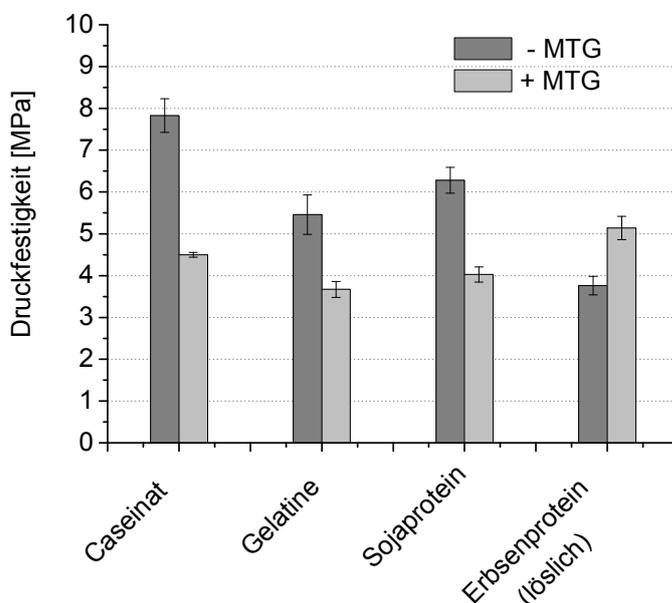


Abbildung 3-15: Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins auf die Druckfestigkeit von getrockneten proteingebundenen Prüfkörpern ( $n=5$ ), die mit je 1,0 % b.o.s. Protein hergestellt wurden. Die enzymatische Quervernetzung erfolgte jeweils mit  $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ , der Formstoff enthielt jeweils 5 % b.o.s. Pufferlösung (Tris/HCl pH 7 20 mM) vor der Trocknung. Proben ohne Quervernetzung wurden mit thermisch inaktivierter MTG - Lösung hergestellt.

Die Ergebnisse für die Proteine Caseinat, Gelatine, Sojaprotein und Erbsenprotein (lösliche Fraktion) sind in Abbildung 3-15 dargestellt. Bei Gelatine und Sojaprotein trat der gleiche festigkeitsreduzierende Effekt durch die Quervernetzung wie bei Caseinat auf.

Bei Erbsenprotein konnte jedoch eine Zunahme der Festigkeit (+ 36 %) beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob es sich nicht um Messfehler (oder andere ergebnisverfälschende Einflüsse) handelt, wurde das Experiment mit 1,5 % b.o.s. Proteinanteil im Formstoffgemisch wiederholt. Bei Caseinat wurde bereits gezeigt, dass verhältnismäßig hohe Enzymkonzentrationen ( $> 10 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ ) keinen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit von trockenen Prüfkörpern haben. Bei Verwendung von 1,5 % b.o.s. Erbsenprotein wurde der Anteil der Enzympräparation im Formstoff nicht erhöht, was zu einer Reduktion der Aktivität von  $25 \text{ U/g}_{\text{Erbsenprotein}}$  (bei 1,0 % b.o.s.) auf  $16,7 \text{ U/g}_{\text{Erbsenprotein}}$  führte. Damit konnte ein möglicher Einfluss höherer Maltodextrinanteile im Formstoff vermieden werden (siehe Abschnitt 3.1.2.).

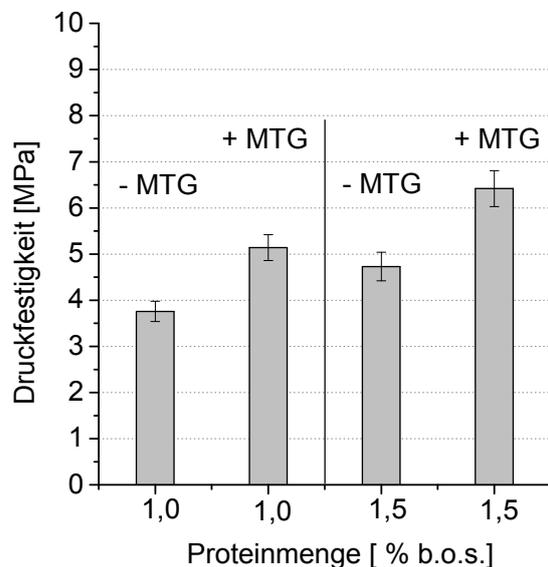


Abbildung 3-16: Vergleich der Druckfestigkeit von getrockneten Prüfkörpern, die mit Erbsenprotein (lösliche Fraktion) als Bindemittel und jeweils mit und ohne enzymatische Quervernetzung hergestellt wurden ( $16,7 \text{ U/g}_{\text{Erbsenprotein}}$  bei 1,5 % b.o.s. Protein,  $25 \text{ U/g}_{\text{Erbsenprotein}}$  bei 1,0 % b.o.s. Protein). Herstellung der Prüfkörper mit ursprünglich 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM) im Formstoff.

In Abbildung 3-16 ist der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung bei Formstoffgemischen mit löslicher Erbsenproteinfraktion dargestellt. Die enzymatische Quervernetzung bewirkte in beiden Fällen eine signifikante Festigkeitssteigerung. Bei 1,0 % b.o.s. Proteinanteil stieg die Festigkeit um 36 %, bei 1,5 % b.o.s. Proteinanteil stieg sie um 37 % gegenüber den jeweils gleichen Prüfkörperzusammensetzungen ohne Quervernetzung.

Um zu untersuchen, ob die gleichen strukturellen Änderungen auch bei Erbsenprotein auftraten, wurden ebenfalls ESEM - Aufnahmen von Probekörpern (mit und ohne Vernetzung) angefertigt.

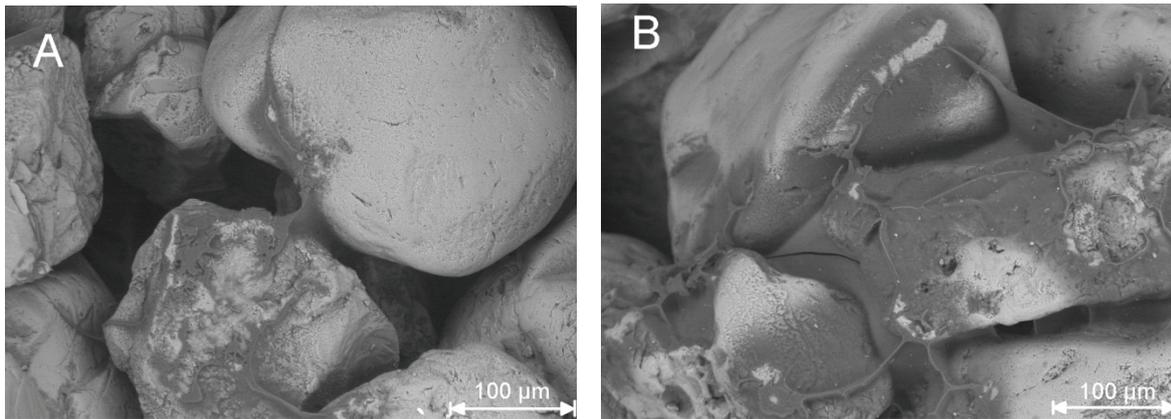


Abbildung 3-17: ESEM – Aufnahmen der Bruchfläche von Sand, der mit löslichem Erbsenprotein als Bindemittel (je 1,0 % b.o.s.) hergestellt wurde. In Bild A ist das Protein nicht enzymatisch quervernetzt, in Bild B wurde das Protein (mit 25 U/g<sub>Erbsenprotein</sub>) enzymatisch quervernetzt.

Durch ESEM – Aufnahmen von den Bruchflächen konnten die gleichen visuellen Strukturänderungen des Proteins wie bei Caseinat an den Sandkörnern nachgewiesen werden (Abbildung 3-17 A + B, siehe auch Abbildungen 8-1 und 8-2 im Anhang). Diese Strukturänderung hatte jedoch, im Gegensatz zur Verwendung anderer Proteine (Caseinat, Sojaprotein, Gelatine), keinen festigkeitsmindernden Einfluss.

Mittels SDS-Page sollte die enzymatische Quervernetzung der Proteine im Formstoff untersucht werden, um mögliche Unterschiede bei der Vernetzung der Proteine zu bestimmen.

Es ist möglich, dass die Extraktionsmethode bei der Gewinnung der einzelnen Proteine einen Einfluss auf die Molekulargewichtsverteilung hat und dass die Proteine dabei unterschiedlich denaturiert werden können. So führt beispielsweise eine extensive Wärmebehandlung häufig zur Exposition hydrophober Bereiche, durch die das Protein weniger löslich oder unlöslich wird. Außerdem kann es zur Desamidierung der Glutaminreste kommen (Abspaltung von Ammoniak von Glutamin zur Glutaminsäure), die für die enzymatische Vernetzbarkeit (mittels MTG) notwendig sind. Häufig werden bei der Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung Glutamin/Glutaminsäure gemeinsam angegeben, da eine genaue Unterscheidung aufwändigere Methoden erfordert. Um zu überprüfen, ob die Proteine bzw. alle Proteinfractionen für die enzymatische Quervernetzung tatsächlich zugänglich waren, wurde eine Gel-Elektrophorese aus Proben von (in Abschnitt 3.1.6 verwendeten) Prüfkörpern mit jeweils unvernetztem bzw. vernetztem Protein durchgeführt.

Enzymatisch vernetzbare Proteine werden durch die Bildung von Isopeptidbindungen unlöslich, nicht vernetzte Proteine/Proteinfractionen müssten dementsprechend nach der enzymatischen Behandlung weiterhin im Trenngel (an der gleichen Stelle) nachweisbar sein.

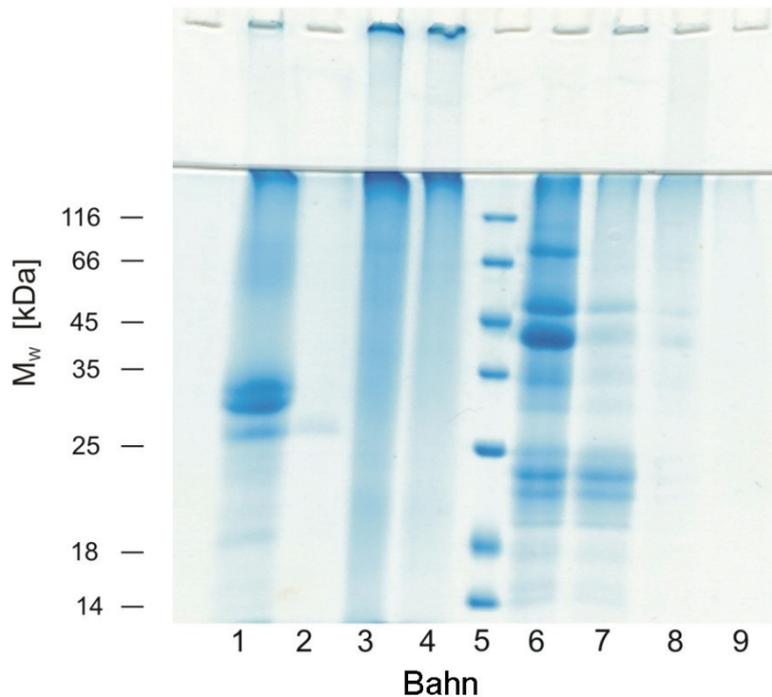


Abbildung 3-18: SDS-PAGE von verschiedenen Proteinen, welche jeweils aus Prüfkörpern mit und ohne enzymatische Quervernetzung (+MTG/-MTG) extrahiert wurden (siehe Abschnitt 0): Lane 1: Caseinat (-MTG); 2: Caseinat (+ MTG); 3: Soja (- MTG); 4: Soja (+MTG); 5: Molekulargewichtsmarker; 6: lösliches Erbsenprotein (- MTG); 7: Erbsenprotein (+ MTG), 8: Gelatine (- MTG), 9: Gelatine (+MTG)

Wie in Abbildung 3-18 gezeigt, waren bei Prüfkörpern mit enzymatischer QV die Proteine in unterschiedlichem Maße unlöslich geworden. Bei Casein konnten fast keine niedermolekularen Proteinbanden nach der Quervernetzung nachgewiesen werden (außer Spuren von  $\kappa$ -Casein, Bahn 2), bei Sojaprotein wurden bereits vor der Vernetzung hochmolekulare Bestandteile im Sammelgel zurückgehalten (Bahn 3), jedoch war eine Abnahme der Proteinmenge nach Vernetzung zu beobachten (Bahn 4). Von dem löslichen Erbsenprotein wurden nicht alle Fraktionen vernetzt. Besonders im Bereich zwischen 18 – 25 kDa findet sich kaum eine Verringerung der Proteinmenge (Bahn 7). Dagegen waren die hochmolekularen Fraktionen (>25 kDa) gut vernetzbar. Gelatine konnte auch im unvernetzten Zustand nur schwer nachgewiesen werden, da die natürliche Gelierung das Protein im Probenpuffer (bei RT) ebenfalls schwer löslich macht.

Mittels SDS-Page wurde gezeigt, dass Casein, Sojaprotein und lösliches Erbsenprotein durch die Quervernetzung unlöslich bzw. weniger löslich wurden. Dieser Effekt könnte in der industriellen Verwendung bei der Kernherstellung von Vorteil sein.

In der Kernherstellung werden bevorzugt wässrige Kernschichten zur Verbesserung der Kernoberfläche benutzt, jedoch ist dies nicht bei allen Bindemitteltypen ohne weiteres möglich. Um zu überprüfen, ob die Vernetzung das Protein soweit unlöslich gemacht hatte, dass es durch Wasser aus dem Prüfkörper nicht mehr herausgelöst wird, wurde je ein Caseinat-

gebundener Prüfkörper (1 % b.o.s. Caseinat, ohne und mit enzymatischer QV (25 U/g<sub>Caseinat</sub>)) in Wasser (bei RT) gelegt.

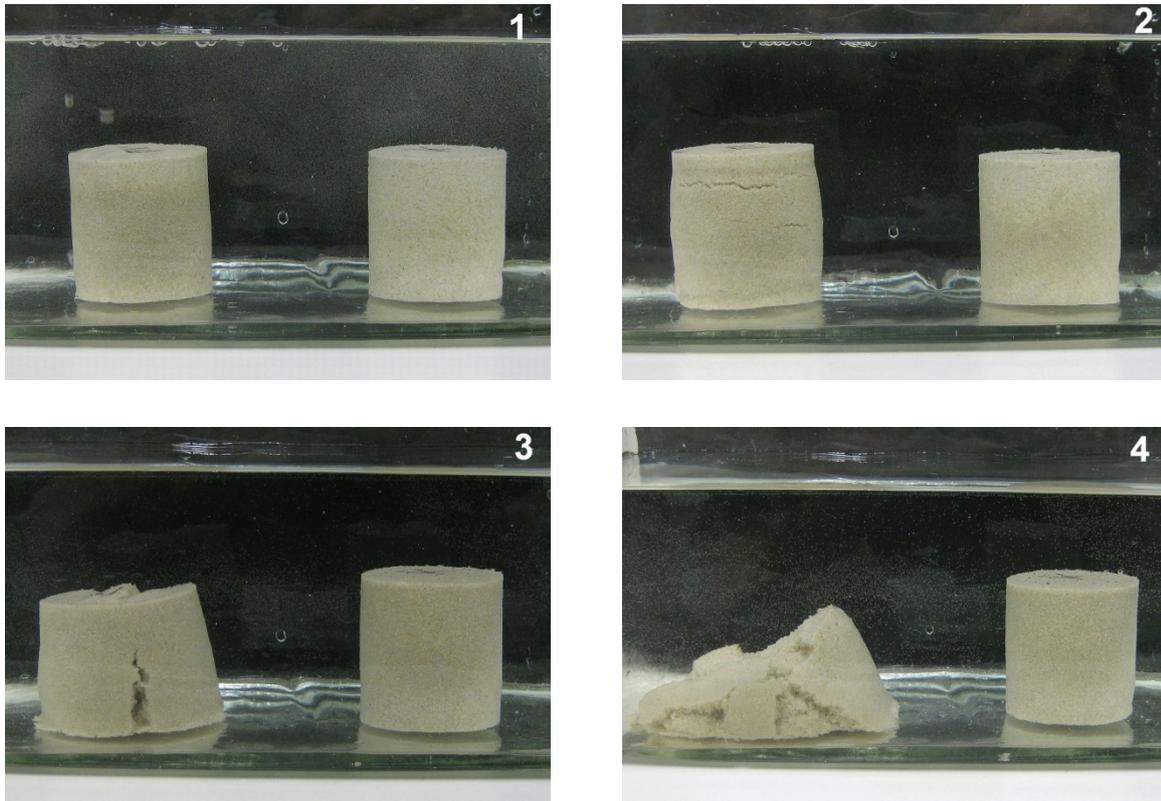


Abbildung 3-19: Vergleich der Formstabilität von Caseinat-gebundenen Druckprüfkörpern in Wasser bei Raumtemperatur. Die getrockneten Prüfkörper wurden mit 1,0 % b.o.s. Caseinat hergestellt. Der Prüfkörper links wurde mit inaktivierter MTG, rechts mit enzymatischer Quervernetzung des Proteins hergestellt (25 U/g<sub>Caseinat</sub>). Zeitverlauf: Bilder 1-4: 1: unmittelbar nach dem Eintauchen, 2: nach 1 min, 3: nach 10 min, 4: nach 20 min.

Wie in Abbildung 3-19 zu sehen ist, löste sich die Struktur des Prüfkörpers ohne enzymatische QV innerhalb kurzer Zeit auf (im Bild links), da das Protein in Lösung ging. Der Prüfkörper mit enzymatisch vernetztem Protein hingegen änderte sich äußerlich nicht. Das vernetzte Protein löste sich nicht im Wasser und der Prüfkörper konnte nach 20 min Lagerung von Hand entnommen werden.

### 3.1.7 Verwendung einer genetisch optimierten Transglutaminase

Die Zusammensetzung der in den vorangegangenen Versuchen verwendeten, kommerziellen Transglutaminasepräparation war nicht vollständig bekannt, außer der Tatsache dass nur 1 % (m/m) aktives Enzym sowie große Mengen Dextrin (ca. 99 % (m/m)) enthalten sind (Herstellerangabe Ajinomoto). Für eine in Nutzung in werkstofflichen oder insbesondere pharmazeutischen Anwendungen könnte es erforderlich sein, die Transglutaminase in möglichst

reiner Form zu verwenden. Ebenso ist hohe spezifische Aktivität wünschenswert, um die einzusetzende Menge an Enzym reduzieren zu können. Eine genetisch optimierte Transglutaminase (siehe Abschnitt 2.1.4), bei der an 2. Stelle der Primärstruktur die Aminosäure Serin gegen Prolin ausgetauscht ist, (MTG-S2P) wurde deshalb für die folgenden Versuche verwendet. Die spezifische Aktivität beider Enzyme ( $\text{U}/\text{mg}_{\text{Enzym}}$ ) unterscheidet sich jedoch erheblich voneinander. Die spezifische Aktivität der Activa-MTG liegt bei etwa  $23 \text{ U}/\text{mg}_{\text{Protein}}$  [Ando et al., 1989], während die spezifische Aktivität der MTG-S2P über einen weiten Temperaturbereich etwa doppelt so hoch ist [Marx, 2008]. Für die Versuche mit der MTG-S2P – Variante wurde stets ein Tris/HCl – Puffer (50 mM, pH 8, 300 mM NaCl) verwendet, da das NaCl die Löslichkeit der S2P-MTG verbesserte. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde zunächst die enzymatische Aktivität beider Enzyme (Activa-MTG und MTG-S2P) per Hydroxamattest (siehe Abschnitt 2.3.3) bestimmt. Der Vergleichsversuch mit Activa-MTG wurde mit dem gleichen Puffer (wie oben) durchgeführt. Im folgenden Versuch wurden verschiedene Enzymaktivitäten eingesetzt, um feuchte, quervernetzte Prüfkörper mit je 1,0 % b.o.s. Erbsenprotein (lösliche Fraktion) herzustellen. Durch Zugabe von je  $25 \text{ U}/\text{g}_{\text{Erbsenprotein}}$  (Activa-MTG bzw. S2P-MTG) bzw.  $40 \text{ U}/\text{g}_{\text{Erbsenprotein}}$  (MTG-S2P) wurde das Erbsenprotein quervernetzt und die Festigkeitszunahme im Zeitverlauf gemessen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse sicherzustellen, wurde bei den Versuchen mit MTG-S2P das Maltodextrin aus der Activa-MTG zugesetzt (aus getrockneter, inaktivierter Activa – Lösung).

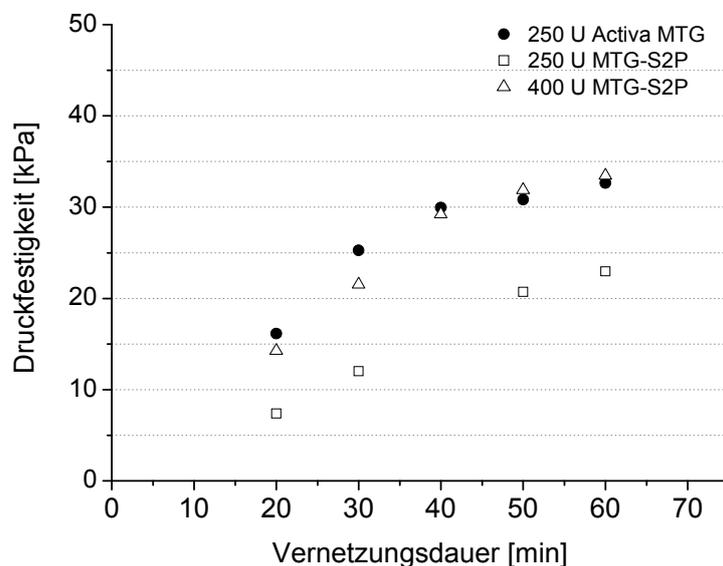


Abbildung 3-20: Einfluss der enzymatischen Quervernetzung auf die Druckfestigkeit von feuchten Prüfkörpern. Herstellung mit jeweils 1,0 % b.o.s. lösliches Erbsenprotein und 5 % b.o.s. Tris/HCl – Puffer (50 mM, pH 8 mit 300 mM NaCl). Verwendete Transglutaminasen: Activa-MTG ( $25 \text{ U}/\text{g}_{\text{Protein}}$ ) und MTG-S2P ( $25 \text{ U}/\text{g}_{\text{Protein}}$  bzw.  $40 \text{ U}/\text{g}_{\text{Protein}}$ ), die Vernetzung fand bei  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  statt.

Die Verwendung von  $40 \text{ U}_{\text{S2P}}/\text{g}_{\text{Erbsenprotein}}$  resultierte in einer gleich hohen Festigkeit (ca. 35 kPa maximal) wie bei Verwendung von  $25 \text{ U}_{\text{MTG}}/\text{g}_{\text{Erbsenprotein}}$  (Abbildung 3-20). Die Festigkeit war bei der S2P – Variante mit gleicher enzymatischer Aktivität geringer als bei Verwendung der Activa-MTG. Bei Einsatz der gleichen enzymatischen Aktivität wäre auch eine gleiche Festigkeitssteigerung zu erwarten gewesen.

