

Kovalente Modifikationen von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen zur Optimierung von Filmeigenschaften

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)

des

Zentrums für Ingenieurwissenschaften

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl.-Ing. Kristin Riedel

geboren am 01. Februar 1984 in Schleiz

Gutachter:

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

Tag der mündlichen Verteidigung: 26.04.2013

Danksagung

Die vorliegende Dissertation entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ des Institutes für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Viele Menschen haben mich während dieser Zeit unterstützt und dazu beigetragen, dass ich mich wissenschaftlich als auch zwischenmenschlich sehr wohl gefühlt habe. Diesen Personen möchte ich im Folgenden danken.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, sein stetiges Interesse am Voranschreiten der Promotion, die Diskussionsbereitschaft und das entgegengebrachte Vertrauen.

Bei der Arbeitsgruppe „Physikalische Chemie der Polymere“ unter der Leitung von Prof. Dr. Jörg Kreßler möchte ich mich für die Bereitstellung und Einweisung in das Kontaktwinkel-messgerät bedanken. Herrn Prof. Dr. Wolfgang Grellmann und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Werkstoffdiagnostik/Werkstoffprüfung“ gilt mein besonderer Dank, da sie mich bei der mechanischen Charakterisierung der Proteinfilme unterstützten. Für die Synthese von Dansyl-WQR danke ich Herrn Dr. Miroslav Malesevic der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung Halle/Saale.

Dem Agrochemischen Institut Piesteritz e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung während meiner Arbeit.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Aufarbeitung biotechnischer Produkte“ bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit sowie offene und freundschaftliche Atmosphäre. Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Hertel für seine stets kompetenten Ratschläge und wertvollen Hinweise. Meinen früheren und aktuellen Mitdoktoranden und Freunden Katja Patzsch, Karin Büttner, Christian Sommer, Matthias Jacob, Hany Hassounah, Patrick Froberg, Andreas Migge, Anna Schildbach, Isabell Stolte, Martin Wolfram, Christian Beyerodt, Uwe Hildebrandt, Christian Bensing, René Heppner und Ramona Konrad danke ich für die Hilfsbereitschaft bei Problemlösungen, die fachlichen Diskussionen und die schönen gemeinsamen Unternehmungen, die mir in guter Erinnerung bleiben werden.

Zu Dank bin ich natürlich auch meinen Projektstudenten Tamoor Babur und Sebastian Nitschke verpflichtet.

Bei Katja Patzsch, Karin Büttner und Jan Klapproth möchte ich mich für das sorgfältige Korrekturlesen bedanken.

Ein herzlicher Dank gebührt meinen Eltern und Geschwistern für deren moralische Unterstützung, Aufmunterung, Geduld und Vertrauen während der gesamten Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 Proteine.....	11
1.1.1 Casein	11
1.1.2 Kollagen/Gelatine	12
1.2 Proteinfilme	13
1.3 Modifikationen	14
1.3.1 Vernetzung der Proteine	14
1.3.1.1 Transglutaminase	15
1.3.2 Additive.....	16
1.3.2.1 Weichmacher.....	17
1.3.2.2 Lipide	17
1.3.2.3 Primäre aliphatische Amine.....	18
1.3.2.4 Reaktivfarbstoffe.....	19
1.4 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Geräte	24
2.1.3 Puffer.....	25
2.1.4 Proteine	25
2.1.5 Transglutaminasen.....	26
2.2 Analytik.....	27
2.2.1 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität.....	27
2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.2.2.1 Färbung mittels Coomassie	29
2.2.2.2 Färbung mittels Silber.....	30
2.2.3 Mechanische Prüfung von Filmen mittels Zugversuch.....	31
2.2.4 Löslichkeit von Proteinfilmen.....	32
2.2.4.1 Löslichkeit in Wasser unter Temperatureinfluss.....	32
2.2.4.2 Untersuchung der Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit.....	33
2.2.5 Kontaktwinkelmessung.....	33
2.2.6 Abbaubarkeit im Boden.....	34

2.2.7	Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)	34
2.3	Methoden	36
2.3.1	Modifikation von Caseinat mit Farbstoff	36
2.3.1.1	Variation des pH-Wertes und des Protein _{Lys} -Farbstoff-Verhältnisses	36
2.3.1.2	Behandlung der Caseinat-Farbstoff-Lösung mit Butylamin	37
2.3.1.3	Gewinnung des modifizierten Caseinats	37
2.3.2	Ermittlung reaktiver Glutamin- und Lysinreste für MTG	38
2.3.3	Eignung primärer aliphatischer Amine als MTG-Substrate	39
2.3.4	Modifikation von Caseinat mit Octylamin	40
2.3.5	Vernetzbarkeit von Proteinen mittels MTG.....	41
2.3.6	Filmherstellung	41
2.3.6.1	Standardverfahren	41
2.3.6.2	Beschichtungsverfahren	43
2.3.6.3	Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration	43
2.3.6.4	Untersuchungen zur Enzympräparation und -konzentration	43
2.3.7	Fettextraktion.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Kovalente Modifikation von Caseinat	45
3.1.1	Modifikation mit Dichlortriazin-Reaktivfarbstoff	45
3.1.1.1	Voruntersuchung	45
3.1.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen	46
3.1.1.3	Behandlung mit Butylamin und Gewinnung des modifizierten Proteins	47
3.1.1.4	Vernetzbarkeit von modifiziertem Caseinat mittels MTG.....	48
3.1.1.5	Nachweis reaktiver Glutamine und Lysine	50
3.1.2	Modifikation mit primären aliphatischen Amin	53
3.1.2.1	Substratspezifität der MTG für Alkylamine	53
3.1.2.2	Vernetzung zwischen Caseinat und Octylamin	55
3.2	Charakterisierung von Filmen aus Rohkollagen.....	58
3.2.1	Vernetzbarkeit mittels MTG.....	58
3.2.2	Filmherstellung	59
3.2.3	Mechanische Charakterisierung mittels Zugversuch.....	60
3.2.4	Variation der Weichmacherkonzentration	60
3.2.4.1	Glycerin als Weichmacher	61
3.2.4.2	Harnstoff als Weichmacher	63
3.2.5	Optimierung und Charakterisierung von Rohkollagen-Filmen ohne Weichmacher	65

3.2.5.1	Variation der MTG Activa® WM-Konzentration	65
3.2.5.2	Einfluss von Maltodextrin auf die mechanischen Eigenschaften	66
3.2.5.3	Verwendung einer rekombinanten Transglutaminase (MTG S2P)	67
3.2.5.4	Variation des Herstellungsverfahrens	69
3.2.5.5	Mechanische Eigenschaften nach Fettextraktion	70
3.2.5.6	Benetzbarkeit mit Wasser	72
3.2.5.7	Löslichkeit in Wasser	73
3.2.5.8	Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit	77
3.2.5.9	Biologischer Abbau	78
3.2.5.10	Vergleich von Rohkollagen-Filmen mit Filmen anderer tierischer Proteine	79
4	Diskussion	83
4.1	Reaktivfarbstoff – Kovalente Markierung von Caseinat	83
4.2	Fettamine – Additive zur Verbesserung der Hydrophobizität	86
4.3	Rohkollagen – Alternatives Protein für die Filmherstellung	90
5	Zusammenfassung	99
6	Ausblick	101
7	Literatur	103
8	Anhang	113
8.1	Proteinfilme	113
8.1.1	Mechanische Charakterisierung	113
8.1.2	Benetzbarkeit	114
8.1.3	Löslichkeit	115
8.2	RP-HPLC	116
8.2.1	Kalibrierung	116
8.2.2	Chromatogramme	116
	Eidesstattliche Erklärung	119
	Lebenslauf	120
	Publikationsliste	121

Abkürzungen

3D	Dreidimensional
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BD	Bruchdehnung
BOD	Biochemischer Sauerstoffbedarf (engl. <i>biochemical oxygen demand</i>)
Cas	Caseinat
C	Kohlenstoff
CLSM	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (engl. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
Dansyl-WQR	Dansyl-Tryptophan-Glutaminyl-Arginin
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DMC	Dimethylcasein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
FS	Farbstoff
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Lys	Lysin
M	Molekulargewichtsmarker
M _w	Molekulargewicht
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MDC	Monodansylcadaverin
mod.	modifiziert
MTG	Mikrobielle Transglutaminase
MWCO	Ausschlussgrenze (engl. <i>molecular weight cut off</i>)
Na	Natrium
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PP	Polypropylen
PTFE	Polytetrafluorethylen
RK	Rohkollagen
rLF	relative Luftfeuchte
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (engl. <i>reversed phase</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PP	SDS-Probenpuffer
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TG	Transglutaminase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Ü	Überstand

UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
WVP	Wasserdampfpermeabilität
ZF	Zugfestigkeit
Z-Gln-Gly	Dipeptid-Glutaminylglycin

Symbole

\bar{x}	Mittelwert
s	Standardabweichung
n	Anzahl der Werte
A	Querschnittsfläche [mm ²]
E	Extinktion [-]
F _M	Maximal- bzw. Höchstkraft [N]
f _{rot}	Drehzahl [rpm]
L ₀	Einspannlänge [mm]
m	Masse [mg], [g]
t	Zeit [s], [min], [h], [d]
T [°C]	Temperatur [°C]
T [%]	Totalacrylamidkonzentration [%]
U	Unit [μmol/min]
V	Volumen [μL], [mL], [L]
ΔGewicht	Gewichtsverlust [%]
ΔL	Längenänderung [mm]
ε	Extinktionskoeffizient [cm ² /μmol]
ε _B	Bruchdehnung [%]
σ _M	Zugfestigkeit [N/mm ²]
θ	Kontaktwinkel [°]

1 Einleitung

Kunststoffe sind Materialien, die ohne Einbußen der Lebensqualität aus der heutigen Zeit nicht mehr wegzudenken sind. Aufgrund ihrer vielfältigen Eigenschaften, universellen Einsetzbarkeit und relativ geringen Kosten haben diese synthetisch hergestellten, organischen Polymere zahlreiche Anwendungsgebiete erobert und begegnen uns nahezu überall im täglichen Leben. Die Weltproduktion an Kunststoffen verzeichnete in den letzten 60 Jahren einen drastischen Anstieg – von 1,7 Millionen Tonnen im Jahr 1950 auf 265 Millionen Tonnen im Jahr 2010 [PlasticsEurope, 2011]. Die meist auf Erdöl basierenden Kunststoffe sind durch ihre Beständigkeit in der Umwelt und dem stetigen Bevölkerungswachstum jedoch eine zunehmende Gefahr für das Ökosystem. Zudem wird es in Zukunft, aufgrund Verknappung fossiler Rohstoffe, zu einer Teuerung herkömmlicher Kunststoffe kommen. Die Verwertung konventioneller Kunststoffe erfolgt meist auf Mülldeponien oder in Verbrennungsanlagen, wodurch große Mengen an Kohlendioxid (CO_2) in die Atmosphäre gelangen. Ein verstärktes Umweltbewusstsein der Menschheit sowie Klima- und Ressourcenschutz gewinnen zunehmend an Bedeutung und fordern umweltfreundliche Alternativen. Biokunststoffe, aus nachwachsenden Rohstoffen erzeugt, sind voll biologisch abbaubar und zerfallen in natürlich vorkommende, ungiftige Ausgangsprodukte. Durch mikrobiellen und enzymatischen Abbau bleiben nur Wasser, Kohlendioxid und Biomasse zurück, die von der Natur weiter verwertet werden (Abbildung 1-1). Im Vergleich zu erdölbasierenden Kunststoffen sind Biokunststoffe weitestgehend CO_2 -neutral – ohne Berücksichtigung von Herstellung, Transport und Lagerung – da bei der Verwertung nur soviel CO_2 freigesetzt wird, wie die Pflanzen während ihres Wachstums von der Atmosphäre aufgenommen haben. Durch thermische Verwertung biobasierender Kunststoffe kann zudem CO_2 -neutrale Energie erzeugt werden. Anwendungen können Biokunststoffe aufgrund ihrer Eigenschaften in der Verpackungsindustrie, Medizin, Pharmazie, Landwirtschaft, Gartenbau sowie im Hygiene- und Cateringbereich finden [Guilbert und Cuq, 2005].

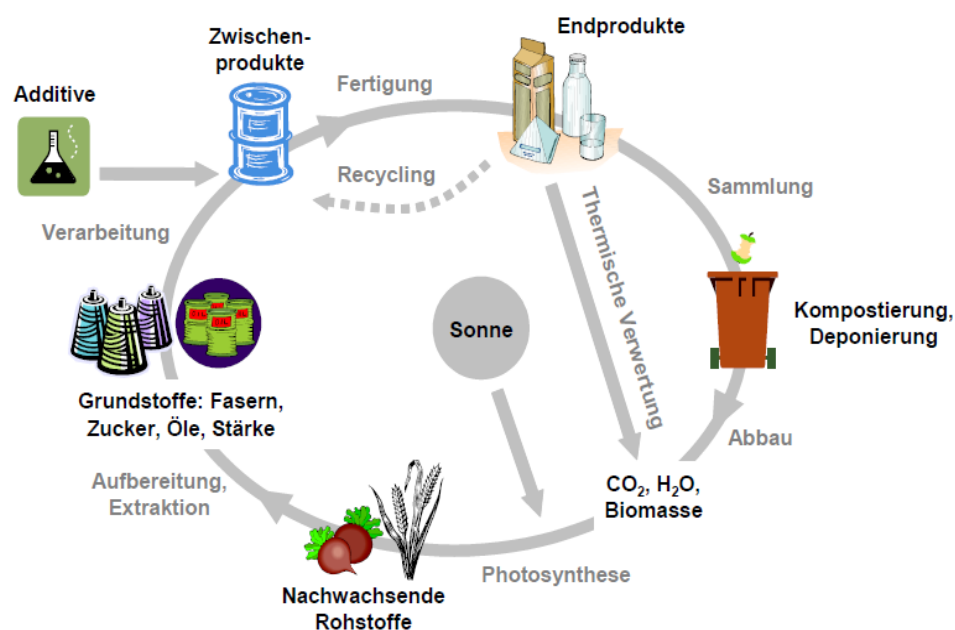


Abbildung 1-1: Produktions- und Verwertungszyklus von Biokunststoffen [Beucker et al., 2007].

Als Rohstoffe für die Produktion von Biokunststoffen kommen bisher in erster Linie Stärke und Zucker aus landwirtschaftlichen Erzeugnissen oder Zellulose aus der Holzindustrie zum Einsatz. Diese pflanzlichen Ausgangsstoffe werden zu Polymeren verarbeitet, um schließlich als Biokunststoff extrudiert oder geformt zu werden. Thermoplastische Stärke, ein Gemisch aus geschmolzener Stärke und Plastifizierungsmittel, ist das derzeit gebräuchlichste Biopolymer. Aufgrund des hydrophilen Charakters der Stärke wird diese, zur Verbesserung der Materialeigenschaften, häufig in Kombination mit wasserabweisenden, biologisch abbaubaren Polymeren zu Kunststoffblends verarbeitet. Anwendung findet thermoplastische Stärke z.B. bei Verpackungschips, Einweggeschirr, Operationsmaterialien oder Landwirtschaftsfilmen. Unter Einwirkung von Mikroorganismen lassen sich aus Stärke bzw. Zucker Polyester erzeugen, eine weitere Gruppe biologisch abbaubarer Polymere. Dazu gehören die Polymilchsäure (Polylactid, PLA), die durch chemische Polymerisation der fermentativ hergestellten Milchsäure gewonnen wird, und Polyhydroxybuttersäure (PHB). Beide Polyester eignen sich zur Fertigung von transparenten Biokunststoffen mit guten mechanischen Eigenschaften, die u.a. für Tragetaschen und kurzlebige Verpackungsfolien eingesetzt werden. Zellulose, ein natürliches Biopolymer aus Zuckermolekülen, ist aufgrund der langkettigen Struktur in Wasser und organischen Reagenzien unlöslich. Durch chemische Modifizierung – Veresterung mittels Essigsäure – wird Zellulose zu einem thermoplastisch bearbeitbaren Zelluloseacetat umgewandelt. Als Beschichtungsmaterial in der Pharmazie oder für viele weitere Produkte (z.B. Spielzeug, Werkzeuggriffe, Schreibwaren) finden zellulosebasierende Kunststoffe Einsatz [Han, 2005; Kolybaba, 2003; Widdecke et al., 2006].

Proteine stellen eine weitere Grundlage für die Herstellung von Biokunststoffen dar. Besonders pflanzliche Proteine, die bei der Herstellung von Stärke oder Pflanzenölen aus Mais, Erbsen, Weizen, Soja und Sonnenblumen als Koppelprodukte anfallen, sind von steigendem Interesse. Bisher werden diese proteinhaltigen Produkte überwiegend als Tierfuttermittel vermarktet. Proteine aus tierischen Erzeugnissen wie Gelatine, Casein, Molkenprotein oder Keratin eignen sich ebenfalls für die Herstellung von Biopolymeren. Proteine wurden seit Jahrtausenden für verschiedenste Anwendungen genutzt, so z.B. als Bindemittel für Höhlenmalereifarben oder als Caseinleim im Möbelbau. Die Herstellung von hartplastischen Werkstoffen wie Knöpfen oder Schirmgriffen, aus mit Formaldehyd kovalent vernetztem Casein, erfolgte erstmals im Jahr 1897 [Krische und Spitteler, 1897]. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts fand Gelatine häufig Anwendung in der Fotografie, Lebensmittelindustrie oder als Medikamentenkapsel in der Pharmazie. Mit der Entwicklung petrochemischer Kunststoffe ab 1950 wurden proteinbasierende Kunststoffe jedoch weitgehend verdrängt. In den letzten Jahrzehnten wurde die Forschung im Bereich nachwachsender Rohstoffe aufgrund schwindender Erdölvorkommen intensiviert, um Alternativen für bestehende Materialien zu schaffen. Die Eigenschaften der bisher entwickelten Polymere auf Proteinbasis sind gegenüber den erdölbasierenden Kunststoffen allerdings begrenzt – schlechtere Resistenz gegenüber Wasserdampf sowie niedrigere mechanische Eigenschaften [Bourtoom, 2009]. Eine Limitierung der Anwendungsgebiete proteinbasierender Materialien ist die Folge, da z.B. Landwirtschaftsfilme (Mulchfolie, Siloabdeckfilm) eine hohe Witterungsbeständigkeit und mechanische Stabilität gegenüber Zug-, Weiterreiß- und Durchstoßbeanspruchung fordern.

1.1 Proteine

Proteine sind Makromoleküle, die durch Aneinanderreihung der 20 verschiedenen, sogenannten proteinogenen Aminosäuren entstehen. Eine Aminosäure besteht aus einer Aminogruppe (-NH₂) und einer Carboxylgruppe (-COOH), welche über ein Kohlenstoffatom miteinander verknüpft sind. Zusätzlich sind an dem C-Atom ein Wasserstoffatom und eine Seitenkette gebunden. Diese Seitenkette, für jede Aminosäure verschieden, kann unpolar (hydrophob), polar (hydrophil) bzw. positiv oder negativ geladen sein. Durch Ausbildung von Peptidbindungen zwischen den Amino- und Carboxylgruppen benachbarter Aminosäuren werden diese zu langen Ketten miteinander verbunden. Die meisten Proteine sind aus 100 bis 500 Aminosäuren aufgebaut. Abhängig von der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) formen sich räumliche Strukturen des Proteins (Sekundärstruktur), wie z.B. α -Helices oder β -Faltblätter – stabilisiert durch Wasserstoffbrückenbindungen. Weitere stabilisierende Kräfte und Bindungen (Disulfidbindungen, Ionenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte) zwischen den Seitenketten der Aminosäuren führen zu einer, der Sekundärstruktur übergeordneten, räumlichen Anordnung der Polypeptidketten (Tertiärstruktur). Die Quartärstruktur, d.h. ein Proteinkomplex, bildet sich durch Wechselwirkungen von Proteinmolekülen untereinander. In Abhängigkeit von der Struktur erfolgt eine Gruppierung in globuläre (z.B. Gluten, Laktalbumin) und fibrilläre (z.B. Kollagen, Keratin) Proteine. Einflüsse wie hohe Temperaturen und Drücke, Bestrahlung, Zugabe von Chemikalien oder andere nichtphysiologische Bedingungen bewirken Modifikationen der Proteinstruktur, ohne Veränderung der Aminosäuresequenz. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet [Bannwarth et al., 2011; Guilbert und Cuq, 2005].

Proteine verfügen aufgrund ihres Aufbaus und Struktur über eine große Funktionsvielfalt, wodurch sie sich für die Herstellung vielfältiger Produkte als Rohmaterial prädestinieren. So können sie z.B. als Folie oder Beschichtung in der Landwirtschaft, Lebensmittelindustrie bzw. Pharmazie (Mulchfolien, Saatbänder, Verpackungsfolien, Verkapselungen) sowie als Formkörper im Gartenbau oder Cateringservice (Pflanztöpfe, Besteck, Tassen) eingesetzt werden.

1.1.1 Casein

Casein (lat. *caseus* = Käse) ist ein Protein, das aus Kuhmilch gewonnen wird. Es kann in die Untereinheiten α_{S1-} , α_{S2-} , β - und κ -Casein eingeteilt werden, die im Verhältnis von etwa 4:1:4:1 ca. 80 % des gesamten Milcheiweißes repräsentieren. Die restlichen 20 % sind Molkenproteine und die entsprechenden Fraktionen (Laktalbumin, β -Laktoglobulin, Rinder-serumalbumin). Die vier Untereinheiten des Caseins unterscheiden sich im Molekulargewicht (19-25 kDa) und der Hydrophobizität, besitzen aber die gleiche allgemeine Struktur.

In der Milch liegt Casein nicht als Monomer, sondern in Form kolloidaler Partikel, den sogenannten Caseinmicellen vor, die durch Calciumphosphatbrücken zusammengehalten werden. Gegenüber Hitze sind diese Micellen (lat. *mica* = Klümpchen) stabil, im sauren Milieu (isoelektrische Punkt: pH 4,6) kommt es allerdings leicht zur Koagulation des Proteins. Casein gehört zu den Phosphoproteinen und enthält ca. 0,85 % Phosphor. Die organischen Phosphatresiduen im Casein bilden sogenannte Phosphatzentren, die eine negative Ladung bei neutralem pH-Wert besitzen und somit Calciumionen stark binden. Diese strukturelle Besonderheit ist wahrscheinlich für die gute thermische Stabilität des Proteins verantwortlich.

Caseine weisen wenige Sekundär- und Tertiärstrukturen auf, da der hohe Anteil der Aminosäure Prolin (etwa 12 %) die Bildung von α -Helices und β -Faltblättern verhindert. Durch den offenen, flexiblen und mobilen Aufbau der Caseinmoleküle, auch als „random coil“ bezeichnet und die Fähigkeit komplexe intermolekulare Wasserstoffbrücken sowie elektrostatische und hydrophobe Bindungen auszubilden, besitzen Caseine gute filmbildende Eigenschaften [Chen, 2002; Fox und Kelly, 2004; Marechal, 2007; McHugh und Krochta, 1994a]. Filme und Beschichtungen werden hauptsächlich aus kommerziell verfügbaren Caseinaten gewonnen. Deren Herstellung erfolgt durch Säurefällung des Caseins mit anschließender Neutralisierung mittels Calcium-, Kalium- oder Natriumhydroxid und Sprühtrocknung der Caseinate. Vorrangig kommen Natrium-Caseinate (NaCas) zum Einsatz, da diese im Vergleich zum Casein eine höhere Wasserlöslichkeit sowie bessere funktionale Charakteristiken besitzen.

1.1.2 Kollagen/Gelatine

Kollagen (griech. *colla* = Klebe, *genno* = gebären) ist ein Faserprotein und bildet den wichtigsten Strukturbestandteil von Haut, Knochen, Knorpel und Sehnen aller Wirbeltiere. Bei Säugetieren repräsentiert Kollagen etwa 30 % des gesamten Proteingehaltes. Bisher konnten ca. 28 verschiedene Kollagentypen in der extrazellulären Matrix identifiziert werden, deren Eigenschaften und Funktionen sich unterscheiden. Alle diese Kollagene haben jedoch die gleiche Grundstruktur. Sie bestehen aus drei linksgängigen Polypeptidketten (α -Ketten), die in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix miteinander verdreht sind. Jede dieser Ketten ($M_w \sim 95$ kDa) ist aus einer repetitiven Aminosäuresequenz (Glycin-X-Y) aufgebaut, wobei an den Positionen X und Y häufig die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin stehen. Abhängig vom Kollagentyp kann eine α -Kette aus mehreren Hundert bis mehreren Tausend Aminosäuren aufgebaut sein. Die tripelhelikale Struktur des Kollagens wird durch inter- und intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Durch Aneinanderlagerung vieler Tripelhelices entstehen Kollagenfibrillen, die durch kovalente Quervernetzung stabilisiert werden und ein dreidimensionales Netzwerk (Kollagenfasern) bilden. Bedingt durch diese Struktur ist Kollagen nicht wasserlöslich und verfügt über eine hohe mechanische Stabilität [Babel, 1996; Kühn, 1967; Kühn, 1974; Rassow, 2012].

Kollagen ist Ausgangsstoff für die Herstellung von Gelatine. Tierische Knochen sowie Schweineschwarte bzw. Kalbs- und Rinderhäute sind dabei die wichtigsten Rohstoffquellen. Die Gewinnung von Gelatine (lat. *gelatus* = gefroren) aus nativen Kollagen erfolgt über zahlreiche chemisch-thermische Verfahrensschritte wie z.B. Hydrolyse und Extraktion. Nicht-kollagene Proteine, Fette, Mineralstoffe, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten werden dabei vom Rohmaterial entfernt. Die Kollagen-stabilisierenden Bindungen sowie die Tripelhelix-Struktur werden zerstört, resultierend in einzelnen Polypeptidketten. Gelatine wird daher auch oft als „denaturiertes Kollagen“ bezeichnet. Abhängig vom Rohmaterial, der Vorbehandlung, den Extraktionsparametern und dem Hydrolysegrad zeigt Gelatine eine polydisperse Molmassenverteilung zwischen 20 und 300 kDa. Eine der wichtigsten Eigenschaften von Gelatine ist die Ausbildung thermoreversibler Gele in Verbindung mit Wasser, die sogenannte Sol/Gel-Umwandlung ($T \sim 35-40$ °C). Diese Umwandlung kann mit einer partiellen Renaturierung der Tripelhelix-Struktur verbunden sein. Im Handel wird Gelatine als Granulat, Pulver oder in Blattform angeboten. Die Charakterisierung erfolgt hauptsächlich für die Gelierkraft und die Viskosität. Die Gelierkraft ist ein Maß für die Gallertfestigkeit und wird über den Bloom-Index beschrieben. Dieser Wert liegt zwischen 50

und 300 und symbolisiert mit einem Anstieg eine Zunahme der Gelierkraft. Filmbildende Eigenschaften von Gelatine wurden bereits umfangreich nachgewiesen und untersucht. Der kommerziell erfolgreichste essbare Kollagenfilm ist in der Lebensmittelindustrie in Form einer Wursthülle zu finden [Babel, 2005; Gomez-Guillen et al., 2011; Han, 2005; Karim und Bhat, 2009; Keenan, 2003; Schrieber, 2007].

1.2 Proteinfilme

Als (Protein-) Film wird in der vorliegenden Arbeit ein dünnes, flächiges, freistehendes Material auf Basis von Proteinen bezeichnet. Die Herstellung der Proteinfilme erfolgte nach einem Lösungsmittelverfahren, auch als Gießverfahren oder Nassprozess bezeichnet. Unter diesem Verfahren wird das Lösen bzw. homogene Dispergieren von Proteinen in einem Lösungsmittel (Wasser, Ethanol) mit anschließender Trocknung und resultierender Filmformation verstanden. In den filmbildenden Mechanismus involviert sind die Bildung inter- und intramolekularer Kräfte und ein dadurch entstehendes Makromolekülnetzwerk. Die Formgebung des Filmes passiert durch Gießen der filmbildenden Lösung auf einen Träger, der ein Ablösen des getrockneten Filmes gewährleistet. Temperaturschritte und pH-Einstellungen, die für die verwendeten Proteine oder gewünschten Filmeigenschaften nötig sind, können in das Verfahren eingebaut sein. Mit dem Lösungsmittelverfahren werden auch die technischen Prozesse Sprühen und Beschichten von proteinogenen Materialien realisiert. Eine andere Strategie zur Anfertigung proteinbasierender Filme ist das thermoplastische Verfahren, allgemein als Trockenprozess bekannt. Die Formgebung bei diesem Verfahren, unter Einwirkung von hohen Temperaturen und Drücken, wird hauptsächlich durch Formpressen und Extrusion verwirklicht [Guilbert und Cuq, 2005; Han, 2005; Irissin-Mangata et al., 2001; Lu et al., 2003]. Froberg gelang es mittels eines gleichförmigen Doppelschneckenextruders eine kontinuierliche Produktion von verpackungsfähigen Proteinfilmen zu etablieren [Froberg, 2010].

Für die Herstellung proteinbasierender Filme wurden bereits eine Vielzahl tierischer und pflanzlicher Proteine, wie z.B. Kollagen, Gelatine, Molkenprotein, Caseinat, Weizengluten, Maiszein, Sojaproteinisolat, Erbsen- und Reisprotein eingesetzt [Arvanitoyannis, 2006; Gennadios, 2004; Janjarasskul und Krochta, 2010].

Filmeigenschaften

Proteinfilme können in den verschiedensten Bereichen, wie z.B. als Ernteverfrühungsfilm in der Landwirtschaft oder als Verpackungsmaterial in der Lebensmittelindustrie Anwendung finden. Je nach Anwendungsgebiet benötigt ein proteinbasierender Film unterschiedliche mechanische, sensorische und Barriereigenschaften. Diese Eigenschaften sind abhängig von intrinsischen Eigenschaften der Filmbestandteile (Aminosäuresequenz, 3D-Struktur, Molekulargröße, Polarität, Kristallisationsgrad) und extrinsischen Herstellungsfaktoren (Prozesstemperatur, Trocknungsbedingungen, relative Luftfeuchtigkeit während Prozess/Lagerung, pH, Viskosität, Ionenstärke, Additive) [Dangaran et al., 2009; Janjarasskul und Krochta, 2010]. Allgemein sind Materialien basierend auf Proteinen gute Barrieren gegenüber Sauerstoff, Kohlendioxid, Fetten und Aromastoffen, verfügen aufgrund der hydrophilen Natur von Proteinen jedoch über eine sehr hohe Wasserdampfpermeabilität (WVP) bzw. Wasserlöslichkeit. Im Vergleich zu synthetischen Kunststofffilmen besitzen Proteinfilme eine geringe mechanische Stabilität [Gennadios, 2004; Krochta und De Mulder-

Johnston, 1997]. Zahlreiche Methoden zur Verbesserung der funktionellen Filmeigenschaften wurden bereits untersucht. Die Veränderungen der Proteinstruktur und intermolekularen Bindungen durch chemische, physikalische oder enzymatische Behandlung wie z.B. Vernetzung, Zugabe eines Weichmachers, pH-Wert bzw. Temperaturerhöhung oder Bestrahlung erzielten, im Vergleich zu unbehandelten Proteinfilmen, meist verbesserte Eigenschaften [Bourtoom, 2009; Krochta, 2002]. Eine weitere Methode ist die Herstellung von heterogenen Verbundwerkstoffen (Blend). Kombinationen von Proteinen mit Polysacchariden wie Stärke, Zellulose, Chitosan oder Alginat [Al-Hassan und Norziah, 2012; Di Pierro et al., 2006; Gennadios et al., 1998a; Pereda et al., 2011], mit Lipiden wie Fettsäuren, Ölen oder Wachsen [Fabra et al., 2009; Gontard et al., 1994; Shellhammer und Krochta, 1997] bzw. Gemische verschiedener Proteine [Cao et al., 2007b; Park et al., 2000; Yang et al., 2011] wurden zu Filmen verarbeitet.

Neben den mechanischen und Barriereigenschaften ist bei Proteinfilmen auch die Bioabbaubarkeit von Interesse. Die Kinetik des biologischen Abbaus ist vom Protein (Struktur, Molekulargewicht, Kristallisationsgrad) und den verwendeten Additiven wie Weichmacher und Füllstoff abhängig. Proteinbasierende Materialien sind vollständig bioabbaubar und nicht umweltschädlich [Guilbert und Gontard, 2005]. Filme aus verschiedenen Proteinen wie Weizengluten [Domenek et al., 2004], Caseinat [Mezgheni et al., 1998] oder Molkenprotein [Li und Chen, 2000] sowie ein Soja-Weizengluten-Blend [Park et al., 2000] wurden auf deren Bioabbaubarkeit untersucht. Der beim Abbau von Proteinen freiwerdende Stickstoff kann zudem als Pflanzendünger dienen [Patzsch, 2010]. Andere nicht-proteinogene Filme können diese Düngewirkung nicht vorweisen.

1.3 Modifikationen

Die hohe Wassersensitivität sowie unzureichende mechanische Eigenschaften führen zu einer Anwendungslimitierung proteinbasierender Produkte. Methoden, die ziel- und anwendungsorientierte Struktur- und Funktionsänderungen der Proteine bzw. Proteinnetzwerke ermöglichen, mussten entwickelt werden. Diese werden allgemein als Modifikationen bezeichnet, initiiert durch chemische, physikalische oder enzymatische Behandlung. Solche Veränderungen können einerseits die Verarbeitung von Proteinen ermöglichen bzw. verbessern, andererseits nehmen derartige Modifikationen Einfluss auf die Produkteigenschaften bzw. ermöglichen eine Optimierung derselben. Zu den wichtigsten Modifikationsmöglichkeiten gehören der Einsatz von Weichmachern und Vernetzungsreaktionen der Proteine. Die hohe Wasserdampfpermeabilität von Proteinfilmen fordert Kombinationen mit hydrophoben Additiven in Form eines Zwei- oder Mehrschichtenfilmes oder als stabile Emulsion des Additivs in einer Proteinmatrix [Bourtoom, 2009; Guilbert und Cuq, 2005; Janjarasskul und Krochta, 2010].

1.3.1 Vernetzung der Proteine

Eine Methode zur Vernetzung von Proteinen ist die Bestrahlung (UV, Mikrowellen, Gammastrahlen). Bei der UV-Bestrahlung werden die Strahlen durch aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Phenylalanin) adsorbiert und die entstehenden Radikale für eine kovalente Verknüpfung in Proteinen genutzt. Isoliertes Sojaprotein wurde mittels dieser Methode polymerisiert [Gennadios et al., 1998b]. Die Gammastrahlung wurde für die Vernetzung z.B.

von Caseinat [Lacroix, 1998], Maiszein [Soliman und Furuta, 2009] und Weizengluten [Lee et al., 2005] eingesetzt.

Chemische Vernetzungen von Proteinen durch niedermolekulare Aldehyde, wie z.B. Glutar- oder Formaldehyd, stellen eine weitere Möglichkeit der Modifikation dar. Formaldehyd reagiert mit jeweils zwei ϵ -Aminogruppen im Protein unter Ausbildung einer Methylenbrücke, welche eine kovalente Verbindung zwischen Proteinketten ermöglicht. Der Einsatz von Aldehyden führte bei verschiedensten Proteinen wie Caseinat [Audic und Chaufer, 2005], Erbsenprotein [Gueguen et al., 1998], Weizengluten [Micard et al., 2000] und Gelatine [de Carvalho und Grosso, 2004] zu einer erfolgreichen Vernetzung. Aufgrund der Toxizität sind diese Chemikalien für die Herstellung von Proteinfilmen für den Lebensmittelbereich allerdings nicht geeignet. Ein Carbodiimid (EDC, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) wird ebenfalls als chemischer Vernetzer von Proteinen eingesetzt [Piotrowska et al., 2008; Tropini et al., 2004]. Genipin ist ein natürlicher Vernetzer durch den Filme aus Sojaproteinisolat [Gonzalez et al., 2011] und Gelatine [Bigi et al., 2002] modifiziert wurden.

Die Vernetzung von Proteinen durch Enzyme stellt eine dritte Möglichkeit dar. Das Enzym mikrobielle Transglutaminase (MTG) wurde bereits für die Polymerisation zahlreicher Proteine wie Caseinat [Bruno et al., 2008; Oh et al., 2004], Gelatine [Lim et al., 1999; Taylor et al., 2002], Sojaprotein [Tang et al., 2005], Weizengluten [Lai und Chiang, 2006] und Erbsenprotein [Marco et al., 2007] verwendet. Ein Vergleich der Vernetzungseffekte ist aufgrund unterschiedlicher Parameter (Reaktionszeit, Temperatur, Konzentration) während der Enzymbehandlung nur bedingt möglich. Durch Meerrettichperoxidase konnte die Filmbildung von Sojaprotein enzymatisch beeinflusst werden [Stuchell und Krochta, 1994].

1.3.1.1 Transglutaminase

Transglutaminasen (Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TG) sind Enzyme, welche eine kovalente Verknüpfung von Proteinen und Peptiden katalysieren [Zhu et al., 1995]. Als Reaktion wird ein Acyltransfer zwischen der γ -Carboxamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes katalysiert, welcher zur Entstehung einer ϵ -(γ -Glutamyl)Lysin-Isopeptidbindung führt [Seguro, 1999]. Des Weiteren können auch primäre Amine als Lysin-Komponente fungieren [Ohtsuka et al., 2000]. Der Reaktionsmechanismus der Transglutaminase ist in Abbildung 1-2 dargestellt.

Transglutaminasen sind weit verbreitet und kommen bei Tieren, Pflanzen und Bakterien vor. Eukaryotische Transglutaminasen, wie die TG aus der Meerschweinchenleber, die Fisch-TG oder der Blutgerinnungsfaktor XIIIa, sind Calcium-abhängig [Folk und Cole, 1966a]. Einige dieser TGs sind aus mehreren Untereinheiten aufgebaut. Die 1989 von Ando entdeckte mikrobielle Transglutaminase (MTG) aus *Streptomyces mobaraensis* bot eine Alternative, da sie gegenüber Transglutaminasen aus anderen Quellen entscheidende Vorteile bietet [Ando et al., 1989]. Die MTG besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 38 kDa [Yokoyama et al., 2004], ist Calcium-unabhängig [Seguro, 1999] und verfügt über eine geringe Substratspezifität [Zhu et al., 1995]. Die Herstellungskosten sind aufgrund traditioneller Fermentationsprozesse gering [Lu et al., 2003]. Die mikrobielle Transglutaminase ist über einen weiten pH- und Temperaturbereich stabil (pH 3-9, 20 °C-60 °C) [Lu et al., 2003]. Das Temperaturoptimum liegt bei 50 °C, das pH-Wert-Optimum zwischen 5 bis 8 [Yokoyama et al., 2004].

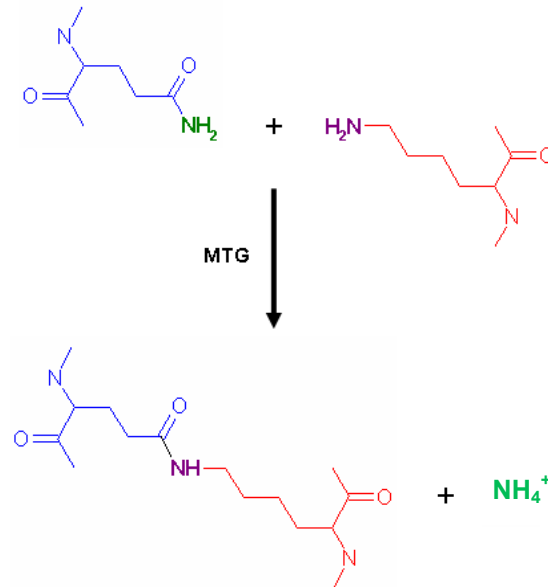


Abbildung 1-2: Reaktionsmechanismus der Transglutaminase. Bildung einer ϵ -(γ -Glutamyl)Lysin-Isopeptidbindung zwischen der γ -Carboxyamid-Gruppe (grün) eines Glutaminrestes (blau) und der ϵ -Aminogruppe (lila) eines Lysinrestes (rot).

Die natürliche Funktion der MTG ist noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielt sie bei der Sporenbildung, um widerstandsfähige Zellwände aufzubauen, eine Rolle [Kobayashi et al., 1996]. Die industrielle Anwendung der mikrobiellen Transglutaminase ist sehr vielfältig. In der Lebensmittelindustrie wird die MTG zur Restrukturierung von Fleisch und Fisch sowie zur Texturverbesserung von Joghurt und Käse verwendet [Zhu et al., 1995]. Für die Immobilisierung von Enzymen z.B. an Ionenaustauscher [Kamata et al., 1992] oder Silicagel [Synowiecki und Wolosowska, 2006] findet MTG ebenfalls Einsatz. Weitere Anwendungsbereiche sind in der Medizin, Pharmazie, Kosmetik-, Textil- und Kunststoffindustrie zu finden [Arrizubieta, 2007; Mariniello und Porta, 2005]. Die MTG aus *Streptomyces mobaraensis* ist derzeit als „Activa[®]WM“ bei Ajinomoto (Hamburg) kommerziell erhältlich.

Die Expression des Enzyms in löslicher Form in *Escherichia coli* gelang erstmals im Jahr 2007 [Marx et al., 2007]. Durch gentechnische Veränderungen dieser rekombinanten MTG mittels Random Mutagenese und DNA-Shuffling konnten Enzymvarianten mit verbesserter Thermostabilität und Hitzesensitivität erzielt werden. Das Temperaturoptimum verschob sich auf 55-60 °C. Die spezifische Aktivität wurde im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp-Enzym ebenfalls optimiert [Buettner et al., 2012; Marx et al., 2008].

1.3.2 Additive

Um die Synthese, die Fertigung und die Eigenschaften von Polymeren gezielt zu beeinflussen bzw. zu verbessern, werden oft sogenannte Additive zugefügt. Diese Stoffe wie z.B. Stabilisatoren, Weichmacher, Füllstoffe, Emulgatoren, Farb- oder Vernetzungsmittel können der filmbildenden Proteinlösung direkt beigemischt oder das Protein bzw. der intakte Proteinfilm damit behandelt werden.

1.3.2.1 Weichmacher

Auf Proteinen basierende Materialien sind in der Regel sehr steif und brüchig. Die Ursache dafür sind die stark ausgeprägten intermolekularen Kräfte zwischen den Polymerketten – elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen sowie Disulfidbrücken. Für die Herstellung, Verarbeitung und Endprodukteigenschaften ist in den meisten Fällen jedoch eine entsprechende Materialflexibilität von essentieller Bedeutung. Zu dessen Gewährleistung kommen Weichmacher zum Einsatz. Weichmacher sind niedermolekulare Substanzen, meist mit hydrophilem Charakter, die sich zwischen die Proteinmoleküle schieben und mit den Polymerketten um elektrostatische Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen konkurrieren. Dadurch kommt es zur Reduzierung der intermolekularen Wechselwirkungen, welche in einer Erhöhung des freien Volumens und damit höheren Beweglichkeit der Proteinmoleküle resultieren. Eine Erniedrigung der Glasübergangstemperatur der Proteine und eine Verbesserung der Filmflexibilität – gekennzeichnet durch zunehmende Bruchdehnung und abnehmende Zugfestigkeit – sind die Folge. Zwei Arten von Weichmachern sind zu unterscheiden, interne und externe. Interne Weichmacher sind Bestandteile der Polymermoleküle, die entweder in die Proteinstruktur copolymerisiert wurden oder mit dieser reagiert haben. Damit sind interne Weichmacher kovalent mit dem Polymer verknüpft. Externe Weichmacher sind nicht chemisch an das Protein gebunden, interagieren lediglich mit dem Proteinmolekül. Aufgrund der großen Auswahl – je nach verlangter Filmeigenschaft – kommen externe Weichmacher bevorzugt zum Einsatz. Häufig verwendete externe Weichmacher sind Polyole (Glycerin, Sorbitol, Polyethylenglykol, Propylenglykol), Mono-, Di-, oder Oligosaccharide (Glukose, Sukrose) sowie Lipide und deren Derivate (Fettsäuren, Phospholipide) [Gennadios, 2002; Guilbert und Cuq, 2005; Han, 2005; Sothornvit und Krochta, 2005]. Aminoalkohole wie z.B. Diethanol- und Triethanolamin zur Plastifizierung von Filmen aus Sojaprotein [Tian et al., 2009], Weizengluten [Irissin-Mangata et al., 2001], Caseinat [Audic und Chaufer, 2010] und Gelatine [Cao et al., 2009] fanden ebenfalls Anwendung. Wasser bzw. adsorbierte Feuchte stellen weitere effektive Weichmacher dar [Matveev et al., 2000]. Verschiedene Amino-Polyethylenglykole (M_w 750-5000 g/mol) zur inneren Weichmachung von Caseinat-Filmen wurden untersucht, führten allerdings zu brüchigen, instabilen Filmen [Patzsch, 2010].

Die Barriereigenschaften eines Proteinfilmes werden durch einen Weichmacher ebenso wie die mechanischen Eigenschaften beeinflusst. Der Einsatz eines Plastifizierungsmittels führt im Allgemeinen zu einem Anstieg von Gas-, Wasserdampf- und Aromapermeabilität. Die Wasserdiffusion des Filmes wird durch die Polarität des Weichmachers begünstigt. Ein Herauslösen des hydrophilen Additivs aus dem Proteinfilm mit der Zeit und eine daraus resultierende Versprödung des Films sind die Folge. Eine mechanische Charakterisierung von plastifizierten Filmen aus Caseinat und Gelatine nach Bewitterung war nicht möglich [Patzsch, 2010].

1.3.2.2 Lipide

Die Barriereigenschaften von Biopolymerfilmen sind für die meisten Anwendungen wichtige Parameter. Aufgrund der hydrophilen Natur von Proteinen und der hohen Polarität der Weichmacher sind proteinbasierende Filme schwache Barrieren gegenüber Wasserdampf. Lipide wie Fettsäuren, Triacylglyceride (Fette, Öle) und Wachse sind niedrig polare bzw. unpolare Substanzen, die aufgrund ihrer Hydrophobizität gute Feuchtigkeitsbarrieren darstellen. Allein sind Lipide fragil und bilden keine kohäsiven, selbsttragenden Filme.

Verbundwerkstoffe aus Protein und Lipid wurden daher umfangreich erforscht [Avena-Bustillos und Krochta, 1993; Fabra et al., 2009; Gontard et al., 1994; Li und Chen, 2000; McHugh und Krochta, 1994b; Shellhammer und Krochta, 1997]. Im Vergleich zu reinen Proteinfilmen stellen Protein-Lipid-Filme meist eine verbesserte Wasserdampfbarriere dar, allerdings gekoppelt mit geringeren mechanischen Eigenschaften des Materials. Diese Instabilität des Filmes wird durch die unzureichende kohäsive Strukturintegrität des Lipids verursacht. Brüchige, opake Filme sind die Folge, abhängig von der Lipidkomponente und -konzentration. Proteinfilme können durch Beschichtung mit einem Lipid (Zwei- oder Mehrschichtfilm) oder durch eine stabile Lipidemulsion in der Proteinmatrix modifiziert werden. Um eine Phasentrennung der Emulsion aufgrund der verschiedenen Polaritäten zu vermeiden, sollten die Lipidtropfen gleichmäßig dispergiert und mit kleiner Partikelgröße in der Trägermatrix vorliegen. Zur Stabilisierung der Lipidpartikel werden häufig oberflächenaktive Substanzen, sogenannte Emulgatoren wie z.B. Lecithin dem Proteinfilm beigelegt. Eine inhomogene Verteilung des Lipids resultiert in einer schwächeren Feuchtigkeitsbarriere. Generell verfügen Schichtfilme über eine bessere WVP-Effizienz als Filme einer stabilen Protein-Lipid-Emulsion. Kovalente Bindungen zwischen dem Protein und dem hydrophoben Additiv werden nicht gebildet, Lipide interagieren lediglich mit den Proteinseitenketten [Bourtoom, 2009; Gennadios, 2002; Janjarasskul und Krochta, 2010; McHugh, 2000; Perez-Gago und Krochta, 2001]. Die Feuchtigkeitsresistenz eines Verbundwerkstoffes ist stark von der Polarität, dem Schmelzpunkt und dem Sättigungsgrad der Lipidkomponente abhängig. Bei Raumtemperatur flüssige Lipide wie Rapsöl, Tungöl oder Zimtöl sowie ungesättigte Fettsäuren (z.B. Ölsäure) erreichen meist nur eine geringe Reduzierung der Wasserdampfpermeabilität [Araes et al., 2010; Kokoszka et al., 2010; Pereda et al., 2010]. Ölsäure führte stattdessen zur Plastifizierung von Proteinfilmen aus Zein [Lai und Padua, 1998] und Caseinat [Fabra et al., 2009]. Wachse stellen gegenüber anderen Lipiden signifikant höhere Wasserdampfbarrieren dar, was auf die starke Hydrophobizität und die orthorhombisch-kristalline Struktur zurückzuführen ist. Häufig verwendete Wachse – trotz des antiplastischen Effektes – sind Bienenwachs, Carnaubawachs, Candelillawachs und Paraffinwachs [Chick et al., 2002; Gontard et al., 1995; Talens und Krochta, 2005].

1.3.2.3 Primäre aliphatische Amine

Proteinfilme werden zur Verbesserung der Wasserresistenz mit Lipiden, vorrangig Wachsen, kombiniert. Die reduzierte WVP der Protein-Lipid-Filme ist meist mit geringeren mechanischen Eigenschaften verknüpft. Außerdem führen fehlende kovalente Bindungen zwischen Protein und Lipid mit der Zeit zur Trennung beider Komponenten. Alternative hydrophobe Additive zur Beeinflussung der Wassersensitivität von Proteinen, mit einer möglichen internen Plastifizierung der Proteinfilme sind nicht erforscht. Primäre aliphatische Amine – bestehend aus einer Aminogruppe verknüpft mit einer Kohlenstoffkette – sind Substanzen, deren Hydrophobizität mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge steigt. Langkettige Alkylamine werden als Fettamine bezeichnet. Die Wasserlöslichkeit sowie weitere Eigenschaften primärer aliphatischer Amine sind in der Tabelle 1-1 dargestellt. Durch ihre NH_2 -Gruppe verfügen primäre Amine über eine funktionelle Gruppe, die als Lysin-Komponente in der MTG-Reaktion fungieren kann – resultierend in einer kovalenten Verknüpfung zwischen Amin und peptid- bzw. proteingebundenem Glutamin. Primäre aliphatische Amine mit einer Kettenlänge von bis zu sechs Kohlenstoffatomen wurden bereits als Substrate für die mikrobielle Transglutaminase identifiziert [Ohtsuka et al., 2000]. Die kovalente Modifikation eines

Proteins mittels Alkylamin könnte in einer verringerten Wasserlöslichkeit des Proteins bzw. verbesserten Feuchtigkeitsbarriere des Proteinfilms resultieren. Eine plastifizierende Wirkung primärer Amine ist nicht bekannt. Aufgrund der kovalenten Verknüpfung würden diese allerdings zur inneren Weichmachung der Proteinfilme dienen. Eine Versprödung der Filme durch Auswaschen des Additivs bei Kontakt mit Wasser würde vermieden bzw. erschwert.

Tabelle 1-1: Physikalische und chemische Eigenschaften primärer aliphatischer Amine (Angaben entstammen Sicherheitsdatenblättern).

Amin	Summenformel	M _w [g/mol]	Aggregatzustand	Wasserlöslichkeit
Butylamin	C ₄ H ₁₁ N	73,14	flüssig	löslich
Hexylamin	C ₆ H ₁₅ N	101,19	flüssig	14 g/L
Octylamin	C ₈ H ₁₉ N	129,25	flüssig	0,2 g/L
Dodecylamin	C ₁₂ H ₂₇ N	185,35	fest, kristallin	0,078 g/L
Octadecylamin	C ₁₈ H ₃₉ N	269,52	fest, pulvrig	unlöslich

Primäre Amine sind in großen Mengen toxisch für Wasserorganismen [Finlay und Callow, 1997; Newsome et al., 1991; Schultz et al., 1991]. Zur Gewährleistung niedriger Amin-Konzentrationen in der Umwelt ist ein mikrobieller Abbau dieser organischen Stoffe von hoher Wichtigkeit. Eine gute Bioabbaubarkeit für lineare Alkylamine mit 4-18 Kohlenstoffatomen konnte ermittelt werden. Der biochemische Sauerstoffbedarf (BOD) lag bei über 60 % nach 12 Tagen [Yoshimura et al., 1980]. Fettamine aus natürlichen Rohstoffen werden z.B. von der Deutsche Hydrierwerke GmbH Rodleben unter dem Handelsnamen ROFAMIN produziert und vertrieben. Diese Amine finden Einsatz z.B. als Desinfektions-, Antitack-, Dispersions-, Waschhilfs-, Korrosionsschutz- oder Haftmittel für Klebstoffe und Lacke sowie als Emulgator und Bakterizid [EcogreenOlechemicals, Broschüre] Auch viele Pharmazeutika und Farbstoffe enthalten Amin-Funktionalitäten.

