



Technische Universität München

Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik

Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Markus Schmid

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Karl-Heinz Engel

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Horst-Christian Langowski
2. Prof. Dr. Cordt Zollfrank

Die Dissertation wurde am 19.07.2017 bei der Technischen
Universität München eingereicht und durch die Fakultät
Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt am 13.11.2017 angenommen.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2011 bis 2017 im Rahmen meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer-Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV und am Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik des Wissenschaftszentrums Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München in Freising.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Horst-Christian Langowski, Ordinarius des Lehrstuhls für Lebensmittelverpackungstechnik der Technischen Universität München, für die Betreuung meiner Arbeit sowie für das allzeit entgegengebrachte Vertrauen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Cordt Zollfrank, Leiter der Professur für Biogene Polymere der Technischen Universität München, für das Interesse an meiner Arbeit und für die Tätigkeit als Prüfer. Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel, Ordinarius des Lehrstuhls für Allgemeine Lebensmitteltechnologie der Technischen Universität München, danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Frau Dr. Cornelia Stramm, Herrn Dr. Klaus Noller und Herrn Prof. Dr. Kajetan Müller danke ich ganz herzlich für deren Förderung und die fruchtbaren Diskussionen während meiner gesamten Zeit in der Abteilung Materialentwicklung des Fraunhofer IVV, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt auch allen beteiligten Kolleginnen und Kollegen des Fraunhofer IVV für ihre tatkräftige Unterstützung bei der Bearbeitung meiner Dissertation. Allen voran seien an dieser Stelle Frau Zuzana Scheuerer und die Herren Marius Jesdinszki, Sven Sängerlaub, Daniel Schlemmer, Andreas Stäbler, Dr. Matthias Reinelt und Norbert Rodler genannt.

Ein großes Dankeschön geht an meine Projektpartner, mit denen ich im Rahmen der europäischen Forschungsprojekte WHEYLAYER, WHEYLAYER² und THERMOWHEY zusammenarbeiten durfte. Ein weiterer Dank gilt den Studierenden der Abteilung Materialentwicklung, die mich bei den verschiedenen Forschungsprojekten unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Ehefrau Ramona, die durch ihre grenzenlose Geduld, ihre moralische Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt die Bearbeitung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meiner Tochter Lara dafür, dass sie mich nach langen Arbeitstagen und auch nach mehrtägiger Abwesenheit mit einem Lächeln empfangen hat. Ihr Lachen ist meine größte Motivation.

Kurzfassung

Der Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts, des Denaturierungsgrades, der Transglutaminase- und UV-induzierten Quervernetzung auf die Wechselwirkungseigenschaftsbeziehungen von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen wurde untersucht. Eine Reduktion des Ausgangsmolekulargewichts und des Denaturierungsgrades führt zu weniger vernetzten und flexibleren Folien. Die Transglutaminase-Quervernetzung verringert die Wasserdampfdurchlässigkeit. Die UV-Bestrahlung erhöht die Zugfestigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen.

Abstract

The effect of the initial molecular weight, the degree of denaturation, the transglutaminase- and UV-induced crosslinking on interaction-property relationships of whey protein-based films and coatings was investigated. The reduction of the initial molecular weight and the degree of denaturation leads to reduced crosslinking but more flexible films and coatings. Transglutaminase-crosslinking reduces the water vapour permeability. The UV-radiation increases the tensile strength of whey protein-based coatings.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Kurzfassung	II
Abstract	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
2 Zielsetzung	3
3 Grundlagen und Stand des Wissens	4
3.1 Grundlagen zu Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen	5
3.1.1 Molke	5
3.1.2 Molkenprotein.....	6
3.1.3 Molkenproteinisolat und – konzentrat	7
3.1.4 Filmbildende Eigenschaften von Molkenprotein.....	8
3.1.5 Weichmacher und Molekulargewicht bei WPI-basierten Folien und Beschichtungen.....	10
3.1.6 Denaturierung von WPI-basierten Formulierungen.....	14
3.1.7 TG-Quervernetzung von WPI-basierten Formulierungen.....	15
3.1.8 UV-Bestrahlung von WPI-basierten Folien und Beschichtungen	16
3.2 Grundlagen zu verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen.....	19
3.2.1 Stofftransport durch Folien und Beschichtungen	19
3.2.2 Mechanische Eigenschaften.....	27
3.2.3 Oberflächenenergie.....	30
3.3 Molekulare Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen.....	32
3.3.1 Bestimmung molekularer Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen	33
3.3.2 Vernetzungsgrad und -dichte in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen.....	34
4 Material und Methoden	39
4.1 Versuchsplan	39
4.2 Molkenprotein-basierte Formulierungen, Folien und Beschichtungen.....	41
4.2.1 Molkenproteinisolat und hydrolysiertes Molkenproteinisolat	41

4.2.2	Molkenprotein-basierte Standardformulierung	41
4.2.3	Herstellung von Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht	44
4.2.4	Herstellung von Folien und Beschichtungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad	46
4.2.5	Herstellung von Folien und Beschichtungen aus TG quervernetzen Formulierungen	50
4.2.6	Herstellung von UV-bestrahlten Folien und Beschichtungen	51
4.2.7	Musterherstellung zur Ermittlung der Permselectivität, feuchteabhängige Sauerstoffpermeation und Aktivierungsenergie der Permeation	52
4.2.8	Musterherstellung zur Ermittlung der lagerzeitabhängigen Permeation und Nachvernetzung	52
4.3	Untersuchungen zu verpackungsrelevanten Eigenschaften	53
4.3.1	Bestimmung von Permeationseigenschaften	53
4.3.2	Bestimmung der mechanischen Eigenschaften	55
4.3.3	Bestimmung der Oberflächenenergie	55
4.3.4	Untersuchung weiterer Eigenschaften	56
4.4	Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen	57
4.4.1	Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen	58
4.4.2	Durchführung der Lösungsversuche	59
4.5	Bestimmung des Quellgrades – DoS	62
4.6	Bestimmung von Vernetzungsgrad und –dichte	62
4.7	Statistische Methoden	63
4.7.1	Test auf Normalverteilung	63
4.7.2	Prüfung auf Ausreißer	64
4.7.3	Prüfung auf Mittelwertunterschied	64
5	Ergebnisse und Diskussion	65
5.1	Einfluss der Lagerungszeit auf die molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen	65
5.1.1	Veränderung der molekularen Wechselwirkungen während der Lagerungszeit	66
5.1.2	Veränderung der Sauerstoffdurchlässigkeit während der Lagerungszeit	71
5.2	Gasdurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur und der relativen Feuchtigkeit	72
5.2.1	Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxid durchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur	73
5.2.2	Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit	74
5.3	Molekulargewicht und Weichmachergehalt	76
5.3.1	Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts	77
5.3.2	Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts auf verpackungsrelevanten Eigenschaften	80
5.4	WPI-Denaturierungsgrad	87
5.4.1	Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades	87

5.4.2	Einfluss des Denaturierungsgrades auf verpackungsrelevante Eigenschaften	92
5.5	TG-induzierte Quervernetzung	98
5.5.1	Veränderung der Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit der TG-Vernetzung.....	98
5.5.2	Einfluss der TG-Quervernetzung auf verpackungsrelevanten Eigenschaften .	100
5.6	UV-Bestrahlung.....	108
5.6.1	Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts....	108
5.6.2	Einfluss der UV-Quervernetzung auf verpackungsrelevante Eigenschaften ...	112
6	Schlussfolgerungen	119
7	Zusammenfassung	121
	Literaturverzeichnis	123
	Anhang I: Zusatzinformationen	137
	Anhang I-a: Berechnung des durchschnittlichen Molekulargewichts der in WPI enthaltenen Aminosäuren.....	137
	Anhang I-b: Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von Molkenprotein mit Wasser bei unterschiedlichen Ausgangsmolekulargewichten und Denaturierungsgraden.....	138
	Anhang I-c: Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts	140
	Anhang I-d: Gleichgewichtsfeuchte in Abhängigkeit des Weichmachergehaltes und Ausgangsmolekulargewichts	141
	Anhang I-e: Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von TG- und UV-quervernetzten Molkenprotein mit Wasser.....	142
	Anhang I-f: E-Modul von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Gießfolien	146
	Anhang II: Publikationen des Autors	147
	Wissenschaftliche Publikationen mit direktem Bezug zur vorliegenden Dissertation..	147
	Wissenschaftliche Publikationen mit indirektem Bezug zur vorliegenden Dissertation	148
	Konferenzbeiträge (Vorträge und Poster)	149
	Patente.....	153
	Buchbeitrag	153
	Anhang III: Lebenslauf	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von Käsemolke	5
Abbildung 2: Tertiärstruktur von β -Lactoglobulin (a.) und α -Lactalbumin (b.)	7
Abbildung 3: Strukturstabilisierende intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Peptidketten	9
Abbildung 4: Hitzedenaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin	15
Abbildung 5: Beispiel zum Ablauf der TG-Quervernetzung	16
Abbildung 6: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Phenylalanin	17
Abbildung 7: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Tyrosin	18
Abbildung 8: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Tryptophan	18
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Lösung-Diffusions-Modells	20
Abbildung 10: Normierte Sauerstoffdurchlässigkeit und normierte Wasserdampftransmissionsrate unterschiedlicher Polymere	26
Abbildung 11: Typische Spannungs-Dehnungskurven von Polymeren	30
Abbildung 12: Versuchsplan	40
Abbildung 13: Herstellung der Molkenprotein-basierten Standardformulierung	44
Abbildung 14: Beschichtungsautomat CUF 5	47
Abbildung 15: Beispiel eines Chromatogramms einer nativen, unbehandelten WPI Probe	49
Abbildung 16: Schematische Zeichnung der UV-Bestrahlungsanlage	52
Abbildung 17: Massenanteil von Wasser als Funktion der Wurzel der Zeit geteilt durch den Mittelwert der Dicke	57
Abbildung 18: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien in verschiedenen Puffersystemen über die Lagerungszeit	67
Abbildung 19: DoS in Abhängigkeit der Lagerungszeit	70
Abbildung 20: DoC und CLD in Abhängigkeit der Lagerungszeit	70
Abbildung 21: Zeitabhängige Sauerstoffdurchlässigkeit durch Molkenprotein-basierte Beschichtung	71
Abbildung 22: Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxid durchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen bei 0 % r. F. in Abhängigkeit der Temperatur	73
Abbildung 23: Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit (35, 50 und 75 % r. F.) von Molkenprotein-basierten Beschichtungen (WPSS) auf PET und PET-Folie bei 23 °C	75
Abbildung 24: Sauerstoffdurchlässigkeit Q_{100} in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit (35, 50 und 75 % r. F.) von der WPSS Beschichtung bei 23 °C ...	75
Abbildung 25: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit steigendem Anteil an h-WPI in verschiedenen Puffersystemen	77
Abbildung 26: Quervernetzungsdichte CLD in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts	79
Abbildung 27: Modellvorstellung zur Netzwerkausbildung bei Mischungen aus WPI und h-WPI	80
Abbildung 28: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt	82

Abbildung 29: Wasserdampftransmissionsrate von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt	83
Abbildung 30: E-Modul in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts bei konstantem Weichmachergehalt	84
Abbildung 31: Zugfestigkeit in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts bei konstantem Weichmachergehalt	85
Abbildung 32: E-Modul von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt.....	86
Abbildung 33: Zugfestigkeiten von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt.....	87
Abbildung 34: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit variierendem Denaturierungsgrad in verschiedenen Puffersystemen	88
Abbildung 35: Schematische Darstellung der Modellvorstellung des Quellprozesses	90
Abbildung 36: Vernetzungsdichte (CLD) in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades (DG).....	91
Abbildung 37: Modellvorstellung zum Einfluss des Denaturierungsgrades (DG) auf die Vernetzungsdichte (CLD) von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen	92
Abbildung 38: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad	93
Abbildung 39: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad.....	94
Abbildung 40: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Anhängigkeit des DG	95
Abbildung 41: E-Modul von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad	96
Abbildung 42: Zugfestigkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad.....	96
Abbildung 43: Oberflächenenergie von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit vom Denaturierungsgrad (DG).....	97
Abbildung 44: DoS in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit.....	99
Abbildung 45: Vernetzungsgrad und Vernetzungsdichte in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit	100
Abbildung 46: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit.....	101
Abbildung 47: Permeations-, Diffusions- und Sorptionskoeffizienten für Wasserdampf von Molkenprotein-basierten Folien.....	102
Abbildung 48: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der TG-Konzentration und Inkubationszeit.....	103
Abbildung 49: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen auf PET in Abhängigkeit der TG-Konzentration bei 120 min Inkubationszeit.....	103
Abbildung 50: E-Modul in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit	105
Abbildung 51: Zugfestigkeit in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit.....	106
Abbildung 52: Gesamtoberflächenenergie sowie polarer und disperser Anteil von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit der TG-Konzentration bei 120 Minuten Inkubationszeit.	107

Abbildung 53: Löslichkeit der UV-bestrahlten Molkenprotein-Beschichtungen in verschiedenen Puffersystemen	109
Abbildung 54: Grad der Quellung (DoS) in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdosis.....	110
Abbildung 55: Vernetzungsgrad (DoC) und Vernetzungsdichte (CLD) in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdosis	111
Abbildung 56: Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit und der UV-Bestrahlungsdosis von Molkenprotein-basierten Folien	113
Abbildung 57: E-Modul in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis	114
Abbildung 58: Zugfestigkeit in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis	114
Abbildung 59: Modellvorstellung zur Proteinmorphologie von Molkenprotein-basierten Folien	115
Abbildung 60: Modellvorstellung zur Gießfolienmorphologie vor und nach der UV-Quervernetzung	116
Abbildung 61: Gesamtoberflächenenergie sowie polarer und disperser Anteil von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis.....	116
Abbildung 62: Wellenlängenabhängige UV-Lichttransmission von UV-bestrahlten Molkenprotein-basierten Folien	117
Abbildung 63: Gleichgewichtsfeuchte in Abhängigkeit des Weichmachergehalts und Ausgangsmolekulargewichts	141
Abbildung 64: E-Modul von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Gießfolien .	146

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteinfractionen von Molkenprotein.....	6
Tabelle 2: Bindungsenergien von kovalenten Bindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen.....	10
Tabelle 3: Auswahl qualitativer und quantitativer Analysemethoden zur Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen in Protein-basierten Formulierungen, Folien und Beschichtungen	32
Tabelle 4: Wechselwirkungsarten und Reagenzien, die spezifische Wechselwirkungen spalten	34
Tabelle 5: Spezifische Kennzahlen des verwendeten WPI und h-WPI.....	41
Tabelle 6: Materialien und Geräte zur Herstellung der Standardformulierung.....	43
Tabelle 7: Rezeptur der Standardformulierung	43
Tabelle 8: Molkenprotein-basierte Formulierungen mit variierendem Gehalt an BiPRO und BioZate3.....	45
Tabelle 9: Materialien und Geräte für den Beschichtungsprozess	46
Tabelle 10: Mischungsverhältnisse und Beschichtungsprozessparameter für Formulierungen mit einem DG 0 - 100 %	48
Tabelle 11: Zusammensetzung der Transglutaminase behandelte Formulierungen	50
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen.....	58
Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Materialien und Geräte zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen.....	58
Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen.....	59
Tabelle 15: Extraktionsmittelzusammensetzung.....	59
Tabelle 16: Verwendete Extraktionsmittel und deren spezifisch spaltende Wirkung	60
Tabelle 17: Gasdurchlässigkeitsverhältnis in Abhängigkeit der Temperatur	73
Tabelle 18: Aktivierungsenergie E_A der Durchlässigkeit Q für N_2 , O_2 und CO_2	74
Tabelle 19: Grad der Quellung (DoS) und Vernetzungsgrad (DoC) und -dichte (CLD) in Abhängigkeit des WPI:h-WPI Verhältnisses.....	78
Tabelle 20: Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts.....	81
Tabelle 21: Vernetzungskennzahlen DoS und CLD in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades	90
Tabelle 22: Wasserdampftransmissionsrate (WVTR) durch Molkenprotein-basierte Folien mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsdosen	112
Tabelle 23: Zusammensetzung von WPI	137
Tabelle 24: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten und Resultierende Wechselwirkungsparameter χ	138
Tabelle 25: Wechselwirkungsparameter χ von Molkenprotein mit Wasser von Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad (DG). 139	
Tabelle 26: Grad der Quellung (DoS), Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel ϕ_1 , durchschnittliches Molekulargewicht des Polymers zwischen den	

Quervernetzungen M_c sowie Vernetzungsdichte (CLD) und –grad (DoC) in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts.....	140
Tabelle 27: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichen TG-Konzentrationen (units) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und resultierende Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von TG-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien mit Wasser.....	142
Tabelle 28: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien und resultierende Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien mit Wasser.....	144
Tabelle 29: Quervernetzungsichte (CLD) berechnet aus mittlerem, minimalem und maximalem Flury-Huggins Wechselwirkungsparameter χ	145

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

Im Folgenden sind die wichtigsten Abkürzungen und Symbole zusammengestellt, die in dieser Arbeit verwendet wurde. Vereinzelnd können Abkürzungen in den jeweiligen Kapiteln davon abweichende Beschreibungen besitzen und werden dann jeweils definiert.

Abkürzung	Beschreibung
BSA	Serumalbumin
cd	Querrichtung
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COC	Cycloolefin-Copolymere
CPP	Cast Polypropylen
Cys	Cystein
DTT	Dithiothreitol
EVOH	Ethylen-Vinylalkohol-Copolymer
GA-Nr.	Grand Agreement Nummer
Gln	Glutamin
Gly	Glycerol
GVM	Gesellschaft für Verpackungsmarktforschung
H₀	Nullhypothese
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
h-WPI	hydrolysiertes Molkenproteinisolat
K-S	Kolmogorov-Smirnow
Leu	Leucin
IEF	Isoelektrischer Fokussierungs-Puffer
Igs	Immunglobuline
Ile	Isoleucin
LCP	Liquid-Crystal-Polymer
Lys	Lysin
MAP	Modified Atmosphere Packaging
md	Maschinenrichtung
mTG	Mikrobielle Transglutaminase
N₂	Molekularer Stickstoff
O₂	Molekularer Sauerstoff
ODS	Octadecylsilan
OWRK	Owens-Wendt-Rabel-Kaelble
PA	Polyamid

Abkürzung	Beschreibung
PE	Polyethen (Polyethylen)
PE-HD	Polyethen hoher Dichte
PE-LD	Polyethen niedriger Dichte (low density)
PE-LLD	Polyethen (linear low density)
PET	Polyethylenterephthalat
Phe	Phenylalanin
PLA	Polymilchsäure
PP	Phosphat-Puffer
Pp	Proteosepeptone
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
PVC-P	Weich-PVC
PVC-U	Hart-PVC
PVDC	Polyvinylidenchlorid
PEN	Polyethylennaphthalat
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEC	Size exclusion chromatography
TG	Transglutaminase
TH	Thiourea
TFA	Trifluoressigsäure
Trp	Tryptophan
TS	Trockensubstanz
Tyr	Tyrosin
U	Urea
UV	Ultraviolett
UV-C	Ferne UV-Strahlung
WPC	Molkenproteinkonzentrat
WPI	Molkenproteinisolat
WPSS	Molkenprotein-basierte Standardformulierung
α-La	α -Lactalbumin
β-Lg	β -Lactoglobulin

Symbol	Bezeichnung	Einheit
A	Fläche	[m ²]
a_w	Wasseraktivität	[-]
c	Konzentration	[mol/m ³]
CLD	Vernetzungsdichte	[mol/cm ³]
D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
d	Schichtdicke	[μm]
DG	Denaturierungsgrad	[%]
DH	Grad der Hydrolyse	[-]
DoC	Vernetzungsgrad	[%]
DoS	Quellungsgrad	[%]
dx	Länge des Diffusionswegs	[m]
E	Elastizitätsmodul / E-Modul	[MPa]
E_a	Aktivierungsenergie	[J/mol]
F	Kraft	[N]
h	Planck'sches Wirkungsquantum	[Js]
H_B	Beobachtete Häufigkeit	[-]
H_E	Erwartete Häufigkeit	[-]
h_{tot}	Gesamtzahl Peptidbindungen pro Protein	[-]
J	Stoffflussdichte	[mol/m ² s]
L	Länge	[m]
\overline{M}_0	Durchschnittliches Molekulargewicht der Monomere	[g/mol]
m	Masse	[g]
m_∞	Masse absorbierter Substanz im Gleichgewicht	[g]
M_C	Durchschnittliches Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen	[g/mol]
m_s	Masse des Lösungsmittels im gequollenen Gel	[g]
m_t	Masse absorbierter Substanz zum Zeitpunkt t	[g]
m_{WPI}	Masse des Polymers im gequollenen Gel	[g]
OTR	Sauerstofftransmissionsrate	[cm ³ (STP)/(m ² d)]
p	Druck oder Signifikanzwert	[bar] oder [-]
P	Permeationskoeffizient	[cm ³ (STP) μm / (m ² d bar)]
P_{H2O}	Wasserdampfpermeationskoeffizient	[g μm / (m ² d bar)]
P_{O2}	Sauerstoffpermeationskoeffizient	[cm ³ (STP) μm / (m ² d bar)]
Q	Durchlässigkeit	[mol/(m ² s Pa)]
Q₁₀₀	Durchlässigkeit (normiert auf 100μm Schichtdicke)	[mol 100μm/(m ² s Pa)]
R	Universelle Gaskonstante	[J/(K mol)]
S	Löslichkeitskoeffizient	[cm ³ (STP)/cm ³ bar]
T	Temperatur	[K]
T_{CR}	Kritischer Wert	[-]
T_g	Glasübergangstemperatur	[K]

Symbol	Bezeichnung	Einheit
T_x	Prüfgröße	[-]
U	Unit / Katalytische Aktivität	[$\mu\text{mol}/\text{min}$]
V	Molvolumen	[cm^3/mol]
W	Arbeit	[J]
$WVTR$	Wasserdampftransmissionsrate	[$\text{g}/\text{m}^2\text{ d}$]
ε	Dehnung	[-]
ε_B	Bruchdehnung	[-]
ν	Frequenz	[1/s]
ρ_s	Dichte Lösungsmittel	[g/cm^3]
ρ_{WPI}	Dichte der WPI Filme	[g/cm^3]
σ	Spannung	[Pa], [N/m^2]
σ_d	Disperser Anteil der Oberflächenenergie	[mN/m], [J/m^2]
σ_M	Zugfestigkeit	[Pa]
σ_p	Polarer Anteil der Oberflächenenergie	[mN/m], [J/m^2]
σ_s	Oberflächenenergie Festkörper	[mN/m], [J/m^2]
ϕ_1	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel	[-]
ϕ_2	Volumenanteil des Wassers im gequollenen Gel	[-]
χ	Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter	[-]

1 Einleitung

An Verpackungsmaterialien werden insbesondere seitens der Lebensmittelindustrie sehr hohe Anforderungen gestellt, um die Qualität und Haltbarkeit von Lebensmittel sicherzustellen. Hierbei kommt dem Verpackungsmaterial über den gesamten Lebenszyklus, also von der Herstellung, dem Abpackprozess, der Distribution, der Lagerung im Einzelhandel bis hin zum Verbraucher, eine entscheidende Bedeutung zu. Dabei ist die Schutzfunktion die primäre Funktion der Verpackung. Diese Schutzfunktion und somit die Anforderungen an die Verpackung ist abhängig vom Lebensmittel selbst und dessen Transport- und Lagerbedingungen. Um z.B. ein sauerstoffempfindliches Lebensmittel vor dem schädigenden Einfluss von Sauerstoff zu schützen, werden diese Lebensmittel häufig in sog. Schutzgasverpackungen (engl. Modified Atmosphere Packaging – MAP) unter Verwendung von Schutzgasen, wie z.B. Stickstoff, abgepackt. Um diese Schutzgasatmosphäre während der Haltbarkeitsdauer des verpackten Lebensmittels aufrechterhalten zu können, müssen die verwendeten Packmittel geeignete Barriereigenschaften gegenüber Sauerstoff aufweisen. Aber auch weitere produktspezifische Anforderungen, wie ausreichende Barriere gegenüber Licht und Feuchtigkeit sowie mechanische Stabilität, reihen sich in eine Vielzahl weiterer Anforderungen an Verpackungsmaterialien ein. (Robertson, 2013, Langowski, 2008, Schmid et al., 2012, Wani et al., 2013, Langowski, 2015) Um all die geforderten Eigenschaften in einem Packmittel zu vereinen, werden häufig Mehrschichtverbundfolien, bestehend aus mehreren unterschiedlichen Packstoffen, durch Co-Extrusion und/oder Lackier- und Kaschierprozesse hergestellt und als Verpackungsmaterial verwendet. Dies ermöglicht es die spezifischen Eigenschaften der jeweiligen Packstoffe zu kombinieren und so den produktspezifischen Anforderungen an das Verpackungsmaterial gerecht zu werden. Hierbei kommt dem Ethylen-Vinylalkohol-Copolymer (EVOH) als Sauerstoffbarrierematerial eine besondere Bedeutung zu. Laut der Gesellschaft für Verpackungsmarktforschung stellen flexible Verbundfolien mit EVOH bei einem prognostiziertem Verbrauch von 5068 km² in 2021 den am meisten verwendeten Verbundfolientyp in Europa dar (GVM, 2017). EVOH ist ein petrochemisch basiertes und nicht biologisch abbaubares Polymer und wird in Kombination mit anderen Polymeren zu Verbundfolien verarbeitet. Diese Verbundfolien weisen geeignete Barriere- und mechanische Eigenschaften auf, sind aber nur schwer rezyklierbar, da eine sortenreine Trennung der im Verbund enthaltenen Packstoffe mit wirtschaftlich vertretbarem Aufwand nicht möglich ist. (Schmid et al., 2012)

Aufgrund aktueller Bestrebungen nachhaltigere Packstoffe für die Herstellung von Verpackungsmaterialien zu entwickeln, kommt den Proteinen aus Rest- oder Nebenprodukten der Lebensmittelindustrie immer mehr Bedeutung zu. Auch das wachsende Interesse der Öffentlichkeit und somit auch der Politik an Verpackungsmaterialien auf Basis von nachwachsenden Rohstoffen und biologisch abbaubaren Verpackungsmaterialien führt vermehrt zu Forschungsaktivitäten an Proteinen wie Weizengluten, Soja-

protein, Casein und Molkenprotein zur Anwendung als mögliche Rohstoffe für Verpackungsmaterialien.

Ein sehr umfassend untersuchtes Protein ist Molkenprotein, ein Nebenprodukt der Käseherstellung. Molkenprotein-basierte Formulierungen erwiesen sich bereits als geeignet zur Herstellung von essbaren Überzügen, Folien und Beschichtungen und sind Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Dissertation. Diese Folien weisen zwar aufgrund ihres hydrophilen Charakters lediglich eine mittlere Wasserdampfbarriere auf, haben aber exzellente Sauerstoffbarriereigenschaften (Gennadios et al., 1993, Schmid et al., 2012). Ein weiterer Vorteil von Molke und dem daraus gewonnenen Molkenprotein als Rohstoff zur Herstellung von Folien und Beschichtungen ist dessen Verfügbarkeit. Als Nebenprodukt der Käseherstellung fällt Molke in großen Mengen an. Schätzungen nach wurden im Jahr 2005 über 160 Mio. Tonnen Molke produziert, wobei ca. die Hälfte ohne weitere Wertschöpfung verworfen wurde (Smithers, 2008, Guimarães et al., 2010, Chatzipaschali und Stamatis, 2012). Aktuelle Schätzungen nach (exakte Daten sind leider nicht verfügbar) werden derzeit mehr als 200 Mio. Tonnen Molke produziert. Zudem hat sich Molkenprotein inzwischen von einem Abfallprodukt oder als Tierfutter eingesetztem Nebenprodukt zum wertvollen Rohstoff in der Lebensmittelindustrie entwickelt, was insbesondere auf die Fortschritte in der Produktion hochkonzentrierter Proteinprodukte wie Molkenproteinkonzentrat (engl. whey protein concentrate / WPC) und Molkenproteinisolat (engl. whey protein isolate / WPI) zurückzuführen ist (Smithers, 2015).

Die ersten Untersuchungen zu molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien wurden von Guckian et al. (2006) an Folien, welche aus verschiedenen Verhältnissen von denaturiertem und nativem Molkenprotein hergestellt wurden, durchgeführt. Weitere Studien anderer Forschergruppen zur direkten Charakterisierung der molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen und deren Einfluss auf die verpackungsrelevanten Eigenschaften sind nicht bekannt. Auch sind die spezifischen Bindungen und Wechselwirkungen, welche für die verpackungsrelevanten Eigenschaften und die Veränderung von Folieneigenschaften während der Lagerung verantwortlich sind, noch nicht umfassend geklärt. Des Weiteren gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss (1) des Molekulargewichts, (2) des Denaturierungsgrades, (3) der Transglutaminase-Quervernetzung und (4) des Einflusses einer UV-Bestrahlung auf die molekularen Wechselwirkungen und die resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen untersuchten. Somit können bislang nur bedingt Aussagen über den Einfluss konkreter molekularer Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen bei Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen getroffen werden. Es bestehen somit noch zahlreiche Wissenslücken auf dem Gebiet der Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen, woraus sich u.a. die wissenschaftliche Relevanz der vorliegenden Dissertation ergibt.

2 Zielsetzung

Unter Berücksichtigung des aktuellen Stands des Wissens zielt die vorliegende Dissertation darauf ab zu beantworten, inwiefern und in welchem Ausmaß

- das Ausgangsmolekulargewicht (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht),
- der Denaturierungsgrad (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad),
- eine Transglutaminase-Quervernetzung (biochemische Vernetzung mittels Transglutaminase bei der Verarbeitung bzw. Herstellung der Formulierungen) und
- eine UV-Bestrahlung (Nachbehandlung / Quervernetzung der Folien durch UV-Strahlung)

die molekularen Wechselwirkungen sowie die physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat (WPI)-basierten Folien und Beschichtungen beeinflussen.

Zu den betrachteten verpackungsrelevanten Eigenschaften zählen hierbei insbesondere die Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit (die sog. Barriereigenschaften) sowie die mechanischen Eigenschaften der untersuchten Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen. Aber auch weitere physikalische Eigenschaften wie die Oberflächenenergie spielen für die weitere Verarbeitung der Folien und Beschichtungen eine entscheidende Rolle.

Zur Beantwortung der o.g. wissenschaftlichen Fragestellung, wurde für die Beurteilung der Wechselwirkungen auf molekularer Ebene Lösungsversuche in unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt und mit einem Bradford-Assay kombiniert. Des Weiteren wurden Quellversuche zur Ermittlung der Vernetzungsdichte durchgeführt. Diese Untersuchungen ermöglichen es, die molekularen Wechselwirkungen mit den resultierenden physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen zu korrelieren (Ermittlung der molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen) und somit konkrete Aussagen über den Einfluss des Molekulargewichts, des Denaturierungsgrades, der Transglutaminase-Quervernetzung und der UV-Bestrahlung treffen zu können. Des Weiteren wurden Untersuchungen zu erweiterten verpackungsrelevanten Eigenschaften, wie Permselectivität (Gasdurchlässigkeitsverhältnis von $N_2:O_2:CO_2$) und Aktivierungsenergie der Gaspermeation (N_2 , O_2 , CO_2), feuchteabhängige Sauerstoffpermeation und Nachvernetzungs kinetik durchgeführt.

3 Grundlagen und Stand des Wissens

Protein basierte Folien und Beschichtungen weisen zwar bereits gewisse Barriereigenschaften gegenüber Sauerstoff auf, haben aber meist ungenügende mechanische Eigenschaften und eine höhere Wasserdampfdurchlässigkeit als synthetische Kunststoffe (Coltelli et al., 2016, Zink et al., 2016). Um die Eigenschaften von Protein-basierten Folien und Beschichtungen gezielt beeinflussen zu können, ist die Kenntnis über die Rezeptur-Prozess-Struktur-Wechselwirkungsbeziehung bei Proteinfilmern von entscheidender Bedeutung. In zahlreichen Studien, auf die in diesem Kapitel ausführlich eingegangen wird, wurden die unterschiedlichsten Einflüsse auf die technofunktionellen Eigenschaften von Protein-basierten Folien und Beschichtungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Vernetzung der Proteine eine Möglichkeit darstellt, die mechanische Festigkeit sowie die Gas- bzw. Wasserdampfbarriere durch Verstärkung der intermolekularen Wechselwirkungen und somit dichter Molekulpackung und reduzierter Beweglichkeit der Molekülketten, zu beeinflussen (Wihodo und Moraru, 2012). Einige Studien, auf die u.a. in den Kapiteln 3.1.5, 3.1.6, 3.1.7 und 3.1.8 noch näher eingegangen wird, untersuchten bereits die Möglichkeit der Verbesserung der technofunktionellen Eigenschaften von Protein-basierten Folien durch

- thermische (Schofield et al., 1983, Shimada und Cheftel, 1989, Gennadios et al., 1993, Stuchell und Krochta, 1994, Perez-Gago und Krochta, 2001, Perez-Gago et al., 1999),
- enzymatische (Motoki et al., 1984, Motoki und Seguro, 1998, Mahmoud und Savello, 1993, Aboumahmoud und Savello, 1990, Stuchell und Krochta, 1994, Zhu et al., 1995, Yildirim und Hettiarachchy, 1998, De Jong und Koppelman, 2002),
- chemische Vernetzung (Gueguen et al., 1998, Micard et al., 2000, Ustunol und Mert, 2004, Wihodo und Moraru, 2012) als auch Vernetzung durch
- Bestrahlung (Brault et al., 1997, Gennadios et al., 1998, Ustunol und Mert, 2004).

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf Folien und Beschichtungen auf Basis von Molkenproteinisolat im Hinblick auf verpackungsrelevante Eigenschaften. Deshalb sind in diesem Kapitel die für diese Arbeit wichtigsten Grundlagen zu Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen und verpackungsrelevanten Eigenschaften zusammengefasst.

3.1 Grundlagen zu Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

3.1.1 Molke

Molke ist die Flüssigkeit, die als ein Nebenprodukt nach der Käseherstellung übrig bleibt. Dies gilt für 92 % der weltweit anfallenden Molke (Käsemolke). Lediglich 8 % der Molke (Kaseinmolke) werden aus der Herstellung von Kasein oder Frischkäse direkt erzeugt (De Wit, 2001b). Jährlich werden über 200 Millionen Tonnen Molke weltweit produziert (Smithers, 2015). Fox et al. (2000) definieren Molke als wässrige Substanz, welche nach der Entfernung von Fett und Kasein in der Milch verbleibt. Molke ist somit die lösliche Fraktion, die nach der Gerinnung der Milch während der Herstellung von Käse oder Quark abgesondert wird (Chatzipaschali und Stamatis, 2012).

Es wird zwischen Süßmolke (Labmolke) und Sauermolke (Laktische Molke) unterschieden. Süßmolke entsteht bei der Verwendung von Lab, einer Mischung aus den Enzymen Chymosin und Pepsin, bei der Herstellung von Käse (z.B. Gouda, Camembert). Diese Labenzyme verursachen das Gelieren des Kaseins, welches auch das Milchfett enthält. Der so entstandene Käsebruch fällt aus und die Süßmolke verbleibt als überschüssige Flüssigkeit mit einem pH-Wert von 5,8 – 6,6. Sauermolke entsteht durch die Verwendung von Milchsäurebakterienkulturen zur Säuerung der Milch bis auf einen pH-Wert von 4,6. Bei diesem pH-Wert findet die Kaseinfällung statt. Sauermolke verbleibt als Nebenprodukt mit einem pH-Wert von < 5 zurück. Die durchschnittliche Zusammensetzung von Käsemolke ist in Abbildung 1 dargestellt (De Wit, 2001a):

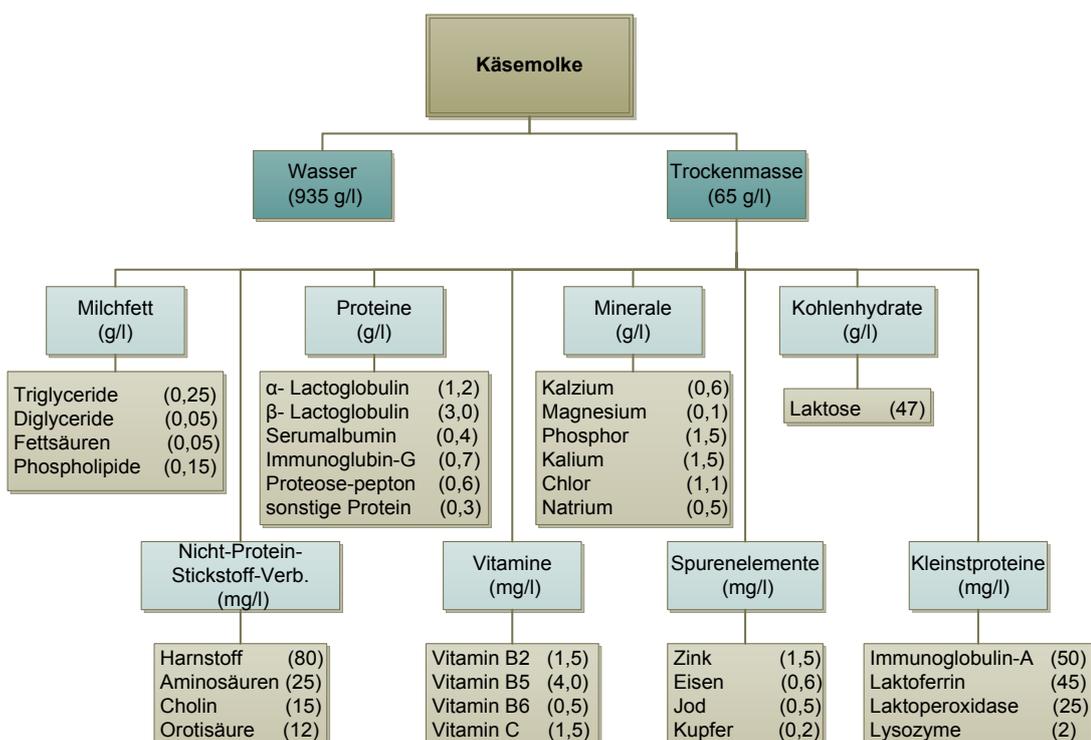


Abbildung 1: Durchschnittliche Zusammensetzung von Käsemolke (De Wit, 2001a)

3.1.2 Molkenprotein

Molkenprotein besteht aus folgenden globulären Proteinfractionen: β -Lactoglobulin (β -Lg), α -Lactalbumin (α -La), Serumalbumin (BSA), Immunoglobuline (Igs) und Proteoseptone (Pp) (De Wit, 2001a, Töpel, 2004, Yada, 2004, Jovanovic et al., 2005). Tabelle 1 listet die verschiedenen Molkenproteinfractionen sowie deren Molekulargewicht, Anzahl der intramolekulare Disulfidbrückenbindungen und Anzahl der freien Thiolgruppen auf.

Tabelle 1: Proteinfractionen von Molkenprotein (Gennadios, 2002)

Fraktion % (m/m)	Molekulargewicht [g/mol]	Disulfidbrückenbindungen pro Makromolekül	Freie Thiolgruppe pro Makromolekül
57 % β -Lg	18.300	2	1
19 % α -La	14.200	4	0
7 % BSA	66.300	17	1
13 % Igs	150.000 – 1.000.000	k.A.	k.A.
4 % Pp	4.100 – 22.000	0	0

Mit 57 % (m/m) der in Tabelle 1 dargestellten Molkenproteinfractionen ist β -Lg der Hauptbestandteil in Molkenprotein und dominiert das Aggregationsverhalten und die Gelbildung von Molkenprotein-basierten Formulierungen (Gennadios, 2002). Die Primärstruktur eines β -Lg Makromoleküls setzt sich aus 162 Aminosäuren zusammen. Das Molekulargewicht beträgt ca. 18 kDa (Yada, 2004, Belitz et al., 2009). Die Sekundärstruktur besteht aus β -Faltblättern und einer dreifach gewundenen α -Helix. Von den fünf Cystein-Molekülen des β -Lactoglobulins bilden vier Cystein-Moleküle zwei kovalente Disulfidbrückenbindungen, welche die Tertiärstruktur von β -Lactoglobulin bestimmen (siehe Abbildung 2). Diese Disulfidbrücken stabilisieren zudem die Quartärstruktur des Proteins, wobei sich unpolare Seitenketten in Richtung Molekülzentrum und polare Seitenketten in Richtung der Moleküloberfläche ausrichten. Dies führt zu einer hohen Wasserlöslichkeit von nativen Molkenproteinen. Die verbleibende freie Thiolgruppe, welche im Inneren des nativen Proteins verborgen ist, ist ausschlaggebend für die Filmbildung (Details siehe Kapitel 3.1.4). (Sawyer et al., 1971, Töpel, 2004, De Wit, 2001a, De Wit, 2001b, De Wit, 1990, Morr und Ha, 1993, Sienkiewicz, 1981a).

α -La ist mit einem Anteil von 18 % (m/m) die zweithäufigste Molkenproteinfraction. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 14 kDa und die Primärstruktur enthält 123 Aminosäuren (Belitz et al., 2009). Das α -La Molekül enthält acht Thiolgruppen, die vier Disulfidbrückenbindungen ausbilden (siehe Tabelle 1). Die Sekundärstruktur wird bestimmt durch drei α -Helices und zwei antiparallelen β -Faltblättern. Bei einer Temperaturerhöhung faltet sich zuerst die Struktur der β -Faltblätter auf, bevor das Auffalten der α -Helices beginnt. Dies führt zum Schmelzen der globulären Struktur. Dieser Zustand wird bis zu einer Temperatur von ca. 90 °C gehalten, solange keine anderen Molkenproteinfractionen anwesend sind. Außerdem bindet α -La Kalziumionen, die das Mole-

kül gegenüber Hitze stabilisieren. Daher weist α -La von allen Molkenproteinfraktionen die höchste Widerstandsfähigkeit gegenüber Hitze auf. Diese Hitzeresistenz wird deutlich durch die Anwesenheit anderer Proteinbestandteile, vor allem derer mit freien Thiolgruppen, beeinflusst. Die Hitzeresistenz nimmt mit steigendem Gehalt an anderen Proteinfraktionen ab (Tolkach, 2007). (Miller et al., 1997, Krochta et al., 1994, Belitz et al., 2009, Lent et al., 1998, Sienkiewicz, 1981b, Jovanovic et al., 2005)

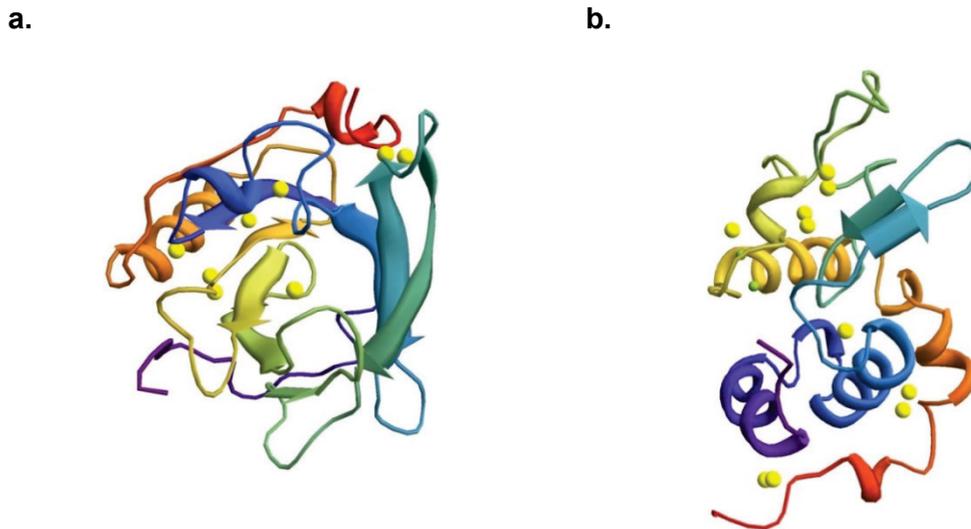


Abbildung 2: Tertiärstruktur von β -Lactoglobulin (a.) und α -Lactalbumin (b.) Die Abbildungen wurden mit Wolfram Mathematica 9.0 unter Verwendung der Daten aus der Proteindatenbank von Laboratory (2014) erstellt (Hamann und Schmid, 2014)

3.1.3 Molkenproteinisolat und – konzentrat

Das getrocknete Molkenprotein wird nach der Reinheit der Proteine in Konzentrat und Isolat unterschieden. Molkenproteinkonzentrat (Whey Protein Concentrate, WPC) enthält 35 - 90 % (m/m) Protein in der Trockenmasse, während Molkenproteinisolat (Whey Protein Isolate, WPI) einen höheren Proteingehalt von mehr als 90 % (m/m) aufweist (Hong und Krochta, 2006). Proteinkonzentrationen von über 50 % (m/m) werden durch Kombination von Ultrafiltration und Diafiltration zum Entfernen von Mineralien und Lactose aus dem Retentat erreicht. Ein Proteingehalt von mindestens 90 % (m/m) kann durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt (z.B. Ionenaustausch-chromatographie) nach den Membranfiltrationsmethoden erreicht werden. (Onwulata und Huth, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit WPI gearbeitet (siehe Kapitel 4.2.1), welche einen Proteingehalt von > 94 % (m/m), bezogen auf die Trockenmasse, aufweisen (Davisco, 2012). Neben Molkenprotein enthält das verwendete WPI noch Fett (ca. 1 % m/m), Mineralstoffe (ca. 3 % m/m) und Lactose (ca. 0,5 % m/m).

3.1.4 Filmbildende Eigenschaften von Molkenprotein

Kohärente Folien und Beschichtungen können mit unterschiedlichen Prozessen hergestellt werden. Dies hängt insbesondere von den Eigenschaften des Ausgangsmaterials ab. So können aufgeschmolzene Lipide und Wachse durch Abkühlen zu Folien und Beschichtungen verarbeitet werden (Fennema und Kester, 1991). Gelöste Biopolymere können durch Änderung der Lösungsbedingungen Filme bilden. Diese sogenannte Koazervation kann u.a. durch Erhitzen, Salzzugabe oder pH-Wert-Änderung erfolgen. Die am weitesten verbreitete Methode zur Herstellung von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen ist das sog. Gießverfahren (engl.: solvent casting). Hierbei wird meist Wasser und/oder Ethanol als Lösemittel verwendet. Die Formulierung (Lösung) aus Molkenprotein, Additiven wie z.B. Weichmacher und Lösemittel wird durch unterschiedliche Verfahren wie das Gießen in Schalen oder durch das Lackieren auf geeigneten Substraten durch Entfernung des Lösemittels (Trocknung) zu Folien oder Beschichtungen verarbeitet. Die Entfernung des Lösemittels kann durch unterschiedliche Trocknungsverfahren und -bedingungen bewerkstelligt werden. Hierzu zählen die Konvektionstrocknung, die Infrarottrocknung, und die Mikrowellentrocknung. Die Trocknungsart und Trocknungsbedingungen (Temperatur-Zeit-Profile) haben einen signifikanten Einfluss auf die physikalischen Eigenschaften (Permeation, Mechanik, Optik) der resultierenden Folien und Beschichtungen (Onwulata und Huth, 2008, Perez-Gago und Krochta, 2000).

Durch unterschiedliche intermolekulare Wechselwirkungen weisen Molkenproteine filmbildende Eigenschaften auf und haben deshalb das Potential geschlossene Folien und Beschichtungen zu bilden. Folien und Beschichtungen aus nativen Molkenproteinen sind durch elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals-Kräfte stabilisiert und können kohärente Filme ausbilden. Durch die Denaturierung können die freien Thiolgruppen, welche im Inneren des nativen Proteins verborgen sind, freigelegt werden und somit einen zusätzlichen Beitrag durch Bildung von intermolekularen Disulfidbrücken zur Filmstabilität leisten. Dies führt u.a. zu höheren Barriere- und Zugfestigkeitseigenschaften von Folien und Beschichtungen aus denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen (Perez-Gago et al., 1999). Nähere Informationen zu den Eigenschaften von denaturierten Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen werden in Kapitel 3.1.6 dargestellt.

3.1.4.1 Arten von molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Ihre Eigenschaften machen Proteine zu einem geeigneten Ausgangsmaterial für Folien und Beschichtungen. Intrinsische Eigenschaften der Folien- und Beschichtungsbestandteile und extrinsische Prozessparameter beeinflussen die finalen Eigenschaften der Folien (Panyam und Kilara, 1996). Hierbei zählt die Aminosäuresequenz der Proteine zu den bedeutendsten intrinsischen Faktoren. Die Proteine enthalten geladene, polare und nicht-polare Aminosäuren, wodurch ein chemisches Potential entlang der Proteinkette erzeugt wird. Resultierende intermolekulare Wechselwirkungen leisten einen großen Beitrag zur Stabilität der Folien und Beschichtungen (Krochta et al.,

1994, Krochta, 2002, Hernández-Muñoz et al., 2004). Barone et al. (2006) haben nachgewiesen, dass Protein-basierte Folien aufgrund intermolekularer Disulfidbrückenbindungen meist mechanisch stabiler sind als Polysaccharid-basierte Folien. Mögliche intermolekulare Wechselwirkungen in nicht modifizierten Protein-basierten Folien und Beschichtungen sind in Abbildung 3 dargestellt.

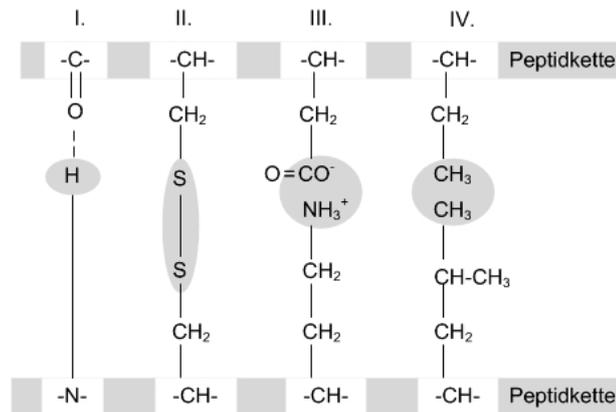


Abbildung 3: Strukturstabilisierende intermolekulare Wechselwirkungen zwischen Peptidketten in Anlehnung an Bannwarth et al. (2007)

- I: Wasserstoffbrückenbindung
- II: Disulfidbrückenbindungen (Cystein (Cys) – (Cys))
- III: Elektrostatische Wechselwirkungen
- IV: Hydrophobe Wechselwirkungen (z.B. zwischen Isoleucin (Ile) und Leucin (Leu))

Die in Abbildung 3 gezeigten intermolekularen Wechselwirkungen zwischen zwei oder mehreren Peptidketten bilden sich auch als intramolekulare Wechselwirkungen innerhalb einer Peptidkette aus.

Disulfidbrückenbindungen weisen mit etwa -230 kJ/mol die höchste Bindungsenergie auf, da es sich um kovalente Bindungen handelt. Elektrostatische Wechselwirkungen zählen mit einer Bindungsenergie von ca. -21 kJ/mol zu den stärksten nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Die Bindungsenergie von Wasserstoffbrückenbindungen liegt bei etwa -15 kJ/mol. Diese sind von besonderer Bedeutung für die Proteinfaltung. Die hydrophoben Wechselwirkungen der unpolaren Bereiche in der Peptidkette spielen zwar eine wichtige Rolle für die Proteinfaltung, haben aber eher eine schwache Bindungsenergie. Des Weiteren sind Dipol-Dipolwechselwirkungen in Proteinfilmen vorhanden, welche aber die niedrigste Bindungsenergie aufweisen. Die Bindungsenergie und entsprechende Beispiele können der Tabelle 2 entnommen werden. So benötigt das Spalten von Disulfidbrückenbindungen einen Energieeintrag von 230 kJ/mol und ist somit eine endotherme Reaktion. Wasserstoffbrückenbindungen haben Bindungsenergien zwischen -12.5 und -16.7 kJ/mol und somit entstehen diese Bindungen spontan. (Bannwarth et al., 2007, Belitz et al., 2009)

Tabelle 2: Bindungsenergien von kovalenten Bindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophoben Wechselwirkungen (Belitz et al., 2009)

Bindungsart	Beispiel	Bindungsenergie [kJ/mol]
Kovalente Bindungen	-S-S-	-230
Elektrostatische Wechselwirkungen	-COO ⁻ H ₃ N ⁺	-21
	>C=O O=C<	+1,3
Wasserstoffbrückenbindungen	-O-H ... O<	-16,7
	>N-H ... O=C<	-12,5
Hydrophobe Wechselwirkungen	-CH ₃ ... HC-	+0,1
	-Ala... Ala-	-3
	-Val ... Val-	-8
	-Leu ... Leu-	-9
	-Phe ... Phe-	-13
	-Trp ... Trp-	-19

Im Rahmen dieser Arbeit werden unter „molekulare Wechselwirkungen“ sowohl kovalente (z.B. Disulfidbrücken) und nicht-kovalente Bindungen bzw. Wechselwirkungen (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen) verstanden, die sich entweder intermolekular und/oder intramolekular ausbilden.

3.1.5 Weichmacher und Molekulargewicht bei WPI-basierten Folien und Beschichtungen

3.1.5.1 Weichmacher in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Um die mechanischen Eigenschaften von Polymeren zu beeinflussen kommen Weichmacher zum Einsatz. Nach Sothornvit und Krochta (2005) unterstützen Weichmacher die Verarbeitbarkeit von Werkstoffen durch Herabsetzung der Prozessstemperatur, Reduktion der Klebrigkeit und Verbesserung der Befeuchtung. Im fertigen Produkt führen Weichmacher zur Erhöhung der Flexibilität, Dehnbarkeit und Zähigkeit. Weichmacher senken die Glasübergangstemperatur (T_g) und reduzieren das Elastizitätsmodul (E-Modul, E). Nach Banker (1966) sind Weichmacher Substanzen, die im Wesentlichen nicht flüchtig, hochsiedend und nicht separierend sind und durch Zugabe zu anderen Werkstoffen deren physikalischen und/oder mechanischen Eigenschaften ändern. Eine Unterscheidung erfolgt in interne und externe Weichmacher.

3.1.5.1.1 Interne Weichmacher

Nach Immergut und Mark (1965) können zwei Arten der internen Weichmachung unterschieden werden. Interne Weichmacher können als Teil des Polymermoleküls angesehen werden, was z. B. durch ein zweites Monomer, welches in die Polymerstruktur co-polymerisiert wird, realisiert werden kann (statistische Polymere). Dadurch liegt das Polymer weniger geordnet vor und daraus folgend ist es für die Ketten schwieriger sich eng aneinander zu lagern und zu interagieren. Eine weitere Art der internen Plastifika-

tion ist die Einführung von Seitenketten, wie Substituenten oder aufgepfropfte Äste, die mit dem Polymer reagieren und kovalente Bindungen ausbilden (Pfcopolymerisation). Hierbei führt die Sperrigkeit der Seitenketten zu einer verminderten Interaktion zwischen den Polymeren (Vieira et al., 2011). Die chemische Quervernetzung zweier Polymerketten durch ein Monomer oder Polymer kann ebenfalls zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften führen (Mekonnen et al., 2013). Nach Godwin (2011) haben reaktive Weichmacher ein niedriges Molekulargewicht und eine reaktive Gruppe (z.B. Epoxid-Gruppe) pro Molekül. Diese tragen zur Verlängerung der Polymersegmente zwischen den Quervernetzungen bei und führen so zu einem leichten Erweichungs- und Flexibilitätseffekt.

3.1.5.1.2 Externe Weichmacher

Externe Weichmacher sind schwer flüchtige Substanzen, welche Polymeren zugegeben werden ohne kovalente Verbindungen einzugehen. Dennoch interagieren sie mit dem Polymer und führen zur Quellung (Sothornvit und Krochta, 2005). Externe Weichmacher wirken durch eine Modifizierung des Aufbaus und der Energie, welche in der dreidimensionalen Struktur von Polymeren steckt (Guilbert et al., 1995). Hierbei haben Polyole, wie zum Beispiel Glycerin (Glycerol) und Sorbit (Sorbitol), dank ihrer Fähigkeit die inneren Wasserstoffbrückenbindungen in Polymeren zu vermindern, eine weichmachende Wirkung. Dabei erhöhen sie das freie Volumen, wodurch die Sprödeheit des Materials abnimmt und die Permeabilität steigt. Der Einsatz von Weichmachern ist bei Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen technologisch notwendig, da das Material ohne Weichmacher zu spröde ist, um geschlossene, kohärente und defektfreie Folien und Beschichtungen bilden zu können (McHugh und Krochta, 1994, McHugh et al., 1994).

Wie externe Weichmacher mit den Polypeptiden interagieren ist im Speziellen nicht bekannt. Wichtige Einflussfaktoren sollen aber die Größe, das Molekulargewicht und die Anzahl der Hydroxylgruppen des Weichmachers sein (di Gioia und Guilbert, 1999).

Die externe Weichmachung von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen ist in der wissenschaftlichen Literatur ausführlich beschrieben. Nachfolgend werden die bei Molkenprotein am häufigsten verwendeten externen Weichmacher aufgeführt und beschrieben. Alle im Folgenden genannten Weichmacherkonzentrationen beziehen sich hierbei auf die verwendete Molkenproteinmasse (m/m).

Sorbitol (Sor) wurde in zahlreichen Studien verwendet, häufig auch im Vergleich zu Glycerol (Gly) (McHugh et al., 1994, Hong und Krochta, 2003, Lee et al., 2008b, Ozdemir und Floros, 2008, Oses et al., 2009). Oses et al. (2009) verwendeten Zugaben zwischen 42,9 % (m/m) und 150 % (m/m). Sie beobachteten, dass 42,9 % (m/m) Sorbitol brüchige und 150 % (m/m) Sorbitol sehr klebrige Filme ergeben. Ab 100 % (m/m) Sorbitolzugabe wurde keine weitere Zunahme der Flexibilität erreicht. Sie beobachteten weiterhin, dass Sorbitol mit der Zeit auskristallisierte. Daraus resultierte eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften der Molkenproteinschichten. Das Mate-

rial wird spröde, härter und weniger flexibel. Auch Hong und Krochta (2003) berichten von einer Auskristallisation von Sorbitol.

Polyethylenglycol mit einem Molekulargewicht von 200 g/mol (PEG200) wurde zur Weichmachung von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen von Lee et al. (2008b), McHugh et al. (1994) und (Hong et al., 2004) in Zugaben von 100 % (m/m) bis 109,2 % (m/m) verwendet, um kohärente und defektfreie Filme herstellen zu können.

Propylenglycol (PG) wurde von (Lee et al., 2008b) mit einer Zugabe von 41,3 % (m/m) und von (Hong und Krochta, 2003) mit einer Zugabe 41,0 % (m/m) zur Herstellung von Molkenprotein-basierten Beschichtungen verwendet.

Glycerol (Gly) wurde aufgrund seiner guten Kompatibilität zu Molkenproteinformulierungen und seiner hohen weichmachenden Wirkung am häufigsten bei wissenschaftlichen Studien, wie auch in dieser Arbeit, verwendet (McHugh et al., 1994, McHugh und Krochta, 1994, Alcantara et al., 1998, Perez-Gago et al., 1999, Perez-Gago und Krochta, 1999, Hong und Krochta, 2004, Hong et al., 2004, Hong und Krochta, 2003, Dangaran und Krochta, 2007, Lee et al., 2008b, Oses et al., 2009). Oses et al. (2009) beobachtete, dass bei einer Zugabe von 42,9 % (m/m) die Proteinbeschichtung brüchig und bei 150 % klebrig war. Ab einer Zugabe von 66,7 % (m/m) wurde keine Zunahme der Flexibilität mehr beobachtet. Diese Weichmacherkonzentration scheint übereinstimmend mit Vorversuchen zu dieser Arbeit geeignet zu sein, um Folien und Beschichtungen aus WPI herstellen zu können, die einen hohen Spielraum für Rezeptur-, und Prozessparameterveränderungen zulassen (Schmid et al., 2012). Aus diesem Grund wird eine Zugabe von 66,7 % (m/m) dieses Weichmachers in der vorliegenden Arbeit für die sog. Standard- bzw. Ausgangsformulierung verwendet.

Neben den o.g. Weichmachern darf das in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen enthaltene Restwasser und dessen weichmachende Wirkung nicht vernachlässigt werden. Wasser zählt zu den effektivsten weichmachenden Substanzen in Biopolymer-basierten Folien und Beschichtungen und wird je nach Trocknungsart, Trocknungsbedingung und -dauer entfernt. Während der weiteren Lagerung stellt sich die Gleichgewichtsfeuchte in den Folien und Beschichtungen ein. Änderungen der Rezeptur und des Herstellungsprozesses sowie mögliche Modifikationen der Formulierung und/oder der Folien und Beschichtungen können eine Änderung der Wassersorptionsisotherme bewirken. Hierdurch kann der Restwassergehalt, sprich die Gleichgewichtsfeuchte, in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen variieren und somit insbesondere die mechanischen Eigenschaften beeinflussen. In diesem Zusammenhang können externe Weichmacher in zwei Kategorien eingeteilt werden (Zhang und Han, 2006a, Zhang und Han, 2006b, Chiellini, 2008).

- Weichmacher, welche direkt durch Wasserstoffbrücken mit den Polymeren interagieren. Diese legen sich zwischen die Polymerketten und vergrößern deren Abstand.
- Weichmacher, die als hydrophile Substanzen agieren und so mehr Wassermoleküle in der Polymermatrix binden können (Erhöhung der Gleichgewichtsfeuchte).

Sorbitol gehört zu der ersten Kategorie und Glycerol zu der zweiten Kategorie (Zhang und Han, 2006a, Zhang und Han, 2006b, Mali et al., 2005, Garcia et al., 2000, Godbillot et al., 2006). Diese umfangreichen Untersuchungen wurden bei Stärke-basierten Folien und Beschichtungen durchgeführt. In Bezug auf Protein-basierte Folien und Beschichtungen liegen keine derart umfangreichen Untersuchungen zur Veränderung der Gleichgewichtsfeuchte durch unterschiedliche Weichmacher vor. Zahlreiche Veröffentlichungen, welche die Effektivität der Weichmachung bei Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen beschreiben, wurden in diesem Kapitel bereits genannt und von Sothornvit und Krochta (2005) zusammengefasst. Es wird übereinstimmend berichtet, dass Glycerol eine hohe Kompatibilität zu und eine hohe weichmachende Effektivität in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen aufweist.

