



Untersuchungen zur Herstellung und Optimierung proteinogener Biowerkstoffe

DISSERTATION

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

eingereicht am

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

von

Herrn Dipl.-Wirtsch.-Ing. Patrick Frohberg
geboren am 31. März 1980 in Halle (Saale), Deutschland

Geschäftsführender Direktor des Zentrums für Ingenieurwissenschaften:
Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. Holm Altenbach

Gutachter:

1. Prof. Dr.-Ing. Dr. h. c. Joachim Ulrich
2. Prof. Dr.-Ing. Günther Schulte

Tag der mündlichen Verteidigung: 22.02.2010

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Thermische Verfahrenstechnik des Zentrums für Ingenieurwissenschaften sowie in der AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte des Institutes für Pharmazie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Was auf natürlichem Wege nur schwer realisierbar erscheint, ermöglicht die Wissenschaft und erlaubt mir zwei Doktorvätern meinen besonderen Dank zu bekunden. Ich bedanke mich daher ganz herzlich bei Prof. Joachim Ulrich und Prof. Markus Pietzsch für die Möglichkeit zur Promotion, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppen und die zahlreichen Anregungen und interessanten Diskussionen. Vor allem freue ich mich über das entgegengebrachte Vertrauen und die Förderung meiner Person.

Ich danke allen Studenten, wissenschaftlichen Hilfskräften und Praktikanten, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Isabell Stolte, die durch ihr Interesse, ihr Engagement und große Anstrengungen ein gemeinsames wissenschaftsorientiertes Gründungsvorhaben in die Welt gerufen hat.

Allen Mitarbeitern der Thermischen Verfahrenstechnik und der AG Aufarbeitung biotechnischer Produkte gilt mein besonderer Dank für die herzliche Aufnahme, die gute Atmosphäre, die immerwährende Hilfsbereitschaft, die inspirierenden Diskussionen und damit zusammengenommen für eine unvergessliche Zeit.

Für die finanzielle Förderung meiner Promotion bedanke ich mich bei der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. sowie beim Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie in Verbindung mit dem Europäischen Sozialfonds für die Unterstützung der aus der Promotion hervorgegangenen Gründungsidee.

Bei meiner Familie und meinen Freunden möchte ich mich ganz herzlich für die uneingeschränkte Unterstützung, Geduld und Rücksichtnahme bedanken.

Halle (Saale), Dezember 2009

Patrick Frohberg

Akademisches Gleichgewicht des Schreckens:
"Ich werde Sie zitieren!" - "Ich Sie auch!"
(Rainer Kohlmayer)

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	3
2.1	BIOPOLYMERE	3
2.1.1	Einführung und Definitionen	3
2.1.2	Natur oder Petrochemie?	4
2.1.3	Proteine – Biopolymere der Zukunft?	5
2.1.3.1	Einführung und Klassifizierung	5
2.1.3.2	Proteine als einzigartige Polymerwerkstoffe	7
2.1.4	Produkte	9
2.1.4.1	Marktüberblick	9
2.1.4.2	Filme, Folien und Beschichtungen.....	10
2.1.5	Funktionale Eigenschaften von Proteinfolien.....	10
2.1.5.1	Überblick	10
2.1.5.2	Mechanische Eigenschaften.....	11
2.2	HERSTELLUNGSVERFAHREN.....	12
2.2.1	Grundlagen	12
2.2.2	Lösungsmittelverfahren.....	13
2.2.3	Thermoplastische Verarbeitung proteinbasierter Materialien.....	14
2.2.3.1	Grundlagen	14
2.2.3.2	Glasübergang in Proteinen	17
2.2.4	Praxisbemerkungen	19
2.2.5	Extrusion.....	20
2.2.5.1	Grundlagen	20
2.2.5.2	Extrusion von Proteinsystemen	21
2.2.5.3	Extruder als enzymatische Bioreaktoren.....	22
2.3	MODIFIKATIONEN	23
2.3.1.1	Überblick und Zielsetzung	23
2.3.1.2	Weichmacher	24
2.3.1.3	Kristallisation	28
2.4	ANALYTIK.....	31
2.4.1	Optik und Organoleptik	31
2.4.2	Mechanische Produkteigenschaften.....	31
2.4.2.1	Zugfestigkeit.....	32
2.4.2.2	Bruchdehnung	33
2.4.2.3	Elastizitätsmodul aus dem Zugversuch	33
2.4.3	Biochemische Analyseverfahren	33
2.4.3.1	Enzymatische Aktivität.....	33
2.4.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.5	STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG	34
2.5.1	Ausgangspunkt und Grundidee	34
2.5.2	Definition und Vorgehensweise	35
2.6	WISSENSCHAFTLICHE PROBLEMSTELLUNG.....	36

3	MATERIALIEN	38
3.1	PROTEINE	38
3.1.1	Natrium-Caseinat	38
3.1.2	Erbse	39
3.1.3	Gelatine	40
3.2	ENZYME	42
3.2.1	Transglutaminase	42
3.2.1.1	Einführung und Reaktionsmechanismus	42
3.2.1.2	Industrielle Anwendungen	44
3.3	HILFSSTOFFE	46
3.3.1	Lösungsmittel	46
3.3.2	Weichmacher	46
3.3.2.1	Glycerin	46
3.3.2.2	Polyethylenglykol (PEG)	47
3.3.3	Additive	48
4	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	49
4.1	FOLIENHERSTELLUNG	49
4.1.1	Gießverfahren	49
4.1.2	Extrusion	50
4.1.2.1	Materialien	50
4.1.2.2	Versuchsanlagen und -durchführung	50
4.1.2.3	Prozessführung	56
4.2	MODIFIKATION	61
4.2.1	Weichmacher	61
4.2.2	Enzymatische Quervernetzung	61
4.2.3	Kristallisation	62
4.3	ANALYTIK	63
4.3.1	Äußere Merkmale	63
4.3.2	Mechanische Produkteigenschaften	63
4.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	64
4.5	STATISTIK	66
4.5.1	Deskriptive Statistik	66
4.5.2	Statistische Versuchsplanung	67
5	DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE	68
5.1	HERSTELLUNGSVERFAHREN	68
5.1.1	Lösungsmittelverfahren	68
5.1.2	Extrusion	68
5.1.2.1	Extruder A – Haake PolyLab OS PTW 24/40	68
5.1.2.2	Extruder B – ZE25A-UTXx48D-UG	70
5.1.3	Optik und Organoleptik	72
5.1.3.1	Extruder A	72
5.1.3.2	Extruder B	73

5.2	MECHANISCHE EIGENSCHAFTEN.....	74
5.2.1	Extruder A.....	74
5.2.2	Extruder B.....	76
5.3	MODIFIKATION.....	78
5.3.1	Weichmacher.....	78
5.3.2	Enzymatische Quervernetzung.....	79
5.3.2.1	Extruder A.....	79
5.3.2.2	Extruder B.....	79
5.3.3	Kristallisation.....	86
5.3.3.1	Folienherstellung.....	86
5.3.3.2	Mechanische Eigenschaften.....	86
5.3.3.3	Morphologie.....	90
5.4	STATISTISCHE VERSUCHSPLANUNG.....	92
6	DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	100
6.1	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	100
6.1.1	Herstellungsverfahren.....	100
6.1.1.1	Lösungsmittelverfahren.....	100
6.1.1.2	Thermoplastisches Verfahren.....	100
6.1.2	Thermoplastische Verarbeitung von Proteinen.....	108
6.1.3	Analytik.....	108
6.1.3.1	Optik und Organoleptik.....	108
6.1.3.2	Mechanische Eigenschaften.....	110
6.1.4	Modifikationen.....	112
6.1.4.1	Weichmacher.....	112
6.1.4.2	Enzymatische Quervernetzung.....	114
6.1.4.3	Kristallisation.....	115
6.1.5	Statistische Versuchsplanung.....	117
6.2	FEHLERBETRACHTUNG.....	118
6.3	ERZIELTE ERKENNTNISSE IM ÜBERBLICK.....	122
6.4	AUSBLICK.....	123
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	125
8	ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS.....	127
8.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	127
8.2	SYMBOLVERZEICHNIS.....	128
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	130
10	ANHANG.....	I
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	1
	LEBENS LAUF.....	2
	PUBLIKATIONS LISTE.....	3

1 Einleitung

Die entscheidende Rolle von Kunststoffen in modernen Gesellschaften ist unumstritten und eröffnete großen Teilen der Weltbevölkerung den Zugang zu einem höheren Lebensstandard, verbesserter Gesundheitsversorgung und Informationsquellen. Simultan dazu gewinnt in neuerer Zeit der Umwelt- und Ressourcenschutz auf nationaler und internationaler Ebene zunehmend an Bedeutung und löste eine dynamische Nachfrageentwicklung nach umweltfreundlichen Technologien und Produkten aus. Viele Unternehmen streben den Übergang zur Nachhaltigkeit an und erkennen, dass vor allem umwelttechnologische Innovationen maßgeblich zur Lösung des Konfliktes zwischen wirtschaftlicher Entwicklung, Umweltschutz und sozialem Fortschritt beitragen können. Diese Innovationsdynamik spiegelt sich deutlich in der Kunststoffindustrie wider, die sich umweltpolitischen Entwicklungen, einem verstärkten Umweltbewusstsein der Bevölkerung und der Verknappung fossiler Rohstoffe und deren hohen preislichen Volatilitäten nicht entziehen kann. Die Bemühungen mündeten in der Entwicklung einer neuen Produktlinie, den Biopolymeren, deren Marktentwicklung sich inzwischen durch äußerst dynamische Tendenzen mit einem ständig wechselnden Angebot an vielfältigsten Produkten auf der Basis von nachwachsenden und fossilen Rohstoffen auszeichnet. Ein aktuelles Weltmarktvolumen von ca. 30 Mrd. € bei einem Wachstum von mehr als 14 % p. a. verdeutlichen das enorme Potenzial in Form stark expandierender Kapazitäten, die zurzeit etwa 8 % des heutigen Kunststoffmarktes abdecken [Eur08, Fre09, She09].

Besonders Proteine gelten durch ihre vollständig biologisch abbaubare, nicht-giftige, essbare und kompostierbare Natur sowie ihre Funktionsvielfalt als aussichtsreiche Rohstoffe für zukunftsfähige Biopolymere. Durch ihre Fähigkeit, alleinstehende Materialien durch Ausbildung und Stabilisierung eines dreidimensionalen Proteinnetzwerkes hervorzubringen, rückte diese Werkstoffklasse in neuester Zeit in das Interessenzentrum von Forschung und Industrie. Um die Marktpotenziale ausschöpfen zu können, müssen bestehende Barrieren abgebaut werden, die derzeit neben hohen Entwicklungskosten und den unzureichenden physikalischen Produkteigenschaften vor allem in Form von fehlenden Kostenvorteilen der Massenproduktion sichtbar werden. Jedoch bieten bisherige Technologien keine zufriedenstellende Lösung der geschilderten Problemstellungen und hemmen damit die technologische und ökonomische Entwicklungsdynamik proteinogener Produkte.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Entwicklung eines kontinuierlichen Herstellungsverfahrens für proteinbasierte Biopolymere, insbesondere Proteinfolien, das Synergien aus ökonomischer Effizienz und ökologischer Nachhaltigkeit hervorzubringen vermag. Darüber hinaus sollen durch gezielte Optimierung und Modifikation der funktionalen Produkteigenschaften in Kombination mit einer stofflichen Ver-

edelung und Mehrwertschaffung Skaleneffekte erzeugt werden, die das bisherige Einsatzspektrum durch die Erschließung neuer Märkte deutlich erweitern können.

Für die Lösung der Problemstellung wurden drei Proteinsysteme pflanzlichen und tierischen Ursprungs ausgewählt und umfangreichen material- und prozesstechnischen Voruntersuchungen unterzogen, um deren prinzipielle Eignung für die Verfahrensschritte einer thermoplastischen Verarbeitung zu überprüfen.

Es hat sich gezeigt, dass basierend auf der Glasübergangstheorie von Proteinen die Befähigung zum Einsatz eines thermomechanischen Formgebungsverfahrens durch den Zusatz von Verarbeitungshilfsstoffen besteht. Mit Orientierung an die bestehende Anlagen- und Verfahrenstechnik der kunststoffverarbeitenden Industrie wurde die Extrusion zur Herstellung von Proteinfohlen auserkoren und eine Machbarkeitsstudie positiven Ausgangs durchgeführt. Die Entwicklung und Evaluierung von Strategien zur anwendungsspezifischen Optimierung der mechanischen und sensorischen Produkteigenschaften sollen abschließend einen maßgeblichen Beitrag zur Verbesserung der Wettbewerbsfähigkeit und der gesellschaftlichen Akzeptanz leisten.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Biopolymere

2.1.1 Einführung und Definitionen

Als Biopolymere bezeichnete Kunststoffe rückten erstmals in den frühen 1970er Jahren durch die starke Zunahme an Plastikabfällen in das wissenschaftliche Interesse und wurden erstmals in den 1980er Jahren kommerzialisiert. Zu dieser Zeit bestanden die sog. Biopolymere der ersten Generation aus einer Mischung konventioneller Polymere, gewöhnlich Polyolefine (z. B. Polyethylene) mit Stärke oder anderen organischen Substanzen. Der mikrobiell bedingte Stärkeabbau führte lediglich zu einem Zerfall der Produkte in kleine Fragmente an Polyolefinen [Rud08, Gon94, Kol03, Bre09, Sco05].

Wissenschaft und Industrie deklarierte zu damaliger Zeit bereits einen geringen Anteil von Stärke (6 - 15 Gew.%) am Gesamtprodukt als Biopolymer. Dieser Umstand führte zu einer starken Verunsicherung und Missverständnissen, da zu dieser Zeit weder wissenschaftlich basierte Testmethoden noch Standards für die Bezeichnungen „abbaubar“ und „kompostierbar“ existierten. In der Folgezeit entwickelten internationale und nationale Organisationen entsprechende Standards, die die Begriffe „abbaubar“, „biologisch abbaubar“ und „kompostierbar“ für Polymere detailliert beschreiben und definieren. Aus diesem Grunde können entsprechende Definitionen und Detailbeschreibungen aus den Normen der International Organization for Standardization (ISO), der American Society for Testing and Materials (ASTM), der European Organization for Standardization (EN) und der Japanese Standards Association (JIS) entnommen werden [Rud08, Sco05, Bre09, Kal07, Sea94]. Basierend auf den Normen ISO 17088, EN 13432 und ASTM D 6400 können die folgenden Definitionen abgeleitet werden:

Abbaubare Kunststoffe

Kunststoffe, die eine signifikante Veränderung in ihrer chemischen Struktur unter spezifischen Umweltbedingungen erfahren, die in einem Verlust von Eigenschaften, nachgewiesen durch standardisierte Testmethoden, resultieren (mechanische Desintegration, z. B. Fotodegradation, Oxidation und Hydrolyse) [Sea94, Rud08, Kum03, Kal07].

Biologisch abbaubare Kunststoffe

Abbaubare Kunststoffe, bei denen der Abbau durch natürlich vorkommende Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Algen erfolgt und in Fragmenten mit geringeren Molekulargewichten resultiert und in einer Überführung in Kohlenstoffdioxid oder Methan

und Wasser endet (metabolische Desintegration) [Rud08, Bre09, Gon94, Van05, Sea94].

Kompostierbare Kunststoffe

Biologisch abbaubare Kunststoffe, die einem Abbau durch biologische Prozesse während einer Kompostierung in CO₂, Wasser, anorganische Bestandteile und Biomasse unterliegen. Der Abbau erfolgt in einer, mit bekannten kompostierbaren Materialien vergleichbaren Rate (Abbaugeschwindigkeit) und hinterlässt keine sichtbaren, wahrnehmbaren oder toxischen Rückstände [Bre09, Rud08, Kol03, Van05, Kal07].

Ein Kunststoff kann per Definition abbaubar aber nicht biologisch abbaubar sein, wenn dieser beispielsweise in Stücke zerfällt oder in Bestandteile, die nicht mit bloßem Auge wahrgenommen werden können, aber nicht mikrobiologisch assimiliert werden. Darüber hinaus kann ein als abbaubar oder sogar biologisch abbaubar bezeichneter Kunststoff nicht kompostierbar sein, wenn dies mit einer zu geringen Rate von statten geht [Rud08, Sea94].

Biopolymere per Begriffsdefinition sind damit unabhängig von dessen Rohmaterialien sondern hängen nur von der chemischen Komposition ab und sind daher in erster Linie als spezifische Funktionsbeschreibung eines Kunststoffes zu betrachten. Eine Unterteilung in Arten ist wiederum nach der chemischen Zusammensetzung, der Herstellungsmethode, der ökonomischen Bedeutung oder dem Verwendungszweck möglich [Bre09, Van05, Kol03].

Eine Klassifizierung bezugnehmend auf die verwendeten Rohstoffe ermöglicht eine einfache und effektive Abgrenzung und erweist sich als zielkonform mit Aussagen in der vorliegenden Arbeit.

2.1.2 Natur oder Petrochemie?

Hinsichtlich der Rohstoffquelle können Biopolymere in zwei Gruppen klassifiziert werden, synthetische Biopolymere auf petrochemischer Basis und natürliche Biopolymere auf Basis nachwachsender Rohstoffe. Petrochemische Biopolymere werden unter Verwendung fossiler Rohstoffe organischen Ursprungs, wie z. B. Rohöl und Kohle produziert während natürliche Biopolymere auf pflanzliche, tierische und mikrobielle Rohstoffe aufbauen [Kum03, Mec04]. Im Folgenden soll sich auf die Klasse der biologisch abbaubaren Biopolymere beschränkt werden, um den Fokus auf die technologische und wirtschaftliche Problemstellung dieser Gruppierung zu lenken. Alle zukünftigen Nennungen des Begriffes „Biopolymer“, „Biokunststoff“ oder „Bioplastik“ in der vorliegenden Arbeit beziehen sich per Definition ausschließlich auf biologisch abbaubare Kunststoffe.

Nach dem genannten Kriterium ergibt sich die in [Abb. 2.1](#) dargestellte Klassifizierungsmöglichkeit für biologisch abbaubare Polymere.

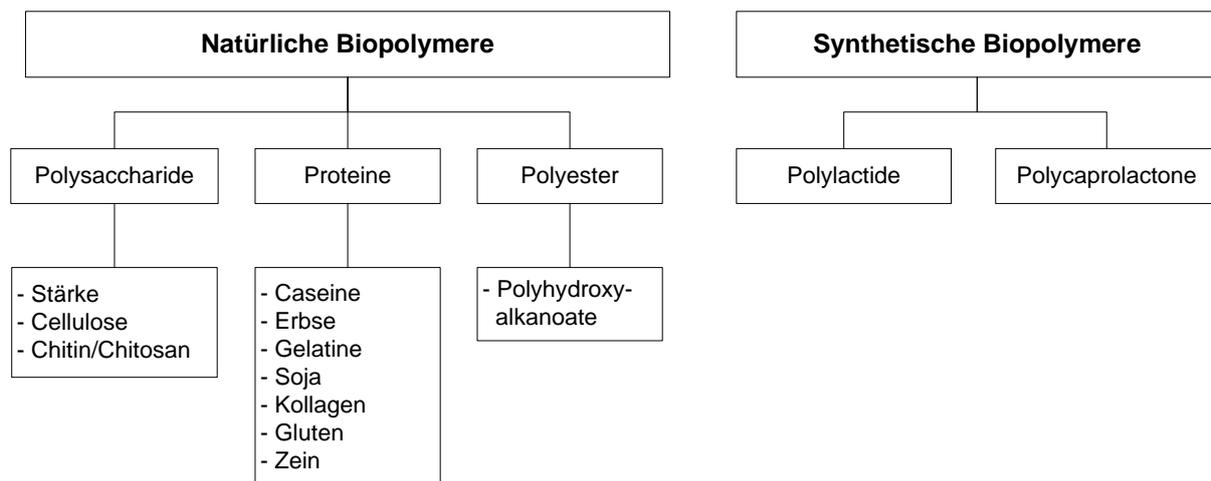


Abb. 2.1: Klassifizierung von biologisch abbaubaren Biopolymeren nach der Rohstoffquelle [Kum03, Rud08]

Die natürlichen Biopolymere werden vorwiegend aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen sowie Meeres- und Nutztieren extrahiert. Diese lassen sich in drei weitere Gruppen, die Polysaccharide, Proteine und Polyester, unterteilen.

Synthetische Biopolymere werden dagegen aus petrochemischen oder biologischen Quellen hergestellt. Es gibt eine Vielzahl an bioabbaubarem Granulat, einschließlich Polymilchsäuren, Polyamidestern, Polyvinylestern und Polyvinylalkohol. In der Praxis existieren zudem Mischungen aus natürlichen und synthetischen Biopolymeren, die durchaus interessante Eigenschaften aufweisen können, aber an dieser Stelle keine nähere Erläuterung finden.

In der durchgeführten Klassifizierung der Biopolymere hebt sich insbesondere eine Werkstoffgruppe durch ihre einmalige funktionale Vielfalt hervor, die Proteine. Stark wachsendes wissenschaftliches und wirtschaftliches Interesse an proteinogenen Biopolymeren zeugen nicht nur von einem aktuellen Trend, sondern von fundierten Potenzialanalysen, die durch eine große Vielfalt an verfügbaren Rohstoffquellen, mannigfaltigen chemischen, physikalischen und enzymatischen Modifikationsmöglichkeiten und damit verbundene gezielte funktionale Eigenschaftsbeeinflussung bei der Verarbeitung und als Endprodukt herrühren.

2.1.3 Proteine – Biopolymere der Zukunft?

2.1.3.1 Einführung und Klassifizierung

Proteine sind Makromoleküle, die durch die Aneinanderreihung der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren entstehen. Hierbei erfolgt die Verknüpfung der Aminosäuren hin zu einer polymeren Struktur auf Grund der Ausbildung von Peptidbindungen in Folge der Kondensation von Carboxyl- und Aminogruppen benachbarter Aminosäuren. Die dabei entstehende Sequenz aus ca. 100 bis 500 Aminosäuren einer Polypeptidkette bildet die Primärstruktur auf Grundlage derer eine Strukturbildung

durch Wasserstoffbrückenbindungen stattfindet, die als Sekundärstruktur bezeichnet wird und die Strukturtypen α -Helix, β -Faltblatt und β -Schleifen beinhaltet. Die Strukturbildung von Proteinen sowie die Ausbildung entsprechender Bindungen und Interaktionen in schematischer Form können der [Abb. 2.2](#) entnommen werden.

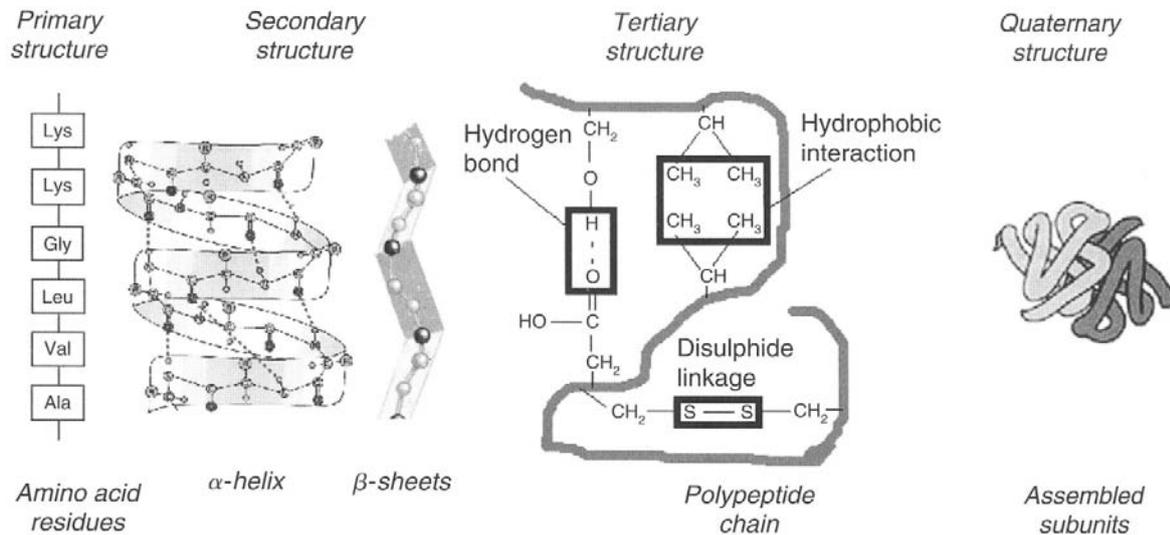


Abb. 2.2: Proteinstrukturen und die Ausbildung von Bindungen und Interaktionen (in Anlehnung an Zhang und Zeng, 2008 [Zha08])

Durch die Ausbildung von kovalenten und non-kovalenten Bindungen sowie Kräften zwischen den Seitenketten der Aminosäuren stabilisiert sich eine übergeordnete räumliche Anordnung der Polypeptidkette, die als Tertiärstruktur zu einer Faltung des Proteins führen kann. Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen führen zu Proteinkomplexen, der sog. Quartärstruktur, die in vielen Fällen zur Funktionsfähigkeit von Proteinen notwendig ist. Durch Einflüsse chemischer und/oder physikalischer Art in Form von Säuren, Salzen, organischen Lösungsmitteln sowie Temperatur, Druck, Bestrahlung und mechanischer Einwirkungen können Strukturänderungen auftreten, ohne die Reihenfolge der Aminosäuren (Primärstruktur) zu verändern. Dieser Vorgang wird als Denaturierung bezeichnet und ist in der Regel irreversibel. [Dam96, Bra99, Klo00].

Neben der Möglichkeit einer strukturellen Gruppierung von Proteinen in globuläre (kugel- oder birnenförmige Tertiär- oder Quartärstrukturen) und fibrilläre Proteine (fadenförmige oder faserige Strukturen) soll im Folgenden eine Klassifizierung nach Vorkommen bzw. Ursprung zweckdienlich sein. Eine Einteilung technisch relevanter Proteine pflanzlichen und tierischen Ursprungs ist in [Tab. 2.1](#) zu finden [Klo00, Bra99].

Tab. 2.1: Einteilung ausgewählter Proteine nach Ursprung [Pom03, Klo00, Cuq98, Shi98, Van07]

Pflanzliche Proteine	Tierische Proteine
Erbse	Caseine
Erdnuss	Molke
Weizengluten	Kollagen
Soja-Protein	Gelatine
Maiszein	Keratin
	myofibrilläre Proteine

In neuester Zeit ist ein stark wissenschaftliches und industrielles Interesse an Proteinen zu verzeichnen, die sich als Rohmaterialien für polymere Werkstoffe im hohen Maße eignen.

2.1.3.2 Proteine als einzigartige Polymerwerkstoffe

Proteine sind Heteropolymere, die eine enorme Anzahl an sequentiellen Anordnungen mit einer breiten Spanne an Interaktionen und chemischen Reaktionen erlauben. Dazu gehören chemische Reaktionen durch kovalente Bindungen (Peptid und Disulfid) und non-kovalente Bindungen (Ionen-, Wasserstoffbrücken- und van der Waals-Bindungen). Zusätzlich treten hydrophobe Interaktionen zwischen non-polaren Gruppen der Aminosäureketten auf [Nus09, Her08, Pom03, Kok94].

Basierend auf den intensiven Interaktionen und chemischen Reaktionen entstehen proteinbasierte Materialien durch die Ausbildung eines relativ geordneten, gering hydratisierten und kontinuierlichen makromolekularen Netzwerkes einer großen Anzahl gleichmäßig verteilter Proteine. Die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung intermolekularer Verbindungen hängt dabei von der Proteinstruktur und den Denaturierungsbedingungen ab (z. B. Lösungsmittel, pH-Wert und Ionenkonzentration sowie Wärmebehandlung) [Gui05, Her08, Pom03].

Verschiedene Typen von Interaktionen sind an der Stabilisierung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinsystemen beteiligt. Im Gegensatz zu synthetischen organischen Polymeren haben Niedrigenergieinteraktionen, wie van-der-Waals-Kräfte nur eine sehr geringe Wirkung auf die strukturelle Ausrichtung von Proteinmaterialien. Eine Stabilisierung findet daher hauptsächlich durch ionische und Wasserstoffbrücken-Interaktionen statt. Zum direkten Vergleich zeigt [Tab. 2.2](#) die Energien der molaren Interaktionen von Proteinen und synthetischen Polymeren.

Tab. 2.2: Vergleich von ausgewählten Interaktionsenergien von Proteinen und synthetischen Polymeren (in Anlehnung an Guilbert und Cuq, 2005) [Gui05]

Interaktion	Energie der Interaktion	
	Proteine	Synthetische Polymere
	[kJ/mol]	[kJ/mol]
van-der-Waals	0,1 - 0,3	2 - 17
Wasserstoffbrücken	8,4 - 42	~ 40
Ionenbindungen	21 - 84	160 - 560

Die geringeren Gesamtwerte der Proteine im Vergleich zu den synthetischen Polymeren können durch die stark heterogene Struktur der Proteine erklärt werden, welche die Frequenz von geordneten Zonen reduziert, die derartige Interaktionen begünstigen [Gui05, Han05, Cuq97].

Zusammenfassend sind für die Ausbildung eines Proteinnetzwerkes als Grundlage proteinogener Materialien folgende Schritte erforderlich:

1. Trennen der niedrigenergetischen intermolekularen Interaktionen, welche das Proteinsystem im nativem Stadium stabilisieren,
2. Proteinreorganisation durch Verarbeitung und Formgebung sowie
3. Formierung eines dreidimensionalen Netzwerkes, stabilisiert durch neue Interaktionen und Verbindungen nach Entfernung des intermolekularen Spaltmittels (z. B. Lösungsmittelentzug) [Gui05, Pom03, Nus09, Cha09, Cuq98].

Erste industrielle Anwendungen von Proteinen als polymere Werkstoffe stammen aus den frühen 1930er und 1940er Jahren durch die Verarbeitung von Caseinen und Soja-Proteinen zu Filmen und Beschichtungen. Proteinogene Biopolymere konnten sich aber bisher nicht mit der gleichen Dynamik wie beispielsweise Stärkederivate entwickeln und sind lediglich in Marktnischen in Form von pharmazeutischen Verkapselungen, Lebensmittelbeschichtungen, Bindemittel und grenzflächenaktive Substanzen präsent [Cla05, Gui05].

Bis vor kurzem war die industrielle Nutzung von Proteinen in der Lebensmittelindustrie konzentriert. Für eine Ausdehnung auf non-food Bereiche sind in neuester Zeit vermehrt Konzepte und Verfahrensweisen der traditionellen Kunststoffwissenschaften eingeflossen, die das Verhältnis zwischen makromolekularer Struktur und Funktion berücksichtigen und folgende Schritte einschließen:

- Studium der dreidimensionalen Organisationsstruktur bei unterschiedlichen Maßstäben (atomare, molekulare und supramolekulare Organisation),

- Verständnis der Zusammenhänge und funktionalen Abhängigkeiten von Prozessparametern (Temperatur, Druck, Lösungsmittel und Additive) und
- Vorhersage bzw. Berechnung der makroskopischen Produkteigenschaften (mechanisch, optisch, thermisch und elektrisch) [Cuq98, Han05, Gui05].

Aus dem wachsenden wissenschaftlichen Fortschritt auf dem Gebiet der proteinbasierten Werkstoffe hat sich eine breite Produktpalette entwickelt, die für viele Industriebereiche wirtschaftliche Relevanz aufweisen.

2.1.4 Produkte

2.1.4.1 Marktüberblick

Proteine können zur Herstellung vielfältiger Produkte eingesetzt werden, die im Wesentlichen die Produktpalette der konventionellen Polymere abdecken. Darüber hinaus besitzen Proteinmaterialien wesentliche Alleinstellungsmerkmale und Kundennutzen, die sich zum einen aus der Verwendung nachwachsender Rohstoffe als Rohstoffquelle und zum anderen aus der enormen und variablen Funktionsvielfalt der Proteine selbst ergeben. Letztere offeriert nicht nur ein ökologisches Alternativprodukt sondern bereichert viele klassische Anwendungsbereiche um deutliche Mehrwerte [Cha04, Kol03, Bou08, Kro02].

Die große Breite an marktfähigen Produkten erfordert eine Untergliederung in entsprechende Industriesektoren mit Produktbeispielen:

- Agrarwirtschaft und Gartenbau,
z. B. Mulch- (Abdeck-), Ernteverfrühungs- und Gewächshausfolien, Pflanztöpfe- und Schalen und Saatbänder,
- Lebensmittelindustrie,
z. B. Verpackungs- und Trennfolien, Beschichtungen von Obst und Gemüse,
- Medizin und Pharmazie
z. B. Verkapselungen, Wirkstoffdepots und resorbierbare Implantate
- Verbundwerkstoffe,
z. B. Matrixmaterialien durch Naturfaserverstärkung,
- Catering,
z. B. Teller, Tassen und Besteck und
- Hygieneartikel,
z. B. Windeln und Ohrstäbchen

[Che95, Khw04, Aud03, Koe94, Gui05, Han05, Sch05a].

Die Schwerpunktanwendungen und damit die Produktgruppierung, in der die Stärken und einmaligen funktionalen Eigenschaften von Proteinen am besten zum Tragen

kommen sind Filme, Folien und Beschichtungen, auf deren Fokus die nachfolgenden theoretischen und praktischen Ausführungen beruhen.

2.1.4.2 Filme, Folien und Beschichtungen

Eine Folie bzw. ein Film bezeichnet ein dünnes, flächiges und freistehendes Material mit gewöhnlichen Dicken zwischen 2 und 500 μm . Beschichtungen sind Materialien, die direkt auf Oberflächen von zu schützenden oder von zu beeinflussenden Objekten einen Film ausbilden und damit über den gesamten Produktlebenszyklus hinweg zum Bestandteil dieses Objektes werden [Kro02, Cha04, Nen06, Bou08, Sch05b].

Die Bezeichnungen „Film“ und „Folie“ finden in fachbezogenen Veröffentlichungen häufig eine gleichbedeutende Assoziation bzw. Definition und sollen deshalb in der vorliegenden Arbeit synonym verwendet werden.

Ein proteinogener Film oder eine Beschichtung besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten, die sich folgendermaßen benennen lassen:

1. Filmbildungsmaterial: Proteine oder Proteinmischungen,
2. Additive: Weichmacher, Verarbeitungshilfsstoffe (Lösungsmittel, Gleitmittel, etc.),
3. Funktionale Zusätze: Antioxidantien, Antimikrobiotika, Farb- und Geruchsstoffe, Vitamine sowie Träger- und Freisetzungskomponenten [Rhi07, Bou08, Cha04].

Aus wirtschaftlicher Sicht haben besonders Filme bzw. Folien seit den 1950er Jahren an Bedeutung gewonnen. Sie bieten eine rationelle und ökologisch vorteilhafte Problemlösung für Verpackungsfragen und technische Probleme [Nen06, Gon94]. Die Kombination dieser in Wirtschaft und Gesellschaft höchst etablierten Produktgattung mit der Bestrebung nach Alternativen mit ökologischer Nachhaltigkeit und großer Funktionsvielfalt setzt große Potenziale für proteinbasierte Filme und Folien frei. Diese können nur durch intensive Forschungsbestrebungen mit anschließender praktischer Umsetzung genutzt und dem Bedarf zugänglich gemacht werden.

2.1.5 Funktionale Eigenschaften von Proteinfohlen

2.1.5.1 Überblick

Das enorme Potenzial proteinbasierter Produkte spiegelt sich besonders in der großen Funktionsvielfalt wieder, die Proteine für verschiedenste Produkte und Anwendungsbereiche als attraktive Rohmaterialien prädestinieren.

Die funktionalen Charakteristiken basieren einerseits auf den spezifischen Eigenschaften des Proteinsystems selbst und andererseits erlangen proteinogene Produkte durch gezielte physikalische, chemische und enzymatische Modifikationen ein anwendungsorientiertes Eigenschaftsprofil. Entsprechende Ausführungen dazu können dem Kapitel 2.3 entnommen werden.

Die funktionalen Eigenschaften von proteinogenen Produkten in Form von Filmen, Folien und Beschichtungen wurden intensiv durch zahlreiche Reviews und Veröffentlichungen beschrieben und ermöglichen die folgende kurze Zusammenfassung und Relevanzfokussierung [Khw04, Bou08, Deb98, Kes86, Kro02, Cha04, Gui95, Koe94].

Übereinstimmend sind für Proteinfohlen und Beschichtungen die folgenden Punkte als Endprodukteigenschaft von Relevanz:

- Mechanische Eigenschaften, z. B. Zugfestigkeit, Dehnung, Flexibilität,
- Barriereigenschaften, z. B. gegenüber Wasser, Gasen und Aromen und
- Sensorische Eigenschaften, z. B. Organoleptik (Geruch, Geschmack, Aussehen und Farbgebung) [Han05, Par08, Rhi07, Bou08].

Generell gelten Proteine und darauf basierende Produkte durch ihre Herkunft als nicht-giftige, essbare, biologisch abbaubare und kompostierbare Biopolymere. Neben umwelttechnischen Gesichtspunkten sind selektive Permeabilitäten, die von der Natur und der Dichte des makromolekularen Netzwerkes, genauer vom Verteilungsverhältnis non-polarer zu polarer Aminosäuren abhängen, ein entscheidender Faktor für die Anwendung von Proteinmaterialien. Generell zeichnen sich Proteinfilme und Beschichtungen durch hohe Wasserdampfpermeabilitäten und sehr geringe Gaspermeabilitäten (O_2 , CO_2) und niedrige Aromapermeabilitäten aus, die wiederum eine deutliche Abhängigkeit von der Temperatur und der relativen Luftfeuchte aufweisen. Ein wichtiges Kriterium der Endverbraucher stellen die optischen Eigenschaften dar, deren Ansprüche und Vorstellungen durch die Gewöhnung an synthetische Kunststoffe seit vielen Jahrzehnten geprägt wurden. Proteinogene Filme und Beschichtungen können diesem Anforderungsprofil durch Homogenität, Transparenz, ansprechende Optik und weitgehender Geruchs- und Geschmacksneutralität in der Regel genügen [Deb98, Rhi07, Mil97, Han05, Cha04].

Von diesen Standpunkten heraus betrachtet werden Proteine vielfach aus funktionalen Gesichtspunkten als Biopolymere der Zukunft angesehen. Andererseits existiert im Wesentlichen eine funktionale Eigenschaft, die durch ihre ungenügende Ausprägung als limitierender Faktor einer weiteren Verbreitung proteinbasierter Materialien wirkt: die für viele Anwendungen unzureichenden mechanischen Eigenschaften.

2.1.5.2 Mechanische Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften spielen bei der Verarbeitung, der Verpackung, dem Transport und der Verwendung von Proteinmaterialien eine maßgebliche Rolle. Die Produkte müssen eine gewisse Stabilität aufweisen, sodass diese während der Anwendung weder permanent deformieren oder brechen noch Abnutzungserscheinungen unterliegen, aber dabei flexibel genug sind, um eine angemessene Handhabung

zu gewährleisten. Zu den wichtigsten mechanischen Eigenschaften zählen Zugfestigkeit, Bruchdehnung sowie der Elastizitätsmodul, deren Definitionen und mathematischen Zusammenhänge dem Kapitel 2.4.2 entnommen werden können [Nen06, Khw04, Cha04, Gui05, Arv06, Rhi07].

Die mechanische Leistungsfähigkeit von Proteinmaterialien kann größtenteils auf die Verteilung und Intensität von inter- und intramolekularen Interaktionen in den primären und räumlichen Strukturen des Proteinsystems sowie auf Interaktionen mit anderen Komponenten zurückgeführt werden. Wenn viele kovalente Bindungen vorhanden sind, die das Proteinnetzwerk stabilisieren oder die Bindungsenergien relativ hoch sind, können Materialien mit vergleichsweise hoher mechanischer Resistenz und Elastizität entstehen. Andererseits führen niedrigerenergetische Interaktionen zu stark dehnbaren und verformbaren Produkten mit geringen Zugfestigkeiten [Gui05, Gal98, Cho01, Gil08, Lim99].

Daraus ergibt sich ein anwendungsspezifisches Optimierungsproblem, dessen Parameterausprägungen über die gesamte Wertschöpfungskette hinweg Berücksichtigung finden müssen, um den Anforderungsprofilen von Industrie, Abnehmern und Kunden entsprechen zu können. Die im Vergleich zu den konventionellen synthetischen Polymeren (z. B. PE, PP und PVC) deutlich schwächeren mechanischen Eigenschaften stellen neben fehlenden Kostenvorteilen einer Massenproduktion den Hauptgrund für die unzureichende Durchdringung des Kunststoffmarktes dar. Daraus abgeleitet soll die vorliegende Arbeit durch die Identifizierung von relevanten Einflussgrößen, der Bestimmung des Einflussraumes und einer anschließenden Optimierung einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge liefern und adäquate Lösungsansätze für die Praxis liefern.

2.2 Herstellungsverfahren

2.2.1 Grundlagen

Bei der Herstellung proteinbasierter Materialien in Form von Filmen, Folien, Bändern und Beschichtungen werden zwei Basisverfahren unterschieden, das Lösungsmittelverfahren, auch als „wet process“ bezeichnet und das thermoplastische Verfahren, allgemein hin als „dry process“ bekannt [Cuq98, Gui05, Her08, Nus09].

Die beiden Verfahren unterscheiden sich grundlegend sowohl in der Prozessführung als auch in der anlagen- und verfahrenstechnischen Auslegung. In der vorliegenden Arbeit werden beide Verfahren vergleichend betrachtet und kritisch bewertet. Zudem sollen grundlegende Erkenntnisse aus dem Lösungsmittelverfahren für die Entwicklung und Optimierung eines kontinuierlichen thermoplastischen Prozesses, der Extrusion dienen.

2.2.2 Lösungsmittelverfahren

Unter dem Lösungsmittelverfahren, auch „wet process“ genannt, wird das Lösen, Dispergieren oder Emulgieren von Proteinen in einem Lösungsmittel mit anschließender Trocknung und resultierender Film- oder Beschichtungsformation verstanden. Hauptsächlich kommen dabei Wasser, Ethanol oder organische Säuren als Lösungsmittel zum Einsatz, abgestimmt auf die Löslichkeit des jeweiligen Proteinsystems sowie auf die Ansprüche an das jeweilige Endprodukt. Mit diesem Verfahren werden die technischen Prozesse Gießen, Sprühen und Beschichten für proteino-gene Materialien realisiert. Durch die relativ einfache Prozessführung und die Eignung für verschiedenste Proteinsysteme stellt der Gießprozess das meist verbreitete Verfahren für die Herstellung von Filmen, Folien und Beschichtungen aus Proteinen dar und ist unter kontrollierten Laborbedingungen bereits umfangreich theoretisch und experimentell durch eine große Anzahl an materialspezifischen Veröffentlichungen sowie in Überblicksschriften abgedeckt [Gui05, Cha04, Han05, Deb98, Bou08, Cuq98, Kom07, Khw04].

Trotz der Vielfalt an wissenschaftlichen Arbeiten und praktischer Umsetzung existiert kein standardisiertes Verfahren für die Herstellung einer filmbildenden Lösung sowie für die anschließenden Teiloperationen, die sich in Aufbringung auf eine Oberfläche durch Gießen, Sprühen, Dippen oder Tauchen, Entfernung des Lösungsmittels und gegebenenfalls Entfernung des Proteinfilms von der Oberfläche eines Hilfsmaterials für die Stabilisierung während des Trocknungsvorganges aufteilen [Gui05, Han05].

Für den Gesamtprozess sind Art und Konzentration des Lösungsmittels von besonderer Bedeutung. Zum einen sollten alle Bestandteile der filmbildenden Lösung homogen im Lösungsmittel dispergiert werden können, ohne dass unerwünschte Phase-separationseffekte auftreten. Dies kann, falls keine Zwei- oder Mehrschichtfilme erwünscht sind, durch kompatible Lösungsmittel oder Emulgatoren sichergestellt werden. Weiterhin sollte in Hinblick auf die nicht-giftige, biologisch abbaubare und kompostierbare Natur von proteinbasierten Biopolymeren auch auf entsprechend adäquate Lösungsmittel zurückgegriffen werden, was die Auswahl größtenteils auf Wasser, Ethanol oder geeignete Mischungen einschränkt. Zuletzt muss in Hinblick auf die Effizienz des Gesamtprozesses die Lösungsmittelmenge an den tatsächlichen Bedarf angepasst werden, was entsprechendes Wissen über Temperatur- und pH-Wert-Abhängigkeit der Löslichkeit von Proteinsystemen im gewählten Solvent voraussetzt. Der Einsatz einer zu hohen Lösungsmittelmenge führt zu einem entsprechend hohen Abführungsaufwand nach der Formgebung und bedingt in vielen Fällen sehr hohe Oberflächenspannungen der erzeugten Proteinlösung. Dies wiederum erschwert das Aufbringen auf flachen Oberflächen mit geringen Oberflächenenergien besonders bei Hochgeschwindigkeits-Beschichtungsverfahren. Zudem vermeidet die korrekte Lösungsmittelmenge durch prozessgeeignete Viskositätsbereiche unerwünschte Tropfeffekte bei Beschichtungsprozessen und gewährleistet eine

ausreichend gute Verteilung auf Formgebungsflächen bei der Filmbildung [Gui05, Han05, Cuq98, Jer05, Shi98, Ani06].

Die Eigenschaften und physikalisch-chemischen Charakteristika von Proteinen in wässrigen Lösungsmitteln hängen darüber hinaus von den pH-Wert-Konditionen ab. Viele proteinbasierte Materialien sind bedingt durch die relativ hohe Anzahl an ionisierten polaren Aminosäuren des Proteinsystems pH-Wert sensitiv. Dies bedarf einer Berücksichtigung als Prozessvariable bei der Auslegung von Verfahren und Anlagen [Kim06, Wan09, Wan08, Gui05, Jan99a].

Nachdem die genannten Punkte Berücksichtigung bei der Herstellung einer filmbildenden Proteinlösung gefunden haben erfolgt der Prozess der Filmformation durch Entfernung des Lösungsmittels in Form der Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes durch die stark ausgeprägten intermolekularen Wasserstoff-, elektrostatischen- und hydrophoben Bindungen, die zu einem Anstieg der innerkettigen Kohäsion führen. Dies kann einerseits direkt als Endprodukt durch eine Beschichtung von Oberflächen erfolgen, z. B. Lebensmittelbeschichtungen durch Sprühen oder Tauchen. Andererseits können Proteinfilme als Zwischenprodukte von der Oberfläche getrennt werden und anderen Einsatzgebieten, wie beispielweise als Verpackungen dem Markt zugeführt werden [Han05, Cuq98, Nus09, DeC04].

2.2.3 Thermoplastische Verarbeitung proteinbasierter Materialien

2.2.3.1 Grundlagen

Die thermoplastische Verarbeitung von Proteinen, auch als „dry process“ bezeichnet, beschreibt die Herstellung von Produkten durch thermische oder thermomechanische Prozesse unter geringen Feuchtigkeitsbedingungen. Sie bildet die Grundlage von hocheffizienten Herstellungsverfahren mit großem kommerziellen Potenzial durch die Kostenvorteile einer Massenproduktion proteinogener Produkte, die hauptsächlich in Form von Formpressungs- oder Extrusionsprozessen realisiert werden können [Her08, Gui05, Bar05, Jer07, Cuq97].

Im Gegensatz zu weit verbreiteten konventionellen thermoplastischen Polymeren zeigen Proteine ein deutlich unterschiedliches thermoplastisches Verhalten. Die sehr komplexe und spezifische molekulare Organisation wird zur Erklärung des Verhaltens von Proteinen während thermomechanischer Beanspruchung unter geringen Hydratisierungsbedingungen herangezogen. Generell müssen zum Verständnis der Prozesse entsprechende Proteinspezifika wie Polydispersität, heterogene intermolekulare Interaktionen, Proteinkettenverflechtungen sowie die Ausbildung von kovalenten Bindungen Berücksichtigung finden. Charakterisiert werden die Materialspezifika der Proteine durch hohe Elastizitätsmoduln in der Region des gummielastischen Plateaus, durch das Fehlen der Fließregion und einer relativ großen Spannweite in den

Glasübergangstemperaturen sowie durch eine anscheinende Reversibilität des Glasüberganges [Gui05, Gui95, Spe05, Her08].

In der Regel können Proteine ohne entsprechende Modifizierung nicht thermoplastisch verarbeitet und geformt werden, da diese den Temperaturbereich ihrer Zersetzung in der Regel früher erreichen als ihren Glasübergang. Aus diesem Grund ist der Zusatz eines Weichmachers erforderlich, um die Deformation der Proteinmatrix während des Verarbeitungsprozesses ohne thermische Zersetzung durch Absenkung der Glasübergangstemperatur zu gewährleisten [Gui05, Cuq97, Cuq98, Her08, Han05]. Am effektivsten ist dabei der Einsatz von Wasser als Weichmacher, der aber verwendet in größeren Mengen, zu Problemen bei der Verarbeitung mittels Extrusion führen kann. Hervorgerufen durch eine geringe Viskosität der Proteinmasse entstehen ein geringes Drehmoment und damit ein reduzierter mechanischer Energieeintrag, die in geringen Produkttemperaturen resultieren und entsprechende Auswirkungen auf den Grad der Proteintransformationen und -interaktionen nach sich ziehen. Darüber hinaus geht Wasser leicht durch Dehydratation bei geringen relativen Luftfeuchten verloren und eignet sich deshalb nicht zur dauerhaften Weichmachung. Aus diesen Gründen besteht die Notwendigkeit zusätzlicher Weichmacher für eine thermoplastische Verarbeitung von Proteinen [Her08, Sot01, Cuq97].

Um die relevanten Prozessparameter während einer thermoplastischen Verarbeitung zu optimieren, zu denen in erster Linie die Temperatur, der Weichmacher- und Lösungsmittelgehalt und die Verweilzeit zählen, müssen die spezifischen Charakteristika des jeweiligen Proteinsystems bestimmt werden. Im Besonderen hervorzuheben sind hierbei die jeweiligen Sensitivitäten gegenüber thermischer, mechanischer und chemischer Beanspruchung sowie die vergleichsweise hohen Viskositäten in der gummielastischen Zone oberhalb der Glasübergangstemperatur. Über die physikalischen und chemischen Faktoren, die in diesen Prozess involviert sind und zu einer Proteinmodifikation führen sind vor allem bei hohen Temperaturen und Drücken in Kombination mit geringen Feuchtebedingungen wenige Erkenntnisse vorhanden. Hauptsächlich für Weizen-Gluten und Soja-Protein liegen entsprechende Basisinformationen aus den genannten Bereichen vor [Gui05, Pom03, Red99, Red00, Jer05, Gra04].

Vergleichbar mit dem Lösungsmittelprozess sind auch bei der thermoplastischen Verarbeitung mehrere Prozessschritte zur Herstellung von Proteinmaterialien erforderlich, die in [Abb. 2.3](#) schematisch verdeutlicht wurden.

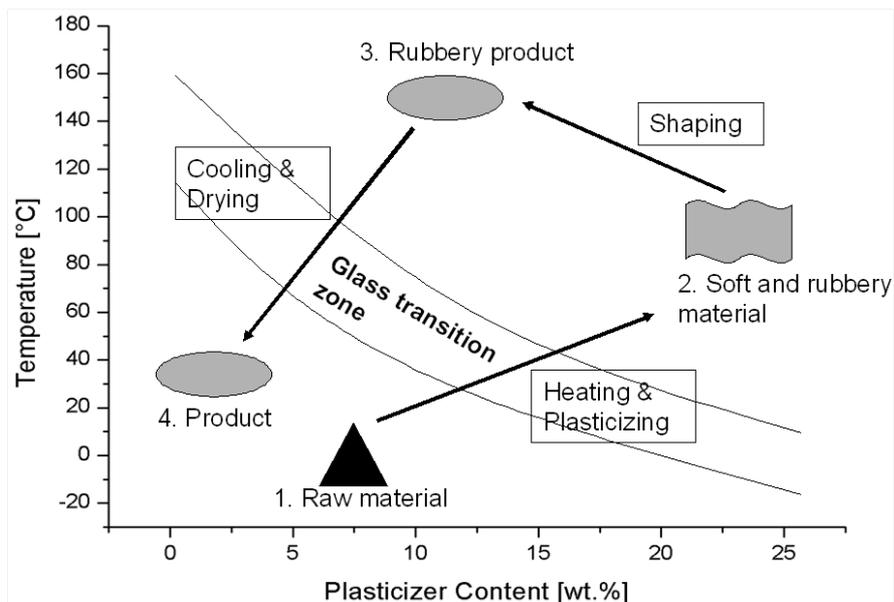


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der thermoplastischen Verarbeitung von Weizen Gluten mit Bezug zur Glasübergangstemperatur (in Anlehnung an Cuq *et al.*, 1998 [Cuq98])

Den proteinogenen Rohmaterialien wird ein Weichmacher zugesetzt. Dieser führt gemeinsam mit einer Erhöhung der Prozesstemperatur zu einer Plastifizierung des Materials durch Erreichen und Überschreiten der Glasübergangszone des Proteinsystems. Das nun im elastischen gummiartigen Zustand vorliegende System wird durch die Zuführung mechanischer Energie zu einer homogenen Masse weiterverarbeitet und einer Formgebung zugeführt. Durch den gemeinsamen Effekt einer Abkühlung und Trocknung (Entfernung von volatilen Weichmachern) des gummiartigen Produktes findet eine Rücktransformation in den starren sprödelastischen Zustand durch Unterschreitung der Glasübergangstemperatur statt und das Produkt wird in seiner Form fixiert. Im Bereich von Filmen und Folien werden vorrangig elastische Produkte nachgefragt. Ein entsprechend hoher Weichmacherzusatz sorgt in diesen Fällen dafür, dass die Glasübergangstemperatur auch bei Trocknung und Kühlung nicht unterschritten wird, um die Anforderungen an die Endproduktnutzung zu erfüllen [Gui05, Her08, Cuq98, Han05, Brä07].

Die Vorteile einer thermoplastischen Verarbeitung von Proteinen liegen vor allem in den geringen Feuchtigkeitslevels, hohen Temperaturen und Drücken und kurzen Verweilzeiten, dessen Kombination die Transformation von Protein-Weichmacher-Mixturen in plastifizierte elastische Proteinmassen herbeiführt. Entsprechende Endprodukte in Form von Filmen und Folien werden durch einen anschließenden Kühlungs- und/oder Trocknungsschritt durch die Reformierung von Wasserstoffbrücken-, ionischen und kovalenten Bindungen sowie hydrophoben Interaktionen gewonnen [Her08, Bar05, Tol93, Moh05, Pom03].

Des Weiteren können Proteine bei einer thermischen Beanspruchung disaggregieren, denaturieren, dissoziieren, sich entfalten und in Fließrichtung ausrichten. Diese Veränderungen erlauben eine Rekombination der Proteinmoleküle sowie spezifische Vernetzungsreaktionen, die in hohen Glasübergangstemperaturen und hohen Viskositäten resultieren [Her08, Red99, Are92, Pom03].

Das thermoplastische Verhalten von Proteinen kann in Verbindung mit der Glasübergangstheorie näher beschrieben werden, die Erklärungsansätze für entsprechende Texturveränderungen während thermomechanischer Beanspruchung liefert [Cuq98].

2.2.3.2 Glasübergang in Proteinen

Der Glasübergang ist ein Phänomen, das prinzipiell bei allen nicht-kristallinen oder teilkristallinen Materialien auftreten kann und ist ausschließlich eine Eigenschaft der amorphen Phase. Es beschreibt den Übergang zwischen dem glasartigen und dem gummiartigen Zustand eines Materials und setzt eine genügend weitreichende molekulare Unordnung in zumindest einer Richtung voraus [Bic06, Spe05, DCr05, Gui05, Mes02].

Unterhalb einer spezifischen Temperatur, der Glasübergangstemperatur T_g , verhält sich das Material wie ein Feststoff mit immobilen Molekülen, gekennzeichnet durch einen starren, harten, sprödelastischen Zustand. Bei Überschreitung der Glasübergangstemperatur findet ein Übergang zu einem flexiblen, elastischen, gummiartigen Zustand des Materials, charakterisiert durch mobile Moleküle und einem mit Flüssigkeiten vergleichbaren Verhalten statt. Dabei kommt es zu Änderungen der volumetrischen, thermischen und mechanischen Eigenschaften des Materials [Spe05, Bic06, Her08, Cuq98, Jer07, Gui05, Bel96, Mes02].

In der Literatur besteht zwar der weitreichende Konsens, dass ein Glasübergang bei Proteinen stattfindet, aber über den Ursprung existieren verschiedene Postulate. Es wird kontrovers diskutiert, ob die Atombewegungen im Protein selbst, die Bewegungen des gebundenen Solvents in der Hydrathülle oder die gemeinsame Bewegung beider Komponenten ursächlich für den Glasübergang sind. Die Analyse von experimentellen Daten verschiedener Quellen deutet aber auf einen gemeinsamen Einfluss von Protein und gebundenem Wasser auf den Glasübergangsmechanismus hin [Nga08, Car79, Sin81, Gre94].

Vergleichbar mit synthetischen Polymeren wird die Glasübergangstemperatur T_g von Proteinen durch die molare Masse, die Kettenbeweglichkeit, die Größe und Polarität der lateralen Gruppen, intermolekulare Bindungen oder kristalline Zonen und auch entscheidend vom gewählten Weichmacher und dessen Konzentration beeinflusst [Cha09, Nga08, Cuq98].

Der Effekt eines Weichmachers in Proteinsystemen ist jedoch schwierig durch standardisierte kalorimetrische Techniken, wie beispielsweise DSC oder DMTA zu detektieren. Proteine besitzen einerseits im Vergleich zu synthetischen Polymeren eine deutlich geringere Kettenmobilität. Andererseits verkompliziert sich die Bestimmung der T_g durch Kristallisationseffekte und die Relaxierungsenthalpie als auch durch Einflüsse von Wasserstoff- und Disulfidbrücken sowie hydrophobische und ionische Interaktionen. Eine daraus resultierende geringe Änderung der spezifischen Wärmekapazitäten (Δc_p) in Verbindung mit einer relativ breiten Glasübergangszone ist durch Signalverluste in Form von Rauscheffekten und Grundlinienverschiebungen schwierig zu detektieren [Cer02, Cha09, Sot05, Cuq98]. Aus den genannten Gründen wird in neuester Zeit eine alternative Technik für die Bestimmung der Glasübergangstemperatur von Proteinen eingesetzt. Die sog. Methode der thermisch stimulierten Ströme (TSC) hängt im Gegensatz zur Bestimmung durch eine dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) nicht von der Detektion der Veränderung in den spezifischen Wärmekapazitäten der Proteinsysteme ab sondern basiert auf der Fähigkeit der Bewegung von polaren Molekülen in einem elektrostatischen Feld. Die Methode reagiert auf die Mobilität von Dipolen und anderen permanenten oder induzierten elektrischen Ladungen und zeigt damit deutliche Vorteile bei der Bestimmung der Glasübergangstemperaturen von reinen Proteinen [Cha09, Red09, Sam04].

Die Glasübergangstemperaturen von natürlichen Proteinen variieren in einer Spanne zwischen 121 und 250 °C und wurden bereits in einer Vielzahl wissenschaftlicher Arbeiten publiziert, deren Bestimmung noch größtenteils auf DSC und/oder DMTA-Methodiken basieren. Die entsprechenden Messwerte sind in [Tab. 2.3](#) zu finden.

Tab. 2.3: Glasübergangstemperaturen technisch relevanter Proteine

Proteine [-]	Analytische Methode [-]	T_g [°C]	Referenzen [-]
Mais-Gluten	DSC/DMTA	174 - 182	[diG99, diG98, Gui05]
Mais-Zein	DSC/DMTA	164 - 168	[Arv06, Mag92, diG98]
aufgereinigtes Zein	DSC	165 - 178	[Wan03, Gui05, Mad96]
kommerzielles Zein	DSC	139 - 167	[Mag92, Mad96]
Weizen-Gluten	DSC/DMTA	160 - 190*	[Arv06, Kal93, Che95a, Gon96]
Gliadin	DSC	121 - 125	[Gui05, Kok94, DeG02]
Caseine	DSC/DMTA	140 - 150*	[Arv06, Kal93a, Sch05]
Natrium-Caseinat	DSC/DMTA	130 - 142*	[Arv06, Arv98, Kal93a, Sch05]
Myofibrillare Proteine	DMTA	215 - 250	[Cuq97, Gui05]
Gelatine	DSC	145 - 200*	[Nis97, Arv98, Gui05]
Soja	DSC/DMTA	145 - 150	[Zha01, Mor99]
Collagen	DSC	180 - 210	[Gui05]

* Extrapolierte Werte auf 0 % Feuchtegehalt

Die Glasübergangstemperatur wird dabei im hohen Maße durch den Feuchtegehalt des Proteinsystems bestimmt und reduziert sich als grober Erfahrungswert um ca. 10 °C bei Erhöhung des Wassergehaltes um 1 Gew.%. Dies ist auf die hydrophile Natur der Proteine zurückzuführen, die unter den verschiedenen Proteinen variiert. Auf praktische Erfahrungen eigener und fremder Arbeiten zurückgreifend, kann die Aussage getroffen werden, dass Proteinsysteme mit mehr als 15 Gew.% Wasser – was generell bei einem Equilibrium mit relativen Luftfeuchten um 85 % bei Raumtemperatur auftritt – die entsprechenden Glasübergangstemperaturen in gleichen Regionen wie die jeweiligen Umgebungstemperaturen zu finden sind. Unter Anwesenheit zusätzlicher Weichmacher gewinnt der beschriebene Effekt an Deutlichkeit [Gui05].