1.3.2.4 Reaktivfarbstoffe

Reaktivfarbstoffe sind farbige, wasserlösliche Verbindungen, die im Laufe eines Färbeprozesses mit Hilfe bestimmter Gruppierungen eine kovalente Bindung mit dem Substrat eingehen. Diese chemische Bindung resultiert in einer waschechten Verbindung [Zollinger, 1961]. Ursprünglich wurden diese Farbstoffe für die Textilindustrie zum Färben von Zellulosefasern bzw. Faserproteinen wie Wolle und Seide entwickelt. Später fanden Reaktivfarbstoffe in der Medizin und Biowissenschaft zur Visualisierung von Gewebe- und Zellstrukturen [Prescott et al., 1968; Rae et al., 1983], als Affinitätsadsorptionsmittel zur Proteinreinigung [Clonis et al., 1987; Labrou, 2002] und als Affinitätsmarker [Labrou, 2000; Small et al., 1982] Anwendung. Ein Reaktivfarbstoff besteht in der Regel aus einem farbgebenden Molekülteil (Chromophor), einer oder mehrerer Löslichkeitserhöhender Gruppen (z.B. Sulfonatgruppen) und einer oder mehrerer Reaktivgruppen, welche zur kovalenten Bindung mit dem Substrat dienen. Die Reaktivgruppe kann direkt oder über ein Brückenglied mit dem Chromophor verbunden sein (Abbildung 1-3 A).

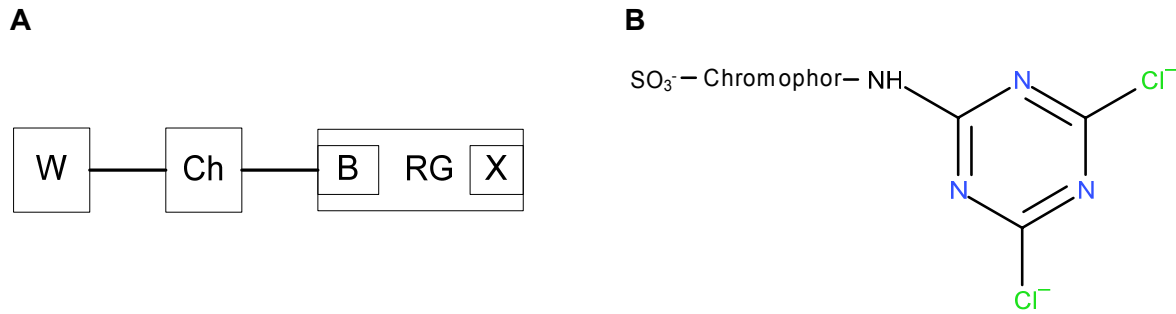


Abbildung 1-3: Schematischer Aufbau eines (A) Reaktivfarbstoffes. W...wasserlöslichmachende Gruppen (z.B. SO₃⁻), Ch...Chromophor, B...Brückenglied (z.B. NH), RG...Reaktivgruppe, X...nukleophile Abgangsgruppen (z.B. F⁻, Cl⁻, SO₄²⁻). **(B) Dichlortriazinfarbstoffes.**

Dichlortriazinfarbstoffe – Handelsname Procion MX – stellen eine Untergruppe der Reaktivfarbstoffe dar. Im Jahr 1956 erfolgte deren Markteinführung durch die englische Firma ICI. Diese Farbstoffe besitzen eine cyclische Struktur mit zwei Chloratomen (Abbildung 1-3 B), über die durch nukleophile Substitution das Material kovalent gebunden werden kann – unter Abspaltung von Salzsäure. Während die Bindung des Farbstoffes an Zellulosefasern über Hydroxylgruppen erfolgt, werden Proteine vorrangig über primäre Aminogruppen von Lysinresten fixiert. Thiol-, Hydroxyl- und Carboxylgruppen anderer Aminosäurereste können ebenfalls zur Bindung führen [Schellenträger, 2006; Shore, 1968; Stute, 1973]. Die Substitution der Chloratome erfolgt stufenweise, abhängig von pH-Wert (bevorzugt alkalisches Milieu), Temperatur und Reaktivität gegenüber den Nucleophilen. Im stark alkalischen Bereich und mit steigender Temperatur können unerwünschte Nebenreaktionen wie die Hydrolyse des Farbstoffes eintreten. Eine kovalente Reaktion des Farbstoffes in dieser wenig reaktiven Form ist nicht möglich [Zahn und Reinert, 1968; Zollinger, 1961]. Verschiedene Dichlortriazinfarbstoffe wie Procion Blue MX, Procion Red MX-5B oder Procion Yellow MX-8G fanden bereits Anwendung, so z.B. zum Färben von chemisch modifiziertem Kollagen [Haroun und Mansour, 2008] bzw. Nylon [Soleimani-Gorgani und Taylor, 2008] oder zur Affinitätsmarkierung von Proteinen bzw. Enzymen [Alderton et al., 1995; Small et al., 1982]. Der Dichlortriazinfarbstoff Procion Yellow M-4RS verfügt über einen fluoreszierenden Chromophor und wird als Fluoreszenzmarker in der Medizin zur Visualisierung von Gewebestrukturen bzw. Nervenzellen angewandt [Berlin et al., 1992; Payton, 1970; Rae, 1974]. Für die Herstellung von Filmen auf Proteinbasis wurden bisher keine permanent gefärbten Materialien eingesetzt. Durch sichtbare Markierung des Proteins könnten allerdings Kenntnisse über Vorgänge innerhalb des Proteinnetzwerkes und die Filmstruktur gewonnen werden.

1.4 Zielsetzung

Biologisch abbaubare, ungiftige und kompostierbare Materialien gelten für Bereiche wie die Landwirtschaft oder Verpackungsindustrie als vielversprechende Innovation. Ein verstärktes Umweltbewusstsein der Menschheit sowie Verknappung fossiler Rohstoffe und eine damit verbundene Teuerung synthetisch hergestellter Kunststoffe begünstigen die Entwicklung von Biokunststoffen. Nachwachsende Rohstoffe wie Stärke, Zucker und Zellulose werden bereits zu Filmen oder Formkörpern verarbeitet und vielseitig eingesetzt. Proteine, Koppelprodukte aus der Stärke- bzw. Biodieselherstellung oder Tierschlachtung, stellen eine weitere Rohstoffquelle dar. Im Vergleich zu konventionellen, erdölbasierenden Kunststoffen ist deren Einsetzbarkeit bisher limitiert – aufgrund der hohen Wassersensitivität und unzureichenden mechanischen Stabilität. Aufgrund dessen finden Proteine, als Ausgangsmaterialien für Biokunststoffe bisher keinen Nutzen. In einer vorhergehenden Arbeit wurden hinsichtlich einer landwirtschaftlichen Anwendung proteinogener Filme (Caseinat, Gelatine, Erbsen- und Kartoffelprotein) umfangreiche Untersuchungen vorgenommen. Dabei trat vor allem bezüglich der Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit weiterer Optimierungsbedarf auf [Patzsch, 2010].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung eines Filmes auf Proteinbasis mit verbesserter Hydrophobizität und Witterungsbeständigkeit unter Erhalt der mechanischen Eigenschaften. Rohkollagen (RK) mit einem Fettanteil von 18,6 % sollte auf dessen Potenzial für eine Filmbildung untersucht werden. Eine Charakterisierung der Filme hinsichtlich mechanischer Stabilität, Wasserlöslichkeit, Benetzbarkeit, Witterungsbeständigkeit und Abbaubarkeit im Boden sollte folgen. Eine plastifizierende Wirkung der Filme, durch das enthaltene Fett und einer damit verbundenen Minimierung des externen Weichmachers, sollte zudem untersucht werden. Die kovalente Vernetzung des Proteins mittels mikrobieller Transglutaminase und deren Einfluss auf die Filmeigenschaften waren zu bewerten.

Die kovalente Modifikation von Proteinen durch hydrophobe Additive stellt eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Wasserresistenz von Proteinfilmen dar. Primäre aliphatische Amine wie z.B. Octylamin, deren Hydrophobizität sich mit steigender Kohlenstoffkettenlänge verbessert, sollten mittels Transglutaminase an das Modellprotein Natrium-Caseinat gekoppelt werden. Der Einfluss einer Modifikation auf die MTG-katalysierte Polymerisation des Proteins sowie die Substratspezifität des Enzyms gegenüber Alkylaminen war zu prüfen.

Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit bestand darin, das Modellprotein Natrium-Caseinat mittels eines Reaktivfarbstoffes kovalent zu modifizieren, um ein besseres Verständnis über Vorgänge innerhalb des Proteinnetzwerkes zu erlangen. Durch eine sichtbare Markierung des Proteins könnte dieses oder mögliche Phasentrennungen im Film lokalisiert werden. Diese Kenntnisse über die Filmstruktur sind für eine Optimierung der Eigenschaften von großer Wichtigkeit, da physikochemische, mechanische und Barriereigenschaften eines Proteinfilms und die daraus resultierende Anwendung vom Aufbau des Proteinnetzwerkes abhängig sind. Optimale Reaktionsbedingungen zur Modifikation von Natrium-Caseinat mittels eines Dichlortriazinfarbstoffes sowie die Eignung des modifizierten Proteins als MTG-Substrat für eine erfolgreiche Vernetzung des Caseinats bzw. Filmherstellung sollten ermittelt bzw. untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendeten Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr.	Reinheit [%]	M _w [g/mol]
Acetonitril (ACN)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.00029.1000	≥ 99,9	41,05
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %) – Mix 32:1	AppliChem GmbH (Darmstadt)	A0947.1000		
Ammoniumperoxodisulfat (APS; (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9592.3	≥ 98,0	228,20
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A512.1		691,90
Butylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	471305	99,5	73,14
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P740.3	≥ 99,0	236,15
Coomassie Brillant Blau G-250	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	9598.2		877,00
Dansyl-Tryptophan-Glutaminyl-Arginin (Dansyl-WQR)	Max-Planck-Institut (Halle/Saale), Dr. M. Malesevic			721,83
di-Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4984.3	99,5	177,99
Dipeptid-Glutaminylglycin (Z-Gln-Gly)	Bachem AG (Bubendorf, Schweiz)	C-1635		337,33
Eisen(III)-chlorid-hexahydrat (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.03943.0250	≥ 99,0	270,33
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3738.2	≥ 99,8	60,05
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	5054.6	95,0	46,07
Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4979.1	37,0	30,03
Glutathion (reduziert)	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04090.0005	≥ 98,0	307,33
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3783.2	≥ 99,5	92,09
Glycin	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3908.2	≥ 99,0	75,07
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	X999.3	≥ 99,5	60,06

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr.	Reinheit [%]	M _w [g/mol]
n-Hexan	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	3907.2	≥ 95,0	86,18
Hexylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	219703	99,0	101,19
Hydroxylammoniumchlorid	Merck KGaA (Darmstadt)	1.04616.0100	≥ 99,0	69,49
Maltodextrin (aus Maisstärke)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	31410		
Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4227.2	≥ 99,0	78,13
Methanol (HPLC grade)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7342.1	≥ 99,9	32,04
Monodansylcadaverin (MDC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	D4008	≥ 99,7	335,50
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	K305.1	≥ 99,0	65,01
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	A135.2	≥ 99,8	105,99
Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat (NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)	Riedel-de Haën (Seelze)	4269 23220	≥ 98,0	156,01
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	1057.1	20,0	288,40
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6771.1	≥ 99,0	40,00
Natriumthiosulfat-5-hydrat (Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P034.2	≥ 99,5	248,18
Octylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	O5802	99,0	129,25
Procion Red MX-5B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	404365	40,0	615,34
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	6752.5	≥ 99,8	60,10
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)	#SM0431		
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4625.2	37,0	36,46
Silbernitrat (AgNO ₃)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	7908.1	≥ 99,9	169,88
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	2367.3	≥ 99,0	116,21
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	8789.2	≥ 99,0	163,40
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	P088.1	99,9	114,02
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe)	4855.3	≥ 99,9	121,14

2.1.2 Geräte

Sämtliche verwendete Geräte sind in Tabelle 2-2 zusammengestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Bewässerungssystem		Gardena GmbH (Ulm, Deutschland)
Bügelmessschraube		Vogel Germany GmbH & Co.KG (Kevelaer, Deutschland)
Dialyseschlauch	Spektra/Por®Dialysis Membrane (MWCO 25,000)	Spectrum Laboratories Inc. (Rancho Dominguez, USA)
Elektrophorese- Apparatur	Electrophoresis Power Supply – EPS301	Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden)
Exsikkator	BOLA-Maxi	Rettberg GmbH (Göttingen, Deutschland)
Extraktionshülse (aus Zellulose)	Innendurchmesser: 48 mm Außendurchmesser: 52 mm	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
Flaschenaufsatzfilter	Millipore Express®Plus (0,22 µm)	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
HPLC-Anlage	SpectraSystem (P2000, AS3000, UV1000)	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
HPLC-Säule	Grom-Sil 120 ODS-5 ST 5 µm (140 x 4 mm)	Alltech Grom GmbH (Rottenburg-Hailfingen, Deutschland)
Kontaktwinkelmessgerät	OCA20	DataPhysics Instruments GmbH (Filderstadt, Deutschland)
Magnetrührer	MR3001 MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Kelheim, Deutschland)
Materialprüfmaschine	BDO-FB0.5TH Zwick Z020	Zwick GmbH & Co.KG (Ulm, Deutschland)
Mikroliterpumpe		Harvard Apparatus (Holliston, USA)
pH-Indikatorpapier	pH 6,0 – 8,1 pH 8,0 – 9,7	Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe, Deutschland)
pH-Meter	Inolab pH Level 2	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Deutschland)
Photometer	Genesys 6	ThermoSpectronic (New York, USA)
Pipetten		Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Rotationsverdampfer	Hei-VAP Advantage	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Kelheim, Deutschland)
Soxhlet		
Spritze	Microliter syringes	Hamilton Messtechnik GmbH (Höchst, Deutschland)
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Trockenschrank	UFE 500	Memmert GmbH & Co.KG (Schwabach, Deutschland)
UV-Detektor-Kamera	Syngene Gene Genius Bio Imaging System	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vakuumpumpsystem	PC 511	Vacuubrand GmbH & Co.KG (Wertheim, Deutschland)
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Waage	BP221S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
	BL310	
	APX-100	Denver Instrument (Denver, USA)
Zentrifuge	Centrifuge 5415R Centrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Zentrifugenrotor	A-4-81 F45-24-11 F45-48-11	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

2.1.3 Puffer

Sämtliche verwendete Puffer sind in Tabelle 2-3 zusammengestellt.

Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Puffer.

Bezeichnung	Molarität [mM]	pH	Einwaage für 1 L [g]	Bemerkungen zur Herstellung
Tris/HCl-Puffer	20	7,0	2,42	Tris in 800 mL dH ₂ O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt.
Tris/HCl-Puffer	100	8,0	12,11	
Natrium-Phosphatpuffer (*NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, **Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	50	8,0 9,0 10,0 10,5	7,8* / 8,9**	Jeweilige Salzmenge wurde separat in 800 mL dH ₂ O gelöst und mit dH ₂ O auf 1 L aufgefüllt. pH ≤ 9: mit **-Lösung wurde der pH-Wert der *-Lösung eingestellt. pH > 9: Zugabe von 1 M NaOH zu **-Lösung bis gewünschte pH-Wert erreicht.

2.1.4 Proteine

Sämtliche verwendete Proteine sind in Tabelle 2-4 zusammengestellt.

Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten Proteine.

Bezeichnung	Lieferant	Art. Nr.	Charge	Reinheit [%]	Fettanteil [%]
Gelatine (300 Bloom)	Gelita AG (Eberbach)		325407		
Natrium-Caseinat	Rovita GmbH (Engelsberg)	0222	L161107001	> 88,0	< 1,5
N,N-Dimethylcasein (DMC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)	39890			
Schweineschwarte* (getrocknet)	Acontex GmbH (Rheda-Wiedenbrück)		110400877	82,8	18,6

*Für das Protein Schweineschwarte wurde in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnung Rohkollagen (RK) verwendet. Weitere Inhaltstoffe sind Asche (1,05 %), Fasern (0,2 %), Chlorid, Mineralstoffe und Kohlenhydrate. Der Feuchtigkeitsgehalt beträgt 6,26 %.

2.1.5 Transglutaminasen

Sämtliche verwendete Transglutaminasen sind in Tabelle 2-5 zusammengestellt.

Tabelle 2-5: Übersicht der verwendeten mikrobiellen Transglutaminasen (MTG).

Bezeichnung	Beschreibung
MTG Activa [®] WM	kommerziell erhältliche MTG-Präparation (1,0 % Enzym in Maltodextrin) von Ajinomoto Foods Deutschland GmbH (Hamburg) Expressionsstamm: <i>Streptomyces mobaraensis</i>
MTG S2P	genetisch optimierte, rekombinante MTG mit Aminosäureaustausch an zweiter Position (Serin gegen Prolin ausgetauscht) [Marx et al., 2008] Expressionsstamm: <i>E. coli</i> BL21 Gold(DE3)

Für die kommerziell erhältliche MTG-Präparation Activa[®]WM wurde nachfolgend die Bezeichnung „MTG_{Activa}“ und für die rekombinant hergestellte MTG-Präparation S2P die Bezeichnung „MTG_{S2P}“ verwendet.

2.2 Analytik

2.2.1 Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität

Zur Bestimmung der MTG-Aktivität wurde der kolorimetrische Hydroxamat-Test eingesetzt [Folk und Cole, 1966b]. Z-Gln-Gly dient hierbei als Glutamin-Substrat, das von der MTG mit Hydroxylamin zu Z- γ -Glutaminyl-Hydroxamat-Gly umgesetzt wird. Mit Eisenionen bildet sich ein Farbkomplex, der bei 525 nm photometrisch detektiert werden kann (Abbildung 2-1).

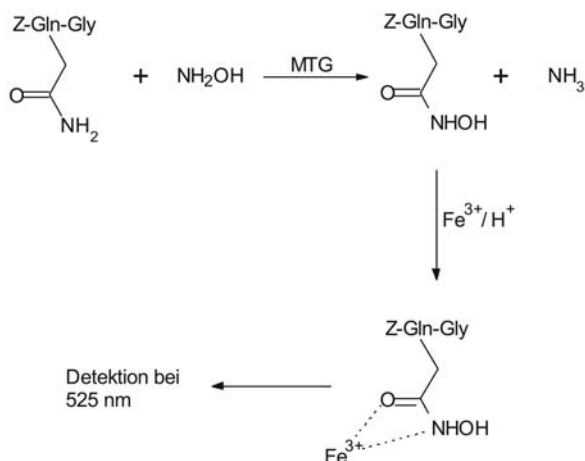


Abbildung 2-1: Prinzip des Hydroxamat-Tests zur Bestimmung der Transglutaminase-Aktivität.

Für den Test wurden die Substrat- und Stopplösung mit den wie in Tabelle 2-6 und Tabelle 2-7 beschriebenen Konzentrationen hergestellt. Für die Substratlösung wurden 5 g dH₂O vorgelegt. Nach Tris-Zugabe wurden 400 μ L 1 M Essigsäure zugesetzt. Anschließend erfolgte die Zugabe aller weiteren Bestandteile, die Einstellung des pH-Wertes mit 1 M Essigsäure auf 6,0 und das Auffüllen mit dH₂O auf 10 g.

Tabelle 2-6: Zusammensetzung der Substratlösung für den Hydroxamat-Test.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Einwaage in 10 g [g]
0,20 M Tris	121,14	0,3028
0,10 M Hydroxylammoniumchlorid	69,49	0,0869
0,01 M Glutathion (reduziert)	307,33	0,0384
0,03 M Z-Gln-Gly	337,33	0,1265

Tabelle 2-7: Zusammensetzung der Stopplösung für den Hydroxamat-Test. Die Lösungen wurden zu gleichen Teilen und in der angegebenen Reihenfolge gemischt.

Konzentration im Test	Molekulargewicht [g/mol]	Reihenfolge
12 % Trichloressigsäure	163,40	1
5 % FeCl ₃ ·6H ₂ O (in 0,1 M HCl)	270,33	2
3 M HCl	36,46	3

Die MTG-Aktivität ließ sich nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz berechnen (Formel 1). Dabei ist eine Unit [U] definiert als die Bildung von 1 μmol γ -Glutaminy-Hydroxamat pro Minute bei 37 °C und einem pH-Wert von 6,0.

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

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

Die Durchführung des Tests erfolgte in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß. Dafür wurden 600 μL Substratlösung und 50 μL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0) vorgelegt und 3 min bei 37 °C inkubiert. 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 anschließend zentrifugiert (2 min, RT, 16100 g) und vom Überstand die Extinktion bei 525 nm gegen einen Blindwert bestimmt. Der Blindwert enthielt 100 μL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0) ohne Enzym.

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

2.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für den Nachweis einer Vernetzungsreaktion durch MTG und zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die SDS-PAGE nach Laemmli eingesetzt [Laemmli, 1970]. Alle verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2-9 zusammengefasst.

Die Gele für die SDS-PAGE bestanden aus je einem Trenn- und einem Sammelgel. Die Zusammensetzung ist in Tabelle 2-8 dargestellt. Die zu analysierenden Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Es wurden 10 μL Probe und 5 μL Molekulargewichtsmarker auf das 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).

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

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

Tabelle 2-9: Reagenzien zur Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Trenngelpuffer	181,8 g/L Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 8,8	Substanzen in 800 mL dH_2O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
Sammelgelpuffer	60,6 g/L Tris 20 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung pH 6,8	Substanzen in 700 mL dH_2O gelöst, pH mit HCl eingestellt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30 %) Mix 32:1	290,9 g/L Acrylamid, 9,1 g/L Bisacrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt) vgl. 2.1.1
APS-Lösung (gesättigt)	$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	In einem Reaktionsgefäß dH_2O vorgelegt und eine entsprechende Menge APS hinzugefügt, bis sich keine Kristalle mehr lösen.
Kathodenpuffer (10x konzentriert)	30,28 g/L Tris 144 g/L Glycin 50 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 1 mL 10 % (w/v) NaN_3 -Lösung	Substanzen in 800 mL dH_2O gelöst und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
SDS-Probenpuffer	27,2 g/L Tris 30 mL HCl (3 M) 250 mL 20 % (w/v) SDS-Lösung 500 mg Bromphenolblau 500 g Glycerin pH 6,8	Substanzen in etwas dH_2O gelöst, pH mit 3 M HCl eingestellt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt. Vor Verwendung wurden 10 μL Mercaptoethanol pro mL SDS-Probenpuffer zugesetzt.

2.2.2.1 Färbung mittels Coomassie

Das SDS-PAGE-Gel wurde über Nacht in Färbelösung auf einem Wipptisch geschüttelt. Nach der Färbung wurde das Gel mit Entfärbelösung bis zum maximalen Kontrast entfärbt (Wechsel der Lösung nach 30 min). Nach Spülen mit dH_2O (10-20 min) wurde das Gel für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert. Das Gel wurde luftblasenfrei zwischen zwei benetzte Zellophanfolien gespannt und für zwei Tage bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-10 aufgelistet.

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

Bezeichnung	Zusammensetzung	Bemerkung zur Herstellung
Färbelösung	1 g/L Coomassie Brillant Blau G-250 20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Coomassie Brillant Blau in 700 mL dH_2O gelöst, danach Zugabe der Lösungen.
Entfärbelösung	20 % (v/v) 2-Propanol 10 % (v/v) Essigsäure	Lösungen gemischt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.
Geltrocknerlösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Glycerin	Substanzen in 500 mL dH_2O gemischt und mit dH_2O auf 1 L aufgefüllt.

2.2.2.2 Färbung mittels Silber

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

Tabelle 2-11: Protokoll zur Durchführung der Silberfärbung nach [Blum et al., 1987]. Pro Gel wurden je 100 mL Lösung verwendet.

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

Um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden, erfolgte die Herstellung aller Lösungen mit mehrfach deionisiertem Wasser und Methanol in HPLC Qualität. Weiterhin wurden die Lösungen zum Sensitivieren, Färben und Entwickeln kurz vor Verwendung frisch hergestellt. Nach den genannten Schritten wurde das Gel in 50 % (v/v) Methanol aufbewahrt oder wie das Gel der Coomassie-Färbung getrocknet (vgl. Abschnitt 2.2.2.1).

2.2.3 Mechanische Prüfung von Filmen mittels Zugversuch

Die Messung der Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen erfolgte an einer Zwick Materialprüfmaschine des Typs BDO-FB0.5TH (Zwick GmbH & Co.KG, Ulm) angelehnt an die Norm DIN EN ISO 527-3. Dafür wurden Probestreifen (15 x 150 mm) aus einem plastifizierten Proteinfilm herausgeschnitten und zwischen pneumatischen Klemmen mit Aluminium/Vulkollan-Spannbacken (Abbildung 2-2 A) fixiert. Probestreifen von Filmen ohne Weichmacher wurden mit der Dimension 10 x 150 mm ausgeschnitten. Für die Prüfung wurden diese Filmstreifen zwischen Klemmen mit Backeneinsätzen aus Stahl mit Schuppenraster-Oberfläche gespannt (Abbildung 2-2 B). Die Änderungen wurden notwendig, da unplastifizierte Filme während der Messung von den Aluminium/Vulkollan-Spannbacken nicht gehalten wurden und der Kraftaufnehmer der Prüfmaschine (Maximalkraft 100 N) nicht ausreichte, um den Probestreifen bis zum Bruch zu fahren. Gelatine-Filme ohne Weichmacher wurden mit der Materialprüfmaschine Zwick Z020 (Maximalkraft 2,5 kN) vermessen.

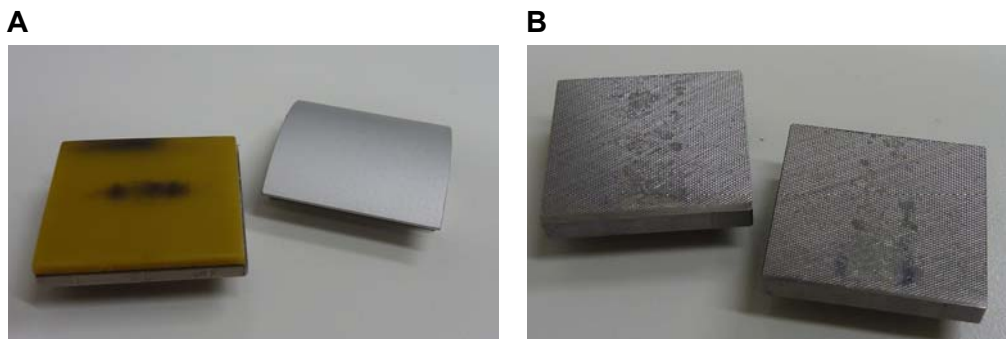


Abbildung 2-2: Backeneinsätze zur Bestimmung der Zugeigenschaften von Proteinfilmen an einer Zwick Materialprüfmaschine. A: Aluminium konvex/Vulkollan glatt (Filme mit Weichmacher); **B:** Stahl Schuppenraster 0,4 mm (Filme ohne Weichmacher).

Die Einspannlänge wurde bei der Prüfung auf 100 mm eingestellt. Die Vorkraft zur Ausrichtung der Probe betrug 0,1 N. Die Prüfungsgeschwindigkeit zur Bestimmung des Zugmoduls betrug 1 mm/min. Der Zugmodul wurde im Dehnungsbereich von 0,05-0,25 % gemessen. Bei Erreichen von 0,25 % Dehnung wurde die Prüfungsgeschwindigkeit auf 50 mm/min erhöht. Die Prüfung wurde bis zum Bruch des Probestreifens durchgeführt. Dabei erfolgte die Aufzeichnung der Spannung-Dehnungs-Kurve. Zur Auswertung des Zugversuches wurde die Software TestXpert II Version 1.42 verwendet. Es wurde die Zugfestigkeit σ_M (Formel 2) und die Bruchdehnung ε_B (Formel 3) ermittelt.

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

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

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

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

Die Dicke eines Filmstreifens – Parameter zur Berechnung der Querschnittsfläche A – wurde mittels einer Bügelmessschraube bestimmt. Pro Streifen erfolgte eine Dreifachbestimmung.

Der Zugversuch wurde bei 23 ± 2 °C durchgeführt. Die Proben wurden vor der Messung mindestens 48 h bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % relativer Luftfeuchte (rLF) über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung in einem Exsikkator konditioniert. Die dargestellten Daten repräsentieren den Mittelwert aus mindestens zehn Probestreifen \pm Standardabweichung als Fehlerbalken. Die Standardabweichung betrug 0,1-10 %.

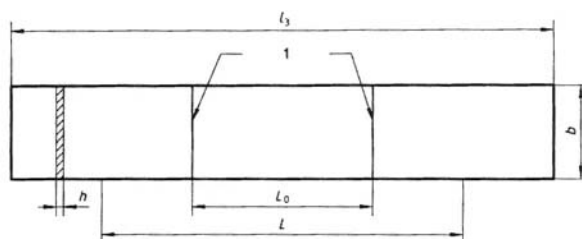


Abbildung 2-3: Probekörper Typ 2 zur Bestimmung der Zugeigenschaften von Proteinfilmstreifen [DIN EN ISO 527-3, 1995]. 1...Messmarken; b...Probenbreite 10-25 mm; h...Probendicke ≤ 1 mm; L_0 ...Messlänge $50 \pm 0,5$ mm; L...Anfangsabstand der Einspannklemmen 100 ± 5 mm; l_3 ...Gesamtlänge ≥ 150 mm.

2.2.4 Löslichkeit von Proteinfilmstreifen

2.2.4.1 Löslichkeit in Wasser unter Temperatureinfluss

Die Durchführung zur Bestimmung der Wasserlöslichkeit der Proteinfilmstreifen ist in Abbildung 2-4 dargestellt. Eine Filmprobe (10 x 50 mm) wurde in einem Reaktionsgefäß mit 10 mL dH_2O für 1 h mittels Thermomixer geschüttelt (500 rpm) und anschließend der Filmrest dem Reaktionsgefäß wenn möglich entnommen. Die Temperatur des Wassers variierte zwischen 23 °C und 85 °C (23/ 30/ 40/ 55/ 85 °C). Der Filmrest wurde 24 h bei 70 °C getrocknet. Die wässrige Lösung wurde verworfen.

Die Gewichtsunterschied zwischen dem getrockneten Filmrest nach dem Löslichkeitstest und dem Trockengewicht der Ausgangsprobe entspricht dem Gewichtsverlust des Filmes (Formel 4). War eine Entnahme des Filmrestes aus dem Reaktionsgefäß nicht möglich, entsprach das einem 100 %igen Gewichtsverlust bzw. einer vollständigen Löslichkeit der Probe in Wasser.

$$\Delta\text{Gewicht} = \frac{m_{\text{Film}} - m_{\text{Rest}}}{m_{\text{Film}}} \cdot 100 \quad (4)$$

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

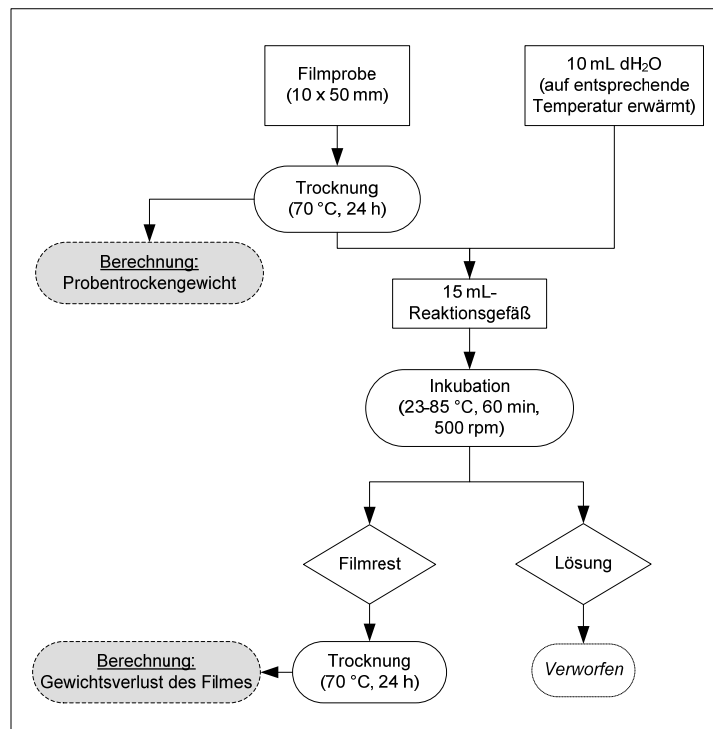


Abbildung 2-4: Durchführung zur Bestimmung der Löslichkeit von Proteinfilmen in Wasser bei unterschiedlichen Temperaturen (23/ 30/ 40/ 55/ 85 °C). dH₂O...deionisiertes Wasser.

2.2.4.2 Untersuchung der Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit

Zur Untersuchung der Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit von Proteinfilmen wurden die nach Abschnitt 2.3.6 hergestellten Filme in dH₂O getaucht und nach Trocknung deren mechanischen Eigenschaften analysiert. Der Test simulierte eine vollständige Überflutung des Filmes z.B. bei Starkregen. Die Filme (200 x 200 mm) wurden zwischen Acrylglas-Rahmen gespannt, für 1 h bei Raumtemperatur in dH₂O getaucht und anschließend bei gleicher Temperatur getrocknet. Diesem Bewitterungszyklus (Wässerung-Trocknung) wurde ein Proteinfilm bis zu vier Mal ausgesetzt. Nach der letzten Trocknung wurden die Proteinfilme für mindestens 48 h bei 23±2 °C und 50±3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) in einem Exsikkator konditioniert. Die Zugeigenschaften der Filme wurden wie unter Abschnitt 2.2.3 beschrieben ermittelt.

2.2.5 Kontaktwinkelmessung

Die Messung der Kontaktwinkel von Proteinfilmen erfolgte mittels des videogestützten, optischen Kontaktwinkelmessgeräts OCA20 (DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt). Dafür wurde ein 5 µL Tropfen deionisiertes Wasser mittels einer Mikroliter-Spritze auf die Filmoberfläche appliziert. Die Filmprobe samt Tropfen wurde photographisch erfasst. Die Berechnung des Winkels zwischen Basislinie (Filmoberfläche) und dem Wassertropfen erfolgte automatisch mittels der Software SCA20. Auf beiden Seiten des Filmes, d.h. während der Trocknung der Luft (Oberseite) bzw. der PTFE-Form zugewandten Seite (Unterseite) wurden die Kontaktwinkel bestimmt. Die Messung erfolgte bei Raumtemperatur. Pro Film wurden mindestens zehn Messwerte aufgenommen und der Mittelwert ± Standardabweichung bestimmt. Die Standardabweichung betrug 2-6 %.

Der Kontaktwinkel θ stellt ein Maß für die Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche durch eine Flüssigkeit dar (Abbildung 2-5). Dabei sind zwei Grenzfälle beobachtbar. Entweder der aufgetragene Tropfen „verschwindet“ und bildet einen dünnen, flüssigen Film (vollständige Benetzung, $\theta = 0^\circ$) oder es tritt eine absolute Unbenetzbarkeit des Körpers ($\theta = 180^\circ$) ein [Dörfler, 2002]. Oberflächen mit einer partiellen Benetzbarkeit und einem Kontaktwinkel kleiner 90° werden als hydrophil bezeichnet. Beträgt der Winkel mehr als 90° ist die Oberfläche hydrophob.

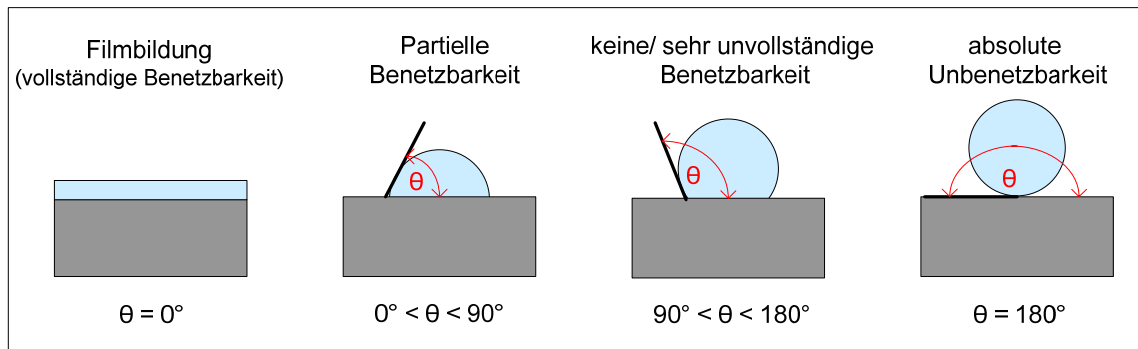


Abbildung 2-5: Darstellung verschiedener Situationen der Benetzbarkeit einer Festkörperoberfläche durch eine Flüssigkeit unter Angabe des Kontaktwinkels θ .

2.2.6 Abbaubarkeit im Boden

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens der Proteinfilm im Boden wurden Anzuchtschalen (200 x 330 x 60 mm) bis zur Hälfte mit Pikiererde (Einheitserde Classic) gefüllt. Darauf wurden Filmproben (40 x 40 mm) gelegt und diese mit weiterer Erde vollständig bedeckt (1-2 cm hoch). Pro Schale wurden 15 Proben platziert. Gelagert wurden die präparierten Schalen bei $23 \pm 2^\circ \text{C}$ und $55 \pm 5\% \text{ rLF}$. Um ein Austrocknen der Erde zu vermeiden, wurden in einem 24 h-Rhythmus 90 mL Wasser pro Schale zugeführt. Die Zugabe war durch ein Bewässerungssystem automatisiert und erfolgte innerhalb einer Minute. Die Versuchsdauer betrug 60 Tage. Pro Versuchstag erfolgte eine Doppelbestimmung. Dafür wurden die Filmproben den Schalen wenn möglich vorsichtig entnommen, das Abbauverhalten fotografisch dokumentiert und bewertet.

2.2.7 Reverse Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Die Analytik der Kalibrierlösungen und Reaktionsproben aus Abschnitt 2.3.3 erfolgte mit einer SpectraSystem-HPLC-Anlage. Als Trennsäule wurde eine Grom-Sil 120 ODS-5 ST $5 \mu\text{m}$ (140 x 4 mm) von Alltech Grom GmbH (Rottenburg-Hailfingen) verwendet. Die Steuerung der Anlage, Datenaufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme wurde über die Software ChromQuest 2.51 realisiert. Für alle Durchläufe wurde eine Flussrate von 1 mL/min gewählt. Die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 215 nm.

Die Probeninjektion erfolgte über eine sogenannte „Push Loop“-Methode mit 50 μL Probe je Injektion. Es wurde pro HPLC-Fläschchen eine Doppelbestimmung vorgenommen. Zur Trennung der Probengemische wurde ein Stufengradient mit einmaligem Umschalten von Laufmittel A (0-5 min) zu Laufmittel B (5,1-12 min) gefahren.

Alle bei der Chromatographie verwendeten Laufmittel und Lösungen wurden filtriert (Porendurchmesser des Filters: 0,22 μm) und entgast. Die Zusammensetzungen der beiden Laufmittel sind in Tabelle 2-12 dargestellt.

Tabelle 2-12: Zusammensetzung der Laufmittel für die RP-HPLC.

	Laufmittel A	Laufmittel B
Acetonitril	30 %	60 %
Trifluoressigsäure	0,1 %	0,1 %
dH ₂ O	69,9 %	39,9 %

Die HPLC-Anlage wurde nach etwa 10-15 Messungen mit 100 % Methanol gespült, um die mit dem Laufmittel nicht eluierbaren Substanzen zu entfernen. Zuvor wurde die Apparatur mit 20 % Methanol gespült, zur Entfernung des Laufmittels und zur Verhinderung einer Präzipitation der darin gelösten Salze.

In Abschnitt 8.2 sind Chromatogramme der analysierten Reaktionsproben sowie die Kalibrierung der Substratlösung dargestellt. Tabelle 2-13 veranschaulicht die Retentionszeiten des Substrates Z-Gln-Gly und der gebildeten Reaktionsprodukte, abhängig vom verwendeten primären Amin. Ausgehend von den Peakflächen der Kalibrierung – Lösungen bekannter Konzentrationen – konnte ein linearer Faktor bestimmt werden, mit dem schließlich die Substratkonzentrationen der Reaktionsproben berechnet wurden. Die Konzentrationen der Produkte resultierten aus der Abnahme der jeweiligen Z-Gln-Gly-Konzentration. Eine Kalibrierung der Produkte war aufgrund fehlender Referenzsubstanzen nicht möglich.

Tabelle 2-13: Retentionszeiten analysierter Komponenten.

Komponente		Retentionszeit [min]
Substrat	Z-Gln-Gly	2,5
Produkte	Butylamin	7,7
	Hexylamin	8,7
	Octylamin	10,2

2.3 Methoden

2.3.1 Modifikation von Caseinat mit Farbstoff

Die Durchführung zur Modifikation von Natrium-Caseinat mittels eines Dichlortriazin-farbstoffes – Handelsname Procion Red MX-5B – ist in Abbildung 2-6 dargestellt. Dieser Reaktivfarbstoff kann durch nukleophile Substitution der beiden Chloratome kovalent an Hydroxyl- und Aminogruppen von Zellulosefasern bzw. Proteinen binden [Zollinger, 1961].

Der Reaktionsansatz bestand aus 0,88 mg/mL Protein und 5,75 mM Farbstoff in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 8,0 und wurde bei 25 °C für 120 min inkubiert. Das Verhältnis zwischen Caseinat bzw. den Lysinen des Proteins – 62 Lysine pro Caseinmolekül – und dem Farbstoff betrug 1:10, d.h. ein zehnfacher Farbstoffüberschuss lag vor. Für die Berechnung des Protein_{Lys}-Farbstoff-Verhältnisses wurden nur die Lysine des Proteins verwendet, da sich Reaktivfarbstoffe vorrangig an die primäre ε-Aminogruppe dieser Aminosäure binden.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten 20 µL dem Reaktionsansatz entnommen, mit 20 µL SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

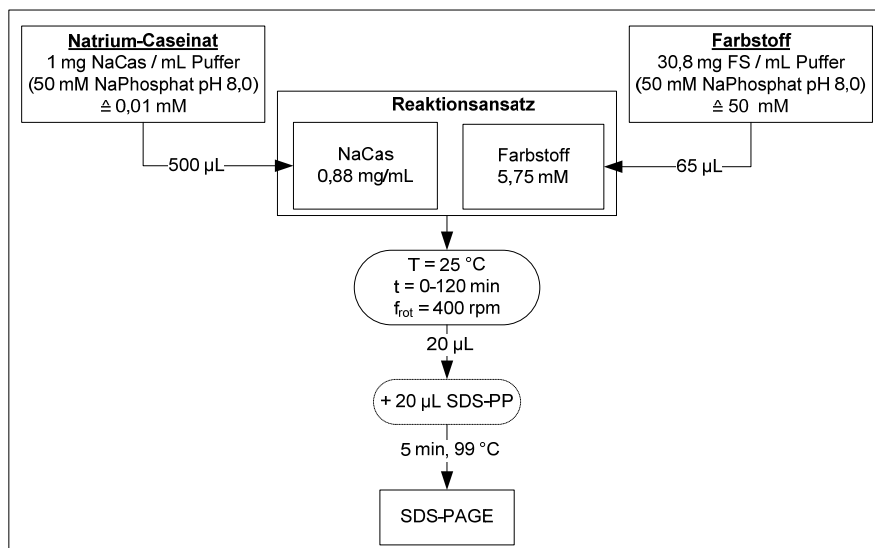


Abbildung 2-6: Durchführung zur Untersuchung der kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat mittels Dichlortriazinfarbstoff (Procion Red MX-5B) bei 25 °C. FS...Farbstoff, SDS-PP...SDS-Probenpuffer.

2.3.1.1 Variation des pH-Wertes und des Protein_{Lys}-Farbstoff-Verhältnisses

Der Einfluss von zwei Parametern – pH-Wert und Protein_{Lys}-Farbstoff-Verhältnis – auf die Modifikation des Natrium-Caseinats wurde untersucht. Die Durchführung erfolgte angelehnt an das in Abbildung 2-6 dargestellte Fließschema mit einigen Veränderungen.

In der ersten Versuchsreihe wurde der pH-Wert der Protein- und Farbstofflösung zwischen 50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 9, 10 und 10,5 variiert. Der Reaktionsansatz sowie die Bedingungen (25 °C, 120 min, Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis 1:10) wurden konstant gehalten. In der zweiten Versuchsreihe wurde das Protein_{Lys}-Farbstoff-Verhältnis zwischen 1:1, 1:2,5 und 1:5 variiert. Um diese Verhältnisse im Reaktionsansatz einzustellen, wurden verschiedene Mengen an Farbstofflösung (Konzentration: 10 mM = 6,37 mg/mL) dem Ansatz zugeführt. Die zugesetzten Volumina sowie die Farbstoffkonzentrationen im Reaktionsansatz

sind in Tabelle 2-14 aufgelistet. Die Reaktionsbedingungen betragen 25 °C, 120 min und 50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 10,5.

Die Analyse beider Versuchsreihen erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten 20 µL dem Reaktionsansatz entnommen, mit 20 µL SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Tabelle 2-14: Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnisse bzw. Farbstoffkonzentrationen im Reaktionsansatz unter Angabe der zugesetzten Farbstoffvolumina.

Protein _{Lys} :Farbstoff-Verhältnis	Zugesetzte Farbstoffvolumen (10 mM = 6,37 mg/mL)	Farbstoffkonzentration im Reaktionsansatz
1:1	35 µL	0,654 mM
1:2,5	80 µL	1,38 mM
1:5	160 µL	2,42 mM

2.3.1.2 Behandlung der Caseinat-Farbstoff-Lösung mit Butylamin

Zur Substitution restlicher Chloratome der Farbstoffmoleküle wurde die Caseinat-Farbstoff-Lösung einer Behandlung mit Butylamin unterzogen. Die Lösung wurde mit Butylamin versetzt und bei 30 °C für 240 min im Thermomixer (600 rpm) inkubiert. Das zugesetzte Volumen an Butylamin wurde so gewählt, dass im Reaktionsansatz ein Farbstoff-Butylamin-Verhältnis von 1:25 vorlag. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten dem Reaktionsansatz Proben entnommen, mit dH₂O auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

2.3.1.3 Gewinnung des modifizierten Caseinats

Da sich das Zielprotein in Lösung befand, wurde als Reinigungsmethode das Ausfällen mittels Salzsäure angewandt. Eine genaue Säurekonzentration zum Fällen des modifizierten Caseinats war nicht bekannt. Daher wurde dem Caseinat-Farbstoff-Butylamin-Gemisch bei 25 °C stufenweise 4 M HCl zugesetzt. Nach jeder Stufe wurde der Ansatz zentrifugiert (5 min, RT, 3220 g) sowie Überstand und Pellet voneinander getrennt. Die Zugabe von HCl zum Überstand erfolgte bis das Protein präzipitierte – bei etwa 12,5 % Säure. Die Analyse der Salzsäurefällung erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden die nach Zentrifugation erhaltenen Pellets in dH₂O resolubilisiert bzw. den Überständen vor der nächsten HCl-Zugabe eine Probe entnommen. Alle Proben wurden mit dH₂O auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert.

Um das säuregefällte Protein von Salzen und ungebundenem Farbstoff zu befreien, wurde dieses in dH₂O resolubilisiert und in einen Dialyseschlauch (MWCO 25,000) überführt. Zur Vorbereitung des Dialyseschlauches und zur Entfernung der Natriumazid-haltigen Lagerlösung wurde der Schlauch zuvor mehrmals mit dH₂O gespült. Die Dialyse gegen dH₂O erfolgte für 24 h bei 4 °C unter Rühren. Das Wasser wurde mehrmals gewechselt. Die dialysierte Proteinlösung wurde anschließend mittels einer Vakuumzentrifuge solange eingengt bis das Protein als Feststoff vorlag.

Zur Untersuchung eines Einflusses der angewandten Reinigungsmethode auf die Vernetzbarkeit des Proteins mittels mikrobieller Transglutaminase wurde in einem Kontrollversuch unbehandeltes Caseinat einer Salzsäurefällung unterzogen. Dafür wurde einer Caseinat-

Lösung – 1 g Protein/10 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0) – solange bei 25 °C stufenweise 4 M HCl zugesetzt bis das Protein präzipitierte. Nach Trennung von Überstand und Pellet mittels Zentrifugation (5 min, RT, 3220 g) wurde das präzipitierte Caseinat fünfmal mit Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) gewaschen. Anschließend erfolgte unter Erwärmung (Wasserbad, ~60 °C) die Resolubilisierung des Proteins in 10 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,0). Die enzymatische Vernetzung des Caseinats bei 23 °C erfolgte wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben und wurde mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2) analysiert.

2.3.2 Ermittlung reaktiver Glutamin- und Lysinreste für MTG

Monodansylcadaverin (MDC) und Dansyl-Tryptophan-Glutaminyl-Arginin (Dansyl-WQR) sind fluoreszierende Komponenten, die zum Nachweis reaktiver Glutamin- und Lysinreste im modifizierten Caseinat (vgl. Abschnitt 2.3.1) verwendet wurden. Dabei diente eine kovalente Bindung zwischen Protein und MDC, katalysiert durch die mikrobielle Transglutaminase, zum Nachweis von Lysinresten und Dansyl-WQR von Glutaminresten. Um die Konzentration des Proteins im Reaktionsgemisch gering zu halten, wurde eine Fed-batch-Fahrweise (Zufütterung) gewählt. Ein Reaktionsansatz, dessen Zusammensetzung in Tabelle 2-15 aufgelistet ist, wurde dafür unter Rühren auf 37 °C temperiert. Die Startkonzentrationen betragen 14 mg/mL MTG Activa[®]WM, 575 µM MDC bzw. 534 µM Dansyl-WQR. Zum Lösen der fluoreszierenden Komponenten wurde der Reaktionsansatz mit 20 µL 0,1 M Essigsäure versetzt. Nach der Temperierung wurden in das 2 mL Reaktionsgefäß mit anfänglich 1554 µL mittels einer Mikroliter-Spritze 250 µL/h Caseinat-Lösung (Konzentration: 60 mg/mL) gepumpt. Den kontinuierlichen Zustrom ermöglichte eine Mikroliterpumpe, in der die Spritze eingespannt war. Als Reaktionsstart wurde das Einschalten der Pumpe gewählt. Nach 60 min und Zugabe der Caseinat-Lösung wurde die Pumpe abgeschaltet. Zur vollständigen Reaktion wurde die Inkubationszeit auf 70 min verlängert.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dazu wurden in 10-Minuten-Intervallen (0-70 min) dem Reaktionsansatz Proben entnommen, mit SDS-Probenpuffer auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Die Probenahme 0 min erfolgte vor Reaktionsstart. Die SDS-PAGE-Gele wurden im UV-Licht auf fluoreszierende Banden untersucht und anschließend Coomassie gefärbt. Als Referenzen dienten SDS-PAGE-Proben der verwendeten Enzym- und Caseinat-Lösung, welche analog der Reaktionsproben mit SDS-Probenpuffer behandelt wurden.

Tabelle 2-15: Zusammensetzung des Startreaktionsansatzes zur Bestimmung von reaktiven Glutamin- und Lysinresten für die mikrobielle Transglutaminase (MTG).

	Monodansylcadaverin ($M_w = 335,5 \text{ g/mol}$)	Dansyl-WQR ($M_w = 721,83 \text{ g/mol}$)
Fluoreszierende Komponente	0,3 mg	0,6 mg
0,1 M Essigsäure	20 µL	20 µL
20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0	1450 µL	1450 µL
MTG _{Activa} (Stammlösung: 260 mg/mL)	84 µL	84 µL

Für eine Positivkontrolle zum Nachweis reaktiver Glutaminreste wurde das Protein Dimethylcasein (DMC) eingesetzt. Bei DMC sind alle in der Aminosäuresequenz enthaltenen Lysinreste methyliert, so dass dieses Protein nur als Glutamin-Substrat für die Transglutaminase fungiert. Die Durchführung erfolgte in einem Batch-Prozess. Ein Reaktionsansatz

aus 1,67 mg/mL DMC und 200 μ M MDC – gelöst in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) unter Zugabe von 20 μ L 0,1 M Essigsäure – wurde mit MTG Activa[®]WM (14 mg/mL) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Vor (ohne Enzym) und nach der Inkubation wurde eine Probe dem Reaktionsansatz entnommen, 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2).

2.3.3 Eignung primärer aliphatischer Amine als MTG-Substrate

Ohtsuka *et al.* publizierte im Jahr 2000, dass primäre aliphatische Amine mit einer Kettenlänge bis zu sechs Kohlenstoffatomen als Substrate für die mikrobielle Transglutaminase fungieren [Ohtsuka *et al.*, 2000]. Die Untersuchung der Eignung von Octylamin als MTG-Substrat erfolgte angelehnt an diese Publikation mit einigen Veränderungen. Die Durchführung ist in Abbildung 2-7 dargestellt. Zum Vergleich der Substratspezifitäten wurden Reaktionen mit den bekannten Substraten Butyl- und Hexylamin angefertigt.

Die Reaktionsansätze bestanden aus 10 mM Z-Gln-Gly, 10 mM Amin und 15 mg/mL MTG Activa[®]WM in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 gelöst. Die pH-Werte der Dipeptid- und Amin-Lösungen wurden vor den Reaktionen auf pH 8-9 eingestellt (Z-Gln-Gly: 1 M NaOH; Amin: 0,75 M Essigsäure). Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 240 min.

Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels RP-HPLC (vgl. Abschnitt 2.2.7). Da die Reaktionsansätze mit Octylamin infolge der MTG-Reaktion gelierten und eine Probenahme nach unterschiedlichen Reaktionszeiten nicht möglich war, wurden jeweils die gesamten Ansätze aufgearbeitet. Dafür wurden die Ansätze nach verschiedenen Zeitpunkten mit 900 μ L 1 % Trifluoressigsäure (TFA) und 300 μ L 100 % Acetonitril (ACN) versetzt, zentrifugiert (5 min, RT, 16100 g) und anschließend 200 μ L Überstand in ein HPLC-Fläschchen überführt. Jeder Zeitpunkt repräsentierte einen einzelnen Reaktionsansatz. Die Probe 0 min entsprach einem Ansatz ohne Enzymzugabe. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz ohne Amin, dem 35 μ L Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 8,0) zugesetzt wurde.

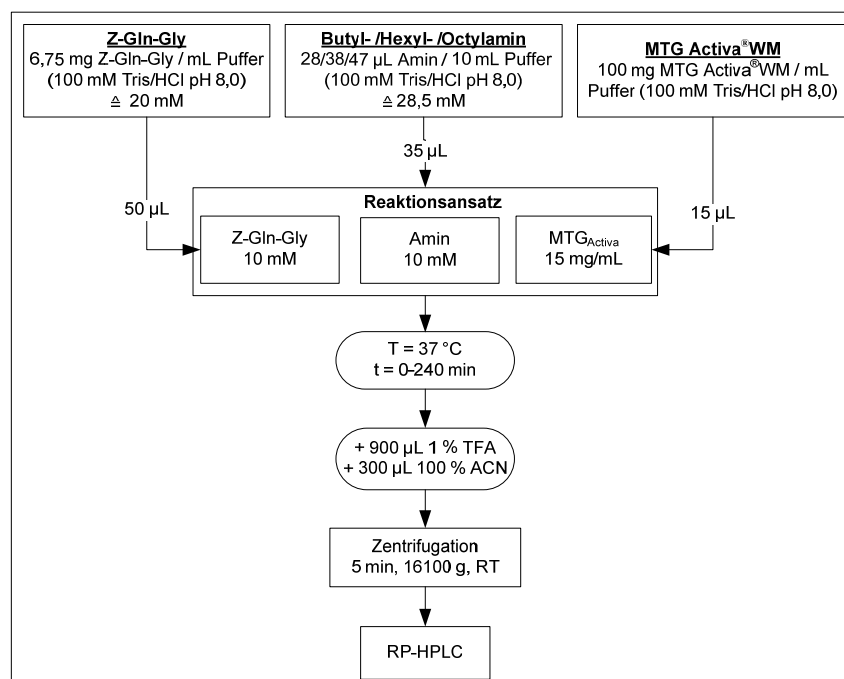


Abbildung 2-7: Durchführung zur Untersuchung der Eignung von Aminen (Butyl-, Hexyl-, Octylamin) als Substrate für die mikrobielle Transglutaminase (MTG Activa[®]WM). ACN...Acetonitril, RT...Raumtemperatur, TFA...Trifluoressigsäure, Z-Gln-Gly...Dipeptid-Glutaminylglycin.

Für die Kalibrierung der Reaktion wurde eine Stammlösung aus 10 mM Z-Gln-Gly und 10 mM Amin (Butyl-, Hexyl- bzw. Octylamin) in 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 angefertigt. Verschiedene Volumina der Stammlösung (250 μ L, 200 μ L, 150 μ L, 100 μ L, 50 μ L, 0 μ L) wurden entnommen, mit Tris/HCl-Puffer (100 mM, pH 8,0) auf 250 μ L aufgefüllt und somit Verdünnungen bekannter Konzentrationen hergestellt. Diese Ansätze wurden jeweils mit 2,25 mL 1 % TFA und 750 μ L 100 % ACN versetzt. Die Trifluoressigsäure bewirkte das Abstoppen der Reaktion. Die Proben wurden analog der Reaktionsansätze zentrifugiert und 200 μ L Überstand für die Analyse in HPLC-Fläschchen überführt.

2.3.4 Modifikation von Caseinat mit Octylamin

Die Durchführung zur kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat mit Octylamin durch enzymatische Vernetzung ist in Abbildung 2-8 dargestellt. Octylamin ist ein primäres aliphatisches Amin mit einer Kohlenstoffkette aus acht C-Atomen. Die Löslichkeit in Wasser ist sehr gering (0,2 g/L). Durch eine Kopplung desamins an das Caseinat könnte die Wasserresistenz des Proteins bzw. Proteinfilms möglicherweise verbessert werden.

Der Reaktionsansatz bestand aus 25 mg/mL NaCas, 32,5 mM Octylamin und 50 mg/mL MTG Activa[®]WM in dH₂O gelöst. Die pH-Werte der Protein- und Amin-Lösung wurden vor der Reaktion auf pH 8-9 eingestellt (Protein: 1 M NaOH, Amin: 0,75 M Essigsäure). Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 23 °C für 120 min. Das Verhältnis zwischen den 65 Glutaminen pro Caseinmolekül und dem Amin betrug 1:2, d.h. ein zweifacher Amin-Überschuss lag vor.

Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, diese 1:12 mit dH₂O verdünnt, im Verhältnis 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Die Probenahme 0 min erfolgte vor der Enzymzugabe. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz ohne Octylamin, dem 250 μ L deionisiertes Wasser zugesetzt wurde.

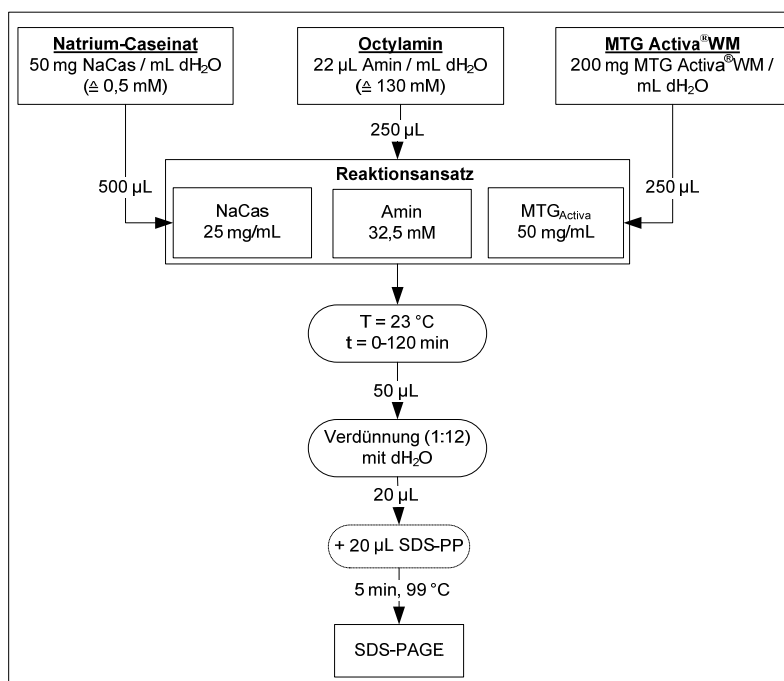


Abbildung 2-8: Durchführung zur Untersuchung der kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat mit Octylamin durch mikrobielle Transglutaminase (MTG Activa[®] WM) bei 23 °C. dH₂O...deionisiertes Wasser, MTG...mikrobielle Transglutaminase, SDS-PP...SDS-Probenpuffer.

Dimethylcasein (DMC) in dessen Aminosäuresequenz alle enthaltenen Lysinreste methyliert sind, so dass dieses Protein nur als Glutamin-Substrat für die Transglutaminase fungiert, wurde ebenfalls der kovalenten Modifikation mit Octylamin unterzogen. Die Durchführung erfolgte analog dem in Abbildung 2-8 dargestellten Fließschema. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz ohne Amin.

2.3.5 Vernetzbarkeit von Proteinen mittels MTG

Verschiedene Proteine wurden auf ihre Vernetzbarkeit mittels mikrobieller Transglutaminase untersucht. Die Durchführung ist in Abbildung 2-9 dargestellt. Wenn nicht anders angegeben, bestand der Reaktionsansatz aus 1,67 mg/mL Protein sowie 13 mg/mL MTG Activa[®]WM in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 und wurde bei 23 °C für 2 h in einem Thermomixer (700 rpm) inkubiert. Die Analyse der Vernetzungsreaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Dafür wurden nach verschiedenen Zeitpunkten 20 µL dem Reaktionsansatz entnommen, mit 20 µL SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Kontrollproben der MTG_{Activa}-Lösung (13 mg/mL) sowie der Proteine wurden ebenfalls angefertigt. Wurde die Vernetzbarkeit eines Proteingemisches untersucht, betrug das dem Reaktionsansatz zugesetzte Proteinvolumen je 0,625 mL und die Konzentration im Ansatz pro Protein 0,825 mg/mL.

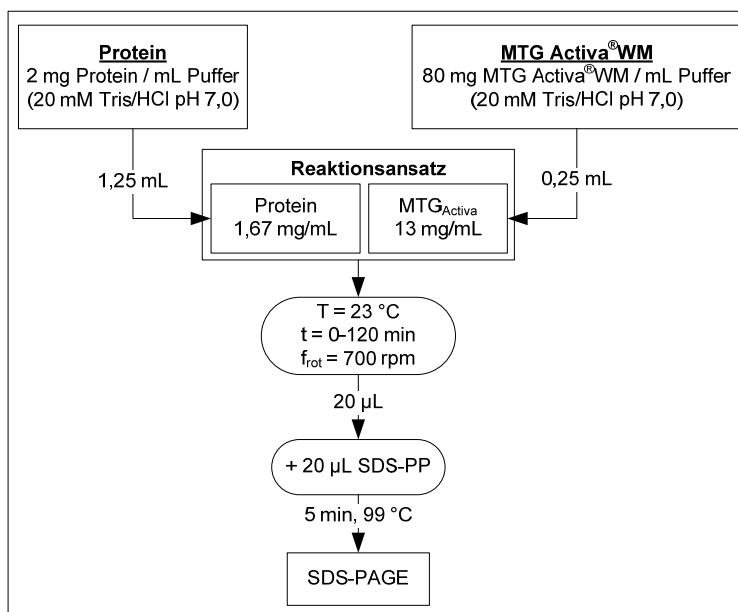


Abbildung 2-9: Durchführung zur Untersuchung der Vernetzbarkeit von Proteinen mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 23 °C. MTG...mikrobielle Transglutaminase, SDS-PP...SDS-Probenpuffer.

2.3.6 Filmherstellung

2.3.6.1 Standardverfahren

Proteinfilme wurden angelehnt an das Verfahren von K. Patzsch mit einigen Modifikationen hergestellt [Patzsch, 2010]. Die Durchführung ist in Abbildung 2-10 dargestellt. Für eine enzymatische Vernetzung (+MTG) wurde MTG Activa[®]WM, die aus 1 % Enzym und 99 % Maltodextrin besteht, eingesetzt. Als Äquivalent für unvernetzte Filme (-MTG) wurde inaktivierte MTG_{Activa}-Lösung verwendet. Dafür wurde das Enzym in Puffer (20 mM Tris/HCl

pH 7,0) gelöst und zweimal mittels einer Mikrowelle zum Kochen (5 min, 99 °C) gebracht. Nach Zentrifugation (2 min, RT, 3220 g), Aktivitätsbestimmung mittels Hydroxamat-Test (vgl. Abschnitt 2.2.1) und Kühlung auf 50 °C wurde das Enzym (inaktiviert) der filmbildenden Lösung zugesetzt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für die Herstellung eines Filmes 3 g Weichmacher in 110,4 mL Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) gelöst, dieses Gemisch zu 6 g Protein (Rohkollagen, Gelatine, Natrium-Caseinat) hinzugefügt und für mindestens 30 min bei RT ohne Rühren quellen gelassen. Bei der Herstellung von Natrium-Caseinat-Filmen erfolgte direkt nach der Einwaage eine Homogenisierung der Proteinlösung bei 90 °C für 30 min. Anschließend wurde die NaCas-Lösung auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Homogenisierung der Gelatine-Lösung bei 40 °C wurde nach der Quellung durchgeführt. Das Rohkollagen konnte in dem Glycerin-Puffer-Gemisch nicht gelöst werden. Es lag nach der Quellung in Form eines heterogenen Stoffgemisches aus einer Flüssigkeit und darin fein verteilten Festkörpern vor (Suspension). Unter Rühren wurde der pH-Wert aller Proteinlösungen/-suspension mittels 1 M NaOH auf pH 7 eingestellt (pH-Indikatorpapier). Danach wurde die filmbildende Lösung/Suspension auf 50 °C erwärmt. 1,5 g MTG Activa[®]WM wurde in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 (50 °C) gelöst und der Proteinlösung/-suspension unter Rühren zugefügt (für unvernetzte Filme wurde 6 mL inaktivierte MTG Activa[®]WM verwendet). Die Lösung/Suspension wurde anschließend in eine PTFE-Form (200 x 200 mm) gegossen und für 24 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Belüftung während der Trocknung wurde durch Ventilatoren gewährleistet. Zur Konditionierung wurden die Proteinfilme in einem Exsikkator bei 23±2 °C und 50±3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) für 48 h gelagert.

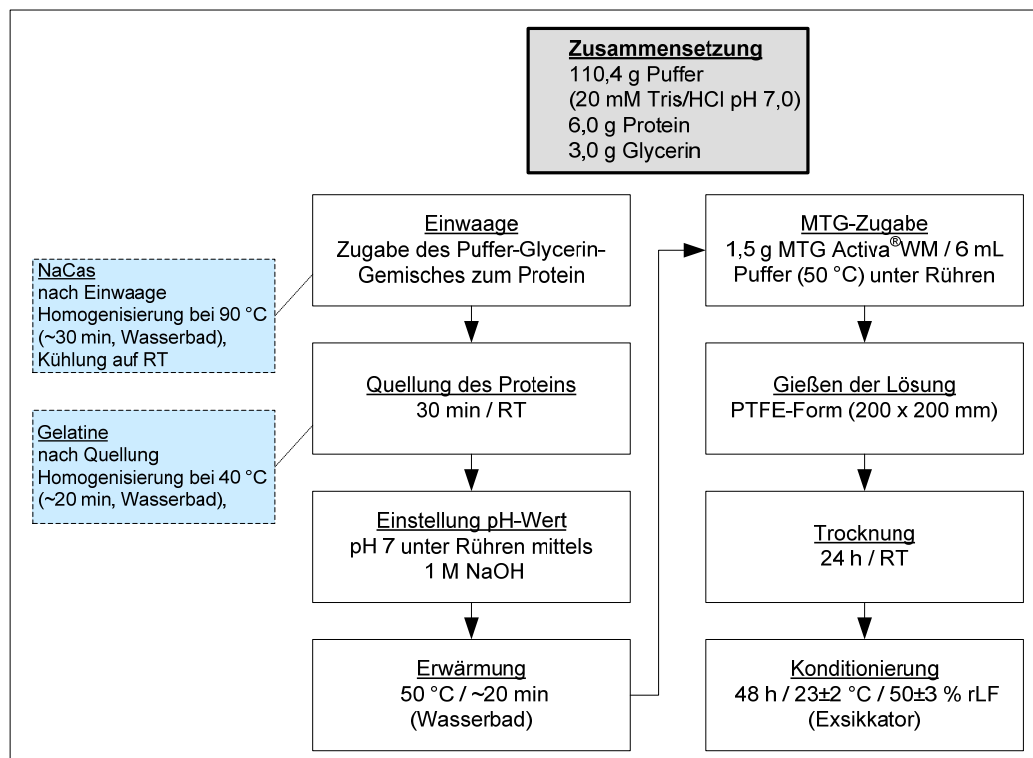


Abbildung 2-10: Fließschema zur Herstellung von Proteinfilmen nach dem Standardverfahren. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

2.3.6.2 Beschichtungsverfahren

Die Herstellung von Proteinfilmen (Rohkollagen, Gelatine) nach dem Beschichtungsverfahren erfolgte analog dem Standardverfahren, außer dass die Zugabe der mikrobiellen Transglutaminase nach dem Gießprozess und der Proteingelierung erfolgte. Nach Quellung des Proteins im Puffer-Glycerin-Gemisch, Homogenisierung, pH-Einstellung und Erwärmung auf 50 °C wurde die filmbildende Lösung/Suspension in eine 200 x 200 mm PTFE-Form gegossen. Nach Gelierung des Proteins für 2 h bei RT wurde der Film mit 100 mL MTG_{Activa}-Lösung (1,5 g MTG Activa[®]WM gelöst in 100 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0) beschichtet. Die Beschichtung unvernetzter Filme wurde mit 1,5 g inaktivierter MTG_{Activa}/100 mL Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) vorgenommen. Die Verteilung der Enzymlösung auf dem Film wurde mittels eines Drigalskispatels durchgeführt. Die Trocknung erfolgte für 24 h bei RT unter Belüftung mittels Ventilatoren. Die Proteinfilme wurden anschließend in einem Exsikkator bei 23±2 °C und 50±3 % rLF (über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung) für 48 h konditioniert.

2.3.6.3 Untersuchungen zu Weichmachertyp und -konzentration

Proteinfilme wurden wie in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben hergestellt. Als Weichmacher wurden Glycerin und Harnstoff eingesetzt. Die Weichmacherkonzentration wurde im Verhältnis zum Protein variiert (0, 25, 50, 75, 100 % (w/w Protein)). Die Zugeigenschaften der Proteinfilme wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben gemessen. Unplastifizierte Filme (0 % (w/w Protein)) wurden außerdem hinsichtlich der Wasserlöslichkeit, Benetzbarkeit, Witterungsbeständigkeit und Bioabbaubarkeit charakterisiert (vgl. Abschnitte 2.2.4 - 2.2.6).

2.3.6.4 Untersuchungen zur Enzympräparation und -konzentration

Proteinfilme ohne Weichmacher wurden wie in Abschnitt 2.3.6.1 bzw. 2.3.6.2 beschrieben hergestellt. Dabei wurde die Enzymkonzentration von 0-50 U/g_{Protein} variiert. Neben der kommerziell erhältlichen MTG-Präparation (MTG Activa[®]WM) wurde eine genetisch optimierte, rekombinante mikrobielle Transglutaminase (MTG S2P) als Vernetzungsmittel verwendet. Die eingesetzten Mengen an MTG Activa[®]WM (Aktivität laut Hersteller: 100 U/g) und MTG S2P (ermittelte Aktivität: 800 U/mL) sind in der Tabelle 2-16 zusammengefasst.

Tabelle 2-16: Übersicht der verwendeten Enzymkonzentrationen und -mengen in Proteinfilmen. Aktivitäten der Transglutaminasen laut Hersteller bzw. mittels Hydroxamat-Test ermittelt: 100 U/g (MTG Activa[®]WM), 800 U/mL (MTG S2P). MTG...mikrobielle Transglutaminase.

MTG-Konzentration [U/g _{Protein}]	Eingesetzte Menge an MTG Activa [®] WM [g]	Eingesetzte Menge an MTG S2P [µL]
0	0	0
6,25	0,375	47
12,5	0,75	94
25	1,5	188
50	3,0	375

Filme ohne Vernetzung, als Äquivalent zu MTG_{Activa}-vernetzten Filmen, wurden mit inaktivierter MTG Activa[®]WM versetzt. Die Enzymlösungen, in angegebenen Konzentrationen, wurden zur Inaktivierung für 5 min bei 99 °C inkubiert. 6 mL vorgewärmter 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 (50 °C) wurden der filmbildenden Proteinlösung/-suspension mit einer

MTG-Konzentration von $0 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ zugefügt. Die Proteinfilme wurden hinsichtlich der Zugeigenschaften, Wasserlöslichkeit, Witterungsbeständigkeit, Benetzbarkeit und Bioabbaubarkeit, wie in den Abschnitten 2.2.3 bis 2.2.6 beschrieben, charakterisiert.

2.3.7 Fettextraktion

Das für die Filmherstellung eingesetzte Protein Rohkollagen verfügt laut Hersteller (Acontex GmbH, Rheda-Wiedenbrück) über einen Fettanteil von 18,6 %. Um eine Weichmachereffizienz des Fettes auf die Filmeigenschaften zu untersuchen, wurde das Protein einer Fettextraktion unterzogen. Die Extraktion erfolgte mit Hilfe einer Soxhlet-Apparatur, bestehend aus einem Rundkolben, einem Soxhlet-Aufsatz mit Extraktionshülse und einem Rückflusskühler. Im Rundkolben befand sich das Lösungsmittel Hexan und in der Hülse der zu extrahierende Feststoff (40 g Rohkollagen). Eine Soxhlet-Apparatur ermöglicht eine kontinuierliche Extraktion. Zuerst wurde das Lösungsmittel im Kolben bis zum Sieden erhitzt. Dessen Dämpfe stiegen durch das Dampfrohr des Aufsatzes auf und kondensierten im Kühler. Das Lösungsmittel tropfte in die Extraktionshülse – einseitig offene Zelloseröhre – und löste das Fett aus dem Rohkollagen. Der Soxhlet-Aufsatz mit Hülse wurde solange mit Flüssigkeit gefüllt, bis die durch ein Steigrohr vorgegebene Höhe erreicht wurde. Durch eine auftretende Saugheberwirkung wurde der Aufsatz schlagartig entleert und das Lösungsmittel mit Extrakt zurück in den Kolben gefördert. Durch kontinuierliches Sieden des Hexans wurde der Extraktionszyklus wiederholt. Insgesamt erfolgte die Extraktion über sechs Stunden.

Das in der Extraktionshülse befindliche Protein konnte zurückgewonnen und getrocknet werden. Durch Verdampfung des Hexans mittels Rotationsverdampfer (50 °C, 250 mbar) wurde das Lösungsmittel eingeengt. Als Rückstand verblieb im Kolben das extrahierte Fett. Das aus der Extraktion gewonnene Rohkollagen wurde für die Filmherstellung, wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, eingesetzt. Die Filme wurden hinsichtlich der mechanischen Eigenschaften, Wasserlöslichkeit und Benetzbarkeit (vgl. Abschnitte 2.2.3 - 2.2.5) charakterisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Kovalente Modifikation von Caseinat

3.1.1 Modifikation mit Dichlortriazin-Reaktivfarbstoff

Zur Optimierung der Eigenschaften von Proteinfilmen ist ein besseres Verständnis der Vorgänge innerhalb des Proteinnetzwerkes wünschenswert. Eine sichtbare Markierung einzelner Ausgangsmaterialien im hergestellten Proteinfilm wäre von Vorteil. Durch eine Färbung des Proteins könnte dieses und mögliche Phasentrennungen im Film lokalisiert werden. Aus diesem Grund sollte im Rahmen der Arbeit versucht werden, Natrium-Caseinat mittels eines Reaktivfarbstoffes kovalent zu modifizieren. Dichlortriazinfarbstoffe enthalten zwei Chloratome, über die durch nukleophile Substitution primäre Aminogruppen von Proteinen oder Hydroxylgruppen von Zellulosefasern kovalent gebunden werden können [Zollinger, 1961]. Die Substitutionen erfolgen schrittweise und sind stark pH- und temperaturabhängig.

3.1.1.1 Voruntersuchung

Der optimale Wirkungsbereich für Dichlortriazinfarbstoffe liegt zwischen 20-60 °C und einem neutralen bis alkalischen pH-Wert. Die Untersuchung zur Modifikation von Natrium-Caseinat mit Procion Red MX-5B wurde wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Dafür wurde Caseinat mit Farbstoff, beide Substanzen gelöst in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 8, versetzt und bei 25 °C für 2 h inkubiert. Das Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis während der Reaktion betrug 1:10. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

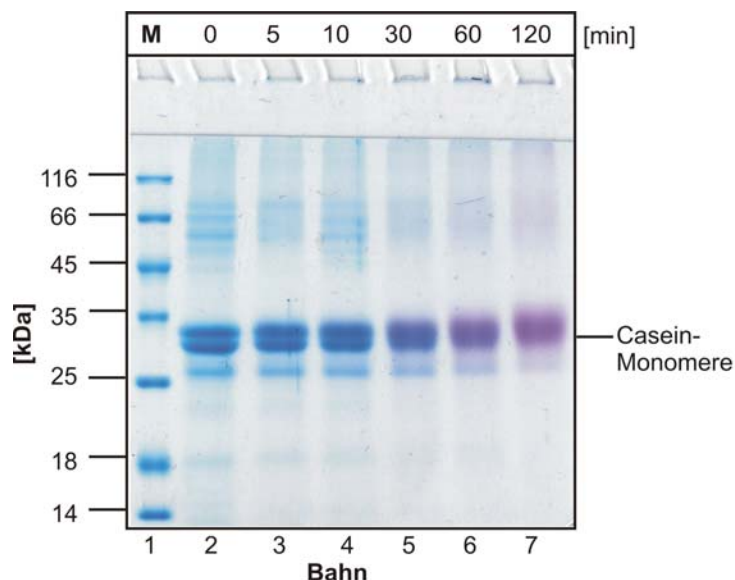


Abbildung 3-1: SDS-PAGE-Gel (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat mittels Dichlortriazinfarbstoff (Procion Red MX-5B) bei 25 °C, pH 8,0 und Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis 1:10. NaCas (Endkonzentration 0,88 mg/mL) wurde mit Procion Red MX-5B (Endkonzentration 5,75 mM), beides in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 8 gelöst, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 25 °C im Thermomixer (400 rpm) inkubiert. Probenahme erfolgte nach 0, 5, 10, 30, 60 und 120 min. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. M...Molekulargewichtsmarker, 0-120...Reaktionszeit in Minuten.

In Bahn 2 sind die Casein-Monomere mit einem Molekulargewicht von 25-32 kDa sichtbar. Mit Reaktionsverlauf (Bahn 3 bis 7) nahm die molare Masse des Proteins leicht zu und die Färbung der Proteinbande wechselte von Blau auf Rot. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (25 °C, pH 8, 1:10) hatte demzufolge eine kovalente Modifikation des Caseinats durch Farbstoffmoleküle stattgefunden. Das entstandene Produkt (Bahn 7) war nicht als eine klare Proteinbande, sondern als Bande die sich über einen größeren Molekulargewichtsbereich erstreckte, erkennbar. Weiterhin ist festzustellen, dass die Modifikation des Caseinats trotz des hohen Farbstoffüberschusses relativ langsam verlief. Erst nach 30 min Reaktionszeit wurde die farbliche Änderung und die Molekulargewichtszunahme des Proteins sichtbar – Resultate der kovalenten Modifikation die sich mit dem Zeitverlauf verstärkten. Die Rotfärbung der Caseinat-Bande war bereits während der Elektrophorese auf dem SDS-PAGE-Gel ersichtlich.

3.1.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Um die Modifikation des Caseinats mittels Procion Red MX-5B zu verbessern und die Anzahl gekoppelter Farbstoffmoleküle zu erhöhen, wurden weitere Reaktionsbedingungen untersucht. In zwei Versuchsreihen wurden der pH-Wert bzw. das Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis des Reaktionsansatzes variiert, wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-2 (A: Variation pH-Wert; B: Variation Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis) dargestellt.

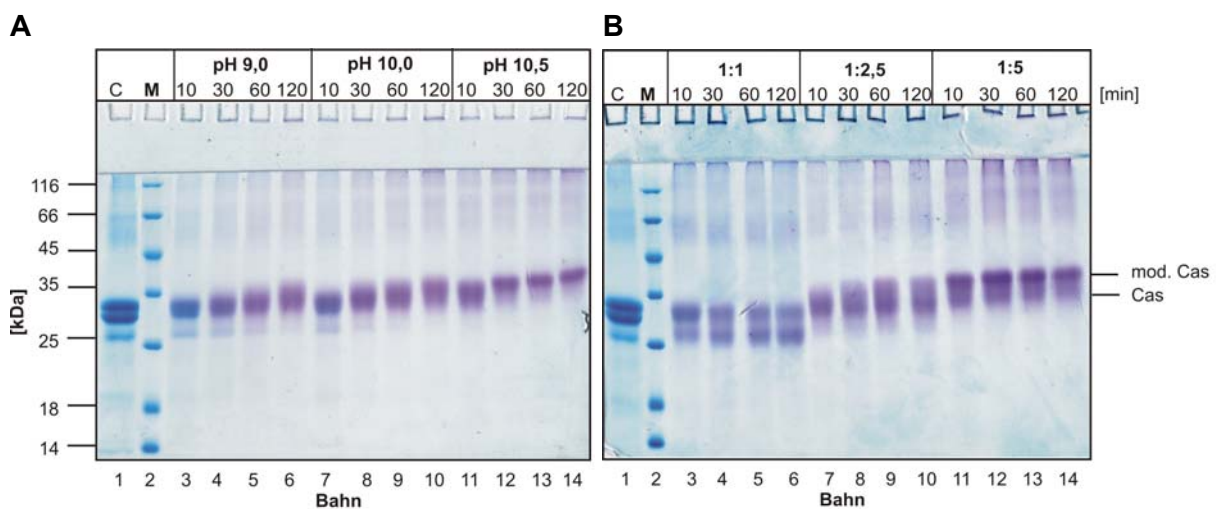


Abbildung 3-2: SDS-PAGE-Gele (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat mittels Dichlortriazinfarbstoff (Procion Red MX-5B) bei 25 °C. A: Variation pH-Wert (pH 9,0/ 10,0/ 10,5), Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis 1:10. NaCas (Endkonzentration 0,88 mg/mL) wurde mit Procion Red MX-5B (Endkonzentration 5,75 mM), beides in Na-Phosphatpuffer (50 mM; pH 9,0/ 10,0/ 10,5) gelöst, versetzt. **B: Variation Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis (1:1/ 1:2,5/ 1:5), pH 10,5.** NaCas (Endkonzentration 0,88 mg/mL) wurde mit Procion Red MX-5B (Endkonzentration 0,654/ 1,38/ 2,42 mM), beides in 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 10,5 gelöst, versetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei 25 °C im Thermomixer (400 rpm) inkubiert. Probenahme erfolgte vor Farbstoffzugabe bzw. nach 10, 30, 60 und 120 min. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. C...Natrium-Caseinat, M...Molekulargewichtsmarker, 10-120...Reaktionszeit in Minuten.

Anhand Abbildung 3-2 A wird erkennbar, dass der pH-Wert des Reaktionsansatzes wie erwartet einen Einfluss auf die Modifikation des Caseinats hatte. Je alkalischer der pH-Wert des 50 mM Natrium-Phosphatpuffers war, desto schneller verlief die Färbereaktion des Caseinats. Nach 10 min Reaktion wies die Proteinbande bei pH 9,0 eine Blaufärbung auf

(Bahn 3). Bei pH 10,5 waren bereits nach 10 min eine Rotfärbung und eine Molekulargewichtszunahme der Caseinat-Bande erkennbar (Bahn 11). Eine stetige Zunahme des Molekulargewichtes sowie Rotfärbung des Proteins über die Zeit konnten bei allen pH-Werten detektiert werden. Die Schärfe der Produktbande war ebenfalls pH-Wert-abhängig. Bei $\text{pH} \leq 10,0$ war eine breite Proteinbande, die sich über einen größeren Molekulargewichtsbereich erstreckte, erkennbar. Das Reaktionsprodukt bei pH 10,5 (Bahn 14) konnte indes als klare Bande mit einem Molekulargewicht von 36-38 kDa detektiert werden. Ausgehend von einer Molmasse des Caseinats von 30 kDa entspricht diese Zunahme um 6-8 kDa einer Kopplung von 10-14 Farbstoffmolekülen ($M_w=615,34 \text{ g/mol}$). Maximal wären pro Caseinat-Molekül 62 Lysinreste zur Modifizierung verfügbar gewesen. Das $\text{Protein}_{\text{Lys}}:\text{Farbstoff}$ -Verhältnis während der Untersuchungen betrug 1:10.

In Abbildung 3-2 B ist der Einfluss des $\text{Protein}_{\text{Lys}}:\text{Farbstoff}$ -Verhältnisses auf die kovalente Modifikation von Caseinat mittels Reaktivfarbstoff dargestellt. Der pH-Wert des Natrium-Phosphatpuffers betrug 10,5. Ein Verhältnis von 1:1, d.h. die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes konnte mit einem Farbstoffmolekül reagieren, führte nicht zur Vergrößerung des Molekulargewichtes. Lediglich die leichte Rotfärbung der Proteinbanden (Bahn 3-6) ließ auf eine Kopplung mit einer geringen Anzahl an Farbstoffmolekülen schließen. Die Rotfärbung der Proteinbanden sowie die Molekulargewichtszunahme verstärkten sich mit steigendem $\text{Protein}_{\text{Lys}}:\text{Farbstoff}$ -Verhältnis. Ein Verhältnis von 1:5 war allerdings notwendig, um nach 120 min Reaktion eine eindeutige Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 36-38 kDa detektieren zu können (Abbildung 3-2 B, Bahn 14).

Für eine erfolgreiche kovalente Modifikation von Caseinat mittels Procion Red MX-5B – Kopplung von 10-14 Farbstoffmolekülen – wurden $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 10,5 und ein $\text{Protein}_{\text{Lys}}:\text{Farbstoff}$ -Verhältnis $\geq 1:5$ als optimale Reaktionsbedingungen ermittelt.

3.1.1.3 Behandlung mit Butylamin und Gewinnung des modifizierten Proteins

Für die kovalente Modifikation von Natrium-Caseinat mittels Procion Red MX-5B war ein Farbstoffüberschuss notwendig. Um eine spätere Reaktion des Farbstoffes mit Proteinen zu vermeiden, wurde die Substitution restlicher Chloratome unvermeidbar. Primäre Amine, die über eine NH_2 -Gruppe verfügen, können unter geeigneten Bedingungen eine Substitution der Chloratome bewirken und kovalent an den Farbstoff binden. Die Behandlung der Caseinat-Farbstoff-Lösung mit Butylamin erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben. Nach Zugabe des Amins zur Protein-Farbstoff-Lösung wurde der Ansatz für 4 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Ein Farbstoff-Butylamin-Verhältnis von 1:25 lag über den gesamten Zeitraum vor. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-3 A dargestellt.

Das Produkt der Caseinat-Farbstoff-Reaktion wurde durch die Butylamin-Behandlung nicht beeinträchtigt. Die Proteinbande des modifizierten Caseinats ($M_w \sim 36\text{-}38 \text{ kDa}$) war über 240 min in gleicher Intensität und im gleichen Molekulargewichtsbereich erkennbar. Hochmolekulare Produkte, aufgrund Vernetzung mehrerer Caseinat-Moleküle mittels Farbstoff, wurden unter den gewählten Bedingungen nicht gebildet. Ob durch die Behandlung, trotz des starken Amin-Überschusses, eine vollständige Substitution der Chloratome am Farbstoff erfolgte, wurde nicht analysiert.

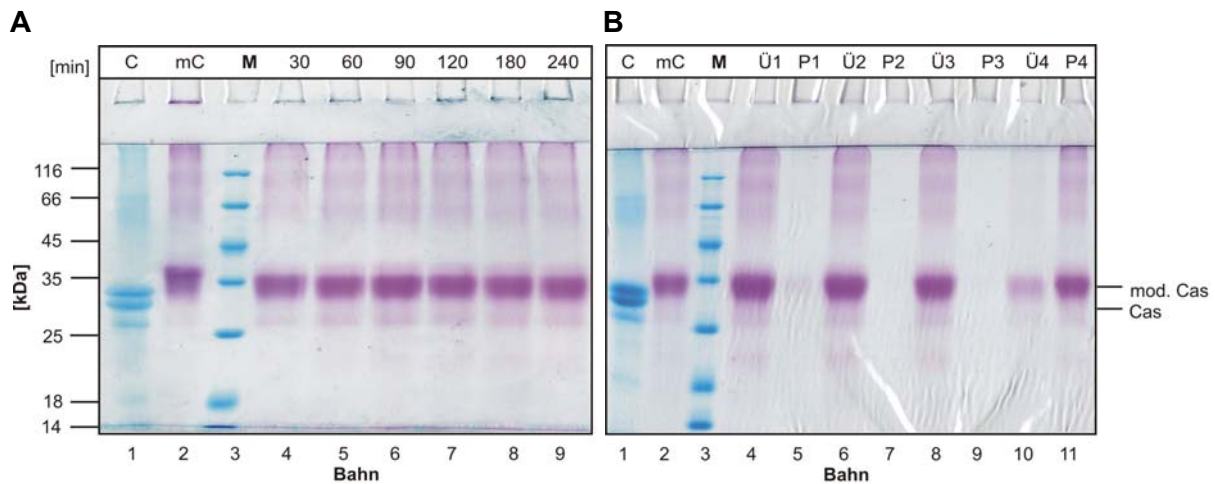


Abbildung 3-3: SDS-PAGE-Gele (Coomassie-Färbung) A: Zeitlicher Verlauf der Behandlung der Caseinat-Farbstoff-Lösung mit Butylamin bei 30 °C. NaCas-Farbstoff-Lösung wurde mit Butylamin versetzt und im Thermomixer (600 rpm) für 4 h bei 30 °C inkubiert. Das Farbstoff-Butylamin-Verhältnis im Reaktionsansatz betrug 1:25. Probenahme erfolgte vor Aminzugabe bzw. nach 30, 60, 90, 120, 180 und 240 min. Alle Proben wurden mit dH₂O auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt und 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt. **B: Stufenweise Fällung des modifizierten Caseinats mittels Salzsäure bei 25 °C.** NaCas-Farbstoff-Butylamin-Gemisch wurde stufenweise 4 M HCl zugesetzt – bis Protein bei etwa 12,5 % Säure präzipitierte. Zentrifugation (5 min, RT, 3220 g) und Trennung Überstand/Pellet nach jeder Stufe. Proben der Überstände und Pellets (resolubilisiert in dH₂O) mit dH₂O auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt und 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt. C...Natrium-Caseinat, mC...modifiziertes Natrium-Caseinat, M...Molekulargewichtsmarker, P...Pellet, Ü...Überstand, 30-240...Reaktionszeit in Minuten.

Für eine Anwendung des modifizierten Caseinats bei der Filmherstellung war eine Gewinnung des Caseinats aus dem Reaktionsgemisch erforderlich. Die Gewinnung erfolgte durch Fällung des Proteins aus der Lösung, Dialyse und Verdampfung des Lösungsmittels, wie in Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben. Ungebundener Farbstoff, der im hohen Überschuss vorlag, sollte durch diese Schritte vom Protein abgetrennt werden. Das Ergebnis der stufenweisen Salzsäurefällung ist in Abbildung 3-3 B dargestellt.

Das modifizierte Caseinat wurde bis zur dritten Fällungsstufe – etwa 7,5 % Säure – im Überstand analysiert (Bahn 4, 6, 8). In den resolubilisierten Pellets (Bahn 5, 7, 9) konnten keine Proteinbanden detektiert werden. Das bis zu dieser Fällungsstufe zugesetzte Salzsäurevolumen war somit nicht ausreichend, um das Protein aus der Lösung zu fällen. Durch eine weitere Säurezugabe wurde ein Großteil des Caseinats aus dem Lösungsmittel gefällt – bei etwa 12,5 % Säure (P4, Bahn 11). Dieses Material war zähflüssig und rot gefärbt. Durch eine 24-stündige Dialyse des resolubilisierten Caseinats konnten Salze und ein Teil des ungebundenen, präzipitierten Farbstoffes abgetrennt werden. Zur Gewinnung des modifizierten Caseinats als Feststoff wurde anschließend das Lösungsmittel mittels einer Vakuumzentrifuge eingengt.

3.1.1.4 Vernetzbarkeit von modifiziertem Caseinat mittels MTG

Eine enzymatisch katalysierte Vernetzung des modifizierten Caseinats bzw. dessen Einbau in ein Proteinnetzwerk setzen voraus, dass das Protein ein Substrat für die MTG darstellt, d.h. Verfügbarkeit reaktiver, proteingebundener Glutamin- und/oder Lysinreste. Allerdings wäre von Vorteil, wenn das gefärbte Caseinat nur über reaktive Glutamine verfügte und die Lysine durch z.B. Farbstoffmoleküle abgesättigt wären. Solch ein Protein kann durch die mikrobielle Transglutaminase nicht vernetzt werden. In Kombination mit einem

unbehandelten Protein wäre ein irreversibler Einbau des modifizierten Caseinats in dessen Netzwerk möglich.

Die Vernetzbarkeit des modifizierten Caseinats mittels MTG_{Activa} wurde wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben bei 23 °C durchgeführt. Als Referenzen wurden die Polymerisationen eines unbehandelten Natrium-Caseinats sowie Gemisches beider Caseinat-Präparationen mittels SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-4 dargestellt.

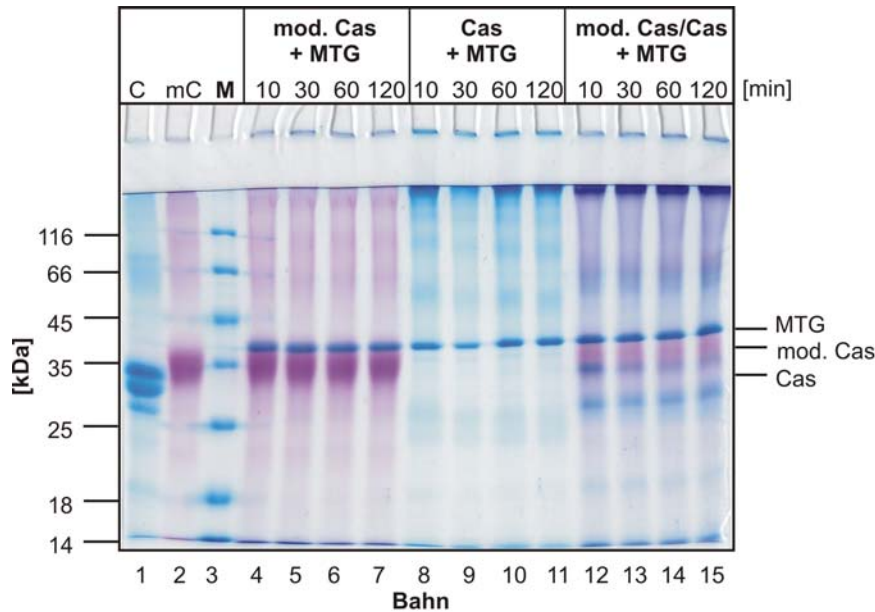


Abbildung 3-4: SDS-PAGE-Gel (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der Vernetzungsreaktionen von unbehandeltem Natrium-Caseinat, modifiziertem Natrium-Caseinat und einem Gemisch beider Proteine mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 23 °C. NaCas (Endkonzentration 1,67 mg/mL), modifiziertes NaCas (Endkonzentration 1,67 mg/mL) oder Caseinat/modifiziertes Caseinat-Gemisch (Endkonzentration pro Protein 0,835 mg/mL) wurde mit MTG Activa[®]WM (Endkonzentration 13 mg/mL) versetzt. Die Reaktionsansätze wurden bei 23 °C im Thermomixer (700 rpm) inkubiert. Probenahme erfolgte vor Enzymzugabe bzw. nach 10, 30, 60 und 120 min. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. C...Natrium-Caseinat, mC...modifiziertes Natrium-Caseinat, M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, 10-120...Reaktionszeit in Minuten.

In Bahn 1 sind die Monomere des unbehandelten Caseinats ($M_w \sim 25-32$ kDa) sichtbar. Diese waren bereits nach 10-minütiger MTG_{Activa}-Reaktion vollständig vernetzt. Es entstanden Polymere mit einem $M_w > 116$ kDa, die nicht ins Trenngel eindringen konnten (Bahn 8-11). Die Bande der mikrobiellen Transglutaminase mit einem Molekulargewicht von 38 kDa war über den gesamten Zeitraum erkennbar. Beim modifizierten Caseinat (Bahn 4-7) konnte keine Abnahme der Bandenintensität bzw. die Bildung eines hochmolekularen Produktes detektiert werden. Eine enzymatische Vernetzung hatte unter den gewählten Bedingungen nicht stattgefunden. In Bahn 12-15 ist die Vernetzungsreaktion eines Gemisches aus reinem und modifiziertem Caseinat mittels MTG dargestellt. Nach Enzymzugabe wurde eine Vernetzung detektiert, an welcher vorrangig das unbehandelte Caseinat beteiligt war. Die Konzentrationen der beiden größten Casein-Monomere nahmen ab und es entstanden Polymere deren Molekulargewichte zu groß für das Passieren des Trenngels waren. Die Bandenintensität der kleinsten Untereinheit des reinen Proteins blieb indes über 120 min konstant bzw. verringerte sich für das modifizierte Caseinat geringfügig. Aus der Intensitätsabnahme der modifizierten Caseinat-Bande und der violetten Färbung der Polymerbande wurde eine Vernetzung zwischen den beiden Caseinat-Präparationen geschlussfolgert, allerdings nur in

einem geringen Umfang. Zudem beeinträchtigte die Zugabe des modifizierten Caseinats die Polymerisation des unbehandelten Proteins. Während reines Caseinat allein bereits nach 10 min MTG-Reaktion vollständig polymerisiert war (Bahn 8), verlief die Reaktion in Gegenwart des gefärbten Caseinats langsamer und unvollständig. Die Zunahme der Molekulargewichte der Proteinbanden in Bahn 15 sind einem Randeffect des Gels geschuldet und nicht auf eine Vernetzung zurückzuführen.

3.1.1.5 Nachweis reaktiver Glutamine und Lysine

Für eine Vernetzung mittels mikrobieller Transglutaminase benötigen Proteine Glutamin- und Lysinreste, die dem Enzym zugänglich sind. Da das modifizierte Natrium-Caseinat durch die MTG nur geringfügig vernetzt werden konnte (vgl. Abschnitt 3.1.1.4), sollte das Protein auf seine Eignung als Enzymsubstrat geprüft werden. Der Nachweis erfolgte durch den Einbau der fluoreszierenden TG-Substrate Monodansylcadaverin (MDC) bzw. Dansyl-Tryptophan-Glutaminyl-Arginin (Dansyl-WQR). Dabei diente MDC als Lysinkomponente und Dansyl-WQR als Glutaminkomponente. Die Untersuchungen wurden wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, in einer Fed-batch-Fahrweise bei 37 °C für 70 min durchgeführt. Dafür wurde einem Reaktionsansatz aus MTG_{Activa}-Lösung und fluoreszierender Komponente kontinuierlich Caseinat-Lösung zu dosiert. Diese Zufütterung gewährte über den gesamten Reaktionszeitraum einen Konzentrationsüberschuss an MDC bzw. Dansyl-WQR im Vergleich zum Protein und ermöglichte damit eine Absättigung aller reaktiven Gruppen mit Fluoreszenzmarker. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden SDS-PAGE-Gele angefertigt. Diese wurden nach Beobachtung im UV-Licht mittels Coomassie gefärbt. Dimethylcasein (DMC), ein Protein dessen Lysine methyliert sind und das deshalb nicht mit sich selbst vernetzt werden kann, wurde als Positivkontrolle zum Nachweis reaktiver Glutamine verwendet. Die Ergebnisse zum Nachweis reaktiver Glutamine sind in Abbildung 3-5 (A: modifiziertes Caseinat; B: Dimethylcasein) dargestellt.

Das Coomassie-gefärbte Gel (Abbildung 3-5 A, Bahn 1-11) zeigte über den gesamten Reaktionsverlauf keine Intensitätsänderung der modifizierten Caseinat-Bande. Ein hochmolekulares Produkt aufgrund enzymatischer Vernetzung des Proteins wurde nicht gebildet. Die Intensität der MTG_{Activa}-Bande ($M_w \sim 38$ kDa) verringerte sich mit steigendem Zeitverlauf. Diese Abnahme war der sinkenden Konzentration aufgrund der Zufütterung geschuldet. Die Fluoreszenz-Aufnahme (Abbildung 3-5 A, Bahn 12-20) wies keine fluoreszierende Bande auf, welche im Molekulargewichtsbereich des modifizierten Proteins lag. Die sichtbare Bande (Bahnen 12-17) spiegelte den Farbstoff, der das Gel ohne Bindung passierte wieder. Aufgrund der fehlenden Markierung konnte das modifizierte Caseinat unter den gewählten Bedingungen nicht als reaktives Glutamin-Substrat für die mikrobielle Transglutaminase bestimmt werden. Der Einbau von Monodansylcadaverin in Dimethylcasein mittels MTG_{Activa} als Positivkontrolle war erfolgreich (Abbildung 3-5 B). Nach 10 min Reaktion wurde eine fluoreszierende Proteinbande mit dem Molekulargewicht von DMC detektiert (Bahn 5). DMC wurde somit als Glutamin-Substrat identifiziert.

Für den Einbau von Dansyl-WQR zum Nachweis reaktiver Lysinreste im modifizierten Caseinat konnte das gleiche Ergebnis ermittelt werden (Abbildung 3-6). Die Proteinbande zeigte keine Fluoreszenzmarkierung, lediglich der das Gel ohne Bindung passierende Farbstoff wurde detektiert. Das modifizierte Caseinat konnte ebenfalls nicht als reaktives Lysin-Substrat für die MTG identifiziert werden.

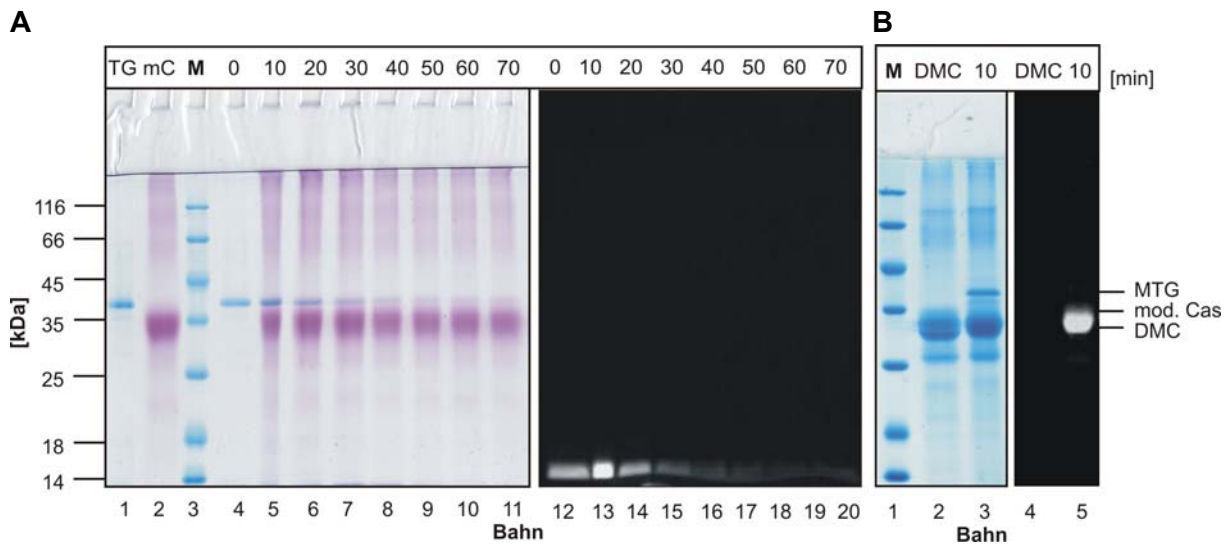


Abbildung 3-5: SDS-PAGE-Gele Nachweis reaktiver Glutamine im modifizierten Natrium-Caseinat bzw. Dimethylcasein (Positivkontrolle) durch Einbau von Monodansylcadaverin (MDC) mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 37 °C. A: modifiziertes Na-Caseinat (Bahn 1-11 Coomassie-Färbung, Bahn 12-20 Fluoreszenz-Aufnahme). Reaktionsansatz aus MDC (575 µM) und MTG Activa[®]WM (14 mg/mL), beides in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst, wurde innerhalb 1 h kontinuierlich 250 µL Caseinat-Lösung (60 mg/mL) zu dosiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Probenahme erfolgte vor Zugabe des Caseinats sowie nach 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 min. Alle Proben wurden mit SDS-Probenpuffer auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt. **B: Dimethylcasein (Bahn 1-3 Coomassie-Färbung, Bahn 4-5 Fluoreszenz-Aufnahme).** Reaktionsansatz aus DMC (Endkonzentration 1,67 mg/mL), MDC (Endkonzentration 200 µM) und MTG Activa[®]WM (Endkonzentration 14 mg/mL), alles in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst, wurde bei 37 °C für 10 min inkubiert. Probenahme erfolgte vor (ohne MTG) und nach Inkubation. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. Nach der Elektrophorese wurden beide Gele mittels UV-Licht auf fluoreszierende Banden analysiert und anschließend Coomassie gefärbt. DMC...Dimethylcasein, MDC...Monodansylcadaverin, M...Molekulargewichtsmarker, mC...modifiziertes Caseinat, MTG...mikrobielle Transglutaminase, 0-70...Reaktionszeit in Minuten.