Bezogen auf die Aktivität von  $400 \text{ U}_{\text{MTG-S2P}}$  bzw.  $250 \text{ U}_{\text{Activa}}$  wurden bei Verwendung beider Transglutaminasen etwa gleiche Stoffmengen (Enzymmoleküle) eingesetzt. Da das Enzym durch die Quervernetzung selber seinen Bewegungsradius im Proteinnetzwerk verringert und auch die Beweglichkeit der Substratmoleküle eingeschränkt ist, könnte die Anzahl der Quervernetzungen stärker von der Stoffmenge (Anzahl der Enzymmoleküle) als von der spezifischen Aktivität abhängen.

Insgesamt wiesen beide Probentypen eine geringe absolute Festigkeit der Prüfkörper auf. Gegenüber Prüfkörpern, die mit dem Standardpuffer unter gleichen Bedingungen hergestellt wurden, sank die Festigkeit im feuchten Zustand auf etwa 50 % (vgl. mit Abbildung 3-9, Abschnitt 3.1.4.2). Die Gründe dafür sind nicht bekannt. Es ist allerdings bekannt, dass die Aktivität von Enzymen nicht nur abhängig vom pH-Wert und der Temperatur ist, sondern insbesondere auch bei der Transglutaminase die Anwesenheit von Salz-Ionen einen starken Einfluss auf die Aktivität hat. So zeigten beispielsweise zweiwertige Metallionen ( $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ ) eine Verringerung der enzymatischen Aktivität, während einwertige Metallionen (z.B.  $\text{Na}^+$ ) eine leicht stabilisierende Wirkung zeigten [Kuetemeyer et al., 2005]. Außerdem ist es möglich, dass die Proteine in Anwesenheit von Salzionen unterschiedlich quervernetzt werden (geänderte Konformation).

### 3.1.8 Einfluss von Salzen auf die Festigkeit

Für die vollständige Resolubilisierung der MTG-S2P war ein NaCl-haltiger Puffer erforderlich. Die Ergebnisse aus Abschnitt 3.1.7 zeigten, dass die Festigkeit von feuchten Prüfkörpern (siehe auch Abschnitt 3.1.4.1) durch die Verwendung eines anderen Puffers (Tris/ HCl 50 mM, pH 8, 300 mM gegenüber Tris/ HCl 20 mM, pH 7, kein NaCl) signifikant sank. Daher sollte der Einfluss von verschiedenen Salzen (NaCl,  $\text{CaCl}_2$ , KCl) auf die enzymatische Quervernetzung der Proteine in den Prüfkörpern untersucht werden. Um einen möglichen Einfluss des unterschiedlichen pH-Wertes des in Abschnitt 3.1.7 verwendeten Puffers (pH 8) auszuschließen, wurde als Lösungsmittel Tris/HCl - Puffer (20 mM) mit pH 7 verwendet. Dieser Puffer wurde durch Zugabe der entsprechenden Salze auf jeweils 300 mM Salzkonzentration eingestellt. Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte nicht mittels Hydroxamattest, da die Interaktion der MTG mit den Proteinmolekülen in diesem Test nicht abgebildet werden kann. In Abbildung 3-21 sind die Festigkeiten der feuchten, vernetzten Prüfkörper dargestellt.

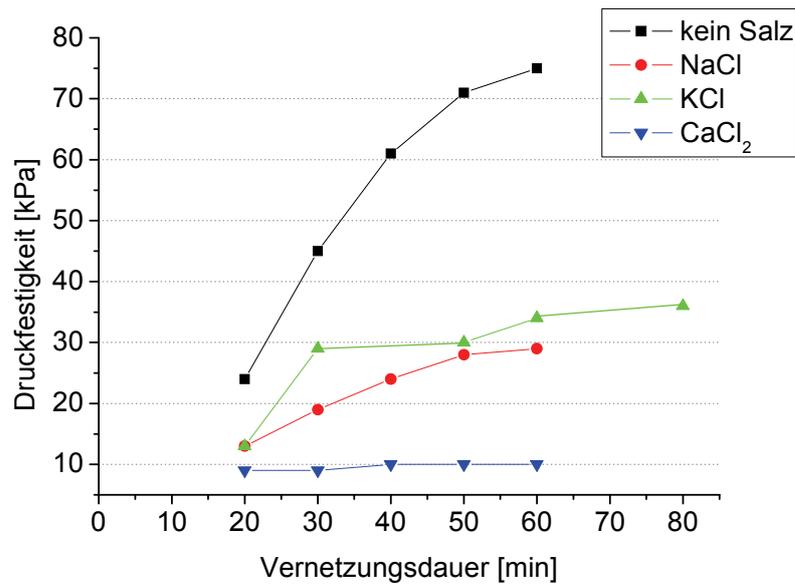


Abbildung 3-21: Einfluss verschiedener Salze auf die enzymatische Quervernetzung von Caseinat und daraus resultierende Änderung der Druckfestigkeit feuchter proteingebundener Formkörper. Sämtliche Proben wurden mit 1 % b.o.s. Caseinat sowie 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl 50 mM, pH 8) hergestellt. Der Puffer enthielt jeweils 300 mM des Salzes, die Enzymaktivität betrug jeweils 25 U/g<sub>Caseinat</sub>.

Wie in Abbildung 3-21 erkennbar ist, reduzierte jede Art der Salzzugabe die Festigkeit im feuchten Zustand, jedoch in unterschiedlich starkem Maße. NaCl und KCl verringerten die Festigkeit deutlich auf 30 – 40 % der Festigkeit, die ohne Salz erreicht wurde. Die Proben, bei denen CaCl<sub>2</sub> verwendet wurde, zeigten extrem geringe Festigkeiten (an der unteren Grenze des Messbereichs). Von einer Quervernetzung konnte bei der Verwendung von CaCl<sub>2</sub> deshalb nicht ausgegangen werden.

Die Ursache für den negativen Einfluss aller verwendeten Salze wurde anhand trockener Prüfkörper weiter untersucht, da nicht klar war, ob es sich um einen Einfluss auf die Aktivität der MTG oder auf die Struktur des Caseinats handelte. Dafür wurden Prüfkörper wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschreiben, hergestellt. Die Pufferlösung (Tris/HCl 50 mM, pH 8) enthielt je 300 mM NaCl, KCl oder CaCl<sub>2</sub>.

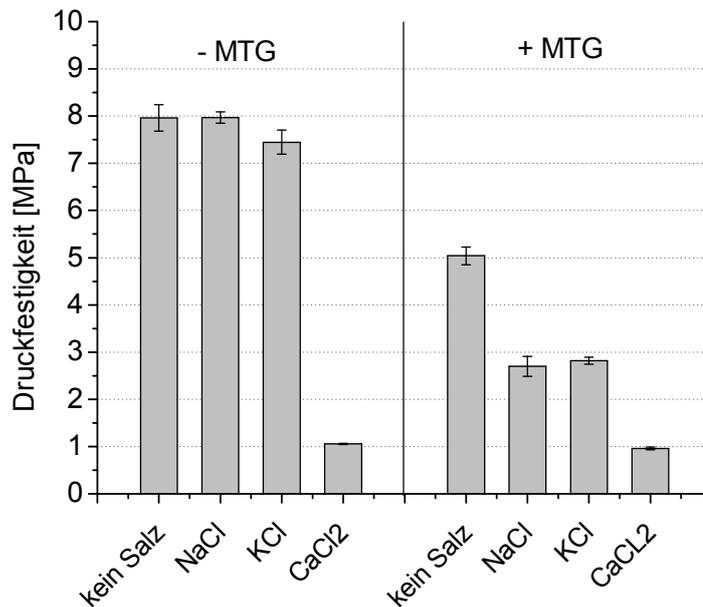


Abbildung 3-22: Einfluss verschiedener Salze auf die enzymatische Quervernetzung von Proteinen und daraus resultierende Änderung der Druckfestigkeit trockener proteingebundener Formkörper. Sämtliche Proben wurden mit 1 % b.o.s. Caseinat sowie 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl 50 mM, pH 8) hergestellt. Der Puffer enthielt jeweils 300 mM des Salzes. Bei vernetztem Protein betrug die Enzymaktivität jeweils 25 U/g<sub>Caseinat</sub>.

Die Verwendung der Salze NaCl und KCl bei trockenen Prüfkörpern ohne Quervernetzung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit (Abbildung 3-22). Bei trockenen Prüfkörpern mit enzymatisch quervernetztem Protein sank die Druckfestigkeit bei Verwendung von NaCl und KCl um jeweils etwa 65 % gegenüber unvernetztem Caseinat. Bezogen auf das vernetzte Caseinat ohne Salzzugabe sank also die Festigkeit erneut um 50 %. Der Festigkeitsverlust im trockenen Zustand durch die enzymatische Quervernetzung entsprach früheren Ergebnissen (Abschnitt 3.1.4.3). Es blieb jedoch offen, weshalb NaCl und KCl im trockenen Zustand einen weiteren festigkeitsreduzierenden Einfluss hatten. Bei der Verwendung von CaCl<sub>2</sub> war ein starker Festigkeitsabfall (ca. 78 %) sowohl bei unvernetztem als auch bei vernetztem Protein im trockenen Zustand zu beobachten (Abbildung 3-22).

CaCl<sub>2</sub> hatte offensichtlich einen deutlichen Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins, so dass weder eine Quervernetzung noch ein entsprechendes Bindevormögen zwischen Sand und Protein zustande kam. Aus der Literatur ist die Fällung von Casein mittels Calcium-Ionen bekannt [Zittle et al., 1957]. Die Fällung des Caseinats konnte auch anhand von ESEM – Aufnahmen bestätigt werden, bei denen das Protein offensichtlich nicht mehr in der Lage war, in die Zwickel zu migrieren (Abbildung 3-23).

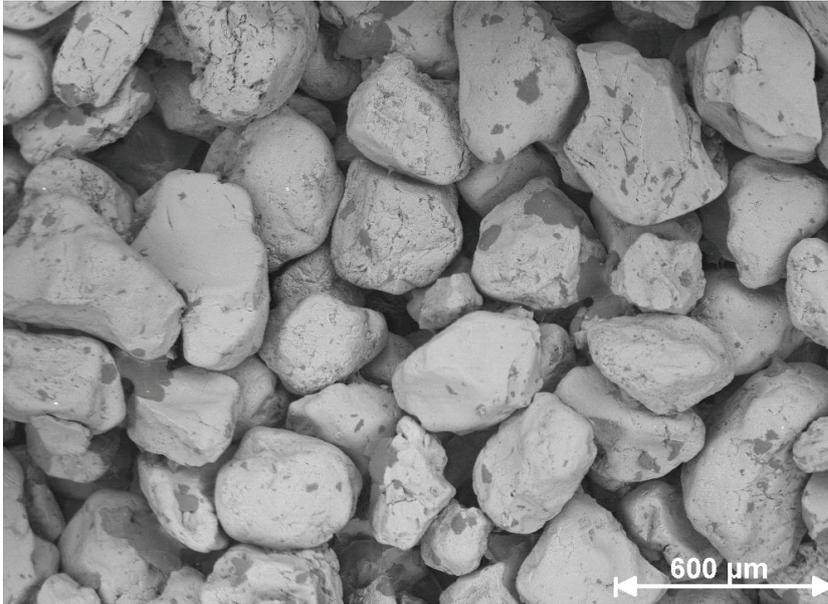


Abbildung 3-23: ESEM – Aufnahme von proteingebundenem Sand. Bindemittel: 1,0 % b.o.s. Caseinat, verwendeter Puffer bei Herstellung: 5 % b.o.s. Tris/HCl pH 7, 20 mM, 300 mM  $\text{CaCl}_2$ .

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass  $\text{CaCl}_2$  einen negativen Einfluss auf die Raumstruktur und die enzymatische Quervernetzung des Caseins hat. Ob dies auch für andere Proteine zutrifft, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

### 3.1.9 Temperaturstabilität und Recycling von Sand mit Caseinat als Bindemittel

#### 3.1.9.1 Temperaturstabilität von Caseinat-gebundenem Sand

Die verschiedenen Anforderungen an Bindemittel bezüglich ihres Temperaturverhaltens wurden in Abschnitt 1.1.2 einleitend erörtert. Zudem wurde das thermische Recycling von proteingebundenem Sand untersucht, da in Gießereien erhebliche Mengen Altsand anfallen, der durch mehrfaches Recycling wiederverwendet werden könnte. Zunächst wurde das Festigkeitsverhalten von Caseinat-gebundenem Formstoff bei höheren Temperaturen untersucht.

Trockene Prüfkörper wurden (entsprechend Abschnitt 2.2.1.3) mit 0,7 % b.o.s. Caseinat und 5 % b.o.s. Tris/ HCl 20 mM, pH 7 - Puffer ohne enzymatische QV hergestellt. Nach entsprechender Konditionierung und Lagerung im Exsikkator bei 50 % r.F. wurden die Prüfkörper in einem Ofen verschiedenen Temperaturen (200/300/400 °C) oxidierender Atmosphäre (Luft) ausgesetzt. In festgelegten Zeitintervallen wurden jeweils Prüfkörper aus dem Ofen entnommen. Nach Abkühlung der Proben auf RT wurde deren Druckfestigkeit bestimmt.

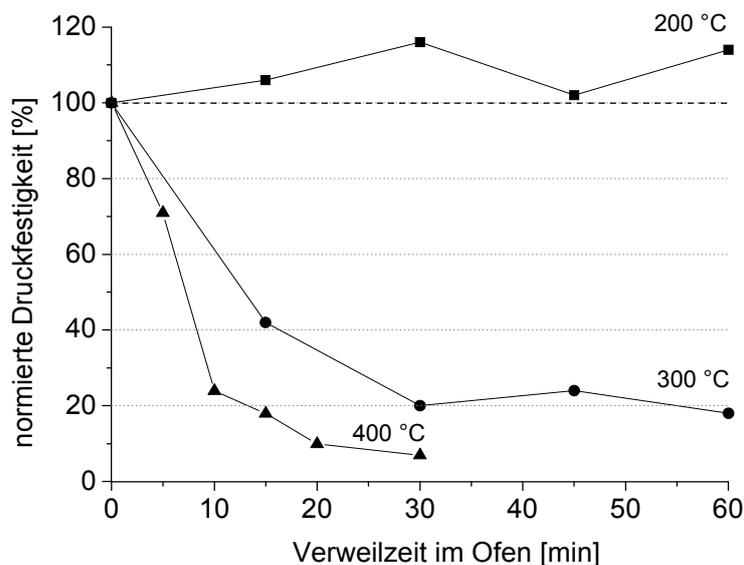


Abbildung 3-24: Einfluss der thermischen Belastung auf die Druckfestigkeit proteingebundener Prüfkörper. Die Herstellung erfolgte mit 0,7 % b.o.s. Caseinat und 5 % b.o.s. Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM. Der Referenzwert (100 %) wurde aus thermisch nichtbelasteten Prüfkörpern (n=4) ermittelt. Die Prüfung der thermisch belasteten Proben erfolgte jeweils nach Abkühlung auf RT (n=1).

Wie man Abbildung 3-24 entnehmen kann, wurde bei 200 °C keine Reduktion der Festigkeit über einen Zeitraum von 60 min festgestellt, allerdings war bei den Einzelmesswerten eine verhältnismäßig hohe Streuung der Messwerte um den Vergleichswert (nicht wärmebehandelte Prüfkörper) zu beobachten. Bei Temperaturen von 300 °C bzw. 400 °C fiel die Festig-

keit sehr stark ab, so dass bereits bei 300 °C nach weniger als 15 min (300 °C) die Festigkeit unter 50 % des Anfangswertes der Referenzproben gefallen war. Bei 400°C fiel die Festigkeit bereits nach 10 min auf weniger als 25 % der Ausgangsfestigkeit, nach 30 min wurden weniger als 10 % der Ausgangsfestigkeit gemessen.

Der Festigkeitsverlust der Prüfkörper lässt sich nicht unmittelbar auf reale Gusskerne übertragen, da das eingebrachte Schmelzevolumen bzw. das Verhältnis Schmelzemasse zu Formstoffmasse stark variieren können. Es konnte allerdings festgestellt werden, dass die Festigkeit in der unmittelbaren Nähe der Metallschmelze (Wärmeinflusszone) relativ schnell sinkt und damit die Entformbarkeit von Gussteilen begünstigen würde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Caseinat ein relativ temperaturstabiles Protein ist, da bei 200 °C kein Festigkeitsverlust über 60 min festgestellt wurde. Dies ist wiederum für die Herstellung von Gussformen relevant, da eine schnelle Trocknung des feuchten Formstoffes bei hohen Temperaturen kurze Taktzeiten ermöglichen würde.

### **3.1.9.2 Glühverlustbestimmung**

Mittels Glühverlustbestimmung wurde in Anlehnung an die VDG-Richtlinie P 33 [VDG, 1987] untersucht, bei welcher Temperatur eine nahezu rückstandsfreie Entfernung des Bindemittels (Proteins) möglich ist. In der VDG - Richtlinie P 33 wird der Glühverlust bei 900 °C anhand von Proben von 10 g bestimmt. Die Proben werden bis zur Gewichtskonstanz, mindestens jedoch 3 h in oxidierender Atmosphäre ausgeglüht und die Massenabnahme bestimmt. Da für die verwendeten Proteine eine geringere Zersetzungstemperatur erwartet wurde, wurden die Proben abweichend von dieser Richtlinie bei niedrigeren Temperaturen (350 °C – 500 °C) für 3 h in oxidierender Atmosphäre ausgeglüht. Der Glühverlust von reinem Sand wurde ebenfalls bestimmt und in die Bilanzierung einbezogen.

Der Glühverlust wurde anhand von Prüfkörpern mit 1,0 % b.o.s. Caseinat (ohne enzymatische QV) als Bindemittel bestimmt. Die Proben wurden bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Bereich von 350 °C – 500 °C für 3 h erhitzt und der Masseverlust als Funktion der Temperatur aufgenommen.

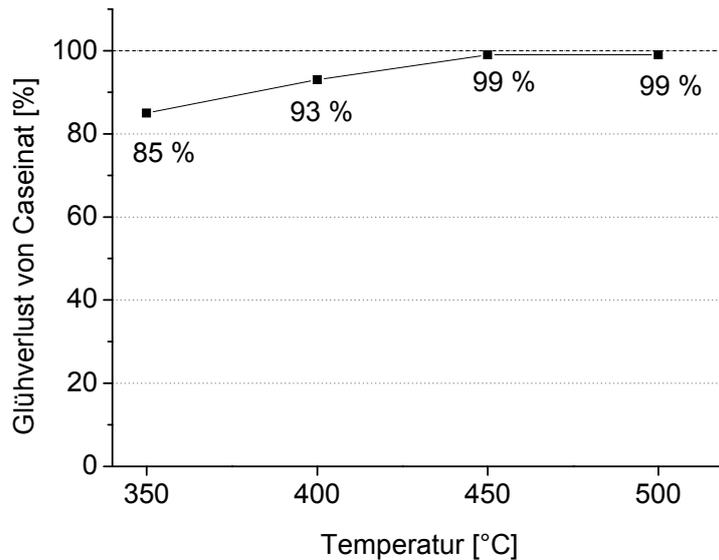


Abbildung 3-25: Glühverlust von Caseinat in Abhängigkeit von der Temperatur nach 3 h Lagerung in oxidierender Atmosphäre (Luft). Das Caseinat lag adsorbiert an Sand vor (1 % b.o.s. Caseinat)

Wie Abbildung 3-25 zu entnehmen ist, stieg der Masseverlust des Bindemittels in dem Intervall von 350 °C auf 450 °C von 85% auf 99%. Ein weiterer Masseverlust bei höheren Temperaturen (500 °C) konnte nicht festgestellt werden. Wie in Abbildung 3-24 (Abschnitt 3.1.9.1) bereits gezeigt wurde, sank die Festigkeit von Druckprüfkörpern nach 30 min bei 400 °C auf 7% der Ausgangsfestigkeit. Bei einer Glühtemperatur von 450 °C für 3 h war daher von einer vollständigen Aufhebung des Bindeeffektes auszugehen.

### 3.1.9.3 Thermische Formstoffaufbereitung

Die thermische Aufbereitung von gebrauchtem Gießereisand ist üblich, um eine hohe Recyclingquote von Altsand zu erreichen, meist muss jedoch ein Teil Neusand (ca. 15 %) zugesetzt werden, da die Aufbereitung einen Qualitätsverlust des Sandes bewirkt [Harris und Lafarge, 2006]. Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass das Caseinat bei einer Temperatur von 450 °C innerhalb von 3 h nahezu vollständig aus dem Formstoff entfernt werden konnte. Anhand von Wiederholversuchen sollte ermittelt werden, inwieweit die Festigkeit von regeneriertem Sand nach erneutem Bindemittelzusatz durch die bei der Verkohlung des Proteins entstandenen Rückstände beeinflusst wird.

Prüfkörper für den Druckversuch wurden nach Standardmethode mit 0,7 % b.o.s. Caseinat hergestellt und deren Druckfestigkeit ermittelt. Anschließend wurde der Prüfkörperbruch für 3 h bei 450 °C in einem Muffelofen ausgebrannt und für die erneute Prüfkörperherstellung (nach Standardmethode mit 0,7 % b.o.s. Caseinat) ohne einen weiteren Reinigungsschritt oder Zusatz von Neusand verwendet.

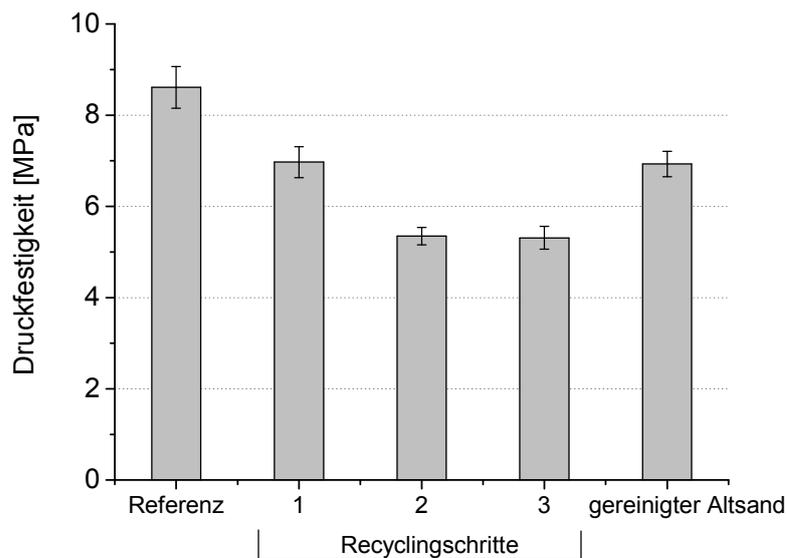


Abbildung 3-26: Änderung der Druckfestigkeit von Caseinat-gebundenem Formstoff in Abhängigkeit von der Zahl der Recyclingschritte. Getrocknete Prüfkörper wurden mit 0,7 % b.o.s. Caseinat hergestellt und die Druckfestigkeit gemessen. Der Prüfkörperbruch wurde 3 h bei 450 °C an Luft erhitzt (das Protein verbrannt) und zur erneuten Prüfkörperherstellung unter Verwendung neuen Proteins (wieder 0,7 % b.o.s. zugegeben) benutzt.