2.2.4 Praxisbemerkungen

Bis in die heutige Zeit hinein werden Proteinfilm und Beschichtungen überwiegend im Lösungsmittelverfahren in kleinen Maßstäben unter kontrollierten Laborbedingungen hergestellt und im Anschluss standardisierten Testverfahren unterzogen. In den meisten Fällen wird das Gießverfahren für die Erzeugung von Folien und das Tauch-, Dipp- oder Sprühverfahren für Beschichtungen genutzt.

Das Lösungsmittelverfahren ist zweifellos im hohen Maß für die Herstellung von Filmen und Beschichtungen im Labormaßstab geeignet und etabliert. Durch die Wahl eines geeigneten Lösungsmittels ist es für den Großteil an technologisch bedeutenden Proteinen geeignet und erfolgreich umgesetzt. Zur Verdeutlichung zeigt die Tab. 2.4 eine Übersicht der verwendeten Herstellungsmethodik für Proteinfolien aus unterschiedlichen Rohstoffquellen und gibt Auskunft über eine gelungene Filmbildung durch das jeweilige Verfahren.

Tab. 2.4: Ausgewählte Proteine, deren Verarbeitungsmöglichkeiten und filmbildende Eigenschaften (+ symbolisiert ein positives Ergebnis)

Proteine	Herstellungsverfahren und Formgebung				Referenzen
	Lösungsmittel		Thermoplastisch		
	Prozess	Filmbildung	Prozess	Filmbildung	
Maiszein	+		+		[Wan03, Pol02, diG99, Pom03]
Weizengluten	+	+	+	+	[Red00, Che95a, Gon94a, Gon96, Jer05]
Soja	+	+	+	+	[Cao02, Cro01, Kum02, Mau08, Zha01]
Erbse	+	+			[Cho01, Vir00, Liu05]
Erdnuss	+	+			[Jan99, Jan99a]
Keratin	+				[Bar05, Cuq98]
Gelatine	+	+	+	+	[Arv97, Cao09, Cha06, Wan09, Par08]
Caseine	+	+			[Aud05, Ave93, Cha06, Khw04b]
Myofibrilläre Proteine	+		+		[Shi03, Sob02, Cuq97]

Es ist ersichtlich, dass eine Vielzahl an pflanzlichen und tierischen Proteinen in Lösung überführt werden können, wenn auch einige Filme durch unzureichende Integrität, primär durch mangelnde Kohäsion verursacht, nicht für eine weitere Verarbeitung zu Endprodukten geeignet sind. In den meisten Fällen erweisen sich Proteine, die durch das Lösungsmittelverfahren keiner Formgebung unterzogen werden können, auch für die Verarbeitung mittels thermoplastischer Verfahren für ungeeignet.

Die hohe Nachfrage nach biologisch abbaubaren, ungiftigen und kompostierbaren Materialien verlangt aber nach Verfahren, die angemessene Produktionskapazitäten bei gleichbleibend hohen Qualitäten bieten. Diesen Ansprüchen kann nur durch massenproduktionsfähige, standardisierte Verfahren Rechnung getragen werden, welche die Kosten- und Nutzensvorteile traditioneller Verfahren zur Kunststoffverarbeitung auch der Herstellung von proteinbasierter Materialien zugänglich machen. An dieser Stelle setzen die thermoplastischen Verfahren an, deren Umsetzung und großtechnischer Einsatz für Proteinmaterialien, wie in Tab. 2.4 ersichtlich, noch weitere Forschungs- und Entwicklungsarbeit verlangt und für diese die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zu leisten vermag.

Aus den genannten Gründen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Proteinsysteme ausgewählt, die eine große technologische Bedeutung durch Ihre hohe Verfügbarkeit und ihre Funktionsvielfalt aufweisen und bisher noch nicht einer Verarbeitung und Formgebung durch thermoplastische Prozesse überführt werden konnten. Das tierische Proteinsystem Natrium-Caseinat und ein aus Erbsen extrahiertes pflanzliches Protein (nachstehend als Erbsenprotein bezeichnet). Die Wahl des thermoplastischen Herstellungsverfahrens fiel auf die Extrusion, die alle Anforderungen an das Rohmaterial, angemessenen Output und Flexibilität sowie Wirtschaftlichkeit und Effizienz bietet und nachfolgend einer kurzen Beschreibung unterzogen wird.

2.2.5 Extrusion

2.2.5.1 Grundlagen

Die Extrusion (von lat. *extrudere* = hinausstoßen, -treiben) ist ein kontinuierlicher Misch-, Knet- und Formgebungsprozess [Akd99]. Extrusionsprozesse und entsprechende Extruder wurden über die beiden letzten Jahrhunderte hinweg in unterschiedlichen Industrien simultan erforscht und weiterentwickelt. Um das Jahr 1935 nahm die erste Maschine für die Extrusion thermoplastischer Materialien ihren Betrieb auf und läutete eine rasante Entwicklung ein, die eine intensive industrielle und großtechnische Nutzung nach sich zog. Besonders die Kunststoffindustrie verzeichnete durch den Einzug der Extrusionsverfahren einen enormen Aufwind, deren Marktvolumen und -wachstum durch stetige Neu- und Weiterentwicklungen bis heute auf hohem Niveau verweilen. Die Anlagen- und Prozesstechnik für die Verarbeitung von Kunststoffen ist im hohen Maß erforscht und optimiert [Ria00, Rau01a, Rau01,

Koh07, Rau08]. Die traditionellen Extrusionsprozesse besitzen daher einen umfangreichen Kenntnisstand in Forschung und Praxis, der sich in der Vielzahl an verfügbarer Fachliteratur widerspiegelt. Aus diesen Gründen soll, unter dem Verzicht auf Erläuterungen zu den Grundprinzipien konventioneller Extrusionsprozesse, der Fokus für die weiteren Ausführungen in dieser Arbeit auf der Verarbeitung von proteinogenen Materialien mittels Extrusion liegen.

2.2.5.2 Extrusion von Proteinsystemen

Trotz der rasanten Neu- und Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Extrusionstechnologie ist bis in die heutige Zeit hinein nur wenig über die komplexen Zusammenhänge der Proteinreaktionen und den Variablen des Extrusionsprozesses bekannt. Die postulierten Modifikationen der Proteinstruktur im Rahmen einer thermoplastischen Verarbeitung aus [Kapitel 2.2.3](#) treffen größtenteils auch auf den Extrusionsprozess zu und wurden detailliert beschrieben.

Arbeiten aus den späten 1980er Jahren konzentrierten sich erstmals intensiver auf Proteininteraktionen und -modifikationen bei thermoplastischer Extrusion. Praktische Umsetzungen bestätigten die Annahmen, dass durch molekulare Veränderungen der Proteinfraction diese weniger löslich wird und zu einer makromolekularen Struktur agglomeriert. Diese komplexen Vorgänge beinhalten übereinstimmend Veränderungen kovalenter und non-kovalenter Interaktionen [Liu08, Liu07, Are92, Akd99, Alo00, Cam91, Fis04].

Kontroverse Meinungen zahlreicher Wissenschaftler in Bezug auf die relative Bedeutung non-kovalenter Interaktionen, intermolekularer Disulfidbindungen und möglicher anderer kovalenter Bindungen für die strukturelle Stabilisierung des Extrudates mündeten in einer weitgehenden Übereinstimmung Ende der 1990er Jahre. Trotz noch immer nicht lückenloser Nachweiskette herrscht zunehmend die einhellige Meinung, dass sowohl Disulfidbindungen als auch non-kovalente Bindungen für die vergleichsweise geringe Löslichkeit und die feste Struktur des Extrudates verantwortlich sind. Diese Schlussfolgerung basiert auf der generellen Beobachtung, dass eine Resolubilisierung der extrudierten Produkte nur durch Extraktionslösungen möglich ist, die Inhaltsstoffe beinhalten, um Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen aufzuheben (z. B. SDS und Harnstoff) und zusätzlich Mittel zur Unterbrechung von Disulfidbindungen (z. B. 2-Mercaptoethanol und Dithiothreitol) enthalten. In genereller Übereinstimmung können damit die Proteinmodifikationen während der Extrusion wie folgt zusammengefasst werden:

- Denaturierung bzw. Entfaltung globulärer Proteine mit bedingtem Verlust sekundärer und tertiärer Strukturen,
- Aggregation durch Zuführung thermischer Energie, bedingt eine abnehmende Löslichkeit der Proteinfraction durch die Ausbildung hydrophobischer und ionischer Bindungen,

- Zerstörung bzw. Aufhebung der Agglomerate (komplett oder teilweise) durch Scherkräfte und Wärmezufuhr resultierend in der Ausbildung einer konzentrierten Proteinlösung,
- Mögliche Formierung von kovalenten Bindungen bei hohen Temperaturen sowie
- Formation nicht-kovalenter Bindungen und Disulfidbindungen während der Kühlung [Liu08, Akd99, Szp93, DeG00, Cam91, Hag02, Her08a, Liu07, Pru93].

Bis zum heutigen Tage fehlt ein konsistentes Modell zur Erklärung der Phänomene, die eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung eines dreidimensionalen Proteinnetzwerkes spielen [Alo00, Rou06]. Dieser Umstand erfordert im Rahmen einer anlagen- und verfahrenstechnischen Auslegung daher einen hohen praktischen Versuchsaufwand durch die große Anzahl an Einflussfaktoren und deren Ausprägungen und prädestiniert damit den Einsatz einer statistischen Versuchsplanung und –auswertung, die in Kapitel 2.5 näher beschrieben wird.

2.2.5.3 Extruder als enzymatische Bioreaktoren

Der Einsatz von Extrudern erlaubt nicht nur die kontinuierliche Verarbeitung von Proteinen und die geschilderten Modifikationen, sondern eignet sich darüber hinaus als Reaktor für chemische und enzymatische Reaktionen. Im Rahmen der konventionellen Polymerverarbeitung können Extruder zugleich als Druckreaktoren für chemische Synthesen in einem hochviskosen Reaktionsmedium genutzt werden. Die sog. reaktiven Extrusionsverfahren umfassen Polymersyntheseverfahren, ausgehend von Mono- und Oligomeren, Polykondensationsreaktionen sowie radikalische und ionische Polymerisationen [Rau01a, Gil05, Ria00].

Erste Ideen und theoretische Ansätze der Nutzung von Extrudern als kontinuierliche Bioreaktoren wurden in den späten 1980er Jahren entwickelt. Die praktische Umsetzung erfolgte durch eine enzymatische oder nicht-enzymatische Behandlung von Materialien bei erhöhten Temperatur-, Druck- und Scherverhältnissen unter vorwiegend hohen Feuchtigkeitsbedingungen von 70 % und mehr. Die Nutzung der Extrusionstechnologie ermöglicht damit die simultane und kontinuierliche Durchführung von enzymatisch katalysierten Reaktionen und thermomechanischen Prozessen unter kontrollierten Bedingungen [Lin89, Akd99].

Besonders aussichtsreich gilt allgemein die Etablierung einer Quervernetzungsreaktion und damit die Ausbildung zusätzlicher kovalenter Verknüpfungen von Proteinen und Peptiden. Das Prinzip wurde bisher lediglich in das Lösungsmittelverfahren integriert, wobei besonders die Eignung des Enzyms mikrobielle Transglutaminase in Hinblick auf die Verbesserung der funktionalen Produkteigenschaften in zahlreichen Studien nachgewiesen werden konnte [Ber06, Cha06, DeJ02, Gho09, Tan05, Sak94, Tru04]. Enzymreaktionen zählen zu den wichtigsten Modifikationsver-

fahren von Proteinsystemen und finden im nachstehenden Kapitel eine ausführliche Beschreibung.

In der vorliegenden Arbeit soll erstmals die Integration einer enzymatisch katalysierten Quervernetzungsreaktion in einen kontinuierlichen Extrusionsprozess vollzogen werden. Allgemeine Einflüsse auf den Herstellungsprozess, die Abhängigkeiten von relevanten Prozessparametern der Extrusion und die Auswirkungen auf die Produkteigenschaften standen bei den Untersuchungen im Vordergrund.

2.3 Modifikationen

2.3.1.1 Überblick und Zielsetzung

Proteinmaterialien müssen herstellungs- und anwendungsspezifisch vielfältigsten Anforderungen genügen, um wirtschaftlichen und technologischen Kriterien und einer ausreichenden Verbraucherakzeptanz gerecht zu werden.

Hingegen führen vergleichsweise schlechte Wasser- und Wasserdampfresistenzen und ungenügende mechanische Eigenschaften, wie beschrieben, zu einer Anwendungslimitierung proteinbasierter Produkte für viele Bereiche. Aus diesen Gründen müssen Strategien entwickelt werden, die ziel- und anwendungsorientierte Funktions- und Strukturänderungen ermöglichen. Diese werden allgemein als Modifikationen bezeichnet [Rhi07, Bou09, Koe94].

Modifikationen beschreiben Methoden zur direkten Einflussnahme auf die Struktur und die Funktion von Proteinen und deren Produkte. Die verfolgte Zielsetzung umfasst im Wesentlichen die Verarbeitung und die Eigenschaften des Endproduktes. Einerseits werden chemische Modifikationen initiiert, um die Verarbeitung von Proteinen zu Endprodukten zu ermöglichen bzw. zu verbessern. Andererseits dienen derartige Modifikationen der Einflussnahme auf die finalen Produkteigenschaften sowie der Optimierung derselben. Dabei werden in vielen Fällen beide Zielsetzungen parallel verfolgt, um die Effizienz der Produktion und die Produktleistung zu maximieren [Rud08, Han05, Gui05].

Zu den wichtigsten chemischen Modifikationsmöglichkeiten für Proteinsysteme zählen neben pH-Wert-Änderungen, Zugabe von Salzen, Temperaturänderungen, Denaturierung, Peptidhydrolyse, Lösungsmittelauswahl und Zugabe von Fremdproteinen vor allem Quervernetzungsreaktionen und der Einsatz von Weichmachern. Weitverbreitete physikalische Modifikationen betreffen die Fraktionierung (Ultrafiltration, Zentrifugation), mechanische Behandlung (Druck, Scherung) und Bestrahlung (UV, Mikrowellen, Ultraschall) [Rhi07, Cao09, Ban96, Kry06, Lac02, Gen98, Vac00, Jia98].

Darüber hinaus existieren enzymatische Verfahren, um spezifische Veränderungen der Primärstrukturen von Proteinen, z. B. durch kovalente Bindungen zu katalysieren [Gho09, Tha02, Orb04, Kob01, Mar07]. Durch den Einsatz des Enzyms mikrobielle Transglutaminase konnte ein vielversprechender Ansatz zur Etablierung von permanenten Bindungen zwischen Proteinen entwickelt werden, der unter verschiedenen pH-Wert-Bedingungen und Temperaturen zu einer Polymerisation der Proteine führt. Dies trägt zu einer Verbesserung ausgewählter Eigenschaften der Proteinmaterialien, wie beispielsweise höhere Flexibilität und geringere Wassersensitivität bei. Das Enzym mikrobielle Transglutaminase einschließlich Reaktionsmechanismus und Anwendungsmöglichkeiten wird in Kapitel 3.2.1 näher charakterisiert [Kob01, Jon86, Whi85, Bon96, Tak97].

Neben den beschriebenen Modifikationen, die durch Anlagen- und Prozessführungen (beispielsweise in Extrusionsprozessen) verarbeitungsbedingt auftreten, ist der gezielte Einsatz von Weichmachern ein effizientes Instrument zur Prozess- und Produktoptimierung. Im Rahmen dieser Arbeit werden zudem zwei Neuentwicklungen zur gezielten Modifikation von proteinogenen Produkten präsentiert, der Einsatz kristalliner Substanzen und eine enzymatisch katalysierte Proteinquervernetzung als integraler Bestandteil eines kontinuierlichen Herstellungsverfahrens.

2.3.1.2 Weichmacher

2.3.1.2.1 Definition und Wirkungsweise

Weichmacher sind allgemein hin definiert als niedrigmolekulare, inerte, organische und nicht-flüchtige Substanzen, die einem Polymer zugesetzt werden, um dessen Flexibilität und Dehnbarkeit zu verbessern [Cad00, Wad01, Wil96, Wyp04, Aud05].

In den traditionellen Polymerwissenschaften wird zwischen zwei Typen von Weichmachern unterschieden, internen und externen. Interne Weichmacher sind Bestandteil der Polymermoleküle, die entweder in die Struktur des Kunststoffes copolymerisiert wurden oder mit der Polymerstruktur reagiert haben. Damit sind interne Weichmacher kovalent mit dem Polymer verbunden. Im Vergleich dazu findet bei externen Weichmachern keine chemische Modifikation sondern lediglich eine Interaktion mit dem Polymer statt. Externe Weichmacher proklamieren dabei deutlich geringere Kosten und haben einen höheren Freiheitsgrad bezüglich Art und Konzentration der eingesetzten Substanzen und kommen aus diesen Gründen bevorzugt zum Einsatz [Wil96, Cad00, Cad00a, Wad01, Sot05, Kro02, Wyp04].

Es existieren vier generalisierte Theorien zum Wirkungsmechanismus von externen Weichmachern, die sich im Detail und ihrer Komplexität voneinander unterscheiden. Einige Theorien beinhalten detaillierte Analysen von Polaritäten, Löslichkeiten, Inter-

aktionsparametern sowie thermodynamische Aspekte, wohingegen andere die Weichmachung als einen einfachen Schmierprozess zwischen den Polymerketten betrachten, ähnlich der Schmierung von Metallteilen durch Öl [Wad01, Cad00, Cad00a, Sot05]. Ein tieferes Verständnis des Weichmachungsprozesses setzt daher eine Kombination von Ansätzen, Ideen und Aspekten jeder Theorie voraus, die sich wie folgt auflisten lassen:

- Schmier-Theorie,
- Gel-Theorie,
- Freie-Volumen-Theorie und
- Thermodynamische oder mechanistische Theorie [Wad01].

Die sog. Schmier-Theorie postuliert die Wirkungsweise des Weichmachers als eine Art Schmiermittel, um die Beweglichkeit der Polymerketten zu verbessern. Dies liegt in der Annahme begründet, dass die Festigkeit bzw. Steife des Materials durch intermolekulare Reibung der Polymerketten verursacht wird, welche die Ketten in ein starres Netzwerk bindet. Durch Wärmezufuhr werden die Reibungskräfte reduziert, was den Weichmachermolekülen erlaubt, sich zwischen den Ketten zu positionieren. Abgekühlt auf Raumtemperatur können die Weichmachermoleküle anschließend als Schmiermittel für die Polymerketten fungieren.

Die Geltheorie verfolgt den Grundgedanken, durch Aufhebung und Reformationshinderung der Polymerverbindungen und -interaktionen untereinander eine weichmachende Wirkung zu erzielen. Dies reduziert die Festigkeit der Gelstruktur und erhöht deren Flexibilität.

Die Freie-Volumen-Theorie zählt zu den ältesten Erklärungsansätzen und erweitert die zwei bereits beschriebenen Theorien um eine quantitative Beurteilung des Prozesses. Dabei wird das freie Volumen in einem Polymer bestimmt, dass bei einer Zunahme zu einer erhöhten Beweglichkeit der Polymerketten führt und damit die Flexibilität erhöht.

Im Rahmen der thermodynamischen oder mechanistischen Theorie wird herausgestellt, dass die Moleküle des Weichmachers nicht permanent mit dem Polymer verbunden sind, sondern eher ein dynamisches Equilibrium zwischen Solvation und Desolvation der Polymerketten durch den Weichmacher existiert. Dies impliziert das Fehlen eines stöchiometrischen Gleichgewichtes zwischen Polymer und Weichmacher, obwohl einige quasi-stöchiometrische Zusammenhänge in der Literatur postuliert werden [Wyp04, Sot05, Wad01, Cad00, Cad00a, Wil96].

Zurzeit werden ungefähr 300 verschiedene Weichmacher hergestellt, wovon etwa 100 von kommerzieller Relevanz sind [Cad00a]. Daher beziehen sich die weiteren

Ausführungen auf weit verbreitete Weichmacher in Biopolymeren und im Speziellen in proteinbasierenden Filmen, Folien und Beschichtungen.

2.3.1.2.2 Weichmacher in proteinogenen Biopolymeren

Auf Proteinen basierende Filme, Folien und Beschichtungen sind in der Regel sehr steif und brüchig. Dies ist auf die stark ausgeprägten intermolekularen Kräfte zwischen den Polymerketten, im Speziellen hervorgerufen durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrücken- und hydrophobe Bindungen und/oder Disulfidbrücken zurückzuführen [Kro02, Aud05, Che02, Khw04, Khw04a, Jon06, Bou06].

In den meisten Fällen ist jedoch eine entsprechende Materialflexibilität bei der Herstellung, Weiterverarbeitung sowie als Endprodukteigenschaft von essenzieller Bedeutung, zu dessen Gewährleistung Weichmacher zum Einsatz kommen [Wyp04, Sot05]. Im Allgemeinen werden Weichmachern daher zwei grundlegende Funktionen zugeschrieben, zum einen als Hilfsstoff zur Herstellung und Verarbeitung und zum anderen zur Beeinflussung der Endprodukteigenschaften. Eingesetzt als Hilfsstoffe für die Herstellung von Polymeren können Weichmacher die Prozesstemperaturen senken, das Verkleben verhindern, die Benetzungs- und Befeuchtungsfähigkeit verbessern sowie die Glasübergangstemperatur absenken. In Bezug auf die Modifizierung der Produkteigenschaften sind generell eine Vergrößerung des Temperatureinsatzbereiches, eine höhere Flexibilität und verbesserte Dehnungswerte des Erzeugnisses zu erwarten [Sot05, Aud05, Wad01, Cad00, Kro02, Her08, Rin03, Bec03].

Besonders für Anwendungen als Verpackungsmaterialien in der Lebensmittelindustrie sind einerseits entsprechende Resistenzen gegenüber Bruch und Abrieb von Nöten, um die Lebensmittel zu schützen und das Handling zu verbessern. Darüber hinaus garantiert eine angemessene Flexibilität, mögliche Deformationen während dem Verpackungs- und Nutzungszeitraum ohne Materialschäden abfedern zu können. Andererseits bestehen Anforderungen an das Verpackungsmaterial, organoleptische Qualitätsverluste, physikalisch-chemische Modifikationen, Texturverluste sowie eine erhöhte mikrobielle Kontamination des Lebensmittels durch gute Barriereigenschaften zu verhindern [Gon94, Cal97, Deb94].

Die durch Weichmacher hervorgerufenen Effekte erweisen sich daher nicht in allen Bereichen als vorteilhaft, da deren Einsatz im Allgemeinen zu abnehmender Kohäsion in den Materialien führt. Dies hat wiederum starke Auswirkungen auf dessen Barriereigenschaften und führt zu einem Anstieg von Gas-, Wasserdampf-, Feuchtigkeits- und Aromapermeabilitäten. Proteinfilme, bestehend aus einem Stoffsystem zeichnen sich daher entweder als Materialien mit guten mechanischen Eigenschaften oder guten Barriereigenschaften aus und kreieren damit ein anwendungsspezifisches Optimierungsproblem [Kro02, Gon93, Sot05, Cao09, Özd08, Wan07, Wan09, Jan99, Sha02, Sha02a].

Für Biopolymere in Form von Filmen, Folien und Beschichtungen werden vorrangig Monosaccharide, Disaccharide oder Oligosaccharide (z. B. Glukose, Fruktose, Sukrose und Honig), Polyole (z. B. Glycerin, Sorbitol und Polyethylenglykol) sowie Lipide und Derivate (Phospholipide, Fettsäuren und Tenside) als externe Weichmacher eingesetzt [Sot05, Kro02, Arv06, Ban66, Tal05, OrI03, Tan01, Iri01]. Die entsprechenden Weichmacher werden gewöhnlich in Konzentrationen zwischen ca. 10 und 60 % bezogen auf die Trockenmasse abhängig von der Sprödigkeit bzw. Festigkeit des Polymers sowie von herstellungs- und anwendungsspezifischen Anforderungen eingesetzt [Gui95, Gha06, Suy05, OrI03].

Der Großteil der Weichmacher besitzt Hydroxylgruppen, die zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Biopolymer führen. Dies zieht eine Zunahme des freien Volumens nach sich und erhöht damit die Flexibilität der Filmmatrix. Die Weichmacher unterscheiden sich dabei in der Anzahl an Hydroxylgruppen, besitzen unterschiedliche Aggregatzustände (fest oder flüssig) und differieren damit im Wirkungsgrad ihrer weichmachenden Eigenschaft [Kro02, Sot05, Suy05].

Bei hygroskopischen proteinogenen Materialien spielt der jeweilige Feuchtigkeitsgehalt eine wichtige Rolle, der entscheidend von der relativen Luftfeuchte der Umgebung abhängt. Wasser mit einer molekularen Masse von $M_w = 18,02$ g/mol stellt einen ausgezeichneten Weichmacher dar, der einen großen Einfluss auf die Eigenschaften des Produktes ausübt. Aus diesem Grund muss die Aufnahme von Wasser bei hydrophilen Materialien Berücksichtigung finden. Darüber hinaus ist bei Weichmachern, die eine stärker ausgeprägte Hygroskopizität besitzen als das Biopolymer selbst, mit einer Verstärkung des Plastifizierungseffektes zu rechnen, wie es beispielsweise bei Proteinfilmen mit Glycerin als Weichmacher der Fall ist [Sot05, Ugr07, Jer07, Sha02, Yu06, Jan99, Mor00, Kim01].

Besonders bei Beschichtungen auf Proteinbasis kommen häufig Lipide, wie u. a. Fettsäuren und Derivate, Lecithin, Öle und Wachse als Weichmacher zum Einsatz. Diese non-polaren Substanzen stellen aufgrund ihrer Hydrophobizität gute Barrieren gegen Feuchtigkeit dar und verleihen dem Produkt zudem Glanz und steigern damit die optische Attraktivität. Demgegenüber führen lipidbasierte Weichmacher zu deutlich schlechteren mechanischen Eigenschaften hervorgerufen durch unzureichende kohäsive Strukturintegrität und als Resultat zu brüchigen Materialien. Nichtsdestotrotz erzielen Lipide eine weichmachende Wirkung, die besonders bei Milchproteinen und Weizen-Gluten zu beobachten ist [Bou08, Kes86, Cal97, Mor02, She97, Gon94a, Khw04, Sot05, Han08, Tal05, Ave93, Tre00, Soh06].

In der Literatur wird zudem übereinstimmend berichtet, dass Wachse eine signifikant höhere Wasserdampfbarriere darstellen als andere Lipide, was einerseits auf die starke Hydrophobizität (keine oder nur geringe Anzahl an polaren Gruppen) und andererseits auf ihre molekulare Organisation (dichte orthorhombisch-kristalline Anordnung senkrecht zur Richtung des Gasstromes) zurückzuführen ist. Ebenso wurde eine Korrelation zwischen Wasserdampf- und Sauerstoffpermeabilitäten und der Lipid-Kettenlänge sowie dem Grad der Übersättigung festgestellt. Die Permeabilitäten der Materialien reduzieren sich, wenn die Kettenlänge der Lipide und der Grad der Übersättigung zunehmen [Cal97, Khw04, Gon94a, Mar02, Mar02a, Sch49].

Weiterführende Studien haben zudem gezeigt, dass die Reduzierung der molekularen Masse eines Polymers dessen Flexibilität steigern kann ohne einen negativen Einfluss auf die Wasserdampfpermeabilität auszuüben. Die Abnahme der molaren Masse reduziert die intermolekularen Kräfte entlang der Polymerketten und erhöht damit das freie Volumen des Polymers [Sot05, Wyp04, Par93, Ayr97, Par02].

Der Auswahl eines geeigneten Weichmachers müssen neben dem Kostenfaktor weitere Kriterien zugrunde gelegt werden, die in der Basis die Kompatibilität, die Effizienz sowie die Permanenz betreffen. Generell werden Weichmacher für ein bestimmtes Proteinsystem als geeignet eingestuft, die durch eine chemisch ähnliche Struktur eine ausreichende Kompatibilität zum Proteinnetzwerk besitzen. Zudem erweist sich ein stark weichmachender Effekt bereits bei geringen Konzentrationen zur Verbesserung von Prozess und Produkt als wichtiges Effizienzkriterium. Darüber hinaus sind Faktoren, wie z. B. molare Masse und Diffusionsrate des Weichmachers durch ihren Einfluss auf die Wirkungspersistenz als Entscheidungskriterien mit einzubeziehen. [Her08, Sot05, Wyp04, Jer07].

Im Rahmen dieser Arbeit werden drei Weichmachersysteme (Wasser, Glycerin und PEG) untersucht, deren Eignung im Rahmen der Herstellung durch Lösungsmittel- und thermoplastische Verfahren als prozessunterstützende Substanzen sowie zur Beeinflussung der Endprodukteigenschaften untersucht und evaluiert wird.

2.3.1.3 Kristallisation

2.3.1.3.1 Definition und Begriffsklärung

Die Kristallisation bezeichnet den Phasenübergang einer oder mehrerer in einem Lösungsmittel, einem Gas oder einer Schmelze enthaltenen Komponenten in kristalliner Form. Dabei wird ein Stoff aus einem amorphen, flüssigen oder gasförmigen Zustand in eine feste geordnete Phase überführt. Durch die gleichzeitige Wirkung des Wärme- und Stofftransports beim Phasenübergang flüssig-fest sowie mechanischer Einwirkungen (z. B. Sekundärkeimbildung und Agglomeration) auf die Korn-

größenverteilung des Kristallisates stellt die Kristallisation einen sehr komplexen Prozess dar. Als eines der ältesten angewandten industriellen Trennverfahren wird die Kristallisation zur Gemischtrennung, Reinigung und Formgebung eingesetzt [Wei93, Mul01, Hof04].

2.3.1.3.2 Kristallisationskinetik

Die Kristallisation lässt sich kinetisch als ein zweistufiger Prozess bezeichnen, der aus Keimbildung und Kristallwachstum besteht. Der Beginn des Kristallisationsprozesses, der die Ausbildung einer geordneten festen Phase aus einer flüssigen oder amorphen Phase darstellt, wird als Keimbildung bezeichnet und ruft neue Kristalle hervor. Dabei lassen sich, wie in Abb. 2.4 dargestellt, Primär- und Sekundärkeimbildung unterscheiden [Mul01, Wei93, Ulr02].

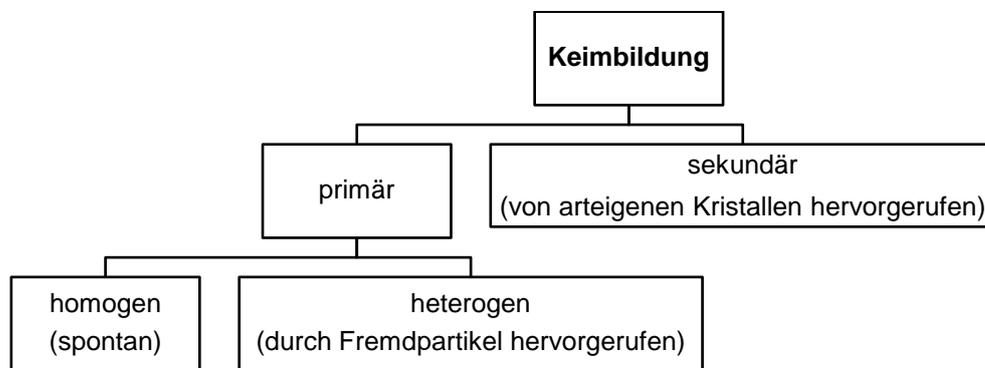


Abb. 2.4: Keimbildungsmechanismen [Wei93]

Wenn in Abwesenheit von arteigenem Kristallinat Keime entstehen, wird der Begriff primäre Keimbildung geprägt. Die sog. Primärkeime können spontan durch homogene Primärkeimbildung entstehen oder durch Fremdpartikel hervorgerufen werden. Letzteres erfolgt an Teilchen (Verunreinigungen) und an Flächen (Wände, Rührer, etc.) in Anwesenheit von Fremdkeimen und wird als heterogene Primärkeimbildung bezeichnet. Die Bildung von Sekundärkeimen wird durch den Abrieb arteigener Kristalle initiiert, beispielsweise durch Kollision der Kristalle untereinander oder mit Einbauten [Wei93, Mul01, Ulr02].

Voraussetzung für die Keimbildung ist eine Übersättigung, bei der die Lösung ihren Gleichgewichtszustand verlässt. Ein Stoff ist dementsprechend nur dann in der Lage zu kristallisieren, wenn das System aus seinem Gleichgewicht gebracht wird [Wei93]. In Abb. 2.5 sind die Breite des metastabilen Bereiches und die verschiedenen Keimbildungsarten dargestellt.

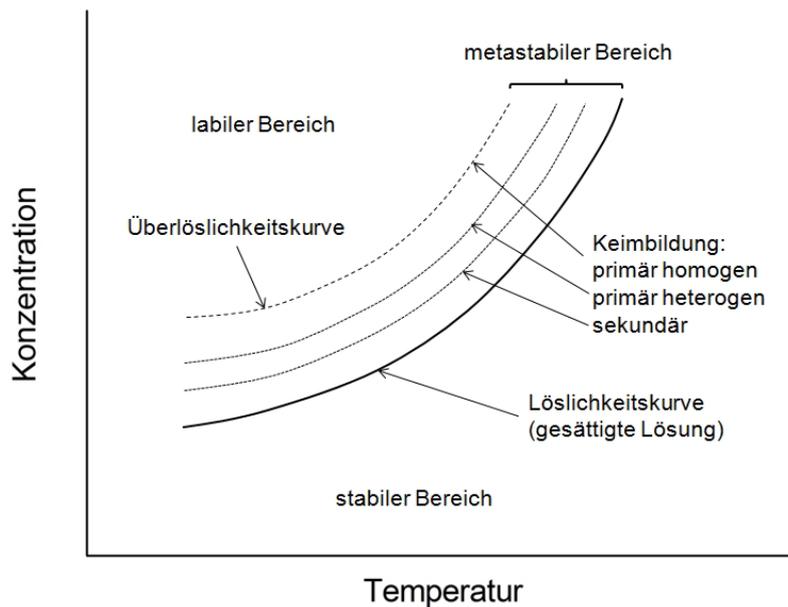


Abb. 2.5: Der metastabile Bereich und Keimbildungsarten [Mul01, Mer01]

Unterhalb der Löslichkeitskurve befindet sich die Lösung in einem stabilen Bereich, in dem aufgrund der Untersättigung keine Keimbildung möglich ist. Die Löslichkeitskurve repräsentiert die Gleichgewichtskurve, auf der sich der Auflösungs- und Kristallisationsprozess im Einklang befinden. Ein Überschreiten der Löslichkeitskurve in den metastabilen Bereich hinein führt zu einer Übersättigung der Lösung. Der metastabile Bereich wird am oberen Ende durch die Überlöslichkeitskurve begrenzt. Im Vergleich zur Löslichkeitskurve ist die obere Grenze des metastabilen Bereiches nicht thermodynamisch festgelegt, sondern abhängig vom Stoffsystem und den Prozessparametern (Temperaturbereich, Geschwindigkeit der Übersättigungsänderung und Erschütterungen, Anwesenheit oder Abwesenheit arteigener Kristalle). Der labile Bereich wird bei einer Überschreitung der Überlöslichkeitskurve erreicht. Spontane Keimbildung (primär homogen) tritt erst an der oberen Grenze des metastabilen Bereiches auf. Bei geringeren Übersättigungen finden die heterogene Primärkeimbildung bei Fremdpartikeln im System und die sekundäre Keimbildung bei Vorhandensein arteigener Kristalle (z. B. Saatkristalle) statt [Ulr02, Kas00, Mye02].

Wird die Übersättigung aufrecht erhalten, so können erzeugte Kristallkeime durch Anlagerung weiterer Kristallbausteine zur Produktkorngröße heranwachsen. Das Kristallwachstum erfolgt dabei in drei Teilschritten. Zunächst erfolgt der Transport der Gitterbausteine aus der Lösung an die Oberfläche der Kristalle durch konvektiven Stofftransport. Im Anschluss findet ein Transport der Gitterbausteine auf der Kristalloberfläche bis zur Einlagerungsstelle, gefolgt von einer Einbaureaktion in das Kristallgitter, statt. Zusätzlicher Einfluss auf die Wachstumskinetik geht von dem Wärmetransport aus, der sich aus der Freisetzung der Kristallisationswärme beim Phasenübergang fluid-fest und aus dem konvektiven Wärmetransport ergibt [Kru93, Ulr02, Mul01, Jon02, Wei93].

Die wesentlichen Aspekte von Keimbildung und Kristallwachstum wurden in literarischen Quellen intensiv erörtert und vertieft [Mul01, Hof04, Mer01, Mye02, Kas00].

Der Einsatz kristalliner Substanzen und/oder die Schaffung kristalliner Zonen stellt ein innovatives und effizientes Verfahren zur Optimierung und Eigenschaftsbeeinflussung proteinogener Produkte dar. Froberg et al., 2008 [Fro08] konnten durch den Zusatz kristalliner Substanzen und den Einbau dergleichen in die Proteinmatrix während des Herstellungsprozesses die mechanischen Eigenschaften von Proteinfilmen deutlich verbessern und gleichzeitig den Einsatz externer Weichmacher nachhaltig senken. Darüber hinaus können Proteinfilme als Träger- und Freisetzungsmaterialien für kristalline Substanzen, z. B. Düngemittel in der Agrarwirtschaft oder pharmazeutische Wirkstoffe in der Biomedizin fungieren und damit einen erheblichen Produktmehrwert schaffen [Fro08, Fro09].

2.4 Analytik

2.4.1 Optik und Organoleptik

Die optischen Eigenschaften von proteinogenen Filmen und Folien bestimmen das äußere Erscheinungsbild und tragen wesentlich zum Image des Produktes bei. Zu den wichtigsten Eigenschaften zählen neben Form und Abmessungen, die anwendungsspezifische Anforderungen erfüllen müssen, vor allem Glanz und Transparenz bzw. Farbgebung. Des Weiteren sind jene organoleptischen Eigenschaften von Bedeutung, welche die Produkte nach Geruch, Geschmack und Tastgefühl charakterisieren und besonders bei essbaren Proteinfolien und Beschichtungen zum Tragen kommen. Optik und Organoleptik zählen zu den funktionalen Eigenschaften und wurden in Kapitel 2.1.5.1 entsprechend eingeordnet.

Die optischen Eigenschaften sind in erster Linie materialbedingt, aber auch die Technologie des Herstellungsverfahrens, z. B. Walzenbeschaffenheit, Abkühlvorgang und Nachbehandlungen in Form von Wickeln oder Schneiden sowie der Zusatz von Additiven gelten als Einflussfaktoren [Tim05, Nen06, Rau01a, Esp06].

Die Produkte aus den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen anhand der genannten Eigenschaften subjektiv und objektiv über Messverfahren beschrieben und bewertet werden.

2.4.2 Mechanische Produkteigenschaften

Die Bestimmung von Kennwerten zur Charakterisierung der Produkteigenschaften erfolgt über Werkstoffprüfverfahren, die entsprechende Kenngrößen von Probekörpern unter mechanischer, thermischer oder chemischer Beanspruchung ermitteln.

Zu den wichtigsten funktionalen Eigenschaften von Proteinfilmen und -folien, die in Kapitel 2.1.5.2 ausführlich beschrieben wurden, zählen die mechanischen Kennwer-

te. Diese werden unter standardisierten Bedingungen mittels Zugversuch ermittelt [Nen06]. Das resultierende Spannungs-Dehnungs-Diagramm dient zur Bestimmung der Festigkeits- und Verformungskenngrößen von Werkstoffen und ist in Abb. 2.6 beispielhaft dargestellt.

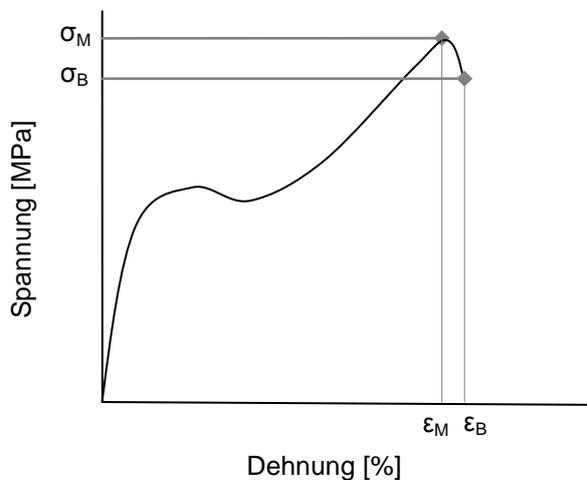


Abb. 2.6: Spannungs-Dehnungs-Diagramm mit typischem Verlauf bei zähem Werkstoffverhalten mit vorhandener Streckgrenze [DIN96]

Die entsprechenden Größen werden in den nachfolgenden Ausführungen erläutert und arithmetisch charakterisiert.

2.4.2.1 Zugfestigkeit

Die Zugfestigkeit σ_M beschreibt die Maximalspannung, die der Probekörper während eines Zugversuchs trägt und wird in Megapascal (MPa) angegeben. Die Spannungswerte werden dabei auf Grundlage der Anfangsquerschnittsfläche des Probekörpers berechnet [DIN95, DIN96].

$$\sigma_M = \frac{F}{A_0} \quad \text{Gl. 2-1}$$

mit σ_M Zugfestigkeit
 F max. gemessene Kraft
 A_0 Anfangsquerschnittsfläche des Probekörpers,

und
$$A_0 = b \cdot h \quad \text{Gl. 2-2}$$

mit b Breite des Probekörpers
 h Höhe des Probekörpers [DIN96].

Die Angabe der Zugfestigkeit bei Folien erfolgt zumeist in Längs- und Querrichtung bezogen auf die Extrusionsrichtung, da diese Größe beispielsweise durch eine Verstreckung bei einem Folienabzug am Extruderausgang wesentlich beeinflussbar ist [Nen06].

2.4.2.2 Bruchdehnung

Die Dehnung stellt die Fähigkeit eines Materials zur Ausdehnung unter Belastung dar [Nen06]. Diese ist definiert als die auf die ursprüngliche Länge bezogene Änderung der Messlänge. Es gilt dabei zwischen der Dehnung bei Maximalspannung ε_M und Dehnung bei Bruchspannung ε_B zu unterscheiden. Erstere beschreibt die Dehnung bei Maximalspannung, wenn diese ohne oder im Streckpunkt auftritt. Die Bruchdehnung beschreibt die Dehnung bei der Bruchspannung, wenn der Bruch vor Erreichen eines Streckpunktes stattfindet [DIN95]. Für die Charakterisierung der Dehnung wird einheitlich die Bruchdehnung ε_B für alle Probekörper herangezogen.

Die Angabe der Dehnung erfolgt als Prozentsatz (%) bezogen auf die ursprüngliche Länge [DIN96].

$$\varepsilon_B = 100 \cdot \frac{\Delta L_0}{L_0} \quad \text{Gl. 2-3}$$

mit ε_B Dehnungswert bei Bruchspannung
 L_0 Messlänge am Probekörper
 ΔL_0 Vergrößerung der Probekörperlänge zwischen den Messmarken [DIN96].

2.4.2.3 Elastizitätsmodul aus dem Zugversuch

Der Elastizitätsmodul (E-Modul) E_t ist definiert als Verhältnis von Spannungs- zu dem entsprechenden Dehnungsunterschied und wird in Megapascal (MPa) angegeben. Das E-Modul dient der Messung der internen Steifheit einer Folie [Din96, Che95].

$$E_t = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1} \quad \text{Gl. 2-4}$$

mit E_t Zugmodul
 σ_1 beim Dehnungswert $\varepsilon_1 = 0,0005$ gemessene Spannung
 σ_2 beim Dehnungswert $\varepsilon_2 = 0,0025$ gemessene Spannung [DIN96].

Bei rechnergestützten Prüfeinrichtungen kann die Ermittlung des E-Moduls über zwei ausgewählte Spannungs-/Dehnungswerte erfolgen, indem eine lineare Regression auf dem Kurvenbereich zwischen diesen ausgewählten Punkten durchgeführt wird [DIN95].

2.4.3 Biochemische Analyseverfahren

2.4.3.1 Enzymatische Aktivität

2.4.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Prinzip der Elektrophorese beruht auf einem elektrischen Gleichstromfeld, in dem geladene Moleküle und Partikel jeweils in die Richtung der Elektrode mit entge-

gegengesetztem Vorzeichen wandern. Dabei bewegen sich verschiedenartige Moleküle und Partikel eines Gemisches in wässriger Lösung aufgrund verschiedenartiger Ladungen und Massen mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und werden dabei in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Bei der Elektrophorese kommt ein homogenes Puffersystem zum Einsatz, das eine pH-Wert-Konstanz über die gesamte Trenndistanz gewährleistet. Die Methodik wird zur qualitativen Charakterisierung einer Substanz oder eines Substanzgemisches, zur Reinheitsprüfung, für Gehaltsbestimmungen und für präparative Zwecke eingesetzt [Wes90, Mic95, Bla91, Eck97].

Zur Vermeidung von Diffusionseffekten finden die Elektrophoresen in Gelen als Trägermatrix statt, die neben Agarose hauptsächlich aus Polyacrylamid bestehen. Um das Protein in seine Untereinheiten aufzuspalten, wird Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt, was die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle auflöst. Zudem werden Disulfidbrücken durch die Zugabe von Mercaptoethanol oder Dithiothreitol reduziert. Durch die Beladung mit der anionischen Detergenz SDS werden die Eigenladungen von Proteinen so effektiv überdeckt, dass anionische Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit entstehen. Durch das gleiche Ladungs-Masse-Verhältnis hängt die Wanderung im elektrischen Feld nicht mehr von der Ladung der Proteinuntereinheiten ab, sondern nur noch von der Proteingröße. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen [Bol96, Wes90, Eck97].

Die SDS-PAGE kann deshalb dazu verwendet werden, das Molekulargewicht eines Proteins zu bestimmen. Dabei wird neben dem zu untersuchenden Protein eine Probe von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht, der sog. Proteinmarker, aufgetragen. Mithilfe einer Eichgeraden und dem Vermessen der Laufstrecke der zu untersuchenden Proteine können die jeweiligen Molekulargewichte berechnet werden [Mic95, Eck97, Bla91].

Diese Methodik findet im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorrangig zum Nachweis einer enzymatisch katalysierten Quervernetzung der eingesetzten Proteinsysteme Anwendung und ist damit zur vergleichenden Bewertung der Reaktionseffizienz zwischen verschiedenen Herstellungsverfahren und Proteinen zu verstehen.

2.5 Statistische Versuchsplanung

2.5.1 Ausgangspunkt und Grundidee

Jede angewandte Wissenschaft bedient sich des Experimentes als Mittel zur Erkenntnisgewinnung im weitesten Sinne, sei es zur Forschung, zur Untersuchung neuer Sachverhalte oder bei der Kontrolle und Steuerung von Abläufen. Dabei müssen jeder experimentellen Untersuchung eine genaue Problemstellung und eine ent-

sprechende Zielsetzung zugrunde liegen. Häufig wird zur Lösung letzterer eine wohldefinierte, endliche Menge an Versuchen durchgeführt, ausgewertet und beurteilt. Anhand dieser Ergebnisse werden dann weiterführende Überlegungen angestellt. Jedoch führen einschränkende Vorgabewerte für Zeit und Kosten zu einer unbefriedigenden Beurteilung dieser Vorgehensweise. Durch das Bestreben, die gewünschten oder erforderlichen Erkenntnisse aus der experimentellen Untersuchung mit möglichst geringen Versuchsaufwand zu gewinnen, gehen die Bemühungen hin zu einer mathematisch-statistischen Präzisierung der Problemstellung, infolge derer, die zu untersuchenden Größen und Bedingungen festgelegt werden. Mit dem Ziel der Systematisierung und Rationalisierung der Empirie bietet die statistische Versuchsplanung ein wertvolles Hilfsmittel für die Gestaltung von Experimenten [Sch97, Kle09, Mon09].

2.5.2 Definition und Vorgehensweise

Die statistische Versuchsplanung (auch DoE = Design of Experiments) stellt eine effiziente Methode zur Erfassung und reproduzierbaren Bewertung des Effekts von Einflussgrößen auf Zielgrößen dar. In der Praxis wird von statistischer Versuchsplanung gesprochen, wenn in einem gegebenen Sachverhalt verschiedene konkurrierende Möglichkeiten für Experimente zur Verfügung stehen. Erfolgt die Auswahl dieser beobachtbaren Zufallselemente nach einem gegebenen Optimalitätskriterium, so handelt es sich um eine statistisch optimale Versuchsplanung [Ban94, Muk06].

Die Einflussgrößenbewertung erfolgt mithilfe mehrfaktorieller Regressionsmodelle, welche einen Bewertungsformalismus darstellen, über dessen Ergebnisse kein Streit möglich ist. Im Gegensatz zur klassischen Versuchsmethodik, welche die möglichen Einflussgrößen nacheinander untersucht („one factor at a time“), werden bei der DoE-Vorgehensweise mehrere Faktoren in einem Versuchsplan in systematischer Weise parallel variiert. Dabei stellt die Ausgewogenheit der Versuchspläne sicher, dass sich die Einflüsse der verschiedenen Faktoren tatsächlich auch trennen lassen. Weitere entscheidende Vorteile gegenüber der klassischen Vorgehensweise lassen sich wie folgt identifizieren:

- systematische Planung und programmiertes Vorgehen,
- Modellierung und Optimierung experimenteller Versuche und
- Einsparung von Forschungsaufwand und damit auch von Zeit und Kosten [Muk06, Kle09].

Die statistische Versuchsplanung ist immer dann anwendbar, wenn:

- die Werte bestimmter Einflussgrößen für das Optimum oder für entsprechende Zielgrößen ermittelt werden sollen,

- die Abhängigkeit zwischen Einfluss- und Zielgröße erfasst werden soll,
- die grundsätzlichen physikalischen oder chemischen Zusammenhänge unbekannt sind und
- eine große Anzahl von Variablen zu untersuchen bzw. die Versuche sehr aufwendig sind [Muk06, Mon09].

Im Gegenzug ist die statistische Versuchsplanung nur bedingt für Grundlagenuntersuchungen angebracht, bei der nichtstatistische funktionelle Zusammenhänge ermittelt werden sollen, da diese die DoE-Vorgehensweise nicht liefern kann. Zudem ist ihre Anwendung nicht sinnvoll, wenn der Versuchsaufwand gering ist und die Ermittlung der Ergebnisse wenig Aufwand erfordert [Sch97, Kle09, Mon09].

2.6 Wissenschaftliche Problemstellung

Biologisch abbaubare, nicht giftige und kompostierbare Materialien gelten als vielversprechende Innovation für verschiedenste Wirtschaftszweige. Begünstigt durch eine weltweit strengere Umweltgesetzgebung, ein verstärktes Umweltbewusstsein der Verbraucher, die Verknappung konventioneller, erdölbasierender Materialien und derer hohen preislichen Volatilitäten verbunden mit stark expandierenden Kapazitäten ist mit einer deutlichen Ausweitung des Marktvolumens insbesondere für Biokunststoffe zu rechnen.

Basierend auf dem geschilderten Grundlagenwissen über proteinbasierte Materialien, deren Herstellung, Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten, können im Wesentlichen drei Punkte abgeleitet werden, die für eine Ausschöpfung der vorhandenen Marktpotenziale von essentieller Natur sind:

1. Kostenvorteile durch die Etablierung eines standardisierten massenproduktfähigen Herstellungsverfahrens für Proteinmaterialien,
2. Angemessene, anwendungsspezifische funktionale, physikalische und chemische Produkteigenschaften und
3. Veredelung und Mehrwertschaffung vorhandener Produkte.

Bisherige Forschungs- und Entwicklungsbestrebungen konnten die genannten komplexen Problemstellungen nicht in hinreichende Lösungen überführen, die wirtschaftlichen und gesellschaftlichen Anforderungsprofilen genügen. Diese sind primär in der Dominanz und dem Erfolg synthetischer, auf fossilen Rohstoffen basierender Produkte begründet und bremsen den Markterfolg durch nicht erfüllte Erwartungshaltungen.

Verantwortlich für den Siegeszug synthetischer Massenkunststoffe in den vergangenen 50 Jahren war neben der verlässlichen Rohstoffbasis, den vielseitigen Einsatzmöglichkeiten durch gute funktionale Eigenschaften vor allem die thermoplastische Verarbeitung ein ausschlaggebender Faktor. Erst standardisierte Herstellungsverfahren ermöglichten eine effiziente, kostengünstige und umweltfreundliche Produktion von Kunststoffen als Massenwaren.

In Anlehnung an die genannten limitierenden Faktoren für einen wirtschaftlichen Erfolg und eine nachhaltige Verbraucherakzeptanz ergeben sich für die vorliegende Arbeit die folgenden wissenschaftlichen Problemstellungen:

1. Entwicklung eines kontinuierlichen Herstellungsverfahrens durch Modifikation von Anlagen und Prozessen der traditionellen Kunststoffindustrie,
2. Gezielte Beeinflussung von funktionalen Eigenschaften des Endproduktes durch physikalische, chemische und enzymatische Methoden und
3. Veredelung und Mehrwertschaffung durch Funktionsbereicherung der Produkte.

Aus den genannten Punkten ergibt sich eine konkretisierte Zielstellung, die nachfolgend eine Beschreibung mit grundlegenden Produkt- und Prozessinnovationen findet.

Auf der Basis einer etablierten Herstellungs- und Verarbeitungstechnologie für synthetische Polymere, der Extrusion, soll zunächst die Eignung von Proteinsystemen für eine thermoplastische Verarbeitung von Proteinen zu Filmen, Folien und Beschichtungen im Rahmen einer Machbarkeitsstudie untersucht werden. Eine anschließende Optimierung der anlagen- und verfahrenstechnischen Parameter soll einen Beitrag zur Etablierung und Standardisierung des Herstellungsverfahrens leisten. Darüber hinaus sollen Methoden entwickelt und angewendet werden, um die physikalischen Eigenschaften der Produkte einer zielgerichteten Optimierung zu unterziehen. In diesem Zusammenhang finden physikalische, chemische und enzymatische Behandlungen vor, während und nach der Herstellung entsprechend Anwendung. Durch die zusätzliche Schaffung produkt- und prozessflankierender Innovationen sollen die Endprodukte funktional verbessert, veredelt und aufgewertet werden. Dazu werden neuentwickelte Strategien vorgestellt, zu denen die Integration einer enzymkatalysierten Reaktion in den Extrusionsprozess und der Einbau kristalliner Substanzen in die Proteinmatrix gehören.

Damit soll ein Beitrag zur Funktionsvielfalt und Akzeptanz proteinogener Produkte in Wirtschaft und Gesellschaft geleistet werden, mit der Zielsetzung einer nachhaltigen Etablierung und Verbreitung von Biopolymeren als Substitutions- oder Komplementärprodukte für synthetische Kunststoffe.

3 Materialien

3.1 Proteine

3.1.1 Natrium-Caseinat

Casein (lat. *caseus* = Käse) ist ein Protein, das aus Kuhmilch gewonnen wird. Caseine können 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 Milchproteins repräsentieren [Jos07, Fox04, Che02, Mar07a, Dal97]. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Typen im Molekulargewicht (19 bis 25 kDa) sowie in ihrer Hydrophobizität, besitzen aber die gleiche allgemeine molekulare Struktur, die in [Abb. 3.1](#) dargestellt ist [Che02, Mar07a].

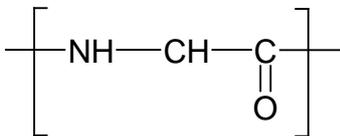


Abb. 3.1: Allgemeine Struktur der Caseine [Mar07a]

Molkenproteine und die entsprechenden Untereinheiten (Lactalbumin und β -Lactoglobulin) stellen mit ca. 20 % Anteil die zweite Proteinfraction in der Kuhmilch dar [Fox04, Jos07, Bön06, Vaz03].

Die chemischen und physikalischen Eigenschaften von Caseinen wurden bereits in vielen Studien umfangreich charakterisiert [Bru81, Fox98, Mar07a, Che02].

Caseine sind hauptsächlich Phosphoproteine und enthalten ca. 0,85 % Phosphor. Die organischen Phosphatresiduen im Casein bilden sog. Phosphatzentren, die eine deutlich negative Ladung bei neutralem pH-Wert besitzen und somit Calciumionen stark binden. Es wird allgemein davon ausgegangen, dass diese strukturelle Besonderheit für die gute thermische Stabilität der Caseine verantwortlich ist [Che02, Dal97, Mar07a]. Die hohe Resistenz gegenüber thermischer Beanspruchung ist für die Entwicklung eines kontinuierlichen Herstellungsverfahrens von großer Bedeutung.

Caseine weisen zudem wenige Sekundär- und Tertiärstrukturen auf, da der vergleichsweise hohe Anteil der Aminosäure Prolin die α -Helices und die β -Faltblätter teilweise aufhebt [Fox98]. Der offene, flexible und mobile Aufbau der Caseinmoleküle, auch bezeichnet als offene Ringstruktur, fördert die Ausbildung von Filmen durch intermolekulare Wasserstoffbrücken- und elektrostatische Bindungen sowie durch hydrophobe Interaktionen [Che95, Che02, Fox98, Cha04, McH94, Khw04].

Filme und Beschichtungen werden hauptsächlich aus kommerziell verfügbaren Caseinaten gewonnen. Die Herstellung von Caseinaten bzw. denaturiertem Casein erfolgt durch eine Säurefällung mit anschließender Neutralisierung mittels Calciumhydroxid, Kaliumhydroxid oder Natriumhydroxid und abschließender Sprühtrocknung der Caseinate [Che02, Cha04, Vaz03, Fox98, Mar07a, Lyn97].

Vorrangig kommen Natrium-Caseinate (NaCas) zum Einsatz, da diese eine allgemein höhere Löslichkeit sowie bessere funktionale Charakteristiken besitzen als die Caseine [McH94, Cha04].

In der vorliegenden Arbeit wurde das kommerziell verfügbare Produkt Natrium-Caseinat der Bayerischen Milchindustrie eG (BMI) für die Experimente verwendet, welches lt. Herstellerangaben wie folgt zusammengesetzt ist: 88 % Protein, 1,5 % Fett, 0,2 % Lactose, 4,5 % Asche und 6 % Wasser [BMI09].

3.1.2 Erbse

Erbsen (*Pisum sativum*), zur Gruppe der Leguminosen (Hülsenfrüchte) gehörend, stellen durch ihren vergleichsweise hohen Proteingehalt und ihre vorteilhafte Aminosäure-Zusammensetzung aus ernährungsphysiologischer Sicht eine attraktive Quelle für pflanzliche Proteine dar [Gue83, Cho01, Pat74, Hor89]. Für die Extraktion der enthaltenen Proteine kommen in erster Linie verschiedene Sorten von Körnerleguminosen zum Einsatz, die sich in ihren Inhaltsstoffen teilweise deutlich unterscheiden [Wu05, Gue83, Mar98, Cho01, Pat74]. In Tab. 3.1 ist ein Überblick über die Inhaltsstoffe von technisch relevanten Leguminosen gegeben.

Tab. 3.1: Nutritative Inhaltsstoffe ausgewählter Körnerleguminosen; TM=Trockenmasse [Mar98, Pat74, Gue83, Wu05]

Bezeichnung	Protein [g/100 g TM]	Fett [g/100 g TM]	Kohlenhydrate [g/100 g TM]
Felderbse	25,7	1,4	53,7
Kichererbse	22,7	5,0	54,6
Sojabohne	39,0	19,6	7,6
Gartenbohne	24,1	1,8	54,1
Sau-(Pferde-) Bohne	26,7	2,3	44,8
Erdnuss	27,4	50,7	9,1
Linse	26,6	1,6	57,6

Die Proteinfractionen der Hülsenfrüchte liegen im Bereich zwischen 22,7 und 27,4 %. Einzig die Sojabohne besitzt einen Anteil von 39 % bezogen auf ihre Trockenmasse. Die Hauptproteinfraction stellen dabei die Globuline dar (> 80 % des Gesamtproteins), während Albumine nur in einem geringen Umfang zu finden sind [Cho01,

Gue83]. Die Gewinnung von Proteinen aus der Frucht erfolgt im Allgemeinen durch eine alkalische Extraktion gefolgt von einer isoelektrischen Präzipitation. Der Extraktionsprozess führt zu Protein-Isolaten mit einem durchschnittlichen Proteingehalt zwischen 90 und 95 % sowie eine Proteinausbeute in Größenordnungen zwischen 60 und 65 % bezogen auf den Gesamtproteininhalt der jeweiligen Hülsenfrucht [Sch07, Vir00, Cho01, Gue83, Vos80, Sat81, Töm01].

