

**Charakterisierung und Optimierung von Polythiolen für  
Klebstoffanwendungen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Martin Diekmann**  
aus Düsseldorf

Düsseldorf, November 2023

aus dem Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. Laura Hartmann

2. Prof. Dr. Constantin Czekelius

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2024



Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Makromolekulare Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Kooperation mit der Henkel AG & Co KGaA und dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB Institutsteil Straubing sowie dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP, unter Förderung durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, angefertigt.

Referent: Prof. Dr. Laura Hartmann

Institut für Makromolekulare Chemie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Mentor: Prof. Dr. Constantin Czekelius

Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

# Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Diese Dissertation wurde weder in der vorliegenden noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht, noch wurden bisher anderweitige Promotionsversuche meinerseits unternommen.

---

Name

---

Ort, Datum

# Kurzzusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polythiole charakterisiert und hinsichtlich ihrer Eignung für die Anwendung in Klebstoffsystemen untersucht. Teilweise wurden diese Polythiole synthetisiert, teilweise wurde auf Polythiole aus nachwachsenden Quellen zurückgegriffen. Die betrachteten Polythiole lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zum einen wurde hydrolysiertes Federkeratin untersucht, zum anderen 1,2-Dithiolane.

Die betrachteten hydrolysierten Keratin-Peptide (KHPs) entstanden im Zuge eines gemeinsamen FNR-Projekts in wirksamer Zusammenarbeit mit Fraunhofer IGB. Die Entwicklung der Keratin-Hydrolyse durch Fraunhofer IGB, aus welcher die in dieser Arbeit eingesetzten KHPs entstammen, wurde dabei durch gezielte Analytik im Rahmen dieser Arbeit unterstützt – eine detaillierte Beschreibung des Hydrolyseprozesses, sowie der beigesteuerten Analytik ist in Kapitel IV zu finden.

In erster Linie setzt diese Arbeit jedoch nach Erhalt der KHPs ein. Bei diesen handelte es sich um eine gänzlich neue, nicht-charakterisierte Ressource. Deshalb wurden zunächst grundlegende Eigenschaften untersucht. Eine Peptidsequenzierung wurde durchgeführt bei welcher festgestellt wurde, dass die KHPs zwar aus einer Vielzahl unterschiedlicher Peptide bestehen, jedoch ein aus elf Aminosäuren bestehendes, polythioles Peptid bis zu ca. der Hälfte der Peptide ausmacht und ca. 60 % der KHPs Polythiole sind (vgl. Kap. V.1). Als Produkt der Hydrolyse eines Naturstoffes unterliegen diese Werte jedoch bei unterschiedlichen Chargen einer gewissen Schwankung.

Ein Raman-Messprotokoll wurde entwickelt welches es schafft, der starken Untergrundfluoreszenz der Keratin-Peptide zum Trotz, aussagekräftige Raman-Analytik durchzuführen. Daraufhin wurden die KHPs umfangreich spektroskopisch charakterisiert und mit den Hühnerfedern, aus welchen sie hydrolysiert wurden, verglichen. Besonderer Fokus wurde dabei darauf gelegt die Oxidationsstufe der im Keratin präsenten Cysteine ermitteln zu können (vgl. Kap. V.2).

Außerdem wurden die Peptide auf ihre Befähigung zur Filmbildung untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die KHPs wie sie erhalten wurden nicht in der Lage waren Filme zu ziehen. Auch bei Zugabe großer Mengen von Koaleszenzmitteln. Als Grund hierfür

konnte der Phosphatanteil von ca. 15 % (w/w), welcher aus dem Hydrolyseprozess zurückblieb, ermittelt werden. Daher wurde eine Entsalzungsmethode für die Peptide entwickelt; hierbei erwies sich das Suspendieren in Methanol mit anschließender Filtration und Einengen des Filtrats als effektivste Methode. Nach der Entsalzung der KHPs konnte eine starke Verbesserung der Filmbildungseigenschaften gezeigt werden (vgl. Kap. V.3 bis V.5).

Im Keratin liegen die Thiole in ihrer oxidierten Form, als Disulfide, vor. Um das volle Potential der Peptide nutzbar zu machen war es daher notwendig eine Methode zur Reduktion zu entwickeln. Hierfür stellte sich das phosphin-basierte TCEP als beste Wahl heraus. Dieses führt zu einer vollständigen Reduktion der Disulfide zu den korrespondierenden Thiolen. Dies konnte mittels Raman-Spektroskopie, sowie HPLC-Thiol-Messungen gezeigt werden. Im Anschluss wurde die Filmbildung mit einhergehender Reoxidation der Peptide, sowohl mit sich selbst, als auch mit einem anderen Polythiol durchgeführt und charakterisiert (vgl. Kap. V.6 bis V.8).

Insgesamt konnte eine grundlegende Charakterisierung der KHPs, sowie Anwendungstests durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die selektive und vollständige Reduktion zum Thiol und die anschließende gezielte Reoxidation möglich sind. Durch die Arbeiten zur Entsalzung konnte außerdem zur Verbesserung des Hydrolyseprozesses beigetragen werden indem dieser auf ein anderes Puffersystem umgestellt wurde.

Neben den KHPs wurden zudem zwei 1,2-Dithiolane auf ihre Eignung für Klebstoffsysteme untersucht. 1,2-Dithiolane sind Fünfringe mit einer internen Disulfidbindung.

(1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol (DT) konnte erfolgreich synthetisiert werden, wobei die bereits berichtete Synthese stark verbessert werden konnte. Eine grundlegende spektroskopische Charakterisierung wurde durchgeführt (vgl. Kap. V.9).

Im Anschluss wurde DT für die Synthese von Polyurethanen eingesetzt um eine darüber ablaufende Vernetzung zu ermöglichen. Zwar konnten erste qualitative Tests eine Vergelung der DT-PU's durch Hitzeeinwirkung und durch Umsetzung mit Allyl- und Vinylether-PU's zeigen, doch konnte diese bei rheometrischen Messungen nicht reproduziert werden. Da DT durch den Thorpe-Ingold-Effekt eine starke Neigung zur Ausbildung des intramolekularen Disulfids zeigte wurde als Alternative für die

Vernetzung von PUs durch 1,2-Dithiolane die Liponsäure herangezogen. Diese bot neben ihrer Verfügbarkeit aus nachwachsenden Quellen den Vorteil nicht dem Thorpe-Ingold-Effekt zu unterliegen, was in einem Experiment zu ihrem Verhalten in Disulfidaustauschreaktionen gezeigt werden konnte. Deshalb wurde die Säure als Endgruppenreagenz für Polyurethane genutzt und es konnte gezeigt werden, dass diese in der Lage ist über die 1,2-Dithiolan-Endgruppen eine Vernetzung zu erzeugen. Somit konnte Liponsäure als spannende Verbindung für die Vernetzung von Polymersystemen identifiziert werden (vgl. Kap. V.10).

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung .....	v
Zusammenfassung .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abkürzungsverzeichnis.....	1
I. Motivation.....	2
II. Zielsetzung.....	4
III. Kenntnisstand .....	5
III.1 Federn und Keratin.....	5
III.1.1 Struktur von Keratin.....	5
III.1.2 Raman-Spektroskopie für die Analytik von Keratin .....	11
III.2 Keratinaufschluss .....	11
III.2.1 Reduktionsmethode.....	13
III.2.2 Ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösemittel .....	16
III.2.3 Physikalische Explosion .....	17
III.2.4 Mikrobielle und enzymatische Methoden .....	18
III.2.5 Weitere Methoden .....	19
III.2.6 Eignung der verschiedenen Methoden für das KERAbond-Projekt.....	19
III.3 Chemie der Thiole und Disulfide .....	22
III.3.1 Thiole .....	23
III.3.2 Disulfide.....	27
III.4 Raman-Spektroskopie .....	29
III.4.2 Theoretische Grundlagen.....	30
III.4.3 Raman-Spektroskopie im Vergleich mit IR-Spektroskopie.....	33
IV Erweiterter Kenntnisstand: der KERAbond-Hydrolyseprozess .....	36
V. Ergebnisse und Diskussion.....	44
V.1 KHP-Löslichkeit und -sequenzierung.....	44

V.2 Raman-Analyse der KHPs .....	48
V.3 Anwendungstests - Filmbildungsexperimente.....	57
V.4 Entsalzung der KHPs.....	60
V.5 Filmbildungsexperimente mit MeOH-KHPs.....	68
V.6 KHP-Reduktion .....	73
V.7 Filmbildungsexperimente mit reduzierten MeOH-KHPs.....	77
V.8 r-MeOH-KHP-Filme mit petrochemischem Thiol-Härter .....	84
V.9 Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol .....	86
V.10 Dithiolan-Anwendungstests.....	90
VI. Zusammenfassung.....	104
VII. Ausblick.....	108
VIII. Experimentalteil.....	111
VIII.1 Verwendete Geräte und Chemikalien.....	111
VIII.2 alkoholische Extraktion der KHP .....	114
VIII.3 Chemische Reaktionen .....	114
Dithiolan-Synthesen .....	115
IX. Literaturverzeichnis.....	119
X. Anhang.....	130
XI. Danksagung .....	175

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ATG	Ammoniumthioglycolat
CFK	Chicken Feather Keratin
DES	Deep Eutectic Solvent
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DT	1,2-Dithiolan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IC	Ionenchromatographie
IR-Spektroskopie	Infrarotspektroskopie
KHPs	Keratinhydrolyseproteine
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>p</i> TSA	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFA	Röntgenfluoreszenzanalyse
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TC1300	Thiocure ETTMP 1300
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur
TGA	Thermo Gravimetric Analysis

# I. Motivation

Das stetige Voranschreiten des Klimawandels und die daraus resultierenden Folgen für Umwelt und Menschheit machen ein zügiges Handeln unabdingbar. Dieses Bewusstsein hat sich bis heute mehr und mehr in den Köpfen der Menschen verbreitet. Schritte wurden unternommen um den Klimawandel einzudämmen und zu bekämpfen. So wurde 2015 das Pariser Klimaabkommen geschlossen, in welchem sich zum damaligen Zeitpunkt 195 Nationen verpflichteten, Maßnahmen zum Erhalt der Natur zu folgen und die Erderwärmung unter 2 °C zu halten.<sup>[1]</sup> Am 11. Dezember 2019 stellte die EU-Kommission den *European Green Deal* vor. Dieser hat sich ein klimaneutrales Europa bis zum Jahr 2050 als Ziel gesetzt und dafür, neben vielen anderen Bereichen, die Forschung in Milliardenhöhe subventioniert.<sup>[2]</sup>

Die Stellschrauben, an denen gedreht werden kann, um eine nachhaltigere Gesellschaft zu schaffen, sind zahlreich. Von energieeffizienteren Autos und der Abkehr von klassischen Verbrennungsmotoren, über das Vermeiden von Plastikmüll und verstärkte Bemühungen beim Recycling,<sup>[3-5]</sup> bis zu dem Essen auf unseren Tellern. Lokal produzierte Lebensmittel steigen in ihrer Beliebtheit im gleichen Maße an, wie das Bewusstsein in der Bevölkerung. Doch auch die Verkürzung bzw. Vermeidung von Transportstrecken stellt nur einen Teil der Lösung dar. Insbesondere die industrialisierte Massentierhaltung, welche uns einen kostengünstigen Konsum von Fleisch ermöglicht, sieht sich mit einer Reihe von ökologischen Herausforderungen konfrontiert.<sup>[6]</sup> Eines dieser Probleme ist das Anfallen von Abfällen, welche nicht verwertet werden können.<sup>[7]</sup>

Einer dieser Abfälle ist das Protein Keratin. Durch die global betriebene Massentierhaltung ist Keratin eines der häufigsten Biopolymere. Jährlich fallen global ca. 2,5 Mio. Tonnen Wolle<sup>[8-10]</sup> und bis zu 65 Mio. Tonnen Federn an.<sup>[11, 12]</sup> Bei einer angenommenen Dichte von etwa 50 g/L für Federn<sup>[13]</sup> bedeutet dies, dass jährlich 1170 Federnhaufen der Größe des Eiffelturms errichtet werden könnten. Insbesondere jene Federn, welche durch die Haltung von Hühnern, Truthähnen, Gänsen und anderem Geflügel anfallen, sind bis jetzt nicht gut verwertbar und werden zum überwiegenden Teil als Abfall verbrannt oder vergraben.<sup>[11, 12]</sup> Neben dem enormen wirtschaftlichen Potential, welches in der Verwertung einer solch großen Menge an kostengünstig verfügbarem

## I. Motivation

Material liegt, machen es ökologische Zwänge, wie der Klimawandel, in Zukunft lohnenswert, Möglichkeiten zu finden, Keratine als Ressource für industrielle Prozesse zu erschließen.

Den Hauptgrund für die geringe bisherige Verwertung von Keratin stellt die schlechte Verfügbarkeit des Proteins als lösliche bzw. gelöste und reaktive Ressource dar.<sup>[7]</sup> Keratin ist ein Strukturprotein und weist als solches einen hohen Grad an intra- und intermolekularer Vernetzung durch Disulfide auf wodurch es nur schlecht durch klassische organische Lösemittel, oder Wasser, in Lösung gebracht werden kann.<sup>[7]</sup> Gelingt es jedoch das Protein zu lösen und die Disulfide zu spalten, eröffnen sich eine Vielzahl neuer Nutzungsmöglichkeit für die Chemie.

Das KERAbond-Projekt, welches in Kooperation der Henkel AG & Co. KGaA mit Fraunhofer IGB, unter Förderung des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft, ins Leben gerufen wurde, hat sich eben dies zum Ziel gesetzt. Im Projekt sollen durch Hydrolyse und Reduktion von Keratin so genannte Keratinhydrolyseproteine (KHPs) erzeugt und auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht werden. Die Reduktion, sowie die Charakterisierung der erhaltenen Peptide und die Untersuchung auf ihre Anwendungsmöglichkeiten sind, neben anderen Dingen, Bestandteil dieser Arbeit.

Allgemein werden in der vorliegenden Arbeit Polythiole untersucht und zum Teil synthetisiert. Neben den benannten KHPs, die grundlegend charakterisiert, modifiziert und auf Ihre Eignung zum Ersatz klassischer, erdölbasierter Polythiole untersucht wurden, stehen auch 1,2-Dithiolane im Fokus. Diese sind Fünfringe mit einer intramolekularen Disulfidbindung. Durch den Einsatz von 1,2-Dithiolanen lassen sich potentiell Polyurethan-Polythiole darstellen – auch dies wird behandelt.

## II. Zielsetzung

Wie in der Einleitung beschrieben, ist diese Arbeit im Kontext des durch das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft geförderten Projekts KERAbond angefertigt worden. Das KERAbond-Projekt beschäftigt sich mit der Wertschöpfung aus dem Keratin von Hühnerfedern. Um einen Beitrag zum Wandel hin zu einer nachhaltigen Gesellschaft zu leisten, wurden als Quelle Hühnerfederabfälle aus der Geflügelindustrie eingesetzt.

Ziel der Arbeit ist, ausgehend von den Keratinhydrolyseproteinen (KHPs), welche durch den KERAbond-Hydrolyseprozess zur Verfügung stehen und eine bis dato unbekannte Ressource sind, eine grundlegende Charakterisierung, sowie eine Untersuchung auf ihre Anwendbarkeit durchzuführen. Teil der Charakterisierung, ist die Etablierung einer Raman-Methode zur spektroskopischen Untersuchung, insbesondere des Oxidationszustandes der Cysteine. Zudem ist es auch Ziel dieser Arbeit die KHPs auf ihre Fähigkeit zur Filmbildung hin zu untersuchen. Dabei können sowohl reine KHP-Filme, als auch Filme mit weiteren Komponenten betrachtet werden.

Da die Cysteine im Keratin als verbrückende Cystine vorliegen soll zum Erhalt freier Thiole eine Reduktion vorgenommen werden. Dabei soll die Reduktion nach Möglichkeit vollständig sein und selektiv zum Thiol führen.

Neben den Zielen die durch die Zusammenarbeit im KERAbond-Projekt zustande kommen ist es ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeit (biobasierte) Polythiole auf ihren Nutzen für Klebstoffsysteme zu untersuchen. Dazu sollen entweder biobasierte, oder selbst synthetisierte 1,2-Dithiolane genutzt werden. Diese sollen in Polyurethanen eingesetzt und für Vernetzungsreaktionen genutzt werden. Dabei ist es möglich, dass die reduzierte Dithiol-Form oder die oxidierte Disulfid-Form des Dithiolans genutzt wird.

## III. Kenntnisstand

### III.1 Federn und Keratin

Keratin ist ein von Tieren gebildetes Strukturprotein.<sup>[14]</sup> Es existieren zwei Ausprägungen des Keratins: das  $\alpha$ -Keratin welches in Haaren, Wolle, Nägeln, Hufen, Hörnern und den Krallen von Säugetieren gefunden wird, sowie  $\beta$ -Keratin welches strukturgebend für die Schuppen und Krallen von Echsen sowie Vogelfedern ist.<sup>[7]</sup> Keratin, insbesondere die  $\beta$ -Variante, ist strukturell eng mit den Spinnenseidenproteinen verwandt. Auf Grund der Relevanz für diese Arbeit wird im Folgenden ein besonderer Fokus auf Federkeratine gelegt.

#### III.1.1 Struktur von Keratin

Aus der Struktur von Proteinen lassen sich eine Vielzahl von Eigenschaften ableiten. So sind die charakteristischen Eigenschaften des Keratins, seine chemische Resistenz und geringe Löslichkeit in Wasser und herkömmlichen organischen Lösemitteln, auf sein prägendes Strukturmerkmal – den hohen Cystein-Anteil und die daraus resultierenden intra- und intermolekularen Disulfidbrücken – zurückzuführen.<sup>[7]</sup> Die Strukturen verschiedener Keratinsorten variieren, doch allgemein befindet sich das Gros der Cysteine und somit der Disulfidbrücken im amorphen Bereich des Proteins. In Abbildung III.1-1 wird dies an Hand der Sequenzen von Federkeratin 1 (CFK1) gezeigt. Daraus wird erkenntlich, dass fünf der acht Cysteine in der 98 Aminosäuren langen Sequenz im ersten, 23 Aminosäuren langen Abschnitt zu finden sind.<sup>[15]</sup>

Neben den Disulfidbrücken wirken auch Wasserstoffbrücken, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen, sowie ein hoher Grad an Kristallinität stabilisierend auf das Keratin.<sup>[7]</sup> Der kristalline Anteil des Keratins etwa in Federn beträgt bis zu 63 %.<sup>[16]</sup>

Eine Betrachtung der Struktur von Keratin erfordert die Differenzierung von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Keratin. Während beide Formen einige strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich in ihrer Sekundärstruktur und der Anordnung der wichtigsten Aminosäuren. Diese Unterschiede und die daraus resultierenden Unterschiede in den Materialeigenschaften sorgen dafür, dass die verschiedenen Keratin-Varianten in

### III. Kenntnisstand

unterschiedlichen Tierspezies und an verschiedenen Stellen zu finden sind, da sie jeweils spezifische strukturelle Aufgaben erfüllen.<sup>[17]</sup>

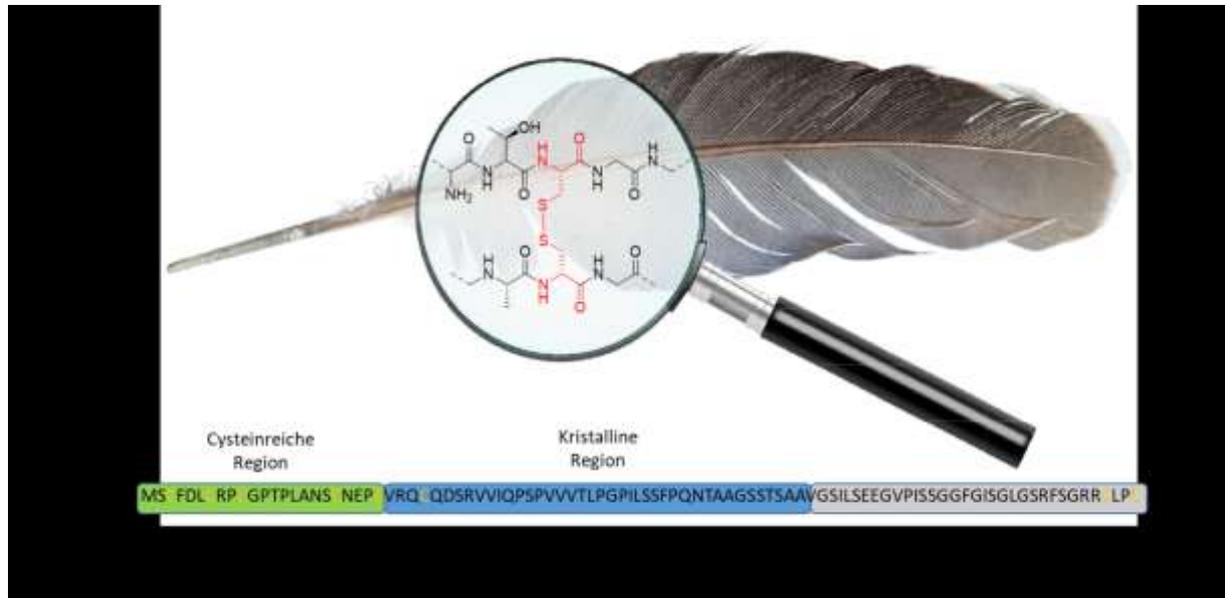


Abbildung III.1-1: Darstellung einer Feder mit den zugehörigen Disulfidbrücken des Keratins. Darunter abgebildet ist die Aminosäuresequenz von CKF1. Unterschiedliche Bereiche in der Peptidsequenz sind farblich hervorgehoben. Cysteine sind orange dargestellt.

Für ein vollständiges Verständnis der strukturellen Unterschiede des Keratins ist es wichtig zu wissen, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Keratin zwar einen gemeinsamen Vorfahren haben, sich aber unabhängig voneinander entwickelten um den Bedürfnissen der verschiedenen Tiergruppen gerecht zu werden. Die spezifischen strukturellen Anpassungen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Keratin ermöglichen es ihnen, den mechanischen Belastungen standzuhalten, die mit ihren jeweiligen Funktionen verbunden sind. So muss etwa der Schnabel eines Spechts höheren Kräften widerstehen können als ein menschliches Haar, welches dafür eine größere Flexibilität aufweisen muss um eine wärmende Schicht über der Haut zu bilden.<sup>[17-19]</sup>

#### **III.1.1.1 Strukturelle Unterschiede von $\alpha$ - und $\beta$ -Keratin**

$\alpha$ -Keratin kommt vorwiegend bei Säugetieren, einschließlich des Menschen, vor. Dort ist es Hauptbestandteil von Haaren, Haut und Nägeln. Der Name  $\alpha$ -Keratin leitet sich von seiner überwiegend  $\alpha$ -helikalen Struktur ab.  $\alpha$ -Helices sind gewundene Strukturen, in denen sich die Polypeptidkette um sich selbst dreht, stabilisiert durch Wasserstoffbrücken.<sup>[20]</sup>

### III. Kenntnisstand

Die  $\alpha$ -helikale Struktur des  $\alpha$ -Keratins ergibt sich aus der repetitiven Aminosäuresequenz. Diese Sequenz enthält häufig einen hohen Anteil an Glycin- und Alaninresten, die eine enge Packung der Helix ermöglichen. Die helikalen Segmente sind durch als Coil-Segmente bezeichnete, nicht-helikale Bereiche verbunden. Diese Segmente verleihen dem Protein Flexibilität und ermöglichen es ihm, mechanischen Belastungen standzuhalten. Die einzelnen  $\alpha$ -Helices fügen sich zu sogenannten Protofilamenten zusammen, welche sich wiederum zu Intermediärfilamenten anordnen. Die Intermediärfilamente werden gebündelt und bilden ein starkes und elastisches Netzwerk, das dem Gewebe strukturelle Unterstützung bietet. In Abbildung III.1-2 ist die Anordnung der  $\alpha$ -Keratin-Strukturelemente dargestellt.<sup>[7, 17, 19]</sup>

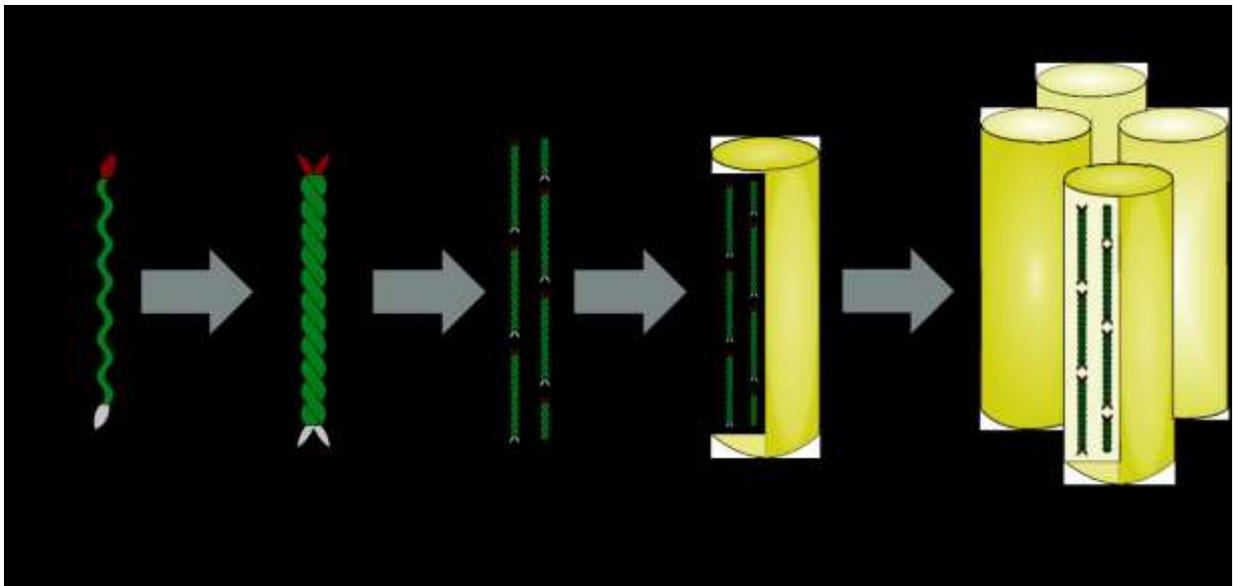


Abbildung III.1-2: Anordnung der  $\alpha$ -Keratin-Helices zu Protofilamenten, sowie deren Anordnung innerhalb der Intermediärfilamente.

Während das  $\alpha$ -Keratin überwiegend von Säugetieren gebildet wird, kommt  $\beta$ -Keratin hauptsächlich bei Reptilien, Vögeln und einigen anderen Wirbeltieren vor. Es ist das wichtigste Strukturprotein in Federn, Schnäbeln, sowie Reptilien-Schuppen und -Krallen.<sup>[17]</sup>

Analog zum  $\alpha$ -Keratin erhält auch das  $\beta$ -Keratin seinen Namen von seinem dominierenden Strukturmotiv – dem  $\beta$ -Faltblatt.  $\beta$ -Keratin hat im Vergleich zu  $\alpha$ -Keratin eine ausgedehntere und mehrschichtige Struktur. Die  $\beta$ -Faltblätter stapeln sich übereinander und bilden eine starre Anordnung. Die starre Anordnung der Faltblätter, sowie die Verbrückung der einzelnen Schichten durch Disulfide übersetzt sich in eine

### III. Kenntnisstand

hohe Steifigkeit und Biegefestigkeit des  $\beta$ -Keratins wodurch es hervorragend für harte Körperteile wie Schnäbel, Hufe oder Nägel geeignet ist.<sup>[7, 17, 19]</sup>

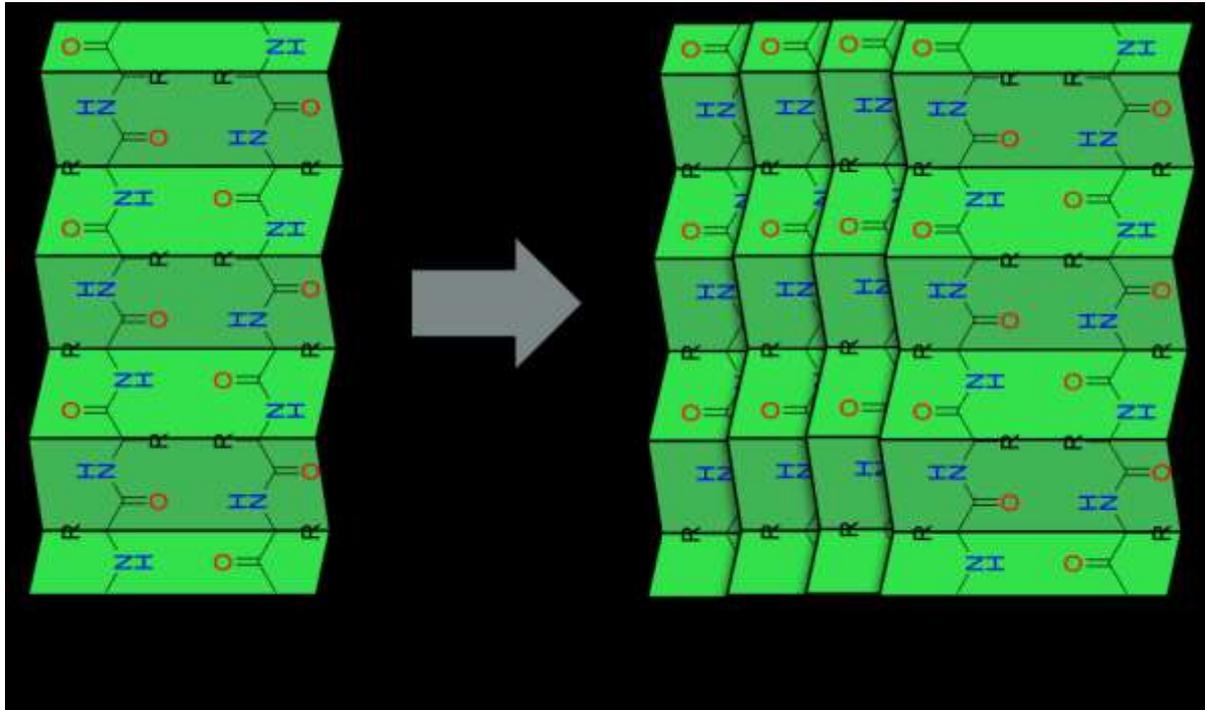


Abbildung III.1-3: Struktur des  $\beta$ -Keratins. Die Aminosäuren richten sich in einer  $\beta$ -Faltblattstruktur aus, die Falblätter werden dann übereinandergestapelt und durch Wasserstoff- sowie Disulfidbrücken stabilisiert.

Eine Ausprägung des  $\beta$ -Keratins ist das Federkeratin. Es unterscheidet sich von anderen Keratinen bspw. in der Aminosäurezusammensetzung, sowie der Organisation der Peptidstränge innerhalb der Federstruktur. Die strukturellen Besonderheiten des Federkeratins werden im folgenden Unterkapitel genauer ausgeführt.

#### **III.1.1.2 Federkeratin und der Aufbau einer Feder**

Federkeratin hat einen hohen Gehalt an Cysteinen, welche sich zu Cystinen zusammenfinden. Die hohe Zahl an Disulfidbrücken sorgt für die Ausbildung von starren und stabilen Strukturen in den Federn, welche für die Anforderungen, die an Federn gestellt werden unerlässlich sind.<sup>[17, 21]</sup>

Auch wenn Federkeratin zur Familie der  $\beta$ -Keratine gehört, weist es einige strukturelle Unterschiede zu anderen Formen von  $\beta$ -Keratinen auf, die bei Reptilien und anderen Wirbeltieren vorkommen. Je nach Federtyp weist Federkeratin unterschiedliche morphologische Variationen auf. So unterscheiden sich bspw. Konturfedern und Daunen in der Sequenz ihrer Keratine, sowie deren Organisation im Verbund. Trotz der

### III. Kenntnisstand

Variationen im Bereich der Federkeratine können einige Eigenschaften identifiziert werden, welche das Federkeratin von anderen  $\beta$ -Keratinen abgrenzen. Diese Eigenschaften sind die Anordnung der Faltblätter, Hydrophobie, Disulfidbrücken und die Überstruktur der Peptidketten.<sup>[17, 21]</sup>

Federkeratin hat eine charakteristische  $\beta$ -Faltblattstruktur. Die  $\beta$ -Faltblätter werden durch intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Peptidketten gebildet, wodurch eine planare, ausgedehnte Konformation entsteht. Im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Keratinen sind die Blätter des Federkeratins in einer nicht-gekräuselten, parallelen Anordnung gestapelt, was die Bildung von starren und elastischen Strukturen ermöglicht.<sup>[17]</sup>

Wie oben erwähnt weist Federkeratin eine relativ hohe Zahl von Cysteinen auf. So enthält das Federkeratin 1 des gemeinen Haushuhns etwa 8 Cysteineinheiten auf 96 Aminosäuren und das Federkeratin 3 auf die gleiche Anzahl Aminosäuren 6 Cysteineinheiten. Die daraus resultierenden interchenaren Disulfidbrücken sorgen durch die Vernetzung der einzelnen Peptidketten für eine hohe strukturelle Stabilität des Federkeratins. Das Proteinnetzwerk wird so besonders robust.

Dieser hohe Grad der Vernetzung einzelner Peptidstränge führt in Kombination mit einem hohen Anteil hydrophober Aminosäuren wie Isoleucin und Phenylalanin zu einer gesteigerten Hydrophobie.<sup>[22]</sup> Dies ist eine notwendige Eigenschaft für die Fähigkeit von Vögeln zu fliegen, da hierdurch vermieden wird, dass sich die Federn mit Wasser vollsaugen und so das Gewicht des Vogels erhöhen.

Final unterscheidet sich das Federkeratin durch die Anordnung und Packung der Keratinketten von anderen  $\beta$ -Keratinstrukturen. Die Keratinmoleküle in Federn sind dicht gepackt, richten sich parallel zueinander aus sodass sie fadenförmige Strukturen bilden. Diese spezielle Packungsanordnung verleiht den Federn Festigkeit, Elastizität sowie Widerstandskraft gegen mechanischen Kräfte während des Flugs.<sup>[17]</sup>

Diese strukturellen Unterschiede im Federkeratin, verglichen mit anderen Keratinen, sorgen für die einzigartigen Eigenschaften der Federn (Festigkeit mit gleichzeitiger Flexibilität, Wasserbeständigkeit) die es Vögeln ermöglichen zu fliegen.<sup>[23, 24]</sup>

### III. Kenntnisstand

Neben den molekularen Eigenschaften des Federkeratins ist jedoch auch der makroskopische Aufbau von Federn bemerkenswert. Dieser ist in Abbildung III.1-4 dargestellt.

Federn werden in den Kiel (*Scapus*) und die Fahne (*Vexillum*) unterteilt. Der Kiel ist das zentrale Element der Feder von welcher die Fahne abgeht. Er dient zur Befestigung der Feder am Körper des Vogels und zeichnet sich durch seine Stabilität aus. Die Fahne ist verhältnismäßig weicher und verformbarer, sodass sich die Feder an den Körper anschmiegen kann. Die Fahne wird weiter in die größere Innenfahne (*Vexillum interior*) und schmalere Außenfahne (*Vexillum exterior*) unterteilt. Der Kiel wiederum wird unterteilt in die Spule (*Calamus*), sowie den Schaft (*Rachis*) von welchem die Fahne abgeht.<sup>[25]</sup>

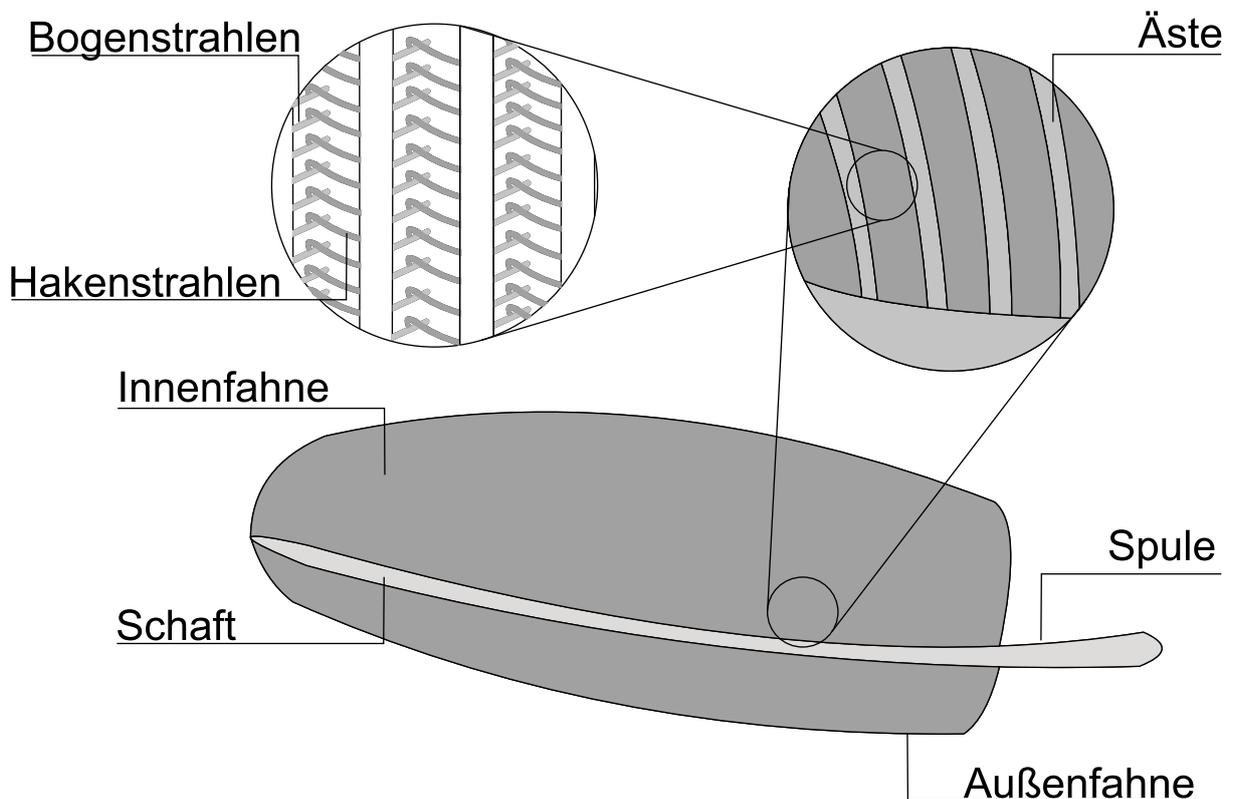


Abbildung III.1-4: Aufbau einer Feder. Unten ist die gesamte Feder dargestellt, bestehend aus Kiel und Fahnen. Oben rechts ist eine vergrößerte Darstellung der Federäste welche vom Kiel abgehen. Oben links findet sich eine weitere Vergrößerung welche die ineinandergreifenden Bogen- und Hakenstrahlen zeigt welche von den Ästen abgehen und für die Einheitlichkeit der Oberfläche der Feder sorgen.

Der Schaft trägt so genannte Federäste (*Barbae* oder *Rami*) welche zu beiden Seiten abgehen. Von den Ästen gehen wiederum zwei Typen von Strahlen ab. Die Bogenstrahlen (*Barbulae proximales*) und die Hakenstrahlen (*Barbulae distales*). Die beiden

### III. Kenntnisstand

Strahlentypen befinden sich auf den gegenüberliegenden Seiten der Äste, sodass die Haken der Hakenstrahlen sich um die Bogenstrahlen legen können. Durch diesen stark hierarchischen Aufbau der Federn wird ihnen Stabilität verliehen und sie können an verschiedene Anforderungen angepasst werden.<sup>[25]</sup>

#### **III.1.2 Raman-Spektroskopie für die Analytik von Keratin**

Die Raman-Spektroskopie stellt eine nicht destruktive Analytikmethode dar, die in der Lage ist, Informationen über die Struktur und die funktionellen Gruppen von Keratin zu liefern. Aus diesem Grund wurde sie in der Vergangenheit bereits vielseitig zur Analyse von Keratinen eingesetzt. Die Art des keratinhaltigen Materials ist dabei nicht entscheidend. Sowohl  $\alpha$ -Keratin-Materialien wie Haare, Wolle und Nägel<sup>[26-28]</sup> als auch  $\beta$ -Keratine in Horn, Hufen oder Federn können identifiziert werden.<sup>[29, 30]</sup> Insbesondere sticht die Raman-Spektroskopie für dieses Anwendungsfeld dadurch heraus, dass sie in der Lage ist, den Oxidationsstatus des Cysteins zu ermitteln und die Menge an Disulfiden oder Thiolen zu quantifizieren. Dadurch lässt sich der Erfolg einer Reduktion des Keratins leicht ermitteln.<sup>[27, 28]</sup>

### **III.2 Keratinaufschluss**

Als Ressource mit einem hohen Wertschöpfungspotential ist Keratin ein spannendes Protein. Sein Anfallen in großen Mengen ist jedoch nicht von Nutzen, solange es nicht industriell nutzbar gemacht werden kann. Daher wurden über die Jahre diverse Techniken entwickelt, bzw. untersucht, um Keratin aufzuschließen. Die Herangehensweisen variieren dabei recht stark, abhängig von der geplanten potentiellen Anwendung. Dieses Kapitel liefert einen knappen Überblick über verschiedene Aufschlussmethoden. Besonderer Fokus wurde dabei auf reduktive Aufschlüsse gelegt, da diese zu Materialien führen können, welche für diese Arbeit von Interesse sind.

Die geringe Löslichkeit und hohe Stabilität von Keratin erschweren den Aufschluss und somit den industriellen Einsatz. Da Keratin bereits vor längerer Zeit als vielversprechende Ressource erkannt wurde, sind in den vergangenen Jahrzehnten diverse Methoden und Ansätze entwickelt worden, um keratinhaltige Materialien verfügbar zu machen. Im Folgenden soll ein Überblick über die bestehenden Methoden, sowie ihre Anwendbarkeit für die Zwecke des KERAbond-Projekts geliefert werden.

### III. Kenntnisstand

Tabelle III.2-1: Überblick über die unterschiedlichen Aufschluss- und Vorbehandlungsmethoden von Keratin mit dazugehörigen Literaturstellen.

Methode	Übersicht	Literaturstelle
Reduktionsmethode	Bei der Reduktionsmethode werden reduzierende Reagenzien eingesetzt um die Disulfidbrücken des Keratins zu spalten. Dabei sollen überwiegend zwei freie Thiole gebildet werden, je nach eingesetztem Reduktionsmittel kann es jedoch auch zu Nebenprodukten wie Bunte-Salzen kommen.	<i>Goddard et al.</i> <sup>[31]</sup> <i>Wang et al.</i> <sup>[19]</sup> <i>Maclaren et al.</i> <sup>[32]</sup> <i>Poole et al.</i> <sup>[33]</sup> <i>Alahyaribeik et al.</i> <sup>[34]</sup>
Ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösemittel	Ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösemittel gelten im Allgemeinen als umweltverträglich. Es konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind Keratin aufzulösen.	<i>Fernández et al.</i> <sup>[35]</sup> <i>Jiang et al.</i> <sup>[36]</sup> <i>Nuutinen et al.</i> <sup>[37]</sup>
Physikalische Explosion	Keratin welches unter hohem Druck und hoher Temperatur mit Wasserdampf behandelt wurde welcher dann schnell relaxiert liegt anschließend in einer entwirrten Form mit gespaltenen Disulfidbrücken vor.	<i>Yu et al.</i> <sup>[38]</sup> <i>Zhao et al.</i> <sup>[39]</sup>
Mikrowellen-Aufschluss	Mikrowellenbestrahlung kann eine ähnliche Wirkung auf Keratin ausüben wie eine physikalische Explosion.	<i>Zoccola et al.</i> <sup>[40]</sup>
Mikrobielle und enzymatische Methoden	Als Naturstoff ist Keratin biologisch abbaubar. Organismen, welche Keratin verwerten können, werden als <i>keratinolytisch</i> bezeichnet. Diese Organismen bzw. ihre Enzyme könnten dabei helfen, Keratin verfügbar zu machen.	<i>Burt et al.</i> <sup>[41]</sup> <i>Lin et al.</i> <sup>[42]</sup> <i>Eslahi et al.</i> <sup>[43]</sup> <i>Offidani et al.</i> <sup>[44]</sup>
Oxidative Methode	Persäuren wurden bereits vor langer Zeit zum Aufschluss keratinhaltiger Materialien verwendet.	<i>Earland et al.</i> <sup>[45]</sup>
Alkalische Methode	Heiße alkalische Lösungen sind in der Lage Wollkeratin aufzulösen. Daher sind sie eine potentielle Option um Keratin aufzuschließen.	<i>Blackburn et al.</i> <sup>[46]</sup>

#### **III.2.1 Reduktionsmethode**

Die Idee der Reduktionsmethode ist es, die Disulfidbrücken, welche maßgeblich die Struktur des Keratins beeinflussen und seine schlechte Löslichkeit bedingen, durch reduktive Spaltung zu öffnen und so die Löslichkeit zu erhöhen. Dadurch würde die Verfügbarkeit des Keratins massiv erhöht, indem das Polypeptidrückgrad als Ganzes verwendet, oder gezielt in kleinere Fragmente gespalten werden kann. Für die Reduktionsmethode wurden über die Jahre verschiedene Reduktionsmittel unter diversen Bedingungen getestet.

##### **III.2.1.1 Reduktion mit Thiolen**

Bereits 1935 führten *Goddard* und *Michaelis* Versuche zur Löslichkeit von Woll-Keratin durch.<sup>[31]</sup> In diesen Versuchen nutzten sie Thioessigsäure, oder das entsprechende Natriumsalz, als Reduktionsmittel. Dabei stellten sie eine Abhängigkeit der Löslichkeit vom pH-Wert fest – im sauren oder neutralen Milieu beobachteten sie keinerlei Löslichkeit; das Optimum lag laut *Goddard* und *Michaelis* bei pH 10,5.

Zu späteren Zeitpunkten wurden Mercaptoethanol<sup>[47]</sup> und L-Cystein<sup>[19, 48]</sup> als Reduktionsmittel getestet und konnten teilweise gute Ergebnisse liefern. Aus den Arbeiten zur Reduktion mit Thiolen konnten zudem hilfreiche Additive wie Harnstoff,<sup>[49, 50]</sup> Thioharnstoff (*Shindai-Methode*)<sup>[51]</sup> identifiziert werden. Diese dringen in die Proteine ein und stören ihre Ordnung, indem sie Wasserstoffbrücken brechen, wodurch eine Denaturierung des Proteins bewirkt wird.<sup>[19, 48]</sup> Werden nach dem Aufschluss das Reduktionsmittel und das Denaturierungsreagenz für weitere Anwendungen, bei denen sie ggf. stören könnten, entfernt, droht die Oxidation der geschaffenen Thiolgruppen und eine Agglomeration der Polypeptidkette. Um dies zu verhindern, können Tenside, wie etwa Natriumdodecylsulfat (SDS) zugegeben werden.<sup>[52, 53]</sup> *Yamauchi et al.* berichten zudem eine Steigerung der Löslichkeit von Keratin durch die Zugabe von SDS.<sup>[53]</sup> Der Effekt der erhöhten Löslichkeit, könnte ein ähnlicher sein, wie bei der Zugabe von Harnstoff und Thioharnstoff. SDS ist als Denaturierungsreagenz für Proteine bekannt, sodass die nicht-kovalente Stabilisierung von Keratin durch SDS beeinträchtigt werden könnte, was die Reduktion der Disulfidbrücken erleichtert. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht in einer späteren Arbeit von *Shrooyen et al.* bestätigt werden. Allerdings fanden *Shrooyen et al.*, dass die Oxidation der Thiole durch SDS verlangsamt wurde.<sup>[52]</sup>

### III. Kenntnisstand

Ein bereits lange etabliertes thiolhaltiges Reduktionsmittel für die Anwendung an Keratin ist Thioglycolsäure. Häufig wird auf Grund der verringerten Geruchsbelästigung das Ammoniumsalz – Ammoniumthioglycolat – verwendet. Dieses findet bereits seit geraumer Zeit Anwendung bei Haarbehandlungen, insbesondere bei Dauerwellen. Das Ammoniumthioglycolat ist in der Lage in das Haar einzudringen und die dort vorhandenen Disulfidbrücken zu spalten. Dies führt zu einem Aufweichen und einer erhöhten Plastizität des Haars, sodass die künstlichen Locken der Dauerwelle gebildet werden können. Anschließend kann das Haar durch Reoxidation der freien Thiole, etwa mit Wasserstoffperoxid, in der gewünschten Form fixiert werden.<sup>[54]</sup>

#### **III.2.1.2 Anorganische Reduktionsmittel**

Eine Alternative zur Reduktion mit Thiolen stellen anorganische Reduktionsmittel dar. Sulfite-, Bisulfite- und Disulfidanionen sind anorganische Reduktionsmittel, welche in der Lage sind, Disulfidbrücken zu spalten; dieser Prozess wird Sulfitolyse genannt.<sup>[7]</sup> Die Effizienz und Geschwindigkeit dieses Prozesses bestimmt der pH-Wert.<sup>[31, 32]</sup> Bei der Sulfitolyse gilt es ebenfalls zu beachten, dass maximal die Hälfte der theoretisch möglichen freien Thiolgruppen zugänglich ist, da bei der Spaltung des Disulfids ein Schwefelatom zum Thiolat reduziert wird, während das Zweite zu einem Bunte-Salz reagiert. Die in Abbildung III.2-1 gezeigte Sulfitolyse läuft i.d.R. nicht zum vollständigen Umsatz abläuft. *Happey et al.* nutzten in ihrer Arbeit zum Aufschluss von Keratin mittels Sulfitolyse eine Kombination aus Harnstoff und SDS, um die Ausbeute zu erhöhen.<sup>[55]</sup> Um gute Umsätze zu erhalten, müssten die Sulfite jedoch im hohen Überschuss zugegeben werden.



### III. Kenntnisstand

Abbildung III.2-1 zu sehen ist, kann das bei der Reduktion der Disulfidbrücke entstehende Dehydroalanin mit Cystein anschließend zum Lanthionin reagieren, oder mit Lysin zum Lysinoalanin.

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion von Disulfidbrücken in Keratin stellen Trialkylphosphine dar. Diese führen zu einer irreversiblen Reduktion der Disulfidbrücken, sodass hier mit stöchiometrischen Mengen gearbeitet werden muss.<sup>[56]</sup>

#### **III.2.1.3 Tris(2-carboxyethyl)phosphin**

Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) ist ein Phosphin-basiertes Reduktionsmittel, welches selektiv Disulfide zu Thiolen reduziert. Daher wird es oftmals verwendet, um Cystin in Proteinen zu reduzieren oder die Bildung von Cystin aus Cystein zu unterdrücken.<sup>[57]</sup> TCEP zeichnet sich neben seiner Selektivität auch durch seine Fähigkeit aus, Disulfide quantitativ zu reduzieren, wodurch es nicht in großen Überschüssen eingesetzt werden muss. Zwei Faktoren, welche die Anwendung von TCEP limitieren, sind seine hohe Sauerstoffsensitivität und sein hoher Preis, welcher einen Einsatz im industriellen Maßstab verbietet. Für Versuche im Labormaßstab kann der Einsatz von TCEP jedoch sinnvoll sein.

### **III.2.2 Ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösemittel**

#### **III.2.2.1 Ionische Flüssigkeiten**

Ionische Flüssigkeiten sind Salze mit einer Schmelztemperatur unterhalb von 100 °C, bestehend aus einem organischen Kation und einem entweder organischen oder anorganischen Anion.<sup>[35, 58]</sup> Als solche weisen sie eine Vielzahl interessanter und physikochemischer Eigenschaften auf. Neben ihrem geringen Dampfdruck, der hohen Leitfähigkeit und geringen Entflammbarkeit, ist vor allem ihr hohes Solvatisierungsvermögen für den Aufschluss von Keratin vielversprechend.<sup>[59, 60]</sup>

Feder- und Wollkeratine konnten erfolgreich in verschiedenen ionischen Flüssigkeiten aufgelöst werden.<sup>[61, 62]</sup> Dabei identifizierten die entsprechenden Arbeiten jene ionischen Flüssigkeiten mit einem Chloridanion als am besten für den Keratinaufschluss geeignet. Das in der ionischen Flüssigkeit gelöste Keratin kann anschließend durch die Zugabe von Wasser ausgefällt werden. Um bei diesem Prozess Disulfidbrücken zu spalten, muss auch hier ein Reduktionsreagenz zugesetzt werden – untersucht wurde dies bisher für Natriumsulfit. Durch den Aufbruch der S-S-Bindung entstanden auch hier Bunte-Salze,<sup>[61]</sup>

### III. Kenntnisstand

<sup>62]</sup> was im Rahmen des KERAbond-Projekts vermieden werden soll. Die maximalen Ausbeuten, durch den Keratinaufschluss mit ionischen Flüssigkeiten lagen bei etwa 50 Prozent.<sup>[7]</sup> Die geringen Ausbeuten dürften damit begründet sein, dass wasserlösliche Teile des aufgelösten Keratins – was insbesondere Cystein-haltige Peptidfragmente beinhaltet - durch die Zugabe von Wasser nicht ausgefällt werden können. Dies stellt ein systemisches Problem dar, welches die Ausbeuten beim Keratinaufschluss mittels ionischer Flüssigkeiten geringhält.

#### **III.2.2.2 Stark eutektische Lösemittel**

Stark eutektische Lösemittel (engl. Deep Eutectic Solvent, DES) sind i.d.R. Salze aus quaternären Ammoniumverbindungen und einem Wasserstoffbrückendonator mit einem Schmelzpunkt (deutlich) unterhalb der Schmelzpunkte der beiden einzelnen Komponenten.<sup>[63]</sup> Studien mit stark eutektischen Lösemitteln konnten ähnliche Ergebnisse erzeugen, wie jene mit ionischen Flüssigkeiten.<sup>[36, 37]</sup> Vorteile gegenüber ionischen Flüssigkeiten bieten die einfache Herstellung der DES, die damit einhergehenden geringeren Kosten, sowie die Umweltverträglichkeit, bzw. biologische Abbaubarkeit von DES.<sup>[63]</sup>

#### **III.2.3 Physikalische Explosion**

Als physikalische Explosionen werden all jene Explosionen bezeichnet, die weder auf chemischen, noch auf kernphysikalischen Prozessen beruhen. Die *steam flash explosion* und *high density steam flash explosion* sind zwei Prozesse zur Vorbehandlung keratinhaltiger Materialien.<sup>[7, 51, 62]</sup> Bei diesen Behandlungsmethoden werden die Substrate Wasserdampf unter hohen Temperaturen für einen kurzen Zeitraum ausgesetzt, wobei der heiße Wasserdampf das Gewebe penetriert. Darauf folgt eine schnelle Dekompression, diese kann bei der *steam flash explosion* einige Sekunden dauern und bei der *high density steam flash explosion* bis zu 0,0875 s ablaufen.<sup>[38]</sup> Auf Grund der verkürzten Dekompressionszeit letzterer Methode werden zwar durch die auf das Protein wirkenden Scherkräfte Disulfidbrücken gespalten, das Peptidrückgrad jedoch nicht angegriffen.<sup>[38, 51]</sup> Die „reguläre“ *steam flash explosion* erzeugt keine so rapide Dekompression, wodurch die Scherkräfte mehr Zeit haben auf das Peptidgerüst zu wirken. Durch die längere Einwirkzeit erfolgt die Zersetzung des Proteins in kleine Peptidfragmente – dadurch bedingt stellt die *high density steam flash explosion* die interessantere Methode zur Vorbehandlung von Keratin dar.

### III. Kenntnisstand

Durch die Vorbehandlung von Keratin mittels *high density steam flash explosion* wird die enzymatische Zugänglichkeit stark erhöht. Außerdem ist die Methode bereits auf 5 m<sup>3</sup> Ansätze skaliert worden.<sup>[38, 39]</sup> Dementsprechend stellt die Kombination aus der Vorbehandlung und einer enzymatischen Methode eine vielversprechende Option dar.

#### **III.2.4 Mikrobielle und enzymatische Methoden**

Neben den klassisch chemischen Methoden zur Reduktion von Disulfidbrücken sollen im Zuge der Arbeiten an KERAbond auch enzymatische oder mikrobielle Ansätze verfolgt werden - naheliegend ist dabei der Einsatz von Keratinasen. Diese Enzyme werden von einer Reihe Bakterien und Pilzen, welche keratinhaltige Substrate als ihre Quelle für Kohlenstoff, Stickstoff und Schwefel nutzen, produziert.<sup>[41, 42]</sup> Für Federkeratin ist bekannt, dass dieses insbesondere durch Vertreter der Gattung *Streptomyces*<sup>[64-68]</sup> oder *Thermoactinomyces*.<sup>[66, 69]</sup> zersetzt werden kann. Gängige Keratinasen sind unter anderem Savinase<sup>[70, 71]</sup> und Esperase.<sup>[72]</sup> Die natürliche Funktion der Keratinasen ist die vollständige Zersetzung des Keratins um die Verwertung der Aminosäuren zu ermöglichen, daher muss beim Arbeiten mit diesen Enzymen darauf geachtet werden, dass der Anteil an kleinen Peptidfragmenten und freien Aminosäuren geringgehalten wird. Weitere unerwünschte Nebenreaktionen betreffen die SH-Funktionalität, welche beim Spalten der Disulfidbindung erhalten bleiben soll und nicht zu Bunte-Salzen reagieren oder oxidiert werden. Dies hat direkten Einfluss auf die potentielle Verwertbarkeit im Sinne des KERAbond-Projekts. Die Anforderungen bzw. Eignungen unterschiedlicher Herangehensweisen werden in Kapitel III.2.6 genauer diskutiert.

Andere Proteasen können Keratin oft nicht oder nur teilweise abbauen. Dies liegt in der kompakten Struktur des Keratins, welche durch seinen hohen kristallinen Anteil (bis zu 63 %)<sup>[16]</sup> zustande kommt, sowie durch die Stabilisierung durch Disulfidbrücken, begründet, welche Keratin auch gegenüber chemischer Behandlung resistent machen. Insbesondere die dichte Packung der Peptidstränge in den kristallinen Bereichen des Moleküls erschwert den Zugang für herkömmliche Proteasen. Daher ist auch eine kombinierte Behandlung des Keratins durch chemisch-reduktive Hydrolyse oder *high density steam flash explosion* - um die enzymatische Verdaulichkeit zu erhöhen - und anschließende Behandlung durch Enzyme möglich. Dennoch wurden auch erfolgreiche Zersetzungen von Keratin mit nicht „natürlich“ keratinolytischen Proteasen durchgeführt. Insbesondere mit Alcalase konnte die Hydrolyse von Keratin verwirklicht werden.<sup>[72]</sup>

### **III.2.5 Weitere Methoden**

#### **III.2.5.1 Mikrowellengestützter Aufschluss**

Der Keratinaufschluss über Mikrowellenbestrahlung funktioniert ähnlich der *high density steam flash explosion*, indem durch die Bestrahlung die Keratin-Lösung erhitzt wird, was die Denaturierung des Proteins bewirkt. Dabei konnten Ausbeuten von ca. 60 % erzeugt werden.<sup>[40]</sup> Die Methode ist insofern weniger effektiv, dass die Einwirkzeiten und die Temperatur höher sind. Zudem geht durch die Mikrowellenbestrahlung der Großteil des Cysteins im Keratin verloren. In einem Versuch sank der Cysteinanteil in Wolle von 9,41 mol% vor dem Mikrowellen-Aufschluss auf 0,5 mol%.<sup>[40]</sup>

#### **III.2.5.2 Oxidative Methoden**

Oxidative Methoden werden bereits seit längerer Zeit eingesetzt, um Keratin aufzuschließen. Dabei werden Persäuren wie Peressigsäure verwendet.<sup>[45]</sup> Die Ausbeuten sind schlecht,<sup>[7, 73]</sup> die Molmasse der Produkte ist größtenteils gering und das Thiol des Cysteins liegt stark überwiegend als Cysteinsäure vor.<sup>[7]</sup>

#### **III.2.5.3 Alkalische Methoden**

Heiße alkalische Lösungen können eingesetzt werden um Wollkeratin aufzulösen,<sup>[46]</sup> wodurch jedoch Cystein zerstört wird und Abbau des Peptidrückgrads stattfindet. Zudem werden große Mengen alkalischer Lösung für den Aufschluss und anschließend große Mengen saurer Lösung für die Neutralisierung gebraucht.

### **III.2.6 Eignung der verschiedenen Methoden für das KERAbond-Projekt**

Ziel des KERAbond-Projekts ist es, durch den Aufschluss von Keratin, Hydrolysate mit überwiegend Peptidfragmenten mit zwei oder mehr freien Thiolfunktionalitäten zu generieren. Ein geringer Anteil an Peptidfragmenten mit nur einer oder gar keiner Thiol-Gruppe ist dabei tolerabel. Die angestrebte Polyfunktionalität eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten für die Folgechemie der Hydrolysate.

### III. Kenntnisstand

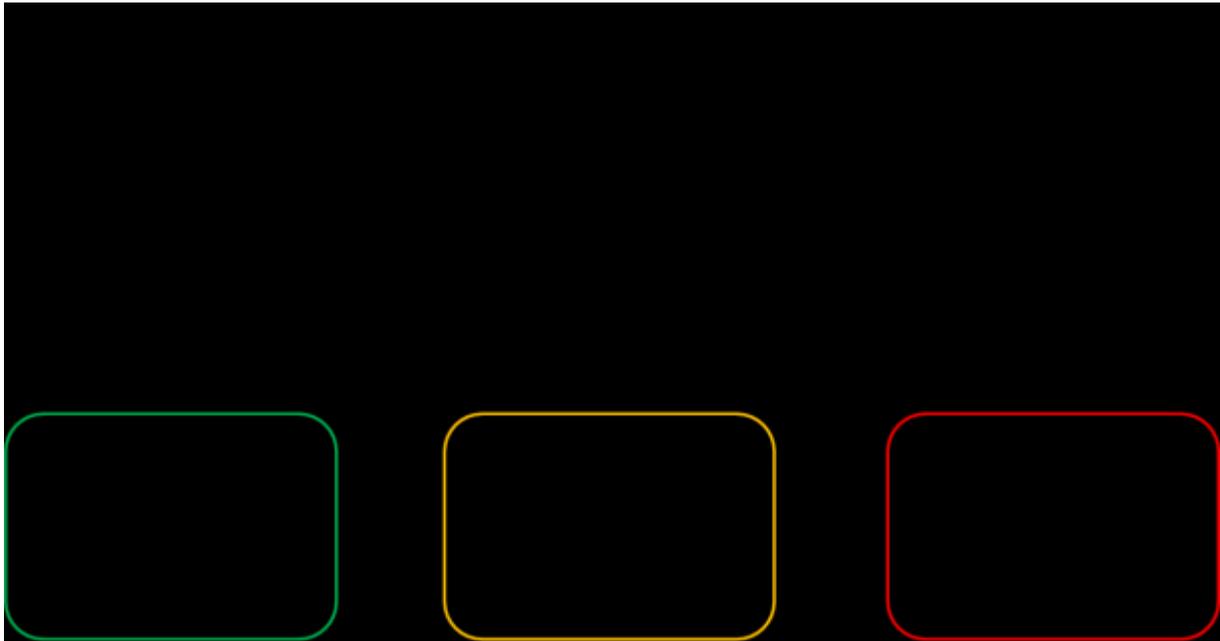


Abbildung III.2-4: Mögliche Spaltungen einer Disulfidbrücke in Keratin durch verschiedene Reduktionsmittel.

Um die Thiolgruppen des Cysteins aus den Disulfidbrücken zu generieren und anschließend vor Oxidation zu schützen, ist ein reduktives Milieu notwendig. Vorangegangene Arbeiten bei Henkel konnten zeigen, dass Ascorbinsäure-Lösungen in der Lage sind die Stabilität von Lösungen thiolhaltiger Peptide zu erhöhen. Die gleiche Arbeit konnte eine noch bessere stabilisierende Wirkung von EDTA nachweisen; es scheint, dass komplexierende Mittel wie EDTA in der Lage sind Cystein-haltige Peptidfragmente vor der Oxidation des Thiols durch Sauerstoff zu schützen. Grund dafür ist, die Rolle von Übergangsmetallen, bereits im Nanomolaren Bereich, als Katalysatoren für die Oxidation zum Disulfid.<sup>[74]</sup> Durch die Komplexierung sind diese nicht dazu in der Lage an der Reaktion teilzunehmen.

Die etablierten Methoden zum reduktiven Aufschluss von Keratin werden unter Einsatz teilweise umweltschädlicher, gesundheitsschädigender oder gar toxischer Thiol-Reagenzien durchgeführt. Im Zuge des KERAbond-Projekts soll auf den Einsatz umweltschädigender und kostenintensiver Reduktionsmittel wie Thiole, Sulfide oder Phosphine, sofern möglich, verzichtet werden. Natriumsulfit und Natriumhydrogensulfit entsprechen diesen Voraussetzungen, allerdings ist es schwierig, mit der Sulfitolyse ohne die Zugabe hoher Konzentrationen denaturierender Reagenzien hohe Umsätze zu erreichen. Zudem ist es notwendig, mit großen Überschüssen zu arbeiten. Zusätzlich besteht die Gefahr der Bildung so genannter Bunte-Salze; dies ist nicht im Sinne des

### III. Kenntnisstand

Projekts und soll durch umsichtige Prozesskontrolle weitestgehend vermieden werden, bspw. indem im sauren pH-Bereich gearbeitet wird.

In der jüngeren Vergangenheit beschäftigte sich die Forschung ebenfalls mit der elektrochemischen Reduktion von Keratin.<sup>[75]</sup> Dieser Ansatz ist zwar noch nicht ausreichend erforscht um eine fundierte Einschätzung seiner Realisierbarkeit im industriellen Maßstab abgeben zu können, doch ist die elektrochemische Reduktion von Disulfiden hinlänglich bekannt,<sup>[76-78]</sup> sodass dieser Ansatz vielversprechend scheint. Ein großer Vorteil einer elektrochemischen Reduktion ist, dass diese ohne gesundheitsschädliche, petrochemisch-basierte Reduktionsmittel auskommt und somit eine grüne Alternative böte.

Der Ansatz einer enzymatischen Hydrolyse von Keratin scheint vielversprechend, da es sich um eine grüne und u.U. kostengünstige Methode handelt. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche enzymatische Hydrolyse ist jedoch, dass es gelingt die Hydrolyse so durchzuführen, dass keine, oder nur wenige freie Aminosäuren entstehen und der überwiegende Anteil der entstehenden Peptidfragmente den an sie gestellten Bedingungen (SH-Zahl  $\geq 2$ ) entsprechen. Übermäßige oder unspezifische Zersetzungen des Peptidrückgrads müssten unterbunden werden. Die Kombination aus einer nicht-enzymatischen Vorbehandlung zur Erhöhung der enzymatischen Verdaulichkeit mit anschließender enzymatischer Hydrolyse ist ebenfalls denkbar.

Ionische Flüssigkeiten und stark eutektische Lösemittel konnten beide ihre Eignung zum Auflösen von Keratin nachweisen. Allerdings sind die bisherigen Versuche diese Lösemittel zum Aufschluss von Keratin zu verwenden, in ihren Ausbeuten begrenzt. Hinzu kommt, dass sie nicht in der Lage sind, die Disulfidbrücken des Keratins zu spalten. Dadurch vermögen die ionischen Flüssigkeiten alleine nicht die für KERAbond gewünschten Keratinhydrolysate zu generieren. Es existieren jedoch, für ionische Flüssigkeiten, Ansätze die Auflösung des Keratins durch die Zugabe von Reduktionsmitteln zu verbessern. Ein großes Problem der Aufschlüsse mittels ionischer Flüssigkeiten stellt die Notwendigkeit des Ausfällens von Proteinfragmenten mit Wasser dar. Wasserlösliche Bestandteile – also insbesondere die Proteinhydrolysate von Interesse – können so verloren werden, was als Grund für die geringen Ausbeuten mit dieser Methode vermutet wird. Aus diesem Grund stellt die Verwendung von stark eutektischen Lösemitteln eine interessantere Alternative dar; DES zeichnen sich durch

### III. Kenntnisstand

ihre Umweltverträglichkeit, sowie einfache Darstellung und damit verbundene geringe Kosten aus.<sup>[63]</sup> Zwar sind auch die stark eutektischen Lösemittel nicht in der Lage Disulfide zu spalten, doch könnten sie die Ordnung des Proteins stören und so die Zugänglichkeit für Reduktionsmittel erhöhen.

Die Behandlung von Keratin mit Mikrowellenstrahlung könnte gute Ergebnisse liefern, jedoch sind die bisher gezeigten Ansätze über die *high density steam flash explosion* Methode vielversprechender für die Vorbehandlung von Federn, da diese zwar die Disulfidbrücken brechen können, dabei jedoch die Peptidkette überwiegend unversehrt lassen. Die Problematik die sich bei dieser Methode ergibt besteht jedoch darin, dass hochspezialisierte Anlagen für die *high density steam flash explosion* notwendig sind welche dem KERAbond-Projekt nicht zur Verfügung stehen.

Der oxidative Aufschluss mit Persäuren ist aus mehreren Gründen nicht interessant für das KERAbond-Projekt. Der wichtigste Grund ist dabei, dass keine freien Thiolgruppen generiert werden können, da Cystein zur Cysteinsäure oxidiert wird. Daher ist diese Methode für KERAbond ungeeignet.

Da der Einsatz stark basischer Lösungen Cystein und das Peptidrückgrad angreift, ist auch diese Methode nicht für die Zwecke von KERAbond geeignet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Einsatz von Reduktionsmitteln nicht umgangen werden kann, um die gewünschten Peptide zu erzeugen, da anders keine zuverlässige Spaltung der Disulfide zu Thiolen möglich ist.

### III.3 Chemie der Thiole und Disulfide

Die Chemie des Schwefels wird, wie die jedes anderen Elements, durch seine Position im Periodensystem bestimmt. Der zentrale Faktor ist dabei seine relativ große Elektronenhülle und die daraus resultierende Polarisierbarkeit sowie das Bestreben die Valenzhülle aufzufüllen.<sup>[79]</sup>

Im HSAB-Konzept wird Schwefel als weich kategorisiert. Daher reagiert Schwefel bevorzugt mit anderen weichen Verbindungen.<sup>[79]</sup> Einige Schwefelverbindungen, wie etwa Sulfate, weisen einen höheren Grad an Härte auf, wodurch sich ihre Reaktivität verändert, doch die für diese Arbeit wichtigen Thiole und Disulfide unterliegen dieser allgemeinen Regel.