Wie Abbildung 3-26 zu entnehmen ist, sank die Festigkeit nach dem ersten und zweiten Recyclingschritt, blieb jedoch beim dritten Recyclingschritt gleich. Das heißt die erreichbare Festigkeit des Formstoffes wurde durch die Recyclingschritte negativ beeinflusst. Nach dem dritten Recycling wurde der Sand mit der gleichen Masse Wasser gespült und nach der Trocknung erneut für die Prüfkörperherstellung verwendet. Die Reinigung des 3-fach recycelten Sandes führte zu einer Festigkeitserhöhung um 23 % und damit auf das Niveau von 1-fach recyceltem Sand. Es wurde angenommen, dass sich hauptsächlich der akkumulierende Ascheanteil des Bindeproteins im Sand negativ auf die erreichbaren Festigkeiten auswirkte. Der Ascheanteil konnte durch Waschen des Sandes erheblich reduziert werden, was auch anhand von ESEM-Aufnahmen gezeigt werden konnte (siehe Abbildung 8-5 und Abbildung 8-4, siehe Anhang). Das ausschließlich thermische Recycling von proteingebundenem Formsand ist daher nicht geeignet, um den Sand vollständig zu regenerieren. Alternativ könnte jedoch eine mechanische Reinigung zur Entfernung des Ascheanteils in Frage kommen.

#### 3.1.9.4 Nassrecycling des Formstoffes

Für das Nassrecycling von proteingebundenem Formsand wurden zwei verschiedenen Varianten untersucht, die sich beide auf thermisch nicht belasteten Sand bezogen. In der ersten Variante wurde das Entfernen des unvernetzten bzw. enzymatisch vernetzten Proteins durch Waschen des Sandes untersucht. In der zweiten Variante sollte untersucht werden, ob en-

zymatisch nicht vernetzter Sand durch einfache Rehydrierung des Formstoffes für die erneute Formfertigung verwendet werden kann.

Bei der thermischen Regenerierung des Sandes war es nicht relevant, ob der Formstoff bereits thermisch belastet war (Wärmeeinflusszone durch Gussteile) oder nicht. Die folgenden Untersuchungen bezogen sich auf Sand, der beispielsweise bei der Kernherstellung übrig bleibt oder von Ausschussteilen stammen kann, die nicht im Abguss verwendet wurden.

Ebenso war bei der thermischen Regenerierung die enzymatische Quervernetzung des Proteins unbedeutend, da das Protein vollständig thermisch zerstört wurde. Bei der Reinigung durch Lösungsmittel (Wasser/Puffer) spielte allerdings die enzymatische Quervernetzung eine entscheidende Rolle, da das Protein im quervernetzten Zustand größtenteils nicht mehr wasserlöslich ist.

Bei Formsand mit enzymatisch nicht vernetztem Protein konnten mittels Puffer mehr als 90 % des Proteins wieder entfernt werden, während nur etwa 70 % des Proteins mit demineralisiertem Wasser entfernt werden konnten (Abbildung 3-27).

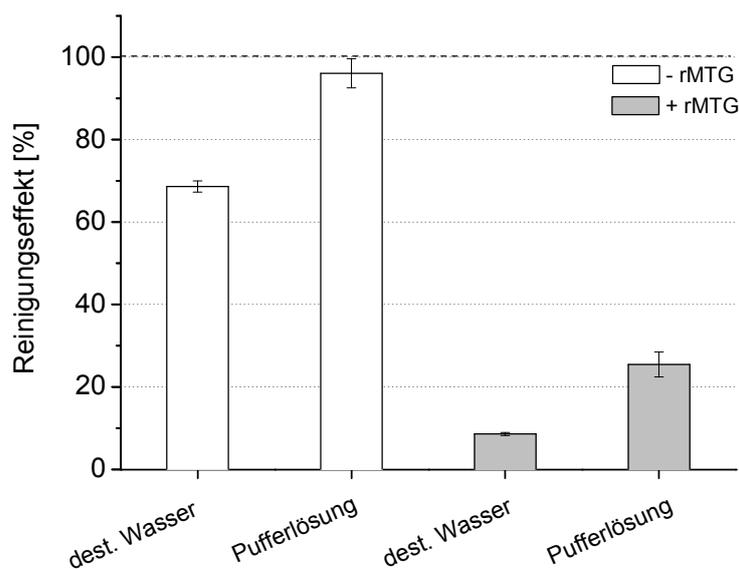


Abbildung 3-27: Reinigungseffekt nach dem Waschen von proteingebundenem Formsand. Der Formsand enthielt 1,0 % b.o.s. Caseinat, bei enzymatischer Quervernetzung wurden 20 U/g<sub>Caseinat</sub> rMTG eingesetzt. Der Sand wurde bei 50 °C gewaschen, als Puffer wurde Tris/HCl 50 mM pH 8 verwendet.

Wie in Abbildung 3-27 ebenfalls dargestellt, konnte bei enzymatisch vernetztem Protein im Vergleich zu unvernetztem Bindemittel wesentlich weniger Protein aus dem Sand entfernt werden (10 % bzw. 30 % für dH<sub>2</sub>O / Pufferlösung). Wie bereits zuvor erwähnt, war das vernetzte Protein größtenteils wasserunlöslich, der geringe Massenverlust resultierte vermutlich aus mechanischem Abrieb (Protein) von der Sandoberfläche während des Waschens. Die

Regenerierung des Formstoffes mit enzymatisch vernetztem Protein war also nicht durch alleiniges Waschen des Sandes möglich.

Eine Möglichkeit, das durch die Vernetzung unlöslich gewordene Protein zu entfernen bestand darin, das Protein mithilfe einer Protease in kleinere, besser lösliche Peptide zu spalten und somit den Sand im Nassverfahren von anhaftendem Protein zu reinigen.

Eine kommerziell erhältliche Protease (*Bacillus lentus* alkalische Protease = BLAP) wurde dazu benutzt, das auf der Sandoberfläche vernetzte Protein in lösliche Peptide zu spalten.

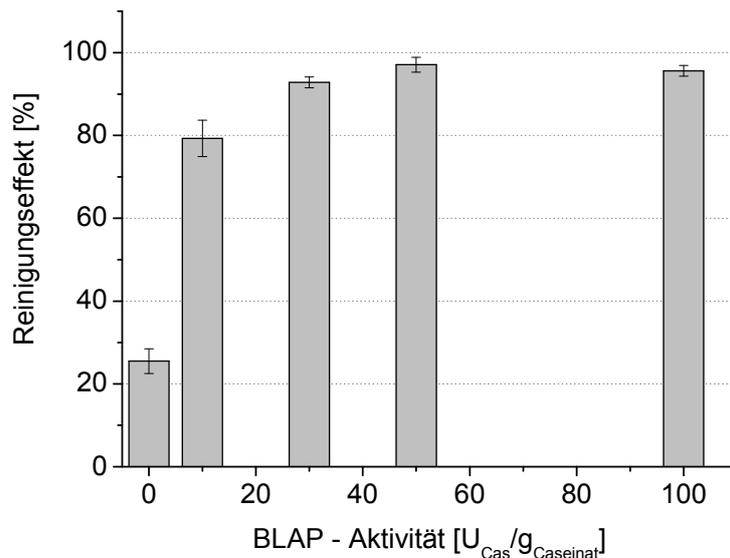


Abbildung 3-28: Einfluss der enzymatischen Protease-Aktivität auf die Reinigung von proteingebundenem Formstoff. Die Aktivität der BLAP, gegeben in caseinolytischen Einheiten ( $U_{Cas}$ ) wurde auf das enzymatisch vernetzte Caseinat ( $g_{Caseinat}$ ) bezogen. Der Formstoff enthielt 1,0 % b.o.s. Caseinat.

In Abbildung 3-28 ist der Reinigungseffekt von Pufferlösungen mit unterschiedlichen Protease – Aktivitäten ( $U_{Cas}$ ) dargestellt.

Bereits ab einer Aktivität von  $30 U_{Cas}/g_{Caseinat}$  konnten über 90 % des anhaftenden Proteins gelöst werden, was auch qualitativ mittels ESEM – Aufnahmen bestätigt werden konnte (hier nicht dargestellt).

Anhand der vorangegangenen Ergebnisse konnte nachgewiesen werden, dass sich Formstoffe mit nicht enzymatisch vernetztem Protein durch einfaches Waschen mit einer Pufferlösung gut regenerieren ließen, dies war jedoch nicht möglich für Formsand der mit enzymatisch vernetztem Protein gebunden war. Formstoffe mit vernetztem Protein konnte erfolgreich durch die Verwendung einer Proteaselösung regeneriert werden.

Um thermisch nicht belasteten Sand ohne enzymatische Quervernetzung des Proteins zu recyceln, wurde außerdem die Möglichkeit untersucht, den Formstoff durch alleiniges Rehydrieren des Proteins wiederzuverwenden.

Zunächst wurden nach Standardmethode Prüfkörper mit 0,7 % b.o.s. Caseinat und 5 % Standardpuffer hergestellt. Nach der Konditionierung wurde die Festigkeit der Prüfkörper im Druckversuch ermittelt. Der beim Druckversuch anfallende Prüfkörperbruch wurde aufgefangen und nach mechanischer Zerkleinerung mit  $\text{dH}_2\text{O}$  rehydriert. Aus Abbildung 3-29 kann entnommen werden, dass die mehrmalige Wiederverwendung des Formstoffes nach dem Druckversuch nur zu einem geringen Festigkeitsverlust führte (11 % nach dreimaligem Recycling). Die Wiederholung des Experiments mit drei Recyclingschritten (Ergebnisse nicht dargestellt) führte sogar nach dem ersten Recycling zu deutlich höheren Festigkeiten (+ 40 %). Bei weiteren Recyclingschritten nahm die Festigkeit wieder leicht ab, blieb aber über der Druckfestigkeit des Neusandes .

Wahrscheinlich spielte die mechanische Aufarbeitung des Sandes dabei eine Rolle. Zwar wurde keine signifikante Veränderung der Korngrößenverteilung nach einer Siebanalyse festgestellt (Abbildung 8-6, siehe Anhang), jedoch war eine Veränderung der Sandkornoberfläche nicht auszuschließen. Ein Aufrauen der Oberfläche der Sandkörner könnte dabei zu höherer Reibung zwischen den Sandkörnern und damit resultierender höherer Festigkeit führen.

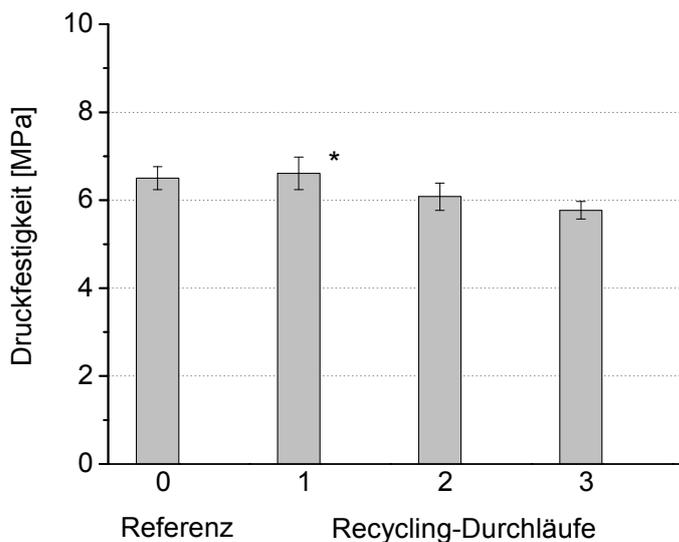


Abbildung 3-29: Einfluss der Anzahl der Recyclingschritte auf die Druckfestigkeit von proteingebundenem Sand (0,7 % b.o.s. Caseinat) nach mehrmaliger Wiederverwendung des Formstoffes. Der Prüfkörperbruch wurde jeweils mit  $\text{dH}_2\text{O}$  wiederbefeuchtet und erneut Druckprüfkörper hergestellt. (Abweichend davon wurde beim ersten Recycling Puffer (Tris/HCl pH 7 20 mM verwendet, mit \* gekennzeichnet.)

Wie in Abbildung 3-29 gezeigt, konnte der enzymatisch nicht vernetzte Formstoff (ohne thermische Belastung) durch Rehydrieren für die Formherstellung mehrmals wiederverwendet werden.

## 3.2 Proteine als Bindemittel für Holzwerkstoffe

Das Ziel der Versuche war es, mit Holzspänen und Protein als alleinigem Bindemittel stabile Spanplatten herzustellen. Primär sollte der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins (mittels MTG) auf das Quellverhalten und mechanische Eigenschaften der Spanplatten untersucht werden. In Abschnitt 2.2.3 sind die verschiedenen Technologien beschrieben, mit denen Spanplatten im Labormaßstab hergestellt wurden.

### 3.2.1 Einfluss der Spanfeuchte auf die Spanplattenherstellung

Zunächst wurde untersucht, ob sich mit Caseinat (10 % m/m) als Bindemittel stabile Spanplatten herstellen lassen. Insbesondere der Einfluss der Spanfeuchte vor dem Pressen sollte dabei untersucht werden (nach Abschnitt 2.2.3, Abbildung 2-5).

Zu Holzspänen in einem Mischer wurde 10 % ige (m/m) Caseinatlösung gegeben, um einen Bindemittelgehalt von 10 % (bezogen auf Holz atro) einzustellen. Durch die geringe Konzentration der Proteinlösung wurde sehr viel Wasser in die Mischung eingebracht. Die feuchten Späne (Feuchte 78 % bezogen auf Holz atro) wurden anschließend auf eine Feuchte von 8,5 % getrocknet. Diese Späne wurden für die anschließende Spanplattenherstellung benutzt. Für alle Spanplatten war der folgende Ablauf gleich: die Späne wurden in einen Formkasten gestreut, bei Raumtemperatur zu einem Spanvlies verdichtet und anschließend nach Entfernen der Form in einer Heißpresse zu einer Spanplatte gepresst.

Da die Prüfung der mechanischen Eigenschaften von Spanplatten erst nach Lagerung und Konditionierung in einem definierten Klima erfolgt (siehe Abschnitt 2.3.1.2), musste ein Kriterium für die sofortige Beurteilung der Spanplattengüte gefunden werden.

Als Kriterium für die optimale Ausgangsfeuchte wurde die Plattendicke nach dem Pressen der Platten festgelegt. Der Pressspalt wurde während des Heißpressens (110 °C) konstant auf 11,5 mm gehalten. Eine nur geringe Dickenzunahme („Rückfederung“) nach Entlastung der Platte ist häufig ein guter Indikator für eine stabile Bindung zwischen den Holzpartikeln.

Mit proteinbeschichteten Holzspänen mit 8,5 % Feuchte und 10 % Caseinat konnte keine stabile Spanplatte hergestellt werden. Die Spanplatte wies nach der Entnahme eine hohe Porosität auf und Späne lösten sich leicht von der Oberfläche ab, eine Messung von mechanischen Kennwerten war damit nicht möglich.

Da bei 8,5 % Spanfeuchte keine stabile Bindung zwischen den Holzpartikeln erreicht wurde, sollte die Spanfeuchte vor dem Pressen erhöht werden, um das Protein stärker zu hydrieren. In weiteren Versuchen sollte außerdem MTG verwendet werden, weshalb bei der Erhöhung der Spanfeuchte auf 12 % atro eine 30 % ige MTG-Lösung (m/m) verwendet wurde. Damit wurde die gleiche Menge Maltodextrin (aus dem kommerziellen Enzymprodukt stammend) in die Holzspäne eingebracht.

Die wirksame Aktivität der Enzymlösung war nicht bekannt, denn aufgrund der Mischmethode (Rührwerk mit DissolVERRÜHRER) konnte es zu einer teilweisen Denaturierung des Enzyms aufgrund hoher Scherkräfte gekommen sein. Die weitere Erhöhung der Spanfeuchte auf 17 % bzw. 22 % atro erfolgte durch die Zugabe von Wasser zu den proteinbeschichteten Holzspänen.

Bei 17 % Ausgangsfeuchte wurde die geringste Rückfederung gegenüber Spanplatten mit 12 % bzw. 22 % Spanfeuchte gemessen (hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche mit 17 % Spanfeuchte durchgeführt. Nach der Konditionierung im Normklima wurde jeweils die Querkzug- und Biegefestigkeit der Spanplatten (Abschnitte 2.3.1.4 und 2.3.1.5) bestimmt.

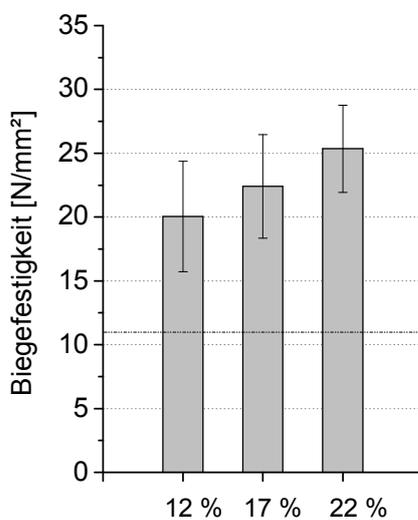


Abbildung 3-30: Biegefestigkeiten von Caseinatgebundenen Spanplatten, die mit unterschiedlichen Spanfeuchten hergestellt wurden. Zusammensetzung der Platten: 10 % Caseinat, 2,5 % Activa-MTG bezogen auf Holz (atro).

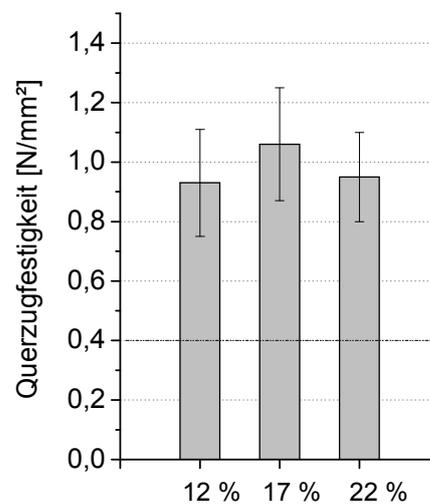


Abbildung 3-31: Querkzugfestigkeiten von Caseinatgebundenen Spanplatten, die mit unterschiedlichen Spanfeuchten hergestellt wurden. Zusammensetzung der Platten: 10 % Caseinat, 2,5 % Activa-MTG bezogen auf Holz (atro).

Wie in Abbildung 3-30 und Abbildung 3-31 zu sehen ist, wurden mit Spanfeuchten von 12,5 % - 22 % Biegefestigkeiten zwischen 20 - 25 N/mm<sup>2</sup> sowie Querkzugfestigkeiten zwischen 0,9 und 1,1 N/mm<sup>2</sup> erreicht.

Die in den beiden Abbildungen eingezeichneten Strichlinien geben die Mindestanforderungen an Spanplatten nach der EN 312 (2010) an. Danach müssen Spanplatten des Typs P2 (für nichttragende Verwendung im Trockenbereich) eine Mindestbiegefestigkeit von 11 N/mm<sup>2</sup> und eine Mindestquerkzugfestigkeit von 0,4 N/mm<sup>2</sup> erreichen. Diese Mindestanforderungen wurden von den proteingebundenen Spanplatten erfüllt.

## 3.2.2 Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins

### 3.2.2.1 Enzymatische Quervernetzung vor der Spantrocknung

Der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins auf die mechanischen Eigenschaften und das Quellverhalten von proteingebundenen Spanplatten sollte untersucht werden. Dafür wurden Holzspäne mit Caseinatlösung gemischt und somit eine hohe Spanfeuchte eingestellt. Anschließend wurde den feuchten Spänen aktive Enzymlösung (entsprechend 25 U/g<sub>Caseinat</sub>) bzw. inaktivierte Enzymlösung zum Vergleich zugesetzt. Nach 20 min Reaktionszeit wurden die Holzspäne von 80 % Feuchte (bezogen auf Holz atro) auf 17 % Feuchte (atro) getrocknet und wie zuvor beschrieben zu Spanplatten (bei 110 °C bzw. 220 °C) gepresst. Die fertigen Spanplatten wurden entsprechend konditioniert und das Quellverhalten sowie die Biege- und Querzugfestigkeit (Abschnitte 2.3.1.4-2.3.1.6) bestimmt.

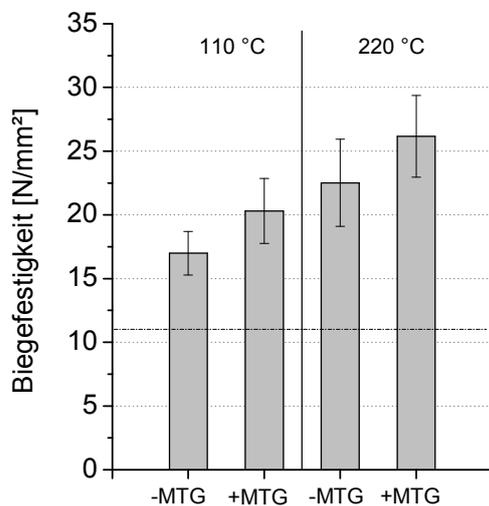


Abbildung 3-32: Biegefestigkeit von Caseinatgebundenen Spanplatten, bei denen das Caseinat auf der Spanoberfläche bei hoher Spanfeuchte vernetzt/nicht vernetzt wurde. Verwendet wurden 10 % Caseinat (m/m) bezogen auf Holz atro, bei enzymatischer Quervernetzung wurden 25 U/g<sub>Caseinat</sub> eingesetzt.

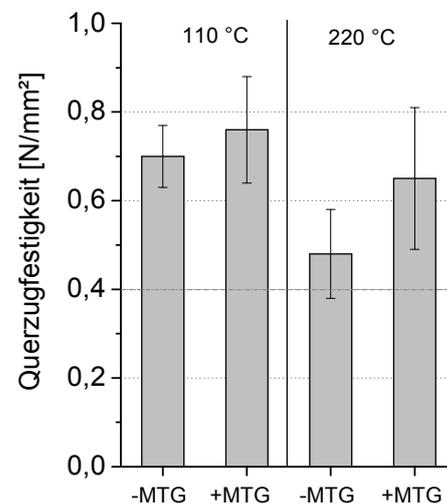


Abbildung 3-33: Querzugfestigkeit von Caseinatgebundenen Spanplatten, bei denen das Caseinat auf der Spanoberfläche bei hoher Spanfeuchte vernetzt/nicht vernetzt wurde. Verwendet wurden 10 % Caseinat (m/m) bezogen auf Holz atro, bei enzymatischer Quervernetzung wurden 25 U/g<sub>Caseinat</sub> eingesetzt.

Es wurde gefunden, dass die enzymatische Quervernetzung des Proteins auf den Holzspänen vor dem Pressen (bei beiden Presstemperaturen) im Gegensatz zu unvernetztem Protein zu höheren Biegefestigkeiten (Abbildung 3-32) sowie höheren Querzugfestigkeiten (Abbildung 3-33) führte.

Die Biegefestigkeit stieg außerdem durch eine höhere Presstemperatur von 220 °C gegenüber Spanplatten, die bei 110 °C gepresst wurden. Bei niedrigerer Presstemperatur von 110 °C wurde jedoch eine höhere Querzugfestigkeit (mit und ohne enzymatischer Vernetzung) erreicht.