Kommerziell verfügbares Erbsenprotein-Isolat besitzt sensorische Eigenschaften, die sich in einer creme- bis gelb-bräunlichen Färbung sowie einem neutralen Geschmacksprofil des pulverförmigen Proteins äußern. Die Wasseraufnahmekapazität beträgt das 2,7 bis 2,8fache ihres Eigengewichtes bei einem pH-Wert von 7 [Vos80, Gue83].

Besonders durch die filmbildenden Eigenschaften dieses pflanzlichen Vertreters steht Erbsenprotein neben dem tierischen Vertreter Natrium-Caseinat ebenfalls im Fokus der verfahrenstechnischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit. Das Potenzial von Erbsenprotein zur Herstellung von biologisch abbaubaren und/oder essbaren Filmen und Beschichtungen, vorrangig für Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden [Cho01, Vir00, Gue96, Jan99, Jan99a]. Weiterhin wurde von einer deutlichen Verbesserung der *in vivo* – Verdaubarkeit berichtet, wenn eine thermische Behandlung des Erbsenproteins erfolgt, wie es beispielsweise bei einer Extrusion der Fall ist [Sch07, Fon99, Bur00, Ste07, Le05]. Dies steigert die Attraktivität im Bereich von essbaren Filmen, Folien und Beschichtungen zusätzlich und verbessert die Einsatzmöglichkeiten für *in vivo* – Applikationen.

Für die nachstehenden Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Erbsenprotein-Isolat (PPI) der Emsland Stärke GmbH, Emlichheim, Deutschland verwendet.

3.1.3 Gelatine

Das tierische Protein Gelatine wird durch chemisch-thermische Verfahrensschritte aus der Proteinfamilie der Kollagene gewonnen, die in Haut, Knochen, Sehnen und Bindegewebe von tierischen und menschlichen Organismen enthalten sind. Abhängig vom Rohmaterial, der Vorbehandlung und den Extraktionsparametern zeigt Gelatine abhängig vom Grad der Hydrolyse eine polydisperse Molmassenverteilung bei mittleren Molmassenbereichen zwischen 30.000 und 300.000 g/mol. Grundsätzlich besteht Gelatine aus 18 linear verknüpften Aminosäuren, die in langen geordneten Ketten ausgerichtet sind. Ihre Triple-Helix-Struktur besteht aus zwei identischen Ketten, bezeichnet als α_1 und α_2 [Sch07a, Bab96, Bab00, Kum03, Kee03].

Marktübliche Gelatine ist ein glasartig-brüchiger und leicht gelblicher Feststoff, der sich durch seine weitgehende Geschmacks- und Geruchslosigkeit auszeichnet. Dieser wird kommerziell in unterschiedlichen Formen von großen Granulaten bis hin zu feinen Pulvern angeboten und enthält im trockenen Zustand ca. 9 – 13 % Feuchtigkeit. Technische Gelatine wird hauptsächlich über die Gelierkraft und die Viskosität charakterisiert. Erstere wird über den Bloom-Index, benannt nach dessen Erfinder Oscar T. Bloom beschrieben und ist Ausdruck für die Gallertfestigkeit, welche über die Deformationsresistenz bei definierten Bedingungen gemessen wird. Die Bloom-Werte liegen im Allgemeinen zwischen 50 und 300 und symbolisieren mit einem Anstieg eine Zunahme der Gelierkraft. Die Viskosität einer Gelatinelösung hängt wiederum von der Gelierkraft, der Gelatinekonzentration, der Temperatur und dem pH-Wert ab. Wässrige Gelatinelösungen zeigen gewöhnlich oberhalb von 40 °C ein Newton'sches Verhalten [Kee03, Sch07a, Bab96].

Die Bezeichnung Gelatine wird seit über 1700 Jahren verwendet und stammt von der lateinischen Bezeichnung *gelatus* = gefroren ab. Dies deutet auf eine der wichtigsten Eigenschaften der Gelatine hin, der Ausbildung thermo-reversibler Gele in Verbindung mit Wasser, die sog. Sol/Gel-Umwandlung. Weitere funktionale Eigenschaften können wie folgt zusammengefasst werden:

- Texturbildung,
- Verdickung und Wasserbindung,
- Emulsionsbildung und -stabilisierung,
- Filmbildung,
- Adhäsion/Kohäsion und
- Schutzkolloid [Bab00, Kee03, Sch07a].

Der Auswahl des Modellproteins Gelatine für die vorliegende Arbeit liegen im Wesentlichen zwei Überlegungen zu Grunde. Zum Ersten konnten die filmbildenden Eigenschaften bereits umfassend nachgewiesen und evaluiert werden, was eine hervorragende Grundlage für einen Vergleich im Rahmen der Einflussermittlung gezielter Modifikationen durch kristalline Substanzen und enzymatische Reaktionen auf die Produkteigenschaften gewährleistet. An den geplanten Modifikationen anknüpfend stellt Gelatine zum Zweiten durch seine Aminosäurezusammensetzung ein geeignetes Substrat für eine Quervernetzung durch das Enzym mikrobielle Transglutaminase dar. Dieser Umstand erlaubt die Untersuchung von kombinierten Modifikationen auf die funktionalen Eigenschaften von Gelatineprodukten [Bab00, Sch07a, Arv97, Cha06, Cao09, Wan09, Szt08, Tho05].

Für die durchgeführten Versuche wurde Gelatine, GELITA AG, Eberbach, mit einem Bloom-Wert von 280 und einem mittleren Molekulargewicht von ~ 147.000 g/mol verwendet.

3.2 Enzyme

3.2.1 Transglutaminase

3.2.1.1 Einführung und Reaktionsmechanismus

Transglutaminasen (TG) repräsentieren eine Gruppe von Enzymen (Protein-Glutamin γ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13), welche eine kovalente Verknüpfung von Proteinen und Peptiden katalysieren [Zhu08, Arr07, DeJ02]. Als Reaktion wird ein Acyltransfer zwischen einer γ -Carboxyamid-Gruppe eines protein- oder peptidgebundenen Glutamins und der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes katalysiert, welcher zur Entstehung einer ϵ -(γ -Glutamyl) Lysin-Isopeptidbindung führt [Seg02, Pfl05, Kas02]. Der entsprechende Reaktionsmechanismus ist in Abb. 3.2 dargestellt.

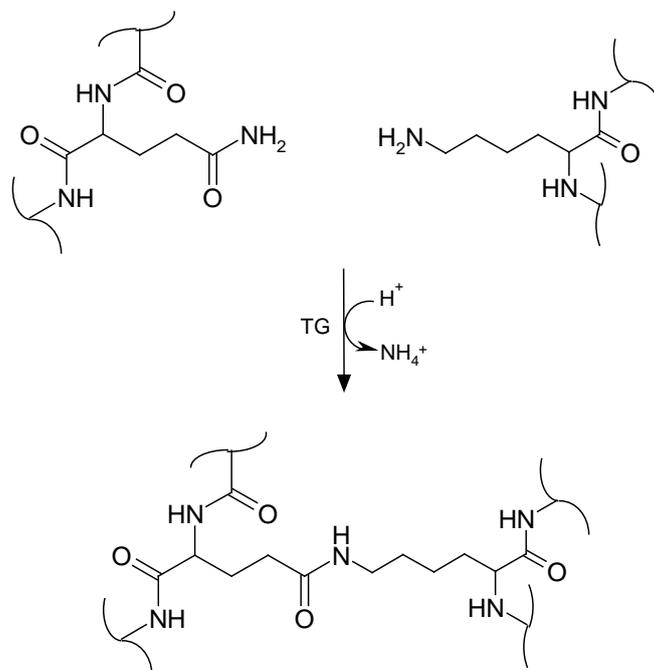


Abb. 3.2: Reaktionsschema von Transglutaminasen (TG). Bildung einer ϵ -(γ -Glutamyl)-Lysin-Isopeptidbindung zwischen einer γ -Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutaminrestes und einer ϵ -Aminogruppe eines proteingebundenen Lysinrestes

Transglutaminasen sind weit verbreitet und haben ihren Ursprung in Bakterien, Tieren und Pflanzen und sind für eine Vielzahl an biologischen Funktionen notwendig [Grif02, Lor03, Jar06]. Bis Ende der 1980er Jahre konnten kommerzielle Transglutaminasen nur aus Tierhäuten und besonders aus Meerschweinchenleber gewonnen werden und haben den Nachteil der Calciumabhängigkeit für ihre Aktivität. Im Gegensatz zu den tierischen oder pflanzlichen Transglutaminasen handelt es sich bei mikrobiellen Transglutaminasen (MTG) um monomere und Ca^{2+} -unabhängige En-

zyme [Arr07, Jar06, Zhu08, Mar05]. Die Vorteile der MTG liegen neben der Calcium-unabhängigkeit vor allem in der geringeren Substratspezifität sowie der hohen Thermostabilität und haben die Möglichkeit einer kostengünstigen Massenproduktion durch traditionelle Fermentationsprozesse eröffnet. Dies führte zu einer schnellen Verbreitung des Enzyms für vielfältigste industrielle Anwendungen [Jar06, Kur01, Zhu05, Zhu08, DeJ02, Shi02].

Mikrobielle Transglutaminase besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einer Molmasse von 37,9 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 8,9. Die dreidimensionale Struktur ist in [Abb. 3.3](#) dargestellt. Das Enzym weist eine scheibenartige Form mit einer zentralen β -Faltblattstruktur auf, die an drei Seiten von α -Helices umgeben ist. Das für die katalytische Aktivität verantwortliche Cys-64 befindet sich im Zentrum der Substrattasche [Kas02, Jar06, Arr07].

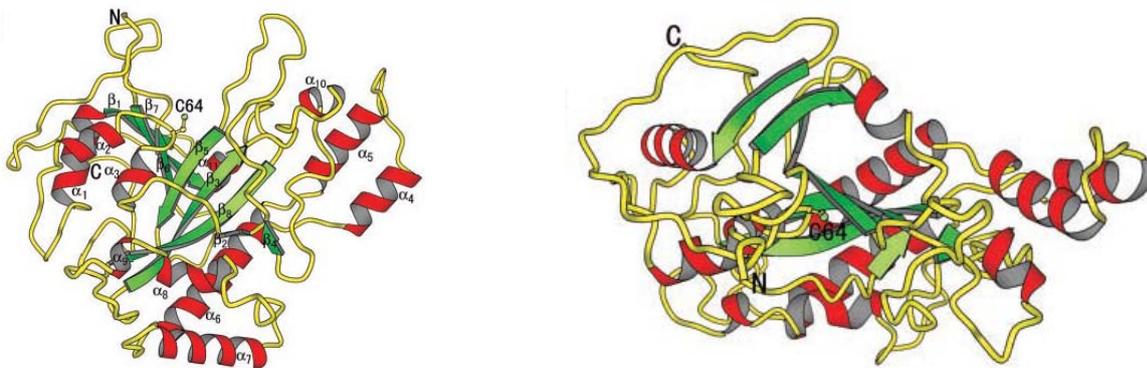


Abb. 3.3: Dreidimensionale Struktur der mikrobiellen Transglutaminase aus verschiedenen Perspektiven [Kas02]

Mikrobielle Transglutaminase besitzt eine hohe Aktivität über einen weiten pH- und Temperaturbereich hinweg. Der pH-Wert-Bereich für optimale Reaktionsbedingungen liegt zwischen 5 und 8, der Temperaturbereich zwischen 45 bis 55 °C. Eine Inaktivierung erfolgt bei Temperaturen höher als 60 °C [Aji09, Lu03, Yok04]. Die jeweiligen Aktivitätsbereiche können der [Abb. 3.4](#) entnommen werden.

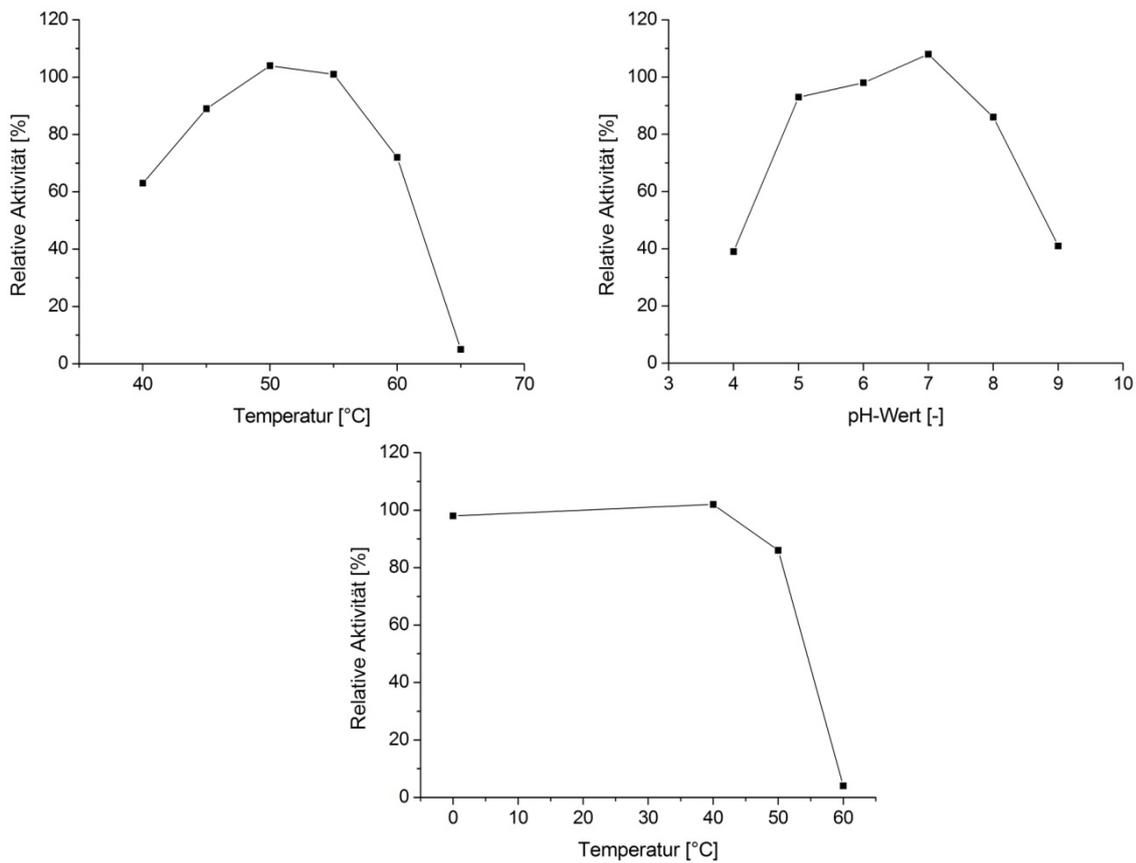


Abb. 3.4: Optimale Reaktionsbedingungen von „ACTIVA[®] WM“, Ajinomoto, optimaler Temperaturbereich (o. l.), optimaler pH-Wert-Bereich (o. r.) sowie thermische Stabilität und Inaktivierung (u.); angepasst nach Ajinomoto, 2009 [Aji09]

MTG ist kommerziell bei der Ajinomoto Foods Deutschland GmbH unter dem Handelsnamen „ACTIVA[®] WM“ erhältlich und wurde für die Versuche in der vorliegenden Arbeit verwendet. In zahlreichen Studien konnte zudem nachgewiesen werden, dass die mikrobielle Transglutaminase Quervernetzungsreaktionen in den gewählten Modellproteinsystemen in einem sehr zufriedenstellenden Umfang katalysiert und deshalb als Biokatalysator für die Versuche überaus geeignet erscheint [Par07, Sha08, Mar07, Cla07, Tan05, Tan06, Ößz06, Cha06, deK02, Lor98, Lor00, Far97, Non92].

3.2.1.2 Industrielle Anwendungen

Die Quervernetzung von Proteinen durch Transglutaminasen zeigt einen deutlichen Einfluss auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften des jeweiligen Produktes. Die Etablierung zusätzlicher kovalenter Bindungen durch das Enzym erweist sich als vielversprechender Weg zur Verbesserung der funktionalen Eigenschaften und eröffnet vielfältigste Einsatzbereiche in der Lebensmittel-, Textil- und Kosmetikindustrie sowie für medizinisch-pharmazeutische Anwendungen [Arr07, Jar06]. Zu den wichtigsten beeinflussbaren Eigenschaften zählen Löslichkeit, Wasserbindevermögen bzw. Emulgierkapazität, Schäumverhalten, Viskosität, Elastizität und Gelbildungsverhalten, die sich im Detail wie folgt auf die Proteinfunktionalität auswirken [Jar06]:

- Verbesserung der Gelbildungseigenschaften [Zhu08, Jar06, Bön06, Li04, Non92, Sch00],
- Stabilisierung von Emulsionen und Schäumen [Jar06, Li04, Bön06],
- Erhöhung der Viskosität (bei Quervernetzung von Casein oder Molkenproteinen) [Bön06, Lau01, Lor00, Arr07],
- Verbesserung der Hitzestabilität (Molkenproteindenaturierung und Gelatine) [Bön06, Bön04, Jar06],
- Verbesserung von Wasserbindekapazität und pH-Löslichkeit [Bön06, Yil98].

Besonders deutlich wird das biotechnologische Potenzial durch die Vielzahl an Patenten und Veröffentlichungen reflektiert, die diese Enzymgruppe und entsprechende Anwendungsfelder betreffen [Gri02, Nie95]. Erste Bestrebungen für eine industrielle Anwendung von tierischen Transglutaminasen zielten auf die Modifizierung von Proteinen aus dem Lebensmittelsektor ab, um die rheologischen Eigenschaften von Nahrungsmitteln zu modulieren [Mat87, Zhu95]. Erst die Gewinnung von mikrobieller Transglutaminase (MTG) aus dem Stamm *Streptomyces mobaraensis* durch Ando *et al.* führte zu einem Durchbruch, da diese für die großtechnische Nutzung einige wesentliche Vorteile gegenüber den tierischen Varianten besitzen, die sich wie folgt äußern [And89]:

- Ca^{2+} - Unabhängigkeit [Seg02],
- Klein, monomer und stabil [Yok04],
- Deutlich geringere Herstellungskosten [Lu03] und
- Geringe Substratspezifität [Zhu95].

In der Folgezeit nahm die industrielle Nutzung des Enzyms MTG stetig zu und setzte sich dabei besonders für Anwendungen in der Lebensmittelindustrie durch. Dabei stellt die aus *Streptomyces* gewonnene MTG bis heute die einzige kommerziell verfügbare Quelle dar [Arr07].

Anwendungen auf industriellem Niveau sind äußerst vielfältig und bereits durch viele zusammenfassende Veröffentlichungen abgedeckt und erstrecken sich über folgende Bereiche [Arr07, Jar06, Ößz06, Gri02, Mar05, Mot98, Yok04, Kur01]:

- Lebensmittel,
z. B. Fleisch, Fisch, Milchprodukte, Backwaren, Nudeln und Soja-Produkte [Zhu95, Arr07, Mar05, Jar06, Bön07, Mot98, Ößz06, Lau00, Tan06, Mar07, Bön06],
- Medizin und Pharmazie,

- z. B. therapeutischer oder diagnostischer Einsatz als Inhibitoren oder Antikörper, Bestandteil in Blutgerinnungsmitteln und Geweberegeneration [Arr07, Mar05, Zhu08, Yun07, Ber06]
- Textil- und Lederindustrie,
z. B. Biokatalyse bei der Verarbeitung von Wolle, Polymerisation von proteinogenen Füllmaterialien bei der Lederherstellung [Zhu08, Arr07, Mar05],
 - Kosmetikindustrie,
z. B. Schutzschichten für Haut, Haar und Nägel, kovalente Binder für verschiedene Stoffe, wie z. B. antimikrobielle Substanzen, Antioxidantien, Farbstoffe und Parfüm [Arr07, Jar06, Mar05],
 - Kunststoffindustrie,
z. B. zur Eigenschaftsbeeinflussung von biologisch abbaubaren und essbaren Filmen und Kompositen [Mar05, Bae09, Cha06, Szt08, Tan05].

Für diese Arbeit ist die Verwendung der MTG zur gezielten Eigenschaftsbeeinflussung von Biopolymeren, insbesondere von biologisch abbaubaren, essbaren und kompostierbaren Filmen durch die Katalyse einer Proteinquervernetzung der Proteine von besonderer Bedeutung.

3.3 Hilfsstoffe

3.3.1 Lösungsmittel

Als Verarbeitungshilfsstoffe wurden im Wesentlichen zwei Lösungsmittel verwendet, eine Pufferlösung sowie Wasser bzw. destilliertes Wasser.

Als Standardpuffer wurde Tris/HCl-Puffer, 20 mM, pH 7 verwendet. Für die Herstellung von einem Liter Pufferlösung wurden 2,423 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan in ca. 800 mL destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit 4 M HCl auf 7 eingestellt und mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Die Abweichungen im pH-Wert können gerätespezifisch bei maximal $\pm 0,1$ pH-Einheiten liegen.

Für die großtechnischen Versuche wurde ebenfalls der Einsatz von Wasser (Trinkwasserqualität) getestet, um Einfluss auf die Kosten- und Zeiteffizienz sowie auf den apparativen Aufwand zu nehmen. Zudem sollte durch den Verzicht auf Tris dem Gedanken der biologischen Unbedenklichkeit und Essbarkeit der Produkte Rechnung getragen werden.

3.3.2 Weichmacher

3.3.2.1 Glycerin

Als Weichmacher kam unter anderem Glycerin 99,5 % PF, Fa. Caldic zum Einsatz. Glycerin liegt als farblose, viskose und hygroskopische Flüssigkeit vor. Dieser Stoff

ist durch eine Molekülmasse von 92,10 g/mol, die Summenformel $C_3H_8O_3$ und die in [Abb. 3.5](#) dargestellte Strukturformel charakterisiert [Cog07].

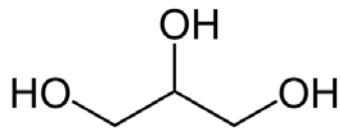


Abb. 3.5: Strukturformel von Glycerin [Han05]

Glycerin hat bei 20 °C eine Dichte von 1,263 g/cm³ und eine Viskosität von 1760 mPa·s. Der Schmelzpunkt liegt bei etwa 18 °C und der Siedepunkt bei 290 °C [Cog07]. Die Glasübergangstemperatur von reinem Glycerin beträgt - 93 °C [Oga00, Che95a].

Glycerin findet unter anderem in der Medizin und der Lebensmittelindustrie Verwendung. Des Weiteren wird es bei der thermoplastischen Verarbeitung von Proteinen eingesetzt [Her08]. Die Eignung von Glycerin als Weichmacher für Biopolymere, insbesondere für proteinbasierte Filme, Folien und Beschichtungen wurde bereits durch Studien mit unterschiedlichen Proteinsystemen nachgewiesen, auf die im [Kapitel 2.3.1.2.2](#) näher eingegangen wurde [Cao09, Par08, Her08, Bou06, Jon06, Aud05, Jan99, Sob02, McH94a, McH94b, Gon93].

3.3.2.2 Polyethylenglykol (PEG)

Polyethylenglykol ist ein chemisch inertes, wasserlösliches und nicht-toxisches Polymer, das je nach Kettenlänge in flüssiger oder fester Form vorliegt. Häufig wird als Abkürzung der Ausdruck PEG oder Macrogol zusammen mit einem Zahlenwert, der die mittlere Molekülmasse angibt, verwendet. Monomere (-CH₂-CH₂-O-) mit einer molaren Masse von 44 g/mol bilden dabei die Grundeinheit der linear aufgebauten PEG-Kette, dessen allgemeine Summenformel $C_2H_6O_2$ als Struktur der [Abb. 3.6](#) zu entnehmen ist [Smo09, Whi00, Cas09].

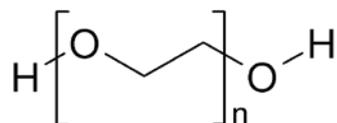


Abb. 3.6: Strukturformel von Polyethylenglykol [Cas09]

PEGs mit geringen molaren Massen zwischen 200 und 600 g/mol liegen als farb- und geruchslose Flüssigkeiten bei Raumtemperatur vor, während molare Massen ab 600 g/mol einen festen Aggregatzustand aufweisen. Flüssige PEGs sind hygroskopisch und vollständig mit Wasser mischbar, während die Löslichkeit mit ansteigendem Molekulargewicht abnimmt [Whi00, Smo09].

Der nicht-flüchtige Charakter, niedrige Toxizitätswerte und der sehr geringe Dampfdruck ($< 10 \text{ Pa}$ bei 20 °C) qualifizieren PEG als Weichmacher für proteinogene Biopolymere. Die Eignung als Weichmacher wurde bereits in einigen Studien im Rahmen der Herstellung von Proteinmaterialien mittels Lösungsmittelverfahren nachgewiesen [Cao09, Jon06, Suy05, diG98, Tan01, Lin03, Wan05, Mez98].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde PEG 300 mit der Bezeichnung LIPOXOL[®] 300, SASOL Germany GmbH, Marl verwendet. Dieses wies gemäß Herstellerangaben eine Dichte von $1,125 \text{ g/cm}^3$ und eine dynamische Viskosität von $80 - 105 \text{ mPa s}$ bei 20 °C auf.

3.3.3 Additive

Für die gezielte Modifikation von Proteinmaterialien wurden die kristallinen Substanzen Kaliumnitrat, Harnstoff und Ammoniumsulfat verwendet, deren Stoffdaten aus der Tab. 3.2 hervorgehen.

Tab. 3.2: Stoffdaten ausgewählter kristalliner Additive [Rot09, Rot09a, Mer06]

Stoffdaten	Einheit	Materialien		
		Kaliumnitrat	Harnstoff	Ammoniumsulfat
Hersteller	-	Carl Roth GmbH & Co. KG	Carl Roth GmbH & Co. KG	Merck KGaA
Summenformel	-	KNO_3	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	$\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$
CAS-Nummer	-	7757-79-1	57-13-6	7783-20-2
Molare Masse	g/mol	101,11	60,06	132,14
Dichte (20°C)	g/cm ³	2,11	1,323	1,77
Schmelzpunkt	°C	334	132 - 134*	235 - 280*
Löslichkeit (20 °C , Wasser)	g/L	320	1000	754

* Zersetzung

Die gewählten Additive sind hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Kristallisationsparameter gut erforscht, weisen eine hohe Verfügbarkeit auf und werden zudem als wichtige Düngemittelzusätze in der Praxis eingesetzt [Fre05, Lau00a, Kon05, Wes03].

4 Versuchsdurchführung

4.1 Folienherstellung

4.1.1 Gießverfahren

In Anlehnung an bekannte Verfahrensweisen für die Herstellung proteinogener Filme und Folien im Lösungsmittelverfahren (siehe [Kapitel 2.2.2](#)) wurde im Folgenden eine modifizierte Variante entwickelt, die für die Herstellung von Proteinfolien im Labormaßstab geeignet ist [Cha06, Oh04, Kes86, Bou08, Bya07, Tan05]. Der sog. Gießprozess stellt ein etabliertes Verfahren dar, dessen Prozessschritte in Form eines allgemeinen Fließschemas der [Abb. 4.1](#) zu entnehmen sind.

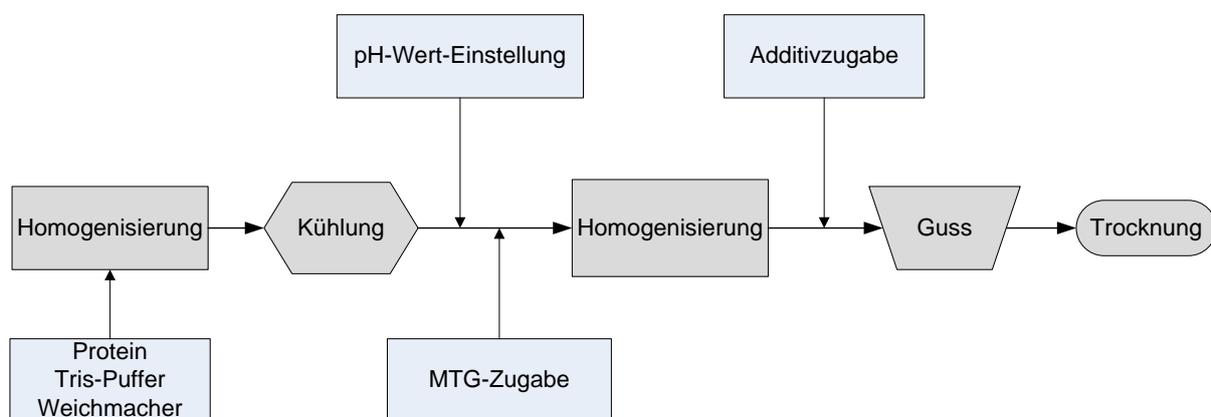


Abb. 4.1: Allgemeines Fließschema für die Folienherstellung im Gießverfahren

Zunächst erfolgte die Erstellung eines Gemisches aus 6 g des jeweiligen Proteins, 3 g Weichmacher (Glycerin oder PEG 300) und 110,4 g Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7) als Kernkomponenten einer filmbildenden Lösung. Im Anschluss daran wurde dieses Gemisch für 30 min bei 90 °C im Wasserbad erhitzt und homogenisiert. Die resultierende Proteinlösung wurde auf Raumtemperatur ohne Zuführung von Kühlenergie abgekühlt und mittels 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7 eingestellt. Im Falle der Integration einer enzymatisch katalysierten Proteinquervernetzungsreaktion in den Gießprozess wurde die Proteinlösung im Anschluss für 30 min im Wasserbad auf 50 °C erwärmt. Die Zugabe des Enzyms MTG erfolgte in vorgelöster Form. Dazu wurden 1,5 g MTG in 6 mL Tris-Puffer (pH 7, 50 °C) gelöst, der Proteinlösung zugesetzt und entsprechend homogenisiert. Zu diesem Zeitpunkt können je nach beschriebener Prozessführung zwei verschiedene Proteinlösungen vorliegen, eine ohne Zusatz von MTG und das reaktive Pendant, die Lösung mit dem Enzym MTG. Der nächste Schritt war durch die Zugabe von Additiven charakterisiert, die als kristalline Feststoffe der jeweiligen Proteinlösung in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt und erneut unter Rühren in Lösung überführt wurden. Vor dem nächsten Prozessschritt, dem Foliengießen, galt es mögliche Luftblasen bzw. Schaum manuell aus der Proteinlösung zu entfernen. Diese wurde im Anschluss in eine PTFE-Form

mit den Abmessungen 200 x 200 mm gegossen und für 48 h bei 23 ± 2 °C unter einem Abzug getrocknet. Im Anschluss an die Trocknungsphase erfolgte die Entnahme der Proteinfolien, die abschließend für 48 h in einem Exsikkator bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF über einer gesättigten Calciumnitrat-Lösung konditioniert wurden.

4.1.2 Extrusion

4.1.2.1 Materialien

An der kontinuierlichen extruderbasierten Verarbeitung von Proteinen zu Filmen bzw. Folien waren im Wesentlichen drei funktionale Komponenten beteiligt.

Das filmbildende Material, die Proteine, lagen in Pulverform vor und konnten ohne Vorbehandlungsaufwand für eine Extrusion genutzt werden. Hinzu kamen die Verarbeitungshilfsstoffe Weichmacher und Lösungsmittel, die in flüssiger Form vorlagen. Der Weichmacher (Glycerin oder PEG 300) wurde mit dem Lösungsmittel (Tris-Puffer oder Wasser) in einem gewünschten Verhältnis gemischt und in einen Behälter abgefüllt. Für die Integration einer reaktiven Komponente in den Extrusionsprozess kam das Enzym mikrobielle Transglutaminase (MTG) zum Einsatz. Dieses wurde in Vorbereitung auf den Extrusionsprozess in dem beschriebenen Flüssigkeitsgemisch aus Weichmacher und Lösungsmittel vorgelöst. Damit ergab sich die Notwendigkeit zwei Zuführungssysteme in den Extrusionsprozess zu integrieren, dessen Ablauf nachstehend beschrieben wird.

4.1.2.2 Versuchsanlagen und -durchführung

Die Untersuchungen zur kontinuierlichen Verarbeitung von Proteinen erfolgten an zwei verschiedenen Versuchsanlagen. Dabei kamen jeweils Extruder mit gleichsinnig drehenden und dicht kämmenden Doppelwellenschnecken zum Einsatz. Die nachfolgend beschriebenen Anlagen- und Prozessparameter sind das Ergebnis zahlreicher Voruntersuchungen und Testläufe, aus denen keine verwertbaren Daten gewonnen werden konnten und beinhalten damit bereits zwangsläufig Optimierungsansätze, die Bestandteil der Diskussion in dieser Arbeit sind. Die technischen Spezifikationen der Versuchsanlagen können der Tab. 4.1 entnommen werden.

Tab. 4.1: Technische Spezifikationen der Extruder mit Antriebseinheit

Extruder	PolyLab OS PTW 24/40	ZE25A-UTXx48D-UG
Technische Spezifikationen	Fa. Thermo Electron	Fa. Krauss Maffei Berstoff
Schneckenlänge	L/D=40:1	L/D=48:1
Schneckendurchmesser	24 mm	25 mm
Schneckenkonfiguration	Variabel	Variabel
Max. Schneckendrehzahl	1100 min ⁻¹	1200 min ⁻¹
Max. Temperatur	350 °C	420 °C
Max. Druck	100 bar	250 bar
Getriebedrehmoment	180 Nm	2 x 103 Nm
Temperierzonen	10	11
Kühlung	Interner Wasserkreislauf	-
Zusätzliche Zuführungs- und Entlüftungsoption	2 oben, 2 seitlich	2 oben, 2 seitlich
Antriebsleistung	16 kW	26 kW
Motordrehmoment	440 Nm	2 x 103 Nm

Im Rahmen einer Machbarkeitsstudie wurden zunächst Versuche auf dem Modellextruder „Haake PolyLab OS PTW 24/40“ in Verbindung mit einem Haake „PolyLab OS RheoDrive 16“ als Antriebseinheit gefahren. Anlagen- und Prozessspezifika dieses Extrusionssystems, welches vereinfacht als „Extruder A“ in weiteren Ausführungen bezeichnet wird, findet nachfolgend eine Detailbeschreibung.

4.1.2.2.1 Extruder A – Haake PolyLab OS PTW 24/40

Initiale Versuche einer kontinuierlichen Verarbeitung von Proteinen zu Folien bzw. Filmen wurden mithilfe des Modellextruders Haake PolyLab OS PTW 24/40 (Fa. Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Die entsprechende Versuchsanlage, bestehend aus Extruder-, Antriebs- und Steuereinheit wurde in [Abb. 4.2](#) veranschaulicht.



Abb. 4.2: Modellextruder Haake PolyLab OS PTW 24/40 (Extruder A) mit Antriebseinheit PolyLab OS RheoDrive 16

Der Extruder besaß 10 einzeln temperierbare Zonen, jeweils zwei Zonen davon mit der Option einer Zuführung von oben und von der Seite sowie zwei mögliche Entlüftungszonen. Die Zonen werden im Folgenden fortlaufend nummeriert beginnend mit der Zone am Extrudereinzug bis zum Extruderausgang.

Die Schneckenkonfiguration bestand aus Förder- und Knetelementen, die variabel zu einem geeigneten geometrischen Profil angeordnet wurden. Förderneutrale Knetscheiben, die zueinander einen Versatz von 180° aufwiesen kamen in den Zonen 4 und 7 zum Einsatz. Darüber hinaus wurde in Zone 9 eine Entlüftungsöffnung angebracht. Daraus resultierte die Festlegung der Schneckenengeometrie, wie in [Abb. 4.3](#) dargestellt.

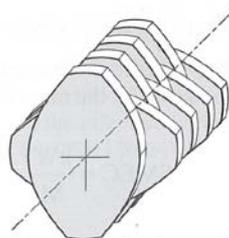
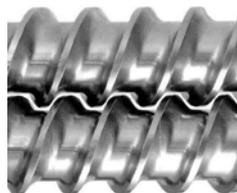


Abb. 4.3: Schneckenengeometrie des Extruders Haake PolyLab OS PTW 24/40 (links) mit Förderelementen (rechts oben) und Knetelementen (rechts unten) [Rau01a]

Für die Zuführung der Rohstoffe kamen zwei Zuführungssysteme zum Einsatz. Die Zudosierung der Proteine erfolgte über einen gravimetrischen Feeder (Brabender GmbH & Co. KG, Duisburg) gemäß [Abb. 4.4](#) (links) in der Extrudereinzugszone 1.



Abb. 4.4: Extruderzuführungssysteme bestehend aus einem gravimetrischen Feststofffeeder mit Trichterzuführung (links) und einer volumetrischen Flüssigkeitspumpe (rechts)

Eine volumetrische Pumpe (Fluke Deutschland GmbH, Kassel, Dosiergenauigkeit $\pm 1\%$) übernahm die Zuführung der flüssigen Komponenten, die der Extruderzone 3 entsprechend [Abb. 4.4](#) (rechts) zugesetzt wurden.

Die Formgebung des Extrudates erfolgte über eine Schlitzdüse (bzw. Film- und Banddüse) mit den Abmessungen des Düsenausgangs von 10 x 100 mm (Höhe x Breite) deren Geometrie schematisch und fotografisch in [Abb. 4.5](#) dargestellt wurde.

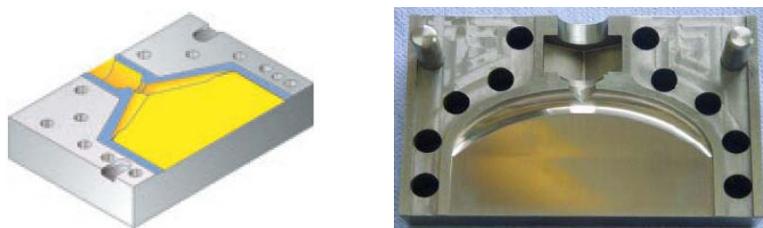


Abb. 4.5: Film- und Banddüse (Innenansicht), schematisch (links), Lichtbildaufnahme (rechts)

Abschließend wurde mithilfe einer Film- und Bandabzugseinheit (Thermo Electron GmbH, Karlsruhe) die extrudierte Folie in ein temperierbares Walzensystem (Kalandrier) überführt. Dieses bestand, wie in [Abb. 4.6](#) erkennbar, aus zwei mittels Thermostat temperierbarer Edelstahlwalzen sowie einer gummierten Transport- und Aufwickelwalze.



Abb. 4.6: Automatisiertes Folien- und Bandabzugssystem im laufenden Betrieb beim Abzug und Aufwickeln einer NaCas-Folie

Die Proteinfolie konnte als Endprodukt in Form einer Folienrolle entnommen und entsprechenden Testverfahren zugeführt werden.

4.1.2.2.2 Extruder B – ZE25A-UTXx48D-UG

Weiterführende Versuche für die Entwicklung eines extruderbasierenden Herstellungsverfahrens proteinogener Produkte wurden mit dem Extruder ZE25A-UTXx48D-UG (Krauss Maffei Berstorff GmbH, Hannover) durchgeführt. Dieser ist als Bestandteil des Extrusionssystems in [Abb. 4.7](#) dargestellt.



Abb. 4.7: Extrudersystem ZE25A-UTXx48D-UG (Extruder B) mit Antriebs- und Steuereinheit

Der Extruder zeichnet sich durch 11 einzeln temperierbare Zonen aus und besitzt zwei Entlüftungsöffnungen, die zur Vakuumentgasung in den Zonen 7 und 9 genutzt wurden. Die jeweilige Anordnung der Schneckenelemente sowie der Zu- und Abführungseinrichtungen kann der Abb. 4.8 entnommen werden.

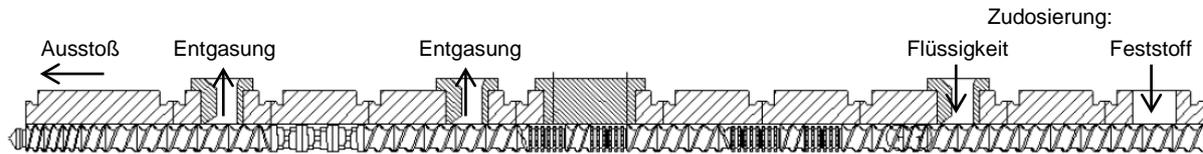


Abb. 4.8: Schneckenkonfiguration mit Anordnung der Zu- und Abführungssysteme

Die Schneckenkonfiguration bestand neben den standardmäßigen Fördererelementen aus Rückförder-, Misch- und Knetelementen, die in Abb. 4.9 dargestellt sind.



Abb. 4.9: Förder-, Rückförder-, Misch- und Knetelemente (v. l. n. r.)

Für die Zuführung der Rohstoffe standen sowohl gravimetrische als auch volumetrische Feeder zur Verfügung, wobei die Zugabe der pulverförmigen Proteine in der ersten Zone des Extruders erfolgte und hierbei ein gravimetrischer Doppelschneckenfeeder (K-TRON Deutschland GmbH, Gelnhausen) zum Einsatz kam. Die Zufuhr der flüssigen Komponenten wurde in der dritten Zone vorgenommen und mittels einer volumetrischen Pumpe (NETZSCH Mohnopumpen GmbH, Waldkraiburg, Dosiergenauigkeit $\pm 1\%$) realisiert. Abb. 4.10 zeigt die verwendeten Feedsysteme.

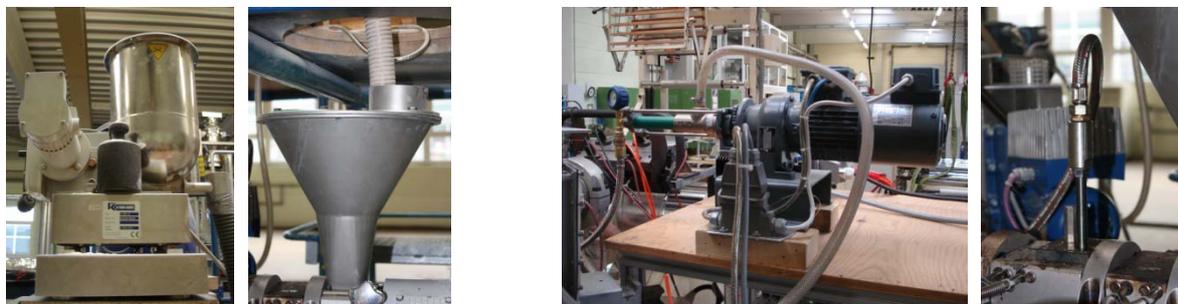


Abb. 4.10: Gravimetrischer Feststofffeeder mit Trichterzuführung (links) und volumetrische Pumpe mit Dosiervorrichtung (rechts)

Dem Extruder wurde zwischen Extruderausgang und Düseneingang eine Zahnradpumpe (Maag Pump Systems, Zürich, Schweiz) zwischengeschaltet. Die Form-

gebung wurde durch eine Breitschlitzdüse der Breite 400 mm und einer maximalen Öffnung von 2 mm umgesetzt, deren Aufbau in Abb. 4.11 ersichtlich ist.



Abb. 4.11: Filmdüse im laufenden Betrieb (links) und in geöffneter Ansicht (rechts)

Abschließend erfolgte der Folienabzug über einen temperierbaren 2-Walzenkalandar mit einer monoaxialen Reckeinheit mit der Bezeichnung DAVO VISKOSYSTEM (Reifenhäuser EXTRUSION GmbH & Co. KG, Troisdorf), der die Folie über zwei temperierbare Transportwalzen auf eine Aufwickelwalze führte. Die beschriebene Anlage ist als Einheit der Abb. 4.12 zu entnehmen.



Abb. 4.12: Automatisiertes Film- und Bandabzugssystem mit 2-Walzenkalandar zum Folienabzug sowie Transport- und Aufwickelsystem

Über das automatisierte Filmabzugssystem wurden die post-extrudalen Prozesse Folienabzug, Kühlung, Transport und Aufwicklung automatisiert und erlaubten die Entnahme einer Folienrolle als Endprodukt.

4.1.2.3 Prozessführung

Aufgrund unterschiedlicher technischer Spezifikationen, die der Tab. 4.1 entnommen werden können, ist zunächst eine Unterteilung der durchgeführten Versuche nach dem verwendeten Extrudersystem erforderlich.

Extruder A:

Die Experimente unter Nutzung des Extruders Haake PolyLab OS PTW 24/40 wurden mit dem Modellprotein Natrium-Caseinat (NaCas) durchgeführt. Zu Beginn der

Extrusion wurde zunächst der Flüssigkeitsstrom in Zone 2 vorgelegt. Kurz darauf wurde mit einem gravimetrischen Feeder der Feststoff in Zone 1 dem Extruder zugeführt. Tab. 4.2 repräsentiert eine Auswahl an Versuchen, die sich in Hinblick auf eine thermoplastische Verarbeitung und eine entsprechende Formgebung als geeignet erwiesen.

Tab. 4.2: Prozessparameter der Versuchsdurchführung an Extruder A

Nr.	Feststoffe		Flüssigkeiten		Temperatur	Drehzahl	Durchsatz	Bemerkungen
	NaCas	MTG	Tris-Puffer	Glycerin	T _{Düse}	n		
[-]	[Gew.%]	[Gew.%]	[Gew.%]	[Gew.%]	[°C]	[1/min]	[kg/h]	[-]
1	40	-	40	20	90	100	4	-
2	40	-	40	20	70	100	4	-
3	40	-	40	20	50	100	4	-
4	50	-	32,5	17,5	70	100	4	-
5	50	-	32,5	17,5	50	100	4	-
6	40	6	34	20	50	100	4	-
7	40	6	34	20	50	100	4	ohne Düse

Bei Versuch Nr. 1 betrug das Verhältnis von Feststoff zu Flüssigkeit 2:3, wobei innerhalb der Flüssigkomponenten ein Verhältnis von Glycerin zu Tris-Puffer von 1:2 eingestellt wurde. Im Versuch Nr. 2 erfolgte während der laufenden Extrusion eine Reduzierung der Temperatur, gemessen in der Düse, von 90 auf 70 °C, gefolgt von einer weiteren Absenkung auf 50 °C repräsentiert durch den Versuch 3.

Der Versuch Nr. 4 war im Wesentlichen durch die Erhöhung der Feststoffkonzentration auf ein Verhältnis von fester zu flüssiger Phase von 1:1 gekennzeichnet, wobei die Temperatur mit 70 °C konstant gehalten wurde. Zur Vorbereitung auf eine reaktive Extrusion wurde im Versuch Nr. 5 die Temperatur bis auf 50 °C abgesenkt.

In den Versuchen Nr. 6 und 7 wurden zusätzlich jeweils 6 Gew.% MTG, vorgelöst in dem Flüssigkeitsgemisch, hinzugegeben, um eine Proteinquervernetzung innerhalb des Extruders zu erreichen. Die enzymatische Aktivität betrug damit 15 U/g NaCas. Das Temperaturniveau wurde auf 50 °C gesenkt und der Proteinanteil wieder auf 40 Gew.% eingestellt.

Alle Versuche wurden mit einer Extruderdrehzahl von 100 U/min und einem Gesamtdurchsatz von 4 kg/h gefahren. Im Rahmen einer Strangextrusion wurde im Versuch 6 die Düse entfernt.

Extruder B:

Unter Berücksichtigung der Vorversuche mit Extruder A in Kombination mit den unterschiedlichen technischen Parametern von Extruder B ergab sich eine veränderte

Prozessführung, deren relevanten Ausprägungen in Tab. 4.3 zusammengefasst wurden. Die dargestellten Versuche beziehen sich zunächst auf das Modellproteinsystem NaCas, wobei die Bezeichnung „C“ für das Modellprotein Natrium-Caseinat, die Nummerierung für die entsprechende Versuchsnummer und die jeweilige Indizierung „L“ bzw. „Q“ für längs bzw. quer zur Extrusionsrichtung entnommene Proben stehen. Im Wesentlichen wurden bei den durchgeführten Versuchen die Stoffkonzentration, das Temperaturprofil und die Drehzahl variiert sowie eine enzymatisch katalysierte Proteinquervernetzung in den Extrusionsprozess integriert. Des Weiteren wurde eine Beschichtung (Indizierung mit „B“) mit NaCas-Pulver als Nachbehandlungsschritt getestet.

Tab. 4.3: Prozessparameter der Versuchsdurchführung an Extruder B mit dem Modellprotein NaCas

Nr.	Feststoffe					Flüssigkeiten				Durchsatz	Temperatur			Drehzahl		
	Protein		MTG			Tris-Puffer		Glycerin			T _z				T _D	T _S
[-]	[Gew. %]	[kg/h]	[Gew. %]	[U/g Protein]	[kg/h]	[Gew. %]	[kg/h]	[Gew. %]	[kg/h]	[kg/h]	[°C]			[°C]	[°C]	[1/min]
C01-L	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-70-70-70-70-75-75	75	72	285		
C01-Q	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-70-70-70-70-75-75	75	72	285		
C02-L	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-70-70-70-70-75-75	75	74	285		
C02-Q	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-70-70-70-70-75-75	75	74	285		
C02-L-2	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	65	285		
C02-Q-2	50,00	5	0	0	0	33,33	3,33	16,67	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	65	285		
C03-L	50,00	5	0	0	0	25,00	2,50	25,00	2,50	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	65	180		
C03-Q	50,00	5	0	0	0	25,00	2,50	25,00	2,50	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	65	180		
C04-L	48,78	5	2,44	5	0,25	32,52	3,33	16,26	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C04-Q	48,78	5	2,44	5	0,25	32,52	3,33	16,26	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C04-L-B	48,78	5	2,44	5	0,25	32,52	3,33	16,26	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C04-Q-B	48,78	5	2,44	5	0,25	32,52	3,33	16,26	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C05-L	47,62	5	4,76	10	0,50	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C05-Q	47,62	5	4,76	10	0,50	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C06-L	46,51	5	6,98	15	0,75	31,01	3,33	15,50	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C06-Q	46,51	5	6,98	15	0,75	31,01	3,33	15,50	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	63	285		
C07	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	160		
C08	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	180		
C09	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	200		
C10	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	220		
C11	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	240		
C12	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	260		
C13	47,62	5	4,76	10	0,5	31,75	3,33	15,87	1,67	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	50	55	280		
C14-L	47,62	5	4,76	10	0,5	23,81	2,50	23,81	2,50	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	58	180		
C14-Q	47,62	5	4,76	10	0,5	23,81	2,50	23,81	2,50	10	30-50-50-50-50-50-50-50-50-50	75	58	180		

Zur Durchführung der dargestellten Experimente wurden für die Versuche C01 und C02 jeweils 5 kg/h NaCas dem Extruder in Zone 1 zudosiert. Für den Versuch Nr. C01 wurde der Flüssigkeitsstrom bestehend aus einem Gemisch Glycerin – Tris-Puffer mit dem Verhältnis 1:2 in die Extruderzone 2 mit einem Massenstrom von 5 kg/h zugegeben. In Vorbereitung auf Versuch C02 und fortfolgende, wurde die Flüssigdosierung von Zone 2 in Zone 3 verlagert. Darüber hinaus fand eine Reduzierung der Düsentemperatur T_D auf 50 °C im Versuch C02-L/Q-2 statt.

Der Versuch C03 war im Wesentlichen durch die Erhöhung des Glycerinanteils in der Flüssigkeit auf ein Verhältnis Glycerin zu Tris-Puffer von 1:1, der Erhöhung der Düsentemperatur von 50 auf 75 °C sowie einer Herabsetzung der Drehzahl von 285 auf 180 min^{-1} gekennzeichnet.

In den darauf folgenden Versuchen wurden zur Katalyse einer Quervernetzung innerhalb des Extruders zusätzlich das Enzym MTG in der Flüssigkeit vorgelöst und Glycerin-Tris-Puffer-Verhältnis von 1:2 gewählt. Die Drehzahl stieg zudem von 180 auf 285 min^{-1} . In den Versuchen C04 bis C06 fand eine schrittweise Erhöhung der Enzymaktivität von 5 auf 10 U/g NaCas sowie auf 15 U/g NaCas statt. Bei Versuch C04-B wurden die extrudierten Folien zudem post-extrudal mit pulverförmigen NaCas durch ein Streuverfahren beschichtet. Im Anschluss daran wurden die Drehzahl zunächst auf 160 min^{-1} und die Düsentemperatur wieder auf 50 °C verringert.

Die Versuche C07 bis C13 waren durch eine schrittweise Erhöhung der Drehzahl auf 160, 180, 200, 220, 240, 260 und 280 min^{-1} bei einer konstanten Enzymaktivität von 10 U/g NaCas sowie konstanter Zusammensetzung und einem einheitlichen Temperaturprofil charakterisiert. Im Versuch C14 wurden entsprechende Anpassungen wie folgt vorgenommen: Glycerin/Tris-Puffer 1:1, Enzymaktivität 10 U/g NaCas, Düsentemperatur 75 °C und Drehzahl 180 min^{-1} .

Angelehnt an die oben stehende Versuchsbeschreibung wurden nachfolgend Versuche mit Erbsenprotein-Isolat (fortführend vereinfacht als Erbse bezeichnet) gefahren. Die Bezeichnung der in [Tab. 4.4](#) dargestellten Versuche erfolge in Anlehnung an das Proteinsystem Erbse mit einem „E“ und entsprechender Nummerierung.

Tab. 4.4: Prozessparameter der Versuchsdurchführung an Extruder B mit dem Modellprotein Erbse

Nr.	Feststoffe		Flüssigkeiten		Temperatur	Drehzahl	Durchsatz	Bemerkungen
	NaCas	MTG	Tris-Puffer	Glycerin	$T_{Düse}$	n		
[-]	[Gew.%]	[Gew.%]	[Gew.%]	[Gew.%]	[°C]	[1/min]	[kg/h]	[-]
E01	50	-	25	25	70	285	10	ohne Düse
E02	50	-	25	25	90	285	10	ohne Düse
E03	50	-	25	25	100	180	10	ohne Düse
E04	50	-	33,33	16,67	70	180	10	ohne Düse
E05	50	-	33,33	16,67	50	160	10	ohne Düse
E06	50	-	25	25	50	160	10	ohne Düse

Bevorzugt wurden die Prozessgrößen Temperatur und Drehzahl sowie das Konzentrationsverhältnis der Flüssigkomponenten variiert. Die technischen Spezifikationen und die Schneckenkonfiguration blieben im Vergleich zu den Experimenten mit dem Protein NaCas an Extruder B unverändert.

4.2 Modifikation

4.2.1 Weichmacher

Dem Einsatz von Weichmachern in Proteinsystemen kommt neben der Beeinflussung entsprechender Endprodukteigenschaften, vor allem bei der thermoplastischen Verarbeitung von Proteinen eine entscheidende Rolle zuteil, die ausführlich in den [Kapiteln 2.2.3](#) sowie [2.3.1.2.2](#) beschrieben wurde.

Bei der Versuchsdurchführung sollen aus diesen Gründen Einflüsse von Weichmachertyp und Konzentration auf wesentliche Prozessgrößen und Endprodukteigenschaften untersucht und mithilfe statistischer Methoden beurteilt werden. Konkretisiert werden die Experimente durch die Variation der weichmachenden Substanz zwischen Glycerin und PEG 300 sowie einer konzentrationsabhängigen Beziehung des Weichmachers auf die mechanischen Eigenschaften. Darüber hinaus wird erstmalig der Wechselwirkungseinfluss kristalliner Substanzen und Weichmacherkonzentration in proteinogenen Materialien untersucht und evaluiert. Eine Substitution des verwendeten Lösungsmittels Tris-Puffer mit Wasser soll abschließend mögliche Einflüsse auf den Extrusionsprozess und die funktionalen Produkteigenschaften aufzeigen.

4.2.2 Enzymatische Quervernetzung

Es ist hinlänglich bekannt und beschrieben, dass eine enzymatische Proteinquervernetzung die funktionale Charakteristik proteinogener Materialien entscheidend manipulieren kann. Dazu zählen im Wesentlichen die Eigenschaften Löslichkeit, Wasserbindevermögen, Viskosität und Elastizität [Jar06, Zhu08, Tre07, Li04]. Andererseits existieren bisher keine Informationen über das Reaktionsverhalten in hochviskosen Medien unter Druck-, Temperatur- und Scherbeanspruchung und den Einfluss auf den Herstellungsprozess sowie auf die finalen Produkteigenschaften im Rahmen einer thermoplastischen Verarbeitung.

Aus diesen Gründen soll der Einfluss einer enzymatisch katalysierten Quervernetzungsreaktion mithilfe des Enzyms MTG auf die Verarbeitungs- und Produktparameter des Extrusionsprozesses untersucht und einer vergleichenden Analyse mit den Resultaten aus den Lösungsmittelverfahren unterzogen werden. Die verfahrenstechnische Umsetzung erfolgte zum einen durch die Integration der reaktiven Komponente in den Gießprozess, wie in [Kapitel 4.1.1](#) beschrieben. Zum anderen wurde der Einfluss des Enzyms in verschiedenen Konzentrationen und damit mit unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten von 5, 10 und 15 U/g Protein durch die Zugabe in den lau-

fenden Extrusionsprozess untersucht. Detailinformation dazu können den [Kapiteln 4.1.2.2](#) und [4.1.2.3](#) entnommen werden.

Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte hinsichtlich des Vernetzungsgrades der Endprodukte mittels SDS-PAGE, dem Einfluss auf die Prozessführung und auf relevante Prozessgrößen, der Formgebung des Produktes sowie optischer und physikalischer Endprodukteigenschaften.

4.2.3 Kristallisation

Der gezielte Einbau kristalliner Substanzen in proteinogene Filme und Folien wurde in Anlehnung an das in Kapitel 4.1.1 beschriebene Gießverfahren experimentell umgesetzt. Dazu erfolgte die Zugabe kristalliner Feststoffe als Additive analog dem vorgestellten Prozessschema unmittelbar nach der Homogenisierung der filmbildenden Proteinlösung. Als Modellsubstanzen zur experimentellen und analytischen Untersuchung des Einflusses kristalliner Additive wurden Kaliumnitrat, Harnstoff und Ammoniumsulfat gewählt. Diese wurden jeweils in festen Verhältnissen zum gewählten Modellprotein der Proteinlösung zugegeben und 10 min unter Rühren homogenisiert. Die weiteren Prozessschritte Foliengießen, Trocknen, Entfernen aus den Folienrahmen und Konditionierung erfolgten analog dem vorgestellten Gießverfahren. Die genaue Zusammensetzung der Proteinlösung kann der Tab. 10.3 im Anhang entnommen werden. Durch die Abführung des Lösungsmittels im Rahmen der Trocknung und der entsprechenden Übersättigung der Lösung fand eine Keimbildung mit anschließendem Kristallwachstum statt.

Die hergestellten kristallinen Folien besaßen nach der Trocknung die in [Abb. 4.13](#) dargestellte Zusammensetzung und basierten auf den Proteinen Natrium-Caseinat oder Gelatine.

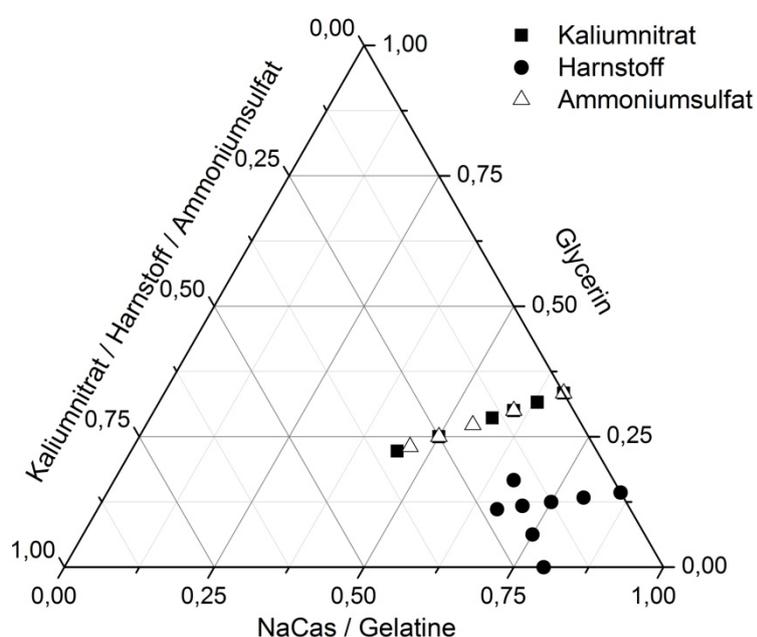


Abb. 4.13: Ternärdiagramm der Folienzusammensetzung nach der Trocknung

Der Anteil der kristallinen Additive betrug substanzabhängig zwischen 5 und 33 Gew.% bezogen auf die Trockenmasse der Folie. Dabei wurden zunächst im Rahmen einer Machbarkeitsstudie die Konzentrationsgrenzen der kristallinen Additive ermittelt, deren stoffspezifischen Auswirkungen auf das Proteinsystem berücksichtigt (z. B. ein weichmachender Einfluss) und Optimierungsbestrebungen hinsichtlich der mechanischen Leistungsfähigkeit betrieben.