3.1.5.2 Beeinflussung des Ausgangsmolekulargewichts von Formulierungen zur Herstellung von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Das Molekulargewicht der in WPI enthaltenen Proteinfractionen (siehe Tabelle 1), und damit deren Funktionalität, kann durch enzymatische Hydrolyse modifiziert werden. Proteine werden unter kontrollierten Bedingungen teilweise hydrolysiert und dabei in kleinere Peptidstücke gespalten. Der Schlüsselparameter zur Bestimmung der Proteinhydrolyse ist der Grad der Hydrolyse (engl. degree of hydrolysis (*DH*)). Dieser ist definiert als der Anteil der gespaltenen Peptidbindungen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Peptidbindungen (Damodaran und Paraf, 1997, Nielsen et al., 2001).

Gleichung 1: Berechnung des Hydrolysegrades *DH* (Nielsen et al., 2001)

$$DH = \frac{h}{h_{tot}}$$

h: Anzahl hydrolysierter Bindungen
h_{tot}: Gesamtzahl Peptidbindungen je Protein

Je höher der Grad der Hydrolyse ist, desto kürzer sind die Peptidketten und desto kleiner das Molekulargewicht. Des Weiteren werden somit intermolekulare Wechselwirkungen entlang der Proteinketten reduziert. Bei Molkenproteinisolat-basierten Folien und Beschichtungen führt ein höherer Gehalt an hydrolysiertem Molkenproteinisolat (h-WPI) zu mehr freien funktionellen Gruppen an den Polymerkettenenden. Die Reduktion des durchschnittlichen Ausgangsmolekulargewichts durch Hydrolyse von Molkenprotein-basierten Formulierungen hat laut Sothornvit und Krochta (2000a) keinen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoff- und Wasserdampfpermeabilität (Sothornvit und Krochta, 2000c). Im Gegensatz dazu weisen Folien und Beschichtungen aus hydrolysierten Molkenprotein-basierten Formulierungen eine deutlich höhere Flexibilität auf. Folglich könnte die Verwendung von hydrolysiertem Molkenproteinisolat (h-WPI) die technologisch notwendige Menge an Weichmacher reduzieren. Die technologisch notwendige Menge an Weichmacher ist die Menge an Weichmacher, die mindestens benötigt wird, um kohärente und defektfreie Folien und Beschichtungen herstellen zu können (Details hierzu siehe Kapitel 3.1.5.1 und 4.2.2). Es ist auch bekannt, dass die Wahl des Weichmachers, aber insbesondere dessen Konzentration die Permeation

von Sauerstoff und Wasserdampf direkt beeinflusst (Sothornvit und Krochta, 2000b). Sothornvit und Krochta (2000b) stellten somit folgerichtig die Hypothese auf, dass durch die Hydrolyse von denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen der Weichmachergehalt reduziert werden kann und dennoch flexible Folien und Beschichtungen entstehen, die aber höhere Barriereigenschaften gegenüber Sauerstoff und Wasserdampf aufweisen. Ob eine Falsifikation bzw. Bestätigung dieser Hypothese stattgefunden hat, kann der wissenschaftlichen Literatur nicht entnommen werden und ist u.a. auch deshalb Untersuchungsgegenstand dieser Dissertation. Des Weiteren wurden die bisherigen Korrelationen zwischen Hydrolysegrad und resultierenden Eigenschaften nur an hydrolysierten Formulierungen durchgeführt, nicht aber an Mischungen aus hochmolekularem WPI und h-WPI. Auch dies ist Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

3.1.6 Denaturierung von WPI-basierten Formulierungen

Unter Denaturierung versteht man eine reversible oder irreversible Veränderung der nativen Konformation des Proteins ohne Spaltung von kovalenten Bindungen, mit Ausnahme von Disulfidbrücken. Bei einer Denaturierung werden daher Wasserstoffbrückenbindungen, ionische und hydrophobe Bindungen gespalten. Folgende Behandlungen führen zur Denaturierung: Änderung der Temperatur, Änderung des pH-Wertes, Einfluss von Scherkräften, Zugabe von Lösungsmitteln, Salzen, Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Detergentien wie Natriumdodecylsulfat (Belitz et al., 2009). Auch die Hochdruckbehandlung kann zur Denaturierung von Molkenproteinen führen (Balasubramaniam et al., 2016).

Bereits in den ersten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum Thema Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen wird beschrieben, dass für die Filmbildung eine Proteindenaturierung mit Ausbildung von intermolekularen Wechselwirkungen vorteilhaft ist (McHugh et al., 1994). Die Denaturierung von globulären Proteinen führt zum Auffalten der Proteinstruktur, wobei reaktive funktionelle Gruppen exponiert werden, die neue Bindungen wie Disulfidbrückenbindungen, van-der-Waals-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen bilden können. (Onwulata und Huth, 2008, de Wit, 2009).

Die einzelnen Molkenproteinfraktionen zeigen für sich alleine ein deutlich unterschiedliches Denaturierungsverhalten. Bei Anwesenheit aller in Molkenprotein enthaltenen Fraktionen wird das Denaturierungs- und Aggregationsverhalten durch β -Lactoglobulin bestimmt, da der Anteil an freien Thiolgruppen, die in β -Lactoglobulin vorkommen, entscheidend für die Denaturierung ist (Tolkach, 2007).

Bei neutralen bis leicht sauren Bedingungen (pH 7,5 - 5,5) liegt β -Lactoglobulin normalerweise als Dimer vor und die thermische Denaturierung erfolgt in zwei Schritten. Im ersten Schritt dissoziieren die Dimere bei Temperaturen über 40 °C in Monomeren. Ab Temperaturen von mehr als 70 °C falten sich die globulären Moleküle auf und treten über Sulfhydrylgruppen in Wechselwirkung, wodurch sich kleine Aggregate mit β -Lactoglobulin oder anderen Thiolgruppen enthaltenden Proteinen wie Serumalbumin

bilden. Im zweiten Schritt reagieren die kleinen Aggregate miteinander zu Aggregaten mit größerem Molekulargewicht (siehe Abbildung 4). Bei weiterer Temperaturerhöhung findet eine irreversible Proteinschädigung statt. Hierbei muss auch der Einfluss von pH-Wert, Salz, Zucker und Proteinkonzentration in Hinblick auf das thermische Verhalten von β -Lactoglobulin beachtet werden (Jovanovic et al., 2005, de Wit, 2009).

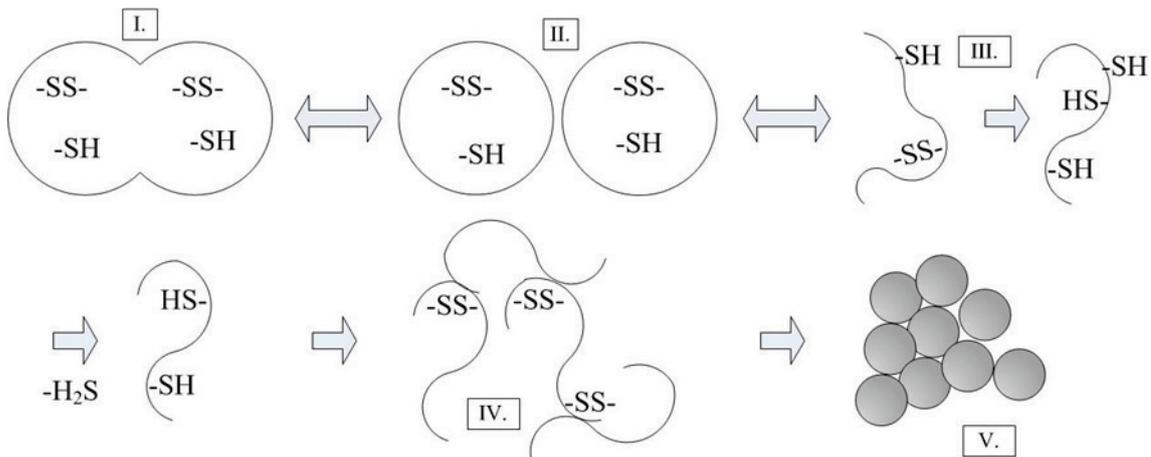


Abbildung 4: Hitzedenaturierung und Aggregation von β -Lactoglobulin in Anlehnung an (Ternes, 2008). I: Dimer, II: Monomer β -Lactoglobulin, III: Auffalten der Proteinstruktur durch Hitzebehandlung, IV: Bildung von neuen Disulfidbrückenbindungen, V: Aggregation

Der Einfluss des Denaturierungsgrades (*DG*) bzw. des Anteils an denaturierten Molekülen in Ausgangsformulierungen auf die resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen ist bislang nur wenig untersucht. In einem Aufsatz von Guckian et al. (2006) wurden WPI-basierte Folien mit unterschiedlichen Denaturierungsgraden durch Mischen von nativen und denaturiertem WPI hergestellt und auf Wasserdampfbarriereigenschaften, mechanische Eigenschaften und molekulare Wechselwirkungen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass Folien mit einem höheren Anteil an denaturiertem Molkenprotein eine höhere Reißdehnung, Zugfestigkeit und E-Modul aufweisen als Folien mit kleineren Anteilen an denaturiertem Molkenprotein. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied bezüglich der Wasserdampfdurchlässigkeit festgestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird der Begriff Denaturierungsgrad (*DG*) auch für den Massenanteil an vollständig denaturierten Molkenproteinen in Formulierungsmischungen aus nativem und denaturiertem Protein verwendet (vgl. Kapitel 4.2.4).

3.1.7 TG-Quervernetzung von WPI-basierten Formulierungen

Enzyme wie Transglutaminase (TG), Lipoxygenase, Lysyloxidase und Peroxidase sind in der Lage Proteine zu vernetzen. Die Transglutaminase, oder genauer die Protein-Glutamin- γ -Glutamyltransferase (EC2.3.2.13), ist ein häufig verwendetes Enzym, das spezifisch den Acyltransfer zwischen der Carboxyamid-Gruppe eines proteingebundenen Glutamins und der Aminogruppe von Lysin katalysiert (Matheis und Whitaker,

1987). Dabei fungiert die γ -Carboxylamid-Gruppe als Acyl-Donor und die ϵ -Aminogruppe als Acyl-Akzeptor.

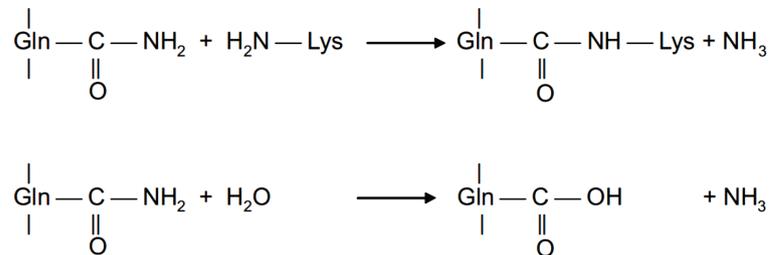


Abbildung 5: Beispiel zum Ablauf der TG-Quervernetzung von Aminosäuren (in Proteinen); oben: Reaktion der Aminosäure Glutamin (Gln) und Lysin (Lys), katalysiert durch TG, was zu einer kovalenten Peptidbindung führt (ϵ -(γ -glutamyl)-lysin Bindung); unten: Reaktion der Aminosäure Gln mit Wasser, wobei eine Carboxylgruppe gebildet wird. (Buchert et al., 2010)

Das Ergebnis sind intra- und intermolekular vernetzte Proteine. In mehreren Studien zeigten mittels TG-vernetzte Proteinformulierungen und Protein-basierte Folien veränderte technofunktionelle Eigenschaften auf (Yildirim und Hettiarachchy, 1998, De Jong und Koppelman, 2002, Oh et al., 2004, Masamba et al., 2016). Der Einfluss auf die resultierenden Folieneigenschaften wird nachfolgend beschrieben und durch die vorliegende Dissertation insbesondere hinsichtlich der verpackungsrelevanten Eigenschaften von TG-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien ergänzt.

Yildirim und Hettiarachchy (1998) stellten bei Molken- und Sojaproteinfilmen eine Verdopplung der Zugfestigkeitseigenschaften durch TG-Quervernetzung fest. Oh et al. (2004) ermittelten bei TG-quervernetzten Kaseinfolien ebenfalls eine Zunahme der Reißdehnung. Es wurde kein signifikanter Einfluss auf die Wasserdampfdurchlässigkeit durch die TG-Quervernetzung festgestellt. Kürzlich veröffentlichten Masamba et al. (2016) ihre Ergebnisse zu TG-quervernetzten Zeinfolien. Auch bei Zeinfolien zeigte die TG-Quervernetzung statistisch signifikant erhöhte Reißdehnungen und Zugfestigkeiten. Des Weiteren wurde von einer deutlichen Verringerung der Wasserdampfdurchlässigkeit berichtet.

3.1.8 UV-Bestrahlung von WPI-basierten Folien und Beschichtungen

Zusätzlich zu den bereits erläuterten Methoden, wie Weichmachung (vgl. Kapitel 3.1.5.1), Hydrolyse (vgl. Kapitel 3.1.5.2), Denaturierung (vgl. Kapitel 3.1.6) und TG-Quervernetzung (vgl. Kapitel 3.1.7), stellt die Behandlung mit ultravioletten (UV)-Strahlen (Wellenlängenbereich = 180 – 400 nm) eine weitere Möglichkeit zur Proteinmodifikation dar (Wihodo und Moraru, 2012).

Die Proteinvernetzung durch Bestrahlung kann u.a. durch ionisierende Strahlung wie α -Strahlung, aber auch durch UV-Strahlung erfolgen. Ionisierende Strahlung kann zu irreversiblen Änderungen der Proteinkonformation, Oxidation der Aminosäuren, Spaltung von kovalenten Bindungen, Bildung freier Radikale und Rekombinations- und Po-

lymerisationsreaktionen führen. Hierbei beruht das Grundprinzip auf der Bildung von Hydroxylradikalen durch Strahlung. Proteine mit einem hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren, wie Phenylalanin und Tyrosin, reagieren hierbei leichter mit den Hydroxylradikalen als die mit aliphatischen Aminosäuren (Sabato et al., 2001). Der Effekt der α -Strahlung auf die Proteinkonformation hängt von mehreren Faktoren, wie Proteinkonzentration, Anwesenheit von Sauerstoff und der Quartärstruktur der Proteine, ab (Brault et al., 1997, Yang und Song, 1999).

Bei der Proteinvernetzung durch UV-Strahlung entstehen zusätzliche kovalente Bindungen in Proteinen durch UV-Absorption und Rekombination der aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Phenylalanin (Fujimori, 1965, Forbes und Sullivan, 1966, Gennadios et al., 1998). Bislang ist der durch UV-Licht ausgelöste Vorgang der Vernetzung von Proteinen immer noch nicht vollständig erforscht. Experimente zeigten, dass mit UV-Licht bestrahlte Sojaproteinisolat-basierte Folien eine höhere Zugfestigkeit bei reduzierter Dehnbarkeit aufweisen. Dies könnte durch den relativ hohen Gehalt an Tyrosin und Phenylalanin in Sojaprotein erklärt werden (Gennadios et al., 1998). Molkenproteine dagegen enthalten eine geringere Anzahl an aromatischen Aminosäuren als Sojaprotein. So erklären Ustunol und Mert (2004) den schwächeren Effekt der UV-Bestrahlung von Molkenprotein-basierten Lösungen. Es wurden bereits mehrere wissenschaftliche Aufsätze von Forschungsgruppen veröffentlicht, welche unterschiedliche Protein-basierten Folien UV-bestrahlt und charakterisiert haben. Diese Strahlung wird insbesondere durch aromatische Gruppen und Doppelbindungen absorbiert und kann zur Bildung von freien Radikalen an Aminosäuren und in Folge zu kovalenten intermolekularen Vernetzung von Proteinen führen (Gennadios et al., 1998, Rhim et al., 1999).

Die in Molkenprotein vorhandenen aromatischen Aminosäuren sind Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Diese sind relativ hydrophob und können insbesondere untereinander an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sein (Cheftel et al., 1992).

Nach Vladimirov et al. (1970) kann sich durch Energieeintrag ($h\nu$) mittels UV-Bestrahlung ein Wasserstoffatom von der Seitenkette des Phenylalanin abspalten und so eine Radikalbildung des Phenylalanin herbeiführen (vgl. Abbildung 6).

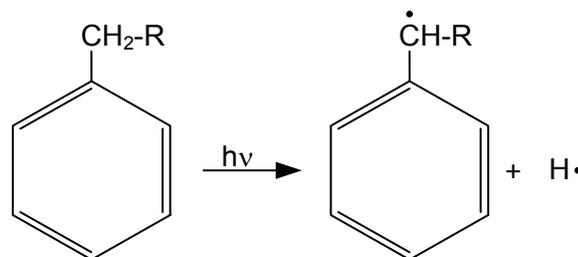


Abbildung 6: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Phenylalanin nach Vladimirov et al. (1970) und Schaich und Pryor (1980)

Durch den Einfluss von UV-Strahlung auf Tyrosin können durch Abspaltung von Wasserstoff Phenoxyradikale entstehen (vgl. Abbildung 7).

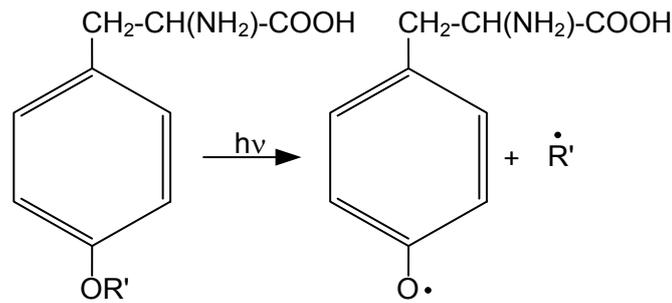


Abbildung 7: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Tyrosin nach Vladimirov et al. (1970) und Schaich und Pryor (1980)

Nach Vladimirov et al. (1970) kann eine UV-Bestrahlung zu einer photochemischen Reaktion bei Tryptophan führen. Hierbei wird Indol modifiziert, wobei die Seitenkette unverändert bleibt. Zusätzlich wird angenommen, dass durch Wasserstoffabspaltung von der Stickstoffgruppe während der UV-Bestrahlung Tryptophanradikale gebildet werden (vgl. Abbildung 8).

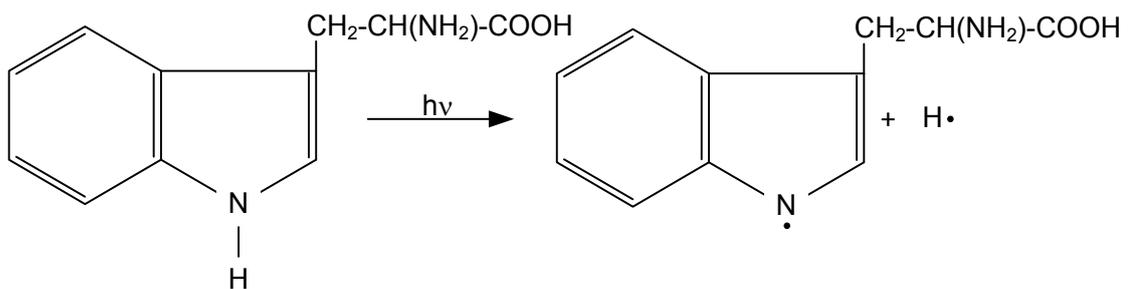


Abbildung 8: Mögliche Reaktion von UV-bestrahltem Tryptophan nach Vladimirov et al. (1970) und Schaich und Pryor (1980)

Der Effekt einer UV-Bestrahlung wurde bereits an Folien aus Sojaprotein, Erdnussprotein, Fisch-Gelatine, Eialbumin und Casein untersucht (Gennadios et al., 1998, Rhim et al., 1999, Liu et al., 2004, Micard et al., 2000, Otoni et al., 2012). In den meisten Fällen wurde berichtet, dass eine UV-Bestrahlung die mechanischen und optischen Eigenschaften der bestrahlten Filme beeinflusst. Die veröffentlichten Ergebnisse variieren aber sehr stark, was auf die unterschiedlichen Proteinherkunft und die unterschiedlichen Ausgangseigenschaften zurückgeführt werden kann.

Nur sehr wenige Informationen über den Einfluss von UV-Strahlung auf Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen sind verfügbar. Ustunol und Mert (2004) haben Molkenprotein-basierte Ausgangsformulierungen für drei Stunden mit UV-Licht bestrahlt und aus den bestrahlten Formulierungen Folien hergestellt. Diese Folien zeigten erhöhte Zugfestigkeitswerte auf. Es konnte aber kein signifikanter Einfluss auf die Barriereigenschaften festgestellt werden.

Bezüglich der direkten UV-Bestrahlung von fertigen Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen waren vor und während der Untersuchungen im Rahmen dieser

Dissertation keine sonstigen Forschungsaktivitäten und daraus resultierenden wissenschaftlichen Publikationen bekannt. Zwischenzeitlich haben sich weitere Wissenschaftler der Thematik angenommen und den Einfluss von UV-Strahlung auf verpackungsrelevante Eigenschaften von fertigen Molkenprotein-basierten Folien untersucht und kürzlich publiziert (Díaz et al., 2016). Diese neuen Erkenntnisse zu verpackungsrelevanten Eigenschaften von UV-bestrahlten Molkenprotein-basierten Folien werden in Kapitel 5.6.2 mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation verglichen und diskutiert. Die Studie von Díaz et al. (2016) zitiert und berücksichtigt inhaltlich den einschlägigen wissenschaftlichen Aufsatz zu den Ergebnissen zum Einfluss der UV-Bestrahlung aus dieser Dissertation (Schmid et al., 2015c). Auch wurden zwei weitere wissenschaftliche Aufsätze, welche im Rahmen dieser Dissertation veröffentlicht wurden (Schmid et al., 2014a, Schmid et al., 2014b), in der Studie von Díaz et al. (2016) zitiert und inhaltlich berücksichtigt.

3.2 Grundlagen zu verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

3.2.1 Stofftransport durch Folien und Beschichtungen

Der Permeationsvorgang spielt für Verpackungsfolien eine entscheidende Rolle, da die Barriereeigenschaften maßgeblich die Qualität und Haltbarkeit von verpackten Lebensmitteln bestimmen (Ahlhaus, 1997). Besonders die Sauerstoff- und die Wasserdampfdurchlässigkeit einer Verpackung können die Eigenschaften des Lebensmittels stark beeinflussen. In diesem Kapitel werden die physikalischen Grundlagen zum Stofftransport durch die Polymermatrix zusammengefasst. Das genaue Vorgehen zur experimentellen Bestimmung der Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit wird in Kapitel 4.3.1 beschrieben.

Permeation wird als Transport von gas-, dampfförmigen oder flüssigen Substanzen (Permeat) durch einen polymeren Feststoff, von der einen Seite auf die andere des Feststoffs, definiert (Coles et al., 2003). Es findet also ein Massentransport statt (Piringer, 1993). Zum einen kann der Permeationsprozess durch sehr kleine Poren im Material (Grenzfall) (Langowski, 2005) oder durch den Lösungs-Diffusionseffekt erfolgen (Robertson, 2013). Eine weitere Möglichkeit stellt der Stofftransport überwiegend an Fehlstellen dar. Hierbei ist der Stofffluss durch das intakte Material gegenüber dem durch die Fehlstelle meist vernachlässigbar klein (Langowski, 2005).

Die Permeation durch Kunststofffolien findet statt, wenn der feste Kunststoff zwei direkt nebeneinander liegende Räume voneinander trennt, die unterschiedliche Gaskonzentrationen c enthalten (vgl. Abbildung 9). Das Druck- bzw. Konzentrationsgefälle stellt die treibende Kraft für den Diffusionsvorgang dar (Menges et al., 2002).

Die Permeation durch homogene Materialien (Langowski, 2005) wie z.B. Polymere, wozu auch die Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen zählen, läuft auf Grundlage unterschiedlicher physikalischer Vorgänge ab. Diese Vorgänge sind: Die

Adsorption an, die Absorption in, die Diffusion durch das Verpackungsmaterial und die Desorption vom Material auf der Seite der niedrigeren Konzentration (Piringer, 1993). Diese Vorgänge sind für ein homogenes Material mit der Schichtdicke d in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:

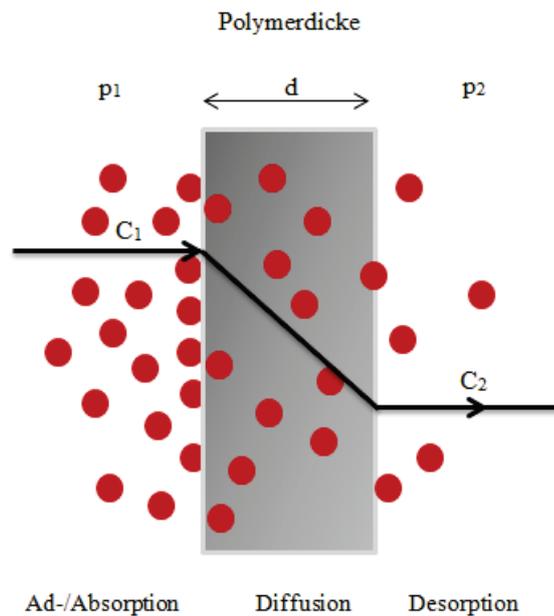


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Lösungs-Diffusions-Modells nach (Robertson, 2013)

Der Permeationsprozess nach dem Lösungs-Diffusions-Modell kann meist mathematisch über das Gesetz nach Henry und das Gesetz nach Fick beschrieben werden (vgl. Abbildung 9). (Menges et al., 2002, Piringer und Baner, 2008, Henry, 1803, Henry, 1800, Fick, 1855, Graham, 1866a, Graham, 1866b).

3.2.1.1 Gesetz nach Henry

Das Gesetz nach Henry (Henrysches Gesetz) beschreibt das Löslichkeitsverhalten von Gasen in einem Polymer. Hierbei diffundieren die Moleküle in das Polymer, bis sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellt. Wenn das dynamische Gleichgewicht eingestellt ist, entspricht die Anzahl der absorbierten Moleküle der Anzahl an desorbierten Moleküle. Bei einer konstanten Partialdruckdifferenz stellt sich so im Polymer ein zeitunabhängiges Konzentrationsprofil ein (Menges et al., 2002). Über das Henrysche Gesetz kann die Konzentration c des absorbierten Stoffes im Polymer in Abhängigkeit vom Partialdruck p wie nachfolgend beschrieben werden (Piringer und Baner, 2008):

Gleichung 2: Henrysches Gesetz (Piringer und Baner, 2008)

Henrysches Gesetz	Symbol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
$c = S \cdot p$	c	Konzentration (STP)	$[\text{cm}^3_{\text{Medium}}(\text{STP})/\text{cm}^3_{\text{Polymer}}]$
	S	Sorptionskoeffizient	$[\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{cm}^3 \cdot \text{bar})]$
	p	Druck	[bar]

STP: Standard temperature and pressure bzw. Normalbedingungen (273,15 K; $1,013 \cdot 10^5$ Pa)

Der Sorptionskoeffizient S wird auch als Löslichkeitskoeffizient bezeichnet. Er ist ein Maß für die Löslichkeit der Moleküle im Polymer und ist u.a. von der Polarität des Permeats und Materials abhängig. Löslichkeitskoeffizienten für inerte Gase in Polymeren liegen bei Raumtemperatur üblicherweise zwischen 0,02 bis $1 \text{ cm}^3(\text{STP})/(\text{cm}^3 \cdot \text{bar})$. (Menges et al., 2002)

Strenggenommen gilt das Henrysche Gesetz nur dann, wenn die sorbierende Substanz im Polymer nicht dissoziiert, geringe Drücke herrschen und die Temperatur oberhalb der Glasübergangstemperatur T_g liegt. Zudem gilt das Henrysche Gesetz nur bei verdünnten Systemen bzw. geringen Partialdrücken (Van Krevelen und Te Nijenhuis, 2009). Da bei der Permeation durch Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen üblicherweise geringe Drücke auftreten, die betrachteten Substanzen nicht dissoziieren und T_g überschritten ist (nach Sothornvit et al. (2002) liegt T_g von β -Lactoglobulin basierten Folien zwischen $-43 \text{ }^\circ\text{C}$ und $-49 \text{ }^\circ\text{C}$), wird in der vorliegenden Arbeit, wie für die meisten Gas/Polymer-Systeme, die Gültigkeit des Henryschen Gesetzes angenommen.

3.2.1.2 Ficksches Gesetz

Die Stoffflussdichte J (Substanzmenge pro Zeit und Flächeneinheit) kann im Gleichgewichtszustand mit dem ersten Fickschen Gesetz beschrieben werden (Menges et al., 2002, Robertson, 2013, Lee et al., 2008a, Fick, 1855):

Gleichung 3: Ficksches Gesetz

Ficksches Gesetz	Symbol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
$J = -D \cdot \frac{dc}{dx}$	J	Stoffflussdichte	$[\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})]$
	dc	Konzentrationsgradient	$[\text{mol}/\text{m}^3]$
	dx	Länge des Diffusionswegs	[m]
	D	Diffusionskoeffizient	$[\text{m}^2/\text{s}]$

Nach einer gewissen Zeit stellt sich durch Diffusionsvorgänge ein Fließgleichgewicht mit konstantem Konzentrationsgradienten ein. Daher gilt für eine Folie mit der Dicke d mit verschiedenen Konzentrationen an den zwei verschiedenen Oberflächen (c_1 für $x=0$ und c_2 für $x=d$) folgender Zusammenhang (Piringer, 1993, Barrer, 1941):

Gleichung 4: Stoffflussdichte im stationären Zustand

Stoffflussdichte	Symbol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
$J = D \cdot \frac{c_1 - c_2}{d} = \text{konst.}$	J	Stoffflussdichte	[mol/(m ² ·s)]
	D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
	c_1	Permeantkonz. an Oberfläche 1	[mol/m ³]
	c_2	Permeantkonz. an Oberfläche 2	[mol/m ³]
	d	Dicke der Polymerschicht	[m]

Crank (1975) leitete aus den Fickschen Gesetzen folgende Näherungsgleichung für die Absorptionsgeschwindigkeit ab.

Gleichung 5: Näherungsgleichung für die sorbierte Stoffmenge in Abhängigkeit von der Zeit nach Crank (1975)

Näherungsgleichung nach Crank	Symbol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
$\frac{m_t}{m_\infty} = \frac{4}{\sqrt{\pi}} \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t}{d^2}}$	m_t	Masse absorbiertes Substanz im Polymer zum Zeitpunkt t	[g]
	m_∞	Masse absorbiertes Substanz im Polymer im Gleichgewicht	[g]
	D	Diffusionskoeffizient	[m ² /s]
	d	Foliendicke	[m]

Mit Gleichung 5 lassen sich Diffusionskoeffizienten durch Sorptionsexperimente ermitteln (vgl. 4.3.4.3).

3.2.1.3 Resultierendes Permeationsgesetz

Der Zusammenhang der Permeation, der Löslichkeit und der Diffusion ist für ein homogenes Material über den Permeationskoeffizienten P definiert (vgl. Gleichung 6) (Van Krevelen und Te Nijenhuis, 2009, Barrer, 1941). Der Permeationskoeffizient ist eine von der Foliendicke d unabhängige Größe, also eine intrinsische Materialeigenschaft. Diese ist abhängig von der Temperatur und der permeierenden Substanz. P ist das Produkt aus dem Löslichkeitskoeffizient S und dem Diffusionskoeffizient D , falls D und S konzentrationsunabhängig sind (Miller und Krochta, 1997, Barrer, 1941).

Gleichung 6: Permeationskoeffizient P für homogenes Material (Miesbauer et al., 2008)

Permeationskoeffizient	Symbol	Bezeichnung	Einheit (z.B.)
$P = D \cdot S$	P	Permeationskoeffizient	[mol/(m s Pa)]

Häufig wird der Permeationskoeffizient für Gase in cm³(STP)·µm/(m²·d·bar) und für Wasserdampf in g·µm/(m²·d) angegeben (Menges et al., 2002). Der Permeationskoeff-

fizient steigt mit steigender Temperatur und kann für die meisten Polymere und über große praxisrelevante Temperaturbereiche durch folgenden Arrhenius-Ansatz dargestellt werden (Bleisch et al., 2014, Arrhenius, 1889).

Gleichung 7: Arrhenius Gleichung

Arrhenius Gleichung	Symbol	Bezeichnung	Einheit (z.B.)
$P = P_0 \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$	P	Permeationskoeffizient	[cm ³ (STP) μm / (m ² d bar)]
	P_0	Konstante	[cm ³ (STP) μm / (m ² d bar)]
	E_A	Aktivierungsenergie	[J/mol]
	R	Universelle Gaskonstante	[J/(K·mol)]
	T	Temperatur	[K]

Gleichung 7 kann für Polymere angewendet werden, welche sich in einem bestimmten morphologischen Zustand befinden. Der amorphe Teil von Polymeren befindet sich unterhalb der Glasübergangstemperatur T_g im Glaszustand. Oberhalb der T_g befinden sie sich im gummielastischen Bereich. Sothornvit et al. (2002) ermittelten die T_g von reinen sowie mit Sorbitol und Glycerol weichgemachten β-Lactoglobulin Folien. Sie postulieren eine T_g von -47 bis -45 °C ohne signifikante Einflüsse der Lagerfeuchte, Weichmacherart und Weichmacherkonzentration auf T_g . Es kann daher davon ausgegangen werden, dass sich weichgemachte Molkenproteinisolat-basierte Folien und Beschichtungen, wie sie im Rahmen dieser Dissertation hergestellt und charakterisiert werden, sich deutlich oberhalb von T_g befinden.

Bei Löslichkeits- und Diffusionskoeffizienten bestehen ähnliche Abhängigkeiten. (McKeen, 2012) Die Anwesenheit anderer Substanzen (z.B. H₂O) können die Permeationskoeffizienten von Polymeren beeinflussen, wenn diese sich in signifikanter Konzentration im Polymer lösen. Dies kann zu strukturellen Veränderungen im Polymer führen. So nimmt z.B. bei polaren Polymeren der Permeationskoeffizient bei steigender relativer Luftfeuchtigkeit zu, da die Polymerstruktur aufgrund der starken Wechselwirkungen zwischen Polymer und Wasser aufgeweitet wird. (Bleisch et al., 2014)

Um die Permeationseigenschaften einer vorliegenden Polymerprobe zu beschreiben, wird die Durchlässigkeit Q verwendet (Langowski, 2008).

Gleichung 8: Durchlässigkeit Q (Langowski, 2008)

Durchlässigkeit	Symbol	Bezeichnung	Einheit (z.B.)
$Q = P/d$	Q	Durchlässigkeit	[mol/(m ² s Pa)]

Die Durchlässigkeit Q wird auch in unterschiedlichen Einheiten angegeben. In der technischen Praxis wird als Maß der Substanzmenge für bei Raumtemperatur gasförmige Substanzen (z.B. O₂, CO₂, N₂) das Volumen unter Normalbedingungen (STP) verwendet. Hierbei wird das Durchlässigkeitsverhältnis zwischen verschiedenen Sub-

stanzen nach Yasuda und Lamaze (1971) Permselectivität genannt. Bei Substanzen, bei denen Flüssigkeit und Dampfphase im Gleichgewicht stehen (z.B. H₂O), wird nicht das Volumen, sondern die Masse eingesetzt. Daher werden auch in der vorliegenden Dissertation die Einheiten für die Durchlässigkeit Q von Gasen in $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2 \text{ d bar})$ und für Wasserdampf in $\text{g}/(\text{m}^2 \text{ d bar})$ verwendet.

Der Permeationskoeffizient kann, wie häufig verwendet, auch nach Gleichung 8 in der Form der Durchlässigkeit Q auf eine Dicke von 100 μm Schichtdicke normiert und als Q_{100} -Wert ausgedrückt werden (vgl. Gleichung 9).

Gleichung 9: Durchlässigkeit Q normiert auf 100 μm Schichtdicke

Stand. Durchlässigkeit	Symbol	Bezeichnung
$Q_{100} = Q \cdot \left(\frac{d}{100}\right)$	Q_{100}	Durchlässigkeit (Permeabilität) normiert auf 100 μm Schichtdicke

Bei Mehrschichtverbundfolien aus unterschiedlichen Polymeren mit den Permeationskoeffizienten P_i und den Dicken d_i gilt für die Gesamtdurchlässigkeit Q_{ges} des Verbundes Gleichung 10 (Langowski, 2005, Barrer, 1941, Lee et al., 2008a, Crank, 1975):

Gleichung 10: Durchlässigkeit Q_{ges} für Mehrschichtverbundfolien auf polymerer Basis

Durchlässigkeit polymerer Mehrschichtverbundfolien	Symbol	Bezeichnung
$\frac{1}{Q_{ges}} = \sum_i \frac{d_i}{P_i} = \frac{1}{Q_1} + \frac{1}{Q_2} + \frac{1}{Q_3} + \dots + \frac{1}{Q_n}$	Q_{ges}	Durchlässigkeit Verbundfolie
	Q_n	Durchlässigkeit Monoschicht
	P_i	Permeationskoeff. Monoschicht
	d_i	Schichtdicke Monoschicht

Unter Verwendung von Gleichung 10 kann nach entsprechender Umstellung die Durchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen bei zwei oder Mehrschichtverbunden berechnet werden (Hong und Krochta, 2003). Dies ist eine Möglichkeit, die Durchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen zu ermitteln, die untrennbar mit dem beschichteten Substrat verbundenen sind. Hierfür wird die Durchlässigkeit des unbeschichteten Substrats und ggf., bei Verbunden aus mehr als zwei Komponenten, die Durchlässigkeiten weiterer Monoschichten sowie die Durchlässigkeit des Gesamtverbundes gemessen. Somit kann die Durchlässigkeit unter Verwendung von Gleichung 10 nach entsprechender Umstellung berechnet werden.

3.2.1.4 Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit

Die Sauerstoffdurchlässigkeit ist besonders für Polymer-basierte Verpackungen zur Anwendung bei sauerstoffempfindlichen Produkten eine wichtige verpackungsrelevante Eigenschaft. Zur Quantifizierung der permeierenden Sauerstoffmenge durch Folien und Beschichtungen wird üblicherweise die Sauerstofftransmissionsrate OTR (Oxygen

Transmission Rate) gemessen, aus der der Sauerstoffpermeationskoeffizient P_{O_2} errechnet werden kann (Hong und Krochta, 2003).

Gleichung 11: Sauerstoffpermeationskoeffizient P_{O_2} (Mehyar und Han, 2004)

O ₂ -Permeationskoeff.	Symbol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
	P_{O_2}	O ₂ -Permeationskoeff.	[(cm ³ (STP) μm)/(m ² d bar)]
	OTR	O ₂ -Transmissionsrate	[(cm ³ (STP))/(m ² d)]
$P_{O_2} = \frac{OTR}{p_1 - p_2} \cdot d$	$p_1 - p_2$	Partialdruckdifferenz zwischen zwei Folien-seiten	[bar]
	d	Foliendicke	[μm]

Die Wasserdampfdurchlässigkeit von Packmitteln wird stark durch die Eigenschaften der verwendeten Polymere beeinflusst. Hierzu zählen u.a. die Polarität, Orientierung und Kristallisationsgrad (Jenkins und Harrington, 1992). Wenn das Henrysche Gesetz Gültigkeit hat, kann die Wasserdampfpermeationsrate (water vapour transmission rate, *WVTR*) experimentell bestimmt und dann der Wasserdampfpermeationskoeffizient P_{H_2O} nach Gleichung 12 berechnet werden.

Gleichung 12: Wasserdampfpermeationskoeffizient P_{H_2O} (Mehyar und Han, 2004)

Wasserdampfpermeationskoeffizient	Sym-bol	Bezeichnung	Übliche Einheit (z.B.)
	P_{H_2O}	Wasserdampfpermeationskoeffizient	[(g μm)/(m ² d bar)]
	$WVTR$	Wasserdampftransmissionsrate	[g/(m ² d)]
$P_{H_2O} = \frac{WVTR}{p_1 - p_2} \cdot d$	$p_1 - p_2$	Partialdruckdifferenz zwischen zwei Folien-seiten	[bar]
	d	Foliendicke	[μm]

Wie bereits erwähnt, variieren die Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeiten verschiedener Polymere aufgrund einer Vielzahl an unterschiedlichen intrinsischen Eigenschaften teilweise um mehrere Größenordnungen (vgl. Abbildung 10). Dies ist einer der ausschlaggebenden Gründe dafür, warum oft Mehrschichtverbundfolien als Packmittel für sensible Lebensmittel verwendet werden. Durch die Kombination der jeweiligen Eigenschaften der verwendeten Polymere können Verbundfolien mit für das Packgut maßgeschneiderten Permeationseigenschaften hergestellt werden. Abbildung 10 zeigt die auf 100 μm Foliendicke standardisierte Durchlässigkeit Q_{100} unterschiedlicher Polymere.

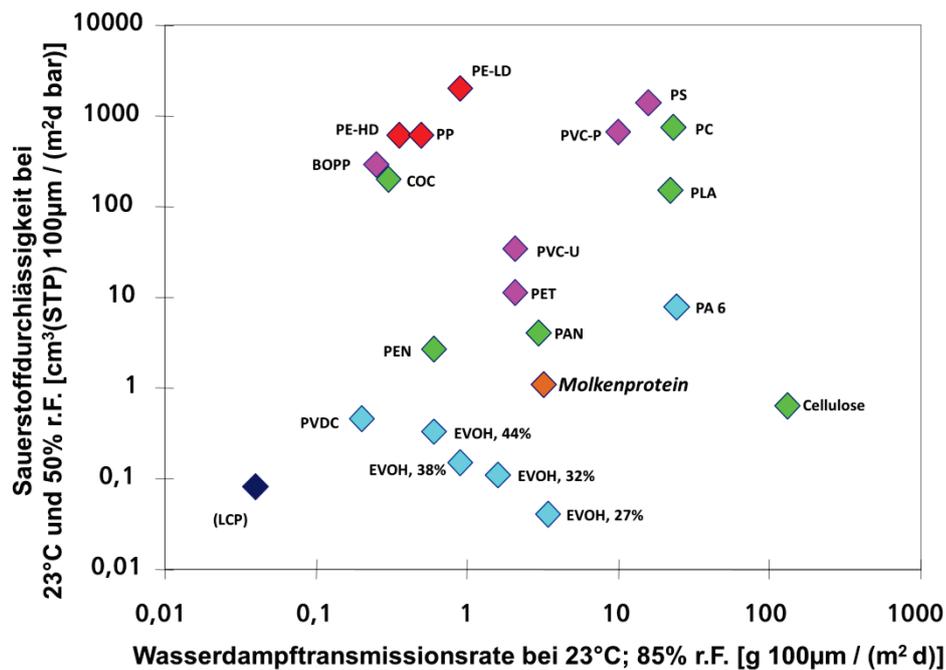


Abbildung 10: Normierte Sauerstoffdurchlässigkeit und normierte Wasserdampftransmissionsrate unterschiedlicher Polymere adaptiert aus Langowski (2008) und Molkenprotein: Stand der Technik zu Beginn dieser Arbeit (Schmid et al., 2012).

Auch aus ökonomischen Gründen ist die Kombination von unterschiedlichen Polymeren zu Mehrschichtverbundfolien, trotz des größeren Herstellungsaufwandes im Vergleich zu Monofolien, durchaus sinnvoll. Dies wird deutlich, wenn man sich vor Augen hält, dass sich die Durchlässigkeiten der unterschiedlichen Polymere oft um mehrere Größenordnungen, aber die Polymerpreise in €/m³ sich nur um bis zu Faktor sechs (Endres und Siebert-Raths, 2011), unterscheiden. Da laut Gleichung 10 (S. 24) die jeweiligen Komponenten mit der geringsten Durchlässigkeit die Gesamtdurchlässigkeit limitieren, und aufgrund des umgekehrt proportionalen Zusammenhanges zwischen Durchlässigkeit und Schichtdicke (vgl. Gleichung 8, S. 23), können so kosteneffiziente Mehrschichtverbundfolien gestaltet werden. Dieses Prinzip gilt auch bei der Verwendung von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Mehrschichtverbundfolien. In den EU-Projekten Wheylayer (2008-2011; Grant Agreement Nummer (GA-Nr.): 218340-25), Wheylayer 2 (2012-2014; GA-Nr.: 315743) und ThermoWhey (2014-2016; GA-Nr.: 13-3-005) wurden unter Mitwirkung des Autors Mehrschichtverbundfolien mit Molkenprotein-basierten Beschichtungen bis zum industriellen Demonstrator entwickelt (Schmid et al., 2012, Bugnicourt et al., 2013, Schmid et al., 2013b, Stähler und Schmid, 2016). Die Molkenprotein-basierte Schicht fungiert hierbei als Ersatz für das üblicherweise in Mehrschichtverbundfolien als Sauerstoffbarriere eingesetzte EVOH (vgl. Abbildung 10). Im Gegensatz zur vorliegenden Dissertation, welche sich mit der Beantwortung von grundlegenden Fragestellungen zu Rezeptur-Prozess-Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen beschäftigt, stand bei den genannten Projekten die Entwicklung möglichst kosteneffizienter Molkenprotein-basierter Formulie-

rungen im Vordergrund, welche sich auf industriellen Lackier- und Kaschieranlagen verarbeiten lassen und marktrelevante Eigenschaften aufweisen (Schmid et al., 2012, Schmid et al., 2013b, Cinelli et al., 2014, Bugnicourt et al., 2013). Hierbei spielen Lebensmittelverpackungsrechtliche Aspekte eine entscheidende Rolle, welche nachfolgend kurz erläutert werden.

Molkenprotein ist eine sehr vielseitig einsetzbare Lebensmittelzutat. Als solche sind Molkenproteine aus rechtlicher Sicht prinzipiell geeignet, um als essbare Überzüge mit Lebensmittel direkt in Kontakt zu kommen oder als Zutat in Lebensmitteln verarbeitet zu werden (Onwulata und Huth, 2008). Für den Einsatz als Lebensmittelverpackung müssen auch Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen die Anforderungen der Verordnung (EU) Nr. 10/2011 über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen, erfüllen. Nach Bugnicourt et al. (2013) erfüllen Mehrschichtverbundfolien, bei denen eine Molkenproteinisolat-basierte Barrierschicht im Inneren der Verbundfolie vorhanden ist, die Anforderungen der Verordnung (EU) Nr. 10/2011. Auch flexible Folien, Tubenlamine und daraus hergestellte Tuben sowie Blister, die unter dem eingetragenen Markennamen WHEYLAYER[®] vertrieben werden sollen, sind nach Angaben der Markeninhaber für den Einsatz mit Lebensmitteln nach Verordnung (EU) Nr. 10/2011 geeignet (Zeme, 2014).

3.2.2 Mechanische Eigenschaften

Mechanische Beanspruchungen, die während der Herstellung und dem Gebrauch einer Verpackungen auftreten, können zu einer Beschädigung der Verpackung und damit zu einer potentiellen Schädigung des Füllgutes führen (Bergmair et al., 2004, Buchner, 1999). Kennwerte, die auf die mechanischen Eigenschaften und die daraus resultierende Anwendungsbereiche einer Folie schließen lassen, sind die Zugfestigkeit σ_m , die Bruchdehnung ε_b und das Elastizitätsmodul (E-Modul) E (Shah et al., 2017). Ziel bei der Herstellung von Folien ist dabei eine möglichst hohe Zugfestigkeit und Bruchdehnung, da es bei einer Überschreitung der maximalen Zugfestigkeit und Bruchdehnung zum Abriss der Folie kommt. Während des Gebrauchs können diese Beschädigungen zum Verlust der Barriereigenschaften des Packmittels führen. Die Zugfestigkeit und Bruchdehnung sind oft gegenläufig (Bergmair et al., 2004).

Die mechanischen Kennwerte können mittels Zugversuche nach DIN EN ISO 527 ermittelt werden. Hierbei wird eine Probe mit einer definierten Anfangsfläche A_0 und mit einer definierten Kraft F bis zum Bruch belastet. Es wird die Spannung σ und Dehnung ε berechnet und in einem Spannungs-Dehnungsdiagramm aufgetragen (Bergmair et al., 2004). Die Spannung ist durch folgende Gleichung definiert:

Gleichung 13: Mechanische Spannung σ

Spannung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\sigma = \frac{F}{A_0}$	σ	Spannung	[N·m ⁻²]
	F	Kraft	[N]
	A_0	Anfangsfläche	[m ²]

Die Dehnung als dimensionslose Zahl ist durch Gleichung 14 definiert.

Gleichung 14: Dehnung ε

Dehnung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\varepsilon = \frac{\Delta L}{L_0}$	ε	Dehnung	[-]
	ΔL	Längenänderung	[m]
	L_0	ursprüngliche Länge	[m]

In der Norm DIN EN ISO 527-1 sind die Zugeigenschaften von Kunststoffen unter festgelegten Bedingungen definiert. Als Zugfestigkeit σ_m versteht man die Spannung beim ersten Spannungsmaximum im Zugversuch (vgl. Abbildung 11). Sie wird aus der ersten maximal erreichten Zugkraft, bezogen auf den ursprünglichen Querschnitt der Probe, errechnet. Die Zugfestigkeit wird in der Einheit N/mm² oder MPa angegeben. Die Zugfestigkeit kann die Spannung sein, bei der die Probe zu fließen beginnt oder bricht und ist durch Gleichung 15 definiert:

Gleichung 15: Zugfestigkeit σ_m

Zugfestigkeit	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\sigma_m = \frac{F_{max.}}{A_0}$	$F_{max.}$	Max. Kraft	[N]
	A_0	Ausgangsfläche	[mm ²]
	σ_m	Zugfestigkeit	[MPa = N/mm ²]

Als Bruchdehnung ε_b ist die maximale Dehnung eines Körpers, bis es zum Bruch kommt, definiert (Nentwig, 2006). Nach DIN EN ISO 527-1 ist ε_b der zuletzt aufgezeichnete Dehnungswert, bevor ein Spannungsabfall auf $\leq 10\%$ des Festigkeitswerts erfolgt.

Gleichung 16: Bruchdehnung ε_b

Bruchdehnung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\varepsilon_b = \frac{L_b - L_0}{L_0}$	L_b	Länge beim Bruch	[mm]
	L_0	Anfangslänge	[mm]
	ε_b	Bruchdehnung	[-]

Durch Auftragung der Spannungen σ und Dehnungen ε während des Prüfverlaufs im Spannungs-Dehnungsdiagramm, kann das Elastizitätsmodul E (E-Modul oder Zugmodul) eines Materials bestimmt werden. Es ist definiert als die Steigung der Spannungs-Dehnungskurve $\sigma(\varepsilon)$ innerhalb der ε -Werte 0,05 und 0,25 %. Die Messgeschwindigkeit für die Bestimmung des E-Moduls E erfolgt nach DIN EN ISO 527-1 bei 0,5 % L_0 /min (vgl. Kapitel 4.3.2). Es hat die Einheit MPa und ist über folgende Gleichung definiert:

Gleichung 17: Elastizitätsmodul E

Elastizitätsmodul	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$E = \frac{\sigma_2 - \sigma_1}{\varepsilon_2 - \varepsilon_1}$	σ_1, σ_2	Spannungen bei Dehnung 1, 2	[MPa]
	$\varepsilon_1, \varepsilon_2$	Dehnungen 1, 2	[-]
	E	E-Modul	[MPa]

Das Elastizitätsmodul ist ein Maß für die Steifigkeit eines Werkstoffs. Das Elastizitätsmodul ist umso größer, je mehr Widerstand ein Material seiner elastischen Verformung entgegensetzt (Arnold, 2013). Nach DIN EN ISO 527-1 wird ein Werkstoff als steif bezeichnet, wenn das Zug-Elastizitätsmodul über 700 MPa liegt. Als halbsteif wird es bezeichnet, wenn das Zug-Elastizitätsmodul Werte zwischen 70 und 700 MPa aufweist. Proteinbasierte Folien können sowohl in die Kategorie steif als auch halbsteif eingeteilt werden. Je nach Proteinherkunft, Formulierung und Herstellungsart kann das E-Modul dieser Folien sowohl zwischen 70 und 700 MPa als auch über 700 MPa liegen (Schmid et al., 2015b, Coltelli et al., 2016). Abbildung 11 zeigt dieses Verhalten an typischen Spannungs-Dehnungskurven von Polymeren. Die hier nicht definierte Symbole sind für die vorliegende Dissertation nicht relevant.

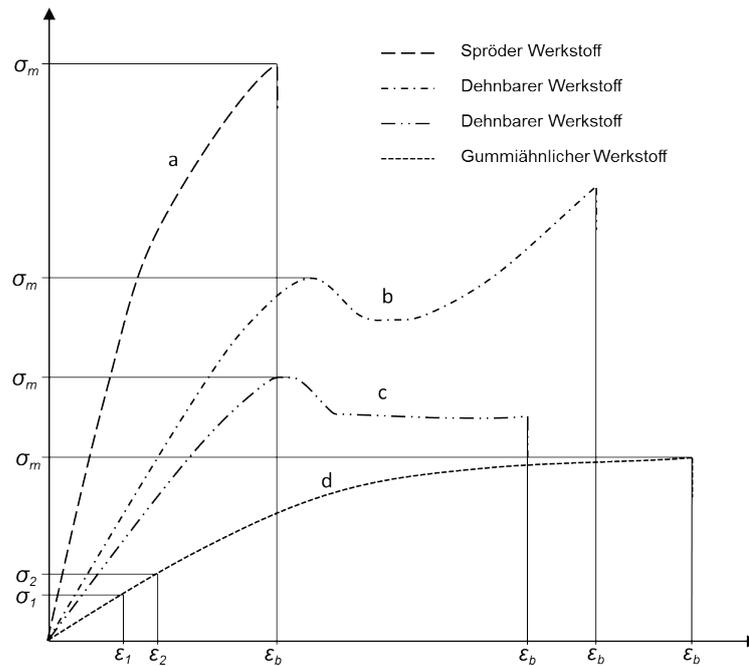


Abbildung 11: Typische Spannungs-Dehnungskurven von Polymeren adaptiert nach DIN EN ISO 527-1

Der lineare Anstieg zu Beginn des Spannungs-Dehnungsdiagramms wird als Hookesche Gerade bezeichnet (Arnold, 2013, Askeland et al., 2011). Während des linearen Verlaufs ist die Formänderung des Prüfkörpers reversibel. Im Anschluss kommt es zur plastischen, irreversiblen Verformung (Ehrenstein, 1999). Der senkrechte Abfall der Kurve stellt den Bruch des Materials dar und wird in Abbildung 11 mit dem Index b dargestellt. Kurve (a) entspricht sprödem Material mit niedrigen Dehnungswerten ε , wobei keine Streckgrenze erreicht wird. Kurve (d) hingegen entspricht gummiartigem Material mit höheren Dehnungswerten ε . Kurven (b) und (c) zeigen dehnbares Material, wobei (b) härter ist als (c). Molkenproteinisolat-basierte Folien mit entsprechendem Weichmachergehalt zeigen einen Spannungs-Dehnungskurvenverlauf, der dem gummiähnlicher Werkstoffe entspricht (Anker et al., 1998).

3.2.3 Oberflächenenergie

Ergänzend zu den in den vorherigen Kapiteln beschriebenen verpackungsrelevanten Eigenschaften wird in diesem Kapitel die Oberflächenenergie von Folien und Beschichtungen, welche zur Interpretation der erarbeiteten Ergebnisse von Nutzen ist, beschrieben.

In Flüssigkeiten und Festkörpern wirken Kohäsionskräfte, welche in Oberflächennähe eine nach innen gerichtete Kraft bewirken. Um die Flächeneinheit einer neuen Oberfläche zu erzeugen, muss eine Arbeit verrichtet werden. Somit ergibt sich die Oberflächenenergie σ_s , aus dem Verhältnis der zur Oberflächenvergrößerung dA benötigten Arbeit dW zur Oberflächenänderung dA (Gleichung 18).

Gleichung 18: Oberflächenenergie

Oberflächenenergie	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\sigma_s = \frac{dW}{dA} = \sigma_p + \sigma_d$	dW	Arbeit	[J]
	dA	Oberflächenänderung	[m ²]
	σ_s	Oberflächenenergie Festkörper	[J/m ²]/[mN/m]

Die Oberflächenenergie σ_s kann als messbare Größe für die Summe der Bindungskräfte an einer Oberfläche angesehen werden und setzt sich aus einem polaren σ_p und einem dispersen σ_d Anteil zusammen. Als Ursache für die polaren Kräfte werden durch die unterschiedlichen Elektronegativitäten der Atome eines Moleküls und die sich dadurch ergebenden permanenten Dipole, sog. Keesom- und Debye-Wechselwirkungen, betrachtet. Dispersionskräfte sind zwischen allen Molekülen vorhanden und werden durch temporär unsymmetrische Ladungsverteilungen verursacht, sog. Londonsche Kräfte. (Lake, 2009, Schäfer, 2012)

Zur Messung der Oberflächenenergie werden u.a. Kontaktwinkelmessgeräte bzw. Randwinkelmessgeräte eingesetzt. Hierbei werden unterschiedliche Flüssigkeiten bekannter Oberflächenspannung σ_l eingesetzt. Young (1805) stellte den Zusammenhang zwischen dem Kontaktwinkel α und dem Verhältnis der Oberflächenspannung der flüssigen Phase σ_l und der Oberflächenenergie der festen Phase σ_s her (Gleichung 19).

Gleichung 19: Youngsche Gleichung (Lake, 2009)

Youngsche Gleichung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l \cdot \cos \alpha$	σ_s	Oberflächenenergie Festkörper	[J/m ²]/[mN/m]
	σ_l	Oberflächenspannung Flüssigkeit	[m ²]
	σ_{sl}	Grenzflächenspannung	[J/m ²]/[mN/m]
	α	Kontaktwinkel	[°]

Durch Anwendung der Owens-Wendt-Rabel-Kaelble Methode (OWRK-Methode), welche die Grenzflächenspannung aus den molekularen Wechselwirkungen zwischen den Phasen ableitet, lässt sich so die Oberflächenspannung sowie deren polarer und disperser Anteil eines Festkörpers ermitteln. (Owens und Wendt, 1969, Kaelble und Moacanin, 1977). Hierbei gilt grundsätzlich, dass eine Erhöhung der molekularen Wechselwirkungen an der Grenzfläche zu niedrigeren Grenzflächenspannungen führt. (Schäfer, 2012).

Für Beschichtungs- und Kaschierprozesse ist die Kenntnis der Oberflächenenergie von entscheidender Bedeutung, da die Benetzbarkeit von Substratoberflächen eine Grundvoraussetzung für haftfeste Beschichtungen ist. Nach Fox und Zisman (1950) gilt, dass für eine gute Benetzung der Substratoberfläche die Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_l kleiner oder gleich der Oberflächenenergie σ_s des Substrats sein muss. Wasser-basierte Formulierungen (wie z.B. Molkenprotein-basierte Formulierungen), haben

oft eine vergleichsweise hohe Oberflächenspannung, was durch den ausgeprägten Dipol-Charakter von Wasser und der damit einhergehenden starken Attraktionskräfte erklärt werden kann (Nanetti, 2016). Durch die Ermittlung der Oberflächenenergie sowie deren polaren und dispersen Anteils, können Abschätzungen über die Beschaffenheit der Oberflächenchemie eines Festkörpers sowie über das Adhäsionspotential unterschiedlicher Beschichtungsmaterialien auf dem Festkörper getroffen werden. (Schäfer, 2012)

3.3 Molekulare Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Die Bestimmung und Quantifizierung molekularer Wechselwirkungen in Protein-basierten Formulierungen (Lösungen) und daraus hergestellter Folien und Beschichtungen (vgl. Kapitel 3.1.4.1) kann mittels unterschiedlicher analytischer Methoden erfolgen. Eine Auswahl dieser Methoden, welche in der wissenschaftlichen Literatur zur Bestimmung und Quantifizierung von molekularen Wechselwirkungen bei Sojaprotein-, Weizengluten-, und Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen verwendet wurden, werden in einem wissenschaftlichen Übersichtsaufsatz von Hammann und Schmid (2014) erörtert und zusammengefasst. Hierbei kann in Analyse der Formulierungen (Proteinlösungen) und Analyse der Protein-basierten Folien bzw. Beschichtungen sowie jeweils in qualitative und quantitative Analysen unterschieden werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Auswahl qualitativer und quantitativer Analysemethoden zur Bestimmung von molekularen Wechselwirkungen in Protein-basierten Formulierungen, Folien und Beschichtungen (Hammann und Schmid, 2014)

Zustand	Qualifizierung	Quantifizierung
Lösung	SDS-Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) SEC (Size exclusion chromatography) Röntgenstreuung (X-ray scattering)	-
Folie/ Beschichtung	Spektroskopische Untersuchungen Röntgenbeugung (X-ray diffraction) Löslichkeitsuntersuchung	Quellversuche Löslichkeitsuntersuchung

Insgesamt konnten mehr angewendete Methoden zur Qualifizierung als zur Quantifizierung der molekularen Wechselwirkungen in Protein-basierte Formulierungen, Folien und Beschichtungen gefunden werden. Zur Quantifizierung des Vernetzungsgrades und der Quervernetzungsichte von festen Folien und Beschichtungen erwiesen sich Quellversuche als geeignet, welche in Kapitel 3.3.2 näher beschrieben werden. Als

vielversprechendste Methode zur Qualifizierung der intermolekularen Wechselwirkungen in Protein-basierten Folien und Beschichtungen stellten sich Löslichkeitsuntersuchungen mit spezifisch spaltenden Puffersystemen und anschließendem Bradford-Assay heraus. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass sie zudem an festen Folien und Beschichtungen angewendet werden kann. (Hammann und Schmid, 2014). Die theoretischen Grundlagen zu dieser Methode werden nachfolgend näher beschrieben.