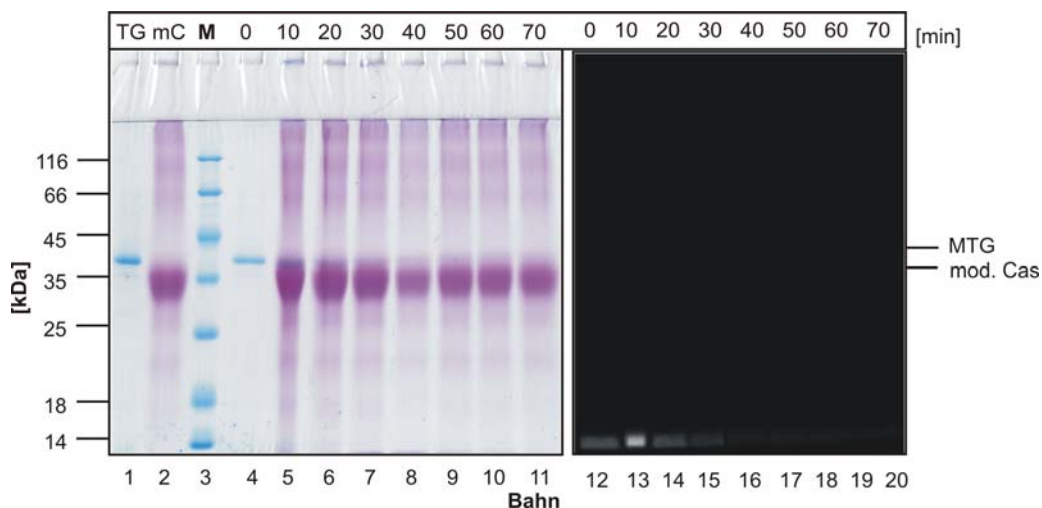


Abbildung 3-6: SDS-PAGE-Gel Nachweis reaktiver Lysine im modifizierten Natrium-Caseinat durch Einbau von Dansyl-WQR mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 37 °C (Bahn 1-11 Coomassie-Färbung, Bahn 12-20 Fluoreszenz-Aufnahme). Reaktionsansatz aus Dansyl-WQR (534 µM) und MTG Activa[®]WM (14 mg/mL), beides in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst, wurde innerhalb 1 h kontinuierlich 250 µL Caseinat-Lösung (60 mg/mL) zu dosiert. Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Probenahme erfolgte vor Zugabe des Caseinats sowie nach 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 min. Alle Proben wurden mit SDS-Probenpuffer auf 1 mg/mL Proteinkonzentration verdünnt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mittels UV-Licht auf fluoreszierende Banden analysiert und anschließend Coomassie gefärbt. M...Molekulargewichtsmarker, mC...modifiziertes Caseinat, MTG...mikrobielle Transglutaminase, 0-70...Reaktionszeit in Minuten.

Beide, für die MTG-Reaktion notwendigen Aminosäuren Glutamin und Lysin konnten in dem, mittels Dichlortriazinfarbstoff kovalent modifizierten Caseinat nicht nachgewiesen werden. Eine enzymatisch katalysierte Vernetzung bzw. Einbau des gefärbten Caseinats in ein Netzwerk aus unbehandeltem Protein zur Erlangung von Kenntnissen über Vorgänge im Proteinnetzwerk und die Filmstruktur war folglich nicht möglich. Offensichtlich verhinderte der an Lysine gebundene rote Farbstoff die Erkennung des Proteins als MTG-Substrat. Eine gemutmaßte Deamidierung der Glutamine durch die bei der Reinigung des modifizierten Caseinats angewandte Salzsäurefällung konnte mittels eines Kontrollversuches widerlegt werden. Die Durchführung des Versuches erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben. Dafür wurde reines Caseinat mittels 4 M HCl aus der Lösung gefällt und anschließend das in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) resolubilisierte Protein auf seine MTG-Vernetzbarkeit untersucht. Als Referenz wurde die Polymerisation von Caseinat ohne Säurefällung mittels SDS-PAGE analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 dargestellt.

In Bahn 2 und 8 sind die Monomere beider Caseinat-Präparationen ($M_w \sim 25-32$ kDa) erkennbar. Bereits eine Minute nach der MTG_{Activa}-Zugabe wurde eine Verringerung der Bandenintensitäten und die Bildung eines hochmolekularen Produktes ($M_w > 116$ kDa) detektiert. Nach 10 min Reaktionszeit waren beide Caseinate – ohne und mit Säurefällung – vollständig vernetzt. Das bedeutet, dass säuregefällte Protein wurde durch die HCl nicht deamidiert und stellt ein Substrat für die mikrobielle Transglutaminase ($M_w \sim 38$ kDa) dar.

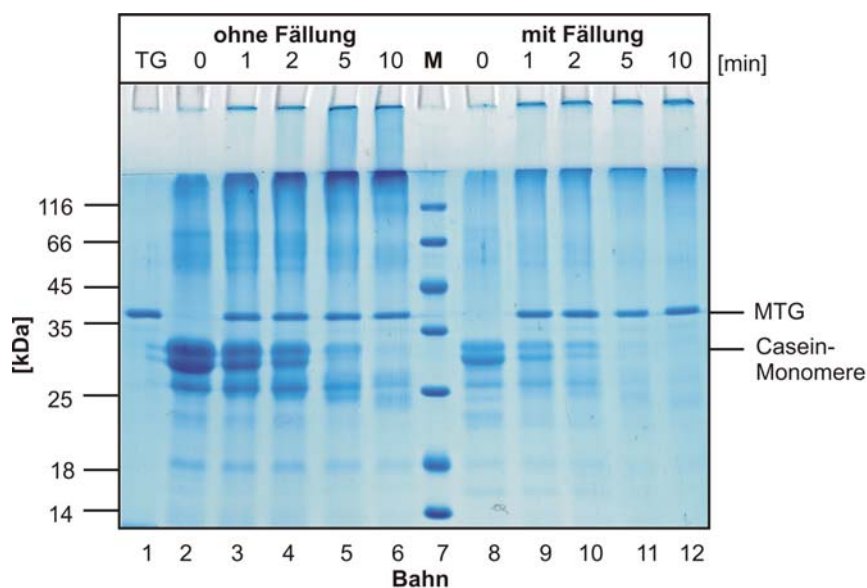


Abbildung 3-7: SDS-PAGE-Gel (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der Vernetzungsreaktion von Natrium-Caseinat ohne bzw. mit HCl-Fällung mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa® WM) bei 23 °C. NaCas-Lösung (100 mg/mL) wurde bei 25 °C 4 M HCl zugesetzt bis Protein präzipitierte, Zentrifugation (5 min, RT, 3220 g), Trennung Überstand/Pellet, Waschung (5x) des Pellets mit Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0), Resolubilisierung des Pellets in 10 mL Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0). NaCas (**ohne Fällung**) bzw. resolubilisiertes NaCas (**mit Fällung**) – Endkonzentration $\sim 1,67$ mg/mL – wurde mit MTG Activa® WM (Endkonzentration 13 mg/mL), beides in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,0 gelöst, versetzt. Beide Reaktionsansätze wurden bei 23 °C inkubiert. Probenahme erfolgte vor Enzymzugabe (0 min) bzw. nach 1, 2, 5 und 10 min. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. MTG...mikrobielle Transglutaminase, 0-10...Reaktionszeit in Minuten.

Eine Filmherstellung aus dem modifizierten Caseinat (-MTG) wurde aufgrund unzureichend produzierter Proteinmenge ($\sim 2,5$ g) nicht durchgeführt. Des Weiteren lag trotz 24-stündiger Dialyse ungebundener Reaktivfarbstoff in der Präparation vor, der die Herstellung und Visualisierung des Proteins im Film mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinträchtigt hätte.

3.1.2 Modifikation mit primären aliphatischen Amin

Zur Optimierung der Wasserresistenz von Proteinfilmen können diese mit Fetten bzw. Wachsen beschichtet oder eine hydrophobe Substanz in die filmbildende Lösung emulgiert werden. Kovalente Bindungen zwischen Protein und Fett werden nicht gebildet. Primäre aliphatische Amine wie z.B. Octylamin sind Substanzen, deren Hydrophobizität mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge steigt. Durch die NH_2 -Gruppe verfügen Alkylamine über eine reaktive Gruppe, die mittels mikrobieller Transglutaminase kovalent an Proteine gebunden werden kann. Diese Modifikation von Proteinen durch Amine kann eine weitere Methode zur Verringerung der Wasserlöslichkeit von Proteinfilmen darstellen und wurde in der vorliegenden Arbeit am Modellprotein Natrium-Caseinat untersucht.

3.1.2.1 Substratspezifität der MTG für Alkylamine

Das Enzym mikrobielle Transglutaminase katalysiert eine kovalente Verknüpfung zwischen peptid- oder proteingebundenen Glutamin- und Lysinresten. Primäre aliphatische Amine mit einer Kettenlänge bis zu sechs Kohlenstoffatomen wurden bereits als MTG-Substrate identifiziert [Ohtsuka et al., 2000]. Für eine Verbesserung der Wasserresistenz von Proteinfilmen sind jedoch Modifikationen mit Fettaminen erforderlich. Die Substratspezifität der MTG für längerkettige Amine wurde bisher nicht publiziert.

Die Untersuchung der Eignung von Octylamin als MTG-Substrat wurde wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, in Anlehnung an Ohtsuka *et al.* mit einigen Modifikationen durchgeführt. Dafür wurde das Dipeptid-Glutaminylglycin (Z-Gln-Gly) mit Octylamin versetzt und nach MTG Activa[®]WM-Zugabe für 240 min bei 37 °C inkubiert. Zum Vergleich wurden Reaktionen mit den bereits bekannten MTG-Substraten Butyl- und Hexylamin vorgenommen. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (vgl. Abschnitt 2.2.7). Anhand der erhaltenen Chromatogramme konnte der zeitliche Verlauf der Substratminimierung bzw. Produktbildung bestimmt werden. Die Ergebnisse der Substratspezifitäten der MTG für primäre aliphatische Amine sind in der Abbildung 3-8 dargestellt.

Anhand der Kurvenverläufe des Substrates (Z-Gln-Gly) wird für alle drei Amine eine Abnahme der Konzentration erkenntlich. Gleichzeitig kam es zur Bildung eines Produktes, das durch steigende Konzentration gekennzeichnet ist. Eine Reaktion zwischen Z-Gln-Gly und Amin mittels mikrobieller Transglutaminase hatte somit für alle getesteten Amine stattgefunden. Jedoch traten Differenzen innerhalb der Kurvenverläufe auf, abhängig vom Amin. Mit steigender Kohlenstoffkettenlänge verlangsamte sich die Produktbildung, woraus eine Reduzierung der Reaktionsumsätze resultierte. Die Produktbildung aus Z-Gln-Gly und Butylamin war am höchsten. Nach 90 min lag der Umsatz bei 50 %, nach 240 min bei 65 % (Abbildung 3-8 A). Die Reaktion mit Hexylamin erzielte nach 240 min einem Umsatz von etwa 60 % – nach 140 min war die Hälfte des Substrates umgesetzt (Abbildung 3-8 B). Bei der Reaktion mit dem längerkettigen Octylamin stagnierte die Produktbildung nach 150 min. Der Umsatz betrug 50 % (Abbildung 3-8 C).

Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung war, dass alle untersuchten primären aliphatischen Amine ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{N}$ – $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{N}$) Substrate für die mikrobielle Transglutaminase darstellen, deren Spezifität aber stark von der Kohlenstoffkettenlänge abhängig ist.

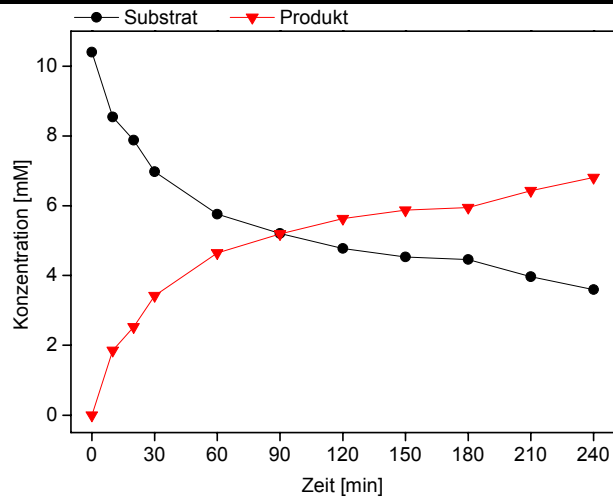
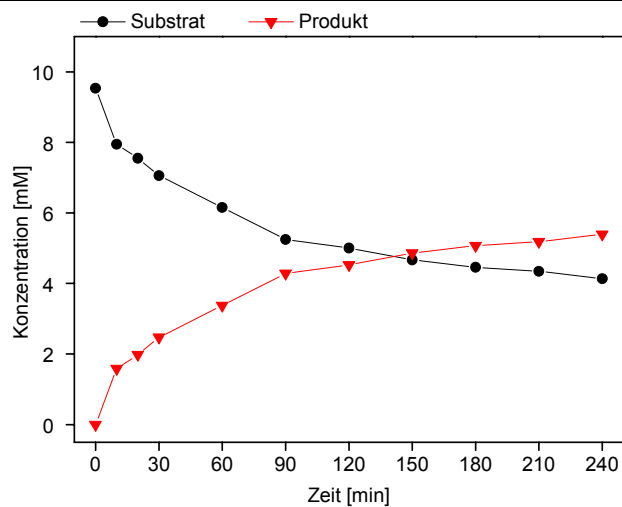
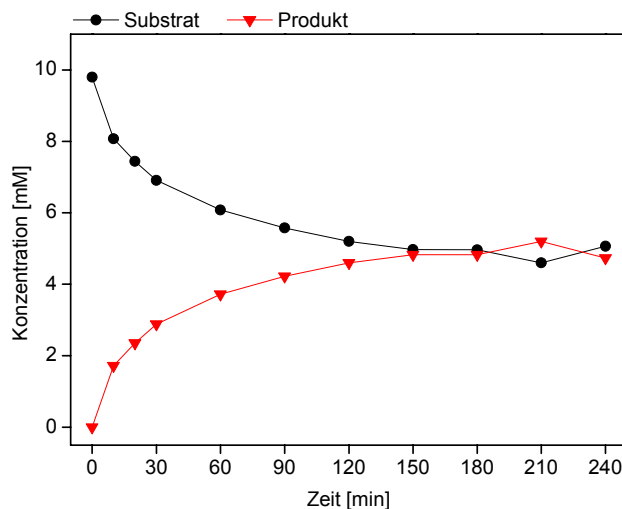
AButylamin ($C_4H_{11}N$)+ Z-Gln-Gly + MTG_{Activa}**B**Hexylamin ($C_6H_{15}N$)+ Z-Gln-Gly + MTG_{Activa}**C**Octylamin ($C_8H_{19}N$)+ Z-Gln-Gly + MTG_{Activa}

Abbildung 3-8: RP-HPLC-Analyse Zeitliche Verläufe der Reaktionsansätze aus Z-Gln-Gly, primären Amin (A: Butylamin, B: Hexylamin, C: Octylamin) und mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 37 °C für 4 h. Z-Gln-Gly (Endkonzentration 10 mM) und Amin (Endkonzentration 10 mM) wurde mit MTG Activa[®]WM (Endkonzentration 15 mg/mL) versetzt und bei 37 °C inkubiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 min) wurde der Reaktionsansatz mit 900 µL 1 % TFA und 300 µL 100 % ACN versetzt (jeder Zeitpunkt repräsentiert eine Reaktion), zentrifugiert (5 min, RT, 16100 g) und mittels RP-HPLC analysiert (Laufmittel A: 30 % ACN + 0,1 % TFA + 69,9 % dH₂O (0-5 min); Laufmittel B: 60 % ACN + 0,1 % TFA + 39,9 % dH₂O (5,1-12 min); Flussrate: 1 mL/min; UV-Detektion: 215 nm). Chromatogramme sind im Abschnitt 8.2.2 dargestellt. ACN...Acetonitril, MTG...mikrobielle Transglutaminase, TFA...Trifluoressigsäure.

Während der Reaktion von Z-Gln-Gly mit Octylamin kam es zu einer Änderung des Aggregatzustandes. Ein anfänglich flüssiger Reaktionsansatz wandelte sich mit zunehmender Zeit zu einer viskosen, gelartigen Masse um. Bei den Reaktionen mit Butyl- und Hexylamin konnte diese Änderung nicht festgestellt werden – die Reaktionsansätze waren über den gesamten Zeitraum flüssig. Das viskose Produkt wurde bei Kontrollreaktionen, wo jeweils eine Komponente des Reaktionsansatzes entfiel, ebenfalls nicht beobachtet (Abbildung 3-9). Die Aggregatänderung lag somit in einer erfolgreichen Vernetzung von Z-Gln-Gly mit Octylamin, katalysiert durch die mikrobielle Transglutaminase, begründet. Eine Analytik von Feststoffen mittels HPLC ist nicht möglich. Aufgrund dessen wurde nach einem Lösungsmittel für die gelartige Masse gesucht, welches eine Analyse ermöglichte und das Ergebnis nicht beeinträchtigte. Acetonitril konnte als geeignetes Lösungsmittel identifiziert werden. Zum Abstoppen der Reaktion wurde daher neben TFA jedem Reaktionsansatz ACN als Lösungsvermittler zugesetzt. In Wasser zeigte das viskose Reaktionsprodukt keine Löslichkeit. Lediglich durch Erhitzung konnte die gelartige Masse in den flüssigen Zustand überführt werden, gelierte aber bei Abkühlung wieder.



Abbildung 3-9: Optische Darstellung des Reaktionsansatzes (R) aus Z-Gln-Gly, Octylamin und MTG Activa[®]WM nach 120 min bei 37 °C im Vergleich zu Kontrollreaktionen (C). Reaktionsansatz (R) aus Z-Gln-Gly und Octylamin (Verhältnis 1:1) wurde mit MTG Activa[®]WM versetzt und 120 min bei 37 °C inkubiert. C1: Z-Gln-Gly + MTG Activa[®]WM; C2: Octylamin + Z-Gln-Gly; C3: Octylamin + MTG Activa[®]WM. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

3.1.2.2 Vernetzung zwischen Caseinat und Octylamin

Octylamin konnte mittels HPLC-Analyse als Substrat für die mikrobielle Transglutaminase identifiziert werden (vgl. Abschnitt 3.1.2.1). Eine enzymkatalysierte, kovalente Bindung zwischen proteingebundenen Glutaminen und primären Amin-Molekülen ist daher theoretisch möglich. Diese Modifikation des Proteins würde in einer Molekulargewichtsvergrößerung und möglicherweise erhöhten Hydrophobizität des Proteins resultieren.

Die Untersuchung zur Modifikation von Natrium-Caseinat mit Octylamin wurde wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben, durchgeführt. Ein Reaktionsansatz aus Caseinat und Octylamin gelöst in dH₂O wurde mit MTG Activa[®]WM versetzt und bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Das Verhältnis proteingebundener Glutamine zu Octylamin betrug während der Reaktion 1:2, d.h. das Amin lag im Überschuss vor. Die pH-Werte der Protein- und der Amin-Lösung wurden vor der Reaktion auf pH 8-9 korrigiert. Als Referenz diente ein Ansatz aus Caseinat ohne Amin. Die Analyse der Reaktionen erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-10 (A: ohne Amin; B: mit Amin) dargestellt.

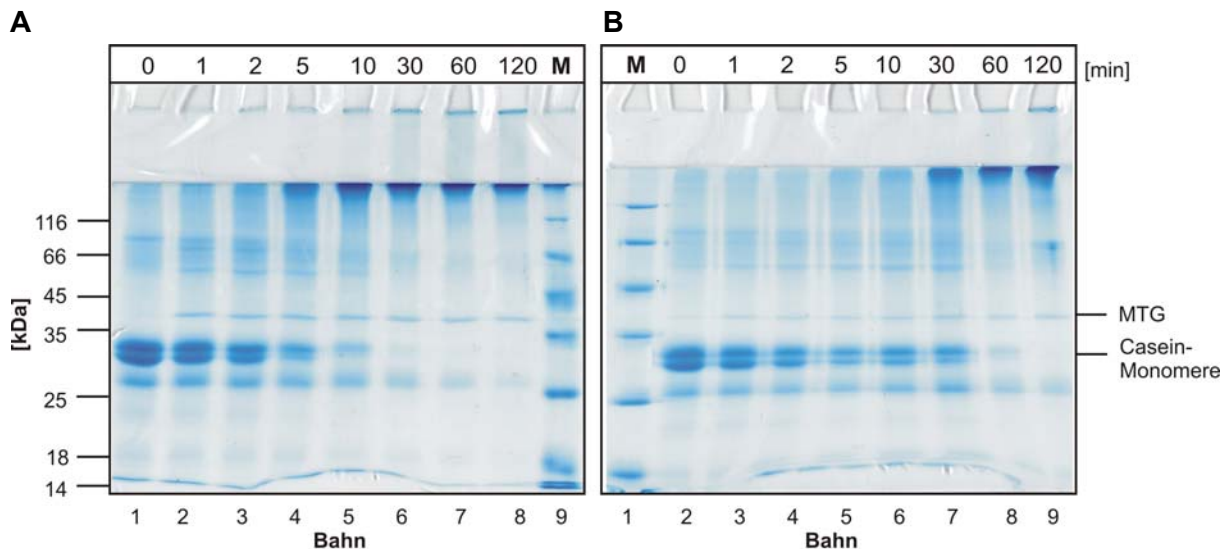


Abbildung 3-10: SDS-PAGE-Gele (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der kovalenten Modifikation von Natrium-Caseinat durch Octylamin mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa®WM) bei 23 °C. A: ohne Amin (Referenz). NaCas (Endkonzentration 25 mg/mL) wurde mit MTG Activa®WM (Endkonzentration 50 mg/mL) versetzt. **B: mit Amin.** NaCas (Endkonzentration 25 mg/mL) wurde mit Octylamin (Endkonzentration 32,5 mM) und MTG Activa®WM (Endkonzentration 50 mg/mL) versetzt. Beide Reaktionsansätze wurden bei 23 °C inkubiert. Probenahme erfolgte nach 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60 und 120 min (Probenahme 0 min vor Enzymzugabe). Alle Proben wurden 1:12 mit dH₂O verdünnt und 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt. M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, 0-120...Reaktionszeit in Minuten.

Anhand Abbildung 3-10 A wird erkennbar, dass die Casein-Monomere (Bahn 1) mit einer Molmasse von 25-32 kDa nach Enzymzugabe (Bahn 2-8) zu einem hochmolekularen Polymer vernetzt wurden. Bereits nach 5 min konnte eine Produktbildung und Intensitätsabnahme der Banden detektiert werden. Nach 30 min war die Vernetzung weitestgehend abgeschlossen, lediglich die Proteinbande der kleinsten Untereinheit war in geringer Intensität sichtbar. Die entstandenen Polymere ($M_w > 116$ kDa) konnten das Trenngel nicht mehr passieren. Die Bande bei 38 kDa entspricht der MTG_{Activa}-Bande.

Durch die Zugabe von Octylamin (Abbildung 3-10 B) wurde die Polymerisation von Caseinat beeinträchtigt, die Reaktion verlief langsamer. Neben einer hochmolekularen Produktbande waren nach 30 min Reaktion die Banden der Casein-Monomere noch deutlich erkennbar (Bahn 7). Bei der Referenz wurde nach gleicher Reaktionszeit eine fast vollständige Vernetzung des Proteins analysiert. Nach 120 min war das Protein bei beiden Reaktionen mittels MTG zu einem hochmolekularen Polymer vernetzt wurden.

Die gewünschte Modifikation von Natrium-Caseinat mit Octylamin konnte mittels dieser Analyseverfahren trotz Amin-Überschuss nicht nachgewiesen werden. Eine Kopplung aller im Protein verfügbaren 65 Glutaminreste mit einem Octylamin-Molekül ($M_w = 129,25$ g/mol) würde eine Molekulargewichtsvergrößerung von etwa 8 kDa ergeben. Die Bildung neuer Banden im Bereich zwischen 30-40 kDa aufgrund erfolgreicher Modifikation wurde jedoch nicht detektiert. Unter den gewählten Bedingungen wurde die Vernetzungsreaktion der Caseinat-Moleküle untereinander bevorzugt.

Dimethylcasein (DMC) ist ein Protein, in dessen Aminosäuresequenz alle enthaltenen Lysinreste methyliert sind, so dass es nur als Glutamin-Substrat für die Transglutaminase fungiert. Eine enzymatische Vernetzung von DMC-Moleküle untereinander ist daher nicht möglich. Die Untersuchung zur kovalenten Modifikation von Dimethylcasein mit Octylamin

erfolgte analog der Reaktion mit Natrium-Caseinat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-11 (A: ohne Amin, B: mit Amin) dargestellt.

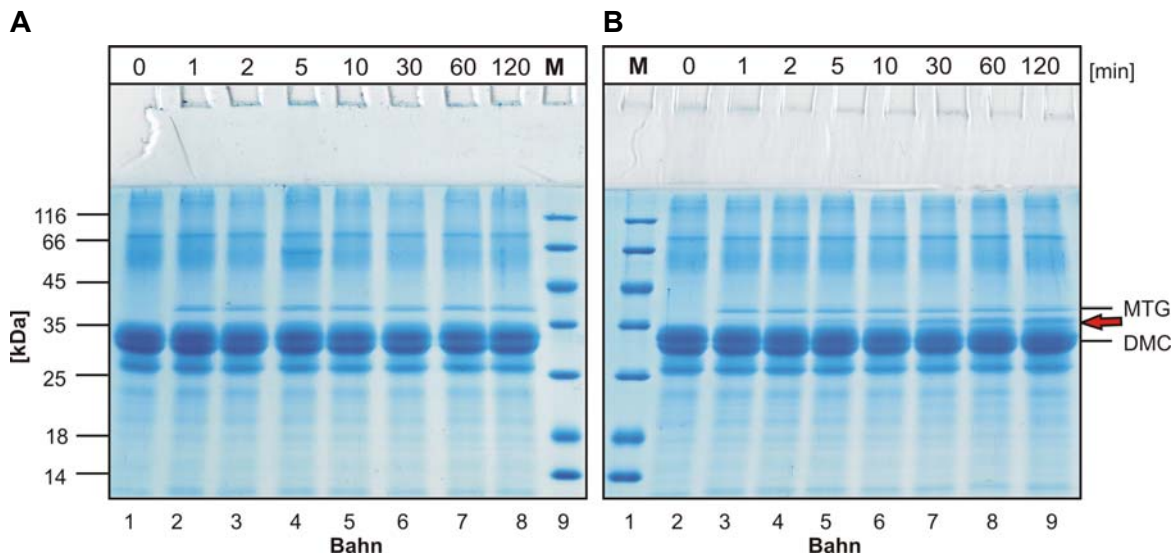


Abbildung 3-11: SDS-PAGE-Gele (Coomassie-Färbung) Zeitlicher Verlauf der kovalenten Modifikation von Dimethylcasein (DMC) durch Octylamin mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa®WM) bei 23 °C. A: ohne Amin (Referenz). DMC (Endkonzentration 25 mg/mL) wurde mit MTG Activa®WM (Endkonzentration 50 mg/mL) versetzt. **B: mit Amin.** DMC (Endkonzentration 25 mg/mL) wurde mit Octylamin (Endkonzentration 32,5 mM) und MTG Activa®WM (Endkonzentration 50 mg/mL) versetzt. Beide Reaktionsansätze wurden bei 23 °C inkubiert. Probenahme erfolgte nach 0, 1, 2, 5, 10, 30, 60 und 120 min (Probenahme 0 min vor Enzymzugabe). Alle Proben wurden 1:12 mit dH₂O verdünnt und 1:2 mit SDS-Probenpuffer versetzt. M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, 0-120 min... Reaktionszeit in Minuten.

Anhand Abbildung 3-11 A wird deutlich, dass wie bereits erwähnt keine Vernetzung des Proteins durch die MTG_{Activa} erfolgte. Über den gesamten Reaktionszeitraum war keine Reduzierung der Bandenintensitäten bzw. die Bildung eines hochmolekularen Polymers erkennbar. Die Bande bei 38 kDa repräsentiert das Enzym mikrobielle Transglutaminase. Im Vergleich zum Natrium-Caseinat (Abbildung 3-10) konnte für das Dimethylcasein eine MTG-katalysierte Modifikation durch Octylamin mittels SDS-PAGE analysiert werden (Abbildung 3-11 B). Zwischen der Casein- und der MTG-Bande wurde die Bildung einer neuen Proteinbande ($M_w \sim 35$ kDa) detektiert, deren Schärfe sich mit steigendem Zeitverlauf intensiviert (Bahn 3-9). Die Intensitäten der Casein-Monomere, vor allem die der größten Untereinheit, verringerten sich über 120 min Reaktionszeit geringfügig. Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung war, dass Amin-Moleküle unter den gewählten Bedingungen erfolgreich an reaktive Glutaminreste des Dimethylcaseins mittels MTG gekoppelt werden konnten. Die genaue Anzahl gebundener Amine konnte mittels SDS-PAGE allerdings nicht bestimmt werden. Eine Aggregatänderung des Reaktionsansatzes aufgrund der Vernetzungsreaktion, wie beim Dipeptid-Glutaminyglycin (Abschnitt 3.1.2.1) festgestellt, wurde nicht beobachtet.

Die Herstellung von Filmen aus Amin-behandeltem Protein erfolgte nicht. Wie zuvor analysiert, konnte Natrium-Caseinat unter den gewählten Bedingungen durch Octylamin nicht modifiziert werden. Das Ziel ein Protein bzw. Proteinfilm mit verbesserter Hydrophobizität herzustellen, hätte nicht erreicht werden können. Dimethylcasein konnte mit Octylamin modifiziert werden, ist aufgrund der hohen Kosten (~100 €/g) allerdings für eine Filmherstellung ungeeignet.

3.2 Charakterisierung von Filmen aus Rohkollagen

Tierische Proteine wie Caseinat, Gelatine oder Molkenprotein sind für die Herstellung von Proteinfilmen umfangreich erforscht und charakterisiert worden. Durch den Einsatz alternativer, proteinogener Materialien könnten Filmeigenschaften optimiert und neue Anwendungsgebiete für Proteinfilme erschlossen werden. Rohkollagen (RK) der Firma Acontex GmbH (Rheda-Wiedenbrück) mit einem Fettanteil von 18,6 % sollte hinsichtlich der filmbildenden Eigenschaften untersucht und charakterisiert werden. Der Einfluss einer kovalenten Vernetzung des Proteins mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG) auf die Filmeigenschaften war zu prüfen.

3.2.1 Vernetzbarkeit mittels MTG

Zunächst wurde die Vernetzbarkeit des Rohkollagens mittels MTG Activa[®]WM wie in Abschnitt 2.3.5 beschrieben untersucht. Die Analyse der Reaktion erfolgte mittels SDS-PAGE (vgl. Abschnitt 2.2.2). Das Ergebnis ist in Abbildung 3-12 dargestellt.

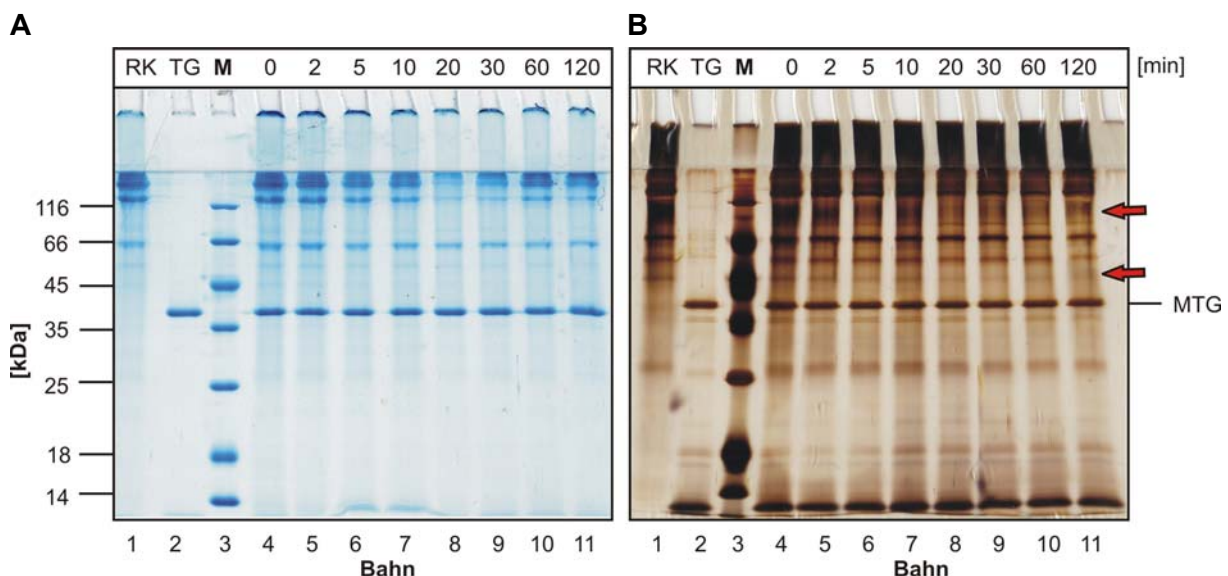


Abbildung 3-12: SDS-PAGE-Gel (A: Coomassie-Färbung, B: Silberfärbung) Zeitlicher Verlauf der Vernetzungsreaktion von Rohkollagen mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) bei 23 °C. Rohkollagen (Endkonzentration 1,67 mg/mL) wurde mit MTG Activa[®]WM (Endkonzentration 13 mg/mL), beides in 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst bzw. suspendiert, versetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 23 °C inkubiert. Probenahme erfolgte nach 0, 2, 5, 10, 20, 30, 60 und 120 min. Alle Proben wurden 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt. M...Molekulargewichtsmarker, MTG...mikrobielle Transglutaminase, RK...Rohkollagen, 0-120... Reaktionszeit in Minuten.

Das mittels Coomassie gefärbte Gel (Abbildung 3-12 A) wies im Rohkollagen eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa und Banden, die sich im hochmolekularen Bereich ($M_w \geq 116$ kDa) erstreckten, auf. Proteine mit einem Molekulargewicht größer 250-300 kDa, welche das Trenn- und Sammelgel nicht passieren konnten sowie Proteine mit einem $M_w \sim 45-60$ kDa in sehr geringer Konzentration, waren ebenfalls enthalten (Bahn 1). Die Bande bei 38 kDa entspricht der MTG_{Activa}-Bande (Bahn 2). Da über den gesamten Reaktionszeitraum eine MTG-katalysierte Vernetzung des Rohkollagens – gekennzeichnet durch Intensitätsabnahme der Proteinbanden und Bildung eines hochmolekularen Polymers – mittels dieser Färbemethode nicht nachgewiesen werden konnte

(Bahn 4-11), wurde das Gel zusätzlich mit der sensitiveren Silberfärbung gefärbt (Abbildung 3-12 B). Die Bildung eines Vernetzungsproduktes war aufgrund der hochmolekularen Proteine im Rohkollagen auch mit dieser Methode nicht analysierbar. Durch die Zugabe der MTG_{Activa} konnte jedoch die Intensitätsabnahme einzelner Proteinbanden aufgezeigt werden (Bahn 4-11). Die Intensität der Bande mit einem Molekulargewicht von 45 kDa verringerte sich mit Reaktionszeit so deutlich, dass nach 120 min diese Bande im Gel nicht mehr sichtbar war. Ebenfalls war eine Reduzierung der Intensitäten von Banden im Bereich von 66-116 kDa erkennbar. Die im untersuchten Material detektierten Proteine repräsentieren neben Kollagen mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere extrazelluläre Matrixproteine wie Elastin ($M_w \sim 68$ kDa), Blutserumalbumin ($M_w \sim 66$ kDa) und Proteoglykane, wodurch sich das Rohkollagen von anderen kommerziell verfügbaren Kollagenen und Gelatinen unterscheidet.

3.2.2 Filmherstellung

Filme aus dem gelb-weißlich, watteähnlichen Rohkollagen (Abbildung 3-13 A) wurden wie in Abschnitt 2.3.6.1 beschrieben, nach dem Standardverfahren ohne bzw. mit MTG-Vernetzung hergestellt. Das Ergebnis eines enzymatisch vernetzten (MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}), Glycerin-plastifizierten (50 % (w/w Protein)) Filmes ist in Abbildung 3-13 B dargestellt.

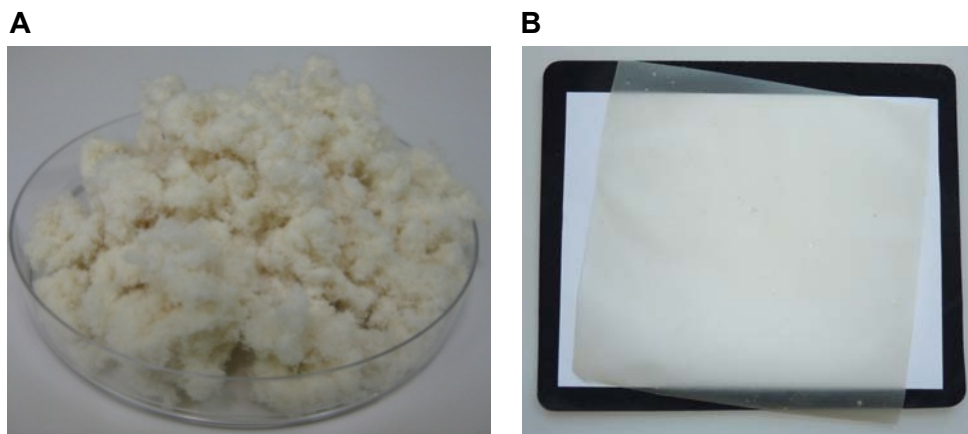


Abbildung 3-13: Filmherstellung aus Rohkollagen mit mikrobieller Transglutaminase-Vernetzung (MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren). A: Rohmaterial; B: Film. 6 g Rohkollagen wurde in einem Glycerin (3 g) - Puffer (110,4 mL 20 Tris/HCl pH 7)-Gemisch für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von 1,5 g MTG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, RT...Raumtemperatur.

Das Rohkollagen erwies sich als geeignetes Material für die Herstellung von Filmen. Unter Verwendung des Weichmachers Glycerin konnten nach dem Standardverfahren erfolgreich Proteinfilme angefertigt werden. Die Filme waren stabil, nicht klebrig und zeigten eine opake, gelbliche Färbung. Die Oberfläche der Filme war rau, die während der Trocknung der PTFE-Form zugewandte Unterseite glatt. Unlösliche Partikel, die im Rohkollagen in geringen Mengen enthalten und die von der filmbildenden Suspension mittels Zentrifugation nicht abgetrennt werden konnten, waren in die Filme eingeschlossen. Alle Filme wiesen eine Dicke von 180-220 µm und einen relativ starken Geruch auf. Die Haptik der Proteinfilme war durch den Fettanteil geprägt, die Filme wiesen eine leicht fettige Oberfläche auf. Das Erscheinungsbild der Rohkollagen-Filme wurde durch die enzymatische Vernetzung des Proteins nicht beeinflusst.

3.2.3 Mechanische Charakterisierung mittels Zugversuch

Die mechanische Charakterisierung ist für Kunststofffolien sehr bedeutend. Dabei nimmt der Zugversuch in der Kunststoffprüfung eine Vorrangstellung ein [Grellmann und Seidler, 2005]. Die Zugeigenschaften – Zugfestigkeit (ZF) und Bruchdehnung (BD) – der nach Standardverfahren hergestellten Rohkollagen-Filme wurden wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-14 dargestellt.

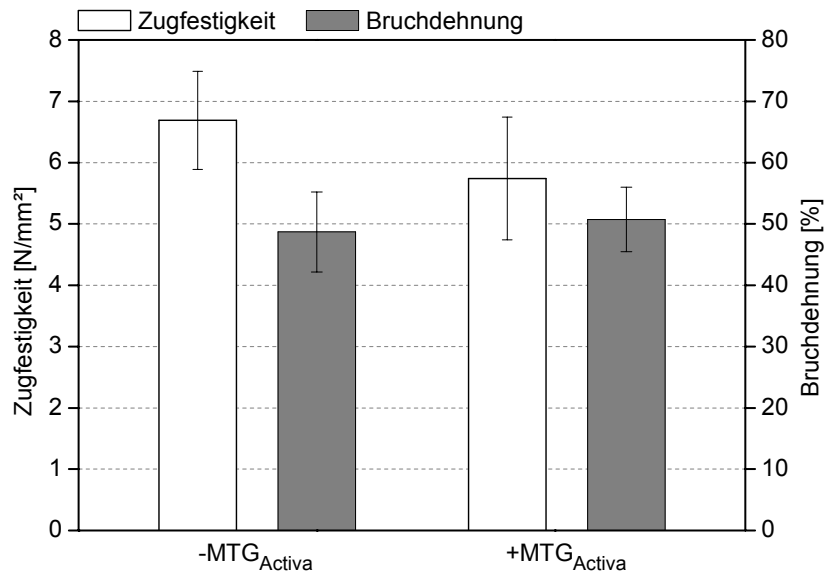


Abbildung 3-14: Einfluss der enzymatischen Vernetzung auf die Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren). 6 g Rohkollagen wurde in einem Glycerin (3 g) - Puffer (110,4 mL 20 mM Tris/HCl pH 7)-Gemisch für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von 1,5 g MTG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) bzw. 1,5 g inaktivierter MTG Activa[®]WM (in 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst; Inkubation für 5 min bei 99 °C; Kühlung auf 50 °C), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 15 mm, Prüfungsgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 10. Werte in Tabelle 8-1. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

Beide Filme – ohne bzw. mit enzymatischer Vernetzung – waren stabil und mechanisch messbar. Für unvernetzte Filme wurden eine Zugfestigkeit von 6,7 N/mm² und eine Bruchdehnung von 49 % gemessen. Die mechanischen Eigenschaften wurden durch die Vernetzung des Rohkollagens mittels mikrobieller Transglutaminase (MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}) nicht bzw. nur sehr gering beeinflusst. Die Messwerte der RK-Filme \pm MTG_{Activa} lagen im Fehlerbereich – allenfalls ist eine leichte Reduzierung der Zugfestigkeit in Gegenwart des Enzyms erkennbar.

3.2.4 Variation der Weichmacherkonzentration

Für die Herstellung von Proteinfilmen ist der Zusatz eines Weichmachers meist notwendig. Reine Proteinfilme sind wegen ihrer Wechselwirkungen zwischen den Polypeptidketten (Wasserstoff- und Disulfidbrücken, elektrostatische und hydrophobe Kräfte) häufig steif und brüchig. Weichmacher reduzieren diese Ketten-Wechselwirkungen, erniedrigen die Glasübergangstemperatur der Proteine und erhöhen die Flexibilität der Filme. Bei Kontakt mit Wasser werden allerdings die meisten Weichmacher, aufgrund des hydrophilen Charakters

aus dem Film herausgelöst. Instabile und brüchige Filme sind die Folge. Durch Einsatz hydrophober oder interner Weichmacher würde ein Herauslösen und Verspröden verhindert bzw. erschwert. Das im Rohkollagen enthaltene Fett (18,6 %) könnte möglicherweise als solch ein interner, hydrophober Weichmacher agieren. Die Konzentration an herkömmlichen Plastifizierungsmittel im Proteinfilm könnte dadurch reduziert bzw. vermieden werden, unter Erhalt der mechanischen Stabilität. Die bei der Filmherstellung für den externen Weichmacher anfallenden Materialkosten würden eingespart. Des Weiteren wäre aufgrund des Fettanteils im Material eine verbesserte Wasserresistenz der hergestellten Filme denkbar.

3.2.4.1 Glycerin als Weichmacher

Glycerin ist mit einem Molekulargewicht von 92 g/mol ein kleines Molekül. Zusätzlich zum hydrophilen Charakter trägt die geringe Größe zum leichten Herauslösen des Glycerins bei Kontakt mit Wasser aus Proteinfilmen bei. Für eine Anwendung proteinbasierender Filme z.B. in der Landwirtschaft wäre eine minimierte Weichmacherkonzentration vorteilhaft, um eine Versprödung des Filmes bei Bewitterung zu vermeiden.

Rohkollagen-Filme mit Glycerin-Konzentrationen von 0-100 % (w/w Protein) wurden wie in Abschnitt 2.3.6.3 beschrieben, nach dem Standardverfahren hergestellt. Die Ergebnisse der mechanischen Charakterisierung mittels Zugversuch sind in Abbildung 3-15 dargestellt.

Über den gesamten Konzentrationsbereich waren die Filme stabil und mechanisch messbar. Filme ohne externen Weichmacher konnten erfolgreich hergestellt werden. Diese erzielten die höchste Zugfestigkeit (48 N/mm^2). Durch Erhöhung der Weichmacherkonzentration von 0 % auf 100 % (w/w Protein) sank die ZF der Filme bis zu 94 % ($48 \rightarrow 2,7 \text{ N/mm}^2$; Abbildung 3-15 A). Die Bruchdehnung stieg mit Erhöhung der Glycerin-Konzentration. Bei 100 % (w/w Protein) Glycerin wurde mit 82 % ein Maximum erreicht (Abbildung 3-15 B). Im Vergleich zu 0 % (w/w Protein) Glycerin – Bruchdehnung von 2,1 % – entspricht das einer 40-fachen Steigerung. Gegenüber publizierten Proteinfilmen aus Gelatine wiesen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten RK-Filme, unabhängig von der Weichmacherkonzentration, meist geringere mechanische Eigenschaften auf. Eine ausführliche Diskussion dieser Erkenntnis erfolgt in Abschnitt 4.3.

Die enzymatische Vernetzung (MTG Activa[®] WM, $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$) des Rohkollagens resultierte in Filmen, plastifiziert mit Glycerin $\leq 25 \%$ (w/w Protein), deren Zugfestigkeiten gegenüber unvernetzten Filmen bis zu 30 % erniedrigt waren. Ab einer Glycerin-Konzentration von 50 % (w/w Protein) konnte kein Einfluss der MTG-Behandlung mehr ermittelt werden – die Zugfestigkeiten der RK-Filme $\pm \text{MTG}_{\text{Activa}}$ lagen im Fehlerbereich (2-15 %). Bezüglich der Bruchdehnung der Film konnte über den gesamten Glycerin-Konzentrationsbereich (0-100 % (w/w Protein)) keine Beeinflussung durch die MTG dargelegt werden. Die meisten Messwerte der Filme $\pm \text{MTG}_{\text{Activa}}$ lagen ebenfalls im Fehlerbereich (4-16 %).

Ab einer Glycerin-Konzentration von 75 % (w/w Protein) erwiesen sich die Rohkollagen-Filme als klebrig und schlecht handhabbar.

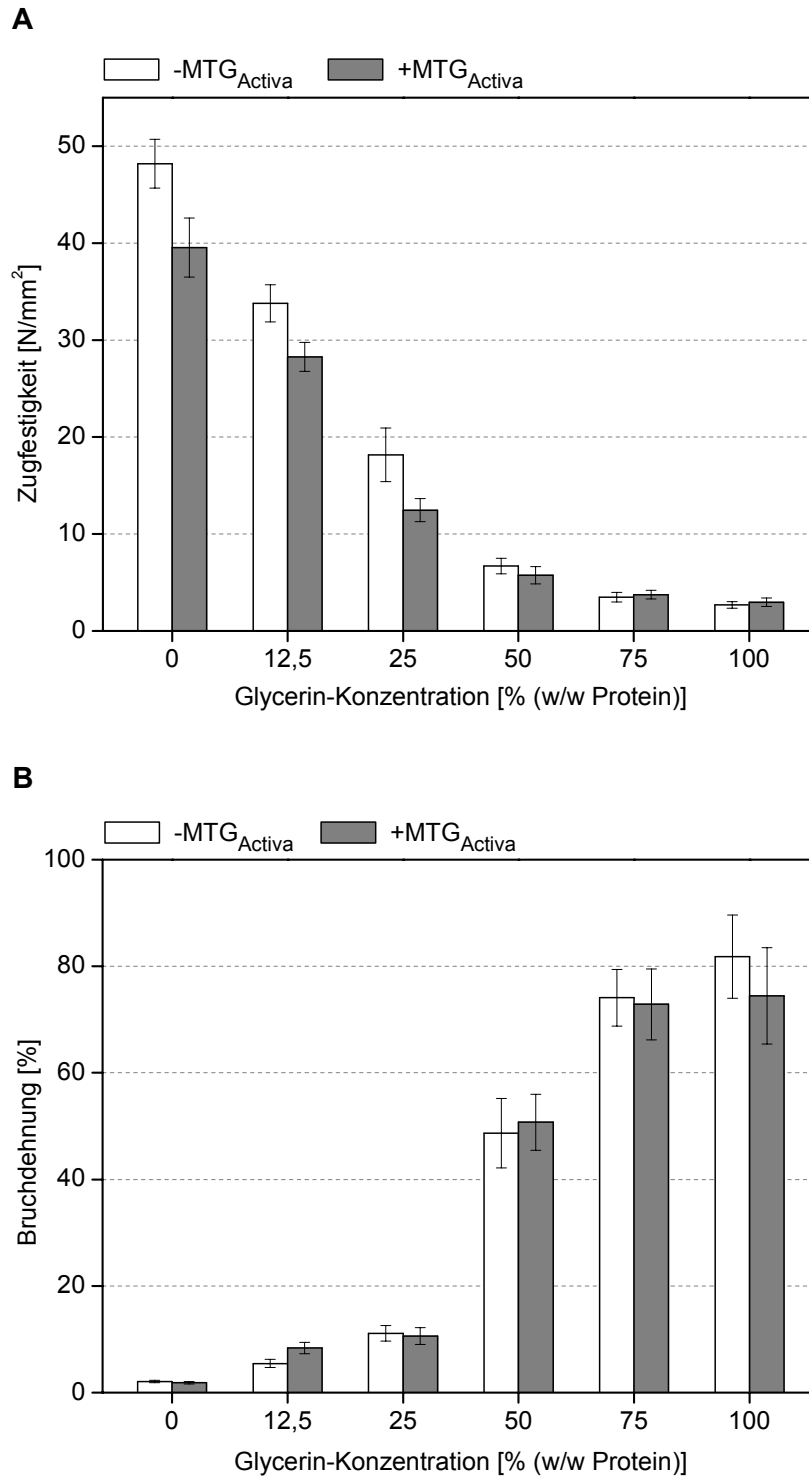


Abbildung 3-15: Einfluss verschiedener Glycerin-Konzentrationen auf die Zugeigenschaften (A: Zugfestigkeit, B: Bruchdehnung) von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren). 6 g Rohkollagen wurde in einem Glycerin (0/ 0,75/ 1,5/ 3/ 4,5/ 6 g) - Puffer (110,4 mL 20 mM Tris/HCl pH 7)-Gemisch für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von 1,5 g MTG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) bzw. 1,5 g inaktivierter MTG Activa[®]WM (in 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst; Inkubation für 5 min bei 99 °C; Kühlung auf 50 °C), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm (Glycerin-Konzentration 0 % (w/w Protein)) bzw. 15 mm (Glycerin-Konzentration \geq 12,5 % (w/w Protein)), Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 10. Werte in Tabelle 8-1. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

3.2.4.2 Harnstoff als Weichmacher

Harnstoff stellt aufgrund seines hohen Stickstoffgehaltes ein weltweit bedeutendes Düngemittel dar. In der Kosmetikindustrie findet Harnstoff aufgrund der feuchtigkeits-spendenden Eigenschaften Anwendung, so z.B. in Pflegeprodukten wie Hautcremes und Shampoos. Zur Plastifizierung von Biopolymeren wie z.B. thermoplastischer Stärke [Ma et al., 2004] oder Caseinat-Filmen [Patzsch, 2010] wurde Harnstoff bereits eingesetzt. Beim biologischen Abbau von Harnstoff-plastifizierten Materialien würde dem Boden, mit dem freisetzenen Stickstoff, ein zusätzlicher Dünger zugeführt.

Zur Untersuchung der Weichmachereffizienz von Harnstoff auf Rohkollagen-Filme wurden Filme mit Harnstoff-Konzentrationen von 0-100 % (w/w Protein), wie in Abschnitt 2.3.6.3 beschrieben, nach dem Standardverfahren hergestellt. Die Ergebnisse der mechanischen Charakterisierung mittels Zugversuch sind in Abbildung 3-16 dargestellt.

Über den gesamten Konzentrationsbereich waren die Filme stabil und mechanisch messbar. Die Zugfestigkeit der RK-Filme sank bis zu einer Harnstoff-Konzentration von 50 % (w/w Protein) von 48 N/mm² (ohne Weichmacher) auf 5,6 N/mm². Dies entspricht einem Verlust um 88 %. Durch weitere Konzentrationserhöhung ≥ 75 % (w/w Protein) Harnstoff stieg die ZF wieder leicht an. Die Bruchdehnung erreichte bei 50 % (w/w) Harnstoff ein Maximum von 50 %, sank mit steigender Konzentration auf 17 % (100 % (w/w Protein)). Bei Rohkollagen-Filmen ohne Harnstoff wurde die niedrigste Bruchdehnung von 2,1 % gemessen.

Der Einfluss der MTG_{Activa}-Vernetzung auf die mechanischen Eigenschaften der Proteinfilme war gering. Bei Filmen, plastifiziert mit Harnstoff-Konzentrationen $\leq 12,5$ % (w/w Protein) wurden Verluste der ZF bis 18 % ermittelt. Bei höheren Weichmacherkonzentrationen wurden die Zugfestigkeiten der RK-Filme durch die Vernetzung nicht beeinflusst – die Unterschiede zwischen den meisten Filmen \pm MTG_{Activa} lagen im Fehlerbereich (2-15 %). Bezüglich der Bruchdehnung wurden zwischen unvernetzten und vernetzten Filmen ebenfalls keine erheblichen Differenzen gemessen. Die Messwerte lagen im Fehlerbereich – allenfalls ist eine leichte Tendenz zu höheren Bruchdehnungen erkennbar.