4.3 Analytik

4.3.1 Äußere Merkmale

Die Analyse der äußeren Merkmale der hergestellten Produkte erfolgte sowohl subjektiv im Rahmen der Bestimmung organoleptischer bzw. sensorischer Eigenschaften als auch durch objektive Messverfahren.

Für die Einschätzung der optischen Eigenschaften wurden die Proben nach qualitativen und funktionalen Gesichtspunkten charakterisiert. Dazu zählen hauptsächlich Integrität, Homogenität, Oberflächenbeschaffenheit, Farbgebung und Geruch, die in Form eines traditionellen Benotungssystems einer Beurteilung zugeführt wurden. Die Bestimmung der Produktgeometrie erfolgte über Messverfahren. Für die Ermittlung der Foliendicken wurde ein Mikrometer eingesetzt. Alle Messergebnisse unterlagen einer Mehrfachbestimmung und wurden als arithmetisches Mittel angegeben, das die Berechnungsgrundlage für ausgewählte Kenngrößen darstellt.

4.3.2 Mechanische Produkteigenschaften

Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften erfolgte im Zugversuch entsprechend DIN EN ISO 527-3 unter Nutzung der Materialprüfmaschine BDO-FB0.5TH, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm in Verbindung mit der Software TestXpert II, Version 1.42 zur Berechnung und grafischen Auswertung der Ergebnisse.

Vor der Durchführung des Zugversuches wurden die zu prüfenden Proben 48 h bei 23 ± 2 °C und 50 ± 3 % rLF in einem Exsikkator über gesättigter Calciumnitratlösung konditioniert. Die Präparation der Probestreifen in normgerechte Dimensionen erfolgte mithilfe eines Rollenschneiders entsprechend Tab. 4.5. Durch eine Dreifachmessung mittels Mikrometerschraube wurde die Dicke der Probestreifen bestimmt und das arithmetische Mittel gebildet. Die zu vermessende Probe wurde mittels pneumatischer Spannklemmen in den Einspannköpfen der Prüfmaschine befestigt und anschließend mit den in Tab. 4.5 dargestellten Parametern bis zum Bruch belastet.

Tab. 4.5: Parameter der Prüfmaschine und der Probendimensionen für den Zugversuch gemäß DIN EN ISO 527-3

Parameter der Prüfmaschine	Wert	Einheit
Vorkraft	0,1	N mm ⁻²
Prüfgeschwindigkeit	50	mm min ⁻¹
Geschwindigkeit Zugmodul	1	mm min ⁻¹
Einspannlänge bei Startposition	100	mm
Parameter des Probestreifens		
Breite	15	mm
Länge	100	mm

Die durch den Antrieb erzeugten Kräfte wurden über die Einspannvorrichtung auf die Probe übertragen. Über eine massenträgheitsfreie Kraftmesseinrichtung wurde die auf den gehaltenen Probekörper einwirkende Zugkraft mit einer gerätespezifischen Unsicherheit < 1 % ermittelt. Die Längenänderungsmesseinrichtung konnte automatisiert die Änderung der Messlänge am Probekörper zu jedem Zeitpunkt während der Prüfung bestimmen. Die dabei auftretenden Messfehler lagen entsprechend der Vorschrift ebenfalls unter 1 %. Für jede verlangte Prüfrichtung wurden im Rahmen einer ausreichenden statistischen Absicherung mindestens 5 Probekörper geprüft. Daraufhin konnten der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt werden. Die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul erfolgte analog der Berechnungsvorschriften in [Kapitel 2.4.2](#), die anschließend grafisch aufbereitet wurden.

4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Nachweis einer enzymatisch katalysierten Proteinquervernetzung des Extrudates erfolgte zum einen wie beschrieben durch den Einfluss auf Prozessgrößen, wie beispielsweise der Veränderung der Viskosität der Proteinmasse und damit den Druck- und Drehmomentenverhältnissen im Extruder. Zum anderen bestand die Notwendigkeit, extrudierte Produkte über den Grad der Proteinquervernetzung zu charakterisieren und darüber Rückschlüsse auf Umfang, Geschwindigkeit und Effizienz der Reaktion zu ziehen. Zu diesem Zwecke wurde mithilfe der SDS-PAGE die Molekulargewichtsverteilung des extrudierten Proteinsystems wie folgt analysiert.

In einem ersten Schritt erfolgte die Herstellung der für die SDS-PAGE erforderlichen Trenn- und Sammelgele, deren Zusammensetzung aus [Tab. 4.6](#) hervorgeht.

Tab. 4.6: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele nach Laemmli, Dicke 1 mm [Lae70]

	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	3,0 mL
TEMED	10 μ L	10 μ L
gesättigtes APS	20 μ L	8 μ L

Der Trenngelpuffer bestand aus 18,18 g Tris, 2 mL 20 % w/v SDS-Lösung, 100 μ L 10 % w/v Natriumazid-Lösung und destilliertem Wasser (auf 80 mL aufgefüllt). Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,8 eingestellt und danach mit destilliertem Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Der Sammelgelpuffer war wie folgt zusammengesetzt: 6,06 g Tris, 2 mL 20 %ige (w/v) SDS-Lösung, 100 μ L 10 %ige (w/v) Natriumazid-Lösung und wurde zunächst mit destilliertem Wasser auf 70 mL aufgefüllt. Nach der pH-Wert-Einstellung auf 6,8 mit HCl erfolgte die Auffüllung mit destilliertem Wasser auf 100 mL. Die 30 %ige Acryl/Bisacrylamid-Lösung wurde aus 29,1 g Acrylamid und 0,9 g Bisacrylamid hergestellt. Nach dem Lösen in destilliertem Wasser wurde mit dem gleichen auf 100 mL aufgefüllt. Zur Herstellung der gesättigten APS-Lösung wurde Ammoniumperoxodisulfat (APS) in destilliertem Wasser gelöst, sodass sich noch ungelöstes APS am Boden befand. Der verwendete Kathodenpuffer (10-fach konzentriert) enthielt pro Liter 30,28 g Tris, 144 g Glycin, 50 mL 20 %ige (w/v) SDS-Lösung und 1 mL 10 %ige (w/v) Natriumazid-Lösung.

Der Probenpuffer wurde aus 2,72 g Tris, 3 mL 3 M HCl, 25 mL 20 %ige (w/v) SDS-Lösung, 50 mg Bromphenolblau und 50 g Glycerin gewonnen. Nach dem Lösen in destilliertem Wasser erfolgte die pH-Wert-Einstellung mittels 3 M HCl auf 6,8 und die anschließende Auffüllung mit destilliertem Wasser auf 100 mL. Vor Verwendung wurden 10 μ L Mercaptoethanol pro mL zugesetzt.

Die dem Extruder am Ausgang entnommenen Proben wurden mit SDS-Probenpuffer verdünnt und falls nicht anders angegeben für 10 min bei 99 °C inkubiert. Aufgetragen wurden im Anschluss 10 μ L der Probe und 5 μ L Molekulargewichtsmarker mit anschließender Durchführung einer zweistufigen Elektrophorese (1. Stufe: 300 V, 80 mA, 6 min; 2. Stufe: 300 V, 60 mA, 40 min). Die resultierenden Gele wurden über Nacht in einer Färbelösung mithilfe eines Wipptisches bewegt.

Zur Herstellung von Färbelösung wurden 1 g Brilliant Blau G-250 in 700 mL destilliertem Wasser unter Rühren aufgelöst und 200 mL 2-Propanol hinzugefügt. Nach dem Zusatz von 100 mL Essigsäure (100 %) erfolgte die Filtration der Lösung. Nach der Färbung wurde das Gel mit destilliertem Wasser abgespült und mit Entfärbelösung

bis zum maximalen Kontrast entfärbt. Diese bestand aus 200 mL 2-Propanol und 100 mL Essigsäure (100 %) und wurde mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt. Nach erneutem Spülen mit destilliertem Wasser wurden die Gele für 30 min in Geltrocknerlösung inkubiert, die 200 mL Ethanol und 100 mL Glycerin enthielt und ebenfalls auf 1 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde. Zum Abschluss wurden die Gele luftblasenfrei zwischen zwei mit destilliertem Wasser benetzte Cellophanfolien gespannt und anschließend 2 Tage bei Raumtemperatur getrocknet. Die Analyse der resultierenden Gele ermöglichte die Analyse der extrudierten Proteine und erlaubte damit Rückschlüsse auf Prozess- und reaktionsbedingte Molekulargewichtsveränderungen des untersuchten Proteinsystems.

4.5 Statistik

4.5.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive oder auch beschreibende Statistik wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Erhebung, Darstellung und Beschreibung von empirischen Daten aus Experimenten und Messwerten eingesetzt. Die Auswertung erfolgte zahlenmäßig durch geeignete grundlegende Kenngrößen, zu denen neben Mittelwerten, Standardabweichungen und Varianzen vor allem der Vergleich von zwei Mittelwerten durch den t-Test gehörte. Letzterer setzte die Ermittlung des sog. Vertrauens- oder Konfidenzbereiches voraus, um Aussagen darüber treffen zu können, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen besteht und wie stark dieser ausgeprägt ist. Zu diesem Zwecke wurde der 95 %-Vertrauensbereich für ausgewählte Vergleiche bestimmt, und mit softwaretechnischer Unterstützung durch die Berechnung des P-Wertes („Probability“, Wahrscheinlichkeit) beurteilt. Es handelt sich um die Wahrscheinlichkeit dafür, dass der beobachtete Effekt oder ein noch größerer Effekt nur zufällig auftritt, wenn der wahre Effekt 0 ist. Schlussfolgernd bedeutet dies, je kleiner diese Wahrscheinlichkeit (d. h. je kleiner P), desto größer ist die Überzeugung, dass wirklich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht. Dies resultiert in folgender Beurteilung:

$P > 0,05$:	kein Hinweis auf einen Unterschied
$0,05 \geq P > 0,01$:	indifferent (möglichst mehr Daten erforderlich)
$0,01 \geq P > 0,001$:	signifikanter Unterschied
$0,001 \geq P$:	hochsignifikanter Unterschied

Die entsprechenden statistischen Beurteilungen finden an geeigneten Stellen in der Ergebnisdiskussion Anwendung und dienen der Absicherung vergleichender Aussagen über Versuchsergebnisse und Messdaten.

4.5.2 Statistische Versuchsplanung

Bereits die Ergebnisse der traditionellen Versuchsdurchführung ermöglichen die Darstellung von Abhängigkeiten der Ausgangsparameter auf das Endprodukt. Diese Vorgehensweise erlaubt jedoch nur die Bestimmung der Abhängigkeit einer Zielgröße von jeweils einer Variablen unter Konstanthaltung der übrigen. Die statistische Versuchsplanung bietet durch den Einsatz eines mehrfaktoriellen Regressionsmodells die Möglichkeit mehrere Faktoren gleichzeitig zu variieren. Somit können zum einen Wechselwirkungen zwischen den Faktoren erkannt und zum anderen Zielgrößeneffekte der ursächlichen Variable zugeordnet und quantifiziert werden.

Die Festlegung der relevanten Zielgrößen stellt bei der Durchführung der statistischen Versuchsplanung den Ausgangspunkt dar. Dabei handelt es sich um die mechanischen Kennwerte der extrudierten Folien, die Zugfestigkeit, die Bruchdehnung und der Elastizitätsmodul, die zielkonform mit der Aufgabenstellung als Antwortgrößen auf die Einflüsse ausgewählter Parameter untersucht und optimiert werden sollen. Im nächsten Schritt wurden die Einflussfaktoren und deren Ausprägungen identifiziert, die einen Effekt auf die oben genannten Zielgrößen ausüben. Dabei handelt es sich um die Weichmacherkonzentration, den Einfluss einer enzymatischen Quervernetzung mittels MTG, den Effekt einer Probenentnahme längs und quer der Extrusionsrichtung sowie die Temperaturen des Extrusionsprozesses. Aus diesen Ausgangsdaten wurden Faktorenversuchspläne erstellt, die je nach der Anzahl der Parameter im 2^n -Design strukturiert wurden. Dabei wurden n Einflussgrößen mit je 2 möglichen Ausprägungen bzw. Niveaus (-1; 1) zu einem Versuchsplan zusammengefasst.

Die Ergebnisauswertung erfolgte mithilfe des Programms Statistica[®] 8.0, StatSoft, Tulsa, USA. Durch multifaktorielle Regression wurden die Effekte der Einflussgrößen quantifiziert und die Richtung des Einflusses bestimmt (positiver Einfluss auf die Zielgröße (+); negativer Einfluss auf die Zielgröße (-)). Zusätzlich konnten die Wechselwirkungen zwischen den Parametern identifiziert und deren kombinierte Einflüsse auf die Antwortgröße dargestellt werden.

5 Darstellung der Ergebnisse

5.1 Herstellungsverfahren

5.1.1 Lösungsmittelverfahren

Durch die Herstellung von Proteinfohlen entsprechend dem in [Kapitel 4.1.1](#) beschriebenen Gießverfahren konnte gezeigt werden, dass die gewählten Proteinsysteme Natrium-Caseinat, Gelatine und Erbse grundsätzlich für die Bildung von Folien und Filmen mit angemessenen optischen, organoleptischen und mechanischen Eigenschaften geeignet sind. Die typische Optik einer 200 x 200 mm Gießfolie ist in [Abb. 5.1](#) zu sehen.

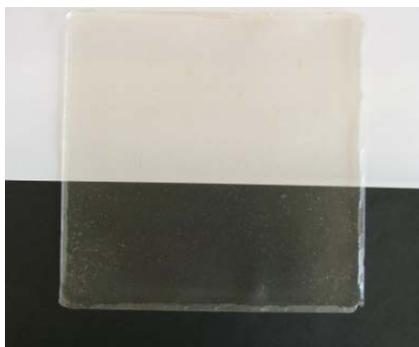


Abb. 5.1: NaCas-Folie als repräsentatives Produkt des Gießfolienprozesses

Die gewonnenen Messwerte in Zusammenhang mit relevanten technisch-funktionalen Charakteristiken dienen als Grundlage für die Entwicklung und entsprechende Übertragung auf einen thermoplastischen Prozess, der Extrusion. Aus diesen Gründen soll auf eine gesonderte Darstellung der Ergebnisse für Gießfolien verzichtet werden. Stattdessen werden diese zweckmäßig für eine vergleichende Betrachtung von Produkt- und Prozessparametern in der Ergebnisdiskussion entsprechend herangezogen und zielorientiert analysiert. Darüber hinaus finden wesentliche analytische Ergebnisse des Gießfolienprozesses bei der Darstellung des Einflusses kristalliner Substanzen in [Kapitel 5.3.3](#) eine ausführliche Beschreibung.

5.1.2 Extrusion

5.1.2.1 Extruder A – Haake PolyLab OS PTW 24/40

Die Wahl der in [Kapitel 4.1.2.3](#) vorgestellten Prozessparameter erwies sich hinsichtlich der Durchführung eines kontinuierlichen Extrusionsprozesses als geeignet. Zum Ersten konnte gezeigt werden, dass die gewählten Zuführungssysteme für das Proteinsystem als auch für die Dosierung des Tris-Puffer-Weichmacher-Gemisches eine sehr gute Praktikabilität und Zuverlässigkeit aufwiesen. Das Protein NaCas konnte ohne Vorbehandlungsschritte in der vom Hersteller bereitgestellten Pulverform ver-

arbeitet werden. Zum Zweiten hat sich herausgestellt, dass die gewählte Schneckenkonfiguration mit der Anordnung von förderneutralen Knetscheiben in den Zonen 4 und 7, die zueinander einen Versatz von 180° besaßen, eine vollständige Homogenisierung der Proteinmasse gewährleisten haben. Zudem wurden die in der Einzugszone entstandenen Proteinagglomerate, wie aus [Abb. 5.2](#) hervorgeht vollständig aufgehoben und zu einer konzentrierten Proteinlösung weiterverarbeitet.



Abb. 5.2: Gefüllte Extruderdoppelschnecke der Zonen 5 und 6 (v. r. n. l.) mit NaCas und ansteigender Massenhomogenität und reduzierten Proteinagglomeraten

Die Schlitzdüse am Extruderausgang ermöglichte die Formgebung des Extrudates zu einem kontinuierlichen Folienband, wie aus [Abb. 5.3](#) hervorgeht.

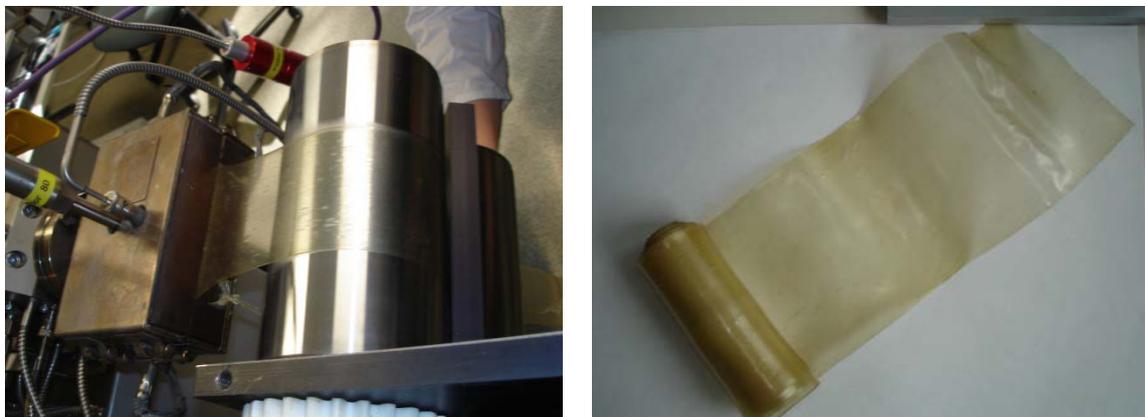


Abb. 5.3: Folienabzug einer NaCas-Folie mittels Kalender (links) und Folienrolle als Endprodukt nach Aufwicklung (rechts)

Die Extrudatdehnung war angemessen hoch und ermöglichte der nachgeschalteten Abzugsvorrichtung eine Streckung in Längsrichtung, den Ab- und Weitertransport, eine kontrollierte Kühlung und die abschließende Aufwicklung in Form einer Folienrolle. Das Endprodukt konnte im direkten Anschluss entnommen, verpackt und gelagert werden.

5.1.2.2 Extruder B – ZE25A-UTXx48D-UG

Wesentliche Erkenntnisse über das Stoffsystem sowie über die Anlagen- und Prozessführung aus den Versuchen mit Extruder A konnten für weiterführende Experimente und Optimierungsbestrebungen an Extruder B adaptiert werden.

In Anlehnung an die Zuführungssysteme des Extruders A stellten sich die verwendeten Systeme zum Transport der Rohstoffe in den Extruder als ideal heraus und wiesen durch die computergestützte Steuerung eine hohe Präzision auf. Die nach den Erkenntnissen zahlreicher Vorversuche konstruierte Schneckenkonfiguration stellte sich hinsichtlich der Mischung und Homogenisierung der Rohstoffe ebenfalls als im hohen Maß praktikabel und zweckdienlich heraus. Aus diesen Gründen konnten alle in Tab. 4.3 des Kapitels 4.1.2.3 dargestellten Versuche des Modellproteinsystems NaCas erfolgreich mit den beschriebenen Verfahrensparametern umgesetzt werden. Des Weiteren stellten die zwei installierten Vakuumpumpen eine effiziente Entgasung der Proteinmasse sicher und die Schmelzepumpe garantierte zum einen den ausreichenden Druckaufbau vor der Düse und zum anderen einen konstanten Massenstrom, sodass, wie in Abb. 5.4 ersichtlich, die kontinuierliche Formgebung und Entnahme der Folien erfolgen konnten.



Abb. 5.4: NaCas-Folie als Ergebnis des Formgebungsprozesses des Extrudates (links) und Folienabzug mittels einer Edelstahlwalze als Kalandertestandteil (rechts)

Hinsichtlich der Aufnahme des Folienbandes, axialer Streckung, Trocknung, Weitertransport und abschließender Überführung in eine Folienrolle war der Kalandertestand ein geeignetes Instrument, wie durch die Visualisierung der post-extrudalen Prozesse in Abb. 5.5 gezeigt wird.



Abb. 5.5: Weitertransport der extrudierten Folien (links) und Aufwicklung zur Folienrolle als entnehmbares Endprodukt

Im Anschluss an die erfolgreiche Extrusion erfolgte auch für die Folien aus Extruder B eine umfangreiche Charakterisierung hinsichtlich optischer, sensorischer und physikalischer Eigenschaften.

Die Versuche E01 bis E06 aus Tab. 4.4 wurden mit dem Modellprotein Erbse durchgeführt. Die Prozessschritte Zuführung, Mischung und Transport konnten in einem mit NaCas vergleichbar guten Niveau umgesetzt werden. Es ist aber in keinem der Versuche gelungen, eine homogene Proteinlösung zu generieren und durch eine Filmdüse in Folienform zu überführen. Lediglich eine partielle Lösung des Erbsenproteins in dem Tris-Puffer-Glycerin-Gemisch mit vorwiegend gequollenen Partikeln konnte erreicht werden. Die Reduzierung der Extruderdrehzahl von 285 auf 160 min^{-1} und die damit verbundene Erhöhung der mittleren Verweilzeit von 90 auf 120 s verbesserte zwar den Grad der Löslichkeit am Extruderausgang, konnte aber auch keine vollständige Lösung und Homogenisierung erreichen. Demzufolge gelang keine Formgebung als Folie, sondern die Extrusion der in [Abb. 5.6](#) gezeigten Stränge, die sich in ihrer Konsistenz, Integrität und Farbgebung voneinander unterschieden.



Abb. 5.6: Erbsenprotein-Extrudat in Strangform als Ergebnis der Versuche E01 bis E03 (links), Versuche E04 und E05 (mittig) und in gepresster Form aus den Versuchen E04 und E05 (rechts), Tab. 4.4

Durch ein Verpressen der extrudierten Masse zwischen zwei Teflonfolien bei Raumtemperatur als nachgeschalteter Prozessschritt gelang die Erzeugung von transparenten, leicht glänzenden Folien mit einer glatten homogenen und integrativen Oberfläche. Die erreichte Foliendicke betrug zwischen 50 und 150 μm .

5.1.3 Optik und Organoleptik

5.1.3.1 Extruder A

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung und den Prozessparametern zeichneten sich die produzierten NaCas-Folien durch optische Homogenität und strukturelle Integrität aus. Das allgemeine Erscheinungsbild kann gemäß [Abb. 5.7](#) als transparent bis leicht gelblich, matt bis glänzend und haptisch ansprechend bis leicht haftend charakterisiert werden.



Abb. 5.7: Extrudierte NaCas-Folien bei unterschiedlichen Temperaturprofilen charakterisiert über die Temperatur in der Düse T_D , 90 °C (links) 70 °C (mittig), 50 °C (rechts), Unterscheidung (l, r) nur durch verschiedenfarbige Unterlagen

Zudem konnten mit einer Variation des Temperaturprofils entsprechend [Abb. 5.7](#) die optischen Eigenschaften beeinflusst werden. Thermische Profile mit den Zonentemperaturen 30-30-50-50-60-60-70-70-80-90 °C führten zu matten, gelblichen, leicht intransparenten und klebrigen Folien. Eine Veränderung der Zonen- und Düsentemperaturen auf 30-30-45-45-50-50-50-60-60-70 °C zog optische Veränderungen zu transparenten, glänzenden, nicht haftenden und fühlbar elastischeren Folien nach sich. Die weiterführende Absenkung des Temperaturprofils auf 30-30-45-45-45-45-50-50-50-50 °C in Vorbereitung auf eine reaktive Versuchsdurchführung zeigte eine erneute Veränderung von Optik und Haptik der Produkte. Dabei prägten vor allem eine leichte Intransparenz und die gelbliche Farbgebung das Erscheinungsbild der Folien, die sich leicht matter und fühlbar fester zeigten. Die Foliengeometrie war durch eine durchschnittliche Breite von 7 bis 8 cm und einer Dicke zwischen 140 und 570 μm gekennzeichnet. Die exakte Foliengeometrie jedes Produktes kann in [Tab. 10.1](#) des Anhanges eingesehen werden.

Wie bereits in den Abbildungen Abb. 5.3 und Abb. 5.7 zu erkennen war, wiesen die produzierten Folien Fehlstellen in Form von Gaseinschlüssen auf, die in Folge des Folienabzuges eine Streckung in Längsrichtung erfahren haben. Dieses Phänomen ist deutlich in Abb. 5.8 (links) erkennbar, die das Folienband zwischen Düse und Abnehmerwalze zeigt.



Abb. 5.8: Fehlstellen in Form von Gaseinschlüssen im extrudierten Folienband (links) und Entlüftungsöffnung in Zone 9 des Extruders zur Abführung volatiler Bestandteile (rechts)

Die Installation einer Entlüftungsöffnung in Zone 9 unter Atmosphärendruck gemäß Abb. 5.8 (rechts) konnte die volatilen Bestandteile des Extrudates nur in unzureichendem Maße abführen. In seltenen Fällen konnten Proteinagglomerate in den extrudierten Folien festgestellt werden.

5.1.3.2 Extruder B

Das Ergebnis der Extrusionsversuche am Extruder B waren transparente bis leicht opake Folien mit einer leicht gelblichen Tönung. Die Konsistenz reichte in Abhängigkeit von der Zusammensetzung von leicht klebrig, bei Folien mit einem Glyceringehalt von 25 Gew.% (bezogen auf die Extrudatzusammensetzung) bis zu wenig haftend bei reduziertem Weichmacherzusatz und erhöhten Temperaturen. Generell zeigten die Produkte eine homogene Zusammensetzung ohne Fehlstellen oder Stoffeinschlüsse, eine leicht glänzende und glatte Oberfläche, eine angenehme Haptik sowie ein neutrales Geruchsprofil. Die Produkte des Extrusionsprozesses zeigt die Abb. 5.9 aus verschiedenen Perspektiven.



Abb. 5.9: Extrudierte NaCas-Folien einschließlich Weiterverarbeitung zu Folienrollen

Die produkttypischen Abmessungen der extrudierten Folien betragen in der Breite zwischen 30 und 35 cm und besaßen ein Dickenprofil im Bereich zwischen 150 und 300 μm .

5.2 Mechanische Eigenschaften

5.2.1 Extruder A

Die im Hinblick auf die Produktion von Folienbahnen erfolgreich durchgeführten Versuche an Extruder A können entsprechend Tab. 4.2 hauptsächlich anhand der Extrudatzusammensetzung und dem Temperaturprofil unterschieden werden. Eine mechanische Charakterisierung mithilfe des Zugversuches ergibt, dargestellt in [Abb. 5.10](#), die Abhängigkeiten von Zugfestigkeit und Bruchdehnung von der an der Düse gemessenen Temperatur.

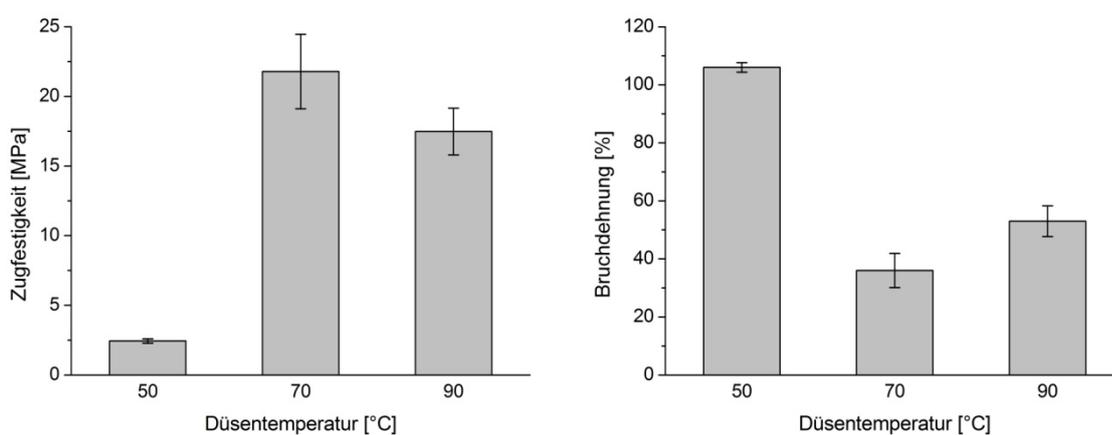


Abb. 5.10: Zugfestigkeiten und Bruchdehnungen extrudierter Folien mit Extruder A in Abhängigkeit von der Düsentemperatur (50 °C: Versuch 3, 70 °C: Versuch 2, 90 °C: Versuch 1; Tab. 4.2); $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$

Eine Erhöhung des Temperaturprofils, charakterisiert durch die Veränderung der Zonentemperaturen von 30-30-45-45-45-45-50-50-50-50 °C ($T_D=50$ °C) auf 30-30-45-

45-50-50-50-60-60-70 °C ($T_D=70$ °C) zog einen sehr stark ausgeprägten Anstieg in den Zugfestigkeiten der produzierten Folien nach sich. Diese verbesserten sich fast um das 9-fache von 2,44 auf 21,79 MPa. Eine weitere Anpassung des Temperaturprofils auf 30-30-50-50-60-60-70-70-80-90 °C ($T_D=90$ °C) zeigte einen leicht negativen Einfluss auf die Zugfestigkeit in Form einer knapp 20%igen Abnahme auf 17,48 MPa. Eine gegensätzliche Entwicklung bekunden die Messwerte der Bruchdehnungen durch eine Abnahme von 106 % auf 36 % bei einer Erhöhung des Temperaturniveaus, beschrieben durch die Düsentemperatur von 50 auf 70 °C. Eine Verbesserung von ca. 47 % konnte durch das höchste Temperaturprofil mit einer Düsentemperatur von 90 °C im Vergleich zum mittleren erreicht werden. Alle untersuchten Proben bestätigten den gegensätzlichen Verlauf von Zugfestigkeit und Bruchdehnung, der auch bei einem Vergleich unterschiedlicher Extrudatzusammensetzungen, insbesondere in Form der Erhöhung des Weichmachergehaltes zum Tragen kommt. Letzterer wurde beispielhaft durch die Bestimmung der mechanischen Kennwerte bei unterschiedlicher Glycerinkonzentration umgesetzt und grafisch in [Abb. 5.11](#) aufbereitet.

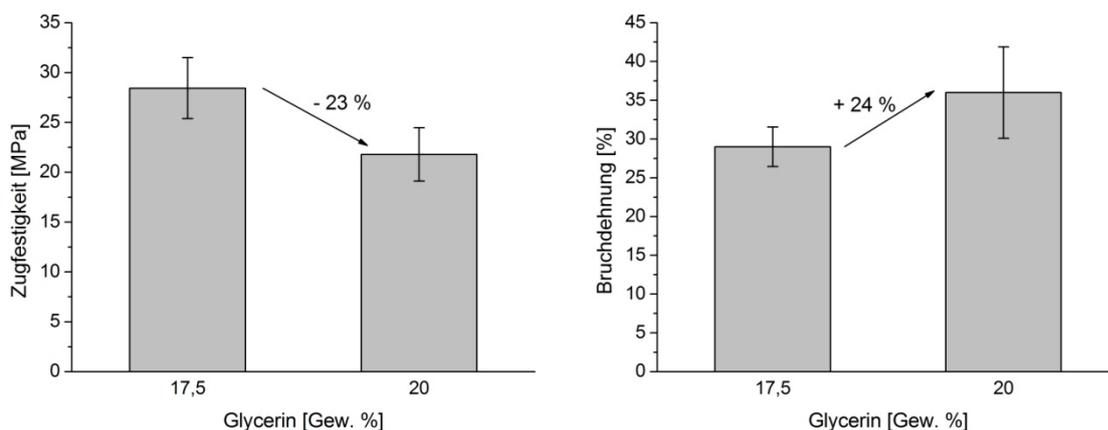


Abb. 5.11: Zugfestigkeiten und Bruchdehnungen extrudierter Folien mit Extruder A in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration der Extrusionsmasse (17,5 Gew.% Gly: Versuch 4, 20 Gew.% Gly: Versuch 2, Tab. 4.2); $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Es ist ersichtlich, dass bereits eine geringe Konzentrationsänderung des Glycerins im Extrudat einen deutlichen Einfluss auf die mechanischen Kennwerte ausübt. Dieser äußert sich in Form einer Reduzierung der Zugfestigkeit um ca. 23 % auf 21,79 MPa und einer Zunahme der Bruchdehnung um ca. 24 % auf 36 MPa.

Die Bestimmung der mechanischen Kennwerte von Extrusionsprodukten aus Versuch 6 und 7, die durch eine enzymatisch katalysierte Quervernetzungsreaktion charakterisiert waren, konnte aufgrund der in [Kapitel 5.3.2.1](#) beschriebenen Formgebungsproblematik nicht durchgeführt werden.

5.2.2 Extruder B

Für die erfolgreich an Extruder B extrudierten Folien gemäß Tab. 4.3 wurde zunächst der Einfluss des gefahrenen Temperaturprofils auf die mechanischen Kennwerte bestimmt. Der Vergleich basiert auf zwei repräsentativen Düsentemperaturen, 50 und 75 °C, denen unterschiedliche Zonentemperaturen von 30-50-50-50-50-50-50-50-50-50-50 und 30-50-50-50-70-70-70-70-70-75-75 °C vorausgehen. Die in [Abb. 5.12](#) grafisch aufbereiteten Messwerte basieren sowohl auf einer Probenentnahme aus den extrudierten Folien in Längs- als auch in Querrichtung.

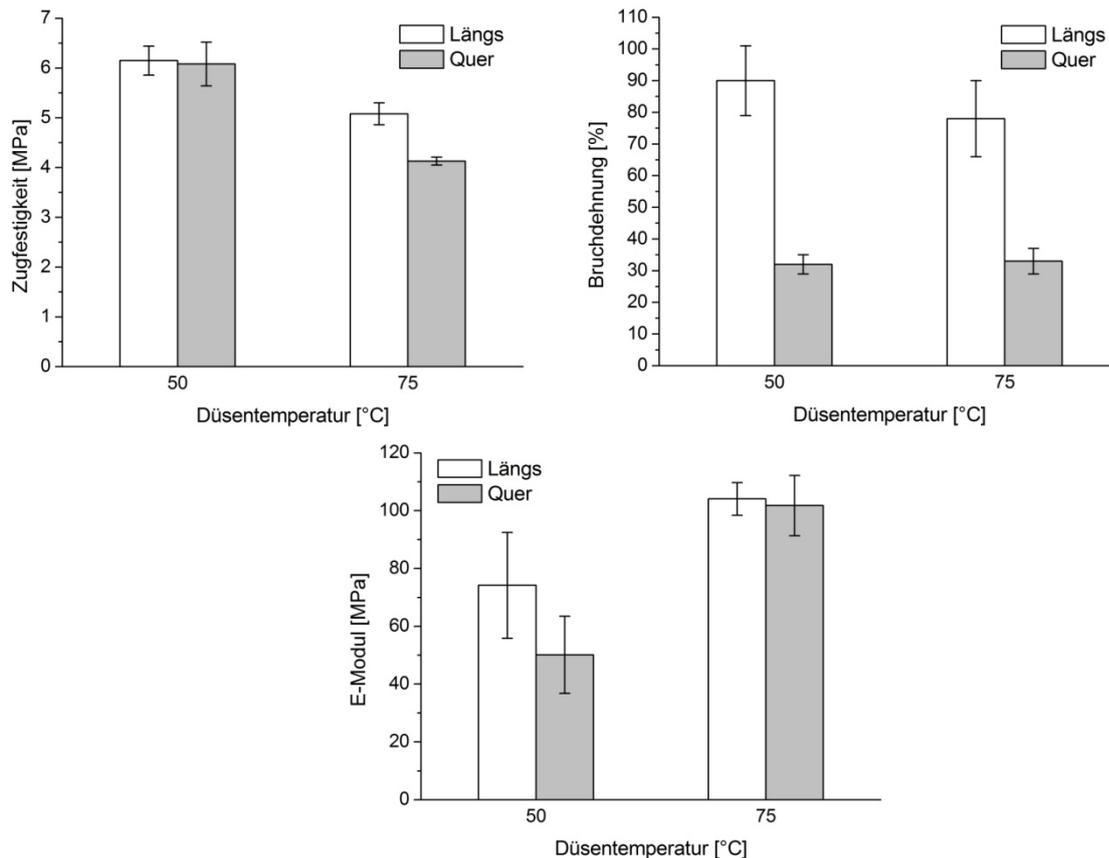


Abb. 5.12: Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmodul extrudierter Folien in Abhängigkeit vom Temperaturprofil und der Probenentnahmerichtung, Versuche C02-L/Q und C03-L/Q aus Tab. 4.3; $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Sowohl die Zugfestigkeit als auch die Bruchdehnung zeigen eine negative Tendenz bei Erhöhung des Temperaturprofils, charakterisiert durch die Düsentemperatur. Lediglich der Elastizitätsmodul verzeichnet eine Zunahme bei Temperaturerhöhung. In dieser Betrachtung wird zudem deutlich, dass die Entnahmerichtung der Folienproben einen großen Einfluss auf dessen mechanische Kennwerte aufweist. Während eine Entnahme quer zur Extrusionsrichtung die Zugfestigkeiten der Folien nur geringfügig um 1 % (50 °C) bzw. 19 % (75 °C) verringert, zeigen die jeweiligen Bruchdehnungen einen stärker ausgebildeten Trend mit einer Abnahme von mehr als 50 % in beiden Temperaturbereichen. Ansteigende Kennwerte wiederum erfährt der Elastizi-

tätsmodul mit Erhöhung des Temperaturniveaus unabhängig von der Probenentnahmerichtung.

Als weiterer Untersuchungsgegenstand wurde eine der Extrusion nachgeschaltete Beschichtung der Folien mit pulverförmigen NaCas und dessen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften ausgewählt, dessen Ergebnisse in [Abb. 5.13](#) zu finden sind.

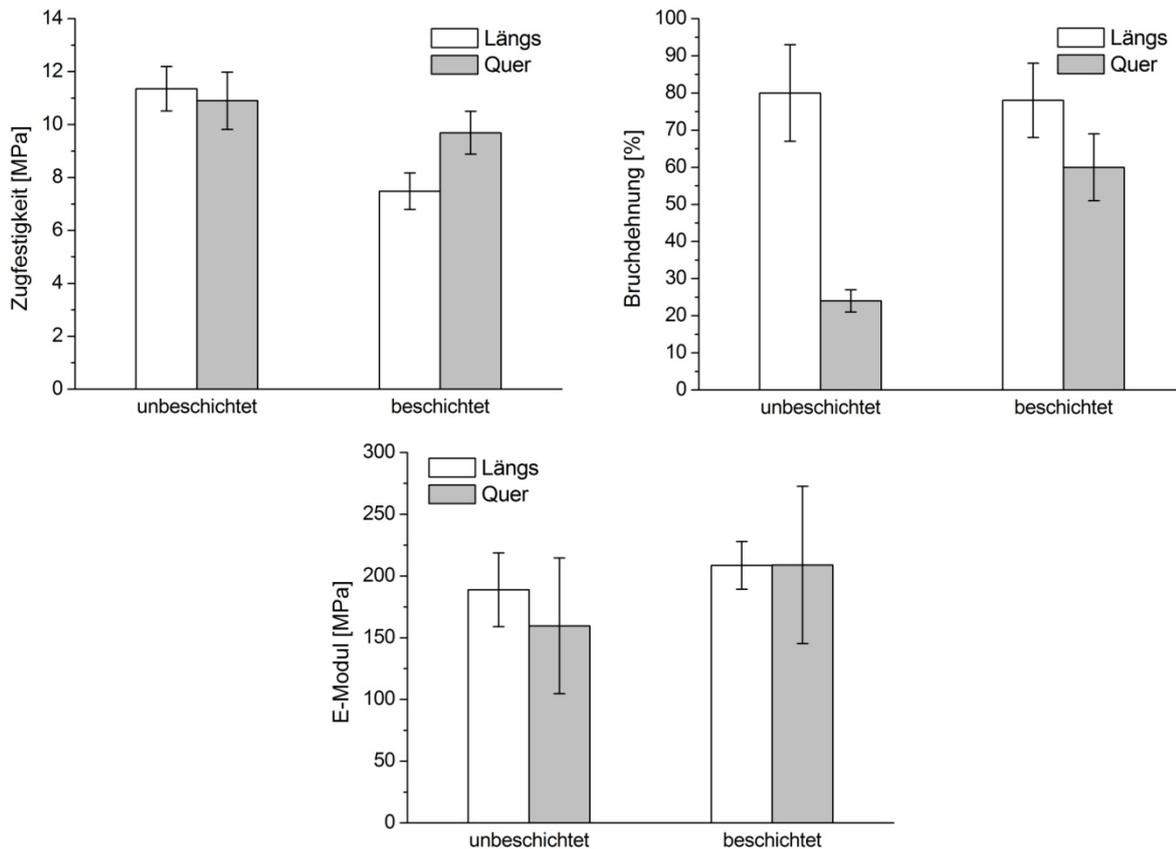


Abb. 5.13: Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmoduln extrudierter Folien in Abhängigkeit einer post-extrudalen Beschichtung mittels pulverförmigen NaCas und der Probenentnahmerichtung, Versuche C04-L/Q und C04-L/Q-B aus Tab. 4.3; $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Die Beschichtung der NaCas-Folien wirkte sich unabhängig von der Richtung der Probenentnahme negativ auf die Zugfestigkeit aus, wohingegen die Bruchdehnung für Proben in Längsrichtung nahezu gleichbleibende Werte aufzeigten und in Querrichtung sogar eine Verbesserung um 250 % durch das Aufbringen einer Beschichtung erfuhren. Darüber hinaus konnten bei letzterem leichte Steigerungen des Elastizitätsmodules für beide Probenentnahmerichtungen festgestellt werden.

Eine Charakterisierung in Form mechanischer Kenngrößen für die Extrusionsprodukte aus dem Modellprotein Erbse (Versuche E01 bis E06, Tab. 4.4) war aufgrund der in [Kapitel 5.1.2.2](#) beschriebenen mangelhaften Löslichkeit des Proteins und unzureichender Formstabilität des Extrudates nicht möglich. Weiterführende Betrachtungen zu den mechanischen Eigenschaften von NaCas-Folien aus Extruder B

können den vergleichenden Darstellungen mit den Ergebnissen einer reaktiven Extrusion durch eine gezielte Enzymkatalyse in [Kapitel 5.3.2.2](#) entnommen werden.

5.3 Modifikation

5.3.1 Weichmacher

Die Wahl des Weichmachers Glycerin stellte sich sowohl bei der Verarbeitung als auch hinsichtlich der finalen Produkteigenschaften als überaus geeignet und vorteilhaft heraus. Dessen Einsatz ermöglichte die erfolgreiche Produktion von Folienbahnen mit den in [Kapitel 5.1.3](#) und [5.2](#) beschriebenen sensorischen und mechanischen Eigenschaften.

Der Wechsel des Weichmachersystems auf PEG 300 erwies sich hinsichtlich Zuführung, Agglomeration, Homogenisierung und Transport des Extrudates im gleichen Maße probat wie der Einsatz von Glycerin. Eine dauerhafte Formgebung konnte aber nicht erfolgreich durchgeführt werden, da der Einsatz von PEG 300 bei Konstanz der anderen Parameter zu einer klebrigen, gummiartigen Masse mit hoher Dehnbarkeit führte, die aufgrund ihrer Konsistenz, die in [Abb. 5.14](#) zu sehen ist, nicht in Folienform überführt werden konnte.

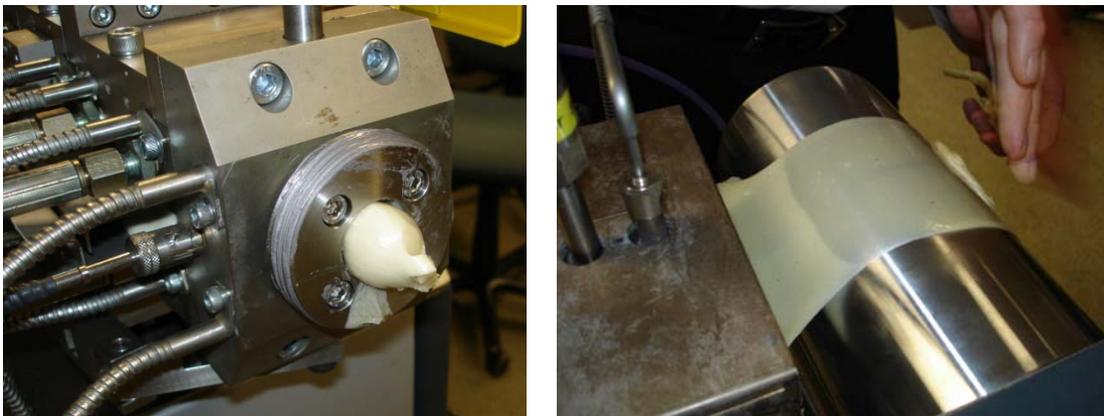


Abb. 5.14: Extrudat mit PEG 300 als Weichmacher (links) und entsprechende Formgebung durch eine Schlitzdüse (rechts), Extruder A

Dieses Phänomen konnte bei allen gefahrenen Temperaturbereichen beobachtet werden. Der Effekt wurde durch eine Erhöhung der PEG-Konzentration von 17,5 auf 20 Gew.% noch verstärkt.

Aus den genannten Gründen wurde von einer Verwendung von PEG 300 für die Versuche an Extruder B abgesehen. Der Wechsel des Lösungsmittels von Tris-Puffer zu Wasser erfolgte beispielhaft für die Versuche C01 und C05 (Tab. 4.3) an Extruder B. Es konnten keine verfahrens- oder produkttechnische Beeinflussung festgestellt wer-

den. Auswirkungen auf die Proteinvernetzungsreaktion durch den Einsatz von MTG waren ebenfalls nicht erkennbar bzw. nicht messbar.

5.3.2 Enzymatische Quervernetzung

5.3.2.1 Extruder A

Die im [Kapitel 3.2.1](#) beschriebene enzymatische Quervernetzungsreaktion fand durch den Zusatz von MTG in vorgelöster Form eine erfolgreiche verfahrenstechnische Umsetzung. Es ist gelungen, durch die Anpassung des Temperaturprofils der Extruderzonen auf 30-30-45-45-45-50-50-50-50 °C eine Enzymreaktion in den laufenden Extrusionsprozess zu integrieren. Der Einfluss der MTG wurde vor allem durch einen deutlichen Viskositätsanstieg deutlich, der zu stark erhöhten Drehmoment- und Druckverhältnissen des Extruders führte. Dieser Umstand erlaubte keine Formgebung durch die verwendete Schlitzdüse und erforderte deren Demontage für den Versuch einer Strangextrusion, die in [Abb. 5.15](#) illustriert ist.



Abb. 5.15: Strangförmiges Extrudat als Ergebnis einer enzymatisch katalysierten Quervernetzungsreaktion mit MTG, 15 U/g NaCas (links und mittig) und Endprodukt in Strangform und sowie als Ergebnis einer post-extrudalen Walzprozesses (rechts)

Das Extrudat in Form eines wulstartigen Stranges kann als optisch und haptisch homogen und konsistent bezeichnet werden. Die Veränderung des Extrudates durch die Quervernetzungsreaktion führte zu einer sehr festen und zähen Struktur und wurde von einer Farbveränderung in Richtung dunkelgelb bis hellbraun begleitet. Der in [Abb. 5.15](#) (links und mittig) dokumentierte Strang wurde zudem einem Walzprozess zwischen zwei Edelstahlrollen unterzogen, um durch dessen Verflachung eine Folienform zu erreichen. Das Ergebnis der Strangnachbehandlung ist, wie in [Abb. 5.15](#) (rechts) ersichtlich, als ungenügend zu bezeichnen.

5.3.2.2 Extruder B

Die Etablierung einer enzymatisch katalysierten Quervernetzungsreaktion in den Extrusionsprozess erfolgte in den Versuchen C03 bis C13 ([Tab. 4.3](#)) mit dem Modell-

Prozessbedingt korreliert die Verweilzeit negativ mit einer Erhöhung der Extruderdrehzahl und ist damit unabhängig von stofflichen und reaktiven Einflüssen. Die Integration einer Enzymreaktion zeigt einen deutlichen Einfluss in Abhängigkeit von der mittleren Verweilzeit der Partikel und damit auch von der resultierenden Reaktionszeit, deren Zunahme zu ansteigenden Druckverhältnissen vor der Düse und einen erhöhten Drehmoment des Extruders führt. Eine vergleichbare indirekte Abhängigkeit von der Drehzahl besteht auch hinsichtlich der Masstemperatur, welche die Temperatur des Proteinextrudates unmittelbar vor Düseneintritt beschreibt. Eine Erhöhung der Extruderdrehzahl von 90 auf 285 min^{-1} führte zu einer Zunahme der Masstemperatur um 10 °C von 53 auf 63 °C bei Konstanz des gefahrenen Temperaturprofils.

Neben der Analyse von Prozessvariablen wurden die extrudierten Folien mittels SDS-PAGE untersucht, um den Einfluss einer Quervernetzung auf die Molekulargewichtsverteilung des Proteinsystems nachzuweisen. Die biochemische Analyse der Extrusionsprodukte der Versuche C04 bis C06 aus Tab. 4.3 zeigt in [Abb. 5.17](#) den Einfluss der Quervernetzungsreaktion bei enzymatischen Aktivitäten von 5, 10 und 15 U/g NaCas, einem Temperaturprofil von 30-50-50-50-50-50-50-50-50-50-75 °C, einer Extruderdrehzahl von 285 min^{-1} und daraus resultierend einer mittleren Verweilzeit von 90 s.

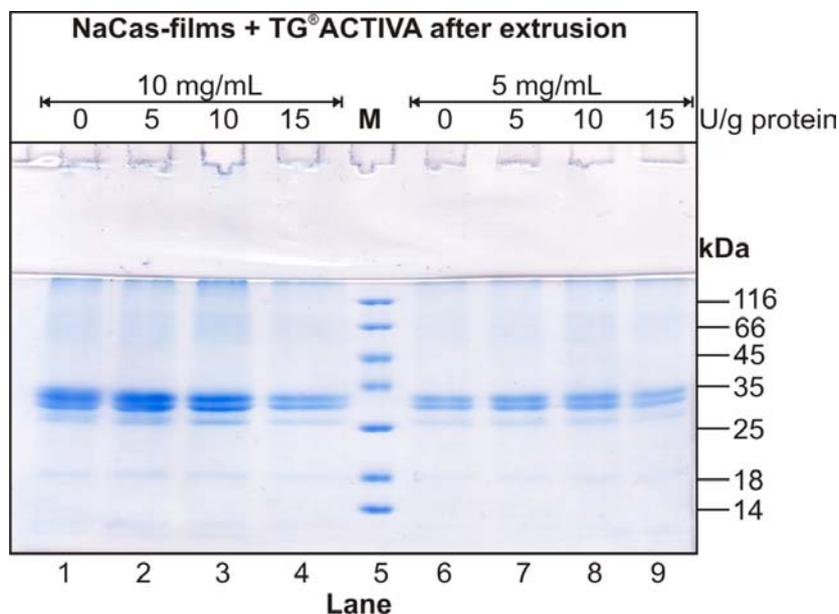


Abb. 5.17: SDS-PAGE zur Analyse der Quervernetzungsreaktion von NaCas durch MTG bei einer Drehzahl von 285 min^{-1} und verschiedenen enzymatischen Aktivitäten und Probenverdünnungen (M: Marker), Versuche C04 – C06 aus Tab. 4.3

Im Vergleich zur Referenzprobe (0 U/g NaCas), bei der auf den Einsatz von MTG verzichtet wurde kann lediglich bei der höchsten Aktivität von 15 U/g NaCas eine Abnahme niedrigmolekularer Verbindungen im Molekulargewichtsbereich der NaCas-

Monomere zwischen 26 und 32 kDa beobachtet werden. Hochmolekulare Verbindungen sind in allen Fällen nicht ersichtlich.

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss der Reaktionszeit auf die enzymatisch katalysierte Proteinquervernetzung durch die Variation der Drehzahl und damit der entsprechenden mittleren Verweilzeit bestimmt. Für das in [Abb. 5.18](#) dargestellte SDS-Gel erfolgte eine Probenentnahme am Düsenausgang in Drehzahlbereichen zwischen 90 und 285 min^{-1} . Eine Korrelation zwischen Drehzahl und mittlerer Verweilzeit war in [Abb. 5.16](#) ersichtlich.

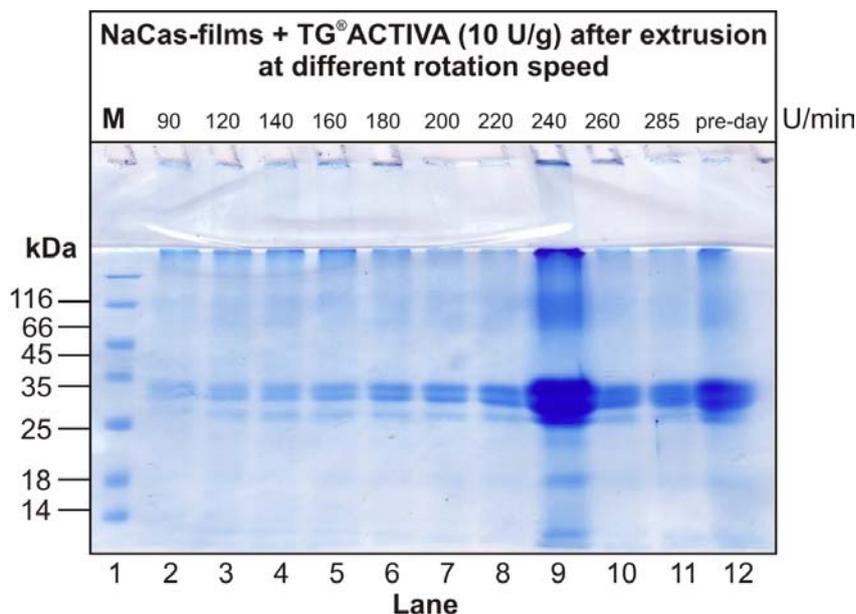


Abb. 5.18: SDS-PAGE zur Analyse der Quervernetzungsreaktion von NaCas durch MTG bei Variation der Extruderdrehzahl und einer enzymatischen Aktivität von 10 U/g NaCas (M: Marker, pre-day: Vortagesflüssigkeitsgemisch mit MTG)

Es wurde offenkundig, dass durch die Reduzierung der Drehzahl deutlich weniger NaCas-Monomere in den Folienproben vorhanden waren. Ab einer Drehzahl kleiner als 180 min^{-1} ist die Entstehung höher molekularer Verbindungen zu erkennen und unterstreicht die Grundtendenz, dass mit zunehmender Reaktionszeit infolge einer Drehzahlerniedrigung die Löslichkeit der Proben in SDS-Probenpuffer sehr deutlich abnimmt.

In Anlehnung an die Einflüsse einer durch MTG katalysierten Vernetzungsreaktion auf ausgewählte Prozessparameter und der anschließenden biochemischen Untersuchung des Extrudates mittels SDS-PAGE soll abschließend eine Korrelation der mechanischen Kennwerte mit der mittleren Verweilzeit und damit indirekt mit der durch dem durch die Drehzahl beeinflussten Reaktionsumfang hergestellt werden. Zu diesem Zwecke gibt die [Abb. 5.19](#) die funktionalen Zusammenhänge von Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmodul der produzierten Folien mit der mitt-

leren Verweilzeit wieder. Die Darstellung ist auf die Versuche C07 bis C13 (gemäß Tab. 4.3) beschränkt, da das Extrudat bei Drehzahlen kleiner als 160 min^{-1} aufgrund seiner festen Konsistenz keinem Formgebungsprozess durch die vorhandene Düse unterzogen werden konnte.

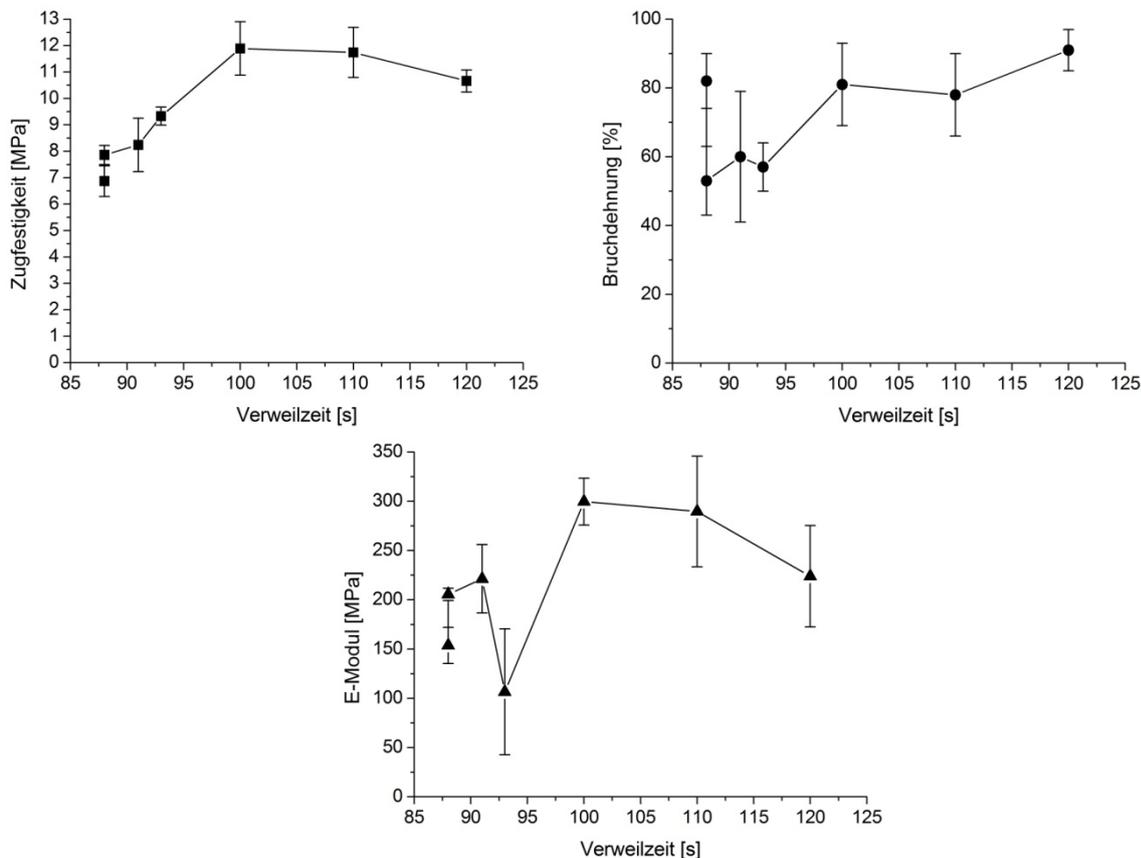


Abb. 5.19: Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmoduln extrudierter Folien im Rahmen einer reaktiven Extrusion mit einer enzymatischen Aktivität von 10 U/g NaCas in Abhängigkeit von der mittleren Verweilzeit, Versuche C07 bis C13 aus Tab. 4.3; $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$

In dem engen Bereich der mittleren Verweilzeiten zwischen 88 und 91 s sind nur geringe Abweichungen der mechanischen Eigenschaften zu beobachten. Eine weitere Zunahme der mittleren Verweilzeiten auf 100 s bedingt durch die Drehzahlerhöhung führt zu einem ansteigenden mechanischen Eigenschaftsprofil, verdeutlicht durch die Zunahme aller dargestellten Kennwerte. Ausgenommen von der Bruchdehnung erfahren alle gemessenen Kennwerte bei mittleren Verweilzeiten im Extruder von mehr als 100 s eine Abnahme und finden ihr Minimum jeweils bei der höchsten Verweilzeit von 120 s, was einer Extruderdrehzahl von 160 min^{-1} entspricht.