3.3.1 Bestimmung molekularer Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen aus nativen Proteinen sind über einen großen Bereich von Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur und ionische Bedingungen in Wasser löslich (Perez-Gago et al., 1999), da viele hydrophobe Gruppen im Inneren der Tertiärstruktur des Proteins verborgen sind und somit keine kovalenten intermolekularen Wechselwirkungen, wie z.B. Disulfidbrückenbindungen, ausgebildet werden können. Hitzedenaturierte Molkenproteinfolien sind im Gegensatz dazu nahezu unlöslich, mit Ausnahme der verwendeten hydrophilen Weichmacher sowie nicht vernetzter niedermolekularer Peptide und freier Aminosäuren. Durch die in Kapitel 3.1.6 ausführlich beschriebene Denaturierung von Molkenproteinen kommt es zu einer Umstrukturierung der Tertiärstruktur des Proteins. Hierbei werden freie, im Inneren verborgene Thiolgruppen zugänglich gemacht und können andere Thiolgruppen oxidieren, um kovalente Disulfidbrückenbindungen auszubilden. Zudem können die freien Thiolgruppen mit anderen Disulfidbrückenbindungen wechselwirken. Durch diese Polymerisationsreaktionen werden Aggregate gebildet, wobei die eigentliche Folienbildung als eine Konzentrierung dieser Aggregate sowie deren kovalente Vernetzung über Disulfidbrückenbindungen beschrieben wird. In Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen stehen auch nach einer vollständigen Proteindenaturierung noch freie reaktive Thiolgruppen für eine Quervernetzung zur Verfügung. (Perez-Gago und Krochta, 2001, Floris et al., 2008)

Eine vollständige Löslichkeit denaturierter Molkenprotein-basierter Folien und Beschichtungen wird allerdings erst durch das Spalten aller intermolekularen Wechselwirkungen erreicht. Die Proteinlöslichkeitsstudie bzw. -untersuchung macht sich diesen Umstand zu Nutze, um qualitative und semiquantitative Aussagen über die beteiligten intermolekularen Wechselwirkungen treffen zu können. Hierbei basiert das Vorgehen auf der Lösung der Folien und Beschichtungen durch Anwendung unterschiedlicher Lösungsmittel (Puffersysteme mit spezifisch spaltenden Reagenzien). Das jeweilige Reagens spaltet dabei spezifisch molekulare Wechselwirkungen. Nach Liu und Hsieh (2008) können die in Tabelle 4 aufgeführten Reagenzien spezifisch verschiedene Wechselwirkungsarten (Bindungen) spalten.

Tabelle 4: Wechselwirkungsarten und Reagenzien, die spezifische Wechselwirkungen spalten (Liu und Hsieh, 2008)

Wechselwirkungstyp	Spezifische Wechselwirkung	Spaltendes Reagenz
kovalent	Disulfidbrückenbindungen	Oxidierende oder reduzierende Agenzien, wie Perjodsäure, Dithiothreitol (DTT), 2-Mercaptoethanol, Natriumsulfite
nicht-kovalent	Wasserstoffbrückenbindungen	Stark Wasserstoff-bindende Agenzien, wie Urea, Dimethylformamid, Thiourea, Natriumdodecylsulfat (SDS)
nicht-kovalent	hydrophobe Wechselwirkungen	Ionische und nicht-ionische Agenzien, wie SDS, Thiourea,
nicht-kovalent elektrostatisch	sauer hydrophil alkalisch hydrophil	Saure, alkalische oder salzige Lösungen, wie Salzsäure (HCl), Natronlauge (NaOH), Natriumchlorid (NaCl)

Proteinlöslichkeitsstudien zur Bestimmung der molekularen Wechselwirkungen in Proteinfolien beginnen mit der Herstellung einer gepufferten Lösung aus allen Reagenzien, um alle zu untersuchenden molekularen Wechselwirkungen zu spalten. Anschließend werden Puffersysteme hergestellt, bei denen ein oder mehrere Reagenzien nicht eingesetzt werden und die resultierende Löslichkeit wird mit der Löslichkeit der alle Reagenzien enthaltenden Pufferlösung abgeglichen. Dadurch können Rückschlüsse auf die in den Folien und Beschichtungen involvierten Protein-Protein-Wechselwirkungen gezogen werden (Liu und Hsieh, 2008). Diese Vorgehensweise bei Proteinlöslichkeitsuntersuchungen machten sich bereits mehrere Forschergruppen zu Nutze und bestätigten die Eignung dieser Methode zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen in Protein-basierten Folien und Beschichtungen (Shimada und Cheftel, 1989, Guckian et al., 2006, Liu und Hsieh, 2008, Ciannamea et al., 2015) und wird daher im Rahmen dieser Dissertation adaptiert und angewendet (siehe Kapitel 4.4).

3.3.2 Vernetzungsgrad und -dichte in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen

Zur Quantifizierung des Vernetzungsgrades und der Vernetzungsdichte von festen Folien und Beschichtungen erwiesen sich Quellversuche als geeignet (Perez-Gago und Krochta, 2001, Hammann und Schmid, 2014). Nachfolgend werden die theoretischen Grundlagen dieser Methode erläutert.

Allgemein versteht man unter Quellen die Veränderung von Volumen und Form eines Feststoffes durch die Einflüsse von Flüssigkeiten, Dämpfen oder Gasen (Gröngröft, 2016). Dieser Prozess kann in reversible und irreversible Quellung unterteilt werden. Die irreversible Quellung ist dabei durch eine Steigerung des Volumens und eine unvollständige Drainage nach dem Entfernen des Quellmediums gekennzeichnet (Nakai und Modler, 1996). Wird die Quellung nicht begrenzt (z.B. zeitlich), kann das Polymer in eine Suspension übergehen oder verbleibt bei Begrenzung der Quellung kohärent (Kocher, 2005). Während des Quellprozesses kommt es durch den Einfluss des Lö-

sungsmittels zu einer Steigerung des Abstandes zwischen den Polymerketten. Elastische Kräfte des Polymers wirken dem entgegen. Deshalb reagieren quervernetzte Polymer-Hydrogele in Kontakt mit Wasser oder anderen entsprechenden Lösungsmitteln mit einer Quellung, anstatt sich aufzulösen. Die Polymerketten werden mit zunehmendem Grad der Quellung (engl. degree of swelling – DoS) in die Länge gezogen, wobei die Entropie des gesamten Systems sinkt. Die Quelleigenschaften, die als DoS von Hydrogelen definiert werden, sind von der Netzwerkdicke, Lösungsmittelbeschaffenheit sowie den Lösungsmittel-Polymer-Wechselwirkungsparametern abhängig. (Peppas et al., 2010)

Der DoS ist nach DIN EN ISO 175 durch Gleichung 20 definiert.

Gleichung 20: Grad der Quellung - DoS nach DIN EN ISO 175

Grad der Quellung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\text{DoS} = \frac{m_2 - m_3}{m_3}$	m_2	Masse der gequollenen Folie	[g]
	m_3	Masse der Folie (ohne Quellmedium)	[g]

Der DoS ist ein relativer Wert und verhält sich umgekehrt proportional zum Grad der Quervernetzung bzw. Vernetzungsgrad (engl. degree of crosslinking –DoC). So nutzen Perez-Gago und Krochta (2001) die Ermittlung des DoS als Indikation für die Quervernetzung in thermisch behandelten Molkenprotein-basierten Folien. Auch bei Folien aus Gelatine wurde diese Methode angewendet, um die vernetzende Eigenschaft von Genipin zu untersuchen (Bigi et al., 2002).

Nach Ding et al. (1991) ist der DoC über Gleichung 21 definiert.

Gleichung 21: Vernetzungsgrad - DoC nach Ding et al. (1991)

Grad der Vernetzung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\text{DoC} = \frac{\overline{M}_0}{M_c}$	\overline{M}_0	Ø Molekulargewicht der Monomere	[g/mol]
	M_c	Ø Molekulargewicht des Polymers zwischen zwei Quervernetzungen	[g/mol]

Somit kann als \overline{M}_0 bei vernetzten Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen das durchschnittliche Molekulargewicht der enthaltenen Aminosäuren verwendet werden. Die Berechnung ist im Anhang I-a aufgeführt. M_c entspricht dem durchschnittlichen Molekulargewicht zwischen zwei Quervernetzungen. Somit weist M_c auch auf den Anteil, an bei der Quervernetzung involvierten Aminosäuren hin und ist damit eine veranschaulichende Größe. Unter Berücksichtigung der Aminosäurezusammensetzung der enthaltenen Molkenproteinfraktionen und deren Mengenverhältnissen kann mit den Daten aus Andrews (1978), de Wit (2009) und Töpel (2004) ein Molekulargewicht einer

durchschnittlichen Aminosäure (\overline{M}_0) mit 123,3 g/mol berechnet werden (Details siehe Anhang I-a).

Im Gegensatz zum Vernetzungsgrad DoC, bei dem es sich um einen Relativwert handelt, bezeichnet die Vernetzungsdichte (engl. crosslinking density – CLD) einen Absolutwert mit der Einheit mol/cm³ bzw. mol/g (Bezug über die Dichte). Es sind keine Veröffentlichungen zur CLD von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen bekannt. Die CLD für natürliches Gummi liegt bei $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/cm³ (Ahmed et al., 2012).

Die CLD ist nach Ahmed et al. (2012) und Marzocca (2007) durch Gleichung 22 definiert.

Gleichung 22: Vernetzungsdichte - CLD nach Ahmed et al. (2012) und Marzocca (2007)

Vernetzungsdichte	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$CLD = \frac{1}{M_C}$	CLD	Vernetzungsdichte	[mol/g]
	M_C	Ø Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen	[g/mol]

M_C kann mit Hilfe der oben beschriebenen Quellversuche unter Anwendung der Flory-Rehner-Gleichung (Gleichung 23) bestimmt werden (Isik und Kis, 2004, Favre et al., 1993, Valentín et al., 2008):

Gleichung 23: Flory-Rehner Gleichung (Isik und Kis, 2004, Favre et al., 1993, Valentín et al., 2008)

Flory-Rehner Gleichung	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$M_C = \frac{\rho_{WPI} \cdot V_2 \cdot \left(\varphi_1^{\frac{1}{3}} - \frac{\varphi_1}{2} \right)}{(\ln(1 - \varphi_1) + \varphi_1 + \chi + \varphi_1^2)}$	ρ_{WPI}	Dichte der Folie	[g/cm ³]
	V_2	Molvolumen dest. H ₂ O	[cm ³ /mol]
	φ_1	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel	[-]
	χ	Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ WPI mit H ₂ O	[-]
	M_C	Ø Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen	[g/mol]

Es kann angenommen werden, dass eine binäre Mischung aus Polymer (WPI-basierten Filmen) und Wasser vorliegt, da in den Filmen vorhandene hydrophile Weichmacher während des Quellprozess herausgelöst werden. Somit können diese bei der Berechnung vernachlässigt werden. Der Volumenanteil des Polymers (WPI) im gequollenen Gel kann somit wie folgt berechnet werden:

Gleichung 24: Polymer Volumenanteil Berechnung

Polymer Volumenanteil	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\varphi_1 = \frac{m_{WPI}}{\rho_{WPI} \left(\frac{m_{WPI}}{\rho_{WPI}} + \frac{m_S}{\rho_S} \right)}$	ρ_{WPI}	Dichte der WPI-Filme	[g/cm ³]
	m_{WPI}	Masse WPI im gequollenen Gel	[g]
	φ_1	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel	[-]
	ρ_S	Dichte des Lösemittels (H ₂ O)	[g/cm ³]
	m_S	Masse Lösungsmittel im gequollenen Gel	[g/mol]

Die durchschnittliche Dichte ρ_{WPI} der in dieser Arbeit verwendeten Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen lag bei $1,40 \pm 0,06$ g/cm³ und ist daher wie die tabellierte Dichte von Wasser bekannt (Schmid et al., 2014b). Somit kann φ_1 nach Gleichung 24 berechnet werden.

Der nun noch unbekanntes Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ stellt den Interaktionsparameter zwischen Lösungsmittel (hier: destilliertem Wasser) und Polymer (hier: WPI-basierten Folien und Beschichtungen) dar. Laut Peters et al. (2015) und Karimi et al. (2005) kann dieser Parameter über die Messung der Wasserdampfsorptionsisothermen unter Anwendung der Flurry-Huggins Gleichung bestimmt werden (Gleichung 25). Die Flory-Huggins Gleichung ist in ihrer vereinfachten Form wie folgt definiert (Flory, 1941, Huggins, 1941):

Gleichung 25: Flory-Huggins Gleichung (Flory, 1941, Huggins, 1941)

Symbol	Bezeichnung	Einheit
$\frac{\Delta\mu^{mix}}{RT} = \ln a_w = \ln(1 - \varphi_1) + \varphi_1 + \chi \cdot \varphi_1^2$		
$\Delta\mu^{mix}$	Unterschied des chemischen Potentials der Mischung aus WPI-basiertem Film und Wasser	[J/mol]
φ_1	Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel	[-]
χ	Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ WPI mit H ₂ O	[-]
R	Universelle Gaskonstante	[J/(mol K)]
T	Temperatur	[K]

Der Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ wird bestimmt, indem man die entsprechend angepasste Flory-Huggins-Gleichung mit der Kleinstquadratmethode an die gemessenen Wasserdampfsorptionsisothermen anpasst.

Der Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter verändert sich mit der Vernetzungsdichte (Marzocca et al., 2010). Laut McKenna et al. (1990) führt eine steigende Quer-

vernetzung zu einer Erhöhung des Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ bei Gummi.

Auf dem in diesem Kapitel zusammengefassten aktuellen Stand des Wissens aufbauend, zielt die vorliegende Dissertation darauf ab zu beantworten, inwiefern und in welchem Ausmaß

- das Ausgangsmolekulargewicht (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht),
- der Denaturierungsgrad (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad),
- die Transglutaminase-Quervernetzung (biochemische Vernetzung mittels TG bei der Verarbeitung bzw. Herstellung der Formulierungen) und
- die UV-Bestrahlung (Nachbehandlung / Quervernetzung der Folien durch UV-Strahlung)

die molekularen Wechselwirkungen sowie die physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat (WPI)-basierten Folien und Beschichtungen beeinflussen. Untersuchungen zu Eigenschaften wie Permselectivität und Aktivierungsenergie der Gaspermeation (N_2 , O_2 , CO_2), feuchteabhängige Sauerstoffpermeation und Nachvernetzungs kinetik sollen die Arbeit abrunden. Die hierfür verwendeten Methoden werden im nächsten Kapitel beschrieben.

4 Material und Methoden

Dieses Kapitel beschreibt die verwendeten Materialien, Geräte und Methoden, welche für das Verständnis dieser Arbeit notwendig sind. Darüber hinausgehende Detailinformationen können dem Kapitel 3 Grundlagen und Stand des Wissens entnommen werden.

In dieser Arbeit werden die Begriffe Folie und Beschichtung wie folgt definiert. Als Folie wird eine dünne alleinstehende Schicht, welche zum größten Teil aus Molkenprotein besteht und eine im Verhältnis zur Schichtdicke sehr große Oberfläche hat, bezeichnet. Diese Folien werden in dieser Arbeit durch das Gießverfahren (engl. Castfilm processing) hergestellt. Bei Beschichtungen handelt es sich um dünne Schichten, welche mit geeigneten Lackierverfahren auf einem Trägersubstrat aufgebracht werden. Die so entstandenen Beschichtungen gehen feste Verbindungen mit den Trägersubstraten ein und es entstehen Mehrschichtverbunde. Technisch bedingt, können durch nasschemische Lackierverfahren deutlich dünnere Schichten als durch das Gießverfahren hergestellt werden. Zur Beantwortung gewisser Fragestellungen ist es notwendig, sehr dünne Folien herzustellen, behandeln und charakterisieren zu können. Insbesondere zur Frage des Einflusses einer UV-Behandlung auf verpackungsrelevante Eigenschaften ist dies notwendig, da die Eindringtiefe von UV-Strahlen gering ist und deren Einfluss sonst nicht zur Modifizierung der Folien beitragen würde. Deshalb wurden auch Folien durch Lackierung auf einem Substrat hergestellt. Hierbei wurden die hergestellten Beschichtungen vom Trägersubstrat nachträglich wieder abgelöst. Wieder abgelöste Beschichtungen werden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als Folien bezeichnet (vgl. Kapitel 4.2.4.1).

4.1 Versuchsplan

Abbildung 12 stellt die unterschiedlichen Versuche und Analysen dar, welche zur Beantwortung folgender wissenschaftlichen Fragestellung (vgl. Kapitel 2) durchgeführt worden sind:

Inwiefern und in welchem Ausmaß beeinflusst das Ausgangsmolekulargewicht, der Denaturierungsgrad, die Transglutaminase-Quervernetzung und die UV-Bestrahlung die molekularen Wechselwirkungen sowie die physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat (WPI)-basierten Folien und Beschichtungen?

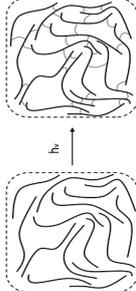
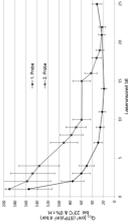
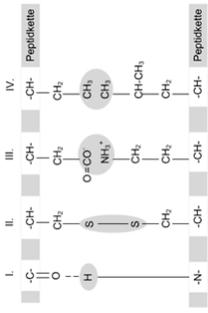
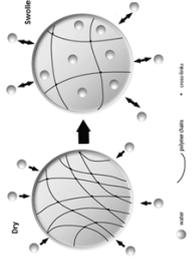
Ermittlung der molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen	
Molkenprotein Standardformulierung (WPSS)	
Variation der Rezeptur und Prozessparameter	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ausgangsmolekulargewicht (allg. Morphologie)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Denaturierungsgrad (Anfangs-Quervernetzung)</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \text{GH}-\text{C}-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{N}-\text{Lys} \longrightarrow \text{GH}-\text{C}-\text{NH}-\text{Lys} + \text{NH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ $\begin{array}{c} \text{GH}-\text{C}-\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{GH}-\text{C}-\text{OH} + \text{NH}_3 \\ \quad \quad \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \end{array}$ <p>TG Konzentration und Inkubationszeit (Anfangs-Quervernetzung)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>UV-Bestrahlungsdosis (Anfangs-Quervernetzung)</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Lagerungsdauer (Nachvernetzung)</p> </div> </div>
Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 45%;"> <p>Qualitative Bestimmung der molekularen Wechselwirkungen (Löslichkeitsversuche in unterschiedlichen Puffersystemen)</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 45%;"> <p>Quantitative Bestimmung der intermolekularen kovalenten Wechselwirkungen (CLD, DoS und DoC) (Quellversuche und Flory-Reiner Ansatz)</p> </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>
Ermittlung der verpackungsrelevanten Eigenschaften	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 15%;"> <p>Sauerstoffdurchlässigkeit</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 15%;"> <p>Wasserdampfdurchlässigkeit (Diffusions- und Löslichkeitskoeffizient)</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 15%;"> <p>E-Modul</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 15%;"> <p>Zugfestigkeit</p> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 15%;"> <p>Oberflächenenergie</p> </div> </div>

Abbildung 12: Versuchsplan

4.2 Molkenprotein-basierte Formulierungen, Folien und Beschichtungen

4.2.1 Molkenproteinisolat und hydrolysiertes Molkenproteinisolat

Zur Herstellung der Molkenprotein-basierten Formulierungen wurde das marktverfügbare Molkenproteinisolat (WPI) BiPRO® von Davisco (Davisco Food International Inc., Le Sueur, Minnesota, USA) verwendet. Es wird aus Süßmolke hergestellt und ist ein hochreines, homogenes, natives (d.h. nicht denaturiertes) und rieselfähiges Pulver (Davisco, 2012). Als hydrolysiertes Molkenproteinisolat (h-WPI) wurde das marktverfügbare BioZate®3 von Davisco verwendet (Davisco, 2013). Es ist ein hochgereinigtes Molkenproteinisolat mit kürzeren Peptidketten als herkömmliches WPI.

Tabelle 5: Spezifische Kennzahlen des verwendeten WPI und h-WPI (BiPRO und BioZate3) laut (Davisco, 2012, Davisco, 2013)

	BiPRO (WPI)	BioZate3 (h-WPI)
Hersteller & Lieferant	Davisco Food International Inc., Le Sueur, Minnesota, USA	
Feuchtigkeitsgehalt [% (m/m)]	4,7 ± 0,3	4,6 ± 0,5
Protein in Trockenmasse [% (m/m)]	97,7 ± 0,7	94,9 ± 0,8
Hydrolysegrad DH (vgl. Kapitel 3.1.5.2)	0	10,0 ± 1,2
pH	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,2

Die Molekulargewichtsverteilung des h-WPI ist nachfolgend dargestellt (Herstellerangaben in Prozent der Peptide):

- 60 % – 75 %: < 2 kDa
- 15 % – 25 %: 2–5 kDa
- 5 % – 15 %: 5–10 kDa
- 1 % – 10 %: >10 kDa

Da es sich bei Molkenproteinisolat um ein Naturprodukt handelt und es während der Herstellung mehrere Prozessschritte durchläuft, kann es in seiner Zusammensetzung natürlichen Schwankungen unterliegen (u.a. saisonal und/oder technisch bedingt). Deshalb wurden innerhalb der jeweiligen Versuchsreihen ausschließlich Molkenproteinisolate (WPI und h-WPI) derselben Chargen verwendet.

4.2.2 Molkenprotein-basierte Standardformulierung

Neben den o.g. Molkenproteinisolaten wurde Glycerol (Gly) aufgrund seiner guten Kompatibilität zu Molkenproteinformulierungen und seiner hohen weichmachenden Wirkung am häufigsten bei wissenschaftlichen Studien, wie auch in dieser Arbeit, verwendet (vgl. Kapitel 3.1.5.1.2.). Basierend auf Vorversuchen zu dieser Arbeit, zeigte sich, dass eine Weichmacherkonzentration von 66,7 Massenprozent % (m/m) bezogen auf die verwendete wasserfreie WPI Menge geeignet ist, um Folien und Beschich-

tungen aus WPI herstellen zu können, die einen hohen Spielraum für Rezeptur-, und Prozessparameterveränderungen sowie für verschiedene Nachbehandlungen zulassen (Schmid et al., 2012). Das bedeutet, dass trotz unterschiedlicher Modifizierungsvarianten und Verarbeitungsweisen kohärente und geschlossene Folien und Beschichtungen hergestellt werden können. Dies ist eine Grundvoraussetzung, um verpackungsrelevante Eigenschaften messtechnisch analysieren zu können. Aus diesem Grund wird eine Zugabe von 66,7 % dieses Weichmachers in der vorliegenden Arbeit, und der daraus entstandenen wissenschaftlichen Publikationen, als die sog. Molkenproteinbasierte Standardformulierung (WPSS) verwendet. Konkret bedeutet dies, dass sämtliche Versuchsreihen zur Beantwortung der in Kapitel 2 genannten wissenschaftlichen Fragestellungen auf dieser Formulierung aufbauen. Variationen dieser Standardformulierung wurden hinsichtlich des Ausgangsmolekulargewichtes sowie des Denaturierungsgrades vorgenommen (siehe Kapitel 4.2.3 und 4.2.4). Des Weiteren wurden die Versuche zur TG-Quervernetzung an dieser Formulierung durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.5). Darüber hinaus wurde die UV-Bestrahlung an Folien und Beschichtungen aus dieser Standardformulierung durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.6). Somit hat diese Standardformulierung, welche nachfolgend näher beschrieben wird, eine zentrale Bedeutung für diese Arbeit (siehe Tabelle 6 und Tabelle 7).

Es wird an dieser Stelle explizit darauf hingewiesen, dass es sich bei dieser Standardformulierung und deren Variationen nicht um die „Best Performance“ Formulierungen aus den EU-Projekten Wheylayer (2008-2011), Wheylayer 2 (2012-2014) und Thermowhey (2014-2016) handelt. Die im Rahmen der genannten Projekte für den Industrieinsatz entwickelten Formulierungen und Prozesse wurden insbesondere hinsichtlich deren Sauerstoffbarriereigenschaften und industrieller Verarbeitbarkeit optimiert. Diese Formulierungen, Prozesse und Verbundaufbauten sind zwar zu Patenten angemeldet (Stäbler und Schmid, 2016, Schmid et al., 2013b), werden aber dennoch in ihrer genauen Zusammensetzung und detaillierten Verarbeitungsweise als Geschäftsgeheimnis klassifiziert. Des Weiteren haben Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen aus diesen für den Industrieinsatz optimierten Formulierungen nur eingeschränkte Spielräume bezüglich Rezeptur-, und Prozessparameterveränderungen sowie bezüglich verschiedener Nachbehandlungen. Somit erfüllt die in dieser Arbeit verwendete Standardformulierung zwar die notwendigen Eigenschaften für die zur Beantwortung der wissenschaftlichen Fragestellungen notwendigen und durchgeführten Versuche, verletzt aber nicht die Interessen der aktuellen und zukünftigen Anspruchspersonen der o.g. Projekte und der eingetragenen Marke WHEYLAYER®.

Die zur Herstellung der Standardformulierung und deren Variationen verwendeten Materialien und Geräte sowie deren Hersteller sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Materialien und Geräte zur Herstellung der Standardformulierung und deren Variationen

Material	Bezeichnung	Hersteller
Molkenproteinisolat (WPI)	BiPRO	Davisco Foods International Inc., Le Sueur, Minnesota, USA
Hydrolysiertes Molkenproteinisolat (h-WPI)	BioZate 3	Davisco Foods International Inc., Le Sueur, Minnesota, USA
Weichmacher	Glycerol (Gly)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Destilliertes Wasser	-	Fraunhofer IVV, Freising
Mixer mit Heizelement	TM 31-1	Vorwerk Deutschland Stiftung & Co. KG, Wuppertal
Ultraschallbad	DT 514H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Waage	Kern 440-53	Kern & Sohn GmbH, Ballingen-Frommern

Die Rezeptur der Standardformulierung kann aus Tabelle 7 entnommen werden. Der Gleichgewichtsfeuchtegehalt bei 23 °C und 50 % r. F. von BiPRO (WPI) beträgt 5 % (m/m). Dieser Wassergehalt wird bei der Formulierungsherstellung berücksichtigt. Der Anteil an Weichmacher (Gly) bezieht sich somit auf den Gehalt an wasserfreiem BiPRO (WPI).

Tabelle 7: Rezeptur der Standardformulierung (Einwaagetabelle)

WPI Gehalt in Lösung	10 % (m/m)	
WPI Gehalt in BiPRO	95 % (m/m)	
Gewicht an BiPRO in Lösung	10,53 % (m/m)	105,3 g
Weichmachergehalt in Bezug auf WPI Gehalt	66,70 % (m/m)	
Gewicht an Weichmacher in Lösung	6,67 % (m/m)	66,7 g
Gesamtrockensubstanzgehalt (WPI + Weichmacher)	16,67 % (m/m)	
Gesamtwassergehalt	83,33 % (m/m)	
Wassergehalt in BiPRO	0,53 % (m/m)	
Gewicht an Wasser in Lösung	82,80 % (m/m)	828,0 g
	Σ 100 % (m/m)	Σ 1000 g

Es wurden Variationen der Standardformulierung hergestellt, um die in Kapitel 2 genannten wissenschaftlichen Fragenstellungen zu bearbeiten und die daraus abgeleiteten Versuche durchzuführen. Hierbei wurde zur Reduktion des Ausgangsmolekulargewichts WPI teilweise durch h-WPI substituiert, der Denaturierungsschritt ausgelassen (Schritt 3 in Abbildung 13), um Formulierungen mit reduzierten Denaturierungsgrad herzustellen, und TG zugesetzt, um eine biochemisch katalysierte Quervernetzung zu erwirken. Zudem wurden die aus der Standardformulierung hergestellten Folien und Beschichtungen anschließend UV-bestrahlt. Hierauf wird in Kapitel 3.2 eingegangen. Somit ist die Grundlage für alle Folien und Beschichtungen die o.g. Standardformulierung, welche nach folgendem Prozessschema hergestellt wurde (Abbildung 13):

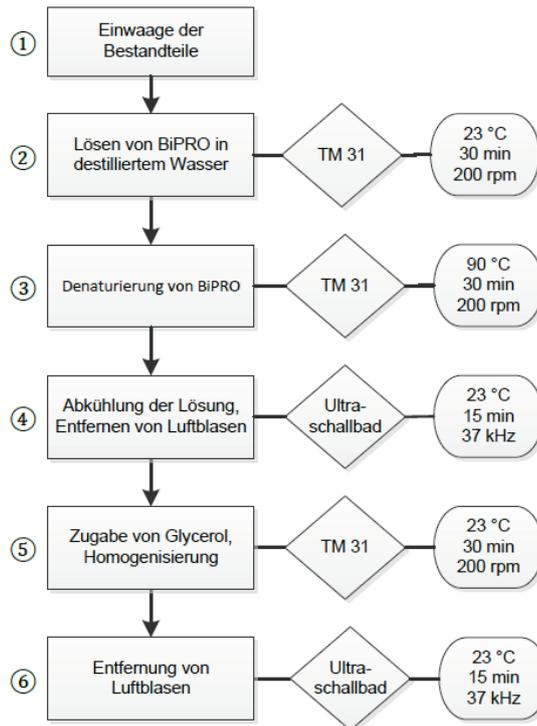


Abbildung 13: Herstellung der Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS)

Zur Herstellung der Standardformulierung werden die Bestandteile entsprechend der Angaben in Tabelle 7 eingewogen. BiPRO wird in destilliertem Wasser durch Rühren für 30 min mit einer Drehzahl von 200 rpm (min^{-1}) bei 23 °C gelöst. Anschließend wird die Lösung auf 90 °C erhitzt und für 30 min gehalten, um eine vollständige Denaturierung zu gewährleisten (dieser Schritt entfällt bei der Herstellung von nativen Formulierungen). Die noch heiße Lösung wird in Weithalsflaschen überführt und anschließend für 15 min in einem Ultraschallbad behandelt (23 °C und 37 kHz). Letzteres ist ein wirksames Vorgehen, um eine möglichst blasenfreie Formulierung zu erhalten, ohne die Struktur und das Molekulargewicht der Proteine signifikant zu beeinflussen (Chandrapala et al., 2011, Jambrak et al., 2014). Anschließend wird der Weichmacher (Gly) hinzugefügt. Die nun vollständige Formulierung wird für weitere 30 min mit 200 rpm bei 23 °C homogenisiert und anschließend im Ultraschallbad für 15 min mit 37 kHz bei 23 °C entgast.

4.2.3 Herstellung von Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht

4.2.3.1 Folien aus Formulierungen mit konstantem Weichmachergehalt

Um den Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts auf die verpackungsrelevanten Eigenschaften Molkenprotein-basierter Folien zu untersuchen, wurde WPI durch hydrolysiertem WPI (h-WPI) ersetzt, ohne den Weichmachergehalt zu variieren. Es wurde ausgehend von der Standardformulierung jeweils 1 % (m/m) BiPRO (WPI) durch 1 % (m/m) BioZate3 (h-WPI) substituiert. Hierfür wurden die Formulierungen mit BiPRO und

BioZate3, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, hergestellt. Um unerwünschte Effekte (z.B. frühzeitige Gelbildung) zu verhindern, wurden die in Tabelle 8 genannten Lösungen getrennt voneinander erhitzt.

Tabelle 8: Molkenprotein-basierte Formulierungen mit variierendem Gehalt an BiPRO und BioZate3

[Gly:WPI: h-WPI]	BiPRO (WPI) [%] (m/m)	Gly [%] (m/m)	BioZate (h-WPI) [%] (m/m)	Wasser [%] (m/m)	Protein [%] bezogen auf Gesamtanteil (m/m)	Gly [%] be- zogen auf Gesamtanteil (m/m)	Mittleres Pro- tein Moleku- largewicht [kDa]
6,67:10:0	10	6,67	0	83,33	10	66,7	59,89
6,67:9:1	9	6,67	1	83,33	10	66,7	54,23
6,67:8:2	8	6,67	2	83,33	10	66,7	48,56
6,67:7:3	7	6,67	3	83,33	10	66,7	42,89
6,67:6:4	6	6,67	4	83,33	10	66,7	37,23
6,67:5:5	5	6,67	5	83,33	10	66,7	31,56

Es wurden jeweils 17,1 ml der in Tabelle 8 genannten Formulierungen in Petrischalen aus Polystyrol (Greiner Bio One International AG, Kremsmünster, Österreich, 120 mm x 120 mm) gegossen, um eine Foliendicke von ca. 200 µm zu erhalten. Die Gießfolien werden bei 23 °C und 50 % r. F. getrocknet und erreichten nach ca. 7 Tagen ihre Gleichgewichtsfeuchte. Die so hergestellten Folien wurden frühestens nach 14 Tagen hinsichtlich verpackungsrelevanter Eigenschaften und molekularer Wechselwirkungen charakterisiert. Die mittleren Protein-Ausgangsmolekulargewichte der Formulierungen wurden unter Berücksichtigung der Molekulargewichtsverteilung des h-WPI (BioZate3) berechnet (siehe Kapitel 4.2.1).

4.2.3.2 Folien aus Formulierungen mit variierendem Protein und Weichmachergehalt

Wie in Kapitel 3.1.5.2 beschrieben, können Folien und Beschichtungen aus WPI mit steigendem Hydrolysegrad (sinkendem Molekulargewicht) weichere und flexiblere Filme ausbilden. Zudem hat die Weichmacherkonzentration direkten Einfluss auf die Permeation von Sauerstoff und Wasserdampf durch Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen. Sothornvit und Krochta (2000b) stellten in diesem Zusammenhang die Hypothese auf, dass durch die Hydrolyse von denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen der Weichmachergehalt reduziert werden kann und dennoch flexible Folien und Beschichtungen entstehen, die aber geringere Permeationswerte gegenüber Sauerstoff und Wasserdampf aufweisen. Um diese Hypothese zu falsifizieren bzw. zu bestätigen und um erstmals Korrelationen zwischen Mischungen aus hochmolekularem WPI und h-WPI und deren verpackungsrelevante Eigenschaften aufstellen zu können, wurden Formulierungen mit sinkendem WPI:h-WPI Verhältnis und sinkendem Weichmachergehalt (Gly) hergestellt und charakterisiert. Hierfür wurde bei der Standardformulierung in ihrer nativen Variante (dop-

pelter Trockensubstanzgehalt bei gleichem WPI:Gly Verhältnis) 1 % (m/m) WPI und 1 % Gly (m/m) durch 2 % (m/m) h-WPI ersetzt. So wurden insgesamt 6 Formulierungen, von 0 % (m/m) bis 10 % (m/m) h-WPI Gehalt, hergestellt und wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben zu Gießfolien verarbeitet.

4.2.4 Herstellung von Folien und Beschichtungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad

Der globale Denaturierungsgrad (DG) von Molkenprotein-basierten Formulierungen wurde durch das Mischen vollständig hitzedenaturierter (D) und nativer (N) WPI Lösungen eingestellt. Die Lösungen wurden wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben hergestellt, wobei der Denaturierungsschritt für die native Formulierung übersprungen wurde. Die hitzedenaturierte und native Formulierung wurden für 5 min bei 23 °C so gemischt, dass sich folgende D:N (m/m) Verhältnisse ergaben: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 und 100:0. Der globale DG der Formulierungen wird in 0, 25, 50, 75 bzw. 100 % angegeben.

4.2.4.1 Herstellung von Beschichtungen und Folien durch nasschemische Beschichtung

Die in Kapitel 4.2.4 genannten Formulierungen wurden durch Beschichtung aus der flüssigen Phase auf Trägersubstraten zu beschichteten Mehrschichtverbunden und auch durch späteres Ablösen vom Trägersubstrat zu Folien verarbeitet. Hierfür wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Materialien und Geräte verwendet.

Tabelle 9: Materialien und Geräte für den Beschichtungsprozess

Material/Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Beschichtungsautomat	CUF 5	Sumet Messtechnik, Denklingen
Korona-Anlage	CLNE002-130-1KB4 Typ 7015	Softal Corona & Plasma GmbH, Hamburg
Feindosierungsspritzen	DIN EN ISO 7886-1	Wolf GmbH, Tuttlingen
PTFE	rein, weiß, d = 500 ± 20 µm	Sahlberg GmbH & Co. KG, Feldkirchen
PET	Hostaphan RNK d = 12,0 µm	Mitsubishi Polyester Film GmbH, Wies- baden
Rakel	variierende Windungszahl	Sumet Messtechnik, Denklingen

Da für die Lösungsversuche zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen dünne Molkenprotein-basierte Folien ohne Trägersubstrat benötigt werden, wurde u.a. Polytetrafluorethylen (PTFE) als Beschichtungsgrundlage (Trägersubstrat) verwendet. Um eine ausreichende Benetzung der Molkenprotein-basierten Formulierungen auf den Trägersubstraten zu gewährleisten, wurden diese in der o.g. Korona-Anlage vorbehandelt. Details zum Effekt einer Koronabehandlung von Kunststoffen werden u.a. von Novák et al. (2006) und Matsunaga und Whitney (2000) beschrieben. Die Korona-Vorbehandlung wurde mit einer Bahngeschwindigkeit von 3 m/min und einer Genera-

torleistung von 1000 W durchgeführt. Hierdurch konnten Oberflächenenergien von > 39 mN/m für PTFE und >44 mN/m für PET generiert werden (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Molkenprotein-basierten Formulierungen wurden jeweils unter Anwendung der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Prozessparameter mittels des Beschichtungsautomaten CUF 5 (Abbildung 14) auf PTFE und Polyethylenterephthalat (PET) beschichtet und anschließend bei 23 °C und 50% r.F. gelagert. Nach ca. 14 Tagen war es möglich, die Beschichtung vom PTFE-Trägersubstrat abzulösen und so defektfreie Folien zu erhalten. Dieses für diese Arbeit äußerst nützliche Verhalten könnte u.a. durch die üblicherweise während der Lagerung sinkenden Oberflächenenergie bei Corona-vorbehandelten Polymerfolien begünstigt worden sein (Mesic et al., 2006). Beschichtungen auf PET gingen eine untrennbare Verbindung mit dem Substrat ein.

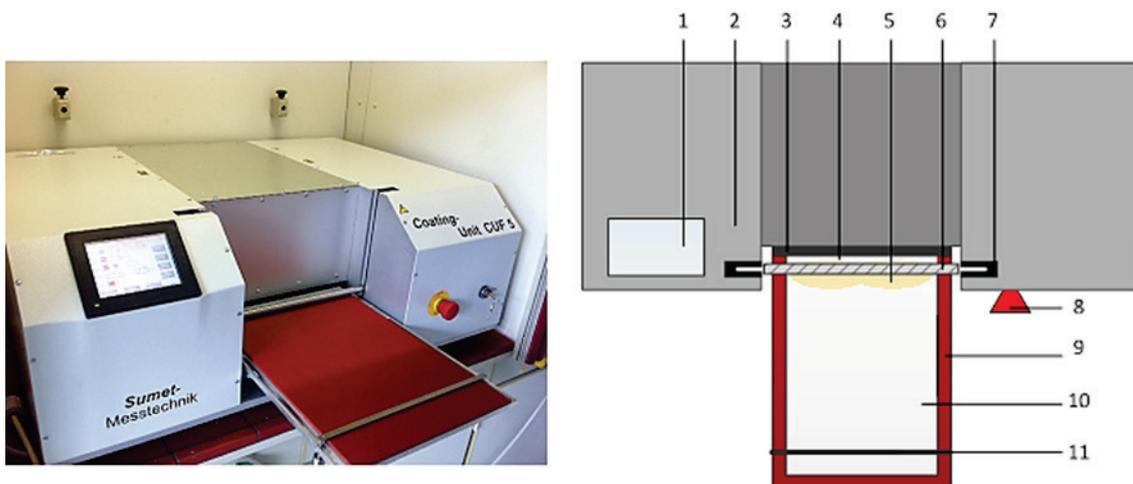


Abbildung 14: Beschichtungsautomat CUF 5 (Frontansicht links, schematische Aufsicht rechts) mit seinen Komponenten und Beschichtungsmaterial (rechts): 1. Bedienfeld, 2. Konvektionstrockner, 3. Hydraulische Blattspanvorrichtung, 4. aufgetragene WPI Lösung, 5. WPI Lösung, 6. Rakel, 7. Rakeleinsatz, 8. Not-Aus, 9. Probenschlitten, 10. Probe (DIN A4), 11. Blattklemme

Durch den jeweiligen Drahtdurchmesser und/oder die Windungszahl der Drähte auf den Rakeln, wird die Nassfilmdicke der Beschichtungen festgelegt. Dies beeinflusst u.a. die Trocknungszeit. Daher ist es notwendig die Trocknungstemperatur, Trocknungszeit und Wahl der verwendeten Rakel an den jeweiligen Prozess anzupassen. Die verwendeten Parameter werden nachfolgend für Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad, aber auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit, wenn notwendig, genannt.

Die hergestellten Mischungsverhältnisse sowie die Prozessbedingungen zur Beschichtung von Molkenprotein-basierten Formulierungen mit variierendem D:N Verhältnis werden in Tabelle 10 gelistet. Die Beschichtungen wurden mit einer Rakel zum Auftrag von einer $64\text{ }\mu\text{m}$ Nassfilmdicke durchgeführt (20 N Anpressdruck; 20 mm/s Beschichtungsgeschwindigkeit). Die Trocknung erfolgte bei 35 °C und somit deutlich unterhalb der Denaturierungstemperatur (vgl. 3.1.6) für 1200 s , um eine zusätzliche Denaturie-

rung während des Trocknungsprozesses auszuschließen. Die resultierenden Beschichtungsdicken nach der Trocknung betragen durchschnittlich 4,3 μm . Die entstandenen Muster wurden bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. (Schmid et al., 2014a)

Tabelle 10: Mischungsverhältnisse und Beschichtungsprozessparameter für Formulierungen mit einem DG 0 - 100 %

Nr.	Native WPI Lösung [g]	Denaturierte WPI Lösung [g]	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Denaturierungsgrad [%]
1	600	0	35	1200	0
2	450	150	35	1200	25
3	300	300	35	1200	50
4	150	450	35	1200	75
6	0	600	35	1200	100

Des Weiteren wurden aus den in Tabelle 10 gelisteten Formulierungen Nr. 3 - 6 auch Gießfolien nach der in Kapitel 4.2.3.1 beschriebenen Methode hergestellt (Schmid et al., 2017b). Um festzustellen, ob die eingestellten Denaturierungsgrade auch noch in den Beschichtungen und Folien vorlagen, wurden die Proben nach deren Herstellung und Lagerung auf deren Anteil an nativen Fraktionen geprüft (siehe Kapitel 4.2.4.2).

4.2.4.2 Analytische Bestimmung des Denaturierungsgrades

Durch die wiederholte Bestimmung des Denaturierungsgrades (DG) soll zum einen nachgewiesen werden, dass das verwendete Molkenprotein auch in seiner nativen Form vorliegt und zum anderen, ob während der Herstellung der Folien und Beschichtungen der eingestellte Denaturierungsgrad nicht verändert wurde.

Hierfür wurde der Gehalt an nativen Molkenproteinfraktionen mittels RP-HPLC (Reversed Phase-Chromatographie) ermittelt. Die Molkenprotein-basierten Folien wurden in einer Trockenfilmkonzentration von 0,1 % (m/m) in destilliertes Wasser eingewogen und für 24 Stunden bei 23 °C und 400 rpm gerührt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 4,6 (isoelektrischer Punkt des WPI) durch Zugabe einer 0,1 molaren HCl Lösung abgesenkt. Hierbei fallen irreversibel denaturierte Proteinfractionen aus, wogegen native Fraktionen in Lösung bleiben (Parris und Baginski, 1991, Anandharamakrishnan et al., 2008, Haque et al., 2013a, Haque et al., 2013b, Pelegrine und Gasparetto, 2005). Die so erhaltenen Proben wurden mit 11.000 g für 10 min bei 23 °C zentrifugiert (MiniSpin Zentrifuge, Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde vor der RP-HPLC Messung filtriert (0,45 μm Spritzenfilter, Chromafil RC-45/15, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren). Als Säule wurde die RP-Säule Zorbax 300SB-C18 (Agilent Technologies, Waldbronn) mit einer stationären Phase aus Octadecylsilan (ODS, 5 μm , 300 Å, 150 x 4,6 mm) verwendet. Das HPLC Instrument von Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA) bestand aus einer binären Gradientenpumpe mit Hochdruckmischer (Dionex P680, Dionex Corp., Sunnyvale, CA), einem Autosampler (Dionex ASI-100) und dem Dionex UltiMate 3000 RS Detektor sowie einer Entgasungseinheit (Gastorr BG-24, Flom Co. Ltd., Tokyo). Es wurde eine Gradientenelution nach Ferreira und Cacote

(2003) durchgeführt. Eluent A, bestehend aus 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) und 99,9 % (v/v) Wasser, wurde mit Eluent B, bestehend aus 0,1 % (v/v) TFA, 19,98 % (v/v) Wasser und 79,92 % (v/v) Acetonitril, nach folgendem Programm durch die stationäre Phase geführt:

0 – 11 Minuten 45 % A zu 56 % B;

11 – 15 Minuten 56 % A zu 57,6 % B; und

15 – 16 Minuten 57,6 % A zu 45 % B.

Die Säulentemperatur und der Volumenstrom wurden bei 40 °C und 1 ml/min konstant gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 40 µl und die Detektion wurde bei einer Wellenlänge von 215 nm durchgeführt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Denaturierungsgrad wurde nach Parris und Baginski (1991) durch die Auswertung der Chromatogramme der jeweiligen Proben und nativen Molkenproteinstandards β -Lg A & B, α -La und BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit der Software Dionex Chromeleon® Version 6.80 SR8 Build 2623 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ermittelt. Hierfür wurde die Summe der Peakflächen der jeweiligen Proben von der Summe der Peakflächen der nativen Molkenproteinstandards (siehe Abbildung 15) subtrahiert und durch die Summe der Peakflächen der nativen Molkenproteinstandards dividiert. Hierdurch erhält man den DG (siehe auch Schmid et al. (2014a)).

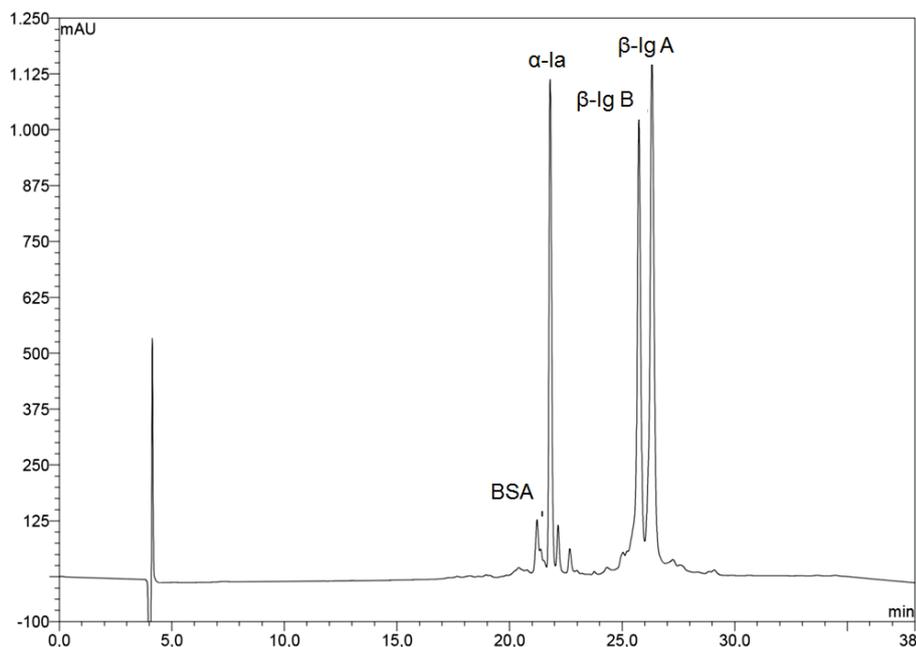


Abbildung 15: Beispiel eines Chromatogramms einer nativen, unbehandelten WPI Probe. Y-Achse = Absorptionsgrad [mAU] und X-Achse = Retentionzeit [min]. Abgewandelt von Schmid et al. (2014a)

4.2.5 Herstellung von Folien und Beschichtungen aus TG quervernetzten Formulierungen

Zur Herstellung von Folien und Beschichtungen aus Transglutaminase-quervernetzten Formulierungen wurde die in Kapitel 4.2.2 beschriebene Molkenprotein-basierte Standardformulierung (WPSS) verwendet. Diese wurde mit Konzentrationen von 0 – 10 Units je Gramm Trockenmasse WPI an TG der Marke Activia YG (Ajinomoto Foods Europe SAS, Hamburg) versetzt (siehe Tabelle 11). Die Enzymaktivität beträgt laut Hersteller 85 – 121 Units U pro Gramm Enzymzubereitung (1 U = 1 μ mol/min).

Tabelle 11: Zusammensetzung der Transglutaminase behandelte Formulierungen

Probenbezeichnung	TG-Zugabe [Units]	Inkubationszeit [min]	Masse TG [g]	Masse WPSS [g]
TG_0_0	0,0	0	0,0	150,00
TG_0,1_0	0,1	0	0,015	150,00
TG_0,1_30	0,1	30	0,015	150,00
TG_0,1_60	0,1	60	0,015	150,00
TG_0,1_120	0,1	120	0,015	150,00
TG_0,1_1440	0,1	1440	0,015	150,00
TG_1_0	1,0	0	0,146	150,00
TG_1_30	1,0	30	0,146	150,00
TG_1_60	1,0	60	0,146	150,00
TG_1_120	1,0	120	0,146	150,00
TG_1_1440	1,0	1440	0,146	150,00
TG_10_0	10,0	0	1,456	150,00
TG_10_30	10,0	30	1,456	150,00
TG_10_60	10,0	60	1,456	150,00
TG_10_120	10,0	120	1,456	150,00
TG_10_1440	10,0	1440	1,456	150,00

Die in Tabelle 11 genannten Formulierungen wurden nach der in Kapitel 4.2.3.1 genannten Methode in Petrischalen überführt und direkt im Anschluss inkubiert.

Als Inkubationstemperatur wurden 23 °C gewählt, um eine frühzeitige Gelbildung zu vermeiden, da für die nachfolgend beschriebenen Beschichtungsversuche die Fließfähigkeit der Lösung aufrecht erhalten bleiben muss. Dies war für die in Tabelle 11 genannten höchsten Konzentrationen und Inkubationszeiten bis 120 min bei 23 °C der Fall. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde die TG in der Lösung bei 80 °C (30 min) inaktiviert. Anschließend wurden die Gießfolien bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert.

Die nasschemische Beschichtung wurde mit dem in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen Beschichtungsautomaten CFU 5 unter Verwendung einer Rakel zum Auftrag von 80 μm Nassfilmdicke durchgeführt (20 N Anpressdruck; 20 mm/s Beschichtungsgeschwindigkeit). Beschichtet wurden die in Tabelle 11 genannten Formulierungen mit einer Inkubationszeit von 120 min bei 23 °C. Als Beschichtungssubstrat wurde PET verwendet (Hostaphan® RNK 12.0, 12 μm , Mitsubishi Polyester Film GmbH, Wiesbaden). Die PET Folie wurde vor der Beschichtung wie in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen Korona-vorbehandelt. Die resultierende Oberflächenenergie betrug >44 mN/m. Die Trocknung erfolgte bei 80 °C und einem Trocknungsluftvolumenstrom von 1400 l/min (entspricht 100 % des Maximalvolumenstroms) für 300 s. Die Trocknung wurde mit 75 % der maximalen Leistungsaufnahme (1500 Watt maximal) der eingebauten IR-Einheit unterstützt. Die so hergestellten Proben wurden anschließend bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. (Schmid et al., 2014b)

4.2.6 Herstellung von UV-bestrahlten Folien und Beschichtungen

Insbesondere zur Beantwortung der Frage des Einflusses einer UV-Behandlung auf verpackungsrelevante Eigenschaften war notwendig, möglichst dünne Folien herstellen zu können, da aufgrund der hohen UV-Absorption die Eindringtiefe von UV-Strahlen limitiert ist und deren Einfluss bei zu dicken Folien nicht zur Modifizierung der Folien beitragen würde (vgl. Kapitel 3.1.8). Deshalb wurden Molkenprotein-basierte Folien durch Lackierung auf einem Trägersubstrat aus Polytetrafluorethylen (PTFE) hergestellt und nachträglich wieder abgelöst. Die Beschichtungen mit der Molkenprotein-basierten Standardformulierung WPSS (vgl. Kapitel 4.2.2) wurden mit dem in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen Beschichtungsautomaten CUF 5 unter Verwendung einer Rakel zum Auftrag von 120 μm Nassfilmdicke auf Korona-vorbehandeltem PTFE durchgeführt (20 N Anpressdruck; 20 mm/s Beschichtungsgeschwindigkeit). Die Trocknung erfolgte bei 105 °C und einem Trocknungsluftvolumenstrom von 1400 l/min für 510 s. Nach ca. zweiwöchiger Konditionierung bei 23 °C und 50 % r. F. wurden die Folien mit UV-Licht bestrahlt. Hierfür wurde eine Bestrahlungsvorrichtung verwendet (Fraunhofer IVV, Freising, siehe Abbildung 16). Die UV-Lampen (254 nm UV-Niederdrucklampen, Heraeus Noblelight GmbH, Hanau) wurden 70 mm über dem Boden installiert. Mindestens 5 Minuten vor dem Start der Bestrahlung (Einlegen der beschichteten PTFE-Trägersubstrate) wurden die UV-Lampen aktiviert, um die UV-Intensität zu stabilisieren. Die UV-Strahlungsintensität wurde mit einem UV Radiometer (PowerPuck SN 1645, UVECO GmbH, Bruckmühl) gemessen und betrug im 190 mm breiten Bestrahlungszentrum (vgl. Abbildung 16) $0,004$ W/cm². In Vorversuchen wurde mit dem vorher genannten UV Radiometer eine Eindringtiefe der UV-Strahlung von maximal $24,6 \pm 0,9$ μm ermittelt. Hierfür wurden Folien mit Dicken von 5,9 μm bis 31,2 μm bestrahlt. Ab 24,6 μm konnte keine UV-Strahlungsintensität ermittelt werden. Die Proben wurden mit UV-Bestrahlungsdosen von 0 (Kontrolle); 2,3; 10,2; 19,0 und 31,4 (UV-C, 200-280 nm, dotiert bei 254 nm) J/cm² bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Beschichtungen bei 23 °C und 50 % r.F. für ca. 14 Tage gelagert und vor den Charakterisierungen vom PTFE-Trägersubstrat abgelöst.

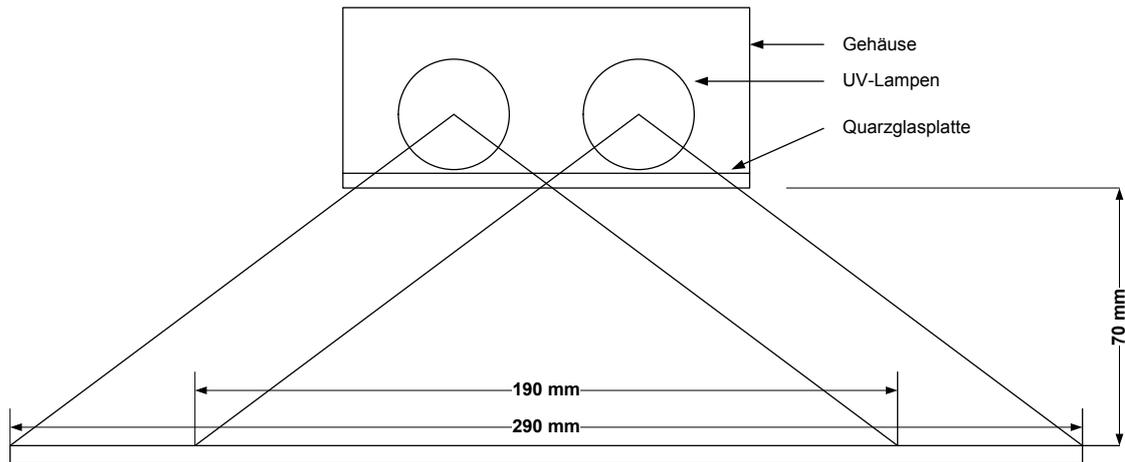


Abbildung 16: Schematische Zeichnung der UV-Bestrahlungsanlage adaptiert und übersetzt aus Schmid et al. (2015c). Das Bestrahlungszentrum hat eine Breite von 190 mm

4.2.7 Musterherstellung zur Ermittlung der Permselectivität, feuchteabhängige Sauerstoffpermeation und Aktivierungsenergie der Permeation

Für die Ermittlung der Permselectivität (vgl. Kapitel 3.2.1.3), also dem Durchlässigkeitsverhältnis von N_2 , O_2 und CO_2 , und zur Ermittlung der jeweiligen Aktivierungsenergien der Permeation wurden Beschichtungen mit der Molkenprotein-basierten Standardformulierung WPSS (vgl. Kapitel 4.2.2) mit dem in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen Beschichtungsautomaten CUF 5 unter Verwendung einer Rakel zum Auftrag von 120 μm Nassfilmdicke auf Korona-vorbehandeltem PTFE durchgeführt (20 N Anpressdruck; 20 mm/s Beschichtungsgeschwindigkeit). Die Korona-Vorbehandlung wurde mit einer Bahngeschwindigkeit von 3 m/min und einer Generatorleistung von 1000 W durchgeführt. Hierdurch konnten Oberflächenenergien von $> 39 \text{ mN/m}$ für PTFE erzielt werden (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Trocknung erfolgte bei 105 °C und einem Trocknungsluftvolumenstrom von 1400 l/min für 510 s. Nach dem Trocknungsvorgang resultierten Beschichtungsdicken von $24,2 \pm 4,2 \mu\text{m}$. Die so hergestellten Proben wurden anschließend bei 23 °C und 50 % r. F. für mindestens 5 Tage gelagert, bevor die Molkenprotein-basierte Beschichtung vom PTFE-Trägersubstrat abgelöst wurde. Die so entstandenen Molkenprotein-basierten Folien wurden mindestens weitere 10 Tage bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. Als Beschichtungssubstrat für Muster zur Ermittlung der feuchteabhängigen Sauerstoffpermeation wurde Korona-vorbehandeltes PET (Hostaphan® RNK 12.0, 12 μm , Oberflächenenergie $>44\text{mN/m}$, DIN A4, Mitsubishi Polyester Film GmbH, Wiesbaden) mit denselben Prozessparametern beschichtet und für mindestens 14 Tage bei 23 °C und 50 % r.F. gelagert.

4.2.8 Musterherstellung zur Ermittlung der lagerzeitabhängigen Permeation und Nachvernetzung

Um die lagerzeitabhängige O_2 -Durchlässigkeit und Nachvernetzung der Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) zu messen, wurde die WPSS (vgl. Kapitel

4.2.2) wie in Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen mit einer Rakel zum Auftrag von 150 μm Nassfilmdicke auf Korona-vorbehandeltem CPP (Cast Polypropylen, 200 μm , Profol Kunststoffe GmbH, Halfing) beschichtet (30 N Anpressdruck; 20 mm/s Beschichtungsgeschwindigkeit). Hierdurch resultierte eine Trockenschichtdicke von ca. 23 μm . Die Korona-Vorbehandlung wurde mit einer Bahngeschwindigkeit von 3 m/min und einer Generatorleistung von 1000 W an der Lackier- und Kaschieranlage des Fraunhofer IVV durchgeführt. Die Trocknung erfolgte bei 90 °C und einem Trocknungsluftvolumenstrom von 1400 l/min für 510 s. Die so hergestellten Proben wurden anschließend direkt zur Charakterisierung der lagerzeitabhängigen Sauerstoffpermeation (vgl. Kapitel 4.3.1.2) verwendet. Zur Ermittlung der lagerzeitabhängigen Veränderung der molekularen Wechselwirkungen sollten bevorzugt Monofolien vorliegen. Deshalb wurden Molkenprotein-basierte Folien durch Lackierung auf einem Trägersubstrat aus PTFE hergestellt und an den Lagerungstagen 1, 2, 3, 7, 10 und 14 vom PTFE-Trägersubstrat wieder abgelöst und für die Lösungsversuche zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen verwendet (vgl. Kapitel 4.4). Die Beschichtungen mit der Molkenprotein-basierten Standardformulierung WPSS (vgl. Kapitel 4.2.2) wurden, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit einer Rakel zum Auftrag von 150 μm Nassfilmdicke auf Korona-vorbehandeltem PTFE beschichtet. Des Weiteren wurden Gießfolien aus WPSS, wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, hergestellt und für die Ermittlung von Vernetzungskennzahlen verwendet (vgl. Kapitel 4.5 und 4.6).

4.3 Untersuchungen zu verpackungsrelevanten Eigenschaften

4.3.1 Bestimmung von Permeationseigenschaften

4.3.1.1 Bestimmung der Sauerstoffdurchlässigkeit / sauerstoffspezifisches Trägergasverfahren

Die Sauerstoffdurchlässigkeit (vgl. Kapitel 3.2.1) von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen wurde u.a. mit dem sauerstoffspezifischen Trägergasverfahren (DIN 53380-3) bestimmt. Hierbei wurden die flächigen Proben zwischen zwei Teile einer Permeationskammer eingespannt. Durch einen Teil der Permeationskammer strömt Stickstoff als Trägergas und durch den anderen Teil der Permeationskammer strömt Sauerstoff. Die Probe fungiert somit als Membran zwischen den beiden Permeationskammern. Während der Messung permeiert der Sauerstoff durch die Probe in das Trägergas, welches zu einem elektrochemischen Sensor geführt wird. Die elektrochemische Reaktion bewirkt eine Stromstärke, die mit dem Sauerstoffmengenstrom (Stoffstrom) direktproportional korreliert. Über die Probenfläche ergibt sich die Stoffstromdichte und durch Normierung auf die Partialdruckdifferenz ergibt sich die Sauerstoffdurchlässigkeit in der Einheit $\text{cm}^3(\text{STP})/\text{m}^2 \text{ d bar}$ (Bleisch et al., 2014). Die Sauerstoffdurchlässigkeitsmessungen wurden in den akkreditierten Prüflabors (Deutsche Akkreditierungsstelle DAkkS) des Fraunhofer IVV in Freising mit Sauerstoffpermeationsmessgeräten der Firma Mocon Instruments (Mocon Inc., Minneapolis, Minnesota,

MN, USA) durchgeführt. Die Messungen wurden bei 23 °C und 50 % r. F. durchgeführt. Zusätzlich wurden ausgewählte Muster bei 35 % und 75 % r. F. gemessen, um die Feuchteabhängigkeit der Sauerstoffdurchlässigkeit zu bestimmen. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Bei einer Messwertdifferenz von >20 % wurden weitere Messungen durchgeführt. Die jeweils angewendeten Messbedingungen werden bei der Darstellung der Ergebnisse genannt. Die Folien- bzw. Beschichtungsdicken wurden mit der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode bestimmt.