### III. Kenntnisstand

Ein interessanter Vergleich ist mit dem Gruppennachbarn des Schwefels, dem Sauerstoff, möglich, da die Chemie der beiden an manchen Stellen recht verschieden ist; so zeigt der Schwefel etwa eine merklich höhere Neigung zur Ausbildung homogener Bindungen in Form von Disulfiden als dies beim Sauerstoff der Fall ist.

#### **III.3.1 Thiole**

Als Thiole (Mercaptane) werden solche organischen Verbindungen bezeichnet, welche eine Thiolgruppe (auch Sulfhydrylgruppe), enthalten. Die Thiolgruppe hat einen maßgeblichen Einfluss auf die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Verbindungen.

##### **III.3.1.1 Chemie der Thiole**

Thiole zeigen im Vergleich zu den verwandten Alkoholen eine höhere Azidität.<sup>[80]</sup> Durch die größere Ausdehnung des Atoms können negative Ladungen besser stabilisiert werden wodurch das Thiolat-Ion gegenüber dem Alkoholat bevorzugt ist. So hat die Thiol-Gruppe des Cysteins etwa einen pKs-Wert von 8,14<sup>[81]</sup> verglichen mit dem durchschnittlichen pKs-Wert eines Alkohols von etwa 15. Diese erhöhte Bereitwilligkeit zur Bildung eines Anions korreliert mit einer der charakteristischsten chemischen Eigenschaften der Thiole: ihre Nukleophilie. Beide sind durch die schwächere S-H-Bindung gegenüber der O-H-Bindung sowie der Größe des Schwefelatoms mit der einhergehenden besseren Ladungsstabilisierung bedingt.

Thiole sind von Natur aus nukleophil. Insbesondere ihre anionische Form, das Thiolat, reagiert bereitwillig mit (insbesondere) weichen Elektrophilen wie Alkylhalogeniden,<sup>[82]</sup> oder Michael-Systemen.<sup>[80, 83, 84]</sup> Insbesondere die beiden letztgenannten Technologien werden oft in der Klebstoff-Industrie verwendet, um zusammen mit Thiolen Polymernetzwerke auszubilden. Insbesondere Thiol-En-„Click“-Reaktionen werden vielseitig eingesetzt – bspw. für das schnelle Aushärten von Klebstoffsystemen.<sup>[85-88]</sup>

Epoxid-Harze stellen eine eigene Klasse der Klebstoffsysteme dar, da sie sich durch ihre Stärke, Langlebigkeit und Chemikalienresistenz auszeichnen. Gepaart mit einer relativ breiten Anwendbarkeit von Metalloberflächen bis Holz macht sie das zu einem attraktiven Ausgangsmaterial.<sup>[89]</sup> Chemisch betrachtet handelt es sich bei Epoxiden um Elektrophile, sodass die Aushärtung von Epoxid-Harzen durch die Addition von Nukleophilen geschieht. Gängige Härtereagenzien sind oftmals Amine. Diese reagieren

### III. Kenntnisstand

hervorragend mit klassischen Glycidylether-Epoxiden, jedoch sehr viel weniger gut mit anderen Epoxiden wie den aufkommenden, biobasierten, epoxidierten Fetten.<sup>[89-92]</sup> An dieser Stelle zeigt sich die Relevanz der Thiol-basierten Härter, da diese, durch ihre höhere Nukleophilie, verglichen mit Aminen, in der Lage sind auch mit den weniger reaktiven epoxidierten Fetten zu reagieren.<sup>[89-92]</sup>

Neben ihrer Rolle in der Aushärtung von Epoxid-Harzen finden Thiole auch in Form der Thiol-En-, „Click“-Reaktion große Anwendung im Klebstoffbereich. Als quasi-„Click“-Reaktion läuft diese schnell, selektiv, annähernd quantitativ und unter einem breiten Spektrum von Bedingungen ab.<sup>[93]</sup> Sowohl reguläre, meist endständige Doppelbindungen als auch Michael-Systeme können so mit Thiolen reagieren. Bei der Reaktion mit regulären Doppelbindungen kommt die Fähigkeit der Thiole, stabile Radikale auszubilden zum Tragen, da diese über das Thionylradikal, durch einen Radikalstarter getriggert abläuft.<sup>[93, 94]</sup> Bei der basisch katalysierten Thiol-Michael-Reaktion ist es erneut die Nukleophilie des Schwefels, welche die treibende Kraft der Reaktion darstellt.<sup>[93-95]</sup>

Gängige Reaktionspartner für die radikalische Thiol-En-, „Click“-Reaktion sind unter anderem Vinyl- und Allylether. Beide sind gute Reaktionspartner für die Thionylradikale, jedoch sind Vinylether besonders gut geeignet, da diese besser in der Lage sind Radikale zu stabilisieren.<sup>[93, 96-99]</sup> Die Thiol-En-, „Click“-Reaktion ist im Bereich der Klebstoffhärtung vor allem auf Grund ihrer Geschwindigkeit, des geringen Schrumpfes, sowie der Möglichkeit sie durch Lichtimpulse zu triggern verbreitet.<sup>[93]</sup> Das so mögliche sehr schnelle Aushärten mit geringem Schrumpf ist bspw. für das Verkleben von Kameramodulen attraktiv.

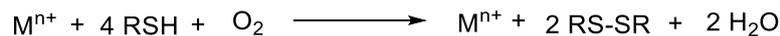
Zusätzlich sind Thiole in der Lage Übergangsmetalle zu komplexieren, wobei das Schwefelatom als Donor fungiert. Dies wird etwa in der Katalyse ausgenutzt,<sup>[100-102]</sup> auch in der Natur finden sich Thiole, oftmals als reaktive Zentren von Enzymen.<sup>[103-105]</sup> Cysteine fungieren auch als Redox-Schalter, um die katalytische Aktivität von Enzymen zu regulieren.<sup>[106]</sup>

Die Fähigkeit, Komplexe mit Übergangsmetallen einzugehen, ist entscheidend für einen weiteren wichtigen Reaktionstypen von Thiolen. Thiole können durch Oxidation zu Disulfiden reagieren.<sup>[107]</sup> Für diese Oxidation ist Luftsauerstoff bereits ausreichend. Jedoch muss dieser als Triplett-Sauerstoff vorliegen, sodass die Oxidation meist nur

### III. Kenntnisstand

langsam abläuft.<sup>[108, 109]</sup> Ebenfalls bedarf es der Katalyse durch Übergangsmetalle, wobei bereits Konzentrationen im nanomolaren Bereich ausreichend sind.<sup>[107]</sup>

Der Mechanismus dieser Autooxidation ist nicht vollständig geklärt<sup>[74]</sup> und scheint von der Struktur des Thiols, der Anzahl an Thiolgruppen, dem Übergangsmetall und weiteren funktionellen Gruppen abhängig zu sein. Die grundlegende Reaktion lautet je nach Bedingungen:



Oder:



Diese Reaktionen – die Oxidation zweier Thiole zum Disulfid – sind die einzig stattfindende Reaktion in neutralen und leicht basischen Medien (pH 7- 9).<sup>[110]</sup> Wird der pH-Wert weiter erhöht kommt es auch zur Bildung von Sulfin- und Sulfonsäuren. Bei pH 12 sind diese die überwiegenden Reaktionsprodukte.<sup>[74]</sup> In sauren Medien erfolgt keine Autooxidation. Dies wird zumeist dadurch erklärt, dass bei niedrigen pH-Werten keine Thiolate vorliegen welche für die Oxidation zum Disulfid notwendig zu sein scheinen.

Unter Umständen kann der Übergangsmetall-Katalysator auch eine inhibierende Wirkung auf die Autooxidation haben, und zwar dann, wenn die Thiole oder andere Verbindungen einen stabilen Komplex mit dem Metall ausbilden. Eine solche Komplexbildung des Metall-Katalysators (bspw. durch EDTA) kann dementsprechend auch als Möglichkeit genutzt werden, Thiole vor der Oxidation zum Disulfid zu schützen, indem das Metallkation in einen starken Komplex gebunden wird und so die Thiole nicht an das Kation koordinieren und daran reagieren können.

### III. Kenntnisstand

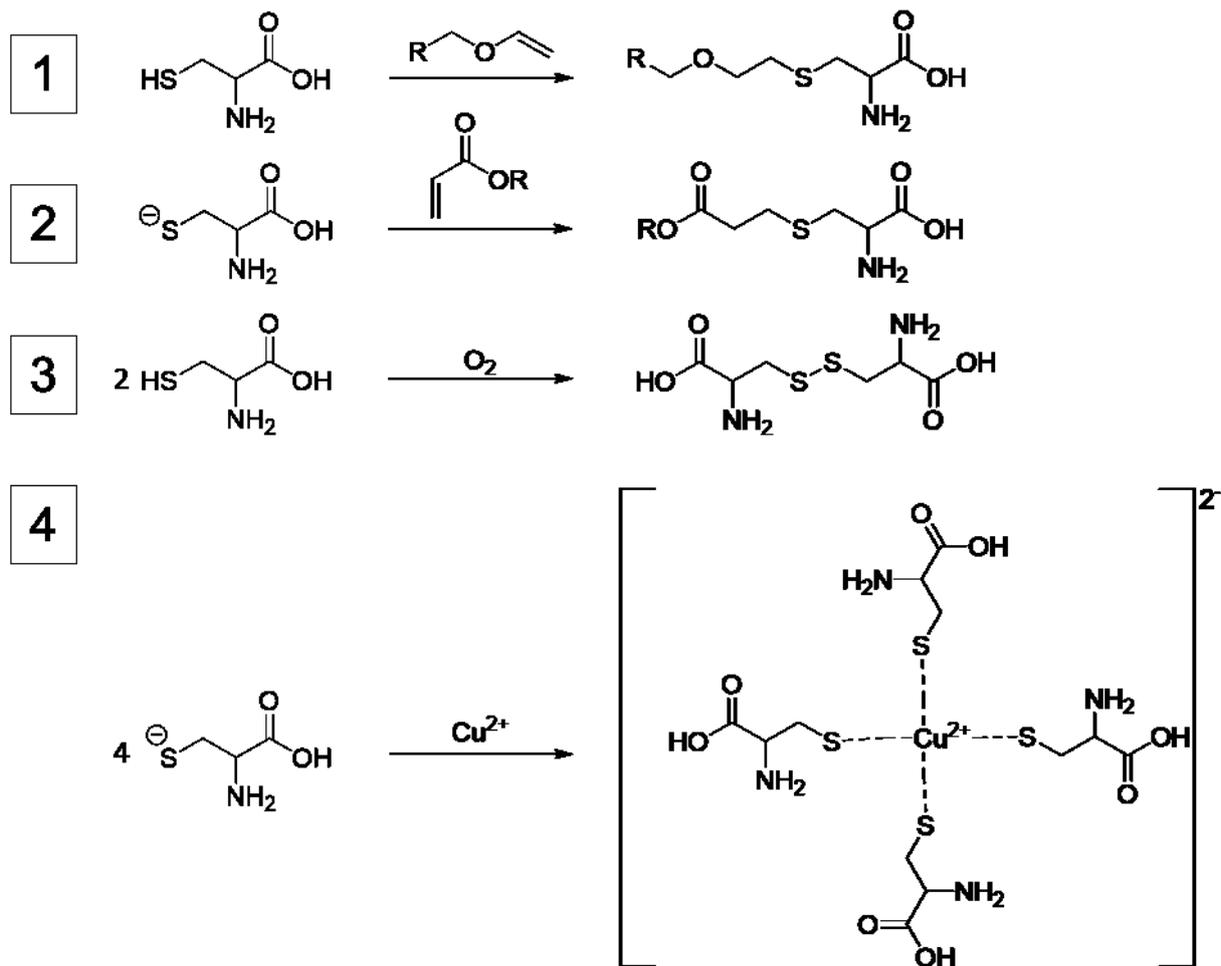


Abbildung III.3-1: Exemplarische Darstellung der beschriebenen Reaktionen von Thiolen an Hand des Beispiels von Cystein. Stöchiometrien wurden nicht berücksichtigt. 1) (radikalische) Thiol-En-, „Click“-Reaktion 2) Thiol-Michael-Reaktion 3) sauerstoffgetriebene Oxidation zum Disulfid 4) Schwermetallkomplexierung.

#### III.3.1.2 Thiole in der Natur

Thiole finden sich in der Natur in einer Vielzahl von Formen und Zwecken. Von strukturgebenden oder funktionellen Proteinen über Boten- oder Abwehrstoffe bis hin zur Komplexierung von Metallen und unzähligen weiteren Bereichen leisten Thiole durch ihre Eigenschaften einen unverzichtbaren Beitrag in zahlreichen Organismen. Die hier genannten Beispiele werden nun genauer ausgeführt.

Die Rolle thiolhaltiger Verbindungen in der Natur wird durch ihre oben beschriebene Reaktivität bestimmt. So übersetzt sich etwa die Fähigkeit der Thiole zur Metallkomplexierung in ihren Einsatz in Metallothioneinen. Dabei handelt es sich um Proteine, die eine hohe Anzahl freier Cysteine enthalten wodurch sie in der Lage sind

### III. Kenntnisstand

Metalle zu binden. So können sich Organismen gegen eine Vergiftung durch toxische Metalle wie Quecksilber, Kupfer oder Kadmium wehren.<sup>[111-113]</sup>

Neben ihrer Fähigkeit Metalle zu komplexieren ist eine weitere oben beschriebene Eigenschaft von Thiolen ihre Redoxchemie. Dabei geht es vor allem, aber nicht nur, um ihre Neigung Disulfide auszubilden. Ein Beispiel für die Redoxeigenschaften biogener Thiole ist Glutathion, welches in der Lage ist durch seine reduktive Wirkung reaktive Sauerstoffspezies abzufangen und so zum Redox-Gleichgewicht der Zellen beizutragen.<sup>[114-116]</sup>

Ebenfalls spielen Thiole eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von Proteinen. Die Thiolgruppe des Cysteins wird zum Disulfid oxidiert, wodurch es inter- oder intrachainar stabilisierend wirken kann. Dieses Strukturmotiv ist so gängig, dass es unzählige Beispiele gibt. Eine Proteinklasse sticht jedoch dabei besonders heraus – die Strukturproteine. Sei es das für diese Arbeit wichtige Keratin,<sup>[14, 117]</sup> Kollagen<sup>[118]</sup> oder Spinnenseidenproteine,<sup>[119]</sup> alle enthalten oxidierte Cysteine als unverzichtbare Stabilisationskomponente.

Die Rolle des Cysteins in Proteinen beschränkt sich jedoch nicht nur auf seine Fähigkeit zur Disulfidbildung und die Stabilisierung. Die freie Thiol-Gruppe des Cysteins findet sich auch oft im reaktiven Zentrum eines Enzyms wo es einen elementaren Bestandteil des Reaktionsmechanismus‘ darstellt.<sup>[120]</sup> Ein Beispiel für ein Enzym in dem Cystein eine tragende Rolle im Reaktionsmechanismus trägt ist Papain. In diesem Fall findet ein nukleophiler Angriff ausgehend von dem Thiolat des Cys25 auf die Carbonylgruppe eines Peptids statt. Hierdurch entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand, welcher dann durch seine energetisch höhere Lage genutzt wird, um die Peptidbindung zu spalten.<sup>[121]</sup>

#### **III.3.2 Disulfide**

Disulfide sind oxidierte Thiole. Sie bilden sich durch Reaktion mit Sauerstoff durch Exposition an der Luft.<sup>[107-109]</sup> Die Bildung der Disulfide wurde bereits in Kapitel III.2.1.1 behandelt, sodass in diesem Kapitel vermehrt die Chemie ausgehend von Disulfiden beschrieben wird; eine Ausnahme bildet die Reduktion von Disulfiden, diese wird in Kapitel III.4.1 ausführlich behandelt.

### III. Kenntnisstand

#### III.3.2.1 Chemie der Disulfide

Die Chemie der Disulfide wird durch zwei Reaktionen dominiert: zum einen Disulfidaustauschreaktionen mit Thiolen<sup>[122, 123]</sup> und zum anderen Austauschreaktionen zwischen Disulfiden.<sup>[124]</sup>

Befinden sich Thiolate in der Nähe von Disulfiden können diese eine Austauschreaktion eingehen. Das Thiolat-Anion führt dabei einen nukleophilen Angriff auf das Disulfid aus. Als Produkte der Reaktion entstehen auf der einen Seite ein neues Disulfid, auf der anderen ein neues, freies Thiolat. Da die Reaktion über ein Thiolat-Anion verläuft, findet sie vor allem im basischen Milieu statt.<sup>[122, 123]</sup>

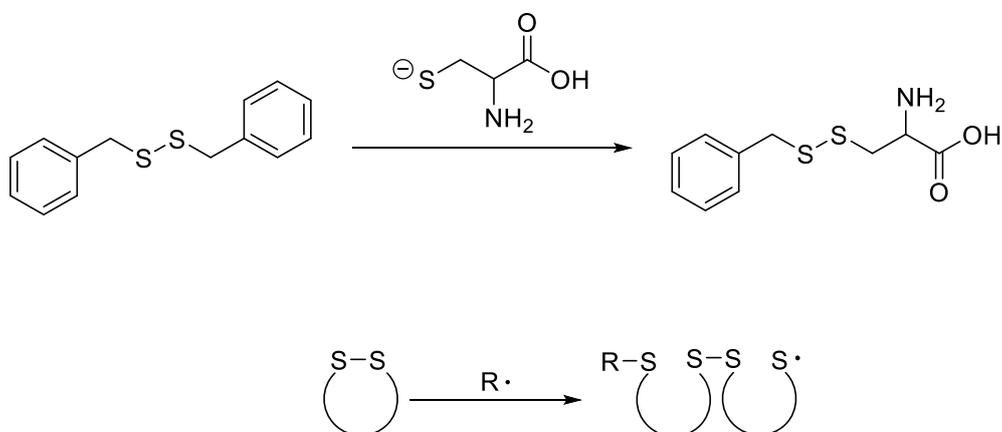


Abbildung III.3-2: Oben: Austauschreaktion zwischen einem Disulfid (Dibenzyldisulfid) und dem Thiolat-Anion des Cysteins. Unten: Schematische Darstellung einer radikalischen Disulfidaustauschreaktion und ROMP eines cyclischen Disulfids.

Die Disulfidaustauschreaktion zwischen zwei Disulfiden verläuft radikalisch. Freie Radikale sind per se in der Lage mit Disulfiden zu reagieren; dabei muss es sich nicht zwingend um ein Thionyl-Radikal handeln. Wird eine Disulfid-Bindung durch Reaktion mit einem Radikal gespalten entsteht ein freies Thionyl-Radikal welches dann in der Lage ist weitere Austauschreaktionen mit Disulfiden einzugehen. Daher werden cyclische Disulfide auch für ringöffnende Methathesepolymerisationen (ROMP) eingesetzt.<sup>[125, 126]</sup>

Strukturell verwandt mit den Disulfiden sind organische Polysulfide. Als organische Polysulfide werden Verbindungen mit der allgemeinen Strukturformel  $R^1-S_n-R^2$  mit einem  $n > 2$  bezeichnet. Das vermutlich geläufigste Vorkommen von Polysulfiden ist die Vulkanisierung von Kautschuk, bei der elementarer Schwefel an die Doppelbindungen der Kautschuk-Isoprenoide addiert wird.<sup>[127]</sup> Durch die Vulkanisierung entsteht ein elastomeres Polymer Netzwerk.

### III. Kenntnisstand

Auch im Bereich der Kleb- und Dichtstoffe spielen Polysulfide durch ihre speziellen Eigenschaften eine Rolle. Sie zeichnen sich durch exzellente Wasser- und Lösemittelresistenz aus, was sie für den Einsatz bspw. für den Einsatz im Automobilbereich prädestiniert, wo sie für die Montage von Frontscheiben zum Einsatz kommen.<sup>[128]</sup> Auch für Tanks sind sie auf Grund ihrer Lösemittelbeständigkeit gängige Dichtmittel.<sup>[128]</sup> Ebenso werden sie wegen ihrer chemischen Resistenz als Batteriekleber verwendet.<sup>[129, 130]</sup>

Dargestellt werden organische Polysulfide meist in einer Kondensationsreaktion ausgehend von organischen Dihaliden (i.d.R. Dichlorethan oder Dichlorpropan) durch die Umsetzung mit Alkalimetallpolysulfiden.<sup>[131]</sup> Die allgemeine Reaktionsgleichung, gezeigt am Beispiel von Dichlorethan lautet:  $n \text{Na}_2\text{S}_m + n \text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \rightarrow [\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}_m]_n + 2n \text{NaCl}$ .

#### **III.3.2.2 Disulfide in der Natur**

Da die Chemie der Disulfide untrennbar mit jener der Thiole verwoben ist, wurden zahlreiche Disulfid-Quellen in der Natur bereits im Kapitel über Thiole in der Natur besprochen. Daher sei an dieser Stelle nur noch einmal auf die Wichtigkeit der Disulfide in der Proteinstabilisierung,<sup>[14, 117-119]</sup> sowie ihre Beteiligung an zahlreichen Redox-Kontrollsystemen<sup>[114-116]</sup> hingewiesen. Insbesondere für Strukturproteine wie Keratin,<sup>[17]</sup> Kollagen<sup>[132]</sup> oder Spinnenseidenproteine<sup>[133, 134]</sup> spielen Disulfide eine tragende Rolle, da sie in der Lage sind ein hohes Maß an konformativer Starre in Proteine einzubringen. Doch auch andere Proteine wie Insulin,<sup>[135]</sup> oder das Speicherprotein Napin greifen auf Disulfide als stabilisierendes Strukturmotiv zurück. Napin ist aus zwei Aminosäuresträngen unterschiedlicher Größe zusammengesetzt. Diese beiden Stränge werden über zwei interchenare Disulfidbrücken verbunden.<sup>[136]</sup>

Eine weitere Rolle die von Disulfiden eingenommen wird ist ihre enzymatische Aktivität. Ähnlich der Thiole finden sich Disulfide in einer Reihe von Enzymen. Ein Beispiel sind die Oxidoreduktasen in deren aktivem Zentrum sie am Redox-Mechanismus teilhaben.<sup>[137, 138]</sup>

### **III.4 Raman-Spektroskopie**

Als Raman-Spektroskopie wird jene spektroskopische Untersuchung bezeichnet, die auf der inelastischen Streuung von Photonen an Molekülen oder Festkörpern beruht.<sup>[139]</sup> Bis heute wurden starke Verbesserungen der technischen Möglichkeiten hervorgebracht und eine Vielzahl unterschiedlicher Raman-Methoden entwickelt.

### III. Kenntnisstand

Als spektroskopische Methode ist Raman für die chemische Betrachtung unlöslicher Proben geeignet. Im Bereich der Klebstoffe ist dies oftmals notwendig, da (hoch)vernetzte Polymernetzwerke betrachtet werden. Da Raman-Spektroskopie bzw. Raman-Imaging mit deutlich höheren technischen Ansprüchen, sowie höheren Kosten verbunden ist als dies bei der IR-Spektroskopie der Fall ist, ist diese bisher nicht gleichwertig etabliert. Gerade für die Untersuchung von Klebstoffsystemen ist die Raman-Spektroskopie jedoch durch ihre Stärke in der Betrachtung schwefelhaltiger Systeme sehr interessant.<sup>[140]</sup> Daher wurde in dieser Arbeit grundlegende methodische Entwicklung betrieben wurde.

## **III.4.2 Theoretische Grundlagen**

### **III.4.2.1 Der Raman-Effekt**

Der Raman-Effekt beschreibt die inelastische Streuung von Licht an Molekülen. Daher kann die Raman-Streuung auch als Gegenstück zur Rayleigh-Streuung betrachtet werden welche die elastische Streuung von Licht an Molekülen beschreibt.<sup>[141]</sup> Der Energieübertrag bei einer Raman-Streuung kann in zwei Richtungen ablaufen. Zum einen ist es möglich, dass die Streuung an einem Teilchen in einem energetisch nicht angeregten Zustand ( $N_0$ ) stattfindet. In diesem Fall wird das Teilchen durch die inelastische Streuung auf ein virtuelles Energieniveau angeregt von welchem aus es in den nächst niedrigeren zugelassenen Zustand relaxiert ( $N_1$ ). Das gestreute Photon hat in diesem Fall eine geringere Frequenz (und somit Energie) als vor der Streuung. Es findet eine Rotverschiebung statt. Dieser Fall wird als Stokes-Raman-Streuung bezeichnet.<sup>[140, 142, 143]</sup>

Alternativ kann das Photon auf ein Teilchen im angeregten Zustand ( $N_1$ ) gestreut werden. Auch in diesem Fall wird es zu einer weiteren Anregung in ein virtuelles Energieniveau kommen. Anders als bei der Stokes-Raman-Streuung findet im Anschluss jedoch eine Relaxation auf ein geringeres Energieniveau als vor der Streuung statt; es kommt zu einem Energieübertrag vom Teilchen zum Photon. Es findet also eine Blauverschiebung statt, da das gestreute Photon eine höhere Frequenz als vor der Interaktion mit dem Teilchen aufweist. Dieser Fall wird als anti-Stokes-Raman-Streuung bezeichnet.<sup>[140, 142, 143]</sup>

### III. Kenntnisstand

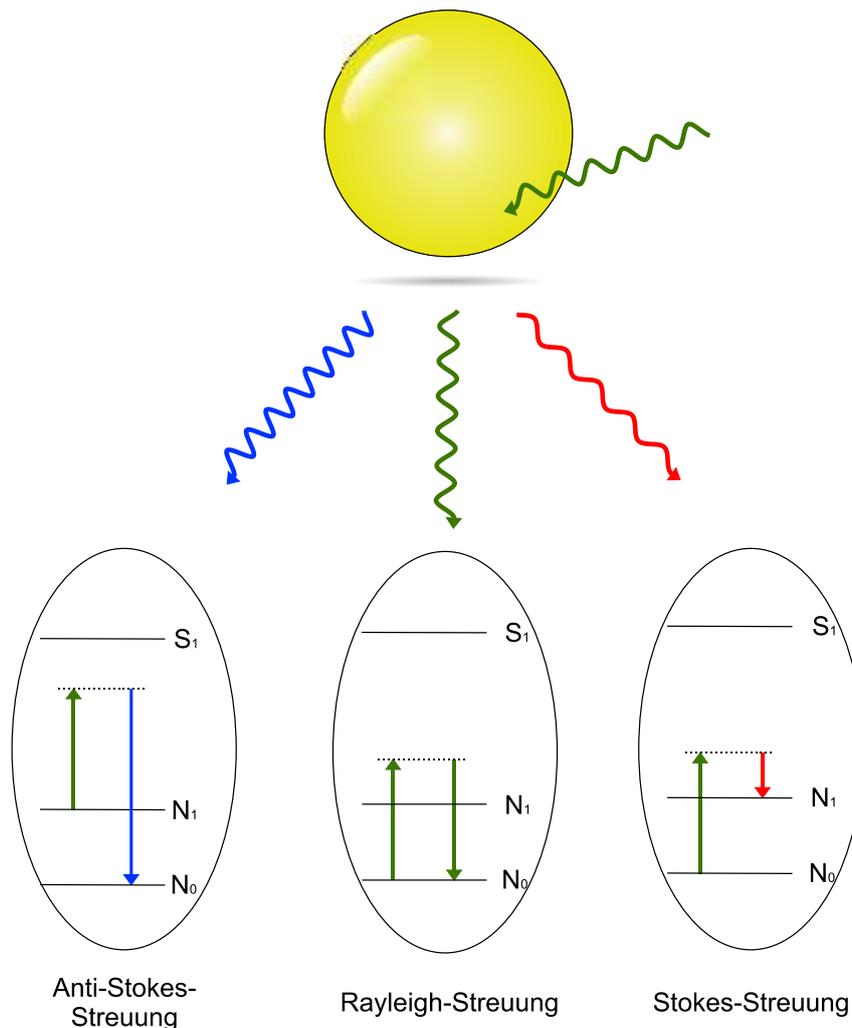


Abbildung III.4.-1: Vergleich der Energieniveaus der streuenden Teilchen vor und nach der Interaktion mit Licht im Fall einer Rayleigh-Streuung, sowie einer Stokes- und anti-Stokes-Raman-Streuung.

Die anregende Lichtquelle, meist ein Laser, muss monochromatisch sein, da sich aus den Differenzen der Energielevel der gestreuten Photonen verglichen mit dem einfallenden Licht die Schwingungs- und Rotationsenergien der betrachteten Teilchen bestimmen lassen. Dies ist der Fall, da diese den Energien der Rot- oder Blauverschiebungen entsprechen.<sup>[142, 144, 145]</sup>

#### **III.4.2.2 Messgeometrie**

Die Messgeometrie wird durch die spezifischen Anforderungen der Messmethode definiert. So unterscheidet sie sich etwa von der IR-Spektroskopie dadurch, dass für die Anregung der Probe i.d.R. ein Laser verwendet werden muss. Insgesamt ist der Aufbau eines Raman-Spektrometers darauf ausgelegt, eine kontrollierte und stabile Lichtquelle bereitzustellen, das Streulicht zu sammeln und zu streuen und die Raman-Spektren der Probe genau erfassen und analysieren zu können.

### III. Kenntnisstand

Ein Raman-Spektrometer besteht in der Regel aus folgenden Hauptkomponenten:<sup>[140, 146]</sup>

1. **Lichtquelle:** Die Raman-Spektroskopie verlässt sich zur Anregung der Probe zumeist auf Laser; in der Regel mit einer Wellenlänge die im Bereich des sichtbaren Lichts oder im NIR-Bereich liegt. Laser werden verwendet, um eine monochromatische Anregung nutzen zu können und da die Empfindlichkeit des Raman-Effekts verglichen mit der der IR-Spektroskopie um den Faktor  $10^{-4}$  geringer ist.
2. **Optik:** Der Lichtstrahl wird durch ein System aus Spiegeln, Linsen und Filtern durch die Apparatur gelenkt und auf die Probe fokussiert, um anschließend wieder eingefangen und auf den Detektor gelenkt zu werden.
3. **Probekammer:** Die Kammer ist so konzipiert, dass die Probe während der Messung stabil gelagert wird, wodurch die spektrale Auflösung verbessert wird. Je nach Gerät und Anforderungen der Probe können Temperatur und Atmosphäre reguliert werden.
4. **Spektrometer:** Das von der Probe gestreute Licht wird in ein Spektrometer geleitet. Das Spektrometer besteht aus einem Beugungsgitter oder einem Prisma, welches das Licht in seine verschiedenen Wellenlängen aufteilt. Das gestreute Licht wird dann von einem Detektor erfasst.
5. **Detektor:** Heutzutage werden zumeist CCD-Detektoren (Charge-Coupled Device) oder PMTs (Photomultiplier Tubes) verwendet. Die Funktion der Detektoren ist grundlegend die gleiche: sie sammeln das von der Probe gestreute Licht und messen die Intensität bei unterschiedlichen Wellenlängen. Anschließend wandeln sie es in ein elektrisches Signal um, welches dann von einer Software analysiert werden kann.<sup>[144]</sup>

Das in dieser Arbeit verwendete Raman DXR3 xi Raman-Mikroskop der Firma *Thermo Scientific* verfügt über einen CCD-Detektor, welcher in der Lage ist bis zu 1000 Spektren pro Sekunde aufzunehmen. Derartig schnelle Spektrenaufnahmen sind für Anwendungen im Klebstoffbereich interessant, da sie es ermöglichen auch schnell ablaufende Reaktionen wie photogetriggerte Thiol-En-Reaktionen, welche im Bereich der Klebstoffaushärtung gängig sind, zu verfolgen. Zudem ist durch so die Aufnahme vieler Spektren in kurzer Zeit auch eine Verbesserung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses ohne massive Erhöhung der Messzeiten möglich, wodurch die Betrachtung schwacher Banden wie jener der Disulfide oder Thioether erleichtert wird.

### III. Kenntnisstand

Auch der Einsatz von Raman-Mikroskopen ist gängig. Diese unterscheiden sich im grundlegenden Aufbau nur geringfügig vom Spektrometer. Allerdings verfügen Mikroskope über einige zusätzliche optische Komponenten, die eine orts aufgelöste Analyse und Bildgebung ermöglichen und eine detaillierte Charakterisierung kleiner Regionen innerhalb einer Probe erlauben. Als Mikroskope enthalten sie ein Objektiv, welches notwendig ist, um das Laserlicht auf die Probe zu fokussieren und das Streulicht zu sammeln. Zudem haben Raman-Mikroskope für gewöhnlich einen Scanning-Mechanismus und ein bildgebendes System.<sup>[147-149]</sup>

Der Scanning-Mechanismus ermöglicht es, Raman-Spektren von verschiedenen Stellen der Probe zu erfassen. Diese Scanning-Fähigkeit ist für die Erstellung von räumlich aufgelösten Raman-Karten oder -Bildern unerlässlich.<sup>[144, 150, 151]</sup> Die räumlich aufgelösten Raman-Spektren können zur Visualisierung und Analyse der chemischen Zusammensetzung und Verteilung innerhalb der Probe verwendet werden.<sup>[147, 149]</sup> Dies stellt ebenfalls eine attraktive Eigenschaft für die Klebstoffforschung dar, da so ein detaillierter Blick auf Verklebungen geworfen werden kann und Inhomogenitäten, Probleme bei der Substratbenetzung oder andere Faktoren untersucht werden können, welche einen (negativen) Einfluss auf die Klebekraft darstellen.

#### **III.4.3 Raman-Spektroskopie im Vergleich mit IR-Spektroskopie**

Sowohl bei der Raman- als auch der IR-Spektroskopie handelt es sich um schwingungsspektroskopische Methoden zur Untersuchung molekularer Zusammensetzungen bzw. der Aufklärung molekularer Strukturen.<sup>[142]</sup> Sie unterscheiden sich jedoch in der Art und Weise, wie sie Molekülschwingungen untersuchen, und in der Art der Informationen, die sie liefern. So zeigen Raman- und IR-Spektroskopie unterschiedliche Stärken und Schwächen beim Nachweisen von funktionellen Gruppen. Dabei komplementieren sie sich jedoch oftmals. Im Folgenden wird beschrieben nach welchen Kriterien die geeignete Wahl zwischen diesen beiden Methoden getroffen werden kann.

Zunächst einige allgemeine Aspekte: Die IR-Spektroskopie zeichnet sich gegenüber der Raman-Spektroskopie durch ihre Messgeschwindigkeit und -einfachheit aus. Raman-Messungen dauern meist länger und müssen an die Probe angepasst werden (Wahl des Lasers, Laserstärke, Belichtungsdauer und Zahl der Scans), während IR-Messungen in

### III. Kenntnisstand

aller Regel mit einer Standard-Methode vermessen werden können. Die IR-Spektroskopie ist zudem bei der Vermessung von Gasen überlegen.

Für die Auswahl einer Methode müssen diverse Faktoren berücksichtigt werden. Im Anschluss sollen zwei zentrale Faktoren besprochen werden: Die zu betrachtende funktionelle Gruppe und die Farbe bzw. Transparenz der Probe.

Das wichtigste Auswahlkriterium stellt die funktionelle Gruppe von Interesse dar. Funktionelle Gruppen haben unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber beiden Methoden, was dazu führt, dass diese unterschiedlich starke Banden erzeugen.<sup>[146, 152]</sup> Allgemein gilt, dass die Polarität einer Gruppe über ihre Sichtbarkeit im IR entscheidet, während Raman-Sensitivität mit steigender Polarisierbarkeit zunimmt. Dies bedeutet, dass unpolare Bindungen und funktionelle Gruppen mit großen Atomen oftmals besser im Raman-Spektrum zu erkennen sind, während polare Bindungen und funktionelle Gruppen mit Atomen der ersten beiden Perioden eine stärkere Bande im IR-Spektrum abgeben.<sup>[146, 152]</sup>

Daraus ergibt sich, dass die Thiol-Gruppe des Cysteins besser im Raman-Spektrum zu erkennen sein wird, da der enthaltene Schwefel eine große Elektronenhülle besitzt und die S-H-Bindung nicht stark polarisiert ist.<sup>[140, 144, 153]</sup> Wird Cystein zum Disulfid oxidiert, ist die resultierende Bindung gänzlich unpolar und besteht zwischen zwei Schwefelatomen; die Disulfidbande wird also im Raman-Spektrum besser zu erkennen sein.<sup>[154, 155]</sup> Wird das Cystein jedoch zur Cysteinsäure oxidiert, ist die Sulfit-Gruppe durch die drei gebundenen Sauerstoffatome stark polarisiert, sodass hier eine Vermessung mittels IR vielversprechender ist.<sup>[156]</sup>

Neben der funktionellen Gruppe ist auch die Farbe bzw. Transparenz der Probe ein wichtiger zu betrachtender Faktor. Die IR-Spektroskopie wird hierdurch nicht oder nur geringfügig beeinflusst. Die Raman-Spektroskopie hingegen zeigt die besten Ergebnisse für transparente oder helle Proben, da sie empfindlich gegenüber Untergrundfluoreszenz ist, welche meist effektiver als die Raman-Streuung ist, sodass diese die Raman-Banden überlagert. Dies kann durch Photobleaching, durch längerfristige Exposition der Probe gegenüber dem Laser, minimiert werden, jedoch muss dafür die Probe für längere Zeit mit dem Laser beschossen werden was bei stark absorbierenden Proben (dunklen Proben) zu einer starken Aufheizung oder gar zur Verbrennung der Probe führen kann.<sup>[140]</sup>

### III. Kenntnisstand

Ein dritter, entscheidender Faktor fällt an, wenn Proben in Lösung vermessen werden sollen. Meist ist die Konzentration des Lösemittels größer als jene der Probe. Daher kann es schnell zu einer Überlagerung der Proben-Signale durch die Lösemittel-Signale kommen. Unpolare Lösemittel wie Alkane sind also bei Raman-Messungen kritisch. Ein großer Vorteil ergibt sich jedoch beim Vermessen von wässrigen Proben. Wasser gibt eine starke Bande im IR-Spektrum ab, wodurch das Messen von wässrigen Proben mittels IR massiv erschwert wird. Durch seine Polarität zeigt Wasser jedoch keine starke Raman-Streuung, weshalb das Messen wässriger Proben mittels Raman-Spektroskopie unproblematisch ist.

Die Methodenwahl muss also basierend auf der Polarität bzw. Polarisierbarkeit der zu betrachtenden funktionellen Gruppe getroffen werden. Daneben ist auch die Farbe bzw. Transparenz der Probe entscheidend, da es bei der Raman-Spektroskopie durch den Einsatz eines Lasers schnell zu Untergrundfluoreszenz und dem Aufheizen der Probe kommen kann.

## IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Die Entwicklung des Hydrolyseprotokolls verlief, im Zuge des KERAbond-Projekts, im engen Austausch zwischen der Henkel AG & Co. KGaA und dem Fraunhofer-Institut für Grenzflächen-und Bioverfahrenstechnik IGB sowie dem Fraunhofer-Zentrum für Chemisch-Biotechnologische Prozesse CBP als wirksame Zusammenarbeit, gemäß der Förderfibel der FNR und der Definition des Unionsrahmens für staatliche Beihilfen zur Förderung von Forschung, Entwicklung und Innovation der Europäischen Union.<sup>[157]</sup>

Die Laborarbeiten zur Entwicklung sowie dem Upscaling der Keratin-Hydrolyse geschahen im Zuge einer parallel laufenden Promotion und fanden an den beiden genannten Fraunhofer-Instituten statt. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dem Beisteuern von Analytik, sowie mit der Aufarbeitung, Anwendung und Reduktion der KHPs – diese Ergebnisse werden überwiegend in den Kapiteln V.1 bis V.8 besprochen.

Zwar ist der angestrebte Hydrolyseprozess zur Darstellung von KHPs (Keratinhydrolyseproteinen) mit relativ geringem Molekulargewicht und freien Thiolen eine Neuheit, doch wurden in den letzten Jahren bereits mehrfach Prozesse zur Hydrolyse von Keratinen entwickelt. Hierdurch besteht bereits ein Wissensschatz aus welchem geschöpft werden kann. Daher konnte die Entwicklung des Hydrolyseprozesses auf drei Hauptsäulen heruntergebrochen werden. Dabei handelt es sich um die Untersuchung von: a) Reduktionsmitteln, b) Enzymen und c) chaotropen Reagenzien. Weiter bedurfte es selbstverständlich auch der Optimierung der Reaktionsbedingungen, sowie der Aufarbeitung. In Abbildung IV-1 wird eine Übersicht der über zwei Jahre, in einer Vielzahl von Experimenten optimierten und aufeinander abgestimmten Faktoren der Prozessentwicklung bzw. -optimierung gegeben.

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

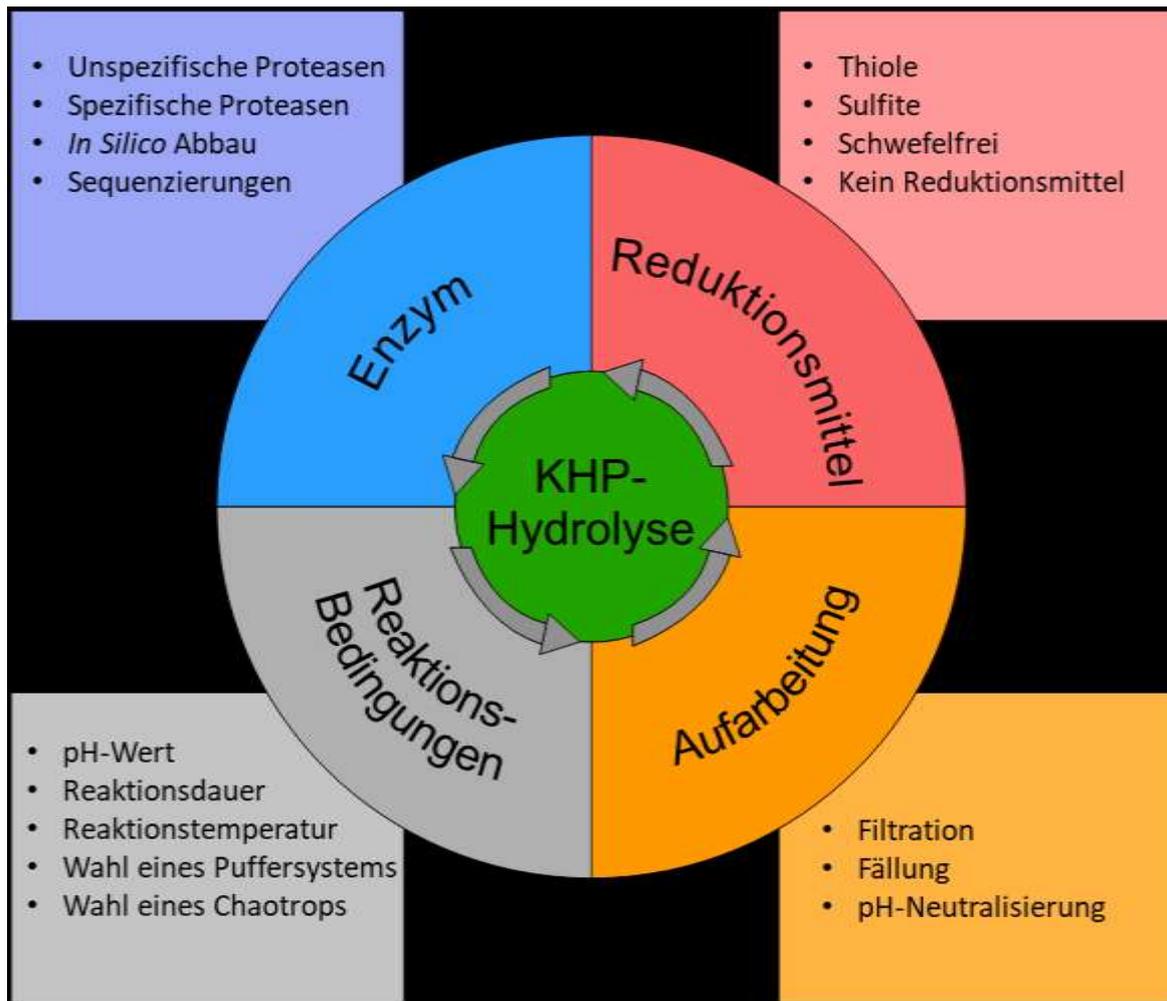


Abbildung IV-1: Die Abbildung zeigt die für die Hydrolyse betrachteten Faktoren, eingeordnet in vier übergeordnete Gebiete. Diese Gebiete sind die Wahl eines Reduktionsmittels, die Wahl eines Enzyms, die Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen, sowie die Aufarbeitung nach der Hydrolyse. Wie durch die Pfeile indiziert, war es notwendig die einzelnen Faktoren in einer Vielzahl von Experimenten immer wieder aufeinander abzustimmen.

Bevor eine Untersuchung der Hydrolysebedingungen möglich war, musste zunächst eine Reinigung sowie eine Zerkleinerung der Federn etabliert werden. Die Federn wurden ungereinigt von einem Schlachthof bezogen und sind daher mit Blut, Exkrementen und weiterem Schmutz kontaminiert, wodurch sie einen guten Nährboden für Keime darstellen. Daher mussten die Federn vor der weiteren Behandlung zum Schutz der im Labor befindlichen Menschen und des Substrats, sowie zur Verhinderung einer möglichen Zersetzung durch Mikroorganismen, dekontaminiert werden. Gemäß den Vorgaben, des Gesetzgebers, erfolgte dies durch Autoklavierung (121 °C, 2 atm, 15 min). Nach der Autoklavierung wurden die Federn bei -20 °C gelagert.

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Die Autoklavierung befreit die Federn von Keimen, wodurch keine Gesundheitsgefährdung mehr möglich ist und eine mikrobielle Zersetzung der Federn während der Lagerung ausgeschlossen werden kann. Die Verunreinigungen werden auf diese Weise jedoch nicht entfernt, weshalb die Federn im Anschluss an die Autoklavierung durch Waschen in einem Waschtrockner mit einem Basiswaschmittel ohne Enzyme oder sich auf den Federn ablagernden Zusätzen bei 30 °C gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Federn für mehrere Tage an der Luft getrocknet, da die Federn nach dem Waschvorgang noch Restfeuchte enthielten.

Die autoklavierten, gewaschenen und getrockneten Federn konnten dann in einem handelsüblichen Küchenmixer zerkleinert werden. Die zerkleinerten Federn wurden anschließend luftdicht in Plastikbeuteln verpackt und bis zur weiteren Nutzung bei Raumtemperatur gelagert.

Für die anfängliche Entwicklung eines Hydrolyseprotokolls konnte sich zunächst an Wissen aus der Literatur orientiert werden. Von der Vielzahl bereits etablierter Keratin-Hydrolysemethoden wurde, aufgrund der an die KHPs gestellten Anforderungen (freie Thiole) zunächst für eine reduktive Hydrolysemethode als Vorlage gewählt. Als Vorbild diente die Arbeit von *Xu et al.*, in welcher Federkeratin in einer 8 M Harnstofflösung mit 10 % (w/w) Cystein-Lösung reduziert wurde. Die Hydrolyse fand dort bei einem pH von 10,5 und einer Temperatur von 70 °C statt. Die Hydrolysedauer betrug zwölf Stunden.<sup>[158]</sup>

In einer Adaption der Methode von *Xu et al.* wurden Hühner- oder Gänsefedern mit einer wässrigen, Harnstoff-haltigen Reduktionslösung versetzt. Nach der Hydrolyse folgte eine Fest-Flüssig-Trennung; beide Phasen wurden danach analysiert. Neben dem von *Xu et al.* eingesetzten Cystein, dessen Fähigkeit Hühnerfedern zu zersetzen bestätigt werden konnte, wurde noch eine Reihe weiterer Reduktionsmittel untersucht. Einige dieser Reduktionsmittel zeigten ebenfalls gute zersetzende Eigenschaften.

Untersucht wurden insgesamt zwölf Reduktionsmittel. Dabei wurden die besten Ausbeuten, in Übereinstimmung mit den Befunden der Literatur, beim Einsatz von Thiolen oder Sulfiten erreicht. Sulfiten zeigen zwar ein starkes Reduktionspotential für Disulfide, jedoch sind sie auch in der Lage Bunte-Salze zu erzeugen,<sup>[55, 159]</sup> wodurch ihr Einsatz für KERAbond nicht optimal ist.

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Durch die Anforderung an die Peptide, freie Thiole zu enthalten, kommen für die Entwicklung der Hydrolyse nur jene Reduktionsmittel in Frage, welche in der Lage sind Disulfide selektiv in Thiole zu spalten. Reduktionsmittel, die dazu nicht im Stande sind, dienen hier lediglich als Referenz für die Zersetzungseffektivität. Auch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) vermag lediglich als Referenz zu dienen, da es auf Grund seines hohen Kostenpunkts und seiner Sauerstoffempfindlichkeit ausscheidet, weil diese Eigenschaften einen Einsatz im großen Maßstab verbieten.

Die Ergebnisse der Literatur, dass hohe Konzentrationen chaotroper Reagenzien (vorwiegend Harnstoff) notwendig sind um die Hydrolyse von Keratin zu begünstigen konnten ebenfalls in einer Reihe von Versuchen bestätigt werden. Daraus folgt, dass für eine effektive chemische Hydrolyse große Mengen Chemikalien eingesetzt und später entfernt werden müssen. Da der Hydrolyseprozess in größerem Maßstab stattfinden und dabei kostengünstig soll, wurden als nächstes Alternativen zur hydrolytischen Zersetzung von Keratin gesucht. Hierbei fiel der Fokus auf eine enzymatische Zersetzung der Hühnerfedern.

Ein Blick auf die Aminosäuresequenz von CFK 1 zeigt, dass sich am *N*-terminalen Ende eine 23 Aminosäuren lange Domäne befindet, die fünf der acht Cysteine enthält. Dieser Domäne folgt eine Region, welche einen starken Hang zur Ausbildung von  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweist. Idealerweise wäre es möglich, am Übergang dieser beiden Domänen zu schneiden, sodass die cysteinreiche Aminosäuresequenz erhalten bleibt. Hierfür wurde eine Reihe spezifischer und unspezifischer Proteasen untersucht.

Für die enzymatische Hydrolyse wurden zunächst unspezifische Proteasen getestet. Hierfür wurden vier Subtilisin-artige Enzyme untersucht. Umfangreiche Untersuchungen zur Qualifizierung der einzelnen Proteasen, sowie zur Hydrolysedauer zeigten ein Optimum des Hydrolysezeitraums bei 16 – 19 h und, dass alle betrachteten Enzyme eine deutlich größere Menge Keratin in Lösung zu bringen vermochten, als dies in den Negativkontrollen beobachtet wurde. Jedoch wiesen die unspezifischen Proteasen auch hohe Anteile nicht eindeutig identifizierbarer Verbindungen auf (bis zu 28 % (w/w)). Durch Umsetzung mit Ninhydrin und anschließender UV/VIS-spektroskopischer Betrachtung bei 570 nm konnte das Vorhandensein von Aminofunktionalitäten nachgewiesen werden, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass es sich, zumindest in Teilen, um freie Aminosäuren handelt.

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Der hohe Anteil freier Aminosäuren weist auf eine starke Zersetzung des Peptidrückgrads hin. Da lediglich Peptidoligomere mit einem möglichst hohen Anteil an Cystein im Sinne des KERAbond-Projekts liegen, sollen hohe Anteile niedermolekularer Verbindungen wie freier Aminosäuren vermieden werden. Aus diesem Grund wurden als nächstes spezifische Proteasen auf ihre Keratin-Hydrolyse-Eigenschaften untersucht.

Basierend auf dem Hydrolyseprotokoll der unspezifischen Proteasen wurden als nächstes Hydrolysen mit spezifischen Proteasen über 19 h durchgeführt. Es wurden vier Enzyme je ohne Reduktionsmittel und mit Natriumsulfit getestet. Das Natriumsulfit diente zur Kontrolle, ob ein reduktives Milieu durch eine etwaige Spaltung der Disulfide eine verbesserte Hydrolyseeffektivität bietet. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, gegen die die vier Enzyme verglichen wurden. Von den getesteten Enzymen brachten Papain und Trypsin etwa die Hälfte der eingesetzten Masse in Lösung und waren damit die effektivsten. Die Zugabe von Natriumsulfit führte in allen Fällen zu einer Erhöhung der Ausbeute.

Um eine Entscheidung für die Wahl der Protease für das finale Hydrolyseprotokoll zu treffen, wurde die theoretische Fragmentierung des Keratins bei einem Verdau mit den unterschiedlichen Enzymen errechnet. Hierbei erwies sich Trypsin als am besten geeignet, da es zwei interessante Polythiol-Fragmente erzeugen würde. Hierdurch fiel die Wahl auf Trypsin, da dieses nach dem *in silico* Verdau zwei Peptidfragmente, welche im Sinne des KERAbond-Projekts sind, als Hauptfragmente aufweisen sollte.

Ein weiterer Vorteil des Trypsins ist, dass es keine hochspezifischen Anforderungen für eine effektive Hydrolyse stellt. Daher konnte hier mit einem 50 mM Kaliumphosphat-Puffer bei pH 7,8 gearbeitet werden. Der Einsatz eines Reduktionsmittels oder eines denaturierenden Reagenzes war nicht notwendig. Daher wurde die Betrachtung der Reduktion des Keratins im Anschluss an die Hydrolyse bevorzugt. Diese ist Teil dieser Arbeit und wird in Kapitel V.6 behandelt.

Basierend auf den erzeugten Daten musste nun ein finales Hydrolyseprotokoll für das Upscaling bestimmt werden, damit größere Mengen Federnhydrolysat zur weiteren Charakterisierung und für grundlegende Anwendungstests erzeugt werden konnten. Die meisten grundlegenden Parameter standen bereits fest (50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8, Konzentration Trypsin 1,18 g/l), die Dauer der Hydrolyse wurde auf 16 h bis 19 h festgelegt, da diese bereits ausreichen einen Großteil des Proteins in Lösung zu bringen.

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Zwar bewirkt eine höhere Hydrolysedauer auch einen Anstieg in der Ausbeute der in Lösung gebrachten Peptide, jedoch in einem unökonomischen Verhältnis. Der finale Prozess ist schematisch in Abbildung IV-2 dargestellt.

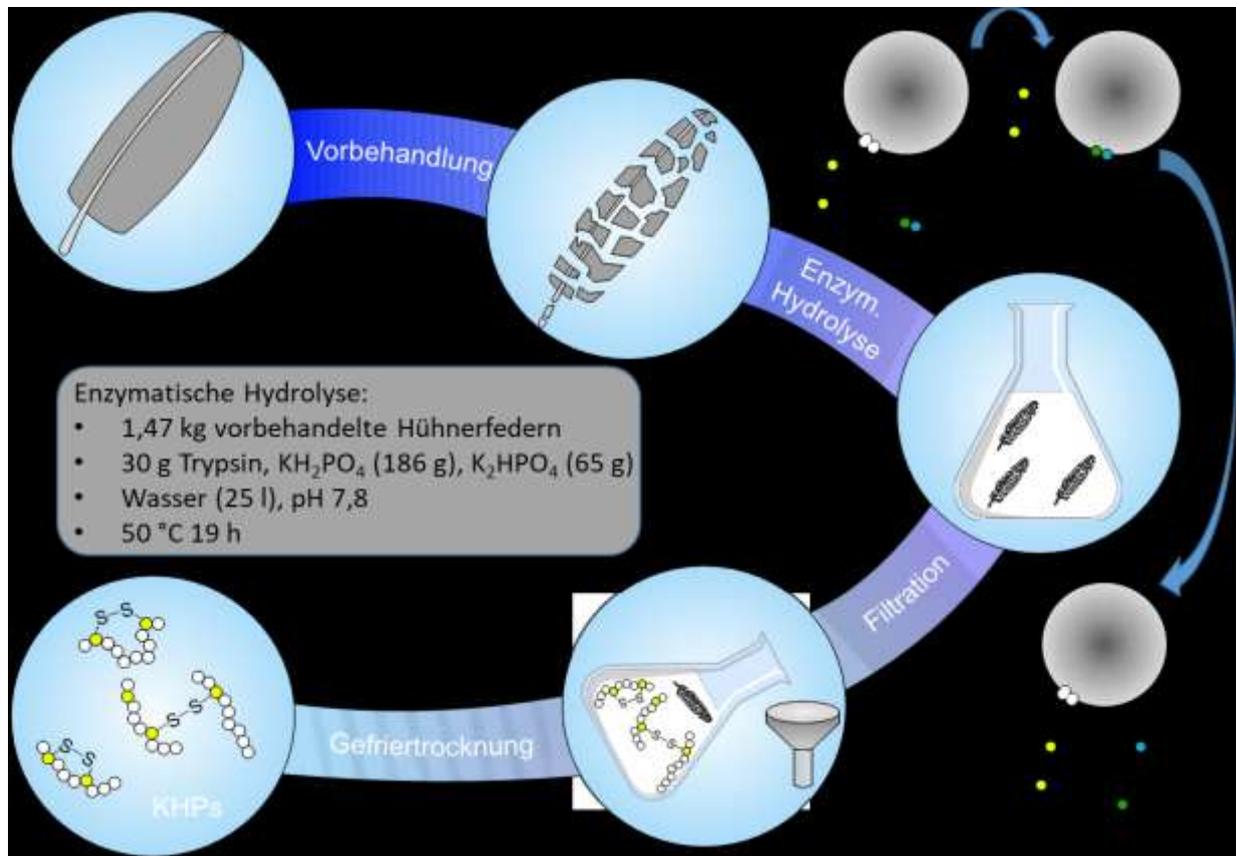


Abbildung IV-2: Schematische Übersicht über den KERAbond-Hydrolyseprozess.

Basierend auf den Arbeiten von *Kurz et al.*<sup>[160]</sup> und *Hansen et al.*<sup>[161]</sup> konnte, während der Entwicklung der Keratin-Hydrolyse, eine HPLC-Methode zur Bestimmung von Thiol- oder Disulfidgehalten in KHP-Proben entwickelt werden. Dazu wurde zunächst eine L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat Lösung (10 mM) in vollentsalztem Wasser angesetzt, aus welcher dann eine Konzentrationsreihe von L-Cystein-Hydrochlorid-Monohydrat Lösungen mit Konzentrationen zwischen 5 mM und 5  $\mu\text{M}$  als Standards hergestellt wurde. Ebenfalls wurde eine 4,4'-Dithiodipyridin (DTDP)-Lösung (40 mM in vollentsalztem Wasser) nach *Kurz et al.*<sup>[160]</sup> und eine Pufferlösung bestehend aus Guanidin-Hydrochlorid (6 M), Phosphat (100 mM) und EDTA (0,2 mM) bei pH 5 in vollentsalztem Wasser angesetzt.

Die Proben für die Thiolgehaltsbestimmung wurden dann hergestellt aus 100  $\mu\text{L}$  Probe oder Cystein-Standard, 1850  $\mu\text{L}$  Pufferlösung, sowie 50  $\mu\text{L}$  40 mM 4,4'-Dithiodipyridin-

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

Lösung. Nach Durchmischung der Probe wurde diese für 10 Minuten bei RT und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Vor der Untersuchung mittels HPLC wurde die Probe durch einen Spritzenfilter (0,2 µm) filtriert. Das Probenvolumen betrug 1 mL.

Vor die HPLC-Messung konnte eine Reduktion der Probe mittels NaBH<sub>3</sub> geschaltet werden. Durch die Behandlung mit NaBH<sub>4</sub> wurden Disulfide zu Thiolen reduziert. Auf diese Weise konnte durch den Vergleich der Thiol-Gehalte aus Messungen von Proben mit und ohne Reduktion der Gehalt von freien und als Disulfiden gebundenen Thiolen bestimmt werden.

Das Prozess-Upscaling wird als Teil der parallelen Doktorarbeit des KERAbond-Projekts Gegenstand dieser in naher Zukunft durch Fraunhofer IGB veröffentlichten Doktorarbeit sein und liefert keine für das Verständnis der weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse notwendigen Informationen, sodass dieses hier nicht weiter ausgeführt werden muss.

Im Zuge der in dieser Arbeit weiter beschriebenen Forschung stellte sich die durch die enzymatische Hydrolyse, bzw. den Kaliumphosphat-Puffer verbliebene Salzfracht als störend, sowie schwierig zu entfernen heraus. In den Kapiteln V.3 und V.4 wird dies ausführlich behandelt. Auf Basis der in diesen Kapiteln beschriebenen Ergebnisse vollzog Fraunhofer IGB eine Umstellung der Keratin-Hydrolyse von einem Kaliumphosphat- auf einen Natriumcarbonat-Puffer. Die Idee hinter dieser Umstellung liegt in der Möglichkeit, Carbonate durch Ansäuern auszugasen begründet. Die Effektivität dieser Desalinierungsmethode wird gegenwärtig untersucht. Der Carbonat-Puffer erwies sich jedoch insofern schon als eine gute Alternative, dass durch den Wechsel eine Steigerung der Ausbeute an gelöstem Federprotein gelang. Da die Prozessumstellung jedoch erst durch die hier beschriebenen Ergebnisse initialisiert wurde und weiterer Forschung bedurfte wurden für die im weiteren Verlauf der Arbeit beschriebenen Ergebnisse mit den Kaliumphosphat-KHPs erzeugt.

Der KERAbond-Hydrolyseprozess ist das Ergebnis der Zusammenarbeit zwischen der Henkel AG & Co. KGaA und dem Fraunhofer IGB im Rahmen des Forschungsprojekts KERAbond.

Am Fraunhofer IGB wurde der Hydrolyse-Prozess entwickelt und vom Labor- in den technischen Maßstab skaliert. Begleitend dazu wurden dort eine schnelle Analytik für

#### IV. Vorarbeiten und Ergebnisse des Projektpartners: der KERAbond-Hydrolyseprozess

peptidgebundene Thiole und Disulfide etabliert und komplementäre Materialentwicklungen vorangetrieben. Dies fand im Rahmen einer am Fraunhofer IGB durchgeführten Doktorarbeit statt. Die dabei erhaltenen KHPs wurden für die hier vorliegende Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklung des Hydrolyseprozesses durch Analytik (Raman-Spektroskopie, REM, Salzgehalt-Bestimmung, Löslichkeitsverhalten) unterstützt und durch Anwendungstests und Versuche zur Optimierung (Filmbildung, Desalinierung, Reduktion) erweitert. Zwischen dem Fraunhofer IGB und der Henkel AG & Co. KGaA wurde eine wirksame Zusammenarbeit umgesetzt.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist die Betrachtung schwefelhaltiger Verbindungen auf ihren potentiellen Nutzen für Klebeanwendungen. Als Teil des KERAbond-Projekts stellt das cysteinreiche Protein Keratin, bzw. dessen Hydrolysat, einen zentralen Teil dieser Betrachtungen dar. In den Kapiteln V.1 bis V.8 folgen die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der KHPs, welche nicht zwingend direkt anwendungsbezogen sind, jedoch ein besseres Verständnis der Peptide generieren. Besonderer Fokus liegt dabei auf den Cysteinen, welche mit ihrer Thiol-Gruppe für Anwendungen in verschiedenen Bereichen interessant sind. Abschließend folgt eine Betrachtung von Dithiolan-Verbindungen in den Kapiteln V.9 und V.10.

### V.1 KHP-Löslichkeit und -sequenzierung

Für ein besseres Verständnis des Ablaufs der in Kapitel IV beschriebenen Federnhydrolyse wurde zunächst die Hydrolyse nicht-zerkleinerter Federn untersucht, indem diese als Ganzes einer Hydrolyse unterzogen und anschließend im Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet wurden. Dabei wurde die Hydrolyse durch Fraunhofer IGB durchgeführt, die Mikroskopie war Teil der vorliegenden Arbeit. Die REM-Aufnahmen sind Abbildung V.1-1 zu entnehmen.

Aus den REM-Aufnahmen ist zu erkennen, dass die Hydrolyse der Federn an den Fahnen beginnt. Insbesondere die feinen Strukturen der Haken und Strahlen lösen sich als erstes auf. Dies ist insofern nicht überraschend, da diese die weniger starren Elemente einer Feder darstellen und ein größeres Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis aufweisen. Auch nach 48 h sind der starre Kiel, sowie die Bögen weitestgehend unbeeinträchtigt. Dieses Experiment unterstreicht die Wichtigkeit der Vorbehandlung der Federn; insbesondere der Zerkleinerung und evtl. auch der Autoklavierung, da so die Zugänglichkeit für hydrolysierende Chemikalien oder Enzyme erhöht wird.

Abgesehen vom oben beschriebenen Betrachtung ganzer Federn wurde im Zuge dieser Arbeit ausgehend von den KHPs gearbeitet. Bei diesen handelt es sich um ein gelblich-weißes Pulver (bzw. Flocken) mit geringer Schüttdichte. Da die Löslichkeit eines Substrats für fast alle seine potentiellen Anwendungen, sowie auch für die Möglichkeiten

## V. Ergebnisse und Diskussion

zur Charakterisierung, ausschlaggebend sind wurde zunächst die Löslichkeit der Peptide in unterschiedlichen Lösemitteln untersucht. Tabelle V.1-1 zeigt die Ergebnisse dieser Löslichkeitsuntersuchung. Die Löslichkeiten wurden bestimmt durch Lösen von je 100 mg KHPs in bis zu 10 ml Lösemittel. Unlösliche Anteile wurden anschließend abfiltriert, getrocknet und gewogen. Aus der Massendifferenz wurde die Löslichkeit errechnet.

Da zur Hydrolyse des Keratins eine 50 mM Kaliumphosphat-Lösung als Puffer eingesetzt wurde muss das nach der Hydrolyse verbleibende Salz, im Folgenden auch als Salzfracht bezeichnet, betrachtet werden. Zunächst ist es wichtig den Salzanteil an den erhaltenen KHPs zu bestimmen, dann muss im späteren Verlauf der Untersuchungen die Rolle des Salzes als eventueller Störfaktor betrachtet werden.

Zur Bestimmung des Salzgehalts wurden eine Röntgenfluoreszenzanalyse (RFA), sowie eine Ionenchromatographie (IC) mit den KHPs durchgeführt. Die RFA quantifiziert Elemente in einer Probe, während die IC in der Lage ist Ionen zu quantifizieren. Mittels RFA wurde der Phosphorgehalt auf 5,1 – 5,2 % (w/w) bestimmt. Die IC taxierte den Phosphatgehalt auf 15,1 % (w/w) in den KHPs, was sich mit dem gemessenen Phosphorgehalt deckt. Der hohe Restgehalt des Phosphats wirkt sich auf die in Tabelle V.1-1 gezeigten Löslichkeiten aus und hat auch Implikationen für die weiteren Eigenschaften der KHPs – etwa der Filmbildung. Diese werden in Kapitel V.3 ausführlicher behandelt. In Kapitel V.4 werden die Ergebnisse zu untersuchten Desalinierungsmethoden behandelt.

Tabelle V.1-1: Löslichkeit der KHPs in polaren organischen Lösemitteln und Wasser. Die korrigierte Löslichkeit bezieht sich auf die Netto-Peptid-Masse der KHPs, ohne das nach der Hydrolyse verbliebene Kaliumphosphat.

Lösemittel	Löslichkeit [g/l]	Korrigierte Löslichkeit [g/l]
Aceton	<1	<1
Methanol	4,1	3,49
Ethanol	<1	<1
Isopropanol	<1	<1
Acetonitril	<1	<1
THF	<1	<1
2-Methyl-THF	<1	<1
Xylol	<1	<1
DMF	4	3,4
DMSO	40	34
Wasser	>100	>100

## V. Ergebnisse und Diskussion

Wie Tabelle V.1-1 zu entnehmen ist, ist die Löslichkeit der KHPs in fast allen polaren Lösemitteln sehr schlecht. Unpolare Lösemittel wurden auf Grund der polaren Natur der Peptide nicht getestet. Dies wird dadurch bekräftigt, dass es nur die polarsten der getesteten Lösemittel vermögen, KHPs mit mehr als 1 g/L zu lösen. DMF und DMSO sind zwar vergleichsweise gute Lösemittel, bereiten aber durch ihre hohen Siedepunkte Schwierigkeiten bei der Entfernung der Lösemittel, was im Hinblick auf einen technischen Prozess ein potentiell Problem darstellt. Somit sind die vielversprechendsten Lösemittel für die Arbeiten mit KHPs Methanol und - je nach Anwendung - Wasser.

Tabelle V.1-2: Die häufigsten Peptide der KHPs, gemäß Sequenzierung durch *Proteom Factory*. Die Anteile wurden durch das Verhältnis der Peakflächen im Chromatogramm approximiert. Cysteine sind in den Peptidsequenzen farbig markiert.

Peptidsequenz	Anteil [%]
DL <b>C</b> RP <b>C</b> GP <b>T</b> PL	45,78
SCFDL <b>C</b> RP <b>C</b> GP <b>T</b> PL	8,37
AVGSILSEEGVPISSGGF	5,12
SEEGVPISSGGF	3,21
DL <b>C</b> RP <b>C</b> GP <b>T</b> PLAN	2,29
STSAAVGSILSEEGVPISSGGF	1,69
DL <b>C</b> RP <b>C</b> GP <b>T</b> PLANS <b>C</b> NEA <b>C</b> VR	1,53
SPFPQNTAVGSSTSA	1,52
VVIQSPVVVTLPGPILS	1,49
ILSEEGVPISSGGF	1,44

Nachdem die Löslichkeit der KHPs untersucht wurde, war es wichtig ein Verständnis dafür zu bekommen, wie die KHPs zusammengesetzt sind. Da die Peptide aus der Hydrolyse eines größeren Proteins stammen, sind diese nicht einheitlich. Daher wurde eine Sequenzierung zur Bestimmung der KHPs durchgeführt. Tabelle V.1-4 zeigt die zehn häufigsten Peptide, die nach der Sequenzierung in den KHPs enthalten sind, sowie ihren Anteil im Peptidgemisch.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass aus späteren Sequenzierungen, bei denen mit einer erweiterten Datenbank gearbeitet wurde, gänzlich andere Ergebnisse erhalten wurden. Dabei wurden in der Suche mit erweiterter Datenbank Peptide, die zuvor mit hohem Anteil detektiert wurden, nicht mehr gefunden, dafür jedoch andere Peptide, die aus demselben Protein stammen. Daher ist die Belastbarkeit dieser Sequenzierungsergebnisse nicht einwandfrei gegeben. Da dies jedoch keinen Einfluss auf die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit hat, werden sie hier dennoch angegeben. Ein

## V. Ergebnisse und Diskussion

Peptid, welches in dieser ersten Messung als das häufigste identifiziert wurde, wurde als exemplarischer Standard für die Raman-Charakterisierung in Kapitel V.2 genutzt. Dieses wird fortan als häufigstes Peptid oder synthetisches Peptid bezeichnet.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass ein Peptid (DLCRPCGPTPL) als der Großteil der Peptidmischung identifiziert wurde. Die Struktur dieses Peptids ist in Abbildung V.1-1 gezeigt. Insgesamt enthalten circa 60 % der Peptide mindestens ein Cystein.