Neben der isolierten Betrachtung der Auswirkungen einer reaktiven Extrusion besteht ein besonderes Interesse an einer vergleichenden Quantifizierung mit den mechanischen Folieneigenschaften aus einer nicht-reaktiven Extrusion. Zu diesem Zwecke zeigt [Abb. 5.20](#) eine gegenüberstellende Darstellung mechanischer Kennwerte ex-

trudierter Folien ohne MTG (nicht-reaktive Extrusion) mit bei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten hergestellten Produkten einer reaktiven Extrusion.

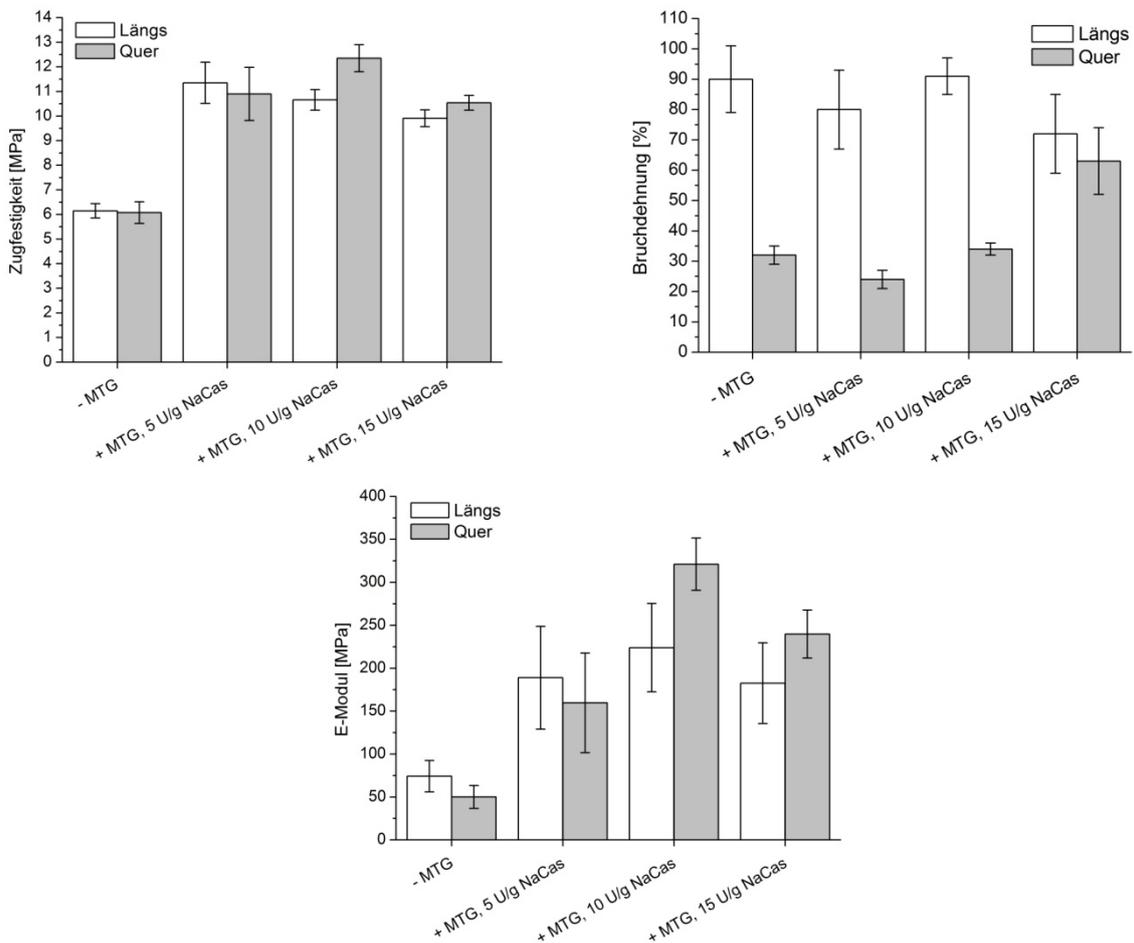


Abb. 5.20: Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmoduln extrudierter Folien in Abhängigkeit der Enzymaktivität und einer Probenentnahme längs und quer der Extrusionsrichtung, Versuche C02-L/Q-2, C04-L/Q, C05-L/Q und C06-L/Q aus Tab. 4.3; $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Aus der Darstellung geht hervor, dass eine reaktive Extrusion bereits bei einer geringen Enzymaktivität von 5 U/g NaCas (entspricht 2,44 Gew.% des Extrudates) zu einer deutlichen Verbesserung der Zugfestigkeit beiträgt. Diese konnte um ca. 85 % von 6,15 MPa auf 11,35 MPa bei Probenentnahme längs der Extrusionsrichtung gesteigert werden. Dabei fällt besonders auf, dass die Erhöhung der Zugfestigkeiten keine signifikante Reduzierung der Bruchdehnungen bedingt hat, die sich auch bei einer reaktiven Extrusion auf hohem Niveau in den Vertrauensbereichen ihrer Standardabweichungen bewegt. Der Elastizitätsmodul erreicht seine Maximalwerte bei der enzymatischen Aktivität von 10 U/g NaCas für beide Entnahmerichtungen.

Der Darbietung von Auswirkungen der Enzymaktivität schließt die Ergebnisdarstellung des Einflusses der Weichmacherkonzentration auf die mechanischen Eigenschaften bei Enzymaktivitätskonstanz von 10 U/g NaCas an, die in Form einer Überblicksbetrachtung in [Abb. 5.21](#) zu finden ist.

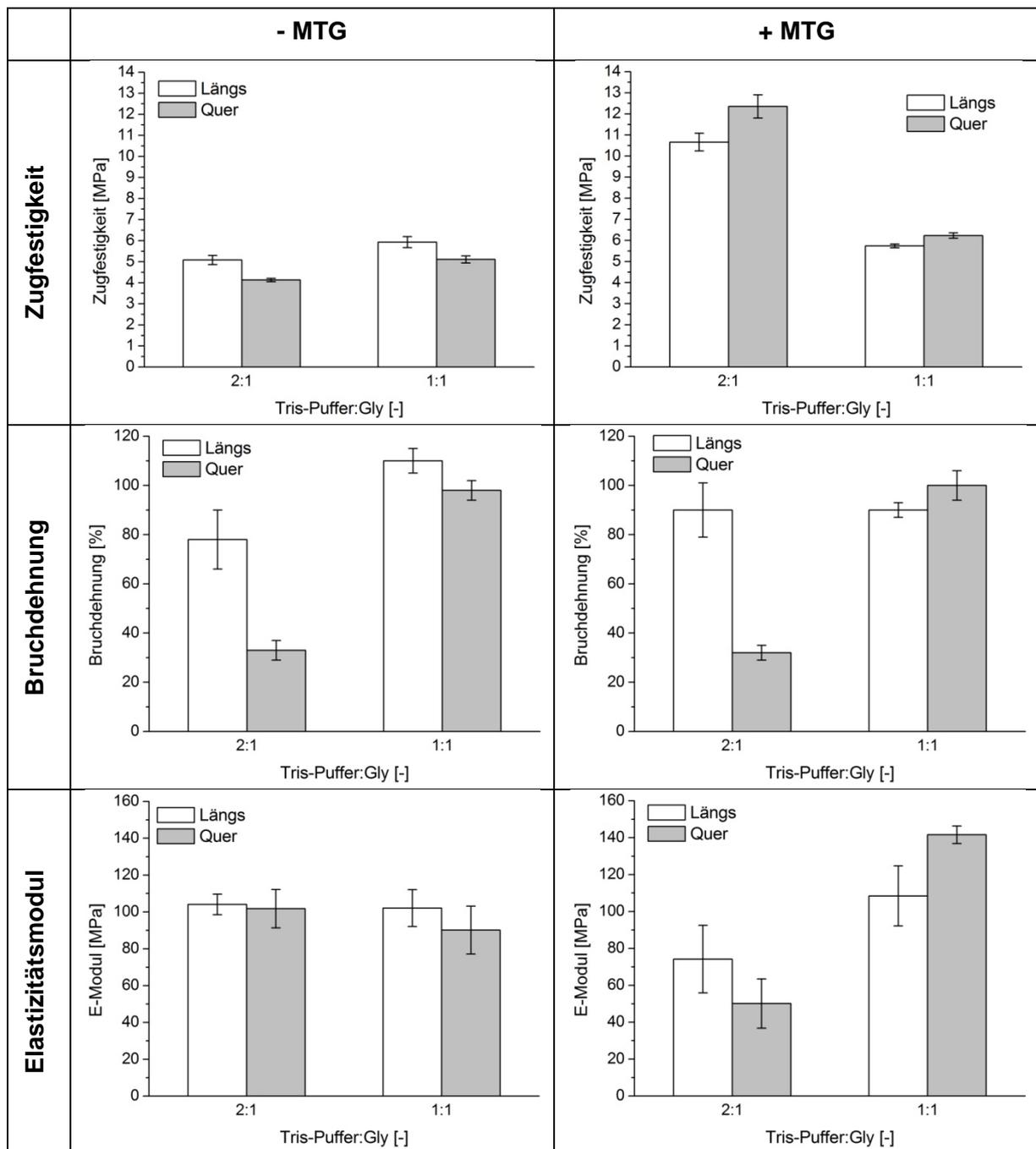


Abb. 5.21: Zugfestigkeiten, Bruchdehnungen und Elastizitätsmodul extrudierter Folien in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Flüssigkomponenten Tris-Puffer, pH 7 und Glycerin (Gly) bei einer Enzymaktivität von 10 U/g NaCas und einer Probenentnahme längs und quer der Extrusionsrichtung, Versuche C02-L/Q, bis C03-L/Q, C05-L/Q und C14-L/Q aus Tab. 4.3; $\bar{x} \pm SD$, n=5

Durch die einheitliche Skalierung der jeweiligen Kennwerte fällt zunächst besonders die deutliche Steigerung der Zugfestigkeiten bei Etablierung einer Quervernetzungsreaktion bei einem Verhältnis von Tris-Puffer zu Glycerin von 2:1 auf. Eine Erhöhung des Glyceringehaltes im Extrudat auf ein paritätisches 1:1-Verhältnis zog keine signifikante Änderung der Zugfestigkeit bei MTG-Zugabe nach sich. In diesem Zusammenhang hebt sich besonders die deutliche Abnahme der Zugfestigkeit bei Erhöhung der Glycerinkonzentration um ca. 46 % (Probenentnahme in Längsrichtung) bei einer reaktiven Extrusion hervor. Im Gegensatz dazu verzeichnen Proben ohne enzymati-

sche Behandlung während der Extrusion nur geringfügige Änderungen bei einem Anstieg der Glycerinkonzentration.

Veränderungen in nicht signifikantem Maße weisen die Werte der Bruchdehnungen hinsichtlich des Einflusses einer Quervernetzungsreaktion auf, wohingegen in allen Fällen verbesserte Bruchdehnungen bei einer Erhöhung des Glyceringehaltes unabhängig von der Probenentnahmerichtung festgestellt wurden.

Während bei den nicht vernetzten Folien eine erhöhte Weichmacherkonzentration keine signifikante Wirkung auf den Elastizitätsmodul zeigt, wirkt sich diese im Falle quervernetzter Folien deutlich positiv auf den Kennwert aus.

Auf eine reaktive Extrusion des Modellproteins Erbse wurde aufgrund des geschilderten Optimierungsbedarfes hinsichtlich Rohstoff und Prozess verzichtet.

5.3.3 Kristallisation

5.3.3.1 Folienherstellung

Die Herstellung kristalliner Folien mit den Additiven Kaliumnitrat, Harnstoff und Ammoniumsulfat durch das in Kapitel 4.1.1 vorgestellte Gießverfahren erwies sich als überaus praktikabel. Die vergleichsweise hohen Löslichkeiten der verwendeten kristallinen Substanzen erlaubten eine schnelle und vollständige Integration in die filmbildende Proteinlösung. Negative Auswirkungen auf den Gießprozess, die Filmbildung, die Trocknung, das Entfernen aus den Gussformen sowie der anschließenden Konditionierung konnten nicht festgestellt werden.

5.3.3.2 Mechanische Eigenschaften

Im Anschluss an die Herstellung im Lösungsmittelverfahren erfolgte die Untersuchung des Einflusses kristalliner Substanzen quantitativ mithilfe des Zugversuches. Für die Modellproteinsysteme NaCas und Gelatine wurden die Kenngrößen Zugfestigkeit und Bruchdehnung in Abhängigkeit von Art und Konzentration des Additives bestimmt und grafisch ausgewertet.

Zunächst erfolgte die Einflussquantifizierung des Additives Kaliumnitrat, dass in Verhältnissen zwischen 0:1 bis 1:1,33 KNO_3 :Protein in die Folie eingebracht worden war. Gravimetrisch betrug der Zusatz unter Berücksichtigung einer konstanten Proteinmasse pro Folie von 6 g zwischen 0 und 4,5 g, wobei die Proben mit einem KNO_3 /Protein-Verhältnis von 0:1 jeweils die Referenzprobe darstellen und additivfrei sind. Die exakte Zusammensetzung der Probekörper ist in [Tab. 10.3](#) des Anhangs aufgeführt. Bei der Betrachtung der Zugfestigkeiten in [Abb. 5.22](#) ist zu erkennen, dass die Folien ohne KNO_3 -Zusatz die höchsten Werte aufweisen. Dies trifft für beide Proteinsysteme zu.

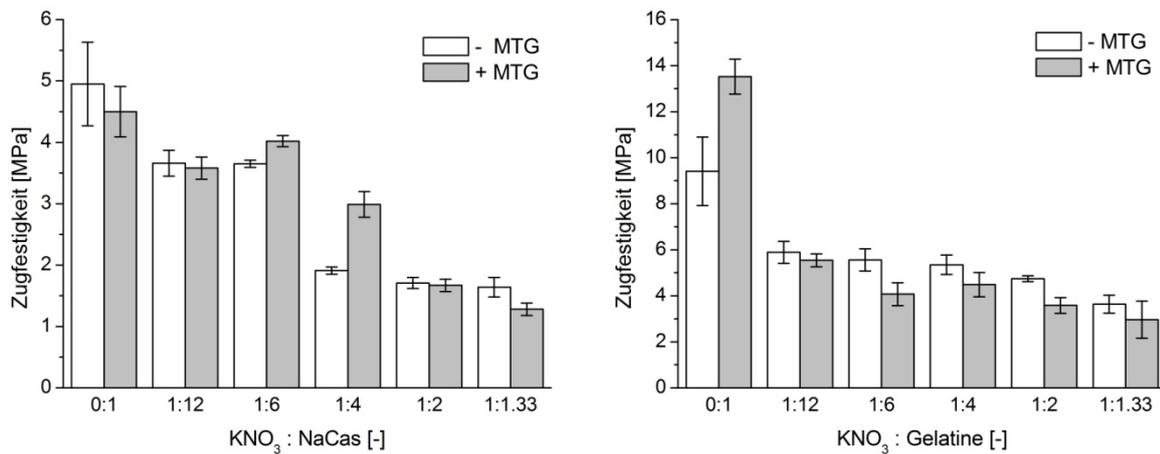


Abb. 5.22: Zugfestigkeiten ausgewählter NaCas-Folien (links) und Gelatine-Folien (rechts) in Abhängigkeit von der KNO₃-Konzentration und der Proteinquervernetzung mittels MTG, Versuche C-K01-06 (Tab. 10.4) und G-K01-06 (Tab. 10.5); $\bar{x} \pm SD$, n=5

Mit zunehmender Additivkonzentration ist in beiden Fällen eine Abnahme der Zugfestigkeiten zu verzeichnen, die im Falle von NaCas-Filmen eine Abnahme von ca. 67 % bei einem Verhältnis von 1:1,33 (KNO₃:NaCas) im Vergleich zur Referenzprobe bedeutet. Im Falle von Gelatine sinkt bereits bei einer geringen Menge an KNO₃ die Zugfestigkeit deutlich und erreicht ab einem Verhältnis von 1:12 bis 1:1,33 (KNO₃:Gelatine) lediglich Zugfestigkeiten zwischen 5,89 und 2,96 MPa. Signifikante Unterschiede der Kennwerte im Rahmen einer enzymatischen Quervernetzung konnten nur bei der Gelatine-Referenzprobe festgestellt werden, bei der eine Verbesserung um ca. 44 % durch die Quervernetzung erzielt werden konnte.

Ein anderes Bild zeigt die Entwicklung der Bruchdehnung bei KNO₃-Zugabe im gewählten Konzentrationsbereich, deren grafische Aufbereitung in [Abb. 5.23](#) ersichtlich ist.

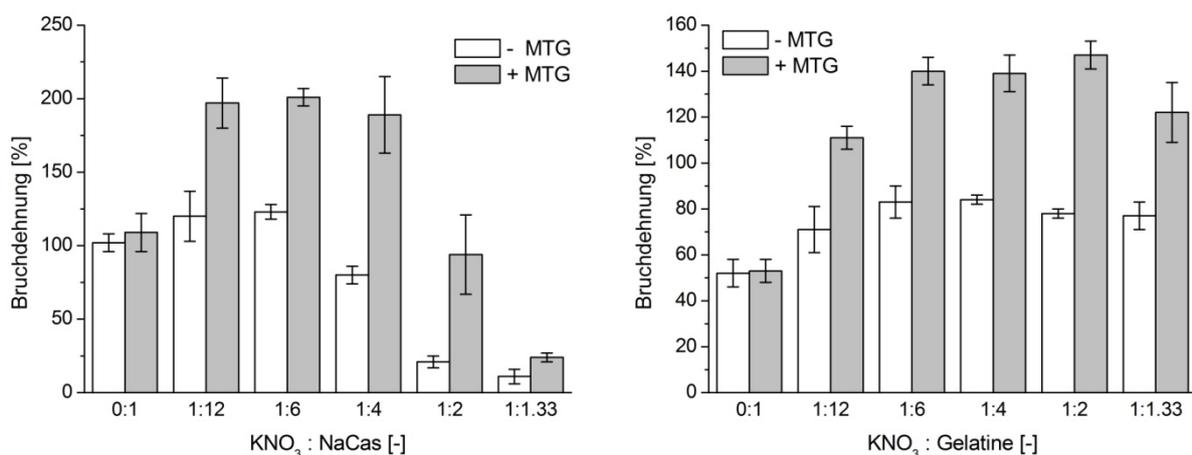


Abb. 5.23: Bruchdehnungen ausgewählter NaCas-Folien (links) und Gelatine-Folien (rechts) in Abhängigkeit von der KNO₃-Konzentration und der Proteinquervernetzung mittels MTG, Versuche C-K01-06 (Tab. 10.4) und G-K01-06 (Tab. 10.5); $\bar{x} \pm SD$, n=5

Durch den Einsatz von Kaliumnitrat gelang eine deutliche Verbesserung der Bruchdehnung in beiden Proteinsystemen. Darüber hinaus erwies sich besonders der kombinierte Einfluss mit mikrobieller Transglutaminase als positiver Faktor und erhöhte die Bruchdehnung der NaCas-Folien um ca. 97 % (bei KNO_3 :NaCas 1:6 im Vergleich zur Referenz). Im Falle von Gelatine gelang bei gleicher Additivkonzentration eine Steigerung um bis zu 269 %. Während die Gelatine-Folien das gute Niveau ihrer Bruchdehnungen auch bei hohen Additivkonzentrationen halten können, ist bei NaCas-Folien eine signifikante Abnahme bei KNO_3 /NaCas-Verhältnissen größer als 1:4 zu verzeichnen.

Bei der Betrachtung der Zugfestigkeiten unter dem Einfluss einer Ammoniumsulfat-Kristallisation ist ein mit KNO_3 als Additiv vergleichbarer negativer Einfluss zu erkennen. Aus [Abb. 5.24](#) geht hervor, dass die Abnahme unabhängig von einer enzymatischen Quervernetzung bei NaCas-Folien deutlich stärker ausgeprägt ist als im Gelatinesystem, wobei im letzteren die quervernetzten Folien in allen Fällen eine bessere Zugfestigkeit zeigten.

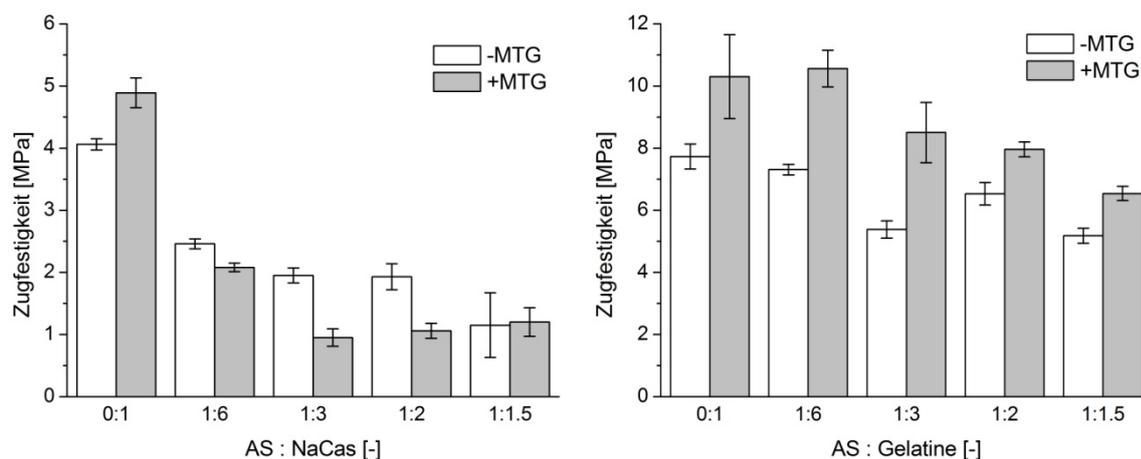


Abb. 5.24: Zugfestigkeiten ausgewählter NaCas-Folien (links) und Gelatine-Folien (rechts) in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfat-Konzentration (AS) und der Proteinquervernetzung mittels MTG, Versuche C-A01-05 (Tab. 10.4) und G-A01-05 (Tab. 10.5); $\bar{x} \pm \text{SD}$, $n=5$

Über den Konzentrationsbereich hinweg erzielten damit die NaCas-Folien einen Verlust an Zugfestigkeit von ca. 72 % und Gelatine-Folien von nur ca. 33 % ohne Berücksichtigung einer Vernetzungsreaktion im Vergleich zur jeweiligen Referenzprobe.

Noch intensiver ausgeprägt zeigt sich der Einfluss von Ammoniumsulfat auf die Bruchdehnungswerte der Proteinsysteme in [Abb. 5.25](#). Bewegen sich die Bruchdehnungen von Gelatinefolien beim zunehmenden Ammoniumsulfat-Gehalt noch in gleichen Größenordnungen, brechen die Werte bei NaCas-Folien ab einem AS/NaCas-Verhältnis von 1:3 drastisch ein.

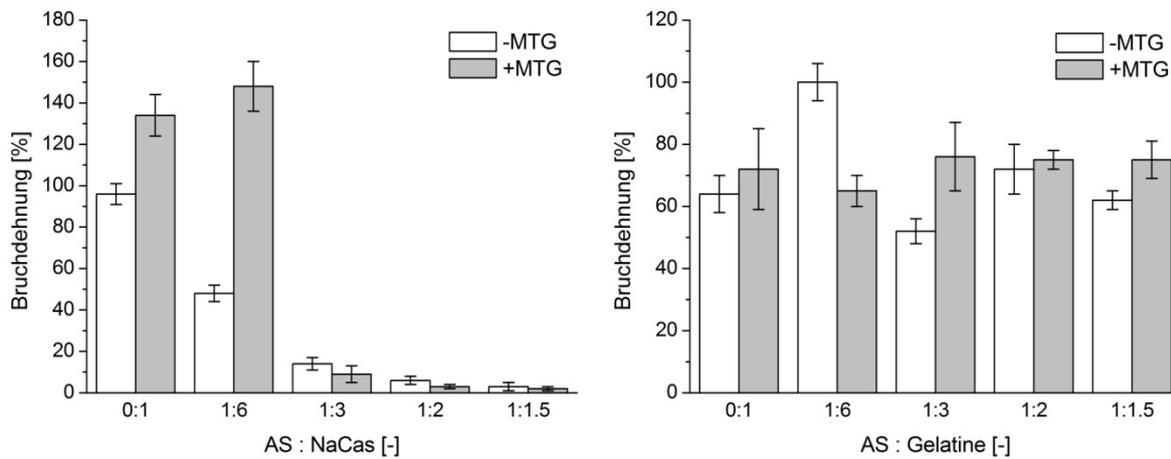


Abb. 5.25: Bruchdehnungen ausgewählter NaCas-Folien (links) und Gelatine-Folien (rechts) in Abhängigkeit von der Ammoniumsulfat-Konzentration (AS) und der Proteinquervernetzung mittels MTG, Versuche C-A01-05 (Tab. 10.4) und G-A01-05 (Tab. 10.5); $\bar{x} \pm SD$, n=5

Dabei fällt auf, dass die Verwendung von MTG diesen Effekt bei einem Verhältnis von 1:6 noch ausreichend kompensiert, dann aber ein MTG-unabhängiger Einbruch folgt.

Der Einsatz von Harnstoff (Urea) als Additiv im Foliengießprozess bedurfte zunächst einer Reduzierung der üblichen Weichmachermenge von 6 auf 1 g pro Folie (entspricht 0,84 Gew.% in der filmbildenden Lösung), um die Ausbildung vermessbarer Folien gewährleisten zu können. Die Beibehaltung der erhöhten Weichmacherkonzentration führte zu einer unzureichenden Stabilisierung des Proteinnetzwerkes und in dessen Konsequenz zu gummi- bis gelartigen Materialien mit geringer struktureller Integrität.

In [Abb. 5.26](#) kann eine auffallende Gleichmäßigkeit in den Kennwertentwicklungen unter Harnstoffeinfluss festgestellt werden, die sich durch eine Abnahme der Zugfestigkeit und einer deutlichen Zunahme der Bruchdehnung bei Erhöhung der Urea-Konzentration in beiden Proteinsystemen äußert.

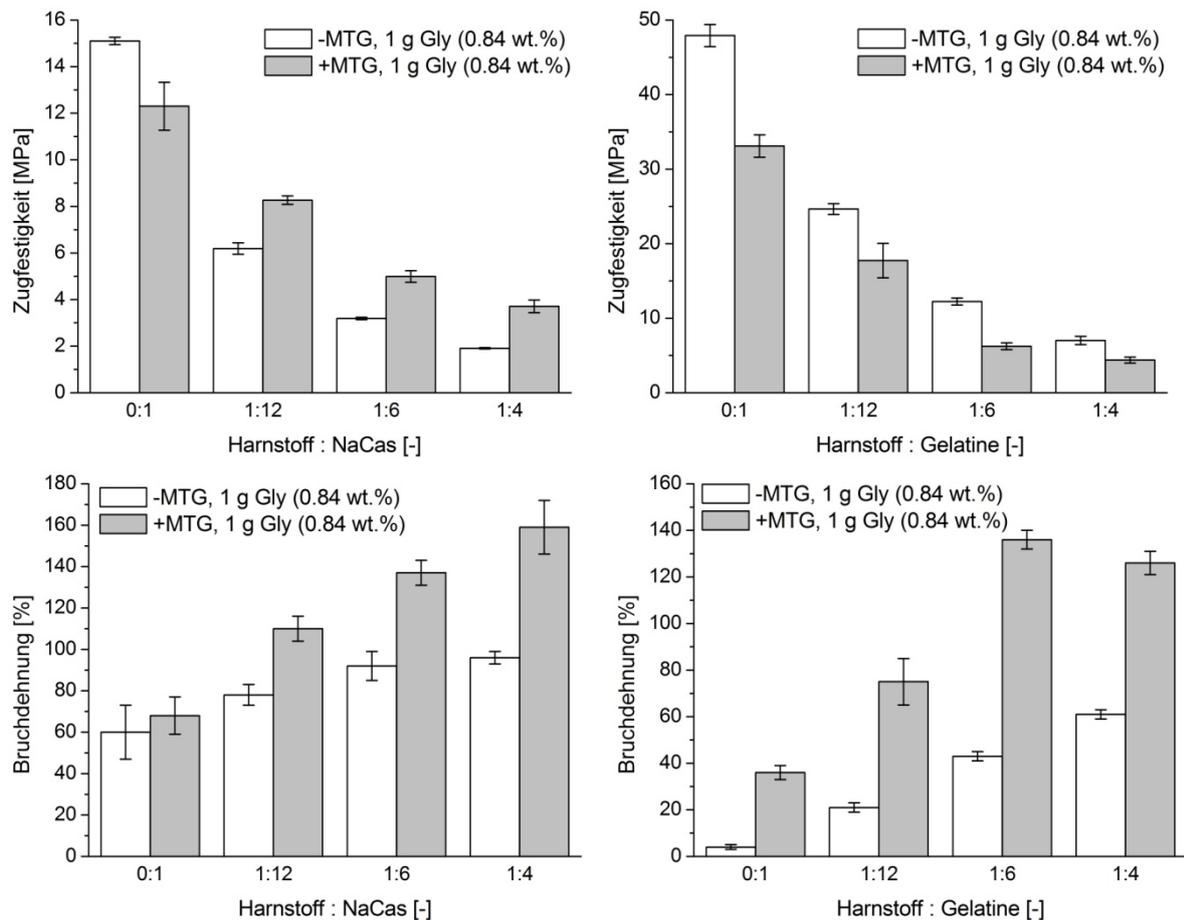


Abb. 5.26: Zugfestigkeiten (oben) und Bruchdehnungen (unten) ausgewählter NaCas-Folien (links) und Gelatine-Folien (rechts) in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration und der Proteinquervernetzung mittels MTG, Versuche C-H01-08 (Tab. 10.4) und G-H01-08 (Tab. 10.5); $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Mit Ausnahme der Zugfestigkeiten von Gelatine-Filmen unter Harnstoffeinfluss, konnte die Etablierung einer enzymatischen Proteinquervernetzung in allen Fällen zu einer Kennwertverbesserung beitragen. Das große Potenzial von Urea zur Verbesserung der Bruchdehnungswerte geht dabei ohne Ausnahme zu Lasten der Zugfestigkeit.

5.3.3.3 Morphologie

Die Untersuchung des Kristallisationseffektes erfolgte zunächst mikroskopisch durch die Bestimmung von Größe, Form und Verteilung anhand des Modellproteins NaCas und des Additivs Kaliumnitrat.

In Abhängigkeit von der KNO_3 -Konzentration konnten verschiedene Kristallgrößen und strukturelle Ausprägungen beobachtet werden. Wie aus den Mikroskopaufnahmen in [Abb. 5.27](#) hervorgeht, konnten für Verhältnisse zwischen 1:6 bis 1:4 mittlere Kristallgrößen im Bereich zwischen 30 und 100 μm bei einer homogenen Verteilung festgestellt werden. Eine Erhöhung der Additivkonzentration auf 1:2 ([Abb. 5.27 \(c, e\)](#)) führte zu einem Anstieg der Kristallgrößen auf durchschnittlich 100 und 200 μm , die

sich in der für KNO_3 typischen orthorhombischen (Aragonit-Typ) Struktur zeigten (Abb. 5.27 (e)).

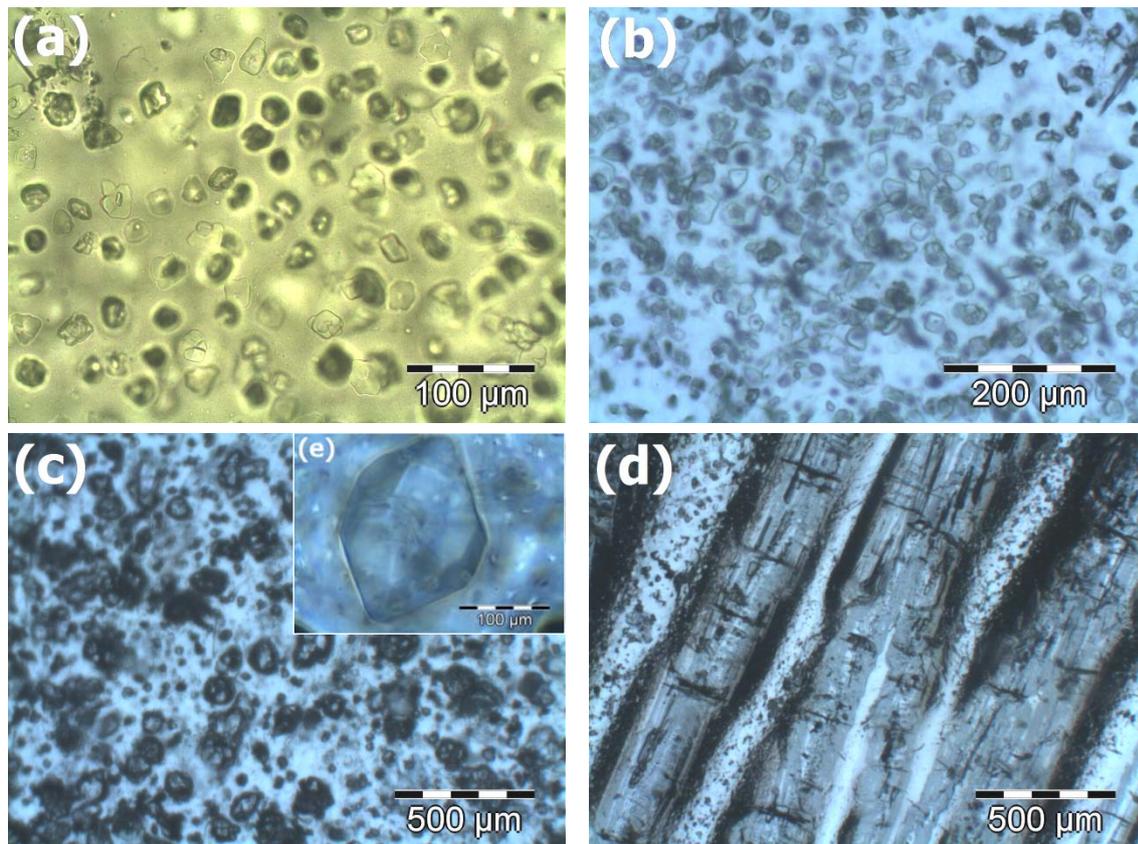


Abb. 5.27: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Kaliumnitratkristallen in NaCas-Folien bei $\text{KNO}_3/\text{NaCas}$ -Verhältnissen von (a) 1:6, (b) 1:4, (c, e) 1:2 und (d) 1:1,33

Eine weitere Erhöhung der Kaliumnitratkonzentration auf 1:1,33 bedingte brüchige, säulenförmig streuende Kristalle mit effektiven Längen von bis zu 80 μm , die die Oberflächen der Folien beidseitig durchdrangen. Die entsprechende makroskopische Ausprägung dieses Phänomens kann der [Abb. 5.28 \(h\)](#) entnommen werden.

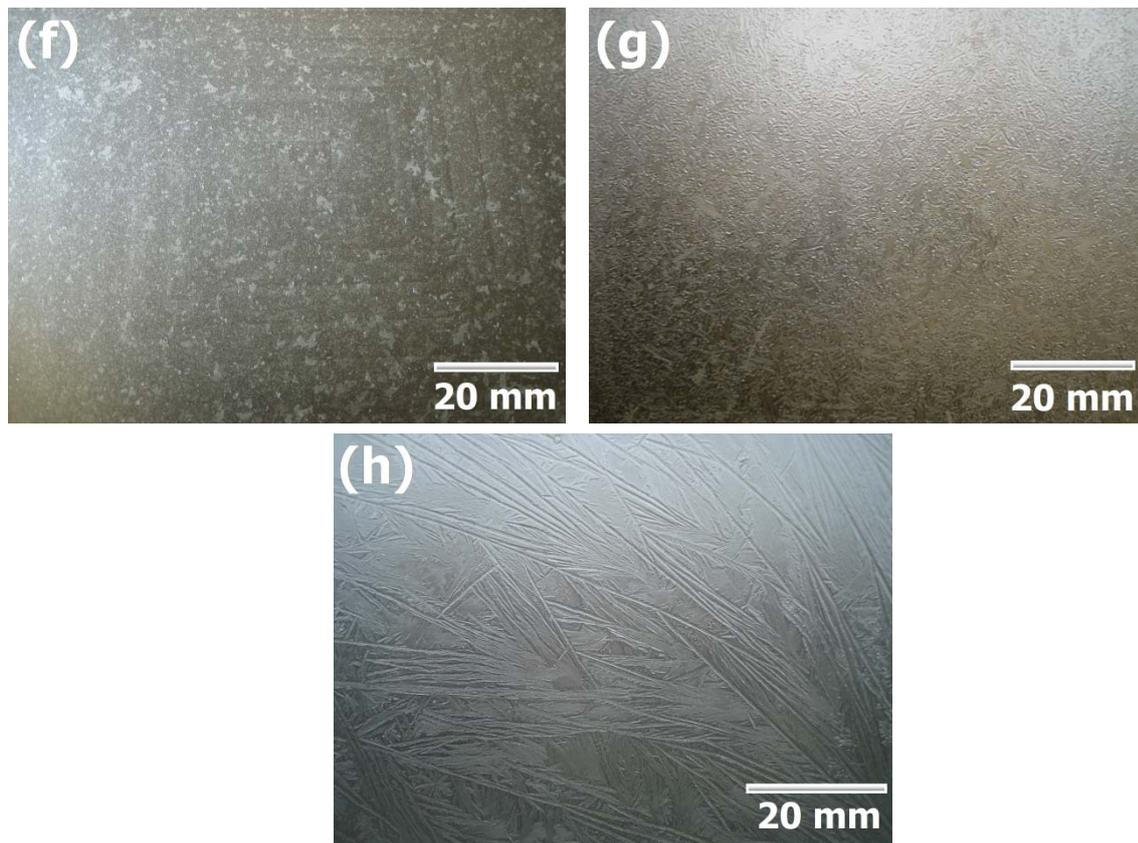


Abb. 5.28: Lichtbildaufnahmen von Kaliumnitratkristallen in NaCas-Folien bei $\text{KNO}_3/\text{NaCas}$ -Verhältnissen von (f) 1:4, (g) 1:2 und (h) 1:1,33

Folien mit einer KNO_3 -Konzentration kleiner als 1:4 zeigten keine makroskopisch sichtbaren kristallinen Bereiche und waren optisch und haptisch mit additivfreien Folien vergleichbar. Inhomogen verteilte kristalline Bereiche, wie in Abb. 5.28 (f, g) ersichtlich, sowie komplexe makroskopische Strukturen prägten in einigen Fällen das Erscheinungsbild der Folien im Verhältnisbereich 1:4 bis 1:2.

Generell nimmt bei allen Folien die Transparenz mit zunehmender Kristallinität ab, die mit einer Erhöhung der Additivkonzentration korreliert. Mikroskopisch und makroskopisch sichtbare Kristallbildung konnte in NaCas- und Gelatine-Folien mit den Additiven Kaliumnitrat und Ammoniumsulfat erfolgreich durchgeführt werden. Bei dem Additiv Harnstoff konnte die für eine Kristallisation erforderliche Konzentration nicht in die filmbildende Lösung eingebracht werden. In diesem Fall fand keine Ausbildung eines Filmes statt, sondern lediglich die Entstehung einer gallertartigen Masse nach Abführen des Lösungsmittels.

5.4 Statistische Versuchsplanung

Zunächst wurden der Einfluss der Glycerinkonzentration in den Folien sowie einer enzymkatalysierten Quervernetzung mittels MTG auf die Zielgrößen Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul längs zur Extrusionsrichtung bestimmt. Dazu wurde ein 2^2 -Faktorenversuchsplan erstellt, der in [Tab. 5.1](#) dargestellt ist.

Tab. 5.1: 2²-Faktorenversuchsplan mit den Einflussgrößen Glycerinkonzentration und MTG für Folienproben längs zur Extrusionsrichtung

Versuch [Nr.]	Kombination [-]	Versuch [-]	Zielgrößen		
			Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]	E-Modul [MPa]
1	A ₁ :B ₁	C02-L-2	6,15	90	74,19
2	A ₂ :B ₁	C03-L	5,93	110	102,09
3	A ₁ :B ₂	C05-L	10,66	91	223,89
4	A ₂ :B ₂	C14-L	5,74	90	108,42

Tab. 5.2: 2²-Faktorenversuchsplan mit den Einflussgrößen Glycerinkonzentration und MTG für Folienproben quer zur Extrusionsrichtung

Versuch [Nr.]	Kombination [-]	Versuch [-]	Zielgrößen		
			Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]	E-Modul [MPa]
1	A ₁ :B ₁	C02-Q-2	6,08	32	50,12
2	A ₂ :B ₁	C03-Q	5,11	98	90,16
3	A ₁ :B ₂	C05-Q	12,35	34	321,06
4	A ₂ :B ₂	C14-Q	6,23	100	141,59

Die Spalte „Kombination“ stellt die Einflussgrößen auf die mechanischen Kennwerte dar. Dazu zählen die Glycerinkonzentration (A) und die Zugabe von MTG (B), wobei die jeweiligen Indices unterschiedliche Ausprägungen beziehungsweise Niveaus darstellen, die sich wie folgt ergeben:

A₁ 16,67 Gew.% Glycerin, B₁ - MTG,
 A₂ 25,00 Gew.% Glycerin, B₂ + MTG.

Die Schätzung der absoluten Effekte der Einflussgrößen auf die jeweilige Zielgröße als Ergebnis der mehrfaktoriellen Regressionsrechnung sowie die Parameterwechselwirkung sind in [Abb. 5.29](#) abgebildet. Die Richtung der Effektwirkung kann sowohl negativ als auch positiv sein, je nachdem, ob die Einflussgrößen den Wert der jeweiligen Zielgröße erhöhen oder verringern.

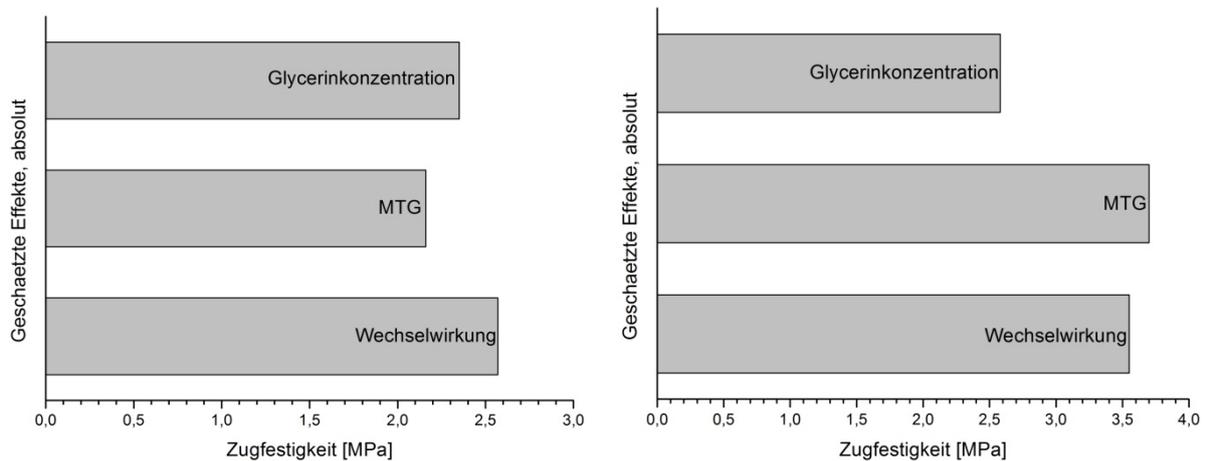


Abb. 5.29: Effektdarstellung der 2²-Faktorenversuchsplanung als Pareto-Diagramm für die Zielgröße „Zugfestigkeit“, längs (links) und quer (rechts) zur Extrusionsrichtung

In Bezug auf die Zielgröße „Zugfestigkeit“ ist erkennbar, dass sowohl bei Erhöhung der Glycerinkonzentration als auch durch eine enzymatische Vernetzung mit MTG eine Verbesserung der Zugfestigkeit zu erwarten ist. Ebenso kann festgestellt werden, dass der kombinierte Einfluss von Glycerinkonzentration und MTG-Zugabe die Zugfestigkeit um geschätzte 2,57 bzw. 3,35 MPa für längs und quer zur Extrusionsrichtung entnommene Proben erhöht. Insgesamt sind die geschätzten Effekte in Bezug auf die Extrusionsrichtung gleichgerichtet und relativ gleichwertig.

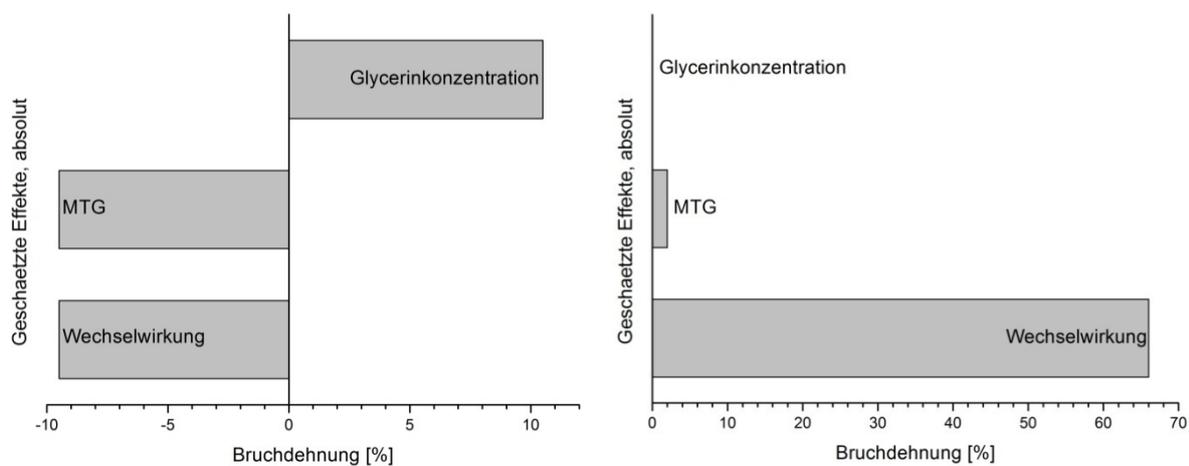


Abb. 5.30: Effektdarstellung der 2²-Faktorenversuchsplanung als Pareto-Diagramm für die Zielgröße „Bruchdehnung“, längs (links) und quer (rechts) zur Extrusionsrichtung

Im Rahmen der Effektschätzung bezogen auf die Bruchdehnung, dargestellt in [Abb. 5.30](#) sind negative Effekte bei MTG-Zugabe und bei der Wechselwirkung beider Einflussgrößen vorhanden, wenn die Probekörper längs zur Extrusionsrichtung entnommen wurden. Lediglich eine Erhöhung der Glycerinkonzentration von 16,67 auf 25,00 Gew.% führt zu einer geschätzten Verbesserung der Antwortgröße „Bruchdehnung“ von 10,5 %. Ein anderes Bild zeichnet sich für quer zur Extrusionsrichtung entnommene Folienkörper ab. In diesem Fall führt der kombinierte Einfluss von einer

Erhöhung des Glycerinanteils und einer enzymatischen Proteinquervernetzung zu einem deutlichen Anstieg der Bruchdehnung um geschätzte 66 %. Der isolierte Effekt der MTG-Zugabe führt lediglich zu einer geringfügigen Erhöhung von geschätzten 2 %.

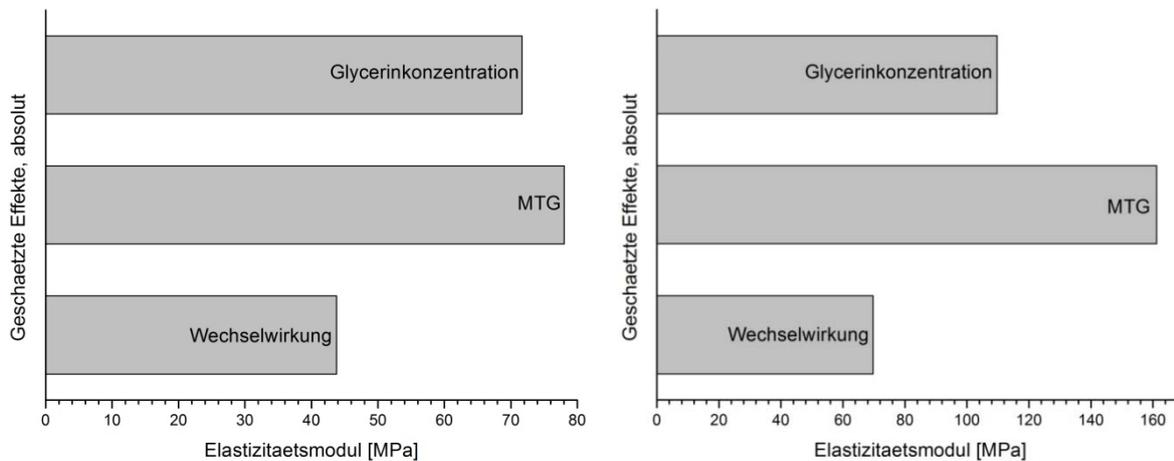


Abb. 5.31: Effektdarstellung der 2²-Faktorenversuchsplanung als Pareto-Diagramm für die Zielgröße „Elastizitätsmodul“, längs (links) und quer (rechts) zur Extrusionsrichtung

Der Faktorenversuchsplan für den Parametereinfluss auf den Elastizitätsmodul in [Abb. 5.31](#) zeigt unabhängig von der Extrusionsrichtung den gleichen Einfluss in positive Richtung. Das heißt, alle untersuchten Einflussgrößen führen zu einer geschätzten Erhöhung des Elastizitätsmoduls, wobei der Einfluss auf die quer zur Extrusionsrichtung entnommen Proben in allen Fällen deutlich größer ist. Am deutlichsten ist der Einfluss einer enzymatischen Quervernetzung der extrudierten Folien, der sich in einem prognostizierten Anstieg des Elastizitätsmoduls von 78,02 beziehungsweise 161,19 MPa für längs beziehungsweise quer zur Abzugsrichtung untersuchte Folienkörper äußert.

Des Weiteren galt es zu ermitteln, welchen Einfluss die Glycerinkonzentration in Verbindung mit MTG und der Richtung der Probenentnahme (Extrusionsrichtung) auf die mechanischen Folieneigenschaften ausübt. Um alle möglichen Kombinationen abzudecken und einen vollständig aufgelösten 2³-Faktorenversuchsplan zu erstellen, waren 8 Experimente erforderlich, die in [Tab. 5.3](#) dargestellt sind.

Tab. 5.3: 2³-Faktorenversuchsplan mit den Einflussgrößen Glycerinkonzentration, MTG und Extrusionsrichtung

				Zielgrößen		
A [-]	B [-]	C [-]	Versuch [-]	Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]	E-Modul [MPa]
-1	-1	-1	C02-L-2	6,15	90	74,19
1	-1	-1	C03-L	5,93	110	102,09
-1	1	-1	C05-L	10,66	91	223,89
1	1	-1	C14-L	5,74	90	108,42
-1	-1	1	C02-Q-2	6,08	32	50,12
1	-1	1	C03-Q	5,11	98	90,16
-1	1	1	C05-Q	12,35	34	321,06
1	1	1	C14-Q	6,23	100	141,59

Um eine angemessene Übersichtlichkeit zu gewährleisten, wurden die jeweiligen Merkmalsausprägungen mit den Zahlen 1 und -1 beschrieben, welche die unterschiedlichen Niveaus der Einflussgrößen widerspiegeln und wie folgt definiert sind:

- A Glyceringehalt (-1: 16,67 Gew.%; 1: 25 Gew.),
- B MTG (-1: ohne MTG; 1: mit MTG),
- C Extrusionsrichtung (-1: längs; 1: quer).

Die als Pareto-Diagramm aufbereiteten Ergebnisse sind in [Abb. 5.32](#) ersichtlich.

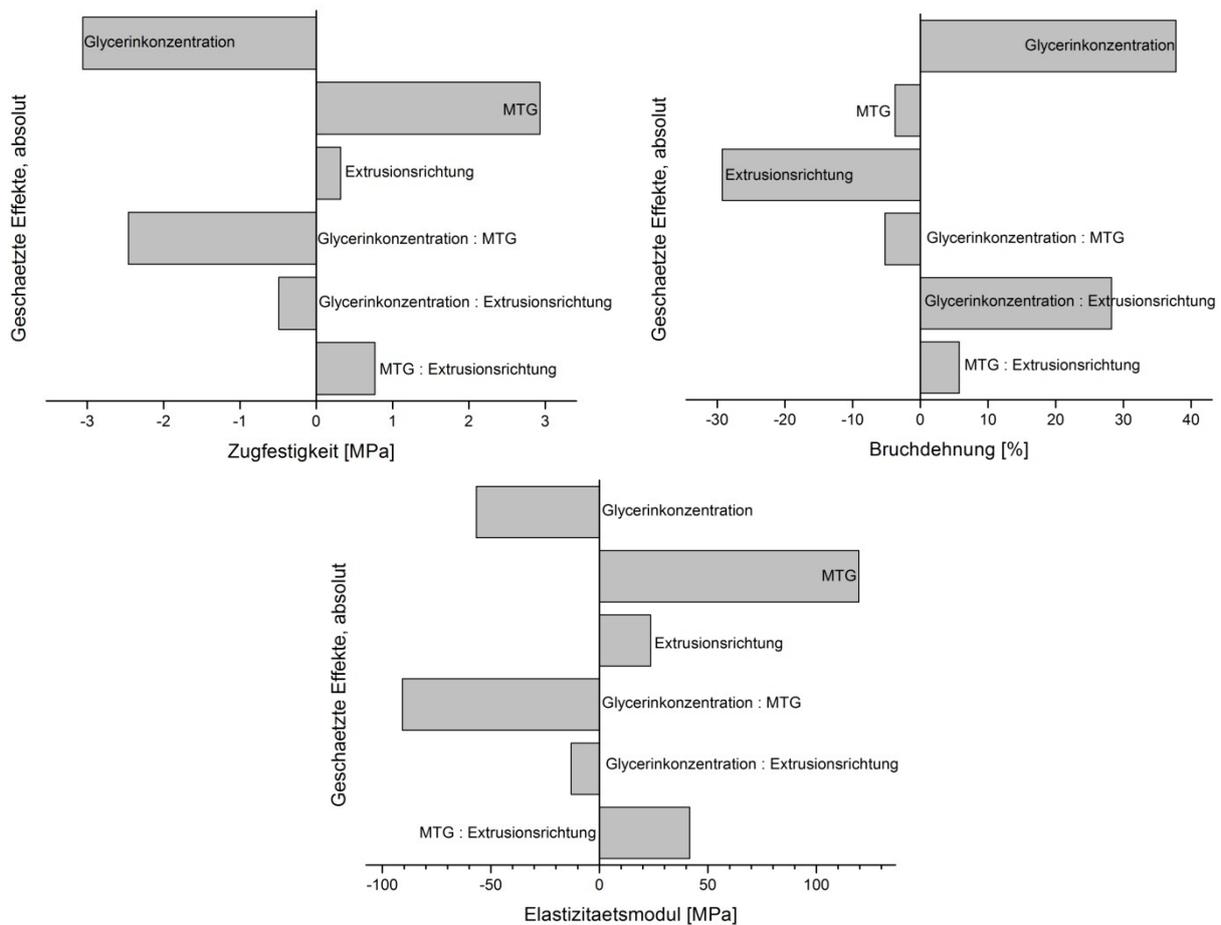


Abb. 5.32: Effektdarstellung der 2^3 -Faktorenversuchsplanung als Pareto-Diagramm für die Zielgrößen: Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul

Bei Betrachtung der Effektschätzung auf die Zugfestigkeit kann festgestellt werden, dass eine enzymatische Proteinquervernetzung mit einer geschätzten Verbesserung der Zugfestigkeit um 2,93 MPa den größten Positiveinfluss auf die Zielgröße darstellt. Auf der anderen Seite tragen eine Erhöhung der Glycerinkonzentration und die Wechselwirkung von Glycerinkonzentration und MTG maßgeblich zu einer geschätzten Verschlechterung der Zugfestigkeit bei.

Im Rahmen der Einflusserschätzung auf die Zielgröße „Bruchdehnung“ ist bezüglich der Erhöhung des Glyceringehaltes eine im Vergleich mit der Zielgröße „Zugfestigkeit“ gegensätzliche Entwicklung auszumachen. Eine Erhöhung des Glyceringehaltes in den Folien auf 25 Gew.% führt zu einer geschätzten Erhöhung der Bruchdehnung um 37,75 %. Einen negativen Einfluss übt wiederum die Extrusionsrichtung aus, da quer entnommene Probenstreifen eine geschätzte geringere Bruchdehnung von 29,25 % nach sich ziehen. Zusätzlich kann die Wechselwirkung von Glycerinkonzentration und Extrusionsrichtung als signifikanter Positiveinfluss identifiziert werden.

Den größten Einfluss auf eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls zeigt die Verwendung von MTG, welche den Elastizitätsmodul um geschätzte 119,6 MPa erhöht. Dem gegenüber steht die Wechselwirkung der Effekte Erhöhung des Glycerinanteils in

Kombination mit Zugabe von MTG, die zu einer geschätzten Abnahme des Elastizitätsmoduls von 90,72 MPa führen. Zudem wirkt sich auch eine Erhöhung des Glyceringehaltes deutlich negativ auf die Zielgröße aus.

Zuletzt wurde der Einfluss unterschiedlicher Düsentemperaturen und einer enzymatisch katalysierten Proteinquervernetzung auf die mechanischen Kennwerte der hergestellten Folien ermittelt. Für diesen Zweck wurde der in [Tab. 5.4](#) dargestellte 2²-Faktorenversuchsplan entwickelt.

Tab. 5.4: 2²-Faktorenversuchsplan mit den Einflussgrößen Düsentemperatur (T_D) und MTG

Versuch [Nr.]	Kombination [-]	Versuch [-]	Zielgrößen		
			Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]	E-Modul [MPa]
1	A ₁ :B ₁	C02-L-2	6,15	90	74,19
2	A ₂ :B ₁	C02-L	5,08	78	104,08
3	A ₁ :B ₂	C12	11,74	78	289,62
4	A ₂ :B ₂	C05-L	10,66	91	223,89

In der Spalte „Kombination“ sind die Einflussgrößen „Düsentemperatur“ (A) und „Zugabe von MTG“ (B) dargestellt. Die Indices stellen auch in diesem Fall unterschiedliche Ausprägungen beziehungsweise Niveaus dar, die sich wie folgt ergeben:

A₁ $T_D = 55 \text{ °C}$, B₁ - MTG,
A₂ $T_D = 75 \text{ °C}$, B₂ + MTG.

Als Ergebnis der mehrfaktoriellen Regressionsrechnung sind in [Abb. 5.33](#) die Schätzungen der absoluten Effekte der Einflussgrößen auf die jeweilige Zielgröße dargestellt.

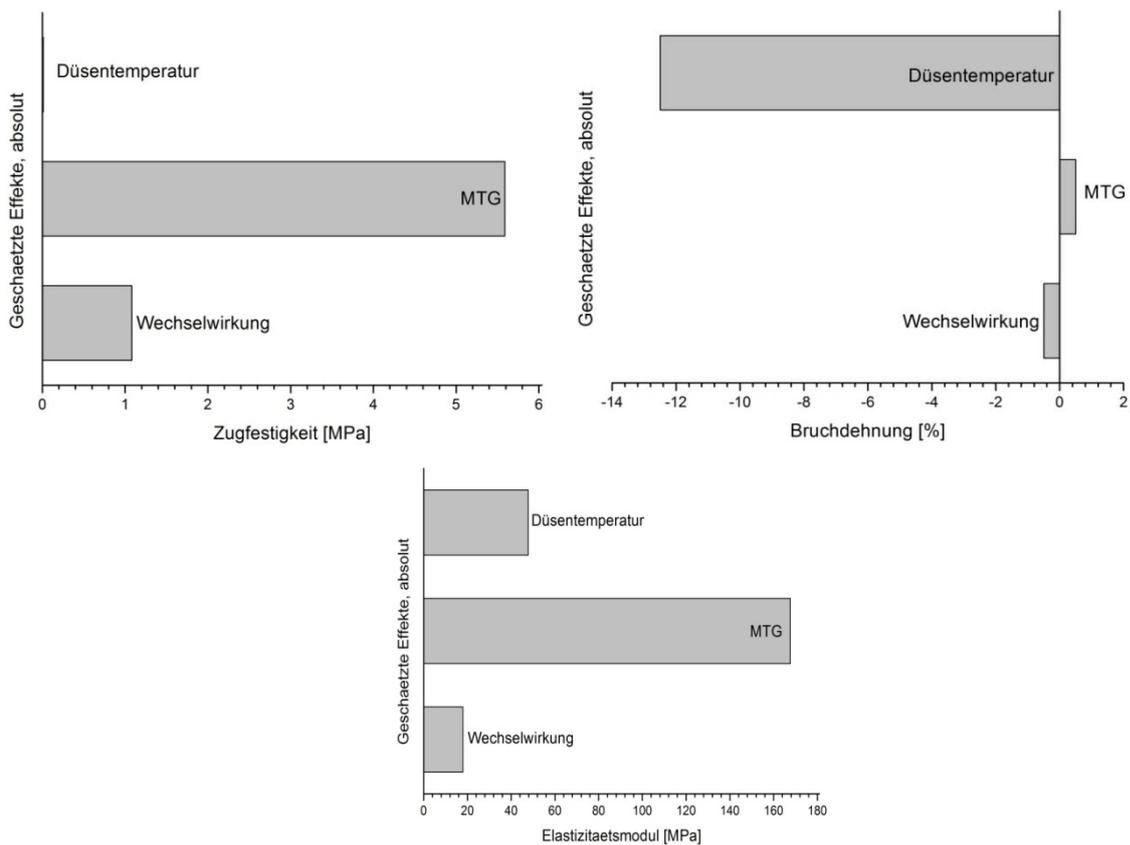


Abb. 5.33: Effektdarstellung der 2^2 -Faktorenversuchsplanung als Pareto-Diagramm für die Zielgrößen: Düsentemperatur und MTG

Dabei ist zu erkennen, dass eine enzymatische Quervernetzung einen deutlich positiven Einfluss auf die Zugfestigkeit sowie auf den Elastizitätsmodul ausübt. Es konnte ein Anstieg der Zugfestigkeit von 5,59 MPa und eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls um 167,62 MPa geschätzt werden.