4.3.1.2 Bestimmung der Gasdurchlässigkeit / manometrisches Verfahren

Zur Bestimmung der Permselectivität und Aktivierungsenergie der Permeation (vgl. Kapitel 3.2.1.3) wurden Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxiddurchlässigkeitsmessungen in Anlehnung an DIN 53380-2, dem sog. manometrischen Verfahren, mit dem Permeationsmessgerät GDP/E (Brugger Feinmechanik GmbH, München) bei 23 °C, 35 °C und 40 °C sowie jeweils 0 % r. F. durchgeführt. Die Proben (vgl. Kapitel 4.2.7) wurden hierbei in die zweiteilige Messzelle eingespannt und trennen somit als Membrane das Zellen-Oberteil vom Zellen-Unterteil. Während der Messung strömt das Testgas durch das Zellen-Oberteil und permeiert durch die Probe in das Zellen-Unterteil. Im Zellen-Unterteil wurde vor Beginn der Messung ein Unterdruck erzeugt, welcher aufgrund des permeierenden Testgases während der Messung ansteigt. Dieser Druckanstieg korreliert mit der Gasdurchlässigkeit, welche nach DIN 53380-2 berechnet werden kann und in der Einheit $\text{cm}^3(\text{STP})/(\text{m}^2 \text{ d bar})$ angegeben wird (Schmid et al., 2015g). Die Messungen wurden so lange wiederholt, bis die Durchlässigkeit konstant war. Hiervon abweichend wurden die Messungen zur Ermittlung der lagerzeitabhängigen Sauerstoffdurchlässigkeit an den in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Proben durchgeführt. Dies war notwendig, da sich die intermolekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen während der ersten Wochen nach deren Herstellung weiter ausbildeten (siehe Kapitel 5.1) und somit erst nach ausreichend langer Lagerung konstante Durchlässigkeiten gemessen werden können. Deshalb wurden die Messungen nach folgenden festgelegten Intervallen durchgeführt. Zwischen Lagertag 1 bis 3 wurde in 24 Stundenintervallen, zwischen Lagertag 4 bis 10 in 48 Stundenintervallen und zwischen Lagertag 11 bis 25 in 72 Stundenintervallen die Sauerstoffdurchlässigkeit gemessen und als konstant angenommen. Diese Messungen wurden bei 23 °C und 0 % r. F. in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte dabei in den Messzellen des o.g. GDP/E Permeationsmessgerätes. Die Folien- bzw. Beschichtungsdicken wurden mit der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode bestimmt. (Schmid et al., 2015e)

4.3.1.3 Bestimmung der Wasserdampfdurchlässigkeit

Die Bestimmung der Wasserdampftransmissionsrate (WVTR) durch Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen wurde nach DIN 53122-1 (gravimetrisches Verfahren) durchgeführt. Hierbei wurden Aluminiumschalen mit Silikagel als Absorptionsmittel befüllt. Die Proben wurden auf die Aluminiumschalen gelegt, welche anschließend mit einem Dichtring verschlossen und bei 23° C und 50 % bzw. 85 % r. F. gelagert wurden

(die jeweils angewendeten Messbedingungen werden bei der Darstellung der Ergebnisse genannt). Die permeierende Wasserdampfmenge wurde durch die Messung der Gewichtszunahme der Schalen ermittelt. Nach dem Erreichen eines linearen Verlaufs der Gewichtszunahme mit der Zeit wurde die Wasserdampftransmissionsrate nach DIN 53122-1 in der Einheit $\text{g}/(\text{m}^2 \text{ d})$ errechnet. Es wurden jeweils Vierfachbestimmungen an den Mustern durchgeführt. (Schmid, 2013, Schmid et al., 2013a, Schmid et al., 2014b, Schmid et al., 2014a, Schmid et al., 2015c, Schmid et al., 2015g). Die Folien- bzw. Beschichtungsdicken wurden mit der in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Methode bestimmt. Sowohl in der Normung (DIN 53122-1) als auch in der industriellen Praxis wird die Wasserdampfpermeationsrate meist als Wasserdampfdurchlässigkeit bezeichnet (Bleisch et al., 2014).

4.3.2 Bestimmung der mechanischen Eigenschaften

Die mechanischen Eigenschaften der Molkenprotein-basierten Folien wurden mit der Universalzugprüfmaschine Z005 (Allround Line, Zwick GmbH & Co. KG, Ulm) und RM 50 (Doli BmbH Industrie Electronic, München) bei 23 °C und 50 % r. F. nach DIN EN ISO 527-1 gemessen. Die Folienmuster wurden zu je fünf bis zehn Streifen (mindestens Fünf- bis maximal Zehnfachbestimmung) mit einer definierten Breite von 15 mm und einer Länge von 70 mm zugeschnitten. Vor der Zugprüfung wurden die Foliendicken mit dem Dickenmessgerät Precision Thickness Gauge Model FT3 (Rhopoint Instruments, Beyhill on Sea, UK) an fünf unterschiedlichen Positionen der Proben gemessen (Messgenauigkeit $\pm 0,4 \mu\text{m}$). Daraus wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die ermittelten Probendicken werden für die Berechnung der mechanischen Eigenschaften (vgl. Kapitel 3.2.2) verwendet. Die Folien wurden mit einer Anfangsmesslänge von 50 mm in die Klemmbacken eingespannt. Die Messungen erfolgten mit einer Messgeschwindigkeit von 100 mm/min für die Zugfestigkeit σ_m und Bruchdehnung ε_b . Die Messgeschwindigkeit für die Bestimmung des E-Moduls E erfolgte bei 0,5 % L_0/min (vgl. Kapitel 3.2.2), wobei der Dehnungsaufnehmer (Extensometer) einen Abstand von 25 mm aufwies. Die Messsignale der Zugprüfmaschinen wurden über die Software DOLI (DOLI Elektronik GmbH, München) verarbeitet und damit die in Kapitel 3.2.2 beschriebenen mechanischen Eigenschaften E-Modul E , Zugfestigkeit σ_m und die Bruchdehnung ε_b berechnet.

4.3.3 Bestimmung der Oberflächenenergie

Die Oberflächenenergie (vgl. Kapitel 3.2.3) der Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen wurde mit dem Kontaktwinkelmessgerät G2 (Krüss GmbH, Stephanskirchen/Rosenheim) und dessen integrierter Software durch Anwendung der Youngschen Gleichung (siehe Gleichung 19, S. 31) ermittelt. Als Testflüssigkeiten wurden destilliertes Wasser (Fraunhofer IVV, Freising), Diiodmethan, Ethylenglykol und Dimethylphthalat (>99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. 3 μl Testflüssigkeiten wurden mit einer Dosiergeschwindigkeit von 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die Proben aufgebracht. Die optische Kontaktwinkelmessung erfolgte bei jeder Probe bei 20 s nach dem Aufbringen

der Testflüssigkeit bei 23 °C und 50 % r. F.. Somit wurde die Oberflächenenergie nicht im Gleichgewichtszustand, sondern nach einer vorgegebenen und für die Messung praktikablen Zeit gemessen. Dies begründet sich aus der Tatsache, dass die Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen, je nach Zusammensetzung und Verarbeitung in den verwendeten Testflüssigkeiten, löslich sind. Daher kann kein Gleichgewichtszustand erreicht werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit keine absolute Oberflächenenergie, sondern eine nach vorgegebener Zeit ermittelte Oberflächenenergie, zum Zwecke des Vergleichs mehrerer Muster innerhalb einer Versuchsreihe, ermittelt. Durch Anwendung der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Methode nach Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (OWRK-Methode) wurde die Oberflächenenergie in polare und disperse Anteile aufgeteilt. Der Kontaktwinkel jeder Testflüssigkeit wurde an fünf unterschiedlichen Positionen je Probe wie oben beschrieben gemessen. Für jedes Folien- bzw. Beschichtungsmuster wurden fünf Proben vermessen (Fünffachbestimmung).

4.3.4 Untersuchung weiterer Eigenschaften

4.3.4.1 Messung der UV-Lichtdurchlässigkeit

Die UV-Lichtdurchlässigkeit im Wellenlängenbereich von 200 – 290 nm wurde mit dem Spectrophotometer Uvicon XL1 (BioTek, Winooski, USA) in Doppelbestimmung für die UV-quervernetzten Folien (vgl. Kapitel 4.2.6) ermittelt. Bei den Messungen wurde eine Ulbricht-Kugel verwendet, um Lichtstreuungsverluste bei der Messung zu minimieren.

4.3.4.2 Messung der Wasserdampfsorptionsisothermen

Die Wasserdampfsorptionsisothermen von Molkenprotein-basierten Folien wurden mit dem SPS Sorptionstestsystem SPS-1 μ High Load (ProUmid GmbH, Ulm, Germany) bei einer Temperatur von 23 °C gemessen. Aus den unterschiedlichen Musterfolien wurden dafür kreisrunde Proben mit einem Durchmesser von 25 mm ausgeschnitten. Diese werden in Tiegel mit bekannter Masse gegeben und während der Messung mit einer im SPS-1 μ High Load verbauten Präzisionswaage gewogen. Bei der Messung startet die relative Feuchte bei 0 % und wird in 10 % Schritten bis zu einer relative Feuchte von 90 % erhöht. Anschließend wurde die r. F. von 90 % wieder in 10 % Schritten auf 0 % abgesenkt. Die nächst höhere bzw. niedrigere Feuchtigkeitsstufe wird dann eingestellt, sobald sich bei der vorherigen Feuchtestufe Massenkonstanz eingestellt hat (die Gleichgewichtsfeuchte ist erreicht). Dies ist der Fall, wenn sich der Wert für die letzten 300 min um weniger als 0,002 mg/min verändert hat oder nach einer maximalen Messzeit von 3000 min. Die Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Des Weiteren wurde der Feuchtegehalt in den Molkenprotein-basierten Folien (Gleichgewichtsfeuchte bei 23 °C und 50 % r. F.) thermo-gravimetrisch mit den Waagen MA30 bzw. MA100C (Satorius AG, Göttingen) ermittelt. Hierfür wurden jeweils 0,5 g der Proben in Vierfachbestimmung bei einer Temperatur von 105 °C so lange getrocknet, bis Massenkonstanz (Massenänderung < 1 mg in 300 s) vorherrschte.

4.3.4.3 Bestimmung von Diffusions- und Sorptionskoeffizienten für Wasserdampf durch Sorptionsexperimente

Die Diffusionskoeffizienten (D) und die Sorptionskoeffizienten (S) für Wasserdampf wurden exemplarisch an ausgewählten Mustern von TG-quervernetzten Folien bestimmt. Hierfür wurden Folien mit 0,1 Unit und 1 Unit TG nach 1440 min Inkubationszeit sowie jeweils Referenzfolien ohne Inkubationszeit, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, hergestellt. Vor Beginn der Wasserdampfsorptionsmessungen wurden die Proben für 14 Tage bei 0 % r.F. und 23 °C getrocknet. Die Wasserdampfsorption wurde als Funktion der Zeit bei 50 % r.F. und 85 % r.F. bei 23 °C gravimetrisch gemessen. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Der relative Massenanteil von Wasser ($m_t \cdot m_\infty^{-1}$) wurde als Funktion der Wurzel der Zeit t , geteilt durch den Mittelwert der Dicke d , aufgetragen (siehe Abbildung 17). Aus dem Anstieg der Geraden (bei einem relativen von Massenanteil Wasser zwischen $\sim 0,1$ bis $\sim 0,6$) wurde nach Gleichung 5 (S. 22) der Diffusionskoeffizient berechnet. Der Sorptionskoeffizient wurde mit Gleichung 2 (S. 21) berechnet. Hierfür wurde die ermittelte Wasserkonzentration, bezogen auf das Trockenvolumen im Gleichgewicht, sowie die Dichte der Probe und der jeweilige Wasserdampfpartialdruck, verwendet. Durch Multiplikation von S und D wurde der Permeationskoeffizient berechnet (vgl. Gleichung 6, S. 22).

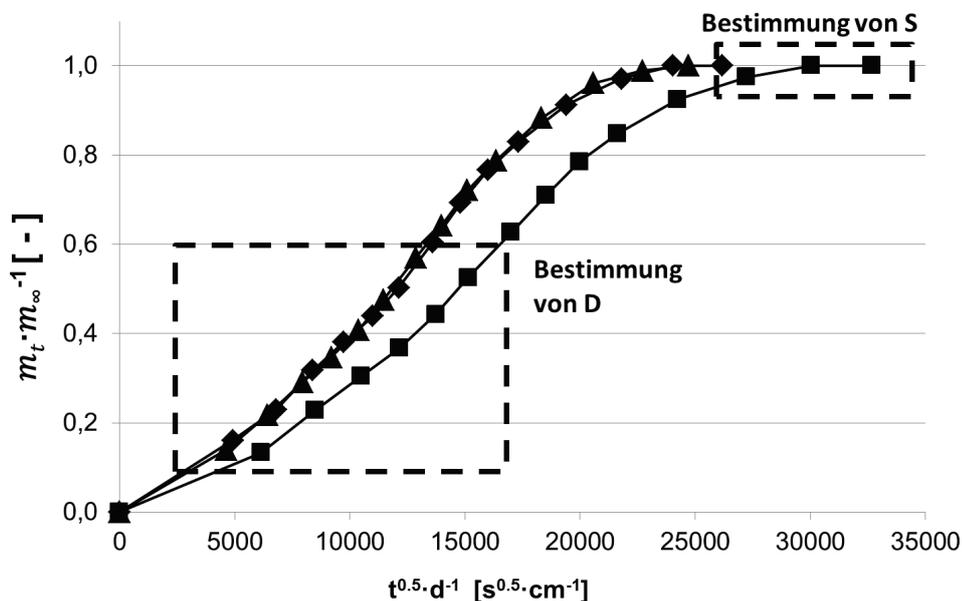


Abbildung 17: Massenanteil von Wasser als Funktion der Wurzel der Zeit geteilt durch den Mittelwert der Dicke. Adaptiert und übersetzt aus Schmid et al. (2014b)

4.4 Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen

Wie in Kapitel 3.3.1 ausführlich beschrieben, stellen Löslichkeitsuntersuchungen mit spezifisch spaltenden Puffersystemen und anschließendem Bradford-Assay eine Möglichkeit dar, intermolekulare Wechselwirkungen in Protein-basierten Folien und Be-

schichtungen zu identifizieren und zu quantifizieren. Dass diese Methode zudem an festen Folien und Beschichtungen angewendet werden kann, stellt einen großen Vorteil dar (Hammann und Schmid, 2014). Die theoretischen Grundlagen zu dieser Methode sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben. Die praktische Durchführung dieser Methode, welche an den in Kapitel 4.2.3, 4.2.4, 4.2.6 und 4.2.7 beschriebenen Mustern durchgeführt wurde, wird nachfolgend erläutert.

4.4.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick über die Chemikalien (Tabelle 12), die Materialien und Geräte (Tabelle 13), sowie über die Verbrauchsmaterialien (Tabelle 14), die für die Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen verwendet wurden.

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Chemikalien zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen

Chemikalien	Hersteller
Bio Rad Protein Assay Kit II	LECO Instrumente GmbH, Mönchengladbach
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Stickstoff (flüssig)	Linde AG, München
Thiourea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Urea	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 13: Übersicht der verwendeten Materialien und Geräte zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen

Materialien / Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Labormühle	ZM 100	F.Kurt Retsch GmbH & Co. KG, Haan
Pipetten	Eppendorf research	Eppendorf AG, Hamburg
Rührplatte	Magnetic emotion, mix control	2mag AG, München
Schüttler	Vibrofix VF1 Electronic	IKA ®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
Spektralphotometer	Specord ® 210 PLUS	Analytik Jena AG, Jena
Wasserbad	Memmert WNB 7-45	Memmert GmbH + CO KG, Schwabach
Waagen	Extend ED2202 S-CW	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge	Refrigerated Centrifuge 3K30	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode
Zentrifugenröhrchen	Polypropylene copolymer 50 ml	Nalgene ® Labware, USA

Tabelle 14: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen

Verbrauchsmaterialien	Bezeichnung	Hersteller
Küvetten-Rührstäbchen	Rührspatel, 120 mm, PS	Wagner & Munz GmbH, München
Küvetten	Ratiolab® Küvetten, Halbmikro PS	Ratiolab GmbH, Dreieich
Tubes	Safe-Lock Tubes 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg
	Safe-Lock Tubes 1,5 ml	
	Eppendorf Tubes 5,0 ml	

4.4.2 Durchführung der Lösungsversuche

4.4.2.1 Probenvorbereitung

Die Beschichtungen wurden am jeweiligen Versuchstag (für die Betrachtung des Einflusses der Lagerungszeit) bzw. nach min. 14 Tagen Lagerung von den PTFE-Trägersubstraten abgezogen und anschließend mittels einer Labormühle nach vorangegangenem Gefrieren mit Flüssigstickstoff zu einem homogenen Pulver gemahlen. Das Mahlen führt zu einer notwendigen Oberflächenvergrößerung, wodurch der Zugang für die Spaltungsreagenzien zu den Proteinketten erleichtert wird.

Molkenprotein-basierte Gießfilme wurden spätestens nach 14 Tagen aus den Petrischalen gelöst (vgl. 4.2.3). Die Gießfilme wurden in Stücke geschnitten und anschließend mit Flüssigstickstoff eingefroren und gemahlen.

4.4.2.2 Extraktion

Die Extraktion der Proben erfolgte durch Anwendung von fünf (Schmid et al., 2015e) bzw. sechs (Schmid et al., 2015c) verschiedenen Puffersystemen. Die Puffersysteme bestanden aus einer Kombination folgender Reagenzien: 0,1 M Phosphatpuffer (PP), 1 M Thiourea (TH), 50 mM Dithiothreitol (DTT) und 8 M Urea (U). Die Basis aller Puffersysteme war 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,5, hergestellt aus Natriumdihydrogenphosphat und Dinatriumhydrogenphosphat. Tabelle 15 zeigt die Zusammensetzung der verwendeten Puffersysteme.

Tabelle 15: Extraktionsmittelzusammensetzung

Nr.	Extraktionssystem	Phosphatpuffer (PP)	Urea (U)	Thiourea (TH)	DTT (D)
1	PP	+	-	-	-
2	IEF-U-D	+	-	+	-
3	IEF-U	+	-	+	+
4	IEF-D	+	+	+	-
5	IEF-TH	+	+	-	+
6	IEF	+	+	+	+

Die o.g. Reagenzien spalten spezifisch molekulare Wechselwirkungen, wodurch der Beitrag von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen zur Filmstabilisierung für Mol-

kenprotein-basierte Folien und Beschichtungen qualitativ abgeschätzt werden kann. Durch den Phosphatpuffer (PP) kann zudem eine erfolgreiche Denaturierung nachgewiesen werden, da native Proteine in Phosphatpuffer (PP) löslich sind, aber denaturierte Proteine aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen nicht. Durch die Anwendung verschiedener Reagenzien bei der Extraktion (Tabelle 16) können unterschiedliche Bindungen gespalten werden (Details siehe Kapitel 3.3.1).

Tabelle 16: Verwendete Extraktionsmittel und deren spezifisch spaltende Wirkung

Spezifische Wechselwirkungen	Spaltendes Reagenz
Native Proteinstruktur	Phosphatpuffer (PP)
Hydrophobe Wechselwirkungen	Thiourea (TH)
Disulfidbrückenbindungen	Dithiothreitol (DTT) bzw. (D)
Wasserstoffbrückenbindungen	Urea (U)

Somit spaltet der IEF-U-D Puffer, Thiourea (TH) enthaltend, hydrophobe Wechselwirkungen. Urea kann Wasserstoffbrückenbindungen lösen und das reduzierende DTT kann Disulfidbrückenbindungen spalten. IEF-U ist eine Kombination zweier Reagenzien: DTT zu Spaltung von Disulfidbrückenbindungen und TH zum Lösen hydrophober Wechselwirkungen. IEF-D enthält U und TH und spaltet somit Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkung. Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrückenbindungen werden durch den IEF-TH Puffer gespalten. Zudem wurde ein isoelektrischer Fokussierungs-Puffer (IEF) eingesetzt, der alle vier Reagenzien enthält und nach Liu und Hsieh (2007) in der Lage sein sollte, alle o.g. molekularen Wechselwirkungen in Protein-basierten Folien und Beschichtungen spalten zu können.

Für die Extraktion wurden jeweils 0,5 g der gemahlten Proben in sechs 100 ml DURAN® Laborgläser eingewogen und 10 ml (Schmid et al., 2015e) bzw. 20 ml (Schmid et al., 2015c) des jeweiligen Extraktionsmittel hinzugefügt. Die Laborgläser wurden bei 25 °C für 2,5 Stunden in ein temperiertes Wasserbad gestellt, um die Proteine bei kontinuierlichem Rühren zu lösen. Nach der Extraktion wurden in einer Laborzentrifuge die Proteinsuspensionen für 15 Minuten bei 20 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels nachfolgend beschriebenen Bradford-Assay verwendet. (Schmid et al., 2015c, Schmid et al., 2015f)

4.4.2.3 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay ist eine schnelle und empfindliche photometrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösungen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass die Anwesenheit von Proteinen zu einer Farbveränderung des Farbreagenz Coomassie-Brillant-Blau führt. Durch diesen Farbumschlag kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm. (Bradford, 1976, Compton und Jones, 1985)

Die Methode wurde für einen Proteinkonzentrationsbereich von 5-20 µg/ml angepasst. Eine Kalibrierungsgerade mittels einer Serumalbumin(BSA)-Standardlösung wurde vor jeder Messreihe erstellt. BSA-Standardprotein wurde mit 20 ml destillierten Wasser verdünnt, sodass sich eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1,45 mg/ml ergab. Die Stammlösung wurde in 1,5-ml-Tubes gefüllt und bei -25 °C bevorratet. Die BSA-Standardlösung wurde auf 20 µg/ml mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde dunkel bei 8 °C gelagert und maximal bis zu einer Woche nach ihrer Herstellung verwendet. Die für die Bestimmung der Kalibrierkurve notwendigen Konzentrationen von 5, 10, 15 µg/ml wurden durch Verdünnen mit destilliertem Wasser aus der Standardlösung mit 20 µg/ml hergestellt.

Die Molkenproteinextrakte wurden mit destilliertem Wasser so verdünnt, dass eine Messung innerhalb des Kalibrierungsbereichs möglich war. Zu 0,8 ml der verdünnten Proteinextrakte wurden 0,2 ml Farbreagenz Coomassie-Brillant-Blau in die Küvetten pipettiert, um die Farbreaktion zu starten. In einem Einweg-Küvettenrührer wurden die Proben für 20 min bei 23 °C inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz wurde Luft gemessen. Alle Messungen wurden als Sechsfachbestimmungen durchgeführt.

4.4.2.4 Proteinbestimmung nach Dumas

Zur Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen wurde die im vorhergegangenen Kapitel beschriebene Methode verwendet. Um aber den Proteingehalt in der Trockenmasse der Proben zu messen, wurde der Stickstoffgehalt der Proben nach der Methode von Dumas bestimmt. Die Dumas-Methode wird oft als Alternative zur Kjeldahl-Methode zur Proteingehaltsbestimmung verwendet (Jung et al., 2003). Die Proben wurden in Keramiktiegel eingewogen und die Messungen, wie in Schmid et al. (2015c) und Schmid et al. (2015e) beschrieben, durchgeführt. Der Proteingehalt wurde durch Multiplikation des ermittelten Stickstoffgehalts (Massenprozent) mit dem Faktor 6,25 berechnet.

Um die Proteinlöslichkeit LP nach Gleichung 26 zu berechnen, musste der Proteingehalt auf die Trockensubstanz (TS) bezogen werden. Hierfür wurde der Wassergehalt der gemahlten Proben mit dem thermogravimetrischen Analysengerät LECO TGA 601 (LECO Corporaton, Saint Josep) bestimmt und der Trockensubstanzgehalt berechnet.

Gleichung 26: Berechnung der Proteinlöslichkeit (Schmid et al., 2015c, Schmid et al., 2015e)

$$LP [-] = \frac{\text{Lösliche Proteine } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}\right] * V (\text{Extraktionslösung})[\text{ml}] * \frac{1}{VF}}{M (\text{Probe})[\text{g}] * \text{Protein auf TS berechnet } \left[\frac{\mu\text{g}}{\text{g}}\right]}$$

M = Masse

TS = Trockensubstanz

V = Volumen

VF = Verdünnungsfaktor

Ergänzend zu den Lösungsversuchen mit unterschiedlichen Puffersystemen zur Ermittlung der molekularen Wechselwirkungen, wurde an ausgewählten Mustern (vgl. Kapitel 4.2.4) der Massenanteil an wasserlöslichen Fraktionen in den Molkenprotein-basierten

Mustern mit unterschiedlichen Denaturierungsgraden ermittelt. Diese gravimetrische Methode ist in Schmid et al. (2014a) ausführlich beschrieben.

4.5 Bestimmung des Quellgrades – DoS

Der DoS verhält sich auch bei Proteinfilmern umgekehrt proportional zum Grad der Quervernetzung bzw. Vernetzungsgrad (engl. degree of crosslinking –DoC) und wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet, um Rückschlüsse auf den DoC und dessen Einfluss auf die mechanischen und Barriereigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien zu untersuchen. Die theoretischen Grundlagen hierzu sind in Kapitel 3.3.2 erläutert.

Der Grad der Quellung (DoS) wurde in Anlehnung an die DIN EN ISO 175:2000 bestimmt (vgl. 3.3.2.). Hierfür wurden die Molkenprotein-basierten Folien auf eine Größe von 50 mm x 50 mm zugeschnitten. Die bei 23 °C und 50 % relativer Feuchte gelagerten Filme wurden gewogen (m_1), bevor sie in ein Probengefäß gegeben wurden, welches mit 200 ml destilliertem Wasser befüllt war. Somit entspricht die verwendete Füllmenge den in der DIN EN ISO 175:2000 vorgegebenen 8 ml an Quellmedium pro cm² Probenfläche. Die verschlossenen Gefäße wurden für 24 Stunden bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. Nach der Quellung wird die Masse der Probe mit einer Präzisionswaage bestimmt (m_2). Die Proben wurden dann bei 65 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet, wobei die Masse der getrockneten Folien (m_3) in regelmäßigen Abständen mit einer Präzisionswaage bestimmt wurde. Die Versuche wurden in Fünffachbestimmung durchgeführt.

4.6 Bestimmung von Vernetzungsgrad und –dichte

Wie ausführlich in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wird der Vernetzungsgrad (DoC) über die Gleichung 21 (S. 35) und die Vernetzungsdichte (CLD) über die Gleichung 22 (S. 36) berechnet. Hierfür wird das durchschnittliche Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen (M_c), welches über die Flory-Rehner-Gleichung (Gleichung 23, S. 36) berechnet werden kann, benötigt. In der Flory-Rehner-Gleichung zur Berechnung von M_c werden allerdings der Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ und der Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel φ_1 benötigt, welche mit den folgend beschriebenen Methoden bestimmt wurden.

Zur Berechnung des Flory-Huggins Wechselwirkungsparameters wurden zunächst aus der Doppelbestimmung der Wasserdampfsorptionsisotherme (vgl. Kapitel 4.3.4.2) der Mittelwert aus den resultierenden Gleichgewichtsmassen pro Feuchteschritt ermittelt. Anschließend wird für jede Feuchtegleichgewichtsmasse die Massenzunahme (Δm) im Vergleich zur Feuchtegleichgewichtsmasse bei 0 % relativer Feuchte berechnet. Mit Hilfe von Δm wird unter der Annahme, dass bei 0 % Feuchte lediglich reines WPI vorliegt mit Gleichung 27 die Masse des Wassers in der Probe berechnet.

Gleichung 27: Bestimmung des Wassergehalts der Proben aus Sorptionsisothermen

Masse des Wassers	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$m_{H_2O} = m_{WPI} - \Delta m$	m_{WPI}	Masse des Polymers im gequollenem Gel	[g]
	m_{H_2O}	Masse des Wassers im gequollenem Gel	[g]
	Δm	Massenzunahme	

Nun kann mit Gleichung 24 (S. 37) der Polymervolumenanteil im gequollenem Gel φ_1 berechnet werden. Hiermit wurde durch Anwendung der Flory-Huggins Gleichung (Gleichung 25, S. 37) der a_w -Wert berechnet. Danach wurde für jeden Feuchteschritt die Differenz aus dem berechneten und dem gegebenen a_w -Wert gebildet. Diese Werte wurden quadriert und aufsummiert. Somit erhält man das Fehlerquadrat der Differenz zwischen theoretischem und berechnetem a_w -Wert. Der Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ wurde anschließend bestimmt, indem man die Flory-Huggins-Gleichung (Gleichung 24, S. 37) mit der Kleinstquadratmethode an die gemessenen Wasserdampfsorptionsisothermen anpasst. Hierfür wurde das Excel-Solver-Werkzeug (Microsoft Office Professional Plus 2010, Microsoft, Redmond, Washington, USA) verwendet.

Mit dem so ermittelten Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ wurde nun über die Flory-Rehner Gleichung (Gleichung 23, S. 36) das durchschnittliche Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen (M_c) berechnet. Somit sind nun alle Informationen verfügbar und der Vernetzungsgrad (DoC) wurde entsprechend über Gleichung 21 sowie die Vernetzungsdichte (CLD) über Gleichung 22 (S. 36) berechnet.

4.7 Statistische Methoden

4.7.1 Test auf Normalverteilung

Die Messergebnisse wurden bei einer Probenanzahl von $3 < 5$ mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest und bei einer Probenanzahl ≥ 5 mit dem Anderson-Darling-Test auf Standardnormalverteilung geprüft. Es wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 gewählt. Hierfür wurde die Software Visual XSel 12.1 (CRGraph, München) verwendet. (Ronniger, 2013)

4.7.1.1 Kolmogorov-Smirnow-Anpassungstest

Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde u.a. der Kolmogorov-Smirnow-Test (K-S-Test), welcher besonders gut geeignet ist, um bei kleinen Stichprobenumfängen Abweichungen von der Normalverteilung aufzudecken, verwendet. Die Nullhypothese H_0 des Kolmogorov-Smirnow-Anpassungstest lautet:

H_0 : Die Werte der Stichprobe sind normalverteilt.

Der maximale Differenzwert aus dem Vergleich der relativen Summenhäufigkeit wird als Prüfwert T_x für jeden Wert verwendet.

Gleichung 28: Prüfwert T_x im Kolmogorov-Smirnow-Anpassungstest

Prüfwert T_x	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$T_x = \max H_B - H_E $	T_x	Prüfgröße	[-]
	H_B	beobachtete Häufigkeit	[-]
	ΔH_E	erwartete Häufigkeit	[-]

Die erwarteten Summenhäufigkeiten können durch eine Klassifizierung der Daten bestimmt werden. Der in einschlägigen Tabellenwerken vorhandene kritische Wert T_{Cr} wird mit T_x verglichen. Ist T_{Cr} größer als T_x , kann die Nullhypothese auf dem gewählten Signifikanzniveau nicht abgelehnt und somit eine Normalverteilung der gemessenen Werte angenommen werden. (Ronniger, 2013)

4.7.1.2 Anderson-Darling-Test

Die Nullhypothese, welche bei Anwendung des Anderson-Darling-Tests überprüft wird, unterstellt, dass die Proben Teil einer normalverteilten Grundgesamtheit sind. Eine Klassifizierung der gemessenen Werte ist im Gegensatz zum K-S-Test nicht nötig. Der Anderson-Darling-Test ist ab einer Stichprobenanzahl ≥ 5 geeignet. (Ronniger, 2013)

4.7.2 Prüfung auf Ausreißer

Der Hampel-Ausreißer-Test wurde genutzt, um Ausreißer in auffälligen Datensätzen zu identifizieren. Diese wurden dann bei weiteren Berechnungen nicht berücksichtigt, wobei die als Ausreißer identifizierten Messwerte dokumentiert sind. Der Hampel-Ausreißer-Test arbeitet mit den Größen Median und absolute Abweichung vom Median (Pearson, 2002). Nähere Details zur Vorgehensweise werden von Kölling (2001) beschrieben. Der Hampel-Ausreißer-Test wurde mit der Statistiksoftware Visual XSel 12.1 (CRGraph, München) unter Anwendung eines Signifikanzniveaus von 0,05 durchgeführt.

4.7.3 Prüfung auf Mittelwertunterschied

Mit dem sog. Student's t-Test (t-Test) wurde geprüft, ob statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von zwei Probenreihen vorliegen. Der Test setzt eine Varianzhomogenität der Stichproben voraus. Deshalb wurden vor der Durchführung alle Varianzen auf einen signifikanten Unterschied (Signifikanzwert: 0,05) getestet. Eine weitere Voraussetzung für den t-Test ist die Normalverteilung aller Datenreihen, was wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, geprüft wurde. Da im Rahmen dieser Arbeit meist mehr als zwei Datensätze miteinander verglichen werden mussten, wurde ein Multi-t-Test durchgeführt. Dieser führt mehrere t-Tests gleichzeitig durch und vergleicht immer zwei Datensätze miteinander. Hierfür wurde die Software Visual XSel 12.1 (CRGraph, München) verwendet. Als Signifikanzniveau p wurde 0,05 festgelegt. (Adamek, 2015, Ronniger, 2013, Harris et al., 2007)

5 Ergebnisse und Diskussion

Auf dem in Kapitel 3 zusammengefassten aktuellen Stand des Wissens aufbauend, zielt die vorliegende Dissertation darauf ab zu beantworten, inwiefern und in welchem Ausmaß

- das Ausgangsmolekulargewicht (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht),
- der Denaturierungsgrad (Rezeptur / Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad),
- eine Transglutaminase-induzierte Quervernetzung (biochemische Vernetzung mittels Transglutaminase (TG) bei der Verarbeitung bzw. Herstellung der Formulierungen) und
- eine UV-Bestrahlung (Nachbehandlung / Quervernetzung der Folien durch UV-Strahlung)

die molekularen Wechselwirkungen sowie die physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat (WPI)-basierten Folien und Beschichtungen beeinflussen. Des Weiteren wurden Untersuchungen zu Eigenschaften, wie Permselectivität und Aktivierungsenergie der Gaspermeation (N_2 , O_2 , CO_2), feuchteabhängige Sauerstoffpermeation und Nachvernetzungs kinetik durchgeführt. Letzteres ist auch insbesondere hinsichtlich der zeitlich geeigneten Probencharakterisierung von entscheidender Bedeutung, da eine zu kurze Lagerung der Proben – d.h. bei nicht vollständig abgeschlossener Nachvernetzung – zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen könnte. Deshalb werden in diesem Kapitel zuerst die Ergebnisse zur Nachvernetzung dargestellt und diskutiert, gefolgt von den Ergebnissen zu den weiteren o.g. wissenschaftlichen Fragestellungen. Hierbei werden in den jeweiligen Unterkapiteln zuerst die Ergebnisse der ermittelten molekularen Wechselwirkungen dargestellt. Anschließend werden die verpackungsrelevanten Eigenschaften aufgeführt und u.a. anhand der ermittelten molekularen Wechselwirkungen diskutiert. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse zu Prozess- Formulierungs- molekulare Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen generiert werden.

5.1 Einfluss der Lagerungszeit auf die molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Lagerungszeit von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen auf die molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen untersucht. Erstaunlicherweise wird in zahlreichen wissenschaftlichen Publikationen davon ausgegangen, dass bereits sehr kurze Zeit nach der Herstellung konstante Eigenschaften vorliegen. So wurden u.a. Molkenprotein-basierte Beschichtungen und Folien bereits 18 Stunden (Hong und Krochta, 2003, Hong und

Krochta, 2004) bzw. 24 Stunden (Díaz et al., 2016) oder auch 3 und 7 Tage (Díaz et al., 2017, Guckian et al., 2006) nach deren Herstellung auf deren funktionelle und/oder molekulare Eigenschaften untersucht. Dabei zeigten Vorversuche im Rahmen dieser Arbeit, dass sich die Sauerstoffpermeationseigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien noch bis zu 14 Tage nach deren Herstellung verändern. Aus diesem Grund wurden hierzu systematische Lösungsversuche durchgeführt, um erstmals die qualitativen Veränderungen der molekularen Wechselwirkungen während der Lagerungszeit zu ermitteln und mit den veränderten Eigenschaften (hier: Sauerstoffdurchlässigkeit) zu korrelieren sowie um notwendige Informationen u.a. hinsichtlich der zeitlich geeigneten Probencharakterisierung zu erlangen. Offenbar birgt eine zu kurze Lagerung der Proben – also u.a. eine nicht vollständig abgeschlossene Nachvernetzung – die Gefahr von Fehlinterpretationen der ermittelten Ergebnisse. Obwohl bei manchen Messmethoden (wie z.B. bei der Permeationsmessung) der stationäre Zustand des Messsignals abgewartet wird, so könnten dennoch einige Messungen, insbesondere zu den molekularen Wechselwirkungen durch Quell- und/oder Lösungsversuche, fehlinterpretiert werden. Zudem erschien eine systematische Untersuchung zur Ausbildung der unterschiedlichen molekularen Wechselwirkungen direkt nach der Filmherstellung schon alleine deshalb interessant, um neue Erkenntnisse über die Nachvernetzungs-kinetik von Molkenprotein-basierten Folien zu erlangen.

5.1.1 Veränderung der molekularen Wechselwirkungen während der Lagerungszeit

5.1.1.1 Qualifizierung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit der Lagerungszeit

Da im Rahmen von Vorversuchen die Sauerstoffdurchlässigkeitsmessungen in Abhängigkeit der Lagerungszeit ergaben, dass es erst 14 Tage nach der Folien- bzw. Beschichtungsherstellung zu keiner weiteren Abnahme der Sauerstoffpermeabilität kommt, wurde eine Messdauer von 14 Tagen für die Lösungsversuche gewählt. Es kann angenommen werden, dass die Nachvernetzung innerhalb dieses Zeitraums abgeschlossen ist (Schmid et al., 2015f, Schmid et al., 2015e, Schmid et al., 2015d).

Wie in Kapitel 3.3.1 und Kapitel 4.4 beschrieben, wurde die unterschiedliche Löslichkeit der Proben in Puffersystemen (siehe Tabelle 16), welche spezifisch molekulare Wechselwirkungen spalten, genutzt, um die Ausbildungen molekularer Wechselwirkungen (Definition siehe Kapitel 3.1.4.1) in Abhängigkeit von der Lagerungszeit zu qualifizieren. In Abbildung 18 ist die Löslichkeit von Molkenproteinisolat-basierten Folien in den verwendeten Puffersystemen in Abhängigkeit der Lagerungszeit dargestellt. Im Phosphat-Puffersystem (PP) zeigen alle Muster eine sehr geringe Löslichkeit. Da PP keine molekularen Wechselwirkungen spaltet, kann gefolgert werden, dass die meisten Polypeptide durch kovalente und nicht-kovalente Bindungen infolge der Proteindenaturierung in das aus ihnen gebildete Proteinnetzwerk eingebaut sind. Im IEF-U-D Puffer, welcher die hydrophoben Wechselwirkungen löst, waren die Muster auch über den gesamten Lagerungszeitraum kaum löslich. Daraus kann abgeleitet werden, dass nur

ein kleiner Anteil der Polypeptidketten ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen im Netzwerk eingebunden ist. Da die Molkenproteinketten mehrere funktionelle Gruppen enthalten, welche unterschiedliche kovalente und nichtkovalente Bindungen eingehen können, war dies zu erwarten. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, dass Polypeptide nur durch eine einzige Wechselwirkungsart in das Proteinnetzwerk eingebunden sind. Die geringe Löslichkeit im IEF-U-D Puffer, welcher hydrophobe Wechselwirkungen löst, schließt trotzdem nicht aus, dass hydrophobe Wechselwirkungen in Kombination mit anderen Wechselwirkungen einen Beitrag zur Stabilisierung des Proteinnetzwerkes leisten.

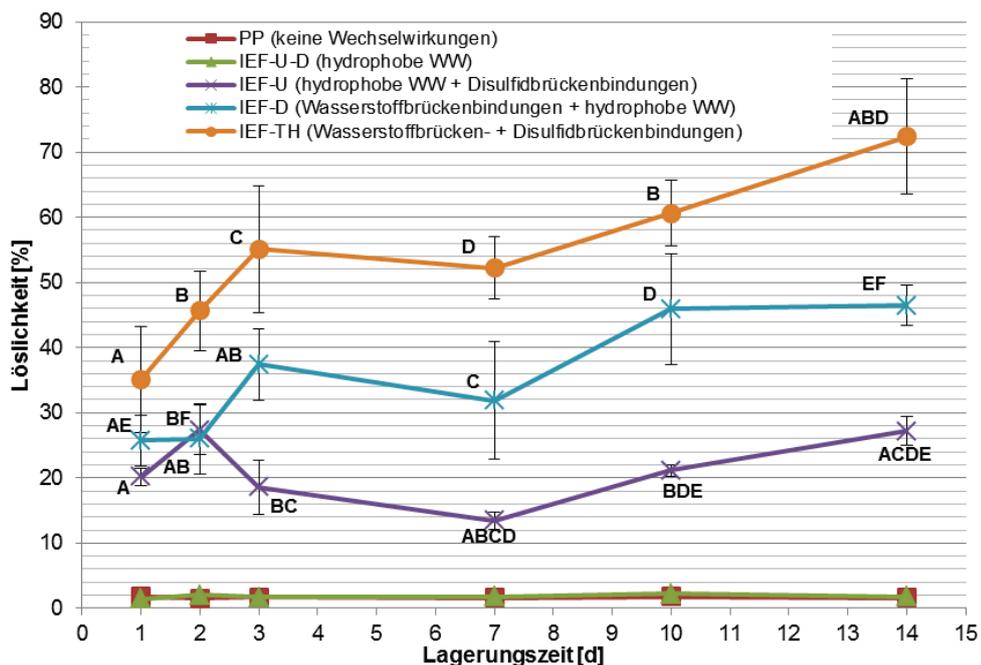


Abbildung 18: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien in verschiedenen Puffersystemen über die Lagerungszeit. (Bei gleichen Buchstaben besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten Mittelwerten ($p < 0,05$) innerhalb eines Puffersystems). Übersetzt aus Schmid et al. (2015e)

Die charakterisierten Proben zeigten im IEF-U Puffer eine signifikant höhere Löslichkeit als im PP und IEF-U-D Puffer. Da das IEF-U Puffersystem sowohl hydrophobe Wechselwirkungen löst als auch Disulfidbrückenbindungen spaltet, kann gefolgert werden, dass die Kombination aus diesen beiden Wechselwirkungen bedeutsam für die Netzwerkstabilisierung ist. Die Proteinlöslichkeit im IEF-U Puffer war jedoch nicht konstant über die Lagerungszeit, was darauf schließen lässt, dass der Beitrag dieser Wechselwirkungen im Polymernetzwerk mit der Lagerungszeit variiert. Zwischen Tag eins, zwei und drei war kein statistisch signifikanter Unterschied der Löslichkeit im IEF-U Puffer messbar. Das bedeutet, dass der Anteil an Proteinen, der über hydrophobe Wechselwirkungen und Disulfidbrückenbindungen eingebunden ist, konstant bleibt, obwohl in diesem Zeitfenster noch eine höhere Mobilität der Proteinketten gegeben sein könnte. Von Tag drei bis Tag sieben sank die Löslichkeit signifikant. Da der Energieeintrag

während der Lagerung, z.B. durch Wärme, nicht ausreicht um kovalente Bindungen zu spalten, kann vermutet werden, dass die gesunkene Löslichkeit durch einen reduzierten Beitrag von hydrophoben Wechselwirkungen bedingt ist. Ab Tag sieben ist ein signifikanter Löslichkeitsanstieg zu beobachten. Dies weist auf einen zunehmenden Beitrag von hydrophoben Wechselwirkungen und Disulfidbrückenbindungen hin und führt zu einer geringeren Beweglichkeit der Polypeptidketten. Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass ein erheblicher Anteil der Proteine über Disulfidbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verbunden ist. Hierbei wird den hydrophoben Wechselwirkungen eine geringere Bedeutung für den Filmbildungsprozess zugeschrieben, was auch übereinstimmend von mehreren Forschungsgruppen berichtet wurde (McHugh et al., 1994, Perez-Gago et al., 1999, Le Tien et al., 2000, Barone et al., 2006, Hernandez-Izquierdo und Krochta, 2008).

Im IEF-D Puffer wurde innerhalb der ersten Tage nach der Folienherstellung ein signifikanter Anstieg der Löslichkeit festgestellt. Dieses Puffersystem löst hauptsächlich nicht-kovalente Bindungen. Ab Tag sieben konnte keine weitere signifikante Veränderung beobachtet werden. Der anfängliche Anstieg der Löslichkeit im IEF-D Puffersystem impliziert einen steigenden Anteil an Polypeptiden, die weitestgehend über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen verbunden sind. Da es zu keiner Abnahme der Löslichkeit nach Tag drei kam, kann die Annahme getroffen werden, dass nach dem Beschichtungsprozess nur wenige intermolekulare Disulfidbrückenbindungen ausgebildet werden. Das Fehlen eines geeigneten Reaktionspartners in der Umgebung einer freien Thiolgruppe oder die Bildung intramolekularer Bindungen könnte ein Grund hierfür sein. Außerdem fällt auf, dass die Proteinlöslichkeit im IEF-D Puffer größer ist als im IEF-U Puffer und somit ein signifikanter Anteil der Polypeptide über nicht-kovalente Bindungen im Polymernetzwerk eingebunden ist. (Schmid et al., 2015e)

Nur im IEF-TH-Puffer wurde ein konstanter Anstieg der Proteinlöslichkeit über die gesamte Lagerungszeit gemessen. Da dieser Puffer Wasserstoffbrückenbindungen löst und Disulfidbrückenbindungen spaltet, kann daraus abgeleitet werden, dass die Bedeutung der Kombination dieser beiden Wechselwirkungen über die Lagerungszeit ansteigt. Die insgesamt höhere Proteinlöslichkeit in diesem Puffersystem im Vergleich zu den anderen Puffersystemen deutet darauf hin, dass die meisten Polypeptide über diese Wechselwirkungen in das Proteinnetzwerk eingebunden sind. Da die Löslichkeitsergebnisse des IEF-D-Puffers zeigten, dass eine Nachvernetzung durch Disulfidbrückenbindungen innerhalb der ersten zwei Tage nahezu abgeschlossen ist, kann der Anstieg der Proteinlöslichkeit auf eine zunehmende Bedeutung von Wasserstoffbrückenbindungen während der Lagerung zurückgeführt werden. Diese Hypothese wird durch die Primärstruktur der beiden Hauptproteinfraktionen in Molkenprotein bekräftigt. β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin enthalten nur fünf bzw. acht Thiolgruppen, wohingegen der Gehalt an polaren Aminosäuren, die geeignet sind Wasserstoffbrücken auszubilden, signifikant höher ist (Sienkiewicz, 1981a, Sienkiewicz, 1981b). Daher ist in einem Proteinnetzwerk, mit sehr eingeschränkter Beweglichkeit der Molekülketten die statistische Wahrscheinlichkeit um ein vielfaches höher, dass hydrophile Aminosäuren

Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden, als dass die wenigen Cysteine Disulfidbrückenbindungen bilden.

Ciannamea et al. (2015) untersuchten ebenso die Veränderung der funktionellen Eigenschaften von Proteinfohlen über die Lagerungszeit. Allerdings untersuchten sie Sojaproteinkonzentrat-basierte Folien über eine Lagerungszeit von 90 Tagen. Hierbei wiesen sie nach, dass hauptsächlich nicht-elektrostatische Wechselwirkungen das Polymernetzwerk stabilisieren (d.h. alle Wechselwirkungen, mit Ausnahme von elektrostatischen Wechselwirkungen, stabilisieren das Polymernetzwerk). Bei einer Lagerung von 90 Tagen war die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrückenbindungen über Lösungsversuche nachweisbar.

Basierend auf diesen Ergebnissen kann zusammenfassend gefolgert werden, dass Wasserstoffbrückenbindungen die vorherrschenden Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien sind. Zudem scheint die Bedeutung dieser Bindungen über den betrachteten Lagerungszeitraum zu steigen. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass nicht nur die reine Quantität der intermolekularen Wechselwirkungen für die Stabilisierung des Proteinnetzwerks und damit für die Folieneigenschaften ausschlaggebend ist, sondern auch die Bindungsenergien berücksichtigt werden müssen. Denn wenige, aber starke kovalente intermolekulare Wechselwirkungen sind sicherlich von großer Bedeutung für die Netzwerkstabilisierung, wie in mehreren unabhängigen Studien übereinstimmend berichtet wurde (McHugh et al., 1994, Bryant und McClements, 1998, de la Fuente et al., 2002, Foegeding et al., 2002). Daraus kann gefolgert werden, dass durch die Modifikation von starken kovalenten intermolekularen Wechselwirkungen die Netzwerkstabilität gezielt beeinflusst werden kann (Zink et al., 2016).

5.1.1.2 Quantifizierung der Vernetzung von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der Lagerungszeit

Zur Quantifizierung der Vernetzung von Folien aus der Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) in Abhängigkeit der Lagerungszeit wurden Muster, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, hergestellt. Die Methodologie zur Bestimmung des Grades der Quellung (DoS) ist in Kapitel 4.5, die zur Bestimmung von Vernetzungsgrad (DoC) und -dichte (CLD) ist in Kapitel 4.6 beschrieben. Die ermittelten Ergebnisse zu DoS in Abhängigkeit der Lagerungszeit (Tag 1 – 14) sind in nachfolgender Abbildung dargestellt (Abbildung 19).

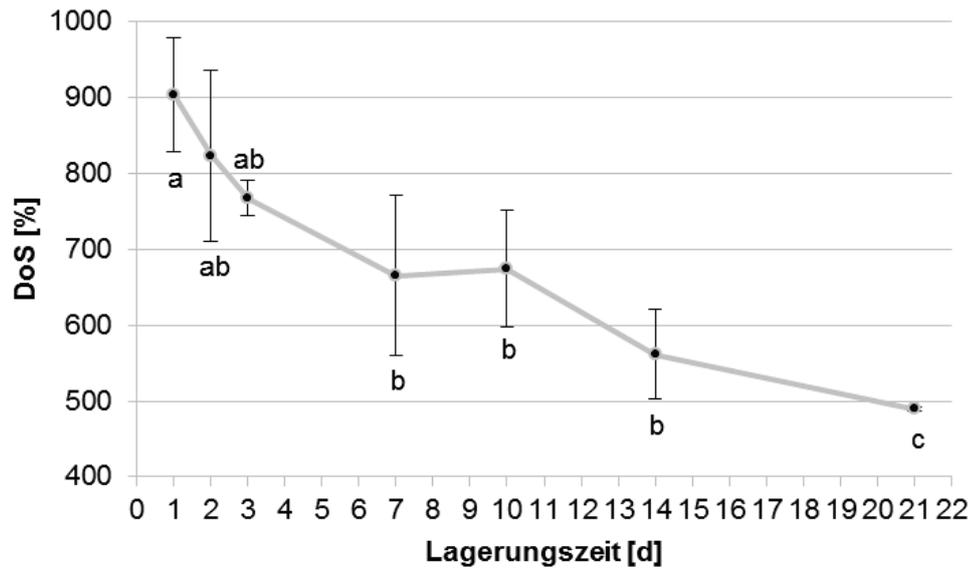


Abbildung 19: DoS in Abhängigkeit der Lagerungszeit (Unterschiedliche Buchstaben bedeuten, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten besteht)

Der DoS sinkt signifikant während der Lagerzeit, was auf eine Nachvernetzung der Molkenprotein-basierten Folien zurückzuführen ist. Das Ausmaß der Nachvernetzung zeigt sich auch durch den steigenden DoC und die steigende CLD, welche in nachfolgender Abbildung in Abhängigkeit der Lagerungszeit dargestellt sind (Abbildung 20):

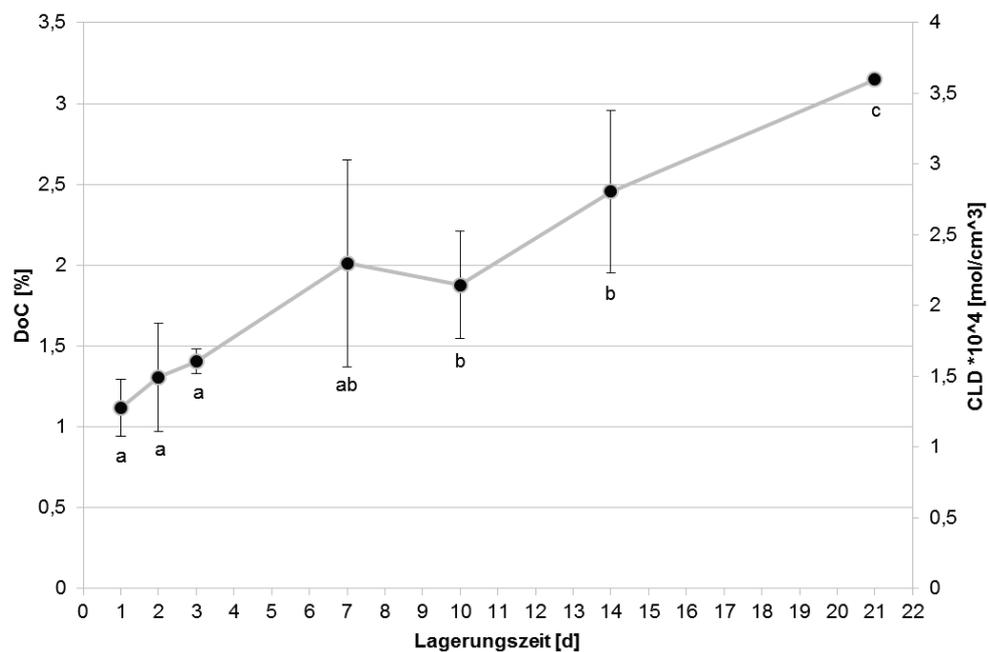


Abbildung 20: DoC und CLD in Abhängigkeit der Lagerungszeit (Unterschiedliche Buchstaben bedeuten, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten besteht)

Der DoC und die CLD steigen signifikant über die Lagerungszeit. Dies korreliert wiederum mit der sinkenden Sauerstoffdurchlässigkeit, welche in nachfolgendem Kapitel 5.1.2 erörtert wird.

5.1.2 Veränderung der Sauerstoffdurchlässigkeit während der Lagerungszeit

Zur Ermittlung der Veränderung der Sauerstoffdurchlässigkeit durch Molkenprotein-basierte Beschichtungen während der Lagerungszeit wurden die Proben, wie in Kapitel 4.2.8 beschrieben, hergestellt (beschichtet auf CPP, Cast Polypropylen) und wie in Kapitel 4.3.1.2 beschrieben, untersucht. Abbildung 21 zeigt, dass eine inverse Korrelation zwischen der Sauerstoffdurchlässigkeit und der Lagerungszeit besteht. Für beide durchgeführten Testreihen konnte eine starke Abnahme der Sauerstoffdurchlässigkeit von bis zu 80 % innerhalb der ersten Lagerungswoche festgestellt werden (vgl. Abbildung 21). In den darauf folgenden Tagen sank die Durchlässigkeit weiter. Es kam lediglich zu sehr geringen Gewichtsveränderungen (-0,1 % bei Probe 1 und +0,16% bei Probe 2) und somit zu vernachlässigbaren Veränderungen des Wassergehalts der Proben während der Lagerungszeit.

Die stetig abnehmenden Sauerstoffdurchlässigkeitswerte innerhalb der ersten zwei Wochen nach Beschichtungsherstellung zeigen an, dass es während der Lagerung zu strukturellen Veränderungen kommt.

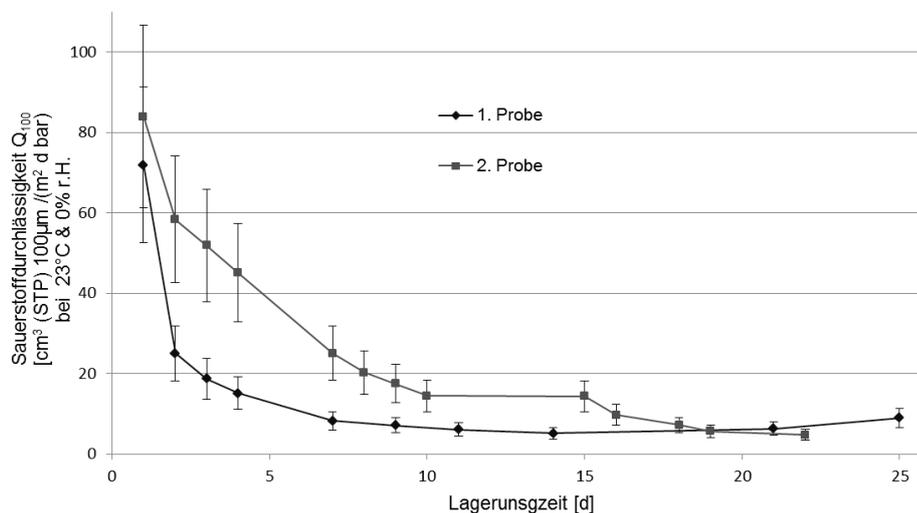


Abbildung 21: Zeitabhängige Sauerstoffdurchlässigkeit durch Molkenprotein-basierte Beschichtung; Fehlerbalken zeigen die relative Fehlerwahrscheinlichkeit von 27 % der Messmethode nach der Validierung durch Becker (1982). Übersetzt aus Schmid et al. (2015e)

Es kann angenommen werden, dass die Sauerstoffdurchlässigkeit mit der zunehmenden Ausbildung an intermolekularen Wechselwirkungen, welche die Nachvernetzung durch sowohl kovalente Disulfidbrücken, aber auch nichtkovalente hydrophobe Wech-

selwirkungen und Wasserstoffbrücken einschließen, abnimmt. Durch Kombination der Ergebnisse aus den Lösungsversuchen und den ermittelten Vernetzungskennzahlen kann gezeigt werden, dass die verschiedenen molekularen Wechselwirkungen einen unterschiedlichen Einfluss während der Phasen der Lagerungszeit haben. Hierdurch könnte der starke Abfall der Sauerstoffdurchlässigkeit innerhalb der ersten drei bis fünf Tage der Lagerungszeit durch eine frühe Bildung von Disulfidbrückenbindungen zu einem Zeitpunkt von großer Beweglichkeit der Polymerketten erklärt werden. Diese Hypothese wird durch eine konstante Proteinlöslichkeit im IEF-D Puffersystem (Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen lösend) während der ersten zwei Lagerungstage im Vergleich zur zunehmenden Löslichkeit im IEF-TH und IEF-U Puffersystem gestützt. Auch Wasserstoffbrückenbindungen werden erwartungsgemäß innerhalb der ersten Lagerungstage ausgebildet, was durch die Zunahme der Proteinlöslichkeit im IEF-D-Puffersystem nachgewiesen wurde. Da Disulfidbrückenbindungen allerdings die stärksten intermolekularen Wechselwirkungen darstellen und somit bedeutsam für die Nachvernetzung sind, kann auch davon ausgegangen werden, dass diese ausschlaggebend für die Abnahme der Sauerstoffdurchlässigkeit über die Lagerungszeit sind. Ciannonea et al. (2015) konnten bei Sojaprotein-basierten Folien eine Abnahme der Wasserdampfpermeation feststellen. Diese war zwar nicht signifikant, wurde aber dennoch auf einen zunehmenden Grad der Quervernetzung zurückgeführt. Es kann geschlussfolgert werden, dass die Ausbildung intermolekularer Wechselwirkungen den Abstand zwischen den Polypeptidketten verringert, somit den Durchgang von Gasmolekülen erschwert und mit einer Reduktion der Sauerstoffdurchlässigkeit einhergeht. (Schmid et al., 2015e)

5.2 Gasdurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur und der relativen Feuchtigkeit

Wie in Kapitel 5.1 erörtert, müssen Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen eine ausreichend lange Zeit nach deren Herstellung gelagert werden, um die stattfindende Nachvernetzung abschließen zu können. Dies wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit beachtet (vgl. Kapitel 4). In diesem Kapitel werden weitere verpackungsrelevante Eigenschaften (Gasdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit und der Temperatur) von Folien und Beschichtungen aus der Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) dargestellt, bevor im weiteren Verlauf dieser Arbeit die nachfolgend aufgeführte Hauptfragestellung behandelt wird (vgl. Kapitel 2): Inwiefern und in welchem Ausmaß beeinflusst das Ausgangsmolekulargewicht, der Denaturierungsgrad, die Transglutaminase-Quervernetzung und die UV-Bestrahlung die molekularen Wechselwirkungen sowie die physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat (WPI)-basierten Folien und Beschichtungen?

5.2.1 Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxiddurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur

Zur Bestimmung der Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxiddurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur T wurden Molkenprotein-basierte Folien wie in Kapitel 4.2 hergestellt. Die Gasdurchlässigkeit wurde mit einem manometrischen Verfahren bei jeweils 0 % r. F. bei 23 °C, 35 °C und 40 °C gemessen (siehe Kapitel 4.3.1.2). Die Gasdurchlässigkeit in Abhängigkeit der Temperatur ist in Abbildung 22 dargestellt.

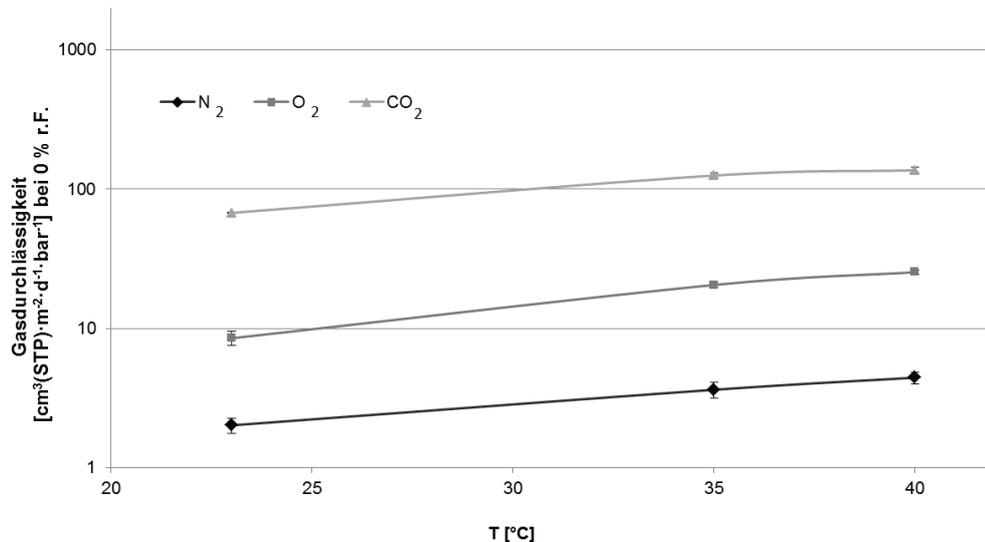


Abbildung 22: Stickstoff-, Sauerstoff- und Kohlendioxiddurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen bei 0 % r. F. in Abhängigkeit der Temperatur T . Die Foliendicke betrug $24,2 \pm 4,2 \mu\text{m}$. Die Fehlerbalken zeigen den Minimal- und Maximalwert an. Übersetzt aus Schmid et al. (2015g)

Das Verhältnis der jeweiligen Gasdurchlässigkeit Q zwischen N_2 , O_2 und CO_2 wird nach Yasuda und Lamaze (1971) Permselectivität genannt und ist in nachfolgender Tabelle 17 auf N_2 normiert dargestellt.