Bei Rohkollagen-Filmen mit Harnstoff als Weichmacher kam es zur Bildung von Kristallen. Bis zu einer Konzentration von 50 % (w/w Protein) wirkte Harnstoff als Weichmacher (ZF \downarrow , BD \uparrow), dabei waren lediglich partiell kleine Harnstoffkristalle vorhanden. Mit steigender Konzentration (≥ 75 % (w/w Protein)) nahm die Kristallbildung zu. Die bei der Trocknung entstandenen Kristalle lagen über den gesamten Proteinfilm verteilt vor, was die leichte Zunahme der ZF und die Abnahme der BD bewirkte. Die Harnstoffkristalle wirkten vermutlich als Füllstoff. Durch die steigende Kristallbildung entstanden weiße und vollständig opake Proteinfilme.

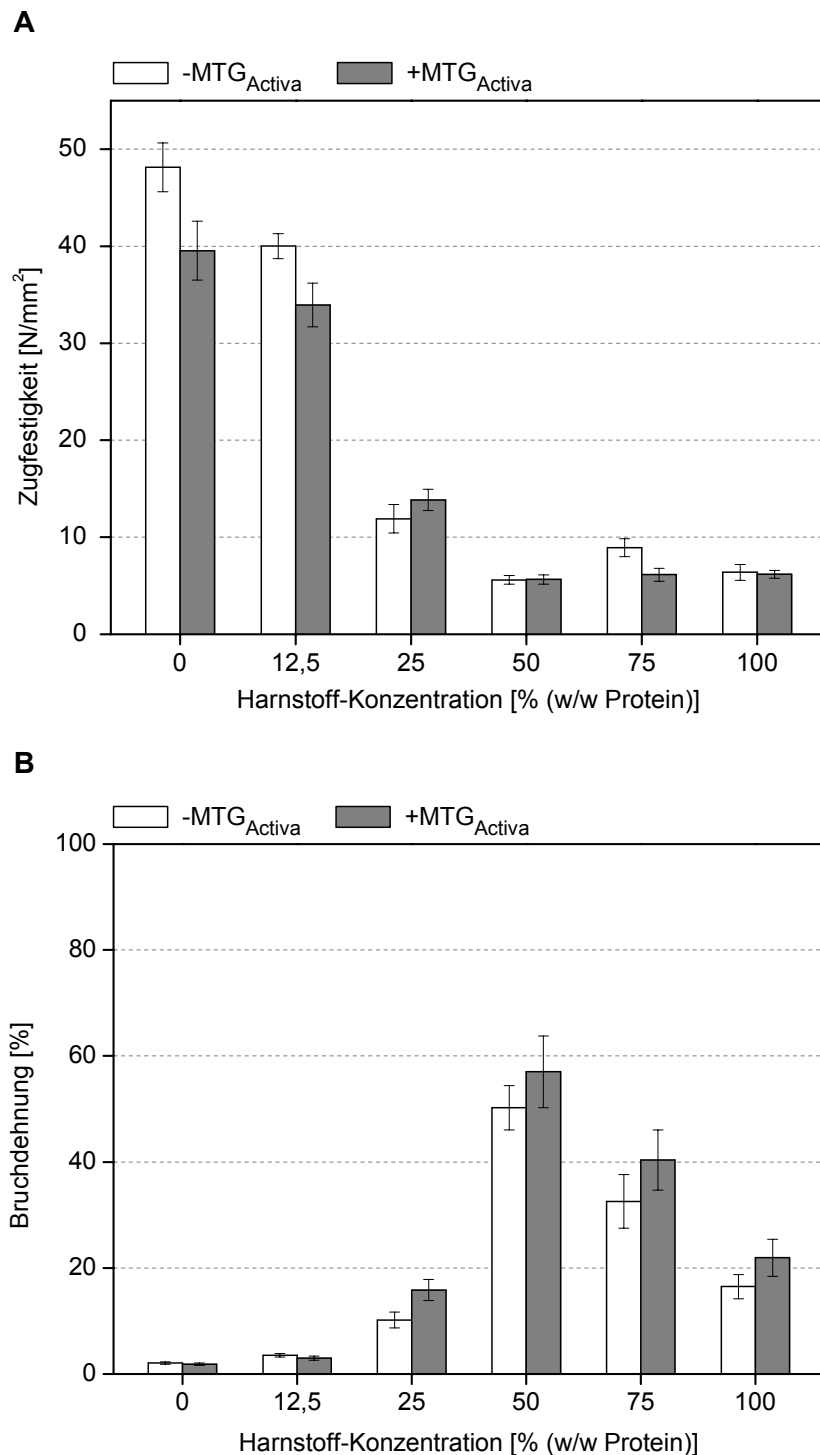


Abbildung 3-16: Einfluss verschiedener Harnstoff-Konzentrationen auf die Zugeigenschaften (A: Zugfestigkeit, B: Bruchdehnung) von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren). 6 g Rohkollagen wurde in einem Harnstoff (0/ 0,75/ 1,5/ 3/ 4,5/ 6 g) - Puffer (110,4 mL 20 mM Tris/HCl pH 7)-Gemisch für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von 1,5 g MTG Activa[®]WM (in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) bzw. 1,5 g inaktiverter MTG Activa[®]WM (in 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst; Inkubation für 5 min bei 99 °C; Kühlung auf 50 °C), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm (Harnstoff-Konzentration 0 % (w/w Protein)) bzw. 15 mm (Harnstoff-Konzentration \geq 12,5 % (w/w Protein)), Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 10. Werte in Tabelle 8-1. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

3.2.5 Optimierung und Charakterisierung von Rohkollagen-Filmen ohne Weichmacher

Intakte und mechanisch stabile Rohkollagen-Filme ohne Zusatz eines externen Weichmachers konnten mittels Standard-Gießverfahren hergestellt werden (vgl. Abschnitt 3.2.4). Die Eigenschaften dieser Filme sollten durch Variation der Enzymkonzentration und des Herstellungsverfahrens optimiert werden. Eine plastifizierende Wirkung des im Rohkollagen enthaltenen Fettes sollte ebenfalls untersucht werden. Eine Charakterisierung der Filme hinsichtlich mechanischer Zugeigenschaften, Benetzbarkeit, Wasserlöslichkeit, Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit und Bioabbaubarkeit wurde durchgeführt.

3.2.5.1 Variation der MTG Activa[®]WM-Konzentration

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass durch eine MTG_{Activa}-Vernetzung des Rohkollagens die mechanischen Eigenschaften unplastifizierter Filme verringert wurden – der Verlust der ZF betrug 18 % (vgl. Abschnitt 3.2.4). Dabei wurde eine Enzymkonzentration von 25 U/g_{Protein} eingesetzt (bezogen auf Herstellerangaben: 100 U/g MTG Activa[®]WM). Wie andere Enzymkonzentrationen die ZF und BD von unplastifizierten RK-Filmen beeinträchtigten, wird in diesem Abschnitt dargelegt. Eine Reduzierung der MTG-Menge unter Erhalt der Filmeigenschaften wäre vorteilhaft, da die Transglutaminase der preisintensivste Rohstoff bei der Filmherstellung ist und dadurch Materialkosten eingespart werden könnten [Patzsch, 2010]. Zur Untersuchung des Einflusses der MTG Activa[®]WM-Konzentration auf die mechanischen Eigenschaften wurden Filme nach der in Abschnitt 2.3.6.1 beschriebenen Standardmethode hergestellt. Die Enzymkonzentrationen variierten zwischen 0-50 U/g_{Protein} MTG Activa[®]WM (vgl. Abschnitt 2.3.6.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-17 dargestellt.

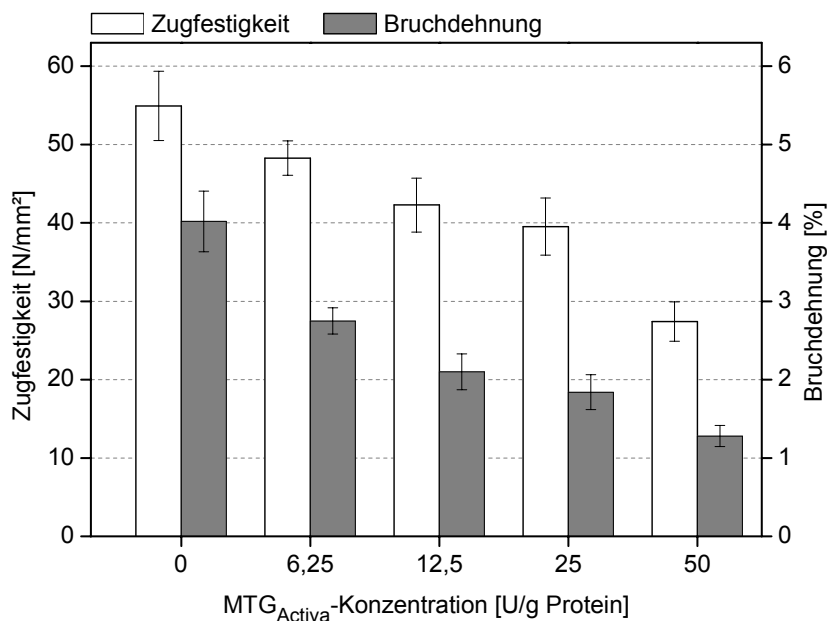


Abbildung 3-17: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen in Abhängigkeit von der MTG Activa[®]WM-Konzentration (bezogen auf Herstellerangaben: 100 U/g MTG Activa[®]WM). 6 g Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von MTG Activa[®]WM (0/ 0,375/ 0,75/ 1,5/ 3 g; jeweils in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23±2 °C und 50±5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. Werte in Tabelle 8-2. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

Beide mechanischen Kennwerte wurden durch die MTG Activa[®]WM-Konzentration beeinflusst. Mit steigender Enzymkonzentration verloren die Proteinfilme an Stabilität und Elastizität. Betrug die Zugfestigkeit eines unvernetzten Filmes ($0 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$) 55 N/mm^2 , konnte bei einem mit $50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ MTG Activa[®]WM-vernnetzten Film nur eine ZF von 27 N/mm^2 ermittelt werden. Das entspricht einem Verlust der Zugfestigkeit um 50 %. Die Bruchdehnung wurde mit zunehmender MTG Activa[®]WM-Konzentration um 68 % verringert. Eine BD von 4,0 % bei unvernetzten Filmen wurde durch MTG Activa[®]WM-Zugabe ($50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$) auf 1,3 % reduziert. Die bisher im Standardverfahren zur Vernetzung eingesetzte MTG Activa[®]WM-Konzentration von $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ erzielte eine ZF von 40 N/mm^2 und eine BD von 1,8 %. Ursachen für den Verlust der mechanischen Eigenschaften können im steigenden Vernetzungsgrad des Proteins oder in der zunehmenden Menge des in MTG Activa[®]WM enthaltenen Stabilisators Maltodextrin begründet liegen.

3.2.5.2 Einfluss von Maltodextrin auf die mechanischen Eigenschaften

Die kommerziell erhältliche mikrobielle Transglutaminase Activa[®]WM besteht aus 1 % Enzym und 99 % Maltodextrin. Nachdem in Abschnitt 3.2.5.1 ein Einfluss der MTG Activa[®]WM-Konzentration auf die mechanischen Eigenschaften der Rohkollagen-Filme aufgezeigt wurde, sollte der Einfluss des Stabilisators Maltodextrin dabei untersucht werden. Dafür wurde den nach Standardverfahren hergestellten Filmen inaktivierte MTG Activa[®]WM in verschiedenen Konzentrationen ($0\text{-}50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$, entspricht $0\text{-}3 \text{ g}$ Maltodextrin) zugesetzt. Zur Inaktivierung wurde die in Puffer ($20 \text{ mM Tris/HCl pH } 7,0$) gelöste MTG Activa[®]WM 5 min bei $99 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Die mechanische Prüfung der Filme mittels Zugversuch erfolgte wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben. Die Kennwerte wurden mit RK-Filmen, denen aktive MTG Activa[®]WM zugesetzt wurde, verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-18 dargestellt. Dem Maltodextrin konnte ein Einfluss auf die Zugfestigkeit und Bruchdehnung der Filme zugeordnet werden. Die mechanischen Kennwerte sanken mit zunehmender MTG Activa[®]WM-Konzentration (inaktiviert) bzw. Maltodextrin-Anteil stetig. Ein steigender Vernetzungsgrad des Rohkollagens konnte bei diesen Filmen als Ursache für die Reduzierung der Filmstabilität und -elastizität ausgeschlossen werden. Im Konzentrationsbereich $0\text{-}50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ MTG Activa[®]WM (inaktiviert) wurde für die Zugfestigkeit ein Verlust von 29 % ermittelt – Reduzierung von 55 N/mm^2 auf 39 N/mm^2 . Die Bruchdehnung von Filmen ohne MTG Activa[®]WM betrug 4,0 %, eine BD von 1,7 % wurde bei Filmen mit $50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ MTG Activa[®]WM (inaktiviert) gemessen. Das entspricht einem Verlust um 59 %. Im Vergleich, die Verluste der mechanischen Kennwerte vernetzter Proteinfilme (MTG Activa[®]WM, $0\text{-}50 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$) betragen 50 % (ZF) bzw. 68 % (BD). Ein Großteil des Verlustes der mechanischen Eigenschaften von MTG Activa[®]WM-vernnetzten Filmen ist somit dem Stabilisator Maltodextrin im kommerziell verfügbaren Enzympräparat geschuldet.

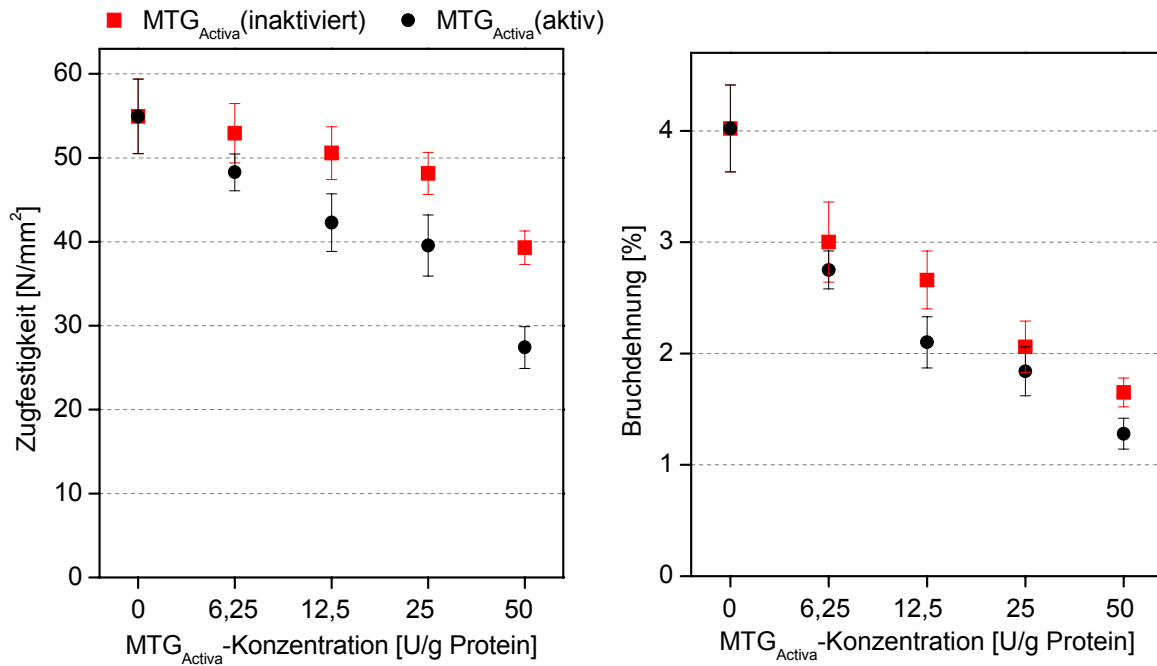


Abbildung 3-18: Einfluss von Maltodextrin (inaktivierte MTG Activa[®]WM) auf die Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration verglichen mit vernetzten Filmen (aktive MTG Activa[®]WM). 6 g Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von MTG Activa[®]WM (0/ 0,375/ 0,75/ 1,5/ 3 g; jeweils in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 gelöst) bzw. inaktivierter MTG Activa[®]WM (0/ 0,375/ 0,75/ 1,5/ 3 g; jeweils in 6 mL 20 mM Tris/HCl pH 7 gelöst; Inkubation für 5 min bei 99 °C; Kühlung auf 50 °C), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23±2 °C und 50±5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. Werte in Tabelle 8-2. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

3.2.5.3 Verwendung einer rekombinanten Transglutaminase (MTG S2P)

Durch den in der MTG Activa[®]WM enthaltenen Stabilisator Maltodextrin wurden die mechanischen Eigenschaften der Rohkollagen-Filme nachteilig beeinflusst. Eine Verringerung der Zugfestigkeit und Bruchdehnung wurde festgestellt (vgl. Abschnitt 3.2.5.2). Um diesen Verlust der mechanischen Filmeigenschaften zu unterbinden, wurde eine in *E. coli* exprimierte, genetisch optimierte, rekombinante MTG für die Vernetzung des Proteins eingesetzt. Aufgrund eines Aminosäureaustausches an zweiter Position – Austausch von Serin gegen Prolin – wurde diese mikrobielle Transglutaminase mit MTG S2P bezeichnet [Marx et al., 2008]. Diese Enzympräparation enthält keine Stabilisatoren.

Zur Untersuchung des Einflusses der MTG S2P-Konzentration auf die mechanischen Kennwerte wurden RK-Filme nach der in Abschnitt 2.3.6.1 beschriebenen Standardmethode hergestellt. Die Enzymkonzentrationen variierten zwischen 0-50 U/g_{Protein} (vgl. Abschnitt 2.3.6.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-19 dargestellt.

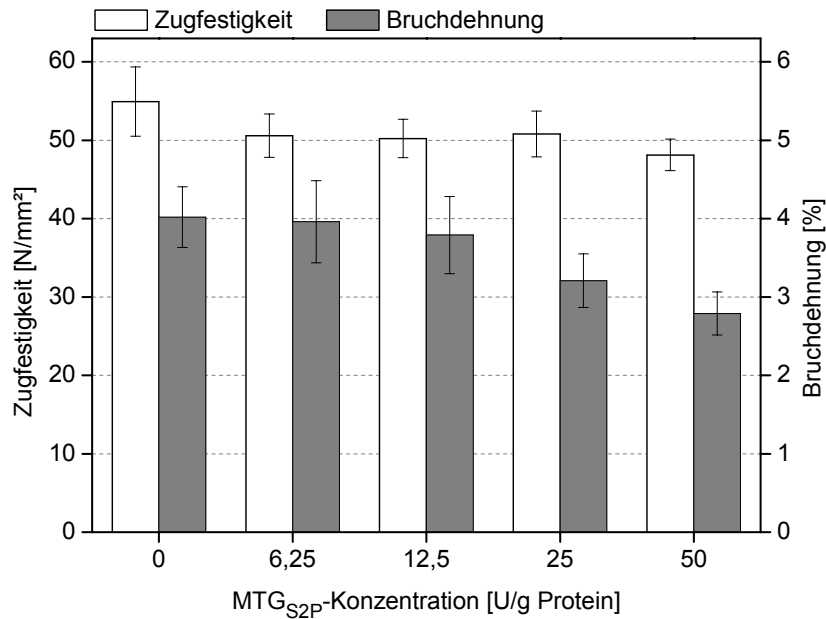


Abbildung 3-19: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen in Abhängigkeit von der MTG S2P-Konzentration (ermittelte Aktivität: 800 U/mL MTG S2P). 6 g Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von MTG S2P (0/ 47/ 94/ 187,5/ 375 µL) und 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23±2 °C und 50±5 % rLF in einem Exsikkator. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. Werte in Tabelle 8-3. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

Die Vernetzung des Proteins mittels MTG S2P zeigte einen geringeren Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften, im Vergleich zum kommerziell verfügbaren Enzympräparat MTG Activa[®]WM. Die Zugfestigkeit wurde durch die MTG_{S2P}-Behandlung nicht merklich beeinflusst. Über den gesamten Konzentrationsbereich lagen die Messwerte der Rohkollagen-Filme im Fehlerbereich – allenfalls ist eine leichte Tendenz zu geringeren Zugfestigkeiten erkennbar. Im Vergleich zu einem unvernetzten Film (55 N/mm²) reduzierte sich die ZF durch Vernetzung mit 50 U MTG_{S2P}/g_{Protein} um maximal 12 % (48 N/mm²). Die Bruchdehnung von unvernetzten Filmen lag bei 4,0 %. Durch die Enzymzugabe und somit kovalente Vernetzung des Proteins sank die Bruchdehnung, allerdings erst ab einer MTG_{S2P}-Konzentration ≥ 25 U/g_{Protein}. Für Filme vernetzt mit 50 U MTG_{S2P}/g_{Protein} wurde eine BD von 2,8 % gemessen, das entspricht gegenüber unvernetzten Filmen einem Verlust von 31 %. Bei MTG Activa[®]WM behandelten Filmen (0-50 U/g_{Protein}) lagen die Verluste bei 50 % (ZF) bzw. 68 % (BD) (vgl. Abschnitt 3.2.5.1).

Die bisher bei der Filmherstellung zur Vernetzung eingesetzte Enzymkonzentration von 25 U MTG_{S2P}/g_{Protein} erzielte eine ZF von 51 N/mm² und eine BD von 3,2 %. Ein mit MTG Activa[®]WM vernetzter Film (25 U/g_{Protein}) erreichte Werte von 40 N/mm² (ZF) und 1,8 % (BD). Wurde einem nach Standardverfahren hergestellten Film neben 25 U MTG_{S2P}/g_{Protein} zusätzlich inaktivierte MTG Activa[®]WM (25 U/g_{Protein}, entspricht 1,5 g Maltodextrin) zugesetzt, konnten mechanische Kennwerte ähnlich dem MTG_{Activa}-vernetzten Film ermittelt werden (41 N/mm²; 2,1 %). Der nachteilige Einfluss des Maltodextrins auf die mechanischen Eigenschaften von MTG Activa[®]WM-behandelten, unplastifizierten Rohkollagen-Filmen wurde somit bestätigt.

3.2.5.4 Variation des Herstellungsverfahrens

Eine weitere Strategie zur Optimierung der mechanischen Eigenschaften unplastifizierter, vernetzter Rohkollagen-Filme war die Änderung des Herstellungsverfahrens. Kollagen ist ein fibrilläres Protein, welches aus einer Tripelhelix aufgebaut ist. Diese Struktur wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Durch Erwärmung ($T > 35-40\text{ °C}$) wird diese tripelhelikale Struktur in Peptid-Einzelketten aufgebrochen. Nach Abkühlung des Proteins bildet sich die Tripelhelix teilweise zurück. Dieser Prozess wird als Renaturierung bezeichnet. Der Übergang von Kollagen zu einem Gelatinesol und -gel durch Erhitzen bzw. Erkalten ist in Abbildung 3-20 bildlich dargestellt.

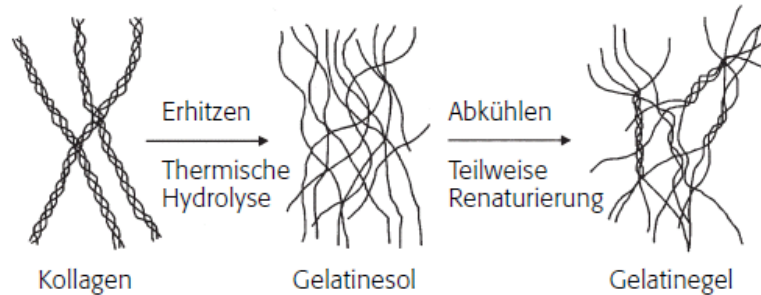


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des Übergangs von Kollagen zu Gelatinesol und -gel durch Erhitzen bzw. Erkalten nach [Babel, 1996].

Erfolgt die Zugabe der mikrobiellen Transglutaminase zur filmbildenden Suspension bei 50 °C , wie beim Standardverfahren angewandt, werden die Peptid-Einzelketten miteinander vernetzt und an einer Renaturierung bei Abkühlung gehindert. Eine Behandlung des sich bildenden RK-Filmes mit MTG nach Gelierung des Proteins, d.h. nach Abkühlung und partieller Ausbildung der stabilen Tripelhelix-Struktur könnte das bestehende Netzwerk weiter vernetzen und zusätzlich stabilisieren. Ein Einfluss der MTG-Behandlung auf die Gelfestigkeit (gemessen mittels Rheometrie) von Gelatine-Lösungen wurde bereits gezeigt – abhängig davon, ob die kovalente Vernetzung vor (Inkubation mit MTG für 15 min bei 50 °C) oder während bzw. nach (Zugabe der MTG unmittelbar vor Kühlung) der Renaturierung der Tripelhelix-Struktur erfolgte [Babin und Dickinson, 2001].

Zur Untersuchung des Einflusses einer MTG-Vernetzung nach Gelierung des Rohkollagens auf die Filmeigenschaften wurde ein Beschichtungsverfahren entwickelt (vgl. Abschnitt 2.3.6.2). Die filmbildende Proteinsuspension wurde analog der Standardmethode angefertigt, allerdings erfolgte nach Inkubation bei 50 °C das Gießen in die $200 \times 200\text{ mm}$ PTFE-Form – ohne Zugabe des Enzyms. Nach Gelierung des Proteins für 2 h bei RT wurde der Film mit MTG-Lösung ($25\text{ U/g}_{\text{Protein}}$) mittels eines Drigalskispatels beschichtet. Die Trocknung und Konditionierung erfolgte analog dem Standardverfahren. In Abbildung 3-21 sind die mechanischen Eigenschaften der nach Standard- und Beschichtungsverfahren hergestellten Rohkollagen-Filme dargestellt.

Die Zugfestigkeit der MTG-vernetzten Filme wurde durch den Herstellungsprozess nicht beeinflusst – alle Messwerte lagen im Fehlerbereich (2-15 %). So wurde unter Verwendung von MTG Activa[®] WM ($25\text{ U/g}_{\text{Protein}}$) für Filme hergestellt nach dem Standardverfahren eine ZF von 40 N/mm^2 und für Filme vernetzt durch das Beschichtungsverfahren von 42 N/mm^2 ermittelt. Bei MTG S2P-vernetzten Filmen betragen die ZF 51 N/mm^2 (Standardverfahren) bzw. 49 N/mm^2 (Beschichtungsverfahren). Die Zugfestigkeit eines unnetzten Filmes (ohne Maltodextrin) lag bei 55 N/mm^2 . Analog der ZF wurde auch die Bruchdehnung von MTG

Activa[®]WM (25 U/g_{Protein})-vernetzten Filmen durch das Herstellungsverfahren nicht merklich beeinflusst. Ein nach dem Standardverfahren hergestellter Proteinfilm erzielte eine BD von 1,8 %, für einen nach dem Beschichtungsverfahren vernetzten Film wurde ein Wert von 2,2 % gemessen. Das entspricht einer Steigerung der BD um 17 % – der Fehlerbereich der Messwerte lag bei 4-16 %. Unter Einsatz der rekombinant hergestellten MTG S2P konnte, im Vergleich zum Standardverfahren, durch die Beschichtung des Filmes eine Steigerung der BD um 38 % erzielt werden (Standard: 3,2 %; Beschichtung: 4,4 %). Eine Bruchdehnung von 4,0 % wurde für unvernetzte Filme gemessen – ohne Zusatz inaktivierter MTG Activa[®]WM.

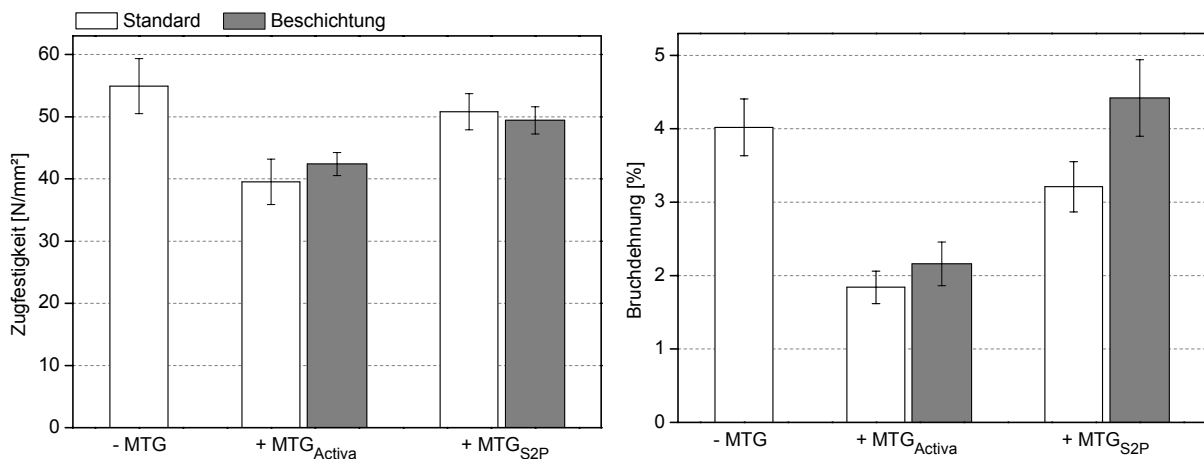


Abbildung 3-21: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG Activa[®]WM bzw. MTG S2P, 25 U/g_{Protein}) in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren. 6 g Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. **Standard:** Zugabe von MTG nach Inkubation bei 50 °C (MTG Activa[®]WM: 1,5 g gelöst in 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7; MTG S2P: 187,5 μ L einer 800 U/mL Präparation + 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7) bzw. 6 mL vorgewärmter 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (-MTG); **Beschichtung:** Überschichtung des für 2 h bei RT gelierten Filmes mit 100 mL MTG-Lösung (MTG Activa[®]WM: 1,5 g gelöst in 100 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7; MTG S2P: 187,5 μ L einer 800 U/mL Präparation zugesetzt zu 100 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7). Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 10. Werte in Tabelle 8-2 und Tabelle 8-3. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

3.2.5.5 Mechanische Eigenschaften nach Fettextraktion

Wie zuvor gezeigt wurde, konnten mechanisch stabile Filme aus Rohkollagen ohne Zusatz eines externen Weichmachers hergestellt werden. Durch den Einsatz einer rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase (MTG S2P) und der Filmherstellung nach dem Beschichtungsverfahren wurden die mechanischen Eigenschaften der Filme optimiert (vgl. Abschnitte 3.2.5.3 und 3.2.5.4). Reine Proteinfilme ohne Weichmacher sind aufgrund der stark ausgeprägten intermolekularen Kräfte zwischen den Polymerketten häufig steif und brüchig. Einen möglichen Grund für die mechanische Stabilität unplastifizierter RK-Filme stellt daher das zu 18,6 % enthaltene Fett dar. Um eine Weichmachereffizienz des Fettes zu untersuchen, wurde das Rohkollagen einer kontinuierlichen Fettextraktion mittels Hexan im Soxhlet-Extraktor wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben, unterzogen. Die Extraktionsdauer betrug 6 h. Nach der Extraktion wurde das Protein vom Lösungsmittel getrennt und getrocknet. Das Hexan wurde mittels Rotationsverdampfer eingeeengt. Als Rückstand verblieb das extrahierte Fett.

Die Herstellung von Filmen aus dem fettextrahierten Protein erfolgte nach den in Abschnitt 2.3.6.1 bzw. 2.3.6.2 beschriebenen Methoden ohne bzw. mit MTG S2P (25 U/g_{Protein})-Vernetzung. Die mechanischen Eigenschaften dieser RK-Filme wurden mit Kennwerten von Filmen ohne Fettextraktion verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-22 dargestellt.

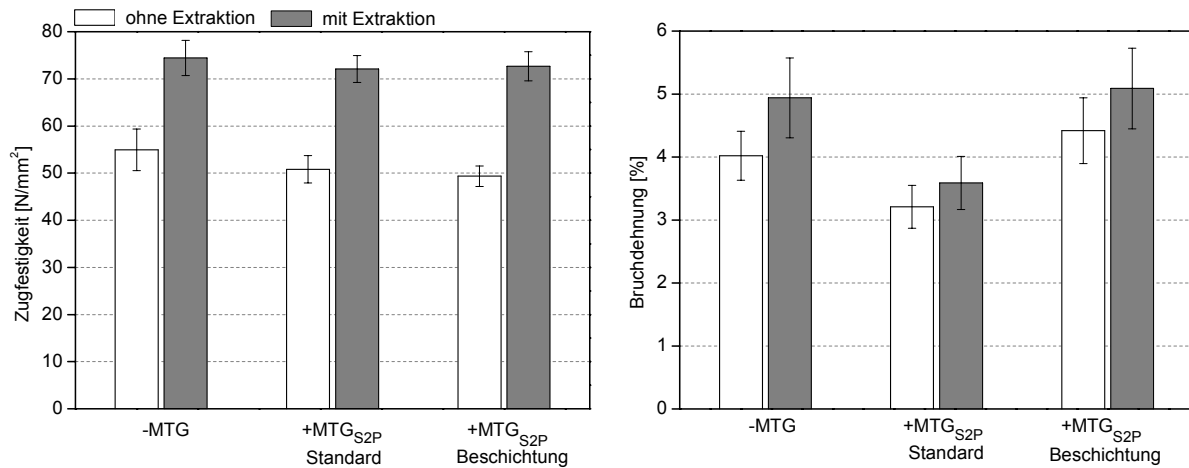


Abbildung 3-22: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen ohne bzw. mit Fettextraktion (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standard- bzw. Beschichtungsverfahren). 6 g Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen, pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. **Standard:** Zugabe von MTG S2P (187,5 μ L einer 800 U/mL Präparation + 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7) bzw. 6 mL vorgewärmter 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (-MTG) nach Inkubation bei 50 °C. **Beschichtung:** Überschichtung des für 2 h bei RT gelierten Filmes mit 100 mL MTG S2P-Lösung (187,5 μ L einer 800 U/mL Präparation zugesetzt zu 100 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7). Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 10. Werte in Tabelle 8-6. MTG...mikrobielle Transglutaminase, PTFE...Polytetrafluorethylen, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

Filme aus dem fettextrahiertem Rohkollagen erzielten höhere Zugeigenschaften, mit und ohne enzymatischer Vernetzung. Ohne Fettextraktion wurde für einen unvernetzten Film eine ZF von 55 N/mm² bestimmt, mit Extraktion erhöhte sich der Wert auf 74 N/mm². Das entspricht einer Steigerung der Zugfestigkeit durch Entfettung des Proteins um 35 %. Bei MTG_{S2P}-vernetzten Filmen (25 U/g_{Protein}) lag die Erhöhung bei 41 % (Standardverfahren) bzw. 47 % (Beschichtungsverfahren). Die ZF der fettfreien RK-Filme wurde durch die rekombinante MTG_{S2P} und somit Ausbildung eines Proteinnetzwerkes nicht beeinflusst. Die Bruchdehnung von Filmen aus fettextrahiertem Rohkollagen ohne MTG-Vernetzung betrug 4,9 %. Verglichen mit Proteinfilmen ohne Extraktion (BD 4,0 %), wurde durch die Entfettung eine Steigerung um 23 % erzielt. Auf die BD von enzymatisch vernetzten Filmen (25 U/g_{Protein} MTG S2P) hatte die Entfettung des Rohkollagens keinen merklichen Einfluss. Die Messwerte lagen im Fehlerbereich (4-16 %) – allenfalls ist eine Tendenz zu leicht höheren Bruchdehnungen erkennbar. In Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren wurde die Elastizität von Filmen aus fettextrahiertem Protein durch die MTG_{S2P}-Vernetzung um 27 % reduziert (Standardverfahren) bzw. nicht beeinflusst (Beschichtungsverfahren), im Vergleich zu einem unvernetzten, fettfreien RK-Film.

Die Schlussfolgerung dieser Untersuchung war, dass das im Rohkollagen enthaltenen Fett eine Plastifizierung der Filme bewirkte. Ohne den Fettanteil waren die Filme fester – allerdings führte die Entfettung nicht wie vermutet zum Verlust der Elastizität.

3.2.5.6 Benetzbarkeit mit Wasser

Die Benetzbarkeit von Rohkollagen-Filmen mit Wasser wurde durch die Bestimmung des Kontaktwinkels ermittelt. Dazu wurde, wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben, ein 5 μL Tropfen deionisiertes Wasser mittels Mikroliter-Spritze auf den Film appliziert. Der Winkel zwischen Film (Basislinie) und Flüssigkeitstropfen wurde automatisch berechnet.

Alle Rohkollagen-Filme, d.h. unvernetzte Filme ohne bzw. mit inaktivierter MTG Activa[®]WM und vernetzte Filme zeigten auf der rauen Filmoberfläche Kontaktwinkel im Bereich von 108°-116° (Abbildung 3-23 B). Die enzymatische Vernetzung des Proteins hatte demnach keinen Einfluss auf die Benetzbarkeit des Filmes. Zwischen MTG Activa[®]WM- und MTG S2P-behandelten Filmen wurden keine Unterschiede der Kontaktwinkel gefunden. Der im kommerziell verfügbaren MTG Activa[®]WM-Präparat zu 99 % enthaltene hydrophile Stabilisator Maltodextrin führte nicht zu veränderten Eigenschaften der Filmoberflächen. Das Herstellungsverfahren beeinflusste die Benetzbarkeit ebenfalls nicht – die Winkel der nach Standard- und Beschichtungsverfahren hergestellten Proteinfilme lagen im genannten Bereich. Einzelne Messpunkte, unabhängig von der Filmherstellung oder Enzympräparation, ergaben Kontaktwinkel zwischen 122°-128° (Abbildung 3-23 C). Eine Ursache für diese Winkel könnte z.B. eine höhere Rauigkeit des Filmes an gemessener Stelle sein, verursacht durch ungelöste Partikel des Proteins. Filme aus dem fettextrahiertem Rohkollagen zeigten ebenso keine Veränderungen. Der Fettanteil (18,6 %) im Protein hatte somit keinen Einfluss auf die Hydrophobizität der Filme. Auf den glatten Unterseiten aller geprüften Filme, d.h. während der Trocknung der PTFE-Form zugewandten Seite, wurden Kontaktwinkel im Bereich von 97°-105° analysiert. Flächen mit Kontaktwinkeln größer 90°, somit auch die Filme aus Rohkollagen, werden als hydrophob bezeichnet. Eine vollständige Benetzbarkeit dieser Filme mit Wasser ist nicht möglich.

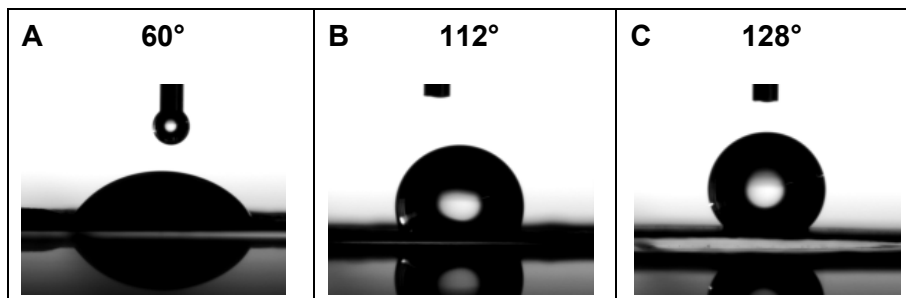


Abbildung 3-23: Bildliche Darstellung der Benetzbarkeit von Rohkollagen-Filmen durch Wasser unter Angabe der Kontaktwinkel. Ein 5 μL Tropfen deionisiertes Wasser wurde mittels Mikroliter-Spritze auf die Filmoberfläche (**A**: RK-Film beschichtet mit kommerziellem Maltodextrin, **B-C**: RK-Film \pm MTG Activa[®]WM bzw. MTG S2P, Standard- bzw. Beschichtungsverfahren) appliziert. Die Filmprobe samt Tropfen wurde photographisch erfasst. Die Berechnung des Winkels zwischen Film (Basislinie) und Wassertropfen erfolgte automatisch mittels der Software SCA20.

Wurde einem RK-Film anstatt inaktivierter MTG Activa[®]WM kommerzielles Maltodextrin aus Maisstärke (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) zugesetzt, ergab sich für den nach dem Standardverfahren hergestellten Film (Oberfläche) ein Kontaktwinkel von 112° und nach dem Beschichtungsverfahren von 60° (Abbildung 3-23 A). Derartig unterschiedliche Kontaktwinkel wurden bei Filmen behandelt mit inaktivierter MTG_{Activa} nicht gefunden. Das bedeutet, dass die MTG Activa[®]WM als Stabilisator vermutlich ein anderes Maltodextrin-Präparat als das kommerziell verfügbare Dextrin enthält. Der reduzierte Kontaktwinkel nach Beschichtung des

Filmes mit dem kommerziellen Maltodextrin wird durch die Polarität des Dextrins begründet. Das Dextrin auf der Filmoberfläche nimmt den Wassertropfen auf, dieser verteilt sich und führt zur partiellen Benetzung des Filmes. In Tabelle 8-7 sind die ermittelten Kontaktwinkel aller untersuchten Rohkollagen-Filme aufgelistet.

3.2.5.7 Löslichkeit in Wasser

Neben der mechanischen Stabilität ist die Wasserlöslichkeit der Proteinfilme ebenfalls von Bedeutung, da z.B. Landwirtschaftsfilme Regen ausgesetzt sind. Die Untersuchung der Löslichkeit von Rohkollagen-Filmen in Wasser wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Eine Filmprobe (10 x 50 mm) wurde bei unterschiedlichen Temperaturen (23-85 °C) für 1 h in Wasser inkubiert und anschließend der Gewichtsverlust der getrockneten Probe ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-24 dargestellt.

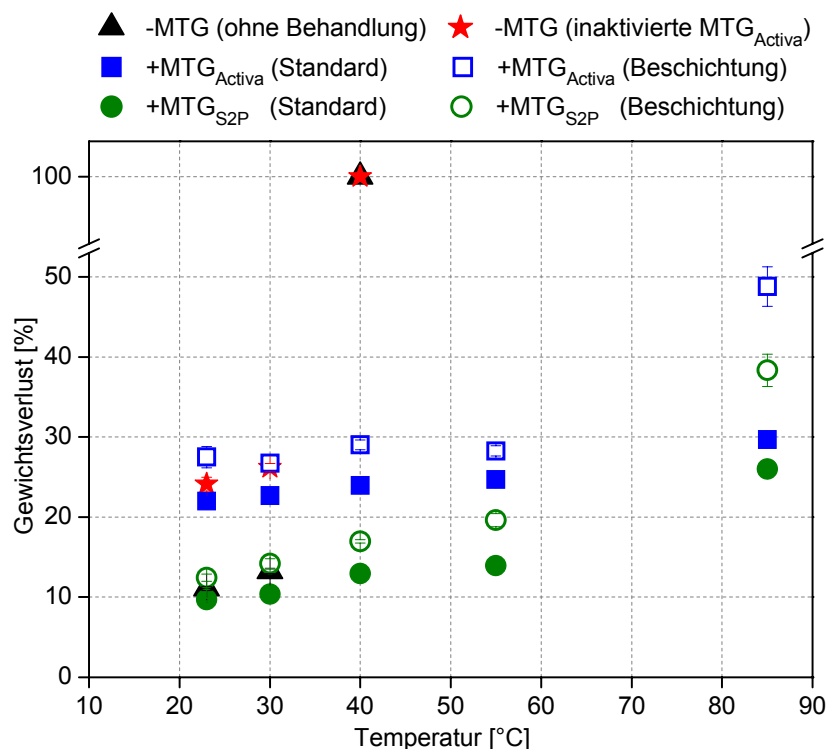


Abbildung 3-24: Einfluss der enzymatischen Vernetzung (\pm MTG, 25 U/g_{Protein}) und des Herstellungsverfahrens auf die Löslichkeit von Rohkollagen-Filmen in Wasser abhängig von der Temperatur (23-85 °C). 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei 23/ 30/ 40/ 55/ 85 °C mittels Thermomixer (500 rpm) geschüttelt, Entnahme der Filmprobe, Trocknung für 24 h bei 70 °C. $\bar{x} \pm s$, n \geq 3. Werte in Tabelle 8-8. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Bis einschließlich einer Temperatur von 30 °C waren die Proben unvernetzter (ohne bzw. mit 25 U/g_{Protein} inaktivierter MTG_{Activa}) sowie vernetzter Rohkollagen-Filme (25 U MTG/g_{Protein} MTG Activa[®]WM bzw. MTG S2P) stabil und konnten dem Wasserbad entnommen werden. Die Gewichtsverluste variierten zwischen 10 % und 28 %, abhängig von der eingesetzten Enzympräparation und dem Herstellungsverfahren. Filme, die durch eine rekombinant hergestellte MTG S2P vernetzt worden waren bzw. unbehandelte Filme (-MTG) zeigten geringere Verluste (10-14 %) als MTG Activa[®]WM-behandelte Rohkollagen-Filme (24-28 %). Diese Differenzen zwischen den beiden Enzympräparationen konnten über den gesamten Temperaturbereich ermittelt werden. Eine mögliche Ursache für den höheren Gewichts-

verlust MTG_{Activa}-behandelter Filme ist das Herauslösen des zu 25 % (w/w Protein) im Film enthaltenen hydrophilen Stabilisators Maltodextrin bei Kontakt mit Wasser und wurde später untersucht. Die unvernetzten Rohkollagen-Filme lösten sich bei 40 °C vollständig auf, d.h. der Gewichtsverlust betrug 100 %. Durch die enzymatische Vernetzung (+MTG) des Proteins konnte die Wasserlöslichkeit erheblich verringert werden. Einer Temperaturerhöhung bis auf 85 °C hielten diese Filme stand. Die Gewichtsverluste vernetzter Filme bei 40 °C lagen zwischen 13 % (MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) und 30 % (MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Beschichtungsverfahren). Bei einer Wassertemperatur von 85 °C variierten die Verluste der Filme zwischen 26-48 %. Über den gesamten Temperaturbereich war erkennbar, dass Filme vernetzt nach dem Standardverfahren geringere Löslichkeit aufzeigten als Filme die nach dem Beschichtungsverfahren behandelt waren – trotz gleicher Enzymkonzentration. Betrug bei 85 °C der Gewichtsverlust eines mit 25 U MTG_{S2P}/g_{Protein} vernetzten Rohkollagen-Filmes hergestellt nach dem Standardverfahren 26 %, wurde für den nach Beschichtungsverfahren angefertigten Film ein Verlust von 38 % verzeichnet.

Einfluss von Maltodextrin auf die Wasserlöslichkeit

Rohkollagen-Filme vernetzt mit MTG Activa[®]WM wiesen über den gesamten Temperaturbereich (23-85 °C) höhere Gewichtsverluste als Filme mit MTG S2P-Vernetzung auf. Ein Herauslösen des hydrophilen Stabilisators Maltodextrin aus MTG_{Activa}-vernetzten Filmen bei Wasserkontakt wurde als Ursache für diese Differenzen nachfolgend untersucht. Dafür wurden RK-Filme mit inaktivierter MTG Activa[®]WM (0-50 U/g_{Protein}, entspricht 0-3 g Dextrin) nach dem Standardverfahren (vgl. Abschnitt 2.3.6.1) hergestellt. Der Löslichkeitstest erfolgte bei einer Wassertemperatur von 23 °C. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-25 dargestellt.

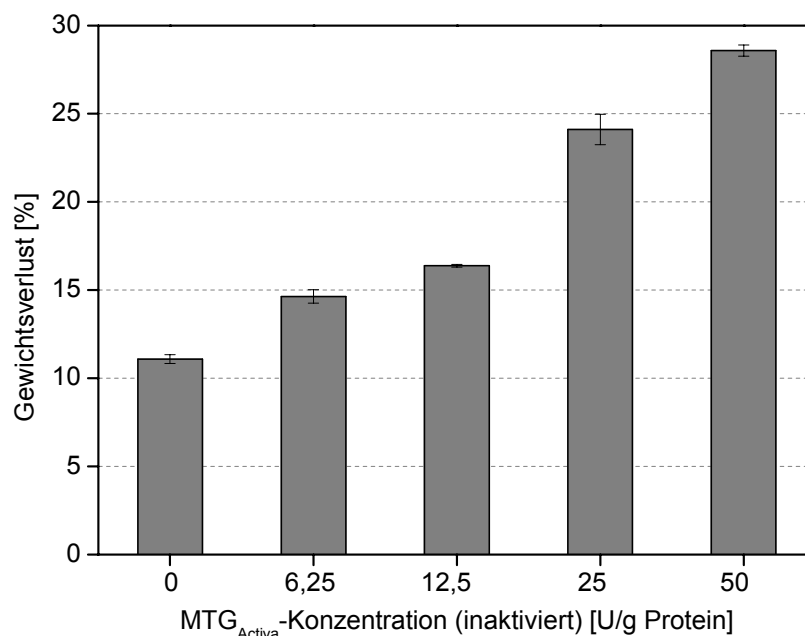


Abbildung 3-25: Einfluss von Maltodextrin (inaktivierte MTG Activa[®]WM, 0-50 U/g_{Protein}) auf die Löslichkeit von Rohkollagen-Filmen (Standardverfahren) in Wasser bei 23 °C. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei 23 °C mittels Thermomixer (500 rpm) geschüttelt, Entnahme der Filmprobe, Trocknung für 24 h bei 70 °C. $\bar{x} \pm s$, n \geq 3. Werte in Tabelle 8-8. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Die Gewichtsverluste der Filme erhöhten sich mit steigendem Maltodextrin-Anteil bzw. Enzymkonzentration (inaktiviert) stetig. Ohne MTG_{Activa}, d.h. ohne Dextrin (0 U/g_{Protein}) wurde

ein Verlust von 11 % ermittelt. Bei Filmen mit einem Maltodextrin-Anteil von 0,75 g (entspricht 12,5 U/g_{Protein} inaktivierte MTG Activa[®]WM) bzw. 3 g (50 U/g_{Protein} inaktivierte MTG Activa[®]WM) wurden Gewichtsverluste von 16 % und 29 % gemessen. Das wasserlösliche Maltodextrin der kommerziell erhältlichen MTG-Präparation hat demnach einen Einfluss auf den erhöhten Gewichtsverlust von MTG Activa[®]WM-vernetzten Proteinfilmen.

Einfluss der Enzymkonzentration auf die Wasserlöslichkeit

Rohkollagen-Filme, die einer Wassertemperatur von 85 °C über eine Stunde standhielten, konnten durch enzymatische Vernetzung des Proteins (25 U/g_{Protein} MTG) hergestellt werden. Unvernetzte RK-Filme lösten sich bei 40 °C auf. Eine Reduzierung der Enzymkonzentration unter Erhalt des Löslichkeitsverhaltens wäre von Vorteil, da die MTG den preisintensivsten Rohstoff bei der Filmherstellung darstellt. Die Untersuchung zum Einfluss der Enzymkonzentration auf die Wasserlöslichkeit erfolgte für MTG S2P-vernetzte Rohkollagen-Filme (0-50 U/g_{Protein}), hergestellt nach dem Standardverfahren (vgl. Abschnitt 2.3.6.1). Der Löslichkeitstest wurde bei Wassertemperaturen von 55 °C und 85 °C durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-26 dargestellt.

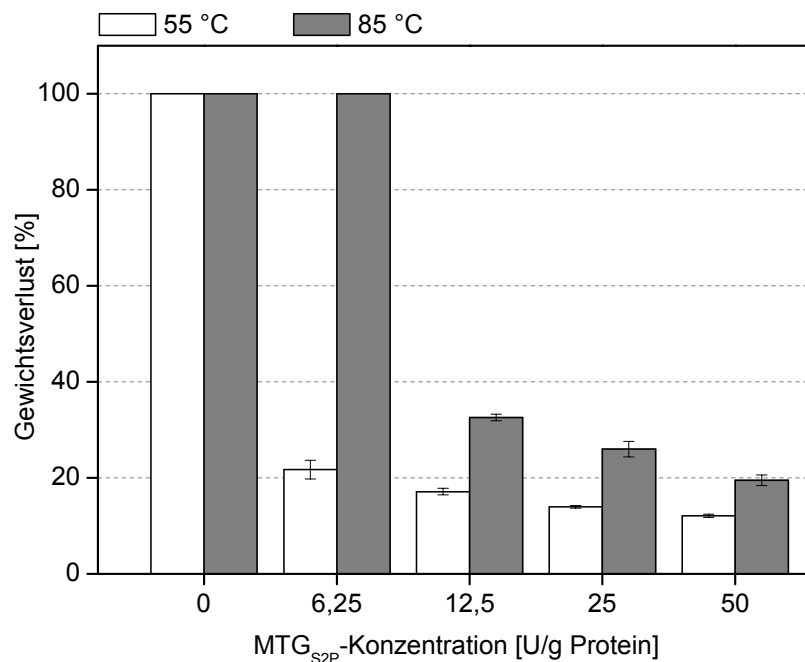


Abbildung 3-26: Einfluss der Enzymkonzentration (\pm MTG S2P, 0-50 U/g_{Protein}) auf die Löslichkeit von Rohkollagen-Filmen (Standardverfahren) in Wasser bei 55 °C bzw. 85 °C. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei 55 °C/ 85 °C mittels Thermomixer (500 rpm) geschüttelt, Entnahme der Filmprobe, Trocknung für 24 h bei 70 °C. $\bar{x} \pm s$, n \geq 3. Werte in Tabelle 8-8. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Die Löslichkeit der Filme in Wasser war vom Vernetzungsgrad des Proteins abhängig. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration verringerte sich der Gewichtsverlust, d.h. die Löslichkeit der Filme nahm ab. Bei 55 °C wurde für Filme mit 6,25 U MTG_{S2P}/g_{Protein} ein Gewichtsverlust von 22 % verzeichnet. Bei Filmen vernetzt mit 50 U/g_{Protein} betrug der Verlust 12 %. Das entspricht einer Reduzierung der Wasserlöslichkeit um 46 %. Eine Enzymkonzentration von 6,25 U/g_{Protein} war allerdings nicht ausreichend, um den Film bei 85 °C zu erhalten. Analog einem unvernetzten Film löste sich dieser im Wasserbad vollständig auf (100 % Gewichtsverlust). Ein mit 12,5 U/g_{Protein} MTG_{S2P}-vernetzter Proteinfilm konnte dieser Wassertemperatur standhalten, der Gewichtsverlust betrug 33 %. Verluste von 26 % bzw. 19 % wurden für

Filme vernetzt mit 25 bzw. 50 U/g_{Protein} MTG S2P nach einstündiger Inkubation bei 85 °C analysiert.