Zudem wurde festgestellt, dass eine Erhöhung der Düsentemperatur zu einer signifikanten Verschlechterung der Bruchdehnung um geschätzte 12,5 % beiträgt, wohingegen kein Einfluss auf die Zugfestigkeit ausgemacht werden konnte. Den jeweiligen Wechselwirkungen aus Düsentemperatur und MTG kommt in diesen Fällen keine große Bedeutung zu.

6 Diskussion der Ergebnisse

6.1 Interpretation der Ergebnisse

6.1.1 Herstellungsverfahren

6.1.1.1 Lösungsmittelverfahren

Die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf die filmbildenden Eigenschaften, die Zusammensetzung und die funktionalen Eigenschaften waren für die Übertragung auf einen kontinuierlichen thermoplastischen Herstellungsprozess von essentieller Natur. Die Überführbarkeit der Proteine in Lösung und die filmbildenden Eigenschaften von NaCas, Gelatine und Erbse haben praktische Bestätigung gefunden. Art und Konzentration der Weichmacher wurden in Hinblick auf die favorisierten Endprodukteigenschaften optimiert und dienten als Grundlage für die Gestaltung und Auslegung der Rohstoffaufbereitung und der Extruderzuführungssysteme.

Der Vergleich von mechanischen und optischen Eigenschaften aus dem Lösungsmittelverfahren mit extrudierten Folien erlaubte Rückschlüsse auf strukturelle Veränderungen in hochviskosen Medien unter Einfluss hoher Druck-, Temperatur- und Scherhältnisse und wird in den nachfolgenden Abschnitten erörtert. Darüber hinaus erwiesen sich die intensiven Voruntersuchungen zum Lösungsmittelprozess zweckdienlich für die Modifikationsverfahren, deren prinzipielle Eignungen, Praktikabilitäten und Optimierungspotenziale zunächst auf Basis des Gießverfahrens evaluiert wurden. Insbesondere der gezielte Einbau kristalliner Substanzen profitierte von dem etablierten, streuungsarmen (robusten) Verfahren durch eine hohe statistische Absicherung der Effekte in Größe und Richtung.

Die Ergebnisse sind insgesamt im hohen Maße mit der existierenden Literatur vergleichbar [Cha06, Sie99, Shi98, Gue96, Kro02, Che02, Vir00, Deb98, Gui95, Kes86, May94]. Der Gießfolienprozess lieferte gute, qualitativ hochwertige Ergebnisse bezüglich der mechanischen und sensorischen Eigenschaften, ist aber in Hinblick auf eine massenproduktionsfähige Umsetzung, aufgrund der sehr kleinen Outputmengen und langen Durchsatzzeiten, des diskontinuierlichen Charakters und der begrenzten Formgebungsvielfalt ungeeignet und ineffizient.

6.1.1.2 Thermoplastisches Verfahren

6.1.1.2.1 Anlagen- und Verfahrenstechnik

Hinsichtlich der verfahrenstechnischen Aufgabe bestand zunächst die Notwendigkeit der Auswahl eines technischen Verfahrens, dass der Zielstellung der vorliegenden Arbeit zweckdienlich war. In Anlehnung an die Anlagen- und Verfahrenstechnik der

traditionellen polymerverarbeitenden Industrie und den Fortschritten von wissenschaftlicher Forschung und deren praktischer Umsetzungen auf dem Gebiet einer thermoplastischen Verarbeitung von Proteinen wurde ein kontinuierliches Verfahren auf Basis einer Extrusion entwickelt und optimiert. Für die Auswahl des Extrudertyps haben vor allem produktspezifische Charakteristika, in Form materialtechnischer Anforderungen an Prozessgrößen (z. B. Temperatur, pH-Wert, Konsistenz und Reaktionsbedingungen) Berücksichtigung gefunden. Im Rahmen einer funktionalen Analyse des Extrusionsprozesses erfolgte ein systematischer Abgleich der Realisierbarkeit der notwendigen Einzelverfahrensschritte in Anlehnung an die Parameter des Lösungsmittelverfahrens. Die Wahl fiel auf einen gleichläufigen Doppelschneckenextruder, der in Verbindung mit einer Schlitzdüse und einer Film- und Bandabzugseinheit eine kontinuierliche Produktion von Folienbahnen bewerkstelligte.

Ein Doppelschneckenextruder besitzt wesentliche Vorteile für die Verarbeitung proteinogener Materialien im Vergleich zu einem Einschneckensystem, die dessen Verwendung einen prädestativen und teilweise obligatorischen Stellenwert verleihen. Für die Zielstellung der Arbeit waren dabei vorrangig die folgenden Vorzüge von Bedeutung:

- Sehr gute Zuführungs- und Fördercharakteristik,
- Sehr gute Kompoundierung und Wärmeübertragung,
- Enge Verweilzeitverteilung,
- Gute Kontrolle über die Massetemperaturen und die Verweilzeiten,
- Gute Ausstoßstabilitäten,
- Eignung für eine reaktive Extrusion sowie Gewährleistung einer effizienter Belüftung und Entgasung sowie
- Hohe Flexibilität und Modularität hinsichtlich Einstell- und Prozessgrößen.

Die hervorragende Zuführungscharakteristik des gewählten Anlagentyps erlaubte die Zuführung der Proteine in feiner Pulverform und vermied damit Aufbereitungsschritte der gelieferten Rohstoffe. Die sehr gute Mischcharakteristik gewährleistete darüber hinaus das effiziente Einmischen von Hilfs- und Füllstoffen in Form von Lösungsmitteln, Weichmachern und Enzymen und sorgte für deren rasche Homogenisierung. Die positive Förderwirkung garantierte auch bei einem niedrigviskosen Extrudat infolge eines vergleichbar hohen Bedarfs an Lösungsmittel einen adäquaten Stofftransport ohne Schlupfverhalten, der bei Bedarf die Zuführung von Fetten und Ölen in vergleichsweise hohen Konzentrationen ermöglicht, die der gezielten Optimierung der Endprodukteigenschaften dienlich sein können. Darüber hinaus gewährleistete die gute Wärmeübertragung durch die größere Fläche eines Doppelschneckenextruders in Kombination mit einer sehr engen Verweilzeitverteilung die notwendige Kontrolle über die thermo-sensitive enzymatisch katalysierte Quervernetzungsreaktion. In

Hinblick auf die genannten Kriterien erwies sich die Auswahl der Anlagentechnik als überaus geeignet und zweckmäßig. Individuelle Einstell- und Prozessgrößen werden in den nachfolgenden Kapiteln einer interpretativen gerätespezifischen Analyse unterzogen.

6.1.1.2.2 Extruderhardware und funktionale Prozessanalyse

Für die Ergebnisdiskussion der durchgeführten Extrusionsversuche bietet sich eine funktionale Prozessanalyse der verschiedenen Verfahrenszonen und ihrer jeweiligen anlagen- und prozessspezifischen Auslegung an. Die Verfahrensschritte sind miteinander gekoppelt und bedingen daher eine abhängige Betrachtungsweise und Analyse der Grundoperationen. Eine zufriedenstellende Abhandlung der verfahrenstechnischen Problemstellung wird durch unzureichende Informationen über die rheologischen und thermodynamischen Eigenschaften proteinogener Materialien erschwert. Durch die komplexe molekulare Struktur, heterogene intermolekulare Interaktionen, Proteinkettenverflechtungen und Bindungen kovalenter Natur sowie prozesstechnologisch bedingte Strukturänderungen in Form von Disaggregation, Denaturierung, Dissoziation und Neuausrichtung des Proteinsystems besonders in Bereichen starker Zustandsänderungen musste daher zum jetzigen Forschungsstand auf umfangreiche Modelluntersuchungen und Versuche zurückgegriffen werden. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse wurden nachfolgend aus funktionaler Sicht interpretiert, mit praktischen Aspekten unterlegt und erheben den Anspruch auf anlagen- und verfahrenstechnische Ansätze für die praktische großtechnische Umsetzung.

Materialzuführung und Einzugszone

Für die Gewährleistung einer kontinuierlichen Rohstoffzuführung wurden ausschließlich Direktdosierungsvorrichtungen gewählt, welche die Fest- und Flüssigkomponenten direkt der Doppelschnecke in der Extrudereinzugszone zugeführt haben. Die Dosierung der Feststoffe erfolgte gravimetrisch, die der Flüssigkomponenten volumetrisch. Erstere regelte den Materialfluss des Proteins mit konstantem Gewicht pro Zeiteinheit. Die Erfassung des Gewichtes erfolgte über ein Wägemodul und erlaubte damit eine kontinuierliche Kontrolle und vollständige Überwachung durch Kopplung an einen Regelkreis. Dies garantierte zum einen eine hohe Prozessqualität durch präzise Dosierung in den gewünschten Verhältnissen ohne Materialakkumulation im Einfülltrichter, eine exakte Steuerung des Durchsatzes unabhängig von der Extruderdrehzahl sowie die Möglichkeit einer Dokumentation des Materialgehaltes im Endprodukt. Zum Zweiten trug das sog. „starve feeding“ durch die Verwendung eines gravimetrischen Feststoffdosierers in Verbindung mit einem Einfülltrichter, deren Funktionsweisen schematisch in [Abb. 6.1](#) und im Einsatz in [Abb. 4.4](#) und [Abb. 4.10](#) zu sehen sind, zur Vermeidung der in Vorversuchen festgestellten Materialflussproblematik pulverförmiger Proteine bei.

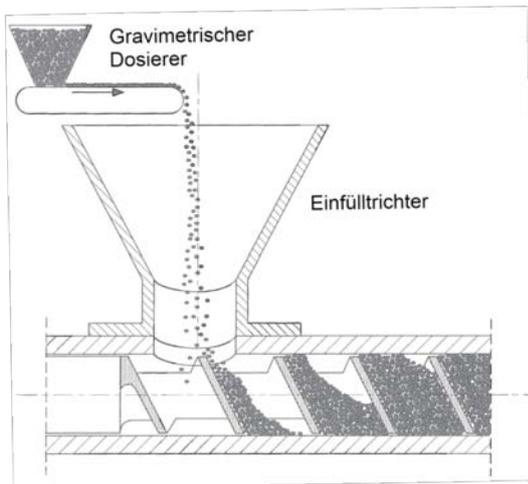


Abb. 6.1: Gravimetrische Dosierung unter Verwendung eines konischen Einfülltrichters, schematische Darstellung (in Anlehnung an Rauwendaal, 2001 [Rau01a])

Die vergleichsweise schlechten Fließeigenschaften aufgrund des hygroskopischen Charakters der Proteinsysteme können zu unerwünschten Effekten, wie Brückenbildung, Kanalisierung und Stagnation führen, die wiederum Dosierungenauigkeiten bis hin zum kompletten Funktionsverlust des Zuführungssystems bedingen können. Der Anspruch an eine geeignete und wirtschaftliche Dosierlösung für die Flüssigkomponenten Lösungsmittel und Weichmacher resultierte in der Wahl volumetrischer, rotierender Verdrängerpumpen, wie den Abb. 4.4 und Abb. 4.10 (rechts) entnommen werden konnte. Die Ermittlung der entsprechenden gravimetrischen Dosierleistungen erfolgte in Kalibriervorgängen, bei denen innerhalb einer definierten Zeiteinheit Proben entnommen und gewogen wurden. Diese konnten anschließend in ein Verhältnis zur Feststoffdosierung gesetzt werden. Dieses Verfahren bot zwar keine direkte Rückmeldung des Gewichtes, was bei Konstanz der Zusammensetzung und der Umgebungsvariablen (vorrangig der Temperatur) aber nicht von Belang war.

Die beschriebene Auslegung der Materialzuführung erwies sich im hohen Maße für das verwendete Stoffsystem durch eine verlässliche und präzise Dosierung der Rohstoffe in die Einzugszone des Extruders als geeignet. Die darauffolgenden Einzugsvorgänge sind volumenbestimmt und waren entsprechend der gewünschten Förderkapazität auszulegen, die wiederum Abhängigkeiten vom freien Schneckenvolumen (Gangtiefe und Gangzahl), der Gangsteigung, der Drehzahl und der Produktdichte aufwies. Es existieren in der Literatur zwar empfohlene Auslegungen für die Einzugszone basierend auf simulativen Untersuchungen und praktischen Erfahrungen für Rohstoffe gängiger synthetischer Plastiken, dennoch waren vielfache Kompoundierungs-Vorversuche erforderlich, um die Hauptaufgaben der Einzugszone – Förderung und Verdichtung – mit wünschenswerten Ergebnissen in Form der beschriebenen Versuchsdurchführung umsetzen zu können [Rau01, Rau01a, Koh07, Gil05].

In Hinblick auf den Gesamtprozess konnten durch die beschriebenen Maßnahmen, insbesondere durch die Wahl einer dosierten Rohstoffzuführung, die Druckverhältnisse auf einem moderaten Niveau gehalten werden. Dies verringerte die Wahrscheinlichkeit und Häufigkeit einer Agglomeratbildung in den Folgezonen und resultierte in einer merklichen Verbesserung der Misch- und Homogenisierungsleistung des Extruders hinsichtlich der verwendeten Stoffsysteme, wie die positive Entwicklung der Mischgüte in der 2-zonigen Darstellung bei Öffnung des Extrudergehäuses gemäß Abb. 5.2 erkennen lässt.

Plastifizier- und Mischzone

Nach erfolgtem Materialeinzug und Verdichtung trat das Gemisch aus Proteinen, Weichmacher und Lösungsmittel in die Plastifizierzone ein, die bei konventionellen Extrusionsprozessen das Aufschmelzen des Polymers als Hauptaufgabe zu erfüllen hat. Das vorliegende Proteingemisch wurde in dieser Zone durch die gemeinsame Wirkung von Lösungsmittel und Weichmacher sowie der Zuführung von Wärme zu einer weichen, gummiartigen Masse durch Überschreitung der Glasübergangstemperatur gemäß Abb. 2.3 weiterverarbeitet. Dabei verlor das Protein seine ursprünglich pulverförmige Konsistenz und agglomerierte partiell, die Extrudatdichte stieg an und es kam zu einem Druckaufbau im Gehäuse. In dieser Region spielten Schermechanismen eine dominante Rolle. Die durch die Schneckenrotation verursachten Scherkräfte waren in dieser Zone für den Temperaturanstieg in den Bereich zwischen ca. 47 und 55 °C verantwortlich. In Hinblick auf eine hohe Energieeffizienz erfolgte die Konzentrationseinstellung an Lösungsmittel und Weichmacher in einem Maße, bei dem der Glasübergang bereits bei Raumtemperatur erfolgte. Dementsprechend konnte in dieser Zone auf die externe Zuführung von Wärme durch das Extrudergehäuse verzichtet werden.

Neben der Plastifizierung übernimmt die Zone auch entscheidende Aufgaben des Mischens und Homogenisierens. Die Mischwirkung konventioneller Fördererlemente ist allerdings stark begrenzt. Daher wurden dispersive Knetelemente installiert, um Feststoffpartikel zu zerteilen und vorhandene Agglomerate zu beseitigen. Für beide verwendeten Extruder kamen Knetelemente zum Einsatz, die sich durch den Versatzwinkel unterschieden. Zwei förderneutrale Knetelemente mit einem 90° Versatzwinkel (siehe Abb. 4.3) sorgten in Extruder A für stark ausgeprägte distributive Mischeffekte und dispersive Schereffekte, die von Versatzwinkel, Scheibenanzahl und Scheibenbreite abhängen [Koh07]. Im Vergleich dazu wurde für Extruder B ein Schneckenmodul mit Knetscheiben ausgestattet, die einen Versatzwinkel von 45° besaßen. Das in Abb. 6.2 dargestellte Element zeichnet sich durch eine positive Förderwirkung aus, weist aber andererseits durch den kleineren Versatzwinkel geringere distributive und dispersive Mischeffekte auf.

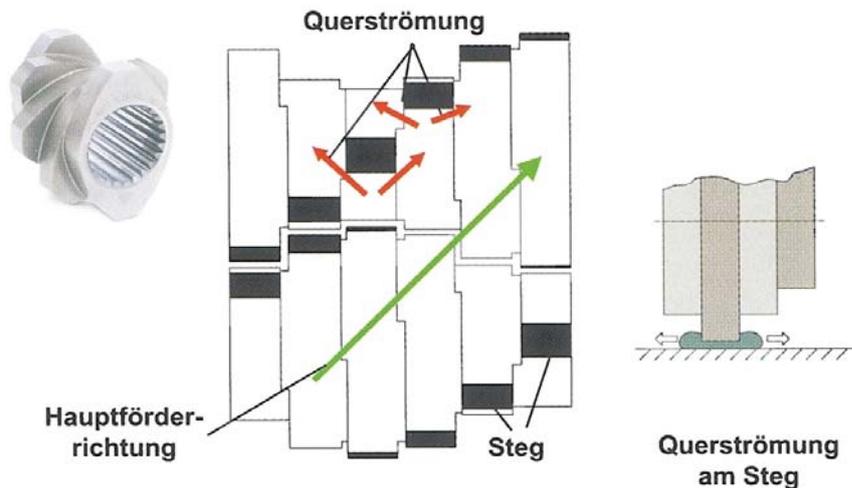


Abb. 6.2: Aufbau und Funktionsweise eines Knetelements, distributives Mischen durch Querströmung [Rau01a, Koh07]

Bei der Extrusion eines Proteinsystems ist die dispersive Mischleistung entscheidend, die wie beschrieben Feststoffteilchen, Agglomerate, Flüssigkeitstropfen oder Gasblasen zerteilt bzw. aufbricht. Im Gegensatz dazu findet bei einem distributiven Mischen eine reine Verteilung von Masseteilchen im Volumen statt. Dies ist von Bedeutung, wenn eine Vermischung von zwei Proteinsystemen erfolgen soll oder die Einmischung löslicher Additive sowie nicht agglomerierter Füllstoffe vorgesehen ist. Da ausschließlich Ein-Protein-Systeme untersucht wurden und im Falle einer reaktiven Extrusion das Enzym bereits vorgelöst mit dem Flüssigkeitsstrom zugeführt wurde, waren keine Maßnahmen zur Erhöhung der distributiven Mischleistung des Extruders A erforderlich. Aus diesem Grunde wurden zudem breite Knetscheiben verwendet, da diese eine ausgeprägte disperse Wirkung besitzen. Dies ist dadurch begründbar, dass mit zunehmender Scheibenbreite die Wahrscheinlichkeit steigt, dass Partikel in den Scherspalt zwischen Knetscheibe und Gehäusewandung gezwungen und wie in Abb. 6.2 (rechts) ersichtlich einer intensiven Scherung ausgesetzt werden. Die Schneckenkonfiguration von Extruder B wurde neben den beschriebenen Knetelementen zusätzlich mit Mischelementen ausgestattet, deren dispersive, scherintensive Mischanteile im Vergleich zu den Knetelementen vernachlässigbar gering waren. Eine rein verfahrenstechnische Notwendigkeit für deren Einsatz im Rahmen einer Standardextrusion lag nicht vor. Stattdessen lag dieser Umstand in den spezifischen Anforderungen einer reaktiven Extrusion begründet. Intensive Scherung führt zu deutlich ansteigenden Temperaturverhältnissen im Extruder und kann bei Überschreitung einer kritischen Temperatur von ca. 60 °C (siehe dazu auch Abb. 3.4) zu einer Inaktivierung des Enzyms MTG und damit eine komplette Unterbindung der Quervernetzungsreaktion zur Folge haben. Diese Variable in Verbindung mit einem nicht vorhandenen Kühlsystem des Extruders B bedingten den Verzicht auf weitere scherintensive Knetelemente und führte zur Dominanz förderneutraler Turbinen-

mischelemente (TME) in der Plastifizier- und Mischzone von Extruder B, deren schematischer Aufbau in [Abb. 6.3](#) zu sehen ist.

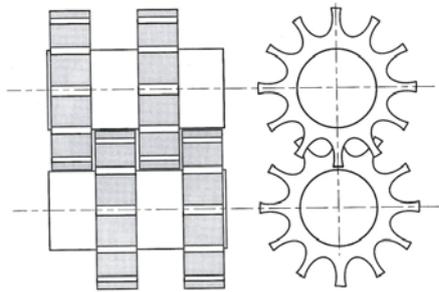


Abb. 6.3: TME-Element mit steigungslosen Ringen und gefrästen Lücken, schematische Darstellung (in Anlehnung an Rauwendaal, 2001 [Rau01a])

Diese förderneutralen Mischelemente sind stets vollständig gefüllt und müssen von stromaufliegenden Elementen überfahren werden. Eine höhere effektive Länge des Extruders kompensiert die vergleichsweise geringe dispersive Mischleistung in geeigneter Weise. Durch diese Maßnahmen wurde ein optimales Reaktionsniveau für die Proteinquervernetzung zwischen 48 und 55 °C geschaffen.

Die Schneckengeometrie wurde von gegenfördernden Abstauerelementen abgerundet, die eine Trennung von Verfahrenszonen in axial offenen Systemen, wie es bei den beiden verwendeten gleichsinnig drehenden und dichtkämmenden Extrudern der Fall war, ermöglichten. Mit dieser Maßnahme konnten durch vollständig gefüllte Bereiche abgedichtete Entgasungszonen für die Abführung volatiler Bestandteile im Extrudat geschaffen werden. In diesen Zonen erfolgte an Extruder B eine Entgasung über Vakuumpumpen. In der Entgasungszone kamen teilgefüllte Gewindeelemente zum Einsatz, um einerseits eine möglichst große Extrudatoberfläche für die Entgasung zur Verfügung zu stellen und andererseits einen Produktaustrag in den Entgasungsdom zu vermeiden.

Förder- und Druckaufbauzone

Die Förderzone begann an dem Punkt, wo eine vollständig homogene und plastifizierte Proteinmasse durch die beschriebenen Maßnahmen in der Plastifizierungs- und Mischzone entstanden war. Sie gewährleistete den Transport des Extrudates von einer Verfahrenszone zur nächsten und war damit ebenfalls ein integraler Bestandteil der o. g. Einzugs-, Plastifizierungs- und Mischzone. Optische Begutachtungen des Extrudates nach dem Aufklappen des Gehäuses bzw. dem Ziehen der Schnecke zeigten bereits in Zone 8 bei Extruder A und B eine vollständige Plastifizierung. Druckaufbauzonen befanden sich vor jedem abstauenden Schneckenelement sowie in der Extruderaustragszone. In letzterer musste der durch das Werkzeug verbrauchte Druck erzeugt werden. In der Druckaufbauzone war durch eine stärkere Rückströmung der plastifizierten Proteinmasse über die Schneckenkämme ein er-

höherer Energieeintrag von Nöten. Um den übermäßigen Energieeintrag zu vermeiden und dem Werkzeug (Schlitzdüse) einen konstanten Massenfluss ($\pm 1\%$ Fluktuation) und damit eine hohe Ausstoßstabilität zur Verfügung zu stellen, erfolgte an Extruder B die Installation einer Zahnradpumpe, die einen deutlich höheren Pumpwirkungsgrad als der Doppelschneckenextruder selbst besaß. Negativeffekte äußerten sich in seltenen Fällen durch das Austragen thermisch zersetzten Materials. Als Schmiermittel verblieben kleine Mengen plastifizierten Proteins für längere Zeit in der Zahnradpumpe und zeigten Zersetzungserscheinungen durch den Temperatureinfluss.

Formgebung

Für die Formgebung des Extrudates wurde eine Schlitz- bzw. Filmdüse verwendet. Die im Extruder thermomechanisch verarbeitete und plastifizierte Proteinmasse wurde an beiden Extrudern mit einer in [Abb. 6.4](#) dargestellten Fischeschwanzdüse in Folienform überführt. Die [Abb. 5.3](#), [Abb. 5.4](#) und [Abb. 4.11](#) zeigten die Düsen und das Produkt im laufenden Betrieb.

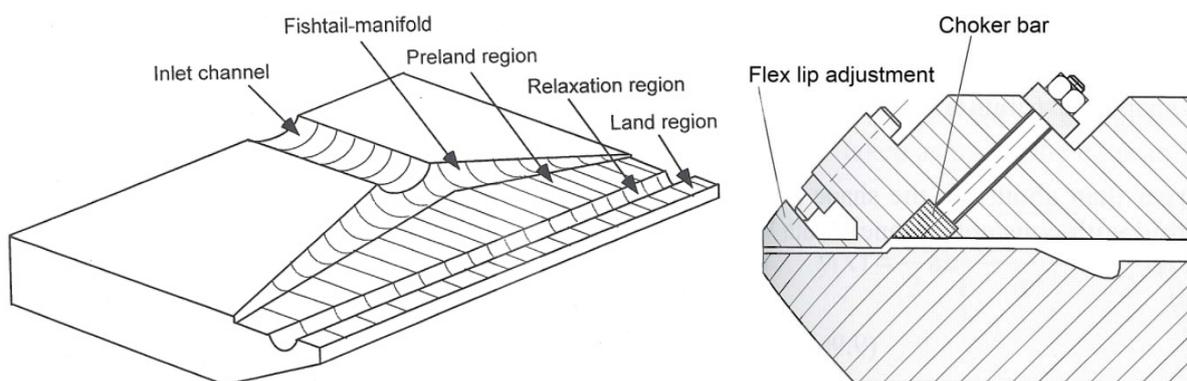


Abb. 6.4: Fischeschwanzdüse in geöffneter Ansicht (links) und geschlossener Seitenansicht (rechts), schematisch mit Bezeichnung der Funktionsbereiche (in Anlehnung an Rauwendaal, 2001 [Rau01a])

Die verwendeten Düsen zeichneten sich durch eine ausreichend homogene Verteilung der plastifizierten Proteinmasse aus, wenngleich der Erreichung einer uniformen Verteilung ein Einstellungsaufwand vorgeschaltet war, der eine kontinuierliche Anpassung bei veränderter Extrudatbeschaffenheit bei der Modifikation von Prozessparametern nach sich zog. Inhomogenitäten äußerten sich vor allem durch differierende Foliendicken, ungleichmäßiges Ablösen der Folie von der Düsenlippe, partielles Abreißen des Produktstromes und die dementsprechende Bildung von Fehlstellen in den Folien. Die notwendige Einstellung des Fließverhaltens erfolgte über die Veränderung der Geometrie des Fließkanals durch die Feinjustierung ($\pm 0,8$ mm) der Düsenlippe einerseits sowie durch die Anpassung der Fließkanalhöhe andererseits, wie aus der [Abb. 6.4](#) (rechts) hervorgeht. Darüber hinaus konnte über die Düsens Temperatur das Fließverhalten des Extrudates kontrolliert werden. Durch den anschließenden Folienabzugsprozess durch einen Kalandrierer wurde Einfluss auf die funktionalen

Eigenschaften der extrudierten Folien genommen, auf den in der analytischen Ergebnisdiskussion (Kapitel 6.1.3) Bezug genommen wird.

6.1.2 Thermoplastische Verarbeitung von Proteinen

Während der thermoplastischen Verarbeitung von Proteinen konnten zunächst Aggregationseffekte in unmittelbarem Anschluss an den Erstkontakt des Proteinpulvers mit dem Flüssigkeitsgemisch in der Einzugszone des Extruders beobachtet werden. Dies kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Ausbildung hydrophober und ionischer Bindungen zurückgeführt werden, welche eine Löslichkeitsabnahme der Proteinfraktion bedingten. Misch- und Knetelemente führten anschließend im Zusammenspiel mit ansteigenden Druck-, Temperatur- und Scherverhältnissen zu einer Zerstörung der Proteinagglomerate und zu einer Aufhebung der stabilisierenden niederenergetischen intermolekularen Kräfte, in Folge dessen die Proteine denaturierten und sich entfalteten. In der Plastifizierungszone erfolgte die Transformation zu einer elastischen Proteinmasse, die eine Proteinreorganisation und die Ausrichtung in Fließrichtung sowie ggf. spezifische Vernetzungsreaktionen beinhaltete. Des Weiteren kann unterstellt werden, dass in der Druckaufbauzone eine Kompaktierung des Proteinnetzwerkes stattfand, in Folge dessen die Neuformation vorrangig kovalenter Bindungen und non-kovalenter hydrophober Bindungen während der Formgebung, des Abzugs, der Trocknung und der Kühlung begünstigt wurden. Der Folienabzug unter Spannung führte zu einer molekularen Ausrichtung in Extrusionsrichtung, die durch die direkt anschließende Trocknung fixiert wurde.

Bei der Extrusion von Erbsenprotein gemäß Tab. 4.4 war es nicht gelungen, eine homogene Proteinlösung zu erreichen. Maßnahmen zur Verbesserung der Misch- und Homogenisierungsqualität und zur Erhöhung der mittleren Verweilzeiten führten zwar zu einer deutlichen Änderung der Extrudatzusammensetzung, wie in Abb. 5.6 zu erkennen war, konnten aber nicht zu einer vollständigen Plastifizierung des Erbsenproteins beitragen. Ein weiterführender experimenteller Aufwand mit veränderter Schneckenkonfiguration, einer Vorkonditionierung des Erbsenproteins und angepasster Prozessgrößen wäre notwendig, um eine kontinuierliche Produktion von Erbsenfolien zu erreichen. Nichtsdestotrotz konnten die filmbildenden Eigenschaften, die im Rahmen des Lösungsmittelverfahrens nachgewiesen wurden, durch eine post-extrudale Pressung des Extrudates gezeigt werden. Aus den genannten Gründen waren Folien aus Erbsenprotein kein Bestandteil der analytischen Untersuchungen.

6.1.3 Analytik

6.1.3.1 Optik und Organoleptik

Die optischen Eigenschaften der extrudierten Folien wurden durch die ganzheitliche anlagen- und verfahrenstechnische Prozessauslegung bestimmt und werden im Fol-

genden eigenschaftsspezifisch den verantwortlichen Teilprozessen zugeordnet und analysiert.

Die finalen Produktdimensionen resultieren aus dem Gesamtdurchsatz und wurden zudem durch die Düsenöffnung und den Folienabzug festgelegt. In den durchgeführten Versuchen wurde der Durchsatz mit 4 kg/h an Extruder A und 10 kg/h an Extruder B im Rahmen einer vergleichenden Analyse konstant gehalten. Die Öffnung der Düsenlippe erfolgte manuell in Abhängigkeit von der Extrudatbeschaffenheit, um einen homogenen Extrudatfluss zu gewährleisten und wurde nach dem Einfahrprozess weitgehend konstant gehalten. Aus diesen Gründen basierten die Foliendimensionen primär auf dem Folienabzug, der die extrudierten Folien unter Spannung abzog und sich nachgeschaltet für die Prozessschritte Kühlung und Verfestigung verantwortlich zeigte. Die Geschwindigkeit des Abzugs bestimmte damit die Foliendicke und Breite, die mit zunehmender Spannung eine Reduzierung erfahren haben. Neben den in [Abb. 6.5](#) (rechts) dargestellten Einfluss des Folienabzugs, waren auch Schwell- und Anhäufungsprozesse ([Abb. 6.5](#) (links)) am Düsenaustritt für eine geometrische Beeinflussung ursächlich.

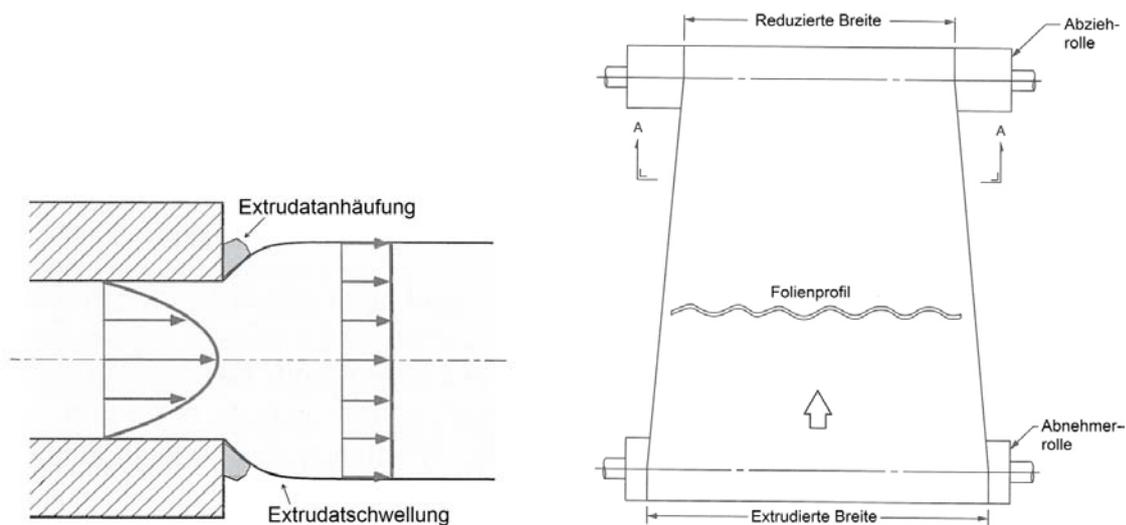


Abb. 6.5: Effektwirkungen von Extrudatschwellung und -anhäufung am Düsenaustritt mit Geschwindigkeitsprofil (links) und Geometrieänderung der Folien durch eine Abzugsvorrichtung (rechts) [Rau01a, Haw03]

Die Foliendicke war stark von der Dehnfähigkeit des Extrudates abhängig. Bestrebungen, die Foliendicke durch eine Erhöhung der Abzugsgeschwindigkeit weiter abzusenken, führten zu einem Abreißen des Extrudatstromes zwischen Düse und Abnehmerrolle. Die homogene, glatte Oberflächenbeschaffenheit und Haptik sind auf das verwendete Rollensystem aus poliertem Edelstahl zurückzuführen. Die organoleptischen Ausprägungen, wie Farbgebung, Geruch und Haftverhalten sind hauptsächlich materialspezifisch (Hygroskopizität von Protein und Weichmacher) und in begrenztem Umfang auf strukturelle Veränderungen während Extrusion und Formgebung zurückzuführen. Ästhetische Abwertungen in Form von Luft einschüssen, Gelbfärbung (Fischaugen), Stippen, Verfärbungen entstanden vereinzelt während der

Extrusion. Ursächlich für gasförmige Einschlüsse sind ein Einschleppen von Luft primär durch den Flüssigkeitsstrom und eine unzureichende Entgasung. Fehlstellen in Form von Fischaugen und Stippen entstanden durch partielle Molekulargewichtserhöhungen infolge einer unvollständigen Quervernetzungsreaktion, Materialersetzung, Verunreinigungen und unzureichender Plastifizierung und Homogenisierung. Linienbildungen und Wellungen der Folien traten in Zusammenhang mit dem Abziehvorgang durch das Ablösen der Extrudatanhäufungen am Düsenausgang und einer ungleichmäßigen Abführung der Restfeuchte und anschließender Kühlung auf.

Unter Ausschluss der beschriebenen Einzelfallproblematiken konnten die ästhetischen, optischen und haptischen Anforderungen von Industrie, Handel und Verbrauch, geprägt durch die Gewöhnung an konventionelle synthetische Folien, weitgehend erfüllt werden.

6.1.3.2 Mechanische Eigenschaften

Die Darstellung der mechanischen Eigenschaften der extrudierten Folien zeigte zwei grundsätzliche Trends. Zum einen wiesen extrudierte Folien mit einer hochsignifikanten statistischen Absicherung ($P < 0,001$) deutlich höhere Zugfestigkeiten im Vergleich zu den Gießfolien im Rahmen eines diskontinuierlichen Lösungsmittelverfahrens auf. Zum anderen offenbarte die Extrusion in allen Fällen geringere Bruchdehnung der Produkte mit signifikantem Charakter ($P < 0,01$).

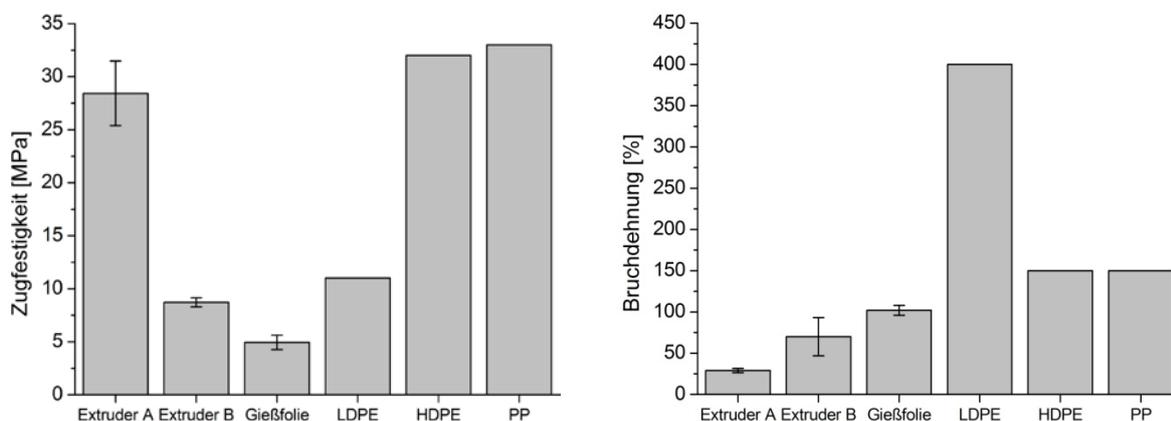


Abb. 6.6: Zugfestigkeiten und Bruchdehnungen ausgewählter Folien aus dem Extrusionsprozess (Extruder A: Versuch 4, Extruder B: C01-L) und Gießprozess (C-K01) im Vergleich mit synthetischen Folien (Werte für LDPE, HDPE und PP aus Crawford, 1998 [Cra98]); $\bar{x} \pm SD$, $n=5$

Des Weiteren gibt die [Abb. 6.6](#) eine Gegenüberstellung der mechanischen Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Folien mit Durchschnittswerten synthetischer Folien wieder, die eine Vergleichsrelevanz durch gemeinsame Schnittmengen mit den angestrebten Absatzmärkten für Proteinfohlen aufweisen. Diese Darstellung verdeutlicht den Fortschritt in der Verbesserung der Zugfestigkeit durch

ein extrusionsbasiertes Verfahren, demonstriert aber auch den Bedarf weiterer Optimierungsbestrebungen hinsichtlich der Bruchdehnungswerte von Proteinfohlen.

Die Intensität und Verteilung von inter- und intramolekularen Kräften bestimmt in hohem Maße die mechanische Leistungsfähigkeit der produzierten Folien. In Anlehnung an die in [Kapitel 6.1.2](#) beschriebenen Veränderungen des Proteinsystems während einer Extrusion wird das Dogma einer strukturellen Stabilisierung des Extrudates durch die bevorzugte Ausbildung kovalenter Bindungen als Begründung für die hohen Zugfestigkeiten der extrudierten Folien herangezogen. Aus der Gruppe der natürlich auftretenden kovalenten Verknüpfungen werden insbesondere Disulfidbindungen, die Bildung von Dehydroalanin und hitzeinduzierte Isopeptidbindungen hinter dem Einfluss auf die dreidimensionale Struktur und der maßgeblichen Kontrolle der Polypeptidkettenflexibilität vermutet. Dafür waren vor allem die hohen Temperaturverhältnisse während der Extrusion ursächlich. Dies steht im Konsens mit den Arbeiten von Singh, 1991, Ghosh *et al.*, 2009 sowie Kleyn und Klostermeyer, 1980, die übereinstimmend vergleichbare Effekte bei Hitzebehandlungen von Proteinen feststellten [Sin91, Gho09, Kle80, Zha06]. Die hergestellten Gießfolien wurden vermutlich vorrangig durch non-kovalente Bindungen stabilisiert, deren Energien aufgrund der stark heterogenen Struktur der Proteine vergleichsweise gering waren. Dieser Umstand ermöglicht auch einen Erklärungsansatz für die Überlegenheit der synthetischen Polymere, deren Bindungsenergien, wie in Tab. 2.2 ersichtlich um ein Vielfaches höher ausfallen.

Die Versuchsergebnisse an Extruder A und B wiesen zudem eine hohe Abhängigkeit vom gefahrenen Temperaturprofil (Abb. 5.10 und Abb. 5.12) und der Probenentnahmerichtung (Abb. 5.12 und Abb. 5.13) auf. Ersteres lässt auf die Hypothese einer strukturellen Extrudatveränderung schließen. In Voruntersuchungen wurde festgestellt, dass die Fließeigenschaften einer konzentrierten Proteinlösung stark von der Temperatur abhängen, deren Zunahme die Viskosität verringert. Dies bedingte wiederum veränderte Druck- und Scherverhältnisse, die Einfluss auf das Denaturierungs- und Entfaltungsniveau der Proteine ausübten und eine veränderte Extrudatdehnung und Abzugscharakteristik bedingten. Eine Verschiebung der Interaktionsbalance zu Gunsten non-kovalenter Bindung könnte daher für die hochsignifikante Abnahme ($P < 0,001$) der Zugfestigkeiten und eine entsprechende Zunahme der Bruchdehnung bei Temperatursenkung an Extruder A verantwortlich sein. Extruder B zeigte hingegen eine geringere Temperatursensitivität. Ein möglicher Einfluss der Scherrate auf die Viskosität wurde in Voruntersuchungen lediglich in Konzentrationsbereichen zwischen 5 und 10 Gew.% NaCas (nicht-newtonsches, dilatantisches Verhalten) festgestellt, während höhere Konzentrationen ein annähernd newtonsches Ver-

halten bei Temperaturen über 20 °C aufwiesen. Eine Analyse mit gleichbleibender Drehzahl konnte diesen Einflussparameter darüber hinaus ausschließen.

Die mechanischen Kennwertedifferenzen zwischen einer Probenentnahme in Extrusionsrichtung und quer dazu werden in der Ausrichtung der Folien auf molekularer Ebene mit anschließender Fixierung in axialer Richtung während des Folienabzuges vermutet, der einen positiven Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Längsproben ausübte. Die Einbeziehung der Elastizitätsmoduln in die Ergebnisdiskussion wurde auf die Bereiche der enzymatischen Quervernetzung (Kapitel 6.1.4.2) und die statistische Charakterisierung (Kapitel 6.1.5) beschränkt und dessen Aussagekraft auf die Ebene einer Trendgrößen- und Richtungsbestimmung reduziert, um Falschinterpretationen zu vermeiden, die in der Fehlerbetrachtung (Kapitel 6.2) eine entsprechende Erläuterung finden.

Die Beschichtung der extrudierten Folien zwischen der Abnehmer- und der Abziehrolle erfolgte mit dem Ziel, die Haftung zwischen Folie und Rollensystem und zwischen den Folien selbst zu reduzieren, um ein Anhaften an den Transportrollen zu verhindern und ein einfaches Abrollen des Produktes von der Folienrolle zu gewährleisten. Dieses Verfahren garantierte eine effiziente Antihafbeschichtung und verbesserte die Handhabung des Extrusionsproduktes deutlich. Die mechanischen Eigenschaften, dargestellt in Abb. 5.13, wurden dabei nur partiell beeinflusst und zeigten bei Proben, die in Längsrichtung entnommen wurden keine signifikanten Unterschiede ($P > 0,05$). Lediglich ein hochsignifikanter Einfluss auf die Zugfestigkeit konnte beobachtet werden ($P < 0,001$). Der Grund für die Beeinflussung wird in der Restfeuchte der extrudierten Folien vermutet, die für einen partiellen Einbau des verwendeten Proteinpulvers in die Oberfläche der Folien verantwortlich war. Das Beschichtungsmaterial konnte nicht vollständig mit angemessenem Aufwand entfernt werden und war damit ein integraler Bestandteil der Proteinfoolie. Die damit geschaffenen Oberflächeninhomogenitäten bedingen eine Schwächung der Kohäsionskräfte und könnten sich für die leichte Abnahme der Zugfestigkeiten und die Zunahme der Bruchdehnung, insbesondere bei quer zur Extrusionsrichtung entnommenen Proben verantwortlich gezeigt haben.

6.1.4 Modifikationen

6.1.4.1 Weichmacher

Die Darstellung der Versuchsergebnisse in [Kapitel 5.3.1](#) brachte im Wesentlichen zwei Erkenntnisse hervor, die für eine kontinuierliche Verarbeitung von Proteinen und für die Endprodukteigenschaften von großer Bedeutung sind.

Zum Ersten war die Zuführung des Weichmachers ein Bestandteil des Glasübergangsprozesses, der zu einer Plastifizierung des Proteinsystems im Extruder führte und somit durch die Absenkung der Glasübergangstemperatur eine energetisch effiziente und damit wirtschaftliche Verfahrensweise ermöglichte. Zum Zweiten war der

Weichmachereinsatz für die Schaffung kontrollierter funktionaler Produkteigenschaften bedeutungsvoll. Verarbeitungstechnische Relevanz konnte primär der Lösungsmittelmenge zugeschrieben werden, deren Minimierung einen Anspruch an die Effizienz des Gesamtprozesses erhebt, da diese nach der Formgebung wieder entfernt werden muss. Deshalb bleibt festzuhalten, dass eine Mindestmenge an Lösungsmittel (ca. 20 Gew.%) für den Plastifizierungsprozess und die Textur des Extrudates von Nöten waren. Die Verwendung von Tris-Puffer garantierte dabei durch die stark weichmachende Eigenschaft des Wasseranteils eine wirkungsvolle Reduzierung der Glasübergangstemperatur auf Raumtemperaturniveau.

Folien erheben für den Großteil ihrer Einsatzbereiche den Anspruch einer angemessenen Flexibilität. Diesem wurde durch den Einsatz von externen, nicht volatilen Weichmachern bereits während der Extrusion Rechnung getragen. Die gewählte Konzentration erfolgte in Anlehnung an den Gießprozess im Labormaßstab, bei dem Verhältnisse zwischen 2:1 und 1,5:1 (Protein : Weichmacher) bezogen auf die trockene Folie in Hinblick auf die Endproduktoptimierung für viele Anwendungsbereiche als geeignet angesehen werden. Einflussrichtung und -größe des Weichmachereinsatzes im Lösungsmittelverfahren und im thermoplastischen Verfahren stellten sich hinsichtlich der Endprodukteigenschaften als vergleichbar heraus und erlaubten daher eine opportune Adaptierung von Art und Konzentration des Weichmachers für die Extrusionsversuche.

Der Einsatz von Glycerin erwies sich verarbeitungs- und produkttechnisch als geeigneter, effizienter und langzeitstabiler Weichmacher. Erwartungsgemäß zeigten die mechanischen Eigenschaften eine deutliche Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration, die unabhängig vom Herstellungsverfahren zu einer Reduzierung der Zugfestigkeiten bei gleichzeitiger Verbesserung der Bruchdehnungen führte. Repräsentative Tendenzen dazu waren der Abb. 5.11 zu entnehmen. Der sichtbare Einfluss kann mit der allgemeinen Funktionsweise des Weichmachers hinreichend genau erklärt werden, der wie in [Kapitel 2.3.1.2](#) hypothetisch beschrieben die intermolekularen Kräfte der Proteinfole schwächt, das freie Volumen erhöht und damit die Kettenmobilität steigert. Die Verwendung von Glycerin bedingte zum einen durch die vorhandenen Hydroxylgruppen, die zur Ausbildung zusätzlicher Wasserstoffbrückenbindungen führten und zum anderen durch die ausgeprägte Hygroskopizität eine Verstärkung des weichmachenden Effektes. Negativfolgen des Weichmachers Glycerin lassen sich primär durch ein für Abzugs- und Verpackungsprozesse unvorteilhaftes Hafteffekt benennen, der aber wie beschrieben durch Beschichtungen minimiert werden konnte.

Die Verwendung von PEG 300 als Weichmacher erwies sich hinsichtlich der Ausbildung einer Filmstruktur als nicht geeignet. Es wird vermutet, dass das relativ hohe Molekulargewicht eine vollständige Integration in das Proteinnetzwerk im untersuchten Konzentrationsbereich verhinderte. Diese Inkompatibilität führte zu einer teilwei-

sen Phasenseparation und bedingte eine gummiartige Proteinmasse ohne kohäsive Integrität und damit ohne ausreichende Eignung zur Bildung alleinstehender Filme. Dies stellt eine Übereinstimmung mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen dar, die vergleichbare Phänomene mit anderen Proteinsystemen feststellten [Rou06, Cao09, Jan99].

6.1.4.2 Enzymatische Quervernetzung

Die Nutzung eines Extruders als Bioreaktor durch die Integration einer enzymatischen Proteinquervernetzung zur gezielten Optimierung der Extrudatstruktur und vor allem der funktionalen Folieneigenschaften zeigte vielversprechende Ergebnisse, die in [Kapitel 5.3.2](#) präsentiert wurden.

Die Versuche an Extruder A besaßen den Charakter einer Machbarkeitsstudie, die einen positiven Verlauf zeigte. Die Gründe für eine erfolgreiche Prozessintegration sind zunächst in der Schaffung der optimalen Reaktionsbedingungen für das Enzym MTG zu suchen, ohne diese eine Reaktion nicht oder nicht vollständig stattfinden konnte. Die in [Abb. 3.4](#) grafisch dargebotenen Reaktionsbedingungen wurden durch die folgenden verfahrenstechnischen Maßnahmen sichergestellt. Eine Schneckenkonfiguration mit hoher Mischleistung bei gleichzeitig geringer Scherwirkung sorgte für ein moderates Temperaturniveau unterhalb 60 °C in der relevanten Plastifizier- und Mischzone des Extruders. Die Verwendung von Tris-Puffer, pH 7 als Lösungsmittel stellte ein konstantes pH-Wert-Niveau während der Reaktion sicher. Die Vorlösung des Enzymes im Flüssigkeitsstrom garantierte eine effiziente Erreichbarkeit der reaktiven Aminosäuren Glutamin und Lysin in dem vorliegenden hochviskosen Reaktionsmedium, das seinerseits ebenfalls Transformationsprozesse durchläuft, die in [Kapitel 6.1.2](#) erläutert wurden. Der Einfluss der Quervernetzungsreaktion machte sich in einem deutlichen Viskositätsanstieg bemerkbar, der in der Texturänderung des Extrudates begründet lag, das während der enzymkatalysierten Polymerisationsreaktion einen deutlichen Anstieg des Molekulargewichtes erfahren hatte. Die Zähigkeit und Festigkeit des Extrudates war auch der Grund für die unzureichende Formgebung an Extruder A und für die optischen Veränderungen des Extrudates. Der Einfluss der Enzymreaktion auf die Textur konnte im Anschluss durch die funktionellen Zusammenhänge der Druck- und Drehzahlverhältnisse mit der Drehzahl an Extruder B quantifiziert werden. Die Ergebnisse in [Abb. 5.16](#) machten zudem deutlich, dass die Verlängerung der Reaktionszeit die Quervernetzungsreaktion stark begünstigte. Andererseits wurde augenfällig, dass die Temperatur der Extrusionsmasse eine negative Korrelation mit der Reaktionszeit aufwies. Diese Beobachtung war ein Resultat des erhöhten mechanischen Leistungseintrages durch die Drehzahlerhöhung und führte wiederum zu einer Scherkraftzunahme und damit zu ansteigenden Temperaturen im Extruder. Dies hatte ein Abstoppen der Enzymreaktion zur Folge, wenn die kritische Temperatur Werte oberhalb 60 °C erreichte. Diese isolierte Betrachtungs-

weise lässt die Schlussfolgerung zu, dass in Hinblick auf den Reaktionsumsatz einerseits Maßnahmen zur Erhöhung der mittleren Verweilzeit insbesondere durch eine Drehzahlreduzierung in Verbindung mit förderneutralen und abstauenden Schneckenelementen angestrebt werden sollten. Andererseits wird empfohlen, die Lösungsmittelmenge zu erhöhen, um präventiv den Viskositätsanstieg durch die Proteinquervernetzung zu antizipieren und damit unverhältnismäßig hohe Drehmoment- und Druckverhältnisse zu unterbinden. Beide Maßnahmenpakete erhöhten nicht nur den Reaktionsumsatz und steigerten die Gesamtenergieeffizienz des Verfahrens im hohen Maße, sondern führten zu einer signifikanten Verbesserung der mechanischen Produkteigenschaften. Die Ausbildung kovalenter Isopeptidbindungen zeigte sich für die in Abb. 5.19 bis Abb. 5.21 dargelegten Zugfestigkeitserhöhungen verantwortlich, dessen Trendentwicklung durch die Zunahme der Elastizitätsmoduln Bestätigung fand und offenbarte, dass die quervernetzten Folien ihrer Verformung einen höheren Widerstand entgegensetzten, als die Produkte aus einer nicht-reaktiven Extrusion. Während der Einfluss auf die Bruchdehnung und den Elastizitätsmodul einen statistisch hochsignifikanten ($P < 0,001$) Charakter besaß, konnten im Gegenzug für die Bruchdehnungswerte keine Hinweise auf signifikante Unterschiede festgestellt werden ($P > 0,05$).

Die Durchführung einer biochemischen Analyse des Extrudates mittels SDS-PAGE bestätigte das geschilderte Reaktionsverhalten zum einen durch den Nachweis von Verbindungen, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht in das engmaschige Trenngel eindringen konnten und zum anderen durch die deutliche Abnahme der Löslichkeit im SDS-Probenpuffer. Letztere signalisierte die Entstehung von Verbindungen, die eine Resolubilisierung in der verwendeten Extraktionslösung verhinderten. Dass auch Proben ohne enzymatische Behandlung eine deutliche Löslichkeitsabnahme im SDS-Probenpuffer erfuhren bestätigte die Theorie von hitzeinduzierten Isopeptidbindungen, die während der Extrusion entstanden. Letztlich untermauerte die Abnahme von Monomeren mit Erhöhung der mittleren Verweilzeit, dargestellt in Abb. 5.18 den Standpunkt einer vermehrten Bildung kovalenter Isopeptidbindungen, die eine Korrelation mit den mechanischen Kennwerten erlaubten.

Eine prinzipielle Eignung mikrobieller Transglutaminase für die hier verwendeten Proteinsubstrate konnte bereits in Voruntersuchungen zum Gießfolienprozess nachgewiesen werden und findet ebenfalls in Fremdpublikationen Bestätigung [Bön07, Bru08, Aud05, Sha08, Tan06].

6.1.4.3 Kristallisation

Die Ergebnisse der Extrusion offenbarten das große Potenzial zur kontrollierten Verbesserung der Zugfestigkeiten von Proteinfohlen zeigte aber auch, dass vor allem die Bruchdehnung weiteren Verbesserungsbestrebungen unterzogen werden muss. An

diesem Punkt setzen die Forschungsarbeiten zum kontrollierten Einbau kristalliner Substanzen in die Matrix der Proteinfohlen an, deren Ergebnisse zwei wesentliche Theorien bestätigten. Zum einen konnte die Durchführbarkeit einer Lösungskristallisation als integrativer Bestandteil eines Gießfolienprozesses für zwei Modellproteinsysteme und drei kristalline Modellsubstanzen gezeigt werden. Zum Zweiten wurde der Einfluss von Additiv- und Weichmacherkonzentration, Kristallgröße und -verteilung sowie einer enzymatischen Quervernetzung quantifiziert und funktionale Abhängigkeiten auf die mechanischen Eigenschaften aufgezeigt. Dabei konnten deutliche Verbesserungen der Bruchdehnungswerte mit hochsignifikanten Charakter ($P < 0,001$) erreicht werden, die durch kovalente Isopeptidbindungen im Rahmen einer Quervernetzung mit MTG nochmals im signifikantem Maße gesteigert wurden.

Der Effekt kristalliner Substanzen in Proteinfohlen auf die mechanischen Eigenschaften ist mit der Wirkungsweise eines Weichmachers vergleichbar. Es wird vermutet, dass der Einschluss von Fremdkristallen in der Proteinmatrix zu einer strukturellen Schwächung der Materialien führte. Die damit verbundene Reduzierung der intermolekularen Kräfte steigerte die Flexibilität der Polymerketten, die sich in einer starken Zunahme der Bruchdehnung und einer Abnahme der Zugfestigkeiten äußerten. Die unterschiedlichen Effektwirkungen auf die beiden Proteinsysteme NaCas und Gelatine können auf die Organisationsstruktur des Proteinnetzwerkes zurückgeführt werden. NaCas besitzt nur wenig Sekundärstruktur in Form von α -Helix und β -Faltblatt und wird generell als ungeordnetes Protein klassifiziert, was in der Konsequenz zu Folien mit einer gering organisierten Matrix führt. Gelatine weist zwar ebenfalls eine gering organisierte Struktur auf, ist aber im Gegensatz zu NaCas in der Lage, während der Gelierung und Filmbildung zu renaturieren und damit Teile seiner Tripelhelixstruktur des Collagens zurückzugewinnen, das als geordnetes Protein gilt. Die kompakte Matrix zeichnet sich durch intensivere intermolekulare Kräfte aus, die die Kohäsion und damit die Zugfestigkeit verbessert. Dies steht in Übereinstimmung mit anderen Arbeitsgruppen, die vergleichbare Ergebnisse auf die Proteinstruktur zurückgeführt haben [Cha06, Sie99, Ach95]. Die Verbesserung der Bruchdehnung bei enzymatisch vernetzten Folien kann ebenfalls mit der Proteinstruktur in Verbindung gebracht werden, die aufgrund der Ausbildung vergleichsweise starker Isopeptidbindungen schwächere non-kovalente Bindungen substituiert und damit die Flexibilität der Materialien verbessert.

Die Verwendung von Harnstoff als kristallines Additiv entzog sich einer vergleichenden Analyse mit den anderen verwendeten Substanzen, da Harnstoff selbst als Weichmacher in Proteinsystem agiert, indem es Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen aufhebt und damit die Proteinstruktur schwächt. Aus diesem Grund ist es nicht gelungen, dass für eine Kristallisation erforderliche Übersättigungsniveau ohne Verlust der filmbildenden Eigenschaften zu erreichen. Anderer-

seits konnte die Eignung als Weichmacher für die Proteinsysteme NaCas und Gelatine nachgewiesen werden, die eine Teilsubstitution des verwendeten Glycerins bei Aufrechterhaltung der mechanischen Leistungsfähigkeit erlaubte.

Neben der kontrollierten Beeinflussung der mechanischen Eigenschaften wurden zudem optische und haptische Veränderungen der Folien festgestellt. Veränderungen der Kristallmorphologie fanden primär in der Abhängigkeit vom Übersättigungsniveau der Proteinlösung ihre Ursache. Mögliche Einflüsse des Proteinsystems, einer enzymatischen Quervernetzung oder Art und Konzentration des Weichmachers bedürfen weiterführender Forschung. Haptische Veränderungen entstanden bei hohen Additivkonzentrationen und äußerten sich in Form einer erhöhten Rauigkeit, verursacht durch eine partielle Penetration der Folienoberflächen durch kristalline Zonen. Korrelationen der Morphologie mit den mechanischen Eigenschaften zeigten, dass homogen verteilte, 50 bis 150 μm große Kristalle durch eine gleichmäßige strukturelle Schwächung der Proteinmatrix für die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften die beste Eignung zeigten.

6.1.5 Statistische Versuchsplanung

Für die Planung, Durchführung und Auswertung der Voruntersuchungen wurde zunächst die klassische Versuchsplanung zugrunde gelegt. Diese sogenannte „one factor at a time“ Vorgehensweise, bei der jeweils nur ein Faktor zur Zeit verändert wurde, erlaubte es den Effekt von Einflussvariablen auf die jeweilige Zielgröße direkt abzulesen und einer Auswertung zuzuführen. Die Festlegung der Zielgrößen erfolgte problemstellungskonform mit der Wahl der mechanischen und optischen Produkteigenschaften und erlaubte die Identifizierung wesentlicher Steuer- und Störgrößen, explizit repräsentiert durch die Temperatur, die Weichmacherkonzentration und eine enzymatische Quervernetzung. Damit war es möglich, den jeweiligen Parametereinfluss auf die mechanischen und optischen Produkteigenschaften isoliert zu betrachten und zu veranschaulichen.