Tabelle 17: Gasdurchlässigkeitsverhältnis in Abhängigkeit der Temperatur. Übersetzt aus Schmid et al. (2015g)

Temperatur →	23 °C	35 °C	40 °C
Permselectivität ↓			
$Q_{\text{N}_2} : Q_{\text{N}_2}$	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.13
$Q_{\text{O}_2} : Q_{\text{N}_2}$	4.22 ± 0.71	5.66 ± 0.77	5.72 ± 0.59
$Q_{\text{CO}_2} : Q_{\text{N}_2}$	33.52 ± 4.08	34.55 ± 4.74	34.07 ± 3.31

Die berechneten Gasdurchlässigkeitsverhältnisse zeigen deutlich, dass die Permselectivität von Molkenprotein-basierten Folien sich deutlich von Standardkunststoffen unterscheidet. Für viele Kunststoffe wie Beispielsweise PE, PET, PS und EVOH beträgt

das $N_2:O_2:CO_2$ Verhältnis ca. 1:4:16 (Müller, 2013, Brandrup et al., 1999). Wie aus Tabelle 17 ersichtlich wird, liegen insbesondere die $CO_2:O_2$ Verhältnisse bei allen gemessenen Temperaturen deutlich höher. Basierend auf diesen Ergebnissen und unter Verwendung eines Arrhenius-Ansatzes (vgl. Gleichung 7, S. 23) kann die Aktivierungsenergie E_A der Durchlässigkeit Q für die drei verwendeten Gase (N_2 , O_2 und CO_2), wie in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben, berechnet werden. Die berechneten Aktivierungsenergien sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Aktivierungsenergie E_A der Durchlässigkeit Q für N_2 , O_2 und CO_2 . Übersetzt aus Schmid et al. (2015g)

Gas	E_A aus dieser Arbeit (Schmid et al., 2015g)	E_A aus Literatur (Hong und Krochta, 2003)
N_2	36,01	-
O_2	50,73	$47,73 \pm 3,77$
CO_2	33,35	-

Je größer die E_A , desto größer ist der Temperatureinfluss auf die Durchlässigkeit. Konkret bedeutet dies, dass eine Temperaturänderung sich deutlich stärker auf die Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien auswirkt als auf die N_2 - und CO_2 -Durchlässigkeit. Die E_A der Sauerstoffdurchlässigkeit wurde bereits von Hong und Krochta (2003) von Molkenprotein-basierten Beschichtungen auf Polypropylen ermittelt und liegt im Bereich der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten E_A . Vergleichswerte für die E_A der N_2 - und CO_2 -Durchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen liegen nicht vor.

5.2.2 Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit

Die Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit (35, 50 und 75 % r. F.) wurde bei Molkenprotein-basierten Beschichtungen auf PET mit dem Sauerstoffspezifischen Trägergasverfahren (vgl. Kapitel 4.3.1.1.) bei 23 °C gemessen. Da auch PET eine von der relativen Feuchtigkeit abhängige Sauerstoffdurchlässigkeit aufweist, wurde zudem die Sauerstoffdurchlässigkeit von unbeschichteten PET-Folien gemessen (siehe Abbildung 23).

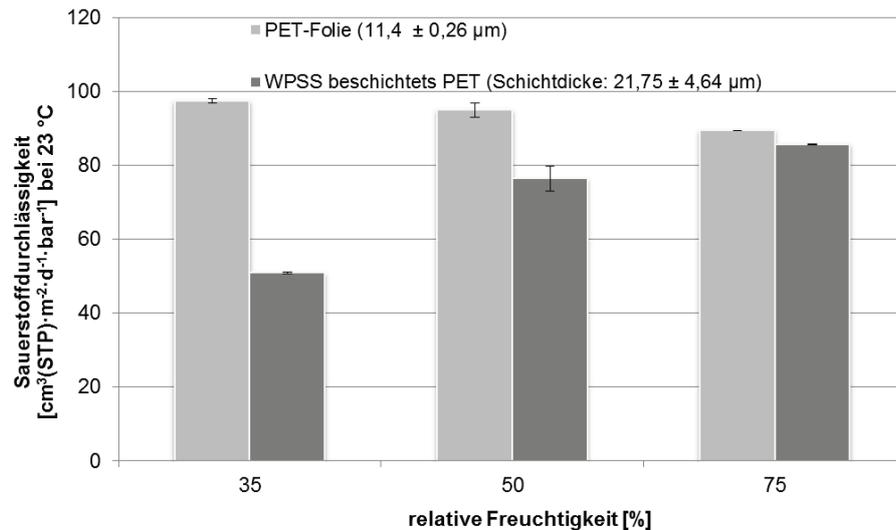


Abbildung 23: Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit (35, 50 und 75 % r. F.) von Molkenprotein-basierten Beschichtungen (WPSS) auf PET und PET-Folie bei 23 °C. Übersetzt aus Schmid et al. (2015g)

Die Sauerstoffdurchlässigkeit der verwendeten PET-Folie sinkt bei steigender relativer Feuchtigkeit. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verlauf (Müller, 2013, Auras et al., 2004). Die Sauerstoffdurchlässigkeit der mit Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) beschichteten PET-Folie hingegen steigt mit steigender relativer Feuchtigkeit. Dies ist dadurch begründet, dass die Molkenprotein-basierte Beschichtung eine geringere Durchlässigkeit als die verwendete PET-Folie aufweist, aber im Gegensatz zu PET bei steigender relativer Feuchtigkeit eine steigende Sauerstoffdurchlässigkeit zeigt. Dies wird deutlich, wenn man die jeweilige Sauerstoffdurchlässigkeit der WPSS Beschichtung allein mit Gleichung 10 (S. 24) berechnet (Abbildung 24).

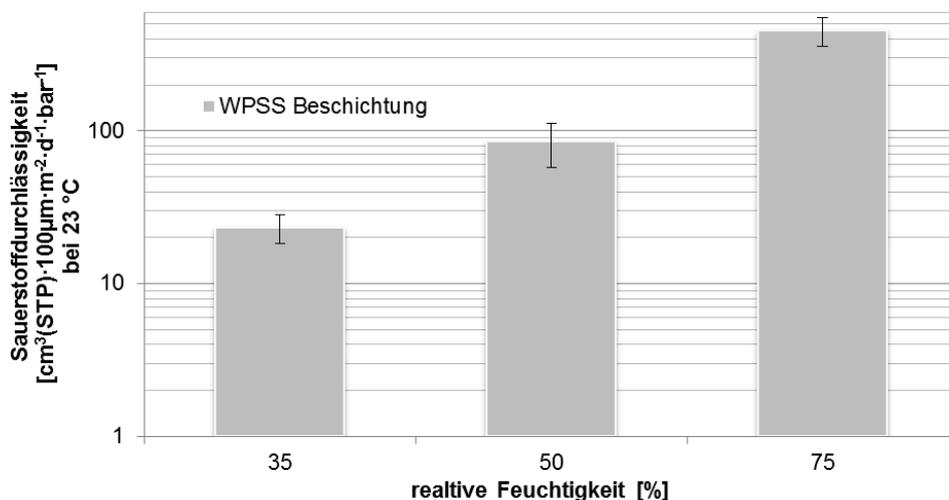


Abbildung 24: Sauerstoffdurchlässigkeit Q_{100} in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit (35, 50 und 75 % r. F.) von der WPSS Beschichtung bei 23 °C. Die Messwerte sind auf 100 µm normiert. Übersetzt aus Schmid et al. (2015g)

Das im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Verhalten, also die steigende Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen bei steigender relativer Feuchtigkeit, stimmt mit den Ergebnissen von Hong und Krochta (2003) überein und kann wie folgt begründet werden. Hydrophile Polymere (hier: Molkenprotein-basierte Beschichtung) lagern entsprechend ihrer Wasserdampf-Sorptionsisotherme mehr Wassermoleküle innerhalb der Polymermatrix an – sie absorbieren Wasser. In den meisten Fällen steigt die Gasdurchlässigkeit bei diesen Polymeren, da Wasser als effektiver Weichmacher fungiert und hierdurch das freie Volumen im Polymer steigt (vgl. Kapitel 3.1.5.1.2). Da es sich bei Molkenprotein-basierten Beschichtungen um ein hydrophiles Polymer handelt, führt dieser Weichmachereffekt zu höheren Durchlässigkeitswerten (Hong und Krochta, 2003). Der Weichmachereffekt von Wasser ist auch bei anderen hydrophilen Polymeren wie z.B. EVOH bekannt (Muramatsu et al., 2003, Del Nobile und Conte, 2013).

5.3 Molekulargewicht und Weichmachergehalt

Wie bereits in Kapitel 3.1.5.2 beschrieben, sinkt mit steigendem Hydrolysegrad das Molekulargewicht der Molkenproteine. Die intermolekularen Wechselwirkungen entlang der Proteinketten werden reduziert und es entstehen mehr freie funktionelle Gruppen aufgrund der höheren Anzahl an Peptidkettendenen.

Die Reduktion des durchschnittlichen Ausgangsmolekulargewichts durch Hydrolyse von Molkenprotein-basierten Formulierungen hat laut Sothornvit und Krochta (2000a) keinen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoff- und Wasserdampfpermeabilität (Sothornvit und Krochta, 2000c). Im Gegensatz dazu weisen Folien und Beschichtungen aus hydrolysierten Molkenprotein-basierten Formulierungen eine deutlich höhere Flexibilität auf. Folglich könnte die Verwendung von hydrolysiertem Molkenproteinisolat (h-WPI) die technologisch notwendige Menge an Weichmacher reduzieren, welche maßgeblich für die Permeationseigenschaften verantwortlich ist. Sothornvit und Krochta (2000b) stellten daher bereits folgerichtig die Hypothese auf, dass durch die Hydrolyse von denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen der Weichmachergehalt reduziert werden kann und dennoch flexible Folien und Beschichtungen entstehen, die aber eine geringere Permeation gegenüber Sauerstoff und Wasserdampf aufweisen. Eine Bestätigung dieser Hypothese wurde bislang nicht in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Auch wurden die bisherigen Korrelationen zwischen Hydrolysegrad und resultierenden molekularen Wechselwirkungen sowie verpackungsrelevanten Eigenschaften nur an hydrolysierten Formulierungen durchgeführt, nicht aber an Mischungen aus hochmolekularem WPI und hydrolysiertem Molkenproteinisolat (h-WPI). Daher war auch dies Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit und wird in den nachfolgenden Kapiteln (5.3.1 und 5.3.2) beschrieben.

5.3.1 Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts

Zur Ermittlung der Veränderung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichtes (Mischungen aus WPI und h-WPI) wurden Molkenprotein-basierte Folien mit dem Gießfilmverfahren (vgl. Kapitel 4.2.3) hergestellt. Das mittlere Protein-Ausgangsmolekulargewicht beträgt ca. 60 kDa bei Formulierungen ohne h-WPI. Bei Formulierungen mit einem WPI:h-WPI Verhältnis von 1:1 beträgt das mittlere Protein-Ausgangsmolekulargewicht 32 kDa (siehe Tabelle 8). Zur Qualifizierung der molekularen Wechselwirkungen wurden Lösungsversuche (siehe Kapitel 4.4) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Vernetzung der Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichtes, wie in den Kapiteln 4.5 und 4.6 beschrieben, quantifiziert.

5.3.1.1 Qualifizierung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts mittels Lösungsversuchen

Um den Einfluss der Reduzierung des Molekulargewichts auf die molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Folien zu untersuchen, wurden Lösungsversuche an Folien mit verschiedenen Mischungsverhältnissen von hydrolysiertem (h-WPI) und nicht-hydrolysiertem WPI durchgeführt. Die Folien wurden vor deren Charakterisierung mindestens 14 Tage bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt.

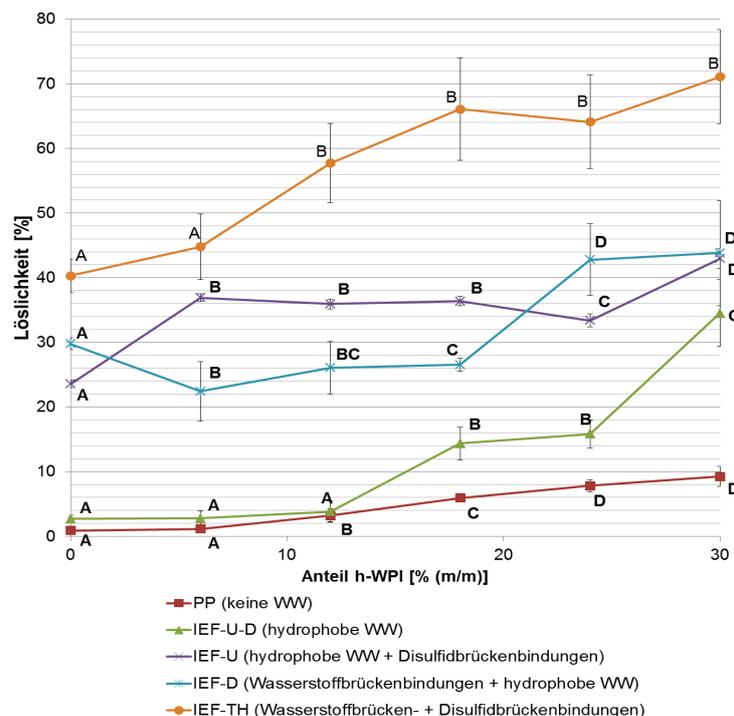


Abbildung 25: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit steigendem Anteil an h-WPI in verschiedenen Puffersystemen (Unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Puffersystems

bedeuten, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten besteht). Übersetzt und adaptiert aus Schmid et al. (2016)

In allen Puffersystemen ist eine signifikante Zunahme der Löslichkeit mit zunehmendem Anteil an h-WPI erkennbar. Somit führt erwartungsgemäß die Hydrolyse von Proteinen im Allgemeinen zu Proteinfohlen mit einer höheren Löslichkeit (Chobert et al., 1988, Damodaran und Paraf, 1997). Dies kann durch den höheren Anteil an polaren Endgruppen (Carboxyl- und Aminogruppen) bei hydrolysierten Proteinen begründet werden und trifft somit auch auf h-WPI im Vergleich zu WPI zu (Damodaran und Paraf, 1997, Sothornvit und Krochta, 2000c).

5.3.1.2 Quantifizierung der Vernetzung der Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichtes

Zur Quantifizierung des Vernetzungsgrades und der Vernetzungsdichte von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen erwiesen sich Quellversuche als geeignet (Hammann und Schmid, 2014). Die Muster zur Quantifizierung der Vernetzung in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts wurden, wie im Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, hergestellt (Gießfolien). Die Herangehensweise zur Bestimmung des Grades der Quellung (DoS) ist in Kapitel 4.5, die zur Bestimmung von Vernetzungsgrad (DoC) und -dichte (CLD) ist in Kapitel 4.6 beschrieben. Die ermittelten Ergebnisse zu DoS, DoC und CLD sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die ermittelten Zwischenergebnisse zur Berechnung der nachfolgend dargestellten Vernetzungskennzahlen sind in Anhang I-b ergänzend aufgeführt.

Tabelle 19: Grad der Quellung (DoS) und Vernetzungsgrad (DoC) und -dichte (CLD) in Abhängigkeit des WPI:h-WPI Verhältnisses. Übersetzt aus Schmid et al. (2016)

Bezeichnung	DoS	CLD	DoC
WPI:h-WPI	[%]	$10^{-4} [\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}]$	[%]
10:0	400 ± 9	1.15 ± 0.24	1.42 ± 0.30
9:1	380 ± 60	1.2 ± 0.5	1.50 ± 0.60
8:2	590 ± 40	0.55 ± 0.15	0.67 ± 0.19
7:3	810 ± 100	0.29 ± 0.11	0.36 ± 0.14
6:4	860 ± 80	0.27 ± 0.09	0.33 ± 0.11
5:5	1100 ± 400	0.18 ± 0.13	0.22 ± 0.16

Insgesamt wird deutlich, dass mit steigendem Anteil an h-WPI und somit mit sinkendem mittlerem Ausgangsmolekulargewicht der DoS deutlich zunimmt und folglich der Vernetzungsgrad und die Vernetzungsdichte abnehmen. Die ermittelten Werte können sicherlich nicht dem Anspruch der absoluten Vergleichbarkeit mit anderen Polymersystemen aus Literaturwerten entsprechen. Dies liegt u.a. daran, dass sich insbesondere

die Proben mit sehr hohem DoS während der Messungen sehr schwer handhaben ließen, was auch zu großen Messschwankungen führte. Daraus begründen sich auch die teilweise sehr hohen Standardabweichungen (siehe Abbildung 26). Des Weiteren sind nicht nur der Weichmacher Glycerin (fast vollständig), sondern auch Teile der nicht vernetzten Polypeptide im Quellmedium löslich ($< 0,1 \text{ \% (m/m)}$), was wiederum zu Messfehlern führen kann. Ungeachtet dieser möglichen Fehlerquellen wird nachfolgend dennoch ein Vergleich zwischen den ermittelten CLD bei Molkenprotein-basierten Folien und der CLD von natürlichem Gummi (Literaturwert) aufgeführt. Hierfür war es aber nötig, die CLD auf die Einheit mol/cm^3 umzurechnen, da die CLD in diesem Fall in der Literatur nicht in mol/g , sondern in mol/cm^3 angegeben wird. Hierfür wird die berechnete CLD in mol/g mit der Dichte der Molkenprotein-basierten Folien multipliziert (vgl. Kapitel 3.3.2.). In Abbildung 26 ist die CLD in der Einheit mol/cm^3 in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts dargestellt.

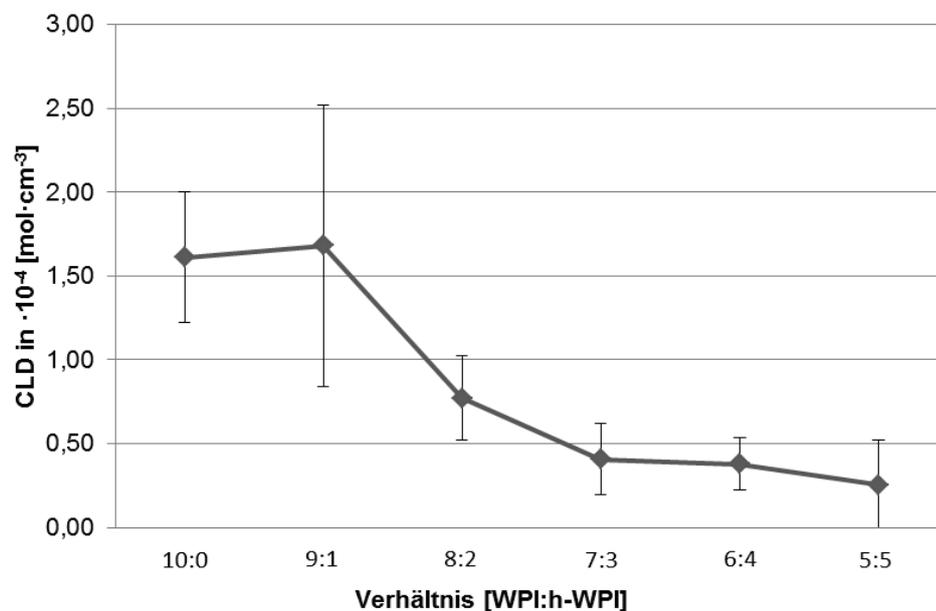


Abbildung 26: Quervernetzungsichte CLD in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts. Übersetzt und adaptiert aus Schmid et al. (2016)

Nach Ahmed et al. (2012) liegt die CLD für natürliches Gummi bei $2,0 - 2,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/cm}^3$ und somit in derselben Größenordnung und nur leicht über den die im Rahmen der o.g. Versuchsreihe ermittelten CLDs für Molkenprotein-basierte Folien mit hohem Ausgangsmolekulargewicht.

Durch die Erhöhung des h-WPI Gehaltes um 20 % wurde die CLD auf $0,55 \cdot 10^{-4} \text{ mol/g}$ im Vergleich zur Formulierung ohne h-WPI halbiert. Eine weitere Erhöhung des h-WPI Gehaltes führte zu einer CLD von $0,29 \cdot 10^{-4} \text{ mol/g}$. Weiter steigende h-WPI Gehalte zeigten keine signifikante Änderung auf die CLD. Bei sehr hohen h-WPI Gehalten ($>30 \text{ \%}$) sind lediglich 0,22 – 0,36 % der Proteine in der Ausbildung von kovalenten

Quervernetzungen und somit in der Netzwerkbildung involviert. Nach Sothornvit und Krochta (2000a) führt die Hydrolyse von WPI zu schwächeren molekularen Wechselwirkungen in den daraus hergestellten Folien und Beschichtungen. Dies bedeutet aber nicht, dass weniger Disulfidbrückenbindungen gebildet werden. Bei der Mischung von hochmolekularem WPI und h-WPI kann auch davon ausgegangen werden, dass niedermolekulare Peptidketten des h-WPI in das Netzwerk eingebunden werden, aber aufgrund deren geringen Größe und evtl. Abwesenheit einer weiteren freien Thiolgruppe nicht weiter quervernetzen können. Somit könnte ein gewisser Anteil dieser niedermolekularen h-WPI Peptidketten eine weitere Quervernetzung verhindern. Diese Modellvorstellung ist schematisch in Abbildung 27 dargestellt. (Schmid et al., 2016)

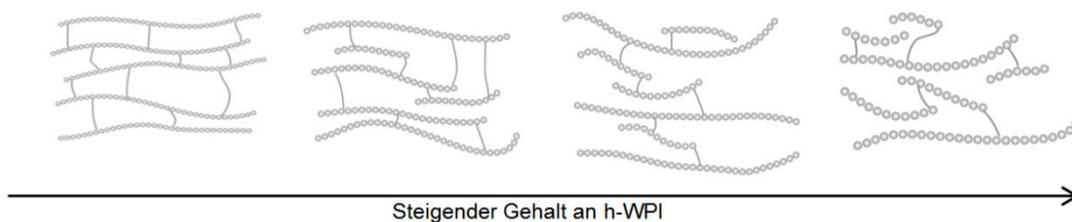


Abbildung 27: Modellvorstellung zur Netzwerkbildung bei Mischungen aus WPI und h-WPI. (links: 0 % h-WPI; rechts: 50 % h-WPI). Übersetzt aus Schmid et al. (2016).

Diese Modellvorstellung erklärt auch die steigenden durchschnittlichen Molekulargewichte zwischen den Quervernetzungen M_c (siehe Tabelle 26 im Anhang I-c) bei steigendem h-WPI Gehalt, da mit steigendem h-WPI Gehalt immer mehr niedermolekulare Peptidstücke (Molekulargewichtverteilung siehe Kapitel 4.2.1) zur Verfügung stehen, um Disulfidbrücken mit den freien Thiolgruppen des hochmolekularen WPI auszubilden. Dem hochmolekularen WPI stehen dann weniger Thiolgruppen zur kovalenten Quervernetzung und Einbindung in das Proteinnetzwerk zur Verfügung. Dies führt zu deutlich größeren M_c und folglich zu sinkenden CLD und DoC.

5.3.2 Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts auf verpackungsrelevanten Eigenschaften

Dieses Kapitel widmet sich den Ergebnissen zum Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts auf die verpackungsrelevanten Eigenschaften. Zur Interpretation der Ergebnisse werden sowohl die Erkenntnisse aus den ermittelten molekularen Wechselwirkungen als auch die Grundlagenliteratur herangezogen. Zur Ermittlung der Veränderung der verpackungsrelevanten Eigenschaften in Abhängigkeit des mittleren Ausgangsmolekulargewichts (siehe Tabelle 8) wurden Molkenprotein-basierte Folien, wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, hergestellt und deren Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit sowie mechanische Eigenschaften gemessen (vgl. Kapitel 4.3).

5.3.2.1 Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts und des Weichmachergehalts

Tabelle 20 zeigt die Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien, hergestellt aus Formulierungen mit unterschiedlichen WPI:h-WPI Anteilen.

Tabelle 20: Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts (Schmid et al., 2013a, Schmid et al., 2016). Bei den Wasserdampfpermeationsraten bedeuten nach der Standardabweichung angegebene unterschiedliche Buchstaben, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten besteht. Bei der Sauerstoffdurchlässigkeit ist anstelle der Standardabweichung die Distanz zum Minimal- und Maximalwert angegeben.

Bezeichnung WPI:h-WPI	Folien Dicke [μm]	Durchlässigkeitseigenschaften		
		Sauerstoffdurchlässigkeit Q_{100} [cm^3 (STP) $100 \mu\text{m}/(\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{bar})$]	Wasserdampf- transmissionsrate [$\text{g}/(\text{m}^2 \cdot \text{d})$] 23 °C & 50→0 % r.F.	CLD $\cdot 10^{-4}$ [$\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$]
		23 °C & 50 % r.F.		
10:0	183 ± 9	101 ± 6	177 ± 6 (a)	1.15 ± 0.28
9:1	191 ± 18	145 ± 9	257 ± 20 (bc)	1.2 ± 0.5
8:2	186 ± 7	99 ± 8	194 ± 7 (ab)	0.55 ± 0.17
7:3	196 ± 12	123 ± 3	253 ± 6 (bc)	0.29 ± 0.12
6:4	211 ± 16	82 ± 5	222 ± 16 (b)	0.27 ± 0.10
5:5	198 ± 8	208 ± 20	264 ± 10 (c)	0.18 ± 0.13

Es besteht kein erkennbarer Zusammenhang zwischen Ausgangsmolekulargewicht und den Durchlässigkeitswerten und somit auch nicht zu den ermittelten CLD-Werten. Da die Vernetzungskennzahlen CLD und DoC proportional zum ermittelten durchschnittlichen Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen M_c (siehe Anhang I-c) und somit auch zueinander proportional sind, gilt derselbe Zusammenhang auch für den DoC. Die Abwesenheit eines Zusammenhangs deckt sich mit den Ergebnissen von Sothornvit und Krochta (2000a) und Sothornvit und Krochta (2000c), da auch in deren Studien kein signifikanter Einfluss des Molekulargewichts auf die Sauerstoffdurchlässigkeit und Wasserdampftransmissionsrate festgestellt wurde. Ein direkter Vergleich der in diesen Studien gemessenen Absolutwerte mit den Durchlässigkeitswerten dieser Arbeit ist allerdings nicht möglich, da bei den Studien von Sothornvit und Krochta keine Mischungen aus h-WPI und WPI, sondern hochmolekulares WPI hydrolysiert und anschließend zu Filmen verarbeitet wurde. Auch wurden andere Herstell- und Messbedingungen verwendet. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit, nach Darstellung der weiteren ermittelten verpackungsrelevanten Eigenschaften, werden Schlussfolgerungen gezogen, um die ermittelte Eigenschaften zu sich selbst und in Bezug zu den veränderten molekularen Wechselwirkungen zu setzen.

Die Reduktion des durchschnittlichen Ausgangsmolekulargewichts durch Hydrolyse von Molkenprotein-basierten Formulierungen hat laut Sothornvit und Krochta (2000a) sowie im Rahmen dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die Sauerstoff- und Wasserdampfpermeabilität (Sothornvit und Krochta, 2000c). Im Gegensatz dazu weisen Folien und Beschichtungen aus hydrolysierten Molkenprotein-basierten Formulierungen eine deutlich höhere Flexibilität auf, was auch in dieser Arbeit bestätigt wurde (siehe Kapitel 5.3.2.2 und Schmid et al. (2013a)). Somit könnte die Verwendung von hydrolysiertem Molkenproteinisolat (h-WPI) die technologisch notwendige Menge an Weichmacher reduzieren, welche maßgeblich für die Permeationseigenschaften verantwortlich ist. Sothornvit und Krochta (2000b) stellten die Hypothese auf, dass durch die Hydrolyse von denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen der Weichmachergehalt reduziert werden kann und dennoch flexible Folien und Beschichtungen entstehen, die aber geringere Permeationswerte gegenüber Sauerstoff und Wasserdampf aufweisen. Da diese Hypothese in der wissenschaftlichen Literatur noch nicht bestätigt wurde, ist dies Untersuchungsgegenstand im Rahmen dieser Arbeit. Nachfolgend sind die ermittelten Ergebnisse zur Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit dargestellt. Um die o.g. Hypothese zu überprüfen, wurden die Rezepturen (Massenverhältnisse von Gly:WPI:h-WPI so angepasst, dass sich in etwa konstante mechanische Eigenschaften einstellten. Hierfür wurden jeweils ein Teil Weichmacher und ein Teil WPI durch zwei Teile h-WPI ersetzt.

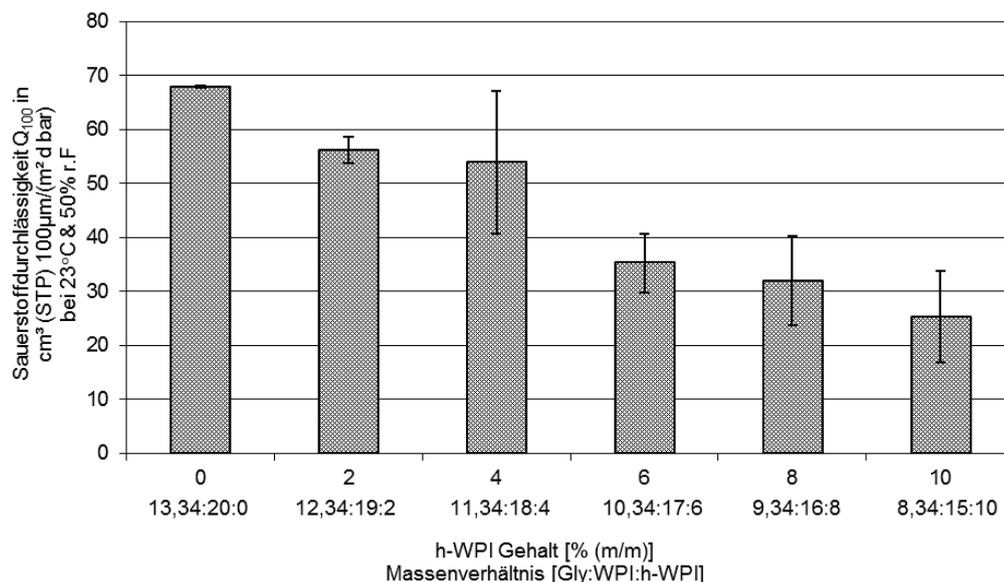


Abbildung 28: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt. Die Fehlerbalken geben die Distanz zum Minimal- und Maximalwert an. Übersetzt aus Schmid (2013)

Es ist deutlich erkennbar, dass eine Reduktion des Weichmachergehalts durch Anwendung von h-WPI als sog. internen Weichmacherersatz zu einer Reduktion der Sauerstoffdurchlässigkeit führt (Abbildung 28). Dass h-WPI einen weichmachenden

Effekt hat, zeigen insbesondere die E-Modulmessungen, welche in dem noch folgenden Kapitel 5.3.2.2 dargestellt sind.

Da der verwendete externe Weichmacher Glycerol (Gly) u.a. durch eine Erhöhung der Gleichgewichtsfeuchte seine starke weichmachende Wirkung in Biopolymer-basierten Folien erhält, führt im Umkehrschluss eine Reduktion des Weichmachergehalts u.a. auch zu einer Reduktion des Wassergehalts (siehe Anhang I-d). Da Wasser zu den effektivsten Weichmachern bei Biopolymeren zählt, führt eine Verringerung des Wassergehalts zusätzlich zur Reduktion des Weichmachergehalts zu einer Verringerung des freien Volumens und somit zu einer geringeren Permeabilität. (Schmid, 2013, Vieira et al., 2011)

Derselbe Zusammenhang kann bei der Wasserdampftransmissionsrate beobachtet werden und ist nachfolgend dargestellt.

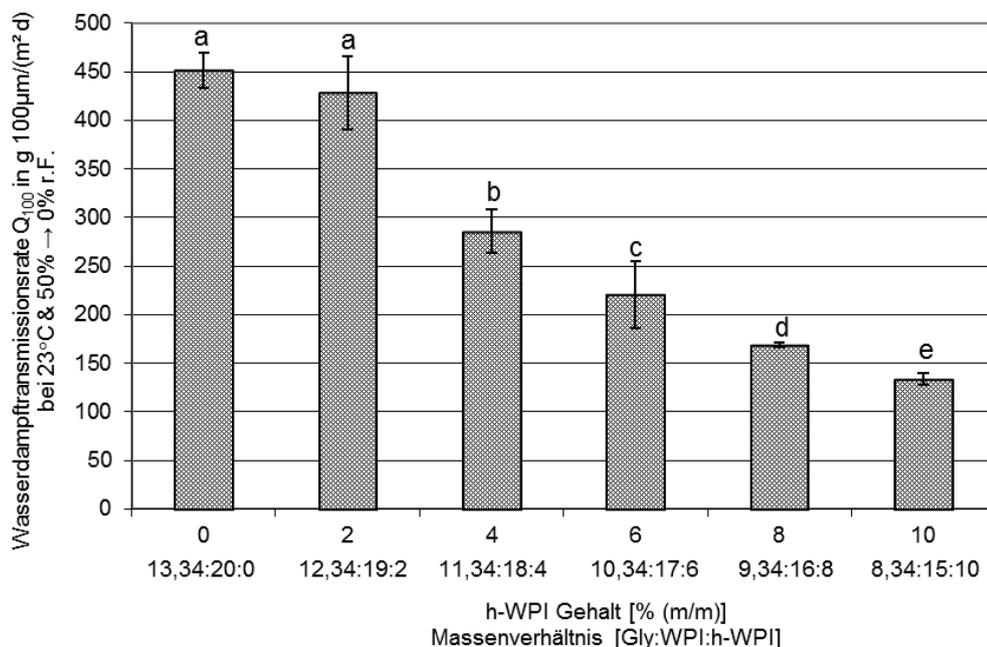


Abbildung 29: Wasserdampftransmissionsrate von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid (2013)

Der in Abbildung 29 dargestellte Zusammenhang, also die signifikante Abnahme der Wasserdampftransmissionsrate bei sinkendem Weichmachergehalt, stimmt mit den Ergebnissen von Sothornvit und Krochta (2000c) überein. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde aber bei Sothornvit und Krochta (2000c) das Ausgangsmolekulargewicht bei sinkendem Weichmachergehalt konstant belassen. Dies führt zwangsläufig zu steiferen und weniger flexiblen Folien. Im nachfolgenden Kapitel 5.3.2.2 werden deshalb die mechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts und des Weichmachergehalts betrachtet.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass die Reduktion des Weichmachergehalts, einhergehend mit der Verringerung der Gleichgewichtsfeuchte, einen größeren Einfluss auf die Gasdurchlässigkeitseigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien hat als die Proteinstruktur und das Ausgangsmolekulargewicht. Dies wird übereinstimmend von mehreren Studien bestätigt (Perez-Gago et al., 1999, Mate und Krochta, 1996, Sothornvit und Krochta, 2000c).

5.3.2.2 Mechanische Eigenschaften in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts und des Weichmachergehalts

Nachfolgend sind die mechanischen Eigenschaften (E-Modul und Zugfestigkeit) von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit des WPI:h-WPI Verhältnisses bei konstantem Weichmachergehalt aufgeführt.

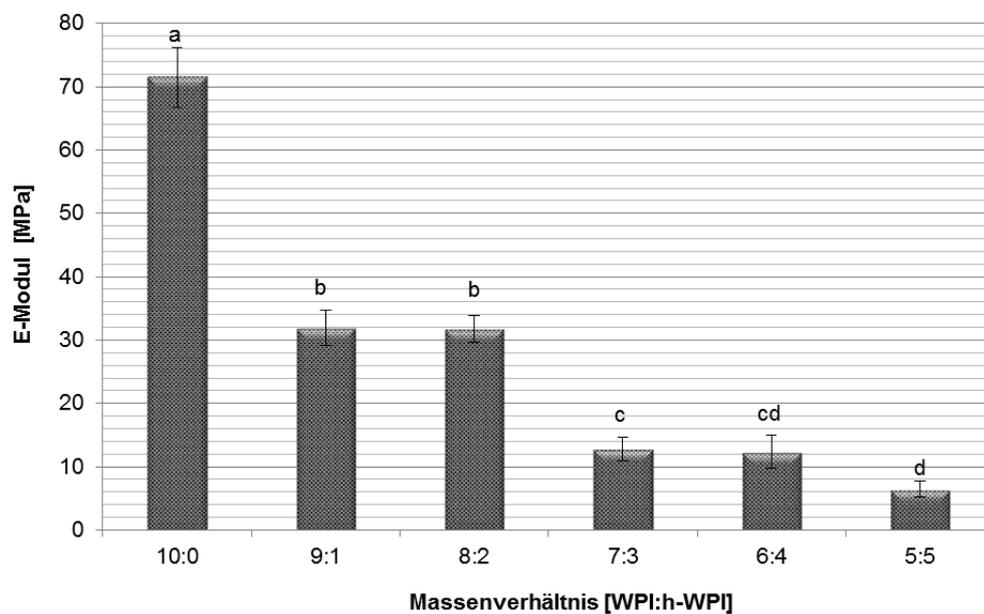


Abbildung 30: E-Modul in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts bei konstantem Weichmachergehalt. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt und angepasst aus Schmid et al. (2013a)

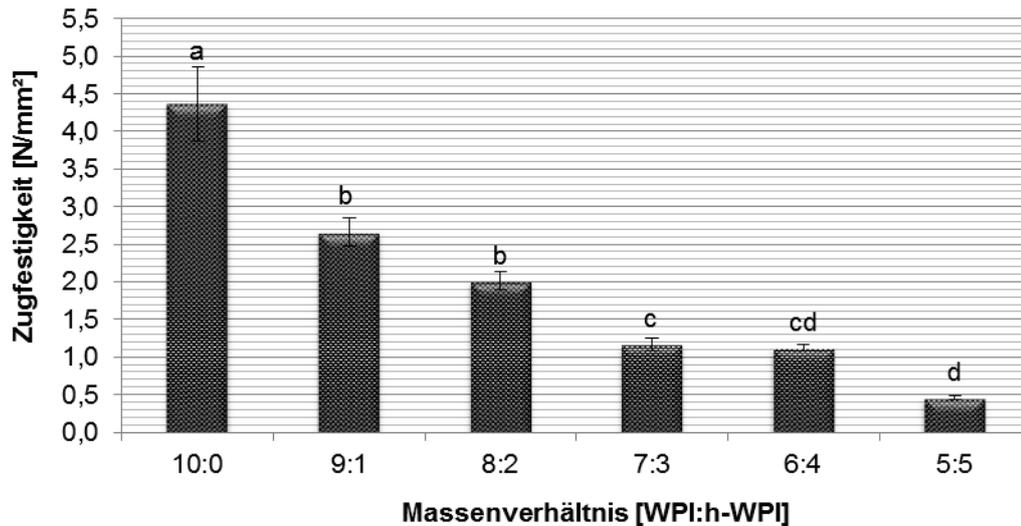


Abbildung 31: Zugfestigkeit in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts bei konstantem Weichmachergehalt. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt und angepasst aus Schmid et al. (2013a)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch niedermolekulare Substanzen, wie h-WPI, eingesetzt werden können, um die Flexibilität von Molkenproteinbasierten Folien zu erhöhen (vgl. Abbildung 30). Durch die Substitution von WPI durch gleiche Anteile an h-WPI bei konstanter Weichmacherkonzentration kann eine signifikante Reduktion der Zugfestigkeit und des E-Moduls erreicht werden, aber gleichzeitig wurden die Durchlässigkeitseigenschaften kaum beeinflusst (vgl. Tabelle 20). Diese Beobachtungen machten auch Sothornvit und Krochta (2000a) mit dem Unterschied, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Mischungsverhältnisse von h-WPI und WPI verwendet wurden. Es könnte also vermutet werden, dass Folien, die aus Mischungen von WPI und h-WPI hergestellt wurden, andere Eigenschaften als Folien aufweisen die h-WPI mit unterschiedlichem Hydrolysegrad enthalten. Diese Vermutung konnte nun widerlegt werden, da auch Mischungen aus WPI und h-WPI ein ähnliches Verhalten aufweisen. Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Reduzierung des Molekulargewichts und der Wasserdampf- bzw. Sauerstoffdurchlässigkeit. Allerdings ist eine signifikante Änderung der mechanischen Eigenschaften mit einem zunehmenden Anteil an h-WPI erkennbar. Abbildung 30 und Abbildung 31 zeigen die signifikante Abnahme der Zugfestigkeit und des E-Moduls mit zunehmendem Anteil an h-WPI. Die Flexibilität der Folien erhöht sich mit steigendem Anteil an h-WPI und somit mit zunehmender Anzahl an kurzen Polypeptidketten. Hierfür könnten die Reduzierung intermolekularer Wechselwirkungen und die Zunahme des freien Volumens innerhalb der Polymerstruktur verantwortlich sein. Die mechanischen Eigenschaften reagieren hierbei stärker auf Veränderungen des freien Volumens und die Reduktion der CLD und des DoC als die Durchlässigkeitseigenschaften (Sears und Darby, 1982, Sothornvit und Krochta, 2000a, Sothornvit und Krochta, 2000c, Schmid et al., 2013a, Schmid, 2013).

Die Untersuchungen zur qualitativen Bestimmung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts mittels der Lösungsversuche konnte aber keine Verschiebung der Verhältnisse der dominierenden molekularen Wechselwirkungen mit zunehmendem h-WPI Gehalt nachweisen (vgl. Kapitel 5.3.1.1). In allen Puffersystemen ist die Proteinlöslichkeit mit zunehmendem Gehalt an niedermolekularen WPI angestiegen. Da h-WPI aber aus kurzen Polypeptidketten mit einer hohen Anzahl an polaren Endgruppen besteht, kommt es zur Ausbildung von mehreren schwachen molekularen Wechselwirkungen zwischen den kurzen Polypeptidketten. Diese sind meist doch im Polymernetzwerk kovalent eingebundenen, deshalb kann von einem internen Weichmachereffekt durch h-WPI gesprochen werden (vgl. Abbildung 27) (Sears und Darby, 1982, Schmid et al., 2013a).

Die Hypothese von Sothornvit und Krochta (2000b), dass durch die Hydrolyse von denaturierten Molkenprotein-basierten Formulierungen der Weichmachergehalt reduziert werden kann und dennoch flexible Folien und Beschichtungen entstehen, und dies zu geringeren Gasdurchlässigkeitseigenschaften führen kann, wurde durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Es ist deutlich erkennbar, dass eine Reduktion des Weichmachergehalts durch Anwendung von h-WPI als sog. internen Weichmachersersatz zu einer Reduktion der Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit führt (Abbildung 28 und Abbildung 29), dies aber nur einen geringen Einfluss (p meist $>0,05$) auf die mechanischen Eigenschaften, wie in Abbildung 32 und Abbildung 33 dargestellt, hat.

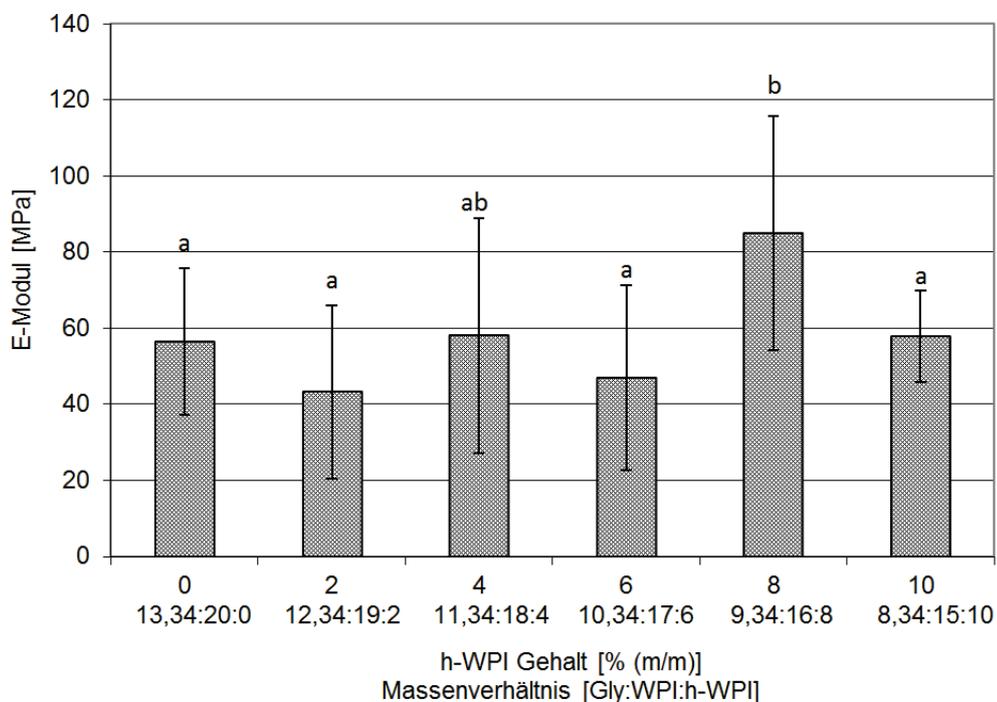


Abbildung 32: E-Modul von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid (2013)

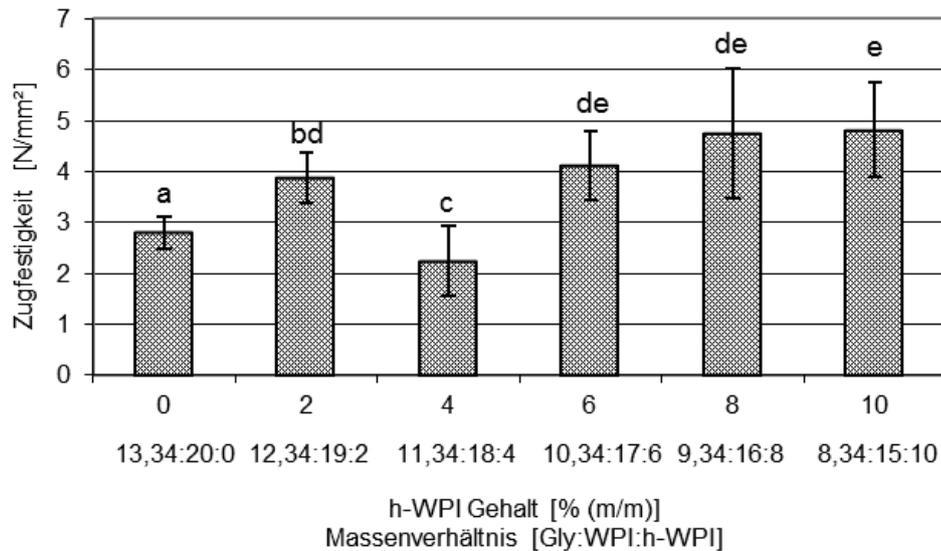


Abbildung 33: Zugfestigkeiten von Molkenprotein-basierten Folien mit sinkendem Ausgangsmolekulargewicht und reduziertem Weichmachergehalt. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid (2013)

5.4 WPI-Denaturierungsgrad

Der Einfluss des Denaturierungsgrades auf die molekularen Wechselwirkungen und daraus resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen wurde bislang nur wenig untersucht und ist Gegenstand dieser Arbeit. In diesem Kapitel 5.4 wird der Einfluss des Denaturierungsgrades auf die molekularen Wechselwirkungen (Kapitel 5.4.1) und auf die verpackungsrelevante Eigenschaften (Kapitel 5.4.2) dargestellt und diskutiert.

5.4.1 Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

Für die Ermittlung des Einflusses des Denaturierungsgrades auf die molekularen Wechselwirkungen und auf die Vernetzungskennzahlen wurden Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen aus Formulierungen mit variierendem Mischungsverhältnis von vollständig hitzedenaturierter und nativer WPI Lösungen hergestellt (vgl. Kapitel 4.2.4), und wie in den Kapiteln 4.4, 4.5 und 4.6 beschrieben, charakterisiert.

5.4.1.1 Qualifizierung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades mittels Lösungsversuche

Lösungsversuche wurden durchgeführt, um den Einfluss des Denaturierungsgrades auf die molekularen Wechselwirkungen in Molkenprotein-basierten Beschichtungen, hergestellt aus unterschiedlichen Verhältnissen von hitzedenaturierter und nativer WPI Lösung, zu charakterisieren. Die Folien und Beschichtungen wurden vor den Lösungsversuchen mindestens 14 Tage bei 23 °C und 50 % r. F. gelagert. In Abbildung 34 sind

die Ergebnisse der Protein Lösungsversuche in unterschiedlichen Puffersystemen dargestellt. Eine signifikante Abnahme der Löslichkeit im PP Puffersystem weist den steigenden Denaturierungsgrad (DG) der folienbildenden Lösung nach. Mit steigendem DG kommt es zur Ausbildung von kovalenten und verstärkten Ausbildung von nicht-kovalenten Bindungen. Dies bedingt eine geringere Löslichkeit im PP Puffersystem, da dieser keine spaltende Wirkung auf molekulare Wechselwirkungen hat. Bei vollständig denaturierten Molkenprotein-basierten Beschichtungen geht die Löslichkeit im PP-Puffersystem gegen Null, da durch die Hitzedenaturierung die meisten Polypeptide durch molekulare Wechselwirkungen in das Proteinnetzwerk eingebaut sind. Allerdings muss beachtet werden, dass auch bei Verwendung von nativen Proteinen zur Beschichtungs- und Folienherstellung die Proteine denaturiert werden könnten. Vorgänge, wie beispielsweise das Entweichen von Wasser während des Trocknungsprozesses, könnten zur Auffaltung der Proteinstruktur und Orientierung der funktionellen Gruppen führen (Haque et al., 2013a, Haque et al., 2013b, Schmid et al., 2015a). Aus diesem Grund wurden die Folien und Beschichtungen, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, hergestellt und auf deren DG untersucht. Konkret bedeutet dies, dass die Folien und Beschichtungen deutlich unterhalb der Denaturierungstemperatur (<35 °C) getrocknet und ausgehärtet wurden. Die Wirksamkeit dieser Maßnahme wurde durch die in Kapitel 4.2.4.2 beschriebene analytische Bestimmung des DG bestätigt. Die eingestellten Denaturierungsgrade von 0, 25, 50, 75 und 100 % konnten exakt nachgewiesen werden (Schmid et al., 2014a).

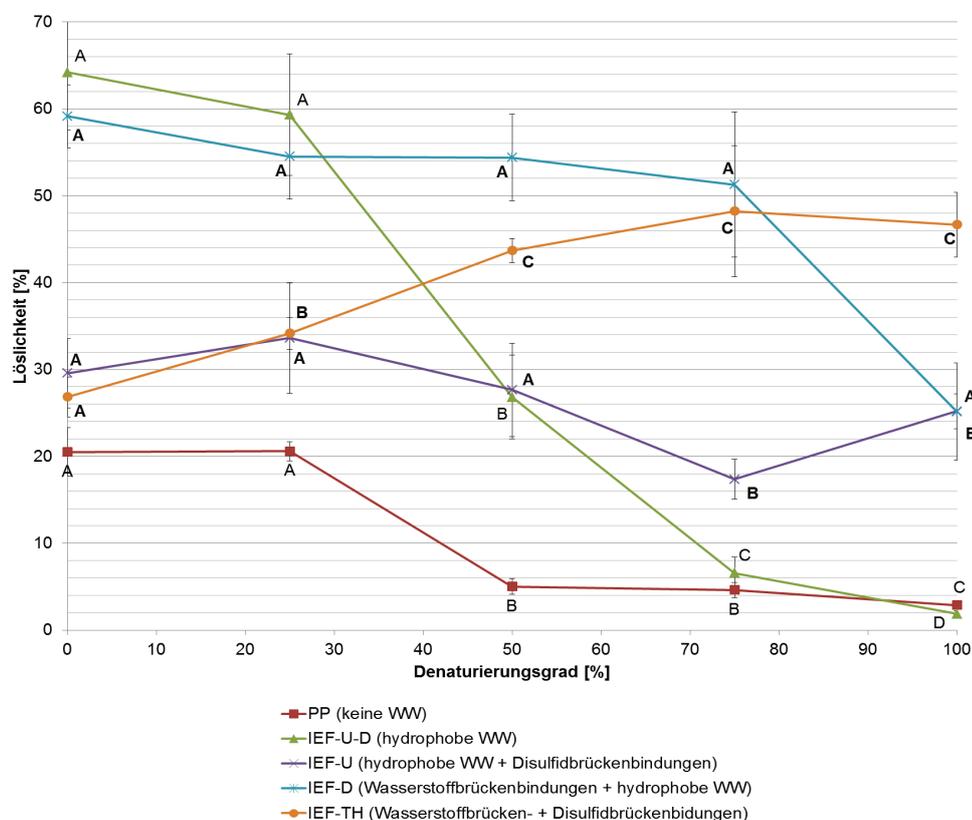


Abbildung 34: Löslichkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit variierendem Denaturierungsgrad in verschiedenen Puffersystemen. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Puffersystems

tems bedeuten, dass ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den Mittelwerten besteht. Angepasst und übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Die Abnahme der Löslichkeit im IEF-U-D Puffersystem (löst hydrophobe WW) mit steigendem DG impliziert nicht zwangsläufig, dass hydrophobe Wechselwirkungen keine stabilisierende Rolle im Proteinnetzwerk spielen, sondern nur, dass die Proteine nicht ausschließlich über hydrophobe Wechselwirkungen eingebunden sind. Denn die Kombination von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen ist entscheidend, da jede Wechselwirkung einen Beitrag zur Proteinnetzwerkstabilisierung leistet.

Beschichtungen mit einem 0 % DG zeigten erwartungsgemäß eine hohe Löslichkeit im IEF-D Puffersystem, welches hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen spezifisch löst. Bekanntermaßen wird die Polymerstruktur von nativen Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen hauptsächlich über Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Der Grund hierfür ist, dass die globulären Strukturen des nativen Molkenproteins intakt und die meisten hydrophoben und Thiolgruppen (auch Sulfhydrylgruppen, -SH genannt) im Inneren verborgen bleiben (Perez-Gago und Krochta, 2001).

Es fällt insbesondere auf, dass sich die Proteinlöslichkeit bei Beschichtungen mit 0 und 25 % DG in allen Puffersystem, außer im IEF-TH Puffersystemen, nicht signifikant voneinander unterscheiden ($p > 0,05$). Es konnte bis zu einem DG von 50 % ein signifikanter Anstieg der Proteinlöslichkeit im IEF-TH Puffersystem ($p < 0,05$), welches Wasserstoffbrückenbindungen löst und Disulfidbrückenbindungen spaltet, nachgewiesen werden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Kombination dieser Wechselwirkungen an Bedeutung zunimmt. Der steigende DG führt dazu, dass mehr Proteine aufgefaltet sind, wobei die im Inneren liegenden hydrophoben und Sulfhydrylgruppen freigelegt werden. Diese funktionellen Gruppen können nun intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen ausbilden. Der Einfluss variierender DG in Molkenprotein-basierten Folien auf die molekularen Wechselwirkungen wurde auch von Guckian et al. (2006) mittels Lösungsversuchen untersucht. Auch sie kamen zum Ergebnis, dass nicht-kovalente hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen die Filmbildung bei Folien mit einem geringen Gehalt an denaturiertem Molkenproteinisolat dominieren und Disulfidbrückenbindungen mit steigendem DG an Bedeutung gewinnen.

5.4.1.2 Quantifizierung der Vernetzung von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

Zur Quantifizierung der Vernetzung wurden Quellversuche durchgeführt. Dies ist eine der wenigen funktionierenden Methoden zur Bestimmung von Vernetzungskennzahlen bei Protein-basierten Folien (Hammann und Schmid, 2014). Die Herstellung der Muster zur Ermittlung der Vernetzungskennzahlen DoS (Grad der Quellung) und CLD (Vernetzungsdichte) in Abhängigkeit des DG wurden, wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben, hergestellt. Die Herangehensweise zur Bestimmung des DoS ist in Kapitel 4.5 und zur Bestimmung der CLD ist in Kapitel 4.6 beschrieben. Die Ergebnisse zu DoS und CLD

sind in Tabelle 21 zusammengefasst. Die ermittelten Zwischenergebnisse zur Berechnung der nachfolgend dargestellten Vernetzungskennzahlen sind in Anhang I-b (Tabelle 25) ergänzend aufgeführt.

Tabelle 21: Vernetzungskennzahlen DoS und CLD in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

	0 % DG	25 % DG	50 % DG	75 % DG	100 % DG
DoS_{23°C}	-	-	1010 % ± 220 %	531 % ± 18 %	400 % ± 9 %
CLD	-	-	$0.22 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$	$0.78 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$	$1.39 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-3}$

Für Filme mit einem DG von 0 und 25 % konnte kein DoS ermittelt und somit kein CLD berechnet werden, da Filme aus 0 % DG sich vollständig und aus 25 % sich teilweise aufgelöst haben. Es standen somit keine kohärenten Filme zur Charakterisierung nach der Quellung zur Verfügung (vgl. Kapitel 4.5). Denn je niedriger DG ist, desto niedriger ist der Anteil an intermolekularen Disulfidbrückenbindungen im Proteinnetzwerk. Die Schlussfolgerung hieraus ist, dass ein hoher DoS auf eine geringere Anzahl an intermolekularen Disulfidbrückenbindungen und somit auf ein schwächeres und weitmaschigeres Polymernetzwerk zurückzuführen ist. Die nachfolgende Abbildung veranschaulicht den Quellprozess (Abbildung 35).

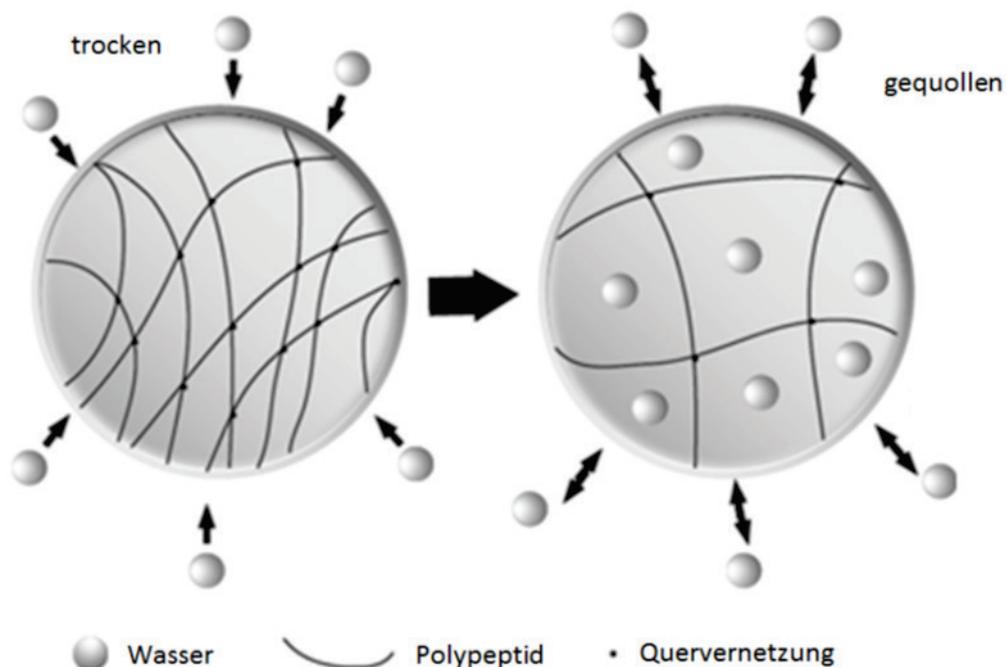


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Modellvorstellung des Quellprozesses. Adaptiert aus Koltzenburg et al. (2014) und Schmid et al. (2017b)

Während der Quellung kommt es durch den Einfluss des Lösungsmittels (hier: Wasser) zu einer Steigerung des Abstandes zwischen den Polymerketten. Elastische Kräfte von

vernetzten Polymeren wirken dem entgegen. Deshalb reagieren nicht oder zu gering quervernetzte Proteinfilme (hier: 0 % und 25 % DG) in Kontakt mit Wasser nicht mit einer Quellung, sondern lösen sich auf (vgl. Kapitel 3.3.2). Diese Beobachtung deckt sich mit den Lösungsversuchen im PP Puffersystem (welches keine spezifischen WW spaltet oder löst), da bei 0 und 25 % noch eine relativ hohe Löslichkeit gegeben ist, welche ab 50 % DG signifikant sinkt ($p < 0,05$). Guckian et al. (2006) schlussfolgerte ebenfalls, dass ein höherer Anteil an hitzedenaturiertem Molkenprotein zu einer verstärkten Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrückenbindungen führt.

Die nachfolgende Auftragung der CLD über DG zeigt deutlich, dass zwischen CLD und DG ein Zusammenhang besteht (Abbildung 36).