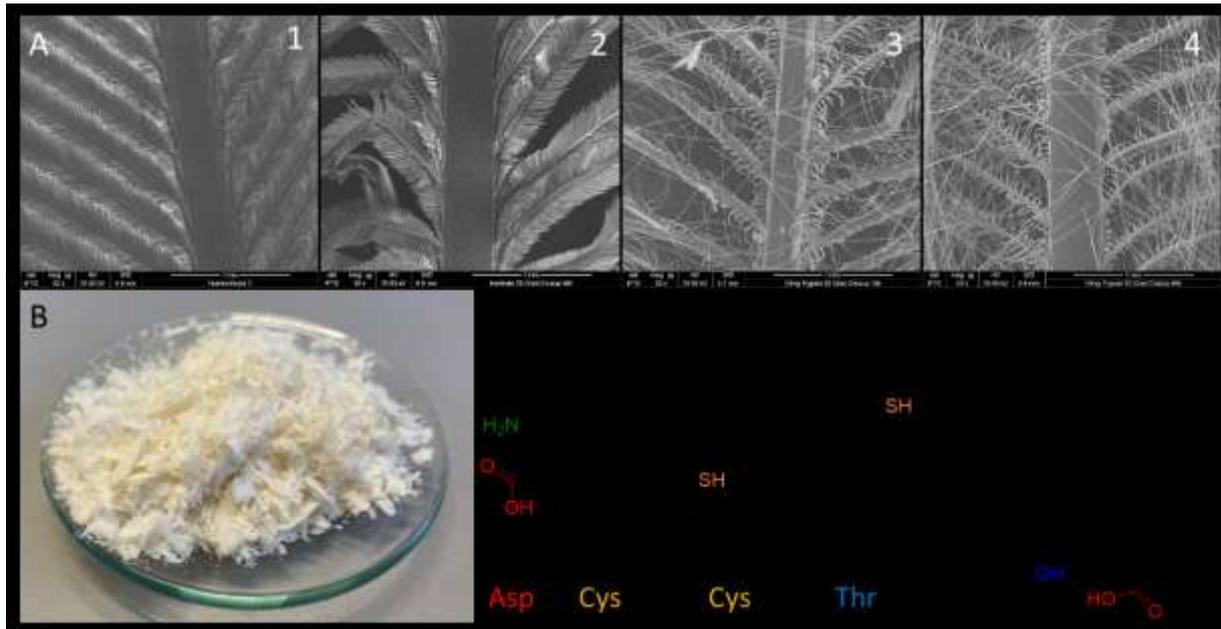


Abbildung V.1-1: A) REM-Aufnahmen einer unbehandelten Feder (1), der Feder aus der Negativkontrolle nach 48 h (2), einer der Trypsin-Hydrolyse unterzogenen Feder nach 16 h (3) und nach 48 h (4). B) Foto der KHPs nach der Gefriertrocknung. Die KHPs bilden in dieser Form eine Art Schuppenstruktur aus was zu einer sehr geringen Dichte des Materials führt. Das Foto wurde bereitgestellt von Fraunhofer IGB. C) Struktur des häufigsten Peptids der KHPs gemäß Sequenzierung. Cysteine sind der Übersichtlichkeit halber als freie Thiole dargestellt. Funktionelle Gruppen die sich für spätere Modifikationsreaktionen eignen sind farbig markiert.

Da das häufigste Peptid zwei Cysteine enthält, ist es sehr gut als Standard für die Charakterisierung der KHPs geeignet. Insbesondere für die Raman-Analytik, welche im folgenden Kapitel ausführlich behandelt wird, ist es sehr hilfreich, da es einen Ausschnitt aus Keratin darstellt, welcher jedoch nicht die starke Untergrundfluoreszenz aufweist, die Raman-Messungen von Keratin erheblich erschweren. Aus diesem Grund wurde eine synthetische Version des Peptids mit untersucht.

## V.2 Raman-Analyse der KHPs

Als cystein- und somit schwefelreiche Verbindung eignet sich Keratin gut zur spektroskopischen Untersuchung mittels Raman-Spektroskopie. Diese Spektroskopiemethode ermöglicht Charakterisierungen von Verbindungen bzw. Bindungen, welche in der Infrarotspektroskopie nicht oder nur schlecht analysiert werden können. Grund dafür ist ihre Sensitivität für polarisierbare Bindungen, welche im Keratin in Form von Disulfiden bzw. u.U. Thiolen gegeben sind. Daher ist einer der ersten Charakterisierungsschritte dieser Arbeit eine ausführliche Raman-Untersuchung des hydrolysierten Keratins, sowie ein Vergleich mit nativem Keratin in Form einer unbehandelten Feder. Dazu werden im Folgenden eine Hühnerfeder, KHPs, MeOH-KHPs (methanolisch aufgearbeitete KHPs, siehe Kapitel V.4) und eine synthetische Version des häufigsten Peptidfragments der KHPs (nach der Sequenzierung in V.1 bestimmt) miteinander verglichen. Abbildung V.2-2 zeigt die Spektren im Vergleich, die Tabellen V.2-1 und V.2-2 zeigen eine Auflistung der Banden mit Identifikation und Vergleich zur Literatur.

Bevor jedoch das Vermessen der Proben möglich war, musste zunächst eine Messmethode entwickelt werden. Dies war insofern schwierig, da die KHPs, als leicht farbige Verbindung, eine starke Untergrundfluoreszenz aufweisen welche die Signale der Peptide überdeckte. Von den zur Verfügung stehenden Lasern (455 nm, 532 nm und 785 nm) erwies sich der 532 nm Laser als am besten geeignet, da hier die Untergrundfluoreszenz am geringsten ausfiel und der Laser ein verhältnismäßig gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufweist. Dennoch überdeckte auch hier die Untergrundfluoreszenz zunächst die KHP-Banden. Daher wurde mit Photobleaching gearbeitet, indem die Probe vor dem Vermessen für mindestens 30 Minuten kontinuierlich mit dem Laser bestrahlt wurde. Der Effekt des Photobleachings über verschiedene Zeiträume ist in Abbildung V.2-1 dargestellt. Durch das Photobleaching wird die Untergrundfluoreszenz verringert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verbessert. Trotz der Verbesserung der Spektren-Qualität durch das Photobleaching kann dieses die Untergrundfluoreszenz nicht vollständig auslöschen, sodass die im folgenden gezeigten Raman-Spektren stets einer Basislinienkorrektur unterzogen wurden.

## V. Ergebnisse und Diskussion

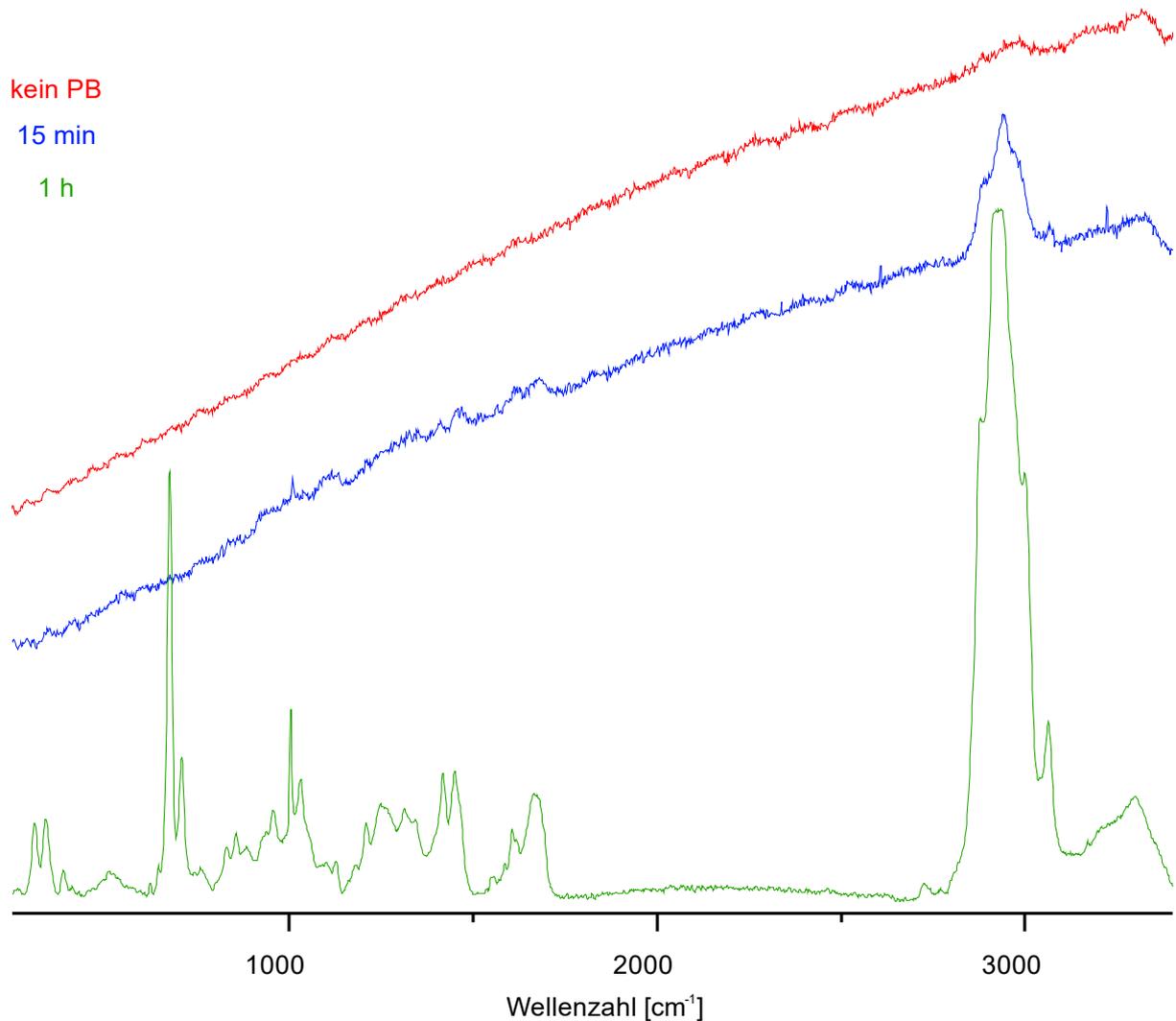


Abbildung V.2-1: Vergleich von KHP-Raman-Spektren nach unterschiedlich langer Photobleaching (PB)-Dauer. In rot ist das Spektrum der KHPs ohne Photobleaching dargestellt, das blaue Spektrum wurde nach 15 Minuten Photobleaching aufgenommen, das grüne nach einer Stunde. Das grüne Spektrum wurde ebenfalls einer Basislinienkorrektur unterzogen.

Die Abbildung zeigt den starken Einfluss den das Photobleaching, bzw. die Dauer des Photobleachings auf die Spektrenqualität besitzt. Das rote Spektrum wurde ohne Photobleaching aufgenommen; hier sind keine Banden klar zu erkennen, lediglich die besonders starke CH-Bande bei ca. 3000  $\text{cm}^{-1}$  kann erahnt werden. Nach 15 Minuten (blaues Spektrum) sticht diese Bande bereits stärker hervor und einige Banden im Fingerprintbereich heben sich bereits von der Untergrundfluoreszenz ab. Das grüne Spektrum zeigt die KHPs nach einer Stunde des kontinuierlichen Photobleachings, sowie einer durchgeführten Basislinienkorrektur – hier sind alle Banden klar zu erkennen und heben sich stark von der Basislinie ab. Daher wurden alle weiteren Spektren ebenfalls einem Photobleaching unterzogen bevor sie vermessen wurden. Die Dauer des

## V. Ergebnisse und Diskussion

Photobleachings ist für jede Probe individuell und wurde so gewählt, dass ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erreicht wurde, jedoch unterschritt sie niemals 30 Minuten.

Ein wichtiger und naheliegender Punkt der Untersuchung ist der Zustand des Cysteins, bzw. ob dieses als freies Thiol, oder als Disulfid vorliegt. Ein Blick auf die Spektren verrät, dass lediglich das synthetische Peptid eine Thiol-Bande bei  $2573\text{ cm}^{-1}$  aufweist. In der natürlichen Form liegt Keratin als Strukturprotein stets in der oxidierten Disulfidform vor – die Disulfide sind es, welche die stabilisierende Wirkung haben, da so eine konformative Starrheit erreicht werden kann wie es mit nicht-kovalenten Bindungen nicht möglich ist. Dies ist auch im Spektrum der Feder (blau) zu erkennen, in welchem lediglich die Disulfidbande bei  $516\text{ cm}^{-1}$  auftritt. Auch die Spektren der KHPs (grün) und MeOH-KHPs (rot) zeigen keine Bande bei  $2573\text{ cm}^{-1}$ , lediglich Disulfidbanden, welche leicht verschoben sind im Vergleich zur Feder ( $510\text{ cm}^{-1}$ ), finden sich im Spektrum. Die Verschiebung der Disulfidbanden kann neben dem breiten Charakter der Disulfidbande, welcher eine kontinuierlich gleiche Lokalisierung der Bande erschwert, auch auf die Hydrolyse des Proteins zurückgeführt werden, da durch diese neue konformative Freiheiten gewonnen werden.

Neben den Schwefel-bezogenen Banden ist ein weiterer offensichtlicher Unterschied zwischen den Spektren das Fehlen einer olefinischen  $\nu(\text{CH})$ -Schwingung im Spektrum des synthetischen Peptids. Bei diesem handelt es sich um eine Repräsentation des durch die Sequenzierung am häufigsten vorkommenden identifizierten Peptid – ein Blick auf die Struktur verrät, dass dieses Peptid keine olefinischen Bindungen enthält, sodass die Abwesenheit der Bande nicht überrascht.

## V. Ergebnisse und Diskussion

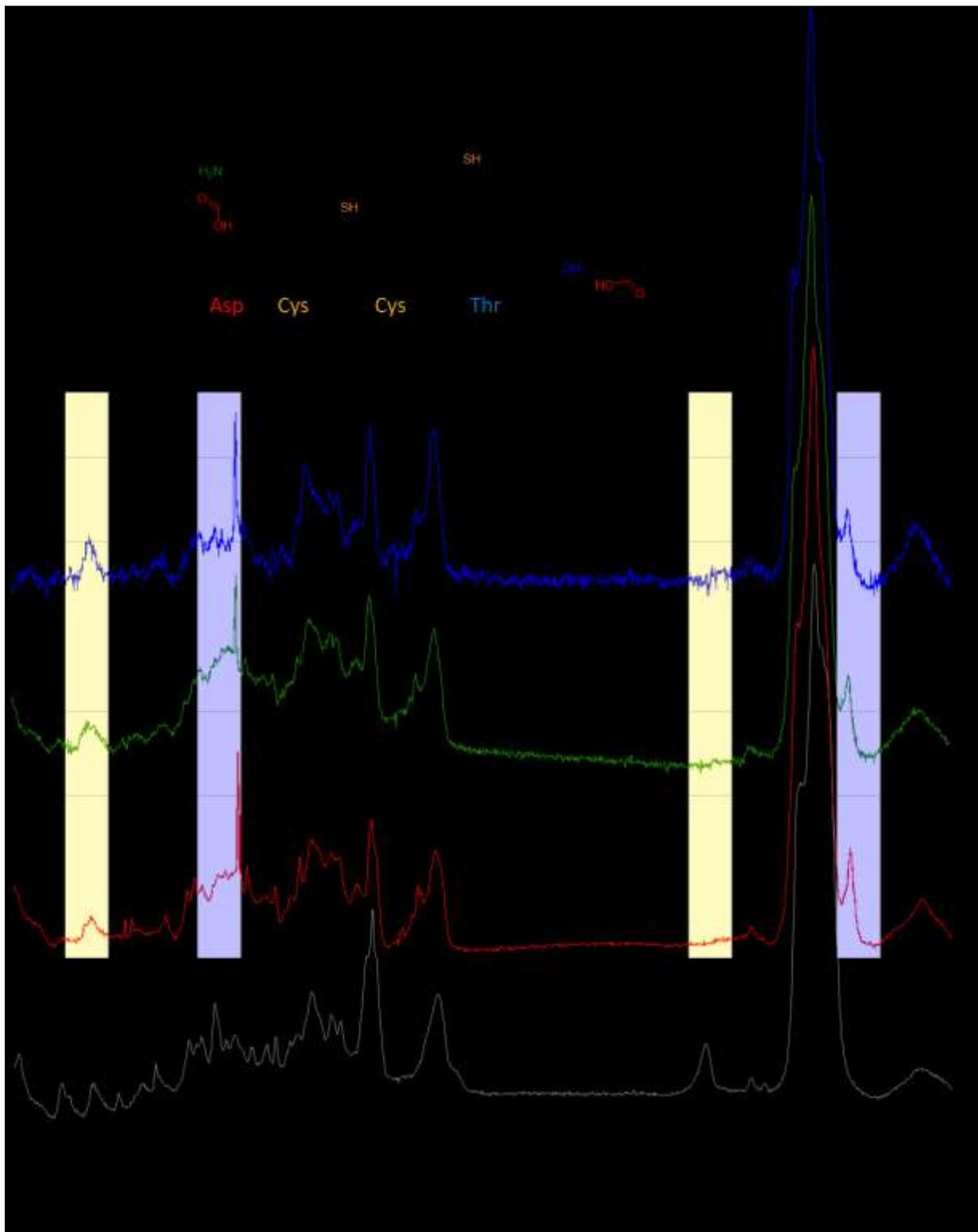


Abbildung V.2-2: Vergleich der Raman-Spektren einer Feder (blau) mit KHPs (grün), MeOH-KHPs (rot) und dem synthetischen 11 AS-Peptid (grau) modelliert nach dem häufigsten Peptidfragment in den KHPs (gemäß Sequenzierung). Gelbe Banden markieren den Bereich der Disulfid- ( $510\text{ cm}^{-1}$ ) bzw. Thiol-Absorptionen ( $2573\text{ cm}^{-1}$ ), blaue Banden die markanten Peaks aromatischer Aminosäuren ( $\sim 1000\text{ cm}^{-1}$ )

## V. Ergebnisse und Diskussion

sowie die charakteristische, olefinische C-H-Schwingung ( $3060\text{ cm}^{-1}$ ) wo diese vorhanden sind. Oben links sind die Struktur des synthetischen Peptids, sowie dessen Aminosäuresequenz abgebildet.

Tabelle V.2-1: Vergleich der Raman-Banden von Feder-Keratin gemäß Literaturwerten mit denen selbst gemessener Spektren von Hühnerfedern, KHPs, MeOH-KHPs, sowie des synthetischen 11-AS-Peptids. Diese Tabelle zeigt alle charakteristischen Banden.

Zuordnung der Schwingung	Literatur <sup>30, 162, 163], [<math>\text{cm}^{-1}</math>]</sup>	Hühnerfeder [ $\text{cm}^{-1}$ ]	KHPs [ $\text{cm}^{-1}$ ]	MeOH-KHPs [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Synth. Peptid [ $\text{cm}^{-1}$ ]
v(CH) olefinisch	3060	3057	3062	3060	-
v(CH <sub>2</sub> ) symmetrisch	2856	-	-	-	-
v(C=O) Amid I $\beta$ -Faltblatt	1665	1667	1668	1666	1667
v(CN) Amid II	1550	1560	1563	1554	1555
v(CN), $\delta$ (NH) Amid III $\alpha$ -Helix	1270	-	-	-	-
$\delta$ (CH <sub>2</sub> ) Wippschw., v(CN) Amide III ungeordnet	1241	1236	1246	1251	1246
v(CC) aromatischer Ring	1003	1003	1004	1003	-
v(CS) <i>gauche</i>	643	648	644	643	667*
v(CS) <i>gauche</i>	621	620	622	621	600*
v(SS) <i>trans-gauche-trans</i>	540	-	-	-	-
v(SS) <i>gauche-gauche-trans</i>	525	526	-	-	-
v(SS) <i>gauche-gauche-gauche</i>	512	516	510	510	512
v(SH)	-	-	-	-	2573

Im Vergleich zur Literaturreferenz von *Akhtars et al.*<sup>[162]</sup> konnten einige Signale in keiner der Proben identifiziert werden. Am auffälligsten ist dabei das Fehlen einer Amid III Bande bei etwa  $1270\text{ cm}^{-1}$ , welche auf eine  $\alpha$ -helicale Struktur hindeutet. Die Bande bei  $1241\text{ cm}^{-1}$  konnte bei allen Proben mit leichten Verschiebungen gefunden werden. Das Fehlen der Bande auch in der unbearbeiteten Hühnerfeder legt nahe, dass es sich hier nicht um ein Resultat des Hydrolyseprozesses – etwa ein Aufbrechen der Helixstruktur – sondern eine Ursache handelt. Da Hühnerfedern nur einen geringen  $\alpha$ -helicalen Anteil besitzen, ist es möglich, dass die Bande aufgrund der starken Untergrundfluoreszenz der Keratin-Proben nicht sichtbar ist. Die Laserwellenlänge ist hierbei ein wichtiger Faktor. *Akhtar et al.* verwenden einen  $1064\text{ nm}$  Laser. Laser dieser Wellenlänge sind typischerweise für die Raman-Analytik von Keratin am besten geeignet, standen jedoch im Zuge dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Stark charakteristisch für das Keratin als Cystein-reiches Strukturprotein sind die in Abbildung V.2-2 hervorgehobenen Thiol- und Disulfidbanden. Um seine strukturgebende Wirkung erzeugen zu können ist das Protein auf die Disulfidbanden als Stabilisatoren bzw. Verstärker der Starrheit angewiesen – daher liegen in natürlichem Keratin alle Cysteine als verbrücktes Cystin, also in Disulfidform, vor. Werden die Disulfide reduktiv gespalten, ändern sich die makroskopischen Eigenschaften keratinoider Materialien - sie werden plastischer. Dies wird bspw. in der Kosmetik ausgenutzt, um Haare dauerhaft in eine bestimmte Form zu bringen. Bei der Dauerwelle werden die Haare zunächst mit einem Reduktionsmittel (oft Ammoniumthioglycolat) behandelt, in die gewünschte Form gebracht wurden und durch Reoxidation mit Wasserstoffperoxid refixiert.<sup>[54]</sup> Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Keratin- bzw. KHP-Proben keine Thiol-Bande zeigen. Weder die Feder noch die Hydrolyseproteine wurden reduktiv behandelt. Lediglich das synthetische Peptid zeigt sowohl eine Disulfid-als auch eine Thiol-Bande, da dieses im reduzierten Zustand dargestellt wurde und anschließend durch Luftsauerstoff einem Oxidationsprozess ausgesetzt war.

Die Lage einer Disulfidbande kann - bestimmt durch die Konformation der Bindung - zwischen  $500\text{ cm}^{-1}$  und  $550\text{ cm}^{-1}$  variieren.<sup>[30, 162, 163]</sup> Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass basierend auf der Bandenlage Rückschlüsse auf die Struktur der Disulfidbanden eines Proteins oder Peptids gezogen werden können. *Akhtar et al.* nennen drei in der Natur gängige Disulfidkonformationen mit den korrespondierenden Bandenlagen. Die erste ist die *trans-gauche-trans*-Konformation. Diese ist die energetisch ungünstigste Disulfidkonformation und ihre Bande befindet sich bei etwa  $540\text{ cm}^{-1}$ , jedoch zeigt keine der vermessenen Proben diese Bande, sodass die *trans-gauche-trans*-Konformation für alle Proben ausgeschlossen werden kann. Dies deckt sich mit der Literatur<sup>[30, 162, 163]</sup> Die energetisch günstigste Disulfidkonformation ist die *gauche-gauche-gauche*-Konformation mit der korrespondierenden Bande bei etwa  $510\text{ cm}^{-1}$ . Diese Bande kann in allen Spektren beobachtet werden. Sie bildet fast den gesamten Anteil an allen beobachteten Disulfiden und ist in allen Proben außer der Feder die einzig beobachtete Disulfidart.  $510\pm 5\text{ cm}^{-1}$  wird die Standardlage der Disulfidbande im weiteren Verlauf dieser Arbeit sein.

Energetisch, sowie lagetechnisch zwischen den beiden genannten Disulfidtypen befindet sich bei einer Lage von  $525\text{ cm}^{-1}$  die *gauche-gauche-trans*-Konformation.<sup>[162]</sup> Diese kann im Spektrum der unbehandelten Hühnerfeder beobachtet werden. Nach der Hydrolyse ist diese Bande in den Spektren der KHPs nicht weiter zu beobachten. Dies bedeutet, dass

## V. Ergebnisse und Diskussion

durch das Aufbrechen der Überstruktur des Keratins im Zuge des Hydrolyseprozesses eine größere konformative Freiheit in die Peptide einkehrt. Diese reagieren darauf mit der Anpassung ihrer Struktur hin zu einer energetisch günstigeren Lage der Disulfide (und u.U. weiterer Bindungen).

Tabelle V.2-2: Vergleich der Raman-Banden von Feder-Keratin gemäß Literaturwerten mit denen selbst gemessener Spektren von Hühnerfedern, KHPs, MeOH-KHPs, sowie des synthetischen 11-AS-Peptids. Diese Tabelle zeigt alle Gerüst- und C-C-Schwingungen

Zuordnung der Schwingung	Literatur <sup>[30, 162, 163]</sup> [cm <sup>-1</sup> ]	Hühnerfeder [cm <sup>-1</sup> ]	KHPs [cm <sup>-1</sup> ]	MeOH-KHPs [cm <sup>-1</sup> ]	Synth. Peptid [cm <sup>-1</sup> ]
v(C=C) olefinisch	1615	1618	-	1616	-
v(C=C) olefinisch	1608	1605	1607	1604	-
v(C=C) olefinisch	1585	1574	1586	1586	-
v(C=C) carotinoid	1524	1536	-	-	-
v(C=C) carotinoid	1508	1506	-	-	-
v(C=C) carotinoid	1500	1500	-	-	-
v(CC)	1210	1209	1209	1207	-
v(CC)	1174	1170	1174	1175	-
v(CC), δ(COH)	1154	1160	1160	-	-
(CC)skeletal, <i>trans</i> conformation	1126	1125	1126	1126	1126
(CC)skeletal, <i>trans</i> conformation	1095	-	1092	1097	1097
(CC)skeletal, random conformation	1085	1087	-	-	-
(CC)skeletal, <i>trans</i> conformation	1061	-	-	-	-
(CC)skeletal, <i>cis</i> conformation	1045	-	-	-	1048
(CC)skeletal, <i>cis</i> conformation	1030	1032	1034	1031	-
ρ(CH <sub>3</sub> ), δ(CCH) olefinisch	959	958	960	959	-
ρ(CH <sub>3</sub> ) terminal, v(CC) alpha-Helix	935	935	937	935	-
δ(CCH) aromatisch	853	866	862	853	-
δ(CCH) aliphatisch	828	829	830	830	-

Ein weiterer leicht zu entdeckender Unterschied zwischen den Spektren ist das Fehlen des scharfen Peaks knapp über 1000 cm<sup>-1</sup> im Spektrum des synthetischen Peptids (vgl. Abb. V.2-2). Diese Bande gehört zur aromatischen C-C-Schwingung,<sup>[162]</sup> sodass das Fehlen

## V. Ergebnisse und Diskussion

hier leicht dadurch zu erklären ist, dass sich im häufigsten Fragment schlicht keine aromatischen Aminosäuren befinden.

Interessant ist das Verschwinden von  $\nu(\text{C}=\text{C})$  Carotinoid-Typ Schwingungen ( $1524\text{ cm}^{-1}$ ,  $1508\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500\text{ cm}^{-1}$ ) von der Feder zu den KHPs und anschließend MeOH-KHPs. Die Abwesenheit dieser Banden lässt darauf schließen, dass diese Teile im Hydrolyse-Prozess verloren gehen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass gewisse strukturelle Gegebenheiten mancher Proteinsequenzen die Resistenz gegenüber der Hydrolyse begünstigen, sodass diese im unlöslichen Rest zurückbleiben. Des Weiteren konnten die symmetrische  $\nu(\text{CH}_2)$ -Schwingung bei  $2856\text{ cm}^{-1}$  und einige CC-Skelettschwingungsbanden ( $1095\text{ cm}^{-1}$ ,  $1085\text{ cm}^{-1}$ ,  $1061\text{ cm}^{-1}$ ,  $1045\text{ cm}^{-1}$ ) bei einigen oder allen Proben nicht gefunden werden.

Einige Skelettschwingungen, welche in der Literatur genannt werden, konnten nicht in den aufgenommenen Spektren gefunden werden. Lediglich die Skelettschwingung bei  $1126\text{ cm}^{-1}$  findet sich in sämtlichen Spektren. Die Skelettschwingungen bei  $1085\text{ cm}^{-1}$ ,  $1061\text{ cm}^{-1}$  und  $1045\text{ cm}^{-1}$  konnten gar nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise ist die *trans*-Konformations-Skelettschwingung bei  $1095\text{ cm}^{-1}$  in allen Spektren außer dem der unbehandelten Hühnerfeder sichtbar. Skelettschwingungen sind oft schwer zu identifizieren, da sie selten diskrete Banden erzeugen. Daher ist die spektrale Auflösung hier ein limitierender Faktor. Alle gemessenen Proben weisen eine sehr starke Untergrundfluoreszenz auf, welche die spektrale Auflösung negativ beeinflussen kann. Dies erklärt das Ausbleiben einiger Schwingungen, insbesondere das Fehlen der Skelettschwingung bei  $1095\text{ cm}^{-1}$ , da die Intensität der Untergrundfluoreszenz der unbehandelten Feder, mit mehr Farbpigmenten, größer ist.

Die Gruppe der Skelettschwingung wird durch eine *cis*-Konformationsschwingung bei  $1030\text{ cm}^{-1}$  komplettiert, welche sich in allen Keratin-Spektren befindet, jedoch nicht im Spektrum des synthetischen Peptids. Dieser Befund ist nicht überraschend, da das synthetische Peptid mit elf Aminosäuren kein vollwertiges „Skelett“ aufweist.

Bei  $935\text{ cm}^{-1}$  befindet sich eine Bande die mit der  $\alpha$ -Helixstruktur assoziiert wird.<sup>[162]</sup> Auch diese Bande ist in allen Keratin-Spektren vorhanden, nicht jedoch in dem des synthetischen Peptids. Auch hier ist dieser Befund nicht überraschend, da Federkeratin zwar überwiegend in der  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegt, jedoch auch  $\alpha$ -Helixabschnitte

## V. Ergebnisse und Diskussion

besitzt.<sup>[17]</sup> Das synthetische Peptid hingegen besitzt keine übergeordneten Struktur motive.

Abschließend werden die C-H-Schwingungen betrachtet. Hieraus können weniger strukturelle Informationen gezogen werden, dennoch lohnt sich ein Vergleich mit den Angaben der Literatur. Alle C-H-Schwingungen können Tabelle V.2-3 entnommen werden. Dort findet sich zunächst ein Quartett aus Banden bei relativ hohen Wellenzahlen wieder. Bei  $2726\text{ cm}^{-1}$  findet sich  $\nu(\text{CH})$  aliphatisch, sowie  $\nu(\text{CH}_2)$  asymmetrisch und  $\nu(\text{CH}_3)$  symmetrisch bei  $2880\text{ cm}^{-1}$  und  $2933\text{ cm}^{-1}$ . Diese Banden können alle in allen Spektren identifiziert werden. Die vierte Schwingung des Quartetts ist  $\nu(\text{CH}_3)$  asymmetrisch, welche jedoch nur in den Spektren der unbehandelten Feder und des synthetischen Peptids sichtbar sind. In diesem Fall handelt es sich hierbei aber nicht um einen Hinweis auf strukturelle Änderungen. Diese Bande überlappt sehr stark mit der symmetrischen  $\nu(\text{CH}_3)$ -Schwingung bei  $2933\text{ cm}^{-1}$  und kann deshalb bei manchen Messungen als Schulter identifiziert werden, während sie bei Messungen mit geringerer Signalintensität meist nicht sichtbar ist (Vgl. Abb. V.2-2).

Tabelle V.2-2: Vergleich der Raman-Banden von Feder-Keratin gemäß Literaturwerten mit denen selbst gemessener Spektren von Hühnerfedern, KHPs, MeOH-KHPs, sowie des synthetischen 11-AS-Peptids. Diese Tabelle zeigt alle C-H-Schwingungen

Zuordnung der Schwingung	Literatur <sup>[30, 162, 163]</sup> , [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Hühnerfeder [ $\text{cm}^{-1}$ ]	KHPs [ $\text{cm}^{-1}$ ]	MeOH-KHPs [ $\text{cm}^{-1}$ ]	Synth. Peptid [ $\text{cm}^{-1}$ ]
$\nu(\text{CH}_3)$ asymmetrisch	2960	2962	-	-	2966
$\nu(\text{CH}_3)$ symmetrisch	2933	2935	2936	2933	2937
$\nu(\text{CH}_2)$ asymmetrisch	2880	2874	2877	2879	2893
$\nu(\text{CH})$ aliphatisch	2726	2720	2723	2723	2770
$\delta(\text{CH}_2)$ Schärschwingung	1449	1452	1450	1449	1450
$\delta(\text{CH}_3)$	1414	1413	1410	-	-
$\delta(\text{CH}_3)$ symmetrisch	1395	1399	1392	1398	-
$\delta(\text{CH})$	1342	1344	1339	1339	-
$\delta(\text{CH}_2)$	1317	1318	1316	1313	-
$\rho(\text{CH}_2)$	880	882	880	881	879
$\rho(\text{CH}_2)$ in-phase	756	755	761	758	-
$\rho(\text{CH}_2)$ in-phase	742	731	-	-	-

## V. Ergebnisse und Diskussion

Die übrigen C-H-Schwingungen zeigen keine Auffälligkeiten. Meist sind diese in allen Spektren, oder allen abgesehen von dem des synthetischen Peptids, zu finden.

### V.3 Anwendungstests - Filmbildungsexperimente

Neben der Charakterisierung der Keratin-Hydrolyseproteine war es ein weiteres Bestreben dieser Arbeit, potentielle Anwendungsbereiche der KHPs zu untersuchen. Keratine finden sich in der Natur in Materialien mit sehr unterschiedlichen makroskopischen Eigenschaften wieder; von weichen Materialien wie Haut oder Haaren über Federn mit steiferen und flexibleren Anteilen bis hin zu starren Nägeln oder Hufen.<sup>[14]</sup>

Da die Arbeiten von *Dinu et al.*<sup>[164]</sup> und *Nuutinen et al.*<sup>[165]</sup> bereits zeigen konnten, dass sich aus aufgeschlossenem Keratin Filme ziehen lassen sollte dies ebenfalls untersucht werden, da die Befähigung Filme auszubilden für eine Vielzahl von Anwendungen relevant ist. So würde dies die KHPs etwa auch, neben der potentiellen Anwendung in Klebesystemen, für den Haircare-Zweig der Henkel AG interessant machen. *Dinu et al.* setzten Keratin mit epoxidiertem Leinsamenöl und Dodecenylnsuccinidandehydrid zu Filmen um. *Nuutinen et al.* konnten Keratin durch Auflösen in DES gewinnen, aus welchem sie sowohl reine Keratin-Filme, als auch mit Glutaraldehyd bzw. 1,4-Butandiol diglycidylether als Vernetzer, erzeugten.

Mit dieser Information im Hinterkopf war es zunächst von Interesse herauszufinden, ob die KHPs ebenfalls ohne weitere Zusätze in der Lage wären, Filme zu bilden, und falls ja, ob diese eher Nägeln, oder Hufen ähnelten oder, einige der weichen Eigenschaften von etwa Haaren erhielten. Dazu wurden zunächst Peptidlösungen aus 100 mg KHPs in 1 ml vollentsalztem Wasser angesetzt, welche dann in Teflonformen mit ausgefrästen Vertiefungen (4 cm x 4 cm oder 1,5 cm x 3,5 cm) der Tiefe 3 mm zum Trocknen an der Luft gegeben wurden. Das Abdampfen des Wassers geschah über Nacht bei RT. Zurück blieb ein Film, welcher in Abbildung V.3-1 gezeigt sind.

Das simple Experiment war also in der Lage, die beiden obenstehenden Fragen zumindest tendenziell zu beantworten: die KHPs scheinen prinzipiell in der Lage Filme zu bilden. Die Eigenschaften dieser Filme sind am härteren Ende des Spektrums der Materialeigenschaften keratinhaltiger Materialien einzuordnen, sie ähneln eher einem brüchigen Nagel, als einem Haar. Tatsächlich ist die Probe so stark brüchig, dass kein

## V. Ergebnisse und Diskussion

durchgehender Film erzeugt werden konnte, sondern nur eine Vielzahl von Keratinschuppen. Zudem erfuhr das Material einen Schrumpf, sowie eine Wölbung in der Mitte (Vgl. auch Abb. A.3-1 und A.3-2). Zur haptischen Einordnung wurden die Keratinschuppen mit einem Holzspatel angekratzt; durch die hohe Sprödigkeit des Materials zerbrach dieses bereits bei relativ geringer Druckausübung.

Da die Sprödigkeit dazu führte, dass keine zufriedenstellenden Filme erzeugt werden konnten, das Material aber prinzipiell in der Lage zu sein schien, dies zu tun, wurde als nächster Schritt die Beimischung eines Weichmachers in Form von Glycerin und eines Koaleszenzmittels in Form von Texanol untersucht. Abbildung V.3-1 zeigt ebenfalls die Filme, die mit unterschiedlichen Texanol- bzw. Glycerin-Anteilen erhalten wurden.

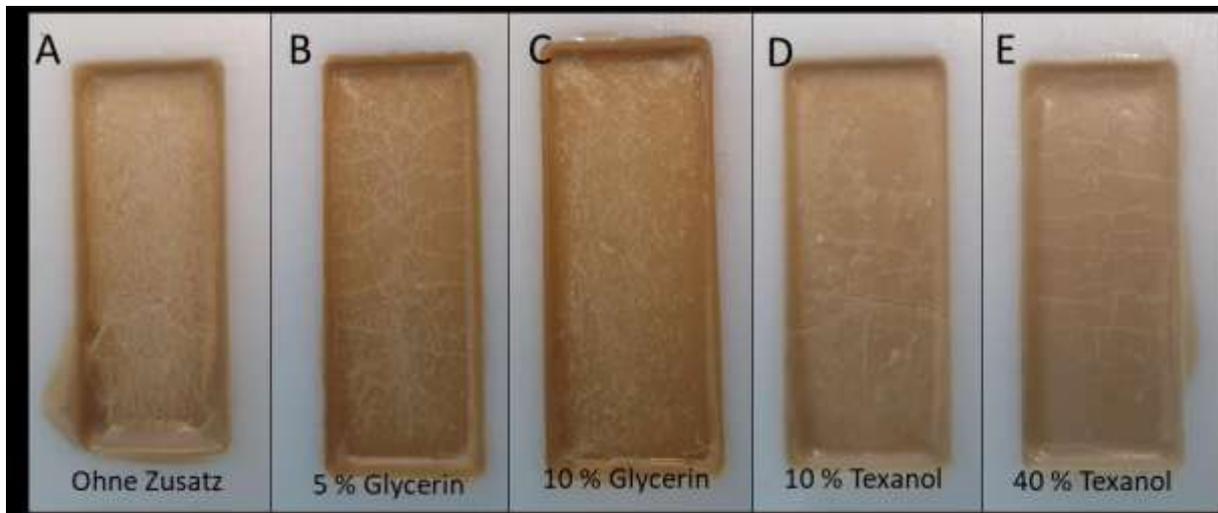


Abbildung V.3-1: Aufnahmen der ersten Filmbildungsversuche mit KHPs. A) KHP-Film ohne Zusatz eines Koaleszenzmittels. B) KHPs mit 5 % (w/w) Glycerin. C) KHPs mit 10 % (w/w) Glycerin. D) KHPs mit 10 % (w/w) Texanol. E) KHPs mit 40 % (w/w) Texanol. Alle Fotos wurden von Filmen in Teflonformen der Ausmaße 1,5 cm x 3,5 cm. Für Fotos der Filme in 4 cm x 4 cm Formen siehe Abbildungen A.3-1 und A.3-2 im Anhang.

Zunächst wurde Texanol als Koaleszenzmittel in gängigen Anteilen bis zu 10 % (w/w) getestet. Dies blieb ohne Erfolg. Zwischen den Filmen mit bis zu 10 % (w/w) Texanol und jenen ohne Zusatz sind keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen, weder optisch noch haptisch. Aufgrund der unzureichenden Wirkung des Texanols in geringen Konzentrationen in der Verbesserung der Filmeigenschaften wurden als nächstes unüblich hohe Texanol-Anteile bis zu 40 % (w/w) verwendet, um zu untersuchen, ob durch den Einsatz von Texanol das Ziehen gleichmäßiger, nicht-brüchiger Filme möglich

## V. Ergebnisse und Diskussion

ist. Wie Abbildung V.3-1 zu entnehmen ist, konnten auch sehr hohe Anteile des Koaleszenzmittels keine guten Filmeigenschaften hervorrufen.

Wegen des Misserfolgs beim Einsatz von Texanol zur Bildung guter Filme, wurde als nächstes Glycerin als Weichmacher eingesetzt. Ein Blick in Abbildung V.3-1 verrät, dass durch das Beimischen von bis zu 10 % (w/w) eine Verbesserung der Filmeigenschaften hin zu einer gleichmäßigeren, wölbungsfreien Oberfläche, sowie eine Verringerung der Brüchigkeit erreicht werden konnten. Jedoch zeigte die haptische Prüfung, dass die Brüchigkeit des Materials nicht ganz verhindert werden konnte. Das Herausbrechen von Keratinschuppen erforderte in diesem Fall allerdings bereits deutlich mehr Kraft und durch das Fehlen einer Wölbung sind die Schuppen weit weniger anfällig gegenüber dem Ausüben einer Normalkraft.

Da sowohl der getestete Weichmacher als auch Koaleszenzmittel keinen finalen Erfolg zur Erzeugung gleichmäßiger, stabiler Filme brachten, stellte sich die Frage nach der Ursache der Brüchigkeit. Peptide sind gemeinhin dafür bekannt, zum Ziehen von Filmen geeignet zu sein.<sup>[166, 167]</sup> Andere gängige Filmbildungsadditive wie Butylglycol<sup>[168]</sup> und Dipropylenglycolmethylether<sup>[169]</sup> hätten u.U. eine Verbesserung der Filmbildungseigenschaften erzeugen können, jedoch wurde, im Sinne eines ressourcenschonenden Vorgehens, eine andere Herangehensweise gewählt.

Die Bildung von Filmen kann bekanntermaßen durch die Präsenz von Salzen negativ beeinflusst werden.<sup>[170]</sup> Daher wurde als nächstes der Einfluss des durch die Hydrolyse in den KHPs verbliebenen Kaliumphosphats betrachtet. Da die aus dem Hydrolyseprozess stammende Salzfracht auch für weitere zukünftige Anwendbarkeitsuntersuchungen potentiell störend ist, ist dieser Schritt ohnehin erforderlich. Die Glycerin-haltigen Filme wurden dafür im IR-Mikroskop untersucht. Die daraus resultierenden Aufnahmen und IR-Spektren können Abbildung V.3-2 entnommen werden.

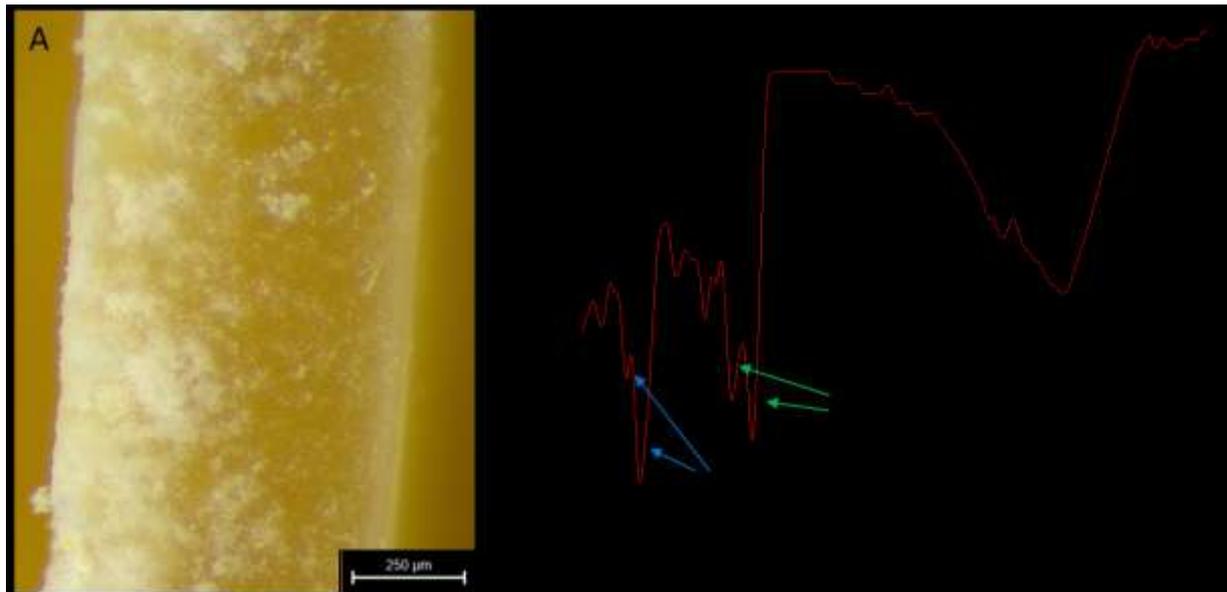


Abbildung V.3-2: A) Mikroskopieaufnahme des KHP-Films mit 10 % (w/w) Glycerin. Zu erkennen ist eine inhomogene Verteilung der KHPs bzw. des Phosphats. Die weißen Bereiche weisen einen höheren Phosphatanteil auf. B) IR-Spektrum des Films aus (A), blaue Pfeile weisen auf den charakteristischen Doppelpeak des Phosphats im Bereich zwischen 950 und 1050  $\text{cm}^{-1}$ , grüne Pfeile weisen auf die Amidbanden I und II mit für Keratin typischer Lage und Form bei ca. 1550 und 1650  $\text{cm}^{-1}$ .

Die IR-Spektroskopie zeigt klar, dass nicht nur der gesamte Film einen Phosphatanteil enthält, sondern auch, dass es diskrete Salzdomänen im Film gibt. Diese inhomogene Verteilung trägt nicht begünstigend zur Bildung gleichmäßiger Filme bei. Da nun Kaliumphosphat als Problemquelle identifiziert werden konnte, wurde es notwendig ein genaueres Bild vom Salzgehalt, sowie dessen Einfluss auf die Filmbildung zu generieren.

### V.4 Entsalzung der KHPs

Wie in Kapitel V.3 beschrieben, wurde die Salzfracht, genauer gesagt das Kaliumphosphat, welches beim Hydrolyseprozess zurückbleibt, als Störfaktor bei der Ausbildung von Filmen aus den KHPs identifiziert. Insbesondere, da ein hoher Salzgehalt auch für künftige potentielle Anwendungen störend sein könnte und der genaue Salzanteil nicht bekannt war, wurde dieser durch Ionenchromatographie und Röntgenfluoreszenzanalytik bestimmt.

Die Röntgenfluoreszenzanalytik ergab einen Phosphorgehalt von 5,1 – 5,2 % (w/w), was einem Phosphatgehalt von 15,3 – 15,6 % (w/w) entspricht. Dieses Ergebnis verträgt sich gut mit dem der ionenchromatographischen Phosphat-Bestimmung, welche auf einen Phosphatanteil von 15,1 % (w/w) kommt. Bei einer so großen Salzlast ist die Unfähigkeit

## V. Ergebnisse und Diskussion

der KHPs homogene Filme auszubilden, nicht verwunderlich. Daher sollte als nächster Schritt eine Entfernung oder zumindest eine starke Reduktion des Salzgehalts erfolgen. Dabei im Hinterkopf behaltend, dass die Entsalzung künftig auch im großtechnischen Maßstab möglich sein muss, durfte die gewählte Methode nicht zu komplex bzw. nicht zu teuer sein, wobei sie gleichzeitig skalierbar sein musste. Daher wurde als erstes eine Dialyse in Betracht gezogen.

Basierend auf den Peptidmassen, die in Tabelle V.1-1 zusammengefasst sind, wurden zwei Membranporengrößen für die Dialyse ausgewählt: MWCO 100 – 500 und MWCO 1000. Jede Dialyse geht mit einem Masseverlust einher, daher ist neben dem Unterschied im Phosphat-Gehalt auch die Massenretention ein wichtiges Kriterium für die Bewertung des Entsalzungsprozesses. Tabelle V.4-1 zeigt die Massenverluste durch die Dialyse, sowie auch die korrigierten Massenverluste bezogen auf die reine Peptidmasse.

Tabelle V.4-1: Vergleich zweier MWCO für die Dialyse von KHP im Hinblick auf den Masseverlust durch die Dialyse mit MWCO 100 – 500 und MWCO 1000.

<b>MWCO</b>	<b>Massenverlust durch Dialyse [%]</b>	<b>Korrigierter Massenverlust durch Dialyse [%]</b>
100-500	85	84
1000	97	n.b.

Mit einem Masseverlust von 97 % kann die Dialysemembran mit MWCO 1000 bereits disqualifiziert werden. MWCO 100 – 500 weist ebenfalls einen sehr hohen Masseverlust von 85 % bzw. 84 % bezogen auf die Masse der Peptide auf, doch könnte diese Methode zum Generieren neuer Erkenntnisse zunächst im Labormaßstab Anwendung finden, in der Hoffnung, dass durch einen Wechsel auf verwandte Verfahren (bspw. Ultrafiltration oder Cross-Flow-Filtration) im größeren Maßstab eine Verbesserung der Massebilanz möglich ist. Daher wurde der Phosphatgehalt der dialysierten KHPs bestimmt. Das Resultat der Ionenchromatographie und Röntgenfluoreszenzanalytik ist in Tabelle V.4-2 abgebildet.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.4-2: Vergleich des Phosphor- bzw. Phosphatgehalts vor und nach dialytischer Entsalzung der KHPs mit Dialysemembranen MWCO 100 – 500 und MWCO 1000. Bei MWCO 1000 wurde nicht ausreichend Masse für eine RFA oder IC-Analyse nach der Dialyse erhalten.

MWCO	Phosphorgehalt gemäß RFA [% (w/w)]	Phosphatgehalt gemäß IC [% (w/w)]
Keine Dialyse	5,1 - 5,2	15,1
100-500	3,3 - 3,4	6,0 - 12,5
1000	n.b.	n.b.

Der Salzgehalt nach der Dialyse mit einem MWCO von 100 – 500 variiert trotz gleichbleibender Bedingungen (Dialysen wurden stets bei RT im Verhältnis 1:150 mit zwei Wasserwechseln nach je zwei Stunden sowie einer finalen Dialyse über Nacht durchgeführt). Ein Salzgehalt von 6,0 % (w/w) könnte u.U. bereits eine ausreichende Verringerung sein um die störenden Effekte des Salzes für diverse Anwendungen ausschalten zu können. Da jedoch der Salzgehalt stark schwankt und die Dialyse mit einem hohen Masseverlust von 84 % Peptidmasse einhergeht, wurde die Entsalzung mittels Dialyse als Option ausgeschlossen.

Als alternative Entsalzungs-Methode wurde eine Extraktion mit einem organischen Lösemittel, in welchem sich das Kaliumphosphat nicht, oder nur sehr schlecht, löst, erwogen. Die angegebenen Löslichkeiten in Tabelle V.1-1 zeigen die schlechte Löslichkeit der KHPs in organischen Lösemitteln. Lediglich DMSO, DMF und Methanol zeigen erhöhtes Lösungsvermögen. Durch ihre hohen Siedepunkte und vermutete gute Salzlöslichkeit schieden DMSO und DMF als Extraktionsmittel aus. Dementsprechend fiel die Wahl auf Methanol. Zusätzlich wurde auch ein vergleichender Versuch mit Ethanol durchgeführt.

Für die Extraktion wurden je 10 g salzhaltige KHPs in 150 ml Alkohol aufgeschlämmt und über Nacht bei RT gerührt. Anschließend wurden unlösliche Anteile abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde die 1. Phase alkoholischer KHPs (ab hier als MeOH-KHPs oder EtOH-KHPs bezeichnet) durch Abdampfen des Lösemittels gewonnen. Für die methanolische Extraktion wurde dieser Prozess zwei weitere Male wiederholt.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.4-3: Übersicht über die Ausbeuten der alkoholischen Aufarbeitung der KHPs, sowie die Salzgehalte (gemessen mittels Ionenchromatographie) nach der Aufarbeitung.

Aufarbeitung	Ausbeute [%]	Phosphatgehalt [% (w/w)]
MeOH-KHP 1. Phase	38	1,4
MeOH-KHP 2. Phase	9	4,7
MeOH-KHP 3. Phase	4	14,0
EtOH-KHP 1. Phase	8	< 0,1

Die erste Phase der KHPs wies eine Ausbeute von 38 % (w/w) auf. In den darauffolgenden Phasen verringerte sich die Ausbeute auf 9 % (w/w) bzw. 4 % (w/w). Der Phosphatgehalt konnte teilweise stark reduziert werden im Vergleich zu den 15,1 % (w/w) vor der Aufarbeitung. Die Erste Phase zeigte den geringsten Phosphatanteil mit 1,4 % (w/w). In den folgenden Phasen stieg dieser auf 4,7 % (w/w) und dann 14,0 % (w/w) an, sodass die dritte Phase kaum eine Verringerung des Salzgehaltes gegenüber der unbehandelten KHPs zeigt. Für die MeOH-KHPs gilt also, dass die Ausbeuten mit steigender Phasenzahl stark abnehmen, während gleichzeitig die Effektivität der Entsalzung stark abnimmt – die erste Phase ist also die einzige, welche einen tatsächlich nutzbaren Entsalzungsvorgang darstellt. Die Werte sind zur Übersicht in Tabelle V.4-3 dargestellt.

Interessant ist auch, dass selbst nach drei Extraktionsvorgängen nur 51 % der ursprünglichen Masse erhalten wurden. Bei einem Salzgehalt von 15 % (w/w) vor der Extraktion entsprächen also 85 % Gesamtausbeute einer vollständigen Überführung der Peptide. Dies weist darauf hin, dass die geringe Löslichkeit der KHPs in Methanol, zumindest in Teilen, durch spezifische Peptide, welche sich nur sehr geringfügig im Alkohol lösen, verursacht wird. Hierbei könnte es sich um besonders hydrophobe Peptide handeln, wobei in diesem Fall u.U. die Löslichkeit der KHPs in unpolaren Lösemitteln wie Xylol oder THF höher ausfiele. Es ist auch vorstellbar, dass es sich bei dem unlöslichen Anteil um besonders stark disulfidverbrückte Peptide handelt, welche gerade auf Grund der Verbrückungen eine schlechte Löslichkeit zeigen. In diesem Fall ginge die methanolische Entsalzung mit einer Verringerung des Thiol- bzw. Disulfidgehalts einher. Aus diesem Grund wurden Raman-Spektren der Proben für eine qualitative Untersuchung auf Disulfide, sowie Messungen des Thiol-Gehalts behandelter und unbehandelter KHPs als quantitative Analyse, durchgeführt und die verschiedenen MeOH-KHP- und EtOH-KHP-Phasen sequenziert, um einen Überblick über die Veränderung der KHP-

## V. Ergebnisse und Diskussion

Zusammensetzung durch die Methanol-Extraktion zu generieren. Die Raman-Spektren sind in Abbildung V.4-1 dargestellt, die Ergebnisse der Thiol-Messung finden sich in Tabelle V.4-4.

Vergleichend wurde auch eine Ethanol-Extraktion der KHPs nach identischer Vorgehensweise durchgeführt. Auch die Resultate dieser Extraktion sind in Tabelle V.4-3 aufgeführt. Die Ethanol-Extraktion war zur Entfernung der Salzfracht am effektivsten; nach der Extraktion lag der Phosphat-Anteil bei  $<0,1\%$  (w/w). Die Effektivität der Phosphat-Entfernung durch Ethanol-Extraktion auch im Vergleich zum Methanol-Analogon ergibt Sinn, da Ethanol über einen größeren unpolaren, organischen Rest verfügt, welcher eine geringere Löslichkeit des polaren Phosphat-Salzes zur Folge hat. Da die Ausbeute jedoch bereits bei der ersten Phase bei lediglich 9 % lag wurden weitere Arbeiten mit der ersten MeOH-KHP-Phase durchgeführt. Dennoch wurde auch die Analytik der EtOH-KHPs zu Vergleichszwecken mit durchgeführt.

Raman-Spektren können ohne Kalibrierungsgeraden nicht für eine quantitative Analytik herangezogen werden. Lediglich grobe Trends lassen sich aus dem Vergleich von Spektren bzw. Banden ablesen. In diesem Fall ist zu beobachten, dass alle drei Spektren eine Disulfidbande bei etwa  $510\text{ cm}^{-1}$  aufweisen. Für das Spektrum der dritten Phase (M3) ist diese Bande jedoch verhältnismäßig kleiner (bei gleichzeitig geringerer Gesamtintensität der Signale), was eine Verringerung des Thiol-Gehalts gegenüber den Phasen 1 und 2 impliziert.

Durch die Aufnahme der Raman-Spektren konnte nachgewiesen werden, dass nach der methanolischen Extraktion nach wie vor Cystin-haltige Peptide in den einzelnen Phasen vorhanden sind. Die Quantifizierung erfolgte nach der in Kapitel IV beschriebenen Methode mittels HPLC.

## V. Ergebnisse und Diskussion

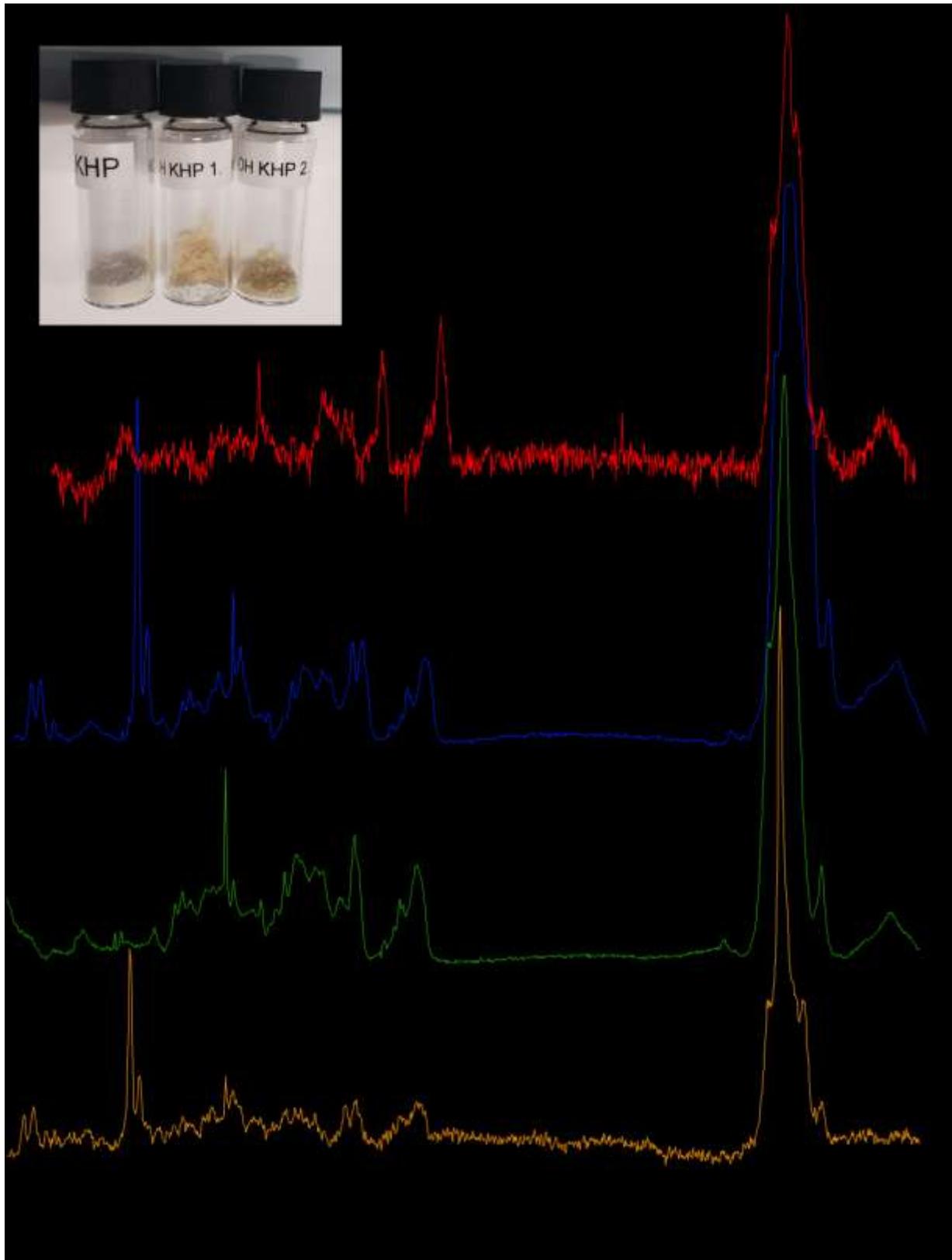


Abbildung V.4-1: Gegenüberstellung der Raman-Spektren von EtOH-KHPs (E1), sowie MeOH-KHP 1. Phase (M1), MeOH-KHP 2. Phase (M2) und MeOH-KHP 3. Phase (M3).

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.4-4: Vergleich der Thiol-Gehalte unterschiedlicher alkoholisch aufgearbeiteter KHPs untereinander sowie mit nicht-aufgearbeiteten KHPs mittels HPLC. Die Messungen wurden durch das Fraunhofer IGB als Einfachbestimmungen durchgeführt, daher konnten keine Standardabweichungen angegeben werden. Die Standardabweichung der neu entwickelten Messmethode ist nicht bekannt, die zugrundeliegenden Arbeiten geben ihre Messgenauigkeit mit  $< 1$  pmol (*Hansen et al.*) bzw.  $< 1,5$  % (*Kurz et al.*) an.

<b>Probe</b>	<b>Molare SH-konz. [mM] oxidiertes Zustand</b>	<b>Molare SH-konz. [mM] reduzierter Zustand</b>
KHP	0,09	7,96
MeOH-KHP 1. Phase	0,06	3,59
MeOH-KHP 2. Phase	0,06	4,13
MeOH-KHP 3. Phase	0,11	3,55
EtOH-KHP 1. Phase	0,05	2,70

Die molaren Thiol-Konzentrationswerte der Methanol-Extraktion zeigen einen klaren Abfall im Vergleich zu den unbehandelten KHPs (7,96 mM). Zwischen den einzelnen Phasen ist kein Trend zu erkennen. Die Thiol-Konzentrationen der ersten und dritten Phase sind annähernd identisch (3,59 mM und 3,55 mM), die der zweiten Phase geringfügig höher mit 4,13 mM. Die EtOH-KHPs weisen mit 2,70 mM die geringste Thiol-Konzentration auf. Alle alkoholischen Entsalzungen gehen also mit einer signifikanten Verringerung des Thiol-Gehalts einher.

Um das Bild der Veränderungen durch die Alkohol-Extraktion zu vervollständigen, wurden die drei methanolischen, sowie die ethanolische Phase sequenziert. Dazu wurden die Peptide gegen eine Datenbank bestehend aus den Federkeratinen 3 und 4 verglichen. Die jeweils 10 häufigsten detektierten Peptide sind mit ihren Anteilen auf die Tabellen V.4-5 und V.4-6 aufgeteilt aufgelistet.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.4-5: Überblick über die häufigsten Peptide der ersten zwei Phasen der Methanol-extrahierten KHPs, gemäß Sequenzierung durch *Proteom Factory*. Die Anteile wurden durch das Verhältnis der Peakflächen im Chromatogramm approximiert. Cysteine sind in den Peptidsequenzen farbig markiert.

MeOH-KHPs 1. Phase		MeOH-KHPs 2. Phase	
Peptid	Anteil [%]	Peptid	Anteil [%]
DL <b>C</b> RPCGPTPLANS <b>C</b> NEP <b>C</b> V <b>R</b>	23,17	SEEGVPISSGGFGISGLGSR	20,26
DL <b>C</b> RPCGPTPLANS <b>C</b> NEP <b>C</b> V <b>R</b>	14,28	FGISGLGSR	13,34
SEEGVPISSGGFGISGLGSR	10,14	SEEGVPISSGGF	13,34
DL <b>C</b> RPCGPTPLAN	5,08	GISGLGSR	5,93
VVIQSPVVV <b>T</b> CPGPILSSFPQN	4,92	VVIQSPVVVTLPGPILSSFPQN	4,22
SCFPL <b>C</b> RPCGPTPL	4,09	IQSPVVVTLPGPISSFPQN	3,45
GISGLGSR	3,91	STSAAVGSILSEEGVPISSGGF	2,08
FGISGLGSR	3,21	SAAVGSILSEEGVPISSGGF	2,04
SCQPL <b>C</b> RPCGPTPLANS <b>C</b> NEP <b>C</b> V <b>R</b>	3,18	TAVGSSTSAAVGSIL	1,99
VVIQSPVVVTLPGPIL	2,86	VVIQSPVVVTSPGPILSSFPQN	1,89

Die Anteile der jeweiligen Peptide wurden aus den Flächen der Peaks ermittelt, lassen sich also nur näherungsweise als Repräsentationen der tatsächlichen Anteile der Peptide im Gemisch nutzen. In der ersten Methanol-Phase machen Cystein-haltige Peptide einen Anteil von 57,44 % aus, was einer Retention gegenüber den unbehandelten KHPs nahekommt. In der zweiten Methanol-Phase wurden gar keine Cystein-haltigen Peptide detektiert und in der dritten Phase lediglich eines mit einem Anteil von 0,73 %. Die Ergebnisse der HPLC-Thiol-Bestimmung und der Raman-Messung zeigen verlässlich und eindeutig das Vorhandensein von Disulfiden in den Peptiden. Da die Federn weder vor noch nach der Hydrolyse mit Thiolen oder Disulfiden in Kontakt kam, muss an dieser Stelle die Validität der Sequenzierungs-Ergebnisse in Frage gestellt werden.

Dennoch wurde auch die Ethanol-Phase betrachtet. Diese Phase zeigt mit einem Anteil von 54,64 % Cystein-haltigen Peptiden einen ähnlich guten Wert wie die 1. Phase der MeOH-KHPs. Auch ist sie die einzige Extraktions-Phase, in welcher das ursprünglich als häufigstes identifizierte Peptid (DL**C**RPCGPTPL) nachgewiesen werden konnte. Nach der Thiol-Gehalt-Bestimmung mittels HPLC wurde der Thiol-Gehalt für die Ethanol-Phase als am geringsten bestimmt, sodass dieses Ergebnis überraschend ist und in Anbetracht der Inkongruenz der zweiten und dritten methanolischen Phasen mit den vorigen Ergebnissen auch in Frage gestellt werden muss.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.4-6: Überblick über die häufigsten Peptide der dritten Phasen der Methanol-extrahierten KHPs und der Ethanol-extrahierten KHPs gemäß Sequenzierung durch *Proteom Factory*. Die Anteile wurden durch das Verhältnis der Peakflächen im Chromatogramm approximiert. Cysteine sind in den Peptidsequenzen farbig markiert.

MeOH-KHPs 3. Phase		EtOH-KHPs 1. Phase	
Peptid	Anteil [%]	Peptid	Anteil [%]
SEEGVPISSGGFGISGLGSR	24,31	DLCRPCGPTPL	40,69
GISGLGSR	13,16	SEEGVPISSGGF	8,86
TAVGSSTSAAVGSIL	10,47	DLGRPCCGPTPLANS <sup>C</sup> NEP <sup>C</sup> VR	6,53
STAAVGSILSEEGVPISSGGF	6,08	TAAVGSSTSAAVGSIL	4,60
AVGSSTSAAVGSIL	4,63	GISGLGSRF	3,63
SAAVGSILSEEGVPISSGGF	3,13	FGISGLGSR	3,63
TAVGSSTSAAVGSILSEEGVPISSGGF	3,06	GISGLGSR	3,50
SSFPQNTAVGSSTSAAVGSIL	2,76	SCFPLCRPCGPTPL	3,32
SFPQNTAVGSSTSAAVGSIL	2,33	DLCRPCGPTPLAN	2,63
SSTSAAVGSILSEEGVPISSGGF	2,25	AVGSSTSAAVGSIL	2,16

Insgesamt sind die Ergebnisse der Sequenzierung unter Vorbehalt zu betrachten, die Raman- und HPLC-Messungen konnten jedoch zeigen, dass mit den Extraktionen mit Methanol bzw. Ethanol zwar ein Verlust an Thiol-Gehalt einhergeht, jedoch alle Phasen weiter Cystein enthalten. Ebenfalls konnte das Hauptziel – die Entsalzung auf ein merklich geringeres Niveau – erreicht werden. Daher werden im Folgenden weitere Versuche mit der ersten Methanol-Phase durchgeführt.

### V.5 Filmbildungsexperimente mit MeOH-KHPs

Die Ergebnisse im vorangegangenen Kapitel zeigen, dass die Methanol-Extraktion für die KHPs mit einer Verringerung des Thiol- bzw. Cystein-Gehalts einhergeht. Daher wird diese Methode der Entsalzung, trotz ihrer Einfachheit wohl keine Anwendung im industriellen Bereich finden. Für diese Arbeit stellt sie jedoch eine simple und schnelle Methode dar, die Salzfracht der KHPs stark zu reduzieren. Ziel dieser Arbeit ist es außerdem das Potential der KHPs auszuloten. Untersuchungen welche sich nicht mit dem freien Thiol beschäftigen, werden nicht durch die Methanol-Extraktion beeinflusst und Charakterisierungen, die auf den Eigenschaften der Thiole basieren, können nach wie vor durchgeführt werden, da das reale Potential der KHPs im Zweifelsfall höher liegt, als hier

## V. Ergebnisse und Diskussion

beobachtet. Bei einem Einsatz der KHPs etwa in einer vernetzenden Reaktion können mit höherem Thiol-Gehalt der KHPs auch höhere Netzwerkichten erzeugt werden.