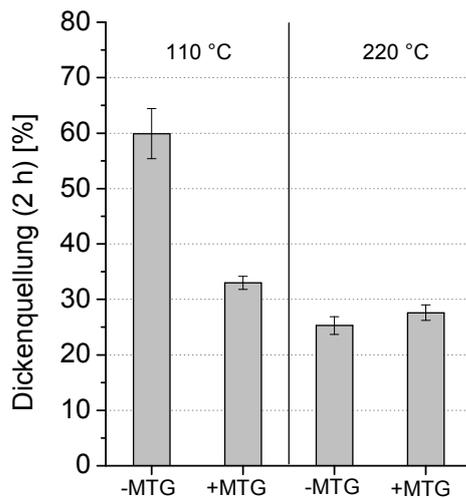


Abbildung 3-34: Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins auf die Quelleigenschaften von Caseinat-gebundenen Spanplatten. Die Vernetzung wurde bei hoher Spanfeuchte (80 % bezogen auf Holz atro) durchgeführt und die Späne anschließend auf 17 % Feuchte vor dem Pressen getrocknet. Verwendet wurden 10 % Caseinat (m/m) bezogen auf Holz atro, bei enzymatischer Quervernetzung wurden 25 U/g<sub>Caseinat</sub> eingesetzt.

Die Quellung der Spanplatten wurden sowohl durch die enzymatische Quervernetzung als auch durch eine höhere Presstemperatur signifikant beeinflusst (Abbildung 3-34). Bei 110 °C Presstemperatur konnte ein deutlich positiver Einfluss der Enzymreaktion beobachtet werden, d.h. die Quellung wurde um etwa 40 % reduziert. Bei 220 °C lag kein signifikanter Unterschied zwischen vernetztem und nichtvernetztem Protein mehr vor. Die Quellung (ca. 30 %) war im Vergleich zu vernetztem Protein mit einer Presstemperatur von 110 °C sogar bei unvernetztem Protein geringer. Es wurde vermutet, dass die hohe Presstemperatur eine Denaturierung des Proteins bewirkte, so dass es weniger hydrophil wurde. Mögliche Einflüsse des Dextrins (aus der Enzympräparation stammend) wurden nicht untersucht, sind aber nicht auszuschließen. Ebenso könnte die höhere Presstemperatur eine Veränderung in der chemischen Struktur des Holzes und eine geringere Quellfähigkeit bewirkt haben.

Die gemessenen Querkzug- und Biegefestigkeiten erfüllten wiederum die Mindestanforderungen der Norm EN 312 (2010). Die enzymatische Vernetzung des Proteins verbesserte die mechanischen Eigenschaften und führte bei niedriger Presstemperatur zu reduzierter Quellung der Spanplatten. Die Quellung der Spanplatten war jedoch mit 30 % relativ hoch gegenüber Spanplatten, die mit konventionellen Bindemitteln hergestellt werden (typischerweise < 20 %).

### 3.2.2.2 Enzymatische Quervernetzung im Spanvlies

Weiterhin wurde untersucht, ob die Vernetzung des Proteins im Spanvlies zu anderen mechanischen Eigenschaften führt als die enzymatische Vernetzung auf den Holzspänen vor der Trocknung (Abbildung 2-7, Abschnitt 2.2.3).

Bei der zuvor betrachteten Vernetzung des Proteins auf den Spänen war vorteilhaft, dass relativ viel Wasser für die enzymatische Vernetzung zur Verfügung stand (ca. 80 % Spanfeuchte). Allerdings wurden die Späne nach der Vernetzungsreaktion getrocknet, d.h. der Verbund der Späne durch vernetztes Protein wurde wieder zerstört.

Holzspäne wurden mit Proteinlösung gemischt (10 % Protein bezogen auf Holz atro) und die Feuchte anschließend durch einen Trockenschritt auf 8,5 % (bezogen auf Holz atro) eingestellt. Danach wurde aktive Enzymlösung (entsprechend 25 U/g<sub>Caseinat</sub>) zugesetzt und damit eine Feuchte von 17 % eingestellt. Diese Späne wurden zu einem Spanvlies (bei RT) verdichtet und 20 min bei RT gelagert. Anschließend wurden Spanplatten bei 110 °C bzw. 220 °C daraus gepresst. Bei der Vernetzung im Spanvlies war zwar wenig Feuchtigkeit vorhanden, jedoch wurde das Spanvlies nach der Vernetzungsreaktion gepresst, so dass eventuell gebildete Bindemittelbrücken nicht mehr zerstört wurden.

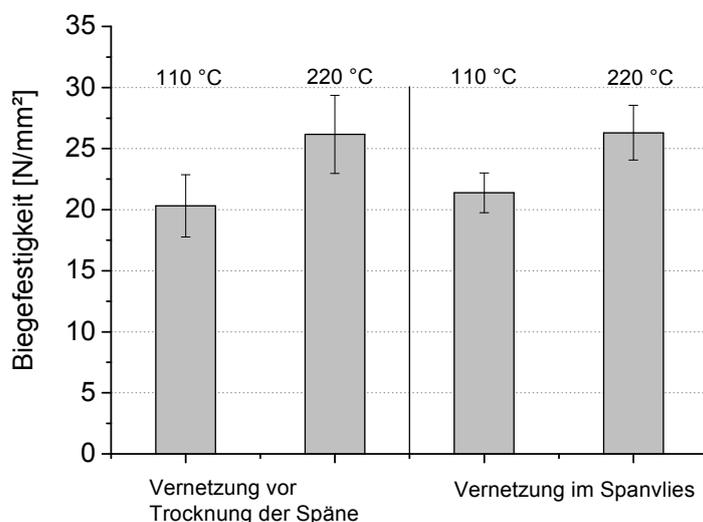


Abbildung 3-35: Einfluss der Vernetzungsbedingungen des Proteins in der Spanplatte auf die Biegefestigkeit. Der Zeitpunkt und die Bedingungen für die enzymatische Vernetzung wurden variiert. Verwendung von 10 % (m/m) Caseinat bezogen auf Holzgewicht (atro). Die eingesetzte enzymatische Aktivität betrug 25 U/g<sub>Caseinat</sub>.

In Abbildung 3-35 sind die Biegefestigkeiten, in Abbildung 3-36 die Querkzugfestigkeiten der Spanplatten dargestellt und wurden mit Ergebnissen aus dem vorangegangenen Versuch (Abschnitt 3.2.2.1) verglichen.

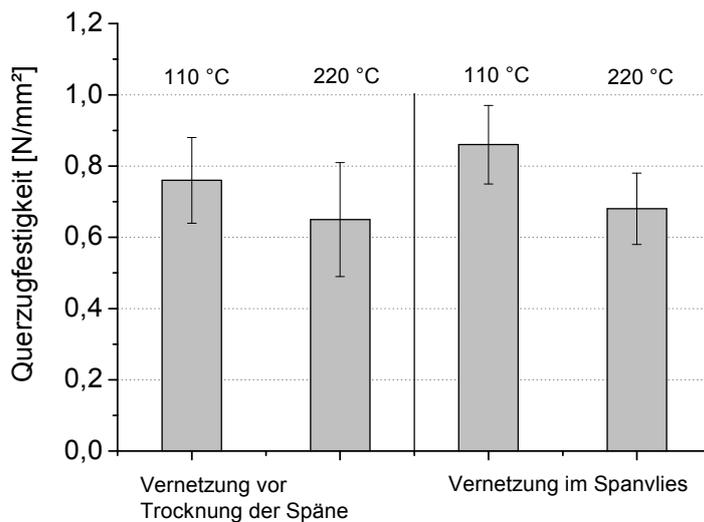


Abbildung 3-36: Einfluss der Vernetzungsbedingungen des Proteins in der Spanplatte auf die Querzugfestigkeit. Der Zeitpunkt und die Bedingungen für die enzymatische Vernetzung wurden variiert. Verwendung von 10 % (m/m) Caseinat bezogen auf Holzgewicht (atro). Die eingesetzte enzymatische Aktivität betrug 25 U/g<sub>Caseinat</sub>.

In beiden Versuchen (Vernetzung vor der Trocknung bzw. Vernetzung im Spanvlies) wurden jeweils sehr ähnliche Biege- und Querzugfestigkeiten gemessen. Die Dickenquellung war bei Quervernetzung im Spanvlies (nicht dargestellt) und einer Presstemperatur von 110 °C mit 66 % so hoch wie bei nichtvernetztem Protein (siehe Abbildung 3-34, Abschnitt 3.2.2.1). Bei einer Presstemperatur von 220 °C wurde dagegen eine vergleichsweise geringe Dickenquellung von 22 % erreicht.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die enzymatische Quervernetzung des Proteins im Spanvlies ebenfalls einen positiven Einfluss auf die mechanischen Kennwerte hat. Der Vernetzungszeitpunkt des Proteins (vor der Trocknung bzw. im Spanvlies) schien keinen Einfluss auf die Querzug- und Biegefestigkeit zu haben.

In weiteren Versuchen (Ergebnisse nicht dargestellt), konnten ebenfalls Spanplatten mit Sojaproteinisolat als Bindemittel hergestellt werden, die die Festigkeitsanforderungen an Spanplatten laut EN 312 (2010) (Typ P2) in Bezug auf die Mindestbiegefestigkeit erfüllten, bzw. bei den erreichten Querzugfestigkeiten im Bereich der geforderten Mindestfestigkeit lagen. Mit Proteinen als alleinigem Bindemittel (Caseinat und Sojaprotein) konnten Spanplatten hergestellt werden, die die Mindestanforderungen nach EN 312 (2010) erfüllten. Die enzymatische Quervernetzung des Proteins verbesserte die mechanischen Eigenschaften der hergestellten Spanplatten und reduzierte die Dickenquellung.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Verwendung von Proteinen als Bindemittel in verschiedenen industriellen Anwendungsgebieten. Hauptsächlich wurde die Verwendbarkeit für die Herstellung von Gusskernen untersucht. Des Weiteren fanden grundlegende Versuche zur Verwendbarkeit als Bindemittel für Holzwerkstoffe - im Speziellen für Spanplatten - statt. Die Verwendung eines Enzyms, der mikrobiellen Transglutaminase, und deren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften dieser Werkstoffe durch die Quervernetzung der Proteinemoleküle stand dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen. Die Verwendung von Transglutaminase wurde bisher in der Literatur meist im Zusammenhang mit deren Einsatz im Lebensmittelbereich beschrieben. Da viele Nahrungsmittel Proteine enthalten, können deren Eigenschaften durch die Quervernetzung im Hinblick auf Textur, Viskosität und Verarbeitbarkeit gezielt beeinflusst werden.

Die Verwendung von Transglutaminase und Proteinen in werkstofflichen Anwendungen wurde hingegen in der Literatur bisher kaum beschrieben. Dies ist auch dem Umstand geschuldet, dass zwar in der Vergangenheit Proteine bereits als Bindemittel verwendet wurden ([Mus et al., 2001; Shi et al., 2001], jedoch die Herstellung von mikrobieller Transglutaminase mittels Fermentation erst seit einigen Jahren möglich ist [Ando et al., 1989].

Im Hinblick auf die Umweltverträglichkeit und biologische Abbaubarkeit von nachwachsenden Rohstoffen stellen Proteine neben anderen natürlichen Rohstoffen wie Stärke, Cellulose oder Öle/Fette eine interessante Alternative dar, fanden aber bisher nicht die gleiche Beachtung im Bereich der Materialforschung wie z.B. Stärkederivate. Der Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen (Protein) in Verbindung mit der Verwendung eines Enzyms als Katalysator stellt eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Bindemitteln dar.

### **Untersuchungen zur Eignung von Proteinen als Bindemittel für Sand**

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit hatten das Ziel, die enzymatische Quervernetzung von Proteinen zu nutzen, um die Festigkeit eines Formstoffs für die Gießerei sowohl im trockenen als auch im feuchten Zustand zu erhöhen. Damit wäre es möglich, unter Einsatz geringerer Bindemittelanteile gleiche Festigkeiten zu erzielen oder absolut höhere Festigkeiten zu erreichen. Eine Verringerung des Bindemittelanteils würde dabei zu verringerten Emissionen sowie geringeren Kosten führen.

Des Weiteren sollte die Quervernetzung bereits im feuchten Zustand eine hohe Festigkeit gewährleisten, so dass bereits geformt Kerne für weitere Prozessschritte zu Verfügung stehen, ohne dass diese vollständig getrocknet sind. So werden z.B. Gusskerne häufig mit sog. Schlichten behandelt, um bessere Oberflächen der Gussteile zu erzielen. Diese Suspensionen basieren meist auf Wasser oder organischen Lösungsmitteln, in denen feine Partikel suspendiert sind. Diese setzen sich auf der Oberfläche ab und bilden eine glatte Oberfläche

bzw. können die Oberflächen weiter verfestigen. Nach diesem Prozessschritt müssen die Kerne ebenfalls getrocknet werden. Die Verwendung von Wasserschichten ist vorteilhaft, da keine Lösungsmittel emittiert werden und das Handling sowie die Lagerung vereinfacht werden [Henneberg, 2011]. Bei unvernetztem Protein als Bindemittel könnten wasserbasierte Schichten jedoch nicht angewandt werden, da sie zu einer Zerstörung der Kerne führen würden.

Die technologischen Anforderungen, die an Bindemittel in der Gießereiindustrie gesetzt werden, wurden in der Einleitung (Abschnitt 1.1.1) dargestellt. Einer der wichtigsten Parameter für die Beurteilung von Bindemitteln ist die erreichbare Formfestigkeit, da beim Einfüllen der Schmelze in die Form, insbesondere auf Gusskerne, sehr hohe Kräfte wirken können. Für Bindemittel (BM) in der Gießereiindustrie existieren keine Normen, die Mindestfestigkeiten der damit hergestellten Gusskerne festlegen. Das Spektrum der verwendbaren Bindemitteltypen, die Variation des verwendeten Bindemittelanteils sowie der verwendete Formstoff haben einen großen Einfluss auf die resultierende Festigkeit. Deshalb ist die Angabe von durchschnittlichen Festigkeiten für konventionelle BM nicht möglich. Erforderliche Festigkeiten werden meist in Vereinbarungen zwischen Lieferant und Anwender festgeschrieben.

Neben der Festigkeit sind noch andere Eigenschaften der BM von Bedeutung, wie z.B. die erzielbare Oberflächengüte der Gussteile, die Gasentwicklung oder entstehende Emissionen während und nach dem Gussprozess, um nur einige zu nennen.

Um die Festigkeit von Formstoffen beurteilen zu können, werden am häufigsten die Druck- oder Biegefestigkeit ermittelt. Da es sich um unterschiedliche Belastungsarten handelt, ist es nicht möglich, die ermittelten mechanischen Kennwerte aus verschiedenen Prüfverfahren zu korrelieren. Beim Druckversuch wird der Widerstand gegen eine Druckkraft gemessen, dies ist z.B. der hydrostatische Druck der Schmelze. Auf Gusskerne, die von Schmelze umgeben sind, wirken wiederum Auftriebskräfte, die in einer Biegebelastung des Gusskernes resultieren. Je nach Belastungsart müsste demnach ein unterschiedliches Messverfahren eingesetzt werden. Häufig ist es jedoch der Fall, dass lediglich eines der beiden Messverfahren eingesetzt wird und aus der gemessenen Festigkeit Rückschlüsse auf die Güte des Formstoffes gezogen werden, was in der Praxis meist ausreichend ist. Daneben existieren noch andere Messverfahren, die jedoch weniger häufig verwendet werden (z.B. Ermittlung der Zugfestigkeit).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden durch die Messung der Druckfestigkeit von Formkörpern erzielt. In ersten Versuchen wurde gezeigt (Abschnitt 3.1.1.2), dass bei der Ermittlung der Druckfestigkeit im Vergleich zur Biegefestigkeit geringere Standardabweichungen auftraten. Außerdem war es nur mittels Druckversuch möglich, die Festigkeit von feuchten Proben zu messen. Da bei allen weiteren Versuchen die Druckfestigkeit ermittelt wurde, sind sämtliche Ergebnisse innerhalb der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Im Jahr 2001 wurde auf einer Fachtagung über die Verwendung von Protein (Gelatine) für Bindemittelzwecke im Sandformguss berichtet [Mus et al., 2001]. Allerdings existieren über die Verwendung von Proteinen als BM für Sand keinerlei Originalpublikationen in wissenschaftlichen Zeitschriften. Lediglich aus Firmenprospekten (z.B. der Fa. Hormel Foods Cooperation) und Patenten konnten einige Angaben entnommen werden. Die wenigen Festigkeitswerte, die gefunden wurden, bezogen sich auf die erreichbare Zugfestigkeit der Formstoffe. Wie bereits erwähnt, können Zugfestigkeiten nicht mit Druckfestigkeiten verglichen werden. Jedoch soll hier die grundsätzliche Eignung von Proteinen anhand des Vergleichs mit der Zugfestigkeit konventioneller BM bzw. anderer alternativer BM gezeigt werden. Für das Gelatine-basierte GMBond wurde eine Zugfestigkeit von 1,72 MPa bei einem Bindemittelanteil von 1,0 % b.o.s. ermittelt [Parker und Herreid, 2005]. Für ein konventionelles (häufigst verwendetes) BM auf Polyurethanbasis (Coldbox-Prozess) wurde als Vergleichswert eine Zugfestigkeit von 1,42 MPa bei einem Bindemittelanteil von 1,1 % b.o.s. angegeben [Crandell et al., 2004]. Mit anderen biologisch abbaubaren Bindemitteln wie PLA, PHB oder PLGA, die dem Formsand (in organischen Lösungsmitteln aufgelöst) zugesetzt wurden, konnten lediglich Zugfestigkeiten  $< 1$  MPa bei einem Bindemittelanteil von 1,67 % ermittelt werden [Dobosz und Major-Gabryś, 2010].

Die in der vorliegenden Arbeit erreichten **Biegefestigkeiten** von Caseinat-gebundenem Sand liegen mit über  $250 \text{ N/cm}^2$  (Abbildung 3-1, Abschnitt 3.1.1.2) ebenfalls im Bereich konventioneller Formsande. Die Biegefestigkeiten von Cold-Box-Bindemitteln (häufigste verwendete BM-Systeme) liegen bei einem Bindemittelgehalt von 1,2 % b.o.s. zwischen  $150 - 450 \text{ N/cm}^2$  [Eder et al., 2006]. Für andere Bindemittelsysteme variieren die Festigkeiten in einem Bereich von  $250 - 700 \text{ N/cm}^2$ , jedoch bei teils deutlich höheren Bindemittelgehalten (ca. 2,5 %) und anderen Herstellungsbedingungen [Bischoff, 2003].

Zur Vergleichbarkeit der **Druckfestigkeit** von harzgebundenen Prüfkörpern mit proteingebundenem Sand sei als Beispiel ein konventionelles Furanharz-System genannt, bei dem mit 1,3 % Bindemittelgehalt (1,0 % Harz + 0,3 % b.o.s. Härterzusatz) eine Druckfestigkeit von 4,5 MPa erreicht wurde [Podobed, 2003]. Bei der Verwendung von Proteinen wurden in der vorliegenden Arbeit bei vergleichbarer Bindemittelmenge weit höhere Druckfestigkeiten von bis zu 9 MPa (mit 1,4 % b.o.s. Caseinat) ermittelt.

Mit den üblicherweise verwendeten Cold-Box-BM können zwar Gusskerne mit sehr hoher Festigkeit hergestellt werden, jedoch gibt es verschiedene Einflussfaktoren, die die Festigkeit teils erheblich herabsetzen können. So führt beispielsweise die Lagerung des mit Harz versetzten Sandes (ohne Zusatz des Katalysators) über einen Zeitraum von wenigen Stunden zu einem hohen Festigkeitsverlust ( $-40\%$  nach 3 h), da bereits unter normalen Lagerbedingungen chemische Reaktionen im Harz stattfinden [Eder et al., 2006]. Ebenso wirken sich

bereits geringste Feuchtegehalte des Sandes auf die erzielbare Festigkeit aus, da die Isocyanatkomponente mit dem Wasser unter  $\text{CO}_2$  – Bildung reagieren kann. Außerdem können alkalisch wirkende Verunreinigungen im Formstoff (aus dem Recyclingprozess) die Festigkeit von Cold-Box-BM im ausgehärteten Zustand bereits nach wenigen Stunden deutlich herabsetzen [Weicker, 2006].

Wie im Ergebnisteil dargestellt (Abbildung 3-3) hatte die Lagerdauer von proteingebundenem (getrockneten) Sand keinen Einfluss auf die Festigkeit, unter der Voraussetzung, dass die relative Luftfeuchte den Wert von 50 % r.F. nicht übersteigt (Abschnitt 3.1.1.4). Durch Wasseraufnahme des Proteins bei höherer Lagerfeuchte sank die Festigkeit des Formstoffes. Allerdings ist zu vermuten, dass sich die ursprüngliche Festigkeit durch das erneute Trocknen der Kerne zumindest größtenteils wieder einstellen würde (sofern keine mikrobielle Kontamination bei sehr hoher Feuchte eintritt).

Im Unterschied zum Cold-Box-Verfahren könnten nicht verbrauchte Kerne einfach recycelt werden, da das Protein durch Wasserzugabe wieder in Lösung geht und der Formstoff seine ursprüngliche Fließfähigkeit zurückgewinnt. Dieses einfache Recycling wäre bei der Veränderung des Produktionszieles oder für Ausschussteile (z.B. Kernbruch in der Fertigung) von Vorteil. D.h. mit dem rehydrierten Formstoff wäre es möglich, unmittelbar nach der Befeuchtung des Sandes daraus wieder neue Kerne herzustellen. Die Lagerung des Formstoffes im feuchten Zustand über wenige Stunden sollte zwar keinen Einfluss auf die erzielbare Festigkeit haben, jedoch handelt es sich bei Proteinen prinzipiell um Substrate, die ein mikrobielles Wachstum ermöglichen und dabei abgebaut werden. Die Verwendung von proteinbeschichtetem Sand, der erst in der Form rehydriert und anschließend gleich wieder getrocknet wird, stellt eine mögliche Variante dar, die nicht untersucht wurde. Neben der guten Lagerfähigkeit kann möglicherweise auch ein besseres Formfüllungsvermögen durch den trockenen Sand bei der Kernherstellung realisiert werden. Diese Verfahren wurde bereits für GMBond patentiert [Herreid und Srsen, 2002].

Die Möglichkeit der Verwendung von Proteinen als Bindemittel für Gießereisand wurde bisher nur vereinzelt beschrieben [Salzberg, 1939; Siak, 1996]. In der vorliegenden Arbeit wurden systematisch mehrere Proteine auf ihre Eignung als Bindemittel in Bezug auf die erreichbare mechanische Festigkeit untersucht. Dabei wurde der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins durch das Enzym Transglutaminase untersucht. Die enzymatische Quervernetzung von Proteinen durch MTG im Lebensmittelbereich ist seit längerem bekannt [Dube et al., 2006] und wird erfolgreich eingesetzt [Yokoyama et al., 2004], jedoch wurde diese Reaktion bisher nicht auf das vorliegende Anwendungsgebiet übertragen.