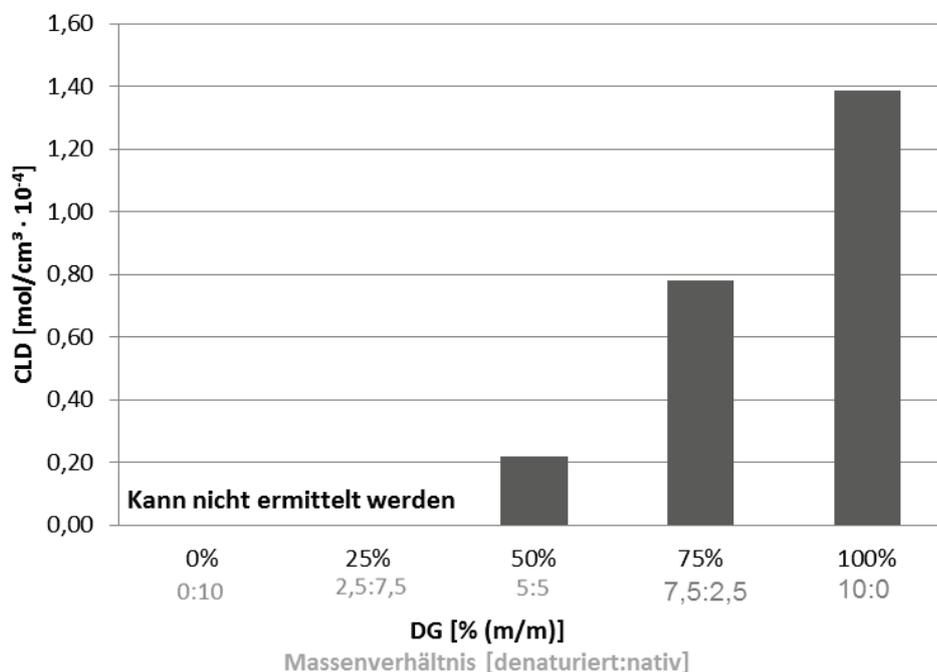


Abbildung 36: Vernetzungsdichte (CLD) in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades (DG). Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Die CLD steigt mit steigendem DG erwartungsgemäß an, was auf die vermehrte Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrückenbindungen zurückgeführt werden kann. Die berechneten Absolutwerte liegen auch im Fall von 100 % DG leicht unterhalb von natürlichem Gummi, welches nach Ahmed et al. (2012) eine CLD von $2,0 - 2,6 \cdot 10^{-4}$ mol/cm³ aufweist und deutlich unterhalb von unterschiedlichen Polyurethan-basierten Elastomeren, welche nach Hepburn (1992) eine CLD von $7,27 - 13,18 \cdot 10^{-3}$ mol/cm³ aufweisen.

In Abbildung 37 ist eine schematische Modellvorstellung zum Einfluss des Denaturierungsgrades auf die CLD von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen dargestellt.



Abbildung 37: Modellvorstellung zum Einfluss des Denaturierungsgrades (DG) auf die Vernetzungsdichte (CLD) von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen. Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Diese stark vereinfachte Modellvorstellung veranschaulicht den Einfluss des Denaturierungsgrades auf die CLD. Von links nach rechts nimmt der Denaturierungsgrad zu und mit ihm die Anzahl an möglichen Quervernetzungen (intermolekulare Disulfidbrückenbindungen). In der Realität ist natürlich nicht davon auszugehen, dass auch bei einem DG von 100 % sämtliche zur Verfügung stehenden funktionellen Gruppen intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden. Dennoch steigt die statistische Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Quervernetzungen mit steigendem DG, was auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen (steigende CLD bzw. sinkender DoS bei steigendem Denaturierungsgrad).

5.4.2 Einfluss des Denaturierungsgrades auf verpackungsrelevante Eigenschaften

Dieses Kapitel widmet sich den Ergebnissen zum Einfluss des Denaturierungsgrades auf verpackungsrelevante Eigenschaften. Zur Interpretation der Ergebnisse werden sowohl die Erkenntnisse aus den ermittelten molekularen Wechselwirkungen, als auch die Grundlagenliteratur herangezogen. Zur Ermittlung der Veränderung der verpackungsrelevanten Eigenschaften in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades wurden Molkenprotein-basierte Folien wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben hergestellt und auf deren verpackungsrelevante Eigenschaften Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit, mechanischen Eigenschaften und Oberflächenenergie untersucht (vgl. Kapitel 4.3).

5.4.2.1 Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

Abbildung 38 zeigt die Sauerstoffdurchlässigkeit und Abbildung 39 die Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien, hergestellt aus Formulierungen mit unterschiedlichen Denaturierungsgrad.

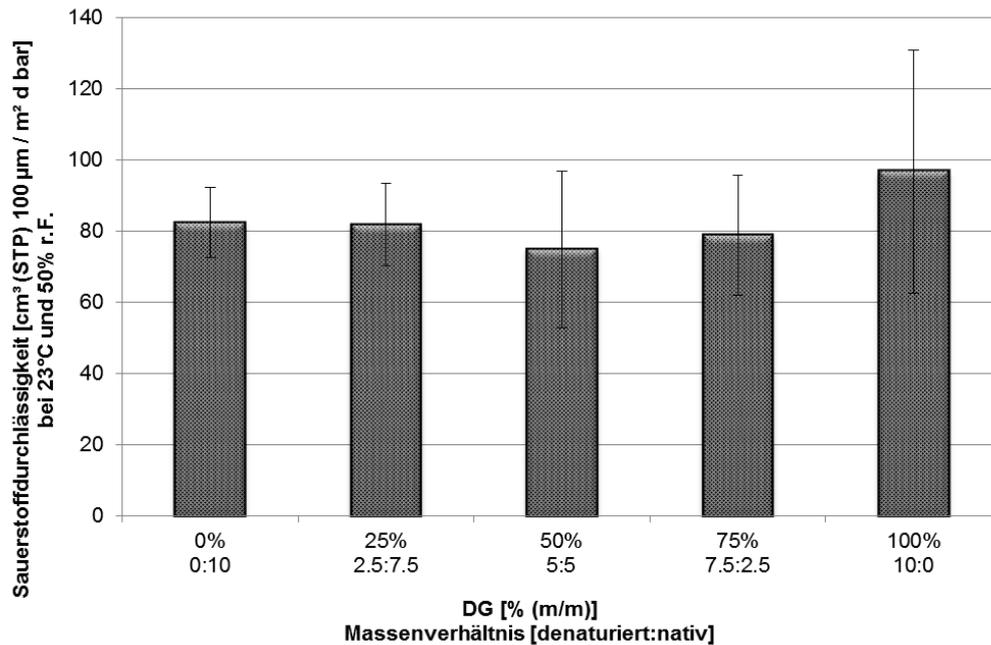


Abbildung 38: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad. Normiert auf 100 µm Foliendicke. Die Fehlerbalken geben die Distanz zum Minimal- und Maximalwert an. Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Nach Perez-Gago und Krochta (2001) weisen denaturierte Molkenproteine eine aufgefaltete lineare Struktur auf, die zu einer dichteren Polymerpackung mit geringerem freien Volumen führt. Auch der signifikante Anstieg der Löslichkeit im IEF-TH Puffersystem, welches Wasserstoffbrückenbindungen löst und Disulfidbrückenbindungen spaltet, weist auf steigende molekulare Wechselwirkungen, insbesondere Wasserstoff- und Disulfidbrücken, hin. Die ermittelten Sauerstoffdurchlässigkeitswerte zeigen aber dennoch keine Abhängigkeit zum DG auf. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass bei den verwendeten Formulierungen der DG und somit die Struktur bzw. die molekularen Wechselwirkungen keinen nachweisbaren Effekt auf die Gasdurchlässigkeit haben, was auch die Studien von Mate und Krochta (1996) und Perez-Gago und Krochta (1999) sowie die bisher dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zum Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts bestätigen (Schmid et al., 2013a, Schmid, 2013)..

Auch die in Abbildung 39 dargestellten Ergebnisse zur Wasserdampfdurchlässigkeit zeigen keine eindeutige Abhängigkeit zum DG. Zwar scheint die Folie mit 50 % DG zu den anderen Folien statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) zu sein, so besteht aber bei Anwendung eines Signifikanzniveaus von 1 % kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten sämtlicher Muster ($p > 0,01$).

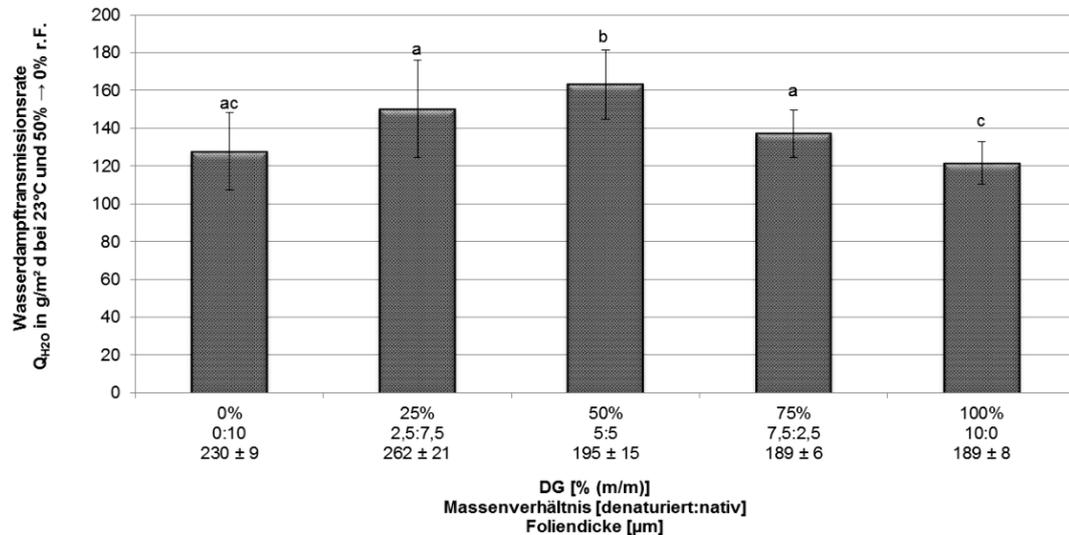


Abbildung 39: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Die Ergebnisse korrelieren weitestgehend mit den Ergebnissen von Guckian et al. (2006). Sie ermittelten lediglich eine leicht erhöhte Wasserdampfdurchlässigkeit bei einem DG von 20% (m/m). McHugh et al. (1994) und Perez-Gago et al. (1999) konnten eine tendenziell höhere Wasserdampfdurchlässigkeit von vollständig nativen Molkenprotein-basierten Folien im Vergleich zu 100 % denaturierten Molkenprotein-basierten Folien feststellen. Dieser Unterschied war aber auch nicht signifikant, was wiederum die Annahme bestätigt, dass die durch Denaturierung hervorgerufene erhöhten molekularen Wechselwirkungen kaum einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Durchlässigkeitseigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen bei den verwendeten Messbedingungen (23 °C und 50 % \rightarrow 0 %) haben. Beschichtungen, welche bei 23 °C und 85 % \rightarrow 0 % gemessen wurden, zeigten hingegen eine deutliche Reduktion der Wasserdampfdurchlässigkeit ab einem DG von 25 % (Abbildung 40).

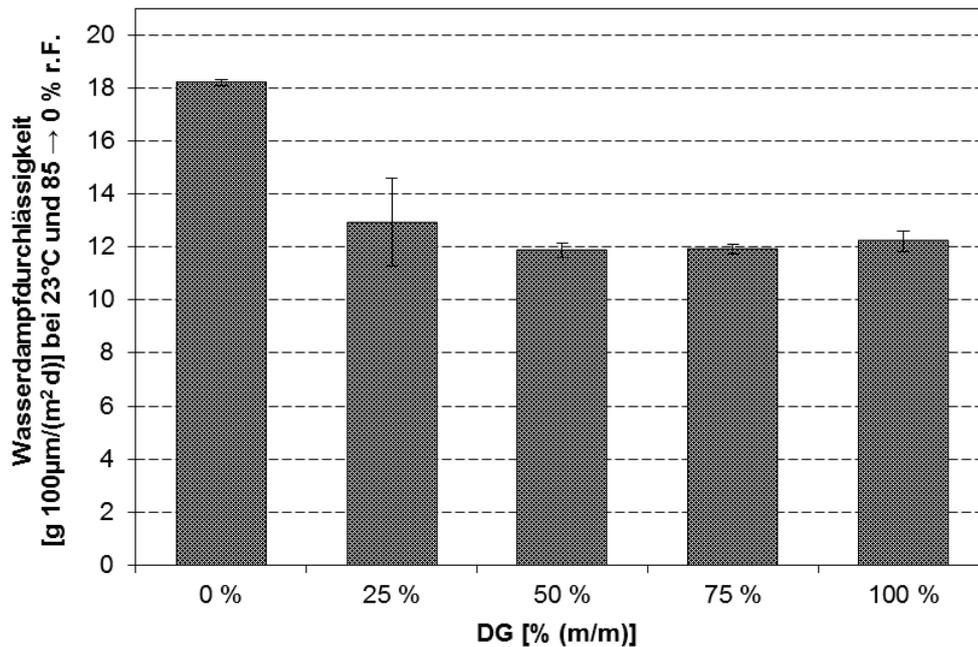


Abbildung 40: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit des DG. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Adaptiert und übersetzt aus (Schmid et al., 2014a)

Eine weitere Erhöhung des DG resultierte aber nicht in einer weiteren Reduktion der Wasserdampfdurchlässigkeit (Schmid et al., 2014a). Dies könnte dadurch begründet sein, dass die bei steigendem DG ausgebildeten molekularen Wechselwirkungen (insbesondere kovalente Bindungen) bei höheren relativen Feuchtigkeiten einen stärkeren Einfluss auf die Durchlässigkeitseigenschaften haben (vgl. Kapitel 5.5.2.1), da Molkenproteinbasierte Folien und Beschichtungen sensibel auf Feuchtigkeit reagieren. Dies konnte bereits, wie in Kapitel 5.2.2 beschrieben, bestätigt werden.

5.4.2.2 Mechanische Eigenschaften in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

In Abbildung 41 und Abbildung 42 sind die mechanischen Eigenschaften (E-Modul und Zugfestigkeit) von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades aufgeführt.

Ab einem DG von 50 % steigt das E-Modul statistisch signifikant an ($p < 0,05$), wobei insgesamt der E-Modul mit steigendem DG ansteigt. Dies kann auf die vermehrte Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen zurückgeführt werden (steigende CLD mit steigendem DG). Native Molkenprotein-basierte Folien sind weitestgehend über schwächere nicht-kovalente WW stabilisiert (u.a. Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen). Starke intermolekulare Wechselwirkungen sind nicht vorhanden und bilden sich erst mit steigendem DG aus (Guckian et al., 2006). Die dargestellten Ergebnisse, also die signifikante Erhöhung des E-Moduls bei steigendem DG

stimmen gut mit den Ergebnissen von Guckian et al. (2006), Perez-Gago und Krochta (2001) und (Perez-Gago et al., 1999) überein.

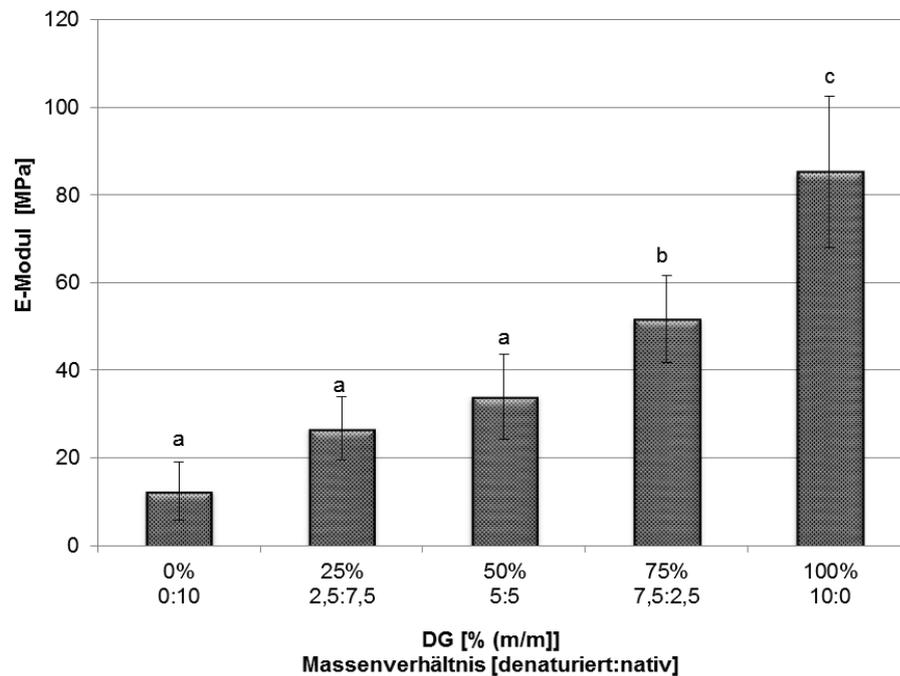


Abbildung 41: E-Modul von Molkenprotein-basierten Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

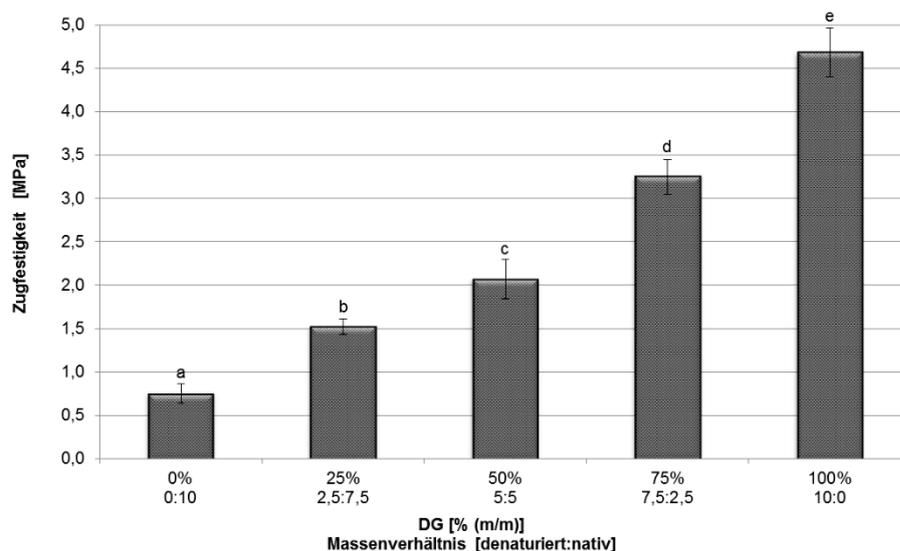


Abbildung 42: Zugfestigkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

Auch die Zugfestigkeit von Molkenprotein-basierten Folien (Abbildung 42) steigt signifikant ($p < 0,05$) mit steigendem Denaturierungsgrad und kann mit denselben Argumenten wie die Zunahme des E-Moduls mit steigendem Denaturierungsgrades begründet werden.

5.4.2.3 Änderung der Oberflächenenergie in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades

Durch die Bestimmung der Oberflächenenergie sowie deren polaren und dispersen Anteils, können u.a. Abschätzungen über die Oberflächenchemie eines Festkörpers sowie über das Benetzungs- und das Adhäsionspotential der unterschiedlichen Beschichtungsmaterialien auf dem Festkörper getroffen werden (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Oberflächenenergie sowie deren disperse und polare Anteile von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit des Denaturierungsgrades wurden deshalb, wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 43 dargestellt.

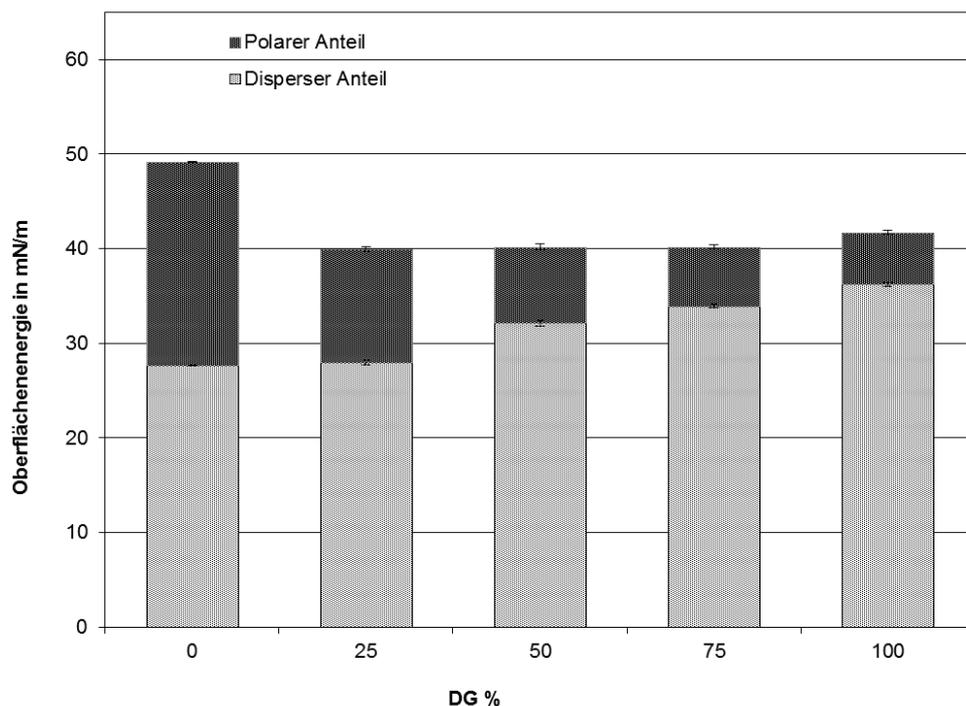


Abbildung 43: Oberflächenenergie von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit vom Denaturierungsgrad (DG). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Adaptiert und übersetzt aus Schmid et al. (2014a)

Eine Erhöhung des Denaturierungsgrades von 0 auf 25 % führt zu einer deutlichen Reduktion der Oberflächenenergie um fast 20 %, wobei diese Reduktion durch den Abfall des polaren Anteils der Oberflächenenergie begründet ist. Eine weitere Erhöhung des Denaturierungsgrades führt zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der Oberflächenenergie, aber zu einer Änderung des Verhältnisses zwischen polarem und dispersem Anteil. Der disperse Anteil steigt hierbei um nahezu den gleichen Betrag um

den der polare Anteil sinkt. Der Anstieg des dispersen Anteils kann durch die verstärkte Ausbildung von Van-der-Waals Kräften erklärt werden. Durch die Lösungsversuche zur Bestimmung der qualitativen molekularen Wechselwirkungen und insbesondere durch den ermittelten Anstieg der CLD bei steigendem DG konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Molekulargewicht bei Erhöhung des DG steigt. Diese Molekulargewichtserhöhung führt zu einer verstärkten Ausbildung von Van-der-Waals Kräften, welche in dispersen Materialien auftreten (Drummond und Chan, 1997). Da das Molekulargewicht proportional zu der Anzahl an Elektronen in der äußersten Hülle des Moleküls ist, nehmen entlang der Polypeptidketten die Van-der-Waals Kräfte zu und erhöhen den dispersen Anteil der Oberflächenenergie (Pauling, 1970, Parsegian, 2006). Somit liefern die in Abbildung 43 aufgeführten Ergebnisse einen weiteren Nachweis für die denaturierungsbedingte Quervernetzung und fügen sich in den bisher erbrachte Argumentationskette ein. (Schmid et al., 2014a)

5.5 TG-induzierte Quervernetzung

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Transglutaminase (TG)-induzierten Quervernetzung (Vernetzungsreaktion der Aminosäure Glutamin und Lysin, katalysiert durch TG) von Molkenprotein-basierten Formulierungen auf das Ausmaß der Vernetzung in Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen werden in nachfolgendem Kapitel 5.5.1 beschrieben. Die daraus resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen werden in Kapitel 5.5.2 dargestellt und interpretiert.

5.5.1 Veränderung der Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit der TG-Vernetzung

Für die Ermittlung des Einflusses der TG-Zugabe auf die Vernetzungskennzahlen wurden Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben hergestellt und, wie in den Kapiteln 4.5 und 4.6 beschrieben, charakterisiert. Die für die Berechnung der Vernetzungsdichte (CLD) und des Vernetzungsgrades (DoC) verwendeten Mess- und Zwischenergebnisse sind in Anhang I-e aufgeführt.

5.5.1.1 Quantifizierung der Vernetzungskennzahlen von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen in Abhängigkeit der TG-Vernetzung

Die unter definierten Bedingungen ermittelten Ergebnisse zum Grad der Quellung (engl. degree of swelling – DoS) sind in Abbildung 44 sowie die Ergebnisse zur Vernetzungsdichte (engl. crosslinking density – CLD) und zum Vernetzungsgrad (engl. degree of crosslinking – DoC) in Abbildung 45 gemeinsam dargestellt. Dies ist möglich, da die beiden Kennzahlen (CLD und DoC) zum durchschnittlichen Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen (M_c) und somit auch zueinander proportional sind (Gleichung 29).

Gleichung 29: Proportionalität zwischen CLD und DoC (vgl. Kapitel 3.3.2)

	Symbol	Bezeichnung	Einheit
$DoC = \frac{\overline{M}_0}{\rho_{WPI}} \cdot CLD$	DoC	Vernetzungsgrad	[-]
	CLD	Vernetzungsdichte	[mol/cm ³]
	\overline{M}_0	Ø Molekulargewicht Monomere	[g/mol]
	ρ_{WPI}	Dichte der WPI-Filme = 1,40±0,06 (Schmid et al., 2014b)	[g/cm ³]

Die ermittelten Zwischenergebnisse zur Berechnung der nachfolgend dargestellten Vernetzungskennzahlen sind in Anhang I-e ergänzend aufgeführt.

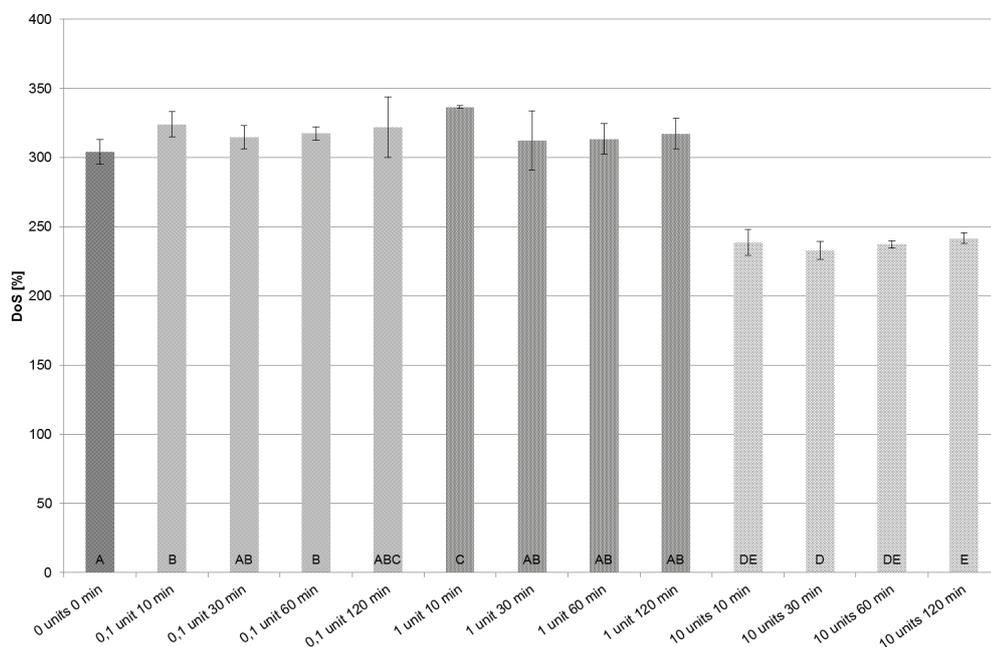


Abbildung 44: DoS in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 (S. 50) genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen

Wie in Kapitel 3.3.2 erläutert, handelt es sich beim DoS um einen relativen Wert, welcher sich umgekehrt proportional zum DoC und auch zur CLD verhält. Somit führt eine erhöhte Quervernetzung innerhalb eines Polymers zu einem sinkenden Grad der Quellung (DoS). Im Umkehrschluss deutet somit ein geringerer DoS auf eine höhere Vernetzung hin (hier DoC und CLD). Unter Berücksichtigung der in Abbildung 44 dargestellten Ergebnisse zum DoS kann somit festgestellt werden, dass sich die mit niedrigen TG-Konzentrationen behandelten Proben kaum signifikant voneinander und von der Referenz unterscheiden, während die Proben, die mit einer TG-Konzentration von 10 Units behandelt wurden, signifikant niedrigere DoS-Werte aufweisen, was auf eine höhere Quervernetzung schließen lässt (siehe auch Abbildung 45).

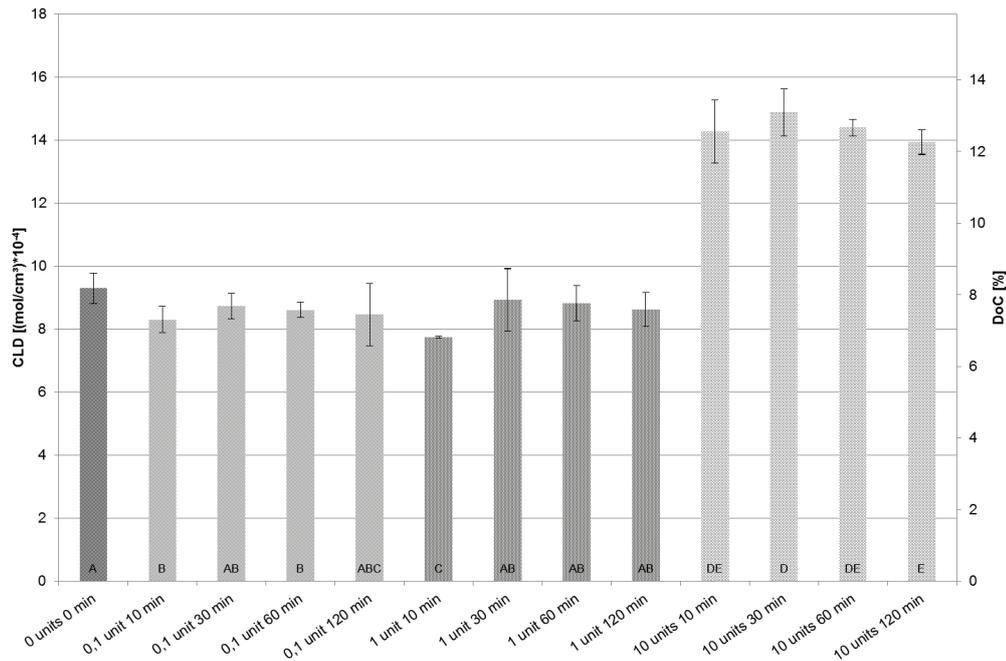


Abbildung 45: Vernetzungsgrad und Vernetzungsdichte in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen

Der DoC und die CLD bei niedriger TG-Konzentration unterscheiden sich meist nicht signifikant und nur sehr gering von der Referenzprobe. Dies deutet darauf hin, dass bei Konzentrationen von „0,1 bzw. 1 Unit“ noch keine mit der angewendeten Methode nachweisbare TG-induzierte Quervernetzung stattgefunden hat. Erst bei „10 Units“ konnten signifikant höhere DoC und CLD Werte ermittelt werden. Die Inkubationszeit scheint dabei keinen signifikanten Einfluss auf die Quervernetzung zu haben. Insgesamt liegen die CLD Werte oberhalb der von natürlichem Gummi (ohne Vulkanisationsbehandlung). Der CLD von natürlichem Gummi liegt laut Ahmed et al. (2012) bei $2,0 \cdot 10^{-4}$ mol/cm³ und somit unterhalb der hier ermittelten Werte, welche zwischen $7,7 \cdot 10^{-4}$ – $14,9 \cdot 10^{-4}$ mol/cm³ liegen.

5.5.2 Einfluss der TG-Quervernetzung auf verpackungsrelevanten Eigenschaften

Dieses Kapitel widmet sich den Ergebnissen zum Einfluss der TG-Quervernetzung auf verpackungsrelevante Eigenschaften. Zur Interpretation der Ergebnisse werden sowohl die Erkenntnisse aus den ermittelten Vernetzungskennzahlen als auch die Grundlagenliteratur herangezogen. Zur Ermittlung der Veränderung der verpackungsrelevanten Eigenschaften in Abhängigkeit der TG-Quervernetzung wurden Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen, wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben, hergestellt und auf deren Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit, mechanische Eigenschaften, Farbe und Oberflächenenergie untersucht (vgl. Kapitel 4.3).

5.5.2.1 Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der TG-Quervernetzung

Abbildung 46 zeigt die Wasserdampfdurchlässigkeit von Folien mit unterschiedlichen TG-Konzentrationen (Units) und Inkubationszeiten.

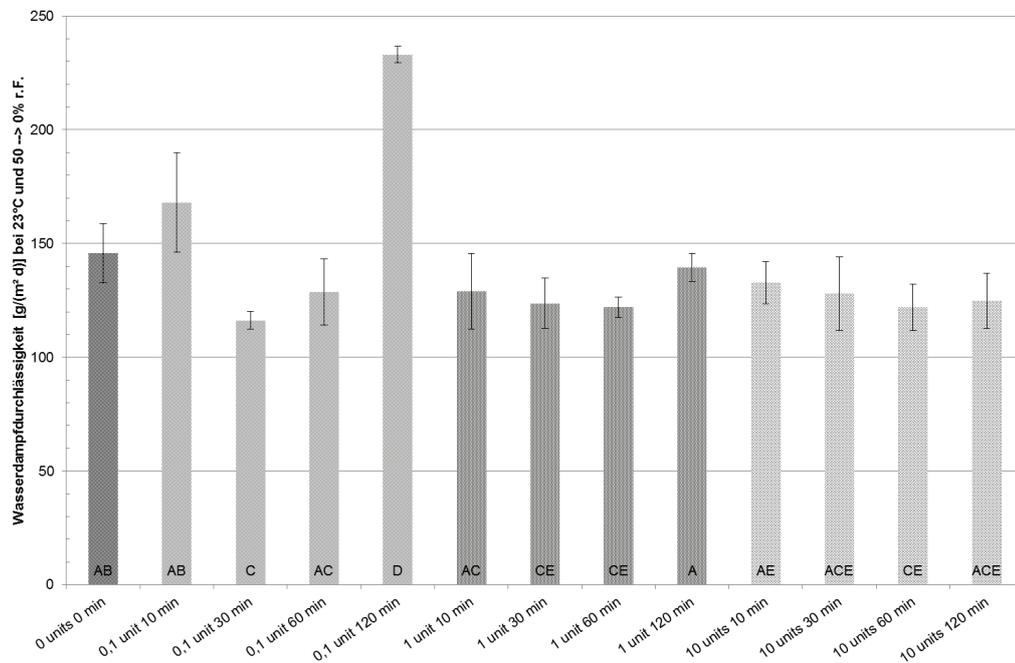


Abbildung 46: Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit. Die \varnothing Foliendicke betrug $190 \pm 13 \mu\text{m}$. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen

Mit Ausnahme des Musters „0,1 Unit bei 120 min“, welches im Vergleich zur Referenz (Molkenprotein-basierte Standardformulierung WPSS ohne TG) eine signifikant höhere Wasserdampfdurchlässigkeit aufweist ($p < 0,05$), konnten die Werte durch eine TG-Behandlung gegenüber der Referenz tendenziell erniedrigt werden. Allerdings konnte eine signifikante Reduzierung der Wasserdampfdurchlässigkeit im Vergleich zur Referenz nur bei vier Mustern (0,1 bzw. 1 Unit bei jeweils 30 min und 1 Unit und 10 Units bei jeweils 60 min) beobachtet werden ($p < 0,05$).

Der Diffusionskoeffizient (D) und der Sorptionskoeffizienten (S) für Wasserdampf wurden exemplarisch an ausgewählten Mustern von TG-quervernetzten Folien bestimmt. Hierfür wurden Folien mit „0,1 Unit und 1 Unit TG nach 1440 min“ Inkubationszeit sowie jeweils Referenzfolien ohne Inkubationszeit für Sorptionsexperimente verwendet. D und S wurden auf Basis der Messergebnisse aus den Sorptionsexperimenten, wie in Kapitel 4.3.4.3 beschrieben, berechnet. Durch Multiplikation von D und S wurde der Permeationskoeffizient (P) berechnet (vgl. Kapitel 3.2.1.3). Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung gemeinsam mit den Koeffizienten für gängige Polymere dargestellt (Abbildung 47).

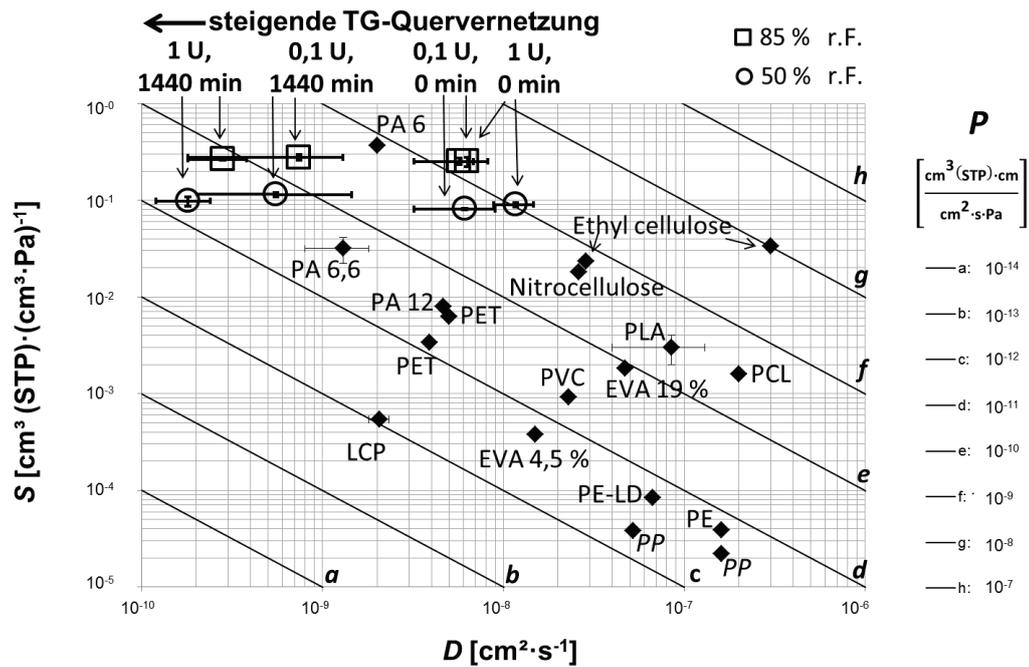


Abbildung 47: Permeations-, Diffusions- und Sorptionskoeffizienten für Wasserdampf von Molkenprotein-basierten Folien. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Übersetzt aus Schmid et al. (2014b)

Die Ergebnisse aus den Sorptionsmessungen zeigen deutlich, dass sich der Wasserdampfsorptionskoeffizient S je nach Messbedingung deutlich unterscheidet. Der S gemessen bei 85 % r. F. ist deutlich größer als der S bei 50 % r. F.. Dies deutet darauf hin, dass strenggenommen das Gesetz nach Henry (vgl. Gleichung 2, S. 21) nicht gilt, aber dennoch als Vereinfachung angenommen wird. Bei gleicher relativer Feuchte war die Wasseraufnahme und damit S bei allen Mustern ähnlich. Dies deutet darauf hin, dass die TG-Quervernetzung einen geringen Einfluss auf den Wasserdampfsorptionskoeffizienten hat, wohingegen der Diffusionskoeffizient deutlich reduziert wird. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine Reduktion der Wasserdampfdurchlässigkeiten (bzw. des Permeationskoeffizienten P) durch TG-Quervernetzung maßgeblich auf die Verringerung des Diffusionskoeffizienten zurückzuführen ist. Dieser Zusammenhang wurde auch von Olsson et al. (2013) für quervernetzte Stärkefolien beschrieben.

Abbildung 48 zeigt die auf 100 μm Foliendicke normierte Sauerstoffdurchlässigkeit der mit TG behandelten Folien in Abhängigkeit der TG-Konzentration und Inkubationszeit. Mit Ausnahme des Musters „0,1 Units TG bei 120 min Einwirkzeit“ zeigen alle Muster mit steigender TG-Konzentration bei allen Einwirkzeiten eine tendenziell sinkende Sauerstoffdurchlässigkeit.

Bei genauerer Betrachtung der unterschiedlichen Einwirkzeiten fällt auf, dass für die beiden TG-Konzentrationen „1 und 10 Units“ die Wasserdampfdurchlässigkeit nach „30 und 60 min“ niedriger sind als nach „10 und 120 min“ Inkubationszeit. Dieser Zusammenhang ist auch bei E-Modul und Zugfestigkeit zu beobachten (vgl. Kapitel 5.5.2.2).

Insgesamt ist aber ein eindeutiger Trend zu beobachten, dass die Sauerstoffdurchlässigkeit bei allen Einwirkzeiten mit steigender Konzentration an Transglutaminase sinkt.

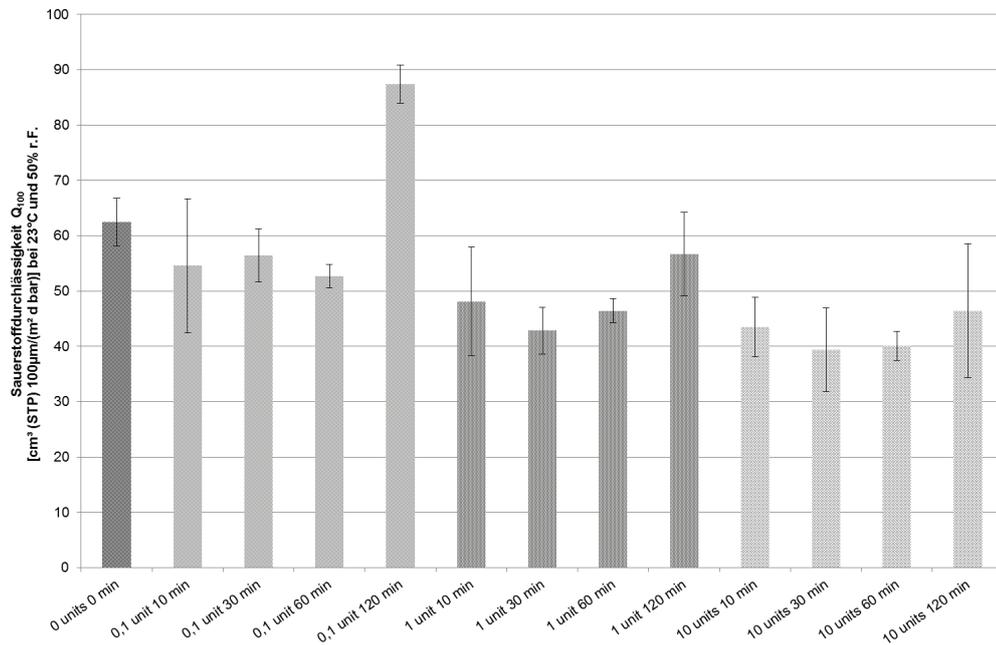


Abbildung 48: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der TG-Konzentration und Inkubationszeit. Die Fehlerbalken zeigen Minimal- und Maximalwert. Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen

Des Weiteren wurden Molkenprotein-basierte Beschichtungen hergestellt und auf deren Sauerstoffdurchlässigkeit untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 49 dargestellt.

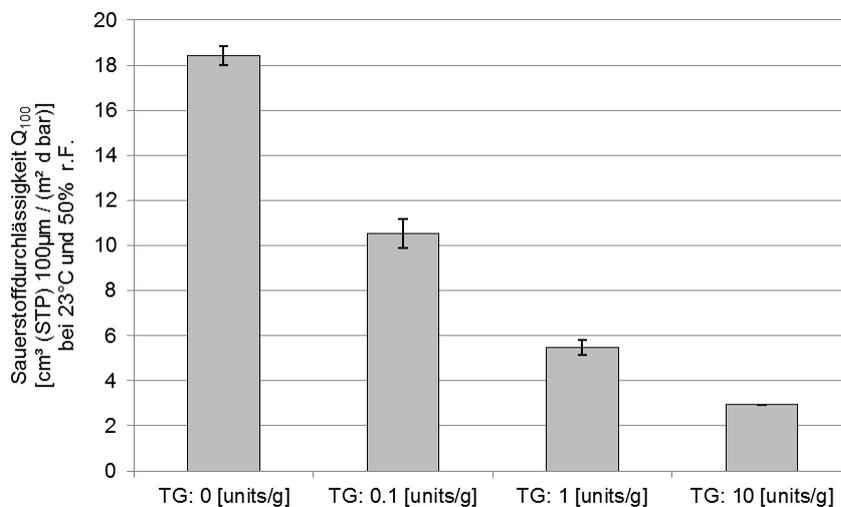


Abbildung 49: Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Beschichtungen auf PET in Abhängigkeit der TG-Konzentration bei 120 min Inkubationszeit. Die Fehlerbalken zeigen Minimal- und Maximalwert. Adaptiert und übersetzt aus Schmid et al. (2014b)

Ein eindeutiger Trend, dass die Sauerstoffdurchlässigkeit mit steigender Konzentration an Transglutaminase sinkt, wird insbesondere bei Beschichtungen deutlich (vgl. Abbildung 49) und weist auch darauf hin, dass die Reaktion nicht substratlimitiert ist. (Schmid et al., 2014b)

Im Vergleich zu den Sauerstoffdurchlässigkeitswerten der im Gießfilmverfahren hergestellten Molkenprotein-basierten Folien zeigen alle Beschichtungen niedrigere Werte auf. Dies ist, wie bereits mehrfach erwähnt, auf die sich deutlich unterscheidenden Herstellungsparameter (Nassfilmdicke, Orientierung, Trocknungstemperatur, Trocknungszeit, etc.) bei der Herstellung von Folien bzw. Beschichtungen zurückzuführen. Ein direkter Vergleich der absolut gemessenen Permeationswerte ist daher nicht möglich. Dennoch zeigt sich derselbe Trend zur sinkenden Sauerstoffdurchlässigkeit bei steigender TG-Konzentration, was sich durch eine höhere Quervernetzung durch TG zurückführen lässt. Der Anstieg der Quervernetzung (ausgedrückt als CLD und DoC) konnte zwar im Rahmen dieser Arbeit erst ab einer TG-Konzentration von 10 Units signifikant nachgewiesen werden, so scheinen aber insbesondere bei Beschichtungen bereits niedrige TG-Konzentrationen einen deutlichen Einfluss auf die Sauerstoffdurchlässigkeitseigenschaften zu haben. Die Massenkonzentrationen der verwendeten Enzymzubereitung in Folien und Beschichtung beträgt bei 10 Units kleiner 5 %, bei 1 Unit kleiner 0,5 % und bei 0,1 Unit sogar kleiner 0,05 % sind (vgl. Tabelle 11, S. 50). Es ist nicht davon auszugehen, dass diese geringen Massenkonzentrationen an Enzymzubereitung selbst (also auch ohne Aktivität) für die Reduktion der Sauerstoffdurchlässigkeit verantwortlich sind, sondern auf die TG-induzierte Quervernetzung zurückzuführen ist. Dies konnte durch Vergleichsmessungen mit thermisch inaktivierter TG bestätigt werden. (Schmid et al., 2014b)

5.5.2.2 Mechanische Eigenschaften in Abhängigkeit der TG-Quervernetzung

In Abbildung 50 und Abbildung 51 sind die mechanischen Eigenschaften (E-Modul und Zugfestigkeit) von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der TG-Konzentration (Zugabe) und Inkubationszeit aufgeführt.

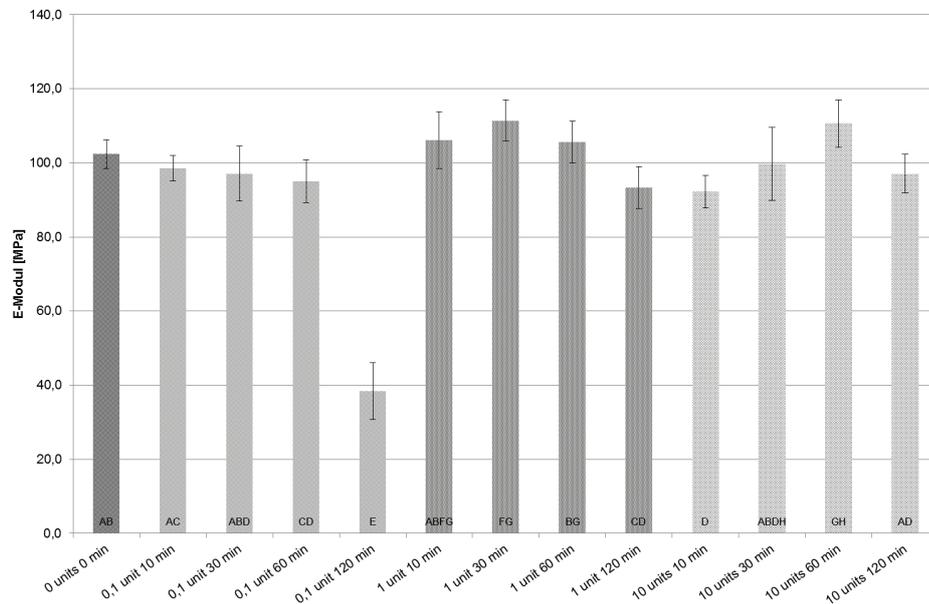


Abbildung 50: E-Modul in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit. Balken mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen

Die Messung des E-Modul der mittels TG quervernetzten Folien ergab nur wenige signifikante Unterschiede zu Referenz ohne TG. Nur vereinzelt sind signifikante Unterschiede aufzuzeigen ($p < 0,05$), die aber keinem eindeutigen Trend folgen. Zu erwarten wäre, dass mit steigender Quervernetzung der E-Modul steigt. Wie aber schon bei der Bestimmung von CLD und DoC scheint die mechanische Messung zu wenig sensitiv zu sein. Besonders auffällig ist wieder das Muster für „120 min Inkubationszeit mit 0,1 Unit“ TG-Konzentration. Der E-Modul ist mit ca. 40 MPa mehr als 50 % reduziert im Vergleich zur Referenz. Dieses Muster war bereits bei den Durchlässigkeitsmessungen auffällig. Nach Reproduktion und Nachmessung wurden die ermittelten Werte bestätigt. Eine Begründung für dieses Verhalten bedarf näherer Untersuchungen unter Verwendung sensiblerer analytischer Methoden (z.B. DMTA, dynamisch mechanisch thermische Analyse), die im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich waren.

Auch bei der Betrachtung der ermittelten Zugfestigkeit der behandelten Folien (Abbildung 51) sind nur wenige signifikante Unterschiede zur Referenz feststellbar.

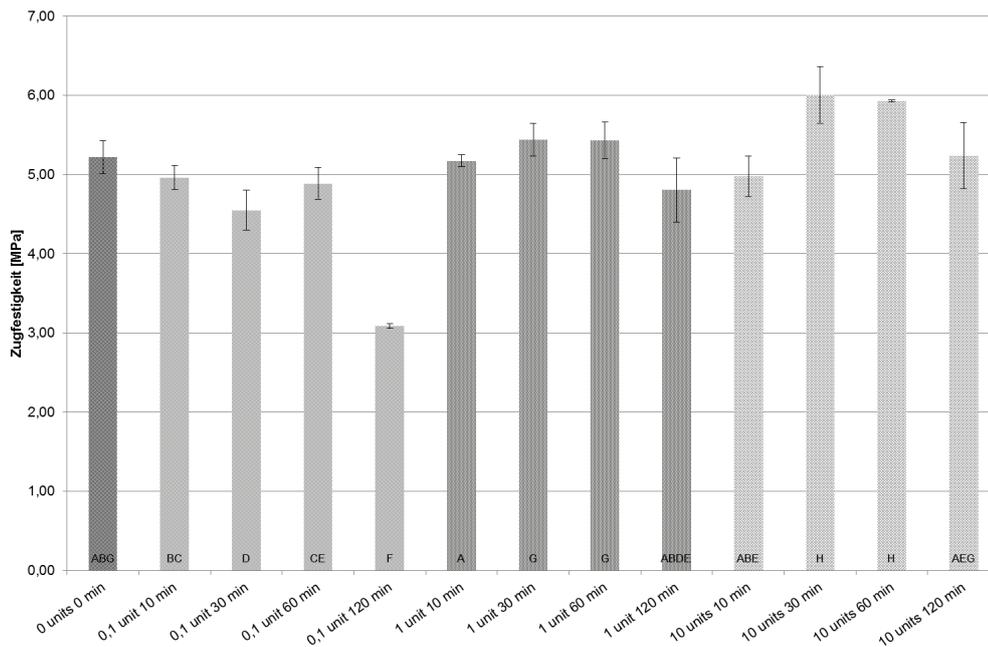


Abbildung 51: Zugfestigkeit in Abhängigkeit der TG-Zugabe und Inkubationszeit. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die Probenbezeichnungen entsprechen der in Tabelle 11 genannten Zusammensetzung der TG behandelten Formulierungen.

Insbesondere Muster mit „0,1 Units“ TG-Konzentration zeigen eine Abnahme der Zugfestigkeit im Vergleich zu der Referenz, obwohl die angenommene Arbeitshypothese eine Zunahme der Zugfestigkeit durch TG-Quervernetzung vorsieht. Zudem ist auffällig, dass wie schon beim E-Modul und Permeation der Wert bei einer Inkubationszeit von „120 min und 0,1 Unit“ einen signifikant niedrigeren Wert aufweist. Lediglich die Muster mit einer TG-Konzentration von „10 Units“ und Inkubationszeiten von „30 und 60 min“ zeigen Zugfestigkeitswerte die gegenüber der Referenz signifikant erhöht sind. Yildirim und Hettiarachchy (1998) führten mechanische Messungen an TG-quervernetzten WPI- und Sojaglobulin-11S-Folien sowie an Folien aus Mischungen der beiden Proteine durch. Dabei lag die Zugfestigkeit ihrer WPI-Referenzprobe mit 5,64 MPa in derselben Größenordnung wie die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte. Allerdings war es ihnen möglich, die Zugfestigkeit sowohl für WPI-, als auch für Sojaprotein-Folien durch Zugabe von „20 Units“ TG je g Protein und einer Inkubationszeit von 5 h zu verdoppeln. Dies kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zwar nicht bestätigt werden, wobei auch eine Falsifizierung aufgrund der großen Unterschiede bei Rezeptur, Herstellung, TG-Konzentration und Inkubationszeit auch nicht möglich ist.

5.5.2.3 Änderung der Oberflächenenergie in Abhängigkeit der TG-Quervernetzung

Abbildung 52 zeigt den Einfluss der TG-Zugabe (Konzentration) auf die Oberflächenenergie von Molkenprotein-basierten Beschichtungen (beschichtet auf PET) bei jeweils 120 min Inkubationszeit.

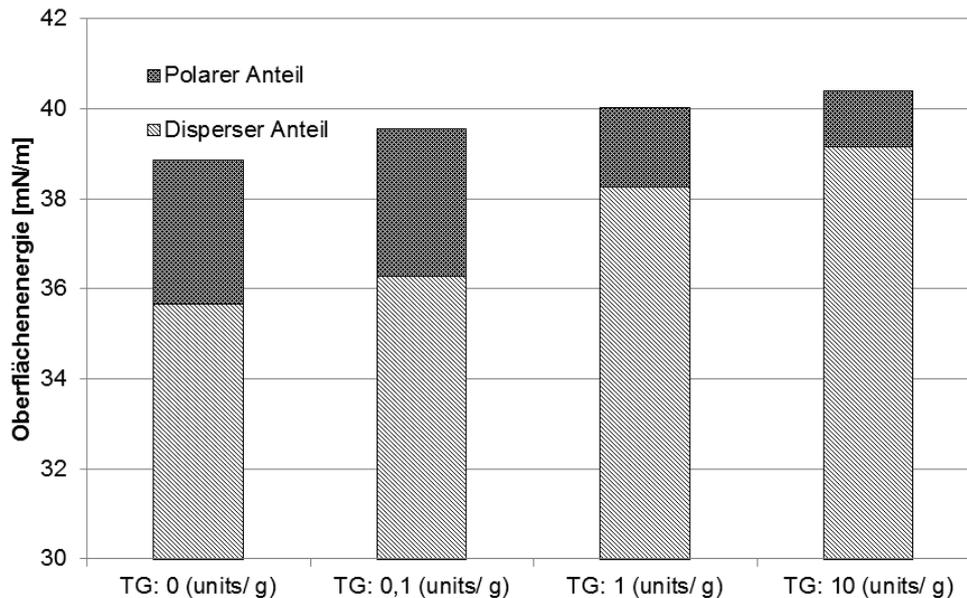


Abbildung 52: Gesamtoberflächenenergie sowie polarer und disperser Anteil von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit der TG-Konzentration bei 120 Minuten Inkubationszeit. Übersetzt aus Schmid et al. (2014b).

Mit zunehmender TG-Konzentration steigt der disperse Anteil der Oberflächenenergie deutlich stärker an als der polare Anteil abnimmt. Hieraus resultiert ein Anstieg der Gesamtoberflächenenergie mit steigender TG-Konzentration, was auf eine deutliche Quervernetzung und somit auf eine Erhöhung des Molekulargewichts zurückzuführen ist (vgl. Argumentation Kapitel 5.4.2.3). Dieser Zusammenhang, also dass Polymere mit einem höheren Molekulargewicht höhere Oberflächenenergien aufweisen, wurde auch von LeGrand und Gaines (1969) für Polyisobutylen und von Dee und Sauer (1992) für Polystyrol und Polyethylen beschrieben. Der polare Anteil der Oberflächenenergie sinkt aufgrund der sinkenden Anzahl an polaren Gruppen bei den an der Quervernetzungsreaktion beteiligten Aminosäuren (vgl. Kapitel 3.1.7).

5.6 UV-Bestrahlung

Der Einfluss der UV-Bestrahlung von Molkenprotein-basierten Folien auf die molekularen Wechselwirkungen sowie die Vernetzungskennzahlen und daraus resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse werden in den nächsten Kapiteln 5.6.1 und 5.6.2 dargestellt.

5.6.1 Veränderung der molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts

Um den Einfluss unterschiedlicher UV-Bestrahlungsdosen auf die molekularen Wechselwirkungen und auf die Vernetzungskennzahlen (Grad der Quellung (engl. degree of swelling – DoS), Vernetzungsdichte (engl. crosslinking density – CLD) und Vernetzungsgrad (engl. degree of crosslinking –DoC)) zu messen, wurden Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, hergestellt und, wie in den Kapiteln 4.4, 4.5 und 4.6 beschrieben, charakterisiert. Die für die Berechnung von CLD und DoC verwendeten Mess- und Zwischenergebnisse sind in Anhang I-e aufgeführt.

5.6.1.1 Qualifizierung der molekularen Wechselwirkungen in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

Die Veränderungen von molekularen Wechselwirkung-Eigenschaftsbeziehungen in Folge einer UV-Bestrahlung von Molkenprotein-basierten Folien können mittels der in Abbildung 53 gezeigten Ergebnisse der durchgeführten Proteinlösungsversuche abgeschätzt werden. Alle Proben zeigen eine insgesamt geringe Löslichkeit im Phosphatpuffer (PP) als auch IEF-U-D Puffersystem. Aufgrund der Tatsache, dass der Phosphatpuffer keine spaltende Wirkung auf molekulare Wechselwirkungen hat, kann gefolgert werden, dass fast alle Peptidketten aufgrund der hitzeinduzierten Proteindenaturierung über kovalente und nicht-kovalente Bindungen verbunden sind. Da die funktionellen Gruppen der Molkenproteinketten verschiedene chemische Bindungen eingehen können, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Proteine durch eine einzelne Wechselwirkung, wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen, in das Polymernetzwerk eingebunden sind. Dies wird bestätigt durch die geringe Löslichkeit in IEF-U-D Puffer, der hydrophobe Wechselwirkungen spaltet.

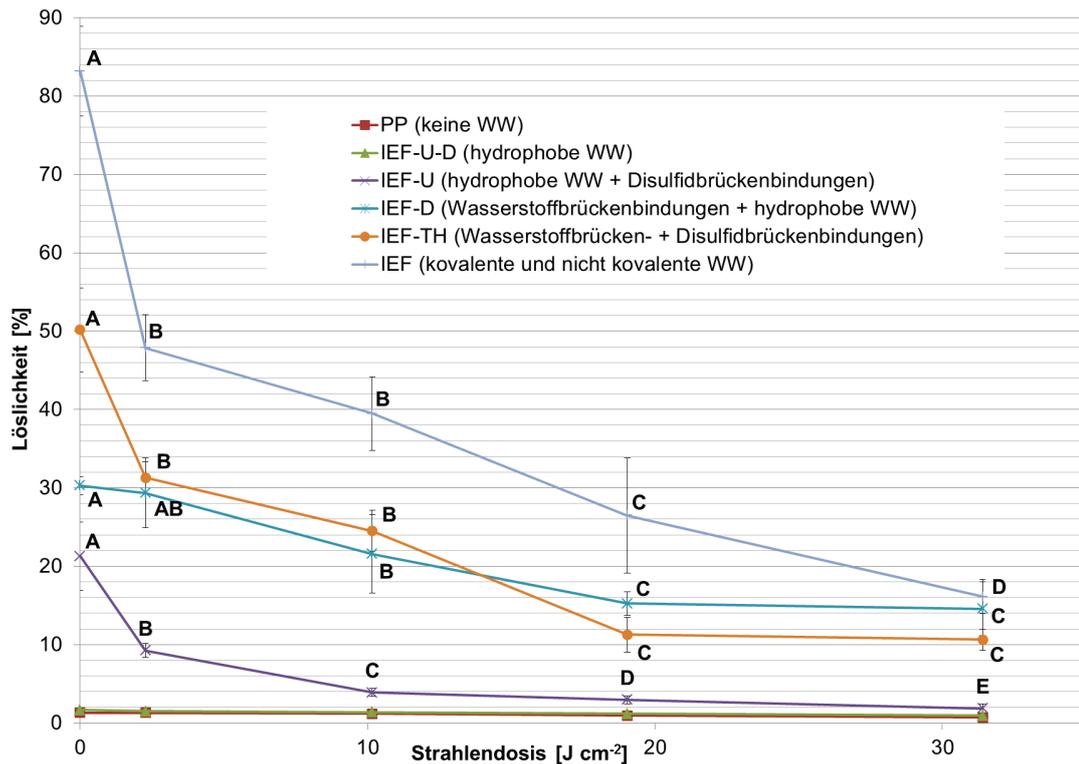


Abbildung 53: Löslichkeit der UV-bestrahlten Molkenprotein-Beschichtungen in verschiedenen Puffersystemen. Die Proben wurden mit UV-Bestrahlungsdosen von 0 (Kontrolle); 2,3; 10,2; 19,0 und 31,4 J/cm² bestrahlt. Unterschiedliche Buchstaben innerhalb eines Puffersystems bedeuten, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten besteht ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2015c).