Daher wurden die Filmbildungsexperimente nach der methanolischen Dephosphatisierung mit den erhaltenen KHPs weitergeführt. Genutzt wurden jene Phasen, die eine nennenswerte Reduktion des Phosphatgehalts zeigten und genügend Material zur Filmbildung erzeugen konnten – dies bedeutet, die ersten beiden Phasen der Methanol-Extraktion. Dafür wurden wässrige MeOH-KHP-Lösungen mit identischer Konzentration (100 mg/L) hergestellt, welche dann in Teflonformen über Nacht an der Luft getrocknet wurden. Die erhaltenen Filme wurden mit einem Holzspatel zur haptischen Einordnung angekratzt. Gelungene Filme wurden nach optischer und haptischer Evaluation mit DSC und TGA analysiert.

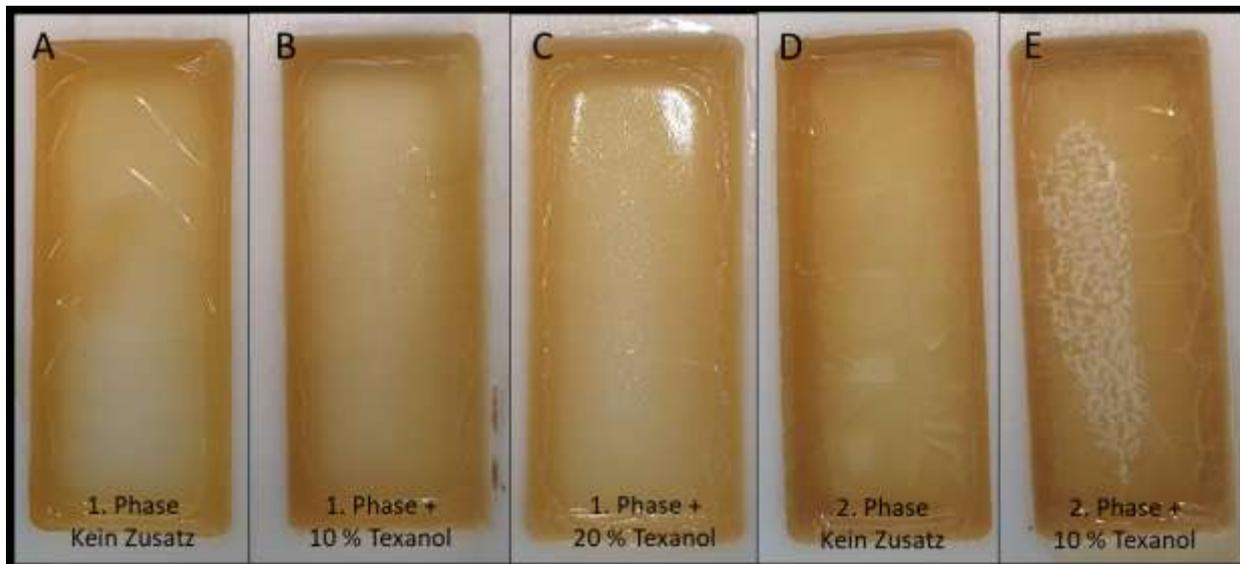


Abbildung V.5-1: Fotos der 1. Phase MeOH-KHP ohne (A) und mit 10 % (w/w) Texanol (B) bzw. 20 % (w/w) Texanol (C). Die 2. Phase MeOH-KHP ohne (D) und mit 10 % (w/w) Texanol (E) sind ebenfalls abgebildet. Alle Fotos wurden von Filmen in Teflonformen der Ausmaße 1,5 cm x 3,5 cm. Für Fotos der Filme in 4 cm x 4 cm Formen siehe Abbildungen A.5-1 und A.5-2 im Anhang.

Die obige Abbildung zeigt die Fotos der ersten beiden MeOH-KHP-Phasen jeweils mit und ohne Texanol als Koaleszenzmittel. Die Filme der ersten Phase unterscheiden sich auf den ersten Blick merklich von jenen bei denen die KHPs zuvor keiner alkoholischen Extraktion unterzogen wurden; hier sind die Peptide in der Lage, einen ebenen und gleichmäßigen Film auszubilden. Das Ankratzen mit einem Holzspatel zeigte eine erhöhte Beständigkeit des Films – es war hier nicht möglich Teile des Films herauszulösen, ohne diesen gezielt zu zerstören. Es scheint, dass der Texanol-haltige Film geringfügig ebener

## V. Ergebnisse und Diskussion

ist, der Einfluss des Texanols ist aber, falls vorhanden, klein, da bereits der reine MeOH-KHP-Film gleichmäßig gebildet wird.

Die Einträge D und E in Abbildung V.5-1 zeigen die Filmbildungsversuche der zweiten MeOH-Phase. Hier zeigt sich ohne Texanol dasselbe Bild wie vor der Extraktion – es kann kein durchgehender Film ausgebildet werden. Es bilden sich lediglich kleine Keratin-Schuppen, welche bei Berührung leicht abblättern. Die Zugabe von 10 % (w/w) Texanol als Koaleszenzmittel weist hier eine stärkere Verbesserung auf als vor der Alkohol-Behandlung der KHPs, doch auch hier kommt es nicht zu einer homogenen Filmbildung. Das Produkt ist zwar durchgängig und berührungstabiler als der Texanol-freie Versuch, doch kann kein ebenmäßiger oder homogener Film gebildet werden. Weiter wurden bis zu 50 % (w/w) Koaleszenzmittel hinzugegeben, doch auch diese sehr hohe Menge führte nicht zu einer durchgehenden Filmbildung (Vgl. Abb. A.5-1)

Die erste Phase MeOH-KHP enthält 1,4 % (w/w) Kaliumphosphat, die zweite Phase besteht zu 4,7 % (w/w) aus dem Salz. Daraus folgt, dass die Maximalgrenze für die Fähigkeit zur Filmbildung der KHPs (auch unter Mitwirken eines Koaleszenzmittels) zwischen diesen beiden Werten liegt.

Als nächstes wurde eine Konzentrationsreihe des Texanols in MeOH-KHP-Filmen untersucht, um zu überprüfen, ob ein Einfluss beobachtet werden kann. Außerdem wurde ein Film vierfacher Dicke ohne Koaleszenzmittel angefertigt, um zu ermitteln, ob dies ein limitierender Faktor ist. Fotos dieser Filme sind im Anhang in Abbildung A.5-2 dargestellt. Die unterschiedlichen Texanol-Konzentrationen können optisch und haptisch nicht voneinander unterschieden werden. Hier sind die DSC-Daten für eine Unterscheidung notwendig. Der dickere Film zeigt, dass der Film ein gewisses Maß an Durchsichtigkeit besitzt. Außerdem ist er merklich weicher und zeigt eine geringere Kohäsion als die dünneren Filme. Der Film, der über dem PVC-Label gezogen wurde, zeigt, trotz dass es sich um einen MeOH-KHP-Film der ersten Phase handelt, eine Schuppenbildung. Die KHPs vermögen also nur auf bestimmten (vermutlich bevorzugt rauen) Oberflächen Filme auszubilden.

## V. Ergebnisse und Diskussion

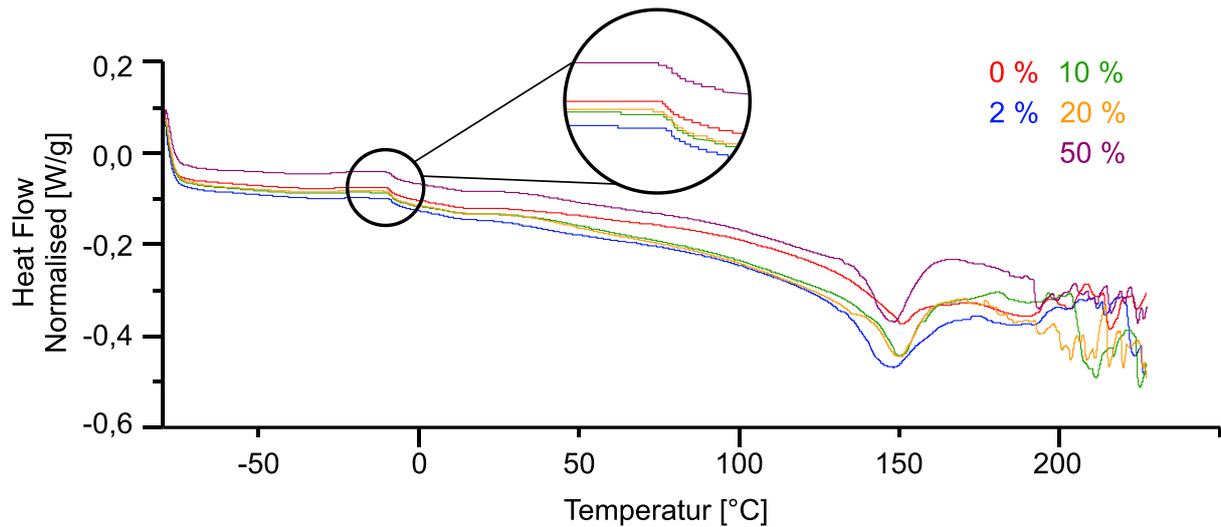


Abbildung V.5-2: DSC-Thermogramme der MeOH-KHP-Filme. Abgebildet sind die Thermogramme der Filme mit 0 % (w/w) (rot), 2 % (w/w) (blau), 10 % (w/w) (grün), 20 % (w/w) (orange) und 50 % (w/w) Texanol (lila). Der rote Kreis markiert die Temperatur an welcher sich die Glasübergangstemperaturen befinden.

Abbildung V.5-2 zeigt die DSC-Aufnahmen der MeOH-KHP-Filme der ersten Phase im Vergleich; die exakten Lagen der Glastemperaturen, sowie die Peakenergien sind in Tabelle V.5-1 aufgelistet. Die Glasübergangstemperaturen aller Proben sind nahezu gleich, lediglich der  $T_g$  der Probe mit vierfacher Masse wurde auf  $-9\text{ °C}$  statt  $-8\text{ °C}$  bestimmt. Diese Abweichung ist jedoch geringer als die Genauigkeit der Methode, sodass alle  $T_g$  als identisch betrachtet werden. Glasübergangstemperaturen sind in erster Linie durch die Energie definiert, die notwendig ist, um die Polymer- bzw. Oligomerketten einer Probe in Bewegung zu versetzen.<sup>[171]</sup> Daher ist es überraschend, dass die Menge an Koaleszenzmittel in der Probe keinen Einfluss auf diese zu haben scheint.

Tabelle V.5-1: Übersicht über die Glasübergangstemperaturen, Peak-Temperaturen und zugehörigen Enthalpien der MeOH-KHP-Filme mit unterschiedlichen Texanol-Konzentrationen.

MeOH-KHP-Probe	$T_g$ [°C]	Peak-Temperatur [°C]	Enthalpie [J/g]
0 % Texanol	-8	150	5,41
2 % Texanol	-8	147	11,66
10 % Texanol	-8	150	10,36
20 % Texanol	-8	150	11,06
50 % Texanol	-8	148	12,98
Vierfache Masse	-9	144	23,22

## V. Ergebnisse und Diskussion

Auch die Peak-Temperaturen sind in Anbetracht der Genauigkeit einer DSC nahezu identisch. Lediglich der Wert der Probe mit vierfacher Masse liegt etwas geringer. Um die Ursache hierfür zu ermitteln, muss zunächst bestimmt werden, wodurch der Peak verursacht wird.

Bekanntlich sind Keratine stark disulfidhaltig; Disulfide können durch Temperatureinwirkung aufgebrochen bzw. zu einem Disulfid-Austausch gebracht werden (vgl. Kapitel V.11). In Haaren wird Disulfidaustausch bereits ab einer Temperatur von etwa 80 °C beobachtet,<sup>[172, 173]</sup> jedoch wird ein starker Anstieg ab 150 °C beobachtet.<sup>[174]</sup> Es ist also möglich, dass es sich bei dem Peak um die Reaktionsenthalpie des Aufbrechens und Austauschs von Disulfiden handelt. Deutlich wahrscheinlicher ist jedoch ein Aufschmelzen des kristallinen Keratinanteils bei dieser Temperatur. In ihrer Arbeit zur Extraktion von Keratin aus Federn beobachteten *Alahyaribeik et al.* das Aufschmelzen kristalliner Teilbereiche in ganzen Federn bei 235 °C, welches jedoch bei Betrachtung aufgeschlossenen Keratins auf Temperaturen zwischen 170 °C und 215 °C sank.<sup>[34]</sup> *Wang et al.* beobachteten bei aufgeschlossenem Keratin aus Hasenhaar ein Aufschmelzen der Kristallstruktur bei 196 °C<sup>[175]</sup> – hierbei muss beachtet werden, dass durch den deutlich höheren Anteil  $\alpha$ -helicaler Strukturen im Hasenhaar-Keratin der erwartete Schmelzpunkt höher liegt. Durch die Unterschiede in den Aufschlussmethoden, sowie teilweise in den betrachteten Keratinquellen ist nicht zu erwarten, dass exakte Übereinstimmungen der Schmelztembereiche beobachtet werden können. Dennoch sind die Übereinstimmungen nahe genug, dass die beobachteten endothermen Peaks mit Hochpunkten bei 145 °C bis 150 °C dem Aufschmelzen kristalliner Teilbereiche in den KHPs zugeordnet werden kann.

Die Enthalpie des Films mit vierfacher Masse, bzw. Dicke, besitzt mit ca. 23 J/g einen etwa doppelt so großen Wert wie die Texanol-haltigen Filme und einen etwa vierfach größeren Wert verglichen mit dem Film ohne Texanol. Mit Ausnahme des Films mit 2 % Texanol steigt die zum Aufschmelzen benötigte Enthalpie mit zunehmendem Texanol-Anteil an. Somit scheint es, dass die Härte des Films umgekehrt proportional zur zum Aufschmelzen benötigten Energie ist. Dies setzt sich mit dem Film vierfacher Masse fort, da dieser, evtl. durch eingeschlossene Feuchtigkeit, der weichste hergestellte Film war.

Abschließend wurde die thermische Stabilität der MeOH-KHPs durch eine TGA-Messung bestimmt. Da der Gehalt an Texanol keinerlei Einfluss auf die thermische Stabilität hat

## V. Ergebnisse und Diskussion

und durch das Abdampfen des Koaleszenzmittels höchstens das Ergebnis verfälschen würde, wird hier nur eine TGA des MeOH-KHP-Films ohne Texanol besprochen. Diese ist in Abbildung V.5-3 zu sehen.

Zu Beginn der Messung wird lediglich das im Film gespeicherte Wasser verdampft – dieses macht 10 % der Gesamtmasse aus. Die Onsettemperatur, also der Beginn der thermischen Zersetzung, liegt bei 157 °C, also nur geringfügig höher als die Peaktemperatur des Disulfidaustauschs. Dies macht eine gezielte Nutzung von Disulfidaustauschreaktionen durch Hitze schwer. Die Temperatur  $T_5$ , welche jene Temperatur angibt bei der 5 % der Masse verloren wurden, liegt bei 183 °C.

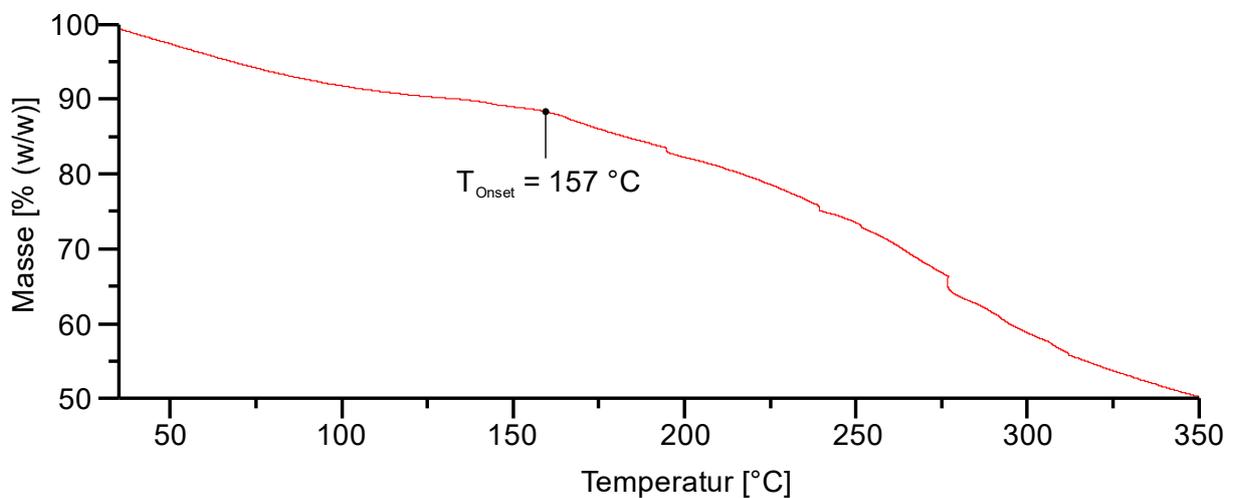


Abbildung V.5-3: Exemplarisches TGA-Thermogramm eines MeOH-KHP-Films ohne Zusatz von Texanol. Heizrate: 10 K/min. Markiert ist die Onset-Temperatur bei 157 °C. Bei den Sprüngen im Masseverlust > 200 °C handelt es sich um Messartefakte.

Nachdem die KHPs durch Methanol-Extraktion soweit von ihrer Salzlast befreit wurden, dass sie zu Filmen verarbeitet werden konnten, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Materialeigenschaften sich ändern, würden die Filme aus reduzierten MeOH-KHPs gezogen. Dazu musste zunächst ein Reduktionsprotokoll entwickelt werden. Dieses wird im kommenden Kapitel behandelt.

## V.6 KHP-Reduktion

In Disulfiden liegen die Schwefelatome in der Oxidationsstufe –I vor, also im Vergleich zu ihrer bevorzugten Oxidationsstufe –II oxidiert. Prinzipiell sind Disulfide nicht sonderlich schwer zu reduzieren, jedoch variieren die Reduktionsprodukte je nach eingesetztem Reduktionsmittel stark. In dieser Arbeit wird die selektive reduktive Spaltung der

## V. Ergebnisse und Diskussion

Disulfide zu zwei freien Thiolen präferiert, es existieren jedoch auch Reduktionsmittel, welche eine asymmetrische Spaltung des Disulfids bewirken. Beispielsweise führt der Einsatz von Sulfid als Reduktionsmittel zu einer Spaltung, bei der ein freies Thiol und ein Bunte-Salz entstehen. Wird die Reduktion mit Natriumsulfid durchgeführt, kommt es zur Bildung von Perthiocystein und Dehydroalanin. Beide Ergebnisse sind unerwünscht: zum einen, da lediglich die freien Thiole für Folgechemie oder eine gezielte Reoxidation zum Disulfid genutzt werden können, zum anderen weil das Aufkommen hochaktiver Substanzen wie Dehydroalanin zu unerwünschten und unvorhersehbaren Nebenreaktionen führen kann.<sup>[33, 55]</sup>

Ein Thiol-freies Reduktionsmittel, welches auch in dieser Arbeit verwendet wurde, das sehr stark in der Reduktion von Disulfiden zu Thiolen ist, ist Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), oft als Hydrochlorid eingesetzt.<sup>[57]</sup>

Dadurch, dass es bereits für die Reduktion von Haarkeratin etabliert ist, wurde als erstes ATG als Reduktionsmittel getestet. Dazu wurden 500 mg KHPs in 1 ml 70 %iger ATG-Lösung in Wasser aufgeschlämmt. Nach 30 min Rühren wurde die Suspension abfiltriert und der feste Rückstand zunächst mit kaltem Aceton gewaschen. Da nach mehrmaligem Waschen mit Aceton noch olfaktorisch die Präsenz von ATG bestimmt werden konnte, wurde der Rückstand anschließend mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Dieser Waschvorgang ging mit einem hohen Verlust an KHPs einher und auch danach war das ATG noch merklich wahrnehmbar.

Darum wurde diese Art der Reaktionsführung verworfen und stattdessen 1155 mg MeOH-KHPs in 10 ml Wasser gelöst. Die Lösung wurde dann für 15 min mit Stickstoff durchgast, um Sauerstoff auszutreiben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 70 %iger ATG-Lösung in Wasser. Nach Rühren für 30 min bei RT wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch (MWCO 100 – 500) überführt. Nach drei Dialysedurchgängen wurde das verbleibende Dialysat eingefroren und mittels Gefriertrocknung getrocknet.

Die so erhaltenen KHPs wurden durch Raman-Spektroskopie auf den Erfolg der Reduktion überprüft. Da auch das ATG eine Thiol-Gruppe aufweist, wurde zusätzlich eine Überprüfung des ATG-Gehalts durch Ionenchromatographie durchgeführt. Dabei kam heraus, dass sich nach der Dialyse noch 2,7 % (w/w) ATG in der Probe befanden. Auch nach mehrmaligem Wiederholen konnte keine ATG-freie Probe erzeugt werden. Dies macht eine zuverlässige Thiol-Analytik der reduzierten KHPs nahezu unmöglich. Dennoch

## V. Ergebnisse und Diskussion

wurde ein Raman-Spektrum aufgenommen, da dieses ggf. anhand der Disulfid-Bande Aufschluss über den Erfolg oder Misserfolg der Reduktion geben kann. Dieses Spektrum ist in Abbildung V.6-1 abgebildet.

Alternativ wurde die KHP-Reduktion durch TCEP untersucht. TCEP ist sehr oxidationsempfindlich. Daher musste hier vermehrt auf anaerobe Reaktionsbedingungen geachtet werden. Deshalb wurde wieder die KHP-Lösung für 15 Minuten bestickt; die Reaktionsapparatur war dabei unter Stickstoffatmosphäre mit einem Septum versiegelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von TCEP im Stickstoffgegenstrom. Nach 30 Minuten Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung in einen Dialyseschlauch überführt und dialysiert. Das finale Dialysat wurde eingefroren und gefriergetrocknet. Abbildung V.6-1 zeigt das Raman-Spektrum der TCEP-reduzierten MeOH-KHPs. Dort ist zu sehen, dass eine vollständige Reduktion erreicht werden konnte.

TCEP zeigt seine stärkste Wirksamkeit im sauren bis neutralen Bereich. Daher wurden unterschiedliche pH-Werte zwischen pH 3 und pH 7 getestet, wobei alle zu einer vollständigen Reduktion der Probe führten. Darum wurden TCEP-Reduktionen anschließend in vollentsalztem Wasser bei pH 7 durchgeführt.

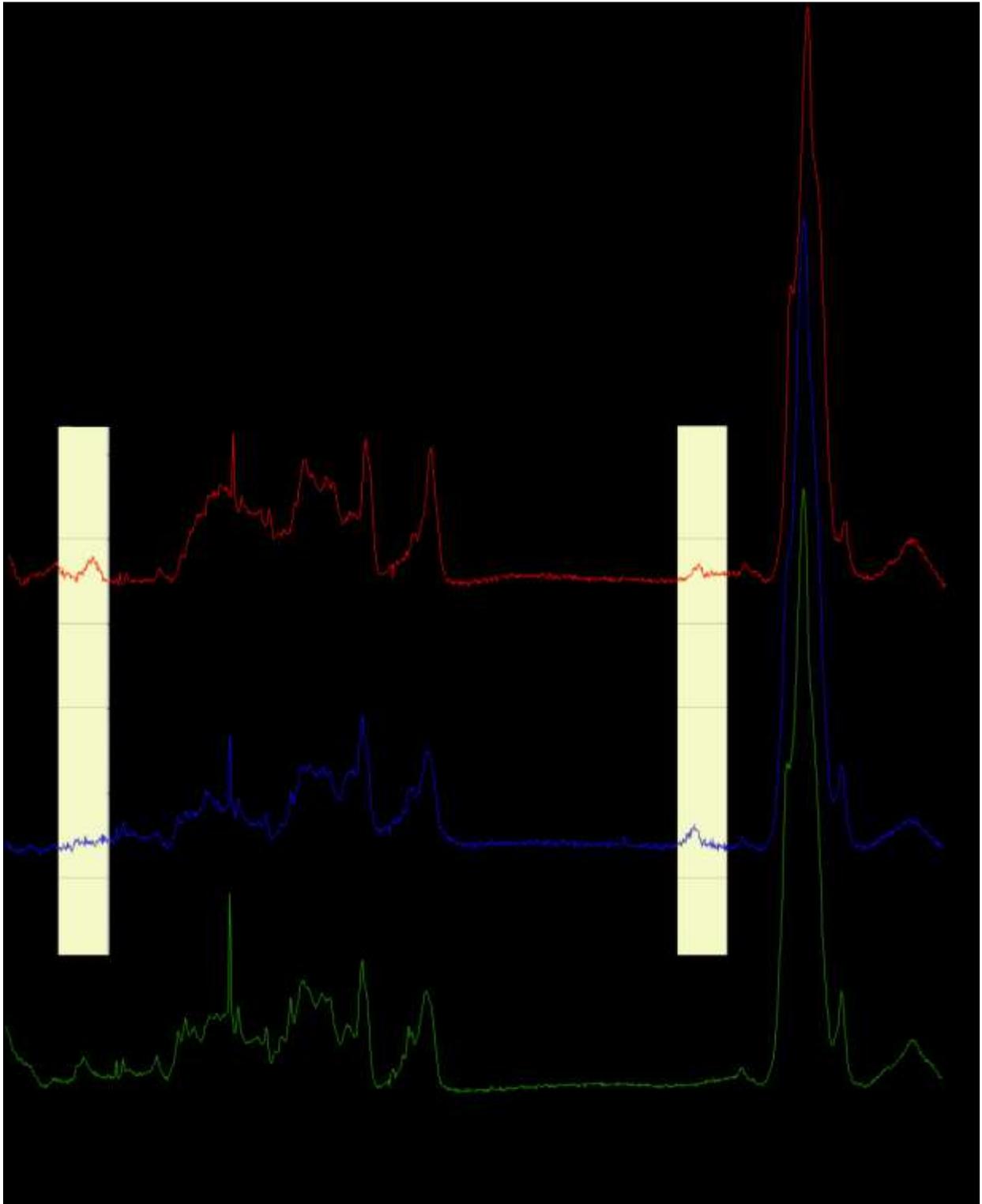


Abbildung V.6-1: Raman-Spektren von MeOH-KHP (grün), MeOH-KHP mit TCEP reduziert (blau) und MeOH-KHP mit ATG reduziert (rot). Oben ist die Reduktion der KHPs durch TCEP bzw. ATG dargestellt.

Während im Spektrum der TCEP-reduzierten MeOH-KHPs nur eine Thiol-Bande bei  $2573\text{ cm}^{-1}$  zu sehen ist, was eine vollständige Reduktion der Disulfide ( $\sim 510\text{ cm}^{-1}$ ) zeigt, finden sich im Spektrum der ATG-reduzierten MeOH-KHPs sowohl eine Disulfid- als auch

## V. Ergebnisse und Diskussion

eine Thiol-Bande. Dies bedeutet, dass hier eine unvollständige Reduktion stattfand. Ein Vergleich der Flächen der Banden ergab, dass diese etwa gleich groß sind – selbstverständlich kann daraus kein genauer Grad der Reduktion abgelesen werden (insbesondere, da sich noch ATG in der Probe befindet), doch lässt sich damit abschätzen, dass die Reduktion nicht zu mehr als 50 % erfolgreich gewesen sein kann. Somit ist TCEP durch seine Befähigung die KHPs vollständig zu reduzieren und durch die stark vereinfachte Kontrolle mittels Raman das Reduktionsmittel der Wahl für künftige Reduktionen im Labormaßstab. So ist es möglich die Eigenschaften reduzierter KHPs zu untersuchen. Für etwaige spätere Reduktionen im größeren Maßstab ist TCEP jedoch auf Grund der oben benannten Oxidationsempfindlichkeit, sowie seines Preises ungeeignet.

### **V.7 Filmbildungsexperimente mit reduzierten MeOH-KHPs**

In Kapitel V.3 wurden Filmbildungsexperimente mit KHPs durchgeführt, in Kapitel V.5 wurden analoge Experimente mit den MeOH-KHPs mit größerem Erfolg wiederholt. Nun sollen Filmbildungsexperimente mit reduzierten MeOH-KHPs (r-MeOH-KHPs) das Bild ergänzen. Die Experimente mit r-MeOH-KHPs setzen sich aus zwei Typen zusammen: zum einen werden Versuche durchgeführt, die an die vorangegangenen angelehnt sind, indem die r-MeOH-KHPs in Wasser (oder wässrigen Lösungen) gelöst werden und dann durch das Verdampfen des Wassers unter Normalbedingungen ein Film erzeugt wird. Hierbei ist es interessant zu sehen, ob es durch Luftsauerstoff allein zu einer Oxidation der Thiole kommt, oder ob diese durch andere Oxidationsmittel erzeugt werden muss. Außerdem wird untersucht, ob die MeOH-KHPs in den Filmen reduziert bleiben oder im Zuge der Filmbildung durch Luftsauerstoff reoxidiert werden können. Der zweite Experiment-Satz beschäftigt sich mit Filmen, die aus einem Gemisch aus r-MeOH-KHPs mit einem anderen Thiol-Vernetzer gezogen werden.

Da untersucht werden soll, ob die r-MeOH-KHPs durch Luftsauerstoff reoxidieren, wurde zunächst die Oxidationsgeschwindigkeit der KHPs als Feststoff untersucht. Hierzu diente das synthetische Peptid als Modellsubstanz, mit welcher durch geringen Aufwand ein guter Einblick in die Oxidationsgeschwindigkeit an der Luft gewonnen werden konnte. Abbildung V.7-1 zeigt die Raman-Spektren des synthetischen Peptids nach unterschiedlich langer Luftexposition (0 Tage, 4 Tage, 7 Tage und 14 Tage).

## V. Ergebnisse und Diskussion

Die aufgenommenen Spektren können ohne adäquate Kalibriergerade nur vollwertig auf ihre qualitative Aussage betrachtet werden, eine genaue Quantifizierung des Disulfid-Gehalts war jedoch auch nicht die Intention der Messreihe. Hier sollte lediglich untersucht werden, ob die Größenordnung der Dauer der KHP-Oxidation hin zum Disulfid an der Luft im Bereich von Tagen, Wochen oder evtl. noch höher liegt. Das Ergebnis, welches in der untenstehenden Abbildung zu sehen ist, zeigt, dass auch nach 14 Tagen noch freie Thiole in nennenswerter Menge nachzuweisen sind. Um einen Trend zu ermitteln, wurde der prozentuale Anteil der jeweiligen Disulfidbandenflächen an den Flächen beider Banden ermittelt. Selbstverständlich korrelieren die Peakflächen nicht direkt mit dem Anteil an Disulfid bzw. Thiol, doch kann aus dem Trend der Flächen auch ein Trend auf die Verteilung der Oxidationsstufen des Schwefels abgeleitet werden. Hier zeigt sich, dass die Oxidation an der Luft überaus langsam abläuft – das Verhältnis der betrachteten Banden bleibt annähernd konstant. Dies deckt sich auch mit der Literatur, welche sich mit der Luftoxidation von Disulfiden beschäftigt.<sup>[107-109]</sup> Abschließend kann also darauf geschlossen werden, dass die Sauerstoffoxidation der KHPs keine relevante Rolle bei der Filmbildung von r-MeOH-KHPs spielt.

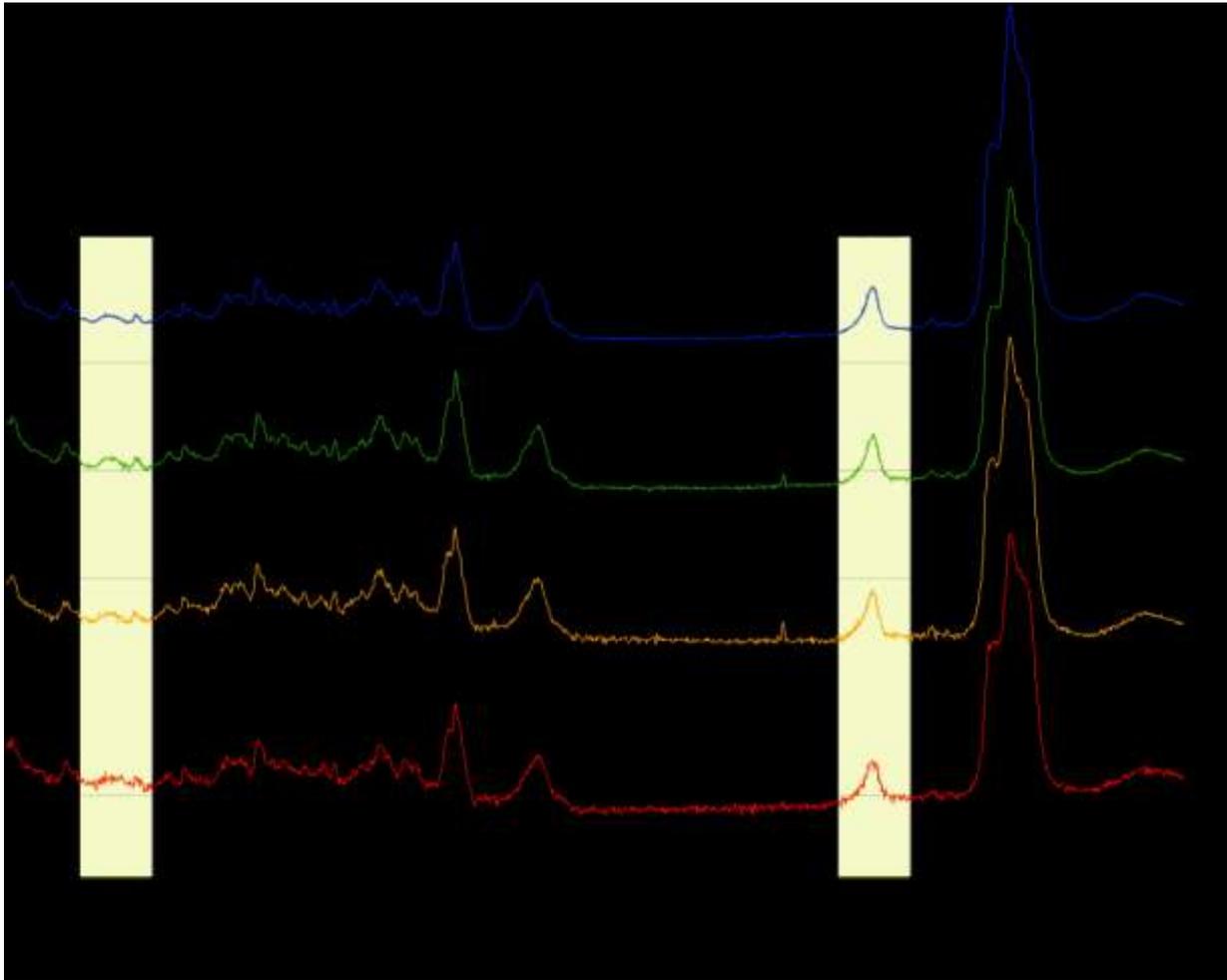


Abbildung V.7-1: Gegenüberstellung der Raman-Spektren des synthetischen Peptids ohne Sauerstoff-Exposition, sowie nach 4, 7 und 14 Tagen an der Luft. Oben ist die Luftoxidation abgebildet.

Da die r-MeOH-KHPs nicht durch Luftsauerstoff in einer realistischen Zeitspanne zur Oxidation gebracht werden können, wurde als nächstes die Reoxidation durch den Einsatz von Wasserstoffperoxid untersucht. Dazu wurde erneut das synthetische Peptid als Modellsubstanz eingesetzt.  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen (0,5 %, 1 % und 2 %) wurden verwendet, um das synthetische Peptid zu lösen. Nach dem Abdampfen des Lösemittels wurden die Peptide mittels Raman-Spektroskopie auf die Vollständigkeit der Oxidation überprüft. Bereits die geringste verwendete Konzentration von 0,5 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  reichte aus, um eine vollständige Oxidation der Thiole zum Disulfid zu bewirken. Die untenstehende Abbildung V.7-2 zeigt das Raman-Spektrum der durch 0,5 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung oxidierten Probe, sowie die IR-Spektren aller drei Proben.

## V. Ergebnisse und Diskussion

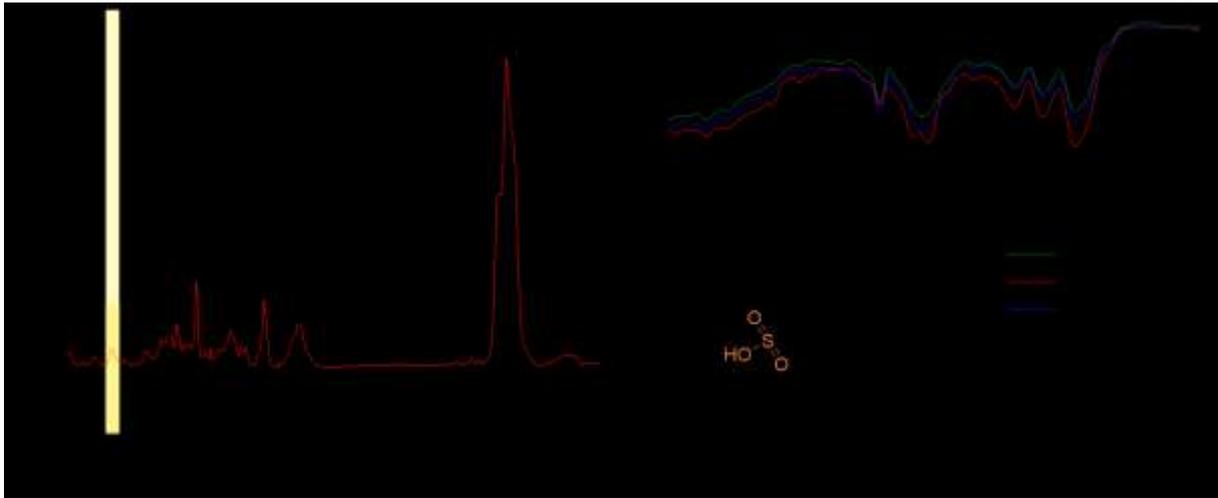


Abbildung V.7-2: A) Raman-Spektrum des mit 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung oxidierten synthetischen Peptids. Gelb markiert ist die Lage der Disulfidbande B) korrespondierendes IR-Spektrum des mit 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung oxidierten synthetischen Peptids, sowie die IR-Spektren der Proben mit 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Sulfongruppe der Cysteinsäure gibt eine scharfe Bande i.d.R. bei ca. 1040 cm<sup>-1</sup> ab,<sup>[176, 177]</sup> hier liegt die Bande bei 1038 cm<sup>-1</sup>.

Wie in Kapitel V.6 beschrieben ist die Oxidation von Haarkeratin mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinlänglich bekannt,<sup>[54]</sup> daher kommt der Erfolg der hier gezeigten Oxidation des synthetischen Keratinfragments nicht überraschend. Im Folgenden wird auch gezeigt werden, dass die Oxidation auch auf die MeOH-KHPs übertragbar ist. Zunächst wurde jedoch eine IR-Analyse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidierten Peptide durchgeführt, da ebenfalls bekannt ist, dass bei der Reoxidation reduzierter Haare („Fixierung“) eine Überoxidation stattfinden kann, sodass ein Teil des Cysteins (Thiol, Oxidationsstufe -II) nicht zum Cystin (Disulfid, Oxidationsstufe -I), sondern zur Cysteinsäure (Sulfonsäure, Oxidationsstufe +IV) oxidiert wird.<sup>[178]</sup> Dies ist insbesondere relevant, da die Oxidation eines Thiols zur Sulfonsäure irreversibel abläuft.

In Abbildung V.7-2 sind die normierten IR-Spektren der Oxidationen mit den drei unterschiedlichen Wasserstoffperoxidkonzentrationen dargestellt. Die Bande der Cysteinsäure ist farblich markiert, sodass klar ersichtlich ist, dass alle drei Konzentrationen auch zu einer geringfügigen Bildung von Cysteinsäure führen. Ebenfalls ist erkennbar, dass die Bandenintensität mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration zunimmt, was einen Anstieg der Cysteinsäure bedeutet. Die Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stellt eine elegante Oxidationsmethode dar, bei welcher keine Reste des Oxidationsmittels (bspw. Iodid) im Film verbleiben. Da bereits die geringste getestete Konzentration von 0,5 % ausreicht, eine vollständige Oxidation herbeizuführen, wurde die geringfügige

## V. Ergebnisse und Diskussion

Überoxidation hin zum Sulfit für die weiteren Laborversuche in Kauf genommen. Die thermischen Eigenschaften wurden später untersucht, sodass im Falle einer massiven Verschlechterung eine neue Oxidationsmethode entwickelt werden könnte.

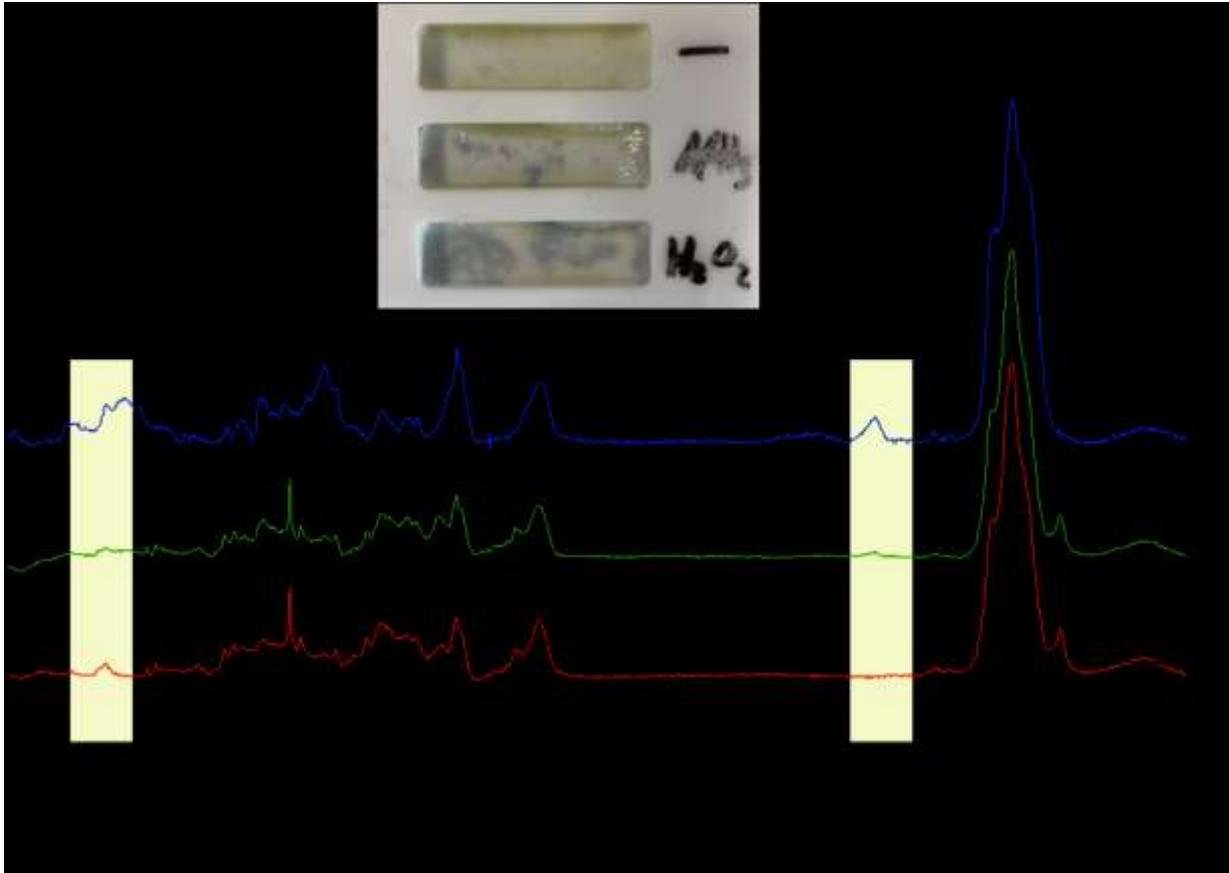


Abbildung V.7-3: Gegenüberstellung der Raman-Spektren der r-MeOH-KHP-Filme gezogen aus Wasser (oben, blau), 10 %iger ammoniakalischer Lösung (Mitte, grün) und 0,5 %iger  $H_2O_2$ -Lösung (unten, rot). Gelbe Banden markieren die Lagen der Disulfid- und Thiol-Signale.

Die obenstehende Abbildung V.7-3 zeigt ein Bild sowie die Raman-Spektren von drei Filmen, die im Anschluss an die Oxidationsversuche am synthetischen Keratinfragment durchgeführt wurden. Hier wurden die r-MeOH-KHPs analog zu allen vorangegangenen Filmbildungsexperimenten mit einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst und durch Abdampfen des Lösemittels ein Film erzeugt. Die getesteten Lösemittel waren dabei Wasser als Referenz, 5 %ige Ammoniaklösung als basisches Medium, sowie 0,5 %ige Wasserstoffperoxidlösung, von der zuvor gezeigt werden konnte, dass sie Federkeratinfragmente zu oxidieren vermag.

Von der wässrigen Lösung wurde keine oxidative Wirkung erwartet, die groß genug wäre, die r-MeOH-KHPs zu oxidieren. Die ammoniakalische Lösung wurde als Alternative zur

## V. Ergebnisse und Diskussion

Oxidation mittels Wasserstoffperoxid getestet. Thiole zeigen in basischen Medien eine höhere Neigung zur Ausbildung von Disulfiden, da die Thiole hier als Thiolate vorliegen, welche mit ihrer erhöhten Nukleophilie die Disulfidbildung begünstigen.<sup>[74]</sup> Ammoniak wurde als Base ausgewählt, da dieses langsam aus der Probe verdunsten kann, sodass der finale Film rückstandsfrei zurückbleibt.

Die Spektren aus Abbildung V.7-3 spiegeln diese Erwartungen gut wider. Das oberste Spektrum wurde aus dem Film der wässrigen Lösung aufgenommen. Klar ersichtlich ist die Thiol-Bande bei  $2573\text{ cm}^{-1}$ , eine Disulfidbande scheint auch vorhanden, wird jedoch durch ihre geringe Intensität von anderen Banden teilweise überdeckt. Die r-MeOH-KHPs liegen also teilweise oxidiert vor, eine Abschätzung des Oxidationsgrades ist jedoch nicht möglich.

Das mittlere Spektrum zeigt den Film der ammoniakalischen Lösung, bei welchem vor dem Versuch keine gut fundierte Vorhersage über den finalen Zustand des Cysteins getroffen werden konnte. Hier zeigt sich, dass nach wie vor Thiole in den Peptiden vorhanden sind, jedoch auch eine eindeutige Disulfidbande ( $\sim 510\text{ cm}^{-1}$ ) zu sehen ist. Hier fand eine unvollständige Oxidation statt.

Das unterste Spektrum gehört zum Film der 0,5 %igen Wasserstoffperoxidlösung. Wie erwartet ist hier keine Thiolbande mehr zu beobachten, dafür eine starke Disulfidbande. Die Peptide liegen hier vollständig oxidiert vor. Die 0,5 %ige Wasserstoffperoxidlösung ist also die beste Wahl bezogen auf die Oxidationsleistung.

Nachdem die Methode zur Oxidation der r-MeOH-KHPs identifiziert werden konnte, wurden die reoxidierten Filme als nächstes durch DSC auf ihre thermischen Eigenschaften untersucht – spezifisch ob diese von jenen der MeOH-KHPs abweichen. Die Thermogramme der drei Proben sind in Abbildung V.7-4 zu sehen. Die DSC-Messungen wurden analog zu den zuvor beschriebenen durchgeführt.

Alle drei Thermogramme zeigen einen ähnlichen Verlauf zu jenen der nicht-reduzierten Proben, mit zwei Unterschieden. Zum einen verschiebt sich die Glasübergangstemperatur durch die Reduktion von  $-8$  auf  $-6\text{ °C}$  was auch durch die Reoxidation nicht revidiert wird. Geringe Temperaturverschiebungen von  $2\text{ °C}$  sind in DSC-Messungen nicht immer auf tatsächliche Eigenschaftsänderungen zurückzuführen, sondern können auch durch Messungenauigkeiten, oder minimale Unterschiede im gebundenen Restwasser

## V. Ergebnisse und Diskussion

verursacht werden, sodass dieser Unterschied mit Vorsicht betrachtet werden muss. Resultiert die Differenz jedoch aus der Reduktion, zeigt dies, dass die Peptide dadurch eine größere konformative Freiheit erfahren und könnte ein Indiz dafür sein, dass Disulfide durch die Reoxidation vorgezogen inter- und nicht intramolekular gebildet werden.

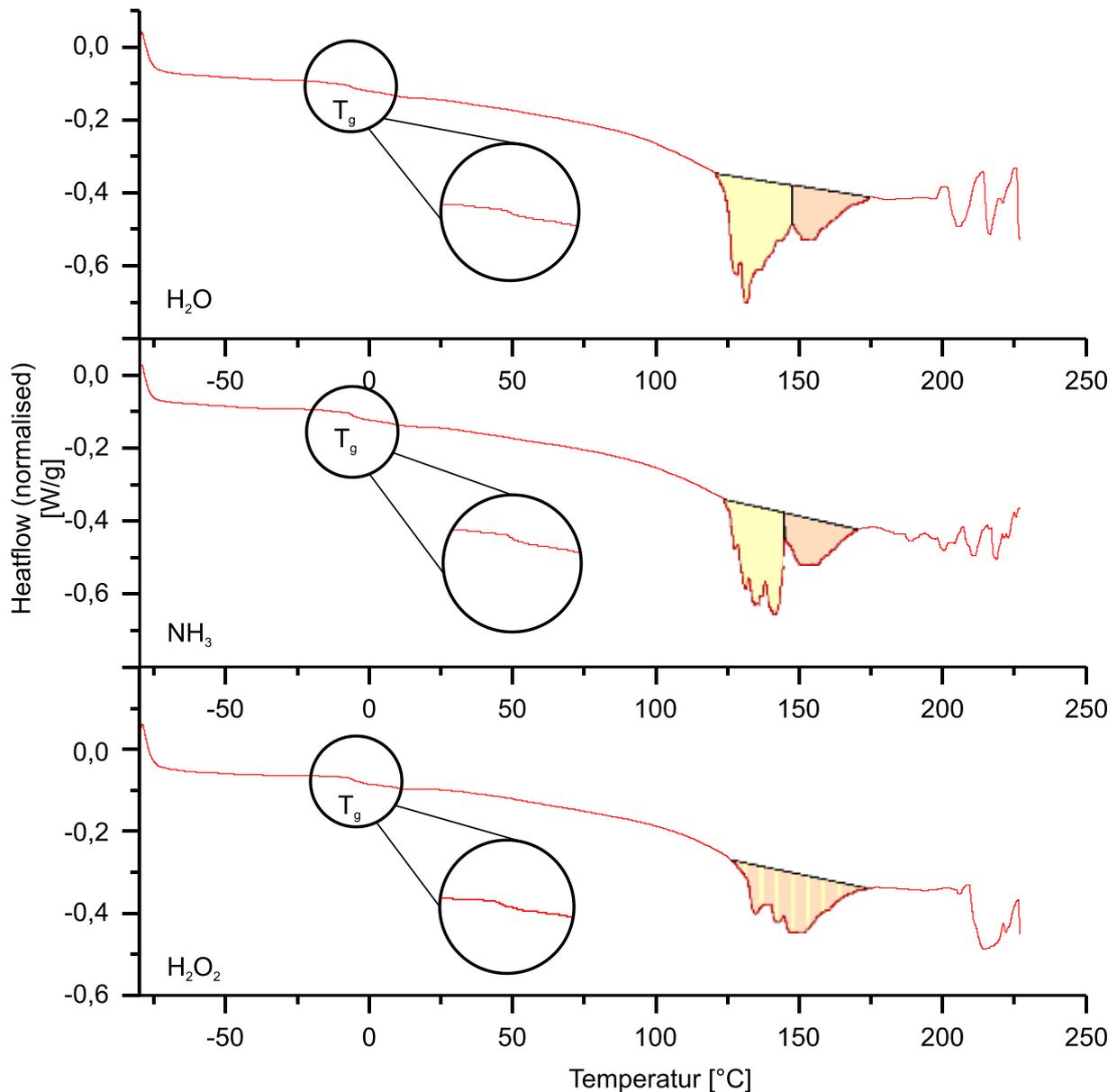


Abbildung V.7-4: Gegenüberstellung der DSC-Thermogramme von r-MeOH-KHP-Filmen aus Wasser (oben),  $NH_3$ -Lösung (Mitte) und  $H_2O_2$ -Lösung (unten).

Der zweite, deutlich größere, Unterschied zeigt sich im endothermen Peak. Dieser beginnt bei den hiesigen Proben bereits bei geringerer Temperatur ( $\sim 125$  °C) und die Form des Peaks ist gänzlich unterschiedlich. Der Peak der r-MeOH-KHPs ist weniger symmetrisch als der der MeOH-KHPs (vgl. Abb. V.5-3). Werden die drei Thermogramme untereinander

## V. Ergebnisse und Diskussion

verglichen fällt auf, dass der Peak bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidierten Probe sehr viel näher an der Form der MeOH-KHPs ist. Außerdem ist zu sehen, dass die Filme aus Wasser und ammoniakalischer Lösung zwei ineinander übergehende Peaks zu zeigen scheinen (in der Abbildung durch gelbe und orangene Flächen markiert). Da die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidierte Probe keine Thiole mehr aufweist, kann daraus geschlossen werden, dass die Änderung des Peaks auf die Anwesenheit freier Thiole zurückzuführen ist.

Der orangene Teil des Peaks entspricht jenem der Thermogramme der nicht-reduzierten MeOH-KHPs. Hierbei handelt es sich also um die Energie, welche notwendig ist, um die teilkristallinen Bereiche der MeOH-KHPs aufzuschmelzen.<sup>[34]</sup> Die Tatsache, dass sich die Peaklagen und Peakformen durch die Präsenz freier Thiole ändern, zeigt, dass diese einen Einfluss auf die von den Peptiden eingenommenen Konformationen haben müssen. Dies ist insofern nicht verwunderlich, dass die reduzierten MeOH-KHPs, wie oben bereits behandelt, ein höheres Maß konformativer Freiheit besitzen. Hierdurch können energetisch günstigere Anordnungen erfolgen – der Grad der Kristallinität könnte zunehmen. Zudem sind durch die Anwesenheit der Thiole zusätzliche gute Wasserstoff-Donoren zum Eingehen von Wasserstoffbrückenbindungen vorhanden. Ein gesteigener Anteil von Wasserstoffbrücken ist ebenfalls in der Lage die Veränderung der endothermen Peaks, in Form und Fläche, zu erklären.

Die Tatsache, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oxidierte Probe die geringste Abweichung zur vorigen Peakform aufweist, stützt den Befund, dass es sich hierbei um den Einfluss der Thiole handelt. Dass es dennoch eine geringfügige Änderung gibt, weist darauf hin, dass auch bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation (mit 0,5 %iger Lösung) einige Thiole zurückbleiben, jedoch in so geringem Maße, dass diese nicht via Raman-Spektroskopie erfasst werden können.

### **V.8 r-MeOH-KHP-Filme mit petrochemischem Thiol-Härter**

Nach der Etablierung einer Reduktions- und Reoxidationsmethode mit Filmbildung der MeOH-KHPs wurde als abschließender Filmbildungstest die Filmbildung mit einem weiteren Thiol-Vernetzer untersucht. Dazu wurden den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-r-MeOH-KHP-Lösungen 25, 50, 75 und 100 Äq% (w/w) Thiocure ETTMP 1300 (TC-1300) beigefügt und durch Verdampfen des Wassers Filme gebildet. Die haptische Untersuchung mittels Holzspatel zeigte jedoch, dass die Filme durch die Zugabe von mehr TC-1300 etwas weicher werden.

## V. Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung V.8-1 sind die Raman-Spektren, sowie die Thermogramme der DSC-Messung dieser Filme abgebildet. Dort ist auch die Struktur des Thiol-Vernetzers abgebildet.

Um den Grad der Oxidation und somit indirekt der Vernetzung zu kontrollieren wurden Raman-Spektren der Filme aufgenommen. Die Oxidation der Mischfilme erfolgte analog der Oxidation der r-MeOH-KHP-Filme durch 0,5 %ige  $H_2O_2$ -Lösung. Ebenso wie zuvor bei den reinen r-MeOH-KHP-Filmen reichte diese auch hier für eine vollständige Oxidation aus. Dies kann in den in Abbildung V.8-1 gezeigten Spektren beobachtet werden. In diesen Raman-Spektren finden sich keine Thiol-Banden mehr, dafür sind Disulfidbanden in das Spektrum getreten.

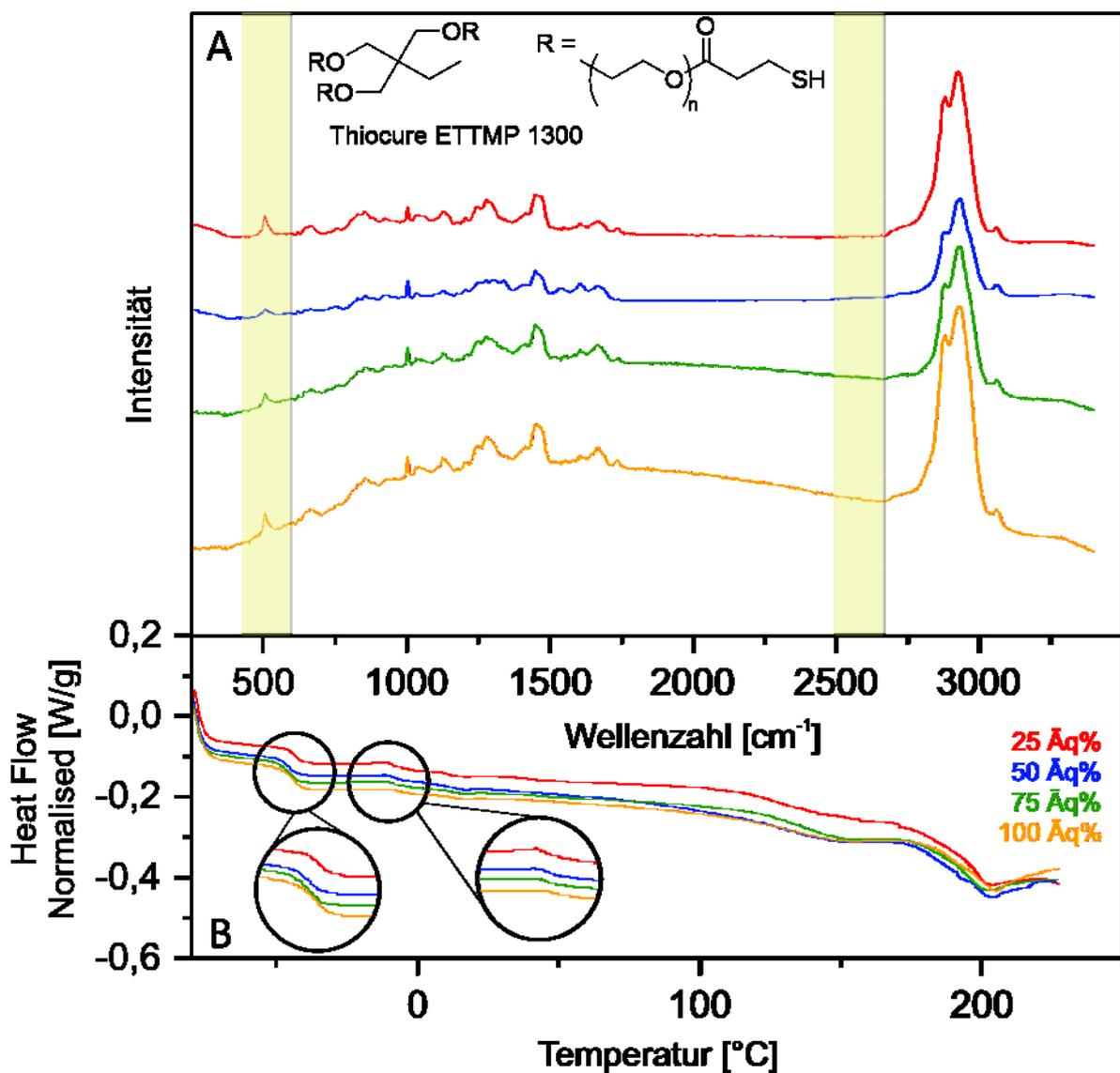


Abbildung V.8-1: A) Raman-Spektren der Filme aus r-MeOH-KHP mit TC-1300 aus 0,5 %iger  $H_2O_2$ -Lösung. Gelbe Banden markieren die Lagen der Disulfid- und Thiol-Signale. Zusätzlich ist die Struktur des

## V. Ergebnisse und Diskussion

verwendeten Vernetzers, TC-1300 gezeigt. B) korrespondierendes Thermogramm aus der DSC-Messung. Die roten Kreise markieren Glasübergangstemperaturen.

Bei ca. 150 °C befindet sich ein endothermer Peak. Dieser ähnelt in seiner Form viel mehr jenen der nicht-reduzierten Filme; die „ausgefranst“ Peaks der r-MeOH-KHP-Filme sind nicht im Thermogramm zu finden, was sich mit der Aussage des Raman-Spektrums deckt. Auch sonst besteht sehr große Ähnlichkeit zu den Werten der MeOH-KHPs, die Glasübergangstemperatur wurde hier ebenfalls auf -8 °C bestimmt. Jedoch findet sich hier eine weitere, deutlich stärkere, Glasübergangstemperatur bei -45 °C, dies deckt sich mit der  $T_g$  von TC-1300 handelt, wie sie in der Literatur berichtet wird.<sup>[179, 180]</sup> Die Ketten der beiden Komponenten werden also durch die gemeinsame Filmbildung nicht in ihren intrinsischen Beweglichkeiten eingeschränkt.

### V.9 Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol

In einem zweiten Projekt wurde die Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol (DT) aus 2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol angestrebt. Das DT kann später als Molekül, welches ein Disulfid und zwei Alkoholgruppen enthält verwendet werden, um in Polymere wie Polyester oder Polyurethane eingebaut zu werden. Da das Disulfid in einem Ring vorliegt, können so zwei freie Thiole in einem Polyester oder Polyurethan erzeugt werden, ohne, dass durch die Reduktion des Disulfids eine Kettenspaltung erzeugt wird.

Nachdem die Synthese von *Wessig et al.*<sup>[181]</sup> nicht reproduziert werden konnte, wurde die Synthese nach einer adaptierten Version eines Patents von *Dayagi et al.*<sup>[182]</sup> entwickelt. Dabei wurde das Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol mit 4 Äquivalenten Natriumhydrogensulfid in Methanol vorgelegt und im Anschluss für 16 Stunden bei RT gerührt. Die Synthese wurde stets ohne Ausschluss von Luft oder Feuchtigkeit durchgeführt. Die Präsenz von Luftsauerstoff ist für diese Reaktion ein wichtiger Faktor, da diese den Ringschluss nach der  $S_N2$ -Reaktion zum Dithiolan ermöglicht.

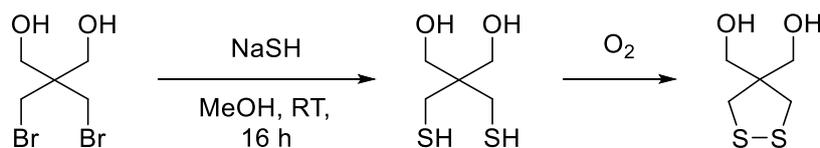


Abbildung V.9-1: Reaktion von Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol zu (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol durch Umsetzung mit Natriumhydrogensulfid und Luftoxidation.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Nach vollendeter Reaktionsdauer befindet sich ein bläulich-weißer Niederschlag im Kolben. Hierbei handelt es sich um das als Nebenprodukt anfallende Natriumbromid, welches im Methanol unlöslich ist. Dieses kann mittels simpler Faltenfilterfiltration abgetrennt werden. Das erhaltene Rohprodukt wurde anschließend aus Ethanol umkristallisiert. Ethanol wurde ausgewählt, da dieses eine noch schlechtere Löslichkeit des Natriumbromids aufweist. Nach der Umkristallisation wurde die mit 56 % beste Ausbeute für die Synthese von DT erhalten. Nach der Umkristallisation wurde das Produkt für 24 h an der Luft stehen gelassen, um ggf. noch nicht oxidierten Thiolen die Gelegenheit zur Oxidation zu bieten. Das finale Produkt wurde durch  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie und Raman-Spektroskopie charakterisiert – beide Spektren sind in Abbildung V.9-2 dargestellt. Laut NMR-Spektroskopie beträgt die Reinheit des Produkts 95 %, gemäß GC wurde diese auf 93 % taxiert. Die Raman-Spektroskopie konnte die vollständige Oxidation der Thiole zum 1,2-Dithiolan nachweisen.

## V. Ergebnisse und Diskussion

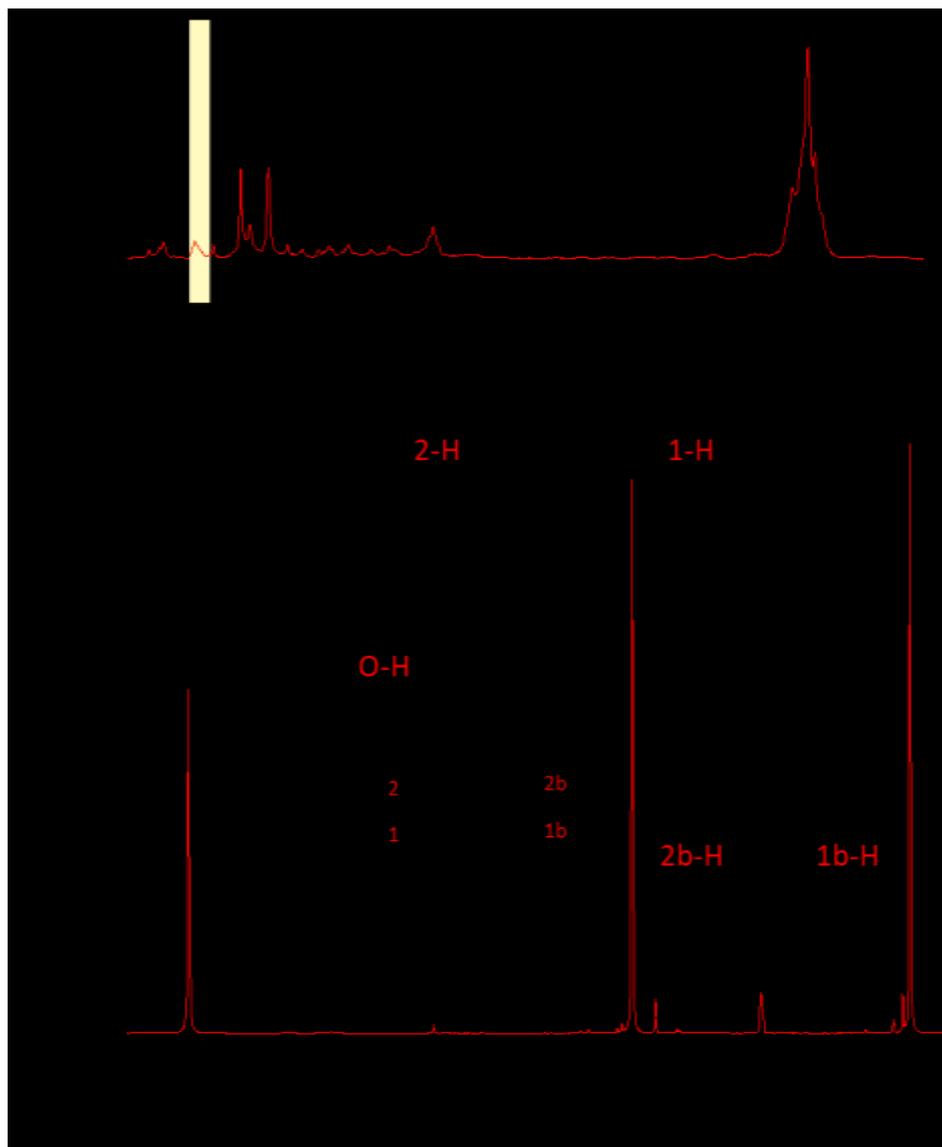


Abbildung V.9-2: A) Raman-Spektrum des (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol (DT). Aufgenommen mit einem 532 nm, Laser, 10 mW, 10 Hz, 50 Scans. Gelb markiert ist die Disulfidbande des DTs B)  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol. Aufgenommen in MeOD.

Die oben beschriebene Reaktionsführung führte zum Produkt mit der besten Reinheit. Im Folgenden werden einige weitere getestete Synthesen gezeigt, welche schlechtere Ausbeuten und/ oder geringere Reinheiten lieferten.

Die Vorlage nach *Dayagi et al.* arbeitet mit 10 Äquivalenten Natriumhydrogensulfid.<sup>[182]</sup> Diese wurden im Zuge der Anpassung und Optimierung der Reaktion auf vier Äquivalente reduziert. Vier Äquivalente wurden ausgewählt, da dies die geringste Anzahl an Äquivalenten war, welche einen vollständigen Umsatz des Edukts gewährleistete. Es wurden auch Reaktionen mit nur zwei bzw. drei Äquivalenten durchgeführt, bei diesen

## V. Ergebnisse und Diskussion

kam es jedoch nie zur vollständigen Umsetzung von Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol zu DT.

Des Weiteren wurde die Ausfällung des überschüssigen Hydrogensulfids durch Eisen (III) und durch Ansäuern untersucht. Für die Eisenfällung wurde nach dem Filtrationschritt zur Entfernung von Natriumbromid Eisen(III)-chlorid zum Ansatz gegeben und dieser für zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt, wobei sich ein schwarzer Niederschlag bildete. Dieser Niederschlag wurde durch Filtration entfernt, wobei eine Grau- bzw. Schwarzfärbung des Produkts verblieb. Die Ausbeute betrug hier 45 %.