Die Bildung der intra- oder intermolekularen Isopeptidbindungen im Protein führt zu einem Molekülnetzwerk, dessen physikalische Eigenschaften sich ändern [Schäfer et al., 2005]. In Abhängigkeit vom Wassergehalt der Proteinlösung bzw. kolloidalen Dispersion kommt es zu

einem Anstieg der Viskosität oder zu einer Gelbildung [Nio et al., 1986; Sakamoto et al., 1993]. Für die Bestimmung des Vernetzungsgrades kamen bisher massenspektrometrische Methoden zum Einsatz [Schäfer et al., 2005]. Ebenso konnte der Zusammenhang zwischen Gelfestigkeit (Messung mittels Texture Analyzer) und Vernetzungsgrad gezeigt werden [Schäfer et al., 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Druckfestigkeit feuchter Prüfkörper mit enzymatisch quervernetztem Protein bestimmt und damit ein relativer Wert für den Quervernetzungsgrad gemessen. Dies ließ jedoch keine Aussage über den absoluten Quervernetzungsgrad zu. Mittels SDS-PAGE konnte zwar die enzymatische Quervernetzung nachgewiesen werden, allerdings gibt die elektrophoretische Trennung keinen Aufschluss über die Anzahl der Bindungen durch die enzymatische Vernetzung. Da bereits jeweils eine Isopeptidbindung zu zwei benachbarten Molekülen schnell zu hohen Molekülmassen führt, kann das Proteinmakromolekül nicht mehr in das Trenngel wandern. Der Quervernetzungsgrad lässt sich deshalb mittels SDS-Page nicht mehr bestimmen.

Bei Druckversuchen an feuchten Prüfkörpern wurden mit einer molekularbiologisch optimierten MTG – Variante (S2P-MTG) trotz höherer spezifischer Aktivität geringere Festigkeiten mit Caseinat als Bindemittel gemessen.

Die Aktivität der Enzymlösungen wurde mittels Hydroxamat-Test bestimmt. Damit können die abweichenden Ergebnisse erklärt werden. Die Substrate in diesem Test (Z-Gln-Gly und Hydroxylamin) sind relativ klein und diffundieren damit leicht. In Proteinmolekülen (mehrere kDa Molekulargewicht, je nach Protein) sind die relevanten Aminosäuren dagegen (Lys, Gln) von anderen Aminosäuren umgeben.

Von Glutamin ist außerdem bekannt, dass es in Abhängigkeit der beiden umgebenden AS ein Substrat für die TG darstellt [Matsumura et al., 1996], d.h. es können auch Glutamine im Protein vorliegen, die nicht vernetzt werden können.

Durch die MTG-induzierte Gelierung des Proteins gelang es in der vorliegenden Arbeit, relativ feste (feuchte) Formkörper herzustellen und das Protein wasserunlöslich zu machen. Feuchte Prüfkörper mit enzymatischer Vernetzung (1,0 % b.o.s. Caseinat) konnten in heißem Wasser gelagert werden (90 °C, 5 min) ohne dabei zu zerfallen (Abbildung 3-19, S. 61). Probekörpern ohne Vernetzung zerfielen dagegen bei Lagerung in heißem Wasser. Ob die erzielte Festigkeit für ein sicheres Handling (z.B. beim industriellen Schichten) ausreichend ist, konnte nicht untersucht werden, da Größe und Geometrie der Formteile stark variieren können.

Bei Verwendung der Proteine Caseinat, Sojaprotein und Gelatine kam es, wie in Abschnitt 3.1.6 dargestellt, zu einer Reduzierung der Druckfestigkeit durch die enzymatische QV im trockenen Zustand gegenüber Formkörpern, die ohne MTG hergestellt wurden. Bei der Ver-

wendung von Erbsenprotein konnte die Festigkeit im trockenen Zustand jedoch gesteigert werden (Abschnitt 3.1.4.3).

Untersuchungen von getrockneten Formkörpern mittels ESEM, die mit Caseinat bzw. Erbsenprotein hergestellt wurden, zeigten Strukturunterschiede innerhalb des Formstoffes bzw. der Binderbrücken infolge der QV. Diese Veränderungen in der Morphologie der Binderbrücken waren jedoch bei beiden Proteinen optisch gleich, so dass daraus allein keine Rückschlüsse auf den festigkeitsreduzierenden Effekt gezogen werden konnten.

Gelatine bildet bei Temperaturen über 40°C mit Wasser eine Lösung, in der die Proteinmoleküle in einer Random Coil - Struktur vorliegen. Bei Absenkung der Temperatur einer solchen Lösung kommt es zur Bildung eines Gels aufgrund der Ausbildung von Tripelhelizes, d.h. temperaturabhängig werden Strukturen mit einem höheren Ordnungsgrad aufgebaut. Diese Strukturen bilden ein Netzwerk und führen damit zur Gelbildung. Die enzymatische Quervernetzung von Gelatine hat einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung des Gelnetzwerks [Babin und Dickinson, 2001]. Im Sol-Zustand führt die enzymatische Vernetzung zu einer beeinträchtigten Mobilität der Gelatinemoleküle und verhindert teilweise die Ausbildung der übergeordneten Strukturen. Damit wäre ein Festigkeitsverlust der Gelatine-gebundenen Sandprüfkörper zu erklären.

Im Gegensatz dazu bildet Caseinat nach derzeitigem Kenntnisstand im trockenen Zustand keine übergeordneten Strukturen [Horne, 2002]. D.h. eine ‚Störung‘ der Ausbildung geordneter Strukturen wie bei Gelatine ist unwahrscheinlich und sollte demnach keinen Einfluss auf die Verfestigung während des Trocknens haben. Durch die zusätzlichen Vernetzungspunkte wäre dagegen eher mit einer höheren Festigkeit zu rechnen gewesen.

Bei Sojaprotein handelt es sich um ein Gemisch von verschiedenen Speicherproteinen, die häufig in Proteingruppen eingeteilt werden. Eine häufige Einteilung findet nach der Löslichkeit statt, wobei Albumine, Globuline, Prolamine und Gluteline unterschieden werden [Osborne, 1924]. Die Globuline sind in den meisten Hülsenfrüchten das Hauptspeicherprotein [Shewry et al., 1995]. Die Konformation der Speicherproteine unterscheidet sich damit wesentlich von Caseinat und Gelatine, während bei Erbsenprotein aufgrund der Verwandtschaft der Erbsenpflanze mit Soja (Leguminosen, Unterfamilie *Faboideae*) eine sehr ähnliche Zusammensetzung und Konformation der Speicherproteine zu erwarten ist [Rimbach et al., 2010]. Das Molekulargewicht der einzelnen Proteine variiert in einem weiten Bereich. Zusätzlich kann es, abhängig von der Extraktionsmethode, zu einem teilweisen Abbau (zur Verringerung des Molekulargewichts) der Makromoleküle geführt haben. Das massebezogen häufigst vorhandene Protein Glycinin in Soja besteht beispielsweise selbst aus 6 Proteinuntereinheiten, diese Hexamere (11S) können zudem in Trimere (8S) und Monomere (3S) dissoziieren [Krishnan, 2001].

Durch die unterschiedlichen Proteinstrukturen sind die verschiedenen verwendeten Proteine somit nicht direkt vergleichbar, am ehesten wäre dies bei Soja- und Erbsenprotein der Fall. Die Untersuchungen mittels SDS-PAGE zeigten jedoch, dass bei Erbsenprotein distinkte Banden der Speicherproteine zu sehen waren. Bei Sojaprotein handelte es sich hingegen um ein Gemisch verschieden großer Peptide, die in einem weiten Molekulargewichtsbereich vorlagen (Abbildung 3-18, S. 60).

Die Glasübergangstemperatur ist bei der Beschreibung der mechanischen Eigenschaften von Polymeren bzw. Makromolekülen von Bedeutung, da die Verformungsfähigkeit solcher Stoffe in diesem Bereich die größte Veränderung erfährt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Glasübergangstemperatur bei Proteinen stark vom Wassergehalt abhängig ist, d.h. je mehr Wasser ein Protein enthält, desto niedriger ist die Glasübergangstemperatur [Cuq et al., 1998; Noel et al., 1995]. Das Wasser auf Proteine einen Weichmachereffekt erzielt, wurde z.B. in Abschnitt 3.1.1.4 gezeigt.

Bei konventionellen Polymeren steigt die Glasübergangstemperatur gewöhnlich mit dem Grad der Quervernetzung, da Molekülbewegungen behindert werden. Bei Proteinen ist dies jedoch nicht immer der Fall. So wurde für Alpha-Casein ein Anstieg der Glasübergangstemperatur infolge enzymatischer Quervernetzung gemessen [Mizuno et al., 1999]. Dagegen wurde die Glasübergangstemperatur von Sojaprotein gesenkt [Mizuno et al., 2000]. Erklärt werden kann dieser Effekt mit einer verstärkten Einlagerung von Wasser (bei Sojaprotein) im Proteinnetzwerk.

Die in der Arbeit übliche Trocknungstemperatur für Formsandkörper lag bei 95 °C. Da der Einfluss einer verstärkten Wassereinlagerung im vernetzten Proteinnetzwerk als Ursache für geringere Festigkeiten bei Caseinat ausgeschlossen werden sollte, wurden Prüfkörper ebenso bei 110 °C getrocknet (Abschnitt 3.1.1.3). Trotz der höheren Trocknungstemperatur und Lagerung über Silicagel konnte keine Änderung der mechanischen Eigenschaften beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Masse von Prüfkörpern überprüft, die mit und ohne enzymatische QV hergestellt wurde, auch hier konnten keine Hinweise auf einen Unterschied im Wassergehalt festgestellt werden. Für Caseinat konnte somit ein festigkeitsreduzierender Einfluss von Wasser im Proteinnetzwerk ausgeschlossen werden.

Aus den Untersuchungen von Proben mit und ohne enzymatische QV mittels ESEM ging hervor, dass sich die Struktur der aus Caseinat bestehenden Bindemittelbrücken durch die QV änderte. Durch die QV bei der Prüfkörperherstellung kommt es zu einem Anstieg der Viskosität der Proteinlösungen. Vermutlich konnte deshalb die Proteinlösung nach der Vernetzung nicht mehr in den Zwickel zwischen den Sandkörnern migrieren. Daher kommt es vermutlich nicht zur Ausbildung einer stabilen Binderbrücke zwischen den Sandkörnern wie

bei Verwendung von Caseinatlösung ohne MTG. Es wurde angenommen, dass die vernetzte Proteinlösung austrocknet und eine (möglicherweise poröse) Proteinstruktur mit geringerer Festigkeit zurückbleibt.

Ein ähnlicher festigkeitsreduzierender Effekt ließ sich durch Gefriertrocknung von Prüfkörpern mit Caseinat als Bindemittel (-MTG/+MTG) erzielen. Die Prüfkörper dieser Versuchsreihe (-MTG/+MTG) wurden nach der Inkubation bei 50 °C aus dem Ofen entnommen und in mehreren Schritten auf - 80 °C gekühlt. Dabei gefriert die Proteinlösung und kann sich ebenso nicht mehr an den Kontaktpunkten der Sandkörner konzentrieren. Nach der Gefriertrocknung wurden bei beiden Prüfkörpertypen (MTG/+MTG) Festigkeiten gemessen, wie sie auch bei enzymatisch vernetzten (im Ofen bei 95 °C getrockneten) Proben gemessen wurden (Abbildung 3-14, S. 56). Es ließ sich damit zeigen, dass bei einer sehr geringen Mobilität der Proteinlösung (durch Vernetzung bzw. Einfrieren) ein starker Festigkeitsverlust auftritt.

Ein Kriterium für die Untersuchung von Bindemitteln auf Proteinbasis ist, dass Proteine aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden können und zudem vollkommen biologisch abbaubar sind.

Bei der Verwendung von Bindemitteln für Gießereisand müssen allerdings im Gegensatz zu den meisten anderen Verwendungsmöglichkeiten von biologisch abbaubaren Werkstoffen die Verbrennung bzw. die Verbrennungsprodukte, die beim Gießen entstehen, in die Betrachtung mit einbezogen werden. Die beim thermischen Abbau des Protein-Bindemittels freigesetzten Emissionen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Die Messung der Pyrolyseprodukte von organischen Bindemitteln für Gießereisande ist sehr komplex, da eine große Vielfalt organischer Stoffe entstehen kann. Zur Charakterisierung von Emissionen werden häufig aufgrund ihrer Toxizität besonders relevante Stoffgruppen zusammengefasst, so z.B. die Gruppe der Aromaten Benzol, Toluol und Xylol (BTX). Für konventionelle Bindemittel wurden bereits umfangreiche Untersuchungen hinsichtlich der entstehenden Emissionen durchgeführt [Spang, 2001]. Ein in den USA initiiertes Forschungsprogramm zur Reduktion von Emissionen (Casting Emission Reduction Program, CERP) untersuchte ein für die Herstellung von Gussformen vorgesehenes Bindemittel auf Gelatinebasis (GMBond). Dieses wurde hinsichtlich der Emissionen im Vergleich mit zwei verschiedenen konventionellen Bindemittelsystemen untersucht [Technikon, 2005]. Unter Verwendung des proteinbasierten Bindemittels konnten während des Gießens, in der Abkühlphase und nach dem Entformen deutlich verringerte Emissionen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse wurden von anderer Seite ebenfalls im Vergleich mit zwei konventionellen Bindemitteln bestätigt [Wang et al., 2007].

In der vorliegenden Arbeit wurden neben Gelatine auch andere Proteine auf ihre Eignung als BM untersucht. Ob die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bezüglich der Emissionen

auf andere Proteine übertragbar sind, wurde nicht untersucht. In Abhängigkeit von der Primärstruktur der verwendeten Proteine ist zu erwarten, dass der Anteil schwefelhaltiger oder aromatischer Aminosäuren einen signifikanten Einfluss auf die Bildung von Luftschadstoffen haben könnte. Weiterhin könnten Verunreinigungen des Proteins für die Emission von Schadstoffen verantwortlich sein. Versuche mit proteingebundenen Prüfkörpern, die in eine Aluminiumschmelze getaucht wurden, zeigten zudem Rauchentwicklung. Eine Möglichkeit der Reduktion von Geruch und Rauch könnten Proteine mit geringem Gehalt von aromatischen Aminosäuren bzw. sehr reine Proteine ohne Verunreinigungen (wie z.B. Fettrückstände) sein. Ein künstliches Protein, das für solche Bindemittelzwecke designt wird (z.B. ohne aromatische AS, ohne schwefelhaltige AS) könnte ebenso zu verringerten Emissionen führen.

Als einer der Vorteile des GMBond - Bindemittels wurden neben den verringerten Emissionen auch eine einfache Entformbarkeit der Gusstücke angeführt [Technikon, 2005]. Bei konventionellen Bindemitteln werden (abhängig von Bindemitteltyp und -menge) sehr hohe Festigkeiten erreicht, was im Gussprozess von Vorteil ist (bis 700 N/cm<sup>2</sup> Biegefestigkeit im Vergleich zu 270 N/cm<sup>2</sup> bei Protein, vgl. Abschnitt 3.1.1.2). Allerdings muss auch sichergestellt sein, dass das Bindemittel infolge der thermischen Belastung genügend Festigkeit verliert, um das Gusstück einfach aus der erkalteten Form entnehmen zu können. Hohe Restfestigkeiten bedeuten einen Mehraufwand in der Produktion und bergen die Gefahr der Zerstörung des Gussteils bei der Entformung bzw. Entfernung der Formreste.

Für Caseinat wurde bereits bei 300°C ein Festigkeitsverlust von 60 % nach 15 min gemessen (siehe Abschnitt 3.1.9.1). Bei Temperaturen von 400 °C wurde bereits nach 10 min ein Festigkeitsverlust von etwa 75 % gemessen, nach 20 min war nur noch eine Restfestigkeit von etwa 10 % messbar. Die Schmelztemperatur von Aluminiumlegierungen liegt dagegen bei etwa 650-700 °C. Es ist anzunehmen, dass das Protein, welches mit Schmelze in direkten Kontakt kommt, während der Abkühlung des Gussteils soweit zerstört wird, dass keine messbare Festigkeit erhalten bleibt. Unter realen Gussbedingungen hängt der Wärmeeintrag allerdings vom Masseverhältnis von Gussteil zu Gussform ab.

Bei unvollständiger thermischer Zerstörung des Proteins (unvernetztes Protein) besteht die Möglichkeit, die proteingebundenen Formstoffreste mittels Wasser aus den Gussteilen zu entfernen. Dies ist bei den meisten konventionellen Bindemitteln (z.B. Coldbox-Verfahren) nicht möglich, da eine chemische Vernetzung des Bindemittels stattgefunden hat. Enzymatisch nicht vernetztes Protein löst sich in Wasser und der Formstoff kann somit gereinigt werden (siehe Abbildung 3-26). Zwar ist (thermisch unbelastetes) enzymatisch vernetztes Protein nicht mehr wasserlöslich, jedoch wird dessen Festigkeit in Anwesenheit von Wasser erheblich reduziert, was zu einer einfachen Entfernung des Formstoffes führt. Wie in Abschnitt 3.1.9.4 gezeigt, können Proteaselösungen benutzt werden, um das Protein vom den

Sand zu lösen und den Sand damit zu reinigen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass wiederbefeuchteter Sand, der nicht thermisch belastet wurde (z.B. wenn Gussformen vor dem Abguss beschädigt wurden) für eine erneute Verwendung zur Formherstellung bei nur geringem Festigkeitsverlust (ca. 10 % nach 3facher Wiederverwendung, siehe Abbildung 3-29) geeignet ist. Zusammenfassend seien hier die möglichen Vor- und Nachteile bei Verwendung von Proteinen als Bindemittel genannt:

- Einfaches Formstoffrecycling nicht genutzter Gusskerne durch Rehydrierung
- niedrigere Zerfallstemperaturen, einfache Entformbarkeit
- ungiftige Ausgangsstoffe
- Recycling des Sandes durch Waschen (optional mit Proteasen) möglich
- Weniger giftige Emissionen durch Ausglühen [Wang et al., 2007]
- Höherer Preis für Proteine
- Wasser als Lösemittel notwendig (Trocknung energieaufwendig, Schütffähigkeit reduziert)
- Geruchs- und Rauchentwicklung beim Gießen

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Proteine prinzipiell als Bindemittel für Sand geeignet sind und hohe Festigkeiten erreicht werden können. Dem Einsatz von Protein steht jedoch der hohe Preis gegenüber konventionellen Bindemitteln entgegen (derzeit 2-10facher Preis von Proteinen gegenüber Phenolharzen, große Schwankungen der Marktpreise). Aufgrund der besseren Recyclingfähigkeit des Altsandes, dem stark verringerten Einsatz von Chemikalien in Verbindung mit reduzierten Emissionen stellen Proteine trotz des höheren Preises eine interessante Alternative zu konventionellen Bindemittelsystemen dar.

### **Untersuchungen zur Eignung von Proteinen als Bindemittel für Holzwerkstoffe**

Innerhalb der letzten 25 Jahre wurde intensive Forschung im Bereich alternativer Bindemittel für Holzwerkstoffe betrieben, wobei sehr unterschiedliche Ansätze genutzt wurden [Krug, 2007a]. Neben der Substitution von konventionellen Bindemitteln durch Protein- oder stärkebasierte Bindemittel wurde untersucht, inwieweit sich die holzeigenen Bindekräfte durch veränderte Aufschlussverfahren (bei Faserplatten) oder eine enzymatische Behandlung des Holzes aktivieren lassen [Felby et al., 2002; Kües et al., 2007]. Neben den vorgenannten gab es außerdem Ansätze, Tannine [Dix und Marutzky, 1985] oder Lignin als Bindemittel zu verwenden.

Die Verwendung von Proteinen als Bindemittel für Holzwerkstoffe wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Dabei wurde das Protein entweder als alleiniges BM eingesetzt [Khosravi et al., 2010; Krug und Tobisch, 2010; Metzger, 2007; Qiang et al., 2010; Schöpfer, 2006], oder konventionelle BM mit Protein gemischt verwendet [Krug, 2007b; Yang et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit sollte primär der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung des Proteins auf die Eigenschaften von Spanplatten untersucht werden. Für diese Versuche wurden keine Blends mit konventionellen BM verwendet, um mögliche Einflüsse auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden und eine mögliche Inaktivierung des Enzyms von vornherein auszuschließen.

Im Gegensatz zu Bindemitteln für Gießereisand gibt es verschiedene nationale Standards, die unterschiedliche Anforderungen an Holzwerkstoffe festlegen. Die Ergebnisse in dieser Arbeit wurden auf die Anforderungen der europäischen Normen bezogen. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2.1 gezeigt, wurden die Mindestanforderungen an Querkzugfestigkeit ( $0,4 \text{ N/mm}^2$ ) und Biegefestigkeit ( $11 \text{ N/mm}^2$ ) in den dargestellten Versuchen erfüllt. Abbildung 4-1 zeigt eine Gegenüberstellung von Werkstoffkennwerten für Spanplatten mit ähnlichen Bindemittelmengen, die an anderer Stelle publiziert wurden. Die Ergebnisse sind allerdings nicht direkt vergleichbar, da verschiedene Herstellungsparameter/-verfahren eingestellt bzw. verwendet wurden. Jedoch haben diese Ergebnisse orientierenden Charakter in Bezug auf die erreichbaren Festigkeiten. Diesen Werten sind die mechanischen Kennwerte von konventionellen PF-Harz-gebundenen Spanplatten gegenübergestellt. Folgende Parameter variierten in den einzelnen Literaturangaben:

- Presszeitfaktor
- Presstemperatur
- Bindemittelmenge
- Ausgangsfeuchte des Spanvlieses
- Plattendicke

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zumindest ansatzweise zu ermöglichen, wurden jeweils die besten erzielten Ergebnisse der einzelnen Publikationen angegeben (für proteingebundene Spanplatten). Dabei wurden als Auswahlkriterien die Biegefestigkeit bzw. Querzugfestigkeit festgelegt.

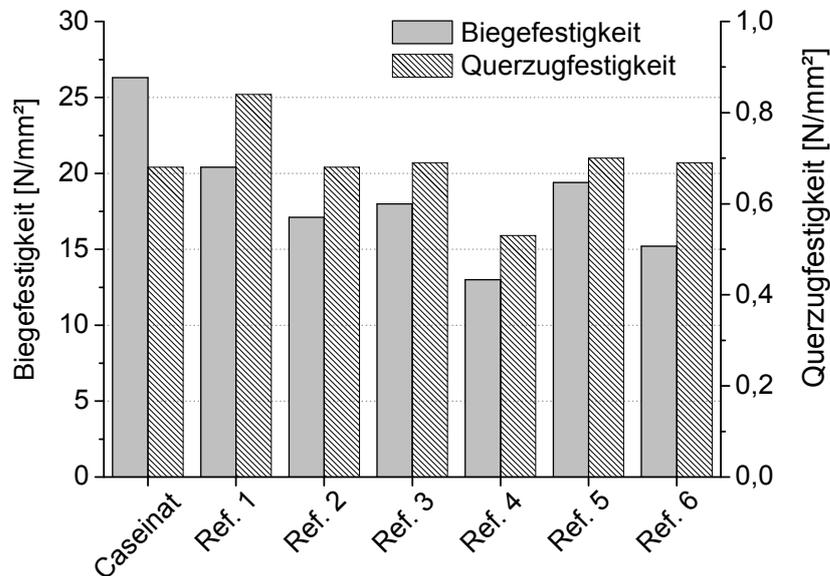


Abbildung 4-1: Vergleich von Querzug- und Biegefestigkeiten von Spanplatten, die mit Proteinen als Bindemittel hergestellt wurden. Zum Vergleich sind die Festigkeitswerte von Spanplatten mit konventionellen PF-Harzen angegeben (Ref. 5 und Ref. 6). Die Legende (Referenzen) findet sich in Tabelle 4-1.