Für die nach dem Beschichtungsverfahren hergestellten RK-Filme konnte der gleiche Trend bezüglich der Löslichkeit ermittelt werden (Werte nicht graphisch dargestellt). Je höher die Enzymkonzentration war, desto geringer war der Gewichtsverlust. Im Vergleich zum Standardverfahren erzielten die nach dem Beschichtungsverfahren hergestellten RK-Filme höhere Verluste. Betrug bei einer Wassertemperatur von 55 °C der Gewichtsverlust eines mit 25 U MTG_{S2P}/g_{Protein} vernetzten Filmes nach Standardverfahren 14 %, wurde ein Verlust von 20 % bei dem nach Beschichtungsverfahren vernetzten Film ermittelt. Bei einer Temperatur von 85 °C wurden Gewichtsverluste von 26 % (Standardverfahren) bzw. 38 % (Beschichtungsverfahren) ermittelt. Eine detaillierte Auflistung der Gewichtsverluste findet sich in Tabelle 8-8.

Einfluss der Fettextraktion auf die Wasserlöslichkeit

Die Fettextraktion des Rohkollagens mittels Hexan führte zu einem Material, dessen Filme höhere mechanische Kennwerte (ZF↑, BD↑) erreichten als Filme ohne Extraktion. Der Einfluss des Fettes auf die Wasserlöslichkeit der RK-Filme wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-27 dargestellt.

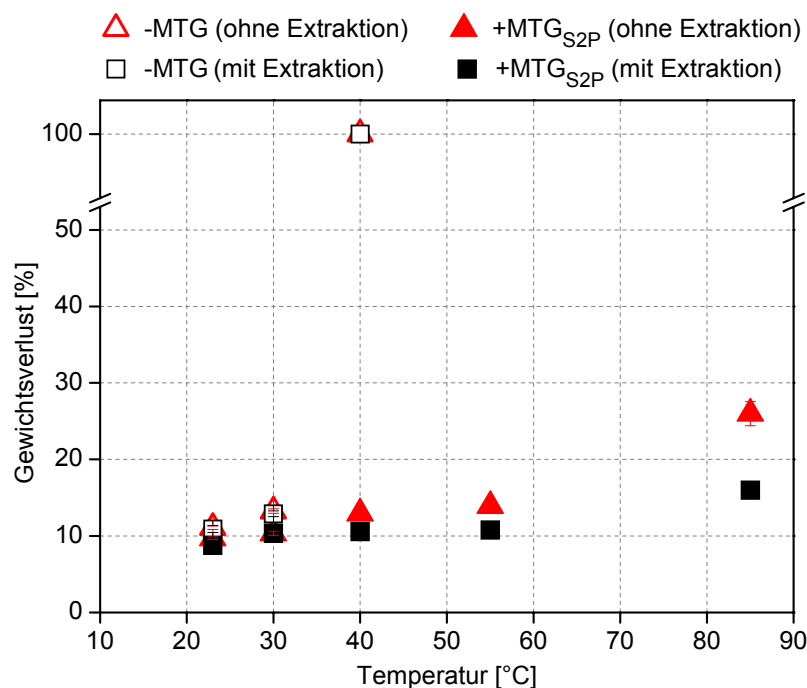


Abbildung 3-27: Einfluss der Fettextraktion auf die Löslichkeit von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) in Wasser abhängig von der Temperatur. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei 23/ 30/ 40/ 55/ 85 °C mittels Thermomixer (500 rpm) geschüttelt, Entnahme der Filmprobe, Trocknung für 24 h bei 70 °C. $\bar{x} \pm s$, n \geq 3. Werte in Tabelle 8-8. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Für unvernetzte Rohkollagen-Filme, mit und ohne Fettextraktion, ergaben sich gleiche Gewichtsverluste. Bei einer Wassertemperatur von 23 °C betrug der Verlust 11 %, bei 30 °C 13 %. Höheren Temperaturen konnten beide Filme nicht standhalten, sie lösten sich vollständig im Wasser auf (100 % Gewichtsverlust). Vernetzte Rohkollagen-Filme (25 U MTG_{S2P}/g_{Protein}), hergestellt nach dem Standardverfahren, waren über den gesamten Temperaturbereich (23-85 °C) stabil. Die Gewichtsverluste der Filme variierten allerdings mit

steigender Temperatur voneinander, abhängig vom Fettgehalt. Bei 30 °C betrug der Gewichtsverlust beider Filme 10 %. Verluste von 14 % (ohne Extraktion) bzw. 11 % (mit Extraktion) wurden bei einer Wassertemperatur von 55 °C ermittelt. Die Differenz der Gewichtsverluste wurde bei 85 °C auf 26 % (ohne Extraktion) und 16 % (mit Extraktion) erhöht. Das entspricht einem, um 40 % verringerten Gewichtsverlust des Rohkollagen-Filmes nach Entfettung. Ursachen für diese Differenzen können in einer verbesserten MTG-Vernetzbarkeit des fettfreien Rohkollagens und einem daraus resultierend dichteren Proteinnetzwerk begründet liegen. Zudem lösten sich möglicherweise aus den Filmen ohne Extraktion mit steigender Temperatur Substanzen, wie z.B. das Fett, die durch die Hexan-Extraktion vom Rohmaterial abgetrennt wurden.

3.2.5.8 Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit

Um eine Anwendung in der Landwirtschaft zu ermöglichen, sollten Proteinfilme gegenüber Umwelteinflüssen wie Regenschauern und Sonnenschein beständig sein. Ebenfalls ist eine Beständigkeit der mechanischen Filmeigenschaften wie Festigkeit und Elastizität über einen längeren Zeitraum notwendig. Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Regenbeständigkeit von plastifizierten Filmen aus Natrium-Caseinat und Gelatine auf wenige Tage begrenzt ist, gekoppelt mit einem Verlust der mechanischen Eigenschaften bis zur Versprödung der Filme. Dieser Verlust war dem Herauslösen des hydrophilen Weichmachers Glycerin aus den Filmen geschuldet [Patzsch, 2010].

Die Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit von Rohkollagen-Filmen ohne externen Weichmacher wurde wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben, durchgeführt. Filme (200 x 200 mm) wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde mit Wasser geflutet und anschließend getrocknet. Diesem Bewitterungszyklus (Wässerung-Trocknung) wurde ein Proteinfilm bis zu vier Mal ausgesetzt. Nach Konditionierung wurden die Filme einer mechanischen Prüfung mittels Zugversuch unterzogen. Es wurden RK-Filme ohne und mit enzymatischer Vernetzung (MTG S2P, 25 U/g_{Protein}), die nach dem Standardverfahren hergestellt wurden, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-28 dargestellt.

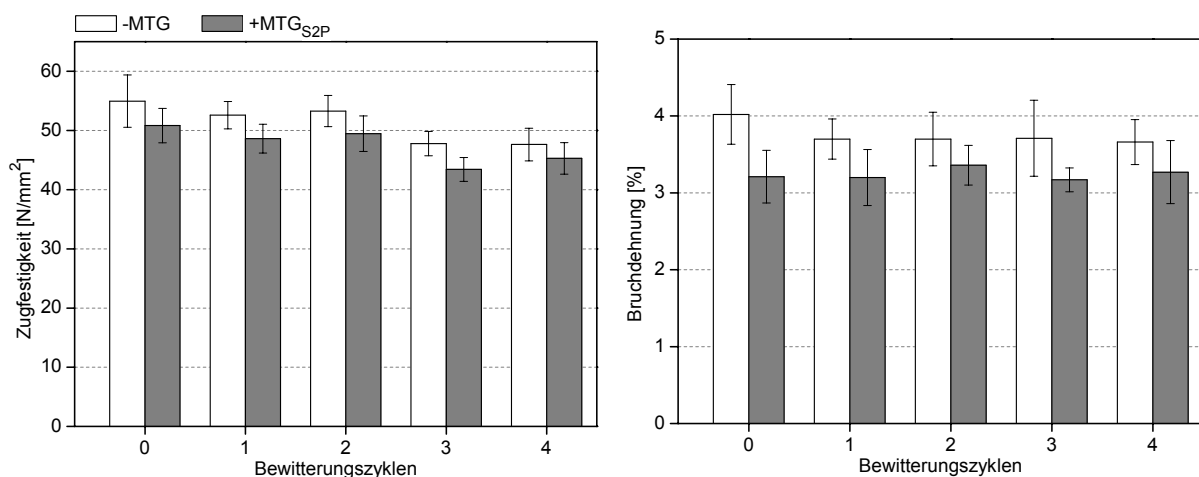


Abbildung 3-28: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) in Abhängigkeit von der Anzahl der Bewitterungszyklen (Wässerung-Trocknung). Rohkollagen-Filme (200 x 200 mm) bei RT für 1 h mit dH₂O geflutet, Trocknung bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23 \pm 2 °C und 50 \pm 5 % rLF in einem Exsikkator. Bewitterungszyklus pro Film bis zu vier Mal wiederholt. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, n \geq 5. Werte in Tabelle 8-5. MTG...mikrobielle Transglutaminase, rLF...relative Luftfeuchte, RT...Raumtemperatur.

Beide Filme, ohne bzw. mit MTG S2P, waren über die vier Bewitterungszyklen stabil und mechanisch messbar. Die Zugfestigkeit der Filme wurde durch die Bewitterung geringfügig beeinflusst. Ein Verlust von 13 % wurde nach vier Zyklen für unvernetzte RK-Filme verzeichnet – Reduktion von 55 auf 48 N/mm². Die ZF von MTG_{S2P}-vernetzten Filmen ohne Bewitterung betrug 51 N/mm². Nach dem vierten Bewitterungszyklus wurde noch eine ZF von 45 N/mm² gemessen. Das entspricht einem Verlust von 11 % und liegt somit im Fehlerbereich der Messwerte (2-15 %). Bis zum zweiten Zyklus waren die Zugfestigkeiten beider Filme (\pm MTG) konstant. Auf die Bruchdehnung der Rohkollagen-Filme hatte die Bewitterung keinen Einfluss. Lediglich ist eine leichte Tendenz zu geringeren Bruchdehnungen für Filme ohne MTG-Vernetzung erkennbar (4,0 \rightarrow 3,7 %). Für MTG_{S2P}-vernetzte Filme wurde bis zum vierten Zyklus eine BD von 3,25 \pm 0,1 % gemessen. Die RK-Filme werden trotz geringer Verluste der mechanischen Eigenschaften über vier Wässerung-Trocknung-Zyklen als regen- bzw. witterungsbeständig eingestuft.

Während der Untersuchung zur Witterungsbeständigkeit wurden optische Veränderungen der Rohkollagen-Filme bei Kontakt mit Wasser beobachtet (Abbildung 3-29). Der ursprünglich gelbliche Film (A) zeigte nach einstündiger Wässerung eine weiße Färbung (B) mit hoher Opazität (Lichtundurchlässigkeit). Des Weiteren führte die Wasseraufnahme zu einer Erweichung des Filmes. Die Dimensionsänderung der RK-Filme aufgrund der Quellung des Proteins war minimal. Die anschließende Trocknung bei Raumtemperatur führte zu einer ungleichförmigen Filmprobe, deren Optik dem Ausgangsfilm glich (C). Um die Verformung der Filme zu vermeiden, wurden die Rohkollagen-Filme während des Witterungsversuches in einem Acrylglas-Rahmen fixiert.

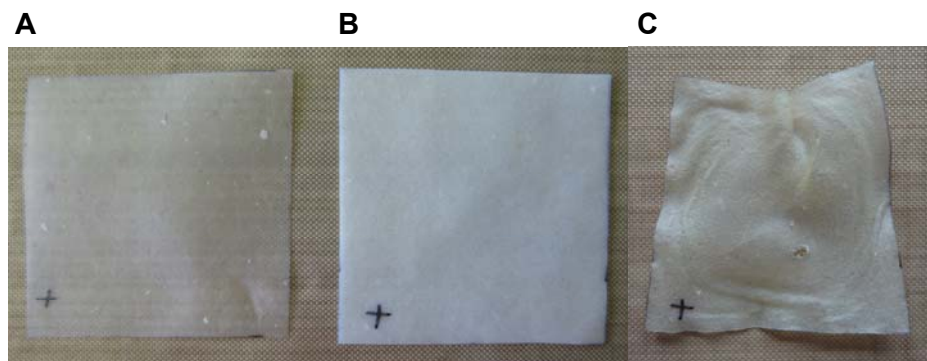












Abbildung 3-29: Erscheinungsbild eines enzymatisch vernetzten Rohkollagen-Filmes (MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) während des Witterungsversuches. **A:** vor Bewitterung, **B:** direkt nach einstündiger Wässerung, **C:** nach Trocknung bei Raumtemperatur.

3.2.5.9 Biologischer Abbau

Für Anwendungen von Proteinfilmen in der Landwirtschaft ist neben der Witterungsbeständigkeit deren Abbaubarkeit im Boden von Bedeutung. Die Untersuchung der Abbaubarkeit von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) wurde wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, durchgeführt. Eine Übersicht der fotografischen Dokumentation des Abbauverhaltens vernetzter Filme befindet sich in Tabelle 3-1. Da die enzymatische Vernetzung des Proteins keinen Einfluss auf die Bioabbaubarkeit der Filme zeigte, wurde auf die Darstellung des Abbaus unvernetzter Filme (-MTG) verzichtet. Beide Filme konnten über eine Versuchsdauer von 45 Tagen dem Boden entnommen werden.

Nach 60 Tagen waren die Filme vollständig zersetzt, eine Entnahme war nicht mehr möglich. Während der Untersuchung erlitten die Filme eine Erweichung und Verfärbung. Bereits nach 4 d hatte sich der ursprünglich gelblich, stabile RK-Film in einen weißlich, weichen Film verwandelt, analog der in Abschnitt 3.2.5.8 aufgezeigten Beobachtungen (Quellung durch Wasseraufnahme). Die Handhabung und Entnahme des Filmes aus dem Boden wurden dadurch erschwert. Nach 10 Tagen traten erste oberflächliche Verfärbungen des Filmes auf, verursacht durch die Bildung von Schimmelpilzkulturen. Im gleichen Zeitrahmen kam es zu ersten Abbaueffekten an den Filmrändern, die sich mit der Versuchsdauer verstärkten. Nach 22 Tagen wurden erste Fehlstellen wie z.B. Risse im Film nachgewiesen. Nach 35 Tagen konnten dem Boden keine intakten RK-Filme, sondern nur noch Bruchstücke entnommen werden. Sehr kleine Stücke waren komplett zersetzt.

Tabelle 3-1: Fotografische Dokumentation der Abbaubarkeit von Rohkollagen-Filmen (+MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) im Boden. Filmproben (40 x 40 mm) wurden vollständig in Pikiererde vergraben. Der Boden wurde durch täglich Wässerung mit 90 mL dH₂O feucht gehalten. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (Versuchsdauer: 60 Tage) wurden Proben der Erde wenn möglich entnommen und fotografisch dokumentiert und bewertet. Pro Versuchstag erfolgte eine Doppelbestimmung. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

0 d 	2 d 	4 d 	7 d 
10 d 	14 d 	22 d 	28 d 
35 d 	45 d 	60 d keine Entnahme/ vollständiger Abbau	

3.2.5.10 Vergleich von Rohkollagen-Filmen mit Filmen anderer tierischer Proteine

Die Herstellung von Filmen aus tierischen Proteinen wie Gelatine und Caseinat sowie deren Eigenschaften wurden umfangreich untersucht [Bruno et al., 2008; Chambi und Grosso, 2006; de Carvalho und Grosso, 2004; Patzsch, 2010; Taylor et al., 2002]. Dabei kamen meist Weichmacher und Vernetzungsmittel zur Optimierung der Filmeigenschaften zum Einsatz. Aus dem Rohkollagen (RK) konnten stabile, mechanisch messbare Filme ohne

Zusatz eines Plastifizierungsmittels hergestellt werden. Die Vernetzung des Proteins mittels mikrobieller Transglutaminase führte zur Verringerung der Wasserlöslichkeit bei hohen Temperaturen. Die Filme waren über vier Bewitterungszyklen (Wässerung-Trocknung) beständig. Eine rekombinant hergestellte Transglutaminase (MTG S2P) erwies sich gegenüber der kommerziell verfügbaren MTG Activa[®]WM als vorteilhaft. Um die Eigenschaften der RK-Filme bewerten zu können, wurde ein Vergleich mit Gelatine- und Natrium-Caseinat-Filmen ohne externe Weichmacher durchgeführt. Der Einfluss der enzymatischen Vernetzung auf die mechanischen Eigenschaften und die Wasserlöslichkeit der Proteinfilme wurde untersucht.

Filmherstellung und mechanische Charakterisierung

Filme aus Gelatine (300 Bloom) und Natrium-Caseinat ohne Zusatz eines Weichmachers wurden nach dem, wie in Abschnitt 2.3.6.1 beschriebenem Standardverfahren hergestellt. Für die Vernetzung der Proteine wurden die kommerziell erhältliche MTG Activa[®]WM und die rekombinante MTG S2P (je 25 U/g_{Protein}) eingesetzt. Gelatine-Filme wurden zusätzlich nach dem Beschichtungsverfahren angefertigt (vgl. Abschnitt 2.3.6.2).

Filme ohne Vernetzung (ohne Maltodextrin) konnten für beide Proteine der Gussform schadensfrei entnommen werden (Abbildung 3-30). Die Gelatine-Filme waren transparent, die NaCas-Filme leicht gelblich gefärbt.

Die enzymatische Vernetzung von Natrium-Caseinat mittels MTG Activa[®]WM bzw. MTG S2P führte allerdings zu Filmen mit hoher Brüchigkeit. Eine Entnahme der Filme aus der PTFE-Form ohne Schädigung war nicht möglich. Gelatine-Filme vernetzt mittels MTG Activa[®]WM waren ebenfalls brüchig, unabhängig vom Herstellungsverfahren. Die MTG_{S2P}-vernetzten Gelatine-Filme waren stabiler, eine Entnahme intakter Filme aus der Gussform war möglich. Das Rohkollagen führte unter allen Bedingungen (\pm MTG, Standard- bzw. Beschichtungsverfahren) zu einer erfolgreichen Filmherstellung (vgl. Abschnitt 3.2.5).

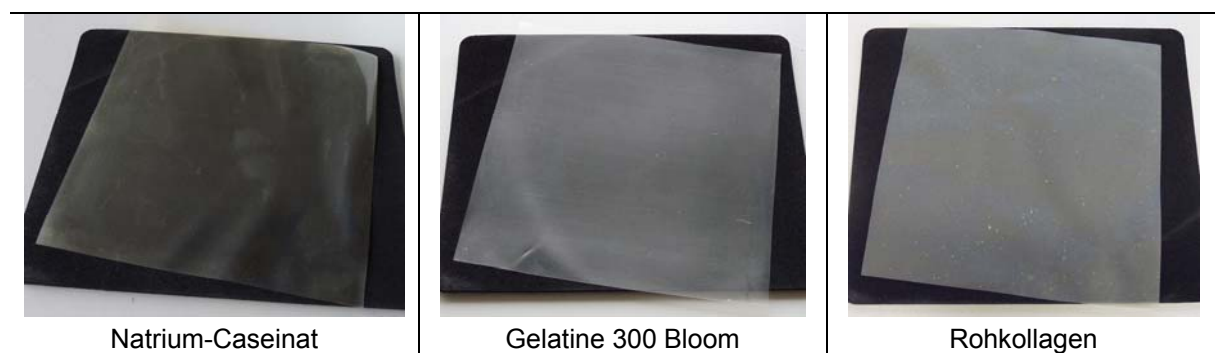


Abbildung 3-30: Filmherstellung aus tierischen Proteinen ohne Weichmacher und ohne enzymatische Vernetzung. 6 g Protein wurde in Puffer (110,4 mL 20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen (NaCas: nach Einwaage Homogenisierung bei 90 °C, Kühlung auf RT; Gelatine: nach Quellung Homogenisierung bei 40 °C), pH-Einstellung auf 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Zugabe von 6 mL vorgewärmten 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (50 °C), Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT. PTFE...Polytetrafluorethylen, RT...Raumtemperatur.

Eine mechanische Prüfung mittels Zugversuch (vgl. Abschnitt 2.2.3) der Natrium-Caseinat-Filme (\pm MTG) sowie der MTG Activa[®]WM-vernetzten Gelatine-Filme war aufgrund der hohen Brüchigkeit nicht möglich. Unvernetzte (-MTG) sowie MTG S2P-vernetzte Gelatine-Filme ohne Weichmacher, hergestellt nach dem Standard- bzw. Beschichtungsverfahren, wurden

indes auf deren mechanische Eigenschaften geprüft und mit Rohkollagen-Filmen (ohne bzw. mit Fettextraktion) verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-31 dargestellt.

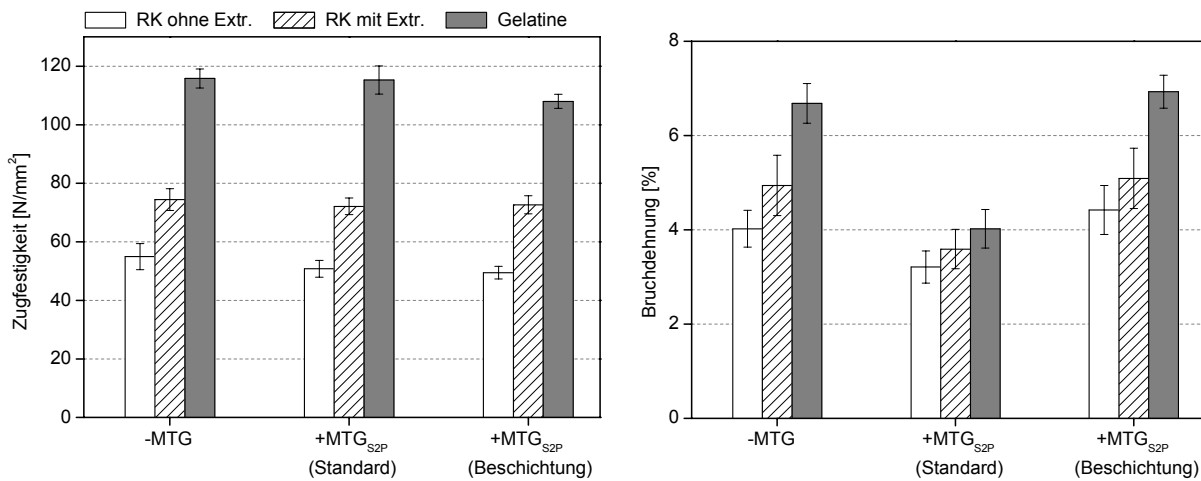


Abbildung 3-31: Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen (300 Bloom) verglichen mit Rohkollagen-Filmen vor bzw. nach Fettextraktion (±MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standard- bzw. Beschichtungsverfahren). 6 g Gelatine bzw. Rohkollagen wurde in 110,4 mL Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) für 30 min bei RT quellen gelassen (Gelatine: Homogenisierung bei 40 °C), pH-Einstellung auf pH 7 unter Rühren, Inkubation für 20 min bei 50 °C, Gießen in eine 200 x 200 mm PTFE-Form, Trocknung für 24 h bei RT, Konditionierung für 48 h bei 23±2 °C und 50±5 % rLF in einem Exsikkator. **Standard:** Zugabe von MTG S2P (187,5 µL einer 800 U/mL Präparation + 6 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7) bzw. 6 mL vorgewärmter 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7 (-MTG) nach Inkubation bei 50 °C. **Beschichtung:** Überschichtung des für 2 h bei RT gelierten Filmes mit 100 mL MTG S2P-Lösung (187,5 µL einer 800 U/mL Präparation zugesetzt zu 100 mL 20 mM Tris/HCl-Puffer pH 7). Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. Werte in Tabelle 8-4 und Tabelle 8-6. Extr...Extraktion, MTG...mikrobielle Transglutaminase, rLF...relative Luftfeuchte, RK...Rohkollagen, RT...Raumtemperatur.

Die unplastifizierten Gelatine-Filme, mit und ohne enzymatischer Vernetzung (25 U/g_{Protein} MTG S2P), waren im Vergleich zu den Rohkollagen-Filmen gegenüber mechanischer Beanspruchung stabiler. Zugfestigkeiten von 108-116 N/mm² wurden für alle Gelatine-Filme unabhängig vom Vernetzungsgrad ermittelt, d.h. die kovalente MTG-Vernetzung hatte keinen erheblichen Einfluss auf diese Filmeigenschaft. Die ZF unvernetzter RK-Filme betrug 55 N/mm² (ohne Extraktion) bzw. 74 N/mm² (mit Extraktion). Analog der Gelatine-Filme wurden die Zugfestigkeiten der Rohkollagen-Filme durch die MTG_{S2P}-Vernetzung nicht beeinflusst. Die Differenzen der Messwerte lagen im Fehlerbereich (2-15 %). Mit einer Bruchdehnung von 6,7 % waren unvernetzte Gelatine-Filme elastischer als RK-Filme (ohne Extraktion: 4 %; mit Extraktion: 4,9 %). Die Elastizität der Gelatine-Filme wurde durch die enzymatische Vernetzung des Proteins um 40 % reduziert (Standardverfahren) bzw. nicht beeinflusst (Beschichtungsverfahren). Für MTG_{S2P}-vernetzte Rohkollagen-Filme wurde in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren hinsichtlich der Bruchdehnung der gleiche Trend charakterisiert.

Löslichkeit in Wasser

Die Untersuchung zur Wasserlöslichkeit der Gelatine-Filme ±MTG S2P (25 U/g_{Protein}) wurde wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben, durchgeführt. Die Wassertemperatur variierte zwischen 23-85 °C. Die Ergebnisse der Löslichkeit von Gelatine-Filmen sind verglichen mit Rohkollagen-Filmen (ohne Extraktion) in Abbildung 3-32 dargestellt.

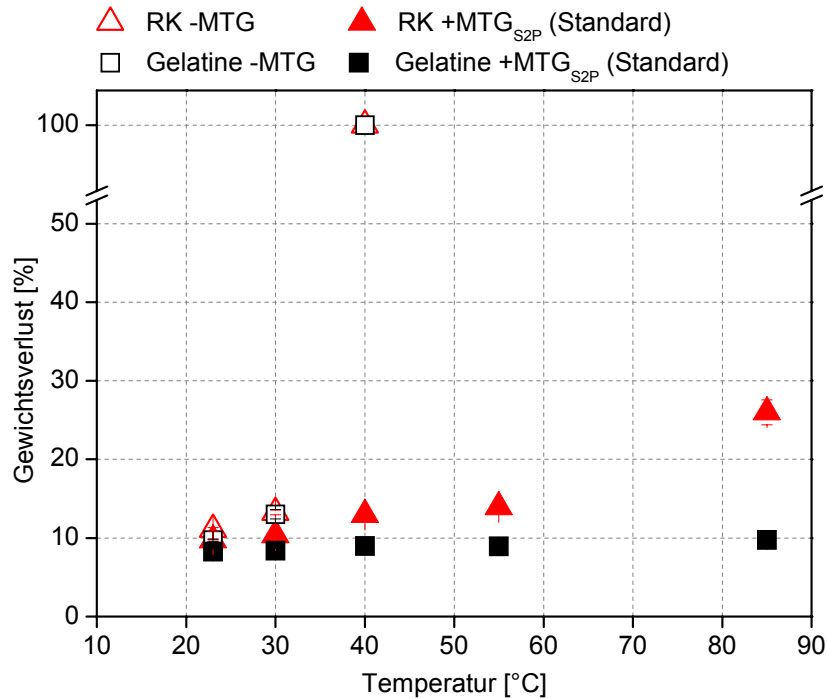


Abbildung 3-32: Löslichkeit von Gelatine-Filmen \pm MTG S2P (25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) in Wasser abhängig von der Temperatur, im Vergleich zu Rohkollagen-Filmen. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei 23/ 30/ 40/ 55/ 85 °C mittels Thermomixer (500 rpm) geschüttelt, Entnahme der Filmprobe, Trocknung für 24 h bei 70 °C. $\bar{x} \pm s$, n \geq 3. Werte in Tabelle 8-9. MTG...mikrobielle Transglutaminase, RK...Rohkollagen.

Gelatine-Filme zeigten eine ähnliche Wasserlöslichkeit wie Rohkollagen-Filme. Die Filme beider Proteine ohne Vernetzung (-MTG) waren bis zu einer Temperatur von 30 °C stabil und konnten dem Wasserbad entnommen werden. Die Gewichtsverluste lagen bei 10-13 %. Bei 40 °C lösten sich beide Proteinfilme vollständig auf (100 % Gewichtsverlust). Die enzymatische Vernetzung der Gelatine mittels MTG_{S2P} führte zur Verbesserung der Wasserresistenz. Analog den RK-Filmen hielten Gelatine-Filme einer Temperatur bis 85 °C stand. Die Gewichtsverluste beider Proteine variierten allerdings zunehmend voneinander. Bei vernetzten Rohkollagen-Filmen (MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) wurde bis zu einer Wassertemperatur von 55 °C ein Gewichtsverlust von 10-14 % verzeichnet. Der Verlust bei 85 °C betrug 26 %. Die Wasserlöslichkeit MTG_{S2P}-vernetzter Gelatine-Filme, hergestellt nach dem Standardverfahren, wurde durch die Temperaturerhöhung nicht beeinflusst. Über den gesamten Bereich (23-85 °C) wurde ein Gewichtsverlust von 8-10 % gemessen. Gelatine-Filme, vernetzt durch das Beschichtungsverfahren (MTG S2P, 25 U/g_{Protein}), wiesen im Vergleich zum Standardverfahren höhere Gewichtsverluste auf – wie bereits für RK-Filme gezeigt (vgl. Abschnitt 3.2.5.7). Die Verluste der Gelatine-Filme stiegen mit Temperaturerhöhung von 11 % (23 °C) auf 22 % (85 °C). Bei Filmen aus Rohkollagen lagen die Verluste bei 12 % bzw. 38 %. Ein möglicher Grund für den höheren Gewichtsverlust der vernetzten RK-Filme bei 85 °C ist das Herauslösen des Fettes oder anderer löslicher Bestandteile. Bei Gelatine wurden diese Substanzen bereits durch den Fertigungsprozess des Proteins abgetrennt. Ein bei den Gelatine-Filmen, aufgrund entfernter Fettmoleküle bzw. unlöslicher Partikel, dichteres Proteinnetzwerk kann ebenso eine Ursache für die Differenzen der Wasserlöslichkeiten darstellen.

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zur kovalenten Modifikation von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen zur Optimierung der Eigenschaften von landwirtschaftlich geeigneten, umweltfreundlichen Filmen auf Proteinbasis. Eine hohe Witterungsbeständigkeit unter Erhalt der mechanischen Stabilität sind Voraussetzungen für eine Anwendung proteinogener Materialien in der Landwirtschaft. Hauptsächlich wurde Rohkollagen (RK), ein bei der Tierschlachtung anfallendes Koppelprodukt, auf dessen Filmbildungspotenzial untersucht und hinsichtlich der gewünschten Eigenschaften charakterisiert. Die kovalente Vernetzung des Proteins mit Hilfe der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) und deren Einfluss auf die Filmeigenschaften stand dabei im Mittelpunkt der Untersuchung. Zur Verbesserung der Hydrophobizität von Proteinen wurde am Modellprotein Natrium-Caseinat zudem eine MTG-induzierte Modifikation mittels Octylamin durchgeführt. Ein weiterer Schwerpunkt bezog sich auf die kovalente Markierung von Natrium-Caseinat mit einem Dichlortriazin-Reaktivfarbstoff.

4.1 Reaktivfarbstoff – Kovalente Markierung von Caseinat

Für eine Optimierung der Eigenschaften proteinbasierender Filme sind Kenntnisse über deren Mikrostruktur von großer Wichtigkeit, da physikochemische, mechanische und Barriereigenschaften eines Proteinfilmes und die resultierende Anwendung vom Aufbau des Proteinnetzwerkes abhängig sind. Durch Färbung einzelner Biomoleküle wird eine Lokalisierung dieser oder auftretender Phasentrennungen innerhalb eines Filmes mittels mikroskopischer Methoden (z.B. CLSM) ermöglicht. Geeignete Fluoreszenzfarbstoffe zur sichtbaren Markierung von Proteinen sind Sypro Orange [Lawrence et al., 2003] und Acid Fuchsin [Lai und Chiang, 2006]. Diese Farbstoffe adsorbieren an das Substrat, d.h. die Färbung ist reversibel. Reaktivfarbstoffe, einst für die Textilindustrie zum Färben von Zellulosefasern oder Faserproteinen entwickelt, gehen indes mit Hilfe reaktiver Gruppen kovalente Bindungen mit dem Substrat ein. Diese Färbung ist permanent und kann ohne Zerstörung des Substrates nicht entfernt werden. Zur Visualisierung von Zell- und Gewebestrukturen in der Medizin [Berlin et al., 1992; Prescott et al., 1968; Rae, 1974] bzw. bildlichen Analyse der Kornstruktur von Stärke [Stute, 1973] fanden Reaktivfarbstoffe bereits Einsatz. Die Untersuchung in der vorliegenden Arbeit hatte das Ziel, Natrium-Caseinat mittels eines Dichlortriazin-Reaktivfarbstoffes – Handelsname Procion Red MX-5B – kovalent zu modifizieren und das markierte Protein auf seine Eignung als MTG-Substrat zu prüfen.

Das Modellprotein Natrium-Caseinat konnte durch Procion Red MX-5B erfolgreich modifiziert werden. Mittels SDS-PAGE wurde nach 120 min Färbereaktion eine kovalente Kopplung von 10-14 Farbstoffmolekülen ($M_w=615,35$ g/mol) an dem Protein analysiert, gekennzeichnet durch eine Molekulargewichtsvergrößerung sowie Rotfärbung der Proteinbande (vgl. Abschnitt 3.1.1.2). Eine genaue Anzahl gebundener Moleküle konnte durch diese Analyse-methode nicht bestimmt werden. Die Reaktion eines Reaktivfarbstoffes mit dem Substrat ist von der Färbezeit, -temperatur, pH-Wert und Farbstoffkonzentration abhängig. Als optimale Färbebedingungen für Natrium-Caseinat wurden eine Temperatur von 25 °C, pH 10,5 und ein Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis $\geq 1:5$ ermittelt. Niedrigere pH-Werte (pH 8-10) bewirkten eine Verzögerung der Färbereaktion, ein Protein_{Lys}:Farbstoff-Verhältnis von 1:1 war für eine erfolgreiche Markierung des Caseinats nicht ausreichend. Eine Korrelation zwischen stark

alkalischen pH-Wert und hoher Reaktionsgeschwindigkeit wurde bereits durch Zahn *et al.* für die Färbung (25 °C, 3 h) einer Kollagenfolie mit Dichlortriazinfarbstoffen erforscht. Die Erhöhung des pH-Wertes war allerdings durch die Hydrolyse des Farbstoffes begrenzt [Zahn und Reinert, 1968]. Rekombinante Rizin A-Ketten wurden durch Procion Blue MX-R bei neutralem pH-Wert und 4 °C über 90 h irreversibel modifiziert. Analog der vorliegenden Arbeit zeigte die SDS-PAGE bereits vor der Coomassie-Behandlung eine Färbung der Proteinbande, wodurch eine Markierung mit dem Triazinfarbstoff nachgewiesen wurde [Alderton *et al.*, 1995].

Für eine MTG-induzierte Vernetzung des modifizierten Caseinats bzw. dessen Bindung an ein unbehandeltes Protein sind reaktive Glutamin- und/oder Lysinreste notwendig. Das farbstoffmarkierte Caseinat konnte allerdings unter den gewählten Bedingungen (23 °C, 120 min) durch die mikrobielle Transglutaminase nicht vernetzt werden. Weder die Bildung eines hochmolekularen Produktes ($M_w > 116$ Da), noch eine Intensitätsabnahme der rotgefärbten Proteinbande wurde mittels SDS-PAGE detektiert. Im Vergleich dazu erfolgte die MTG-Polymerisation der unmodifizierten Casein-Monomere ($M_w \sim 25-32$ kDa) innerhalb von zehn Minuten (vgl. Abschnitt 3.1.1.4). Diese Vernetzung resultierte in NaCas-Filmen mit einer höheren mechanischen Stabilität und verbesserten Wasserresistenz [Patzsch, 2010]. In Gegenwart des gefärbten Caseinats wurde die Polymerbildung verzögert, zur enzymatischen Vernetzung beider Komponenten kam es jedoch nur in sehr geringem Umfang.

Eine Ursache dafür liegt vermutlich in der Unzugänglichkeit reaktiver Glutamin- und Lysinreste nach der kovalenten Modifikation des Proteins. Die fluoreszierenden TG-Substrate Monodansylcadaverin und Dansyl-WQR, zum Nachweis der beiden Aminosäuren, konnten nicht in das modifizierte Caseinat eingebaut werden, d.h. dieses Protein stellt für die mikrobielle Transglutaminase kein Substrat mehr dar (vgl. Abschnitt 3.1.1.5). Eine Absättigung aller reaktiven Lysinreste des Caseinats durch gebundene Farbstoffmoleküle kann dies erklären. Die bei der nukleophilen Substitution bzw. der Hydrolyse des Farbstoffes entstandene Salzsäure kann indes eine Deamidierung der Glutamine bewirkt haben. Die gebildete Glutaminsäure ist für die katalytische Reaktion der MTG ungeeignet. Eine gemutmaßte Deamidierung des modifizierten Caseinats durch die zur Proteingewinnung angewandte Salzsäurefällung konnte allerdings widerlegt werden. Reines Caseinat war nach Säurefällung und Resolubilisierung in Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 7,0) weiterhin mittels MTG Activa[®]WM vernetzbar (vgl. Abschnitt 3.1.1.5). Veränderungen der Aminosäuren oder der Caseinat-Struktur durch die gewählten Bedingungen beim Färbeprozess bzw. Proteingewinnung können nicht ausgeschlossen werden. Osterloh *et al.* konnte nach reaktiver Wollfärbung analytisch zeigen, dass bestimmte Aminosäuren durch den Reaktivfarbstoff Remalanbrilliant Blau chemisch verändert wurden. Neben Cystein, Tyrosin und vor allem Lysin wurden auch endständige Aminosäuren (u.a. Alanin, Glycin, Glutaminsäure, Serin) der Wolle blockiert [Osterloh, 1960].

Ungebundener Reaktivfarbstoff, der trotz ausgiebiger Dialyse nicht vollständig vom modifizierten Caseinat abgetrennt werden konnte, stellt eine weitere mögliche Ursache für die fehlende Vernetzung des Proteins dar. Kovalente Modifikationen von Enzymen durch Triazinfarbstoffe resultierten häufig in einer spezifischen und irreversiblen Inaktivierung. Farbstoffe wie Procion Green H-4G, Procion Red MX-8B oder Procion Brown MX-5BR bewirkten z.B. eine kompetitive Hemmung einer Hefehexokinase [Clonis *et al.*, 1981], Tryptophan-tRNA-Ligase [McArdell *et al.*, 1982] oder Carboxypeptidase [Hughes *et al.*,

1984], indem sie die substratbindende bzw. katalytische Domäne der Enzyme blockierten. Die Inaktivierungen waren zeit-, pH- und temperaturabhängig. Eine Alkoholdehydrogenase wurde durch die Anlagerung von Procion Blue MX-R an die Thiolseitenkette des Cysteins im katalytischen Zentrum innerhalb von 30 min (37 °C, pH 8,5) zu mehr als 90 % inaktiviert [Small et al., 1982]. Die mikrobielle Transglutaminase besitzt in der Substrattasche ebenfalls ein Cystein, welches für die katalytische Aktivität essentiell ist. Eine Interaktion dieser Aminosäure mit ungebundenem Farbstoff des modifizierten Caseinats kann eine Inhibierung des Enzyms und daraus resultierenden Aktivitätsverlust bewirkt haben.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass Natrium-Caseinat erfolgreich durch den Dichlortriazinfarbstoff Procion Red MX-5B modifiziert werden konnte. Die Herstellung eines Filmes aus dem gefärbten Caseinat erfolgte aufgrund fehlender MTG-Vernetzung des Proteins nicht.

4.2 Fettamine – Additive zur Verbesserung der Hydrophobizität

Primäre aliphatische Amine (sogenannte Fettamine, $C_nH_{2n+1}NH_2$) sind organische Komponenten, bestehend aus einer polaren Aminogruppe an die eine Kohlenstoffkette angelagert ist. Mit steigender Kettenlänge erhöht sich deren Hydrophobizität. Durch Modifikationen mit Fettaminen konnten bereits Verbesserungen der Wasserresistenzen verschiedener Materialien erzielt werden. Eine Laccase-vermittelte Kopplung von Dodecylamin ($C_{12}H_{27}N$, Wasserlöslichkeit: 0,078 g/L) an Lignocellulose resultierte in einer gesteigerten Hydrophobizität von Holzurnieren. Der Kontaktwinkel wurde durch die Amin-Behandlung von 58° auf 107° erhöht [Kudanga et al., 2010]. Die Herstellung von superhydrophoben Graphitoxid-Filmen erfolgte durch die Modifikation mit einem langkettigen Fettamin. Octadecylamin ($C_{18}H_{39}N$, wasserunlöslich) wurde dabei vorrangig durch nukleophile Substitutionsreaktionen kovalent an das Graphitoxid gebunden. Die Anlagerung der langen Kohlenstoffketten reduzierte die Oberflächenenergie des Amin-funktionalisierten Filmes und bewirkte eine Zunahme des Kontaktwinkels ($54^\circ \rightarrow 132^\circ$). Nach thermischer Behandlung des modifizierten Graphitoxid-Filmes bei $150^\circ C$ für 1 h und Entfernung der adsorbierten Amin-Moleküle sowie sauerstofftragender, hydrophiler Gruppen des Oxides wurde der Effekt verstärkt. Es entstand eine superhydrophobe Oberfläche mit einem Kontaktwinkel von 163° [Lin et al., 2010].

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel n-Octylamin ($C_8H_{19}N$, Wasserlöslichkeit: 0,2 g/L) kovalent an das Modellprotein Natrium-Caseinat zu binden und dadurch die Hydrophobizität des Proteins bzw. Proteinfilmes zu steigern. Die Modifikation sollte durch das Enzym mikrobielle Transglutaminase katalysiert werden. Für das Enzym zugängliche, protein-gebundene Glutamine sollten dabei nur partiell mit dem Amin reagieren, um anschließend durch Bildung von intra- und intermolekularen Isopeptidbindungen die Herstellung eines MTG-vernetzten Proteinfilmes zu gewährleisten. Enzymatisch vernetzte Caseinat-Filme haben im Vergleich zu unvernetzten Filmen bessere mechanische Eigenschaften (ZF \uparrow , BD \uparrow), sind weniger wasserlöslich und besitzen eine höhere Witterungsbeständigkeit [Patzsch, 2010].

Primäre aliphatische Amine mit einer Kette bis zu sechs C-Atomen konnten bereits als MTG-Substrate identifiziert werden. Dabei offenbarte sich eine Abhängigkeit der Spezifität von der Länge der Alkylgruppe [Ohtsuka et al., 2000]. Octylamin konnte im Laufe dieser Arbeit mittels HPLC-Analyse ebenfalls als Substrat für die MTG ermittelt werden (vgl. Abschnitt 3.1.2.1). Die Aktivität war im Vergleich zu den kurzkettigeren Aminen reduziert. Nach 240 min wurde für die Reaktion mit Butylamin ($C_4H_{11}N$, wasserlöslich) ein Substratumsatz von 65 % und für Hexylamin ($C_6H_{15}N$, Wasserlöslichkeit: 14 g/L) von 60 % ermittelt. Bei der Reaktion mit Octylamin stellte sich nach 150 min ein Umsatz von 50 % ein. Eine weitere Produktbildung folgte nicht. Die Reaktivität der MTG mit den aliphatischen Aminen war wahrscheinlich durch die verringerte Wasserlöslichkeit limitiert. Des Weiteren erzielte die enzymatische Vernetzungsreaktion zwischen dem Modells substrat (Dipeptid Glutaminyl-Glycin) und Octylamin eine Aggregatänderung. Der anfänglich flüssige Reaktionsansatz wandelte sich nach MTG-Zugabe zu einer viskosen, gelartigen Masse um. Dieses Reaktionsprodukt war hydrophob, d.h. in Wasser nicht löslich. Die mittels HPLC analysierte Stagnation der Produktbildung ist vermutlich auf eine steigende Diffusionslimitierung, verursacht durch die Gelierung des Reaktionsansatzes, zurückzuführen. Eine vollständige

Durchmischung des Stoffsystems war nicht mehr gewährleistet. Eine Änderung des Aggregatzustandes trat bei den kurzkettigeren Aminen nicht ein. Von der Länge der Kohlenstoffkette war demnach nicht nur die Substratspezifität der MTG, sondern auch die Polarität des Reaktionsproduktes abhängig.

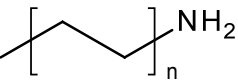
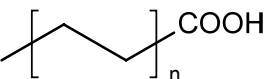
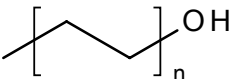
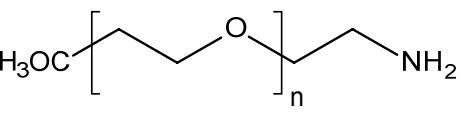
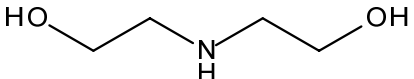
Die Modifikation des Proteins Natrium-Caseinat mit Octylamin, katalysiert durch die mikrobielle Transglutaminase, erfolgte bei 23 °C für 2 h. Mittels SDS-PAGE konnte allerdings keine kovalente Bindung zwischen Amin und Protein analysiert werden (vgl. Abschnitt 3.1.2.2). Die Kopplung von Octylamin-Molekülen ($M_w=129,25$ g/mol) an reaktive, protein-gebundene Glutaminreste hätte in einer Molekulargewichtsvergrößerung und damit Bildung einer neuen Proteinbande resultieren müssen. Da pro Caseinat-Molekül 65 Glutamine verfügbar sind, wäre eine Vergrößerung der Molmasse um maximal 8 kDa möglich gewesen. Eine Bande im Bereich von 30-40 kDa wurde jedoch nicht detektiert. Die MTG-katalysierte Vernetzung der Caseinat-Moleküle untereinander wurde unter den gewählten Reaktionsbedingungen bevorzugt. Dimethylcasein (DMC), in dessen Aminosäuresequenz alle enthaltenen Lysinreste methyliert sind, konnte indes als Substrat für eine kovalente Modifikation mit Octylamin identifiziert werden. Mit zunehmendem Zeitverlauf bildete sich im Molekulargewichtsbereich um 35 kDa eine Proteinbande, deren Schärfe sich intensivierte. Octylamin-Moleküle wurden demnach mittels MTG an reaktive Glutaminreste des DMC gekoppelt. Die genaue Anzahl gebundener Moleküle war mittels SDS-PAGE allerdings nicht analysierbar.

Für den Nachweis einer erfolgreichen Modifikation oder die Bestimmung der Anzahl gekoppelter Amin-Moleküle müssten zukünftig andere Analysemethoden mit hoher Genauigkeit wie z.B. die Massenspektrometrie eingesetzt werden. Dieses Verfahren wird zur Bestimmung von chemischen Elementen, Molekülmassen und Massenfragmenten eingesetzt. Modifikationen des Proteins mit einer geringen Anzahl an Amin-Molekülen könnten somit gemessen werden. Eine MTG-induzierte Modifikation des Proteins α -Laktalbumin (14 kDa, 123 Aminosäuren) mit zwei Octylamin-Molekülen nach 24-stündiger Reaktion (pH 6, 50 °C, 10 mM EDTA) wurde massenspektrometrisch analysiert. Eine Verknüpfung mit fünf Butylamin- bzw. drei Hexylamin-Molekülen pro Proteinmolekül wurde ebenfalls bestimmt. Von den sechs Glutaminen im α -Laktalbumin konnten durch diese Untersuchung fünf als MTG-Substrate identifiziert werden [Nieuwenhuizen et al., 2003].

Die enzymkatalysierte Polymerisation des Natrium-Caseinats wurde allerdings in Gegenwart von Octylamin verzögert. Ohne Amin wurden die Casein-Monomere durch die MTG innerhalb von 30 min vollständig zu einem hochmolekularen Polymer vernetzt. Bei der Reaktion mit Octylamin waren nach dem gleichen Zeitpunkt neben dem Vernetzungsprodukt, die Caseinat-Banden noch eindeutig im SDS-PAGE-Gel erkennbar. Nach 120 min wurde für beide Reaktionen, d.h. mit und ohne Amin, eine vollständige Vernetzung des Proteins detektiert. Eine mögliche Ursache für die verringerte Vernetzungsgeschwindigkeit liegt in einer, durch kovalent gebundene Amine (mittels SDS-PAGE nicht nachweisbar), modifizierten Proteinstruktur oder -eigenschaften. Die Anlagerung der hydrophoben Kohlenstoffketten, deren Beweglichkeit mit steigender Länge limitiert ist, kann die Zugänglichkeit reaktiver, proteingebundener Glutamine für die MTG erschweren. Octylamin als sterisches Hindernis zwischen Caseinat-Molekülen und eine damit erhöhte räumliche Trennung kann ebenfalls die Proteinvernetzung beeinträchtigen. Änderungen des Aggregatzustandes während der Modifikationsreaktionen von Natrium-Caseinat bzw. DMC mit Octylamin wurden nicht beobachtet.

Die Anwendung von Fettaminen zur Verbesserung der Hydrophobizität von Proteinfilmen beruhte auf der Tatsache, dass andere organische Komponenten, die analog der Amine über eine aliphatische Kohlenstoffkette und eine polare Kopfgruppe verfügen, bereits zur Modifikation der Filmeigenschaften eingesetzt wurden. Gesättigte Fettsäuren ($C_nH_{2n+1}COOH$) bestehen aus einer Kohlenstoffkette an die eine Carboxylgruppe gekoppelt ist. Bei geringer Anzahl an C-Atomen sind Fettsäuren, gleich den kurzkettigen Fettaminen, wasserlöslich. Mit steigender Kettenlänge überwiegt immer mehr der hydrophobe Charakter des Kohlenstoffes. Bei Fettalkoholen ($C_nH_{2n+1}OH$) ist die aliphatische Kette an eine Hydroxylgruppe gebunden. Diese Verbindungen sind nicht oder sehr gering mit Wasser mischbar. Beide Komponenten erzielten Protein-Filme deren Wasserdampfpermeabilität (WVP) bzw. Wasseraufnahme im Vergleich zu unbehandelten Filmen reduziert war. Stearinsäure ($C_{18}H_{36}O_2$, wasserunlöslich), in Natrium-Caseinat emulgiert, erreichte eine Reduzierung der WVP um etwa 60 % [Avena-Bustillos und Krochta, 1993]. Langkettige Fettsäure (C12-C18) hatten auf Caseinat-Filme allerdings einen anti-plastischen Effekt. Unabhängig von der Kettenlänge erhöhten sich die Zugfestigkeiten, welche mit signifikant reduzierten Bruchdehnungen korrelierten. Ursache der veränderten mechanischen Eigenschaften war der feste Zustand der Fettsäuren bei Raumtemperatur, welcher die Deformation der dispergierten Phase des Filmes während der Dehnung limitierte. Bei Stearinsäure kam es durch Selbstassoziation der Fettmoleküle während der Filmtrocknung und anschließender Kristallisation der Fettsäure in der Proteinmatrix zur Bildung eines Zweischichten-Filmes [Fabra et al., 2009]. Fettsäuren mit einer geringeren Anzahl an Kohlenstoffatomen (C6-C10) führten hingegen zu einer Erweichung von heißgepressten Weizengluten-Filmen. Die WVP dieser homogenen Protein-Lipid-Filme wurde, im Vergleich zu Glycerin-plastifizierten Gluten-Filmen um 65-92 % reduziert [Pommet et al., 2003]. Die Wasseraufnahme von Filmen aus isoliertem Sonnenblumenprotein konnte durch emulgierte Octansäure ($C_8H_{16}O_2$, Wasserlöslichkeit: 0,68 g/L) bedeutsam vermindert werden, allerdings unter Verlust der mechanischen Stabilität (ZF↑, BD↓). Octanol ($C_8H_{18}O$, Wasserlöslichkeit: 0,3 g/L) hatte bei gleicher Konzentration wie die Fettsäure eine weichmachende Wirkung auf den Proteinfilm [Orliac et al., 2002].