Die Proteinlöslichkeit nimmt insgesamt in den übrigen vier Puffersystemen mit zunehmender Bestrahlungsdosis signifikant ab. Die Reduktion der Proteinlöslichkeit ohne gleichzeitige Erhöhung der Löslichkeit in einem der anderen Puffersysteme deutet darauf hin, dass zusätzliche intermolekulare Wechselwirkungen mit zunehmender Bestrahlungsdosis ausgebildet werden. Diese Wechselwirkungen scheinen von den verwendeten Puffersystemen nicht erfasst werden zu können. Wie in Kapitel 3.1.8 ausführlich beschrieben, werden durch UV-Bestrahlung kovalente Bindungen zwischen den aromatischen Aminosäuren des Proteins ausgebildet. Die Ausbildung dieser zusätzlichen UV-induzierten kovalenten Bindungen scheint der Grund für die Reduktion der Proteinlöslichkeit zu sein. Zudem ist eine überproportional starke Reduktion der Proteinlöslichkeit bei einer Bestrahlungsdosis von 2,3 J/cm² zu erkennen. Bei höheren Bestrahlungszeiten bzw. -dosen nimmt die Proteinlöslichkeit nur leicht, aber immer noch meist statistisch signifikant ($p < 0,05$), ab. Dies deutet darauf hin, dass die UV-Bestrahlung bereits bei geringen Bestrahlungsdosen bestimmend ist und Bestrahlungsdosen > 19 J/cm² einen relativ geringen Einfluss auf die Proteinlöslichkeit haben. Es fällt zudem auf, dass die Reduktion der Proteinlöslichkeit bei steigender Bestrahlungsdosis von 0 auf 2,3 im IEF-D Puffersystem nicht signifikant ist ($p > 0,05$), wohingegen bei den Puffersystemen IEF, IEF-TH und IEF-U eine signifikante Reduktion der Proteinlöslichkeit gemessen wurde ($p < 0,05$). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass

die UV-Bestrahlung maßgeblich kovalenten Bindungen beeinflusst, weniger hingegen die nicht-kovalente Bindungen. (Schmid et al., 2015c)

5.6.1.2 Quantifizierung der Vernetzung der Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

Die Ermittlung der Vernetzungskennzahlen von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis wurde abweichend von den in Kapitel 4.2.6 beschriebenen Beschichtungen Gießfilme aus der Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) mit einer Dicke von ca. 40 μm ($39 \pm 16,1 \mu\text{m}$) hergestellt und mit unterschiedlichen Bestrahlungsdosen von 0 (Kontrolle); 1,2; 2,8; 11,6; 19,9 und 42 (UV-C) J/cm^2 je Seite bestrahlt. Die höheren Filmdicken als im Vergleich zu den sonstigen Mustern waren notwendig, um für die Quellversuche (vgl. Kapitel 4.5) eine ausreichend große Masse je Probe zur Verfügung zu haben. Durch die doppelseitige Bestrahlung kann die limitierte Strahlungseindringtiefe teilweise kompensiert werden. Die in WPI enthaltenen Doppelbindungen sowie aromatische Ringe von Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder Phenylalanin, können UV-Strahlung absorbieren. Dies führt zur Bildung von Radikalen, welche zu intermolekularen kovalenten Bindungen und somit zur UV-Quervernetzung führen. (Gennadios et al., 1998, Rhim et al., 1999)

Die Ergebnisse zum Einfluss der UV-Bestrahlung auf den Grad der Quellung (DoS) sind in Abbildung 54 sowie die Ergebnisse zur Vernetzungsdichte (CLD) und dem Grad der Quervernetzung (DoC) in Abbildung 55 gemeinsam dargestellt. Dies ist möglich, da die beiden Kennzahlen (CLD und DoC) zum durchschnittlichen Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen (M_c) und somit auch zueinander proportional sind (vgl. Gleichung 29, S. 99).

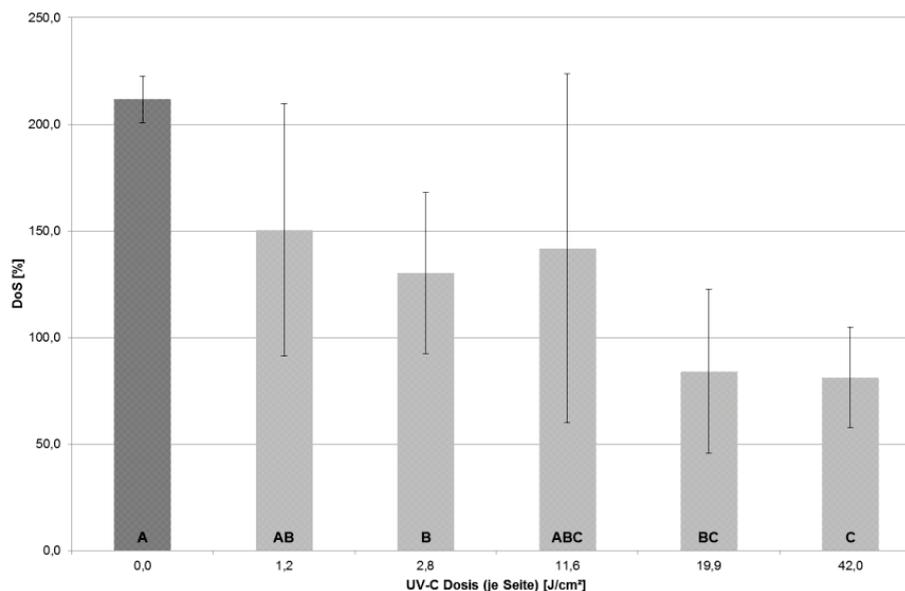


Abbildung 54: Grad der Quellung (DoS) in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdosis. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2017a).

Der Grad der Quellung (DoS) (vgl. Abbildung 54) der bestrahlten Proben, der mittels Quellversuchen (vgl. Kapitel 4.5) ermittelt wurde, verhält sich umgekehrt proportional zu Vernetzungsgrad und Vernetzungsdichte. Das bedeutet, dass die Referenzprobe mit einem DoS von ca. 210 % den höchsten Wert aufweist, während bei steigender UV-Bestrahlungsdosis der Quellgrad weiter sinkt. Dieses Verhalten ist auf eine erhöhte Quervernetzung durch die UV-Bestrahlung zurückzuführen, da eine reduzierte Quellbarkeit eines Polymeres auf dessen Quervernetzung zurückgeführt werden kann (Schmidt et al., 2012). Des Weiteren ist zu beachten, dass vergleichbar zu den Lösungsversuchen in unterschiedlichen Puffersystemen (vgl. Abbildung 53) auch hier die Probe ab einer Bestrahlungsdosis von $>2,3 \text{ J/cm}^2$ (hier $2,8 \text{ J/cm}^2$) gegenüber der Referenz einen signifikant niedrigeren Wert aufweist (vgl. Abbildung 54).

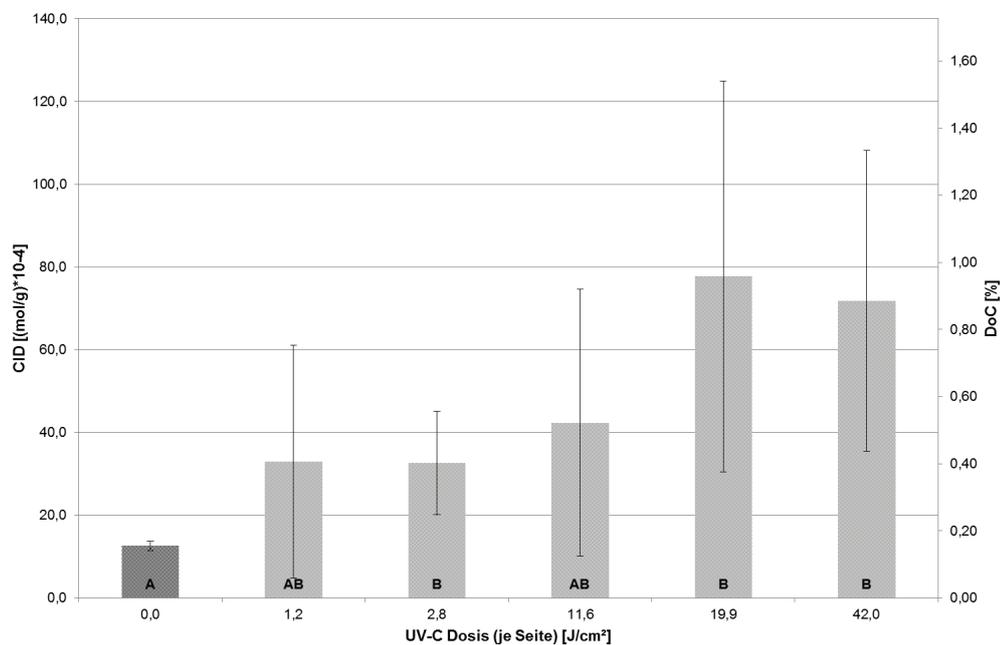


Abbildung 55: Vernetzungsgrad (DoC) und Vernetzungsdichte (CLD) in Abhängigkeit von der UV-Bestrahlungsdosis. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2017a).

Wie in Abbildung 55 ersichtlich, weisen die bestrahlten Proben meist signifikant höhere Vernetzungsdichten und –grade auf als das nicht bestrahlte Referenzmuster. Die bestrahlten Muster unterscheiden sich allerdings untereinander nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). Dies ist u.a. auf die relativ hohen Standardabweichungen zurückzuführen, welche durch das erschwerte Handling der dünnen Filme zustande kommen (trotz Gießfilmherstellung für diese spezifische Fragestellung).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine UV-Bestrahlung die Vernetzung zwischen den Proteinen bereits ab einer Bestrahlungsdosis von $2,8 \text{ J/cm}^2$ signifikant erhöht (vgl. Abbildung 55). Dies deckt sich mit den in Kapitel 5.6.1.1 beschriebenen Ergebnissen zu den Lösungsversuchen in unterschiedlichen Puffersystemen. Mit Hilfe der Lösungsversuche konnte ebenfalls festgestellt werden, dass ein Großteil der Quervernetzungen bereits ab einer Bestrahlungsdosis $2,3 \text{ J/cm}^2$ geknüpft werden (vgl. Ab-

bildung 53). Daher kann basierend auf diesen Ergebnissen die Aussage getroffen werden, dass eine Radikalbildung bereits ab Bestrahlungsdosen von 2,3 J/cm² stattfindet und es somit zu einer Quervernetzung durch eine Kettenwachstumsreaktion kommt, welche mit den verwendeten Puffersystemen nicht qualitativ nachweisbar sind, aber im Rahmen dieser Arbeit quantitativ über die veränderte CLD bzw. DoC nachgewiesen wurden.

5.6.2 Einfluss der UV-Quervernetzung auf verpackungsrelevante Eigenschaften

Dieses Kapitel widmet sich dem Einfluss der UV-Bestrahlungsdosis auf verpackungsrelevante Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien. Zur Interpretation der Ergebnisse werden sowohl die Erkenntnisse aus den ermittelten molekularen Wechselwirkungen und Vernetzungskennzahlen als auch die Grundlagenliteratur herangezogen. Die verwendeten Molkenprotein-basierten Folien wurden, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, hergestellt und UV-bestrahlt und anschließend auf deren Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit, mechanischen Eigenschaften, Oberflächenenergie und UV-Transmission untersucht (vgl. Kapitel 4.3).

5.6.2.1 Wasserdampf- und Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

Tabelle 22 zeigt die Wasserdampfdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsdosen.

Tabelle 22: Wasserdampftransmissionsrate (WVTR) durch Molkenprotein-basierte Folien mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsdosen. Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt aus Schmid et al. (2015c).

Bestrahlungsdosis [J cm ⁻²]	WVTR [g m ⁻² d ⁻¹]	
	bei 23 °C und 50 % → 0 % r.F.	Foliendicke [µm]
0	349 ^a ± 9	27.8 ± 1.1
2.3	511 ^b ± 11	22.7 ± 1.8
10.2	434 ^c ± 23	22.2 ± 1.5
19.0	383 ^{acd} ± 40	28.8 ± 4.0
31.4	386 ^d ± 19	22.2 ± 1.6

Entgegen der Erwartung konnte kein signifikanter Einfluss der UV-Bestrahlungsdosis auf die Wasserdampfdurchlässigkeiten nachgewiesen werden (Schmid et al., 2015c). Diese Ergebnisse wurden zwischenzeitlich durch Díaz et al. (2016) für Molkenprotein-basierte Folien bestätigt. Díaz et al. (2016) verwendeten ein Molkenproteinkonzentrat mit einem Proteingehalt von 80 % (m/m) und Glycerol als Weichmacher (50 % m/m bezogen auf Protein). Sie verwendeten UV-Bestrahlungsdosen von 0,12 bis 12 J/cm².

Die Rezeptur und verwendeten UV-Bestrahlungsdosen sind daher vergleichbar mit der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Molkenprotein-basierten Standardformulierung (WPSS) und den verwendeten UV-Bestrahlungsdosen.

Auch in weiteren Studien zur UV-Bestrahlung anderer Proteinfolien konnte kein signifikanter Einfluss einer UV-Bestrahlung auf die Wasserdampfdurchlässigkeit von Protein-basierten Folien festgestellt werden (Gennadios et al., 1998, Liu et al., 2004, Micard et al., 2000, Rhim et al., 1999, Ustunol und Mert, 2004).

Abbildung 56 zeigt die Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit während der Messung von Molkenprotein-basierten Folien, die mit unterschiedlichen UV-Bestrahlungsdosen behandelt wurden.

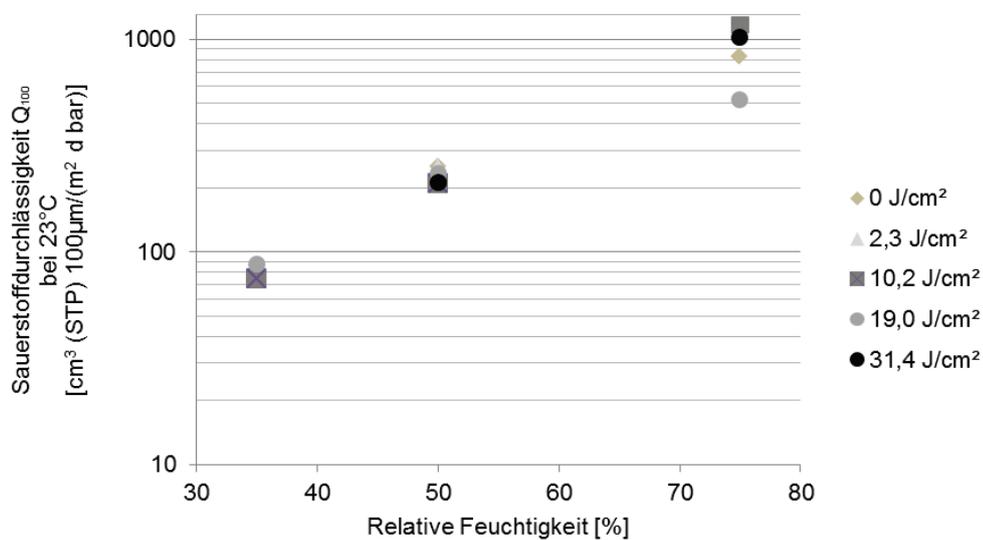


Abbildung 56: Sauerstoffdurchlässigkeit in Abhängigkeit der relativen Feuchtigkeit und der UV-Bestrahlungsdosis von Molkenprotein-basierten Folien (Einfachbestimmungen). Übersetzt und adaptiert aus Schmid et al. (2015c)

Wie erwartet, steigt die Sauerstoffdurchlässigkeit mit steigender relativer Feuchte stark an. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Kapitel 5.2.2 überein (Sauerstoffdurchlässigkeit steigt bei steigender relativer Feuchtigkeit). Eine UV-Bestrahlung zeigt aber auch bei der Sauerstoffdurchlässigkeit keinen eindeutigen Effekt. (Schmid et al., 2015c)

5.6.2.2 Mechanische Eigenschaften in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

In Abbildung 57 und Abbildung 58 sind die mechanischen Eigenschaften (E-Modul und Zugfestigkeit) von Molkenprotein-basierten Folien in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung aufgeführt. Die Folien wurden mittels Beschichtung auf einem PTFE Trägersubstrat mit nachfolgender Ablösung vom Trägersubstrat hergestellt (vgl. Kapitel 4.2.6). Da beim Beschichten auf PTFE eine Orientierung der Proteinmoleküle in Maschinenrichtung vermutet wurde, wurden die Zugversuche an den Proben sowohl in Maschinenrichtung (md) als auch quer zur Maschinenrichtung (cd) durchgeführt.

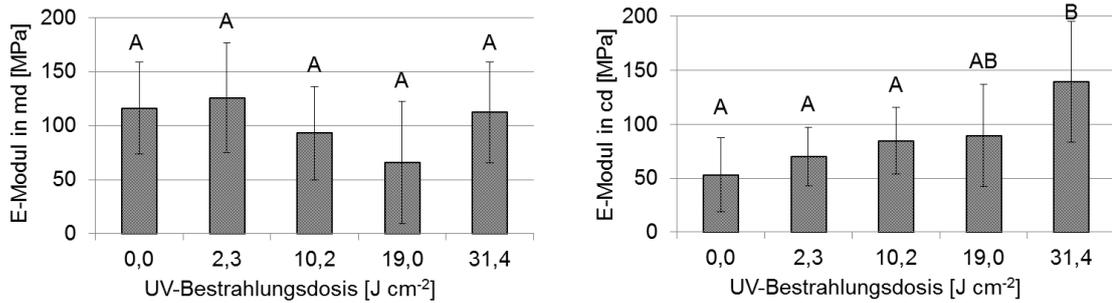


Abbildung 57: E-Modul in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis. Links: gemessen in Maschinenrichtung (md). Rechts: gemessen quer zur Maschinenrichtung (cd). Messergebnisse, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$) Übersetzt und adaptiert aus Schmid et al. (2015c)

Die relativ hohen Standardabweichungen sind der Tatsache geschuldet, dass die nach DIN EN ISO 527-1 vorgesehene Vorrichtung zur exakteren Messung der Längenänderung für den Bereich niedriger Dehnungen (Extensometer) nicht verwendet werden konnte, da die hier verwendeten Folien mit einer Dicke von $27,4 \pm 3,5 \mu\text{m}$ deutlich dünner waren als die sonst im Rahmen dieser Arbeit für Zugversuche verwendeten Gießfolien und das Extensometer durch die Beschaffenheit der Schneiden die Folien beschädigte. Dennoch sind die Messergebnisse auch ohne Extensometer innerhalb der Versuchsreihen vergleichbar. Die Längenänderung wurde in diesem Fall über den Transversenweg ausgewertet. Es wird deutlich, dass in Maschinenrichtung (md) kein signifikanter Einfluss der UV-induzierten Quervernetzung besteht. Quer zur Maschinenrichtung (cd) konnte hingegen ein Trend zu steigenden E-Modulen verzeichnet werden, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) lediglich zwischen den UV-Bestrahlungsdosen 19,0 und 31,4 J/cm² nachweisbar ist. Erwartungsgemäß wurde ein ähnlicher Effekt bei den Zugfestigkeitsmessungen ermittelt (vgl. Abbildung 58).

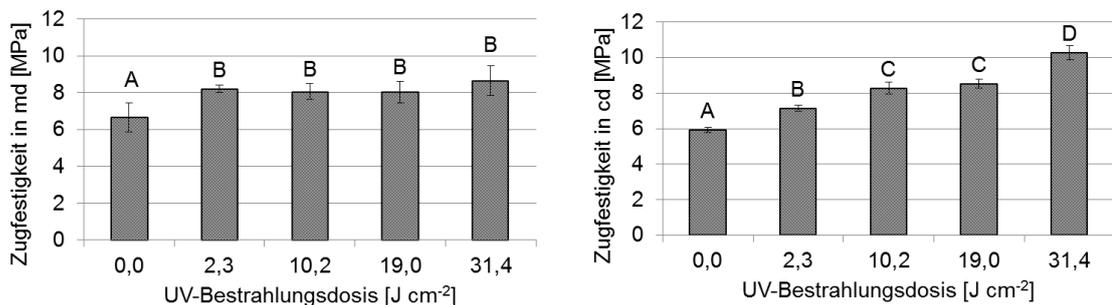


Abbildung 58: Zugfestigkeit in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis. Links: gemessen in Maschinenrichtung (md). Rechts: gemessen quer zur Maschinenrichtung (cd). Messergebnisse mit unterschiedlichen Buchstaben sind statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Übersetzt und adaptiert aus Schmid et al. (2015c)

In Maschinenrichtung (md) weisen zwar alle UV-bestrahlten Muster eine statistisch signifikant höhere Zugfestigkeit gegenüber der Referenz auf, aber eine Erhöhung der UV-Bestrahlungsdosis wirkt sich nicht weiter auf die Zugfestigkeit aus ($p > 0,05$). Quer

zur Maschinenrichtung (cd) hingegen steigt mit der Erhöhung der UV-Bestrahlungsdosis die Zugfestigkeit signifikant an ($p < 0,05$). Anhand der in Abbildung 59 dargestellten Modellvorstellung lässt sich dieser Effekt erklären.

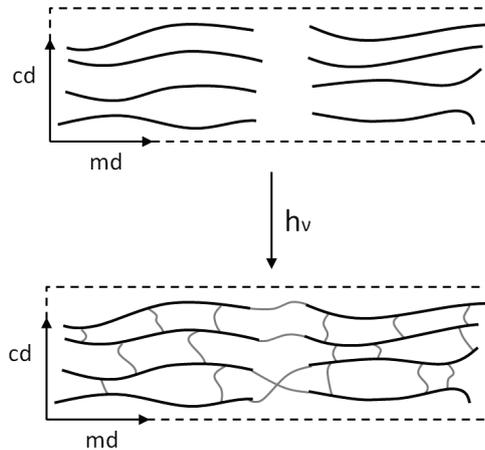


Abbildung 59: Modellvorstellung zur Proteinmorphologie von Molkenprotein-basierten Folien (hergestellt durch Beschichtung auf PTFE) vor und nach der UV-Quervernetzung. Die stark vereinfachte Modellvorstellung zeigt lediglich die zusätzlichen kovalenten intermolekularen Wechselwirkungen (in grau dargestellt), welche durch die UV-Bestrahlung induziert werden. Adaptiert aus Schmid et al. (2015c) und Schmid et al. (2017a)

Wie in Abbildung 59 dargestellt, könnten durch eine Proteinorientierung, welche durch den Beschichtungsprozess zustande kommt, durch die UV-Behandlung viele Quervernetzungen entlang der Proteinketten gebildet werden und somit zu dem signifikanten Anstieg von E-Modul und Zugfestigkeit führen, wogegen in Maschinenrichtung (md) im Extremfall lediglich zwischen den Proteinkettenenden Quervernetzungen ausgebildet werden. Um die Annahme, ob eine Orientierung Grund für dieses Verhalten ist, überprüfen zu können, wurden auch Gießfolien, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, mit einer Dicke von ca. $40 \mu\text{m}$ ($39 \pm 16,1 \mu\text{m}$) hergestellt und UV-bestrahlt. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Referenz und bestrahlten Folien festgestellt werden (siehe Anhang I-f). Dies bestätigt die Annahme, dass bei der Gießfolienherstellung keine oder eine vernachlässigbare Polymerorientierung stattfindet und daher ein ungeordnetes Netzwerk vorliegt. Auch Díaz et al. (2016) bestrahlten Molkenprotein-basierte Gießfolien mit UV und konnten keinen signifikanten Effekt der UV-Bestrahlung feststellen.

Somit führt eine UV-Bestrahlung von Gießfolien zu einer räumlich in alle Richtungen gleichermaßen stattfindenden Quervernetzung, welche aber aufgrund der Abwesenheit einer Proteinorientierung mit der verwendeten Messtechnik nicht nachgewiesen werden können. Abbildung 60 veranschaulicht diese Modellvorstellung.

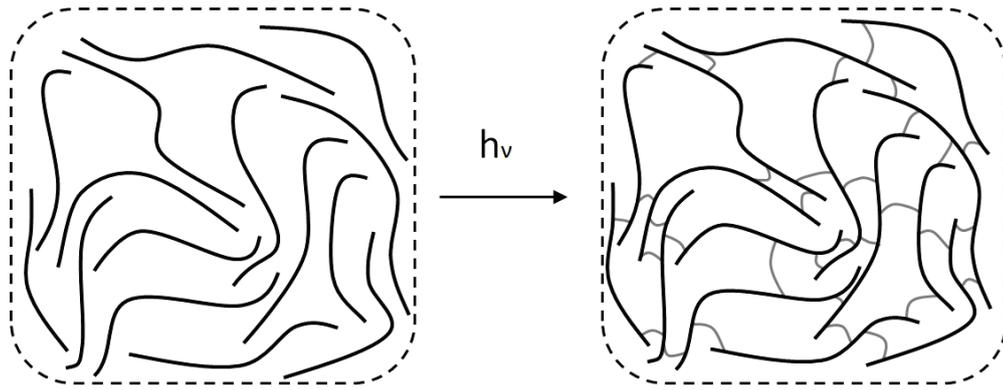


Abbildung 60: Modellvorstellung zur Gießfolienmorphologie vor und nach der UV-Quervernetzung. Diese stark vereinfachte Modellvorstellung zeigt lediglich die zusätzlichen kovalenten intermolekularen Wechselwirkungen (in grau dargestellt), welche durch die UV-Bestrahlung in alle Richtungen induziert werden. Übersetzt aus Schmid et al. (2017a)

5.6.2.3 Änderung der Oberflächenenergie in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

Wie bereits ausführlich dargelegt, können die Molkenproteine in Molkenprotein-basierte Folien durch UV-Bestrahlung quervernetzt werden. Ob und in welchem Ausmaß diese UV-Quervernetzung einen Einfluss auf die Oberflächenenergie hat, wurde mittels der in Kapitel 4.3.3 beschriebenen Kontaktwinkelmessungen untersucht.

Abbildung 61 zeigt den Einfluss der UV-Quervernetzung auf die Oberflächenenergie von Molkenprotein-basierten Folien.

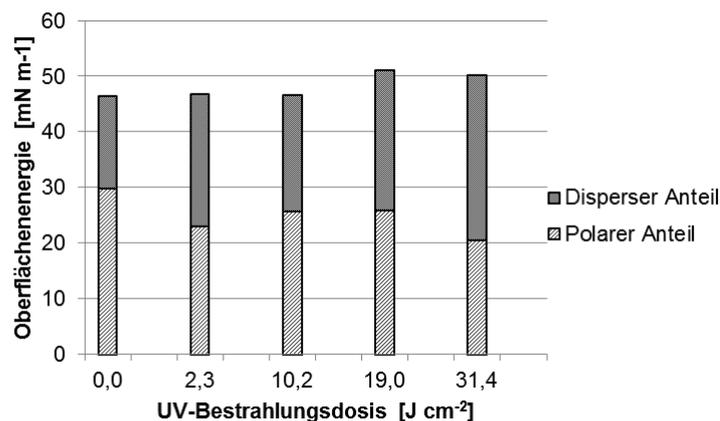


Abbildung 61: Gesamtoberflächenenergie sowie polarer und disperser Anteil von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis. Übersetzt aus Schmid et al. (2015c)

Es konnte keine eindeutige Änderung bzw. kein Trend der Gesamtoberflächenenergie in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis festgestellt werden, wogegen ein gewisser Trend bei der Veränderung des Verhältnisses von polarem und dispersem Anteil insbesondere im Vergleich zur Referenz zu verzeichnen ist. Insgesamt ist der disperse

Anteil von UV-bestrahlten Folien größer als im Vergleich zur nicht bestrahlten Referenzfolie. Hieraus resultiert aber kein deutlicher Anstieg der Gesamtoberflächenenergie, da der polare Anteil entsprechend sinkt. Der Anstieg des dispersen Anteils kann auf die Quervernetzung und somit auf eine Erhöhung des Molekulargewichts zurückgeführt werden (vgl. Argumentation Kapitel 5.4.2.3 und 5.5.2.3).

5.6.2.4 Änderung der UV-Lichtdurchlässigkeit in Abhängigkeit der UV-Quervernetzung

UV-Lichtdurchlässigkeit wurde im Wellenlängenbereich von 200 – 290 nm mit dem Spectrophotometer Uvicon XL1 mit einer Auflösung von 1 nm unter Verwendung einer Ulbricht-Kugel ermittelt und ist in Abbildung 62 dargestellt. (Schmid et al., 2015c)

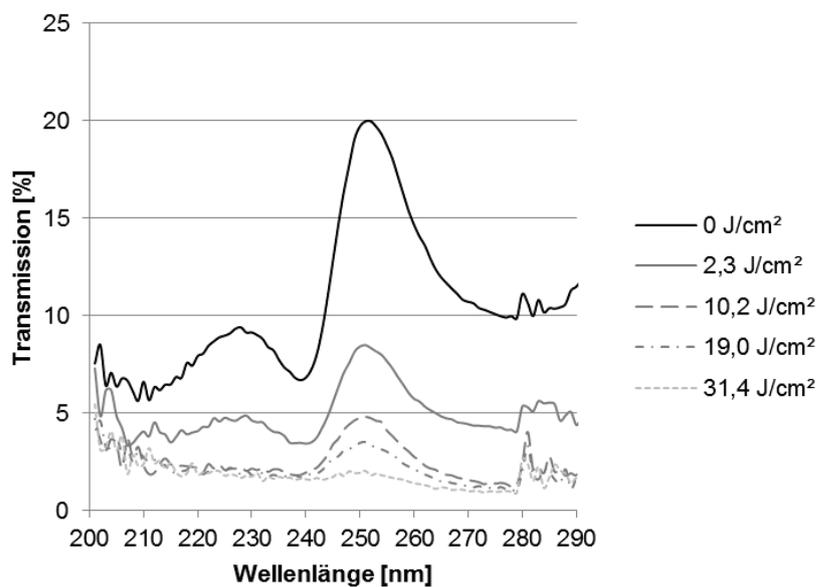


Abbildung 62: Wellenlängenabhängige UV-Lichttransmission von UV-bestrahlten Molkenprotein-basierten Folien. Die Dicke der Folien betrug $27,4 \pm 3,5 \mu\text{m}$. Übersetzt aus (Schmid et al., 2015c)

Die UV-Lichttransmission sinkt mit steigender UV-Bestrahlungsdosis. Insbesondere bei Wellenlängen um 230 nm und sogar noch ausgeprägter bei 250 nm ist dieser Effekt deutlich. Diese Wellenlänge entspricht in etwa dem Emissionsmaximum (254 nm) der zur Bestrahlung verwendeten UV-Niederdrucklampen. Durch die UV-Bestrahlung entstehen zusätzliche kovalente Bindungen in Proteinen durch UV-Absorption und Rekombination der aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Phenylalanin (Fujimori, 1965, Forbes und Sullivan, 1966, Gennadios et al., 1998).

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die Molkenproteine insbesondere an deren aromatischen Aminosäuren durch die UV-Bestrahlung verändert wurden. Nach Belitz und Schieberle (2008) haben die in Molkenprotein enthaltenen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan im UV-Wellenlängenbereich ihre Absorptionsmaxima bei 200 – 230 nm und bei 250 – 290 nm.

Die sinkende UV-Transmission bei steigender UV-Bestrahlungsdosis kann auf die o.g. Veränderungen an den Proteinen zurückgeführt werden, welche beim Betrachten der Proben schon erkennbar wurde. Bei höheren UV-Bestrahlungsdosen erhielten die Proben einen deutlich gelben Farbton (Schmid et al., 2015c). Da eine Ulbricht-Kugel verwendet wurde, können folglich Streulichtverluste als Grund für die sinkende UV-Transmission ausgeschlossen bzw. deren Bedeutung für den beobachteten Effekt vernachlässigt werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die UV-Bestrahlung der Folien zu Veränderungen im Molekül führt. Das Transmissionsmaximum bei ca. 250 nm bleibt dabei erhalten, wird aber in seiner Ausprägung bei steigender Bestrahlungsdosis deutlich reduziert.

6 Schlussfolgerungen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde der Einfluss des Ausgangsmolekulargewichts, des Denaturierungsgrades, einer Transglutaminase-induzierten und einer UV-induzierten Quervernetzung auf die molekularen Wechselwirkungen und die daraus resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat-basierten Folien und Beschichtungen untersucht.

Basierend auf diesen Ergebnissen zu den Veränderungen der molekularen Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen während der Lagerungszeit kann zusammenfassend gefolgert werden, dass aufgrund der Ausbildung von nicht kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen und kovalenten Disulfidbrücken (Abbildung 18 und Abbildung 20) die Sauerstoffdurchlässigkeit während der Lagerung deutlich sinkt (Abbildung 21). Für die wissenschaftliche Praxis bedeutet dies wiederum, dass offenbar eine zu kurze Lagerung der Proben – also u.a. eine nicht vollständig abgeschlossene Nachvernetzung – die Gefahr von Fehlinterpretationen der ermittelten Ergebnisse birgt.

Das Gasdurchlässigkeitsverhältnis (die sog. Permselectivität) von Molkenprotein-basierten Folien unterscheidet sich deutlich von der Permselectivität von Standardkunststoffen. Das $N_2:O_2:CO_2$ Gasdurchlässigkeitsverhältnis von Molkenprotein-basierten Folien beträgt ca. 1:4:34 (Tabelle 17). Dies gilt es insbesondere bei der Anwendung von Molkenprotein-basierten Beschichtungen in Verbundmaterialien für MAP Anwendungen zu beachten. Das in MAP Anwendungen verwendete Gasgemisch besteht nicht selten aus einer Mischung von N_2 und CO_2 (z.B. bei Käse) oder auch aus O_2 und CO_2 (z.B. bei Frischfleisch). Bei MAP Anwendungen könnte es aufgrund der verhältnismäßig hohen CO_2 -Durchlässigkeit zu einem Kollabieren der Verpackung und zu einem vorzeitigen Verlust der vorgegebenen Schutzgaszusammensetzung kommen.

Die Sauerstoffdurchlässigkeit von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen ist stark von der relativen Feuchtigkeit abhängig (Abbildung 24). Mit steigender relativer Feuchtigkeit steigt die Sauerstoffdurchlässigkeit. Für die Anwendung von Molkenprotein-basierten Barrierebeschichtungen in Lebensmittelverpackungsmaterialien bedeutet dies, dass für den Erhalt der Sauerstoffbarriereeigenschaften die Beschichtung in Kombination mit Wasserdampfbarrierschichten, ähnlich wie bei EVOH in Standardverpackungssystemen, verwendet werden sollte. Für trockene und trocken gelagerte Lebensmittel können Molkenprotein-basierte Beschichtungen auch ohne zusätzliche Wasserdampfbarrierschichten verwendet werden.

Es konnte zudem aufgezeigt werden, dass eine Reduktion des Ausgangsmolekulargewichts der Molkenprotein-basierten Formulierungen zu weniger vernetzten (Abbildung 26) und flexibleren (Abbildung 30) Folien führt, ohne die Gasdurchlässigkeitseigenschaften signifikant zu verändern (Tabelle 20). Es wurde demonstriert, dass durch die Verwendung von hydrolysiertem Molkenproteinisolat die technologisch notwendige Menge an Weichmacher reduziert werden kann. Hydrolysiertes Molkenproteinisolat

wirkt als interner Weichmacher, ohne die Barriereigenschaften signifikant zu beeinflussen. Durch die teilweise Substitution des externen Weichmachers Glycerol mit hydrolysiertem Molkenprotein war es möglich flexible Molkenprotein-basierte Folien mit geringeren Gasdurchlässigkeitseigenschaften herzustellen (Abbildung 28, Abbildung 29 und Abbildung 32). Diese Vorgehensweise stellt eine interessante Möglichkeit dar, die Barriereigenschaften von flexiblen Molkenprotein-basierten Beschichtungen zu erhöhen. Hierbei sollte aber beachtet werden, dass der Austausch von Glycerol durch ein hydrolysiertes Molkenproteinisolat ökonomische Risiken birgt. Der mehr als um den Faktor 10 höhere Materialpreis kann nicht durch die höhere intrinsische Barriere kompensiert werden.

Die Erhöhung des Denaturierungsgrades von Molkenprotein-basierten Formulierungen führte zu signifikant stärker vernetzten (Tabelle 21 und Abbildung 36) und weniger flexiblen Folien (Abbildung 41 und Abbildung 42), ohne hierbei die Gasdurchlässigkeitseigenschaften signifikant zu beeinflussen (Abbildung 38 und Abbildung 39). Für die industrielle Praxis bedeutet dies, dass eine vollständige Denaturierung nicht zwingend erforderlich ist, um die Gasbarriereigenschaften von Molkenprotein-basierten Beschichtungen nutzen zu können. Somit können niedrigviskosere Formulierungen mit höherem Trockensubstanzgehalt verwendet werden. Hierdurch lassen sich kosten- und energieeffizientere Beschichtungsprozesse realisieren.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss der Transglutaminase-induzierten Quervernetzung zeigten, dass bei höheren Transglutaminasekonzentrationen der Grad der Quervernetzung messbar steigt (Abbildung 45). Die Sauerstoffdurchlässigkeit kann durch eine Transglutaminase-induzierte Quervernetzung der Proteine in Molkenprotein-basierten Beschichtungen deutlich reduziert werden (Abbildung 49). Die Transglutaminase-induzierte Quervernetzung hat einen geringen Einfluss auf den Wasserdampfsorptionskoeffizienten, wohingegen der Diffusionskoeffizient deutlich reduziert wird (Abbildung 47). Daraus folgt, dass eine Reduktion der Wasserdampfdurchlässigkeiten durch Transglutaminase-induzierte Quervernetzung maßgeblich auf die Verringerung des Diffusionskoeffizienten zurückgeführt werden kann. Der Einfluss einer Transglutaminase-induzierten Quervernetzung auf verpackungsrelevante Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen kann aber insgesamt als gering eingestuft werden. Daher scheint eine sinnvolle industrielle Anwendung der Transglutaminase-induzierten Quervernetzung zur Optimierung der Eigenschaftsprofile von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen als eher unwahrscheinlich.

Bereits geringe UV-Bestrahlungsdosen führen dazu, dass ein Großteil der UV-induzierten Quervernetzungen ausgebildet wird (Abbildung 53 und Abbildung 55). Die UV-Bestrahlung hat aber keinen signifikanten Einfluss auf die Gasdurchlässigkeitseigenschaften (Tabelle 22 und Abbildung 56) und erhöht lediglich die Zugfestigkeit quer zur Maschinenrichtung (Abbildung 58) von Molkenprotein-basierten Folien. Zwar konnte die Vernetzung durch UV-Bestrahlung nachgewiesen werden, deren Einfluss zur Modifikation von verpackungsrelevanten Eigenschaften ist jedoch sehr gering. Im Umkehrschluss bedeutet dies aber auch, dass eine mögliche UV-Exposition im konkreten Anwendungsfall als Verpackungsmaterial, zumindest bei den verwendeten Bestrah-

lungsdosen, keinen negativen Einfluss auf die untersuchten verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen hat.

7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es zu beantworten, inwiefern und in welchem Ausmaß das Ausgangsmolekulargewicht, der Denaturierungsgrad, eine Transglutaminase-induzierte Quervernetzung und eine UV-Bestrahlung die molekularen Wechselwirkungen und die daraus resultierenden verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenproteinisolat-basierten Folien und Beschichtungen beeinflussen.

Zu den betrachteten verpackungsrelevanten Eigenschaften zählten insbesondere die Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit und die mechanischen Eigenschaften der untersuchten Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen. Zur Beurteilung der Wechselwirkungen auf molekularer Ebene wurden Lösungsversuche in unterschiedlichen Puffersystemen durchgeführt und mit einem Bradford-Assay kombiniert. Des Weiteren wurden Quellversuche zur Ermittlung der Vernetzungsdichte durchgeführt. Diese Untersuchungen ermöglichten es, den Einfluss des Molekulargewichts, des Denaturierungsgrades, einer Transglutaminase-induzierten Quervernetzung und einer UV-Bestrahlung auf die molekularen Wechselwirkungen zu ermitteln und mit den resultierenden physikalischen und insbesondere verpackungsrelevanten Eigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien und Beschichtungen zu korrelieren.

Die Ergebnisse zu den Veränderungen der molekularen Wechselwirkungseigenschaftsbeziehungen während der Lagerungszeit zeigten, dass sich nicht kovalente Wasserstoffbrückenbindungen und kovalente Disulfidbrücken während der Lagerungszeit verstärkt ausbilden und hierdurch die Sauerstoffdurchlässigkeit deutlich sinkt.

Das Gasdurchlässigkeitsverhältnis von $N_2:O_2:CO_2$ (die sog. Permselektivität) von Molkenprotein-basierten Folien unterscheidet sich deutlich von der Permselektivität von Standardkunststoffen. Das Gasdurchlässigkeitsverhältnis von $N_2:O_2:CO_2$ bei den untersuchten Molkenprotein-basierten Folien beträgt ca. 1:4:34. Zudem weisen Molkenprotein-basierte Folien und Beschichtungen eine steigende Sauerstoffdurchlässigkeit bei steigender relativer Feuchtigkeit auf.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des Ausgangsmolekulargewichts der Proteinformulierungen zu weniger vernetzten und flexibleren Molkenprotein-basierten Folien führt, ohne die Gasdurchlässigkeitseigenschaften signifikant zu verändern.

Die Reduktion des Denaturierungsgrades von Molkenprotein-basierten Formulierungen führte ebenfalls zu weniger vernetzten und flexibleren Folien und hatte nur wenig Einfluss auf die Gasdurchlässigkeitseigenschaften.

Untersuchungen zum Einfluss der Transglutaminase-induzierten Quervernetzung zeigten, dass bei höheren Transglutaminasekonzentrationen der Grad der Quervernetzung erwartungsgemäß steigt. Die Sauerstoff- und Wasserdampfdurchlässigkeit von Mol-

kenprotein-basierten Beschichtungen können durch eine Transglutaminase-induzierte Quervernetzung reduziert werden, wobei der Wasserdampfsorptionskoeffizient kaum beeinflusst, aber der Diffusionskoeffizient deutlich reduziert wird.

Die ermittelten Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit der UV-Bestrahlungsdosis zeigten, dass bereits geringe UV-Bestrahlungsdosen einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung von UV-induzierten Quervernetzungen haben. Die UV-induzierte Quervernetzung zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Gasdurchlässigkeitseigenschaften von Molkenprotein-basierten Folien, erhöht aber deren Zugfestigkeit quer zur Maschinenrichtung.

Literaturverzeichnis

- ABOUMAHMOUD, R. & SAVELLO, P. 1990. Crosslinking of Whey Protein by Transglutaminase. *Journal of Dairy Science*, 73, 256-263.
- ADAMEK, T. 2015. *Statistik für Anwender Statistik aus der Münze*, Berlin, Springer Berlin.
- AHLHAUS, O. 1997. *Verpackung mit Kunststoffen*, München, Hanser.
- AHMED, K., NIZAMI, S. S., RAZA, N. Z. & MAHMOOD, K. 2012. Mechanical, swelling, and thermal aging properties of marble sludge-natural rubber composites. *International Journal of Industrial Chemistry*, 3, 1-12.
- ALCANTARA, C., RUMSEY, T. & KROCHTA, J. 1998. Drying rate effect on the properties of whey protein films. *Journal of Food Process Engineering*, 21, 387-405.
- ANANDHARAMAKRISHNAN, C., RIELLY, C. D. & STAPLEY, A. G. F. 2008. Loss of solubility of α -lactalbumin and β -lactoglobulin during the spray drying of whey proteins. *Lwt-Food Science and Technology*, 41, 270-277.
- ANDREWS, A. T. 1978. The Composition, Structure and Origin of Proteose-peptone Component 5 of Bovine Milk. *European Journal of Biochemistry*, 90, 59-65.
- ANKER, M., STADING, M. & HERMANSSON, A.-M. 1998. Mechanical properties, water vapor permeability, and moisture contents of β -lactoglobulin and whey protein films using multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1820-1829.
- ARNOLD, B. 2013. *Werkstofftechnik für Wirtschaftsingenieure*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- ARRHENIUS, S. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. *Zeitschrift für physikalische Chemie*, 4, 226-248.
- ASKELAND, D. R., FULAY, P. P. & WRIGHT, W. J. 2011. *The science and engineering of materials*, Stamford, Conn., Cengage Learning.
- AURAS, R., HARTE, B. & SELKE, S. 2004. Effect of water on the oxygen barrier properties of poly(ethylene terephthalate) and polylactide films. *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 1790-1803.
- BALASUBRAMANIAM, V., BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. & LELIEVELD, H. L. 2016. *High Pressure Processing of Food*, New York, Springer.
- BANKER, G. S. 1966. Film coating theory and practice. *Journal of pharmaceutical sciences*, 55, 81-89.
- BANNWARTH, H., KREMER, B. P. & SCHULZ, A. 2007. *Basiswissen Physik, Chemie und Biochemie*, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- BARONE, J. R., DANGARAN, K. & SCHMIDT, W. F. 2006. Blends of cysteine-containing proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5393-5399.
- BARRER, R. M. 1941. *Diffusion in and through solids*, Cambridge, Eng., The University press; New York : Macmillan.
- BECKER, D. K. 1982. Methode zur automatischen Bestimmung der Gasdurchlässigkeit von Kunststoff-Folien und beschichteten Papieren. *Verpackungs-Rundschau* 83, 21-25.

- BELITZ, H.-D., GROSCH, W. & SCHIEBERLE, P. 2009. *Food chemistry : with 634 tables*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- BELITZ, H.-D. G. W. & SCHIEBERLE, P. 2008. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie : mit 634 Tabellen*, Berlin, Heidelberg.
- BERGMAIR, J., WASHÜTTL, M. & WEPNER, B. 2004. *Prüfpraxis für Kunststoffverpackungen: Lebensmittel-, Pharma- und Kosmetikverpackungen*, Hamburg, Behr's Verlag.
- BIGI, A., COJAZZI, G., PANZAVOLTA, S., ROVERI, N. & RUBINI, K. 2002. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*, 23, 4827-4832.
- BLEISCH, G., LANGOWSKI, H.-C. & MAJSCHAK, J.-P. 2014. *Lexikon Verpackungstechnik*, Hamburg, Behr's Verlag.
- BRADFORD, M. M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRANDRUP, J., IMMERGUT, E. H. & GRULKE, E. A. 1999. *Polymer handbook*, New York, Wiley-Interscience.
- BRAULT, D., D'APRANO, G. & LACROIX, M. 1997. Formation of free-standing sterilized edible films from irradiated caseinates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2964-2969.
- BRYANT, C. M. & MCCLEMENTS, D. J. 1998. Molecular basis of protein functionality with special consideration of cold-set gels derived from heat-denatured whey. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 143-151.
- BUCHERT, J., ERCILI CURA, D., MA, H., GASPARETTI, C., MONOGIOUDI, E., FACCIO, G., MATTINEN, M., BOER, H., PARTANEN, R., SELINHEIMO, E., LANTTO, R. & KRJUS, K. 2010. Crosslinking Food Proteins for Improved Functionality. *Annual Review of Food Science and Technology*, 1, 113-138.
- BUCHNER, N. 1999. *Verpackung von Lebensmitteln*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- BUGNICOURT, E., SCHMID, M., NERNEY, O. M., WILDNER, J., SMYKALA, L., LAZZERI, A. & CINELLI, P. 2013. Processing and Validation of Whey-Protein-Coated Films and Laminates at Semi-Industrial Scale as Novel Recyclable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, 10.
- CHANDRAPALA, J., ZISU, B., PALMER, M., KENTISH, S. & ASHOKKUMAR, M. 2011. Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. *Ultrasonics sonochemistry*, 18, 951-957.
- CHATZIPASCHALI, A. A. & STAMATIS, A. G. 2012. Biotechnological Utilization with a Focus on Anaerobic Treatment of Cheese Whey: Current Status and Prospects. *Energies*, 5, 3492-3525.
- CHEFTEL, J.-C., CUQ, J.-L. & LORIENT, D. 1992. *Lebensmittelpoteine : Biochemie, funktionelle Eigenschaften, Ernährungsphysiologie, chemische Modifizierung*, Hamburg, Behr.
- CHIELLINI, E. 2008. *Environmentally compatible food packaging*, Boca Raton; Cambridge, CRC ; Woodhead.
- CHOBERT, J. M., BERTRAND-HARB, C. & NICOLAS, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 883-892.

- CIANNAMEA, E. M., STEFANI, P. M. & RUSECKAITE, R. A. 2015. Storage-induced changes in functional properties of glycerol plasticized - soybean protein concentrate films produced by casting. *Food Hydrocolloids*, 45, 247-255.
- CINELLI, P., SCHMID, M., BUGNICOURT, E., WILDNER, J., BAZZICHI, A., ANGUILLES, I. & LAZZERI, A. 2014. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 151-157.
- COLES, R., KIRWAN, M. J. & MCDOWELL, D. 2003. *Food packaging technology*, Boca Raton, CRC Press LLC.
- COLTELLI, M.-B., WILD, F., BUGNICOURT, E., CINELLI, P., LINDNER, M., SCHMID, M., WECKEL, V., MÜLLER, K., RODRIGUEZ, P., STAEBLER, A., RODRÍGUEZ-TURIENZO, L. & LAZZERI, A. 2016. State of the Art in the Development and Properties of Protein-Based Films and Coatings and Their Applicability to Cellulose Based Products: An Extensive Review. *Coatings*, 6, 1-59.
- COMPTON, S. J. & JONES, C. G. 1985. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, 151, 369-374.
- CRANK, J. 1975. *The mathematics of diffusion*, Oxford, [Eng], Clarendon Press.
- DAMODARAN, S. & PARAF, A. 1997. *Food proteins and their applications*, New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker.
- DANGARAN, K. L. & KROCHTA, J. M. 2007. Preventing the loss of tensile, barrier and appearance properties caused by plasticiser crystallisation in whey protein films. *International Journal of Food Science and Technology*, 42, 1094-1100.
- DAVISCO 2012. Datasheet BiPRO. In: DAVISCO-FOODS-INTERNATIONAL (ed.) 15U-1123 ed.
- DAVISCO 2013. Datasheet BioZate 3. In: DAVISCO-FOODS-INTERNATIONAL (ed.) 09J-0325 ed.
- DE JONG, G. A. H. & KOPPELMAN, S. J. 2002. Transglutaminase catalyzed reactions: Impact on food applications. *Journal of Food Science*, 67, 2798-2806.
- DE LA FUENTE, M. A., SINGH, H. & HEMAR, Y. 2002. Recent advances in the characterisation of heat-induced aggregates and intermediates of whey proteins. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 262-274.
- DE WIT, J. 1990. Thermal stability and functionality of whey proteins. *Journal of Dairy Science*, 73, 3602-3612.
- DE WIT, J. N. 2001a. *Lecturer's handbook on Whey and whey products*, Brüssel, European whey products association.
- DE WIT, J. N. 2001b. *Lehrbuch der Molke und Molkenerzeugnisse*, Brüssel, European whey products association.
- DE WIT, J. N. 2009. Thermal behaviour of bovine beta-lactoglobulin at temperatures up to 150 degrees C. a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 27-34.
- DEE, G. T. & SAUER, B. B. 1992. The molecular weight and temperature dependence of polymer surface tension: Comparison of experiment with interface gradient theory. *Journal of colloid and interface science*, 152, 85-103.
- DEL NOBILE, M. A. & CONTE, A. 2013. *Packaging for Food Preservation*, New York, Springer.

- DI GIOIA, L. & GUILBERT, S. 1999. Corn protein-based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1254-1261.
- DÍAZ, O., CANDIA, D. & COBOS, Á. 2016. Effects of ultraviolet radiation on properties of films from whey protein concentrate treated before or after film formation. *Food Hydrocolloids*, 55, 189-199.
- DÍAZ, O., CANDIA, D. & COBOS, Á. 2017. Whey protein film properties as affected by ultraviolet treatment under alkaline conditions. *International Dairy Journal*, In Press.
- DING, Z. Y., AKLONIS, J. J. & SALOVEY, R. 1991. Model filled polymers. VI. Determination of the crosslink density of polymeric beads by swelling. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 29, 1035-1038.
- DRUMMOND, C. J. & CHAN, D. Y. C. 1997. van der Waals Interaction, Surface Free Energies, and Contact Angles: Dispersive Polymers and Liquids. *Langmuir*, 13, 3890-3895.
- EHRENSTEIN, G. W. 1999. *Polymer-Werkstoffe : Struktur - Eigenschaften - Anwendung* Munich, Hanser Verlag.
- ENDRES, H.-J. & SIEBERT-RATHS, A. 2011. *Engineering Biopolymers - Markets, Manufacturing, Properties and Applications*, Munich, Hanser-Verlag.
- FAVRE, E., NGUYEN, Q. T., SCHAETZEL, P., CLEMENT, R. & NEEL, J. 1993. Sorption of organic solvents into dense silicone membranes. Part 1.—Validity and limitations of Flory–Huggins and related theories. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 89, 4339-4346.
- FENNEMA, O. & KESTER, J. 1991. Resistance of lipid films to transmission of water vapor and oxygen. In: LEVINE, H. & SLADE, L. (eds.) *Water Relationships in Foods*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O. & CACOTE, H. 2003. Detection and quantification of bovine, ovine and caprine milk percentages in protected denomination of origin cheeses by reversed-phase high-performance liquid chromatography of beta-lactoglobulins. *Journal of Chromatography A*, 1015, 111-118.
- FICK, A. 1855. Ueber diffusion. *Annalen der Physik*, 170, 59-86.
- FLORIS, R., BODNAR, I., WEINBRECK, F. & ALTING, A. C. 2008. Dynamic rearrangement of disulfide bridges influences solubility of whey protein coatings. *International Dairy Journal*, 18, 566-573.
- FLORY, P. J. 1941. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 9, 660-660.
- FOEGEDING, E. A., DAVIS, J. P., DOUCET, D. & MCGUFFEY, M. K. 2002. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. *Trends in Food Science & Technology*, 13, 151-159.
- FORBES, W. F. & SULLIVAN, P. D. 1966. The effect of radiation on collagen I. Electron-spin resonance spectra of 2537-Å-irradiated collagen. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics including Photosynthesis*, 120, 222-228.
- FOX, H. & ZISMAN, W. 1950. The spreading of liquids on low energy surfaces. I. polytetrafluoroethylene. *Journal of Colloid Science*, 5, 514-531.
- FOX, P. F., MCSWEENEY, P. L. H., COGAN, T. M. & GUINEE, T. P. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Berlin, Heidelberg, Springer.
- FUJIMORI, E. 1965. Ultraviolet light-induced change in collagen macromolecules. *Biopolymers*, 3, 115-119.

- GARCIA, M. A., MARTINO, M. N. & ZARITZKY, N. E. 2000. Microstructural Characterization of Plasticized Starch-Based Films. *Starch-Stärke*, 52, 118-124.
- GENNADIOS, A. 2002. *Protein-based films and coatings*, Boca Raton, CRC Press.
- GENNADIOS, A., RHIM, J., HANDA, A., WELLER, C. & HANNA, M. 1998. Ultraviolet radiation affects physical and molecular properties of soy protein films. *Journal of Food Science*, 63, 225-228.
- GENNADIOS, A., WELLER, C. & TESTIN, R. 1993. Temperature Effect on Oxygen Permeability of Edible Protein-based Films. *Journal of Food Science*, 58, 212-214.
- GODBILLOT, L., DOLE, P., JOLY, C., ROGÉ, B. & MATHLOUTHI, M. 2006. Analysis of water binding in starch plasticized films. *Food Chemistry*, 96, 380-386.
- GODWIN, A. D. 2011. Plasticizers. In: KUTZ, M. (ed.) *Applied Plastics Engineering Handbook*. Oxford: Elsevier.
- GRAHAM, T. 1866a. LV. On the absorption and dialytic separation of gases by colloid septa. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 32, 401-420.
- GRAHAM, T. 1866b. LXIX. On the absorption and dialytic separation of gases by colloid septa. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 32, 503-531.
- GRÖNGRÖFT, A. 2016. *Quellung*. Thieme RÖMPP Online. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- GUCKIAN, S., DWYER, C., O'SULLIVAN, M., O'RIORDAN, E. D. & MONAHAN, F. J. 2006. Properties of and mechanisms of protein interactions in films formed from different proportions of heated and unheated whey protein solutions. *European Food Research and Technology*, 223, 91-95.
- GUEGUEN, J., VIROBEN, G., NOIREAUX, P. & SUBIRADE, M. 1998. Influence of plasticizers and treatments on the properties of films from pea proteins. *Industrial Crops and Products*, 7, 149-157.
- GUILBERT, S., GONTARD, N. & CUQ, B. 1995. Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*, 8, 339-346.
- GUIMARÃES, P. M. R., TEIXEIRA, J. A. & DOMINGUES, L. 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28, 375-384.
- GVM 2017. Flexible Plastic Packaging Market in Germany and in Europe. *Gesellschaft für Verpackungsmarktforschung*. Mainz: GVM.
- HAMMANN, F. & SCHMID, M. 2014. Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review. *Materials*, 7, 7975-7996.
- HAQUE, M. A., ALDRED, P., CHEN, J., BARROW, C. J. & ADHIKARI, B. 2013a. Comparative study of denaturation of whey protein isolate (WPI) in convective air drying and isothermal heat treatment processes. *Food Chemistry*, 141, 702-711.
- HAQUE, M. A., PUTRANTO, A., ALDRED, P., CHEN, J. & ADHIKARI, B. 2013b. Drying and Denaturation Kinetics of Whey Protein Isolate (WPI) During Convective Air Drying Process. *Drying Technology*, 31, 1532-1544.
- HARRIS, M., TAYLOR, G. & TAYLOR, J. 2007. *Startwissen Mathematik und Statistik : ein Crash-Kurs für Studierende der Biowissenschaften und Medizin*, Heidelberg; München, Elsevier, Spektrum Akad. Verl.

- HENRY, W. Experiments on the Quantity of Gases Absorbed by Water, at Different Temperatures, and under Different Pressures.[Abstract]. Abstracts of the Papers Printed in the Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1800. JSTOR, 103-104.
- HENRY, W. 1803. Experiments on the quantity of gases absorbed by water, at different temperatures, and under different pressures. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 93, 29-276.
- HEPBURN, C. 1992. Trends in polyurethane elastomer technology. *Iranian Journal of Polymer Science d Terhroalogy. t'ol*, 1.
- HERNANDEZ-IZQUIERDO, V. M. & KROCHTA, J. M. 2008. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. *Journal of Food Science*, 73, R30-R39.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P., VILLALOBOS, R. & CHIRALT, A. 2004. Effect of thermal treatments on functional properties of edible films made from wheat gluten fractions. *Food Hydrocolloids*, 18, 647-654.
- HONG, S.-I. & KROCHTA, J. M. 2006. Oxygen barrier performance of whey-protein-coated plastic films as affected by temperature, relative humidity, base film and protein type. *Journal of Food Engineering*, 77, 739-745.
- HONG, S. I., HAN, J. H. & KROCHTA, J. M. 2004. Optical and surface properties of whey protein isolate coatings on plastic films as influenced by substrate, protein concentration, and plasticizer type. *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 335-343.
- HONG, S. I. & KROCHTA, J. M. 2003. Oxygen barrier properties of whey protein isolate coatings on polypropylene films. *Journal of Food Science*, 68, 224-228.
- HONG, S. I. & KROCHTA, J. M. 2004. Whey protein isolate coating on LDPE film as a novel oxygen barrier in the composite structure. *Packaging Technology and Science*, 17, 13-21.
- HUGGINS, M. L. 1941. Solutions of Long Chain Compounds. *The Journal of Chemical Physics*, 9, 440-440.
- IMMERGUT, E. H. & MARK, H. F. 1965. Principles of Plasticization. *Plasticization and Plasticizer Processes*, 48, 1-26.
- ISIĞ, B. & KİS, M. 2004. Preparation and determination of swelling behavior of poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels in water. *Journal of applied polymer science*, 94, 1526-1531.
- JAMBRAK, A. R., MASON, T. J., LELAS, V., PANIWNYK, L. & HERCEG, Z. 2014. Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food Engineering*, 15-23.
- JENKINS, W. A. & HARRINGTON, J. P. 1992. *Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff*, Hamburg, Behr's Verlag.
- JOVANOVIĆ, S., BARAC, M. & MACEJ, O. 2005. Whey proteins-Properties and Possibility of Application. *Mljekarstvo*, 55, 215-233.
- JUNG, S., RICKERT, D. A., DEAK, N. A., ALDIN, E. D., RECKNOR, J., JOHNSON, L. A. & MURPHY, P. A. 2003. Comparison of kjeldahl and dumas methods for determining protein contents of soybean products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 1169-1173.
- KAELBLE, D. & MOACANIN, J. 1977. A surface energy analysis of bioadhesion. *Polymer*, 18, 475-482.
- KARIMI, M., ALBRECHT, W., HEUCHEL, M., KISH, M., FRAHN, J., WEIGEL, T., HOFMANN, D., MODARRESS, H. & LENDLEIN, A. 2005. Determination of

- water/polymer interaction parameter for membrane-forming systems by sorption measurement and a fitting technique. *Journal of membrane science*, 265, 1-12.
- KOCHER, M. 2005. *Quelldruckmessungen und thermische Druckmessungen an ausgewählten Sandsteinen*. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- KÖLLING, W. 2001. METHODEN-Aus der Reihe getanz-Identifikation von Ausreißern mit dem Hampel-Test. *Qualität und Zuverlässigkeit*, 46, 315-319.
- KOLTZENBURG, S., MASKOS, M. & NUYKEN, O. 2014. *Polymere: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Berlin [u.a.], Springer Spektrum.
- KROCHTA, J. M. 2002. Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities. In: GENNADIOS, A. (ed.) *Protein-based films and coatings*. Boca Raton: CRC Press.
- KROCHTA, J. M., BALDWIN, E. A. & NISPEROS-CARRIEDO, M. O. 1994. *Edible coatings and films to improve food quality*, Lancaster, Pa., Technomic Publ. Co.
- LABORATORY, E. M. B. 2014. *Protein Data Bank in Europe* [Online]. European Bioinformatics Institute. Available: www.ebi.ac.uk/pdbe [Accessed 23.06.2014].
- LAKE, M. 2009. *Oberflächentechnik in der Kunststoffverarbeitung: Vorbehandeln, Beschichten, Funktionalisieren und Kennzeichnen von Kunststoffoberflächen*, München, Hanser.
- LANGOWSKI, H.-C. 2005. Stofftransport durch Polymere und anorganische Schichten. *Vakuum in Forschung und Praxis*, 17, 6-13.
- LANGOWSKI, H.-C. 2008. Permeation of Gases and Condensable Substances through Monolayer and Multilayer Structures. In: PIRINGER, O. G. & BANER, A. L. (eds.) *Plastic Packaging*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- LANGOWSKI, H.-C. 2015. Trends, Sustainability, Acceptance - Challenges for Plastic Packaging. *Kunststoffe international*. Munich: Carl Hanser Verlag GmbH & Co. KG.
- LE TIEN, C., LETENDRE, M., ISPAS-SZABO, P., MATEESCU, M. A., DELMAS-PATTERSON, G., YU, H. L. & LACROIX, M. 2000. Development of biodegradable films from whey proteins by cross-linking and entrapment in cellulose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5566-5575.
- LEE, D. S., PIERGIOVANNI, L. & YAM, K. L. 2008a. *Food packaging science and technology*, Boca Raton, Fla. [u.a.], CRC/Taylor & Francis.
- LEE, J.-W., SON, S.-M. & HONG, S.-I. 2008b. Characterization of protein-coated polypropylene films as a novel composite structure for active food packaging application. *Journal of Food Engineering*, 86, 484-493.
- LEGRAND, D. & GAINES, G. 1969. The molecular weight dependence of polymer surface tension. *Journal of Colloid and Interface Science*, 31, 162-167.
- LENT, L., VANASUPA, L. & TONG, P. 1998. Whey protein edible film structures determined by atomic force microscope. *Journal of Food Science*, 63, 824-827.
- LIU, C.-C., TELLEZ-GARAY, A. M. & CASTELL-PEREZ, M. E. 2004. Physical and mechanical properties of peanut protein films. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 731-738.
- LIU, K. & HSIEH, F.-H. 2008. Protein-Protein Interactions during High-Moisture Extrusion for Fibrous Meat Analogues and Comparison of Protein Solubility Methods Using Different Solvent Systems. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2681-2687 2681.