Bei der Aufreinigung mittels Ansäuern wurde nach einer Rührzeit von 16 h bei RT mit HCl ein pH von 1 eingestellt und der Ansatz für vier Stunden zum Rückfluss erhitzt. Der Ansatz wurde dann neutralisiert und für eine weitere Stunde zum Rückfluss erhitzt. Anschließend erfolgten die Filtration und Entfernung des Lösemittels unter verringertem Druck. Die Ausbeute hier betrug 49 %.

Die von *Dayagi et al.* entwickelte Synthese des DT konnte erfolgreich adaptiert und verbessert werden. Die Menge eingesetzter Äquivalente Natriumhydrogensulfid konnte von zehn auf vier reduziert werden. Durch Raman-Spektroskopie konnte die vollständige Oxidation zum Disulfid nachgewiesen werden. Die Reinheit des Produkts kann künftig durch eine zweite Rekristallisation verbessert werden.

(1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol stellt einen interessanten und neuen Baustein für die Synthese von Polyurethanen oder Polyestern da. Durch die zwei Hydroxygruppen ist es möglich das DT in die Ketten der Polyurethane oder Polyester einzubauen. Das fertige Polymer enthält dann eine Disulfid-Gruppe, welche gespalten werden kann ohne ein Spalten der Polymerkette zu erzeugen. So ist es möglich freie Thiole in die genannten Polymere einzubauen. Mit diesen freien Thiolen können dann weitere Reaktionen, wie Modifikationen oder Vernetzungen durchgeführt werden. Der Einbau des DTs in Polyurethane, sowie die Betrachtung der Eignung von Dithiolanen für Klebeanwendungen wurde im Rahmen der Betreuung einer Masterarbeit untersucht. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind im folgenden Kapitel V.10 dargestellt.

## V.10 Dithiolan-Anwendungstests

Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden bei der Betreuung der Masterarbeit von Ching-Yi Choi,<sup>[183]</sup> im Zuge der vorliegenden Arbeit, erhalten.

Polyurethane sind in der Welt der Klebstoffe auf Grund ihrer Inertheit sehr verbreitet. Insbesondere das Feld der Hotmelt-Klebstoffe greift oftmals auf diese Polymere zurück.<sup>[89]</sup> Durch seine zwei primären Hydroxy-Gruppen ist das (1,2-Dithiolan-4,4-diy)dimethanol, dessen Synthese in Kapitel V.9 beschrieben wurde, für die Synthese von Polyurethanen geeignet.

Bei der Synthese von Polyurethanen handelt es sich um eine Polyadditionsreaktion zwischen Polyolen und Polyisocyanaten. Für die Synthese linearer Polyurethane werden Diole und Diisocyanate verwendet. Bei der überwiegenden Mehrheit aller Polyurethanreaktionen kommt lediglich eine kleine Auswahl an Diisocyanaten zum Einsatz; bei den im Folgenden beschriebenen Synthesen wurde ausschließlich Hexamethyldiisocyanat (HDI) eingesetzt. Diole werden je nach gewünschten Eigenschaften oder Funktionalitäten ausgewählt. Dabei ist die Kettenlänge ein entscheidender Faktor für die Viskosität des Polymers, da kurzkettige Diole zu sogenannten Hartsegmenten führen, indem das dichte Aufeinanderfolgen von Urethan-Gruppen die Ausbildung vieler Wasserstoffbrücken und kristalliner Teilbereiche ermöglicht.<sup>[184, 185]</sup> Daher wird als Basis-Diol zumeist ein Präpolymer-Diol eingesetzt. In diesem Fall wurde mit dem hydrierten Polyfarnesendiol (PFD<sub>H</sub>) gearbeitet, um einen hohen Anteil biobasierter Rohstoffe aufzuweisen. Da mit HDI ein aliphatisches Diisocyanat verwendet wurde fand *Borchi Kat 315* als Katalysator Anwendung. Die Strukturen der eingesetzten Verbindungen sind in Abbildung V.10-1 zu sehen; die Zusammensetzung dargestellter Polyurethane ist in Tabelle V.10-1 aufgelistet. Fotos der Polyurethane sind im Anhang dargestellt (vgl. Abb. A.10-1 und A.10-2).

Erste Versuche der Darstellung von DT-PUs scheiterten. Die berechneten Molmassen konnten nicht realisiert werden, wobei ein Trend zu beobachten war, dass die tatsächliche Molmasse umso stärker von der Berechneten abwich, je höher der DT-Anteil war.



Abbildung V.10-1: Strukturen der Diole (ADVE, GAE, DT, PFD<sub>H</sub>), des Diisocyanats (HDI), sowie des Endgruppenreagenzes (DnBA) welche in den Polyurethansynthesen zum Einsatz kamen. Polyurethane mit den kettenverlängernden Diolen GAE und ADVE werden ab S. 94 ff behandelt.

Nachdem sich die Synthese von Polyurethanen mit DT-Anteil zunächst als schwierig erwies, konnte diese doch durch eine Verlängerung der Reaktionsdauer von zwei auf bis zu 20 Stunden realisiert werden (vgl. Tabelle V.10-1: PU-A bis PU-D). Die Molmasse der Polyurethane lag dabei in der anvisierten Größenordnung. Eine Verlängerung der Reaktionsdauer durch das Einbringen kurzkettiger Diole ist nicht ungewöhnlich,<sup>[171]</sup> jedoch weist die hier beobachtete, massive Erhöhung der Reaktionsdauer auf eine geringe Reaktivität des DTs in einer Polyurethanbildung hin.

Disulfide können sich bereits bei geringen Temperaturen in Thiole spalten oder Disulfidaustauschreaktionen eingehen.<sup>[172, 173]</sup> Daher sind sie ein gängiges Strukturmotiv in *Covalent Adaptive Networks (CAN)*<sup>[186-188]</sup> oder *Selfhealing Polymers*.<sup>[187, 189-191]</sup> Aus diesem Grund wurde als Erstes der Einfluss von Temperatur auf PU-C (bei diesem PU wurde beim Abfüllprozess bei 90 °C Vergelung beobachtet) untersucht, da Disulfidaustauschreaktionen durch Erhitzen eine sehr einfache Methode zur Erzeugung von (potentiell selbstheilender) Netzwerkstrukturen darstellen könnten. Dazu wurden zunächst qualitative Betrachtungen in Aluminiumschälchen und Teflonformen durchgeführt, wobei die Polymere in den Formen für 24 h bei 85 °C gelagert wurden. Nach dem Erhitzen der Proben wurde durch Ankratzen mit einem Holzspatel ermittelt ob eine

## V. Ergebnisse und Diskussion

Veränderung der Viskosität erzielt werden konnte. Bilder der vergelten DT-PU nach dem Erhitzen sind im Anhang dargestellt (s. Abb. A.10-3).

Tabelle V.10-1: Tabellarische Auflistung der in den unterschiedlichen PU-Synthesen eingesetzten Substanzen mit Anteilen in Gewichtsprozent. Als Polyol wurde in allen Synthesen hydriertes Polyfarnesendiol (PFD<sub>H</sub>) eingesetzt, das Diisocyanat war in allen Fällen HDI und das Endgruppenreagenz Dibutylamin. Ebenfalls aufgelistet sind die berechneten, sowie die bestimmten Molmassen gemäß GPC. Die PUs PU-E bis PU-I werden ab S. 94 ff. behandelt.

Bezeichnung	w <sub>i</sub> (Polyol) [%]	Diol-1	w <sub>i</sub> [%]	Diol-2	w <sub>i</sub> [%]	Mn (soll) [g/mol]	Mn (best.) [g/mol]
PU-A	99,1	DT	0,9	-	-	10.000	7924
PU-B	98,3	DT	1,7	-	-	10.000	6511
PU-C	97,4	DT	2,6	-	-	10.000	7777
PU-D	96,6	DT	3,4	-	-	10.000	6461
PU-E	96	DT	0	GAE	4	10.000	11200
PU-F	95,3	DT	1,7	GAE	3	10.000	11830
PU-G	94,1	DT	0,9	ADVE	5	10.000	8000
PU-H	96,7	DT	1,3	GAE	2	10.000	8571
PU-I	96	DT	0	ADVE	4	10.000	19534

Nach der Hitze-Exposition zeigte sich das DT-PU als formstabile, zäh-klebrige Masse, welches im Gegensatz zum PU vor der Lagerung bei 85 °C nicht zerfloss. Daraus wurde geschlossen, dass es zu einer Vergelung des Polymers kam.

Polyurethane können aus einer Vielzahl von Gründen vergelen, sodass hier nicht direkt begründet auf einen Zusammenhang mit den enthaltenen Disulfiden geschlossen werden kann. Daher wurden zwei Experimente durchgeführt um den Einfluss der Dithiolan-Gruppen auf die Vergelung besser einschätzen zu können. Zum einen wurde das Löslichkeits- bzw. Quellverhalten des vergelten Polyurethans mit und ohne Natriumsulfid untersucht. Zum anderen wurde die Lagerung unter erhöhter Temperatur mit Butylhydroxytoluol (BHT) als Radikalinhibitor (10 ppm) wiederholt. Disulfidaustauschreaktionen verlaufen radikalisch, sodass sie durch die Präsenz von BHT unterdrückt werden sollten.

Bei den Versuchen wurde beobachtet, dass THF in der Lage war das DT-PU aufzuquellen, jedoch nicht zu lösen. Dies ist ein weiteres Zeichen für die Ausbildung einer Netzwerkstruktur durch die Lagerung bei 85 °C. Durch die Zugabe von

## V. Ergebnisse und Diskussion

Natriumsulfitlösung kam es zu einer Auflösung der vergelten PU-Masse hin zu einer trüben Lösung. Die Tatsache, dass die Zugabe von Sulfit zu einer Auflösung des Polymers führen konnte spricht für eine stattgefundene Sulfitolyse und somit für eine Teilhabe der Disulfide an der Vergelung des Polyurethans. Das zweite Experiment – die Zugabe von BHT vor der Hitzelagerung – wies ebenfalls auf eine, zumindest anteilige, Disulfid-Netzwerkstruktur, da die BHT-haltige Probe in viel geringerem Maße eine Vergelung erfuhr verglichen mit BHT-freien Proben. Bilder der Sulfitolyse, sowie des BHT-Experiments sind im Anhang dargestellt (s. Abb. A.10-4).

Um die qualitativen Ergebnisse der bisher beschriebenen Versuche quantifizieren zu können, wurde anschließend der Vergelungsprozess im Rheometer verfolgt. Hier würde im Falle einer Vergelung ein Sol-Gel-Übergang sichtbar, sodass die Dauer des Vergelungsprozesses sowie auch die Änderung in der Viskosität ermittelt werden könnten. Die rheologischen Messungen wurden durchgeführt, indem je eine Probe des PU-B mit und ohne Zusatz von BHT auf 90 °C erhitzt wurden. Die Temperatur wurde anschließend für 15 h gehalten, bevor die Probe auf RT abgekühlt wurde. Speichermodul ( $G'$ ) und Verlustmodul ( $G''$ ) sind um die Temperatur ergänzt im Zeitprofil in Abbildung V.10-2 dargestellt.

Überraschenderweise konnte bei der rheologischen Betrachtung kein Sol-Gel-Übergang beobachtet werden, sodass sich die vorigen Ergebnisse nicht reproduzieren und quantifizieren ließen. Tatsächlich sinken Speicher- und Verlustmodul während des Erhitzens und steigen während des Abkühlens wieder auf ihre ursprünglichen Werte an, sodass hier davon auszugehen ist, dass keinerlei Vernetzung beobachtet werden kann. Der Grund für das nicht-Beobachten einer Vergelung bei der Untersuchung mittels Rheometer ist nicht gänzlich klar, jedoch ist bekannt, dass für die Reaktivität von Disulfiden Sauerstoff eine zentrale Rolle spielt,<sup>[192, 193]</sup> sodass der Mangel verfügbaren Sauerstoffs in der Platte-Platte-Messgeometrie des Rheometers verantwortlich sein könnte.

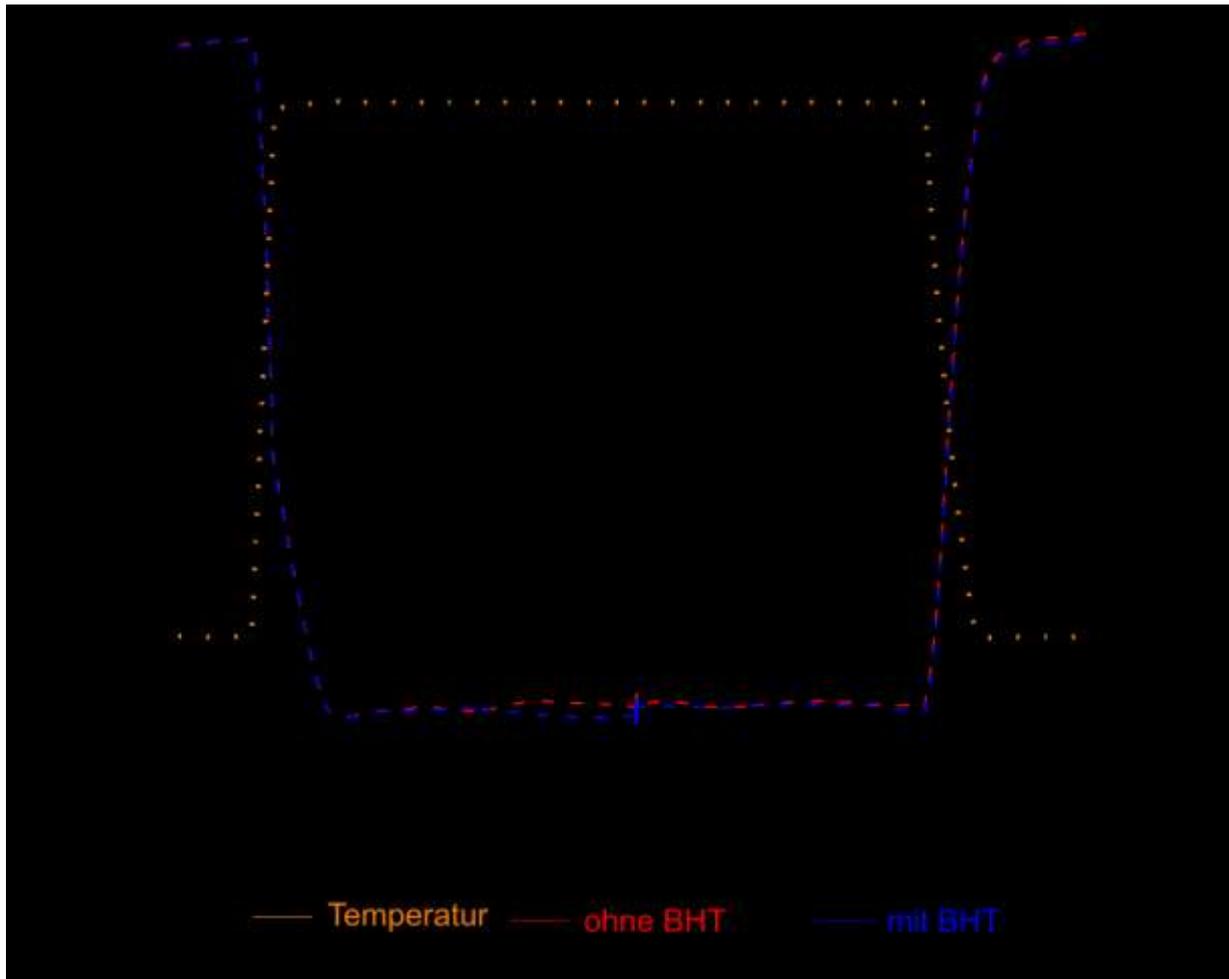


Abbildung V.10-2: Verlauf der Speicher- ( $G'$ ) und Verlustmodule ( $G''$ ) der DT-PU-Proben mit und ohne 10 ppm BHT. Eine zweite Ordinate rechts zeigt den Verlauf der Temperatur. Gezeigt sind nur je die ersten und letzten 90 min der Messungen, da die Kurven im Zwischenbereich keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Eine Darstellung mit abgebildetem Speichermodul ist im Anhang zu finden (Vgl. Abb. A.10-5)

Da die Werte der Speichermodule, vermutlich durch zu geringe Scherkräfte auf der niedrigviskosen Masse, starke Schwankungen unterliegen lassen sich aus diesen keine nützlichen Informationen ableiten und wurden daher aus Abb. V.10-2 rausgelassen. Die Speichermodule sind in Abb. A.10-5 zu sehen. Die Schwankungen der Speichermodule haben jedoch keinen Einfluss auf die Aussage der Messung, da nach dem Abkühlen die Startwerte von Speicher- und Verlustmodul wieder erreicht werden.

Weil die Versuche zur Vergelung der Polyurethane zunächst uneindeutig waren, weil die qualitativen Betrachtungen auf eine gezielte Vergelung durch Erhitzen hinwiesen, diese jedoch nicht durch die rheologische Betrachtung bestätigt werden konnte, wurde das PU-System adaptiert. Dazu wurden Polyurethane mit Vinyl- bzw. Allyletherfunktionalitäten

## V. Ergebnisse und Diskussion

synthetisiert, welche ebenfalls Dithiolan-Diol enthielten (vgl. Tabelle V.10-1: PU-E bis PU-I). Diese Polyurethane werden nachfolgend als DT-En-PUs bezeichnet.

Die DT-En-PUs sollten ebenfalls im Rheometer auf die Änderung ihrer Materialeigenschaften aufgrund einer induzierten Vernetzungsreaktion untersucht werden. In diesem Fall wurde jedoch nicht die Vernetzungsreaktion durch Erhitzen, sondern durch eine photoinduzierte Disulfid-En-„Click“-Reaktion stattfinden. Dazu wurden fünf PU-Systeme definiert (s. Tabelle V.10-2). Zwei der Systeme bestehen aus je einem DT-PU und einem En-PU, zwei Systeme sind DT-En-PUs. Das fünfte System besteht lediglich aus dem dithiolanhaltigen PU-B um zu vergleichen, ob die radikalische Disulfidaustauschreaktion auch durch Lichtbestrahlung ausgelöst werden kann.

Zunächst wurde die Kompatibilität der verschiedenen PU-Systeme mit unterschiedlichen Norrish-Type Photoinitiatoren der Typen I und II untersucht – die Strukturen aller getesteten Photoinitiatoren, mit Einordnung in ihren Typen, sowie die optimale Wellenlänge, sind im Anhang abgebildet (vgl. Abbildung A.10-5). Die Kompatibilitätsversuche wurden, analog zu den oben beschriebenen Vergelungstests, in Aluminiumschälchen durch Vermengen der PU-Systeme mit dem Photoinitiator mit anschließender LED-Bestrahlung (in einer LED-Kammer) für 60 s bei 365 nm durchgeführt. Die Evaluation fand anschließend durch Ankratzen mit einem Holzspatel statt und bewertete die Mischbarkeit und Materialveränderung der Proben. Die ausführlichen Ergebnisse der Schälchenversuche sowie Fotos der bestrahlten Proben sind im Anhang aufgeführt (vgl. Tabelle A.10-1 und Abbildung A.10-6).

Tabelle V.10-2: Zusammensetzungen der PU-Systeme für die Disulfid-En-„Click“-Reaktionen. Bei Mischungen von PUs in den PU-Systemen sind die PUs stets im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Kürzel	Zusammensetzung
PU-S1	PU-B mit 1,7 % (w/w) <b>DT</b> + PU-E mit 4 % (w/w) <b>GAE</b>
PU-S2	PU-F mit 1,7 % (w/w) <b>DT</b> + 3 % (w/w) <b>GAE</b>
PU-S3	PU-G mit 0,9 % (w/w) <b>DT</b> + 5 % (w/w) <b>ADVE</b>
PU-S4	PU-B mit 1,7 % (w/w) <b>DT</b>
PU-S5	PU-A mit 0,9 % (w/w) <b>DT</b> + Thiomilchsäure + PU-E mit 4 % (w/w) <b>GAE</b>

Wie Tabelle A.10-1 entnommen werden kann, erwies sich der Initiator Omnirad BP als am vielversprechendsten. Dieser war in der Lage in allen untersuchten PU-Systemen, außer PU-S3, eine Vergelung bei der Bestrahlung in der LED-Kammer zu erzeugen. Daher

## V. Ergebnisse und Diskussion

wurde dieser für die nachfolgende rheologische Betrachtung eingesetzt. Da die Möglichkeiten zur Bestrahlung am Rheometer nicht die Bedingungen der LED-Kammer exakt zu replizieren vermochten (LED: 562 mW/cm<sup>2</sup> Bestrahlungsstärke, 365 nm | Rheometer: 93 mW/cm<sup>2</sup> Bestrahlungsstärke, 370 nm) wurde die Bestrahlungsdauer auf 5 min erhöht um den vergleichbaren Zerfall des Initiators zu ermöglichen. Abbildung V.10-3 zeigt die Messungen der fünf PU-Systeme je mit Omnirad BP und ohne Initiator.

Wie den Kurven in Abbildung V.10-3 entnommen werden kann konnten die positiven, initialen Ergebnisse der Schälchenversuche erneut nicht in der rheologischen Betrachtung reproduziert werden. Zwar steigen die Modulwerte aller Proben im Verlauf der Bestrahlung an, was auf stattfindende Vernetzungsreaktionen hinweist, doch überschreitet keine der Proben den Sol-Gelpunkt ( $G' = G''$ ). Das Überschreiten des Gelpunkts ist jedoch ein wichtiges Kriterium für die erfolgreiche Anwendung in einem Klebstoffsystem. Artikel aus der Literatur legen nahe, dass die Struktur des (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanols durch den Thorpe-Ingold-Effekt nicht vorteilhaft für Vernetzungen mittels Disulfidaustausch, Disulfid-En-Reaktionen, oder Thiol-En-Reaktionen sein könnte. Der Thorpe-Ingold-Effekt beschreibt den Einfluss geminaler (Alkyl)-Substituenten auf die Neigung zu Ringschlussreaktionen.<sup>[194-196]</sup> Die intramolekulare Disulfidbildung wird also durch die geminalen Substituenten in  $\beta$ -Stellung zu den Schwefelatomen begünstigt. Daraus folgt, dass radikalische Übergangszustände vermehrt zur Ausbildung des Dithiolans führen, was eine Vernetzung über radikalische Reaktionen erheblich erschwert. Bekräftigt wird diese Einschätzung durch den Artikel von *Liu et al.* in welchem das DT reduziert und anschließend die Reoxidation beobachtet wurde. Hierbei wurde beobachtet, dass lediglich 20 % der Thiole zu linearen Disulfiden zusammenfinden, während 80 % zurück zum 1,2-Dithiolan oxidieren.<sup>[197]</sup>

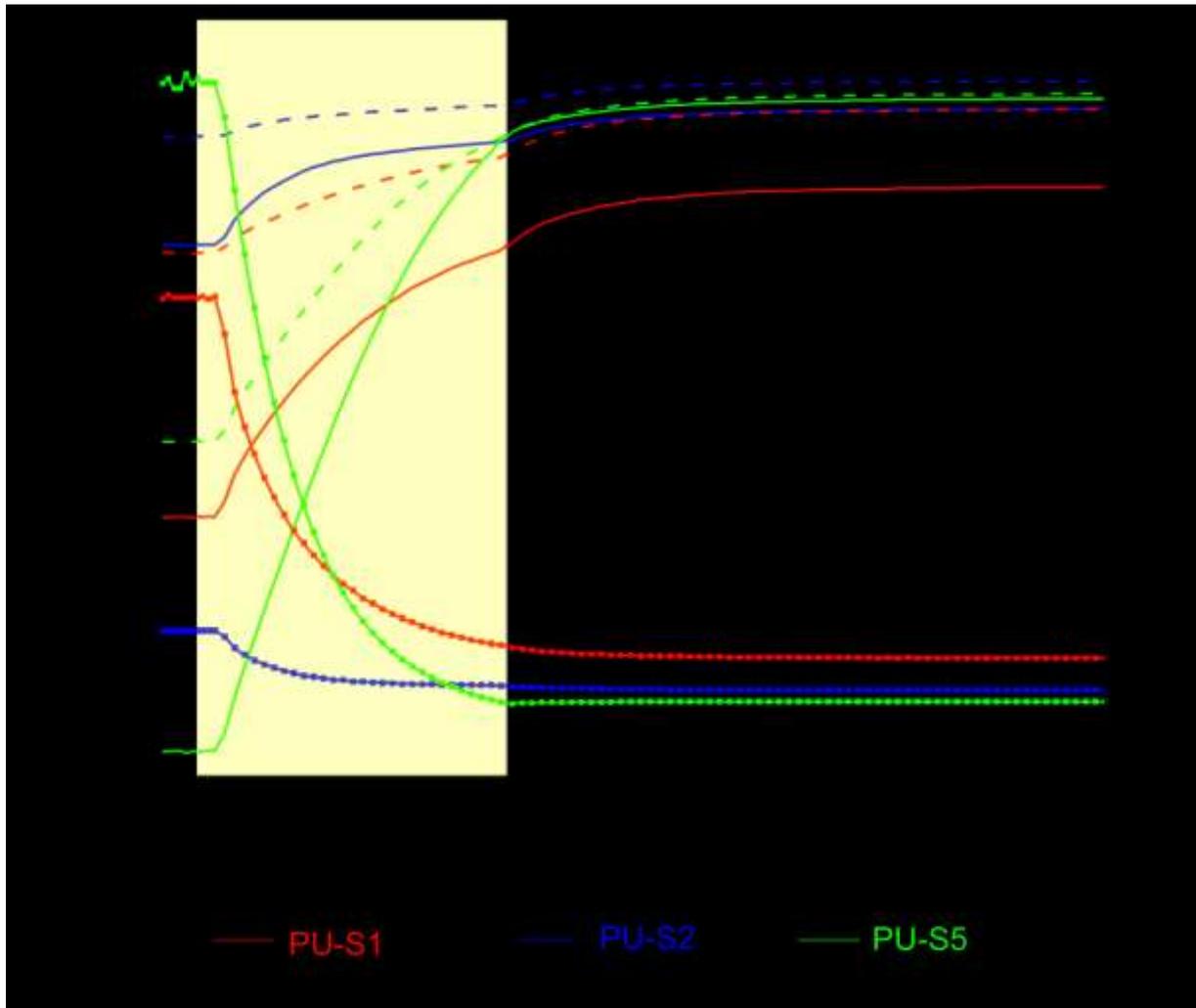


Abbildung V.10-3: Rheometrische Daten der photoinitierten Vernetzungsreaktionen der Systeme PU-S1, PU-S2 und PU-S5. Speichermodul ( $G'$ ) werden dargestellt als Linie mit Quadraten, Verlustmodul ( $G''$ ) sind durchgehende Linien, Verlustfaktoren ( $\tan \delta$ ) sind gepunktete Linien. Das Zeitfenster der Bestrahlung wird durch den gelben Kasten angezeigt.

Aus diesem Grund wurde als nächstes eine andere 1,2-Dithiolan-Quelle herangezogen: die Liponsäure. Diese bietet neben der Tatsache, dass sie biobasiert verfügbar und kommerziell erhältlich ist den Vorteil, dass sich am Dithiolanring keine geminalen Substituenten finden. Dies bedeutet, dass der Thorpe-Ingold-Effekt hier nicht zum Tragen kommen kann. Deshalb wurde mit Liponsäure ein *Scrambling*-Experiment durchgeführt bei welchem die Disulfidaustauschreaktion mit Dibenzyldisulfid untersucht und die Produkte analysiert wurden. So sollte untersucht werden ob 1,2-Dithiolane prinzipiell für Vernetzungsreaktionen nutzbar sein können.

Dazu wurden Liponsäure und Dibenzyldisulfid zusammen mit dem Radikalstarter AIBN in MeCN erhitzt. Nach der Entfernung des Lösemittels erfolgte eine

## V. Ergebnisse und Diskussion

säulenchromatographische Trennung, welche drei Fraktionen lieferte: Fraktion A mit rückgewonnenem Dibenzylidisulfid, Fraktion B mit rückgewonnener Liponsäure und Fraktion C mit einer unbekanntem gelblich-klebrigen Substanz. Da die UV/Vis-Betrachtung der Disulfide einen einfachen Vergleich der Disulfidformen (offen bzw. ringförmig) ermöglicht wurde diese als spektroskopische Methode gewählt. Die Spektren wurden zunächst in MeCN aufgenommen, dann wurden die Messungen, wegen der schlechten Löslichkeit von Fraktion C in MeCN, in MeOH wiederholt.

Wie Abbildung V.10-4 zu entnehmen ist befinden sich im betrachteten Wellenlängenbereich lediglich zwei Peaks. Diese korrelieren mit dem linearen Disulfid (ca. 280 nm)<sup>[198]</sup> und dem Disulfid des 1,2-Dithiolanrings (ca. 330 nm).<sup>[199]</sup> Gemäß *Benevides et al.* ist die Absorption des Benzolrings bei ca. 240 nm zu sehen.<sup>[198]</sup> Diese findet sich jedoch in keinem der Spektren. Grund hierfür sind vermutlich entweder eine Verschiebung der Absorption in einen Bereich <200 nm durch Lösemittel, pH-Effekte, oder eine zu geringe Konzentration.

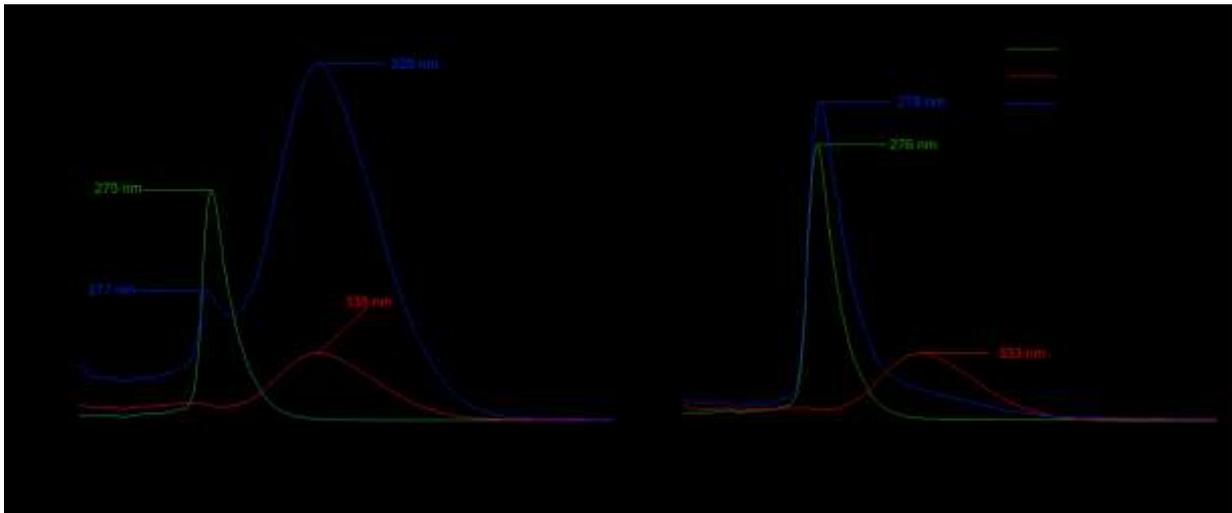


Abbildung V.10-4: A) UV/Vis-Spektren des *Scrambling*-Experiments in MeCN. B) UV/Vis-Spektren des *Scrambling*-Experiments in MeOH. Unter der Legende ist die Struktur von Liponsäure abgebildet.

Beide Spektren zeigen eine Absorption der Fraktion C an den Absorptionsmaxima sowohl des linearen als auch des ringförmigen Disulfids, was auf das Vorkommen beider Disulfidformen in der Probe deutet. Jedoch zeigt das in MeCN aufgenommene Spektrum eine stärkere Absorption im Bereich des ringförmigen Disulfids, während dies im MeOH-Spektrum lediglich eine Schulter des intensiven Peaks bei 278 nm – also des linearen Disulfids – ist. Hierbei mag es eine Rolle gespielt haben, dass die Probe in MeCN nur

## V. Ergebnisse und Diskussion

unzureichend löslich war. Dennoch besteht Einigkeit zwischen den Spektren, dass beide Disulfidtypen detektiert werden konnten.

Als komplementäre Analytik wurden  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von Fraktion C, sowie der Referenzsubstanzen aufgenommen und gegenübergestellt. Diese sind in Abbildung V.10-5 zu sehen. Aus der Gegenüberstellung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren werden drei Dinge ersichtlich: zum einen findet sich in Fraktion C kein Dibenzyldisulfid mehr, des Weiteren sind geringe Mengen Liponsäure in der Probe enthalten, welche aber durch eine neue Substanz, mit sehr breiten Signalen, überschattet werden. Die breiten Signale der neuen Substanz sind ein Hinweis auf einen Polymercharakter. Ein Vergleich mit den Ergebnissen von *Kisanuki et al.* zeigt, dass sich die Signale mit jenen der Polyliponsäure decken.<sup>[200]</sup> Dieser Befund deckt sich auch mit den Peaks der UV/Vis Spektren. Die Spektren beider Lösemittel zeigen Peaks sowohl für lineare Disulfide, als auch des 1,2-Dithiolans, wobei das in MeOH aufgenommene Spektrum die höhere Übereinstimmung mit den Ergebnissen des  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums aufweist. Der Eindruck der aus dem in MeCN aufgenommenen UV/Vis-Spektrum entsteht, dass die 1,2-Dithiolan-Form überwäge, lässt sich somit auch erklären, da das Polymer mit linearen Disulfiden nur schlecht im MeCN löslich ist, während sich Liponsäure gut löst.

## V. Ergebnisse und Diskussion

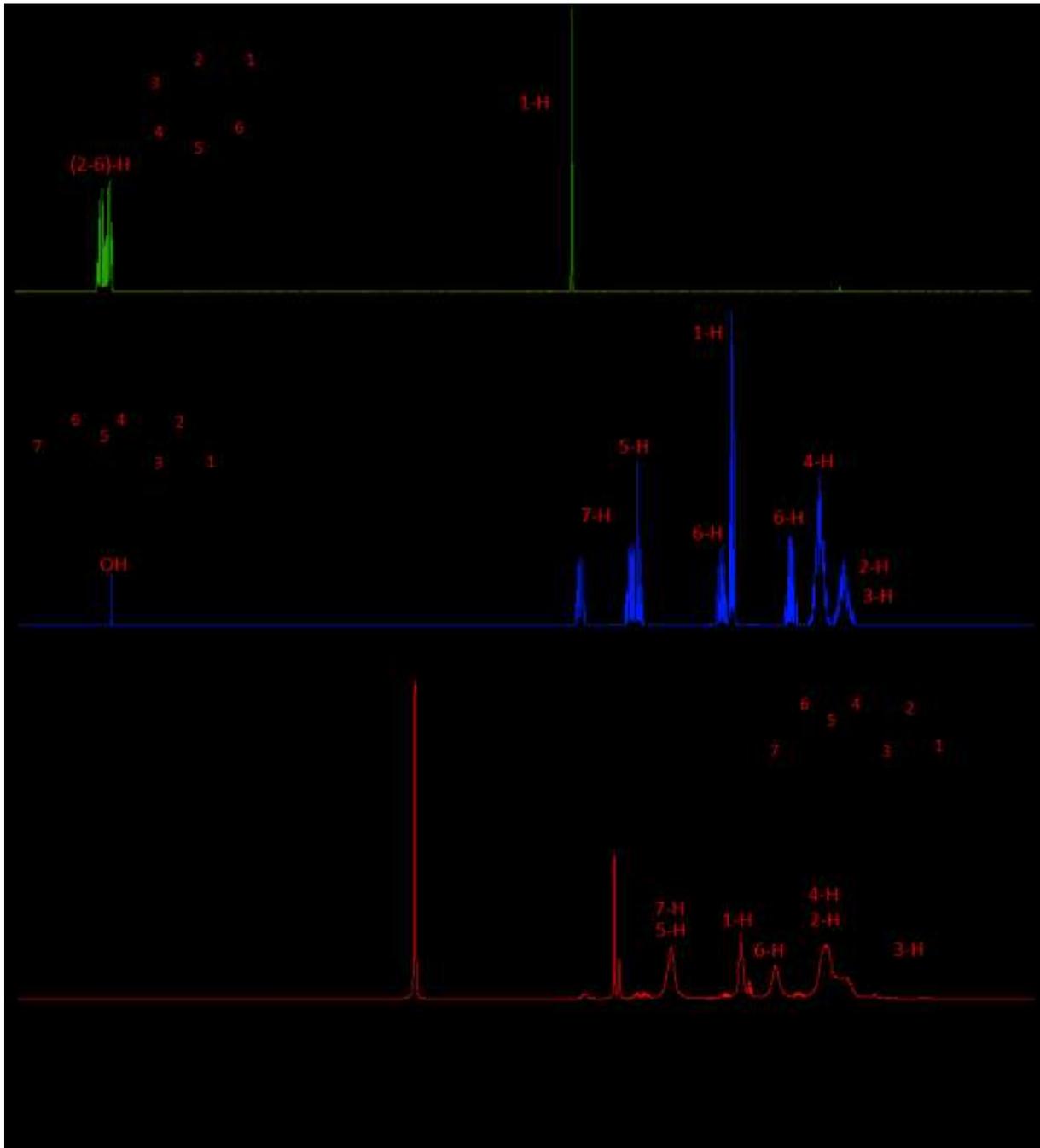


Abbildung V.10-5: Gegenüberstellung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren von A) Dibenzyldisulfid, B) Liponsäure und C) der Polyliponsäure aus dem *Scrambling*-Experiment. Die Spektren wurden in  $\text{CD}_3\text{OD}$  aufgenommen.

Das *Scrambling*-Experiment konnte also zeigen, dass 1,2-Dithiolanringe per se in der Lage sind in Gegenwart eines Radikalinitiators rekombinante Disulfide zu bilden. Ferner scheint es sogar bevorzugt Disulfidaustauschreaktionen mit anderen Dithiolanen einzugehen statt mit einem anderen (linearen) Disulfid zu reagieren. Die Ergebnisse des *Scrambling*-Experiments bekräftigen die Hypothese, dass die Präsenz geminaler Substituenten am Ring, sowie die Symmetrie bzw. Asymmetrie des Substitutionsmusters einen Einfluss auf die Art der entstehenden Disulfide hat.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Die Nutzung von Liponsäure als Endgruppenreagenz für PU-Synthesen ist nicht ideal, da die Reaktivität der Carboxyl-Gruppe mit den elektrophilen Isocyanatgruppen zum Amid unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$ , verhältnismäßig gering ist und zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann.<sup>[201, 202]</sup> Dennoch wurde der Einsatz der Liponsäure als PU-Endgruppenreagenz betrachtet, um das Potential von 1,2-Dithiolanen in PU-Aushärtereaktionen besser einschätzen zu können und die Ergebnisse des *Scrambling*-Experiments in einem anwendungsbezogenen Kontext zu überprüfen. Abbildung V.10-6 zeigt den Einsatz von Liponsäure als Endgruppenreagenz in einer PU-Synthese mit den möglichen Nebenreaktionen.

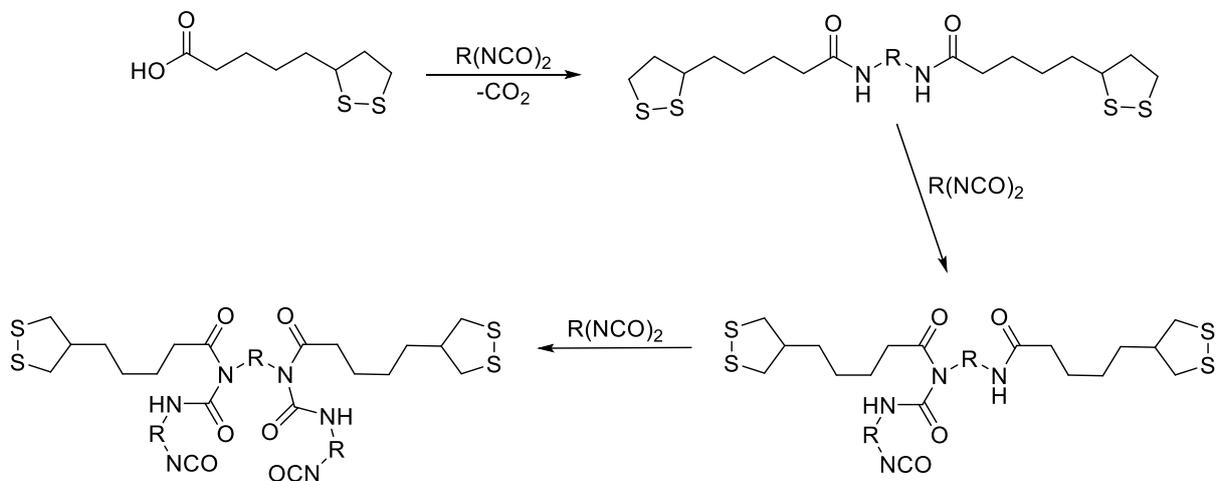


Abbildung V:10-6: Reaktion von Liponsäure als PU-Endgruppenreagenz mit möglicher Nebenreaktion mit weiteren Isocyanaten als Acylharnstoff.

Hierzu wurde PU-J analog zu den oben beschriebenen PUs (bestehend aus  $\text{PFD}_H$  und HDI,  $M_w$  (soll) = 10000 g/mol,  $M_w$  (best.) = 8700 g/mol), jedoch mit Liponsäure als Endgruppenreagenz synthetisiert und in drei PU-Systeme eingebracht. Eines bestehend lediglich aus PU-J, um die Vernetzungsfähigkeit der Liponsäure mit sich selbst zu betrachten, sowie je eines mit einem Allyl- bzw. Vinylether-haltigen PU. Die beschriebenen PU-Systeme sind in Tabelle V.10-3 zusammengefasst. Die Ergebnisse der rheologischen Messungen sind in Abbildung V.10-7 zu sehen.

## V. Ergebnisse und Diskussion

Tabelle V.10-3: Zusammensetzung der PU-Systeme PU-S6, PU-S7 und PU-S8. Bei Mischungen von PUs in den PU-Systemen sind die PUs stets im Verhältnis 1:1 eingesetzt.

Kürzel	Zusammensetzung
PU-S6	PU-J mit 4 % (w/w) <b>Liponsäure</b>
PU-S7	PU-J mit 4 % (w/w) <b>Liponsäure</b> + PU-I mit 7 % (w/w) <b>ADVE</b>
PU-S8	PU-J mit 4 % (w/w) <b>Liponsäure</b> + PU-E mit 4 % (w/w) <b>GAE</b>

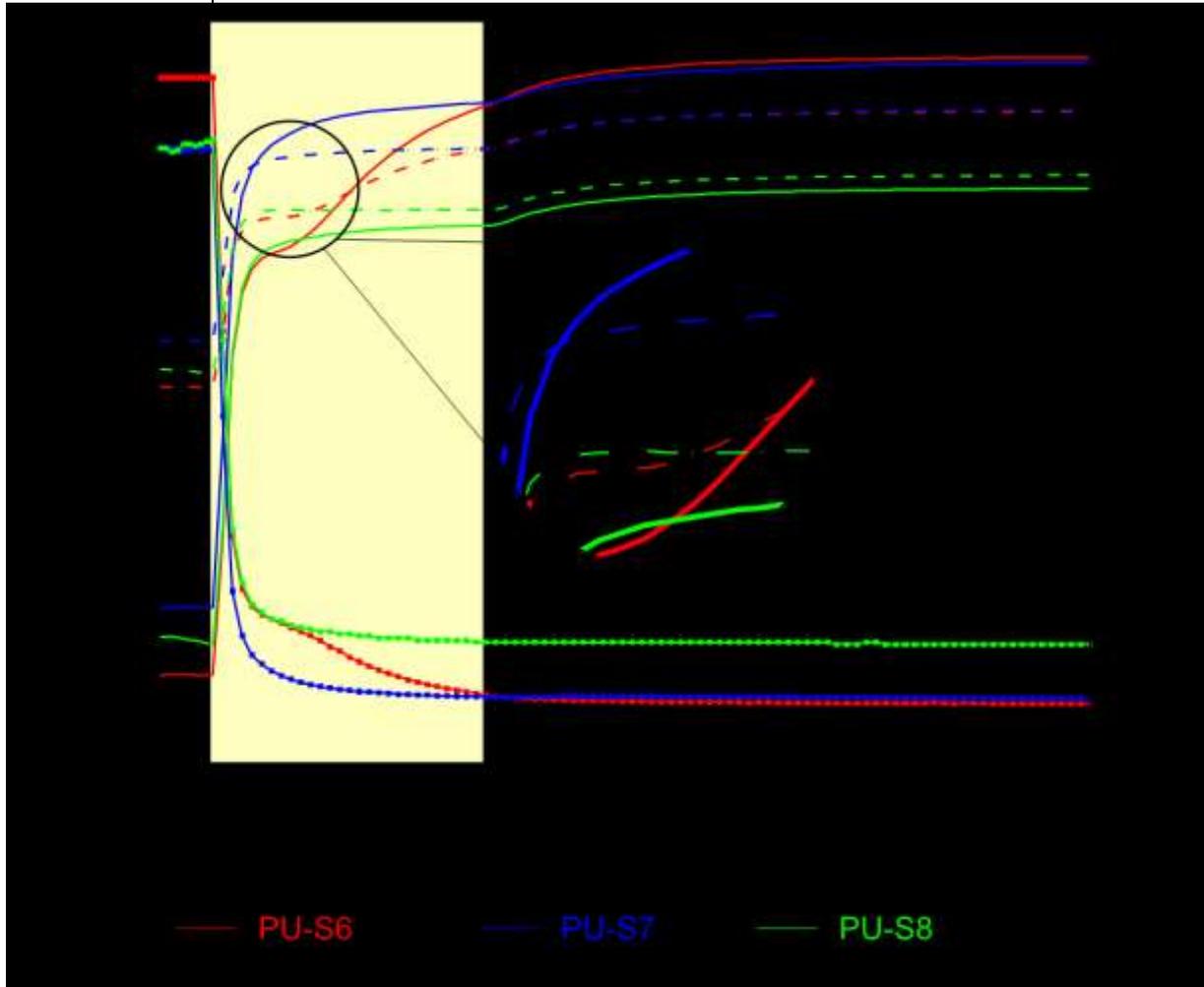


Abbildung V.10-7: Rheometrische Daten der photoinitierten Vernetzungsreaktionen der Systeme PU-S6 bis PU-S8. Speichermodule ( $G'$ ) werden dargestellt als durchgehende Linie, Verlustmodule ( $G''$ ) sind gestrichelte Linien, Verlustfaktoren ( $\tan \delta$ ) sind durchgehende Linien mit Quadraten. Das Zeitfenster der Bestrahlung wird durch den gelben Kasten angezeigt. Zentral sind die Sol-Gel-Übergänge von PU-S6 und PU-S7 vergrößert dargestellt.

Die Auftragung der Speichermodule ( $G'$ ) und Verlustmodule ( $G''$ ) zeigt einen Anstieg beider Module in allen drei Systemen durch die Bestrahlung. Der Anstieg der Module zeigt eine stattfindende Vernetzungsreaktion an. Jedoch erreichen nur die Systeme PU-S6 und PU-S7 einen Sol-Gel-Übergang. System PU-S6 erreicht den Gelpunkt ( $G' = G''$ ) nach gut zwei Minuten Bestrahlung, während PU-S7 diesen bereits nach 36 s überschreitet. Dies

## V. Ergebnisse und Diskussion

zeigt die höhere Geschwindigkeit der Vernetzungsreaktion des 1,2-Dithiolans in einer Disulfid-En-„Click“-Reaktion verglichen mit der Vernetzung durch Disulfidaustausch. Die Unterschiede in der Vernetzungsgeschwindigkeit decken sich mit den allgemeinen Reaktionsgeschwindigkeiten beider Reaktionstypen. Insgesamt zeigen sich jedoch beide Systeme als vielversprechend für die Nutzung in Aushärtungsreaktionen – PU-S8 zeigt zwar auch Anzeichen einer Vernetzung, doch da der Sol-Gel-Übergang nicht erreicht wird darf dieser Reaktion geringeres Potential beigemessen werden. Auch dies ist nicht überraschend, da die Reaktivität von Allylethern gegenüber Vinylethern in „Photoclick“-Reaktionen geringer ausfällt.<sup>[93, 94]</sup>

Die exakten Werte der Speicher- und Verlustmodule sind in diesem Fall wenig aussagekräftig, da es bei der Messung um eine Betrachtung der Eignung von 1,2-Dithiolan als vernetzendes Endgruppenreagenz geht, nicht um eine konkrete Bewertung des Systems als aushärtendes System. Lediglich ein Vergleich der Modulwerte untereinander ist interessant, da diese im Rubbery Plateau Rückschlüsse über den Grad der Vernetzung ermöglichen. Daher ist es erwähnenswert, dass PU-S8 merklich geringere Speicher- und Verlustmodulwerte aufweist, was eine geringere Festigkeit impliziert verglichen mit den PU-S6 und PU-S7 die beide sehr ähnliche Werte zeigen. Außerdem wurde nach Ende der Bestrahlung ein Anstieg von  $G'$  und  $G''$  beobachtet. Der genaue Grund hierfür ist nicht sicher bekannt, jedoch ist es wahrscheinlich, dass es durch die relativ lange Belichtungsdauer von 5 min zu einem Aufheizen der Probe kam, welches eine verringerte Wirkung auf die Module hatte. Nach der Bestrahlung verringerte sich dann die Temperatur wodurch  $G'$  und  $G''$  anstiegen.

Insgesamt konnte das Scrambling-Experiment, sowie die rheologische Betrachtung der Polyurethane mit Liponsäure als Endgruppenreagenz die generelle Eignung von 1,2-Dithiolanen als Vernetzungsreagenz zeigen. Die bessere Vernetzung (in Rheologiversuchen) mit Liponsäure-PU gegenüber den DT-PU konnte durch den Thorpe-Ingold-Effekt erklärt werden, wobei es auch eine weitere sterische Komponente geben mag, da (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol in die PU-Ketten eingebaut wurde, während Liponsäure durch seine Monofunktionalität als Endgruppenreagenz eingesetzt werden kann.

## VI. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die grundlegende Charakterisierung einer neuen Ressource, welche künftig aus einem ökologisch schwierigen Abfallstoff günstig gewonnen werden kann, realisiert werden. Als Peptidgemisch handelt es sich dabei um einen grünen Ausgangsstoff, der in einer Vielzahl potentieller Anwendungen künftig von Nutzen sein kann. Da diese Arbeit in Kooperation mit der Henkel AG & Co. KGaA angefertigt wurde, sind zwei naheliegende Anwendungsfelder der Bereich der Klebstoffe, sowie das der Haarpflegeprodukte.

Für die Anwendbarkeit war es zunächst von Bedeutung, eine Vorstellung über die Löslichkeitseigenschaften zu gewinnen. Dies wurde in dieser Arbeit getan, wobei festgestellt wurde, dass nur Wasser und die polarsten organischen Lösemittel die Peptide zu lösen vermögen.

Im Anschluss wurden die KHPs ausführlich via Raman-Spektroskopie charakterisiert, wobei besonderer Fokus auf die von Cystein (bzw. Cystin) stammenden Disulfidbanden gelegt wurde. Die Charakterisierung konnte ein tieferes Verständnis für die Struktur der KHPs erzeugen und deckte sich mit Angaben aus der Literatur über die Struktur von Federkeratin.

Nach der spektroskopischen Untersuchung der KHPs folgten Versuche zur Filmbildung. Hierbei konnte eine wichtige Erkenntnis für den KERAbond-Prozess gewonnen werden – das Ausmaß bzw. der Einfluss der Salzlast durch den Hydrolyseprozess. Der Gehalt an Phosphat wurde auf etwa 15 % (w/w) bestimmt. Dieser hohe Salzgehalt hatte zur Folge, dass auch mit Weichmachern bzw. Koaleszenzmitteln keine homogenen und durchgängigen Filme gezogen werden konnten. Daher wurden in Form von Dialyse und Alkohol-Extraktion zwei Methoden zur Entsalzung getestet. Überraschenderweise konnte durch Dialyse keine nennenswerte Verringerung des Salzgehalts erreicht werden, obwohl diese Methode mit massiven Masseverlusten von bis zu 85 % einherging. Die Alkohol-Extraktion zeigte größeren Erfolg. Hier konnte durch Methanol der Salzgehalt auf 1,4 % (w/w) verringert werden, wobei etwa 40 % der Masse erhalten blieben. Auch Ethanol wurde getestet und erwies sich in der Salz Entfernung als noch effektiver. Da jedoch die Ethanol-Extraktion weniger als 10 % der Ausgangsmasse zurückließ, wurde

## VI. Zusammenfassung

die Methanol-Extraktion für diese Arbeit zur Methode der Wahl zur Entsalzung. Diese vereint eine starke Verringerung des Salzgehalts mit der höchsten verbliebenen Masse. Zudem kann sie leicht auch im größeren Maßstab durchgeführt werden.

Nach der Methanol-Extraktion wurden erneut Filmbildungsexperimente mit den KHPs (fortan MeOH-KHPs) durchgeführt, bei denen gezeigt werden konnte, dass die KHPs ohne den hohen Salzgehalt zur Ausbildung von harten Filmen in der Lage sind. Die Filme wurden auf ihre thermischen Eigenschaften hin untersucht und es konnte gezeigt werden, dass eine thermische Stabilität bis etwa 160 °C besteht.

Als nächstes wurde die Reduktion der in den KHPs enthaltenen Disulfide etabliert. Als am besten geeignetes Reduktionsmittel stellte sich TCEP heraus, welches die Disulfide selektiv und quantitativ zu Thiolen reduziert. Für eine simple Überprüfung auf vollständige Reduktion konnte die für die Charakterisierung entwickelte Raman-Methode verwendet werden.

Im Anschluss an die Reduktion wurde die Luftstabilität des Thiols untersucht, wobei beobachtet wurde, dass auch nach zwei Wochen nur ein sehr geringfügiger Teil der Thiole durch Luftsauerstoff oxidiert werden konnte. Daher wurde die gezielte (Re)-Oxidation durch Wasserstoffperoxid und Ammoniak getestet. Dabei stellte sich heraus, dass bereits eine geringe Wasserstoffperoxid-Konzentration von 0,5 % ausreicht, um eine vollständige (Re)-Oxidation der Thiole zu gewährleisten. Auch die Oxidation konnte mittels Raman-Spektroskopie verfolgt werden.

Die Filmbildungen wurden auch analog mit einem erdölbasierten Thiol-Vernetzer durchgeführt, mit dem gleichen Ergebnis. Beide Arten der Filme wurden mittels DSC untersucht. Die thermischen Eigenschaften beider Proben ähnelten sich sehr, lediglich die Gegenwart eines zweiten  $T_g$  durch das Einbringen des Vernetzers unterscheidet die Thermogramme.

Die Ergebnisse zur Charakterisierung, sowie Reduktion der KHPs wurden, zusammen mit den Ergebnissen der Keratinhydrolyse des Fraunhofer IGB, zur Patentierung angemeldet. Der Name der Patenteinreichung ist *Protein hydrolysate comprising thiol-containing peptides, methods to obtain it and uses thereof* – Inhalte dieser Arbeit welche in die Patentschrift eingegangen sind, sind die Raman-Analytik sowie die vorherige Reduktion mittels TCEP.

## VI. Zusammenfassung

Anschließend wurden die Ergebnisse bei dem Journal RSC Sustainability unter dem Titel *A Green Process for the Specific Decomposition of Chicken Feather Keratin into Polythiol Building Blocks* eingereicht. Der Artikel wurde vom Journal akzeptiert, jedoch bis dato noch nicht publiziert. Zu besagtem Artikel wurde aus dieser Arbeit die Reduktion der KHPs, sowie Raman-Analytik und REM-Analytik beigetragen. Die weiteren, im Artikel besprochenen Ergebnisse wurden durch Fraunhofer IGB erzeugt.

In einem zweiten Projekt konnte eine Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol nach *Dayagi et al.* optimiert werden, indem die Reduktion der notwendigen Äquivalente Natriumhydrogensulfid realisiert wurde. Die Synthese nach *Wessig et al.* konnte nicht reproduziert werden. Es wurde eine Charakterisierung dieses Diols mit NMR- und Raman-Spektroskopie durchgeführt. Die Raman-Spektroskopie konnte zeigen, dass eine vollständige Oxidation hin zum Disulfid durch Exposition gegenüber Luftsauerstoff möglich ist. Mittels Gaschromatographie wurde eine erreichte Reinheit von ca. 93 % ermittelt.

Durch die zwei im Molekül enthaltenen Hydroxygruppen war es möglich, dieses in Polyurethane einzubauen. Somit stellt (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol einen interessanten neuen Baustein dar. Initiale, qualitative Tests zeigten zunächst Vergelung der Dithiolan-Polyurethane durch Erhitzen. Ebenso konnten analog die Vergelung von Dithiolan-Polyurethan mit Allyl- oder Vinyl-Ether-Gruppen durch Bestrahlung bei 365 nm in Anwesenheit eines Photoinitiators beobachtet werden. Diese Ergebnisse konnten in rheometrischen Messungen jedoch nicht reproduziert und quantifiziert werden, da es bei keiner der Proben zu Überschreiten des Gelpunkts kam.

Dieser Befund wurde auf den Einfluss des Thorpe-Ingold-Effekts zurückgeführt, welcher eine Erhöhung zur Neigung zum Ringschluss durch geminale Substituenten erklärt. Basierend auf dieser Erklärung wurde Liponsäure als alternative 1,2-Dithiolan-Verbindung ausgemacht, welche ebenfalls den Vorteil bietet biobasiert verfügbar zu sein. Daher wurde ein Polyurethan mit Liponsäure als Endgruppenreagenz synthetisiert und ebenfalls auf seine Fähigkeit zur Vernetzung untersucht. Dazu wurde das Liponsäure-Dithiolan allein und im Zusammenspiel mit den Allyl- bzw. Vinylether-Polyurethanen rheologisch betrachtet.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war ein Anstieg der Module in allen drei Fällen, was eine Vernetzungsreaktion anzeigt. Im Falle der Reaktion der Liponsäure mit Vinylethern

## VI. Zusammenfassung

und im Falle des Disulfidaustausches unter den Dithiolan-Gruppen kam es zum Sol-Gel-Übergang. Dies zeigt, dass 1,2-Dithiolane für vernetzende Reaktionen und somit zur Nutzung für aushärtende Reaktionen (bspw. in Klebstoffsystemen) geeignet sind. Ferner bekräftigt es die Vermutung, dass das Substitutionsmuster des Dithiolanrings eine entscheidende Rolle spielt, da das geminal substituierte (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol nicht erfolgreich zur Vernetzung genutzt werden konnte. Liponsäure, ohne geminale Substituenten, jedoch konnte Vernetzungen zeigen.

## VII. Ausblick

Als Teil des FNR-geförderten KERAbond-Projekts sind die sich durch diese Arbeit ergebenden Möglichkeiten zur weiteren Forschung eng mit dem Voranschreiten des Projekts verwoben. Da der Prozess der Keratinhydrolyse noch nicht ganz ausgearbeitet ist, können die Ergebnisse dieser Arbeit Einfluss auf diesen nehmen.

Dies ist bereits insofern geschehen, dass die Erkenntnisse, die zur Problematik der Salzfracht der KHPs erzeugt wurden dazu führten, dass fortan statt Kaliumphosphat als Puffersalz Natriumcarbonat eingesetzt wird. Durch die Umstellung auf Carbonat soll das Entfernen des Salzes durch eine alkoholische Aufarbeitung oder durch eine Membran-involvierende Methode künftig umgangen werden, indem durch Ansäuern mit einer organischen Säure das Salz ausgegast werden kann. Zusätzlich wird gegenwärtig die Möglichkeit untersucht, Organothiolsäuren hierfür einzusetzen, wodurch Entsalzung und Reduktion der KHPs in einem Schritt vollzogen werden könnten. Außerdem führte die Umstellung auf den Carbonat-Puffer zu einer Verbesserung der Prozessausbeute.

Weiter sind eine Vielzahl von Modifikationen der KHPs über beispielsweise die Carboxylgruppen der Peptide möglich. Sowohl chemische als auch enzymatische Modifikationen sind grundsätzlich denkbar, wobei bei Erfolg enzymatische gegenüber den chemischen Modifikationen potentiell einen noch grüneren Prozess ermöglichen würde.

Zu den Modifikationen, die in Zukunft untersucht werden können, gehören zunächst Umsetzung mit einem Monoamin oder Monoalkohol. Dabei können Untersuchungen zum Einfluss der Kettenlänge auf die Polarität und Tensideigenschaften der KHPs durchgeführt werden. Hierdurch ist ein Finetuning der KHP-Polarität denkbar, sodass diese auf unterschiedliche Systeme angepasst werden könnten.

Durch das Finetuning der Polarität und die damit verbundene Einsetzbarkeit der KHPs in Umgebungen diverser Level an Hydrophobie oder Hydrophilie können die Filmbildungsexperimente auf ein bedeutend größeres Spektrum an Substraten erweitert werden. Zunächst ist natürlich, analog zu den hier gezeigten Vernetzungen mit Thiolhärtern, eine Filmbildung mit neuen Thiolhärtern möglich. Insbesondere unpolare

## VII. Ausblick

Thiolhärter sind dadurch zugänglich – dies ist gut, da ein Großteil der industriell gängigen Thiolhärter stark unpolar ist.

Auch eine Vielzahl von Epoxidharzen weisen eine hohe Hydrophobie auf, insbesondere die Klasse biobasierter, epoxidierter Fette. Durch die Anpassung der KHPs werden diese künftig auch miteinander mischbar sein. Die nukleophile Reaktion von Thiolen mit Epoxiden ist gut erforscht und weit verbreitet, sodass sich hier ein weites Feld der Möglichkeiten auftut. Gleiches gilt auch für Alkene. Auch Thiol-En-Reaktionen sind mit den reduzierten KHPs gut vorstellbar.

Neben dem Einsatz der KHP-Modifikation für die Steuerung der Polarität ist es auch vorstellbar, dass diese zur Funktionalisierung eingesetzt wird. So kann etwa auf diese Weise eine geschützte Thiol-Gruppe angebracht werden. Nach der Entschützung wird so dafür gesorgt, dass die Thiol-Zahl erhöht wird – dies ist insbesondere für den potentiellen Einsatz als Vernetzer sehr interessant.

Aber auch andere funktionelle Gruppen wie Epoxide oder aktivierte Doppelbindungen lassen sich so in die KHPs einführen. Hierdurch wäre es möglich, die oben beschriebenen Filmbildungen ohne den Einsatz anderer Epoxid- oder „En“-Reagenzien durchzuführen. Durch das Einbringen der Funktionalitäten direkt in die KHPs können ebenfalls potentielle Schwierigkeiten mit der Mischbarkeit umgangen werden.

Naheliegender ist ebenfalls die Anwendung der KHPs zur Behandlung geschädigtem Haars, oder zur Prävention von Haarschäden. Untersuchungen dazu laufen bereits bei der Henkel AG & Co. KGaA mit vielversprechenden ersten Ergebnissen.

Da gezeigt werden konnte, dass 1,2-Dithiolane prinzipiell für vernetzende Reaktionen geeignet sind lohnt es sich diese Chemie weiter zu erforschen. Da sich (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol nicht vielversprechend zeigte, könnte eine analoge Synthese ausgehend von 1,3-Dibrom-2-propanol zu einem Dithiolan mit einer Hydroxygruppe entwickelt werden. Dieses wäre dann, analog zur Liponsäure, jedoch mit besserer Reaktivität gegenüber NCO-Gruppen, als Endgruppenreagenz für Polyurethane einsetzbar.

## VII. Ausblick

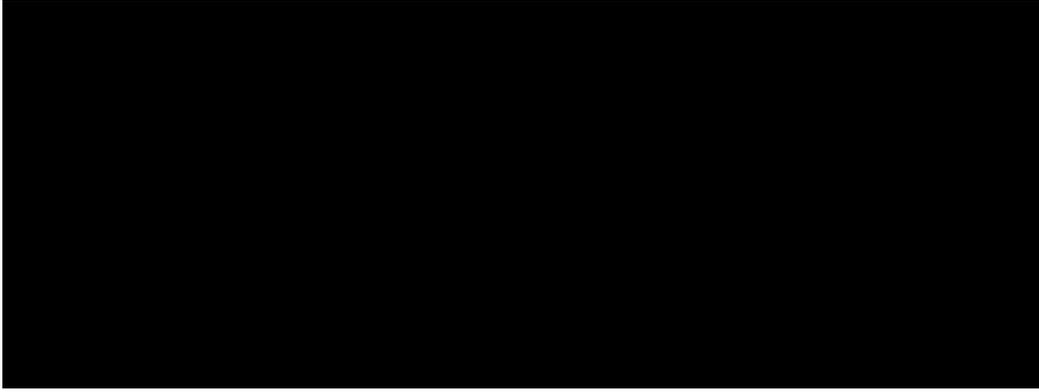


Abbildung VII-1: A) Dithiolan-Synthese ausgehend von 1,3-Dibrom-2-propanol. B) beispielhafte Verwendung des Dithiolans aus (A) in einer Veresterung mit Liponsäure zur Darstellung eines Polythiols.

Ferner könnten beide Dithiolane zusammengeführt werden indem die Moleküle verestert werden. Hierdurch würde ein neuartiges, teilweise biobasiertes, Polythiol zugänglich. Sowohl in der Disulfidform, als auch nach einer Reaktion zu den Thiolen könnte die Verbindung als alternative zu etablierten, vollständig erdölbasierten Thiol-Vernetzer genutzt werden.

## VIII. Experimentalteil

## VIII.1 Verwendete Geräte und Chemikalien

Lösemittel und Chemikalien

Alle nicht selbst dargestellten Chemikalien wurden kommerziell erworben. Sämtliche Chemikalien wurden wie erhalten eingesetzt.

Chemikalie	Hersteller	CAS-Nr	LOT-Nr
KHPs	Fraunhofer IGB/ CBP	n.a.	n.a.
<i>p</i> -Toluolsulfonsäure	Supelco	6192-52-5	K51488513132
1,3-Propandiol	Merck	504-63-2	S7262081
1,4-Butandiol	Merck	110-63-4	S7298332648
1,6-Hexandiol	Arcos Organics	504-63-2	153751-58025
Vinyllaurat	Sigma Aldrich	2146-71-6	BCCG4525
Dodecylamin	Sigma Aldrich	124-22-1	S8189427149
Isopropylalanolat	DeutscheLanolinGesellschaft	n.b.	n.b.
TCEP (Hydrochlorid)	Sigma Aldrich	51805-45-9	BCVG2246
Ammoniumthiglycolat (70	Arcos Organics	5421-46-5	153661-84022
Glycerin	Carl Roth	56-81-5	1972.8
Texanol	Kremer	25265-77-4	246-771-9
AIBN	Sigma-Aldrich	78-67-1	BCEC4092
Butylhydroxytoluol	Sigma-Aldrich	128-37-0	BBDF2122
Dibenzyldisulfid	Sigma-Aldrich	150-60-7	BECC2262
Dibutylamin	Sigma-Aldrich	111-92-2	DFGH3375
HDI	Sigma-Aldrich	822-06-0	BBGD4276
PFD <sub>H</sub>	Total Cray Valley	n.b.	n.b.
Liponsäure	Sigma-Aldrich	1077-28-7	DEGG2121
Thiomilchsäure	Sigma-Aldrich	79-42-5	BFFS4207

Inerte Bedingungen

Wenn nicht anders vermerkt konnten Reaktionen unter nicht-inerten Bedingungen durchgeführt werden. Für die Reaktionen unter inerten Bedingungen wurde eine kombinierte Stickstoff/Vakuum-Schlenkline verwendet. Glasgeräte wurden dann nach dem Ausheizen (12 h bei 120 °C) und vor dem Gebrauch mindestens dreimal sekuriert. Flüssige Chemikalien wurden über Einwegspritzen, Feststoffe wurden im Stickstoffgegenstrom zugegeben. Wurden Reaktionen über längere Zeit gerührt wurde, die Reaktionsapparatur im Stickstoffstrom belassen.

### **Anmerkungen zum chemischen Arbeiten**

Die Entfernung von Lösemittel unter verringertem Druck erfolgte, falls nicht explizit anders beschrieben, an Rotationsverdampfern der Firma *Büchi*.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden mit zurechtgeschnittenen Fertigfolien der Firma *Macherey-Nagel*, POLYGRAM® SIL G/UV254 mit Fluoreszenz-Indikator durchgeführt.

Für Aufreinigungen mittels Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60M der Firma *Macherey-Nagel* (0.040-0.063 mm, 230–400 mesh) in zylindrischen Glassäulen mit Fritte verwendet.

### **Filmbildungsexperimente**

Filmbildungsexperimente wurden in Teflonformen mit eingefrästen Vertiefungen (4 cm x 4 cm oder 3,5 cm x 1,5 cm) durchgeführt. Peptide wurden in vollentsalztem Wasser gelöst und die Lösungen flächendeckend in die Vertiefungen der Teflonformen gegeben (4 cm x 4 cm Formen wurden mit 2,5 ml Peptidlösung benetzt, 3,5 cm x 1,5 cm mit 1 ml). Das Wasser wurde anschließend bei RT abgedampft. Die zurückgebliebenen Peptidfilme wurden durch Ankratzen mit einem Holzspatel, sowie durch optische Betrachtung evaluiert. Ausgewählte Filme wurden dann durch weiterführende Analytik charakterisiert.

Die Peptidlösungen hatten, wenn nicht anders angegeben, eine Konzentration von 400 mg/ml.

### **Analytische Geräte und Programme**

**Raman-Spektroskopie:** Raman-Spektren wurden auf einem Raman DXR3 xi Raman-Mikroskop der Firma *Thermo Scientific* mit einem 532 nm Laser (10 mW) aufgenommen. Proben mit Untergrundfluoreszenz wurden vor der Messung für mindestens 60 min dem Laser zwecks Photobleaching ausgesetzt. Spektreninterpretationen und Basislinienkorrekturen wurden mit *OMNIC Spectra* vorgenommen.

**Infrarot-Spektroskopie:** IR-Spektren wurden auf einem FT-IR Alpha der Firma *Bruker* mit einem ZnSe-ATR-Kristall aufgenommen. Spektreninterpretationen wurden mit OPUS durchgeführt.