Aus der Notwendigkeit heraus, im Rahmen einer thermoplastischen Verarbeitung mittels Extrusion mit deutlicher Zunahme an Einstell- und Prozessgrößen mehrere Faktoren in systematischer Weise parallel variieren zu müssen, wurde auf die statistische Versuchsplanung als leistungsfähiges Instrument zurückgegriffen. Diese ermöglichte es, bei Veränderungen mehrerer Faktoren zur gleichen Zeit den Einfluss eines jeden Faktors auf die jeweiligen Zielparameter in Größe und Richtung sowie Wechselwirkungen zwischen den Einflussgrößen auf die Zielgrößen zu quantifizieren. Die Auswertung der 2^n -Versuchspläne (Tab. 5.1 und Tab. 5.4) ermöglichte die Charakterisierung der Haupteffekte Glycerinkonzentration, enzymatische Proteinquervernetzung, Richtung der Probenentnahme sowie Temperatur. Dabei handelte es sich um den Effekt, der durch den Einfluss einer einzelnen Variablen hervorgeru-

fen wurde. Die Zugfestigkeiten unterlagen einer besonders deutlichen Beeinflussung durch die Glycerinkonzentration aufgrund des beschriebenen Weichmachereffektes und der Quervernetzung durch die Ausbildung kovalenter Bindungen. Im Rahmen der Effektwirkungen auf die Bruchdehnungswerte waren bedingt durch die molekulare Ausrichtung des Proteinnetzwerkes in den Folien deutliche Einflüsse der Probenentnahmerichtungen zu verzeichnen. So zeigten beispielsweise quer zur Extrusionsrichtung entnommene Folienproben keine Änderung der Bruchdehnung bei veränderter Weichmacherkonzentration oder Proteinquervernetzung, während Proben in Extrusionsrichtung stark auf die beiden Einflussgrößen reagierten (Abb. 5.30). Erwartungsgemäß konnte von der Etablierung einer Proteinquervernetzung der Elastizitätsmodul am meisten profitieren, da das Material durch die entstandenen Isopeptidbindungen der Verformung beim Zugversuch mehr Widerstand entgegensetzen konnte.

Die Beschreibung kombinierter Einflüsse auf die Antwortgröße erlaubte die Schätzung der Wechselwirkungseffekte zwischen zwei ausgewählten Einflussgrößen. Ein Wechselwirkungseffekt liegt immer dann vor, wenn der Einfluss eines Faktors von der Einstellung beziehungsweise dem Niveau eines anderen Faktors abhängig ist. Diese können dementsprechend ebenfalls Ursache für Effekte sein, die sich in veränderten Zielgrößen widerspiegeln. Der beidseitige Einfluss des Weichmachers und einer enzymatischen Quervernetzung auf die Kräfteverteilung in der Proteinmatrix verursachte erwartungsgemäß den größten Effekt auf die mechanischen Kennwerte Zugfestigkeit und Bruchdehnung, hatte hingegen auf die Elastizitätsmoduln nur einen drittrangigen Einfluss (Abb. 5.29 bis Abb. 5.31).

Somit konnten Haupt- und Wechselwirkungseffekte in die Ergebnisauswertung und -darstellung als absolute, richtungsabhängige Zielgrößenbeeinflussung einbezogen werden und wertvolle Hinweise über die komplexen Zusammenhänge der vielfältigen Einflussfaktoren liefern. Dies ermöglichte wiederum die Identifizierung und Quantifizierung signifikanter Einflussgrößen und erlaubte damit eine zielgerichtete Optimierung ausgewählter Zielgrößen.

6.2 Fehlerbetrachtung

Für eine Beurteilung von Güte und Qualität der gewonnenen Ergebnisse ist die Identifikation von Fehlerquellen und deren Ausprägungen im Rahmen einer Fehlerbetrachtung ein wichtiges Instrument. Die Resultate wissenschaftlicher Experimente und physikalischer Messungen besitzen stets Unsicherheiten, die durch Abweichungen von dem „wahren“ Wert einer Messgröße sichtbar werden.

Um die Abweichungen abschätzen zu können, ist eine Klassifizierung nach formalen Kriterien erforderlich, die eine Unterteilung in Fehlerarten als Ausgangspunkt besitzt. Es können in der Regel drei Arten von Fehlern wie folgt unterschieden werden:

1. Grobe Fehler,
2. Systematische Fehler und
3. Statistische (zufällige) Fehler [Kle09, Hol95, Dea00, Ges01, Tay88, Wal06].

Grobe Fehler basieren einerseits auf menschlichen Versagen in Form von Irrtümern, Falschablesungen und Verwechslungen. Andererseits werden diese durch Geräte- und Apparatefehler oder deren Versagen hervorgerufen. Diese Fehlerart wurde durch sorgfältiges Arbeiten, unabhängige Wiederholungen wichtiger Arbeitsabläufe und durch eine visuelle Plausibilitätsbetrachtung der Messwerte im Vorfeld minimiert. Systematische Fehler treten bei Wiederholungen der Messvorgänge stets gleichsinnig auf und sind grundsätzlich erfassbar. Demzufolge konnten etwaige Abweichungen nicht durch wiederholte Messungen verringert oder vermieden werden sondern vorrangig durch die Vermeidung einer fehlerhaften oder ungenauen Kalibrierung, unkorrekten Nullpunkteinstellungen, einer systematischen Beeinflussung bzw. Verfälschung durch äußere Faktoren und der Nutzung von formelmäßigen Beziehungen zur Messwertauswertung mit ungenügender Gültigkeit. Grobe und systematische Fehler wurden demzufolge im Rahmen dieser Arbeit durch die Anwendung der beschriebenen Vermeidungsstrategien auf ein Minimalmaß reduziert.

Die folgenden Ausführungen gelten den unvermeidlichen, zufälligen bzw. statistischen Fehlern, die auf statistischen Gesetzmäßigkeiten beruhen und damit regellos nach Vorzeichen und Größe schwanken. Diese Fehlerart wird durch eine im aktuellen Messvorgang begründete, sich zeitlich verändernde Abweichung hervorgerufen und kann damit lediglich abgeschätzt werden. Ursächlich dafür sind subjektive Fehler z. B. Parallaxe und Ablesefehler sowie objektive Fehler, wie z. B. veränderliche äußere Einflüsse, Einstell- und Ableseungenauigkeiten von Messgeräten und im statistischen Charakter der Messgröße selbst. Eine Verringerung dieser Art von Abweichungen ist durch Wiederholungen unter gleichen Bedingungen möglich.

Statistische Fehler wurden in Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Mehrfachmessungen und Mehrfachversuchswiederholungen reduziert und deren Aussagekraft und Verlässlichkeit durch die Angabe der arithmetischen Mittel, Standardabweichung von Einzelwerten und des Mittelwertes, Konfidenzbereichen und Varianzen quantifiziert. Für eine detaillierte Fehlerbetrachtung ist die Unterteilung in experimentelle und messtechnische Teilbereiche sinnvoll.

Versuchsdurchführung

Während der Folienherstellung wurden randomisierte Versuche (zufällige Reihenfolge) gefahren, um zu verhindern, dass ein Trend oder andere unerkannte Änderungen die Ergebnisse und Effektschätzungen verfälschen. Alle verwendeten Geräte

wurden auf eine ordnungsgemäße Kalibrierung hin überprüft und deren Messstreuung bzw. Fehler bei Kenntnis in der Versuchsdurchführung angegeben. Die Durchführung der nichtlinearen Regression im Rahmen der statistischen Versuchsplanung kann mit Bestimmtheitsmaßen zwischen $0,73 \leq R^2 \leq 0,94$ als hinreichend genau bezeichnet werden, da diese hauptsächlich der Identifikation signifikanter Effekte und deren Einflussrichtungen diene.

Mechanische Kennwerte

Bei der Ermittlung von Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul wurden jeweils mindestens 5 Messwerte ermittelt, das arithmetische Mittel berechnet und die Standardabweichung bestimmt. Die Spannweite der jeweiligen Standardabweichungen der mechanischen Kennwerte in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren können in [Tab. 6.1](#) eingesehen werden.

Tab. 6.1: Vergleich der prozentualen Standardabweichungen der ermittelten Messwerte für unterschiedliche Herstellungs- und Modifikationsverfahren

Kennwerte	Prozentuale Standardabweichungen s_{rel}				
	Gießfolien	Extruder A	Extruder B	Reaktive Extrusion	Kristallisation
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Zugfestigkeit	2 - 16	7 - 22	2 - 8	1 - 12	1 - 45
Bruchdehnung	3 - 21	2 - 5	4 - 33	3 - 32	2 - 67
Elastizitätsmodul	4 - 42	18 - 52	5 - 70	3 - 60	-
Foliendicke	1 - 19	3 - 13	5 - 29	2 - 25	1 - 27

Die in einigen Fällen vergleichsweise hohe Spannweite in den Standardabweichungen bleibt einzelnen Ausreißern verschuldet, deren Einfluss durch eine höhere Anzahl an Wiederholungen minimiert und im Rahmen einer statistischen Analyse eliminiert werden sollte. Für die vorliegende Fehleranalyse findet im Kontext einer angemessenen qualitativen Argumentationsgrundlage die Betrachtung des gesamten Schwankungsspektrums der Versuchsergebnisse statt. Die prozentualen Standardabweichungen eines jeden Versuchsergebnisses können in [Tab. 10.6](#) bis [Tab. 10.9](#) im Anhang der Arbeit eingesehen werden.

Die ermittelten Schwankungsbreiten in den mechanischen Eigenschaften Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Elastizitätsmodul als Ergebnis des Zugversuchs können auf sich verändernde Umweltbedingungen, primär in Form von differierenden relativen Luftfeuchten und Temperaturen zurückgeführt werden. Höhere Temperaturen und relative Luftfeuchten wirken auf die hygroskopischen Filme weichmachend, während eine abnehmende Tendenz der genannten Umweltbedingungen den Folien Wasser entzieht und diese verspröden lässt. Diese Einflüsse wurden durch ein kurzmöglichstes Aussetzen der Probestreifen mit diesen Bedingungen minimiert.

Die vergleichsweise breite Streuung der Elastizitätsmoduln resultiert neben den beschriebenen Umwelteinflüssen aus der Prüfmethode, bei der die Ermittlung des E-Moduls über zwei ausgewählte Spannungs-/Dehnungswerte erfolgte, indem eine lineare Regression auf dem Kurvenbereich zwischen diesen Punkten durchgeführt wurde. Da ebenfalls das Bestimmtheitsmaß dieser Regression größeren Schwankungen unterlag, sind die Messwerte der Elastizitätsmoduln nur für tendenzielle Aussagen der Effektgröße und Richtung geeignet. Die Messergebnisse der Zugfestigkeiten und Bruchdehnungen lagen sowohl bei den beiden Herstellungsverfahren als auch bei den Modifizierungsmethoden Enzymreaktion und Kristallisation in einem angemessenen Vertrauensbereich.

Der Einfluss von Abweichungen in den Foliendicken auf die Ergebnisse der mechanischen Testung ist ebenfalls in die Einschätzungen einzubeziehen, da die Probestreifen dazu neigen, an dünnen Stellen zu reißen. Abweichungen in den Foliendicken konnten im Rahmen einer Gießfolienproduktion durch eine regelmäßige Kontrolle der Tarierung verwendeter Gussformen auf ein Mindestmaß von max. $\pm 30 \mu\text{m}$ reduziert werden. Schwankende geometrische Abmessungen produzierter Folien sind bei der Herstellung mittels Extrusion neben Düse und Folienabzug, in der Einstellung von Prozessgrößen zu suchen, die einen Einfluss auf die Extrudatbeschaffenheit aufweisen. Die Formgebung durch die Schlitzdüse (Öffnung und Temperatur) und den Folienabzug (Geschwindigkeit und Trocknung) zeigte großes Spiel hinsichtlich Dickenverteilung des Endproduktes.

Modifikationen

Die Produkte einer reaktiven Extrusion in Form einer enzymkatalysierten Quervernetzungsreaktion zeigten ähnlich verlässliche Messergebnisse im Hinblick auf die mechanischen und geometrischen Eigenschaften. Eine Ausreißereliminierung durch Wiederholungsversuche ergab Schwankungsbereiten von s_{rel} zwischen 1 bis 8 % für die Zugfestigkeiten, von 2 bis 18 % für die Bruchdehnungen und von 3 bis 28 % im Falle der Elastizitätsmoduln. Die vergleichsweise hohen Volatilitäten in den Messwerten der kristallisierten Folien sind primär den schlechten mechanischen Eigenschaften von Folien mit dem Additiv Ammoniumsulfat verschuldet, bei denen bereits geringe absolute Standardabweichungen zu großen relativen führten. Dies trifft insbesondere auf die Versuche C-A03-05/08-10, Tab. 10.4 zu, die in Abb. 5.24 und Abb. 5.25 grafisch aufbereitet wurden. Fluktuationen der Foliendicken ergaben sich insbesondere bei hohen Additivkonzentrationen durch resultierende kristalline Bereiche, die die Oberflächen der Folien partiell penetriert und damit zu leichten Unebenheiten geführt haben.

Schlussfolgernd kann die versuchs- und messergebnisübergreifende Aussage getroffen werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit als präzise (mit geringer Streuung und angemessener Robustheit), zuverlässig und reproduzierbar einzustu-

fen sind. Die erzielten Erkenntnisse und getroffenen Aussagen finden somit keine negative Beeinträchtigung.

6.3 Erzielte Erkenntnisse im Überblick

- Erfolgreiche Eignungsnachweise von Proteinsystemen hinsichtlich Filmbildung, Substrateignung enzymatischer Quervernetzungsreaktion, Weichmacher- und Lösungsmitteln, Additiven, Löslichkeit und Homogenisierung sowie Trocknung und Konditionierung
- Erfolgreiche Ermittlung funktioneller Zusammenhänge wesentlicher Einstell- und Verfahrensparameter auf die physikalischen Eigenschaften von Gießfolien
- Gelungene Entwicklung, Auslegung und praktische Umsetzung eines Anlagen- und Prozessschemas auf Extrusionsbasis
- Positive Machbarkeitsstudie über die thermoplastische Verarbeitung der Proteinsysteme Natrium-Caseinat und Erbsenprotein-Isolat
- Erfolgreiche Integration einer enzymatischen Quervernetzungsreaktion in den Extrusionsprozess durch MTG
- Gelungene funktionale Prozessanalyse mit anschließender Optimierung der Einstell- und Prozessgrößen des Extrusionsprozesses
- Erfolgreicher Nachweis der kontinuierlichen Produktion von NaCas-Folien an zwei verschiedenen Extrusionssystemen mit kontrollierbaren Eigenschaftsprofilen
- Investigative Untersuchung von Strukturveränderungsmechanismen während einer thermoplastischen Transformation mit hypothetischen Erklärungsansätzen
- Vergleichende Analyse und Bewertung autoritativer physikalischer Produkteigenschaften
- Gelungene Entwicklung und Verwirklichung von Strategien zur gezielten Eigenschaftsverbesserung und Mehrwertgenerierung von Proteinfohlen (Proteinquervernetzung und Kristallisation)
- Kontrollierte Enzymkatalyse zur Veränderung der Extrudatstruktur und der Produkteigenschaften
- Erfolgreiche Steuerung der mechanischen Produkteigenschaften durch die Integration kristalliner Substanzen in die Proteinmatrix
- Effektive statistische Absicherung der Versuchs- und Messergebnisse durch Randomisierung (Zufallsreihenfolgen), repräsentative Stichproben, Signifikanzanalysen sowie Berücksichtigung von Zufallsstreuungen und Vertrauensbereichen
- Wirksame Identifizierung und Quantifizierung wesentlicher Einflussgrößen und Wechselwirkungen in Richtung und Größe mithilfe der statistischen Versuchsplanung
- Strategische Lösungsansätze für aufgetretene verfahrenstechnische Probleme und Potenzialanalysen für Produkt und Prozess

6.4 Ausblick

Obgleich der Nachweis erbracht werden konnte, dass durch eine thermoplastische Verarbeitung mittels Extrusion qualitativ hochwertige Proteinfolien hergestellt werden können, existieren noch Optimierungspotenziale im großen Umfang, deren Ausschöpfung die Kernherausforderung für zukünftige Arbeiten in Wissenschaft und Praxis darstellt. Die Entwicklung geeigneter Strategien setzt zunächst ein hinreichendes Prozessverständnis voraus, in dem die komplexen Zusammenhänge von Proteinstrukturen und deren Veränderungen Berücksichtigung finden müssen. In Anlehnung an die traditionellen Extrusionsprozesse müssen bestehende Modellierungs- und Simulationstechniken dahingehend angepasst werden, dass angemessene Güten erzielt und entsprechende Prozessfenster identifiziert werden können. Doch gerade in der frühen Entwicklungs- und Verständnisphase stößt die Modellierung an ihre Grenzen und erfordert praktische Erfahrungen für eine interpretative Ergebnisauslegung, die mit einem großen Versuchsaufwand verbunden sind. Für die Beherrschung der resultierenden Ergebniskomplexität sowie der funktionalen Verflechtungen und Abhängigkeiten müssen statistisch optimierte Versuchspläne favorisiert und daraus sachdienliche Interpretationen und probate Maßnahmenkataloge abgeleitet werden. Diese Maßnahmen tragen entscheidend dazu bei, in naher Zukunft eine Standardisierung der Anlagen- und Verfahrenstechnik zur kontinuierlichen Produktion innovativer Proteinmaterialien zu erreichen, die ökonomischen Ansprüchen genügen und durch ökologische Nachhaltigkeit, Funktionsvielfalt und hohe Verbraucherakzeptanz überzeugen.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit können bereits vielfältige zukünftige Arbeiten abgeleitet werden, die einen Beitrag für die Verbesserung von Produkt- und Prozessqualität zu leisten vermögen und auf einen großtechnischen Einsatz abzielen. Zunächst sollten Strategien entwickelt werden, welche konkrete Lösungsvorschläge für die beschriebenen Probleme offerieren und zu einer stabilen störungsfreien Produktion im Modellmaßstab beitragen sollen. Eine entsprechende Übersicht der in den Versuchen aufgetretenen Probleme und adäquate Lösungsvorschläge für zukünftige Anlagen- und Prozessauslegungen beinhaltet [Tab. 10.10](#), die keinen Anspruch an Vollständigkeit und Praxistauglichkeit erheben. Weitere Proteinsysteme und Verarbeitungshilfsstoffe sollten auf Eignung hin überprüft werden und die optimalen Ausprägungen wesentlicher Einstell- und Prozessgrößen in ein konsistentes Modell einfließen, welches als Basis für die Maßstabsübertragung auf industrielle Fertigungsprozesse genutzt werden kann, um die Kostenvorteile einer Massenproduktion anzustreben.

Besonderes Augenmerk sollte darüber hinaus auf die Optimierung der funktionalen Produkteigenschaften gelegt werden, die substanziellen Charakter für eine angemessene Akzeptanz der Produkte in Wirtschaft und Gesellschaft besitzen. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zwecke zwei Modifikationsansätze vorgestellt und deren

Eignung überprüft. Zukünftige Arbeiten sollten die Einflüsse von enzymatisch katalysierten Reaktionen und der Kristallisation von Fremdsubstanzen auf Verfahren und Produkte weiter vertiefen und bedarfsgerecht zusammenführen. Diese Techniken versprechen großes Potenzial in Hinblick auf die anwendungsspezifische Eigenschaftsverbesserung und Mehrwertgenerierung.

Neben Maßnahmen zur Verbesserung und Anpassung bestehender Produkte und Verfahren sind Neuentwicklungen und die Erschließung neuer Wirtschaftsbereiche anzustreben. Die vollständige biologische Abbaubarkeit und die kontrollierbare Eigenschaftsvielfalt qualifizieren Proteinmaterialien nicht ausschließlich als Rohstoffquellen für Filme und Folien sondern befähigen diese, die bekannte Form- und Funktionsvielfalt synthetischer Polymere abzudecken und deren etablierte Märkte durch Substitutions- und Komplementärprodukte zu bereichern. Dafür müssen basierend auf einer thermoplastischen Verarbeitung neue Formgebungsverfahren entwickelt bzw. angepasst werden von denen aus jetziger Sicht die Thermoformung, der Spritzguss und das Sprühverfahren als besonders aussichtsreich gelten.

7 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, ein Produktionsverfahren für die Herstellung von Proteinfohlen zu entwickeln und wirkungsvolle Strategien für eine anwendungsspezifische Optimierung der Produkte vorzustellen.

Zunächst erfolgte die Auswahl von Modellproteinsystemen, deren prinzipielle Eignung als Filmbildner im Rahmen des Lösungsmittelverfahrens nachgewiesen werden konnte. Unter gezielter Variation wesentlicher Einstell- und Prozessparameter wurden funktionelle Zusammenhänge identifiziert, Einflüsse auf die dreidimensionale Organisationsstruktur der Proteinmatrix studiert und für Prognosen der funktionalen Endprodukteigenschaften herangezogen. Die Ergebnisse der optischen und mechanischen Charakterisierung der Gießfolien dienten als Grundlage für die Übertragung auf ein thermoplastisches Herstellungsverfahren unter Einbeziehung der Glasübergangstheorie von Proteinen.

In Anlehnung an die Anlagen und Prozesse der traditionellen kunststoffverarbeitenden Industrie wurde das Extrusionsverfahren als Basis für eine thermoplastische Verarbeitung von Proteinen ausgewählt. Die speziellen verfahrenstechnischen Ansprüche proteinbasierter Rohstoffe führten zur Auswahl eines gleichläufigen Doppelschneckenextruders mit modularer Schneckenkonfiguration als Versuchsanlage. Die Auslegung der Anlagen- und Verfahrenstechnik erwies sich als überaus geeignet und erlaubte die Durchführung einer Machbarkeitsstudie über die Produktion von Proteinfohlen mit positivem Ergebnis. Eine anschließende funktionale Prozessanalyse ermöglichte die Entwicklung und Umsetzung gezielter Optimierungsstrategien zur Verbesserung des Extrusionsverfahrens und der funktionalen Endprodukteigenschaften.

Anschließend war es gelungen, eine kontinuierliche Produktion von Natrium-Caseinat-Folien im Modellmaßstab zu verpackungsfähigen Folienrollen zu etablieren und die Übertragbarkeit auf ein zweites Extrusionssystem vorzunehmen. Die Produkte zeichneten sich insgesamt durch gute sensorische Eigenschaften aus, die durch homogene optische und haptische Charakteristiken auch ästhetischen Ansprüchen genügen. Für das Modellproteinsystem Erbse sind weiterführende Modifikationen für eine erfolgreiche verfahrenstechnische Umsetzung notwendig, wenngleich durch nachgeschaltete Formgebungsverfahren ebenfalls Folien gewonnen werden konnten.

Insgesamt überzeugten die mechanischen Eigenschaften der extrudierten Folien besonders durch die im Vergleich mit Gießfolien deutlich höheren Zugfestigkeiten. Andererseits führte die Extrusion auch zu Folien mit geringeren Bruchdehnungen. Dies bedingte weiterführende Überlegungen, denen neben der Optimierung von Prozess-

variablen und der Materialzusammensetzung Maßnahmen zur strukturellen Veränderung durch externe Einflussgrößen zugrunde lagen.

Proteinfohlen müssen vielfältigsten Anforderungen genügen, um ein kritisches Akzeptanzniveau für einen wirtschaftlichen Markterfolg zu überschreiten. Aus diesem Grunde wurden Strategien entwickelt und verwirklicht, die zum einen durch die gezielte Beeinflussung der physikalischen Eigenschaften und zum anderen durch Mehrwertschaffung und Produktveredelung einen Beitrag zur Ausschöpfung bestehender Vermarktungspotenziale leisten. Die Ergebnisse einer enzymatischen Proteinquervernetzung und des Einbaus kristalliner Additive in die Proteinmatrix zeigten große Potenziale zur kontrollierten Verbesserung der mechanischen Eigenschaften. Kristalline Substanzen offerieren der Proteinfohle zusätzlichen Mehrwert durch Träger- und Freisetzungsfunktionalität, beispielsweise von kristallinem Dünger in der Landwirtschaft oder in Form einer kontrollierten Wirkstofffreisetzung als pharmazeutische Darreichungsform.

Die Integration einer enzymatischen Quervernetzungsreaktion in den Extrusionsprozess erlaubte bereits während des Herstellungsverfahrens die Einflussnahme auf finale Produktcharakteristika und stellt damit ein ökonomisch und ökologisch effizientes Modifikationsverfahren für Proteinsysteme dar.

Unterstützt wurde die Aussagefähigkeit aller erzielten Erkenntnisse durch anerkannte statistische Methoden der Versuchsplanung und -auswertung. Wesentliche Einflussparameter auf die Zielgrößen konnten in Richtung und Größe quantifiziert werden. Die Erkenntnis, wie sich die gezielte Beeinflussbarkeit der Zielgrößen darstellt trug zum Gesamtverständnis der komplexen Prozesse bei und bildete eine wichtige Entscheidungshilfe für notwendige Optimierungsansätze.

8 Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

8.1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Ammoniumsulfat
ASTM	American Society for Testing and Materials
B	Beschichtung
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Dynamische Differenzkalorimetrie)
DoE	Design of Experiments (Statistische Versuchsplanung)
DMTA	Dynamic mechanical thermal analysis (Dynamisch-mechanische Thermo-Analyse)
E	Erbsenprotein-Isolat
EN	European Organization for Standardization
Gew.%	Gewichtsprozent
Gly	Glycerin
HDPE	High Density Polyethylen
ISO	International Organization for Standardization
JIS	Japanese Standards Association
L	Längsrichtung
LDPE	Low Density Polyethylen
lat	Lateinisch
M	Marker
MTG	Mikrobielle Transglutaminase
NaCas	Natrium-Caseinat
PE	Polyethylene
PEG	Polyethylenglykol
PF	Pflanzlich
PP	Polypropylen
PPI	Pea Protein Isolate (Erbsenprotein-Isolat)
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon®)
PVC	Polyvinylchlorid
Q	Querrichtung
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
sog	sogenannte
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Transglutaminase

TM	Trockenmasse
TME	Turbinenmischelement
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSC	Thermally Stimulated Current (Thermisch stimulierte Ströme)
UV	Ultraviolett
v	volume (Volumen)
w	weight (Gewicht)

8.2 Symbolverzeichnis

Lateinische Buchstaben:

A_1	[-]	Faktor bei der statistischen Versuchsplanung
A_2	[-]	Faktor bei der statistischen Versuchsplanung
A_0	[mm ²]	Anfangsquerschnittsfläche
b	[mm]	Breite
B_1	[-]	Faktor bei der statistischen Versuchsplanung
B_2	[-]	Faktor bei der statistischen Versuchsplanung
c_p	[kJ/kg K]	Spezifische Wärmekapazität bei konstantem Druck
E_t	[MPa]	Elastizitätsmodul
F	[N]	Kraft
h	[mm]	Höhe
L_0	[mm]	Ausgangslänge
m	[g]	Masse
m_w	[g/mol; Da]	Molekulargewicht (molare Masse)
M	[mol/L]	Molarität
n	[-]	Stichprobenumfang
P	[-]	Wahrscheinlichkeit
r	[mm]	Radius
R^2	[-]	Bestimmtheitsmaß
s	[-]	absolute Standardabweichung
s_{rel}	[%]	relative Standardabweichung
t	[s]	Zeit
T	[%]	Totalacrylamidkonzentration
T	[°C]	Temperatur
T_g	[°C]	Glasübergangstemperatur
T_D	[°C]	Düsentemperatur
T_s	[°C]	Temperatur der Schmelze
T_z	[°C]	Zonentemperatur
U	[μ mol/min]	Enzymeinheit (Units)

U	[min ⁻¹]	Umdrehungen
\bar{x}	[-]	arithmetisches Mittel

Griechische Buchstaben:

$\varepsilon(\lambda)$	[-]	Proportionalitätsfaktor
ε_1	[-]	Dehnungswert (0,0005)
ε_2	[-]	Dehnungswert (0,0025)
ε_B	[%]	Bruchdehnung
ε_M	[%]	Maximaldehnung
σ_1	[MPa]	Spannung beim Dehnungswert $\varepsilon_1=0,0005$
σ_2	[MPa]	Spannung beim Dehnungswert $\varepsilon_2=0,0025$
σ_B	[MPa]	Bruchfestigkeit
σ_M	[MPa]	Zugfestigkeit

9 Literaturverzeichnis

- [Ach95] Achet, D. and He, X. W., Determination of the renaturation level in gelatin films, *Polymer*, 36 (1995) 4, 787-791.
- [And89] Ando, H., Adachi, M., Umeda, K., Matsuura, A., Nonaka, M., Uchio, R., Tanaka, H. and Motoki, M., Purification and characteristics of a novel transglutaminase derived from microorganisms, *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (1989) 10, 2613-2617.
- [Aji09] Ajinomoto Foods Deutschland GmbH, Hamburg, Material Safety Data Sheet and Homepage, <http://www.ajinomoto.de>, [Abrufdatum: 15.12.2009].
- [Akd99] Akdogan, H., High moisture food extrusion, *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (1999) 3, 195-207.
- [Alo00] Alonso, R., Orue, E., Zabalza, M. J., Grant, G. and Marzo, F., Effect of extrusion cooking on structure and functional properties of pea and kidney bean proteins, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (2000) 3, 397-403.
- [Ani06] Aniunoh, K. K. and Harrison, G. M., Experimental investigation of film formation: Film casting, *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 22 (2006) 3, 177-192.
- [Are92] Areas, J. A. G., Extrusion of food proteins, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1992) 4, 365-392.
- [Arr07] Arrizubieta, M. J., Transglutaminases, in: *Industrial Enzymes*, ed. by Polaina, J., MacCabe, A. P., Springer, Dordrecht, Die Niederlande, 2007, 567-581.
- [Arv97] Arvanitoyannis, I., Psomiadou, E., Nakayama, A., Aiba, S. and Yamamoto, N., Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols part 3, *Food Chemistry*, 60 (1997) 4, 593-604.
- [Arv98] Arvanitoyannis, I. and Biliaderis, C. G., Physical properties of polyol-plasticized edible films made from sodium caseinate and soluble starch blends, *Food Chemistry*, 62 (1998) 3, 333-342.

- [Arv06] Arvanitoyannis, I. S., 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: Volume 1: Materials, ed. by Mallapragada, S. K., Narasim, B., American Scientific Publishers, Ames, 2006, 200-238.
- [Aud03] Audic, J.-L., Chaufer, B. and Daufin, G., Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review, *Le Lait*, 83 (2003) 6, 417-438.
- [Aud05] Audic, J.-L. and Chaufer, B., Influence of plasticizers and crosslinking on the properties of biodegradable films made from sodium caseinate, *European Polymer Journal*, 41 (2005) 8, 1934-1942.
- [Ave93] Avenabustillos, R. J. and Krochta, J. M., Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium cross-linking and lipid content, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 4, 904-907.
- [Ayr97] Ayrancı, E., Büyüktas, B. S. and Çetin, E. E., The Effect of Molecular Weight of Constituents on Properties of Cellulose-based Edible Films, *Lebensmittelwissenschaft- und Technologie*, 30 (1997) 1, 101-104.
- [Bab96] Babel, W., Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer, *Chemie in unserer Zeit*, 30 (1996) 2, 86-95.
- [Bab00] Babel, W., Schulz, D., Giesen-Wiese, M., Seybold, U., Gareis, H., Dick, E., Schrieber, R., Schott, A. and Stein, W., Gelatin, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2000.
- [Bae09] Bae, H. J., Darby, D. O., Kimmel, R. M., Park, H. J. and Whiteside, W. S., Effects of transglutaminase-induced cross-linking on properties of fish gelatin-nanoclay composite film, *Food Chemistry*, 114 (2009) 1, 180-189.
- [Ban66] Banker, G. S., Film coating theory and practice, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55 (1966) 1, 81-89.
- [Ban94] Bandemer, H., *Statistische Versuchsplanung*, Teubner Verlag, Leipzig, 1994.

- [Ban96] Banerjee, R., Chen, H. and Wu, J., Milk protein-based edible film mechanical strength changes due to ultrasound process, *Journal of Food Science*, 61 (1996) 4, 824-828.
- [Bar05] Barone, J. R., Schmidt, W. F. and Liebner, C. F. E., Thermally processed keratin films, *Journal of Applied Polymer Science*, 97 (2005) 4, 1644-1651.
- [Bec03] Becker, T., Fischer, S., Noe, F., Tournier, A. L., Ullmann, G. M. and Smith, J. C., Protein Dynamics: Glass Transition and Mechanical Function, *Advances in Solid State Physics*, 43 (2003), 677-694.
- [Bel96] Bell, L. N. and Touma, D. E., Glass transition temperatures determined using a temperature-cycling differential scanning calorimeter, *Journal of Food Science*, 61 (1996) 4, 807-810.
- [Ber06] Bertoni, F., Barbani, F., Giusti, P. and Ciardelli, G., Transglutaminase reactivity with gelatine: perspective applications in tissue engineering, *Biotechnology Letters*, 28 (2006) 10, 697-702.
- [Bic06] Bicerano, J. Glass Transition, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, New York, USA, 2006.
- [Bla91] Blauch, R., *Analytische Elektrophoreseverfahren*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991.
- [BMI09] Bayerische Milchindustrie eG, Landshut, Homepage http://www.bmi-eg.com/de_kaseinat.php, [Abrufdatum: 13.12.2009].
- [Bol96] Bollag, D. M., Rozycki, M. D. and Edelstein, S. J., *Protein Methods*, Wiley Liss Inc., New York, USA, 1996.
- [Bon96] Bonneau, P. R., Martin, R., Lee, T., Sakowicz, R., Martichonok, V., Hogan, J. K., Gold, M. and Jones, J. B., Enzymes in organic synthesis. Present and future, in: *VII Brazilian Meeting on Organic Synthesis*, Rio Janeiro, Brazil 1996, Sep. 08-12, 357-369.

- [Bou06] Bourtoom, T., Chinnan, M. S., Jantawat, P. and Sanguandeeikul, R., Effect of plasticizer type and concentration on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in surimi wash-water, *Food Science and Technology International*, 12 (2006) 2, 119-126.
- [Bou08] Bourtoom, T., Edible films and coatings: characteristics and properties, *International Food Research Journal*, 15 (2008) 3, 237-248.
- [Bou09] Bourtoom, T., Edible protein films: properties enhancement, *International Food Research Journal*, 16 (2009) 1, 1-9.
- [Bön04] Bönisch, M. P., Lauber, S. and Kulozik, U., Effect of Ultra-high Temperature Treatment on the Enzymatic Cross-linking of Micellar Casein and Sodium Caseinate by Transglutaminase, *Journal of Food Science*, 69 (2004) 8, 398-404.
- [Bön06] Bönisch, M. P. , Modifizierung der Textur von Lebensmitteln mittels Transglutaminase, Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie, TUM Weihenstephan, München, 2006.
- [Bön07] Bönisch, M. P., Huss, M., Weld, K. and Kulozik, U., Transglutaminase cross-linking of milk proteins and impact on yoghurt gel properties, *International Dairy Journal*, 17 (2007) 11, 1360-1371.
- [Bra99] Branden, C. and Tooze, J., *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing Inc., New York, USA, 1999.
- [Brä07] Bräuer, S., Meister, F., Gottlöber, R. P. and Nechwatal, A., Preparation and thermoplastic processing of modified plant proteins, *Macromolecular Materials and Engineering*, 292 (2007) 2, 176-183.
- [Bre09] Breulmann, M., Künkel, A., Philipp, S., Reimer, V., Siegenthaler, K. O., Skupin, G. and Yamamoto, M. Polymers, Biodegradable, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2009.
- [Bru81] Brunner, J. R., Cow Milk Proteins: Twenty-Five Years of Progress, *J. Dairy Sci.*, 64 (1981) 6, 1038-1054.

- [Bru08] Bruno, M., Giancone, T., Torrieri, E., Masi, P. and Moresi, M., Engineering Properties of Edible Transglutaminase Cross-Linked Caseinate-Based Films, *Food and Bioprocess Technology*, 1 (2008) 4, 393-404.
- [Bur00] Burel, C., Boujard, T., Tulli, F. and Kaushik, S. J., Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*), *Aquaculture*, 188 (2000) 3-4, 285-298.
- [Bya07] Byaruhanga, Y. B., Erasmus, C., Emmambux, M. N. and Taylor, J. R. N., Effect of heating cast kafirin films on their functional properties, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (2007) 1, 167-175.
- [Cad00] Cadogan, D. F., Plasticizers, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2000.
- [Cad00a] Cadogan, D. F. and Howick, C. J., Plasticizers, in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2000.
- [Cal97] Callegarin, F., Gallo, J. A. Q., Debeaufort, F. and Voilley, A., Lipids and biopackaging, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 74 (1997) 10, 1183-1192.
- [Cam91] Camire, M. E., Protein functionality modification by extrusion cooking, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68 (1991) 3, 200-205.
- [Cao02] Cao, Y. M. and Chang, K. C., Edible Films Prepared from Water Extract of Soybeans, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 4, 1449-1454.
- [Cao09] Cao, N., Yang, X. M. and Fu, Y. H., Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films, *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 3, 729-735.
- [Car79] Careri, G., Fasella, P. and Gratton, E., Enzyme Dynamics: The Statistical Physics Approach, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 8 (1979) 1, 69-97.
- [Cas09] Caseri, W. and Weber-Mußmann, A., Polyethylenglycole, *Thieme RÖMPP Online*, 2009.

- [Cer02] Cernosek, Z., Holubova, J., Cernoskova, E. and Liska, M., Enthalpic relaxation and the glass transition, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, 4 (2002) 3, 489-503.
- [Cha04] Chapman, S. and Potter, L., *Edible films and coatings: a review*, Campden & Chorleywood Food Research Association, Chipping Campden, Campden, UK, 2004.
- [Cha06] Chambi, H. and Grosso, C., Edible films produced with gelatin and casein cross-linked with transglutaminase, *Food Research International*, 39 (2006) 4, 458-466.
- [Cha09] Chang, L. and Pikal, M. J. Mechanisms of protein stabilization in the solid state, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 9, 2886-2908.
- [Che95] Chen, H., *Functional Properties and Applications of Edible Films Made of Milk Proteins*, *J. Dairy Sci.*, 78 (1995) 11, 2563-2583.
- [Che95a] Cherian, G., Gennadios, A., Weller, C. and Chinachoti, P., Thermomechanical Behavior of Wheat Gluten Films: Effect of Sucrose, Glycerin, and Sorbitol, *Cereal Chemistry*, 72 (1995) 1, 1-6.
- [Che02] Chen, H., *Formation and Properties of Casein Films and Coatings*, in: *Protein-based Films and Coatings*, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 2002, 181-212.
- [Cho01] Choi, W.-S. and Han, J. H., Physical and Mechanical Properties of Pea-Protein-based Edible Films, *Journal of Food Science*, 66 (2001) 2, 319-322.
- [Cla05] Clarinval, A.-M. and Crif, H. J., Classification of biodegradable polymers, in: *Biodegradable polymers for industrial applications*, ed. by Smith, Ray, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2005, 3-31.
- [Cla07] Clare, D. A., Gharst, G. and Sanders, T. H., Transglutaminase polymerization of peanut proteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 2, 432-438.

- [Cog07] Cognis, Sicherheitsdatenblatt (1907/2006/EG), Glycerin, Cognis GmbH, Düsseldorf, 2007.
- [Cra98] Crawford, R. J., *Plastics Engineering*, Elsevier Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 1998, 22.
- [Cro01] Crowe, T. W. and Johnson, L. A., Twin-screw extrusion texturization of extruded-expelled soybean flour, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78 (2001) 8, 781-786.
- [Cuq97] Cuq, B., Gontard, N. and Guilbert, S., Thermoplastic properties of fish myofibrillar proteins: Application to biopackaging fabrication, *Polymer*, 38 (1997) 16, 4071-4078.
- [Cuq98] Cuq, B., Gontard, N. and Guilbert, S., Proteins as agricultural polymers for packaging production, *Cereal Chemistry*, 75 (1998) 1, 1-9.
- [Dal97] Dalgleish, D. G., Structure-Function Relationship of Caseins, in: *Food Proteins and their Applications*, ed. by Damodaran, Srinivasan and Paraf, Alain, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1997, 199-223.
- [Dam96] Damodaran, S., Amino Acids, Peptides, and Proteins, in: *Food Chemistry*, ed. by Fennema, O. R., Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1996, 321-429.
- [Dea00] Dean, A. M. and Voss, D., *Design and Analysis of Experiments*, Springer, New York, USA, 2000.
- [Deb94] Debeaufort, F. and Voilley, A., Aroma compound and water vapor permeability of edible films and polymeric packagings, *Journal of agricultural and food chemistry*, 42 (1994) 12, 2871-2875.
- [Deb98] Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J.-A. and Voilley, A., Edible Films and Coatings: Tomorrow's Packagings: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (1998) 4, 299-313.
- [DeC04] De Carvalho, R. A. and Grosso, C. R. F., Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde, *Food Hydrocolloids*, 18 (2004) 5, 717-726.

- [DCr05] D'Cruz, N. M. and Bell, L. N., Thermal Unfolding of Gelatin in Solids as Affected by the Glass Transition, *Journal of Food Science*, 70 (2005) 2, E64-E68.
- [DeG00] De Graaf, L. A., Denaturation of proteins from a non-food perspective, *Journal of Biotechnology*, 79 (2000) 3, 299-306.
- [DeG02] De Graaf, E. M., Madeka, H., Cocero, A. M. and Kokini, J. L., Determination of the effect of moisture on gliadin glass transition using mechanical spectrometry and differential scanning calorimetry, *Biotechnology Progress*, 9 (2002) 2, 210-213.
- [DeJ02] DeJong, G. A. H. and Koppelman, S. J., Transglutaminase Catalyzed Reactions: Impact on Food Applications, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 8, 2798-2806.
- [deK02] de Kruif, C. G., Tuinier, R., Holt, C., Timmins, P. A. and Rollema, H. S., Physicochemical Study of Casein Dispersions and the Effect of Cross-Linking by Transglutaminase, *Langmuir*, 18 (2002) 12, 4885-4891.
- [diG98] di Gioia, L., Cuq, B. and Guilbert, S., Effect of hydrophilic plasticizers on thermomechanical properties of corn gluten meal, *Cereal Chemistry*, 75 (1998) 4, 514-519.
- [diG99] di Gioia, L. and Guilbert, S., Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1999) 3, 1254-1261.
- [DIN95] DIN EN ISO 527-3: Kunststoffe - Bestimmung der Zugeigenschaften, Teil 3: Prüfbedingungen für Folien und Tafeln, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1995.
- [DIN96] DIN EN ISO 527-1: Kunststoffe - Bestimmung der Zugeigenschaften, Teil 1: Allgemeine Grundsätze, Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin, 1996.
- [Eck97] Eckert, W. A. and Kartenbeck, J., *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie*, Springer-Verlag, Berlin, 1997.

- [Esp06] Espi, E., Salmeron, A., Fontecha, A., Garcia, Y. and Real, A. I., Plastic films for agricultural applications, *Journal of Plastic Film & Sheeting*, 22 (2006) 2, 85-102.
- [Eur08] European Bioplastics e.V., Proceedings of the Third Bioplastics Conference, Berlin (Deutschland) 2008, 05.-06.11.2008.
- [Far97] Fargemand, M., Murray, B. S. and Dickinson, E., Cross-Linking of Milk Proteins with Transglutaminase at the Oil-Water Interface, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (1997) 7, 2514-2519.
- [Fis04] Fischer, T., Effect of extrusion cooking on protein modification in wheat flour, *European Food Research and Technology*, 218 (2004) 2, 128-132.
- [Fon99] Fontainhas-Fernandes, A., Gomes, E., Reis-Henriques, M. A. and Coimbra, J., Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance, *Aquaculture International*, 7 (1999) 1, 57-67.
- [Fox98] Fox, P. F. and McSweeney, P. L. H., *Dairy chemistry and biochemistry*, Thomson Science, New York, USA, 1998.
- [Fox04] Fox, P. F. and Kelly, A. L., The caseins, in: *Proteins in Food Processing*, ed. by Yada, R. Y., CRC Press, Cambridge, UK, 2004, 29-71.
- [Fre05] Freilich, M. B. and Petersen, R. L., Potassium Compounds, in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2005.
- [Fre09] Freedonia Group Inc., *World Bioplastics: Industry Study with Forecasts for 2013 & 2018*, Study #2548, Cleveland, USA, 2009.
- [Fro08] Froberg, P., Pietzsch, M., Ulrich, J., Effect of crystalline substances in biodegradable films and coatings, in: *proceedings, ISIC 2008 (17th International Symposium of Industrial Crystallization)*, Vol. 1, ed. by J. P. Jansens, J. Ulrich, Maastricht (Netherlands) 2008, 9789076019277.

- [Fro09] Froberg, P., Ulrich, J., Pietzsch, M., Patzsch, K., Verfahren zur Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften bioabbaubarer Werkstoffe, PCT/DE2 009/00079, Deutsches Patent- und Markenamt, Anmeldetag: 05.06.2009
- [Gal98] Galletta, G., Di Gioia, L., Guilbert, S. and Cuq, B., Mechanical and Thermomechanical Properties of Films Based on Whey Proteins as Affected by Plasticizer and Crosslinking Agents, *J. Dairy Sci.*, 81 (1998) 12, 3123-3130.
- [Gen98] Gennadios, A., Rhim, J. W., Handa, A., Weller, C. L. and Hanna, M. A., Ultraviolet Radiation Affects Physical and Molecular Properties of Soy Protein Films, *Journal of Food Science*, 63 (1998) 2, 225-228.
- [Ges01] Geschke, D., *Physikalisches Praktikum*, B. G. Teubner GmbH, Stuttgart, 2001.
- [Gha06] Ghanbarzadeh, B., Oromiehie, A., Musavi, M., Razmi, E. and Milani, J., Effect of polyolic plasticizers on rheological and thermal properties of zein resins, *Iranian Polymer Journal*, 15 (2006) 10, 779-787.
- [Gho09] Ghosh, A., Ali, M. A. and Dias, G. J., Effect of Cross-Linking on Microstructure and Physical Performance of Casein Protein, *Biomacromolecules*, 10 (2009) 7, 1681–1688.
- [Gil05] Giles, H. F., Wagner, J. R. and Mount, E. M., *Extrusion - The Definitive Processing Guide and Handbook*, William Andrew Publishing, Norwich, USA, 2005.
- [Gil08] Gillgren, T. and Stading, M., Mechanical and Barrier Properties of Avenin, Kafirin, and Zein Films, *Food Biophysics*, 3 (2008) 3, 287-294.
- [Gon93] Gontard, N., Guilbert, S. and Cuq, J. L., Water and Glycerol as plasticizers affect mechanical and water -vapor barrier properties of an edible wheat gluten film, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 1, 206-211.
- [Gon94] Gontard, N. and Guilbert, S., Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin, in *Food Packaging and Preservation*, ed. by Mathlouthi, M., Aspen Publishers, Inc., New York, USA, 1994, 159-182.

- [Gon94a] Gontard, N., Duchez, C., Cuq, J. L. and Guilbert, S., Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties, *International Journal of Food Science and Technology*, 29 (1994) 1, 39-50.
- [Gon96] Gontard, N. and Ring, S., Edible Wheat Gluten Film: Influence of Water Content on Glass Transition Temperature, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (1996) 11, 3474-3478.
- [Gra04] Graiver, D., Waikul, L. H., Berger, C. and Narayan, R., Biodegradable soy protein-polyester blends by reactive extrusion process, *Journal of Applied Polymer Science*, 92 (2004) 5, 3231-3239.
- [Gre94] Green, J. L., Fan, J. and Angell, C. A., The protein-glass analogy: New insight from homopeptide comparisons, *The Journal of Physical Chemistry*, 98 (1994) 51, 13780-13790.
- [Gri02] Griffin, M., Casadio, R. and Bergamini, C. M., Transglutaminases: Nature's biological glues, *Biochemical Journal*, 368 (2002) 2, 377-396.
- [Gue83] Gueguen, J., Legume seed protein extraction, processing, and end product characteristics, *Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition*, 32 (1983) 3-4, 267-303.
- [Gue96] Gueguen, J., Viroben, G., Noireaux, P. and Subirade, M., Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins, in: *3rd Symposium on Industrial Crops and Products*, Reims, France 1996, Apr 22-24.
- [Gui95] Guilbert, S., Gontard, N. and Cuq, B., Technology and applications of edible protective films, *Packaging Technology and Science*, 8 (1995) 6, 339-346.
- [Gui05] Guilbert, S. and Cuq, B., Material formed from proteins, in: *Handbook of biodegradable polymers*, ed. by Bastioli, C., Rapra Technology Limited, Shawbury, UK, 2005, 339-384.
- [Hag02] Hager, D. F., Effects of extrusion upon soy concentrate solubility, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32 (2002) 2, 293-296.

- [Han05] Han, J. H., Innovations in Food Packaging, Elsevier Academic Press Inc., San Diego, USA, 2005.
- [Han08] Han, J. H., Hwang, H.-M., Min, S. and Krochta, J. M., Coating of Peanuts with Edible Whey Protein Film Containing α -Tocopherol and Ascorbyl Palmitate, Journal of Food Science, 73 (2008) 8, E349-E355.
- [Haw03] Hawkins, W. E., The plastic film and foil web handling guide, CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 2003.
- [Her08] Hernandez-Izquierdo, V. M. and Krochta, J. M., Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review, Journal of Food Science, 73 (2008) 2, R30-R39.
- [Her08a] Hernandez-Izquierdo, V. M., Reid, D. S., McHugh, T. H., Berrios, J. D. J. and Krochta, J. M., Thermal transitions and extrusion of glycerol-plasticized whey protein mixtures, Journal of Food Science, 73 (2008) 4, E169-E175.
- [Hof04] Hofmann, G., Kristallisation in der industriellen Praxis, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2004.
- [Hol95] Holst, G., Systematisierung der Planungsphase der Statistischen Versuchsmethodik für die industrielle Anwendung, Shaker Verlag, Aachen, 1995.
- [Hor89] Horváth, E., Ormai-Cserhalmi, Z. and Czukor, B., Functional properties of air-classified yellow pea *Pisum sativum* fractions, Journal of the Science of Food and Agriculture, 49 (1989) 4, 493-497.
- [Iri01] Irissin-Mangata, J., Bauduin, G., Boutevin, B. and Gontard, N., New plasticizers for wheat gluten films, European Polymer Journal, 37 (2001) 8, 1533-1541.
- [Jan99] Jangchud, A. and Chinnan, M. S., Properties of peanut protein film: Sorption isotherm and plasticizer effect, Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 32 (1999) 2, 89-94.

- [Jan99a] Jangchud, A. and Chinnan, M. S., Peanut Protein Film as Affected by Drying Temperature and pH of Film Forming Solution, *Journal of Food Science*, 64 (1999) 1, 153-157.
- [Jar06] Jaros, D., Partschefeld, C., Henle, T. and Rohm, H., Transglutaminase in dairy products: chemistry, physics, applications, *Journal of Texture Studies*, 37 (2006) 2, 113-155.
- [Jer05] Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C. and Guerrero, A., Rheology and processing of gluten based bioplastics, *Biochemical Engineering Journal*, 26 (2005) 2-3, 131-138.
- [Jer07] Jerez, A., Partal, P., Martinez, I., Gallegos, C. and Guerrero, A., Protein-based bioplastics: effect of thermo-mechanical processing, *Rheologica Acta*, 46 (2007) 5, 711-720.
- [Jia98] Jiang, S. T., Leu, S. Z. and Tsai, G. J., Cross-Linking of Mackerel Surimi Actomyosin by Microbial Transglutaminase and Ultraviolet Irradiation, *J. Agric. Food Chem.*, 46 (1998) 12, 5278-5282.
- [Jon86] Jones, J. B., *Tetrahedron report number 203 : Enzymes in organic synthesis*, *Tetrahedron*, 42 (1986) 13, 3351-3403.
- [Jon02] Jones, A. G., *Crystallization Process Systems*, Butterworth Heinemann, Oxford, UK, 2002.
- [Jon06] Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Tanaka, M., Effects of plasticizers on the properties of edible films from skin gelatin of bigeye snapper and brownstripe red snapper, *European Food Research and Technology*, 222 (2006) 3-4, 229-235.
- [Jos07] Jost, R., *Milk and Dairy Products*, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2007.
- [Kal93] Kalichevsky, M. T., Jaroszkiewicz, E. M. and Blanshard, J. M. V., Glass transition of gluten. 1: Gluten and gluten-sugar mixtures, *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (1992) 5, 257-266.

- [Kal93a] Kalichevsky, M. T., Blanshard, J. M. V. and Tokarczuk, P. F., Effect of water content and sugars on the glass transition of casein and sodium caseinate, *International Journal of Food Science and Technology*, 28 (1993) 2, 139-151.
- [Kal07] Kale, G., Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Selke, S. E. and Singh, S. P., Compostability of bioplastic packaging materials: An overview, *Macromolecular Bioscience*, 7 (2007) 3, 255-277.
- [Kas00] Kashchiev, D., *Nucleation: Basic theory with applications*, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 2000.
- [Kas02] Kashiwagi, T., Yokoyama, K.-i., Ishikawa, K., Ono, K., Ejima, D., Matsui, H. and Suzuki, E.-i., Crystal Structure of Microbial Transglutaminase from *Streptovorticillium mobaraense*, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 46, 44252-44260.
- [Kee03] Keenan, T. R., Gelatin, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2003.
- [Kes86] Kester, J. J. and Fennema, O. R., Edible films and coatings - a review, *Food Technology*, 40 (1986) 12, 47-59.
- [Khw04] Khwaldia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S. P. and Hardy, J. L., Milk Proteins for Edible Films and Coatings, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44 (2004) 4, 239-251.
- [Khw04a] Khwaldia, K., Banon, S., Desobry, S. and Hardy, J., Mechanical and barrier properties of sodium caseinate-anhydrous milk fat edible films, *International Journal of Food Science & Technology*, 39 (2004) 4, 403-411.
- [Khw04b] Khwaldia, K., Banon, S., Perez, C. and Desobry, S., Properties of Sodium Caseinate Film-Forming Dispersions and Films, *J. Dairy Sci.*, 87 (2004) 7, 2011-2016.
- [Kim01] Kim, S. J. and Ustunol, Z., Solubility and Moisture Sorption Isotherms of Whey-Protein-Based Edible Films as Influenced by Lipid and Plasticizer Incorporation, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2001) 9, 4388-4391.

- [Kim06] Kim, K. M., Son, J. H., Kim, S.-K., Weller, C. L. and Hanna, M. A., Properties of Chitosan Films as a Function of pH and Solvent Type, *Journal of Food Science*, 71 (2006) 3, E119-E124.
- [Kle80] Kleyn, D. H. and Klostermeyer, H., Dehydroalanin als Reaktionsprodukt bei der Erhitzung von β -Casein, *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 170 (1980) 1, 11-13.
- [Kle09] Kleppmann, W., *Taschenbuch Versuchsplanung. Produkte und Prozesse optimieren*, Carl Hanser Verlag, München, 2009.
- [Klo00] Klostermeyer, H., Schmandke, H., Soeder, C. J., Schreiber, W., Oehlschläger, J., Scholtyssek, S., Kobald, M., Sander, A., Eilers, E. and von Kries, E., Proteins, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2000.
- [Kob01] Kobayashi, S. and Uyama, H., Enzymatic Polymerization, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, New York, USA, 2001.
- [Koe94] Koelsch, C., Edible water vapor barriers: properties and promise, *Trends in Food Science & Technology*, 5 (1994) 3, 76-81.
- [Koh07] Kohlgrüber, K., *Der gleichläufige Doppelschneckenextruder*, Carl Hanser Verlag, München, 2007.
- [Kok94] Kokini, J. L., Cocero, A. M. and Madeka, H., State Diagrams help predict rheology of cereal proteins, in *Symposium on Chemical and Rheological Changes during Phase Transition in: Food*, Annual Meeting of the Institute-of-Food-Technologists, Atlanta, USA, 1994, Jun 25-29, 74-82.
- [Kol03] Kolybaba, M., Tabil, L. G., Panigrahi, S., Crerar, W. J., Powell, T. and Wang, B., Biodegradable Polymers: Past, Present, and Future, in: *CSAE/ASAE Annual Intersectional Meeting*, Fargo, USA 2003, October 3-4.
- [Kom07] Kometani, H., Matsumura, T., Suga, T. and Kanai, T., Experimental and theoretical analyses of film casting process, *Journal of Polymer Engineering*, 27 (2007) 1, 1-28.

- [Kon05] Kongshaug, G., Brentnall, B. A., Chaney, K., Gregersen, J.-H., Stokka, P., Persson, B. and Kolmeijer, N. W., Phosphate Fertilizers, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2005.
- [Kro02] Krochta, J. M., Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities, in: Protein- Based Films and Coatings, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 2002, 1-41.
- [Kru93] Kruse, M., Zur Modellierung der Wachstumskinetik in der Lösungskristallisation, Dissertation, Universität Bremen, Fortschrittsberichte VDI, Reihe 3: Verfahrenstechnik, Nr. 309, VDI Verlag, Düsseldorf, 1993.
- [Kry06] Krystyna, C., Salmieri, S. and Lacroix, M., Modification of the properties of milk protein films by gamma radiation and polysaccharide addition, Journal of the Science of Food and Agriculture, 86 (2006) 6, 908-914.
- [Kum02] Kumar, R., Choudhary, V., Mishra, S., Varma, I. K. and Mattiason, B., Adhesives and plastics based on soy protein products, Industrial Crops and Products, 16 (2002) 3, 155-172.
- [Kum03] Kumar, N., Ezra, A., Ehrenfroind, T., Krasko, M. Y. and Domb, A. J., Biodegradable Polymers, Medical Applications, in: Encyclopedia of Polymer Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2003.
- [Kur01] Kuraishi, C., Yamazaki, K. and Susa, Y., Transglutaminase: Its utilization in the food industry, Food Reviews International, 17 (2001) 2, 221-246.
- [Lac02] Lacroix, M., Le, T. C., Ouattara, B., Yu, H., Letendre, M., Sabato, S. F., Mateescu, M. A. and Patterson, G., Use of gamma-irradiation to produce films from whey, casein and soya proteins: structure and functional characteristics, Radiation Physics and Chemistry, 63 (2002) 3-6, 827-832.
- [Lae70] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature, 227 (1970) 5259, 680-685.

- [Lau00] Lauber, S., Henle, T. and Klostermeyer, H., Relationship between the crosslinking of caseins by transglutaminase and the gel strength of yoghurt, *European Food Research and Technology*, V210 (2000) 5, 305-309.
- [Lau00a] Laue, W., Thiemann, M., Scheibler, E. and Wiegand, K. W., Nitrates and Nitrites, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2000.
- [Lau01] Lauber, S., Klostermeyer, H. and Henle, T., On the influence of non-enzymatic crosslinking of caseins on the gel strength of yoghurt, *Nahrung/Food*, 45 (2001) 3, 215-217.
- [Le05] Le Gall, M., Gueguen, J., Seve, B. and Quillien, L., Effects of grinding and thermal treatments on hydrolysis susceptibility of pea proteins (*Pisum sativum L.*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (2005) 8, 3057-3064.
- [Li04] Li-Chan, E. C. Y., Properties of proteins in food systems: an introduction, in: *Proteins in food processing*, ed. by Yada, R. Y., Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2004, 2-26.
- [Lim99] Lim, L. T., Mine, Y. and Tung, M. A., Barrier and Tensile Properties of Transglutaminase Cross-linked Gelatin Films as Affected by Relative Humidity, Temperature, and Glycerol Content, *Journal of Food Science*, 64 (1999) 4, 616-622.
- [Lin89] Linko, P., *Extrusion Cooking*, American Association of Cereal Chemists, New York, USA, 1989.
- [Lin03] Lin, S. Y. and Krochta, J. M., Plasticizer Effect on Grease Barrier and Color Properties of Whey-protein Coatings on Paperboard, *Journal of Food Science*, 68 (2003) 1, 229-233.
- [Liu05] Liu, L., Kerry, J. F. and Kerry, J. P., Selection of optimum extrusion technology parameters in the manufacture of edible/biodegradable packaging films derived from food-based polymers, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3 (2005) 3-4, 51-58.