Tabelle 4-1: Übersicht über mechanische Kennwerte und Dickenquellung von Spanplatten, die mit Protein als Bindemittel hergestellt wurden

	Quelle	Protein/BM	Querzugfestigkeit [N/mm <sup>2</sup> ]	Biegefestigkeit [N/mm <sup>2</sup> ]	Quellung [%] (2 h)
Caseinat	vorliegende Arbeit	Caseinat (MTG-vernetzt)	0,68	26,3	33
Ref. 01	[Kehr und Sirch, 1998]	Caseinat	0,84	20,4	8
Ref. 02	[Kehr, 1999]	Soja/Caseinat (67/33 %)	0,68	17,1	-
Ref. 03	[Kehr, 1999]	Weizen	0,69	18	
Ref. 04	[Sirch und Kehr, 1997]	Weizen	0,53	13	9
Ref. 05	[Dix und Marutzky, 1985]	Phenol-Formaldehyd (PF)	0,7	19,4	15,5
Ref. 06	[Metzger, 2007]	PF	0,69	15,2	16,2

Wie Abbildung 4-1 entnommen werden kann, sind die alternativen Bindemittel den konventionellen BM bezüglich der erreichbaren mechanischen Eigenschaften gleichwertig. Wünschenswert für einen breiten Einsatz biobasierter BM im Holzwerkstoffbereich wäre jedoch

eine verbesserte Resistenz gegen Feuchtigkeit. Konventionelle BM erlauben die Herstellung von Holzwerkstoffen, die aufgrund ihrer Feuchteresistenz auch im Außenbereich eingesetzt werden können. Biobasierte Bindemittel sind dagegen häufig wasserlöslich (Proteine, Kohlenhydrate) oder besitzen ein hohes Wasseraufnahmevermögen. Der Zielkonflikt besteht in der Tatsache, dass die verwendeten Rohstoffe oft als wässrige Lösung verarbeitet werden müssen, jedoch anschließend kein Wasser mehr aufnehmen sollen. Dies setzt jedoch eine Umwandlung (chemisch/physikalisch) der verwendeten Stoffe voraus. Die relativ hohe Quellfähigkeit dieser Werkstoffe beschränkt das mögliche Anwendungsgebiet solcher Holzwerkstoffe, da eine temporäre Exposition zu Wasser oder sehr hoher Luftfeuchte nicht immer vollständig ausgeschlossen werden kann. Die maximale Dickenquellung, die in der EN 312 (2003) für Spanplatten des Typ P3 (allgemeine Zwecke, Verwendung in Feuchträumen) aufgeführt ist, beträgt beispielsweise in dem relevanten Dickenbereich von 8-19 mm 14 % (nach 24 h Quellung). Die in Tabelle 4-1 aufgeführten Werte bezogen sich dagegen nur auf 2 h Quellung, höhere Werte sind nach 24 h Wasserlagerung bei allen aus der Literatur vorgestellten Spanplatten zu erwarten. Eine dauerhafte Verbesserung der Feuchtigkeitsbeständigkeit würde zwar eine deutliche Verbesserung der Akzeptanz und eine größere Bandbreite der Verwendungsmöglichkeiten eröffnen, allerdings wäre damit auch automatisch die biologische Abbaubarkeit reduziert, da diese Abbaumechanismen nur in Anwesenheit von Wasser stattfinden können.

In allen in der Natur vorkommenden biochemischen Prozessen spielen Enzyme eine zentrale Rolle. Bei der Verwendung von Werkstoffen biologischen Ursprungs (z.B. Polysaccharide, Proteine) wurde dem Potential dieser hocheffizienten Katalysatoren bisher nur in beschränktem Umfang Beachtung geschenkt. So erfolgten z.B. Versuche zur Aktivierung von Lignin mittels Laccase, bei denen Holzfasern mit Enzym behandelt und Faserplatten gepresst wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Faserplatten allein durch die vorherige enzymatische Behandlung der Holzfasern (ohne BM) hergestellt werden konnten [Felby et al., 2002]. Die Verwendung von Transglutaminase-vernetztem Protein zur Herstellung von Spanplatten wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten erstmalig, dass die Dickenquellung von Spanplatten durch die enzymatische Quervernetzung von Proteinen reduziert werden kann. Dabei hatte auch die Presstemperatur einen signifikanten Einfluss auf die Dickenquellung (Abbildung 3-34). Die Dickenquellung proteingebundener Spanplatten liegt über den Werten, die mit konventionellen Bindemitteln erreicht wird (33 % gegenüber 15 % bei konventionellen BM). Durch verbesserte Technologien (Verwendung von Additiven wie Wachs) oder die Verwendung von Enzymmischungen könnte eine weitere Optimierung hinsichtlich Festigkeitsresistenz stattfinden.

Bei Spanplatten handelt es sich um den (masse- und volumenbezogen) meist verwendeten Holzwerkstoff in Europa. Den Holzspänen werden dabei relativ große Mengen (Größenord-

nung 10 %) Kunstharze als Bindemittel zugesetzt. Der Konkurrenzdruck im Bereich der Bindemittelhersteller ist bei verhältnismäßig kleinen Gewinnmargen und großen eingesetzten Mengen (bei  $8,7 \times 10^6 \text{ m}^3$  Spanplatten mehrere 100.000 t/a in Deutschland) hoch. Konventionelle Bindemittel sind im Vergleich zu Proteinen relativ preiswert (etwa 600 €/t für UF-Harze, [Schöpfer, 2008]). Pflanzliche Proteine, die in größeren Mengen als tierisches Protein verfügbar sind, kosten mit 1500 €/t für Sojaprotein (90 %, SPI) oder Gluten mit etwa 1000 €/t [Euroduna, 2011] deutlich mehr. Der Einsatz neuer Bindemittel ist nicht nur stark preisabhängig, sondern diese sollten auch kompatibel mit der Herstellungstechnologie sein. Durch die Beimischung von Proteinen zu konventionellen Bindemitteln war es beispielsweise möglich, gleichzeitig die Formaldehydemissionen zu reduzieren und deutlich hellere Leimfugen zu erzielen [Krug, 2007b].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass es mit Proteinen als BM möglich ist, sehr helle Spanplatten (bei 110 °C) herzustellen (vgl. Abbildung 8-8 und Abbildung 8-9, siehe Anhang). Übliche Presszeitfaktoren liegen im Bereich von 7-11 s/mm [Krug et al., 2007], während bei den hier vorgestellten Versuchen Presszeitfaktoren von ca. 55 s/mm notwendig waren. Die Presszeit wurde in den durchgeführten Versuchen nicht optimiert, so dass eine deutliche Reduktion wahrscheinlich ist. Jedoch ist eine insgesamt höhere Presszeit durch die höhere Spanfeuchte von 17 % (gegenüber ca. 12 % bei konventionellen BM) zu erwarten, da entsprechend mehr Energie zum Verdampfen des Wassers notwendig ist. Den Vorteilen bei der Verwendung von Proteinen als Bindemittel, wie die Verringerung der Formaldehydabgabe oder verbesserter Optik stehen somit längere Prozesszeiten und der höhere Preis des BMs entgegen.

Aufgrund der hohen Produktionsmengen entstehen ebenso hohe Abfallmengen nach deren Nutzung. Etwa 50 % der hergestellten Spanplatten finden im Möbelbau Verwendung. Durch die relativ lange Lebensdauer dieser Produkte kommt es zu einem zeitlich verzögerten Abfallaufkommen. Die kontinuierlich steigende Menge an gebrauchten Holzwerkstoffen wird derzeit entweder recycelt und für die erneute Spanplattenproduktion verwendet oder energetisch genutzt [Frühwald et al., 2000]. Problematisch ist hierbei, dass formaldehydhaltige Bindemittel wieder in den Stoffkreislauf zurückgeführt werden und somit weiterhin zu erhöhten Emissionen beitragen oder bei der Verbrennung gefährliche Stoffe freigesetzt werden. Aufgrund der Änderung von gesetzlichen Rahmenbedingungen (insbesondere in Bezug auf die Umweltverträglichkeit) und der vorgenannten Vorteile könnten alternative Bindemittel trotz höherer Preise und höherer Herstellungskosten (z.B. durch lange Presszeiten) zukünftig eine kommerzielle Verwendung finden.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Verwendung von Proteinen als alternatives Bindemittel für Gießereisand zur Herstellung von Gussformen bzw. für die Herstellung von Spanplatten. Dabei wurde der Einfluss der enzymatischen Quervernetzung der Proteine mittels eines Enzyms – mikrobielle Transglutaminase – auf die Festigkeitseigenschaften der hergestellten Werkstoffe untersucht.

Die Verwendung von Caseinat und anderer wasserlöslicher Proteine als Bindemittel für Gießereisand zeigte, dass sich damit Formstoffe hoher Festigkeit (bis zu 9 MPa Druckfestigkeit) herstellen lassen. Diese Biegefestigkeiten lagen ebenso im Bereich derer konventioneller Bindemittel für Formsand (250 N/cm<sup>2</sup>). Durch die Variation der Proteinanteile und des Lösungsmittelgehalts von Caseinat-gebundenem Sand konnte die Festigkeit zudem in einem weiten Bereich eingestellt werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass auch mit anderen Proteinen wie Sojaprotein, Erbsenprotein und Gelatine als Bindemittel für Gießereisand hohe Festigkeiten erreicht werden können (3,8 – 6,3 MPa Druckfestigkeit).

Die Verwendung von (mittels Transglutaminase) enzymatisch quervernetzten Proteinen als Bindemittel wurde im Zusammenhang mit Gießereianwendungen noch nicht beschrieben. Durch diese Vernetzungsreaktion verfestigten sich die Formstoffe im feuchten Zustand und das Protein wurde wasserunlöslich. Die enzymatische Quervernetzung des Proteins im Formstoff bewirkte bei der Verwendung von Casein, Sojaprotein und Gelatine eine Reduktion der Druckfestigkeit des Formstoffes im trockenen Zustand. Bei der Verwendung einer löslichen Erbsenproteinfraktion konnte allerdings eine Festigkeitssteigerung durch die enzymatische Quervernetzung von 36 % gegenüber unvernetztem Protein bewirkt werden. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten zudem strukturelle Änderungen der Bindemittelbrücken im Formstoff identifiziert werden.

Die Untersuchung der Lagerungsbedingungen von Prüfkörpern für den Druckversuch zeigte, dass der Formstoff nach der Trocknung bei Luftfeuchten bis 50 % r.F. über längere Zeit ohne Veränderung der Festigkeitseigenschaften lagerfähig ist. Während der Lagerung bei höherer Luftfeuchte kam es zu einer Wasseraufnahme des Proteins und damit zu einer Verringerung der Festigkeit.

Versuche zum thermischen Recycling der hergestellten Formstoffe zeigten, dass Protein bei Temperaturen von 450 °C größtenteils (zu 99% )wieder vom Formstoff entfernt werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass thermisch nicht belasteter Formsand (mit unvernetztem Protein) zur Wiederverwendung lediglich rehydriert werden muss oder durch Waschen gereinigt werden kann. Bei enzymatisch quervernetztem Proteine war es durch die Verwendung einer Proteaselösung ebenso möglich, thermisch unbelasteten Formsand durch Wa-

schen zu reinigen. Die Möglichkeit des Recyclings von unbenutztem Formstoff ist bei konventionellen Bindemitteln dagegen nicht möglich.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Herstellung von Spanplatten mit Protein als alleinigem Bindemittel untersucht. Mit einer Spanfeuchte von 17 % gegenüber 12 % bei konventionellen Bindemittelsystemen (z.B. Harnstoff-Formaldehyd-Harze) und vergleichbarem Bindemittelanteil (10 % bezogen auf das Holzgewicht) konnten stabile Spanplatten hergestellt werden. Die enzymatische Quervernetzung des Proteins im Spanfließ bzw. auf den Holzspänen führte zu einer Verringerung der Dickenquellung und zusätzlich zu höheren Festigkeiten der Spanplatten. Bei Verwendung einer niedrigen Pressplattentemperatur von 110 °C (im Vgl. zu 220 °C bei konventionellen Bindemitteln) konnten zudem sehr helle Spanplatten mit einer optisch sehr ansprechenden Oberfläche hergestellt werden, da es kaum zu einer Farbänderung des Holzes kam. Die hergestellten Spanplatten erfüllten außerdem bezüglich der ermittelten Querkzug- und Biegefestigkeit die Mindestanforderungen nach EN 312 (2010) (P2 - Spanplatten für Möbel- und Innenausbau im Trockenbereich). Ein Teil der Ergebnisse dieser Arbeit wurde vom Projektpartner weltweit patentiert [van Herwijnen et al., 2009].

Proteine könnten in den dargestellten Anwendungsgebieten eine Alternative zu konventionellen Bindemitteln darstellen, demgegenüber stehen jedoch momentan höhere Rohstoffkosten und längere Prozesszeiten. Die enzymatische Quervernetzung führte dabei zur Verbesserung der mechanischen Festigkeiten von Formstoffen für die Gießerei (Verwendung von Erbsenprotein) sowie von Spanplatten (Caseinat).

## 6 **Ausblick**

Der Einsatz nachwachsender Rohstoffe ist im Hinblick auf Umweltschutz, Nachhaltigkeit und Reduktion von Emissionen interessant, da fossile Ressourcen geschont werden können. Die Verwendung von Proteinen als Bindemittel in speziellen Anwendungsbereichen könnte dabei gleichzeitig zu einer verbesserten Wertschöpfung von Proteinen gegenüber konventionellen Bindemitteln führen. Hinsichtlich der Verwendung von Proteinen in bestehenden Anwendungen und der Erschließung neuer Einsatzgebiete besteht weiterhin Forschungsbedarf.

Anhand der dargestellten Ergebnisse konnte die mögliche Verwendung von Proteinen speziell als Bindemittel für Gießereisand sowie als Bindemittel für Spanplatten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu konventionellen Bindemitteln ist die Wasserresistenz von Proteinen jedoch gering, was die Einsatzgebiete in industriellen Anwendungen einschränkt. Die Erhöhung der Wasserresistenz könnte durch die Verwendung von Blends z.B. mit wasserunlöslichen Proteinen [Guilbert und Cuq, 2005] oder durch Einbringen hydrophober Bestandteile wie Fettsäuren oder pflanzlicher Öle dahingehend weiter untersucht werden. Bei der Herstellung der Spanplatten konnte ein deutlicher Einfluss der Presstemperatur auf die Dickenquellung gemessen werden, d.h. die gezielte thermische Denaturierung der Proteine könnte ebenso zur Verbesserung der Wasserresistenz beitragen.

Die Verwendung von Transglutaminase zeigte, dass Proteine durch dieses Enzym (aufgrund der Bildung makromolekularer Proteinnetzwerke) in ihren Eigenschaften gezielt verändert werden können. Bisher existieren lediglich wenige Ansätze, die Strukturen bzw. den Vernetzungsgrad solcher Proteinnetzwerke z.B. durch Viskositätsmessungen oder Gelfestigkeiten zu charakterisieren. Die Entwicklung von Methoden zur verbesserten Strukturaufklärung insbesondere hinsichtlich der tatsächlichen Quervernetzungsgrade- und räumlichen Verteilung im Proteinnetzwerk könnte die Grundlage für eine verbesserte enzymatische Quervernetzung bilden.

Da für die enzymatische Vernetzungsreaktion mittels Transglutaminase lediglich die Aminosäuren Lysin und Glutamin verwendet werden können, ist deren Anteil in der Primärstruktur sowie die sterische Zugänglichkeit im Proteinmolekül von hoher Bedeutung. Die Suche nach geeigneten Substraten (hohe Anteile beider Aminosäuren im Protein) oder ein zukünftiges gezieltes Design von Substratproteinen könnten dabei den Quervernetzungsgrad deutlich erhöhen und damit wesentlich stärkere Eigenschaftsänderungen bewirken. Eine Verwendung von Proteinblends, bei denen je eine der beiden relevanten Aminosäuren sehr häufig (und die jeweilige andere AS zumindest in geringem Umfang) im Protein vorhanden ist, wäre ebenso möglich.

Die Verfügbarkeit von Proteinen ist weltweit beschränkt, da Proteine meist selbst nicht primär als Rohstoff gewonnen werden, sondern fast ausschließlich als Nebenprodukt vor allem in der Stärkeproduktion anfallen. Zwar werden Proteine aus Pflanzen auch direkt als Futtermittel z.B. für die Fischzucht gewonnen, oder stark proteinhaltige Pflanzen für die Nutztierhaltung angebaut (z.B. Futtererbsen), allerdings handelt es sich bei der produzierten Gesamtmenge von Proteinen um – mit konventionellen Bindemitteln verglichen - geringe Mengen. Die gezielte Proteingewinnung aus Pflanzen ist bisher nur unter bestimmten Rahmenbedingungen wirtschaftlich, d.h. nur dann wenn hohe Herstellungskosten durch eine hohe Wertschöpfung kompensiert werden können (Fischzucht). Die Erschließung neuer Proteinrohstoffquellen, bei denen Proteine unter geringem Verfahrens- bzw. korreliertem Kosteneinsatz gewonnen werden können, stellt ebenso eine Herausforderung dar.

Untersuchungen zur Verwendung von Proteinen als Bindemittel im industriellen Maßstab z.B. für die Herstellung von Spanplatten oder Gussformen gestalten sich schwierig, da beide Branchen in der Massenfertigung unter hohem Kostendruck stehen und als eher konservativ gelten. Für kleinere spezialisierte Unternehmen, die in Nischenanwendungen mit höheren Gewinnmargen agieren, könnten die höheren Rohstoffkosten durch ein entsprechendes Produktimage bzw. wesentlich verbesserte Eigenschaften (z.B. schnelle biologische Abbaubarkeit) kompensiert werden.

Die Verwendung von enzymatisch quervernetztem Protein beschränkt sich nicht nur auf die in dieser Arbeit vorgestellten Gebiete. Neben der Herstellung von Wegwerfartikeln, die nur kurzzeitigen Kontakt mit Feuchtigkeit aufweisen, wie z.B. Cateringgeschirr oder Verkaufsverpackungen, die nicht zum längeren Lagern von feuchten Lebensmitteln bestimmt sind, kommen weitere Anwendungsgebiete in Frage bei denen eine schnelle Kompostierbarkeit erwünscht ist. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Proteinen besteht darin, dass sich beispielsweise Folien ohne Zusatz konventioneller Kunststoffe herstellen lassen. Die Eigenschaftsverbesserung von Folien aus Proteinen mit entsprechenden Füllstoffen oder Fasern (fließender Übergang der Bedeutung des Proteins als Matrixmaterial bzw. als Bindemittel) wurde bisher nur unzureichend untersucht.

Weitere Versuche könnten durchgeführt werden, um den festigkeitsreduzierenden Effekt der Quervernetzung bei einigen Proteinen nutzbar zu machen. Es ist bekannt, dass die MTG bei hohen Temperaturen schnell (Minuten – Sekunden) inaktiviert wird. Bei der Herstellung von Gusskernen in vorgewärmten Werkzeugen würde die MTG bei entsprechend hoher Temperatur in dünnwandigen Bereichen schnell inaktiviert werden. Bei dickwandigen Bauteilen hingegen dauert die Erwärmung des Formstoffs länger, so dass hier eine Vernetzung stattfinden kann und die Festigkeit reduziert wird. Damit wäre eine lokale Vernetzung oder die Einstellung einer festeren Oberfläche mit weichem Kernmaterial (Festigkeitsgradienten) unter Verwendung eines homogenen Formstoffs möglich.

## 7 Literatur

- Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. und Motoki, M. (1989). "Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms." *Agric. Biol. Chem.*, 53, 2613-17.
- Anson, M. L. (1969). "The estimation of Pepsin, Trypsin, Papain and Cathepsin with Haemoglobin." *J. Gen. Physiol.*, 22, 79-89.
- Babin, H. und Dickinson, E. (2001). "Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin." *Food Hydrocolloids*, 15, 271-276.
- Baekeland, L. H. "(1907) Condensation Product and Method of Making same." Great Britain; Pat.-No.: 21566.
- Beier, W. (2009). "Biologisch abbaubare Kunststoffe." Umweltbundesamt, August 2009, 1-11.
- Binder, W. H. und Dunky, M. (2004). "Melamine-Formaldehyde Resins." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Bischoff, F. U. (2003). "Untersuchungen zum Einsatz eines wasserlöslichen, anorganischen Kernbinders auf Basis von Magnesiumsulfat in einer Aluminium-Leichtmetallgießerei," Dissertation, Fakultät für Werkstoffwissenschaften und Werkstofftechnologie, Technische Universität Bergakademie Freiberg, Freiberg.
- Carus, M., Müssig, J. und Gahle, C. (2008). "Naturfaserverstärkte Kunststoffe." Infobroschüre der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe (FNR).
- Coussons, P. J., Price, N. C., Kelly, S. M., Smith, B. und Sawyer, L. (1992). "Transglutaminase catalyses the modification of glutamine side chains in the c-terminal region of bovine b-lactoglobulin." *Biochem. J.*, 283, 803-806.
- Crandell, G. R., Stahl, L., LaFay, V., Glowacki, C. R. und Knight, S. (2004). "Core Additives: Effects on Core Strength, Casting Quality and Air Emissions." Casting Emission Reduction Program - CERP, AFS Paper 05-129.
- Cuq, B., Gontard, N. und Guilbert, S. (1998). "Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production." *Cereal Chemistry*, 75, 1-9.
- de Graaf, L. A. und Kolster, P. (1998). "Industrial Proteins as a Green Alternative for 'Petro' Polymers: Potentials and Limitations." *Macromol. Symp.*, 127, 51-58.
- Destatis. (2009). "Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Jahrbuch 2009."

- DIBt-RL-100. (1994). "Richtlinie über die Klassifizierung und Überwachung von Holzwerkstoffplatten bezüglich der Formaldehydabgabe." DIBt-Richtlinie 100, Fassung vom Juni 1994, Deutsches Institut für Bauwesen.
- Dix, B. und Marutzky, R. (1985). "Mechanisch-technologische Eigenschaften von Spanplatten mit MDI- und PF-modifiziertem Tanninharz als Bindemittel." *European Journal of Wood and Wood Products*, 43.
- Dobosz, S. M. und Major-Gabryś, K. (2010). "Strength properties of moulding sands with chosen biopolymer binders." *Archives of Foundry Engineering*, 10, 17-20.
- Dube, M., Schaefer, C., Neidhart, S. und Carle, R. (2006). "Texturization and modification of vegetable proteins for food applications using microbial transglutaminase." *European Food Research and Technology*, 225, 287-299.
- Dunky, M. und Niemz, P. (2002). "Holzwerkstoffe und Leime." Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York; ISBN: 3-540-42980-8.
- Dynea. (2011). "Internetauftritt der Fa. Dynea OY - <http://www.dynea.com/solutions>", Zugriff am 13.06.2011."
- Eder, G., Psimenos, A. und Sipos, M. (2006). "Cold-Box – Quo Vadis." Langfassung Vortrag Internationale Konferenz: "Moderne Formstoffe", Milovy, CZ.
- Euroduna. (2011). "Market-Focus 30/2011, <http://www.euroduna.com/marktueberblick.08.de.html>, Zugriff am 02.08.2011."
- Felby, C., Hassingboe, J. und Lund, M. (2002). "Pilot-scale production of fiberboards made by laccase oxidized wood fibers: board properties and evidence for cross-linking of lignin." *Enzyme and Microbial Technology*, 31, 736-741.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966). "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.
- Fox, P. F. (2001). "Milk proteins as food ingredients." *International Journal of Dairy Technology*, 54, 41-55.
- Frühwald, A., Scharai-Rad, M. und Hasch, J. (2000). "Ökologische Bewertung von Holzwerkstoffen." Johann Heinrich von Thünen-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ländliche Räume, Wald und Fischerei.
- Glaß, W. (2004). "Fehleinschätzung der wirkenden Kernauftriebskräfte verursacht zwangsläufig Fehlguß." *Giesserei Praxis*, 6, 217-220.