## VIII. Experimentalteil

**pH-Elektrode:** pH-Bestimmungen bzw. -Einstellungen wurden mittels 765 Dosimat der Firma *Metrohm* durchgeführt.

**Dünnschichtchromatographie:** DC-Platten wurden entweder unter einer UVLS-24 Assembly Quecksilberlampe betrachtet oder mit einem Kaliumpermanganat-Färbereagenz angefärbt.

**Gefriertrocknung:** Gefriertrocknungen wurden mit einer Alpha 2-4 der Firma *Christ* bei Drücken <1 mbar, sowie bei RT durchgeführt.

**Thermische Analytik:** Thermische Analytik bestand in dieser Arbeit aus DSC- und TGA-Messungen. Diese wurden an einer TAI Discovery Series gemessen. DSC-Messungen wurden stets zunächst auf 120 °C erhitzt, dann auf -50 °C gekühlt und anschließend final auf 150 °C erhitzt. Die Heizrate betrug dabei 10 K/min.

**NCO-Titrator:** NCO-Titration nach Spielberger erfolgte an einem *T50 Titrator* der Firma *Mettler-Toledo* nach *DIN 53185*.

Blindwertbestimmung:

4 mL Dibutylamin-Lösung (0,5 M in Xylol) wurden in einem Titrierbecher vorgelegt. Anschließend wurden Xylol und Isopropanol (je 25 ml) hinzugegeben und mit Salzsäure (0,5 M) bis zum Äquivalenzpunkt titriert.

PU-Titration:

0,1–1,0 g PU-Probe werden in einem Titrierbecher eingewogen und mit 4 ml Dibutylamin-Lösung (0,5 M in Xylol) versetzt. Anschließend wird Xylol (25 ml) hinzugegeben und die Probe unter Erwärmen auf einer Heizplatte gerührt bis die Probe vollständig aufgelöst ist. Dann wird Isopropanol (25 ml) hinzugefügt und mit Salzsäure (0,5 M) bis zum Äquivalenzpunkt titriert.

**Säulenchromatographie:** Säulenchromatographie erfolgte unter Verwendung des jeweils angegebenen Elutionsmittels. Die stationäre Phase war stets Kieselgel 60 (0,040 bis 0,063 mm) von Merck, 230-430 mesh) der Firma Macherey-Nagel gepackt in zylindrischen Chromatographiesäulen.

**LED-Strahlungskammer:** Schnelle Aushärtungstests erfolgten in einem Aluminiumschälchen mit der EQ CL30 LED Flood 365 Strahlungsquelle ( $\lambda = 365$  nm) von

## VIII. Experimentalteil

*Loctite*. Alle Proben wurden in der mittleren Schiene der LED-Kammer platziert. Auf dieser Höhe wurde eine Bestrahlungsstärke 562 mW/cm<sup>2</sup> vermessen.

**UV/Vis-Spektroskopie:** UV/Vis-Spektren wurden auf einem SpectraMax M2 Multimode Microplate Reader der Firma *Molecular Devices* aufgenommen ( $\lambda = 200$  bis 500 nm).

**Rheologie:** Rheologischen Messungen erfolgten am Rheometer MCR302 der Firma *Anton Paar*. Die Strahlenhärtung erfolgte durch eine externe Lichtquelle Superlite I 07 der Firma *Lumatec* bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 370$  nm. Die Bestrahlungsstärke wurde auf 93 mW/cm<sup>2</sup> gemessen.

**NMR-Spektroskopie:** Alle Proben wurden in MeOD gelöst und vermessen in einem *Agilent MR400*. Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden bei einer Frequenz von  $\nu = 400$  Hz aufgenommen.

**HPLC:** HPLC-Chromatogramme wurden auf *Vanquish Core* HPLC-System der Firma *Thermo Fisher* aufgenommen. Die Proben wurden dazu in einem Wasser-Methanol-Gemisch (1:1) gelöst und vor der Messung zentrifugiert – Vermessen wurden nur die Überstände. Auftrennungen fanden auf einer Hypersil GOLD Silika-HPLC-Säule statt. Zur Detektion der Proben wurde ein *Ultimate 3000* Mehrfachwellenlängendetektor der Firma *Thermo Fisher* genutzt.

## VIII.2 alkoholische Extraktion der KHP

Für die alkoholische Extraktion der KHP wurden diese im Verhältnis 15 ml Alkohol pro Gramm Peptidgemisch suspendiert. Die Suspension wurde für 12 h bei RT gerührt und anschließend abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vakuum getrocknet. Wurde der Filterkuchen erneut in Alkohol suspendiert, geschahen weitere Extraktionsdurchläufe analog zum Ersten.

## VIII.3 Chemische Reaktionen

### Reduktion der KHPs durch Ammoniumthioglycolat

In einem Rundkolben wurden Wasser (10 ml) vorgelegt. Das Wasser wurde 15 Minuten durch Einleiten von Stickstoff bestickt. MeOH-KHP (1155 mg) und ATG-Lösung (70 %, 0,5 ml) wurden im Stickstoffgegenstrom zugegeben und im Wasser gelöst. Der Ansatz

## VIII. Experimentalteil

wurde dann für 30 min unter RT und weiterer Bestickung gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und dialysiert (MWCO = 100 – 500 Da, 3x 2 h, 1:150).

Ausbeute: 578 mg (50 % (w/w)\*)

\*Ausgehend von der Prämisse, dass die Veränderung durch die Reduktion vernachlässigbar gering ist.

**Raman (Mikroskop):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3062, 2937, 2572, 1666, 1449, 1389, 1244, 1002, 947, 764, 510, 432.

### **Reduktion der KHPs durch TCEP-HCl**

In einem Rundkolben wurden Wasser (10 ml) vorgelegt. Das Wasser wurde 15 Minuten bestickt. MeOH-KHP (1155 mg) und TCEP-HCl (100 mg, 0,35 mmol) wurden im Stickstoffgegenstrom zugegeben und im Wasser gelöst. Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten unter RT und weiterer Bestickung gerührt. Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt und dialysiert (MWCO = 100 – 500 Da, 3x 2 h, 1:150).

Ausbeute: 782 mg (68 % (w/w)\*)

\*Ausgehend von der Prämisse, dass die Veränderung durch die Reduktion vernachlässigbar gering ist.

**Raman (Mikroskop):**  $\tilde{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3059, 2936, 2573, 1700, 1616, 1586, 1450, 1340, 1247, 1208, 1004, 975, 922, 857, 828, 644.

### **Dithiolan-Synthesen**

#### Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol

2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol (19,98 g; 76,3 mmol) und NaSH (23,81 g; 305 mmol) wurden in MeOH (100 ml) gelöst und der Ansatz für 16 h bei RT gerührt. Reaktionskontrolle erfolgte mittel GC. Der entstandene weiße Niederschlag wurde mittels Filtration abgetrennt. Das MeOH des Filtrats wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton aufgenommen (100 ml) und erneut filtriert.

## VIII. Experimentalteil

Anschließend wurde das Lösemittel unter verringertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde aus Ethanol umkristallisiert und liefert ein hellgelbes kristallines Produkt.

Ausbeute: 7,12 g, (42,73 mmol, 56 %)

**$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-*d*):**  $\delta$ [ppm]= 2.91 (s, 2 H, 2-H), 3.66 (s, 2 H, 1-H), 4.85 (s, 2 H, 2-OH)

**IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3311 (O-H- $\nu$ ), 2936, 2871, 1711, 1629, 1377, 1180, 1112, 1022, 905, 877, 582, 526.

**Raman (Mikroskop):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2964, 2936 2873, 1455, 1280, 1209, 1121, 1043, 1002, 938, 879, 803, 733, 694 (C-S- $\nu$ ), 585, 507 (S-S- $\nu$ ), 389, 372, 331, 216.

**GC (20 Min, 200 °C):** [min] = 9,672.

### Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol - Eisenchloridfällung

2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol (20,09 g; 76,5 mmol) und NaSH (23,81 g; 305 mmol) wurden in einem 1:1 Gemisch aus MeOH und Aceton (100 ml) und der Ansatz für 5 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde der weiße Niederschlag mittels Filtration abgetrennt. Zum Filtrat wurde FeCl<sub>3</sub> (24,33 g; 150 mmol) in MeOH (25 ml) gegeben und der Ansatz für weitere 2 h zum Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde der schwarze Niederschlag mittels Filtration abgetrennt. Das Lösemittel des Filtrats wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in Aceton (100 ml) aufgenommen, erneut filtriert und das Lösemittel des Filtrats unter verringertem Druck entfernt.

Ausbeute: 5,72 g (34,4 mmol, 45 %)

**$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-*d*):**  $\delta$ [ppm]= 2.92 (s, 2 H, 2-H), 3.66 (s, 2 H, 1-H), 4.84 (s, 2 H, 2-OH)

### Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol - saure Aufarbeitung

2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol (20,01 g; 76,3 mmol) und NaSH (23,88 g; 306 mmol) wurden in einem 1:1 Gemisch aus MeOH und Aceton (100 ml) und über Nacht bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde der Ansatz für 2,5 h zum Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde durch Zugabe von HCl konz. pH 1 eingestellt und der Ansatz für 4 h

## VIII. Experimentalteil

weiter gekocht. Dann wurde die Reaktionslösung neutralisiert und für eine weitere Stunde zum Rückfluss erhitzt. Daraufhin folgte Abkühlen auf RT, der weiße Niederschlag wurde mittels Filtration abgetrennt. Das Lösemittel wurde unter verringertem Druck entfernt.

Ausbeute: 8,75 g (52,7 mmol, 69 %)

**<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, MeOH-*d*):**  $\delta$ [ppm]= 2.91 (s, 2 H, 2-H), 3.64 (s, 2 H, 1-H), 4.84 (s, 2 H, 2-OH)

### Synthese von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol - reduzierte Äquivalente

2,2-Bis(bromomethyl)propan-1,3-diol (9,99 g; 38,1 mmol) und NaSH (9,56 g; 77,5 mmol) wurden in einem 1:1 Gemisch aus MeOH und Aceton (100 ml) und für 68,5 h bei RT gerührt. Darauf folgte 1 h Heizen zum Rückfluss. Nach abkühlen auf RT wurde der weiße Niederschlag mittels Filtration abgetrennt. Das Lösemittel des Filtrats wurde unter verringertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in 50 ml Isopropanol aufgenommen und erneut filtriert. Das Isopropanol des Filtrats wurde unter verringertem Druck entfernt.

Ausbeute: 4,05 g (24,4 mmol, 64 %)

**<sup>1</sup>H-NMR(600 MHz, MeOH-*d*):**  $\delta$ [ppm]= 2.91 (s, 2 H, 2-H), 3.64 (s, 2 H, 1-H), 4.84 (s, 2 H, 2-OH)

## Polyurethan-Synthesen

### **Allgemeine Synthesevorschrift:**

In einem 250 mL Dreihals-Rundkolben wurde hydriertes Polyfarnesendiol (PFD<sub>H</sub>) vorgelegt und unter Hochvakuum (< 1 mbar), sowie ständigem Rühren mit einem KPG-Rührer bei 100 °C entwässert bis keine Blasenbildung mehr zu beobachten war (jedoch mindestens 1 h). Dann wurde im Stickstoffgegenstrom ein Temperaturfühler in den Kolben eingeführt. Nach Abkühlen auf 75 °C folgte die Zugabe des kettenverlängernden Diols (DT, ADVE oder GAE) – sofern bei der Synthese vorgesehen. Sobald eine gute Vermischung der Diolkomponenten beobachtet wurde, wurden das Diisocyanat (HDI),

## VIII. Experimentalteil

sowie Katalysator-Lösung (40  $\mu\text{L}$ , 50 % (w/w) Borch Kat. 315 in getrocknetem Aceton) dazugegeben. Die Reaktionstemperatur wurde anschließend auf 85–90 °C eingestellt und für 2 Stunden erwärmt. Durch NCO-Titrations nach der Methode von Spielberger wurde während der Reaktion der NCO-Wert bestimmt. Sobald der NCO-Endwert erreicht mit dem theoretischen Wert übereinstimmte, wurde das Endgruppenreagenz (Dibutylamin oder Liponsäure) hinzugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde die Heizquelle entfernt und die Reaktion wurde zur Vervollständigung über Nacht gerührt.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz mittels IR-Spektroskopie auf die Anwesenheit von NCO-Gruppen untersucht. Waren NCO-Gruppen vorhanden wurde der Ansatz erneut auf Reaktionstemperatur gebracht und weiter gerührt, bis keine NCO-Gruppen mehr detektiert werden konnten. Sobald dies erreicht war, wurde der Ansatz bei 80-85 °C im Ofen in eine Glasflasche überführt.

**IR (ATR, Film):**  $\tilde{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3330 (-N-H), 2958, 2929 (-CH<sub>3</sub>/-CH<sub>2</sub>-), 2863, 2260 (=N=C=O)\*, 1720 (-NH-COO-), 1636, 1532, 1464 (-CH<sub>3</sub>/-CH<sub>2</sub>-), 1380, 1247, 1145, 735.

\*bezieht sich auf den Fall, dass noch freie NCO-Gruppen detektiert werden konnten.

## IX. Literaturverzeichnis

- [1] R. Cléménçon, *Vol. 25*, SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, **2016**, pp. 3-24.
- [2] C. Fetting, *ESDN report* **2020**, 53; 'The European green deal'.
- [3] V. Beghetto, R. Sole, C. Buranello, M. Al-Abkal, M. Facchin, *Materials* **2021**, 14, 4782; 'Recent advancements in plastic packaging recycling: a mini-review'.
- [4] C. I. Idumah, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2021**, 1-14; 'Recent advancements in thermolysis of plastic solid wastes to liquid fuel'.
- [5] R. Mishra, A. Kumar, E. Singh, S. Kumar, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2023**, 11, 2033-2049; 'Recent research advancements in catalytic pyrolysis of plastic waste'.
- [6] O. Gumenyuk, G. Mesheryakova, S. Shakirova, *Research Development Center-FBEE, Belgrade, Serbia Proceedings Filodiritto, Bologna, Italy* **2019**, 211; 'Problems and methods of ecological safe poultry meat production'.
- [7] A. Shavandi, T. H. Silva, A. A. Bekhit, A. E.-D. A. Bekhit, *Biomaterials science* **2017**, 5, 1699-1735; 'Keratin: dissolution, extraction and biomedical application'.
- [8] J. R. Barone, W. F. Schmidt, C. F. Liebner, *Journal of applied polymer science* **2005**, 97, 1644-1651; 'Thermally processed keratin films'.
- [9] F. N. Tubiello, M. Salvatore, S. Rossi, A. Ferrara, N. Fitton, P. Smith, *Environmental Research Letters* **2013**, 8, 015009; 'The FAOSTAT database of greenhouse gas emissions from agriculture'.
- [10] Y. Zhang, R. Yang, W. Zhao, *Journal of agricultural and food chemistry* **2014**, 62, 2745-2751; 'Improving digestibility of feather meal by steam flash explosion'.
- [11] Y. Dou, X. Huang, B. Zhang, M. He, G. Yin, Y. Cui, *Rsc Advances* **2015**, 5, 27168-27174; 'Preparation and characterization of a dialdehyde starch crosslinked feather keratin film for food packaging application'.
- [12] E. Jin, N. Reddy, Z. Zhu, Y. Yang, *Journal of agricultural and food chemistry* **2011**, 59, 1729-1738; 'Graft polymerization of native chicken feathers for thermoplastic applications'.
- [13] B. Sprenger, *Vol. 2023*, **2022**.
- [14] A. Williams, H. Edwards, B. Barry, *Journal of Raman spectroscopy* **1994**, 25, 95-98; 'Raman spectra of human keratotic biopolymers: skin, callus, hair and nail'.
- [15] J. Chen, J. Liu, J. Jiang, S. Qian, J. Song, R. Kabara, I. Delo, G. Serino, F. Liu, Z. Hua, *New Phytologist* **2021**, 229, 3303-3317; 'F-box protein CFK1 interacts with and degrades de novo DNA methyltransferase in Arabidopsis'.
- [16] Z. P. Rad, H. Tavanai, A. Moradi, *Journal of aerosol science* **2012**, 51, 49-56; 'Production of feather keratin nanopowder through electrospaying'.
- [17] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, M. A. Meyers, *Progress in Materials Science* **2016**, 76, 229-318; 'Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration'.
- [18] M. Calvaresi, L. Eckhart, L. Alibardi, *Journal of Structural Biology* **2016**, 194, 282-291; 'The molecular organization of the beta-sheet region in corneous beta-proteins (beta-keratins) of sauropsids explains its stability and polymerization into filaments'.
- [19] K. Wang, R. Li, J. Ma, Y. Jian, J. Che, *Green Chemistry* **2016**, 18, 476-481; 'Extracting keratin from wool by using L-cysteine'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [20] S. Breakspear, B. Noecker, C. Popescu, *The Journal of Physical Chemistry B* **2019**, *123*, 4505-4511; 'Relevance and evaluation of hydrogen and disulfide bond contribution to the mechanics of hard  $\alpha$ -keratin fibers'.
- [21] B. Ma, X. Qiao, X. Hou, Y. Yang, *International journal of biological macromolecules* **2016**, *89*, 614-621; 'Pure keratin membrane and fibers from chicken feather'.
- [22] Y.-X. Wang, X.-J. Cao, *Process biochemistry* **2012**, *47*, 896-899; 'Extracting keratin from chicken feathers by using a hydrophobic ionic liquid'.
- [23] T. Lingham-Soliar, *Journal of ornithology* **2014**, *155*, 323-336; 'Feather structure, biomechanics and biomimetics: the incredible lightness of being'.
- [24] A. M. Rijke, *Journal of Experimental Biology* **1968**, *48*, 185-189; 'The water repellency and feather structure of cormorants, Phalacrocoracidae'.
- [25] V. Storch, U. Welsch, V. Storch, U. Welsch, *Kükenthal Zoologisches Praktikum* **2014**, 394-412; 'Aves, Vögel'.
- [26] A. Kuzuhara, *International Journal of Cosmetic Science* **2016**, *38*, 201-209; 'Internal structural changes in keratin fibres resulting from combined hair waving and stress relaxation treatments: a Raman spectroscopic investigation'.
- [27] A. Kuzuhara, *International Journal of Cosmetic Science* **2018**, *40*, 34-43; 'A Raman spectroscopic investigation of the mechanism of the reduction in hair with thioglycerol and the accompanying disulphide conformational changes'.
- [28] J. Sato, C. Y. Ogawa, M. Sandrini, A. N. Medina, F. Sato, R. S. Vasconcellos, *Vibrational Spectroscopy* **2019**, *100*, 1-5; 'Study of keratin hair of domestic cat under methionine and cystine experimental diet using FT-Raman spectroscopy'.
- [29] H. Edwards, D. Hunt, M. Sibley, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1998**, *54*, 745-757; 'FT-Raman spectroscopic study of keratotic materials: horn, hoof and tortoiseshell'.
- [30] J. Church, A. Poole, A. Woodhead, *Vibrational Spectroscopy* **2010**, *53*, 107-111; 'The Raman analysis of films cast from dissolved feather keratin'.
- [31] D. R. Goddard, L. Michaelis, *Journal of biological chemistry* **1935**, *112*, 361-371; 'Derivatives of keratin'.
- [32] J. A. Maclaren, B. Milligan, **1981**; 'Wool science. The chemical reactivity of the wool fibre'.
- [33] A. J. Poole, R. E. Lyons, J. S. Church, *Journal of Polymers and the Environment* **2011**, *19*, 995-1004; 'Dissolving feather keratin using sodium sulfide for bio-polymer applications'.
- [34] S. Alahyaribeik, A. Ullah, *International journal of biological macromolecules* **2020**, *148*, 449-456; 'Methods of keratin extraction from poultry feathers and their effects on antioxidant activity of extracted keratin'.
- [35] J. F. Fernández, D. Waterkamp, J. Thöming, *Desalination* **2008**, *224*, 52-56; 'Recovery of ionic liquids from wastewater: Aggregation control for intensified membrane filtration'.
- [36] Z. Jiang, J. Yuan, P. Wang, X. Fan, J. Xu, Q. Wang, L. Zhang, *International journal of biological macromolecules* **2018**, *119*, 423-430; 'Dissolution and regeneration of wool keratin in the deep eutectic solvent of choline chloride-urea'.
- [37] E.-M. Nuutinen, P. Willberg-Keyriläinen, T. Virtanen, A. Mija, L. Kuutti, R. Lantto, A.-S. Jääskeläinen, *RSC advances* **2019**, *9*, 19720-19728; 'Green process to regenerate keratin from feathers with an aqueous deep eutectic solvent'.
- [38] Z. Yu, B. Zhang, F. Yu, G. Xu, A. Song, *Bioresource technology* **2012**, *121*, 335-341; 'A real explosion: The requirement of steam explosion pretreatment'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [39] W. Zhao, R. Yang, Y. Zhang, L. Wu, *Green chemistry* **2012**, *14*, 3352-3360; 'Sustainable and practical utilization of feather keratin by an innovative physicochemical pretreatment: high density steam flash-explosion'.
- [40] M. Zoccola, A. Aluigi, A. Patrucco, C. Vineis, F. Forlini, P. Locatelli, M. C. Sacchi, C. Tonin, *Textile Research Journal* **2012**, *82*, 2006-2018; 'Microwave-assisted chemical-free hydrolysis of wool keratin'.
- [41] E. H. Burt Jr, J. M. Ichida, *The Auk* **1999**, *116*, 364-372; 'Occurrence of feather-degrading bacilli in the plumage of birds'.
- [42] X. Lin, G. Inglis, L. Yanke, K. Cheng, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **1999**, *23*, 149-153; 'Selection and characterization of feather-degrading bacteria from canola meal compost'.
- [43] N. Eslahi, F. Dadashian, N. H. Nejad, *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *43*, 624-648; 'An investigation on keratin extraction from wool and feather waste by enzymatic hydrolysis'.
- [44] C. Offidani, S. S. Rossi, M. Chiarotti, *Forensic science international* **1993**, *63*, 171-174; 'Improved enzymatic hydrolysis of hair'.
- [45] C. Earland, C. Knight, *Biochimica et biophysica acta* **1955**, *17*, 457-461; 'Studies on the structure of keratin: I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid'.
- [46] S. Blackburn, G. Lee, *Biochimica et biophysica acta* **1956**, *19*, 505-512; 'The reaction of wool keratin with alkali'.
- [47] T. Kitahara, H. Ogawa, *Journal of dermatological science* **1991**, *2*, 402-406; 'The extraction and characterization of human nail keratin'.
- [48] H. Xu, Z. Ma, Y. Yang, *Journal of Materials Science* **2014**, *49*, 7513-7521; 'Dissolution and regeneration of wool via controlled disintegration and disentanglement of highly crosslinked keratin'.
- [49] K. Katoh, T. Tanabe, K. Yamauchi, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4255-4262; 'Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity'.
- [50] X.-C. Yin, F.-Y. Li, Y.-F. He, Y. Wang, R.-M. Wang, *Biomaterials Science* **2013**, *1*, 528-536; 'Study on effective extraction of chicken feather keratins and their films for controlling drug release'.
- [51] A. Nakamura, M. Arimoto, K. Takeuchi, T. Fujii, *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2002**, *25*, 569-572; 'A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species'.
- [52] P. M. Schrooyen, P. J. Dijkstra, R. C. Oberthür, A. Bantjes, J. Feijen, *Journal of colloid and interface science* **2001**, *240*, 30-39; 'Stabilization of solutions of feather keratins by sodium dodecyl sulfate'.
- [53] K. Yamauchi, A. Yamauchi, T. Kusunoki, A. Kohda, Y. Konishi, *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* **1996**, *31*, 439-444; 'Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physicochemical and biodegradational properties of films'.
- [54] R. Wickett, *Cutis* **1987**, *39*, 496-497; 'Permanent waving and straightening of hair'.
- [55] F. Happey, R. Wormell, *Journal of the Textile Institute Transactions* **1949**, *40*, T855-T869; '53—Regenerated keratin fibres from wool'.
- [56] J. R. Winther, C. Thorpe, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* **2014**, *1840*, 838-846; 'Quantification of thiols and disulfides'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [57] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides, *The Journal of Organic Chemistry* **1991**, *56*, 2648-2650; 'Selective reduction of disulfides by tris (2-carboxyethyl) phosphine'.
- [58] W. Leitner, *Pure and Applied Chemistry* **2004**, *76*, 635-644; 'Recent advances in catalyst immobilization using supercritical carbon dioxide'.
- [59] J. Dupont, R. F. de Souza, P. A. Suarez, *Chemical reviews* **2002**, *102*, 3667-3692; 'Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis'.
- [60] T. Ueki, *Polymer Journal* **2014**, *46*, 646-655; 'Stimuli-responsive polymers in ionic liquids'.
- [61] Y. Ji, J. Chen, J. Lv, Z. Li, L. Xing, S. Ding, *Separation and Purification Technology* **2014**, *132*, 577-583; 'Extraction of keratin with ionic liquids from poultry feather'.
- [62] H. Xie, S. Li, S. Zhang, *Green chemistry* **2005**, *7*, 606-608; 'Ionic liquids as novel solvents for the dissolution and blending of wool keratin fibers'.
- [63] B. Tang, H. Zhang, K. H. Row, *Journal of separation science* **2015**, *38*, 1053-1064; 'Application of deep eutectic solvents in the extraction and separation of target compounds from various samples'.
- [64] B. Boeckle, B. Galunsky, *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, *61*, 3705-3710; 'Characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DSM 40530'.
- [65] R. Chitte, V. Nalawade, S. Dey, *Letters in Applied Microbiology* **1999**, *28*, 131-136; 'Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8'.
- [66] T. Kornilowicz-Kowalska, J. Bohacz, *Waste management* **2011**, *31*, 1689-1701; 'Biodegradation of keratin waste: theory and practical aspects'.
- [67] W. J. Nickerson, J. J. Noval, R. S. Robison, *Biochimica et biophysica acta* **1963**, *77*, 73-86; 'Keratinase: I. Properties of the enzyme conjugate elaborated by *Streptomyces fradiae*'.
- [68] J. J. Noval, W. J. Nickerson, *Journal of Bacteriology* **1959**, *77*, 251-263; 'Decomposition of native keratin by *Streptomyces fradiae*'.
- [69] A. Gousterova, D. Braikova, I. Goshev, P. Christov, K. Tishinov, E. Vasileva-Tonkova, T. Haertle, P. Nedkov, *Letters in applied microbiology* **2005**, *40*, 335-340; 'Degradation of keratin and collagen containing wastes by newly isolated thermoactinomycetes or by alkaline hydrolysis'.
- [70] C. R. Chilakamarry, S. Mahmood, S. N. B. M. Saffe, M. A. B. Arifin, A. Gupta, M. Y. Sikkandar, S. S. Begum, B. Narasaiah, *3 Biotech* **2021**, *11*, 1-12; 'Extraction and application of keratin from natural resources: a review'.
- [71] P. Mokrejs, P. Svoboda, J. Hrnčirik, D. Janacova, V. Vasek, *Waste Management & Research* **2011**, *29*, 260-267; 'Processing poultry feathers into keratin hydrolysate through alkaline-enzymatic hydrolysis'.
- [72] L. Lange, Y. Huang, P. K. Busk, *Applied microbiology and biotechnology* **2016**, *100*, 2083-2096; 'Microbial decomposition of keratin in nature—a new hypothesis of industrial relevance'.
- [73] J. H. Buchanan, *Biochemical Journal* **1977**, *167*, 489; 'A cystine-rich protein fraction from oxidized alpha-keratin'.
- [74] G. Bagiyan, I. Koroleva, N. Soroka, A. Ufimtsev, *Russian chemical bulletin* **2003**, *52*, 1135-1141; 'Oxidation of thiol compounds by molecular oxygen in aqueous solutions'.
- [75] R. H. Khengar, M. B. Brown, R. B. Turner, M. J. Traynor, K. B. Holt, S. A. Jones, *Free Radical Biology and Medicine* **2010**, *49*, 865-871; 'Free radical facilitated damage of ungual keratin'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [76] S. Mysling, R. Salbo, M. Ploug, T. J. Jørgensen, *Analytical chemistry* **2014**, *86*, 340-345; 'Electrochemical reduction of disulfide-containing proteins for hydrogen/deuterium exchange monitored by mass spectrometry'.
- [77] S. Nicolardi, A. M. Deelder, M. Palmblad, Y. E. van der Burgt, *Analytical chemistry* **2014**, *86*, 5376-5382; 'Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry'.
- [78] H. Kadin, in *Methods in Enzymology, Vol. 143*, Elsevier, **1987**, pp. 257-264.
- [79] E. J. Riedel, Christoph, *Anorganische Chemie, Vol. 8*, **2011**.
- [80] N. Kharasch, C. Y. Meyers, *The Chemistry of Organic Sulfur Compounds*, Elsevier, **2013**.
- [81] Y.-R. Luo, J. Kerr, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, **2010**.
- [82] J. Han, B. Zhao, A. Tang, Y. Gao, C. Gao, *Polymer Chemistry* **2012**, *3*, 1918-1925; 'Fast and scalable production of hyperbranched polythioether-yne by a combination of thiol-halogen click-like coupling and thiol-yne click polymerization'.
- [83] D. P. Nair, M. Podgorski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chemistry of Materials* **2014**, *26*, 724-744; 'The thiol-Michael addition click reaction: a powerful and widely used tool in materials chemistry'.
- [84] J. Pupkaite, J. Rosenquist, J. n. Hilborn, A. Samanta, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3475-3484; 'Injectable shape-holding collagen hydrogel for cell encapsulation and delivery cross-linked using thiol-michael addition click reaction'.
- [85] B. R. Donovan, J. S. Cobb, E. F. Hoff, D. L. Patton, *Rsc Advances* **2014**, *4*, 61927-61935; 'Thiol-ene adhesives from clove oil derivatives'.
- [86] N. Ning, S. Wang, Z. Zhang, Z. Feng, Z. Zheng, B. Yu, M. Tian, L. Zhang, *Chemical Engineering Journal* **2019**, *373*, 318-324; 'Superhydrophobic coating with ultrahigh adhesive force and good anti-scratching on elastomeric substrate by thiol-ene click chemistry'.
- [87] L. Shen, J. Cheng, J. Zhang, *European Polymer Journal* **2020**, *137*, 109927; 'Reworkable adhesives: Healable and fast response at ambient environment based on anthracene-based thiol-ene networks'.
- [88] B. J. Sparks, E. F. Hoff, L. P. Hayes, D. L. Patton, *Chemistry of Materials* **2012**, *24*, 3633-3642; 'Mussel-inspired thiol-ene polymer networks: Influencing network properties and adhesion with catechol functionality'.
- [89] W. Brockmann, P. L. Geiß, J. Klingen, K. B. Schröder, *Adhesive bonding: materials, applications and technology*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [90] D. Radojčić, J. Hong, M. Ionescu, X. Wan, I. Javni, Z. S. Petrović, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2016**, *118*, 1507-1511; 'Study on the reaction of amines with internal epoxides'.
- [91] K. Karadeniz, H. Akı, M. Y. Sen, Y. Çalikoğlu, *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2015**, *92*, 725-731; 'Ring opening of epoxidized soybean oil with compounds containing two different functional groups'.
- [92] A. Sammaiah, K. V. Padmaja, R. B. Prasad, *European Journal of Lipid Science and Technology* **2016**, *118*, 495-502; 'Tribology and oxidation studies of fatty acid sulfide derivatives synthesized via thiol-ene "Click" additions'.
- [93] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 1540-1573; 'Thiol-ene click chemistry'.
- [94] B. D. Fairbanks, D. M. Love, C. N. Bowman, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2017**, *218*, 1700073; 'Efficient Polymer-Polymer Conjugation via Thiol-ene Click Reaction'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [95] B. H. Northrop, S. H. Frayne, U. Choudhary, *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 3415-3430; 'Thiol-maleimide "click" chemistry: evaluating the influence of solvent, initiator, and thiol on the reaction mechanism, kinetics, and selectivity'.
- [96] M. Black, J. W. Rawlins, *European Polymer Journal* **2009**, *45*, 1433-1441; 'Thiol-ene UV-curable coatings using vegetable oil macromonomers'.
- [97] W. D. Cook, S. Chausson, F. Chen, L. Le Pluart, C. N. Bowman, T. F. Scott, *Polymer international* **2008**, *57*, 469-478; 'Photopolymerization kinetics, photorheology and photoplasticity of thiol-ene-allylic sulfide networks'.
- [98] T. Y. Lee, Z. Smith, S. K. Reddy, N. B. Cramer, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2007**, *40*, 1466-1472; 'Thiol-allyl ether-methacrylate ternary systems. polymerization mechanism'.
- [99] S. K. Reddy, N. B. Cramer, C. N. Bowman, *Macromolecules* **2006**, *39*, 3681-3687; 'Thiol-vinyl mechanisms. 2. kinetic modeling of ternary thiol-vinyl photopolymerizations'.
- [100] S. Van de Vyver, J. Geboers, S. Helsen, F. Yu, J. Thomas, M. Smet, W. Dehaen, B. F. Sels, *Chemical Communications* **2012**, *48*, 3497-3499; 'Thiol-promoted catalytic synthesis of diphenolic acid with sulfonated hyperbranched poly (arylene oxindole)s'.
- [101] S. Van de Vyver, S. Helsen, J. Geboers, F. Yu, J. Thomas, M. Smet, W. Dehaen, Y. Román-Leshkov, I. Hermans, B. F. Sels, *ACS Catalysis* **2012**, *2*, 2700-2704; 'Mechanistic insights into the kinetic and regiochemical control of the thiol-promoted catalytic synthesis of diphenolic acid'.
- [102] L. Wlodek, *Pol. J. Pharmacol* **2002**, *54*, 215-223; 'Beneficial and harmful effects of thiols'.
- [103] K. G. Reddie, K. S. Carroll, *Current opinion in chemical biology* **2008**, *12*, 746-754; 'Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation'.
- [104] L. Zhong, E. S. Arnér, A. Holmgren, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 5854-5859; 'Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence'.
- [105] A. Zeida, M. Trujillo, G. Ferrer-Sueta, A. Denicola, D. A. Estrin, R. Radi, *Chemical reviews* **2019**, *119*, 10829-10855; 'Catalysis of peroxide reduction by fast reacting protein thiols: focus review'.
- [106] C. Klomsiri, P. A. Karplus, L. B. Poole, *Antioxidants & redox signaling* **2011**, *14*, 1065-1077; 'Cysteine-based redox switches in enzymes'.
- [107] D. Cavallini, C. De Marco, S. Duprè, G. Rotilio, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1969**, *130*, 354-361; 'The copper catalyzed oxidation of cysteine to cystine'.
- [108] M. D. Sevilla, D. Becker, S. Swarts, J. Herrington, *Biochemical and biophysical research communications* **1987**, *144*, 1037-1042; 'Sulfinyl radical formation from the reaction of cysteine and glutathione thiol radicals with molecular oxygen'.
- [109] C. Timothy, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* **1995**, 955-963; 'EPR studies of the copper-catalysed oxidation of thiols with peroxides'.
- [110] S. Nevejans, N. Ballard, J. I. Miranda, B. Reck, J. M. Asua, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18*, 27577-27583; 'The underlying mechanisms for self-healing of poly (disulfide)s'.
- [111] D. H. Hamer, *Annual review of biochemistry* **1986**, *55*, 913-951; 'Metallothionein'.
- [112] J. S. Lazo, S.-M. Kuo, E. S. Woo, B. R. Pitt, *Chemico-biological interactions* **1998**, *111*, 255-262; 'The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [113] W. Maret, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, *91*, 237-241; 'Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange'.
- [114] D. A. Keire, E. Strauss, W. Guo, B. Noszal, D. L. Rabenstein, *The Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 123-127; 'Kinetics and equilibria of thiol/disulfide interchange reactions of selected biological thiols and related molecules with oxidized glutathione'.
- [115] A. Mirzahassemi, B. Noszál, *Scientific reports* **2016**, *6*, 1-11; 'Species-specific standard redox potential of thiol-disulfide systems: a key parameter to develop agents against oxidative stress'.
- [116] D. Ritz, J. Beckwith, *Annual Reviews in Microbiology* **2001**, *55*, 21-48; 'Roles of thiol-redox pathways in bacteria'.
- [117] S. Liang, J.-J. Deng, M.-S. Zhang, Z.-Y. Luo, W.-J. Lu, D.-L. Lu, H.-H. Mao, Z.-W. Li, J.-Z. Li, X.-C. Luo, *Green Chemistry* **2021**, *23*, 5166-5178; 'Promotion of feather waste recycling by enhancing the reducing power and keratinase activity of *Streptomyces* sp. SCUT-3'.
- [118] R. Wilson, S. Freddi, D. Chan, K. S. Cheah, J. F. Bateman, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, *280*, 15544-15552; 'Misfolding of collagen X chains harboring Schmid metaphyseal chondrodysplasia mutations results in aberrant disulfide bond formation, intracellular retention, and activation of the unfolded protein response'.
- [119] D. Stengel, M. Saric, H. R. Johnson, T. Schiller, J. Diehl, K. Chalek, D. Onofrei, T. Scheibel, G. P. Holland, *Biomacromolecules* **2023**, *24*, 1463-1474; 'Tyrosine's Unique Role in the Hierarchical Assembly of Recombinant Spider Silk Proteins: From Spinning Dope to Fibers'.
- [120] I. V. Peshenko, H. Shichi, *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31*, 292-303; 'Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite'.
- [121] T. Klemm, G. Ebert, D. J. Calleja, C. C. Allison, L. W. Richardson, J. P. Bernardini, B. G. Lu, N. W. Kuchel, C. Grohmann, Y. Shibata, *The EMBO journal* **2020**, *39*, e106275; 'Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PLpro, of SARS-CoV-2'.
- [122] I. Altinbasak, M. Arslan, R. Sanyal, A. Sanyal, *Polymer Chemistry* **2020**, *11*, 7603-7624; 'Pyridyl disulfide-based thiol-disulfide exchange reaction: Shaping the design of redox-responsive polymeric materials'.
- [123] J. Guo, J. Zha, T. Zhang, C.-H. Ding, Q. Tan, B. Xu, *Organic Letters* **2021**, *23*, 3167-3172; 'PdCl<sub>2</sub>/DMSO-Catalyzed Thiol-Disulfide Exchange: Synthesis of Unsymmetrical Disulfide'.
- [124] Y. Zhu, M. Lin, W. Hu, J. Wang, Z. G. Zhang, K. Zhang, B. Yu, F. J. Xu, *Angewandte Chemie International Edition* **2022**, *61*, e202200535; 'Controllable Disulfide Exchange Polymerization of Polyguanidine for Effective Biomedical Applications by Thiol-Mediated Uptake'.
- [125] M. Pięta, V. B. Purohit, J. Pietrasik, C. M. Plummer, *Polymer Chemistry* **2023**; 'Disulfide-containing monomers in chain-growth polymerization'.
- [126] R. Zhang, T. Nie, Y. Fang, H. Huang, J. Wu, *Biomacromolecules* **2021**, *23*, 1-19; 'Poly (disulfide) s: from Synthesis to drug delivery'.
- [127] Y. Ikeda, K. Miyaji, Y. Sakaki, T. Ohashi, H. Kobayashi, *Organometallics* **2022**, *41*, 1942-1959; 'Ingenious Material Design of the Vulcanization of Isoprene Rubber: Electron-Transfer and Dispersion Effects'.
- [128] S. Ebnesajjad, in *Handbook of adhesives and surface preparation*, Elsevier, **2011**, pp. 137-183.

## IX. Literaturverzeichnis

- [129] G. Li, S. Wang, Y. Zhang, M. Li, Z. Chen, J. Lu, *Advanced Materials* **2018**, *30*, 1705590; 'Revisiting the role of polysulfides in lithium–sulfur batteries'.
- [130] T. Tang, Y. Hou, *Small Methods* **2020**, *4*, 1900001; 'Chemical confinement and utility of lithium polysulfides in lithium sulfur batteries'.
- [131] M. Sheydaei, S. Talebi, M. Salami-Kalajahi, *Journal of Sulfur Chemistry* **2021**, *42*, 67-82; 'Synthesis of ethylene dichloride-based polysulfide polymers: investigation of polymerization yield and effect of sulfur content on solubility and flexibility'.
- [132] J. Wu, Z. Li, X. Yuan, P. Wang, Y. Liu, H. Wang, *Transactions of Tianjin University* **2011**, *17*, 111-117; 'Extraction and isolation of type I, III and V collagens and their SDS-PAGE analyses'.
- [133] F. Hagn, *Journal of Peptide Science* **2012**, *18*, 357-365; 'A structural view on spider silk proteins and their role in fiber assembly'.
- [134] O. Tokareva, V. A. Michalczechen-Lacerda, E. L. Rech, D. L. Kaplan, *Microbial biotechnology* **2013**, *6*, 651-663; 'Recombinant DNA production of spider silk proteins'.
- [135] Q. Hua, *Protein & cell* **2010**, *1*, 537-551; 'Insulin: a small protein with a long journey'.
- [136] J. Barciszewski, S. Maciej, T. Haertlé, *Journal of Protein Chemistry* **2000**, *19*, 249-254; 'Minireview: analysis of rape seed napin structure and potential roles of the storage protein'.
- [137] P. Liao, H. Liu, C. He, *Chemical Science* **2022**, *13*, 6322-6327; 'Chemical synthesis of human selenoprotein F and elucidation of its thiol-disulfide oxidoreductase activity'.
- [138] S. Soma, M. N. Morgada, M. T. Naik, A. Boulet, A. A. Roesler, N. Dziuba, A. Ghosh, Q. Yu, P. A. Lindahl, J. B. Ames, *Cell reports* **2019**, *29*, 4114-4126. e4115; 'COA6 is structurally tuned to function as a thiol-disulfide oxidoreductase in copper delivery to mitochondrial cytochrome c oxidase'.
- [139] C. V. Raman, *Nature* **1928**, *121*, 619-619; 'A change of wave-length in light scattering'.
- [140] P. Vandenabeele, *Practical Raman Spectroscopy An Introduction*, Wiley, **2013**.
- [141] V. Twersky, *Applied Optics* **1964**, *3*, 1150-1162; 'Rayleigh scattering'.
- [142] P. W. Atkins, J. De Paula, J. Keeler, *(No Title)* **2018**; 'Atkins' physical chemistry: quantum chemistry, spectroscopy, and statistical thermodynamics'.
- [143] D. A. Long, D. Long, *The Raman effect: a unified treatment of the theory of Raman scattering by molecules, Vol. 8*, Wiley Chichester, **2002**.
- [144] R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for chemical analysis*, John Wiley & Sons, **2005**.
- [145] J. Ralston, R. Chang, *Physical Review B* **1970**, *2*, 1858; 'Spontaneous-Raman-scattering efficiency and stimulated scattering in silicon'.
- [146] B. Schrader, *Infrared and Raman spectroscopy: methods and applications*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [147] T. Dieing, O. Hollricher, J. Toporski, *Confocal raman microscopy, Vol. 158*, Springer, **2011**.
- [148] N. J. Overall, *Analyst* **2010**, *135*, 2512-2522; 'Confocal Raman microscopy: common errors and artefacts'.
- [149] J.-X. Cheng, X. S. Xie, *Coherent Raman scattering microscopy*, CRC press, **2016**.
- [150] J. Bueno, L. Halánková, A. Rzhavskii, I. K. Lednev, *Analytical and bioanalytical chemistry* **2018**, *410*, 7295-7303; 'Raman microspectroscopic mapping as a tool for detection of gunshot residue on adhesive tape'.
- [151] A. Downes, A. Elfick, *Sensors* **2010**, *10*, 1871-1889; 'Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [152] G. Socrates, *Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [153] P. Bazylewski, R. Divigalpitiya, G. Fanchini, *RSC advances* **2017**, *7*, 2964-2970; 'In situ Raman spectroscopy distinguishes between reversible and irreversible thiol modifications in l-cysteine'.
- [154] K. Nakamura, S. Era, Y. Ozaki, M. Sogami, T. Hayashi, M. Murakami, *Febs Letters* **1997**, *417*, 375-378; 'Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy'.
- [155] H. E. Van Wart, A. Lewis, H. A. Scheraga, F. D. Saeva, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, *70*, 2619-2623; 'Disulfide bond dihedral angles from Raman spectroscopy'.
- [156] P. Larkin, *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*, Elsevier, **2017**.
- [157] A. der Europäischen Union, **2014**; 'Unionsrahmen für staatliche Beihilfen zur Förderung von Forschung, Entwicklung und Innovation (2014/C 198/01). 57. Jahrgang, Ausgabe 24.06. 2014'.
- [158] H. Xu, Y. Yang, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2014**, *2*, 1404-1410; 'Controlled de-cross-linking and disentanglement of feather keratin for fiber preparation via a novel process'.
- [159] H. Rajabinejad, M. Zoccola, A. Patrucco, A. Montarsolo, G. Rovero, C. Tonin, *Textile Research Journal* **2018**, *88*, 2415-2424; 'Physicochemical properties of keratin extracted from wool by various methods'.
- [160] F. Kurz, C. Hengst, U. Kulozik, *MethodsX* **2020**, *7*, 101112; 'RP-HPLC method for simultaneous quantification of free and total thiol groups in native and heat aggregated whey proteins'.
- [161] R. E. Hansen, H. Østergaard, P. Nørgaard, J. R. Winther, *Analytical biochemistry* **2007**, *363*, 77-82; 'Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4, 4'-dithiodipyridine'.
- [162] W. Akhtar, H. Edwards, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1997**, *53*, 81-90; 'Fourier-transform Raman spectroscopy of mammalian and avian keratotic biopolymers'.
- [163] S. Hsu, W. H. Moore, S. Krimm, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules* **1976**, *15*, 1513-1528; 'Vibrational spectrum of the unordered polypeptide chain: a Raman study of feather keratin'.
- [164] R. Dinu, N. Briand, A. Mija, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* **2021**, *9*, 15641-15652; 'Influence of keratin on epoxidized linseed Oil curing and thermoset performances'.
- [165] E.-M. Nuutinen, T. Virtanen, R. Lantto, M. Vähä-Nissi, A.-S. Jääskeläinen, *RSC advances* **2021**, *11*, 27512-27522; 'Ductile keratin films from deep eutectic solvent-fractionated feathers'.
- [166] T. H. Anderson, J. Yu, A. Estrada, M. U. Hammer, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Advanced functional materials* **2010**, *20*, 4196-4205; 'The contribution of DOPA to substrate-peptide adhesion and internal cohesion of mussel-inspired synthetic peptide films'.
- [167] D. T. Haynie, L. Zhang, J. S. Rudra, W. Zhao, Y. Zhong, N. Palath, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2895-2913; 'Polypeptide multilayer films'.
- [168] A. V. Souza, M. T. Mendes, S. T. Souza, L. C. Palermo, P. F. Oliveira, C. R. Mansur, *Energy & Fuels* **2017**, *31*, 10612-10619; 'Synthesis of additives based on polyethylenimine modified with non-ionic surfactants for application in phase separation of water-in-oil emulsions'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [169] S. I. Karakashev, N. A. Grozev, K. Batjargal, O. Guven, O. Ozdemir, F. Boylu, M. S. Çelik, *Coatings* **2020**, *10*, 612; 'Correlations for easy calculation of the critical coalescence concentration (CCC) of simple frothers'.
- [170] T. Deming, *Peptide Based Materials, Vol. 1*, Springer Verlag, **2012**.
- [171] B. Tieke, *Makromolekulare Chemie, Vol. 3*, Wiley-VCH, **2014**.
- [172] X. Li, R. Yu, Y. He, Y. Zhang, X. Yang, X. Zhao, W. Huang, *ACS Macro Letters* **2019**, *8*, 1511-1516; 'Self-healing polyurethane elastomers based on a disulfide bond by digital light processing 3D printing'.
- [173] Y. Xu, D. Chen, *Macromolecular Chemistry and Physics* **2016**, *217*, 1191-1196; 'A novel self-healing polyurethane based on disulfide bonds'.
- [174] L. Imbernon, E. Oikonomou, S. Norvez, L. Leibler, *Polymer Chemistry* **2015**, *6*, 4271-4278; 'Chemically crosslinked yet reprocessable epoxidized natural rubber via thermo-activated disulfide rearrangements'.
- [175] D. Wang, X.-H. Yang, R.-C. Tang, F. Yao, *Polymers* **2018**, *10*, 993; 'Extraction of keratin from rabbit hair by a deep eutectic solvent and its characterization'.
- [176] V. Signori, D. M. Lewis, in *Macromolecular Symposia, Vol. 119*, Wiley Online Library, **1997**, pp. 235-240.
- [177] H. Barani, A. Haji, *Journal of Molecular Structure* **2015**, *1079*, 35-40; 'Analysis of structural transformation in wool fiber resulting from oxygen plasma treatment using vibrational spectroscopy'.
- [178] Y. Tomita, M. Ishikawa, S. Takigami, *Transactions of the Materials Research Society of Japan* **2008**, *33*, 865-868; 'Effects of permanent waving and bleaching treatments on damage of human hair'.
- [179] D. B. Larsen, R. Sønderbæk-Jørgensen, J. Ø. Duus, A. E. Daugaard, *European Polymer Journal* **2018**, *102*, 1-8; 'Investigation of curing rates of bio-based thiol-ene films from diallyl 2, 5-furandicarboxylate'.
- [180] V. Hobiger, A. Zahoranova, S. Baudis, R. Liska, P. Krajnc, *Macromolecules* **2021**, *54*, 10370-10380; 'Thiol-Ene Cross-linking of Poly (ethylene glycol) within high internal phase emulsions: Degradable hydrophilic PolyHIPEs for controlled drug release'.
- [181] P. Wessig, M. Gerngroß, D. Freyse, P. Bruhns, M. Przewdzia, U. Schilde, A. Kelling, *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, *81*, 1125-1136; 'Molecular rods based on oligo-spiro-thioketals'.
- [182] Y. Y. Dayagi, L. Dayan, M. Shalom, 2007, Sensitive and selective method and device for the detection of trace amounts of a substance, United States, M.S. Tech Ltd., Ness-Ziona (IL)
- [183] C.-Y. Choi, *Masterarbeit* **2020**, *M.Sc.*; 'Synthese und Untersuchung thiolhaltiger Polymere mit hoher Sauerstoffpermeabilität'.
- [184] M. A. Hood, B. Wang, J. M. Sands, J. J. La Scala, F. L. Beyer, C. Y. Li, *Polymer* **2010**, *51*, 2191-2198; 'Morphology control of segmented polyurethanes by crystallization of hard and soft segments'.
- [185] T. Weiming; 'Segmented polyurethane elastomers with liquid crystalline hard segments'.
- [186] L. Li, X. Chen, J. M. Torkelson, *ACS Applied Polymer Materials* **2020**, *2*, 4658-4665; 'Covalent adaptive networks for enhanced adhesion: Exploiting disulfide dynamic chemistry and annealing during application'.
- [187] S. Sun, T. Wu, *Journal of Polymer Science* **2022**, *60*, 2582-2590; 'Preparation and properties of self-healable solid-state polymer electrolytes based on covalent adaptive networks enabled by disulfide bond'.

## IX. Literaturverzeichnis

- [188] B. Krishnakumar, R. P. Sanka, W. H. Binder, V. Parthasarthy, S. Rana, N. Karak, *Chemical Engineering Journal* **2020**, *385*, 123820; 'Vitrimers: Associative dynamic covalent adaptive networks in thermoset polymers'.
- [189] J. Canadell, H. Goossens, B. Klumperman, *Macromolecules* **2011**, *44*, 2536-2541; 'Self-healing materials based on disulfide links'.
- [190] Y. Amamoto, H. Otsuka, A. Takahara, K. Matyjaszewski, *Advanced Materials* **2012**, *24*, 3975-3980; 'Self-healing of covalently cross-linked polymers by reshuffling thiuram disulfide moieties in air under visible light'.
- [191] U. Lafont, H. Van Zeijl, S. Van Der Zwaag, *ACS applied materials & interfaces* **2012**, *4*, 6280-6288; 'Influence of cross-linkers on the cohesive and adhesive self-healing ability of polysulfide-based thermosets'.
- [192] M. Koritzinsky, F. Levitin, T. van den Beucken, R. A. Rumantir, N. J. Harding, K. C. Chu, P. C. Boutros, I. Braakman, B. G. Wouters, *Journal of Cell Biology* **2013**, *203*, 615-627; 'Two phases of disulfide bond formation have differing requirements for oxygen'.
- [193] T. J. Bechtel, E. Weerapana, *Proteomics* **2017**, *17*, 1600391; 'From structure to redox: The diverse functional roles of disulfides and implications in disease'.
- [194] M. J. O'Neill, J. Cornella, *Chimia* **2018**, *72*, 601-601; 'A Perspective in Catalysis: Development of Efficient Methods in the Age of Sustainability'.
- [195] M. E. Jung, G. Piizzi, *Chemical reviews* **2005**, *105*, 1735-1766; 'gem-Disubstituent effect: theoretical basis and synthetic applications'.
- [196] R. M. Beesley, C. K. Ingold, J. F. Thorpe, *Journal of the Chemical Society, Transactions* **1915**, *107*, 1080-1106; 'CXIX.—The formation and stability of spiro-compounds. Part I. spiro-Compounds from cyclo hexane'.
- [197] Y. Liu, M. J. Van Steenberg, Z. Zhong, S. Oliveira, W. E. Hennink, C. F. Van Nostrum, *Macromolecules* **2020**, *53*, 7009-7024; 'Dithiolane-Crosslinked Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-Based Micelles: Impact of Monomer Sequence, Nature of Monomer, and Reducing Agent on the Dynamic Crosslinking Properties'.
- [198] P. J. C. Benevides, M. C. M. Young, A. M. Giesbrecht, N. d. F. Roque, V. da S Bolzani, *Phytochemistry* **2001**, *57*, 743-747; 'Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L'.
- [199] E. Walton, A. F. Wagner, F. W. Bachelor, L. H. Peterson, F. W. Holly, K. Folkers, *Journal of the American Chemical Society* **1955**, *77*, 5144-5149; 'Synthesis of (+)- $\alpha$ -lipoic acid and its optical antipode<sup>1</sup>'.
- [200] A. Kisanuki, Y. Kimpara, Y. Oikado, N. Kado, M. Matsumoto, K. Endo, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2010**, *48*, 5247-5253; 'Ring-opening polymerization of lipoic acid and characterization of the polymer'.
- [201] E. Quaranta, M. Aresta, *Carbon dioxide as chemical feedstock* **2010**; 'The chemistry of N-CO 2 bonds: synthesis of carbamic acids and their derivatives, isocyanates, and ureas'.
- [202] K. Sasaki, D. Crich, *Organic letters* **2011**, *13*, 2256-2259; 'Facile amide bond formation from carboxylic acids and isocyanates'.

## X. Anhang

### Zusatz zu Kapitel V.3



Abbildung A.3-1: Einfluss von Glycerin auf die Filmbildungseigenschaften un behandelter KHPs. Vergleich zwischen KHP-Filmen unterschiedlicher Glycerin-Konzentrationen: A) kein Glycerin. B) mit 5 % (w/w) Glycerin. C) 10 % (w/w) Glycerin.

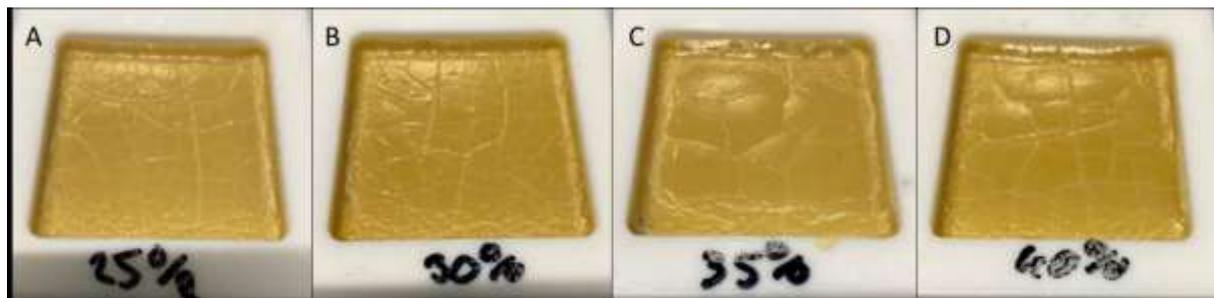


Abbildung A.3-2: Einfluss hoher Anteile Texanol auf die Filmbildungseigenschaften un behandelter KHPs. A) 25 % (w/w) Texanol. B) 30 % (w/w) Texanol. C) 35 % (w/w) Texanol. D) 40 % (w/w) Texanol. Alle Filme zeigen starke Schuppenbildung. Die Fotos wurden von Filmen in 4 cm x 4 cm Teflonformen aufgenommen.

### Zusatz zu Kapitel V.5

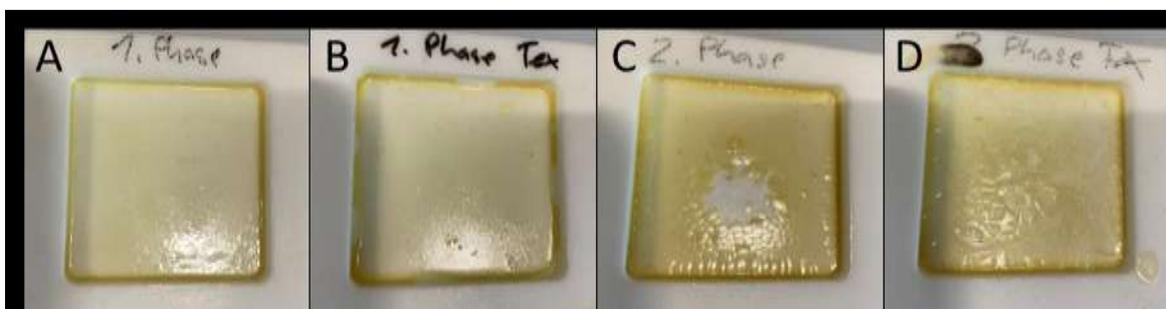


Abbildung A.5-1: Fotos der 1. Phase MeOH-KHP ohne (A) und mit 50 % (w/w) Texanol (B). Die 2. Phase MeOH-KHP ohne (C) und mit 50 % (w/w) Texanol (D) sind ebenfalls abgebildet. Die Fotos wurden von Filmen in 4 cm x 4 cm Teflonformen aufgenommen.

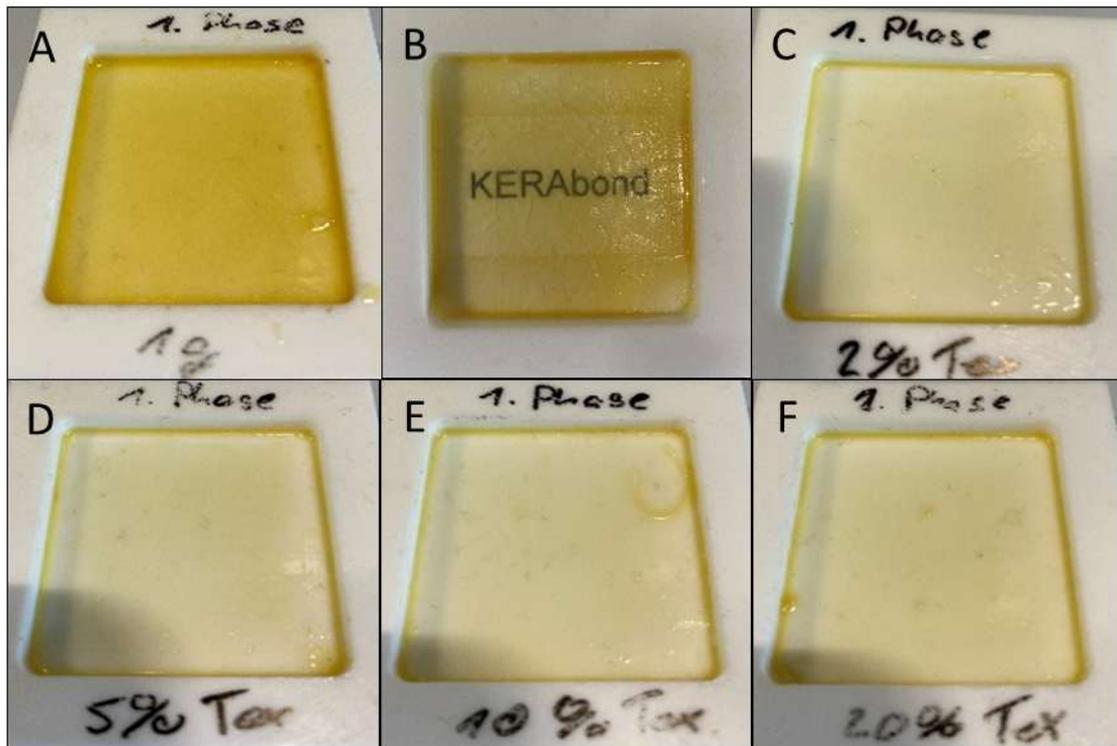


Abbildung A.5-2: A) MeOH-KHP-Film vierfacher Masse/ Dicke B) MeOH-Film über einem „KERAbond“-Label C) MeOH-KHP-Film mit 2 % Texanol D) MeOH-KHP-Film mit 5 % Texanol E) MeOH-KHP-Film mit 10 % Texanol F) ) MeOH-KHP-Film mit 20 % Texanol. Die Fotos wurden von Filmen in 4 cm x 4 cm Teflonformen aufgenommen.

Zusatz zu Kapitel V.10



Abbildung A.10-1: Fotos der DT-PU. A) PU-A, B) PU-B, C) PU-C, D) PU-D. Fotos aufgenommen von C. Choi.<sup>[183]</sup>

## X. Anhang



Abbildung A.10-2: Fotos der DT-En-PU. A) PU-E, B) PU-F, C) PU-G, D) PU-H, E) PU-I. Fotos aufgenommen von C. Choi.<sup>[183]</sup>

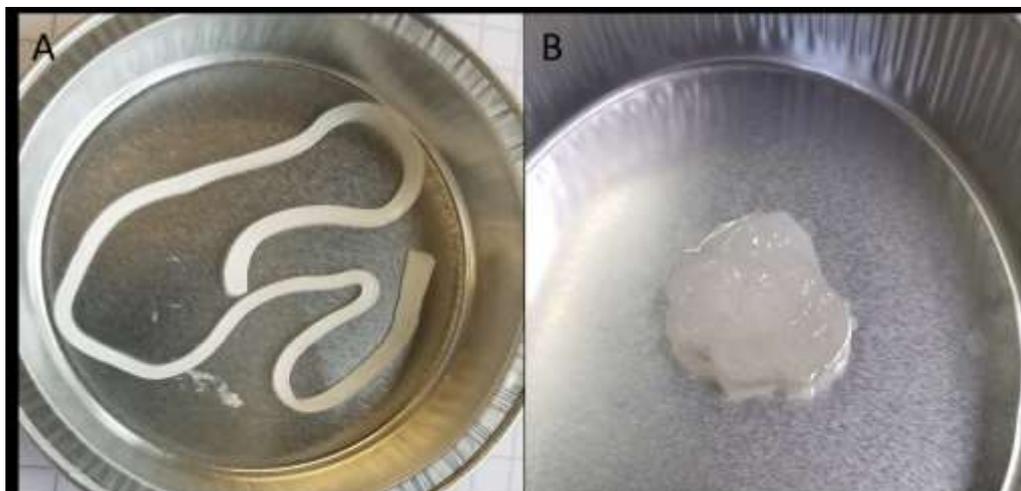


Abbildung A.10-3: Fotos durch Hitzeeinwirkung vergellter DT-PU. A) PU-C in Form eines vergellten Polymerfadens, B) PU-C in Form eines formstabilen Polymerklumpens. Fotos aufgenommen von C. Choi.<sup>[183]</sup>



Abbildung A.10-4: A) PU-C nach Hitzevergelung gequellt in THF. B) PU-C nach Hitzevergelung und Quellen in THF mit Zugabe von  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ -Lösung – die Sulfitolyse führt zu einer partiellen Auflösung des PUs. C) Wärmebehandeltes PU-B ohne Zusatz von BHT – starke Vergelung kann beobachtet werden. D)

## X. Anhang

Wärmebehandeltes PU-B mit 10 ppm BHT - wenig bis keine Vergelung wird beobachtet. Fotos  
Aufgenommen von C. Choi.<sup>[183]</sup>

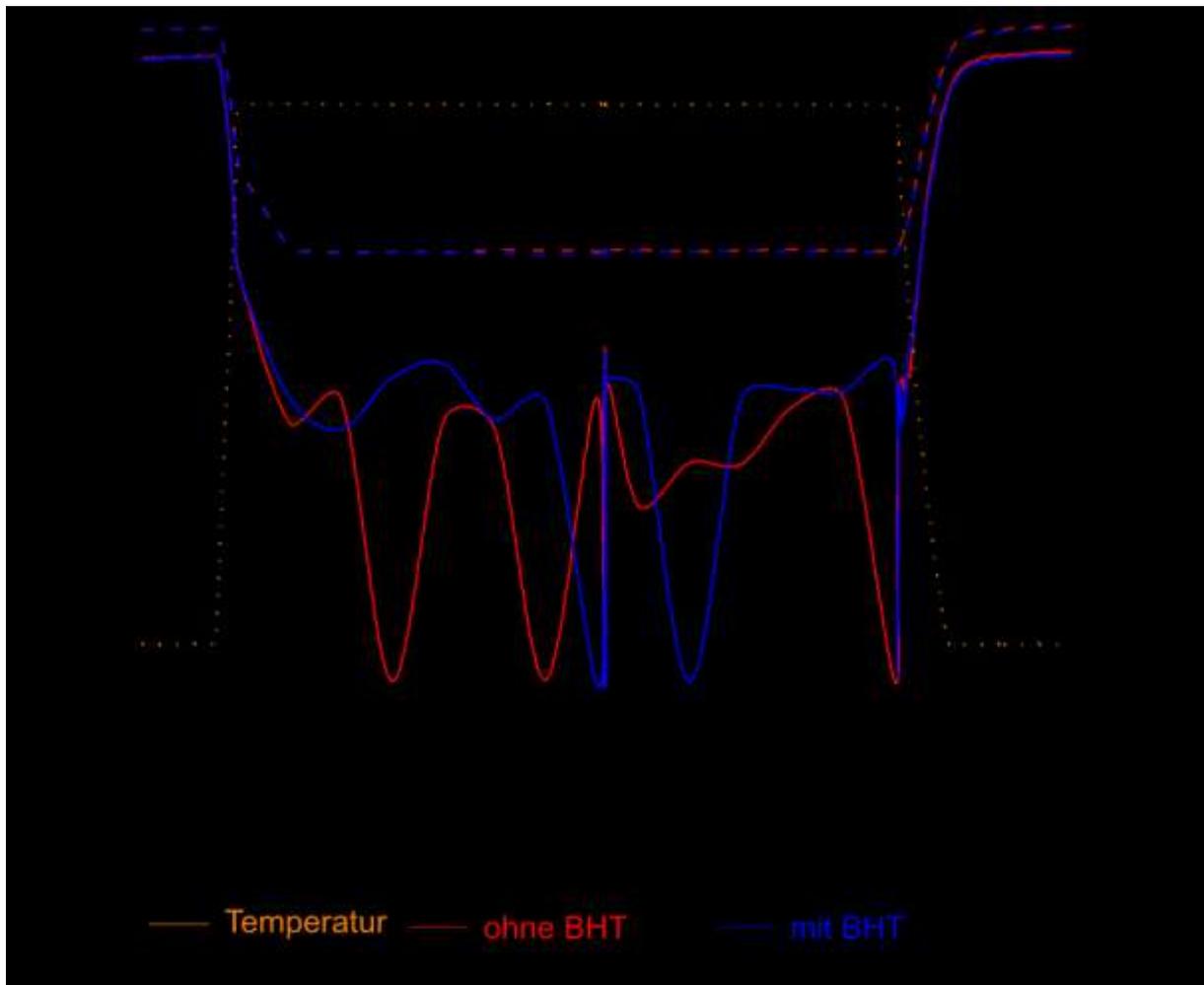


Abbildung A.10-5: Abbildung V.10-2 erweitert um die Kurven der Speichermodule.

## X. Anhang

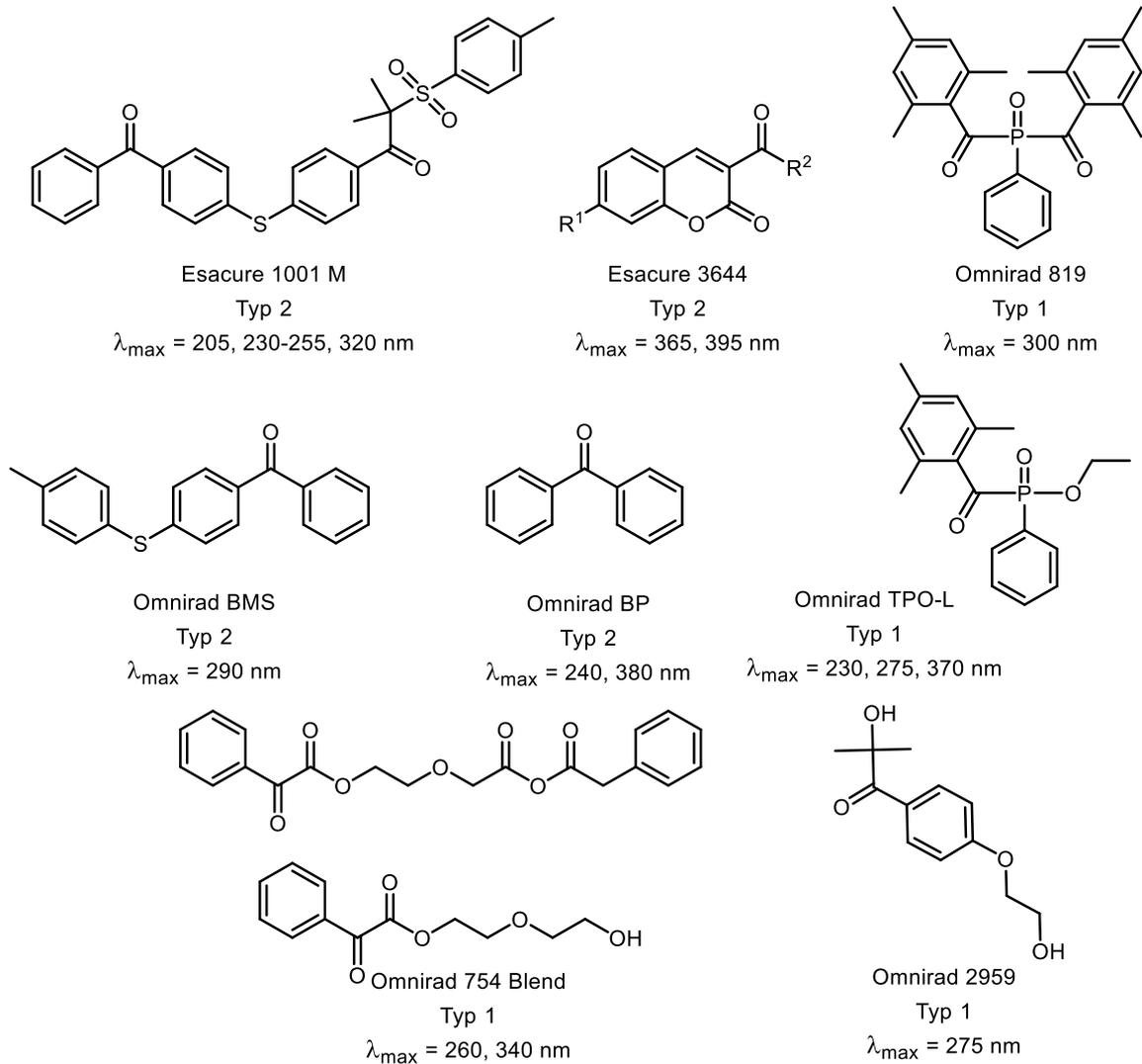


Abbildung A.10-6: Strukturen der untersuchten Photoinitiatoren mit Angabe der Absorptionsmaxima in Nanometern. Abbildung übernommen mit freundlicher Genehmigung von C.Choi.<sup>[183]</sup>

## X. Anhang

Tabelle A.10-1: Kompatibilität der PU-Systeme aus Kapitel IV.11 mit verschiedenen Photoinitiatoren. „XX“ bedeutet mangelnde Mischbarkeit, „X“ steht für Mischbarkeit ohne erkennbare Materialveränderung nach 60 s Bestrahlung in einer LED-Strahlenkammer, „-“ bedeutet Mischbarkeit und geringfügige Veränderung nach Bestrahlung, „+“ zeigt eine Mischbarkeit, sowie vielversprechende Materialveränderungen nach 60 s Bestrahlung an. Für die Zusammensetzung der PU-Systeme siehe Tabelle IV.11-2. Der für die reologischen Messungen verwendeten Initiator ist durch Einrahmung gekennzeichnet.