- [Liu07] Liu, K. S. and Hsieh, F. H., Protein-protein interactions in high moisture-extruded meat analogs and heat-induced soy protein gels, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 84 (2007) 8, 741-748.
- [Liu08] Liu, K. S. and Hsieh, F. H., Protein-protein interactions during high-moisture extrusion for fibrous meat analogues and comparison of protein solubility methods using different solvent systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (2008) 8, 2681-2687.
- [Lor98] Lorenzen, P. C., Schlimme, E. and Roos, N., Crosslinking of sodium caseinate by a microbial transglutaminase, *Die Nahrung*, 42 (1998) 3-4, 151-154.
- [Lor00] Lorenzen, P. C., Techno-functional properties of transglutaminase-treated milk proteins, *Milchwissenschaft-Milk Science International*, 55 (2000) 12, 667-670.
- [Lor03] Lorand, L. and Graham, R. M., Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4 (2003) 2, 140-156.
- [Lu03] Lu, S. Y., Zhou, N. D., Tian, Y. P., Li, H. Z. and Chen, J., Purification and properties of transglutaminase from *Streptoverticillium mobaraense*, *Journal of Food Biochemistry*, 27 (2003) 2, 109-125.
- [Lyn97] Lynch, A. G., Mulvihill, D. M., Law, A. J. R., Leaver, J. and Horne, D. S., Chromatographic elution profiles, electrophoretic properties and free amino and sulphhydryl group contents of commercial sodium caseinates, *International Dairy Journal*, 7 (1997) 4, 213-220.
- [Mad96] Madeka, H. and Kokini, J. L., Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein: Development of a preliminary state diagram, *Cereal Chemistry*, 73 (1996) 4, 433-438.
- [Mag92] Magoshi, J., Nakamura, S. and Murakami, K.-I., Structure and physical properties of seed proteins. I. Glass transition and crystallization of zein protein from corn, *Journal of Applied Polymer Science*, 45 (1992) 11, 2043-2048.

- [Mar98] Marquard, R., Nutritive und antinutritive Inhaltsstoffe der Leguminosen, in Leguminosen zur Kornnutzung, <http://www.genres.de/leguminosen/>, [Abrufdatum: 18.11.2009].
- [Mar02] Martin-Polo, M., Mauguin, C. and Voilley, A., Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 1. Influence of the film preparation technique, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (2002) 3, 407-412.
- [Mar02a] Martin-Polo, M., Voilley, A., Blond, G., Colas, B., Mesnier, M. and Floquet, N., Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of the physical state, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (2002) 3, 413-418.
- [Mar05] Mariniello, L. and Porta, R., Transglutaminases as biotechnological tools, *Progress in Experimental Tumor Research*, 38 (2005), 174-191.
- [Mar07] Marco, C., Perez, G., Ribotta, P. and Rosell, C. M., Effect of microbial transglutaminase on the protein fractions of rice, pea and their blends, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (2007) 14, 2576-2582.
- [Mar07a] Marechal, E., Native and Modified Casein, in: *Handbook of Engineering Biopolymers: Homopolymers, Blends and Composites*, ed. by Fakirov, S., Bhattacharyya, D., Carl Hanser Verlag, München, 2007, 507-535.
- [Mat87] Matheis, G. and Whitaker, J. R., A review: enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods, *Journal of Food Biochemistry*, 11 (1987) 4, 309-327.
- [Mau08] Mauri, A. N. and Anon, M. C., Mechanical and Physical Properties of Soy Protein Films with pH-Modified Microstructures, *Food Science and Technology International*, 14 (2008) 2, 119-125.
- [May94] Maynes, J. R. and Krochta, J. M., Properties of edible films from total milk protein, *Journal of Food Science*, 59 (1994) 4, 909-911.
- [McH94] McHugh, T. H. and Krochta, J. M., Milk-protein-based edible films and coatings, *Food Technology*, 48 (1994) 1, 97-103.

- [McH94a] McHugh, T. H. and Krochta, J. M., Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films : integrated oxygen permeability and tensile property evaluation, *Journal of agricultural and food chemistry*, 42 (1994) 4, 841-845.
- [McH94b] McHugh, T. H., Aujard, J. F. and Krochta, J. M., Plasticized whey-protein edible films - water vapor permeability properties, *Journal of Food Science*, 59 (1994) 2, 416-419.
- [Mec04] Mecking, S. Biologisch abbaubare Werkstoffe - Natur oder Petrochemie?, *Angewandte Chemie*, 116 (2004) 9, 1096-1104.
- [Mer01] Mersmann, A., Heyer, C. and Eble, A., Activated Nucleation, in: *Crystallization Technology Handbook*, ed. by Mersmann, A., Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2001, 45-80.
- [Mer06] Merck, Safety Data Sheet (EC Directive 91/155/ECC), Ammonium Sulfate, Merck KGaA, Darmstadt, 2006.
- [Mes02] Meste, M. L., Champion, D., Roudaut, G., Blond, G. and Simatos, D., Glass Transition and Food Technology: A Critical Appraisal, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 7, 2444-2458.
- [Mez98] Mezgheni, E., D'Aprano, G. and Lacroix, M., Formation of sterilized edible films based on caseinates: Effects of calcium and plasticizers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1998) 1, 318-324.
- [Mic95] Michov, B., *Elektrophorese. Theorie und Praxis*, de Gryter, Berlin, 1995.
- [Mil97] Miller, K. S. and Krochta, J. M., Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 8 (1997) 7, 228-237.
- [Moh05] Mohanty, A. K., Tummala, P., Liu, W., Misra, M., Mulukutla, P. V. and Drzal, L. T., Injection molded biocomposites from soy protein based bioplastic and short industrial hemp fiber, *Journal of Polymers and the Environment*, 13 (2005) 3, 279-285.
- [Mon09] Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc., Danvers, USA, 2009.

- [Mor99] Morales, A. and Kokini, J. L., State diagrams of soy globulins, *Journal of Rheology*, 43 (1999) 2, 315-325.
- [Mor00] Morillon, V., Debeaufort, F., Capelle, M., Blond, G. and Voilley, A., Influence of the Physical State of Water on the Barrier Properties of Hydrophilic and Hydrophobic Films, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 1, 11-16.
- [Mor02] Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. and Voilley, A., Factors Affecting the Moisture Permeability of Lipid-Based Edible Films: A Review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, V42 (2002) 1, 67-89.
- [Mot98] Motoki, M. and Seguro, K., Transglutaminase and its use for food processing, *Trends in Food Science & Technology*, 9 (1998) 5, 204-210.
- [Muk06] Mukerjee, R. and Wu, J. C. F., *A Modern Theory of Factorial Designs*, Springer, Berlin, 2006.
- [Mul01] Mullin, J. W., *Crystallization*, Butterworth Heinemann, Oxford, UK, 2001.
- [Mye02] Myerson, A., S., *Handbook of Industrial Crystallization*, Butterworth-Heinemann, Stonham, USA, 2002.
- [Nen06] Nentwig, J., *Kunststoff-Folien*, Carl Hanser Verlag, München, 2006.
- [Nga08] Ngai, K. L., Capaccioli, S. and Shinyashiki, N., The Protein "Glass" Transition and the Role of the Solvent, *The Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 12, 3826-3832.
- [Nie95] Nielsen, P. M., Reactions and potential industrial applications of transglutaminase. Review of literature and patents, *Food Biotechnology*, 9 (1995) 3, 119-156.
- [Nis97] Nishinari, K., Watase, M. and Hatakeyama, T., Effects of polyols and sugars on the structure of water in concentrated gelatin gels as studied by low temperature differential scanning calorimetry, *Colloid & Polymer Science*, 275 (1997) 11, 1078-1082.

- [Non92] Nonaka, M., Sakamoto, H., Toiguchi, S., Kawajiri, H., Soeda, T. and Motoki, M., Sodium Caseinate and Skim Milk Gels Formed by Incubation with Microbial Transglutaminase, *Journal of Food Science*, 57 (1992) 5, 1214-1241.
- [Nus09] Nussinovitch, A., Biopolymer Films and Composite Coatings, in *Modern Biopolymer Science: Bridging the Divide between Fundamental Treatise and Industrial Application*, ed. by Kasapis, Stefan, Norton, Ian T., Ubink, Johan B., Academic Press, San Diego, USA, 2009, 295-326.
- [Oga00] Ogale, A. A., Cunningham, P., Dawson, P. L. and Acton, J. C., Viscoelastic, Thermal, and Microstructural Characterization of Soy Protein Isolate Films, *Journal of Food Science*, 65 (2000) 4, 672-679.
- [Oh04] Oh, J. H., Wang, B., Field, P. D. and Aglan, H. A., Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase, *International Journal of Food Science and Technology*, 39 (2004) 3, 287-294.
- [Orb04] Orban, J. M., Wilson, L. B., Kofroth, J. A., El-Kurdi, M. S., Maul, T. M. and Vorp, D. A., Crosslinking of collagen gels by transglutaminase, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68A (2004) 4, 756-762.
- [Orl03] Orliac, O., Rouilly, A., Silvestre, F. and Rigal, L., Effects of various plasticizers on the mechanical properties, water resistance and aging of thermo-moulded films made from sunflower proteins, *Industrial Crops and Products*, 18 (2003) 2, 91-100.
- [Ößz06] Ößzrenk, E., The use of transglutaminase in dairy products, *International Journal of Dairy Technology*, 59 (2006) 1, 1-7.
- [Özd08] Özdemir, M. and Floros, J. D., Optimization of edible whey protein films containing preservatives for water vapor permeability, water solubility and sensory characteristics, *Journal of Food Engineering*, 86 (2008) 2, 215-224.
- [Par93] Park, H. J., Weller, C. L., Vergano, P. J. and Testin, R. F., Permeability and Mechanical Properties of Cellulose-Based Edible Films, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 6, 1361-1364.

- [Par02] Park, S. Y., Marsh, K. S. and Rhim, J. W., Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected by the Type of Organic Solvents, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 1, 194-197.
- [Par07] Partschefeld, C., Schwarzenbolz, U., Richter, S. and Henle, T., Crosslinking of casein by microbial transglutaminase and its resulting influence on the stability of micelle structure, *Biotechnology Journal*, 2 (2007) 4, 456-461.
- [Par08] Park, J. W., Whiteside, W. S. and Cho, S. Y., Mechanical and water vapor barrier properties of extruded and heat-pressed gelatin films, *Lwt-Food Science and Technology*, 41 (2008) 4, 692-700.
- [Pat74] Patel, K. M. and Johnson, J. A., Horsebean as protein supplement in breadmaking.1. Isolation of horsebean protein and its amino-acid composition, *Cereal Chemistry*, 51 (1974) 5, 693-701.
- [Pfl05] Pfeleiderer, C., Mainusch, M., Weber, J., Hils, M. and Fuchsbaauer, H.-L., Inhibition of bacterial transglutaminase by its heat-treated pro-enzyme, *Microbiological Research*, 160 (2005) 3, 265-271.
- [Pol02] Pol, H., Dawson, P., Acton, J. and Ogale, A., Soy Protein Isolate/Corn-Zein Laminated Films: Transport and Mechanical Properties, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 1, 212-217.
- [Pom03] Pommet, M., Redl, A., Morel, M. H., Domenek, S. and Guilbert, S., Thermoplastic processing of protein-based bioplastics: Chemical engineering aspects of mixing, extrusion and hot molding, *Macromolecular Symposia*, 197 (2003), 207-217.
- [Pru93] Prudencio-Ferreira, S. H. and Areas, J. A. G., Protein-Protein interactions in the extrusion of soya at various temperatures and moisture contents, *Journal of Food Science*, 58 (1993) 2, 378-381.
- [Rau01] Rauwendaal, C., Extrusion, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2001.
- [Rau01a] Rauwendaal, C., *Polymer Extrusion*, Carl Hanser Verlag, München, 2001.

- [Rau08] Rauwendaal, C., SPC - Statistical Process Control in Injection Molding and Extrusion, Carl Hanser Verlag, München, 2008.
- [Red99] Redl, A., Marie Hélène, M., Joëlle, B., Stéphane, G. and Bruno, V., Rheological properties of gluten plasticized with glycerol: dependence on temperature, glycerol content and mixing conditions, *Rheologica Acta*, V38 (1999) 4, 311-320.
- [Red00] Redl, A., Morel, M. H., Vergnes, B. and Guilbert, S., Rheological and biochemical approaches describing changes in molecular structure of gluten protein during extrusion, in: 7th International Wheat Gluten Workshop, ed. by Shewry, P. R., Tatham, A. S., Bristol, UK, 2000, Apr 02-06, 430-434.
- [Red09] Reddy, R., Chang, L., Luthra, S., Collins, G., Lopez, C., Shamblin, S. L., Pikal, M. J., Gatlin, L. A. and Shalaev, E. Y., The glass transition and Sub- T_g -relaxation in pharmaceutical powders and dried proteins by thermally stimulated current, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2009) 1, 81-93.
- [Rhi07] Rhim, J. W. and Ng, P. K. W., Natural biopolymer-based nanocomposite films for packaging applications, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (2007) 4, 411-433.
- [Ria00] Riaz, M. N., Introduction to Extruders and Their Principles, in: *Extruders in food applications*, ed. by Riaz, Mian N., Technomic Publishing Company, Lancaster, UK, 2000, 1-24.
- [Rin03] Ringe, D. and Petsko, G. A., The 'glass transition' in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it, *Biophysical Chemistry*, 105 (2003) 2-3, 667-680.
- [Rot09] Roth, Sicherheitsdatenblatt (1907/2006/EG), Kaliumnitrat, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, 2009.
- [Rot09a] Roth, Sicherheitsdatenblatt (1907/2006/EG), Harnstoff, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, 2009.
- [Rou06] Rouilly, A., Film extrusion of sunflower protein isolate, *Polymer Engineering und Science*, 46 (2006) 11, 1635-1640.

- [Rud08] Rudnik, E., *Compostable Polymer Materials*, Elsevier Science & Technology, Oxford, UK, 2008.
- [Sak94] Sakamoto, H., Kumazawa, Y. and Motoki, M., Strength of Protein Gels Prepared with Microbial Transglutaminase as Related to Reaction Conditions, *Journal of Food Science*, 59 (1994) 4, 866-871.
- [Sam04] Samouillan, V., Andre, C., Dandurand, J. and Lacabanne, C., Effect of Water on the Molecular Mobility of Elastin, *Biomacromolecules*, 5 (2004) 3, 958-964.
- [Sat81] Sathe, S. K. and Salunkhe, D. K., Preparation and utilization of protein concentrates and isolates for nutritional and functional improvements of foods, *Journal of Food Quality*, 4 (1981) 4, 233-245.
- [Sch49] Schultz, T. H., Miers, J. C., Owens, H. S. and Maclay, W. D., Permeability of Pectinate Films to Water Vapor, *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 53 (1949) 9, 1320-1330.
- [Sch97] Scheffler, E., *Statistische Versuchsplanung und -auswertung: Eine Einführung für Praktiker*, Dt. Verl. für Grundstoffindustrie, Stuttgart, 1997.
- [Sch00] Schorsch, C., Carrie, H. and Norton, I. T., Cross-linking casein micelles by a microbial transglutaminase: influence of cross-links in acid-induced gelation, *International Dairy Journal*, 10 (2000) 8, 529-539.
- [Sch05] Schuck, P., Blanchard, E., Dolivet, A., Mejean, S., Onillon, E. and Jean-tet, R., Water activity and glass transition in dairy ingredients, *Lait*, 85 (2005) 4-5, 295-304.
- [Sch05a] Schou, M., Longares, A., Montesinos-Herrero, C., Monahan, F. J., O'Riordan, D. and O'Sullivan, M., Properties of edible sodium caseinate films and their application as food wrapping, *Food Science and Technology*, 38 (2005) 6, 605-610.
- [Sch05b] Schwank, D., Film Applications, in: *Film Extrusion Manual*, ed. by Butler, Thomas I., Tappi Press, Atlanta, USA, 2005, 15-20.

- [Sch07] Schulz, C., Wickert, M., Kijora, C., Ogunji, J. and Rennert, B., Evaluation of pea protein isolate as alternative protein source in diets for juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*, *Aquaculture Research*, 38 (2007) 5, 537-545.
- [Sch07a] Schrieber, R. and Gareis, H., *Gelatine Handbook*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KG, Weinheim, 2007.
- [Sco05] Scott, G. Standards for environmentally biodegradable plastics, in: *Biodegradable polymers for industrial applications*, ed. by Smith, Ray, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, 2005, 313-335.
- [Sea94] Seal, K. J. Test methods and standards for biodegradable plastics, in: *Chemistry and Technology of Biodegradable Polymers*, ed. by Griffin, G. J. L., Blackie Academic & Professional, London, UK, 1994, 116-134.
- [Seg02] Seguro, K., Transglutaminase, in: *Encyclopedia of Bioprocess Technology - Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2002.
- [Sha02] Shaw, N. B., Monahan, F. J., O'Riordan, E. D. and O'Sullivan, M., Physical Properties of WPI Films Plasticized with Glycerol, Xylitol, or Sorbitol, *Journal of Food Science*, 67 (2002) 1, 164-167.
- [Sha02a] Shaw, N. B., Monahan, F. J., O'Riordan, E. D. and O'Sullivan, M., Effect of soya oil and glycerol on physical properties of composite WPI films, *Journal of Food Engineering*, 51 (2002) 4, 299-304.
- [Sha08] Shand, P. J., Ya, H., Pietrasik, Z. and Wanasundara, P., Transglutaminase treatment of pea proteins: Effect on physicochemical and rheological properties of heat-induced protein gels, *Food Chemistry*, 107 (2008) 2, 692-699.
- [She97] Shellhammer, T. H. and Krochta, J. M., Whey Protein Emulsion Film Performance as Affected by Lipid Type and Amount, *Journal of Food Science*, 62 (1997) 2, 390-394.
- [She09] Shen, L., Haufe, J. and Patel, M. K., Product overview and market projection of emerging bio-based plastics, PRO-BIP 2009, Final Report, Utrecht, Die Niederlande, 2009.

- [Shi98] Shih, F. F., Film-forming properties and edible films of plant proteins, *Nahrung / Food*, 42 (1998) 03-04, 254-256.
- [Shi02] Shimba, N., Yokoyama, Y. and Suzuki, E., NMR-based screening method for transglutaminases: Rapid analysis of their substrate specificities and reaction rates, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (2002) 6, 1330-1334.
- [Shi03] Shiku, Y., Hamaguchi, P. Y. and Tanaka, M., Effect of pH on the preparation of edible films based on fish myofibrillar proteins, *Fisheries Science*, 69 (2003) 5, 1026-1032.
- [Sie99] Siew, D. C. W., Heilmann, C., Easteal, A. J. and Cooney, R. P., Solution and Film Properties of Sodium Caseinate/Glycerol and Sodium Caseinate/Polyethylene Glycol Edible Coating Systems, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999) 8, 3432-3440.
- [Sin81] Singh, G. P., Parak, F., Hunklinger, S. and Dransfeld, K., Role of Adsorbed Water in the Dynamics of Metmyoglobin, *Physical Review Letters*, 47 (1981) 9, 685-688.
- [Sin91] Singh, H., Modification of food proteins by covalent crosslinking, *Trends in Food Science & Technology*, 2 (1991), 196-200.
- [Smo09] Smola, T., Cramer, J., Schneider, A. V., Kefenbaum, K., Braun-Mai, K. and Mosel, J., GESTIS-Stoffdatenbank, BGIA - Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, 2009.
- [Sob02] Sobral, P. J. A., Monterrey-Q, E. S. and Habitante, A., Glass transition study of Nile Tilapia myofibrillar protein films plasticized by glycerin and water, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 67 (2002) 2, 499-504.
- [Soh06] Sohail, S. S., Wang, B., Biswas, M. A. S. and Oh, J.-H., Physical, Morphological, and Barrier Properties of Edible Casein Films with Wax Applications, *Journal of Food Science*, 71 (2006) 4, C255-C259.
- [Sot01] Sothornvit, R. and Krochta, J. M., Plasticizer effect on mechanical properties of β -lactoglobulin films, *Journal of Food Engineering*, 50 (2001) 3, 149-155.

- [Sot05] Sothornvit, R. and Krochta, J. M., Plasticizers in edible films and coatings, in: Innovations in Food Packaging, ed. by Han, J. H., Elsevier Academic Press Inc., San Diego, USA, 2005, 403-433.
- [Spe05] Sperling, L. H., Introduction to Polymer Science, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 2005.
- [Ste07] Stein, H. H. and Bohlke, R. A., The effects of thermal treatment of field peas (*Pisum sativum* L.) on nutrient and energy digestibility growing pigs, Journal of Animal Science, 85 (2007) 6, 1424-1431.
- [Suy05] Suyatma, N. E., Tighzert, L. and Copinet, A., Effects of hydrophilic plasticizers on mechanical, thermal, and surface properties of chitosan films, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 10, 3950-3957.
- [Szp93] Szpendowski, J., Amarowicz, R., Smietana, Z. and Kozikowski, W., Extrusion influence on the nutritive value of casein preparations, Food / Nahrung, 37 (1993) 1, 1-4.
- [Szt08] Sztuka, K. and Kołodziejaska, I., Effect of transglutaminase and EDC on biodegradation of fish gelatin and gelatin-chitosan films, European Food Research and Technology, 226 (2008) 5, 1127-1133.
- [Tak97] Takayama, S., McGarvey, G. J. and Wong, C. H., Enzymes in organic synthesis: recent developments in aldol reactions and glycosylations, Chemical Society Reviews, 26 (1997) 6, 407-415.
- [Tal05] Talens, P. and Krochta, J. M., Plasticizing Effects of Beeswax and Carnauba Wax on Tensile and Water Vapor Permeability Properties of Whey Protein Films, Journal of Food Science, 70 (2005) 3, E239-E243.
- [Tan01] Tanaka, M., Iwata, K., Sanguandeeikul, R., Handa, A. and Ishizaki, S., Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins, Fisheries Science, 67 (2001) 2, 346-351.
- [Tan05] Tang, C., Yang, X. Q., Chen, Z., Wu, H. and Peng, Z. Y., Physicochemical and structural characteristics of sodium caseinate biopolymers induced by microbial transglutaminase, Journal of Food Biochemistry, 29 (2005) 4, 402-421.

- [Tan06] Tang, C. H., Chen, Z., Li, L. and Yang, X. Q., Effects of transglutaminase treatment on the thermal properties of soy protein isolates, *Food Research International*, 39 (2006) 6, 704-711.
- [Tay88] Taylor, J. R., Fehleranalyse, Wiley VHC Verlag GmbH, Weinheim, 1988.
- [Tha02] Thalmann, C. and Lötzbeyer, T., Enzymatic cross-linking of proteins with tyrosinase, *European Food Research and Technology*, V214 (2002) 4, 276-281.
- [Tho05] Thomazine, M., Carvalho, R. A. and Sobral, P. J. A., Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol, *Journal of Food Science*, 70 (2005) 3, E172-E176.
- [Tim05] Timm, D., Film Test Methods, in: *Film Extrusion Manual*, ed. by Butler, Thomas I., Tappi Press, Atlanta, USA, 2005, 339-346.
- [Tol93] Tolstoguzov, V. B., Thermoplastic extrusion - the mechanism of the formation of extrudate structure and properties, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70 (1993) 4, 417-424.
- [Töm01] Tömösközi, S., Lasztity, R., Haraszi, R. and Baticz, O., Isolation and study of the functional properties of pea proteins, *Nahrung-Food*, 45 (2001) 6, 399-401.
- [Tre00] Trezza, T. A. and Krochta, J. M., The Gloss of Edible Coatings as Affected by Surfactants, Lipids, Relative Humidity, and Time, *Journal of Food Science*, 65 (2000) 4, 658-662.
- [Tre07] Trespacios, P. and Pla, R., Simultaneous application of transglutaminase and high pressure to improve functional properties of chicken meat gels, *Food Chemistry*, 100 (2007) 1, 264-272.
- [Tru04] Truong, V. D., Clare, D. A., Catignani, G. L. and Swaisgood, H. E., Cross-Linking and Rheological Changes of Whey Proteins Treated with Microbial Transglutaminase, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 5, 1170-1176.

- [Ugr07] Ugrozov, V., Filippov, A. and Sidorenko, Y., Theoretical description of the hygroscopicity of hydrophilic biopolymers and their mixtures, *Colloid Journal*, 69 (2007) 2, 232-236.
- [Ulr02] Ulrich, J., Crystallization, in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2002.
- [Vac00] Vachon, C., Yu, H. L., Yefsah, R., Alain, R., St-Gelais, D. and Lacroix, M., Mechanical and Structural Properties of Milk Protein Edible Films Cross-Linked by Heating and Gamma-Irradiation, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 8, 3202-3209.
- [Van05] Van der Zee, M., Biodegradability of Polymers - Mechanism and Evaluation Methods, in: *Handbook of biodegradable polymers*, ed. by Bastioli, Catia, Rapra Technology Limited, Shawbury, UK, 2005, 1-32.
- [Van07] Van Beilen, J. and Poirier, Y., Prospects for Biopolymer Production in Plants, in: *Green Gene Technology*, ed. by Van Beilen, Jan, Poirier, Yves, Springer, Berlin, 2007, 133-151.
- [Vaz03] Vaz, C. M., Fossen, M., van Tuil, R. F., de Graaf, L. A., Reis, R. L. and Cunha, A. M., Casein and soybean protein-based thermoplastics and composites as alternative biodegradable polymers for biomedical applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 65A (2003) 1, 60-70.
- [Vir00] Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z. and Gueguen, J., Preparation and Characterization of Films from Pea Protein, *J. Agric. Food Chem.*, 48 (2000) 4, 1064-1069.
- [Vos80] Vose, J. R., Production and functionality of starches and protein isolates from legume seeds (field peas and horsebeans), *Cereal Chemistry*, 57 (1980) 6, 406-410.
- [Wad01] Wadey, B. L., Plasticizers, in *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [Wal06] Walscher, W., *Praktikum der Physik*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, 2006.

- [Wan03] Wang, Y., Rakotonirainy, A. M. and Padua, G. W., Thermal Behavior of Zein-based Biodegradable Films, *Starch - Stärke*, 55 (2003) 1, 25-29.
- [Wan05] Wan, V. C.-H., Kim, M. S. and Lee, S.-Y., Water Vapor Permeability and Mechanical Properties of Soy Protein Isolate Edible Films Composed of Different Plasticizer Combinations, *Journal of Food Science*, 70 (2005) 6, e387-e391.
- [Wan07] Wang, L. Z., Liu, L., Hohnes, J., Kerry, J. F. and Kerry, J. P., Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films, *International Journal of Food Science and Technology*, 42 (2007) 9, 1128-1138.
- [Wan08] Wang, L., Liu, L., Hohnes, J., Huang, J., Kerry, J. F. and Kerry, J. P., Effect of pH and addition of corn oil on the properties of whey protein isolate-based films using response surface methodology, *International Journal of Food Science & Technology*, 43 (2008) 5, 787-796.
- [Wan09] Wang, L. Z., Auty, M. A. E., Rau, A., Kerry, J. F. and Kerry, J. P., Effect of pH and addition of corn oil on the properties of gelatin-based biopolymer films, *Journal of Food Engineering*, 90 (2009) 1, 11-19.
- [Wei93] Weiß, S., Militzer, K.-E. and Gramlich, K., *Thermische Verfahrenstechnik*, Dt. Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1993.
- [Wes90] Westermeier, R., Gronau, S. and Habeck, C., *Elektrophorese-Praktikum*, Wiley-VCH, Weinheim, 1990.
- [Wes03] Weston, C. W., Papcun, J. R. and Dery, M., Ammonium Compounds, in: *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, 2003.
- [Whi85] Whitesides, G. M. and Wong, C.-H., Enzyme in der organischen Synthese, *Angewandte Chemie*, 97 (1985) 8, 617-638.
- [Whi00] Whiteley, K. S., Heggs, T. G., Koch, H., Mawer, R. L. and Immel, W., Polyolefins, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim, 2000.

- [Wil96] Wilson, A. S., *Plasticisers: Principles and Practice*, Maney Publishing, London, UK, 1996.
- [Wu05] Wu, Y. V. and Nichols, N. N., Fine grinding and air classification of field pea, *Cereal Chemistry*, 82 (2005) 3, 341-344.
- [Wyp04] Wypych, G., *Handbook of Plasticizers*, William Andrew Publishing, Toronto, Canada, 2004.
- [Yil98] Yildirim, M. and Hettiarachchy, N. S., Properties of films produced by cross-linking whey proteins and 11S globulin using transglutaminase, *Journal of Food Science*, 63 (1998) 2, 248-252.
- [Yok04] Yokoyama, K., Nio, N. and Kikuchi, Y., Properties and applications of microbial transglutaminase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, V64 (2004) 4, 447-454.
- [Yu06] Yu, L., Dean, K. and Li, L., Polymer blends and composites from renewable resources, *Progress in Polymer Science*, 31 (2006) 6, 576-602.
- [Yun07] Yung, C. W., Wu, L. Q., Tullman, J. A., Payne, G. F., Bentley, W. E. and Barbari, T. A., Transglutaminase crosslinked gelatin as a tissue engineering scaffold, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 83A (2007) 4, 1039-1046.
- [Zha01] Zhang, J., Mungara, P. and Jane, J., Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets, *Polymer*, 42 (2001) 6, 2569-2578.
- [Zha06] Zhang, X., Hoobin, P., Burgar, I. and Do, M. D., pH Effect on the Mechanical Performance and Phase Mobility of Thermally Processed Wheat Gluten-Based Natural Polymer Materials, *Biomacromolecules*, 7 (2006) 12, 3466-3473.
- [Zha08] Zhang, L. and Zeng, M., Proteins as Sources of Materials, in: *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, ed. by Belgacem, M. N., Gandini, A., Elsevier Ltd., Oxford, UK, 2008, 479-493.

- [Zhu95] Zhu, Y., Rinzema, A., Tramper, J. and Bol, J., Microbial transglutaminase - A review of its production and application in food processing, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44 (1995) 3-4, 277-282.
- [Zhu08] Zhu, Y. and Tramper, J., Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing, *Trends in Biotechnology*, 26 (2008) 10, 559-565.

Tab. 10.2: Ergebnisse der Versuchsdurchführung an Extruder B mit dem Modellprotein NaCas lt. Tab. 4.3

Nr.	Ergebnisse									
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		E-Modul		Höhe		Fläche	
	[-]	[MPa]	s [MPa]	[%]	s [%]	[MPa]	s [MPa]	h [μm]	s [μm]	A ₀ [mm ²]
C01-L	8,72	0,42	70	23	164,56	39,48	261,8	33,71	3,93	0,51
C01-Q	9,37	0,73	22	2	192,02	93,72	221,4	29,30	3,32	0,44
C02-L	5,08	0,22	78	12	104,08	5,62	187,6	20,88	2,82	0,31
C02-Q	4,13	0,08	33	4	101,78	10,42	202,4	57,99	3,04	0,87
C02-L-2	6,15	0,29	90	11	74,19	18,30	234,0	54,25	3,51	0,81
C02-Q-2	6,08	0,44	32	3	50,12	35,33	192,4	21,16	2,89	0,32
C03-L	5,93	0,26	110	5	102,09	9,99	364,4	26,43	5,47	0,40
C03-Q	5,11	0,17	98	4	90,16	13,00	415,2	18,94	6,23	0,28
C04-L	11,35	0,84	80	13	188,86	29,83	175,4	17,52	2,63	0,26
C04-Q	10,9	1,08	24	3	159,65	54,99	157,4	17,47	2,36	0,26
C04-L-B	7,48	0,69	78	10	208,60	19,32	234,6	18,06	3,52	0,27
C04-Q-B	9,69	0,81	60	9	208,89	63,69	242,0	19,96	3,63	0,30
C05-L	10,66	0,42	91	6	223,89	51,42	197,2	10,43	2,96	0,16
C05-Q	12,35	0,55	34	2	321,06	30,45	177,4	15,61	2,66	0,23
C06-L	9,91	0,34	72	13	182,55	86,97	549,2	30,09	8,24	0,45
C06-Q	10,54	0,3	63	11	239,72	27,93	604,2	42,28	9,16	0,67
C07	6,87	0,58	82	8	153,62	18,35	528,2	116,00	7,92	1,74
C08	7,86	0,36	53	10	205,50	6,23	396,2	53,70	5,94	0,81
C09	8,24	1,01	60	19	221,27	34,72	444,4	112,90	6,67	1,69
C10	9,33	0,34	57	7	106,53	63,89	490,0	50,45	7,35	0,76
C11	11,89	1,01	81	12	299,67	23,83	453,0	71,18	6,80	1,07
C12	11,74	0,95	78	12	289,62	56,16	503,5	83,40	7,55	1,25
C13	10,66	0,42	91	6	223,89	51,42	482,0	73,00	7,23	1,10
C14-L	5,74	0,09	90	3	108,42	16,25	546,2	8,98	8,20	0,13
C14-Q	6,23	0,13	100	6	141,59	4,79	573,0	23,16	8,60	0,35

Tab. 10.3: Zusammensetzung der Proteinlösung vor dem Gießprozess (C: NaCas, G: Gelatine, K: Kaliumnitrat, H: Harnstoff, A: Ammoniumsulfat)*

Experiment	Zusammensetzung										Beschreibung
	Protein		Glycerin		TRIS-Puffer		MTG		Additiv		
[Nr.]	[g]	[Gew. %]	[g]	[Gew. %]	[g]	[Gew. %]	[g]	U/g NaCas	[g]	[Additiv:Protein]	[-]
Kaliumnitrat											
C/G-K01	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	0,00	0:1	-MTG
C/G-K02	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	0,50	1:12	
C/G-K03	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	1,00	1:6	
C/G-K04	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	1,50	1:4	
C/G-K05	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	3,00	1:2	
C/G-K06	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	4,50	1:1,33	
Harnstoff											
C/G-K07	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	0,00	0:1	+MTG
C/G-K08	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	0,50	1:12	
C/G-K09	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	1,00	1:6	
C/G-K10	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	1,50	1:4	
C/G-K11	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	3,00	1:2	
C/G-K12	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	4,50	1:1,33	
Harnstoff											
C/G-H01	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	0,00	0,00	0,00	0:1	Gly=const. -MTG
C/G-H02	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	0,00	0,00	0,50	1:12	
C/G-H03	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	0,00	0,00	1,00	1:6	
C/G-H04	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	0,00	0,00	1,50	1:4	
C/G-H05	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	1,50	25,00	0,00	0:1	Gly=const. +MTG
C/G-H06	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	1,50	25,00	0,50	1:12	
C/G-H07	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	1,50	25,00	1,00	1:6	
C/G-H08	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	1,50	25,00	1,50	1:4	

* Fortführung auf der nächsten Seite

Experiment	Zusammensetzung										Beschreibung
	Protein		Glycerin		TRIS-Puffer		MTG		Additiv		
	[Nr.]	[g]	[Gew. %]	[g]	[Gew. %]	[g]	[Gew. %]	[g]	U/g NaCas	[g]	
Harnstoff											
C/G-H09	6,00	5,15	0,00	0,00	110,40	94,85	0,00	0,00	1,50	1:4	Harnstoff=const. -MTG
C/G-H10	6,00	5,13	0,50	0,43	110,40	94,44	0,00	0,00	1,50	1:4	
C/G-H11	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	0,00	0,00	1,50	1:4	
C/G-H12	6,00	5,09	1,50	1,27	110,40	93,64	0,00	0,00	1,50	1:4	
C/G-H13	6,00	5,15	0,00	0,00	110,40	94,85	1,50	25,00	1,50	1:4	Harnstoff=const. -MTG
C/G-H14	6,00	5,13	0,50	0,43	110,40	94,44	1,50	25,00	1,50	1:4	
C/G-H15	6,00	5,11	1,00	0,85	110,40	94,04	1,50	25,00	1,50	1:4	
C/G-H16	6,00	5,09	1,50	1,27	110,40	93,64	1,50	25,00	1,50	1:4	
Ammoniumsulfat											
C/G-A01	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	0,00	0:1	-MTG
C/G-A02	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	1,00	1:6	
C/G-A03	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	2,00	1:3	
C/G-A04	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	3,00	1:2	
C/G-A05	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	0,00	0,00	4,00	1:1,5	
C/G-A06	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	0,00	0:1	+MTG
C/G-A07	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	1,00	1:6	
C/G-A08	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	2,00	1:3	
C/G-A09	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	3,00	1:2	
C/G-A10	6,00	5,03	3,00	2,51	110,40	92,46	1,50	25,00	4,00	1:1,5	

Tab. 10.4: Ergebnisse der Versuchsdurchführung einer Folienkristallisation mit dem Modellprotein NaCas lt. Tab. 10.3

Experiment	Ergebnisse							
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		Höhe		Fläche	
	[Nr.]	[MPa]	s [MPa]	[%]	s [%]	h [µm]	s [µm]	A ₀ [mm ²]
Kaliumnitrat, -MTG								
C-K01	4,95	0,68	102,00	6,00	209,40	24,67	3,14	0,37
C-K02	3,66	0,21	120,00	17,00	172,40	3,98	2,59	0,06
C-K03	3,65	0,06	123,00	5,00	178,20	6,46	2,67	0,10
C-K04	1,91	0,06	80,00	6,00	228,80	18,25	3,43	0,27
C-K05	1,71	0,09	21,00	4,00	278,00	13,47	4,17	0,20
C-K06	1,64	0,16	11,00	5,00	252,80	27,66	3,79	0,41
Kaliumnitrat, +MTG								
C-K07	4,50	0,41	109,00	13,00	228,60	15,32	3,43	0,23
C-K08	3,58	0,18	197,00	17,00	235,40	9,50	3,53	0,14
C-K09	4,02	0,09	201,00	6,00	232,80	5,17	3,49	0,08
C-K10	2,99	0,21	189,00	26,00	245,00	7,14	3,68	0,11
C-K11	1,67	0,10	94,00	27,00	287,00	9,57	4,31	0,14
C-K12	1,28	0,10	24,00	3,00	334,20	28,44	5,01	0,42
Harnstoff, Gly=const, -MTG								
C-H01	15,10	0,16	60,00	13,00	151,00	3,16	2,27	0,05
C-H02	6,19	0,25	78,00	5,00	158,50	2,49	2,39	0,04
C-H03	3,19	0,05	92,00	7,00	170,20	5,76	2,55	0,09
C-H04	1,91	0,03	96,00	3,00	187,80	3,96	2,82	0,06
Harnstoff, Gly=const, +MTG								
C-H05	12,30	1,03	68,00	9,00	164,37	4,08	2,47	0,06
C-H06	8,27	0,18	110,00	6,00	166,32	1,98	2,49	0,03
C-H07	4,99	0,25	137,00	6,00	195,20	3,24	2,93	0,05
C-H08	3,71	0,27	159,00	13,00	209,24	6,89	3,14	0,10
Harnstoff=const, -MTG								
C-H09	5,17	1,00	4,00	1,00	188,34	7,21	2,83	0,11
C-H10	4,44	0,16	83,00	7,00	194,06	5,30	2,91	0,08
C-H11	3,21	0,13	98,00	5,00	211,40	4,24	3,17	0,06
C-H12	1,89	0,22	106,00	11,00	245,87	10,24	3,69	0,15
Harnstoff=const, +MTG								
C-H13	7,07	0,50	128,00	6,00	193,00	3,54	2,90	0,05
C-H14	3,95	0,25	177,00	6,00	217,00	4,30	3,26	0,06
C-H15	2,40	0,21	165,00	10,00	256,40	2,97	3,85	0,04
C-H16	2,24	0,57	168,00	25,00	268,20	13,50	4,02	0,21
Ammoniumsulfat, -MTG								
C-A01	4,06	0,09	96,00	5,00	204,00	9,95	3,06	0,15
C-A02	2,46	0,08	48,00	4,00	186,40	4,93	2,80	0,07
C-A03	1,95	0,12	14,00	3,00	197,80	9,23	2,97	0,14
C-A04	1,93	0,21	6,00	2,00	243,00	46,57	3,65	0,70
C-A05	1,15	0,52	3,00	2,00	286,60	76,81	4,30	1,15
Ammoniumsulfat, +MTG								
C-A06	4,89	0,24	134,00	10,00	263,80	4,32	3,96	0,07
C-A07	2,08	0,07	148,00	12,00	269,20	11,43	4,04	0,17
C-A08	0,95	0,14	9,00	4,00	312,40	16,35	4,69	0,25
C-A09	1,06	0,12	3,00	1,00	315,80	11,52	4,74	0,17
C-A10	1,20	0,23	2,00	1,00	343,60	27,53	5,16	1,01

Tab. 10.5: Ergebnisse der Versuchsdurchführung einer Folienkristallisation mit dem Modellprotein Gelatine lt. Tab. 10.3

Experiment	Ergebnisse							
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		Höhe		Höhe	
	[Nr.]	[MPa]	s [MPa]	h [µm]	s [µm]	[MPa]	s [%]	h [µm]
Kaliumnitrat, -MTG								
G-K01	9,41	1,49	52,00	6,00	194,20	11,28	2,91	0,17
G-K02	5,89	0,48	71,00	10,00	195,60	30,03	2,94	0,45
G-K03	5,56	0,48	83,00	7,00	205,40	26,06	3,08	0,39
G-K04	5,35	0,42	84,00	2,00	209,80	15,22	3,15	0,32
G-K05	4,74	0,13	78,00	2,00	223,40	7,99	3,35	0,12
G-K06	3,64	0,39	77,00	6,00	326,60	22,67	4,90	0,34
Kaliumnitrat, +MTG								
G-K07	13,52	0,76	53,00	5,00	213,40	3,58	3,20	0,05
G-K08	5,54	0,28	111,00	5,00	241,60	3,91	3,62	0,07
G-K09	4,07	0,50	140,00	6,00	297,40	2,07	4,46	0,03
G-K10	4,48	0,53	139,00	8,00	292,00	4,53	4,38	0,07
G-K11	3,58	0,34	147,00	6,00	340,00	2,83	5,23	0,16
G-K12	2,96	0,81	122,00	13,00	324,60	16,50	4,87	0,25
Harnstoff, Gly=const, -MTG								
G-H01	47,92	1,47	4,00	1,00	140,20	4,09	2,10	0,06
G-H02	24,65	0,72	21,00	2,00	150,20	0,45	2,25	0,01
G-H03	12,25	0,47	43,00	2,00	161,00	2,55	2,42	0,04
G-H04	7,01	0,55	61,00	2,00	173,00	3,54	2,60	0,05
Harnstoff, Gly=const, +MTG								
G-H05	33,10	1,51	36,00	3,00	189,30	23,01	2,84	0,35
G-H06	17,74	2,31	75,00	10,00	183,00	0,71	2,75	0,01
G-H07	6,24	0,46	136,00	4,00	218,60	2,70	3,28	0,04
G-H08	4,38	0,40	126,00	5,00	227,40	4,16	3,41	0,06
Harnstoff=const, -MTG								
G-H09	22,74	0,48	26,00	2,00	154,40	1,58	2,32	0,02
G-H10	10,90	0,19	49,00	2,00	166,60	2,72	2,50	0,04
G-H11	6,49	0,30	66,00	2,00	177,80	3,78	2,67	0,05
G-H12	4,27	0,33	83,00	3,00	198,00	4,42	2,97	0,07
Harnstoff=const, +MTG								
G-H13	20,81	1,91	41,00	5,00	173,19	3,21	2,60	0,05
G-H14	10,15	1,24	102,00	9,00	183,23	2,84	2,75	0,04
G-H15	6,22	0,39	126,00	6,00	203,54	5,09	3,05	0,08
G-H16	-	-	-	-	-	-	-	-
Ammoniumsulfat, -MTG								
G-A01	7,73	0,40	64,00	6,00	192,20	0,84	2,89	0,01
G-A02	7,31	0,17	100,00	6,00	224,00	4,95	3,36	0,07
G-A03	5,38	0,28	52,00	4,00	234,80	21,34	3,52	0,32
G-A04	6,53	0,36	72,00	8,00	255,80	3,70	3,84	0,05
G-A05	5,18	0,24	62,00	3,00	246,40	4,39	3,70	0,07
Ammoniumsulfat, +MTG								
G-A06	10,30	1,35	72,00	13,00	232,60	8,74	3,49	0,13
G-A07	10,56	0,59	65,00	5,00	225,00	3,67	3,38	0,05
G-A08	8,50	0,97	76,00	11,00	249,80	9,12	3,75	0,14
G-A09	7,96	0,24	75,00	3,00	259,60	2,79	3,90	0,04
G-A010	6,54	0,23	75,00	6,00	279,60	2,97	4,20	0,04

Tab. 10.6: Relative Standardabweichungen der Ergebnisse des Zugversuches mit Proben aus Extruder A

Nr.	Ergebnisse									
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		E-Modul		Höhe		Fläche	
	[-]	[MPa]	s [%]	[%]	s [%]	[MPa]	s [%]	h [μm]	s [%]	A ₀ [mm ²]
1	17,48	9,58	53	10,02	10,97	28,62	570,50	3,31	8,56	3,31
2	21,79	12,27	36	16,39	58,88	52,06	140,30	6,80	2,10	6,80
3	2,44	6,54	106	1,55	161,05	33,34	169,60	13,38	2,54	13,38
4	28,43	10,74	29	8,79	78,34	27,96	345,68	3,61	5,19	3,61
5	4,87	22,18	68	6,71	186,08	18,09	403,60	3,35	6,05	3,35
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 10.7: Relative Standardabweichungen der Ergebnisse des Zugversuches mit Proben aus Extruder B

Nr.	Ergebnisse							
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		E-Modul		Höhe	
	[-]	[MPa]	s [%]	[%]	s [%]	[MPa]	s [%]	h [μm]
C01-L	8,72	4,82	70	32,86	164,56	23,99	261,8	12,88
C01-Q	9,37	8,37	22	9,09	192,02	48,81	221,4	13,23
C02-L	5,08	2,52	78	15,38	104,08	5,40	187,6	11,13
C02-Q	4,13	0,92	33	12,12	101,78	10,24	202,4	28,65
C02-L-2	6,15	3,33	90	12,22	74,19	24,67	234,0	23,18
C02-Q-2	6,08	5,05	32	9,38	50,12	70,49	192,4	11,00
C03-L	5,93	2,98	110	4,55	102,09	9,79	364,4	7,25
C03-Q	5,11	1,95	98	4,08	90,16	14,42	415,2	4,56
C04-L	11,35	9,63	80	16,25	188,86	15,79	175,4	9,99
C04-Q	10,9	12,39	24	12,50	159,65	34,44	157,4	11,10
C04-L-B	7,48	7,91	78	12,82	208,60	9,26	234,6	7,70
C04-Q-B	9,69	9,29	60	15,00	208,89	30,49	242,0	8,25
C05-L	10,66	4,82	91	6,59	223,89	22,97	197,2	5,29
C05-Q	12,35	6,31	34	5,88	321,06	9,48	177,4	8,80
C06-L	9,91	3,90	72	18,06	182,55	47,64	549,2	5,48
C06-Q	10,54	3,44	63	17,46	239,72	11,65	604,2	7,00
C07	6,87	6,65	82	9,76	153,62	11,95	528,2	21,96
C08	7,86	4,13	53	18,87	205,50	3,03	396,2	13,55
C09	8,24	11,58	60	31,67	221,27	15,69	444,4	25,41
C10	9,33	3,90	57	12,28	106,53	59,97	490,0	10,30
C11	11,89	11,58	81	14,81	299,67	7,95	453,0	15,71
C12	11,74	10,89	78	15,38	289,62	19,39	503,5	16,56
C13	10,66	4,82	91	6,59	223,89	22,97	482,0	15,15
C14-L	5,74	1,03	90	3,33	108,42	14,99	546,2	1,64
C14-Q	6,23	1,49	100	6,00	141,59	3,38	573,0	4,04

Tab. 10.8: Relative Standardabweichungen von NaCas-Folien als Ergebnis des Zugversuches mit Proben aus dem Gießfolienprozess modifiziert durch kristalline Substanzen

Experiment	Ergebnisse							
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		Höhe		Fläche	
	[Nr.]	[MPa]	s _{rel} [%]	[%]	s _{rel} [%]	h [µm]	s _{rel} [%]	A ₀ [mm ²]
Kaliumnitrat, -MTG								
C-K01	4,95	13,74	102	5,88	209,4	11,78	3,14	11,78
C-K02	3,66	5,74	120	14,17	172,4	2,31	2,59	2,32
C-K03	3,65	1,64	123	4,07	178,2	3,62	2,67	3,75
C-K04	1,91	3,14	80	7,50	228,8	7,98	3,43	7,87
C-K05	1,71	5,26	21	19,05	278	4,85	4,17	4,80
C-K06	1,64	9,76	11	45,45	252,8	10,94	3,79	10,82
Kaliumnitrat, +MTG								
C-K07	4,5	9,11	109	11,93	228,6	6,70	3,43	6,71
C-K08	3,58	5,03	197	8,63	235,4	4,04	3,53	3,97
C-K09	4,02	2,24	201	2,99	232,8	2,22	3,49	2,29
C-K10	2,99	7,02	189	13,76	245	2,91	3,68	2,99
C-K11	1,67	5,99	94	28,72	287	3,33	4,31	3,25
C-K12	1,28	7,81	24	12,50	334,2	8,51	5,01	8,38
Harnstoff, Gly=const, -MTG								
C-H01	15,1	1,06	60	21,67	151	2,09	2,27	2,20
C-H02	6,19	4,04	78	6,41	158,50	1,57	2,39	1,67
C-H03	3,19	1,57	92	7,61	170,2	3,39	2,55	3,53
C-H04	1,91	1,57	96	3,13	187,80	2,11	2,82	2,13
Harnstoff, Gly=const, +MTG								
C-H05	12,3	8,37	68	13,24	164,37	2,48	2,46555	1,51
C-H06	8,27	2,18	110	5,45	166,32	1,19	2,49	0,72
C-H07	4,99	5,01	137	4,38	195,2	1,66	2,928	0,85
C-H08	3,71	7,28	159	8,18	209,24	3,29	3,14	1,57
Harnstoff=const, -MTG								
C-H09	5,17	19,34	4	25,00	188,34	3,83	2,8251	2,03
C-H10	4,44	3,60	83	8,43	194,06	2,73	2,91	1,41
C-H11	3,21	4,05	98	5,10	211,4	2,01	3,171	0,95
C-H12	1,89	11,64	106	10,38	245,87	4,16	3,69	1,69
Harnstoff=const, +MTG								
C-H13	7,07	7,07	128	4,69	193	1,83	2,9	1,72
C-H14	3,95	6,33	177	3,39	217	1,98	3,26	1,84
C-H15	2,4	8,75	165	6,06	256,4	1,16	3,85	1,04
C-H16	2,24	25,45	168	14,88	268,2	5,03	4,02	5,22
Ammoniumsulfat, -MTG								
C-A01	4,06	2,22	96	5,21	204,00	4,88	3,06	4,90
C-A02	2,46	3,25	48	8,33	186,40	2,64	2,80	2,50
C-A03	1,95	6,15	14	21,43	197,80	4,67	2,97	4,71
C-A04	1,93	10,88	6	33,33	243,00	19,16	3,65	19,18
C-A05	1,15	45,22	3	66,67	286,60	26,80	4,30	26,74
Ammoniumsulfat, +MTG								
C-A05	4,89	4,91	134	7,46	263,80	1,64	3,96	1,77
C-A06	2,08	3,37	148	8,11	269,20	4,25	4,04	4,21
C-A07	0,95	14,74	9	44,44	312,40	5,23	4,69	5,33
C-A08	1,06	11,32	3	33,33	315,80	3,65	4,74	3,59
C-A09	1,2	19,17	2	50,00	343,60	8,01	5,16	19,57

Tab. 10.9: Relative Standardabweichungen von Gelatine-Folien als Ergebnis des Zugversuches mit Proben aus dem Gießfolienprozess modifiziert durch kristalline Substanzen

Experiment	Ergebnisse							
	Zugfestigkeit		Bruchdehnung		Höhe		Fläche	
	[Nr.]	[MPa]	s _{rel} [%]	[%]	s _{rel} [%]	h [µm]	s _{rel} [%]	A ₀ [mm ²]
Kaliumnitrat, -MTG								
G-K01	9,41	15,83	52	11,54	194,2	5,81	2,91	5,84
G-K02	5,89	8,15	71	14,08	195,6	15,35	2,94	15,31
G-K03	5,56	8,63	83	8,43	205,4	12,69	3,08	12,66
G-K04	5,35	7,85	84	2,38	209,8	7,25	3,15	10,16
G-K05	4,74	2,74	78	2,56	223,4	3,58	3,35	3,58
G-K06	3,64	10,71	77	7,79	326,6	6,94	4,9	6,94
Kaliumnitrat, +MTG								
C-K07	13,52	5,62	53	9,43	213,4	1,68	3,2	1,56
C-K08	5,54	5,05	111	4,50	241,6	1,62	3,62	1,93
C-K09	4,07	12,29	140	4,29	297,4	0,70	4,46	0,67
C-K10	4,48	11,83	139	5,76	292	1,55	4,38	1,60
C-K11	3,58	9,50	147	4,08	340	0,83	5,23	3,06
C-K12	2,96	27,36	122	10,66	324,6	5,08	4,87	5,13
Harnstoff, Gly=const, -MTG								
C-H01	47,92	3,07	4	25,00	140,2	2,92	2,1	2,86
C-H02	24,65	2,92	21	9,52	150,20	0,30	2,25	0,44
C-H03	12,25	3,84	43	4,65	161	1,58	2,42	1,65
C-H04	7,01	7,85	61	3,28	173,00	2,04	2,60	1,92
Harnstoff, Gly=const, +MTG								
C-H05	33,1	4,56	36	8,33	189,3	12,16	2,84	12,32
C-H06	17,74	13,02	75	13,33	183,00	0,39	2,75	0,36
C-H07	6,24	7,37	136	2,94	218,6	1,24	3,28	1,22
C-H08	4,38	9,13	126	3,97	227,40	1,83	3,41	1,76
Harnstoff=const, -MTG								
C-H09	22,74	2,11	26	7,69	154,4	1,02	2,32	0,86
C-H10	10,9	1,74	49	4,08	166,60	1,63	2,50	1,60
C-H11	6,49	4,62	66	3,03	177,8	2,13	2,67	1,87
C-H-2	4,27	7,73	83	3,61	198,00	2,23	2,97	2,36
Harnstoff=const, +MTG								
C-H13	20,81	9,18	41	12,20	173,19	1,85	2,59785	1,07
C-H14	10,15	12,22	102	8,82	183,23	1,55	2,74845	0,85
C-H15	6,22	6,27	126	4,76	203,54	2,50	3,0531	1,23
C-H16	-	-	-	-	-	-	-	-
Ammoniumsulfat, -MTG								
C-A01	7,73	5,17	64	9,38	192,20	0,44	2,89	0,35
C-A02	7,31	2,33	100	6,00	224,00	2,21	3,36	2,08
C-A03	5,38	5,20	52	7,69	234,80	9,09	3,52	9,09
C-A04	6,53	5,51	72	11,11	255,80	1,45	3,84	1,30
C-A05	5,18	4,63	62	4,84	246,40	1,78	3,70	1,89
Ammoniumsulfat, +MTG								
C-A05	10,3	13,11	72	18,06	232,60	3,76	3,49	3,72
C-A06	10,56	5,59	65	7,69	225,00	1,63	3,38	1,48
C-A07	8,5	11,41	76	14,47	249,80	3,65	3,75	3,73
C-A08	7,96	3,02	75	4,00	259,60	1,08	3,90	1,03
C-A09	6,54	3,52	75	8,00	279,60	1,06	4,20	0,95

Tab. 10.10: Aufgetretene Probleme während des Extrusionsprozesses und entsprechende Lösungsvorschläge

Nr.	Aufgetretene Probleme	Lösungsvorschläge
1	Lufteinschlüsse im Produkt	Effizientere Vakuumentgasung (z. B. Temperatur- und Vakuumerhöhung) Minimierung der Flüssigkomponenten Drehzahlerhöhung (häufige Oberflächenerneuerung in Entgasungszone) Druckerhöhung zur Kompaktierung des Extrudates Entgasung des Lösungsmittels vor der Zuführung
2	Gelprobleme (z. B. "Fischaugen"), Stippen und Verfärbungen	Vermeidung von Stagnationsgebieten durch Schneckenoptimierung Vermeidung ungleichmäßiger Molekulargewichtsverteilung durch partielle Quervernetzung Überprüfung der Thermostabilitäten der Materialien Überprüfung auf Kontaminierung durch Fremdpartikel
3	Erhöhte Folienhaftung	Alternative Weichmacher Konzentrationsänderung des Weichmachers Beschichtung der Folien Änderung weiterer Prozessparameter (Walzentemperatur) Postextrudale Trocknung
4	Hohe, ungleichmäßige Foliendicke	Optimierung der Fließeigenschaften in der Düse Reduzierung bzw. Justierung der Düsenöffnung oder Hydraulik Erhöhung der Abzugsgeschwindigkeit Erhöhung der Extrudatdehnung Blasfolienextrusion als Alternativverfahren
5	Enzymatische Quervernetzung	
5a	Unvollständige Vernetzung	Erhöhung der enzymatischen Aktivität Verbesserung der Homogenisierung Erhöhung der Verweilzeit Vorkonditionierung des Proteins
5b	Hoher Druck an Film- u. Banddüse	Alternative Düse mit verkürztem Düsenkanal Veränderung der Extrudatzusammensetzung Optimierung der Schneckenauslegung

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht und werden in der Arbeit aufgeführt.

Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Halle (Saale), 01.12.2009

Unterschrift

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Patrick Frohberg
Geburtsdatum: 31.03.1980
Geburtsort: Halle (Saale)
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Schulabschluss: allg. Hochschulreife
Berufsabschluss: Diplom-Wirtschafts-Ingenieur

Schulischer und beruflicher Werdegang

seit 10/2009 EXIST-Gründerstipendium des Bundesministeriums für
Wirtschaft und Technologie kofinanziert durch den Euro-
päischen Sozialfonds

11/2006 – 10/2009 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-
Universität Halle-Wittenberg, Zentrum für Ingenieurwis-
senschaften, Verfahrenstechnik/TVT, Promotion

05/2006 – 10/2006 Diplomarbeit „Herstellung pharmazeutischer Darrei-
chungsformen analog zum Freezecast-Verfahren“

03/2004 – 08/2004 Industriepraktikum bei der BMW AG Werk Leipzig, Abtei-
lung Arbeitssicherheit, Umweltschutz und Ergonomie“

10/1999 – 11/2006 Studium des Wirtschaftsingenieurwesens an der Martin-
Luther-Universität Halle-Wittenberg

09/1996 – 08/1999 Berufsbildende Schulen IV „Friedrich List“ in Halle (Saale),
allg. Hochschulreife

Halle (Saale), 01.Dezember 2009

Patrick Frohberg

Publikationsliste

1. Frohberg, P., Pietzsch, M., Ulrich, J., Effect of crystalline substances in biodegradable films and coatings, in: proceedings, ISIC 2008 (17th International Symposium of Industrial Crystallization), Vol. 1, ed. by J. P. Jansens, J. Ulrich, Maastricht (Netherlands) 2008, 9789076019277.
2. Frohberg, P., Pietzsch, M., Ulrich, J., Effect of crystalline substances in biodegradable films and coatings, Vortrag und Posterpräsentation, ISIC 2008 (17th International Symposium of Industrial Crystallization), Maastricht (Netherlands) 2008, 16.09.2008.
3. Frohberg, P., Ulrich, J., Protein films for pharmaceutical applications, Vorlesung und Skript, Summer School 2008, Hanbat National University, Daejeong, Südkorea, 2008, 30.09.2008.
4. Frohberg, P., Ulrich, J., Simulation of melt crystallization, Vorlesung und Skript, Summer School 2008, Hanbat National University, Daejeong, Südkorea, 2008, 27.09.2008.
5. Frohberg, P., Pietzsch, M., Ulrich, J., Effect of crystalline substances in biodegradable films, Vortrag und Abstracts,ACHEMA 2009, DECHEMA e. V. (29. Internationaler Ausstellungskongress für Chemische Technik, Umweltschutz und Biotechnologie), Frankfurt, 2009, 11.-15.05.2009.
6. Frohberg, P., Ulrich, J., Pietzsch, M., Patzsch, K., Verfahren zur Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften bioabbaubarer Werkstoffe, PCT/DE2 009/00079, Deutsches Patent- und Markenamt, Anmeldetag: 05.06.2009.
7. Frohberg, P., Ulrich, J., Pietzsch, M., Biologisch abbaubare Proteinfolien, Verfahren zu ihrer Herstellung und deren Verwendung, 10 2009 048 563.5, Deutsches Patent- und Markenamt, Anmeldetag: 06.10.2009.
8. Frohberg, P., Stolte, I., Neue funktionale Materialien aus Biopolymeren, BIOTECHNICA 2009, Standposter und -flyer, Gemeinschaftsstand weinberg campus, Hannover, 2009, 06-08.10.2009.
9. Frohberg, P., Pietzsch, M., Ulrich, J., Effect of crystalline substances in biodegradable films, Chemical Engineering Research and Design, (2010) – Status: akzeptiert.