Tabelle 4-1: Strukturformeln verschiedener chemischer Komponenten.

Chemikalie	Struktur
Fettamin	
Fettsäure (gesättigt)	
Fettalkohol	
AminoPEG	
Diethanolamin	

Über eine plastifizierende Wirkung kurzkettiger, bei Raumtemperatur im flüssigen Aggregatzustand vorliegender, primärer aliphatischer Amine auf Proteine ist bisher nichts bekannt. Aufgrund einer möglichen kovalenten Bindung der Alkylamine an das Protein, katalysiert durch die MTG, könnten diese Komponenten eine innere Plastifizierung bewirken. Ein Herauslösen des Weichmachers aus dem Film bei Kontakt mit Wasser würde erschwert bzw. vermieden. Andere Abkömmlinge des Ammoniaks, die Aminoalkohole wie Di- und Triethanolamin (TEA) fanden zur Plastifizierung von Proteinfilmen aus Weizengluten, Gelatine und Sojaproteinisolat bereits Einsatz [Cao et al., 2009; Irissin-Mangata et al., 2001; Tian et al., 2009]. Im Vergleich zu Glycerin verbesserten die Aminoalkohole die mechanischen Eigenschaften der Proteinfilme – vor allem eine signifikante Erhöhung der Bruchdehnung wurde erreicht. So erzielte z.B. Tian *et al.* für Filme aus isoliertem Sojaprotein, plastifiziert mit 30 % ((w/w) Protein) TEA, eine Steigerung der BD um 38 % (87→120 %). Zudem bewirkte dieser Weichmacher eine geringere Wasseraufnahme der Filme. Irissin-Mangata *et al.* erlangte durch die Plastifizierung von Weizengluten-Filmen mit 20 % ((w/w) Protein) Triethanolamin gegenüber Glycerin-plastifizierten Filmen sogar eine 5-fache Erhöhung der Bruchdehnung (22→114 %). Diese Weichmacher liegen wie Glycerin allerdings ohne kovalente Bindung im Proteinfilm vor. Eine Versprödung der Filme durch Auswaschung der hydrophilen Aminoalkohole ist die Folge. Polyethylenglykol (PEG) ist ein gebräuchlicher, externer Weichmacher von Proteinfilmen. Amino-PEGs verfügen über eine funktionelle Aminogruppe, die als Substrat für die MTG fungieren kann. Eine erfolgreiche Bindung zwischen Amino-PEG und Protein könnte daher in einer inneren Plastifizierung des Proteinfilmes resultieren. Eine MTG-vermittelte Verknüpfungsreaktion (PEGylierung) zwischen Natrium-Caseinat und Amino-PEGs verschiedener Molekulargewichte (750-5000 g/mol) konnte mittels SDS-PAGE nachgewiesen werden. Die für die Filmherstellung gewählte Konzentration von 50 % (w/w Protein) Amino-PEG führte jedoch nicht zur Plastifizierung. Die Proteinfilme waren nach der Trocknung brüchig und konnten der Gießform nicht schadensfrei entnommen werden [Patzsch, 2010].

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass eine MTG-induzierte Modifikation von Proteinen durch Fettamine eine vielversprechende Methode zur Verbesserung der Hydrophobizität von Proteinfilmen darstellt. Eine aktuelle Offenlegungsschrift berichtet von einer Transglutaminase (MTG Activa[®]WM) katalysierten Hydrophobisierung von Proteinhydrolysaten mit primären aliphatischen Aminen (Alkylierung). Durch die Modifikation (45 °C, 24 h, pH 7,5) mit Octylamin konnte die Grenzflächenaktivität eines Weizenproteinhydrolysates ($M_w \sim 10$ kDa) deutlich verbessert werden, gekennzeichnet durch Reduktion der Grenz- und Oberflächenspannung des Proteins [Schilling und Thum, 2012]. Eine Übertragung dieser Hydrophobisierung auf Proteine aus nachwachsenden Rohstoffen und proteinbasierende Filme bedarf weiterer Forschung.

4.3 Rohkollagen – Alternatives Protein für die Filmherstellung

Zahlreiche Proteine tierischen und pflanzlichen Ursprungs wurden bereits auf deren Filmbildungspotenzial untersucht und hinsichtlich einer Anwendung der Filme z.B. in der Lebensmittelverpackungsindustrie oder Landwirtschaft charakterisiert. Trotz umfangreicher Modifikationen der Proteinfilme konnte bisher kein proteinbasierendes Material entwickelt werden, welches den synthetischen Polymeren gleicht. Gute Barriereigenschaften der Proteinfilme gegenüber Sauerstoff, Fetten und Aromastoffen korrelieren mit geringer Wasserdampfpermeabilität bzw. Wasserresistenz und meist unzureichenden mechanischen Eigenschaften. Die Anwendungsbereiche von Materialien auf Proteinbasis sind somit limitiert. Alternative Proteine aus nachwachsenden Rohstoffen und andere Herstellungsverfahren bzw. Modifikationen sind notwendig, um Proteinfilme mit mechanischer Stabilität und verbesserter Hydrophobizität zu entwickeln.

Ein bei der Tierschlachtung in großen Mengen anfallendes Produkt ist die Schweinechwarte, bisher vorrangig als Tierfuttermittel vermarktet. Als Schwarte wird die oberste Hautpartie eines Schweines, die vom fetthaltigen Teil des Corium (Lederhaut) getrennt wurde, bezeichnet [Schormüller, 1959]. Mit über 70 % des Trockengewichtes stellt Kollagen die Hauptkomponente der Haut dar. Aufgrund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit für das tierische Material die Bezeichnung Rohkollagen (RK) verwendet. Laut Hersteller (Acontex GmbH, Rheda-Wiedenbrück) besteht das Rohkollagen aus 82,8 % Protein und 18,6 % Fett. Weitere Inhaltsstoffe sind Asche, Fasern, Chlorid, Mineralstoffe und Kohlenhydrate. Der Feuchtigkeitsgehalt beträgt 6,26 %. Neben Kollagen sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auch andere extrazelluläre Matrixproteine wie Elastin, Blutserumalbumin und Proteoglykane im Material enthalten.

Das watteähnliche Rohkollagen konnte erfolgreich zur Filmherstellung verwendet werden. Die resultierenden Filme waren gelblich, opak und hatten eine raue Oberfläche mit leicht fettiger Haptik. Die mechanischen Eigenschaften der RK-Filme waren stark von der Weichmacherkonzentration abhängig (vgl. Abschnitt 3.2.4). Filme, plastifiziert mit 50 % (w/w Protein) Glycerin, besaßen eine ZF von 6,7 N/mm² und BD von 49 %. Nach dem gleichen Verfahren und analoger Weichmacherkonzentration angefertigte Natrium-Caseinat-Filme zeigten eine geringere Zugfestigkeit (2,4 N/mm²) und eine höhere Bruchdehnung (132 %). Filme aus Schweinegelatine (300 Bloom) waren fester (7,9 N/mm²) und elastischer (72 %). Im Vergleich zu den tierischen Proteinen waren Filme aus pflanzlichen Proteinen wesentlich weniger stabil gegenüber mechanischer Beanspruchung. Die Kennwerte für Filme aus Erbsen- und Kartoffelprotein lagen im Bereich von 0,34-0,41 N/mm² bzw. 29-35 % [Patzsch, 2010]. Aus isoliertem Sojaprotein hergestellte Filme erreichten eine ZF von 3,2 N/mm² und BD von 23 % [Gonzalez et al., 2011]. Die Ursache für den Verlust der mechanischen Stabilität liegt vermutlich in der Zusammensetzung der Pflanzenproteine. Diese bestehen meist aus einem Gemisch von Proteinen verschiedener Struktur, Molekulargewicht und Löslichkeit, wodurch keine homogene Filmbildung gegeben ist.

Steigende Glycerin-Konzentrationen korrelierten mit einer Reduktion der Zugfestigkeit und Erhöhung der Bruchdehnung. Konzentrationen ≥ 75 % (w/w Protein) führten zu klebrigen, schlecht handhabbaren Rohkollagen-Filmen mit ZF und BD von 2,7-3,5 N/mm² bzw. 74-82 %. Für Filme aus Rindergelatine wurde durch Rivero *et al.* die gleiche Abhängigkeit

der mechanischen Kennwerte von der Glycerin-Konzentration ermittelt. Die Zugfestigkeit wurde im Konzentrationsbereich von 10-100 % (w/w Protein) um 92 % reduziert ($36 \rightarrow 3 \text{ N/mm}^2$; eigene Filme: $34 \rightarrow 2,7 \text{ N/mm}^2$). Die Bruchdehnung erhöhte sich von 4,7 auf 190 %, das entspricht einer 40-fachen Steigerung. Eine Zunahme der BD um den Faktor 15 ($5,5 \rightarrow 82 \%$) wurde für Rohkollagen-Filme gemessen. Gegenüber der vorliegenden Arbeit wurde zur Herstellung der Gelatine-Filme eine höhere Trocknungstemperatur ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h) und eine höhere relative Luftfeuchte (65 %) während der Konditionierung der Filme verwendet [Rivero et al., 2010].

Harnstoff zeigte bis 50 % (w/w Protein) ebenfalls eine weichmachende Wirkung der Rohkollagen-Filme. Die geringste ZF ($5,6 \text{ N/mm}^2$) und die höchste BD (50 %) wurden bei dieser Konzentration ermittelt. Höhere Harnstoff-Konzentrationen ($\geq 75 \%$ (w/w Protein)) wirkten als Füllstoff (ZF \uparrow , BD \downarrow). Während der Filmtrocknung bildeten sich Kristalle, die über den gesamten Film verteilt vorlagen. Analoge Effekte bei hohen Konzentrationen konnten für Filme aus Natrium-Caseinat beobachtet werden. Ein mit 100 % (w/w Protein) Harnstoff plastifizierter NaCas-Film zeigte gegenüber Polyglykol-behandelten Filmen ($ZF < 1,5 \text{ N/mm}^2$) erhöhte Zugfestigkeiten ($4,0 \text{ N/mm}^2$) [Patzsch, 2010]. Das gleiche Resultat wurde für RK-Filme bestimmt (Glycerin: $2,7 \text{ N/mm}^2$; Harnstoff: $6,4 \text{ N/mm}^2$).

Filme aus reinem Protein ohne Weichmacher sind aufgrund der stark ausgeprägten intermolekularen Kräfte (Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen, elektrostatische Kräfte, Disulfidbrücken) zwischen den Polymerketten in der Regel steif und brüchig. Weichmacher eliminieren die Brüchigkeit und erhöhen die Dehnung der Filme. Für eine Verbesserung der Wasserresistenz von Proteinfilmen sind hydrophile Weichmacher allerdings ungeeignet, da sie Wasser binden und sich aus dem Film lösen. Aus dem Rohkollagen konnte ohne Plastifizierungsmittel ein intakter Film (ohne MTG bzw. Maltodextrin) mit einer ZF von 55 N/mm^2 und BD von 4,0 % hergestellt werden. Eine mechanische Prüfung von Natrium-Caseinat-Filmen ohne Weichmacher war nicht möglich (vgl. Abschnitt 3.2.5.10). Indessen waren die Zugeigenschaften von unplastifizierten Schweinegelatine-Filmen (300 Bloom) gegenüber den RK-Filmen erhöht (ZF: 116 N/mm^2 , BD: 6,7 %).

Gelatine, auch als „denaturiertes Kollagen“ bezeichnet, ist ein durch chemisch-thermische Verfahrensschritte (u.a. Hydrolyse, Extraktion) aus nativen Kollagen gewonnenes Protein. Kommerziell verfügbare Gelatine weist häufig einen sehr hohen Reinheitsgrad auf, da nicht-kollagene Proteine, Fette, Mineralstoffe sowie Komponenten des Bindegewebes (z.B. Kohlenhydrate, Nucleinsäuren) während der Gewinnung vom Rohmaterial entfernt wurden. Filme aus Gelatine sind daher sehr homogen. Die mechanischen Eigenschaften sind von Faktoren wie der Proteinquelle, Gelierkraft (Bloomwert), Molekulargewichtsverteilung, Proteinkonzentration der filmbildenden Lösung sowie Herstellungs- und Konditionierungsbedingungen der Filme abhängig. Der in der vorliegenden Arbeit hergestellte Gelatine-Film zeigt im Vergleich zu anderen unplastifizierten Filmen teilweise erhebliche Differenzen (Tabelle 4-2). Piotrowska *et al.* verwendete für die Anfertigung von Rindergelatine-Filmen ähnliche Bedingungen (5 % (w/w Protein) Gelatine, 300 Bloom, Trocknung: RT/ 24-48 h/ 35-45 % rLF, Konditionierung: $25 \text{ }^\circ\text{C}$ / 24 h/ 50 % rLF), erzielte allerdings Filme mit einer geringeren Elastizität [Piotrowska et al., 2008]. Eine Proteinkonzentration von 33 % (w/w) Rindergelatine (250 Bloom) und Trocknung des Filmes für 3 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ führte zu stark reduzierten Zugeigenschaften [Wangtueai et al., 2010]. Filme aus Fischgelatine (Kaltwasser) erreichten gegenüber Filmen aus Säugetiergelatine generell geringere mechanische Stabilitäten. Die Ursache liegt in den niedrigeren Konzentrationen der Aminosäuren Prolin

und Hydroxyprolin in der Fischgelatine (15-17 %, Säugetier: 22-25 %), einer dadurch verringerten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen und verminderten Renaturierung tripelhelikaler Strukturen während des Filmbildungsprozesses [Karim und Bhat, 2009; Staroszczyk et al., 2012].

Tabelle 4-2: Übersicht mechanischer Kennwerte von Rohkollagen- und Gelatine-Filmen ohne Weichmacher (0 % (w/w Protein)). ZF...Zugfestigkeit, BD...Bruchdehnung.

Referenz	Protein	Quelle	Bloomwert	ZF [N/mm ²]	BD [%]
Eigene Arbeit	Rohkollagen	Schwein	-	55	4,0
	Rohkollagen (fettfrei)		-	74	4,9
	Gelatine		300	116	6,7
[Chiou et al., 2008]	Gelatine	Schwein	250	85	8,1
		Rind	250	70	5,3
		Fisch	-	50	3,5
[Piotrowska et al., 2008]	Gelatine	Rind	300	111	5,9
		Fisch	-	20	1,8
[Wangtueai et al., 2010]	Gelatine	Rind	250	60	3,5
		Fisch	229	32	2,8
[Avena-Bustillos et al., 2011]	Gelatine	Schwein	250	96-99	7,9-8,1
		Rind	250	88-99	6,4-7,3
		Fisch	-	39-61	1,8-3,1

Eine Entfettung des Rohkollagens bewirkte im Vergleich zum Ausgangsmaterial eine Erhöhung der mechanischen Kennwerte (vgl. Abschnitt 3.2.5.5). Die Zugfestigkeit und Bruchdehnung wurden um 35 bzw. 23 % gesteigert. Eine Weichmachereffizienz (ZF↓, BD↑) des im Rohkollagen enthaltenen Fettes konnte somit bestätigt werden. Zwar führte die Fettextraktion nicht wie gemutmaßt zur Verringerung der Bruchdehnung, aus der signifikanten Versteifung des fettfreien Filmes wurde jedoch ein plastifizierender Effekt des Fettes geschlussfolgert. Durch die Zugabe verschiedener organischer Säuren (Öl-, Wein-, Zitronensäure) wurden die mechanischen Eigenschaften von Rindergelatine-Filmen auf die gleiche Weise beeinflusst (ZF↓, BD↓). Im Fall der Ölsäure wurde sogar eine Phasentrennung zwischen Protein und Lipid beobachtet [Cao et al., 2009]. Stearin- und Palmitinsäure erzielten Fischgelatine-Filme mit verringerten Zugfestigkeiten. Die Bruchdehnung der Filme wurde durch Zugabe geringer Mengen an Fettsäure verbessert, resultierte allerdings mit Erhöhung der Konzentration in einem drastischen Verlust der BD [Jongjareonrak et al., 2006]. Die Einführung von Sonnenblumenöl in Fischgelatine bewirkte ebenso eine Destabilisierung der Filme [Perez-Mateos et al., 2009]. Dieser Effekt wurde durch die Reduktion der Interaktionskräfte zwischen den Proteinketten in Gegenwart der hydrophoben Additive verursacht. Die Vernetzung der Gelatine-Moleküle zu einem dichten, stabilen Netzwerk war erschwert. Zudem traten aufgrund mangelnder Kompatibilität beider Komponenten mit steigendem Fettgehalt Inhomogenitäten im Proteinfilm auf, die weniger resistent gegenüber Bruch waren. Im Rohkollagen tragen zusätzlich zum Fett, die nicht-kollagenen Proteine sowie weitere enthaltene Komponenten (Haare, Fasern) zur irregulären Filmstruktur und somit reduzierten mechanischen Kennwerten bei. Des Weiteren können auch unterschiedliche Renaturierungsgrade zwischen Gelatine und Rohkollagen die Differenzen der Filmstabilitäten verursacht haben. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete

extrem hochbloomige Gelatine der Firma Gelita AG (Eberbach) wurde nach Säurebehandlung bei einer Wassertemperatur von etwa 55 °C aus Schweineschwarte extrahiert. Diese hohe Gelierkraft (300 Bloom) ermöglicht eine gute Ausbildung der Tripelhelix-Struktur. Über die Herstellung bzw. den Bloomwert des Rohkollagens liegen keine Informationen vor. Mit einer eingeschränkten Renaturierung des Proteins während der Filmbildung aufgrund geringer Gelierkraft oder Einwirkung der Fremdstoffen (Fett, Proteine, Kohlenhydrate) ist die Reduzierung der Zugeigenschaften erklärbar.

In Bezug auf eine Anwendung in der Landwirtschaft wurde in der vorliegenden Arbeit ein unplastifizierter Rohkollagen-Film (200 x 200 mm) nach Fixierung zwischen Acrylglas-Rahmen auf dessen Regen- bzw. Witterungsbeständigkeit untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.5.8). Ein zuvor durchgeführter Löslichkeitstest, bei dem Filmproben für 1 h in Wasser getaucht wurden, ergab Kenntnisse über das Auflösungsverhalten eines RK-Filmes (ohne MTG) in Abhängigkeit von der Wassertemperatur (23-85 °C). Bis 30 °C war der Film stabil, Gewichtsverluste von 11-13 % wurden analysiert. Bei Wassertemperaturen ≥ 40 °C löste sich der Proteinfilm vollständig auf, hervorgerufen durch den Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen und folglich Destabilisierung der Tripelhelix-Struktur (vgl. Abschnitt 3.2.5.7). Analoge Löslichkeit wurde für Filme aus Gelatine und fettfreiem Rohkollagen bestimmt. Der Bewitterungstest simulierte eine einstündige Überflutung des RK-Filmes mit Wasser (z.B. bei Starkregen) und anschließender Trocknung, beides bei Raumtemperatur. Dieser Zyklus (Wässerung-Trocknung) wurde bis zu vier Mal wiederholt. Der Proteinfilm war trotz der extremen Bedingungen über den gesamten Witterungszeitraum stabil und mechanisch messbar. Die Zugfestigkeit verzeichnete lediglich einen Verlust von 13 % (55 \rightarrow 48 N/mm²). Die Bruchdehnung der Filme wurde durch die Wässerung-Trocknung-Schritte nicht beeinträchtigt. Folglich sind Rohkollagen-Filme über mindestens vier Bewitterungszyklen regen- bzw. witterungsbeständig (T<40 °C). Ein Kontaktwinkel von 105-113° auf der Filmoberfläche bestätigte die Hydrophobizität der Rohkollagen-Filme (vgl. Abschnitt 3.2.5.6). Unvernetzte Filme aus Natrium-Caseinat und Gelatine (300 Bloom), plastifiziert mit 50 % (w/w Protein) Glycerin, sind dagegen sehr sensitiv gegenüber Feuchtigkeit und für eine landwirtschaftliche Nutzung ungeeignet. Ein Bewitterungstest mit Beregnung (Wassermenge: 39,5 mL je Tag/Film) unter Umgebungsbedingungen (12-22 °C; 60-70 % rLF) ergab für NaCas-Filme eine Stabilität von null Tagen. Direkt durch die erste Beregnung (1.Tag) wurde der Film beschädigt und löste sich auf. Nach drei Tagen waren von dem Proteinfilm nur wenige Rückstände sichtbar. Gelatine-Filme zeigten eine Regenbeständigkeit von fünf Tagen. Aufgrund des herausgelösten externen Weichmachers waren die Filme allerdings nach der Bewitterung sehr brüchig [Patzsch, 2010]. Freistehende Rinderkollagen-Filme (60 x 60 mm) rollten sich nach einem Tag Bewitterung in einer Klimakammer (8 h/ 40 °C/ 100 % rLF + 16 h/ 18-28 °C/ >100 % rLF) zusammen. Dieser Prozess setzte sich bis zur Beendigung der Behandlung (20 d) fort. Mechanische Kennwerte dieser Proteinfilme konnten nicht gemessen werden [Sommer und Kunz, 2012a]. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch durch Sommer *et al.* wurden während der Bewitterung der Proteinfilme optische und physikalische Änderungen beobachtet. Beim Rohkollagen resultierte die Adsorption von Wassermolekülen in einer Erweichung (Quellung) des Filmes, allerdings ohne merkliche Form- oder Dimensionsänderung. Die Farbe des Filmes änderte sich von gelblich zu weiß.

Die biologische Abbaubarkeit von proteinbasierenden Filmen im Boden ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber konventionellen Kunststoffen. Das Abbauverhalten von unplastifizierten

Rohkollagen-Filmproben (40 x 40 mm) wurde über 60 Tage photographisch dokumentiert und bewertet (vgl. Abschnitt 3.2.5.9). Die Filmproben wurden dafür in Anzuchtschalen mit Pikiererde vergraben. Durch tägliche Wasserzufuhr wurde die Erde über den gesamten Zeitraum feucht gehalten. Der RK-Film konnte über 28 d Abbau dem Boden vollständig entnommen werden. Lediglich erste Abbaueffekte an den Filmrändern bzw. kleine Risse wurden beobachtet. Eine Erweichung des Filmes durch Wasseraufnahme wurde nach 4 d, erste Anzeichen von Pilzwachstum auf der Filmoberfläche nach 10 d festgestellt. Nach 35 Tagen war die biologische Zersetzung soweit vorangeschritten, dass dem Boden nur noch Filmbruchstücke entnommen werden konnten. Nach 60 Tagen war der Rohkollagen-Film vollständig zersetzt bzw. biologisch abgebaut. Ein deutlich rascherer Abbau wurde für Proteinfilme aus Natrium-Caseinat und Gelatine, plastifiziert mit 50 % (w/w Protein) Glycerin, verzeichnet. Die Filme waren bereits nach 1 d vollständig aufgelöst. Eine Pflanzenverträglichkeit und gleichzeitige Düngerwirkung dieser Proteinfilme wurde in einem anderen Experiment ermittelt. Alle Versuchspflanzen (Mais, Tagetes) wiesen durch den Kontakt zu den Proteinfilmen keinerlei Mangelerscheinungen in Färbung, Größe oder Wuchsverhalten auf und konnten vermutlich den beim Abbau der Proteine freiwerdenden Stickstoff zum Wachstum nutzen [Patzsch, 2010]. Die Bioabbaubarkeit von Weizengluten-Filmen im Boden erfolgte innerhalb von 12 [Zhang et al., 2010] bzw. 50 Tagen [Domenek et al., 2004]. Diese Differenz im Abbauverhalten war den unterschiedlichen Bedingungen im Boden (58 °C/ 50 % rLF bzw. 20 °C/ 75 % rLF) geschuldet. Während des Abbauprozesses der Gluten-Filme waren farbliche Änderungen, Phasendeformation und Pilzwachstum erkennbar.

Einfluss der enzymatischen Vernetzung

Die mikrobielle Transglutaminase (MTG) ist ein zur kovalenten Vernetzung von Proteinen industriell genutztes Enzym. Für eine erfolgreiche Reaktion sind Glutamin- und Lysinreste im proteinogenen Material notwendig. Laut Hersteller verfügt das Rohkollagen über beide Aminosäuren (Lys: 4,09 g/100 g Protein; Gln+Glu: 10,28 g/100 g Protein).

Der Nachweis einer MTG-induzierten Vernetzung (23 °C) des Rohkollagens mittels SDS-PAGE erwies sich als schwierig. Hochmolekulare Proteine im Ausgangsmaterial ($M_w > 116$ kDa), die das Trenn- und Sammelgel nicht passierten, beeinträchtigten die Analyse. Durch die Intensitätsabnahme einzelner Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 45-116 kDa mit zunehmendem Reaktionsverlauf wurde allerdings eine erfolgreiche Polymerisation des Rohkollagens geschlussfolgert (vgl. Abschnitt 3.2.1). Stachel *et al.* analysierte die enzymatische Vernetzung von Kollagen mittels Größenausschlusschromatographie, allerdings nur unter denaturierenden Bedingungen ($T \geq 37$ °C). Natives Kollagen wurde nicht als MTG-Substrat erkannt, d.h. Glutamine und Lysine in der Tripelhelix-Struktur waren für das Enzym nicht zugänglich [Stachel et al., 2010].

Zur Vernetzung des Rohkollagens innerhalb eines Filmes wurde das kommerziell erhältliche MTG Activa[®]WM-Präparat der filmbildenden Suspension unter optimalen Bedingungen (50 °C, pH 7) zugesetzt. Die Enzymkonzentration betrug 25 U/g_{Protein}. Das Protein lag somit im denaturierten Zustand, d.h. in Polypeptid-Einzelketten vor. Ein Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften Glycerin-plastifizierter Rohkollagen-Filme durch Ausbildung einer enzymatisch vernetzten Proteinmatrix konnte nicht festgestellt werden – allenfalls war eine leichte Tendenz zu geringeren Zugfestigkeiten erkennbar (vgl. Abschnitt 3.2.4). Bei Gelatine-Filmen (300 Bloom), plastifiziert mit 50 % (w/w Protein) Glycerin, resultierte die enzymatische Vernetzung in einer um 16 % verringerten ZF und 69 % erhöhten BD. Eine Steigerung beider

mechanischen Kennwerte wurde bei vernetzten Natrium-Caseinat-Filmen ermittelt [Patzsch, 2010]. In der Arbeit von Tang *et al.* wurde die ZF und BD von Gelatine-Filmen, plastifiziert mit 40 % (w/w Protein) Glycerin, durch die MTG-Polymerisation (8 U/g_{Protein}) um 25 bzw. 16 % gesteigert [Tang *et al.*, 2007]. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu De Carvalho *et al.*, bei denen die MTG-Behandlung (10 U/g_{Protein}) zu einer Reduktion der BD um 15 % führte. Die Zugfestigkeit der Gelatine-Filme wurde nicht beeinflusst. Im Vergleich zur MTG-katalysierten Vernetzung erzielte eine Modifikation der Gelatine mittels Formaldehyd festere und dehnbarere Filme [de Carvalho und Grosso, 2004]. Die enzymatische Polymerisation von Proteinen ist allerdings einer chemischen Behandlung mittels Formaldehyd aufgrund dessen Toxizität vorzuziehen. Für einen Einsatz in der Natur oder im Ernährungsbereich sind diese Vernetzer nicht geeignet.

Die kovalente Vernetzung von Rohkollagen-Filmen ohne Weichmacher mittels der mikrobiellen Transglutaminase resultierte in einer Reduzierung der mechanischen Eigenschaften (ZF↓, BD↓). Der Verlust war dabei von der Enzymkonzentration und -präparation abhängig. In Tabelle 4-3 sind die Zugeigenschaften verschieden behandelter RK-Filme aufgelistet.

Tabelle 4-3: Zugeigenschaften von unplastifizierten Rohkollagen-Filmen ± MTG-Vernetzung. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Unplastifizierte Rohkollagen-Filme nach Standardverfahren		Zugfestigkeit [N/mm ²]	Bruchdehnung [%]
Ohne Vernetzung	ohne Behandlung	55	4,0
	inaktivierte MTG Activa [®] WM (25 U/g _{Protein})	48	2,1
Mit Vernetzung	MTG Activa [®] WM (25 U/g _{Protein})	40	1,8
	MTG S2P (25 U/g _{Protein})	51	3,2

Durch die Vernetzung des Rohkollagens mittels der kommerziell erhältlichen MTG Activa[®]WM (25 U/g_{Protein}) wurde im Vergleich zum unvernetzten Film (ohne Dextrin) die ZF und BD um 27 bzw. 55 % verringert. Mit steigender Enzymkonzentration (50 U/g_{Protein}) erhöhte sich der Verlust (50 bzw. 68 %). Piotrowska *et al.* erzielte durch die Vernetzung unplastifizierter Rindergelatine-Filme (300 Bloom) mittels 0,4 U/g_{Protein} MTG Activa[®]WM eine Reduktion der ZF um 47 % (111→59 N/mm²) und BD um 39 % (5,9→3,6 %) [Piotrowska *et al.*, 2008]. Eine mechanische Charakterisierung von Gelatine-Filmen (300 Bloom), vernetzt durch 25 U/g_{Protein} MTG_{Activa}, war aufgrund hoher Brüchigkeit nicht möglich. Die reduzierten Zugeigenschaften resultierten nur teilweise aus dem steigenden Vernetzungsgrad des Proteins. Der im kommerziell verfügbaren Enzympräparat enthaltene Stabilisator Maltodextrin (1 % Enzym, 99 % Dextrin) konnte als Hauptursache für den Verlust der Filmstabilität ermittelt werden. Für Rohkollagen-Filme behandelt mit inaktivierter MTG Activa[®]WM (0-50 U/g_{Protein}, entspricht 0-3 g Dextrin) ergaben sich mit zunehmender Konzentration ebenfalls Verluste der ZF (bis 29 %) und BD (bis 59 %). Eine kovalente Vernetzung dieser Filme durch mikrobielle Transglutaminase konnte ausgeschlossen werden. Von einer Beteiligung des Maltodextrins an der hohen Brüchigkeit eines MTG Activa[®]WM-vernetzten (0,4 U/g_{Protein}), unplastifizierten Fischgelatine-Films wurde berichtet, jedoch nicht mit Werten belegt [Piotrowska *et al.*, 2008].

Die Vernetzung des Rohkollagens mittels einer rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase (MTG S2P, 0-50 U/g_{Protein}), ein Enzympräparat ohne Maltodextrin, beeinflusste die

mechanischen Eigenschaften des Filmes in einem geringeren Maß. Im Vergleich zu unbehandelten RK-Filmen betragen die Verluste an ZF und BD maximal 12 % ($55 \rightarrow 48 \text{ N/mm}^2$) bzw. 31 % ($4,0 \rightarrow 2,8 \%$). Bis zu einer MTG_{S2P} -Konzentration $\leq 12,5 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ (BD) bzw. $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ (ZF) lagen die Verluste beider Kennwerte unter 10 %. Die Zugfestigkeit von Filmen aus fettfreiem Rohkollagen bzw. Gelatine (300 Bloom) wurde durch die Vernetzung mittels $25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ MTG S2P nicht beeinflusst. Allerdings führte die kovalente Polymerisation zu Filmen mit 27 bzw. 40 % verringerter Elastizität (vgl. Abschnitt 3.2.5.10). Durch chemische Modifikationen wurden die Zugeigenschaften von unplastifizierten Schwein- und Rindergelatine-Filmen ebenfalls beeinflusst. Die Zugfestigkeiten waren nach Vernetzung mit Glutaraldehyd [Bigi et al., 2001] sowie Tannin- und Ferulasäure [Cao et al., 2007a] erhöht. Nach Behandlung mit Genipin blieb die ZF konstant [Bigi et al., 2002] bzw. wurde durch ein Carbodiimid (EDC) reduziert [Piotrowska et al., 2008]. Die Bruchdehnungen aller chemisch modifizierten Gelatine-Filme wurden analog der MTG-behandelten Filme mit steigendem Vernetzungsgrad reduziert.

Die Festigkeit von Gelatine-Gelen wurde durch den Zeitpunkt der MTG-Behandlung erheblich beeinflusst. Die Einführung von inter- und intramolekularen kovalenten Bindungen mittels MTG im Sol-Zustand ($T > 40 \text{ }^\circ\text{C}$) beeinträchtigte die Mobilität der Gelatine-Moleküle und verhinderte die Ausbildung der übergeordneten Strukturen. Die Festigkeit (gemessen mittels Rheometrie) der Gelatine-Gele wurde reduziert. Eine höhere Gelfestigkeit wurde durch eine Vernetzung des Proteins während der Renaturierung und Bildung der Tripelhelix erreicht [Babin und Dickinson, 2001]. Die Wirkung des Zeitpunktes der enzymatischen Vernetzung auf die Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen wurde durch Variation des Herstellungsverfahrens untersucht. Beim Standardverfahren, alle bisher diskutierten Ergebnisse beziehen sich auf diesen Prozess, erfolgte die Modifikation des Proteins vor der Renaturierung der Tripelhelix. Die Behandlung eines bereits gelierten, unplastifizierten Proteinfilmes mit MTG ($25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$) wurde mittels eines Beschichtungsverfahrens realisiert (vgl. Abschnitt 3.2.5.4). D.h. die partiell organisierte Kollagen-Matrix konnte zusätzlich durch Isopeptidbindungen stabilisiert werden. Auf die Zugfestigkeit der Rohkollagen-Filme hatte der Zeitpunkt der enzymatischen Vernetzung, unabhängig von der Enzympräparation (MTG Activa[®]WM bzw. MTG S2P), keinen Einfluss. Gegenüber Filmen ohne Vernetzung waren die Zugfestigkeiten allerdings reduziert (10-23 %). Der höhere Anteil an tripelhelikalen Strukturen vor Einführung MTG-induzierter Bindungen resultierte in einer verbesserten Flexibilität der Proteinfilme. Die Bruchdehnung wurde um 17 % (MTG Activa[®]WM) bzw. 38 % (MTG S2P) gesteigert. Des Weiteren konnte im Vergleich zu einem unvernetzten Rohkollagen-Film durch das Beschichtungsverfahren mittels der rekombinanten mikrobiellen Transglutaminase ein vernetzter Film mit leicht erhöhter BD angefertigt werden (-MTG: 4,0 %; +MTG: 4,4 %). Analoge Effekte (ZF konstant; $\text{BD} \uparrow$) nach MTG_{S2P} -Vernetzung mittels Beschichtungsverfahren ergaben sich für Gelatine- und fettfreie Rohkollagen-Filme (vgl. Abschnitt 3.2.5.10). D.h. die partiell renaturierten Tripelhelix-Strukturen des Proteins sind flexibler als die enzymatisch vernetzten Polypeptidketten. Der erhöhte Vernetzungsgrad (Wasserstoffbrücken- und kovalente Bindungen) hatte allerdings keinen merklichen Einfluss auf die Festigkeit der Proteinmatrix.

Auf die Benetzbarkeit der Rohkollagen-Filme mit Wasser hatte die Ausbildung eines MTG-induzierten Proteinnetzwerkes keinen Einfluss. Für alle Filme, unabhängig von der Enzympräparation, dem Herstellungsverfahren oder dem Fettgehalt, wurden auf der rauen

Oberseite bzw. glatten Unterseite Kontaktwinkel zwischen 97°-116° ermittelt (vgl. Abschnitt 3.2.5.6). Allgemein sind Materialien die einen Winkel >90° aufweisen hydrophob, d.h. nicht vollständig mit Wasser benetzbar. Der Kontaktwinkel ist ein Messwert der bereits auf kleinste Veränderungen der Festkörperfläche reagiert. Unebenheit, Porosität oder Staubkörnchen des Untergrundes führen bereits zu einer schlechteren Benetzbarkeit des Materials. Einzelne Messpunkte der RK-Filme erzielten Winkel von 122°-128°, möglicherweise durch unlösliche Partikel oder andere Inhomogenitäten im Film verursacht. Die Benetzbarkeit von Gelatine-Filmen, plastifiziert mit 40 % (w/w Glycerin), wurde durch eine MTG-Vernetzung ebenfalls nicht beeinträchtigt. Ein Kontaktwinkel von 100° wurde ermittelt. Auf andere tierische und pflanzliche Proteinfilme hatte der Zusatz von MTG eine positive Wirkung. Der Kontaktwinkel von Filmen aus Natrium-Caseinat (25°→80°), Weizengluten (68°→85°), Molkenprotein (45°→60°) [Tang et al., 2007] sowie isoliertem Sojaprotein (30°→62°) [Jiang et al., 2007] wurde signifikant erhöht. Rohkollagen zeigte von allen Proteinen die höchste Hydrophobizität und liegt im Bereich von PTFE (120°), Paraffin (105°) und LDPE (95°).

Kovalente Vernetzungen in Proteinfilmen resultieren häufig in einer Reduzierung der Wasserlöslichkeit. Zum Beispiel wurde die Löslichkeit von unplastifizierten Fischgelatine-Filmen in wässrigem Medium (25 °C, 24 h, pH 6) durch eine MTG-Vernetzung (0,4 U/g_{Protein}) von 100 % (-MTG) auf 26 % verringert. Mit 35 % Löslichkeit hielten die Filme einer Temperatur von 100 °C über 60 min stand [Piotrowska et al., 2008]. Ähnliche Ergebnisse konnten für enzymatisch vernetzte Rohkollagen-Filme analysiert werden (vgl. Abschnitt 3.2.5.7). Bis einschließlich einer Wassertemperatur von 85 °C waren die Filme über 1 h stabil. Die Gewichtsverluste variierten dabei in Abhängigkeit von der MTG-Präparation, -konzentration und dem Herstellungsverfahren. Eine Konzentration von 12,5 U/g_{Protein} MTG_{S2P} war allerdings notwendig, um RK-Filme bei dieser Temperatur zu erhalten (33 % Gewichtsverlust). Mit steigendem Vernetzungsgrad reduzierte sich die Löslichkeit. 20 % Verlust wurde für einen nach Standardverfahren mittels 50 U/g_{Protein} MTG S2P-vernetzten Proteinfilm ermittelt. Bei MTG Activa[®]WM-behandelten Rohkollagen-Filmen trat, trotz gleicher Enzymkonzentration, über den gesamten Temperaturbereich (23-85 °C) eine höhere Löslichkeit auf. Die Ursache dafür liegt im Herauslösen des im Proteinfilm eingelagerten hydrophilen Maltodextrins. Ein aufgrund des Stabilisators weniger dicht gepacktes Proteinnetzwerk erleichtert zudem die Diffusion von Wasser und ist weniger resistent gegenüber Löslichkeit. Die Wasserresistenz eines Filmes, vernetzt nach dem Beschichtungsverfahren, war im Vergleich zum Standardverfahren ebenfalls reduziert. D.h. die renaturierte Tripelhelix-Struktur verfügt über eine geringe Anzahl an kovalenten Bindungen. Der Bruch der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Polypeptidketten resultierte mit steigender Temperatur in individuellen Ketten und zunehmender Löslichkeit. Bei 85 °C betrug der Gewichtsverlust eines mit 25 U/g_{Protein} MTG S2P-vernetzten RK-Filmes 26 % (Standardverfahren) bzw. 38 % (Beschichtungsverfahren). Die Löslichkeit von vernetzten Gelatine- und fettfreien Rohkollagen-Filmen (25 U/g_{Protein} MTG S2P, Standardverfahren) bei 85 °C Wassertemperatur betrug 10 bzw. 16 %. Chemische Modifikationen von Rinderkollagen führten ebenfalls zur Bildung von 3D-Netzwerken mit verbesserter Wasserresistenz. Einzelne Vernetzer (Glyoxal, Glutaraldehyd, Formaldehyd) oder deren Kombinationen produzierten Filme, mit einem unlöslichen Anteil ≥ 92 % nach zweistündiger Inkubation bei 80 °C [Sommer und Kunz, 2012b].

Die Witterungsbeständigkeit eines unplastifizierten Rohkollagen-Films wurde durch die Ausbildung einer Proteinnetzwerke mit 25 U/g_{Protein} MTG S2P nicht beeinflusst. Analog den

unvernetzten Filmen verzeichnete die Zugfestigkeit über die vier Bewitterungszyklen einen geringen Verlust (11 %), die Bruchdehnung wurde nicht beeinträchtigt. Der Wert lag konstant bei $3,25 \pm 0,1$ %. Die Regenbeständigkeit von plastifizierten Natrium-Caseinat-Filmen konnte durch die MTG-Behandlung um drei Tage verbessert werden. Auf die Beständigkeit von Gelatine-Filmen hatte die Vernetzung ebenfalls keinen Einfluss. Eine mechanische Prüfung dieser Proteinfilme war aufgrund des herausgelösten Weichmachers und somit hoher Brüchigkeit nicht möglich [Patzsch, 2010].

Die biologische Abbaubarkeit des Rohkollagen-Filmes im Boden wurde durch die enzymatische Vernetzung ($25 \text{ U/g}_{\text{Protein}}$ MTG S2P) nicht beeinflusst. Innerhalb von 60 Tagen waren die Filmproben vollständig zersetzt. Eine Verzögerung des Abbaus um mindestens vier bzw. sieben Tage wurde dagegen bei MTG-vernetzten Natrium-Caseinat und Gelatine-Filmen erreicht. Ohne Vernetzung waren diese Filme bereits nach einem Tag aufgelöst [Patzsch, 2010]. Dalev *et al.* berichtete von einer vollständigen Zersetzung unplastifizierter, unvernetzter Schweinegelatine-Filme nach sechs Tagen. Durch eine chemische Modifikation der Filme mittels verschiedener Aldehyde wurde der Abbau auf zehn Tage verlangsamt [Dalev *et al.*, 2000]. Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Dalev *et al.* adsorbierten die Materialien während des Abbauprozesses Wasser, was zunehmend im Verlust der strukturellen Integrität und farblichen Änderung der Filme resultierte. Die Wasseraufnahme in Proteinfilme mit einem hohen Vernetzungsgrad sowie einem hohen Fettanteil war allerdings reduziert und verzögerte somit die Bioabbaubarkeit. Die Düngerwirkung des beim Abbau von Proteinen freigesetzten Stickstoffes auf Pflanzen kann sich demnach über einen längeren Zeitraum erstrecken.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass Rohkollagen ohne externen Weichmacher zur Herstellung von natürlichen, witterungsbeständigen, mechanisch stabilen und biologisch abbaubaren Filmen geeignet ist. Die Nutzung als Landwirtschaftsfilme ist allerdings aufgrund der niedrigen Bruchdehnung (max. 4,4 %) limitiert. Auf Erdölbasis (PE, PP) oder Basis anderer nachwachsender Rohstoffe (Mater-Bi, Ecoflex) produzierte Filme weisen Bruchdehnungen von 150-400 % auf. Die Zugfestigkeit der RK-Filme ist mit max. 55 N/mm^2 indes gegenüber den genannten Produkten deutlich erhöht ($10\text{-}30 \text{ N/mm}^2$). Demnach besteht für eine Anwendung des Rohkollagens als beispielsweise Ernteverfrühungsfilm hinsichtlich der mechanischen Stabilität weiter Optimierungsbedarf. Die Zugfestigkeit könnte zugunsten der Bruchdehnung reduziert werden. Die Wasserlöslichkeit der RK-Filme bei hohen Temperaturen konnte durch die Ausbildung eines kovalenten Proteinnetzwerkes verbesserte werden. Eine rekombinant hergestellte mikrobielle Transglutaminase ist dabei dem kommerziell erhältlichen Enzympräparat MTG Activa[®]WM vorzuziehen.

Die Kosten von Filmen auf Proteinbasis sind im Allgemeinen gegenüber erdölbasierenden Materialien erhöht. Mit einem Rohstoffpreis von $1,10 \text{ €/kg}$ ist Rohkollagen allerdings im Vergleich zu anderen tierischen Proteinen wie z.B. Gelatine $\sim 13 \text{ €/kg}$ deutlich im Vorteil.

5 Zusammenfassung

Biokunststoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe besitzen ein großes Potential für verschiedenste Anwendungen, da sie fossile Ressourcen schonen und zur Reduzierung der Umweltverschmutzung beitragen. Kommerziell werden bereits stärke- bzw. zuckerbasierende Polymere wie z.B. die Polymilchsäure als Tragetaschen oder Verpackungen verwendet. Proteine, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, als Ausgangsmaterial für Biopolymere finden bisher keinen Nutzen.

Ziel dieser Arbeit war es, das bei der Tierschlachtung in großen Mengen als Nebenprodukt anfallende Rohkollagen (RK) hinsichtlich seiner Eignung zur Herstellung von Proteinfilmen zu bewerten. Das Protein wurde dabei mittels der mikrobiellen Transglutaminase (MTG) vernetzt und bezüglich einer Anwendung in der Landwirtschaft charakterisiert.

Das Rohkollagen ließ sich ohne externen Weichmacher durch ein Gießverfahren zu Filmen verarbeiten und war mittels MTG vernetzbar. Mit einer Zugfestigkeit von 55 N/mm^2 waren die RK-Filme deutlich fester als konventionelle, erdölbasierende Filme ($10\text{-}30 \text{ N/mm}^2$). Die Dehnbarkeit war mit maximal $4,4 \%$ stark limitiert. Durch den Zeitpunkt der enzymatischen Vernetzung (vor/nach Renaturierung des Proteins) sowie Variation der Enzymkonzentration und -präparation konnten die Filmeigenschaften optimiert werden. Die Bildung kovalenter Verknüpfungen nach Renaturierung der Tripelhelix-Struktur resultierte in einer höheren Elastizität. Eine rekombinante MTG erwies sich gegenüber der kommerziell erhältlichen MTG Activa[®] WM (1 % Enzym, 99 % Maltodextrin) als vorteilhaft – das Enzym stabilisierende Dextrin bewirkte mit zunehmender Konzentration eine mechanische Destabilisierung der Filme (ZF↓, BD↓). Die Wasserlöslichkeit der RK-Filme wurde durch die enzymatische Vernetzung erheblich reduziert. Bis zu einer Temperatur von 85 °C hielten diese Filme über 1 h stand. Unvernetzte Filme (-MTG) lösten sich bei der Denaturierungstemperatur des Kollagens ($T \geq 40 \text{ °C}$) auf. Anhand eines durchgeführten Bewitterungstest, der eine vollständige Überflutung des Filmes z.B. bei Starkregen simulierte, konnten die Rohkollagen-Filme als regen- bzw. witterungsbeständig eingestuft werden. Die mechanischen Kennwerte verzeichneten nach viermaliger Bewitterung (Wässerung-Trocknung) keine merklichen Verluste. Eine Hydrophobizität bzw. unvollständige Benetzbarkeit der Filmoberfläche mit Wasser wurde durch die Vermessung des Kontaktwinkels bestätigt ($97^\circ\text{-}116^\circ$). Die Abbaubarkeit der RK-Filme im Boden wurde durch die MTG-Vernetzung nicht beeinflusst. Nach 60 Tagen waren beide Filme (\pm MTG) vollständig zersetzt bzw. biologisch abgebaut. Mit einem Rohstoffpreis von $1,10 \text{ €/kg}$ stellt Rohkollagen somit eine zur Herstellung von natürlichen, witterungsbeständigen, bioabbaubaren und mechanisch stabilen Biokunststoffen im Vergleich zu anderen Proteinen preisgünstige Alternative (Gelatine: $\sim 13 \text{ €/kg}$) dar.

Des Weiteren wurden am Modellprotein Natrium-Caseinat grundlegende Untersuchungen zur sichtbaren Markierung des Proteins mittels eines Reaktivfarbstoffes bzw. Hydrophobisierung mittels eines Fettamins durchgeführt.

Durch eine permanente Färbung von Biomolekülen könnten Kenntnisse über die Vorgänge innerhalb eines Proteinnetzwerkes gewonnen und damit eine Strukturaufklärung der Filme ermöglicht werden. Mittels SDS-PAGE wurde eine Kopplung von 10-14 Procion Red MX-5B-Molekülen nach 120 min, 25 °C , pH 10,5 und fünffachen Farbstoffüberschuss am Protein aufgezeigt. Das kovalent modifizierte Caseinat konnte jedoch aufgrund fehlender reaktiver

Lysin- und Glutaminreste mittels MTG nicht vernetzt werden. Eine Filmherstellung (-MTG) war aufgrund von zu geringem Ausgangsmaterial nicht möglich.

Fettamine mit bis zu acht Kohlenstoffatomen konnten mittels HPLC-Analyse als MTG-Substrate identifiziert werden. Eine kovalente Vernetzungsreaktion zwischen Octylamin (Wasserlöslichkeit: 0,2 g/L) und dem Dipeptid-Glutaminylglycin resultierte in einem viskosen, hydrophoben Reaktionsprodukt. Beim Natrium-Caseinat bewirkte die Amin-Behandlung eine Verzögerung der MTG-katalysierten Polymerisation, eine erfolgreiche Modifikation durch Amin-Moleküle – gekennzeichnet durch eine Molekulargewichtsvergrößerung – war mittels SDS-PAGE allerdings nicht nachweisbar. Dimethylcasein (DMC) konnte indes als Substrat für die kovalente Modifikation mit Octylamin identifiziert werden. Die Bildung einer neuen Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 35 kDa wurde analysiert. Änderungen des Aggregatzustandes während der Modifikationsreaktionen wurden nicht beobachtet. Eine Filmherstellung aus Amin-behandeltem Protein erfolgte aufgrund fehlender Modifikation (Natrium-Caseinat) bzw. zu hohen Materialkosten (DMC) nicht.

6 Ausblick

Für die Optimierung von Proteinfilmen und deren Einsatz speziell in der Landwirtschaft wurden in der vorliegenden Arbeit grundlegende Untersuchungen durchgeführt und umfangreiche Erkenntnisse gewonnen. Das aus der Tierschlachtung erworbene Rohkollagen konnte als erneuerbarer Rohstoff für die Herstellung von Filmen auf Proteinbasis ermittelt werden. Ohne Zusatz eines Weichmachers wurden mechanisch stabile, witterungsbeständige und biologisch abbaubare Filme produziert. Allerdings existiert weiterer Forschungs- und Optimierungsbedarf, der die Grundlage für zukünftige Arbeiten darstellt. So sollte z.B. eine Charakterisierung der Filme hinsichtlich der UV-Beständigkeit, Wasserdampfpermeabilität sowie Durchstoß- und Weiterreißbeständigkeit vorgenommen werden. Ein Feldversuch zur Prüfung der Witterungsbeständigkeit und Düngerwirkung von RK-Filme unter realen Bedingungen wäre sinnvoll. Die mechanischen Eigenschaften könnten durch Verwendung von Verbundwerkstoffen z.B. mit dem wasserunlöslichen, viskoelastischen Weizengluten verändert werden.

Die Herstellung der Rohkollagen-Filme erfolgte durch Gießen einer wässrigen Proteinlösung und Verdampfen des Lösungsmittels. Dieses Verfahren eignet sich nicht für einen industriellen Maßstab. Großtechnisch findet die Produktion von Kunststofffilmen durch Extrusion statt. Dieses Verfahren ist energie-, kosten- und zeitsparender und konnte bereits für die kontinuierliche Produktion von Natrium-Caseinat-Filmen etabliert werden [Frohberg, 2010]. Die Übertragung des Gießverfahrens auf einen Extruder ist daher von essentieller Bedeutung.

Der Einsatz einer mikrobiellen Transglutaminase zeigte, dass Rohkollagen-Filme aufgrund der Bildung eines kovalenten Proteinnetzwerkes in ihren Eigenschaften modifiziert werden können. Die Wasserresistenz der Filme wurde durch die Vernetzung erheblich gesteigert. Allerdings existieren bisher wenige Ansätze, um die Struktur bzw. den Vernetzungsgrad solcher Filme zu charakterisieren. Die Entwicklung von Methoden zur verbesserten Strukturauflösung und somit Gewinnung von Kenntnissen über die räumliche Verteilung und Vorgänge innerhalb des Proteinnetzwerkes könnte die Grundlage für eine weitere Optimierung der Filmeigenschaften bilden.

Am Modellprotein Natrium-Caseinat konnten hingehend einer sichtbaren Markierung des Proteins mittels eines Reaktivfarbstoffes erste Erfolge erzielt werden. Mehrere Farbstoffmoleküle wurden über kovalente Bindungen an das Protein gekoppelt. Allerdings wurde aufgrund unzureichend produzierter Menge die Filmherstellung nicht realisiert. Ein Scale-up des Färbeprozesses zur Bereitstellung einer größeren Menge an gefärbtem Protein und die Etablierung eines Reinigungsverfahrens zur vollständigen Entfernung des ungebundenen Farbstoffes (z.B. Gelfiltration) sind anzustreben. Eine andere Methode zur kovalenten Vernetzung des farbstoff-modifizierten Caseinats sollte zudem erforscht werden, da das modifizierte Protein nicht mehr als Substrat für die MTG fungiert. Nach erfolgreicher Färbung und Filmherstellung wären für die Untersuchung der Filmstruktur verschiedene mikroskopische Methoden (u.a. Fluoreszenzmikroskopie) denkbar.