Initiator	PU-S1	PU-S2	PU-S3	PU-S4	PU-S5
Omnirad TPO-L	-	X	X	-	+
Omnirad BP	+	+	X	+	+
Omnirad 819	XX	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Esacure 1001 M	-	X	-	X	n.b.
Omnirad 2959	XX	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Esacure 3644	XX	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Omnirad BMS	XX	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Omnirad 754	XX	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Ohne Initiator	X	XX	XX	XX	n.b.



Abbildung A.10-7: A) PU-S2 mit Omnirad BP als Photoinitiator nach Bestrahlung bei 365 nm für 60 s in der LED-Kammer. Nur geringfügige Vergelung beobachtet. B) PU-S3 mit Esacure 1001 M als Photoinitiator nach Bestrahlung bei 365 nm für 60 s in der LED-Kammer. Stärkere Vergelung beobachtet. C) PU-S5 mit Omnirad BP als Photoinitiator nach Bestrahlung bei 365 nm für 60 s in der LED-Kammer. Starke Vergelung beobachtet. Fotos aufgenommen von C. Choi.<sup>[183]</sup>

### X.1 Spektrenanhang

Nachfolgend sind sämtliche in dieser Arbeit im Ergebnis- oder Experimententeil dargestellten, bzw. diskutierten Spektren in Gänze abgebildet.

**Spektren aus Kapitel V.2:**

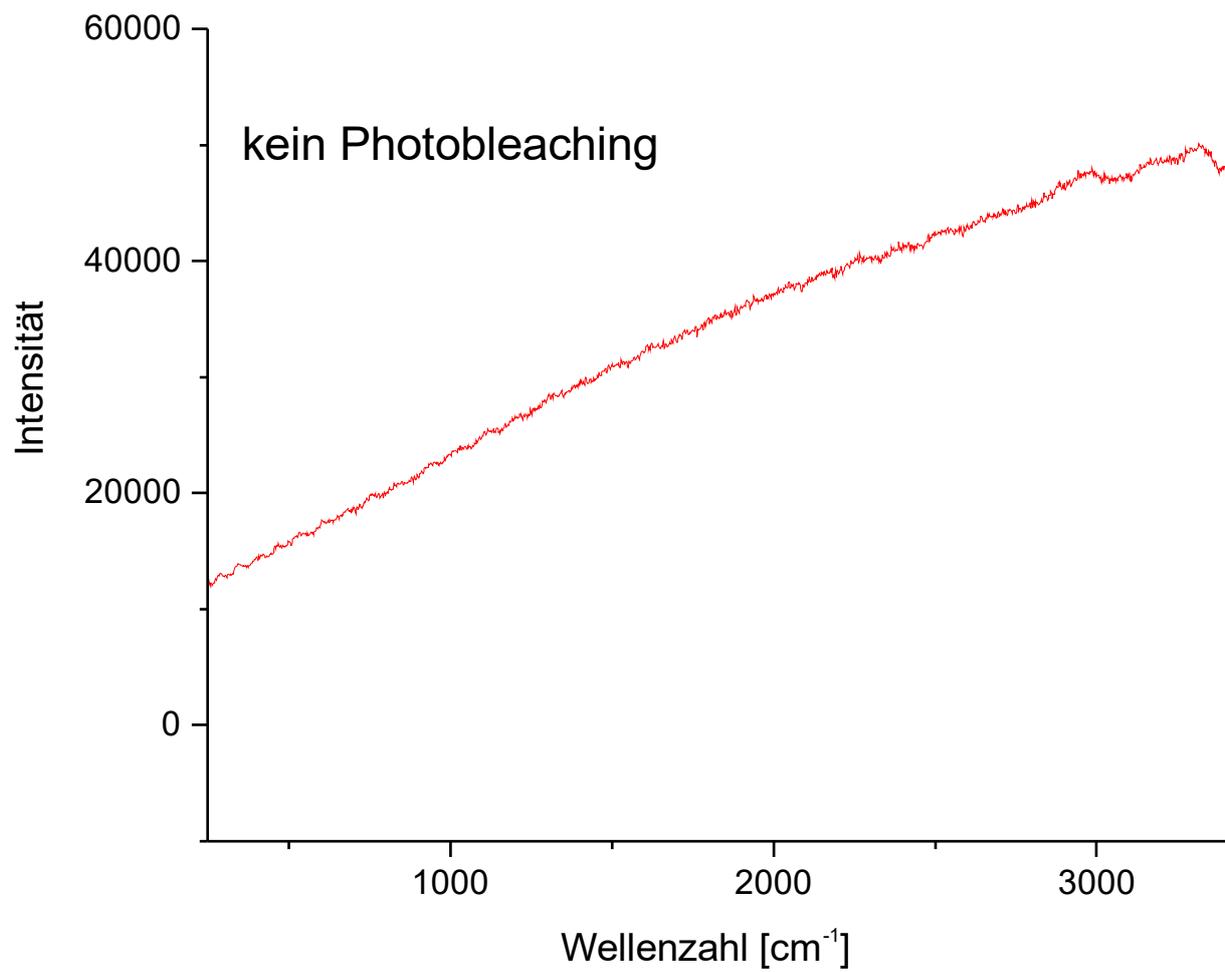


Abbildung X.1-1: Raman-Spektrum von KHPs ohne vorheriges Photobleaching.

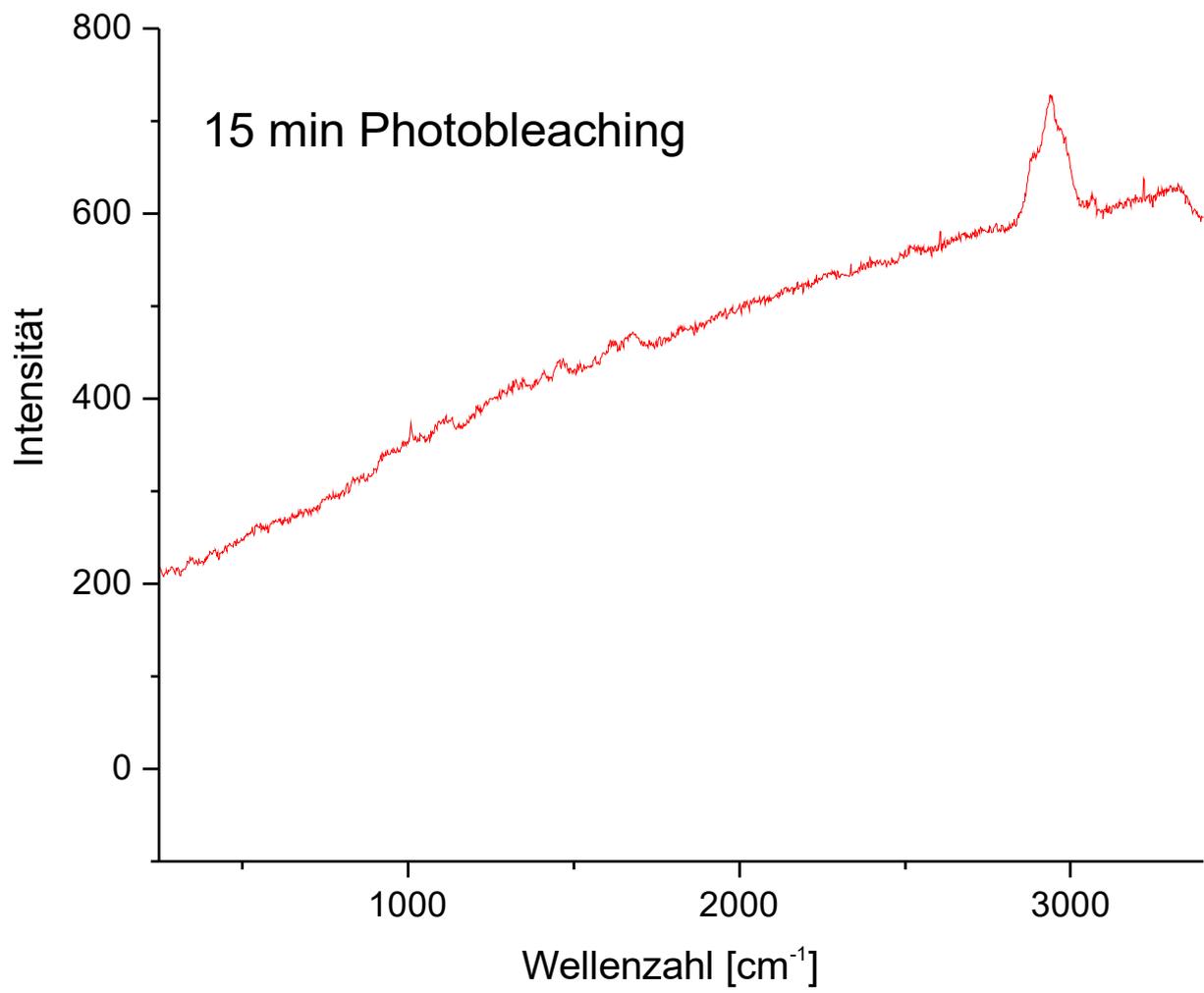


Abbildung X.1-2: Raman-Spektrum von KHPs mit vorherigem 15-minütigem Photobleaching.

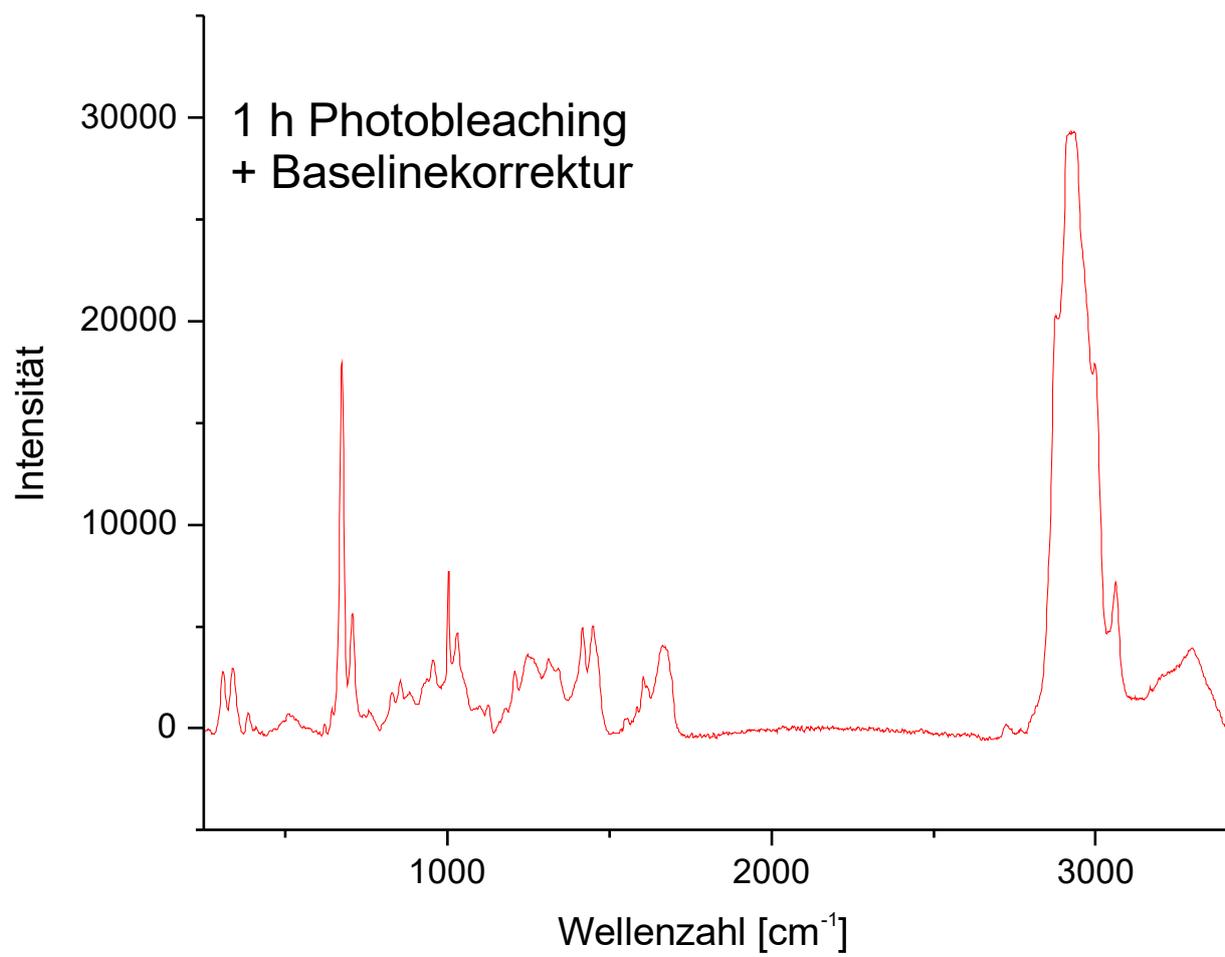


Abbildung X.1-3: Raman-Spektrum von KHPs mit vorherigem 60-minütigem Photobleaching.

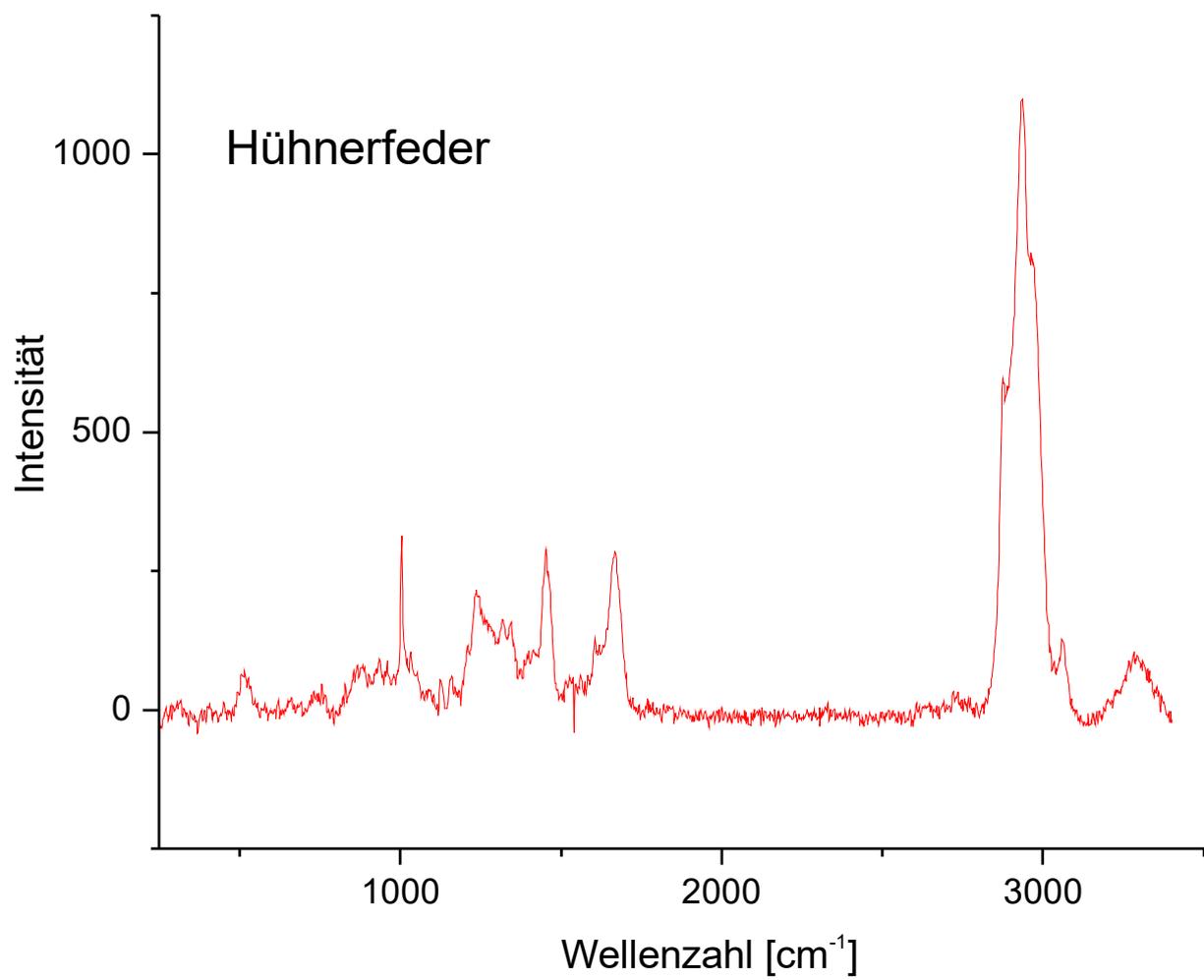


Abbildung X.1-4: Raman-Spektrum einer Hühnerfeder.

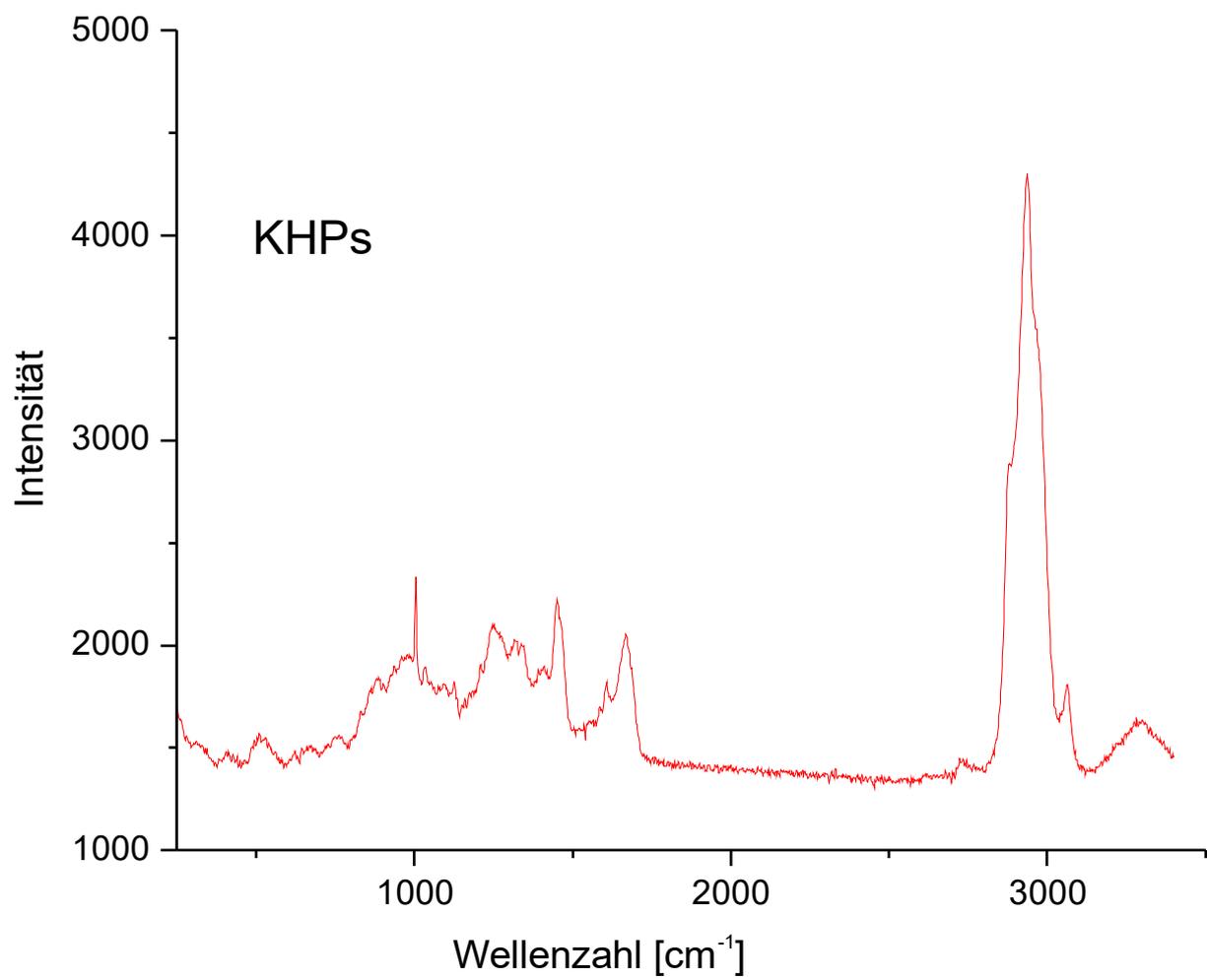


Abbildung X.1-5: Raman-Spektrum von KHPs.

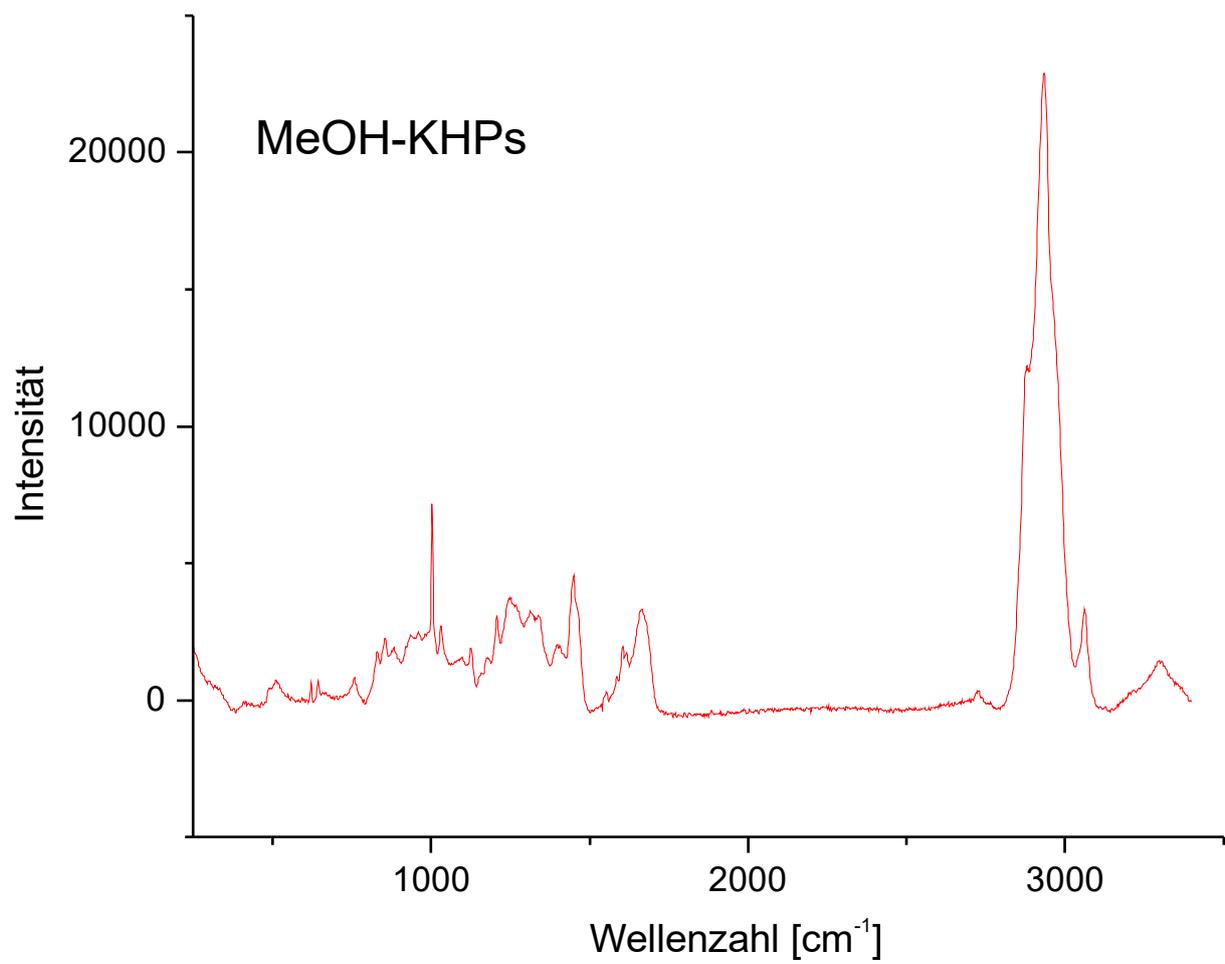


Abbildung X.1-6: Raman-Spektrum von MeOH-KHPs.

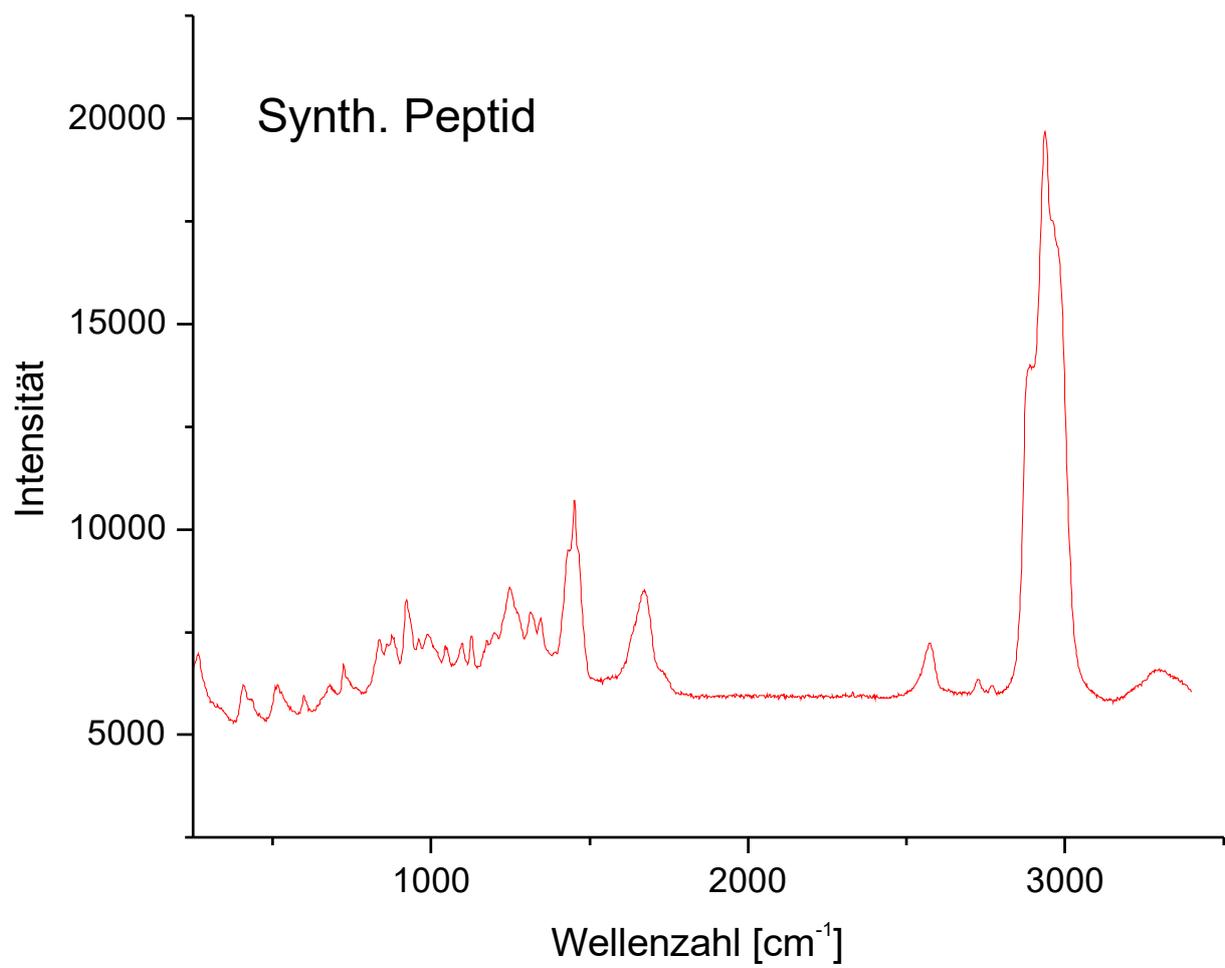


Abbildung X.1-7: Raman-Spektrum des synth. KHP.

**Spektren aus Kapitel V.3:**

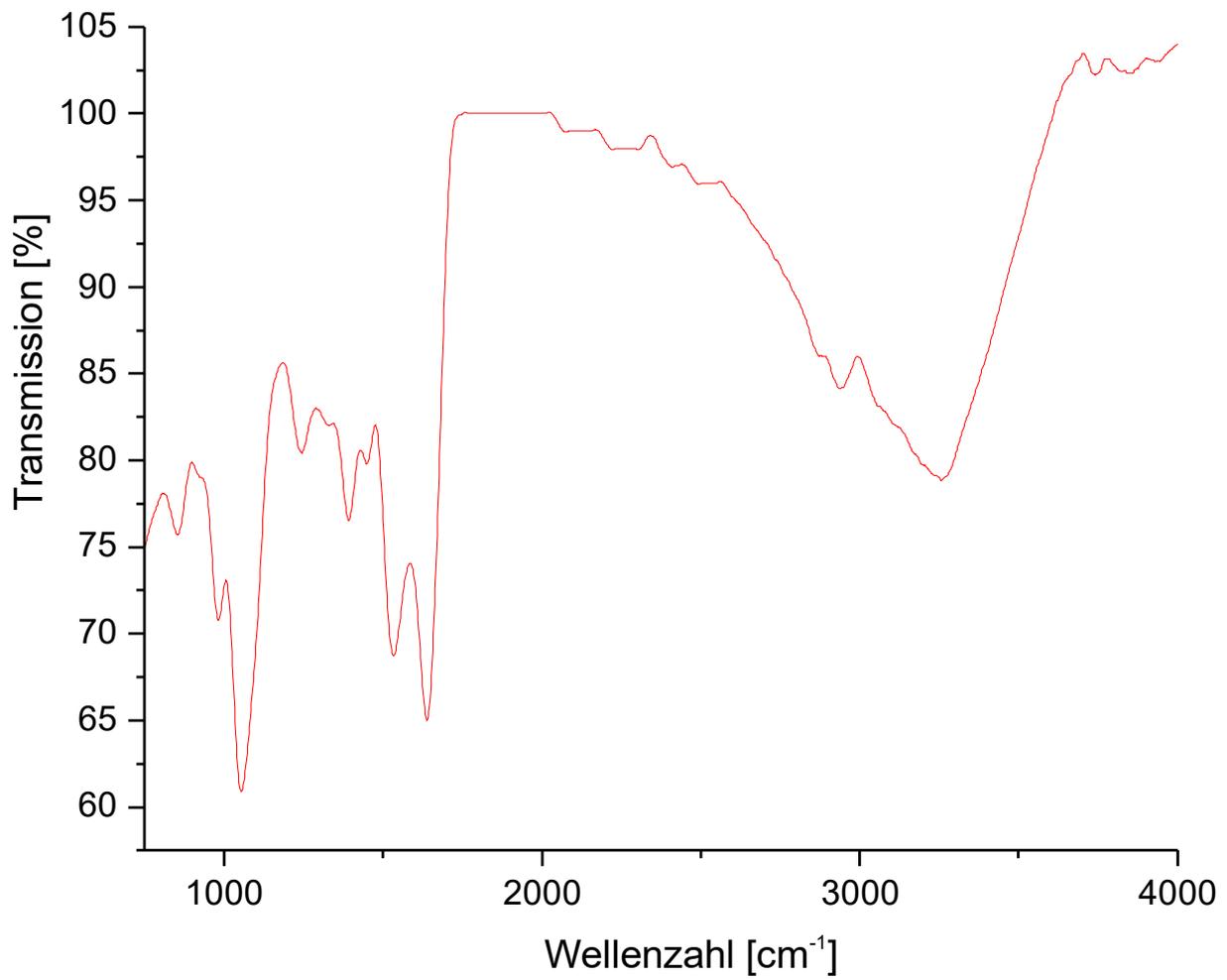


Abbildung X.1-8: IR-Spektrum eines KHP-Films mit 10 % (w/w) Glycerin.

**Spektren aus Kapitel V.4:**

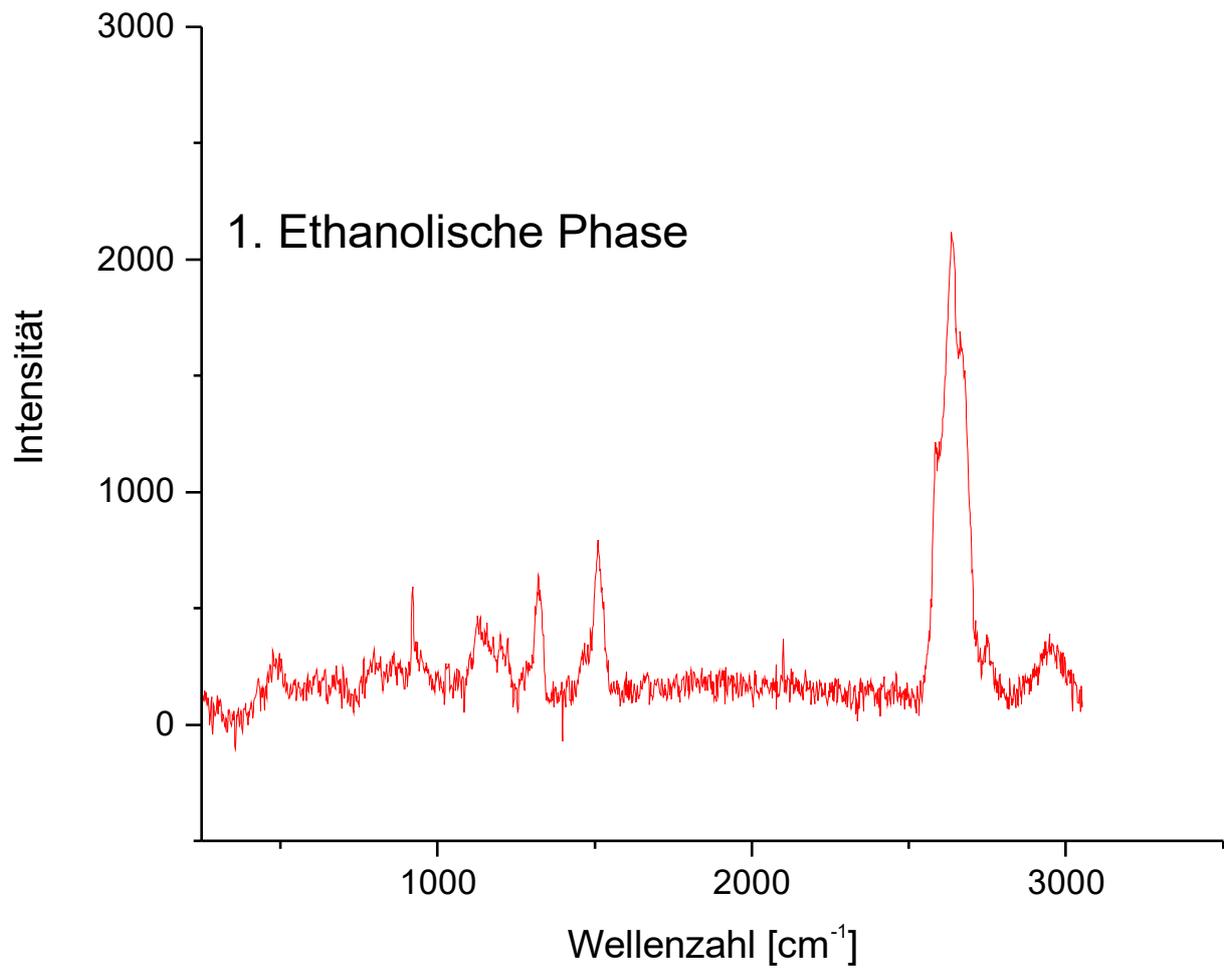


Abbildung X.1-9: Raman-Spektrum von KHPs nach ethanolischer Extraktion.

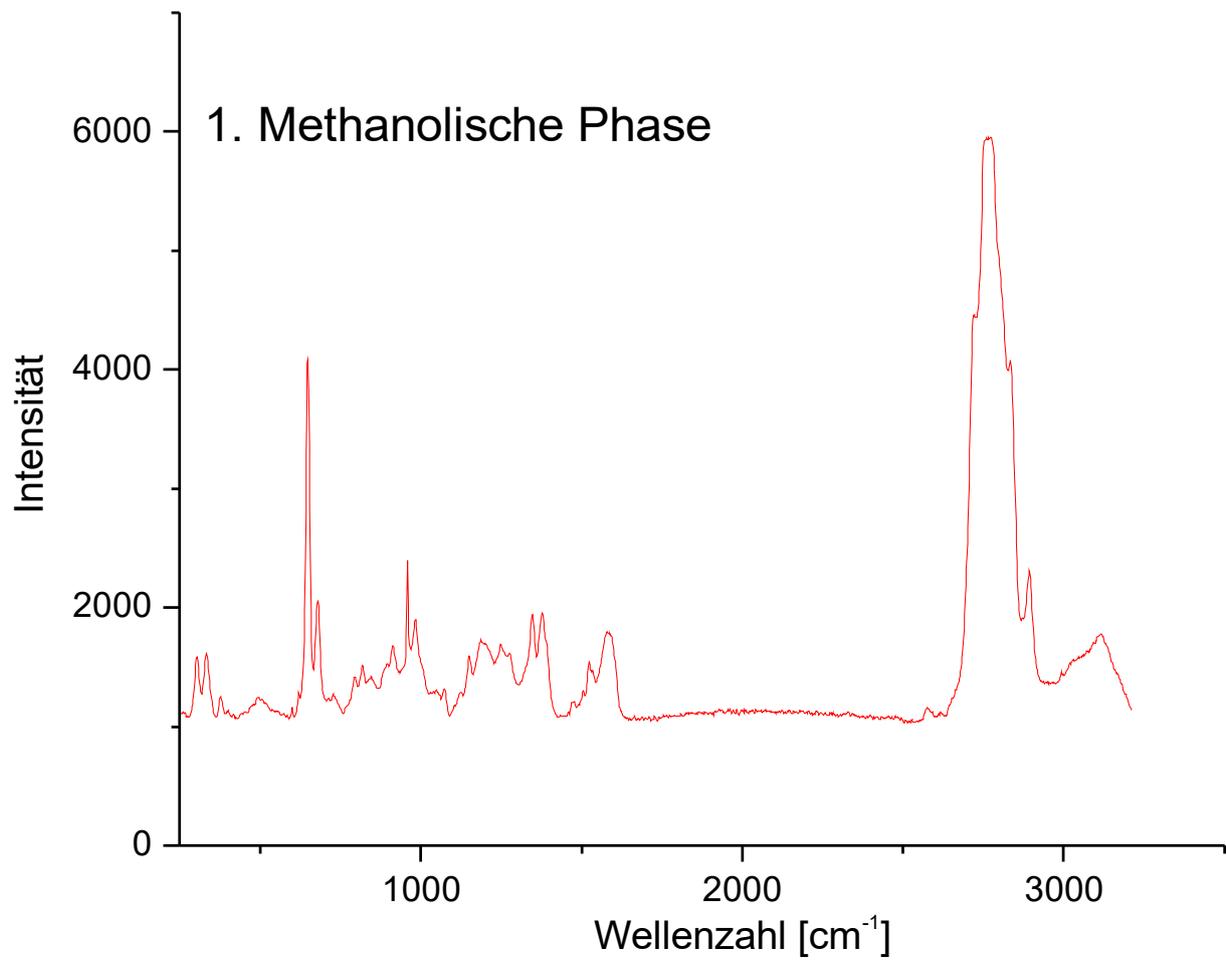


Abbildung X.1-10: Raman-Spektrum von KHPs nach methanolischer Extraktion (1. Phase).

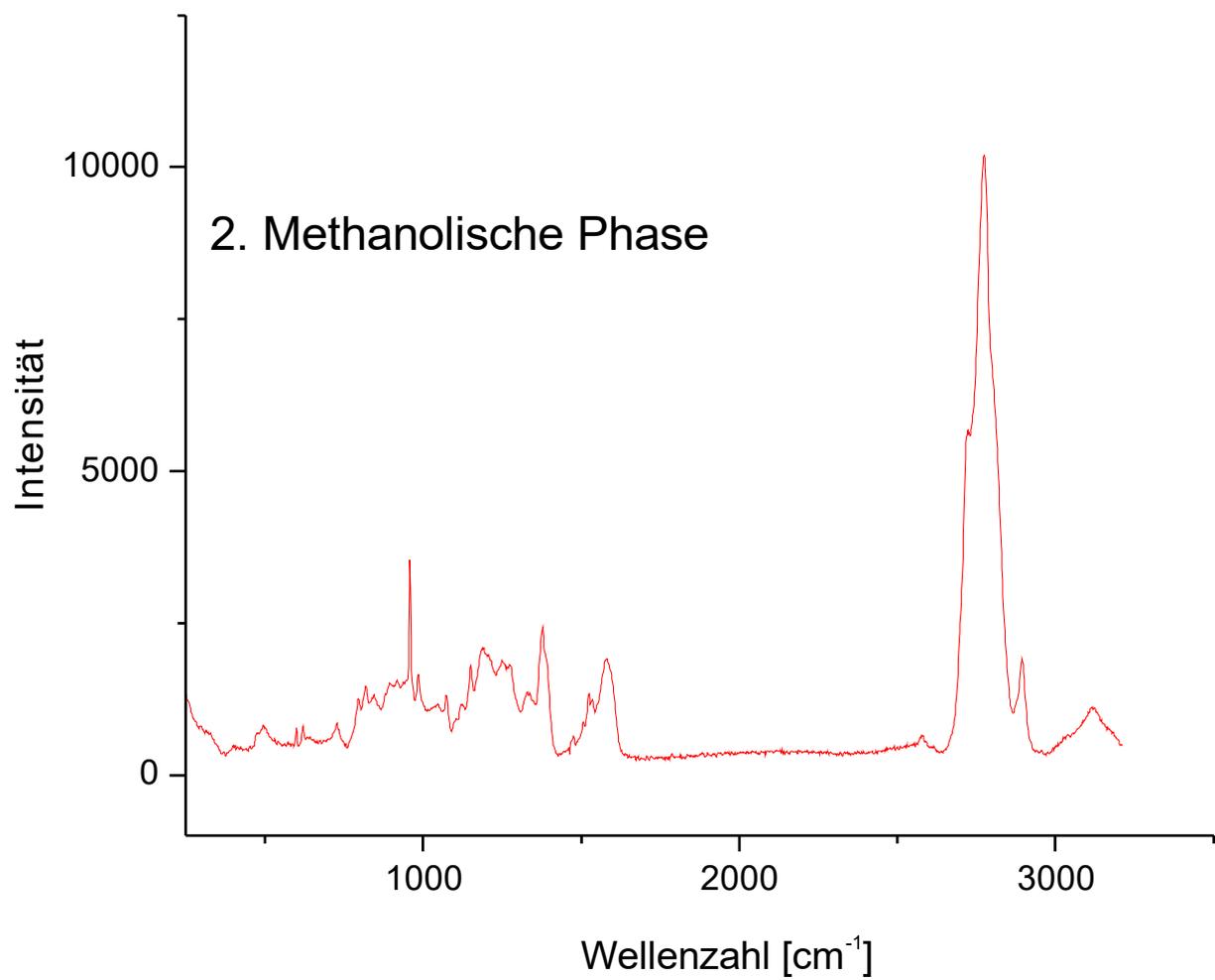


Abbildung X.1-11: Raman-Spektrum von KHPs nach methanolischer Extraktion (2. Phase).

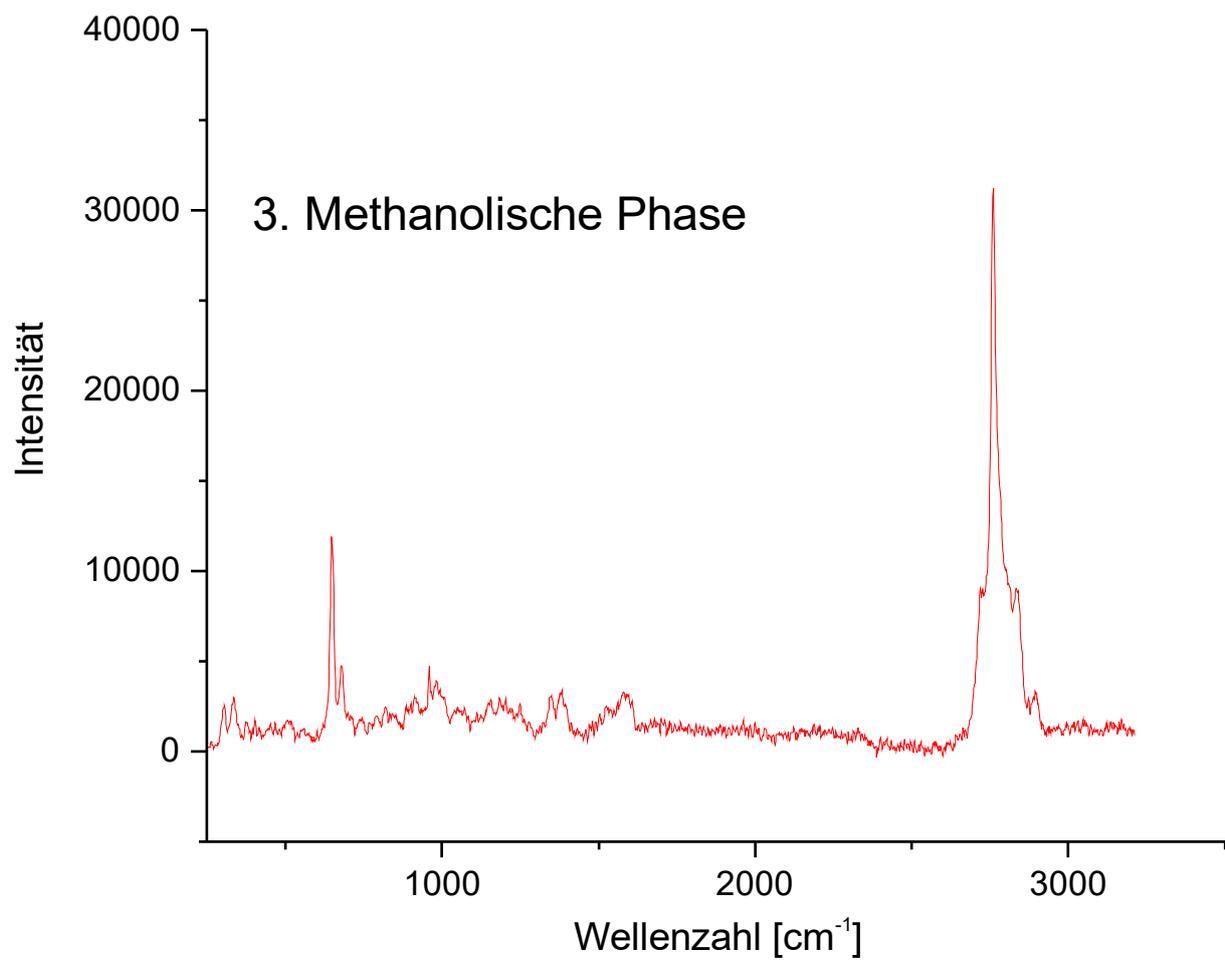


Abbildung X.1-12: Raman-Spektrum von KHPs nach methanolischer Extraktion (3. Phase).

**Spektren aus Kapitel V.6:**

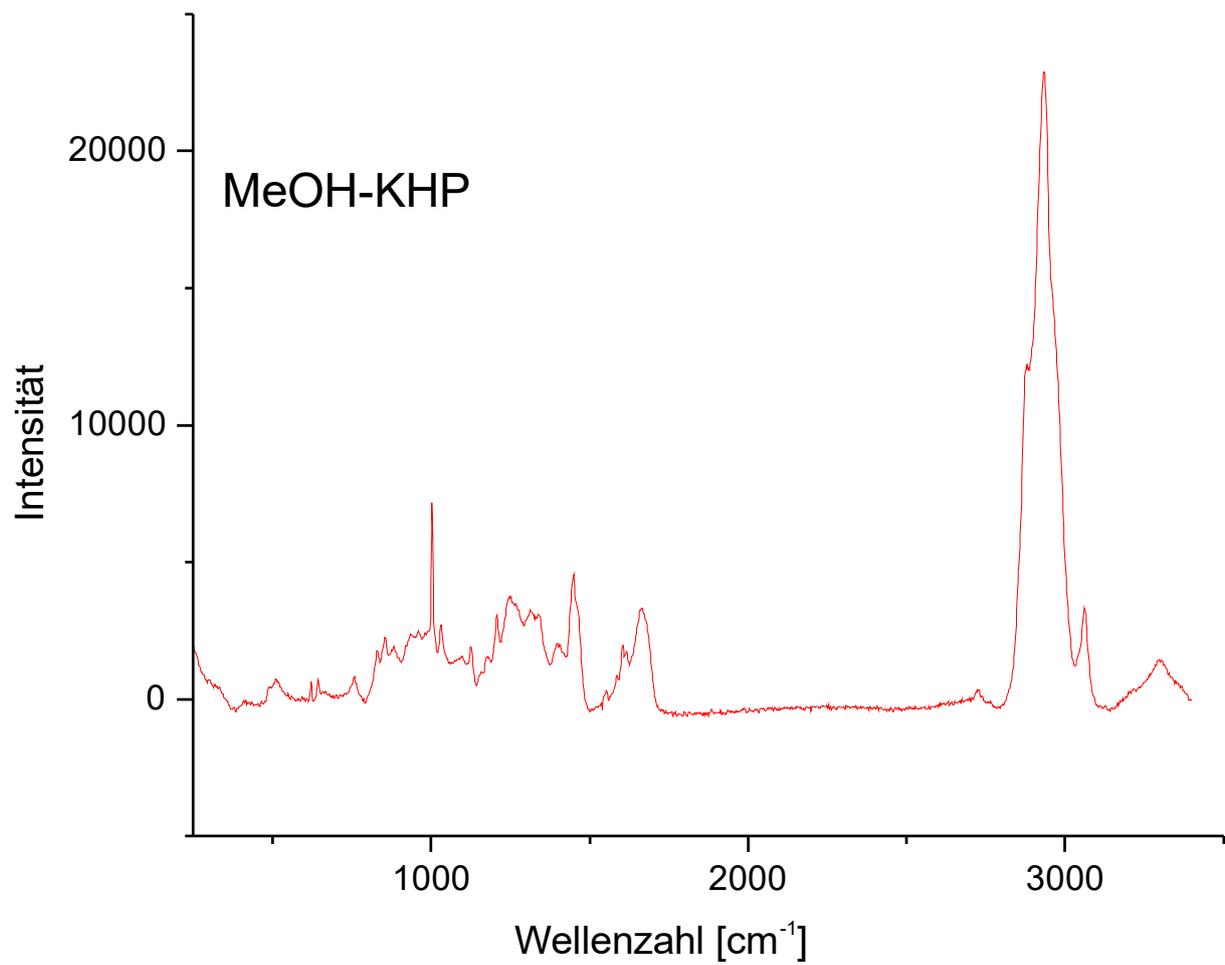


Abbildung X.1-13: Raman-Spektrum von MeOH-KHPs ohne Reduktion.

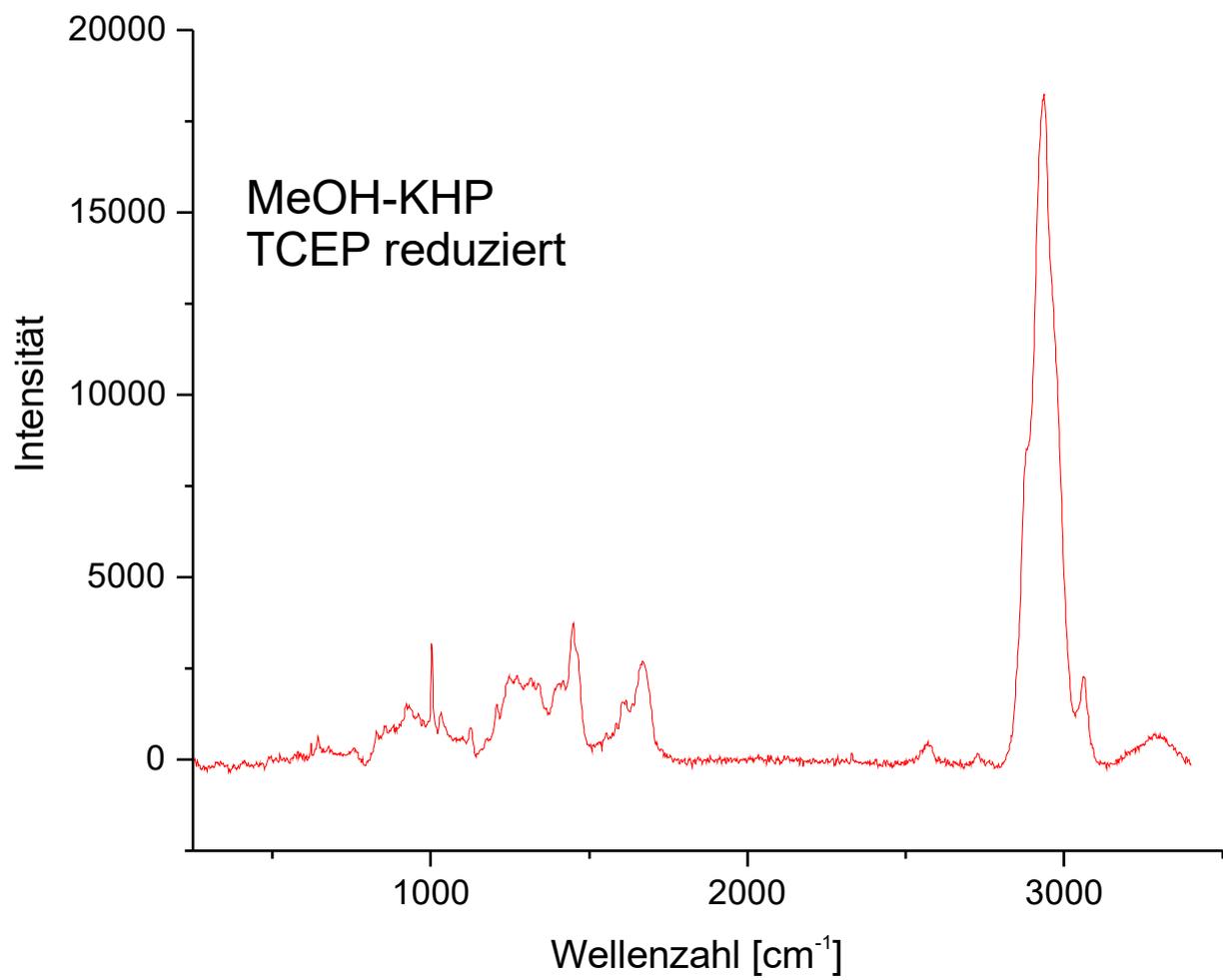


Abbildung X.1-14: Raman-Spektrum von MeOH-KHPs nach Reduktion mittels TCEP.

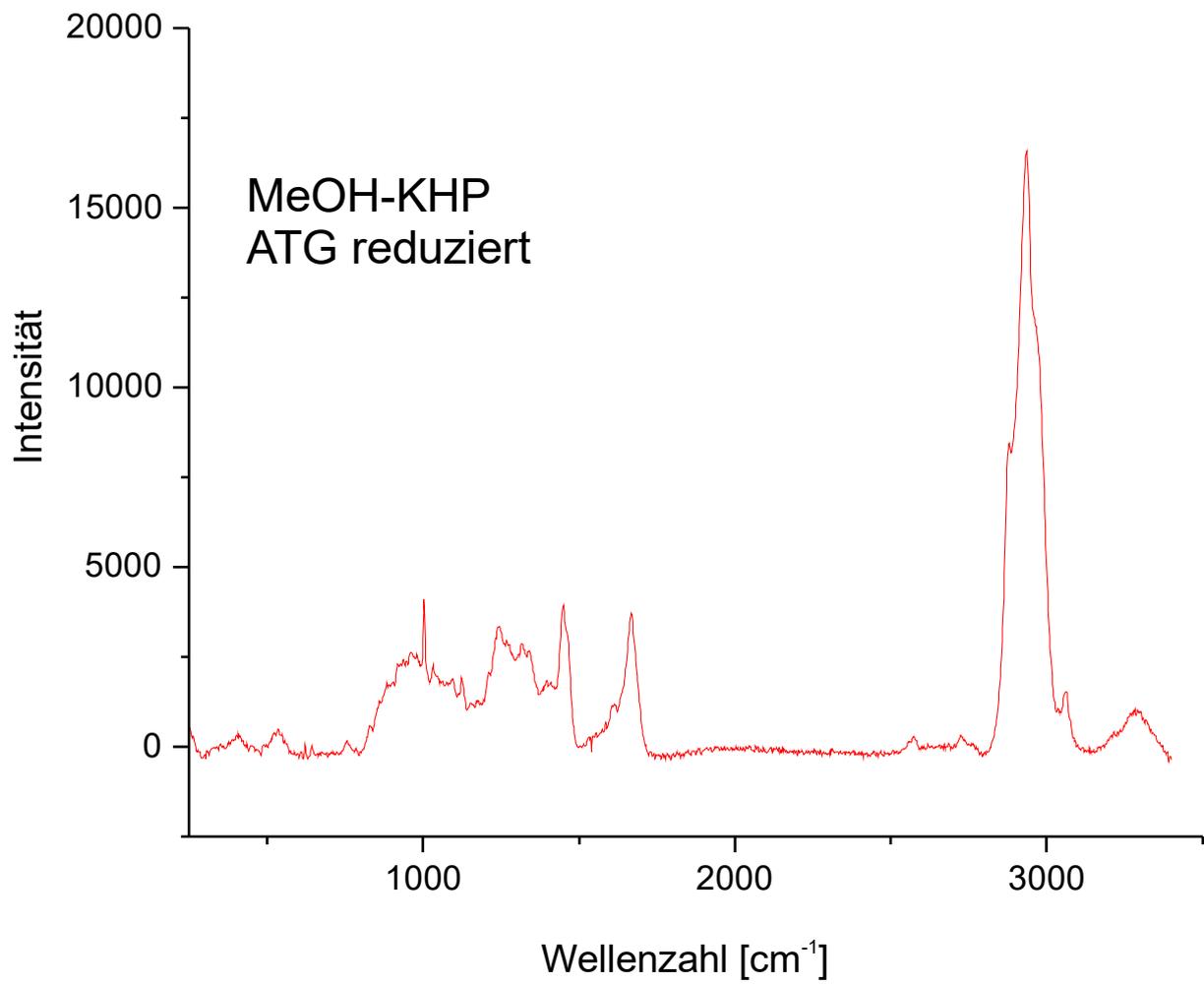


Abbildung X.1-15: Raman-Spektrum von MeOH-KHPs nach Reduktion mittels Ammoniumthioglycolat.

**Spektren aus Kapitel V.7:**

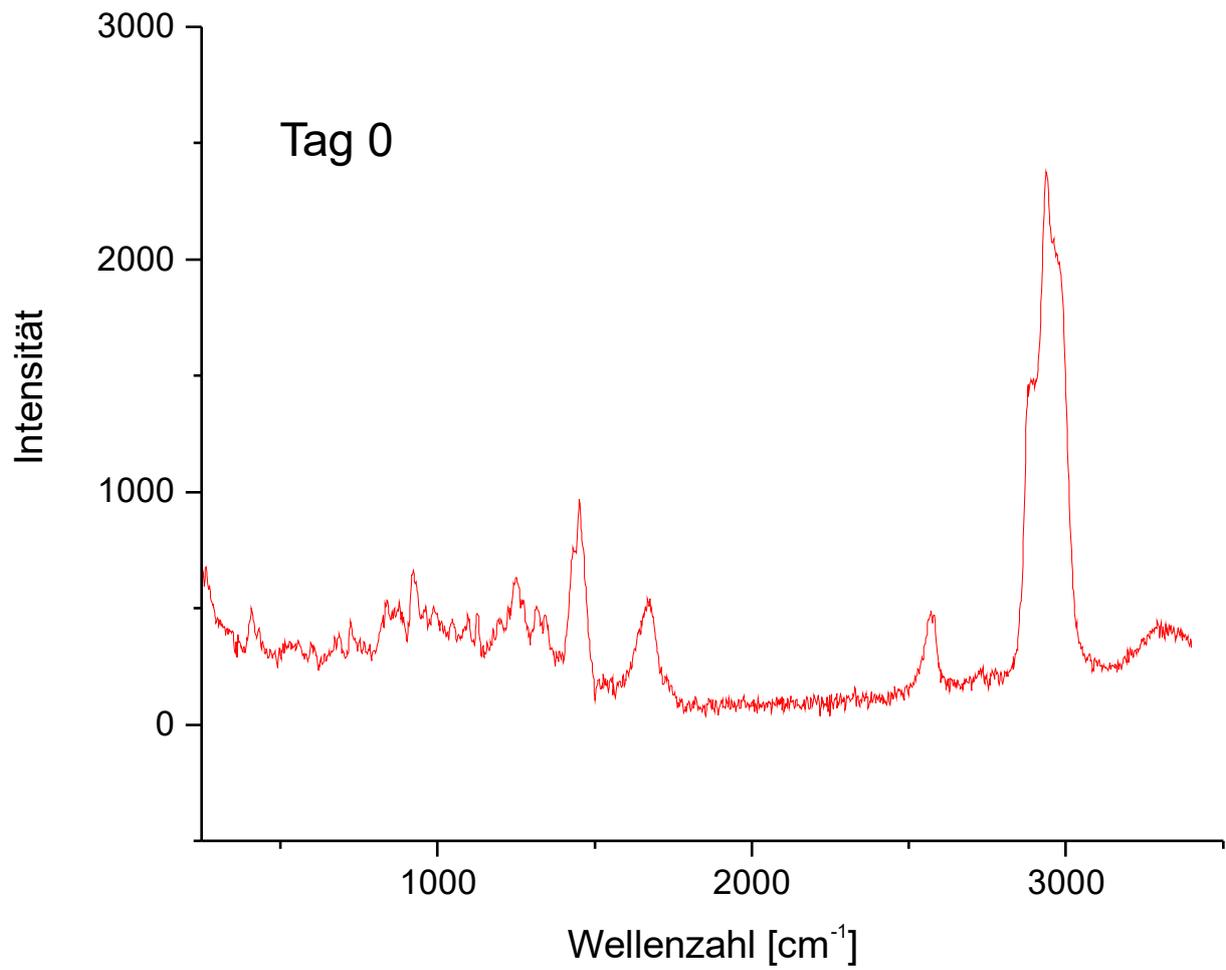


Abbildung X.1-16: Raman-Spektrum des synth. KHPs nach Sauerstoffexposition (0 Tage).

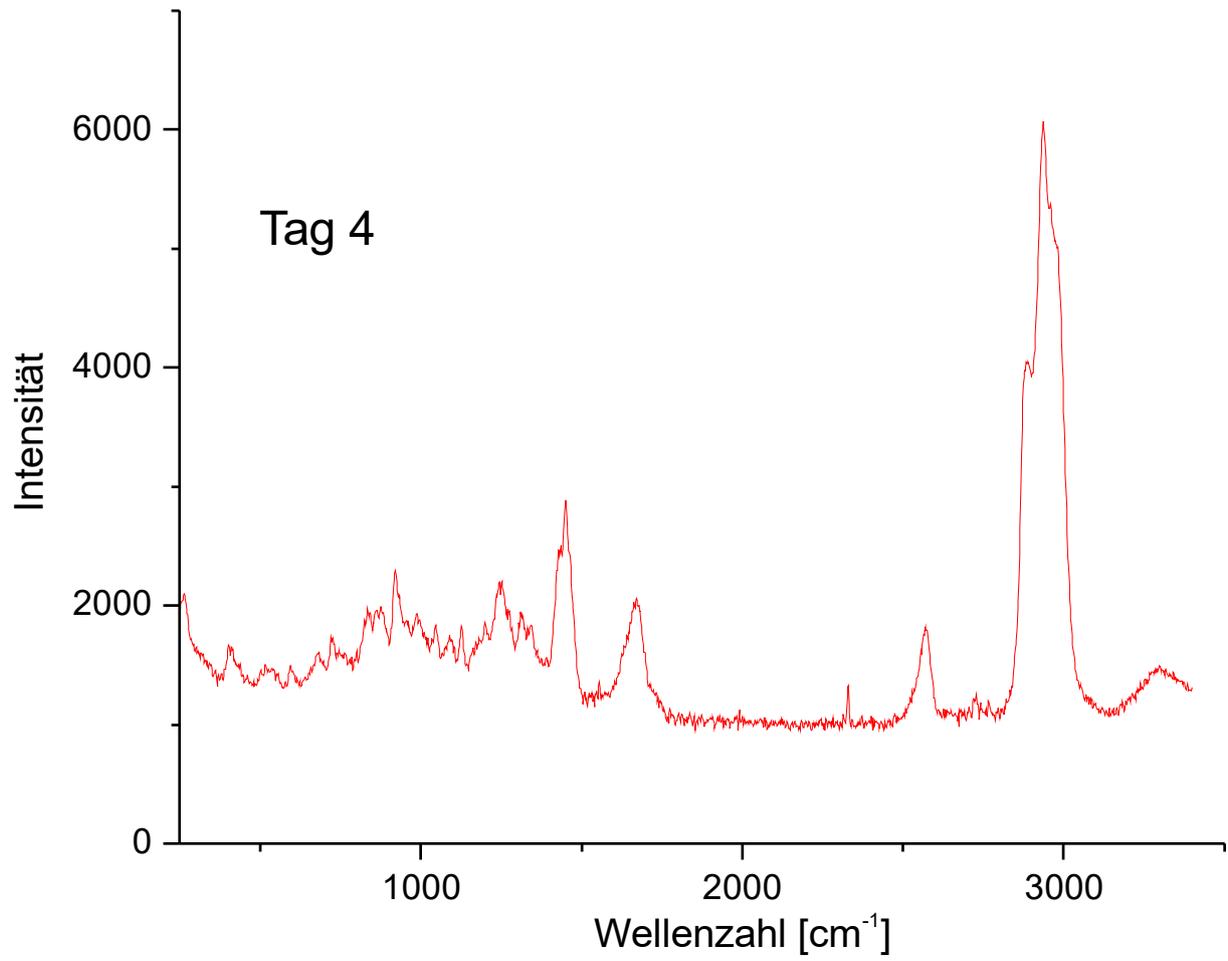


Abbildung X.1-17: Raman-Spektrum des synth. KHPs nach Sauerstoffexposition (4 Tage).