- LIU, K. S. & HSIEH, F.-H. 2007. Protein–protein interactions in high moisture-extruded meat analogs and heat-induced soy protein gels. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 741-748.
- MAHMOUD, R. & SAVELLO, P. A. 1993. Solubility and Hydrolyzability of Films Produced by Transglutaminase Catalytic Crosslinking of Whey Protein. *Journal of Dairy Science*, 76, 29-35.
- MALI, S., SAKANAKA, L., YAMASHITA, F. & GROSSMANN, M. 2005. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*, 60, 283-289.
- MARZOCCA, A. 2007. Evaluation of the polymer–solvent interaction parameter χ for the system cured styrene butadiene rubber and toluene. *European polymer journal*, 43, 2682-2689.
- MARZOCCA, A., GARRAZA, A. R. & MANSILLA, M. 2010. Evaluation of the polymer–solvent interaction parameter χ for the system cured polybutadiene rubber and toluene. *Polymer Testing*, 29, 119-126.
- MASAMBA, K., LI, Y., HATEGEKIMANA, J., ZEHADI, M., MA, J. & ZHONG, F. 2016. Evaluation of mechanical and water barrier properties of transglutaminase cross-linked zein films incorporated with oleic acid. *International Journal of Food Science & Technology*, 51, 1159-1167.
- MATE, J. I. & KROCHTA, J. M. 1996. Comparison of oxygen and water vapor permeabilities of whey protein isolate and beta-lactoglobulin edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3001-3004.
- MATHEIS, G. & WHITAKER, J. R. 1987. A review-Enzymatic cross-linking of proteins applicable to foods *Journal of Food Biochemistry*, 11, 309-327.
- MATSUNAGA, M. & WHITNEY, P. J. 2000. Surface changes brought about by corona discharge treatment of polyethylene film and the effect on subsequent microbial colonisation. *Polymer Degradation and Stability*, 70, 325-332.
- MCHUGH, T. H., AUJARD, J. F. & KROCHTA, J. M. 1994. Plasticized whey-protein edible films - water-vapor permeability properties. *Journal of Food Science*, 59, 416-419.
- MCHUGH, T. H. & KROCHTA, J. M. 1994. Sorbitol-plasticized vs. glycerol-plasticized whey-protein edible films - integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 841-845.
- MCKEEN, L. W. 2012. *Permeability Properties of Plastics and Elastomers*, Amsterdam, Elsevier, WA.
- MCKENNA, G. B., FLYNN, K. M. & CHEN, Y. 1990. Swelling in crosslinked natural rubber: experimental evidence of the crosslink density dependence of χ . *Polymer*, 31, 1937-1945.
- MEHYAR, G. R. & HAN, J. H. 2004. Physical and mechanical properties of highamylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *Journal of Food Science*, 69, E449-E454.
- MEKONNEN, T., MUSSONE, P., KHALIL, H. & BRESSLER, D. 2013. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A*, 1, 13379.
- MENGES, G., HABERSTROH, E., MICHAELI, W. & SCHMACHTENBERG, E. 2002. *Werkstoffkunde Kunststoffe*, München, Hanser Verlag.
- MESIC, B., LESTELIUS, M. & ENGSTRÖM, G. 2006. Influence of corona treatment decay on print quality in water-borne flexographic printing of low-density

- polyethylene-coated paperboard. *Packaging Technology and Science*, 19, 61-70.
- MICARD, V., BELAMRI, R., MOREL, M. H. & GUILBERT, S. 2000. Properties of chemically and physically treated wheat gluten films. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48, 2948-2953.
- MIESBAUER, O., SCHMIDT, M. & LANGOWSKI, H.-C. 2008. Stofftransport durch Schichtsysteme aus Polymeren und dünnen anorganischen Schichten. *Vakuum in Forschung und Praxis*, 20, 32-40.
- MILLER, K., CHIANG, M. & KROCHTA, J. 1997. Heat curing of whey protein films. *Journal of food science*, 62, 1189-1193.
- MILLER, K. S. & KROCHTA, J. M. 1997. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 228-237.
- MORR, C. & HA, E. 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33, 431-476.
- MOTOKI, M., NIO, N. & TAKINAMI, K. 1984. Functional- properties of food proteins polymerized by transglutaminase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48, 1257-1261.
- MOTOKI, M. & SEGURO, K. 1998. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 204-210.
- MÜLLER, K. 2013. Multilayer Films for Bag-in-Container Systems used in Disposable Kegs: Basic Principles of possible Barrier Concepts. *Brewing Science*, 66.
- MURAMATSU, M., OKURA, M., KUBOYAMA, K., OUGIZAWA, T., YAMAMOTO, T., NISHIHARA, Y., SAITO, Y., ITO, K., HIRATA, K. & KOBAYASHI, Y. 2003. Oxygen permeability and free volume hole size in ethylene-vinyl alcohol copolymer film: temperature and humidity dependence. *Radiation Physics and Chemistry*, 68, 561-564.
- NAKAI, S. & MODLER, H. W. 1996. *Food proteins: properties and characterization*, New York, VCH Publishers, Inc.
- NANETTI, P. 2016. *Lack für Einsteiger*, Hannover, Vincentz Network.
- NENTWIG, J. 2006. *Kunststoff-Folien: Herstellung- Eigenschaften- Anwendung*, München, Hanser Fachbuchverlag.
- NIELSEN, P., PETERSEN, D. & DAMBMANN, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of food science*, 66, 642-646.
- NOVÁK, I., POLLÁK, V. & CHODÁK, I. 2006. Study of Surface Properties of Polyolefins Modified by Corona Discharge Plasma. *Plasma Processes and Polymers*, 3, 355-364.
- OH, J.-H., WANG, B., FIELD, P. D. & AGLAN, H. A. 2004. Characteristics of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*, 39, 287-294.
- OLSSON, E., HEDENQVIST, M. S., JOHANSSON, C. & JÄRNSTRÖM, L. 2013. Influence of citric acid and curing on moisture sorption, diffusion and permeability of starch films. *Carbohydrate Polymers*, 94, 765-772.
- ONWULATA, C. & HUTH, P. 2008. *Whey processing, functionality and health benefits*, Ames, Wiley-Blackwell.

- OSSES, J., FERNANDEZ-PAN, I., MENDOZA, M. & MATE, J. I. 2009. Stability of the mechanical properties of edible films based on whey protein isolate during storage at different relative humidity. *Food Hydrocolloids*, 23, 125-131.
- OTONI, C. G., AVENA-BUSTILLOS, R. J., CHIOU, B.-S., BILBAO-SAINZ, C., BECHTEL, P. J. & MCHUGH, T. H. 2012. Ultraviolet-B Radiation Induced Cross-linking Improves Physical Properties of Cold- and Warm-Water Fish Gelatin Gels and Films. *Journal of Food Science*, 77, E215-E223.
- OWENS, D. K. & WENDT, R. 1969. Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*, 13, 1741-1747.
- OZDEMIR, M. & FLOROS, J. D. 2008. Optimization of edible whey protein films containing preservatives for mechanical and optical properties. *Journal of Food Engineering*, 84, 116-123.
- PANYAM, D. & KILARA, A. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 120-125.
- PARRIS, N. & BAGINSKI, M. A. 1991. A Rapid Method for the Determination of Whey-Protein Denaturation. *Journal of Dairy Science*, 74, 58-64.
- PARSEGIAN, V. A. 2006. *Van der Waals forces: a handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists*, New York, Cambridge University Press.
- PAULING, L. 1970. *General chemistry*, San Francisco, W.H. Freeman.
- PEARSON, R. K. 2002. Outliers in process modeling and identification. *IEEE Transactions on Control Systems Technology*, 10, 55-63.
- PELEGRINE, D. H. G. & GASPARETTO, C. A. 2005. Whey proteins solubility as function of temperature and pH. *Lwt-Food Science and Technology*, 38, 77-80.
- PEPPAS, N. A., OTTENBRITE, R. M., PARK, K. & OKANO, T. 2010. *Biomedical applications of hydrogels handbook*, New York [u. a.], Springer Science & Business Media.
- PEREZ-GAGO, M. B. & KROCHTA, J. M. 1999. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. *Journal of Food Science*, 64, 695-698.
- PEREZ-GAGO, M. B. & KROCHTA, J. M. 2000. Drying temperature effect on water vapor permeability mechanical properties of whey protein-lipid emulsion films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2687-2692.
- PEREZ-GAGO, M. B. & KROCHTA, J. M. 2001. Denaturation time and temperature effects on solubility, tensile properties, and oxygen permeability of whey protein edible films. *Journal of Food Science*, 66, 705-710.
- PEREZ-GAGO, M. B., NADAUD, P. & KROCHTA, J. M. 1999. Water vapor permeability, solubility, and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films. *Journal of Food Science*, 64, 1034-1037.
- PETERS, J. P., LUYTEN, H., ALTING, A. C., BOOM, R. M. & VAN DER GOOT, A. J. 2015. Effect of crosslink density on the water-binding capacity of whey protein microparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 277-284.
- PIRINGER, O. G. 1993. *Verpackungen für Lebensmittel*, Weinheim, VCH Verlag.
- PIRINGER, O. G. & BANER, A. L. 2008. *Plastic Packaging - Interactions with Food and Pharmaceuticals*, Weinheim, VCH
- RHIM, J. W., GENNADIOS, A., FU, D., WELLER, C. L. & HANNA, M. A. 1999. Properties of ultraviolet irradiated protein films. *Lwt-Food Science and Technology*, 32, 129-133.
- ROBERTSON, G. L. 2013. *Food packaging: principles and practice*, Boca Raton, Taylor & Francis Group/CRC Press.

- RONNIGER, C. 2013. *Taschenbuch der statistischen Qualitäts- und Zuverlässigkeitsmethoden*, München, Curt Ronniger.
- SABATO, S., OUATTARA, B., YU, H., D'APRANO, G., LE TIEN, C., MATEESCU, M. & LACROIX, M. 2001. Mechanical and barrier properties of cross-linked soy and whey protein based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1397-1403.
- SAWYER, W. H., NORTON, R. S., NICHOL, L. W. & MCKENZIE, G. H. 1971. Thermodenaturation of bovine beta-lactoglobulin kinetics and introduction of beta-structure. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 243, 19-&.
- SCHÄFER, M. 2012. Grenzflächenchemie - Bestimmung der polaren und dispersen Anteile der Oberflächenspannung von Festkörpern mittels Kontaktwinkelmessungen. In: PHILIPPS-UNIVERSITÄT-MARBURG (ed.) *Skripte Praktika Physikalische Chemie*. Marburg: Fachbereich Chemie.
- SCHAICH, K. & PRYOR, W. A. 1980. Free radical initiation in proteins and amino acids by ionizing and ultraviolet radiations and lipid oxidation—part II: Ultraviolet radiation and photolysis. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 13, 131-159.
- SCHMID, M. 2013. Properties of Cast Films Made from Different Ratios of Whey Protein Isolate, Hydrolysed Whey Protein Isolate and Glycerol. *Materials*, 6, 3254-3269.
- SCHMID, M., DALLMANN, K., BUGNICOURT, E., CORDONI, D., WILD, F., LAZZERI, A. & NOLLER, K. 2012. Properties of whey protein coated films and laminates as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. *International Journal of Polymer Science*, 2012, 7.
- SCHMID, M., EIB, S. & REINELT, M. 2015a. Modeling, Simulation and Experimental Validation of Drying and Denaturation Behavior of Whey Protein Isolate Based Coatings. *Drying Technology*, 33, 1382-1395.
- SCHMID, M., HAMMANN, F. & JESDINSZKI, M. 2015. Proteinbasierte Barrierefolien und -Beschichtungen. Fachtagung: Barriere-Verbundfolien - Verbesserte Haltbarkeit von Lebensmitteln, 23.-24.9.2015 Würzburg. Würzburg: SKZ / Innoform.
- SCHMID, M., HELD, J., HAMMANN, F., SCHLEMMER, D. & NOLLER, K. 2015c. Effect of UV-radiation on the packaging-related properties of whey protein isolate based films and coatings. *Packaging Technology and Science*, 28, 883-899.
- SCHMID, M., HINZ, L.-V., WILD, F. & NOLLER, K. 2013a. Effects of Hydrolysed Whey Proteins on the Techno-Functional Characteristics of Whey Protein-Based Films. *Materials*, 6, 927-940.
- SCHMID, M., KRIMMEL, B., GRUPA, U. & NOLLER, K. 2014a. Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based films. *Journal of Dairy Science*, 97, 5315-5327.
- SCHMID, M., NOLLER, K., WILD, F. & BUGNICOURT, E. 2013b. *Whey Protein Coated Films*. PCT/IB2011/053271.
- SCHMID, M., PRINZ, T., MÜLLER, K. & HAAS, A. 2017a. UV-radiation induced cross-linking of whey protein isolate-based films. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 6.
- SCHMID, M., PRÖLS, S., KAINZ, D., HAMMANN, F. & GRUPA, U. 2017b. Effect of thermally induced denaturation on molecular interaction-response relationships of whey protein isolate based films and coatings. *Progress in Organic Coatings*, 104, 161-172.

- SCHMID, M., PRÖLS, S., KAINZ, D. M., HAMMANN, F. & STÄBLER, A. 2016. Impact of hydrolyzed whey protein on the molecular interactions and cross-linking density in whey protein isolate based films. *International Journal of Polymer Science*, 2016, 9.
- SCHMID, M., REICHERT, K., HAMMANN, F. & STÄBLER, A. Effect of Storage Time Dependent Alteration on Molecular Interactions of Whey Protein Isolate Based Coatings. In: LANGOWSKI, H. C. & WANI, A. A., eds. Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety, 15.-17.9.2015 2015d Erding / Munich. Elsevier.
- SCHMID, M., REICHERT, K., HAMMANN, F. & STÄBLER, A. 2015e. Storage time-dependent alteration of molecular interaction–property relationships of whey protein isolate-based films and coatings. *Journal of Materials Science*, 50, 4396-4404.
- SCHMID, M., REICHERT, K., HAMMANN, F., STÄBLER, A. & LINDNER, M. 2015f. Storage Time-Dependent Alteration of Structure-Property Relationships of Whey Protein Isolate Based Films and Coatings. *27th IAPRI Symposium on Packaging 2015*. Valencia.
- SCHMID, M., SÄNGERLAUB, S., WEGE, L. & STÄBLER, A. 2014b. Properties of Transglutaminase Crosslinked Whey Protein Isolate Coatings and Cast Films. *Packaging Technology and Science*, 27, 799-817.
- SCHMID, M., ZILLINGER, W., MÜLLER, K. & SÄNGERLAUB, S. 2015g. Permeation of water vapour, nitrogen, oxygen and carbon dioxide through whey protein isolate based films and coatings - permselectivity and activation energy. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 21-29.
- SCHMIDT, M., RODLER, N., MIESBAUER, O., ROJAHN, M., VOGEL, T., DÖRFLER, R., KUCUKPINAR, E. & LANGOWSKI, H.-C. 2012. Adhesion and barrier performance of novel barrier adhesives used in multilayered high-barrier laminates. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 26, 2405-2436.
- SCHOFIELD, J., BOTTOMLEY, R., TIMMS, M. & BOOTH, M. 1983. The effect of heat on wheat gluten and the involvement of sulphhydryl-disulphide interchange reactions. *Journal of Cereal Science*, 1, 241-253.
- SEARS, J. K. & DARBY, J. R. 1982. *The Technology of Plasticizers*, New York, Wiley.
- SHAH, M. A., SCHMID, M., AGGARWAL, A. & WANI, A. A. 2017. Testing and Quality Assurance of Bioplastics. In: SINGH, P., WANI, A. A. & LANGOWSKI, H.-C. (eds.) *Food Packaging Materials: Testing & Quality Assurance*. Boca Raton: CRC Press.
- SHIMADA, K. & CHEFTEL, J. C. 1989. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat-induced gelation of whey protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 161-168.
- SIENKIEWICZ, T. 1981a. Nomenklatur und einige Eigenschaften der Molkenproteine. 1. Mitt. β -Lactoglobulin. *Food/Nahrung*, 25, 329-334.
- SIENKIEWICZ, T. 1981b. Nomenklatur und einige Eigenschaften der Molkenproteine. 2. Mitt. α -Lactalbumin, Immunglobuline, Proteose-Peptide, Minorproteine und Enzyme. *Food/Nahrung*, 25, 335-343.
- SMITHERS, G. W. 2008. Whey and whey proteins—From ‘gutter-to-gold’. *International Dairy Journal*, 18, 695-704.
- SMITHERS, G. W. 2015. Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2-14.

- SOTHORNVIT, R. & KROCHTA, J. M. 2000a. Oxygen permeability and mechanical properties of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3913-3916.
- SOTHORNVIT, R. & KROCHTA, J. M. 2000b. Plasticizer effect on oxygen permeability of beta-lactoglobulin films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 6298-6302.
- SOTHORNVIT, R. & KROCHTA, J. M. 2000c. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Food Science*, 65, 700-703.
- SOTHORNVIT, R. & KROCHTA, J. M. 2005. Plasticizers in edible films and coatings. In: HAN, J. H. (ed.) *Innovations in Food packaging*. San Diego, London: Elsevier Academic Press.
- SOTHORNVIT, R., REID, D. S. & KROCHTA, J. M. 2002. Plasticizer effect on the glass transition temperature of beta-lactoglobulin films. *Transactions of the Asae*, 45, 1479-1484.
- STÄBLER, A. & SCHMID, M. 2016. *Thermoformbarer Mehrschichtverbund sowie proteinbasierte Formulierung zum Erhalt einer thermoformbaren Schicht mit Sauerstoffbarriere im Verbund* Deutschland patent application 10 2016 108 214.7.
- STUCHELL, Y. M. & KROCHTA, J. M. 1994. Enzymatic Treatments and Thermal Effects on Edible Soy Protein Films. *Journal of Food Science*, 59, 1332-1337.
- TERNES, W. 2008. *Naturwissenschaftliche Grundlage der Lebensmittelzubereitung*, Hamburg, Behr's Verlag.
- TOLKACH, A. 2007. *Thermisches Denaturierungsverhalten von Molkenproteinfraktionen: selektive Denaturierung-Fraktionierung mit Membranen-Reaktions-, Auffaltungs- und Aggregationskinetik*, München, Verlag Dr. Hut.
- TÖPEL, A. 2004. *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff- Rohstoff- Lebensmittel*, Hamburg, Behr's Verlag.
- USTUNOL, Z. & MERT, B. 2004. Water Solubility, Mechanical, Barrier, and Thermal Properties of Cross-linked Whey Protein Isolate-based Films. *Journal of Food Science*, 69, 129-133.
- VALENTÍN, J. L., CARRETERO-GONZÁLEZ, J., MORA-BARRANTES, I., CHASSÉ, W. & SAALWÄCHTER, K. 2008. Uncertainties in the Determination of Cross-Link Density by Equilibrium Swelling Experiments in Natural Rubber. *Macromolecules*, 41, 4717-4729.
- VAN KREVELEN, D. W. & TE NIJENHUIS, K. 2009. *Properties of polymers: their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions*, Amsterdam [u. a.], Elsevier.
- VIEIRA, M. G. A., DA SILVA, M. A., DOS SANTOS, L. O. & BEPPU, M. M. 2011. Natural-based plasticizers and biopolymer films: a review. *European Polymer Journal*, 47, 254-263.
- VLADIMIROV, Y. A., ROSHCHUPKIN, D. & FESENKO, E. 1970. PHOTOCHEMICAL REACTIONS IN AMINO ACID RESIDUES AND INACTIVATION OF ENZYMES DURING UV-IRRADIATION. A REVIEW. *Photochemistry and photobiology*, 11, 227-246.
- WANI, A. A., SINGH, P. & LANGOWSKI, H.-C. 2013. Food Technologies: Packaging. In: MOTARJEMI, Y. (ed.) *Encyclopedia of food safety*. San Diego: Academic Press.

- WIHODO, M. & MORARU, C. I. 2012. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films. A review. *Journal of Food Engineering*, 114, 292-302.
- YADA, R. Y. 2004. *Proteins in food processing*, Boca Raton [u. a.], CRC Press.
- YANG, Y. C. & SONG, K. B. 1999. Effect of ascorbic acid and protein concentration on the molecular weight profile of bovine serum albumin and β -lactoglobulin by γ -irradiation. *Food Research International*, 32, 515-519.
- YASUDA, H. & LAMAZE, C. E. 1971. Permselectivity of solutes in homogeneous water-swollen polymer membranes. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 5, 111-134.
- YILDIRIM, M. & HETTIARACHCHY, N. S. 1998. Properties of Films Produced by Cross-linking Whey Proteins and 11S Globulin Using Transglutaminase. *Journal of Food Science*, 63, 248-252.
- YOUNG, T. 1805. An essay on the cohesion of fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 95, 65-87.
- ZEME, A. 2014. Safety compliance of Wheylayer Products. Celje: Plasttechnics Cluster Slovenia.
- ZHANG, Y. & HAN, J. 2006a. Mechanical and thermal characteristics of pea starch films plasticized with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71, 109-118.
- ZHANG, Y. & HAN, J. 2006b. Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. *Journal of Food Science*, 71, 253-261.
- ZHU, Y., RINZEMA, A., TRAMPER, J. & BOL, J. 1995. Microbial transglutaminase—a review of its production and application in food processing. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 277-282.
- ZINK, J., WYROBNIK, T., PRINZ, T. & SCHMID, M. 2016. Physical, Chemical and Biochemical Modifications of Protein-Based Films and Coatings: An Extensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1376.

Anhang I: Zusatzinformationen

Anhang I-a: Berechnung des durchschnittlichen Molekulargewichts der in WPI enthaltenen Aminosäuren

In nachfolgender Tabelle sind die in Molkenproteinisolat enthaltenen Proteinfractionen mit ihren Massenanteilen, jeweiligen Molekulargewichten sowie Anzahl an Aminosäuren und deren die jeweilige Anzahl an Thiolgruppen aufgeführt (Andrews, 1978, de Wit, 2009, Töpel, 2004). Hieraus wurde das durchschnittliche Molekulargewicht der enthaltenen Aminosäuren sowie das durchschnittliche Molekulargewicht zwischen zwei Quervernetzungen M_c bei 100% Quervernetzung berechnet.

Tabelle 23: Zusammensetzung von WPI (Andrews, 1978, de Wit, 2009, Töpel, 2004), Berechnung des durchschnittliche Molekulargewichts der enthaltenen Aminosäuren sowie Berechnung des durchschnittlichen Molekulargewichts zwischen zwei Quervernetzungen M_c bei 100% Quervernetzung. Übersetzt aus Schmid et al. (2016)

Proteinfraction	Anteil [% m/m]	Molekulargewicht [kDa]	Thiolgruppen	Anzahl Aminosäuren	Durchschnittliches Molekulargewicht der Aminosäuren [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]	M_c theoretisch [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
β -lactoglobulin	56	18.3	5	162	113.0	3660
α -lactalbumin	19	14.2	4	123	115.4	1775
Immunglobulin	14	150	64	990	151.5	2344
Bovine Serum Albumin	7	66.3	35	582	113.9	1894
Proteose Peptone	4	18	0	0	133.3	18000
Lactoferrin	2	80	-	691	115.8	80000
lactoperoxidase	1	78	-	612	127.5	78000
					123.3	theor. M_c 5948

Anhang I-b: Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von Molkenprotein mit Wasser bei unterschiedlichen Ausgangsmolekulargewichten und Denaturierungsgraden

Tabelle 24: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichem Ausgangsmolekulargewicht bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten und Resultierende Wechselwirkungsparameter χ . Übersetzt aus Schmid et al. (2016)

a_w	ϕ_2 von					
	WPI:h-WPI	WPI:h-WPI	WPI:h-WPI	WPI:h-WPI	WPI:h-WPI	WPI:h-WPI
	10:0	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,017	0,020	0,015	0,014	0,016	0,012
0,2	0,042	0,046	0,040	0,038	0,041	0,035
0,3	0,073	0,078	0,073	0,070	0,074	0,069
0,4	0,109	0,114	0,109	0,108	0,112	0,108
0,5	0,153	0,160	0,155	0,155	0,160	0,157
0,6	0,208	0,216	0,213	0,213	0,218	0,215
0,7	0,281	0,292	0,289	0,290	0,296	0,293
0,8	0,394	0,403	0,400	0,408	0,416	0,414
0,9	0,521	0,533	0,527	0,535	0,538	0,547
Berechnetes χ	0,482	0,442	0,468	0,468	0,441	0,460

Tabelle 25: Wechselwirkungsparameter χ von Molkenprotein mit Wasser von Folien aus Formulierungen mit unterschiedlichem Denaturierungsgrad (DG). Übersetzt aus Schmid et al. (2017b)

a_w	ϕ_2 bei DG 0	ϕ_2 bei DG 25	ϕ_2 bei DG 50	ϕ_2 bei DG 75	ϕ_2 bei DG 100
0,0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,011	0,011	0,008	0,007	0,012
0,2	0,028	0,028	0,023	0,021	0,029
0,3	0,048	0,051	0,046	0,042	0,053
0,4	0,076	0,079	0,076	0,072	0,082
0,5	0,114	0,118	0,116	0,110	0,120
0,6	0,168	0,171	0,170	0,172	0,175
0,7	0,262	0,258	0,256	0,259	0,259
0,8	0,431	0,433	0,432	0,420	0,431
0,9	0,611	0,672	0,698	0,645	0,724
Determined χ	0,482	0,531	0,468	0,468	0,441

Anhang I-c: Vernetzungskennzahlen in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts

Tabelle 26: Grad der Quellung (DoS), Volumenanteil des Polymers im gequollenen Gel ϕ_1 , durchschnittliches Molekulargewicht des Polymers zwischen den Quervernetzungen M_c sowie Vernetzungsdichte (CLD) und –grad (DoC) in Abhängigkeit des Ausgangsmolekulargewichts. Übersetzt aus Schmid et al. (2016)

Bezeichnung	DoS	ϕ_1	M_c	CLD	DoC
WPI: h-WPI	[%]	[-]	[g·mol ⁻¹]	·10 ⁻⁴ [mol·g ⁻¹]	[%]
WPI:h-WPI 10:0	400 ± 9	0,1222 ± 0,0023	8700 ± 1800	1,15 ± 0,24	1,42 ± 0,30
WPI:h-WPI 9:1	380 ± 60	0,126 ± 0,015	8100 ± 2800	1,2 ± 0,5	1,5 ± 0,6
WPI:h-WPI 8:2	590 ± 40	0,088 ± 0,005	18000 ± 5000	0,55 ± 0,15	0,67 ± 0,19
WPI:h-WPI 7:3	810 ± 100	0,066 ± 0,009	34000 ± 13000	0,29 ± 0,11	0,36 ± 0,14
WPI:h-WPI 6:4	860 ± 80	0,063 ± 0,006	38000 ± 13000	0,27 ± 0,09	0,33 ± 0,11
WPI:h-WPI 5:5	1100 ± 400	0,052 ± 0,017	60000 ± 40000	0,18 ± 0,13	0,22 ± 0,16

Anhang I-d: Gleichgewichtsfeuchte in Abhängigkeit des Weichmachergehaltes und Ausgangsmolekulargewichts

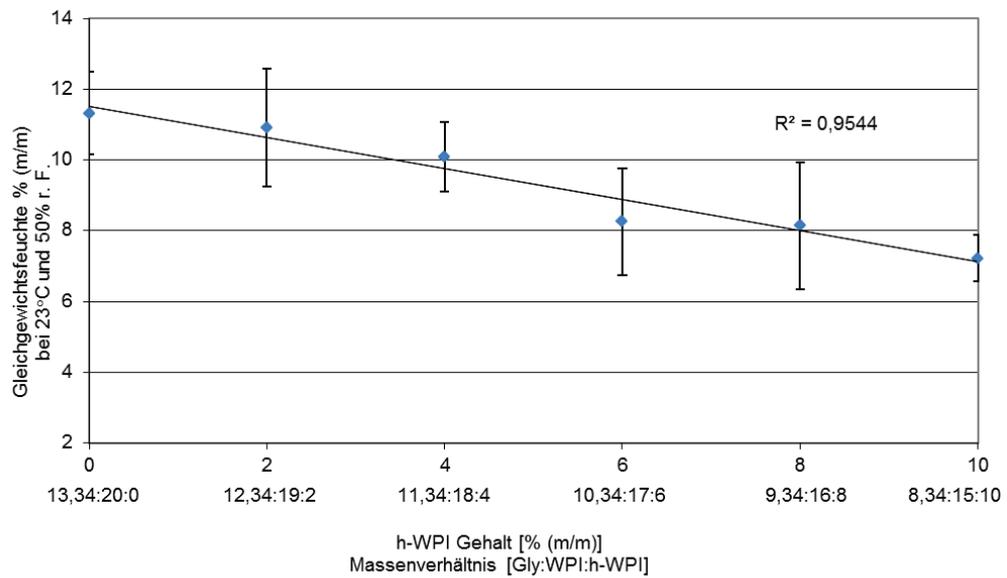


Abbildung 63: Gleichgewichtsfeuchte in Abhängigkeit des Weichmachergehaltes und Ausgangsmolekulargewichts. Übersetzt aus Schmid (2013)

Anhang I-e: Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von TG- und UV-quervernetzten Molkenprotein mit Wasser

Tabelle 27: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von Molkenprotein-basierten Folien mit unterschiedlichen TG-Konzentrationen (units) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten und resultierende Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von TG-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien mit Wasser

a_w-Wert	ϕ_2 von Muster 0 units 0 min	ϕ_2 von Muster 0,1 unit 10 min	ϕ_2 von Muster 0,1 unit 40 min	ϕ_2 von Muster 0,1 unit 70 min	ϕ_2 von Muster 0,1 unit 130 min
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,1	0,0228	0,0260	0,0262	0,0240	0,0282
0,2	0,0512	0,0529	0,0531	0,0523	0,0579
0,3	0,0824	0,0840	0,0843	0,0838	0,0924
0,4	0,1207	0,1215	0,1213	0,1226	0,1338
0,5	0,1617	0,1638	0,1643	0,1647	0,1810
0,6	0,2187	0,2207	0,2212	0,2228	0,2431
0,7	0,2949	0,2968	0,2975	0,2998	0,3250
0,8	0,4091	0,4112	0,4128	0,4151	0,4457
0,9	0,6103	0,6126	0,6192	0,6166	0,6534
berechnetes χ	0,3572	0,3455	0,3429	0,3390	0,2441

Fortsetzung der Tabelle folgt auf der nächsten Seite.

a_w-Wert	φ₂ von Muster 1 unit 10 min	φ₂ von Muster 1 unit 40 min	φ₂ von Muster 1 unit 70 min	φ₂ von Muster 1 unit 130 min
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,1	0,0259	0,0250	0,0249	0,0256
0,2	0,0530	0,0526	0,0527	0,0534
0,3	0,0843	0,0837	0,0839	0,0849
0,4	0,1221	0,1217	0,1220	0,1235
0,5	0,1646	0,1639	0,1640	0,1665
0,6	0,2216	0,2210	0,2211	0,2244
0,7	0,2980	0,2973	0,2973	0,3016
0,8	0,4123	0,4114	0,4114	0,4170
0,9	0,6136	0,6134	0,6125	0,6201
berechnetes χ	0,3414	0,3454	0,3446	0,3296

a_w-Wert	φ₂ von Muster 10 units 10 min	φ₂ von Muster 10 units 40 min	φ₂ von Muster 10 units 70 min	φ₂ von Muster 10 units 130 min
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,1	0,0249	0,0246	0,0259	0,0236
0,2	0,0525	0,0519	0,0525	0,0514
0,3	0,0833	0,0824	0,0835	0,0823
0,4	0,1210	0,1199	0,1201	0,1202
0,5	0,1632	0,1617	0,1632	0,1621
0,6	0,2198	0,2180	0,2190	0,2189
0,7	0,2954	0,2933	0,2938	0,2946
0,8	0,4085	0,4062	0,4072	0,4079
0,9	0,6090	0,6075	0,6112	0,6095
berechnetes χ	0,3511	0,3599	0,3539	0,3575

Tabelle 28: Volumenfraktion von Wasser ($\phi_2 = 1 - \phi_1$) von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien und resultierende Flory-Huggins Wechselwirkungsparameter χ von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Folien mit Wasser

a_w-Wert	ϕ_2 von Muster UV_0	ϕ_2 von Muster UV_5	ϕ_2 von Muater UV_10	ϕ_2 von Muster UV_50	ϕ_2 von- Muster UV_100	ϕ_2 von Muster UV_200
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
0,1	0,0258	0,0256	0,0257	0,0259	0,0253	0,0252
0,2	0,0524	0,0523	0,0525	0,0525	0,0512	0,0509
0,3	0,0835	0,0834	0,0836	0,0834	0,0813	0,0808
0,4	0,1208	0,1202	0,1206	0,1204	0,1173	0,1166
0,5	0,1639	0,1636	0,1642	0,1633	0,1597	0,1583
0,6	0,2207	0,2206	0,2210	0,2200	0,2152	0,2136
0,7	0,2967	0,2964	0,2969	0,2958	0,2895	0,2879
0,8	0,4106	0,4111	0,4106	0,4096	0,4027	0,3995
0,9	0,6125	0,6173	0,6129	0,6144	0,6091	0,6003
berechnetes χ	0,3474	0,3487	0,3468	0,3502	0,3732	0,3804

Tabelle 29: Quervernetzungsdichte (CLD) berechnet aus mittlerem, minimalem und maximalem Flury-Huggins Wechselwirkungsparameter χ

Probe	CLD berechnet aus χ_{min} [mol/cm ³]		CLD berechnet aus $\bar{\chi}$ [mol/cm ³]	CLD berechnet aus χ_{max} [mol/cm ³]		Abweichung nach unten [%]		Abweichung nach oben [%]	
TG_0_0	10,18	9,30	8,06	13%	10%				
TG_0,1_0	9,11	8,30	7,18	14%	10%				
TG_0,1_30	9,58	8,74	7,57	13%	10%				
TG_0,1_60	9,43	8,60	7,45	13%	10%				
TG_0,1_120	9,28	8,47	7,32	13%	10%				
TG_1_0	9,20	8,39	7,26	13%	10%				
TG_1_30	9,78	8,93	7,74	13%	10%				
TG_1_60	9,66	8,81	7,63	13%	10%				
TG_1_120	9,45	8,62	7,46	13%	10%				
TG_10_0	15,51	14,26	12,52	12%	9%				
TG_10_30	16,17	14,87	13,07	12%	9%				
TG_10_60	15,65	14,39	12,63	12%	9%				
TG_10_120	15,17	13,94	12,22	12%	9%				
UV_0	19,14	17,66	15,60	12%	8%				
UV_5	48,99	46,16	42,22	9%	6%				
UV_10	48,64	45,67	41,54	9%	6%				
UV_50	62,76	59,39	54,70	8%	6%				
UV_100	114,07	108,87	101,63	7%	5%				
UV_200	105,54	100,51	93,50	7%	5%				
Mittelwert				10%					

Tabelle 29 zeigt, dass die Abweichung zwischen den Vernetzungsdichten und somit auch den Vernetzungsgraden bei deren Berechnung mit den beiden Extremwerten für den Wechselwirkungsparameter χ auf einem annehmbaren Niveau liegen (maximale Abweichung liegt bei 13 %). Deshalb kann angenommen werden, dass sich die bestimmten χ -Werte vernachlässigbar unterscheiden. Deshalb wurde der mittlere Wechselwirkungsparameter $\bar{\chi}$ für die UV- und die TG-quervernetzten Filme berechnet. Der mittlere Wechselwirkungsparameter $\bar{\chi}$ beträgt $0,351 \pm 0,012$ und wurde für die weiteren Berechnungen verwendet. Die Bestimmung eines gemeinsamen Wechselwirkungsparameters für UV- und TG-Quervernetzte Filme ist auch deshalb möglich, da es sich bei allen gequollenen Filmen um dasselbe Zweiphasensystem aus Wasser und WPI handelt. Von diesem Zweiphasensystem kann ausgegangen werden, da der Weichmacher während der Quellung vollständig aus dem Polymernetzwerk herausgelöst wird. Dies wurde durch Quellversuche mit anschließender Rückstandsanalyse bestätigt.

Anhang I-f: E-Modul von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Gießfolien

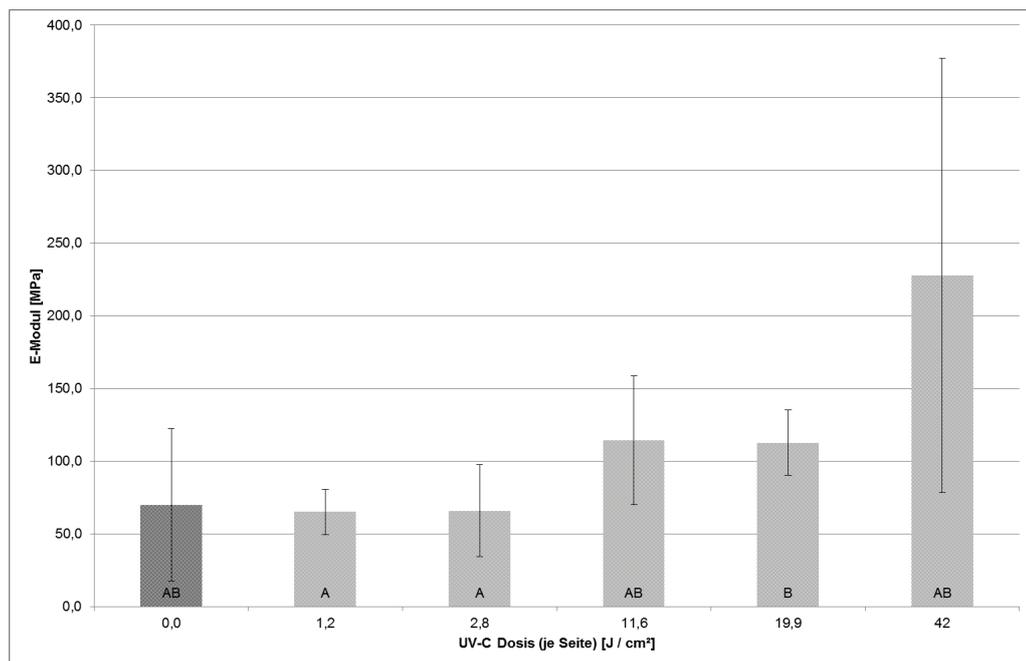


Abbildung 64: E-Modul von UV-quervernetzten Molkenprotein-basierten Gießfolien

Anhang II: Publikationen des Autors

Wissenschaftliche Publikationen mit direktem Bezug zur vorliegenden Dissertation

Nachfolgend gelistete wissenschaftliche Publikationen (peer reviewed) des Autors stehen in direktem Bezug zur vorliegenden Dissertation. Die publizierten Ergebnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation erarbeitet und sind somit teilweise oder vollständig Gegenstand dieser Monografie und wurden entsprechend zitiert. Die Auflistung erfolgt chronologisch nach dem Publikationsdatum (alt nach neu).

1. **SCHMID, M.**, DALLMANN, K., BUGNICOURT, E., CORDONI, D., WILD, F., LAZZERI, A. & NOLLER, K. 2012. Properties of whey protein coated films and laminates as novel recyclable food packaging materials with excellent barrier properties. *International Journal of Polymer Science*, 2012, 7.
2. BUGNICOURT, E., **SCHMID, M.**, NERNEY, O. M., WILDNER, J., SMYKALA, L., LAZZERI, A. & CINELLI, P. 2013. Processing and Validation of Whey-Protein-Coated Films and Laminates at Semi-Industrial Scale as Novel Recyclable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2013, 10.
3. **SCHMID, M.**, HINZ, L.-V., WILD, F. & NOLLER, K. 2013. Effects of Hydrolysed Whey Proteins on the Techno-Functional Characteristics of Whey Protein-Based Films. *Materials*, 6, 927-940.
4. **SCHMID, M.** 2013. Properties of Cast Films Made from Different Ratios of Whey Protein Isolate, Hydrolysed Whey Protein Isolate and Glycerol. *Materials*, 6, 3254-3269.
5. **SCHMID, M.**, SÄNGERLAUB, S., WEGE, L. & STÄBLER, A. 2014. Properties of Transglutaminase Crosslinked Whey Protein Isolate Coatings and Cast Films. *Packaging Technology and Science*, 27, 799-817.
6. **SCHMID, M.**, KRIMMEL, B., GRUPA, U. & NOLLER, K. 2014. Effects of thermally induced denaturation on technological-functional properties of whey protein isolate-based films. *Journal of Dairy Science*, 97, 5315-5327.
7. HAMMANN, F. & **SCHMID, M.** 2014. Determination and Quantification of Molecular Interactions in Protein Films: A Review. *Materials*, 7, 7975-7996.
8. **SCHMID, M.**, REICHERT, K., HAMMANN, F. & STÄBLER, A. 2015. Storage time-dependent alteration of molecular interaction–property relationships of whey protein isolate-based films and coatings. *Journal of Materials Science*, 50, 4396-4404.
9. **SCHMID, M.**, HELD, J., HAMMANN, F., SCHLEMMER, D. & NOLLER, K. 2015. Effect of UV-radiation on the packaging-related properties of whey protein isolate based films and coatings. *Packaging Technology and Science*, 28, 883–899.

10. **SCHMID, M.**, ZILLINGER, W., MÜLLER, K. & SÄNGERLAUB, S. 2015. Permeation of water vapour, nitrogen, oxygen and carbon dioxide through whey protein isolate based films and coatings - permselectivity and activation energy. *Food Packaging and Shelf Life*, 6, 21-29.
11. COLTELLI, M.-B., WILD, F., BUGNICOURT, E., CINELLI, P., LINDNER, M., **SCHMID, M.**, WECKEL, V., MÜLLER, K., RODRIGUEZ, P., STAEBLER, A., RODRÍGUEZ-TURIENZO, L. & LAZZERI, A. 2016. State of the Art in the Development and Properties of Protein-Based Films and Coatings and Their Applicability to Cellulose Based Products: An Extensive Review. *Coatings*, 6, 1-59.
12. ZINK, J., WYROBNIK, T., PRINZ, T. & **SCHMID, M.** 2016. Physical, Chemical and Biochemical Modifications of Protein-Based Films and Coatings: An Extensive Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 1376.
13. **SCHMID, M.**, PRÖLS, S., KAINZ, D. M., HAMMANN, F. & STÄBLER, A. 2016. Impact of hydrolyzed whey protein on the molecular interactions and cross-linking density in whey protein isolate based films. *International Journal of Polymer Science*, 2016. p.9.
14. **SCHMID, M.**, PRÖLS, S., KAINZ, D., HAMMANN, F. & GRUPA, U. 2017. Effect of thermally induced denaturation on molecular interaction-response relationships of whey protein isolate based films and coatings. *Progress in Organic Coatings*, 104, 161-172
15. **SCHMID, M.**, PRINZ, T., MÜLLER, K. & HAAS, A. 2017. UV-radiation induced cross-linking of whey protein isolate-based films. *International Journal of Polymer Science*, 2017, 6.

Wissenschaftliche Publikationen mit indirektem Bezug zur vorliegenden Dissertation

Nachfolgend gelistete wissenschaftliche Publikationen (peer reviewed) des Autors stehen im indirekten Zusammenhang zur vorliegenden Dissertation. Die publizierten Ergebnisse bzw. Erkenntnisse wurden hierbei teilweise auf Grundlage der im Rahmen der vorliegenden Dissertation erarbeiteten Methoden und Erkenntnisse generiert. Hierbei wurden u.a. die Erkenntnisse zu Prozess- Formulierungs- molekulare Wechselwirkungs-Eigenschaftsbeziehungen auf alternative Biopolymere und/oder alternative Verarbeitungsprozesse (z.B. thermoplastische Verarbeitung) übertragen. Die Auflistung erfolgt chronologisch nach dem Publikationsdatum (alt nach neu).

1. **SCHMID, M.**, HAMMANN, F. & WINKLER, H. 2014. Technofunctional Properties of Films Made From Ethylene Vinyl Acetate/Whey Protein Isolate Compounds. *Packaging Technology and Science*, 27, 521-533.
2. JOST, V., KOBSIK, K., **SCHMID, M.** & NOLLER, K. 2014. Influence of plasticiser on the barrier, mechanical and grease resistance properties of alginate cast films. *Carbohydrate Polymers*, 110, 309-319.

3. **SCHMID, M.**, MÜLLER, K., SÄNGERLAUB, S., STÄBLER, A., STARCK, V., ECKER, F. & NOLLER, K. 2014. Mechanical and barrier properties of thermoplastic whey protein isolate/ethylene vinyl acetate blends. *Journal of Applied Polymer Science*, 131.
4. CINELLI, P., **SCHMID, M.**, BUGNICOURT, E., WILDNER, J., BAZZICHI, A., ANGUILLES, I. & LAZZERI, A. 2014. Whey protein layer applied on biodegradable packaging film to improve barrier properties while maintaining biodegradability. *Polymer Degradation and Stability*, 108, 151-157.
5. GOFFERJE, G., **SCHMID, M.** & STÄBLER, A. 2015. Characterization of *Jatropha curcas* L. protein cast films with respect to packaging relevant properties. *International Journal of Polymer Science*, 2015, 9.
6. WINKLER, H., VORWERG, W. & **SCHMID, M.** 2015. Synthesis of Hydrophobic Whey Protein Isolate by Acylation with Fatty Acids. *European Polymer Journal*, 62, 10-18.
7. **SCHMID, M.**, EIB, S. & REINELT, M. 2015. Modeling, Simulation and Experimental Validation of Drying and Denaturation Behavior of Whey Protein Isolate Based Coatings. *Drying Technology*, 33, 1382-1395.
8. **SCHMID, M.**, HERBST, C., MÜLLER, K., STÄBLER, A., SCHLEMMER, D., COLTELLI, M.-B. & LAZZERI, A. 2016. Effect of Potato Pulp Filler on the Mechanical Properties and Water Vapour Transmission Rate of Thermoplastic WPI/PBS Blends. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55, 510-517.
9. CINELLI, P., **SCHMID, M.**, BUGNICOURT, E., COLTELLI, M. B. & LAZZERI, A. 2016. Recyclability of PET/WPI/PE Multilayer Films by Removal of Whey Protein Isolate based Coatings with Enzymatic Detergents. *Materials*, 9, 473.
10. BUGNICOURT, E., **SCHMID, M.**, KAINZ, D. M., LAFORTUNE, P., RODRIGUEZ-TURIENZO, L. & CINELLI, P. 2016. Simulation and experimental validation of the denaturation of a whey protein-based coating during convection and/or infrared drying on a plastic film and influence on its oxygen barrier properties. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 55, 1503-1511.
11. **SCHMID, M.**, PRINZ, T. K., STÄBLER, A. & SÄNGERLAUB, S. 2017. Effect of Sodium Sulfite, Sodium Dodecyl Sulfate, and Urea on the Molecular Interactions and Properties of Whey Protein Isolate-Based Films. *Frontiers in Chemistry*, 4.
12. MÜLLER, K., JESDINSZKI, M. & **SCHMID, M.** 2017. Modification of functional properties of whey protein isolate nanocomposite films and coatings with nanoclays. *Journal of Nanomaterials*, 2017, 10.

Konferenzbeiträge (Vorträge und Poster)

Nachfolgend werden lediglich die Beiträge des Autors auf Konferenzen, Workshops und Symposien gelistet, welche in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen und als Erstautor bzw. Vortragender gezeigt wurden.

Poster sind als „Poster“ gekennzeichnet. Die Auflistung erfolgt chronologisch nach dem Publikationsdatum (alt nach neu).

1. **SCHMID, M.**, et al. Whey coated plastic films to replace expensive polymers and increase recyclability, in GDL-Kongress Lebensmitteltechnologie 2009. 2009. Lemgo: Gesellschaft Deutscher Lebensmitteltechnologe e.V. (Poster)
2. **SCHMID, M.**, et al. Whey coated plastic films to replace expensive polymers and increase recyclability, in 12th Tappi European Place Conference, 18-20 May 2009, Hungary. 2009. Budapest: Tappi. (Poster)
3. **SCHMID, M.** Optimierung der Barriereigenschaften von Molkenproteinfilmen zur Anwendung in Lebensmittelverpackungen, in Anuga 2009. Köln: Das Fraunhofer Food Chain Management. Ein ganzheitlicher Ansatz für die Lebensmittelsicherheit.
4. **SCHMID, M.**, F. WILD, UND K. NOLLER, Optimierung der Barriereigenschaften von Molkenproteinfilmen zur Anwendung in Lebensmittelverpackungen, in GDL-Kongress Lebensmittel-technologie 2009: Lemgo.
5. **SCHMID, M.**, et al., Whey protein coated plastic films to improve barrier properties of food packaging materials, in Sonderschau "Nachhaltigkeit & Corporate Social Responsibility" – Intermopro 2010: Düsseldorf. (Poster)
6. **SCHMID, M.**, K. NOLLER, UND H.-C. LANGOWSKI. Verpackungsmaterialien mit einer Barriere-Schicht auf Basis von Molkenprotein, in Weihenstephaner Milchwirtschaftliche Herbsttagung 2011. 2011.
7. **SCHMID, M.**, et al. Nachhaltige Lebensmittelverpackungen – Aktuelles aus der Forschung zu Biopolymeren in Papier- und Folienanwendungen, in 3. Fachtagung Biopolymere in Folienanwendungen. 2011. Würzburg: SKZ / Innoform.
8. **SCHMID, M.** UND J. HELD. Thermoforming properties of whey protein barrier layers, in Europe-an Plastic Packaging Conference 2011 - ecoPackSystems. 2011. Düsseldorf: PETnology.
9. **SCHMID, M.** Biopolymer-based coating systems for food packaging applications, in Speciality Plastic Films 2011. 2011. Zürich.
10. **SCHMID, M.** Biopolymere als neue Barrierschichten zur Anwendung in Lebensmittelverpackungen, in Barrierefolien - Lösung für zeitgerechte Verpackungen. 2011. Würzburg.
11. **SCHMID, M.** Whey protein films as sustainable barrier material in thermoformed food packaging, in Thin Wall packaging 2011. 2011. Cologne (Köln); Germany.
12. **SCHMID, M.** Recent developments in sustainable film and paper applications, in ICE 2011 - INTERNATIONAL CONVERTING EXHIBITION. 2011. Freising, Germany.
13. **SCHMID, M.** Neuentwicklungen und Trends bei flexiblen Verpackungen - Biopolymere in Papier und Folienanwendungen, in 63. DFTA Fachtagung: Wandel im Umwelt- und Gesundheitsbewusstsein – Wo steht der Flexodruck. 2011. Kassel: DFTA - Deutschsprachiger Flexodruck Fachverband.
14. **SCHMID, M.**, et al. Properties of Whey-Protein-Coated Films and Laminates as Novel Sustainable Food Packaging Materials with Excellent Barrier Properties,

- in 5th international Symposium on Food Packaging. 2012. Berlin: ILSI Europe. (Poster)
15. **SCHMID, M.** New approaches for sustainable food packaging concepts, in Trends in Bioplastics, 2nd International Plastics Conference. 2012. Ljubljana, Slovenia: Slopak and National Institute of Chemistry, Ljubljana.
 16. **SCHMID, M.** Whey protein-based coatings as sustainable barrier material in food packaging applications, in IAPRI World Packaging Conference 2012. 2012. San Luis Obispo, California, USA: DEStech Publications, Inc.
 17. **SCHMID, M.** Whey protein films as sustainable barrier material in food packaging applications, in DLG Forum 18 "Packaging Technology". 2012. Cologne: DLG.
 18. **SCHMID, M.** Innovative biobasierte Werkstoffsysteme zur Anwendung in funktionsoptimierten Lebensmittelverpackungsmaterialien, in VVD Tagung 2012 - Verarbeitungsmaschinen und Verpackungstechnik. 2012. Dresden: TU Dresden.
 19. **SCHMID, M.** UND J. HELD, Whey protein-based barrier coatings in thermoformed food packaging applications, in NOVA-PACK 2012, Schotland Business Research: Arlington, Virginia, USA.
 20. **SCHMID, M.**, et al., Whey protein based barrier layers to enhance the barrier properties in polylactic acid films while maintaining biodegradability, in Bipoco 2012 an International Conference on Bio-Based Polymers and Composites 2012: Siofok, Hungary.
 21. **SCHMID, M.**, Innovative surface modifications for new sustainable food packaging systems to ensure the safety and quality of packaged foods, in 5th international Symposium on Food Packaging 2012, ILSI Europe: Berlin.
 22. **SCHMID, M.**, et al. Biopolymer-basierte Beschichtungen und Substrate. in Forum PackBox - Die Verpackung treibt es bunt, Partner. 2013. Nürnberg.
 23. **SCHMID, M.**, et al. Neue Ansätze für nachhaltige Verpackungskonzepte, in 11. Inno-Meeting; Mega-Trends der Folienbranche. 2013. Osnabrück: Innoform.
 24. **SCHMID, M.** UND V. JOST. Biopolymere aus Reststoffen der Lebensmittelproduktion für Papier- und Folienanwendungen. in Verpackungssymposium 2013. 2013. Kempten: ZLV, Hochschule Kempten.
 25. **SCHMID, M.** Innovative Verpackungsmaterialien, in Innovationstagung 2013 der Randen-kommission - Verpackungskonzepte für die Zukunft. 2013. Berlingen, Switzerland: IPI International Packaging Institute.
 26. **SCHMID, M.** Byproducts and sustainable packaging solutions using the example of whey protein-based barrier layers in food packaging materials, in 8. Cofresco Forum - Round Table - Packaging avoids food waste. 2013. Bremerhaven: Crossrelations brandworks GmbH.
 27. **SCHMID, M.** Barrierschichten auf Basis nachwachsender Rohstoffe zur Anwendung, in Lebensmittelverpackungen. in Freisinger Tage 2014 - Fokus Fleisch und Wurstwaren – Produkte, Verfahren und Verpackungen. 2014. Freising.

28. **SCHMID, M.** UND A. STÄBLER. Organic barrier materials for sustainable packaging: requirements and existing solutions, in Renewable Biomaterials for Paper and Board based Innovative and Smart Food Packaging. 2015. Lucca, Italy: LUCENSE SCpA, Polo Tecnologico Lucchese.
29. **SCHMID, M.**, et al. Permeability of Water Vapour, Nitrogen, Oxygen and Carbon Dioxide through Whey Protein Isolate Based Films and Coatings, in Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety. 2015. Erding / Munich: Elsevier. (Poster)
30. **SCHMID, M.**, et al. How Transglutaminase Cross-Linking Affects Packaging Related Properties of Whey Protein Isolate Based Coatings and Cast Films, in 27th IAPRI Symposium on Packaging 2015. 2015. Valencia. (Poster)
31. **SCHMID, M.**, et al. Effect of Storage Time Dependent Alteration on Molecular Interactions of Whey Protein Isolate Based Coatings, in Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety. 2015. Erding / Munich: Elsevier. (Poster)
32. **SCHMID, M.**, et al. How UV-irradiation Affects Packaging Related Properties of Whey Protein Isolate Based Coatings, in Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety. 2015. Erding / Munich: Elsevier. (Poster)
33. **SCHMID, M.**, F. HAMMANN, AND A. STÄBLER. Molecular interaction-response relationships of whey protein isolate based films and coatings, in Workshop on biopolymers from waste valorization. 2015. Pisa.
34. **SCHMID, M.**, F. HAMMANN, AND M. JESDINSZKI. Proteinbasierte Barrierefolien und –Beschichtungen, in Fachtagung: Barriere-Verbundfolien - Verbesserte Haltbarkeit von Lebensmitteln. 2015. Würzburg: SKZ / Innoform.
35. **SCHMID, M.**, F. HAMMANN, UND A. STÄBLER, Molecular interaction-response relationships of whey protein isolate based films and coatings, in Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety, H.-C. Langowski and A.A. Wani, Editors. 2015, Elsevier: Erding / Munich.
36. **SCHMID, M.** & NOLLER, K. Proteinbasierte Beschichtungen – aktuelle Lösungen und Herausforderungen. 41. Münchener Klebstoff- und Veredelungs-Symposium 2016, 18.10.2016 2016 München. MKVS.
37. **SCHMID, M.**, A. STÄBLER, AND S. SÄNGERLAUB. High Barrier Layers Made of Proteins from By-Products - Substitution of Fossil-Based Polymers. in Kooperationsforum Biopolymere 2016. Straubing, Germany. (Poster)
38. **SCHMID, M.** Nanoscale surface modification of biopolymer based food packaging systems by chemical grafting and physical vapour deposition. NANOTEC 2016 - International Conference on Nanotechnology Applications, 2016 Valencia, Spain.
39. **SCHMID, M.** & A. STÄBLER, ThermoWhey - The material development. ThermoWhey Demo Session - Whey protein based barrier coatings with enhanced thermoformability and agglomerated formulations for a range of packaging applications, 22.11.2016 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

40. **SCHMID, M.** Thermoformbare und recyclingfähige Verbundfolien mit Molkenprotein-basierter Barrierschicht. Freisinger Tage - Lebensmittelverpackung im Kreislauf, 21.-22.02.2017 2017 Freising. Industrievereinigung für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e.V. IVLV.

Patente

1. **SCHMID, M.**, NOLLER, K., WILD, F. & BUGNICOURT, E. 2013. Whey Protein Coated Films. PCT/IB2011/053271.
2. STÄBLER, A. & **SCHMID, M.** 2016. Thermoformbarer Mehrschichtverbund sowie proteinbasierte Formulierung zum Erhalt einer thermoformbaren Schicht mit Sauerstoffbarriere im Verbund. Deutschland, patent application 10 2016 108 214.7.

Buchbeitrag

1. SHAH, M.A., **SCHMID, M.**, AGGARWAL, A., AND WANI A.A., Testing and Quality Assurance of Bioplastics, in Food Packaging Materials: Testing & Quality Assurance, P. Singh, A.A. Wani, and H.-C. Langowski, Editors. 2017, CRC Press: Boca Raton.

Anhang III: Lebenslauf

Zur Person

Markus Schmid
* 14. Juli 1980 in Freudenstadt
verheiratet, eine Tochter

Akademische Laufbahn / Studium

- Seit 04/2009: *Wissenschaftlicher Mitarbeiter*
Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung
IVV Freising, Abteilung Materialentwicklung
seit 04/2011 zu je 50% beschäftigt bei Fraunhofer IVV
und TU München - Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik
- Seit 04/2011: *Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit*
Lehrstuhl für Lebensmittelverpackungstechnik
(Prof. Dr. H.-C. Langowski)
Fakultät WZW der TU München
- 10/2007 – 03/2009: Studium - *M. Sc.*
Studiengang Food Processing
Hochschule Fulda
Masterarbeit am Fraunhofer IVV
auf dem Gebiet der Materialentwicklung
- 09/2003 – 09/2007 Studium - *Dipl.-Ing. (FH)*
Studiengang Lebensmitteltechnologie
Vertiefung: Betriebswirtschaftslehre
Hochschule Fulda
Diplomarbeit bei der Unilever Deutschland GmbH
auf dem Gebiet der Lebensmitteltrocknungstechnik

Nebenberufliche, freiberufliche Tätigkeiten

- Seit 04/2008: Inhaber von *Food Innovations* –
Ingenieurbüro für Lebensmittel- und Verpackungstechnik
Tätigkeitsschwerpunkt: Beratung von Unternehmen der
Lebensmittel- und Lebensmittelverpackungswirtschaft
- Seit 2011/15: *Fachdozent* für Lebensmittelverpackungstechnologie
International Packaging Institute (IPI) Schaffhausen,
Deutsches Verpackungsinstitut (dvi) Berlin, Behr's Verlag
Hamburg und Innoform Coaching Osnabrück
- Seit 2011/13/15: *Lehrbeauftragter*
Hochschulen Fulda, Osnabrück, Kempten und UPC
Barcelona

Berufliche Aus- und Fortbildungen

- 01/2002 – 05/2002: *Betriebswirt des Handwerks*
Abgeschlossene Fortbildung
Gewerbeakademie Reutlingen
- 10/2001 – 12/2001: *Fleischermeister und Ausbildereignungsprüfung*
Abgeschlossene Fortbildung
1. Bayerische Fleischerschule Landshut / Handwerks-
kammer Niederbayern / Oberpfalz
- 09/1997 – 02/2000: *Fleischer*
Abgeschlossene Ausbildung
Metzgerei Kohler, Wittlensweiler (Abschluss als
Innungsbester und Kammersieger der Handwerkskammer
Reutlingen)

Mitgliedschaften

- Mitgliedschaften:
- Berufenes Mitglied im Editorial Board der wissenschaftlichen Fachzeitschrift „Food Packaging and Shelf Life“. Verlag: Elsevier
- Berufenes Mitglied im Editorial Board der wissenschaftlichen Fachzeitschrift „Frontiers in Chemistry“ Sektion „Polymer Chemistry“. Verlag: Frontiers
- Berufenes Mitglied im Editorial Board der wissenschaftlichen Fachzeitschrift „International Journal of Polymer Science“. Verlag: Hindawi
- Mitglied im Bund deutscher Verpackungswissenschaftler
- Mitglied in der Gesellschaft deutscher Lebensmitteltechnologien