- Gotro, J. und Prime, R. B. (2004). "Thermosets." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Grabowska, B. (2008). "Biopolimers-structure, properties and applicability in the foundry industry." *Archives of Foundry Engineering* 8, 51-54.
- Greenberg, C. S., Birckbichler, P. J. und Rice, R. H. (1991). "Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues." *Faseb J*, 5, 3071-7.
- Guilbert, S. und Cuq, B. (2005). "Material formed from proteins." In: *Handbook of biodegradable polymers* (Bastioli, C., ed.), Rapra Technology Ltd., Shawbury, 339-384.
- Harris, K. und Lafarge, P. (2006). "FENOTEC – Estergehärtete alkalische Phenolharzbinder." *Giesserei-Praxis*, 60.
- Helber, J., Lichtenstein, N. und Gabriel, S. (2009). "Organische Pyrolyseprodukte aus Formstoffen in Gießereien." BGIA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, ISBN: 978-3-88383-822-9.
- Henneberg, M. (2011). "Einsatz von Wasserschlichte für den Groß- und Mittelguss." *Giesserei-Praxis*, 04/2011.
- Herreid, R. M. und Srsen, B. J. "Gelatin coated sand core and method of making same." US Patent 6467525 B2.
- Horne, D. S. (2002). "Casein structure, self-assembly and gelation." *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7, 456-461.
- IFG. (1996). "Handbuch Abfall 1 - Untersuchung von Eisen- und NE- Metallgießereien." Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- Ikura, K., Nasu, T.-a., Yokota, H., Tsuchiya, Y., Sasaki, R. und Chiba, H. (1988). "Amino Acid Sequence of Guinea Pig Liver Transglutaminase from Its cDNA Sequence." *Biochemistry*, 27, 2898–2905.
- IPPC. (2004). "Reference Document on Best Available Techniques in the Smitheries and Foundries Industry." European IPPC Bureau - Integrated Pollution Prevention and Control.
- IPPC. (2005). "Reference Document on Best Available Techniques in the Smitheries and Foundries Industry." European IPPC Bureau - Integrated Pollution Prevention and Control.
- Kalapathy, U., Hettiarachchy, N. S., Myers, D. und Hanna, M. A. (1995). "Modification of soy proteins and their adhesive properties on woods ", 72, 507-510.

- Keenan, T. R. (2003). "Gelatin." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Kehr, E. (1999). "Alternative Bindemittelentwicklungen und deren Testung für Holzwerkstoffe." *Vortrag beim 3. IHD Holzwerkstoff-Kolloquium, Dresden, 09.12.1999.*
- Kehr, E. und Sirch, H.-J. (1998). "Entwicklung, Herstellung und Prüfung von Spanplatten unter Einsatz von natürlichen Bindemitteln." unveröffentlichter Abschlussbericht (Juni 1998), Institut für Holztechnologie Dresden.
- Khait, K. (2003). "Recycling, Plastics." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Khosravi, S., Khabbaz, F., Nordqvist, P. und Johansson, M. (2010). "Protein-based adhesives for particleboards" *Industrial Crops and Products*, 32, 275-283
- Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K. und Yamanaka, S. (1996). "[epsilon]-([gamma]-Glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*." *FEMS Microbiology Letters*, 144, 157-160.
- Kobayashi, S. und Uyama, H. (2001). "Enzymatic Polymerization." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Kopf, P. W. (2002). "Phenolic Resins." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Krätz, O. (2004). "Aufstieg und Niedergang des Galaliths." *Chemie in unserer Zeit*, 38, (2), 133-137.
- Krische, W. und Spitteler, A. "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.
- Krishnan, H. B. (2001). "Biochemistry and Molecular Biology of Soybean Seed Storage Proteins." *Journal of New Seeds*, 2, 1-25.
- 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.
- Krug, D. (2007a). "Bindemittel auf Naturstoffbasis für die Holzindustrie." *Holz Innovativ 2007*, Rosenheim, 18.-19.04.2007.
- Krug, D. und Tobisch, S. (2010). "Einsatz von Proteinen als Bindemittel für Holzwerkstoffe." *European Journal of Wood and Wood Products*, 68, 289-301.

- Krug, D., Tobisch, S., Mäbert, M., Heep, W., Kantner, W. und Durkic, K. (2007). "Protein-Hybrid-Bindemittel für die Holzwerkstoffindustrie." *naro.tech - 6. Internationales Symposium "Werkstoffe aus Nachwachsenden Rohstoffen"*, Erfurt, Germany.
- Krug, D. T., Steffen; Heep, Wolfgang; . (2007b). "Helle Holzwerkstoffe mit Phenolharz möglich." *Holz-Zentralblatt*, 133, 192-196.
- Kuckova, S., Hynek, R. und Kodicek, M. (2007). "Identification of proteinaceous binders used in artworks by MALDI-TOF mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 201-206.
- Kües, U., Bohn, C., Euring, M., Müller, C., Polle, A. und Kharazipour, A. (2007). "Enzymatically Modified Wood in Panel Board Production." In: *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*, Universitätsverlag Göttingen, 433-468, Chapter 18.
- Kuetemeyer, C., Froeck, M., Werlein, H. D. und Watkinson, B. M. (2005). "The influence of salts and temperature on enzymatic activity of microbial transglutaminase." *Food Control*, 16, 735-737.
- Kunitz, M. (1947). "Crystalline soybean trypsin inhibitor." *J Gen Physiol.*, 30, 291-310.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, 227, 680-685.
- Marx, C., Hertel, T. und Pietzsch, M. (2007). "Soluble expression of a pro-transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* in *Escherichia coli*." *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1543 - 1550.
- Marx, C. K. (2008). "Optimierung einer mikrobiellen Transglutaminase mittels Random Mutagenese," Dissertation, Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Haale (Saale).
- Marx, C. K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2008). "Random mutagenesis of a recombinant microbial transglutaminase for the generation of thermostable and heat sensitive variants." *Journal of Biotechnology*, 136, 156-162.
- Matsumura, Y., Chanyongvorakul, Y., Kumazawa, Y., Ohtsuka, T. und Mori, T. (1996). "Enhanced susceptibility to transglutaminase reaction of alpha-lactalbumin in the molten globule state." *Biochim Biophys Acta*, 1292, 69-76.
- Matuana, L. M. a. H., P. A. (2004). "Wood Composites." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Metzger, M. T. (2007). "Naturnahe Bindemittel aus nachwachsenden Rohstoffen auf Proteinbasis zur Herstellung von Holzwerkstoffen," Dissertation, Forschungsdepartment In-

- genieurwissenschaften für Lebensmittel und biogene Rohstoffe, Technische Universität München, München.
- Meyer, B. und Boehme, C. (1995). "Massivholz und Formaldehyd " *European Journal of Wood and Wood Products*, 53, 135.
- Mizuno, A., Mitsuiki, M. und Motoki, M. (1999). "Glass Transition Temperature of Casein as Affected by Transglutaminase." *Journal of Food Science*, 64, 796-799.
- Mizuno, A., Mitsuiki, M., Motoki, M., Ebisawa, K. und Suzuki, E.-i. (2000). "Relationship between the Glass Transition of Soy Protein and Molecular Structure." *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3292–3297.
- Motoki, M. und Nio, N. (1983). "Crosslinking between different food proteins by transglutaminase." *J Food Sci*, 48, 561-566.
- Münzenberg, U. und Thumulla, J. (2002). "Formaldehyd aus natürlichem Holz - oder: Wie falsche Messverfahren falsche Ergebnisse produzieren." *Wohnung und Gesundheit, Fachzeitschrift fuer oekologisches Bauen und Leben*, 24, 35.
- Mus, C., Mattiel, M., Valzan, D., Delbianco, A. und Tucker, J. (2001). "Innovative Foundry Technologies for Safety Aluminum Suspension Parts and Complex Castings." SAE World Congress 2001, Detroit, MI, USA, SAE Technical Paper Series, DOI: 10.4271/2001-01-0407
- Narayan, R. und Patel, M. (2004). "Review and Analysis of Bio-based Product LCA's." Download unter <http://www3.abe.iastate.edu/biobased/LCAreview.pdf>, Zugriff am 13.06.2011.
- Nio, N., Motoki, M. und Takinami, K. (1986). "Gelation mechanism of protein solution by transglutaminase." *Agric Biol Chem*, 50, 851-855.
- Noel, T. R., Parker, R. und Ring, S. G., Tatham, A.S. (1995). "The glass-transition behaviour of wheat gluten proteins." *Int. J. Biol. Macromol.*, 17.
- Oberdorfer, G. (2008). "Formaldehydemissionen aus Holzwerkstoffen." in: *Holzforschung Austria - Ausgabe 04.2008*.
- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. und Motoki, M. (2000). "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines." *J. Agric. Food Chem.*, 48, 6230-6233.
- Osborne, T. B. (1924). "The vegetable proteins." *Journal of the Society of Chemical Industry*, 43, 2nd edition. Monographs on Biochemistry. London: Longmans green and Co. 1924. Pric 9s. net. Pp. xiii+154.

- Outerbridge, A. E. "Sand Core for Molds for Casting metals and Process of the Manufacture of such Cores." US 14828, US, (1920).
- Parker, D. und Herreid, R. (2005). "Staying Competitive with Environmentally Friendly Sand Binders." *Foundry Management & Technology, January 2005*, 133, 27-28.
- Patzsch, K. (2010). "Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen," Dissertation, Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Patzsch, K., Riedel, K. und Pietzsch, M. (2010). "Parameter optimization for protein film production using microbial transglutaminase." *Biomacromolecules*, 11, 896-903.
- Phillips, G. O. und Williams, P. A. (2000). "Handbook of hydrocolloids." Woodhead Publishing Limited.
- Podobed, O. (2003). "Entwicklung von Sandformtechnologien für die Fertigung von Prototypen und Gussteilenaus Magnesiumlegierungen," Dissertation, Fakultät für Werkstoffwissenschaft und Werkstofftechnologie, Technische Universität - Bergakademie Freiberg.
- Polzin, H. (2007). "Übersicht chemisch härtende Formstoffe." *Giesserei-Praxis 09/2007*, 334-353.
- Probst, E. (1996). "Die Bronzezeit." Grin Verlag; 1.Auflage; ISBN: 978-3640111770.
- Psimenos, A. C., Sipos, M. M. und Eder, G. (2006). "Neue emissionsarme PUR-Cold-Box-Systeme mit hoher Beständigkeit gegenüber Wasserschichten." *Giesserei*, 93, 72-79.
- Pude, R. und Wenig, B. (2005). "Pflanzen für die Industrie." Broschüre der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR).
- Qiang, G., Yaohui, D., Shifeng, Z. und Jianzhang, L. (2010). "Investigation of Formaldehyde-Free Soybean Meal-Based Adhesive Applying on Particleboard." *Advanced Materials Research (Volumes 113 - 114)*, 2085-2089.
- Rimbach, G., Möhring, J., Erbersdobler, H. F. und F. Erbersdobler, H. (2010). "Hülsenfrüchte." In: *Lebensmittel-Warenkunde für Einsteiger*, Springer Berlin Heidelberg, 147-167.
- Sakamoto, H., Nonaka, M. und Motoki, M. (1993). "Calcium-Independent Transglutaminase Derived from a Microorganism: It's Characteristics and Capability in Protein Crosslinking and Gel Formation." In: *Food Hydrocolloids - Structures, Properties, Functions - ISBN: 0-306-44594-8* (Nishinari, K. und Doi, E., eds.), Plenum Press.
- Salzberg, H. K. "Foundry Core Binder." US-Patent 2145317 (1939).

- Schäfer, C., Schott, M., Brandl, F., Neidhart, S. und Carle, R. (2005). "Identification and quantification of epsilon-(gamma-glutamyl)lysine in digests of enzymatically cross-linked leguminous proteins by high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-ESI-MS)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2830-2837.
- Schäfer, C., Zacherl, C., Engel, K. H., Neidhart, S. und Carle, R. (2007). "Comparative study of gelation and cross-link formation during enzymatic texturisation of leguminous proteins." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 269-278.
- Scheidegger, F. (1994). "Aus der Geschichte der Bautechnik; ." Birkhäuser Verlag, Band 1 - Grundlagen; 2. korr. Auflage, ISBN: 3-7643-5069-5.
- Schöpfer, C. (2006). "Entwicklung eines naturnahen Bindemittels aus nachwachsenden Rohstoffen auf Proteinbasis zur Herstellung von Mitteldichten Faserplatten," Dissertation, Fakultät für Forstwissenschaften und Waldökologie, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.
- Schöpfer, C. (2008). "Klebertechnologie - Vorlesung im Rahmen der Lehrveranstaltung Biotechnologie der Holzverbundwerkstoffe SS 2008." *Büsgen-Institut Abteilung Molekulare Holzbiotechnologie und technische Mykologie*.
- Schorsch, C., Carrie, H., Clark, A. H. und Norton, I. T. (2000). "Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase conditions for formation of transglutaminase-induced gels." *International Dairy Journal*, 10, 519-528.
- Schrieke, R. R. und Winter, G. (2011). "Casein." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Schulte, A., Bernauer, U., Madle, S., Mielke, H., Herbst, U., Richter-Reichhelm, H.-B., Appel, K.-E. und Gundert-Remy, U. (2006). "Assessment of the Carcinogenicity of Formaldehyde." Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin, ISBN 3-938163-14-3.
- Shewry, P., R., Napier, J. A. und Tatham, A. S. (1995). "Seed Storage Proteins: Structures and Biosynthesis." *The Plant Cell*, 7, 945-956.
- Shi, J.-Y., Huang, T.-Y., Shi, H.-Y. und He, Z.-M. (2001). "Technology and mechanism of a new protein-based core sand for aluminum casting." *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 11, 488-491.
- Siak, J.-S. (1996). "GM develops a breakthrough 'green' binder for core sand." *Modern Casting*, 86.
- Singh, H. (1991). "Modification of food proteins by covalent crosslinking." *Trends in Food Science & Technology*, 2, 196-200.

- Sirch, H.-J. und Kehr, E. (1997). "Untersuchungen zur Eignung von Proteinen als Bindemittel für Holzpartikel-Werkstoffe." in: Klein, J.: Marutzky, R. (Hrsg) *Klebstoffe für Holzwerkstoffe und Faserformteile, WKI-Bericht Nr. 32 (Juni 1997)*.
- Sommer, C., Hertel, T. C., Schmelzer, C. E. H. und Pietzsch, M. (2011). "Investigations on the activation of recombinant microbial pro-transglutaminase: In contrast to Proteinase K, Dispase removes the Histidine-tag." *Amino Acids*, DOI 10.1007/s00726-011-1016-x.
- Spang, S. A. (2001). "Schadstoffbildung aus Kern- und Formbindersystemen," Dissertation, Fakultät für Bergbau, Hüttenwesen und Geowissenschaften, Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Aachen.
- Takahashi, N., Takahashi, Y. und Putnam, F. W. (1986). "Primary structure of blood coagulation factor XIIIa (fibrinolygase, transglutaminase) from human placenta." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8019-23.
- Technikon. (2005). "Second Phase Data Collection Required for Cost Benefit Analysis for New Product Development." Casting Emission Reduction Program (CERP): Technikon Report 1410-140.
- Tjeerdsma, B. F., Boonstra, M., Pizzi, A., Tekely, P. und Militz, H. (1998). "Characterisation of thermally modified wood: molecular reasons for wood performance improvement." *European Journal of Wood and Wood Products*, 56, 149-153.
- Trinowski, D. M., Ladegourdie, G. und Löchte, K. (1999). "New Coldbox Binder System for Improved Productivity." *American Foundry Society Transactions*, 105, 51-57.
- van Herwijnen, H. W. G., Jobber, A., Pietzsch, M. und Jacob, M. "Composite material comprising crosslinkable resin of proteinous material." WO 2010125163 A1 (07.05.2009), Dynea Oy, Finland
- VDG. (1987). "VDG-Merkblatt P 33: Prüfung von tongebundenen Formstoffen - Bestimmung des Gehaltes an Kohlenstoffträgern." VDG-Merkblätter Bd. 2, Gruppe P-W (Loseblätter-Sammlung), Verein deutscher Gießereifachleute, Düsseldorf.
- VHI. (2011). "Bindemittel in Holzwerkstoffen"; Verband der Deutschen Holzwerkstoffindustrie e.V.; [www.vhi.de](http://www.vhi.de); Zugriff am 10.08.2011
- Vogt, R., Giegrich, J., Gromke, U., Patyk, A., Fehrenbach, H., Boess, A., Buchert, M. und Dehoust, G. (2006). "Beitrag der Abfallwirtschaft zur nachhaltigen Entwicklung in Deutschland." ifeu – Institut für Energie- und Umweltforschung Heidelberg gGmbH - im Auftrag des Umweltbundesamtes, Heidelberg.

- Wang, J., Cannon, F. S., Salama, M., Goudzwaard, J. und Furness, J. C. (2007). "Characterization of Hydrocarbon Emissions from Green Sand Foundry Core Binders by Analytical Pyrolysis." *Environmental Science & Technology*, 41, 7922-7927.
- Weicker, G. (2006). "Prozessoptimiertes Cold-Box-System zur Produktionssteigerung und Kostenreduzierung." *Giesserei Praxis*, 7, 217-220.
- Williams, L. L. (2002). "Amino Resins." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Winston, P. W. und Bates, D. H. (1960). "Saturated Solutions For the Control of Humidity in Biological Research." *Ecology*, 41, 232-237.
- Wolff, A. und Steinhäuser, T. (2004). "AWB — ein umweltverträgliches Kernherstellverfahren." *Giesserei*, 91, 80-84.
- Wool, R. P. und Sun, X. S. (2005). "Bio-based Polymers and Composites." ISBN: 0-12-763952-7, Elsevier Inc.
- Yang, I., Kuo, M., Myers, D. J. und Pu, A. (2006). "Comparison of protein-based adhesive resins for wood composites" *Journal of Wood Science*, 52, 503-508.
- Yokoyama, K., Nio, N. und Kikuchi, Y. (2004). "Properties and applications of microbial transglutaminase." *Appl Microbiol Biotechnol*, 64, 447-454.
- Yorkgitis, E. M. (2002). "Adhesive Compounds." *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. und Bol, J. (1995). "Microbial transglutaminase - a review of its production and application in food processing." *Appl Microbiol Biotechnol*, 44, 277-282.
- Zittle, C. A., Monica, E. S. D. und Custer, J. H. (1957). "Effect of Certain Salts on Precipitation of Casein by Calcium Chloride and Heat." *Journal of Dairy Science*, 40, 280-288.

## 8 Anhang

Tabelle 8-1: Auszug vom Produktdatenblatt für Quarz Sand H32 (Haltern, Germany)

Durchschnittliche Korngröße [mm]	0,32
theoretische spezifische Oberfläche [cm <sup>2</sup> /g]	75
Korngrößenverteilung (mm )	Rest (Gewichts - %)
> 0,710	
0,710 - 0,500	3
0,500 - 0,355	25
0,355 - 0,250	53
0,250 - 0,180	15
0,180 - 0,125	3
< 0,125	1
linearer Expansionskoeffizient	
20 °C - 300 °C	$14 \cdot 10^{-6} \cdot \text{K}^{-1}$
20 °C - 600 °C	$14 \cdot 10^{-6} \cdot \text{K}^{-1}$
Phasenumwandlung $\alpha \rightarrow \beta$ Quarz	573 °C
Schüttdichte (t/m <sup>3</sup> )	1,4
Dichte (DIN ISO 787-10)	2,65 g/mL
Mohs - Härte	7
Chemische Analyse	Gewichts- %
SiO <sub>2</sub>	99,8
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,1
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,04
Glühverlust 1000 °C (DIN EN ISO 3262-7)	0,1

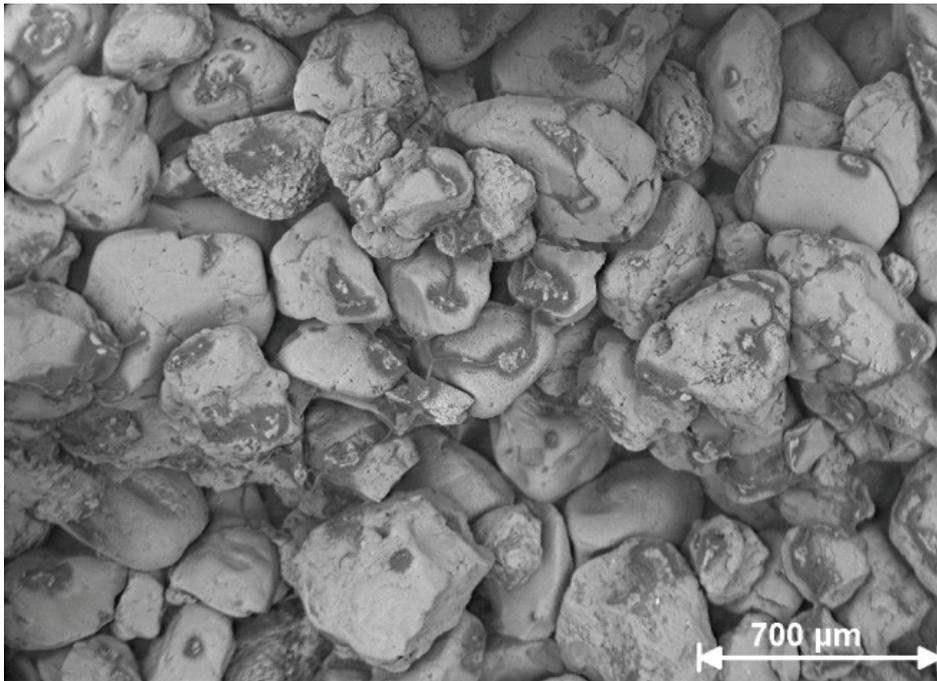


Abbildung 8-1: ESEM – Aufnahme von proteingebundenem Sand. Bindemittel: 1,0 % b.o.s. Erbsenprotein (lösliche Fraktion), verwendeter Puffer bei Herstellung: 5 % b.o.s. Tris/HCl (pH 8, 50 mM, 300 mM NaCl)