Weiterer Forschungsbedarf besteht zudem bei der Hydrophobisierung von Proteinen oder Proteinfilmen durch Fettamine. Verschiedene Proteinhydrolysate ($M_w \sim 1-15$ kDa) konnten bereits durch eine kovalente Modifikation mit primären aliphatischen Aminen, katalysiert durch die MTG, hydrophobisiert werden [Schilling und Thum, 2012]. Veränderte Protein-

strukturen durch z.B. Zugabe von EDTA oder spezifische Glutamin-Tags am Protein könnten eine MTG-induzierte Verknüpfungsreaktion mit Aminen ermöglichen. Die Anfertigung eines Zweischichten-Filmes aus Protein und einem kovalent gekoppelten Fettamin stellt eine weitere Strategie zur Verbesserung der Wasserresistenz von Proteinfilmen dar.

7 Literatur

- Al-Hassan, A. A. und Norziah, M. H. (2012). "Starch-gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers." *Food Hydrocolloids*, **26**, 108-117.
- Alderton, W. K., Thatcher, D. und Lowe, C. R. (1995). "Affinity labeling of recombinant ricin-A chain with Procion Blue MX-R." *European Journal of Biochemistry*, **233**, 880-885.
- 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.
- Arrizubieta, M. J. (2007). "Transglutaminases." In: *Industrial Enzymes - Structure, Function and Applications* (Polaina, J. und MacCabe, A. P., eds.), Springer, 567-581.
- Arvanitoyannis, I. S. (2006). "Biodegradable edible films and coatings based on protein resources: physical properties and applications in food quality management." In: *Handbook of biodegradable polymeric materials and their applications Vol. 1* (Mallapragada, S. K. und Narasimhan, B., eds.), American Scientific Publishers, 199-238.
- Atares, L., Bonilla, J. und Chiralt, A. (2010). "Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils." *Journal of Food Engineering*, **100**, 678-687.
- Audic, J.-L. und Chaufer, B. (2005). "Influence of plasticizer and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate." *European Polymer Journal*, **41**, 1934-1942.
- Audic, J.-L. und Chaufer, B. (2010). "Caseinate Based Biodegradable Films with Improved Water Resistance." *Journal of Applied Polymer Science*, **117**, 1828-1836.
- Avena-Bustillos, R. J., Chiou, B., Olsen, C. W., Bechtel, P. J., Olson, D. A. und McHugh, T. H. (2011). "Gelation, Oxygen Permeability, and Mechanical Properties of Mammalian and Fish Gelatin Films." *Journal of Food Science*, **76**, E519-E524.
- Avena-Bustillos, R. J. und Krochta, J. M. (1993). "Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content." *Journal of Food Science*, **58**, 904-907.
- Babel, W. (1996). "Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer." *Chemie in unserer Zeit*, **30**, 86-95.
- Babel, W. (2005). "Gelatin." *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 16.
- Babin, H. und Dickinson, E. (2001). "Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin." *Food Hydrocolloids*, **15**, 271-276.
- Bannwarth, H., Kremer, B. P. und Schulz, A. (2011). "Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie", Springer Verlag, Heidelberg, 2.Auflage.
- Berlin, R. B., Farnsworth, P., Grothvasselli, B. und Kuo, J. A. (1992). "Procion Yellow fluorescent microscopy - a new method of studying arterial and venous pathology." *Angiology*, **43**, 893-898.

- Beucker, S., und Marscheider-Weidemann, F. (2007). "Zukunftsmarkt Biokunststoffe." 1865-0538, Umweltbundesamt, <http://www.umweltdaten.de/publikationen/fpdf-l/3451.pdf>.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Roveri, N. und Rubini, K. (2002). "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin." *Biomaterials*, **23**, 4827-4832.
- Bigi, A., Cojazzi, G., Panzavolta, S., Rubini, K. und Roveri, N. (2001). "Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking." *Biomaterials*, **22**, 763-768.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H. J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis*, **8**, 93 - 99.
- Bourtoom, T. (2009). "Review Article - Edible protein films: properties enhancement." *International Food Research Journal*, **16**, 1-9.
- Bruno, M., Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P. und Moresi, M. (2008). "Engineering properties of edible transglutaminase cross-linked caseinate-based films." *Food Bioprocess Technology*, **1**, 393-404.
- Buettner, K., Hertel, T. C. und Pietzsch, M. (2012). "Increased thermostability of microbial transglutaminase by combination of several hot spots evolved by random and saturation mutagenesis." *Amino Acids*, **42**, 987-96.
- Cao, N., Fu, Y. und He, J. (2007a). "Mechanical properties of gelatin films cross-linked, respectively, by ferulic acid and tannin acid." *Food Hydrocolloids*, **21**, 575-584.
- Cao, N., Fu, Y. und He, J. (2007b). "Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films." *Food Hydrocolloids*, **21**, 1153-1162.
- Cao, N., Yang, X. und Fu, Y. (2009). "Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films." *Food Hydrocolloids*, **23**, 729-735.
- Chambi, H. und Grosso, C. (2006). "Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase." *Food Research International*, **39**, 458-466.
- Chen, H. (2002). "Formation and properties of casein films and coatings." In: *Protein-based films and coatings* (Gennadios, A., ed.), CRC Press LLC, 181-211.
- Chick, J., und Hernandez, R. J. (2002). "Physical, thermal, and barrier characterization of casein-wax-based edible films." *Journal of Food Science*, **67**, 1073-1079.
- Chiou, B.-S., Avena-Bustillos, R. J., Bechtel, P. J., Jafri, H., Narayan, R., Imam, S. H., Glenn, G. M. und Orts, W. J. (2008). "Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties." *European Polymer Journal*, **44**, 3748-3753.
- Clonis, Y. D., Goldfinch, M. J. und Lowe, C. R. (1981). "The interaction of yeast hexokinase with Procion Green H-4G." *Biochemical Journal*, **197**, 203-211.
- Clonis, Y. D., Stead, C. V. und Lowe, C. R. (1987). "Novel cationic triazine dyes for protein purification." *Biotechnology and Bioengineering*, **30**, 621-627.
- Dalev, P. G., Patil, R. D., Mark, J. E., Vassileva, E. und Fakirov, S. (2000). "Biodegradation of chemically modified gelatin films in soil." *Journal of Applied Polymer Science*, **78**, 1341-1347.

- Dangaran, K., Tomasula, P. M. und Qi, P. (2009). "Structure and function of protein-based edible films and coatings." In: *Edible Films and Coatings for Food Applications* (Embuscado, M. E. und Huber, K. C., eds.), Springer, Heidelberg, 25-56.
- de Carvalho, R. A. und Grosso, C. R. F. (2004). "Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde." *Food Hydrocolloids*, **18**, 717-726.
- Di Pierro, P., Chico, B., Villalonga, R., Mariniello, L., Damiao, A. E., Masi, P. und Porta, R. (2006). "Chitosan-whey protein edible films produced in the absence or presence of transglutaminase: analysis of their mechanical and barrier properties." *Biomacromolecules*, **7**, 744-749.
- DIN EN ISO 527-3. (1995). "Kunststoffe - Bestimmung der Zugeigenschaften - Prüfbedingungen für Folien und Tafeln."
- Domenek, S., Feuilloley, P., Gratraud, J., Morel, M.-H. und Guilbert, S. (2004). "Biodegradability of wheat gluten based bioplastics." *Chemosphere*, **54**, 551-559.
- Dörfler, H.-D. (2002). "Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme: Physik und Chemie." Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- EcogreenOlechemicals. (Broschüre). "Fettamine." <http://www.dhw-ecogreenoleo.de/Fettamine.pdf>.
- Fabra, M. J., Jimenez, A., Atares, L., Talens, P. und Chiralt, A. (2009). "Effect of Fatty Acids and Beeswax Addition on Properties of Sodium Caseinate Dispersions and Films." *Biomacromolecules*, **10**, 1500-1507.
- Finlay, J. A. und Callow, M. E. (1997). "The toxicity of alkyl amines. The effects of pH." *Biofouling*, **11**, 19-30.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966a). "Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase. I. Purification and properties of the enzyme: identification of a functional cysteine essential for activity." *Journal of Biological Chemistry*, **241**, 5518-5525.
- Folk, J. E. und Cole, P. W. (1966b). "Transglutaminase: Mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies." *Biochim. Biophys. Acta*, **122**, 244-264.
- Fox, P. F. und Kelly, A. L. (2004). "The caseins." In: *Proteins in Food Processing* (Yada, R. Y., ed.), CRC Press, Cambridge, 29-71.
- Frohberg, P. (2010). "Untersuchungen zur Herstellung und Optimierung proteinogener Biowerkstoffe," Dissertation, Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Gennadios, A. (2002). "Protein-based films and coatings." CRC Press, Boca Raton.
- Gennadios, A. (2004). "Edible films and coatings from proteins." In: *Proteins in food processing* (Yada, R. Y., ed.), Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 442-467.
- Gennadios, A., Handa, A., Froning, G. W., Weller, C. L. und Hanna, M. A. (1998a). "Physical properties of egg white-dialdehyde starch films." *J Agric Food Chem*, **46**, 1297-1302.

- Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L. und Hanna, M. A. (1998b). "Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films." *Journal of Food Science*, **63**, 225-228.
- Gomez-Guillen, M. C., Gimenez, B., Lopez-Caballero, M. E. und Montero, M. P. (2011). "Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review." *Food Hydrocolloids*, **25**, 1813-1827.
- Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. L. und Guilbert, S. (1994). "Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties." *International Journal of Food Science and Technology*, **29**, 39-50.
- Gontard, N., Marchesseau, S., Cuq, J. L. und Guilbert, S. (1995). "Water vapour permeability of edible bilayer films of wheat gluten and lipids." *International Journal of Food Science and Technology*, **30**, 49-56.
- Gonzalez, A., Cristina Strumia, M. und Alvarez Igarzabal, C. I. (2011). "Cross-linked soy protein as material for biodegradable films: Synthesis, characterization and biodegradation." *Journal of Food Engineering*, **106**, 331-338.
- Grellmann, W. und Seidler, S. (2005). "Kunststoffprüfung." Carl Hanser Verlag, München Wien.
- Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P. und Subirade, M. (1998). "Influence of plasticizers and treatment on the properties of films from pea proteins." *Industrial Crops and Products*, **7**, 149-157.
- Guilbert, S. und Cuq, B. (2005). "Material formed from proteins." In: *Handbook of biodegradable polymers* (Bastoli, C., ed.), Rapra Technology Ltd., Shawbury, 339-384.
- Guilbert, S. und Gontard, N. (2005). "Agro-polymers for edible and biodegradable films: review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics." In: *Innovations in Food Packaging* (Han, J. H., ed.), Elsevier, San Diego, 263-276.
- Han, J. H. (2005). "Innovations in Food Packaging." Academic Press Inc., Amsterdam.
- Haroun, A. A. und Mansour, H. F. (2008). "New approaches for the reactive dyeing of the retanned carbohydrate crust leather." *Dyes and Pigments*, **76**, 213-219.
- Hughes, P., Sherwood, R. F. und Lowe, C. R. (1984). "Studies on the nature of transition-metal-ion-mediated binding of triazine dyes to enzymes - The interaction of Procion Red MX-8B with carboxypeptidase G-2." *European Journal of Biochemistry*, **144**, 135-142.
- Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B. und Gontard, N. (2001). "New plasticizers for wheat gluten films." *European Polymer Journal*, **37**, 1533-1541.
- Janjarasskul, T. und Krochta, J. M. (2010). "Edible packaging materials." *Annual Review of Food Science and Technology*, **1**, 415-448.
- Jiang, Y., Tang, C.-H., Wen, Q.-B., Li, L. und Yang, X.-Q. (2007). "Effect of processing parameters on the properties of transglutaminase-treated soy protein isolate films." *Innovative Food Sciences and Emerging Technologies*, **8**, 218-225.

- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. und Tanaka, M. (2006). "Fatty acids and their sucrose esters affect the properties of fish skin gelatin-based film." *European Food Research and Technology*, **222**, 650-657.
- Kamata, Y., Ishikawa, E. und Motoki, M. (1992). "Enzyme immobilization on ion exchangers by forming an enzyme coating with transglutaminase as a crosslinker." *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 1323-1324.
- Karim, A. A. und Bhat, R. (2009). "Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins." *Food Hydrocolloids*, **23**, 563-576.
- Keenan, R. (2003). "Gelatin." *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, **12**, 436-448.
- 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 Microbiol. Lett.*, **144**, 157-160.
- Kokoszka, S., Debeaufort, F., Lenart, A. und Voilley, A. (2010). "Liquid and vapour water transfer through whey protein/lipid emulsion films." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **90**, 1673-1680.
- Kolybaba, M., Tabil, S., Panigrahi, S., Crerar, W.J., Powell, T., Wang, B. (2003). "Biodegradable polymers: past, present, and future." ACSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting, The Society for engineering in agricultural, food, and biological systems, Fargo, North Dakota, USA, 1-15.
- 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.
- Krochta, J. M. (2002). "Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities." In: *Protein-based Films and Coatings* (Gennadios, A., ed.), CRC Press, New York, 1-41.
- Krochta, J. M. und De Mulder-Johnston, C. (1997). "Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities." *Food Technology*, **51**, 61-73.
- Kudanga, T., Prasetyo, E. N., Sipila, J., Guebitz, G. M. und Nyanhongo, G. S. (2010). "Reactivity of long chain alkylamines to lignin moieties: Implications on hydrophobicity of lignocellulose materials." *Journal of Biotechnology*, **149**, 81-87.
- Kühn, K. (1967). "Untersuchungen zur Struktur des Kollagens." *Die Naturwissenschaften*, **54**, 101-109.
- Kühn, K. (1974). "Struktur und Biochemie des Kollagens." *Chemie in unserer Zeit*, **8**, 97-103.
- Labrou, N. E. (2000). "Dye affinity labelling of yeast alcohol dehydrogenase." *J. Enzyme Inhib.*, **15**, 487-496.
- Labrou, N. E. (2002). "Dye-ligand affinity adsorbents for enzyme purification." *Mol. Biotechnol.*, **20**, 77-84.
- Lacroix, M. (1998). "Polymerization of calcium caseinates solutions induced by gamma irradiation." *Radiation Physics and Chemistry*, **52**, 223-227.

- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, H.-M. und Chiang, I. C. (2006). "Properties of MTGase treated gluten film." *European Food Research and Technology*, **222**, 291-297.
- Lai, H. M. und Padua, G. W. (1998). "Water vapor barrier properties of zein films plasticized with oleic acid." *Cereal Chemistry*, **75**, 194-199.
- Lawrence, J. R., Swerhone, G. D., Leppard, G. G., Araki, T., Zhang, X., West, M. M. und Hitchcock, A. P. (2003). "Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms." *Appl Environ Microbiol*, **69**, 5543-54.
- Lee, S. L., Lee, M. S. und Song, K. B. (2005). "Effect of gamma-irradiation on the physicochemical properties of gluten films." *Food Chemistry*, **92**, 621-625.
- Li, J. und Chen, H. (2000). "Biodegradation of whey protein-based edible films." *Journal of Polymers and the Environment*, **8**, 135-143.
- Lim, L.-T., Mine, Y. und Tung, M. A. (1999). "Barrier and Tensile Properties of Transglutaminase Cross-linked Gelatin Films as Affected by Relative Humidity, Temperature, and Glycerol Content." *Journal of Food Science*, **64**, 616-622.
- Lin, Z., Liu, Y. und Wong, C.-p. (2010). "Facile Fabrication of Superhydrophobic Octadecylamine-Functionalized Graphite Oxide Film." *Langmuir*, **26**, 16110-16114.
- Lu, S., Zhou, N., Tian, Y., Li, H. und Chen, J. (2003). "Purification and properties of transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*." *Journal of Food Biochemistry*, **27**, 109-125.
- Ma, X. F., Yu, J. G. und Jin, F. (2004). "Urea and formamide as a mixed plasticizer for thermoplastic starch." *Polymer International*, **53**, 1780-1785.
- Marco, C., Pérez, G., Ribotta, P. und Rosell, C. M. (2007). "Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends." *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **87**, 2576-2582.
- Marechal, E. (2007). "Native and modified casein." In: *Handbook of Engineering Biopolymers: Homopolymers, Blends and Composites* (Fakirov, S., Bhattacharyya, D., ed.), Carl Hanser Verlag, München, 507-535.
- Mariniello, L. und Porta, R. (2005). "Transglutaminases as biotechnological tools." *Progress in Experimental Tumor Research*, **38**, 174-91.
- 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., 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.
- Matveev, Y. I., Grinberg, V. Y. und Tolstoguzov, V. B. (2000). "The plasticizing effect of water on proteins, polysaccharides and their mixtures. Glassy state of biopolymers, food and seeds." *Food Hydrocolloids*, **14**, 425-437.

- McArdell, J. E. C., Atkinson, T. und Bruton, C. J. (1982). "The interaction of tryptophanyl-tRNA synthetase with the triazine dye Brown MX-5BR." *European Journal of Biochemistry*, **125**, 361-366.
- McHugh, T. H. (2000). "Protein-lipid interactions in edible films and coatings." *Nahrung-Food*, **44**, 148-151.
- McHugh, T. H. und Krochta, J. M. (1994a). "Milk-protein-based edible films and coatings." *Food Technology*, **Jan**, 97-103.
- McHugh, T. H. und Krochta, J. M. (1994b). "Water vapor permeability properties of edible whey protein-lipid emulsions films." *Journal of the American Oil Chemists Society*, **71**, 307-312.
- Mezgheni, E., Vachon, C. und Lacroix, M. (1998). "Biodegradability Behavior of Cross-Linked Calcium Caseinate Films." *Biotechnol. Prog.*, **14**, 534-536.
- Micard, V., Belamri, R., Morel, M.-H. und Guilbert, S. (2000). "Properties of chemically and physically treated wheat gluten films." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2948-2953.
- Newsome, L. D., Johnson, D. E., Lipnick, R. L., Broderius, S. J. und Russom, C. L. (1991). "A QSAR study of the toxicity of amines to the fathead minnow." *Science of the Total Environment*, **109**, 537-551.
- Nieuwenhuizen, W. F., Dekker, H. L., De Koning, L. J., Groneveld, T., De Koster, C. G. und De Jong, G. A. (2003). "Modification of Glutamine and Lysine Residues in Holo and Apo alpha-Lactalbumin with Microbial Transglutaminase." *J Agric Food Chem*, **51**, 7132-7139.
- Oh, J.-H., Wang, B., Field, P. D. und Aglan, H. A. (2004). "Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase." *International Journal of Food Science and Technology*, **39**, 287-294.
- Ohtsuka, T., Sawa, A., Kawabata, R., Nio, N. und Motoki, M. (2000). "Substrate specificities of microbial transglutaminase for primary amines." *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6230-6233.
- Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. und Rigal, L. (2002). "Effects of additives on the mechanical properties, hydrophobicity and water uptake of thermo-moulded films produced from sunflower protein isolate." *Polymer*, **43**, 5417-5425.
- Osterloh, F. (1960). "Einwirkung von Reaktionsfarbstoffen mit der Vinylsulfongruppe auf Wolle." *Melliand Textilber. (1923-1969)*, **41**, 1533-7.
- Park, S. K., Hettiarachchy, N. S. und Were, L. (2000). "Degradation behavior of soy protein-wheat gluten films in simulated soil conditions." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 3027-3031.
- 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).
- Payton, B. W. (1970). "Histological staining properties of Procion Yellow M4RS." *Journal of Cell Biology*, **45**, 659-&.

- Pereda, M., Aranguren, M. I. und Marcovich, N. E. (2010). "Caseinate films modified with tung oil." *Food Hydrocolloids*, **24**, 800-808.
- Pereda, M., Ponce, A. G., Marcovich, N. E., Ruseckaite, R. A. und Martucci, J. F. (2011). "Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity." *Food Hydrocolloids*, **25**, 1372-1381.
- Perez-Gago, M. B. und Krochta, J. M. (2001). "Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 996-1002.
- Perez-Mateos, M., Montero, P. und Gomez-Guillen, M. C. (2009). "Formulation and stability of biodegradable films made from cod gelatin and sunflower oil blends." *Food Hydrocolloids*, **23**, 53-61.
- Piotrowska, B., Sztuka, K., Kolodziejska, I. und Dobrosielska, E. (2008). "Influence of transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) on the properties of fish-skin gelatin films." *Food Hydrocolloids*, **22**, 1362-1371.
- PlasticsEurope. (2011). "Plastics - the Facts 2011." http://www.plasticseurope.org/documents/document/20111026132702-final_factsfigures_uk_10102011.pdf.
- Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H. und Guilbert, S. (2003). "Study of wheat gluten plasticization with fatty acids." *Polymer*, **44**, 115-122.
- Prescott, G. H., Mitchell, D. F. und Fahmy, H. (1968). "Procion dyes as matrix markers in growing bone and teeth." *Am J Phys Anthropol*, **29**, 219-24.
- Rae, J. L. (1974). "Movement of Procion dye in crystalline lens." *Investigative Ophthalmology*, **13**, 147-150.
- Rae, J. L., Truitt, K. D. und Kuszak, J. R. (1983). "The use of procion dyes for light microscopy of the frog lens." *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **24**, 1167-71.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2012). "Duale Reihe Biochemie." Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 3.Auflage.
- Rivero, S., Garcia, M. A. und Pinotti, A. (2010). "Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films." *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **11**, 369-375.
- Schellenträger, M. (2006). "Untersuchungen zur oxidativen Entfärbung ausgewählter Reaktivfarbstoffe: Analyse der Abbauprodukte mittels hochauflösender LC-MS," Dissertation, Fachbereich Analytische Chemie, Bergischen Universität Wuppertal.
- Schilling, M. und Thum, O. "Hydrophobisiertes Proteinhydrolysat." DE 10 2010 062 600 A1 (*Offenlegungsschrift*) (14.06.2012), Evonik Goldschmidt GmbH, Essen, DE.
- Schormüller, J. (1959). "Über die Aminosäuren der Schweineschwarte." *Food / Nahrung*, **3**, 421-427.
- Schrieber, R., Gareis, H. (2007). "Gelatine Handbook - Theory and Industrial Practice." Wiley-VCH verlag GmbH & Co.KG, Weinheim.
- Schultz, T. W., Wilke, T. S., Bryant, S. E. und Hosein, L. M. (1991). "QSARs for selected aliphatic and aromatic amines." *Sci. Total Environ.*, **109-110**, 581-7.

- Seguro, K. (1999). "Transglutaminase." In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation* (Flickinger, M. C. und Drew, S. W., eds.), John Wiley & Sons, New York, 2568-2580, Vol. 5.
- Shellhammer, T. H. und Krochta, J. M. (1997). "Whey protein emulsion film performance as affected by lipid type and amount." *Journal of Food Science*, **62**, 390-394.
- Shore, J. (1968). "Mechanism of reaction of proteins with reactive dyes I-III." *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, **84**.
- Small, D. A. P., Lowe, C. R., Atkinson, T. und Bruton, C. J. (1982). "Affinity labeling of enzymes with triazine dyes - Isolation of a peptide in the catalytic domain of horse-liver alcohol-dehydrogenase using Procion Blue MX-R as a structural probe." *European Journal of Biochemistry*, **128**, 119-123.
- Soleimani-Gorgani, A. und Taylor, J. A. (2008). "Dyeing of nylon with reactive dyes. Part 3: Cationic reactive dyes for nylon." *Dyes and Pigments*, **76**, 610-623.
- Soliman, E. A. und Furuta, M. (2009). "Influence of γ -irradiation on mechanical and water barrier properties of corn protein-based films." *Radiation Physics and Chemistry*, **78**, 651-654.
- Sommer, I. und Kunz, P. M. (2012a). "Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films." *Journal of Plastic Film & Sheeting*, **28**, 30-62.
- Sommer, I. und Kunz, P. M. (2012b). "Improving the water resistance of biodegradable collagen films." *Journal of Applied Polymer Science*, **125**, E27-E41.
- Sothornvit, R. und Krochta, J. M. (2005). "Plasticizers in edible films and coatings." In: *Innovations in Food Packaging* (Han, J., ed.), Elsevier, Amsterdam, 403-433.
- Stachel, I., Schwarzenbolz, U., Henle, T. und Meyer, M. (2010). "Cross-Linking of Type I Collagen with Microbial Transglutaminase: Identification of Cross-Linking Sites." *Biomacromolecules*, **11**, 698-705.
- Staroszczyk, H., Pielichowska, J., Sztuka, K., Stangret, J. und Kolodziejska, I. (2012). "Molecular and structural characteristics of cod gelatin films modified with EDC and TGase." *Food Chemistry*, **130**, 335-343.
- Stuchell, Y. M. und Krochta, J. M. (1994). "Enzymatic treatments and thermal effects on edible soy protein films." *J. Food Sci.*, **59**, 1332-1337.
- Stute, R. (1973). "Die Wechselwirkung zwischen Stärke und Reaktivfarbstoffen - Teil 1. Handelsübliche Farbstoffe, ihre Wechselwirkung mit Stärken und ihre Anwendung in der Stärke-Mikroskopie." *Die Stärke*, **25**, 409-417.
- Synowiecki, J. und Wolosowska, S. (2006). "Immobilization of thermostable β -glucosidase from *Sulfolobus shibatae* by crosslinking with transglutaminase." *Enzyme and Microbial Technology*, **39**, 1417-1422.
- Talens, P. und Krochta, J. M. (2005). "Plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films." *Journal of Food Science*, **70**, E239-E243.

- Tang, C.-H., Jiang und Y. (2007). "Modulation of mechanical and surface hydrophobic properties of food protein films by transglutaminase treatment." *Food Research International*, **40**, 504-509.
- Tang, C.-H., Jiang, Y., Wen, Q.-B. und Yang, X.-Q. (2005). "Effect of transglutaminase treatment on the properties of cast films of soy protein isolates." *Journal of Biotechnology*, **120**, 296-307.
- Taylor, M. M., Liu, C. K., Latona, N., Marmer, W. N. und Brown, E. M. (2002). "Enzymatic modification of hydrolysis products from collagen using a microbial transglutaminase. II. Preparation of films." *J. Am. Leath. Chem. Ass.*, **97**, 225-234.
- Tian, H., Liu, D. und Zhang, L. (2009). "Structure and Properties of Soy Protein Films Plasticized with Hydroxyamine." *Journal of Applied Polymer Science*, **111**, 1549-1556.
- Tropini, V., Lens, J. P., Mulder, W. J. und Silvestre, F. (2004). "Wheat gluten films cross-linked with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide." **20**, 281-289.
- Wangtueai, S., Noomhorm, A. und Regenstein, J. M. (2010). "Effect of Microbial Transglutaminase on Gel Properties and Film Characteristics of Gelatin from Lizardfish (*Saurida* spp.) Scales." *Journal of Food Science*, **75**, C731-C739.
- Widdecke, H., Marek, A. und Otten, A. (2006). "Biokunststoffe: Verarbeitungsparameter und technische Kennwerte ; ein weltweiter Überblick." FH Braunschweig/Wolfenbüttel, Inst. für Recycling.
- Yang, Y.-y., Zhang, K.-z., Song, Y.-h. und Zheng, Q. (2011). "Preparation and properties of wheat gluten/rice protein composites plasticized with glycerol." *Chinese Journal of Polymer Science*, **29**, 87-92.
- Yokoyama, K., Nio, N. und Kikuchi, Y. (2004). "Properties and applications of microbial transglutaminase." *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**, 447-454.
- Yoshimura, K., Machida, S. und Masuda, F. (1980). "Biodegradation of long-chain alkylamines." *Journal of the American Oil Chemists Society*, **57**, 238-241.
- Zahn, H. und Reinert, G. (1968). "Über die Bindung von Vinylsulfon- und Dichlortriazin-Reaktivfarbstoffen an Kollagen." *Kolloid-Zeitschrift & Zeitschrift für Polymere*, **226**, 1-10.
- Zhang, X., Gozukara, Y., Sangwan, P., Gao, D. und Bateman, S. (2010). "Biodegradation of chemically modified wheat gluten-based natural polymer materials." *Polymer Degradation and Stability*, **95**, 2309-2317.
- Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. und Bol, J. (1995). "Microbial transglutaminase. A review of its production and application in food processing." *Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 277-282.
- Zollinger, H. (1961). "Chemismus der Reaktivfarbstoffe." *Angewandte Chemie-International Edition*, **73**, 125-136.

8 Anhang

8.1 Proteinfilme

8.1.1 Mechanische Charakterisierung

Tabelle 8-1: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG Activa[®]WM, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) in Abhängigkeit von Weichmachertyp und -konzentration. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm bzw. 15 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Weichmacher		-MTG _{Activa}		+MTG _{Activa}	
Typ	Konz. [% (w/w Protein)]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Glycerin	0	48,14 \pm 2,52	2,06 \pm 0,23	39,54 \pm 3,05	1,84 \pm 0,22
	12,5	33,78 \pm 1,91	5,46 \pm 0,76	28,27 \pm 1,50	8,37 \pm 1,05
	25	18,17 \pm 2,77	11,09 \pm 1,46	12,46 \pm 1,20	10,61 \pm 1,56
	50	6,69 \pm 0,80	48,68 \pm 6,51	5,74 \pm 0,89	50,73 \pm 5,25
	75	3,48 \pm 0,49	74,09 \pm 5,29	3,75 \pm 0,44	72,86 \pm 6,67
	100	2,69 \pm 0,35	81,81 \pm 7,82	2,97 \pm 0,43	74,46 \pm 9,05
Harnstoff	0	48,14 \pm 2,52	2,06 \pm 0,23	39,54 \pm 3,05	1,84 \pm 0,22
	12,5	40,02 \pm 1,28	3,53 \pm 0,35	33,93 \pm 2,25	2,98 \pm 0,39
	25	11,90 \pm 1,46	10,19 \pm 1,50	13,84 \pm 1,10	15,86 \pm 1,97
	50	5,60 \pm 0,46	50,25 \pm 4,18	5,65 \pm 0,48	57,03 \pm 6,76
	75	8,93 \pm 0,93	32,59 \pm 5,09	6,14 \pm 0,60	40,38 \pm 5,67
	100	6,38 \pm 0,83	16,50 \pm 2,28	6,18 \pm 0,40	21,93 \pm 3,52

Tabelle 8-2: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (ohne Weichmacher) in Abhängigkeit von der MTG Activa[®]WM-Konzentration und dem Herstellungsverfahren. -MTG_{Activa}: Zugabe von inaktivierter MTG Activa[®]WM. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	MTG-Konz. [U/g _{Protein}]	-MTG _{Activa}		+MTG _{Activa}	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Standard	0	54,94 \pm 4,43	4,02 \pm 0,39	54,94 \pm 4,43	4,02 \pm 0,39
	6,25	52,94 \pm 3,54	3,00 \pm 0,36	48,28 \pm 2,19	2,75 \pm 0,17
	12,5	50,57 \pm 3,15	2,66 \pm 0,26	42,28 \pm 3,43	2,10 \pm 0,23
	25	48,14 \pm 2,52	2,06 \pm 0,23	39,54 \pm 3,05	1,84 \pm 0,22
	50	39,30 \pm 2,00	1,65 \pm 0,13	27,41 \pm 2,50	1,28 \pm 0,14
Beschichtung	25	46,17 \pm 3,17	2,15 \pm 0,20	42,39 \pm 1,85	2,16 \pm 0,30

Tabelle 8-3: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (ohne Weichmacher) in Abhängigkeit von der MTG S2P-Konzentration und dem Herstellungsverfahren. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	MTG-Konz. [U/g _{Protein}]	+MTG _{S2P}	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Standard	0	54,94 \pm 4,43	4,02 \pm 0,39
	6,25	50,59 \pm 2,76	3,96 \pm 0,52
	12,5	50,23 \pm 2,45	3,79 \pm 0,49
	25	50,81 \pm 2,90	3,21 \pm 0,34
	50	48,13 \pm 2,01	2,79 \pm 0,28
Beschichtung	25	49,44 \pm 2,19	4,42 \pm 0,52

Tabelle 8-4: Zugeigenschaften von Gelatine-Filmen (ohne Weichmacher) in Abhängigkeit von der MTG S2P-Konzentration und dem Herstellungsverfahren. Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	MTG-Konz. [U/g _{Protein}]	+MTG _{S2P}	
		σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
Standard	0	115,79 ± 3,25	6,68 ± 0,42
	25	115,25 ± 4,81	4,02 ± 0,41
Beschichtung	25	107,98 ± 2,42	6,93 ± 0,35

Tabelle 8-5: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standardverfahren) in Abhängigkeit von der Anzahl der Bewitterungszyklen (Wässerung-Trocknung). Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 5$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Bewitterungszyklen	-MTG		+MTG _{S2P}	
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
0	54,94 ± 4,43	4,02 ± 0,39	50,81 ± 2,90	3,21 ± 0,34
1	52,57 ± 2,33	3,70 ± 0,26	48,62 ± 2,43	3,20 ± 0,36
2	53,27 ± 2,64	3,70 ± 0,35	49,46 ± 3,01	3,35 ± 0,26
3	47,77 ± 2,06	3,71 ± 0,50	43,41 ± 2,01	3,17 ± 0,16
4	47,62 ± 2,75	3,66 ± 0,29	45,27 ± 2,67	3,27 ± 0,41

Tabelle 8-6: Zugeigenschaften von Rohkollagen-Filmen (\pm MTG S2P, 25 U/g_{Protein}, Standard- bzw. Beschichtungsverfahren) in Abhängigkeit vom Fettanteil (vor/nach Fettextraktion). Einspannlänge 100 mm, Probenbreite 10 mm, Prüfgeschwindigkeit 50 mm/min. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Zeitpunkt	-MTG		+MTG _{S2P}	
	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]	σ_M [N/mm ²]	ϵ_B [%]
vor Extraktion	54,94 ± 4,43	4,02 ± 0,39	50,81 ± 2,90	3,21 ± 0,34
nach Extraktion (Standard)	74,42 ± 3,75	4,94 ± 0,64	72,10 ± 2,85	3,59 ± 0,42
nach Extraktion (Beschichtung)	-	-	72,64 ± 3,09	5,09 ± 0,64

8.1.2 Benetzbarkeit

Tabelle 8-7: Kontaktwinkel verschiedener Rohkollagen-Filme (ohne Weichmacher). 5 μ L Tropfen deionisiertes Wasser auf die Filmfläche appliziert. $\bar{x} \pm s$, $n \geq 10$. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	Vernetzung/ Behandlung	Kontaktwinkel [°]	
		Oberseite	Unterseite
Standard	-MTG (ohne Behandlung)	112,5 ± 5	104,7 ± 5
	-MTG (ohne Behandlung, nach Extraktion)	107,7 ± 6	100,8 ± 4
	-MTG (1,5 g Maltodextrin)	112,5 ± 3	98,5 ± 3
	-MTG (1,5 g inaktivierte Activa)	109,3 ± 4	101,6 ± 3
	+MTG (25 U/g Activa)	112,1 ± 5	103,7 ± 6
	+MTG (25 U/g S2P)	110,9 ± 5	100,2 ± 4
	+MTG (25 U/g S2P, nach Extraktion)	110,6 ± 5	104,5 ± 4
	+MTG (25 U/g S2P + 1,5 g Maltodextrin)	115,5 ± 2	104,6 ± 3
	+MTG (25 U/g S2P + 1,5 g inaktivierte Activa)	109,5 ± 3	99,3 ± 3
Beschichtung	-MTG (1,5 g Maltodextrin)	59,5 ± 3	104,3 ± 4
	-MTG (1,5 g inaktivierte Activa)	111,5 ± 3	101,1 ± 4
	+MTG (25 U/g Activa)	111,4 ± 4	101,9 ± 4
	+MTG (25 U/g S2P)	115,7 ± 6	99,8 ± 3
	+MTG (25 U/g S2P + 1,5 g Maltodextrin)	59,0 ± 3	102,2 ± 6
	+MTG (25 U/g S2P + 1,5 g inaktivierte Activa)	114,5 ± 4	96,8 ± 4

8.1.3 Löslichkeit

Tabelle 8-8: Löslichkeit verschiedener Rohkollagen-Filme (ohne Weichmacher) in Wasser unter Angabe der Gewichtsverluste in [%]. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. $\bar{x} \pm s$, n ≥ 3. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	Vernetzung/ Behandlung	23 °C	30 °C	40 °C	55 °C	85 °C
Standard	-MTG (ohne Behandlung)	11,09 ±0,25	13,25 ±0,30	100	-	-
	-MTG (ohne Behandlung, nach Extraktion)	10,9 ±0,45	12,91 ±0,36	100	-	-
	-MTG (0,375 g inaktivierte Activa)	14,64 ±0,37	16,38 ±0,44	100	-	-
	-MTG (0,75 g inaktivierte Activa)	16,38 ±0,08	19,64 ±0,57	100	-	-
	-MTG (1,5 g inaktivierte Activa)	24,11 ±0,86	26,22 ±0,47	100	-	-
	-MTG (3 g inaktivierte Activa)	28,58 ±0,31	32,33 ±0,40	100	-	-
	+MTG (25 U/g Activa)	22,02 ±0,49	22,7 ±0,42	23,97 ±0,43	24,7 ±0,43	29,69 ±0,37
	+MTG (6,25 U/g S2P)	-	-	-	21,73 ±0,97	100
	+MTG (12,5 U/g S2P)	-	-	-	17,13 ±0,68	32,58 ±0,70
	+MTG (25 U/g S2P)	9,70 ±0,16	10,38 ±0,26	12,95 ±0,13	13,96 ±0,26	26,0 ±0,59
	+MTG (25 U/g S2P, nach Extraktion)	8,78 ±0,22	10,33 ±0,44	10,59 ±0,06	10,75 ±0,27	15,99 ±0,37
	+MTG (50 U/g S2P)	-	-	-	12,09 ±0,33	19,47 ±0,89
	+MTG (25 U/g S2P) + 1,5 g inaktivierte TG	20,17 ±0,54	21,57 ±0,80	25,39 ±0,78	27,94 ±0,34	48,64 ±2,03
Beschichtung	+MTG (25 U/g Activa)	27,51 ±1,33	26,76 ±0,97	29,04 ±0,61	28,27 ±0,63	48,81 ±2,47
	+MTG (6,25 U/g S2P)	-	-	-	28,99 ±0,58	100
	+MTG (12,5 U/g S2P)	-	-	-	28,63 ±0,58	46,11 ±2,53
	+MTG (25 U/g S2P)	12,43 ±0,44	14,2 ±0,60	16,97 ±0,22	19,63 ±0,83	38,35 ±2,02
	+MTG (50 U/g S2P)	-	-	-	19,17 ±1,04	37,14 ±1,74

Tabelle 8-9: Löslichkeit verschiedener Gelatine-Filme (ohne Weichmacher) in Wasser unter Angabe der Gewichtsverluste in [%]. 10 x 50 mm Filmprobe in 10 mL dH₂O für 1 h bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. $\bar{x} \pm s$, n ≥ 3. MTG...mikrobielle Transglutaminase.

Verfahren	Vernetzung/ Behandlung	23 °C	30 °C	40 °C	55 °C	85 °C
Standard	-MTG (ohne Behandlung)	9,73 ±0,12	13,01 ±0,61	-	-	-
	+MTG (25 U/g S2P)	8,25 ±0,48	8,37 ±0,27	8,96 ±0,06	8,94 ±0,19	9,77 ±0,09
Beschichtung	+MTG (25 U/g S2P)	11,31 ±0,36	12,40 ±0,41	14,43 ±0,14	15,95 ±0,39	21,71 ±0,64

8.2 RP-HPLC

8.2.1 Kalibrierung

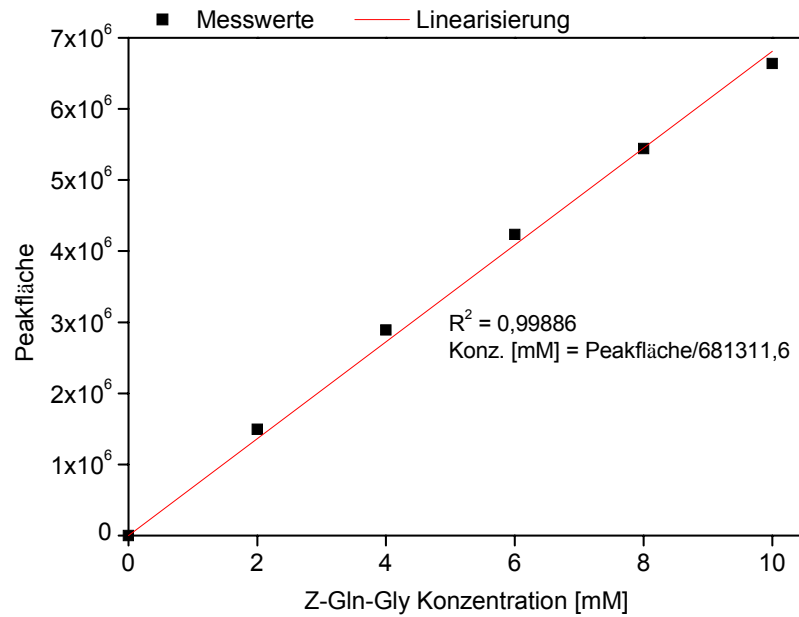


Abbildung 8-1: Kalibrierung des Versuches Z-Gln-Gly + Octylamin.

8.2.2 Chromatogramme

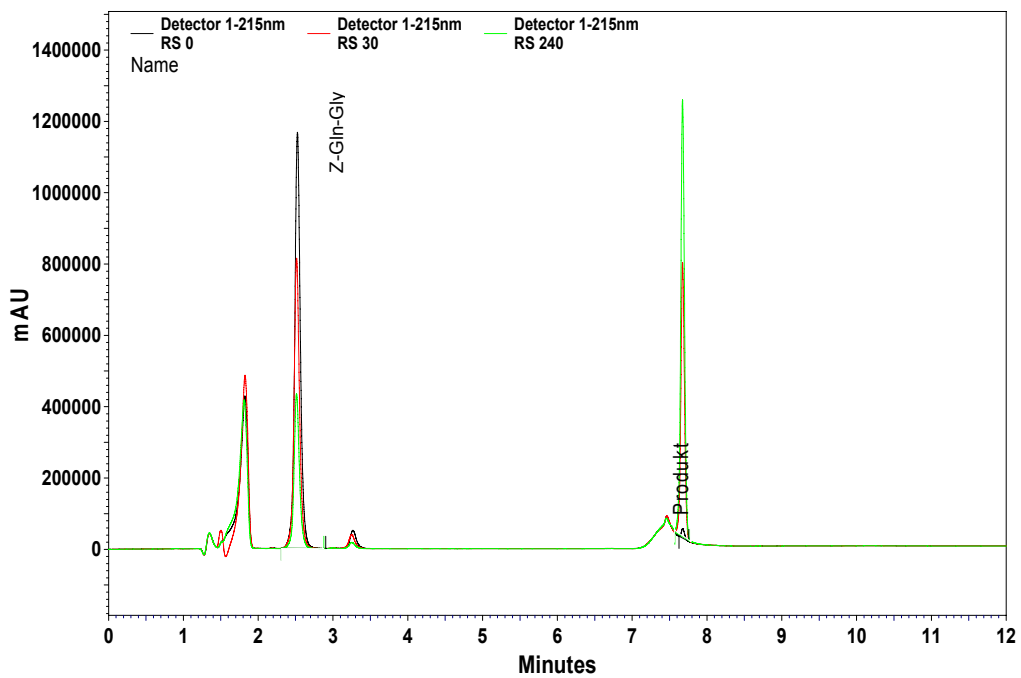


Abbildung 8-2: Chromatogramm Butylamin + Z-Gln-Gly + MTG Activa[®]WM. Trennung von 0-5 min mit Laufmittel A (30 % ACN, 69,9 % dH₂O, 0,1 % TFA) und von 5,1-12 min mit Laufmittel B (60 % ACN, 39,9 % dH₂O, 0,1 % TFA). Retentionszeit: Substrat 2,5 min; Produkt 7,7 min.

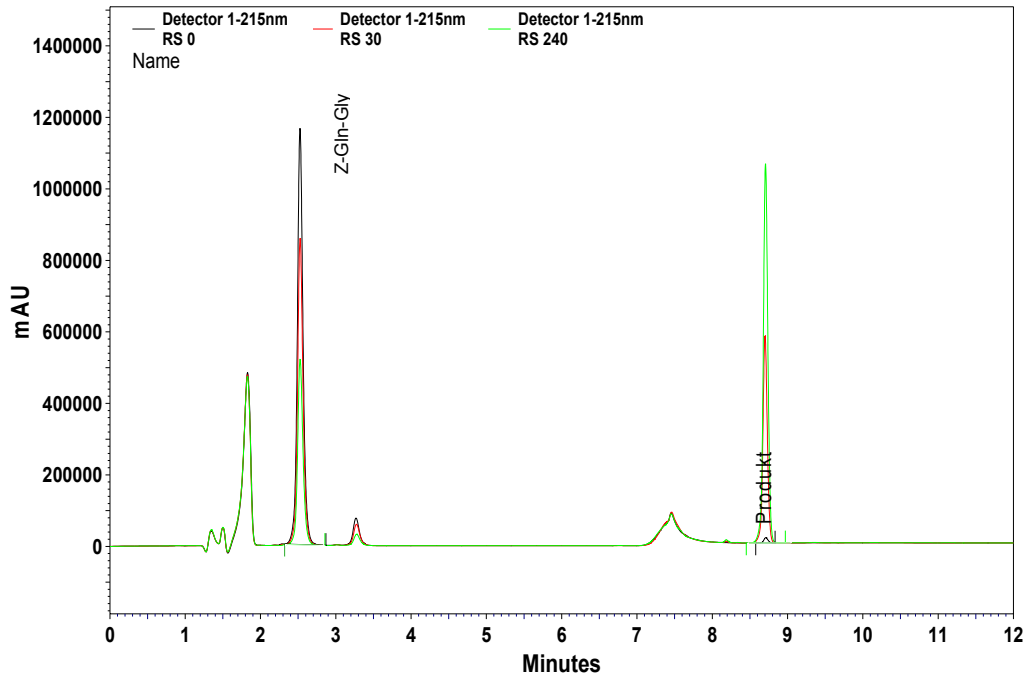


Abbildung 8-3: Chromatogramm Hexylamin + Z-Gln-Gly + MTG Activa[®]WM. Trennung von 0-5 min mit Laufmittel A (30 % ACN, 69,9 % dH₂O, 0,1 % TFA) und von 5,1-12 min mit Laufmittel B (60 % ACN, 39,9 % dH₂O, 0,1 % TFA). Retentionszeit: Substrat 2,5 min; Produkt 8,7 min.

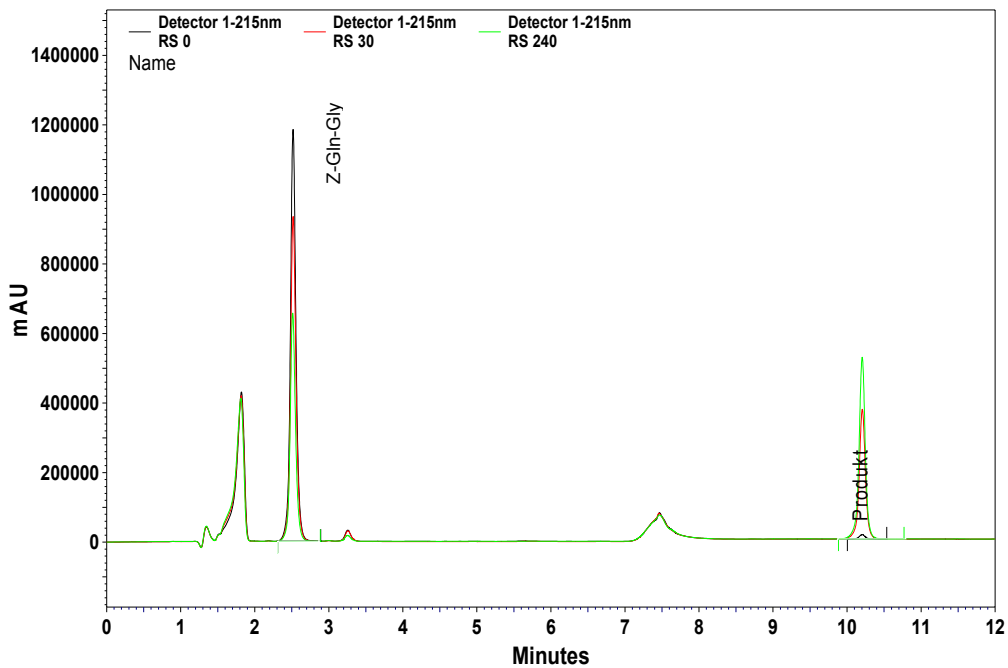


Abbildung 8-4: Chromatogramm Octylamin + Z-Gln-Gly + MTG Activa[®]WM. Trennung von 0-5 min mit Laufmittel A (30 % ACN, 69,9 % dH₂O, 0,1 % TFA) und von 5,1-12 min mit Laufmittel B (60 % ACN, 39,9 % dH₂O, 0,1 % TFA). Retentionszeit: Substrat 2,5 min; Produkt 10,2 min.

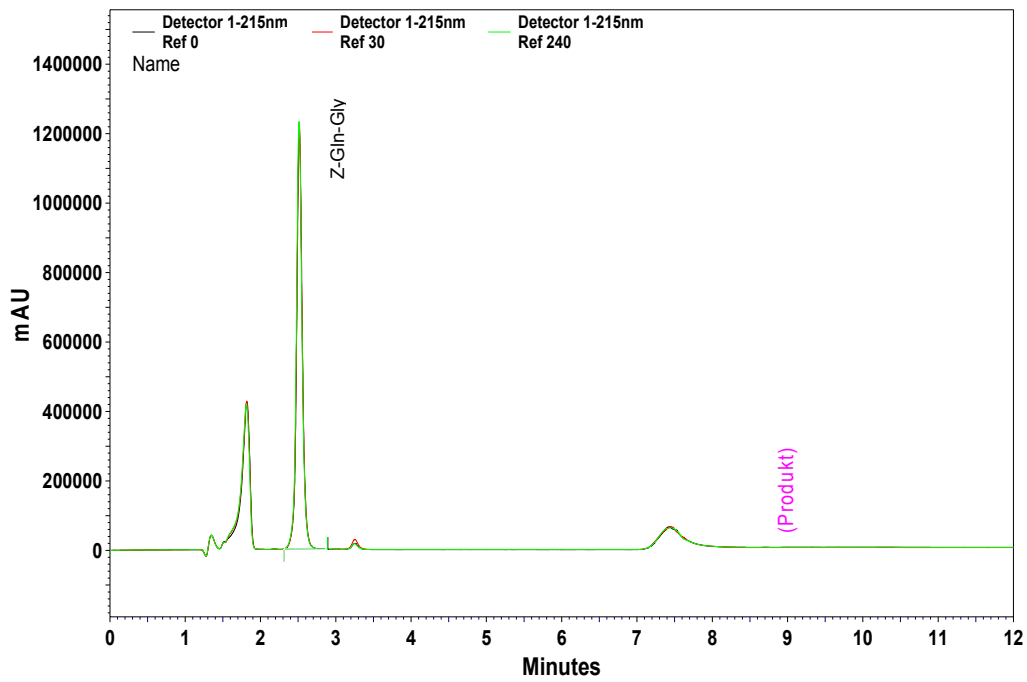


Abbildung 8-5: Chromatogramm Z-Gln-Gly + MTG Activa[®]WM (Referenz). Trennung von 0-5 min mit Laufmittel A (30 % ACN, 69,9 % dH₂O, 0,1 % TFA) und von 5,1-12 min mit Laufmittel B (60 % ACN, 39,9 % dH₂O, 0,1 % TFA). Retentionszeit: Substrat 2,5 min; kein Produkt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Kristin Riedel, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Halle (Saale), 31.01.2013

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Kristin Riedel
Geburtsdatum/-ort: 01.02.1984 in Schleiz
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Akademischer Grad: Dipl.-Ing. Bioprozesstechnik

Schulischer und Beruflicher Werdegang

04/2009 – 03/2013 **Promotion** am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie, AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema: „Kovalente Modifikationen von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen zur Optimierung von Filmeigenschaften“

07/2008 – 03/2009 **Diplomarbeit** „Untersuchungen zu kovalenten Modifikation einer Glutarylamidase mittels Transglutaminase“
AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte

03/2008 – 05/2008 **Industriepraktikum** bei Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (Frankfurt/Main) in der Abteilung Small Molecules

10/2003 – 03/2009 **Studium Bioingenieurwesen** (Vertiefung: Bioprozesstechnik) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/2000 – 06/2003 **Dr. Konrad Duden Gymnasium Schleiz**
Allgemeine Hochschulreife

09/1990 – 06/2000 **Staatliche Regelschule Ziegenrück**
Realschulabschluss

Publikationsliste

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem

Patzsch, K., Riedel, K., Pietzsch, M. (2010). "Parameter optimization of protein film production using microbial transglutaminase." *Biomacromolecules*, 11 (4), 896-903

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

Konferenzbeiträge

Riedel, K., Pietzsch, M. „Herstellung von Folien aus Rohkollagen.“ DEHEMA Frühjahrstagung der Biotechnologen 2013, 04.-05.März 2013, Frankfurt/Main, Deutschland. (Poster)

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