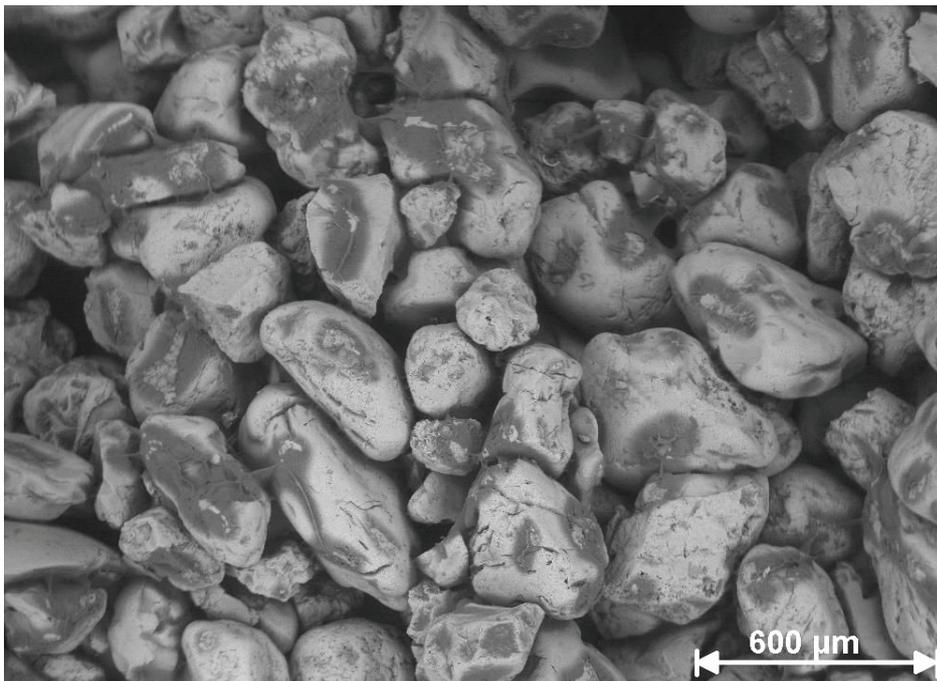


Abbildung 8-2: ESEM – Aufnahme von proteingebundenem Sand. Bindemittel: 1,0 % b.o.s. enzymatisch vernetztes Erbsenprotein (lösliche Fraktion). Vernetzung mit Activa-MTG (25 U/g<sub>Erbsenprotein</sub>), verwendeter Puffer bei Herstellung: 5 % b.o.s. Tris/HCl (pH 8, 50 mM, 300 mM NaCl)

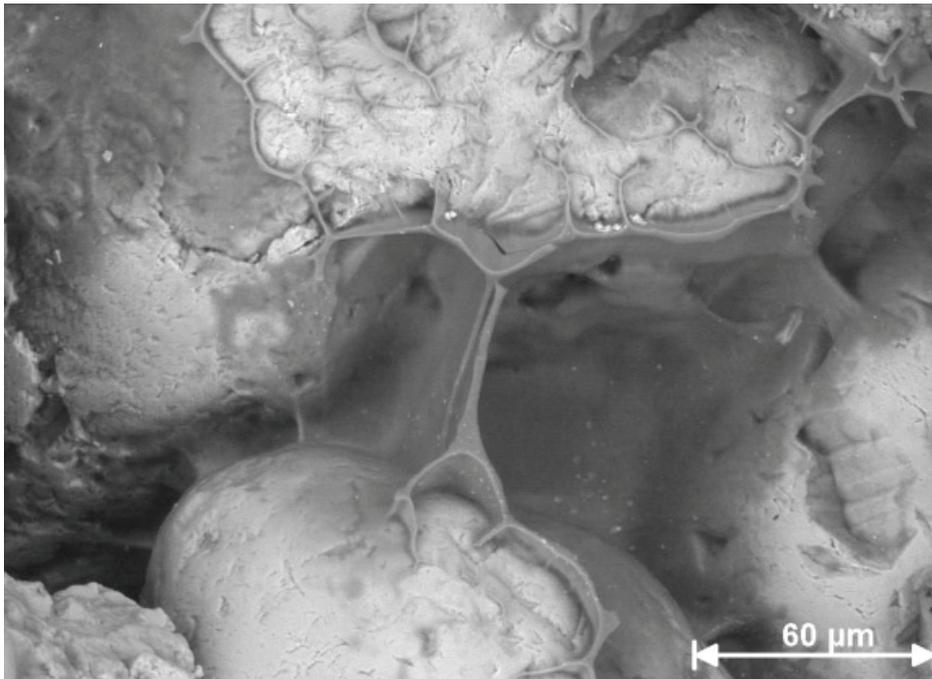


Abbildung 8-3: ESEM – Aufnahme von proteingebundenem Sand. Bindemittel: 1,0 % b.o.s. enzymatisch vernetztes Erbsenprotein (lösliche Fraktion). Vernetzung mit MTG-S2P (66 U/g<sub>Erbsenprotein</sub>), verwendeter Puffer bei Herstellung: 5 % b.o.s. Tris/HCl (pH 8, 50 mM, 300 mM NaCl)

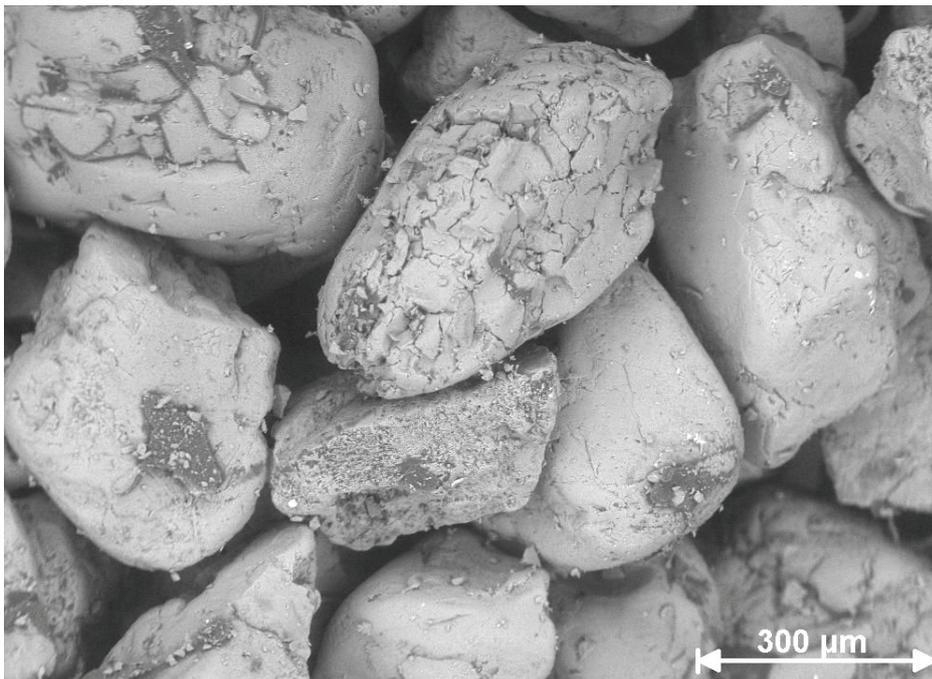


Abbildung 8-4: ESEM – Aufnahmen von thermisch (3 fach) recyceltem Sand mit Verunreinigungen. Der Sand enthielt jeweils zuvor 0,7 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel. Das Protein wurde während des thermischen Recyclings bei 450 °C (für 3 h) verbrannt, der Sand anschließend unter erneuter Proteinzugabe wiederverwendet.

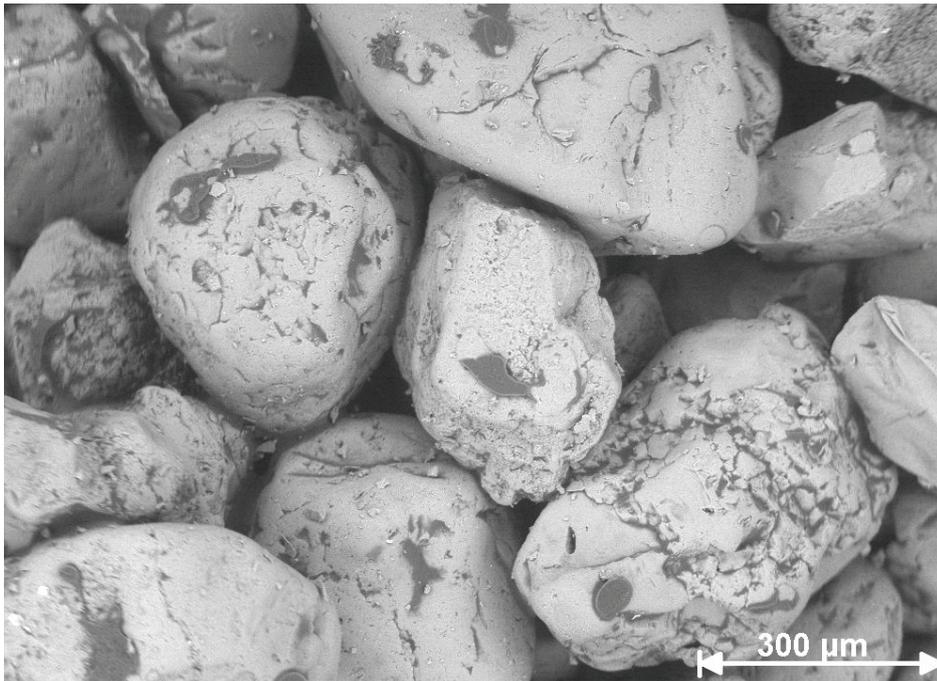


Abbildung 8-5: ESEM – Aufnahmen von thermisch (4 fach) recyceltem Sand nach der Reinigung mit Wasser. Der Sand enthielt jeweils zuvor 0,7 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel. Das Protein wurde während des thermischen Recyclings bei 450 °C (für 3 h) verbrannt, der Sand anschließend unter erneuter Proteinzugabe wiederverwendet.

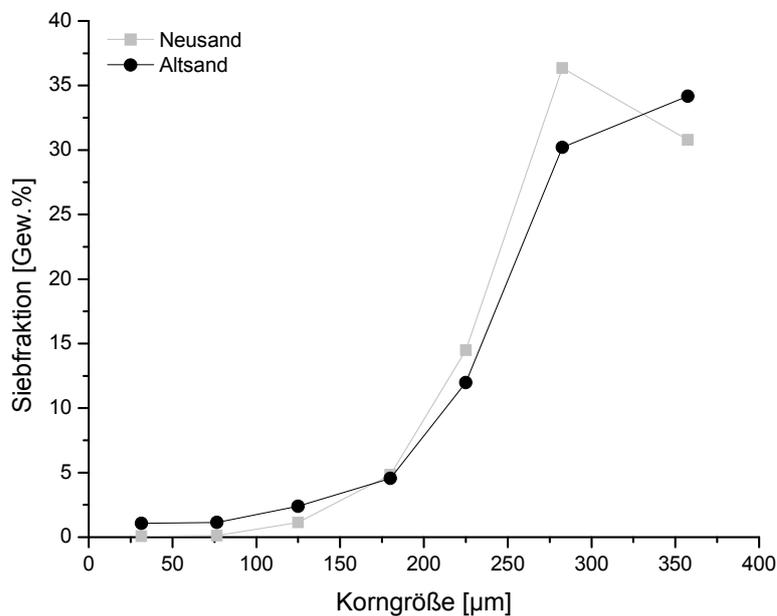


Abbildung 8-6: Vergleich der Korngrößenverteilung von neuem und recyceltem Sand nach dreifacher Wiederverwendung als Formstoff. Der recycelte Sand (0,7 % b.o.s. Caseinat als Bindemittel) wurde jeweils nach mechanischer Zerkleinerung und Rehydrieren zur Formkörperherstellung wiederverwendet.

Programm SS_4 4.0 Dateiname: FI-B-C 60-40 IHD-Var 2.xls Späne (Laborschwingsieb)	<b>Prüfprotokoll</b> <b>Mechanische Siebfractionierung</b> <b>Späne</b>	 <b>ihd</b> Institut für Holztechnologie Dresden gGmbH
---	---	---

Ihd-Codierung:

Auswertungsart

3

Auftraggeber:

Mittlere Korngröße (Km):

1,18 mm

Auftrags-Nr.:

Korngrößen-Intervall (DK):

1,44 mm

Bearbeiter:

Staub [mm]:

&lt; 0,315

3,86 %

Prüfdatum:

Feingut [mm]:

0,315 &lt; ... &lt; 1,0

45,77 %

Rohstoffart:

Fichte

Partikelart:

Schneidspan

Aufbereitung:

Fraktion B + C (60:40)

Siebsatz Masch- weite [mm]	Einwaage [g]				Rückstände der Fraktionierungen		Summen-Häufigkeit der Rückstände			Durchgangs- fraktionen		Werte für die Kennlinie	
	1. Frakt. M1 [g] =	2. Frakt. M2 [g] =	3. Frakt. M3 [g] =	4. Frakt. M4 [g] =	R [g]	[%]	[%]	[%]	[%]	xs	ys		
	MR1 [g]	MR2 [g]	MR3 [g]	MR4 [g]									
												0,00	0,00
4	0,01 #	0,01 ##	0,01 ###				0,03	0,02	100,00	99,98		0,32	3,86
3,15	0,74 #	0,88 ##	0,92 ###				2,54	1,56	99,98	98,42		0,50	12,52
2	7,33 #	7,34 ##	8,48 ###				23,15	14,21	98,42	84,22		0,80	36,76
1,6	5,03 #	6,24 ##	5,81 ###				17,08	10,48	84,22	73,73		1,00	49,63
1	11,33 #	10,77 ##	12,29 ###				34,39	21,10	73,73	52,63		1,60	73,73
0,8	7,73 #	9,02 ##	9,11 ###				25,86	15,87	52,63	36,76		2,00	84,22
0,5	11,99 #	14,34 ##	13,17 ###				39,50	24,24	36,76	12,52		3,15	98,42
0,315	5,05 #	6,80 ##	5,52 ###				17,37	10,66	12,52	1,86		4,00	99,98
0,16	0,85 #	1,16 ##	1,02 ###				3,03	1,86	1,86	0,00			
0,1													
Summe	50,06	56,56	56,33	0,00	162,95	100,00							
0,063													
0	0,10	0,16	1,60										

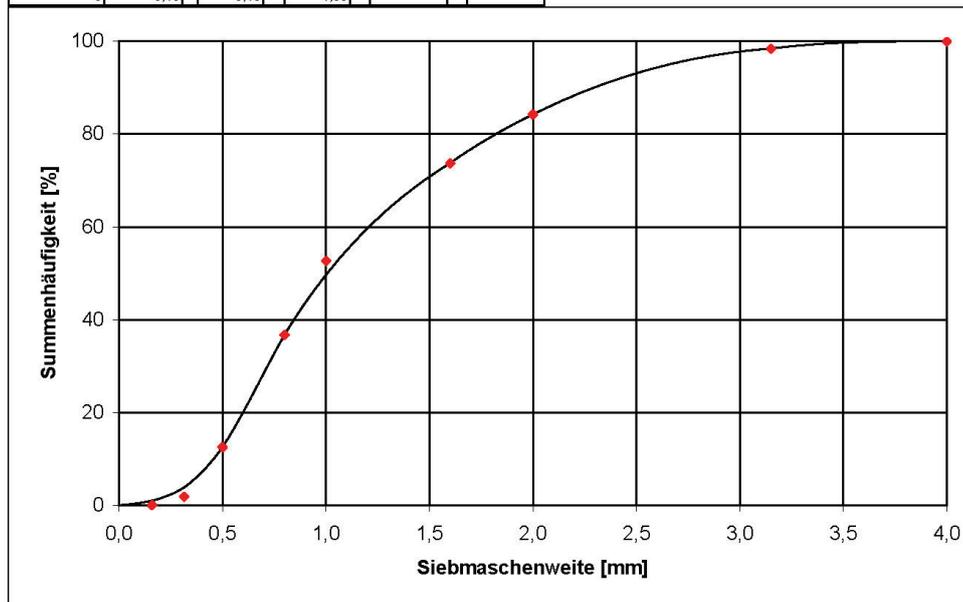


Abbildung 8-7: Siebanalyse der für die Spanplatten verwendeten Fichtenholzspäne

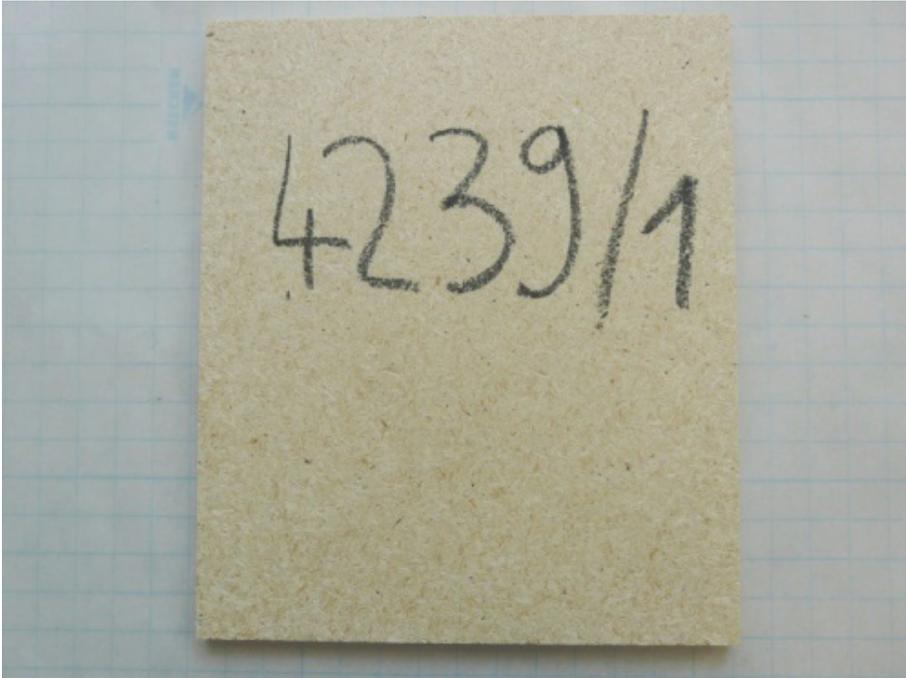


Abbildung 8-8: Fichtenholz-Spanplatte (11 mm) mit 10 % Caseinat, 2,5 % Activa-MTG als Bindemittel (bezogen auf Holz atro). Presszeit 10 min bei 110 °C, Ausgangsfeuchte 17 %.

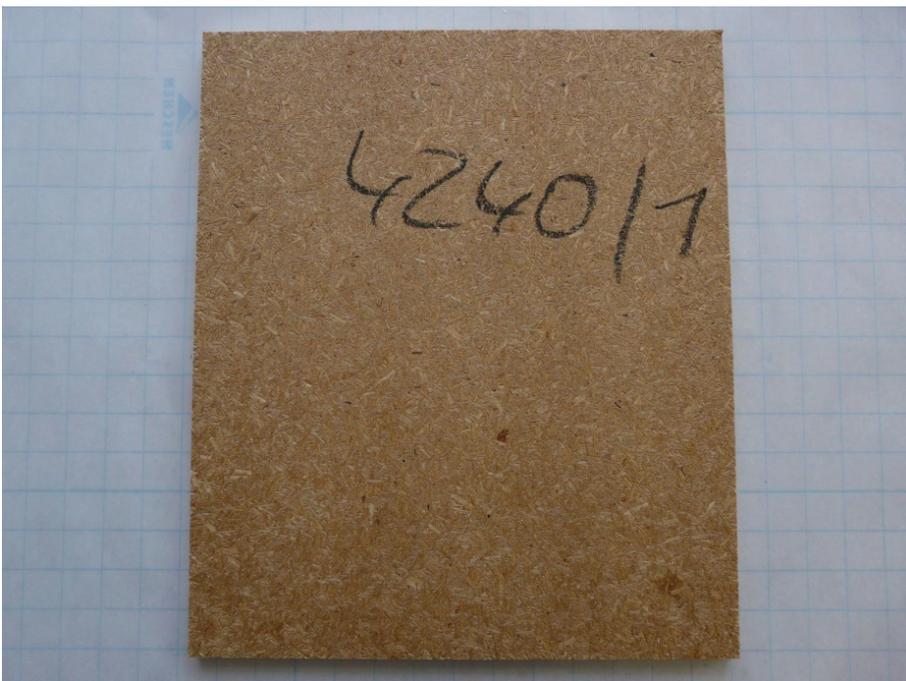


Abbildung 8-9: Fichtenholz-Spanplatte (11 mm) mit 10 % Caseinat, 2,5 % Activa-MTG als Bindemittel (bezogen auf Holz atro). Presszeit 10 min bei 220 °C, Ausgangsfeuchte 17 %.

## 9 Glossar

Formstoff	Mineralische Granulate (meist natürliche Granulate wie z.B. Sand)
Gusskern	In die Form eingelegte Teile der Gussform, die Hohlräume im fertig gegossenen Werkstück abbilden
Kernschlichte	(meist wässrige) Suspension, in die Formteile getaucht werden, um eine besser Oberfläche des Gussteils zu erzielen
Dauerform	Dauerformen können für mehrere Gussvorgänge verwendet werden und werden häufig in der Serienproduktion eingesetzt
Verlorene Form	Verlorene Formen werden beim Guss oder danach zerstört
Hinterschneidung	Frei hervorstehendes Kontruktionselement
Coldbox	2-Komponenten-Bindemittel (Phenolharz+Isocyanat), das durch Be- gasen mit einem Katalysator rasch aushärtet, die Formkästen sind nicht vorgewärmt
Hotbox	In heißen Formkästen erfolgt die Aushärtung des mit Bindemittel ver- setzten Formstoffes
Presszeitfaktor	Presszeit in Sekunden pro mm Spanplatte

## Publikationsliste

Eine Originalpublikation, die auf dem Patent (s. u.) beruht, befindet sich in Arbeit.

### Posterpräsentation

Jacob, M. und Pietzsch, M. (2010) "Investigations on the application of proteins as a binder for foundry sand" Gordon Research Conference - Biocatalysis, Boston, USA

### Patent

WO/2010/125163 (Veröffentlichungsdatum: 04.11.2010)

„Composite Material Comprising Crosslinkable Resin of Proteinous Material“

W.G. van Herwijnen, Hendrikus; Jobber, Andrew; Pietzsch, Markus; Jacob, Matthias

---

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: (Rolf) Matthias Jacob

Geburtsdatum/-ort: 12.05.1981, Leipzig

## Beruflicher Werdegang

seit 10/2011            Entwicklungsingenieur im Bereich Tread Pattern Technology  
Continental Reifen Deutschland GmbH, Hannover

## Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

11/2007 – 09/2011    Promotion über „Untersuchungen zum Ersatz von Duroplasten durch  
enzymatisch quervernetzte Proteine“

04/2005 – 10/2007    Master-Studium im Studiengang „Applied Polymer Science“  
Masterarbeit über: “Modification and preparation of biodegradable foils  
made of proteins”  
Abschluss: Master of Science

## Hochschule für Technik, Wirtschaft und Kultur Leipzig (FH)

09/2000 – 12/2004    Studium des allgemeinen Maschinenbaus, Fachrichtung Produktions-  
technik  
Diplomarbeit über „ Untersuchungen zum Einfluss von Presshilfsmitteln  
und sinteraktivierenden Zusätzen auf das Sinterverhalten von Alumini-  
umsinterlegierungen des Typs AlSi14CuMg“  
Abschluss: Diplom-Ingenieur (FH)

09/1999 – 06/2000    Grundwehrdienst

09/1992 – 06/1999    Abitur  
Gustav-Hertz-Gymnasium Leipzig