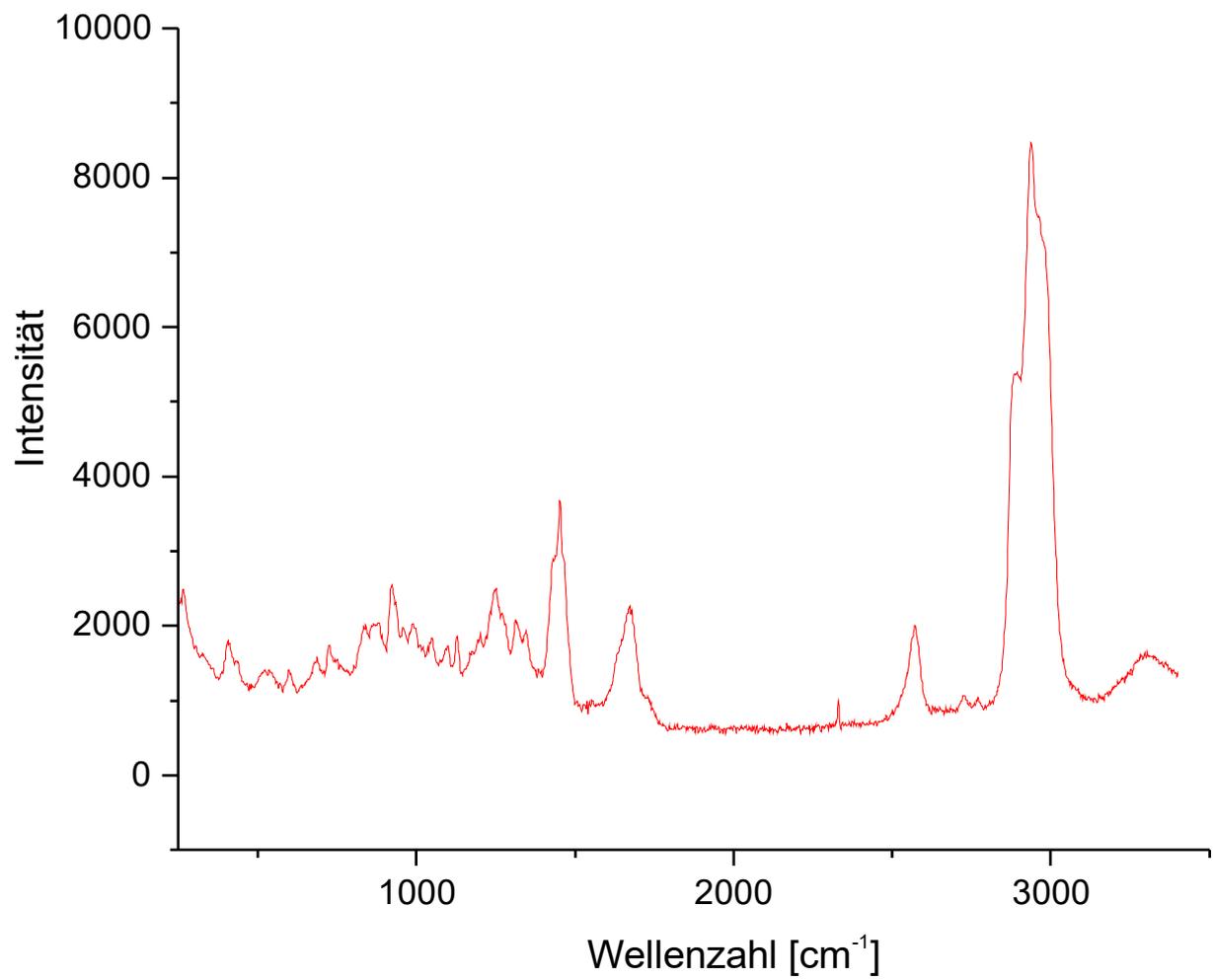


Abbildung X.1-18: Raman-Spektrum des synth. KHPs nach Sauerstoffexposition (7 Tage).

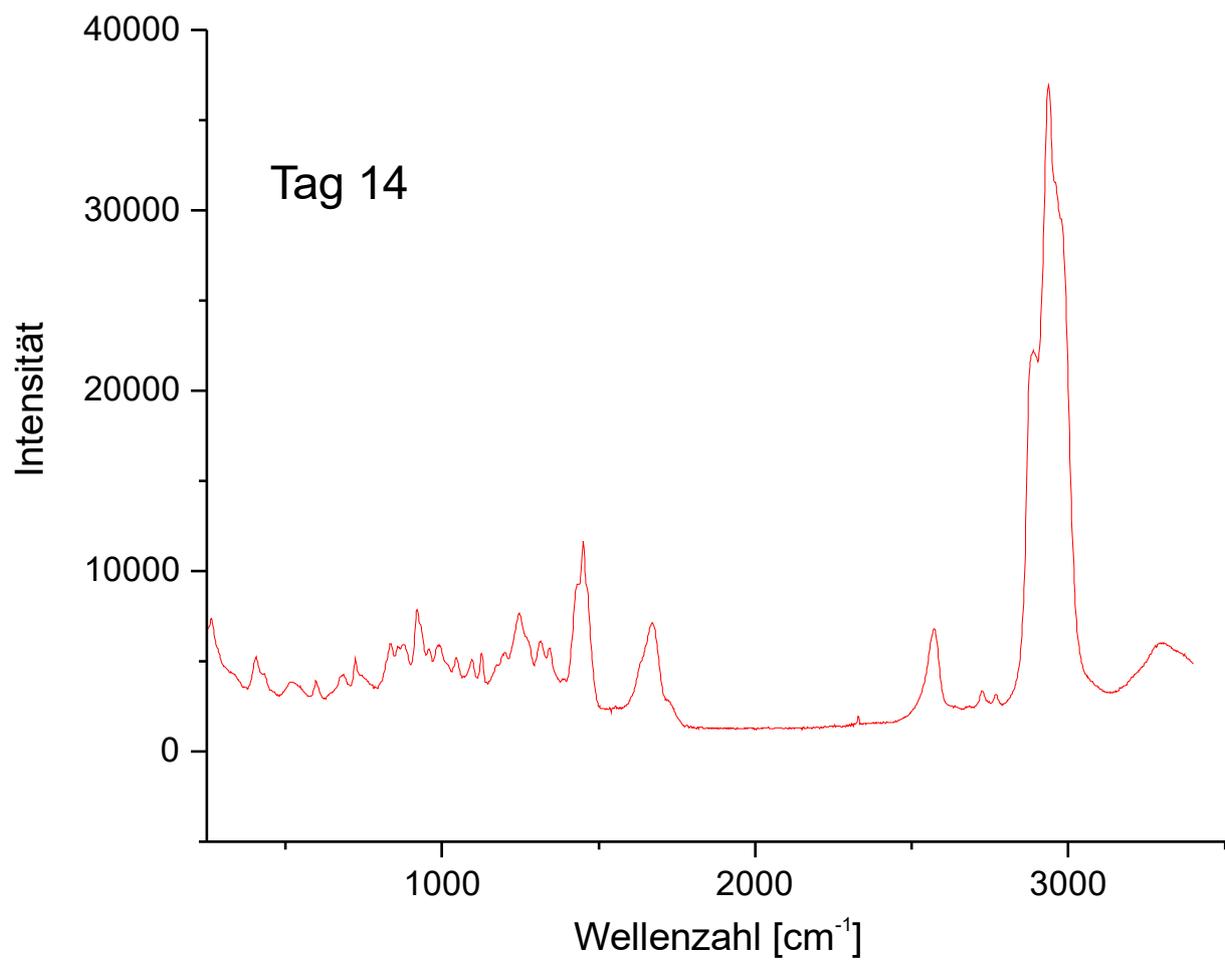


Abbildung X.1-19: Raman-Spektrum des synth. KHPs nach Sauerstoffexposition (14 Tage).

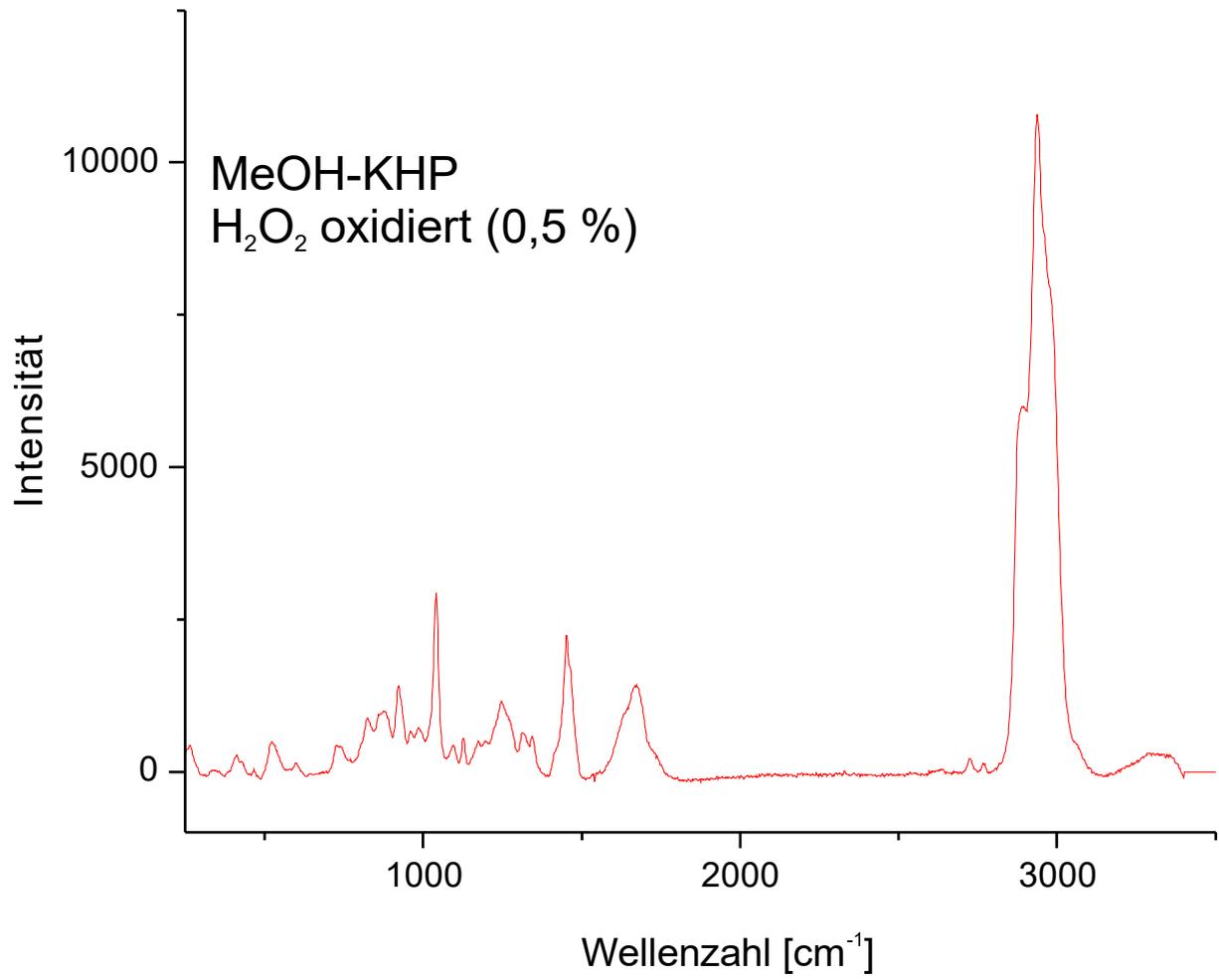


Abbildung X.1-20: Raman-Spektrum von MEOH-KHPs nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 %).

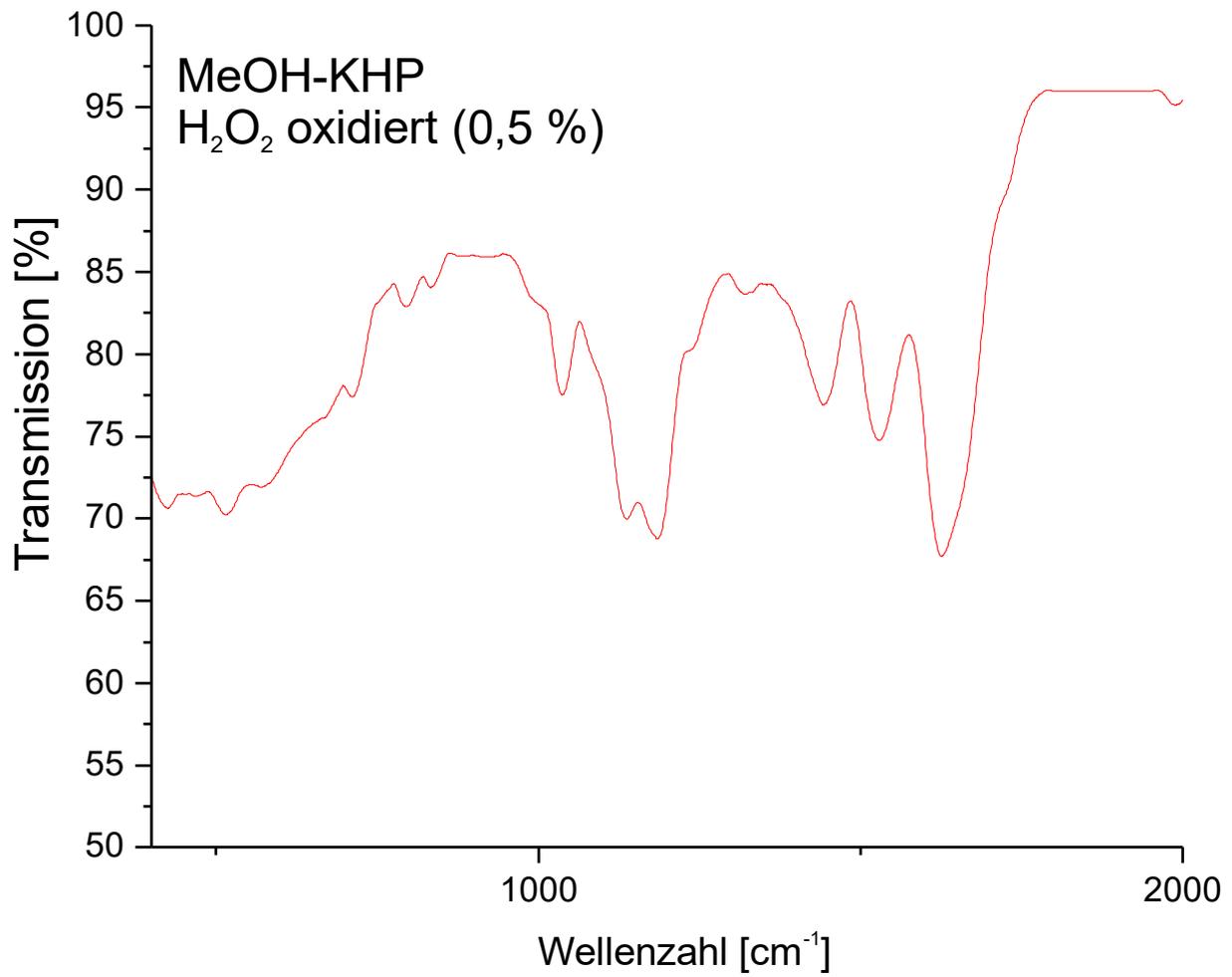


Abbildung X.1-21: IR-Spektrum von MEOH-KHPs nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 %).

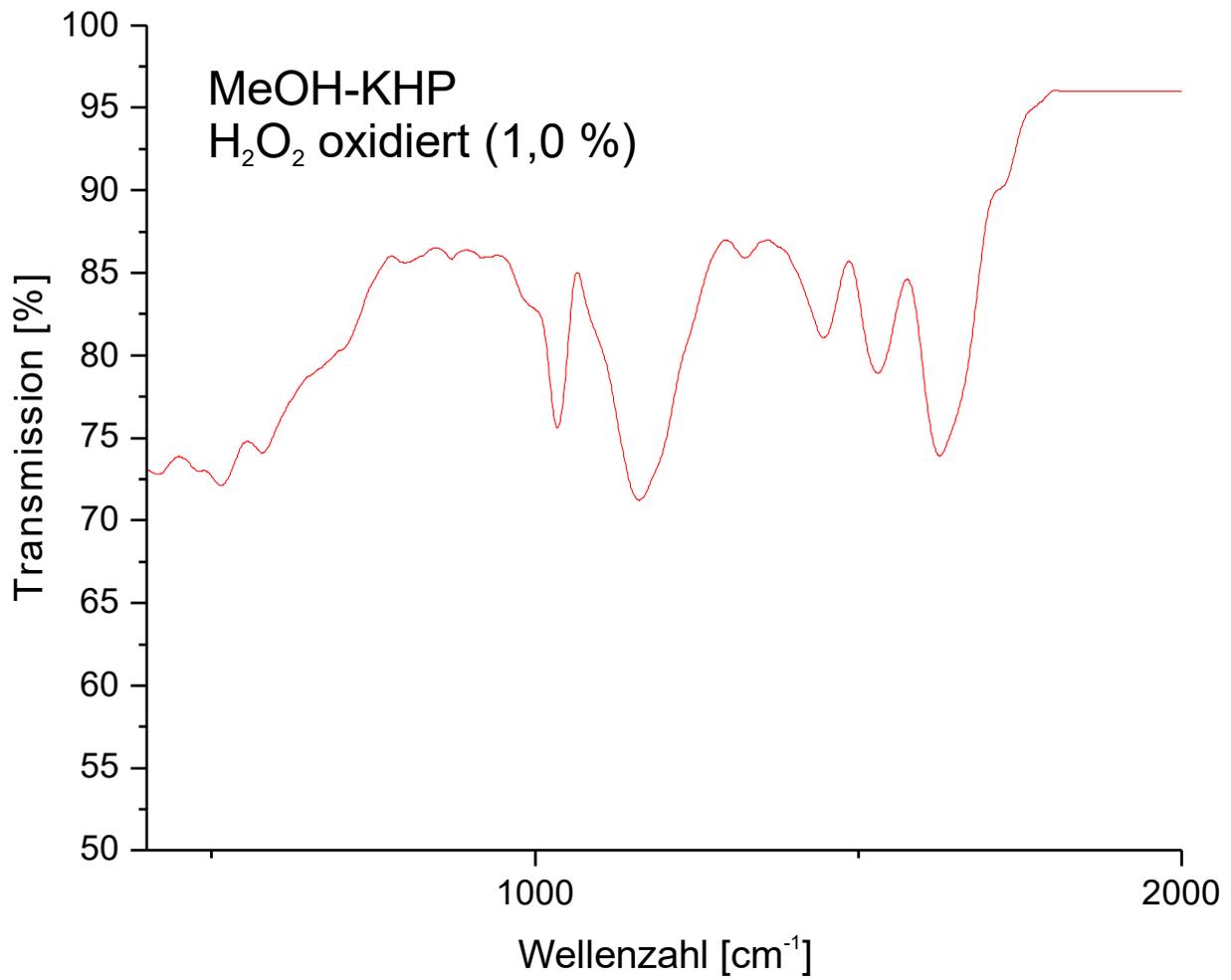


Abbildung X.1-22: Raman-Spektrum von MEOH-KHPs nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1,0 %).

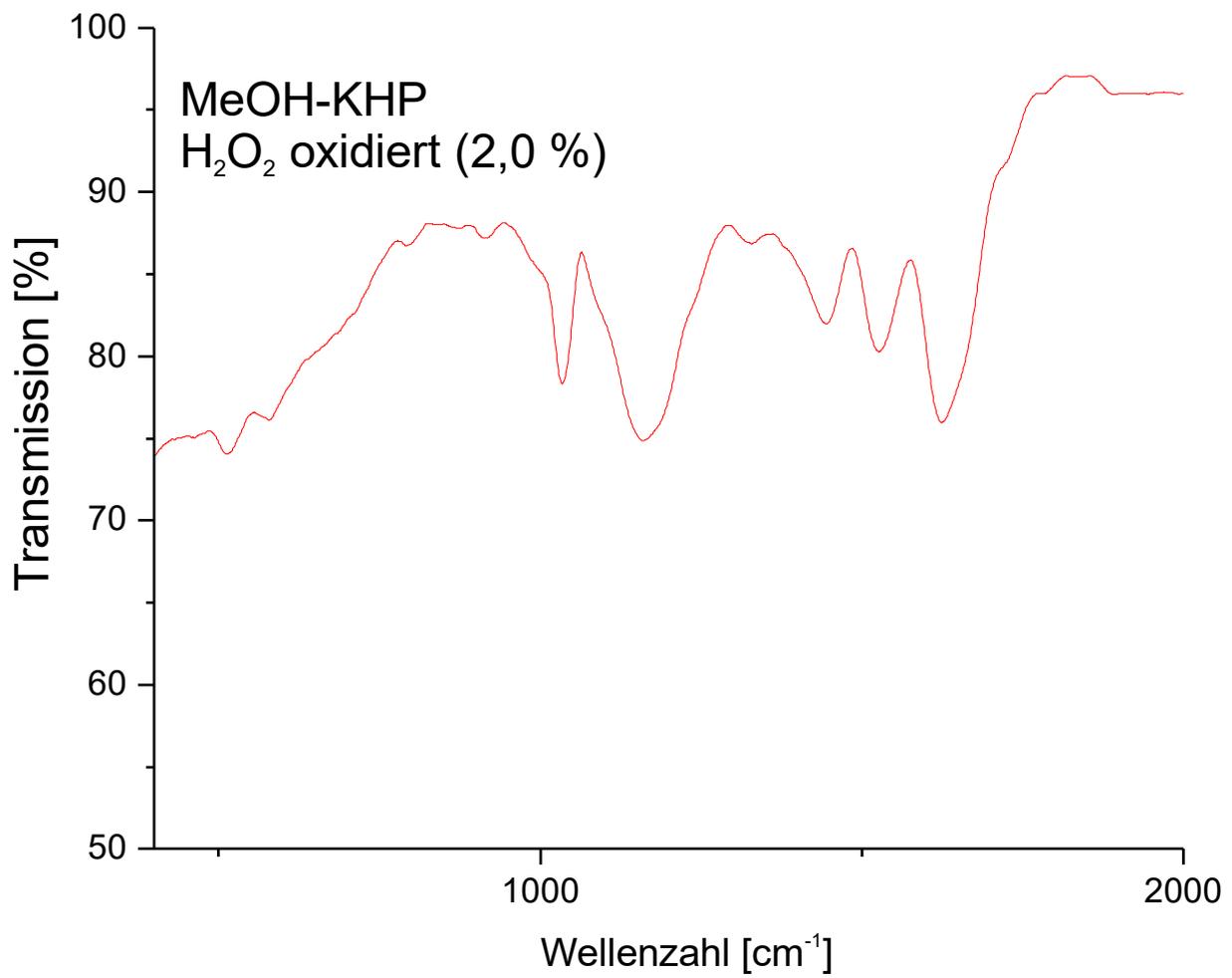


Abbildung X.1-23: Raman-Spektrum von MEOH-KHPs nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,0 %).

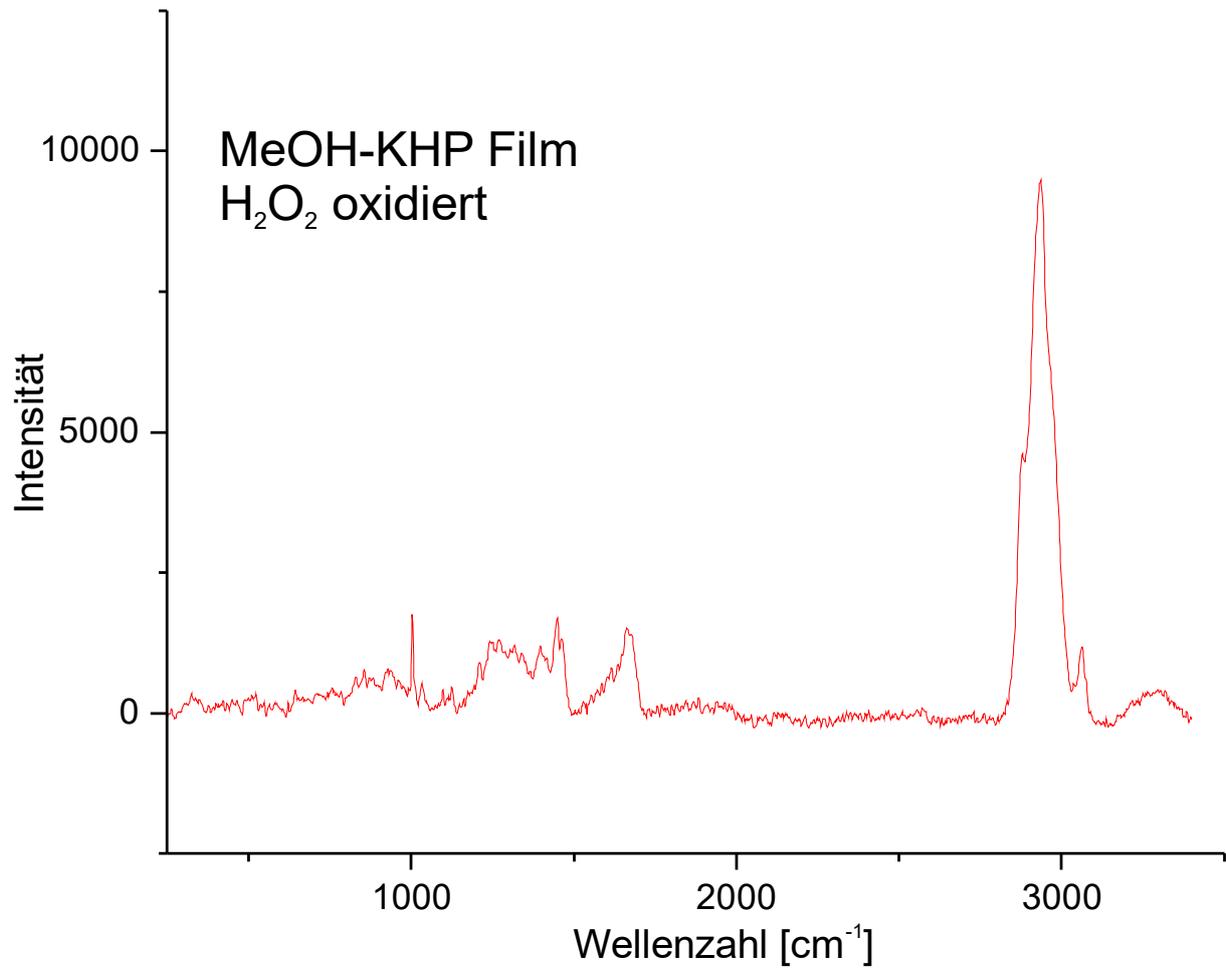


Abbildung X.1-24: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 %)

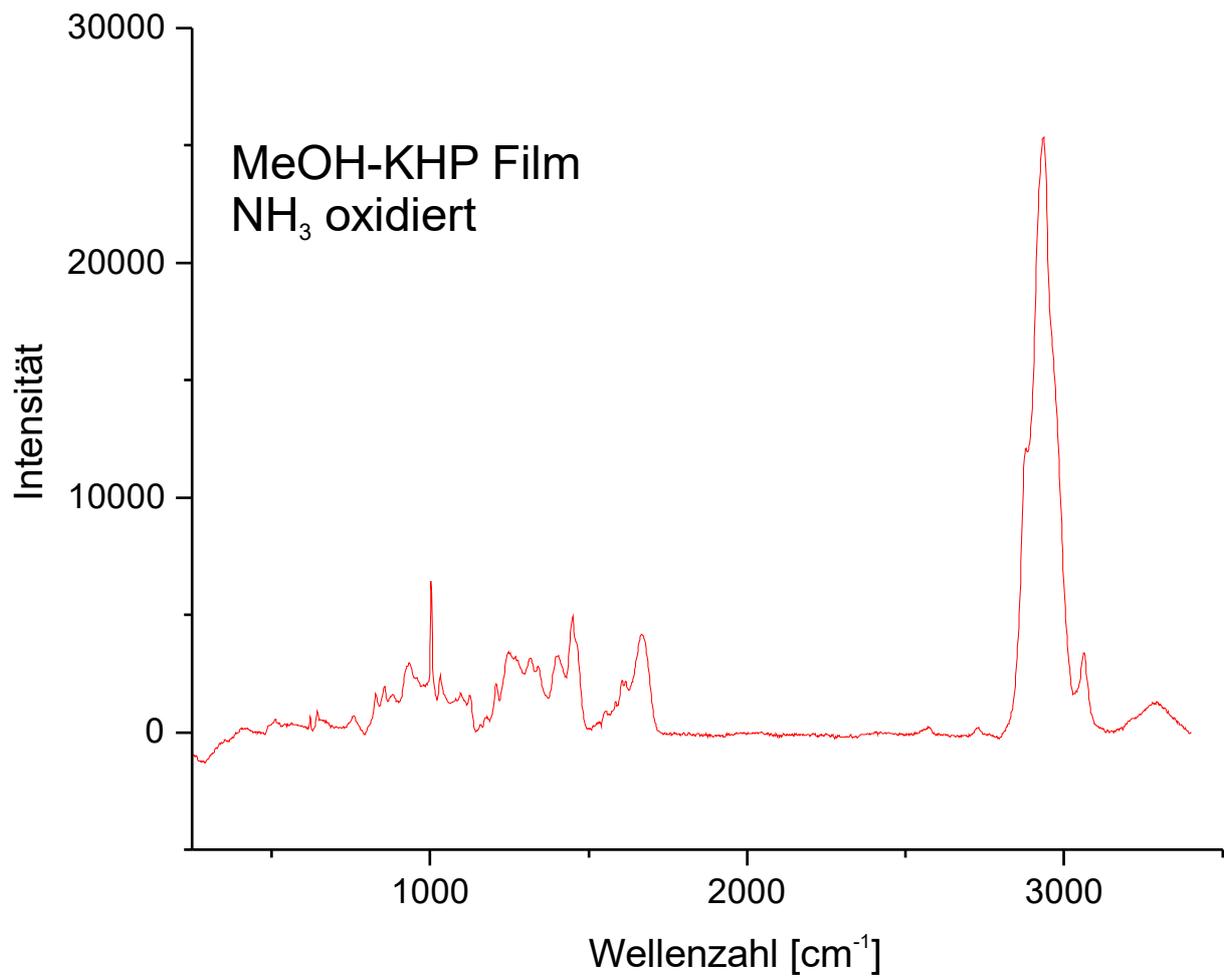


Abbildung X.1-25: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs nach Oxidation mittels NH<sub>3</sub>.

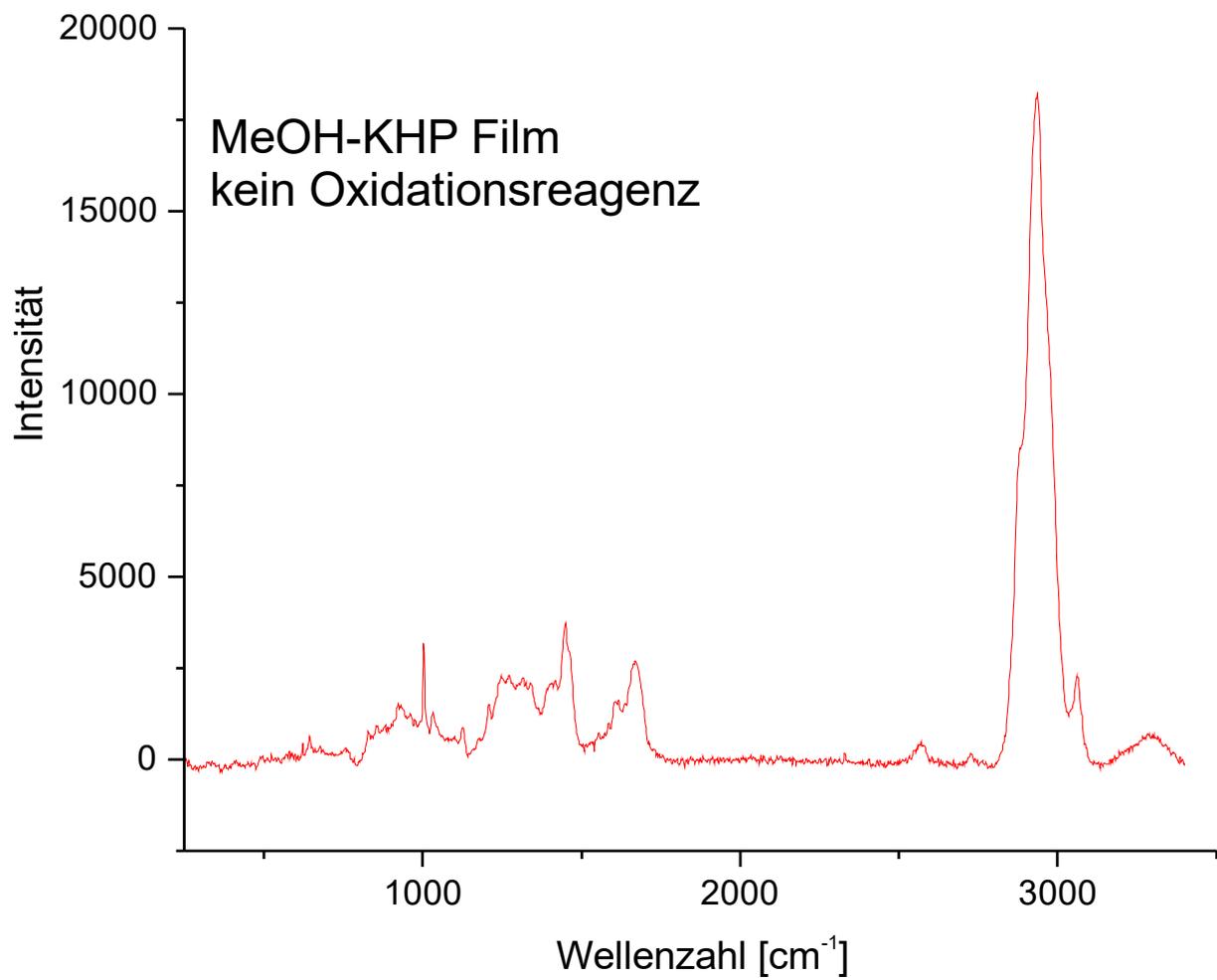


Abbildung X.1-26: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs ohne oxidatives Reagenz.

**Spektren aus Kapitel V.8:**

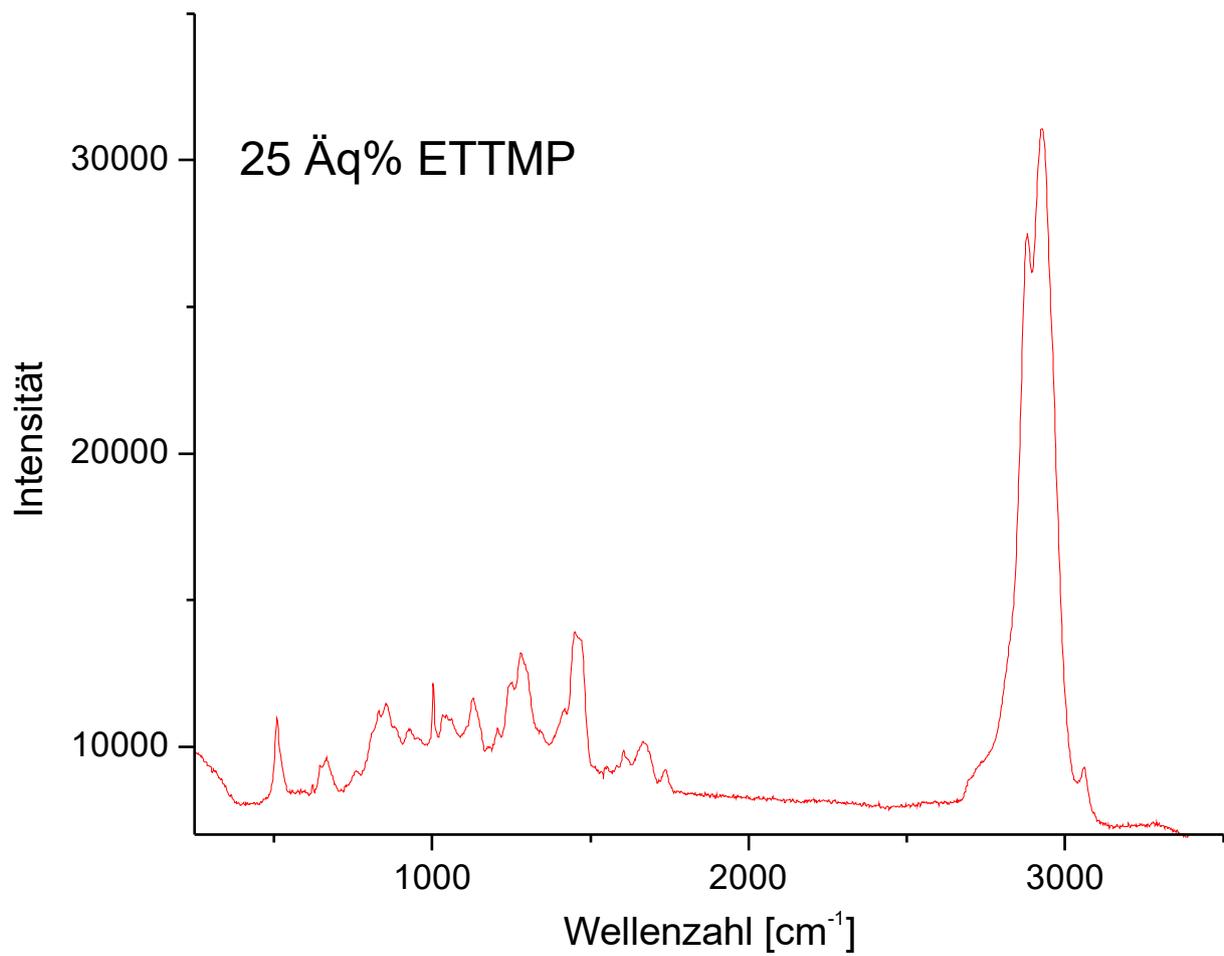


Abbildung X.1-27: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs und Thiocure ETTMP (25 Äq%) nach Oxidation mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 %).

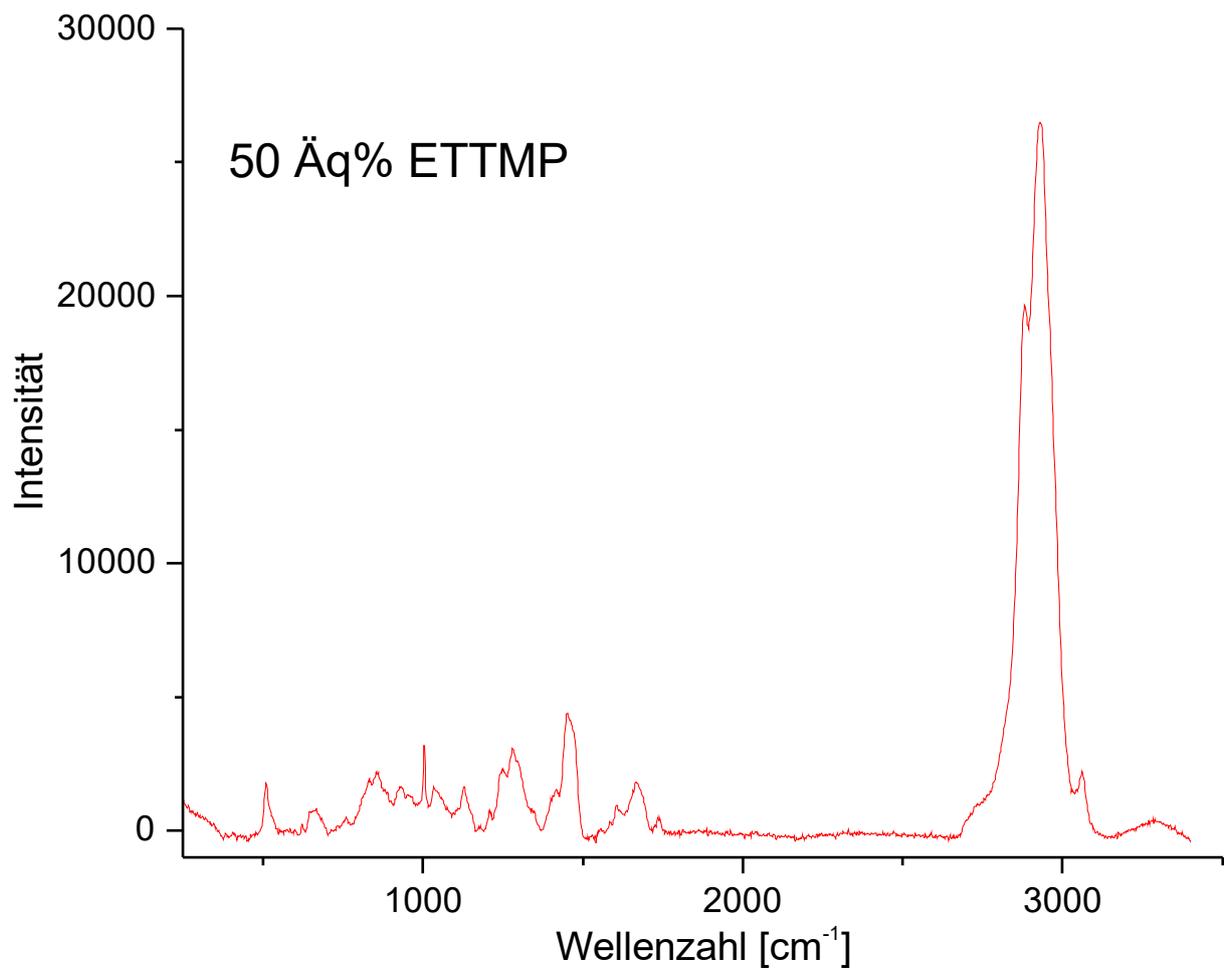


Abbildung X.1-28: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs und Thiocure ETTMP (50 Äq%) nach Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 %).

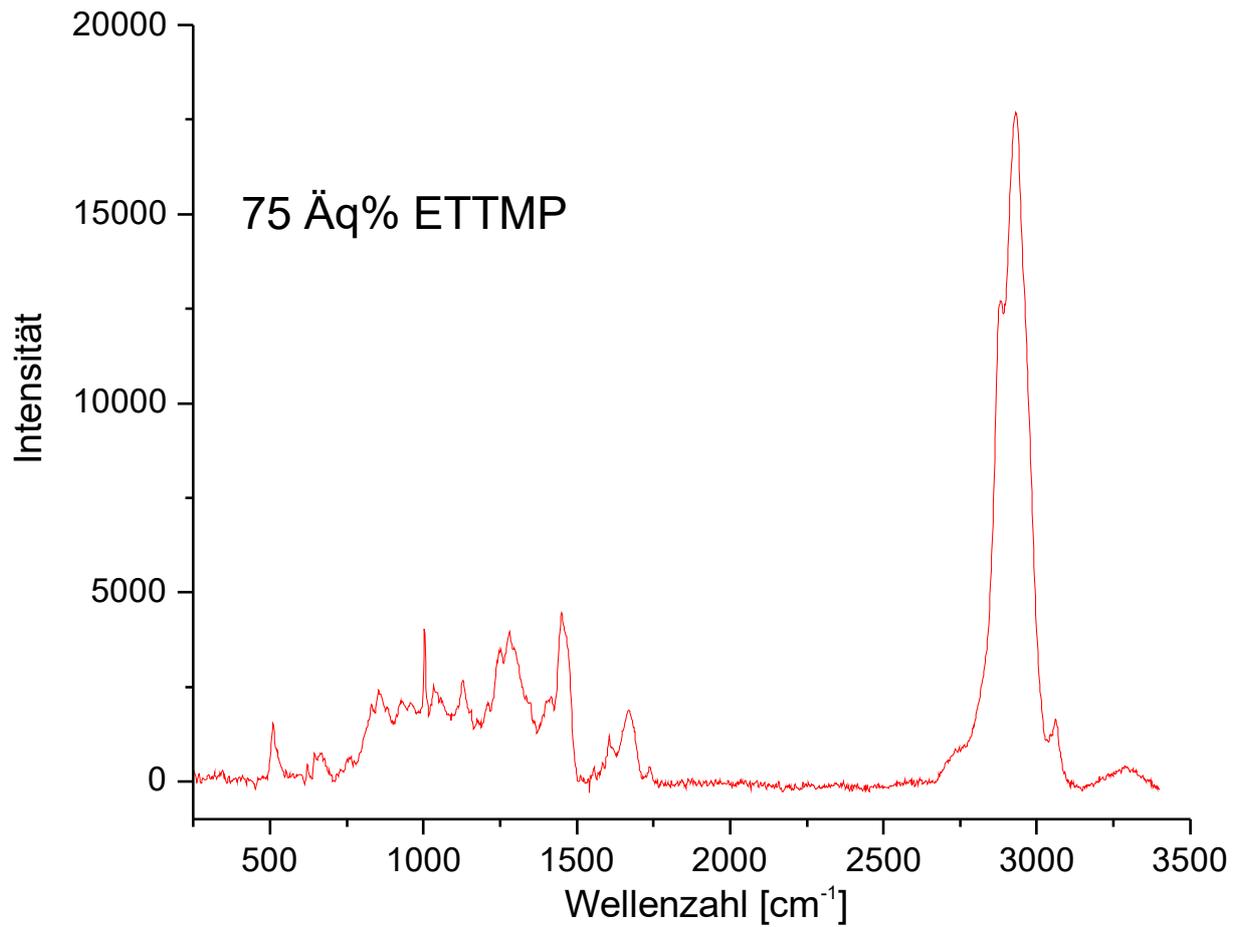


Abbildung X.1-28: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs und Thiocure ETTMP (75 Äq%) nach Oxidation mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 %).

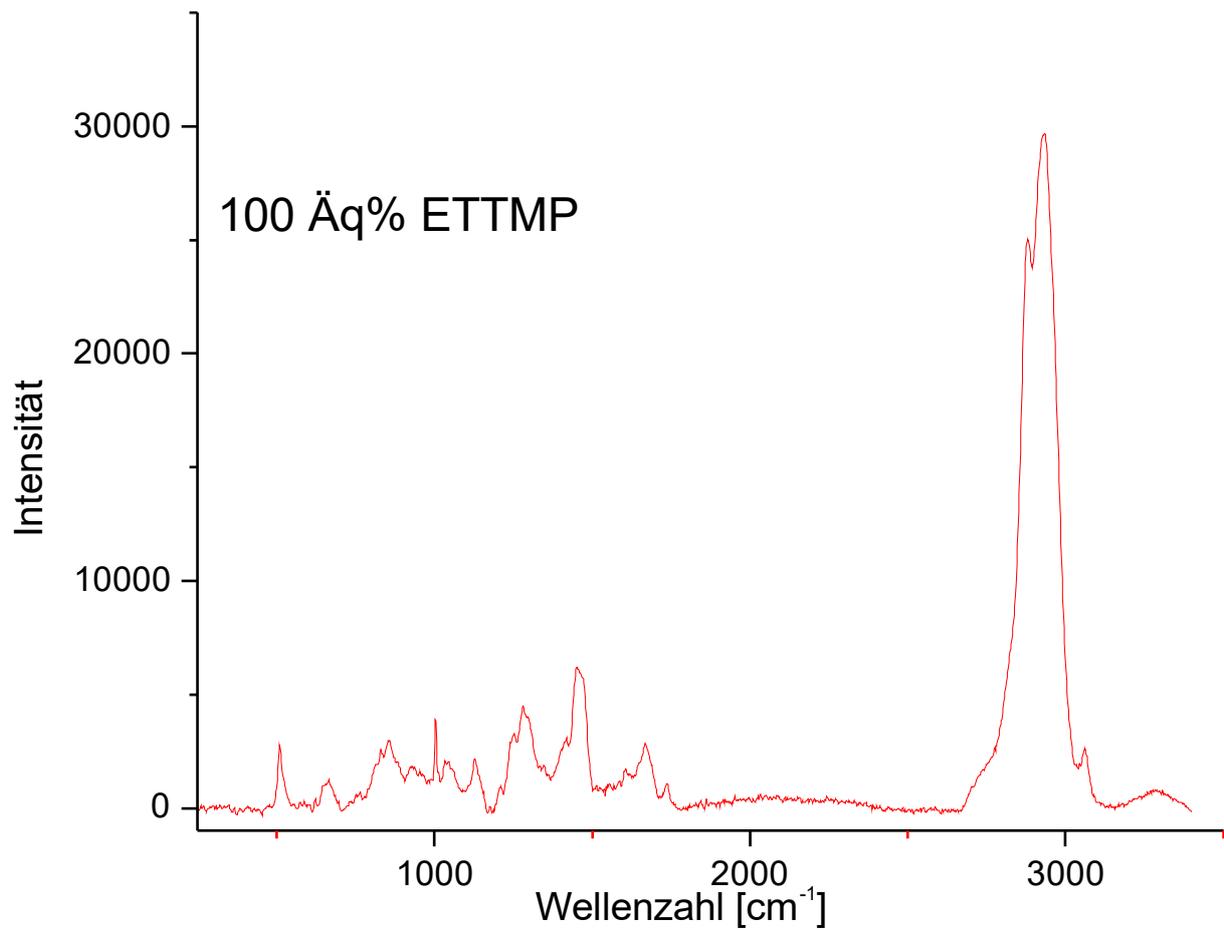


Abbildung X.1-29: Raman-Spektrum eines Films aus MEOH-KHPs und Thiocure ETTMP (100 Åq%) nach Oxidation mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 %).

**Spektren aus Kapitel V.9:**

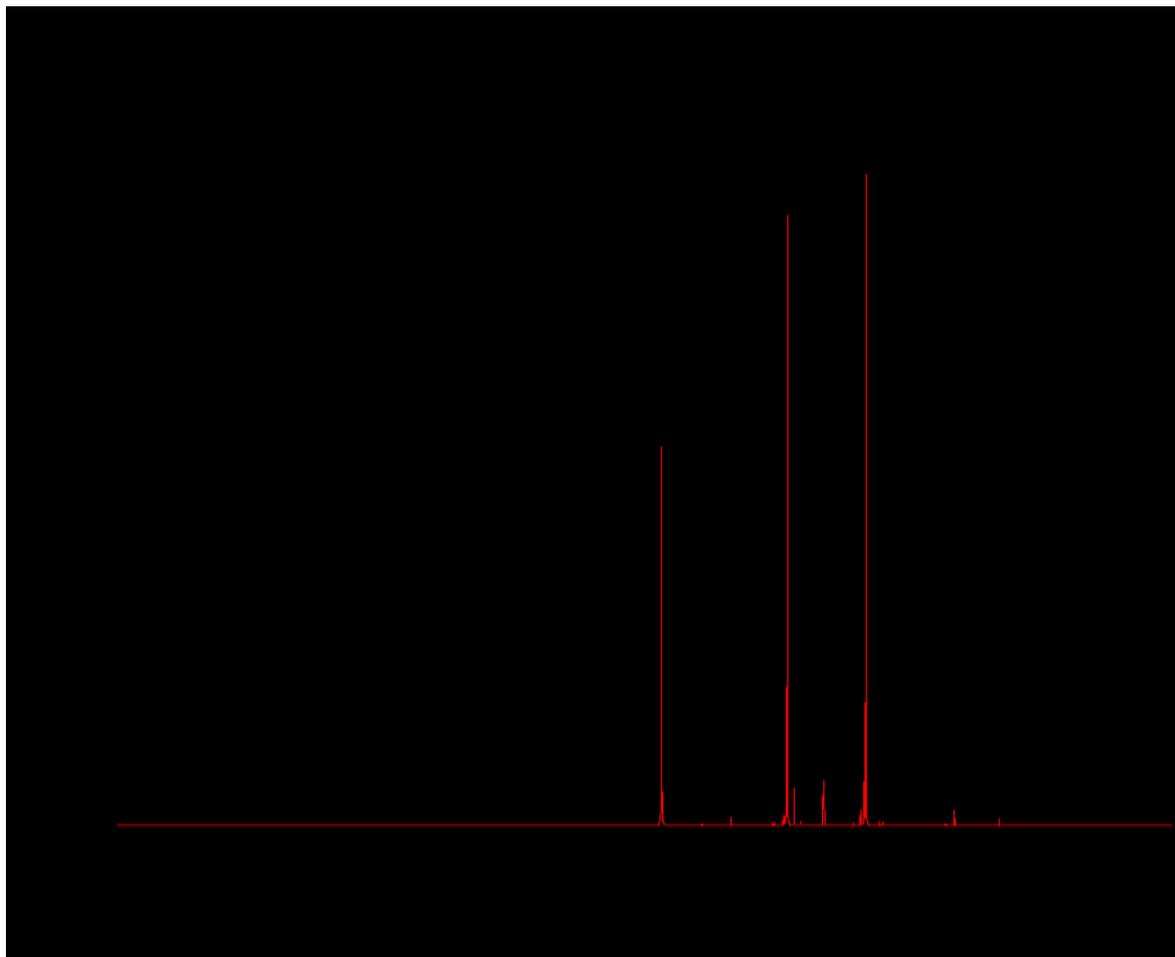


Abbildung X.1-30:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol.

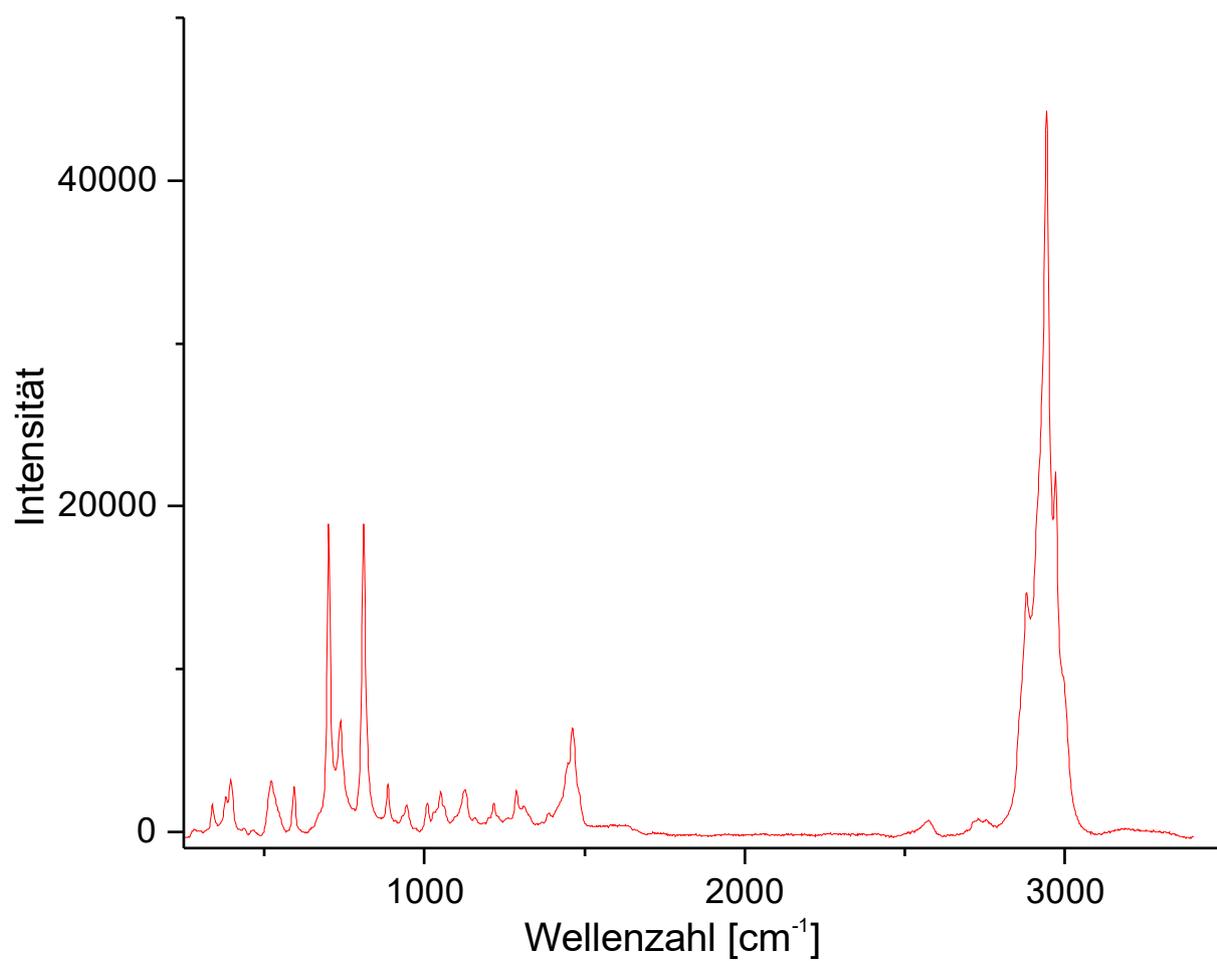


Abbildung X.1-31: Raman-Spektrum von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol.

**Spektren aus Kapitel V.10:**

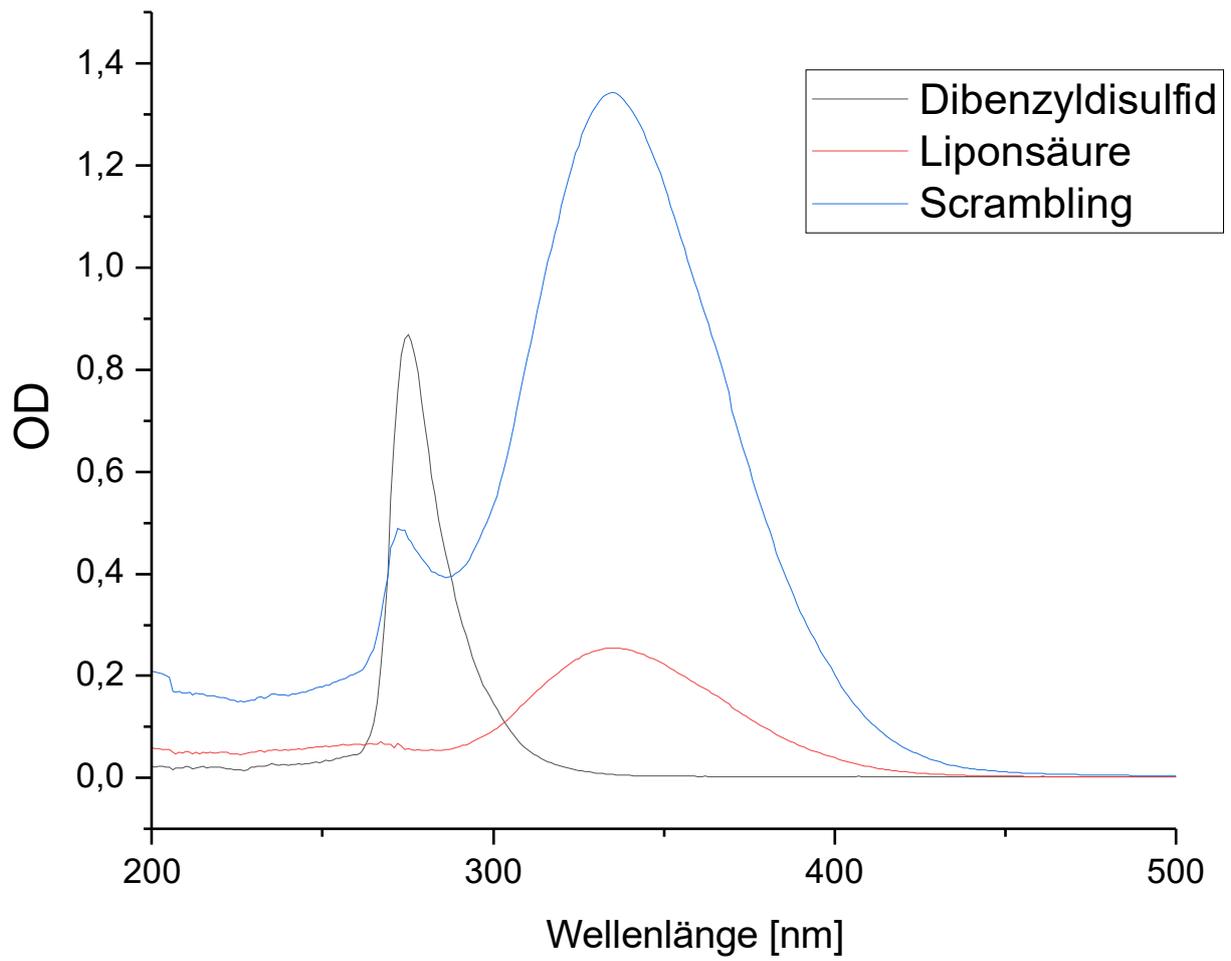


Abbildung X.1-32: UV/Vis-Spektren des Disulfid-Scramblings in MeCN.

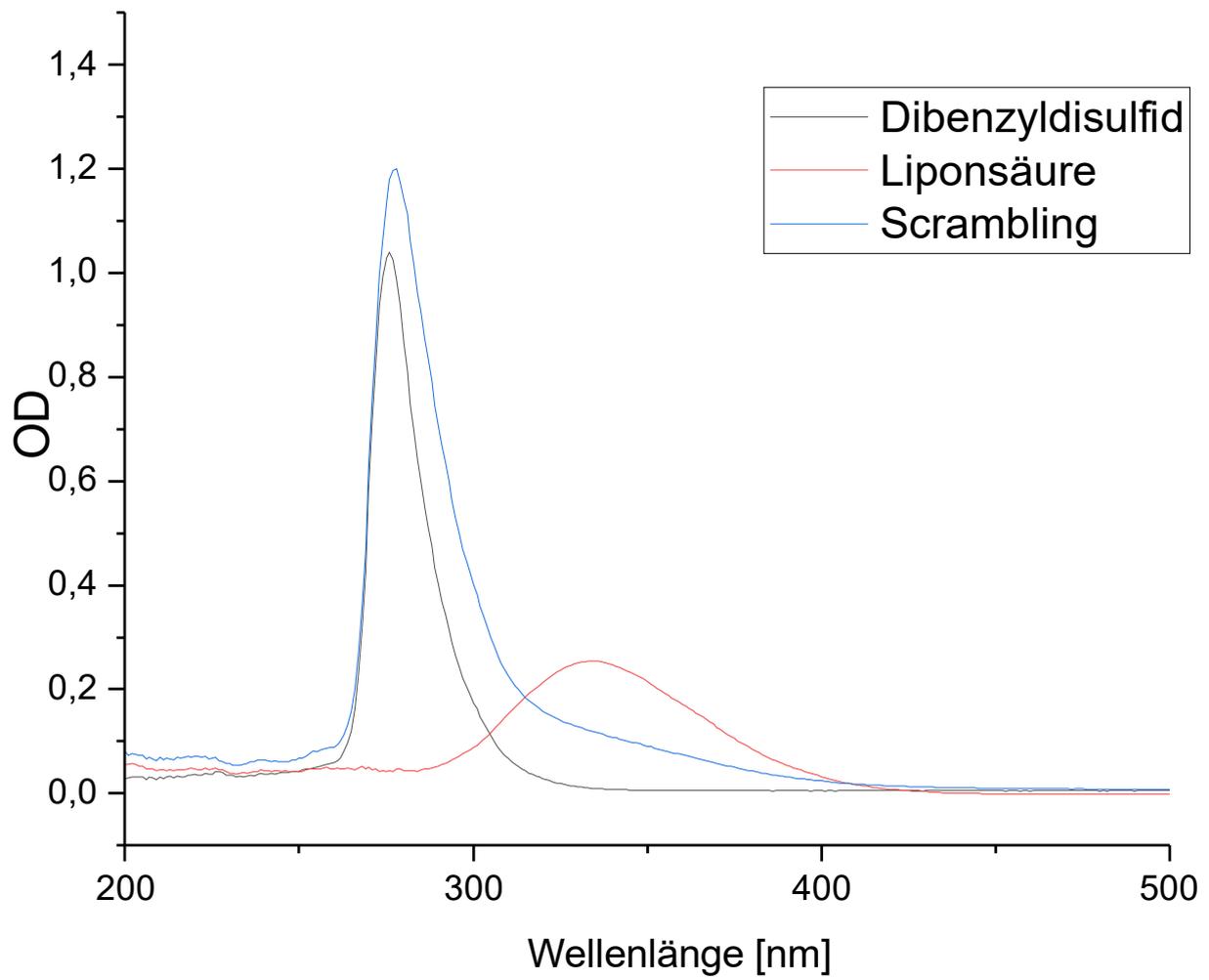


Abbildung X.1-33: UV/Vis-Spektren des Disulfid-Scramblings in MeOH.

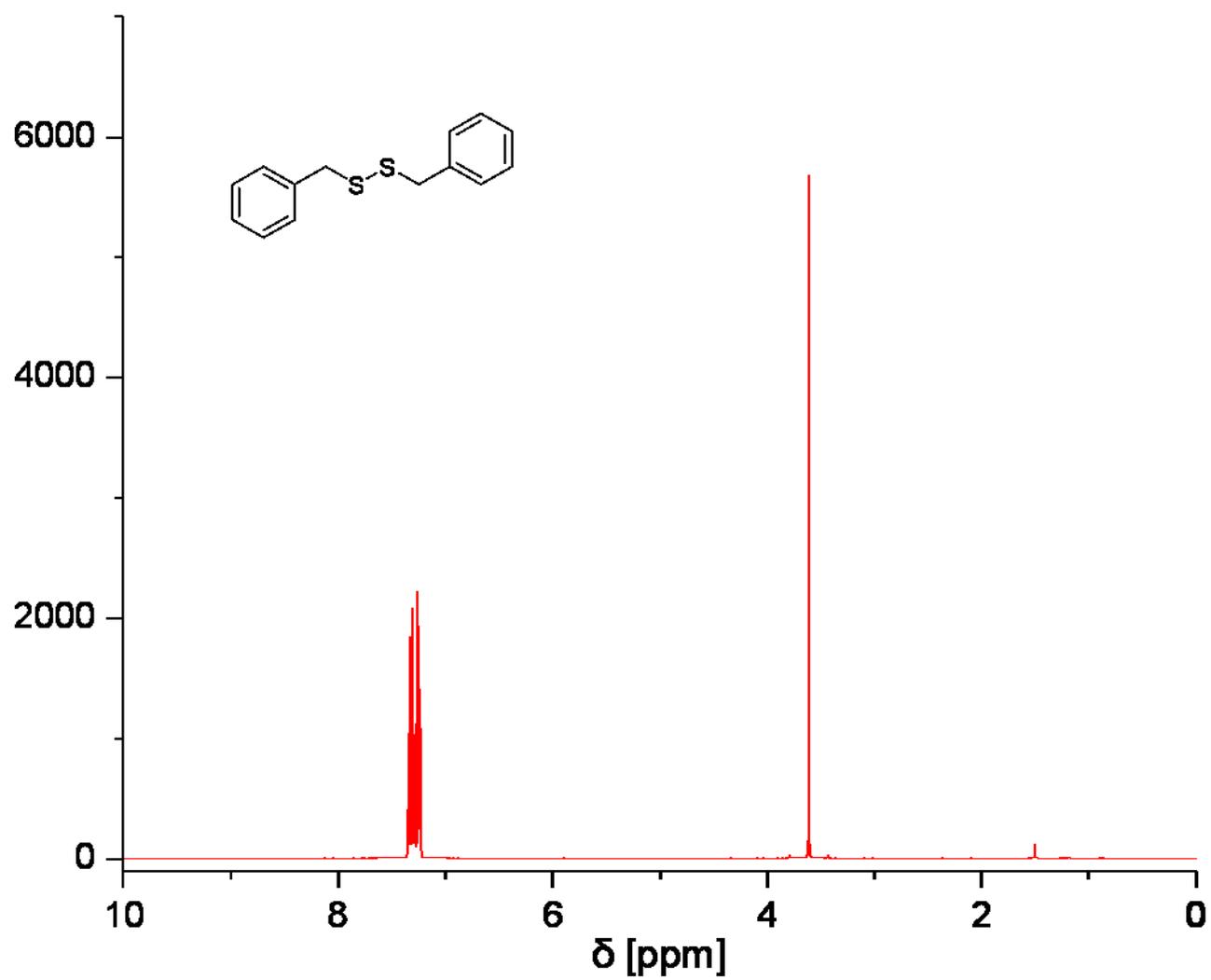


Abbildung X.1-34:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dibenzyldisulfid.

X. Anhang

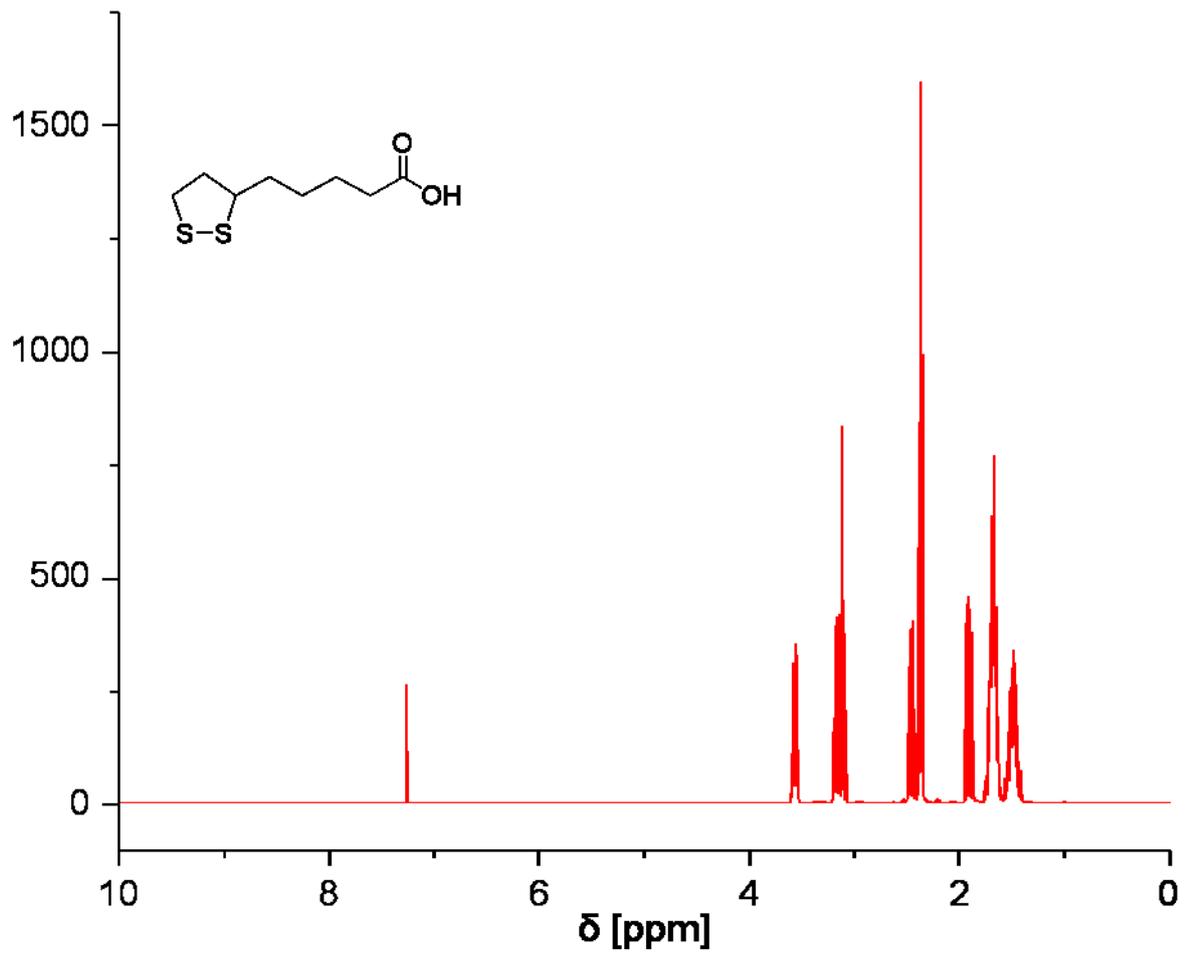


Abbildung X.1-35:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Liponsäure.

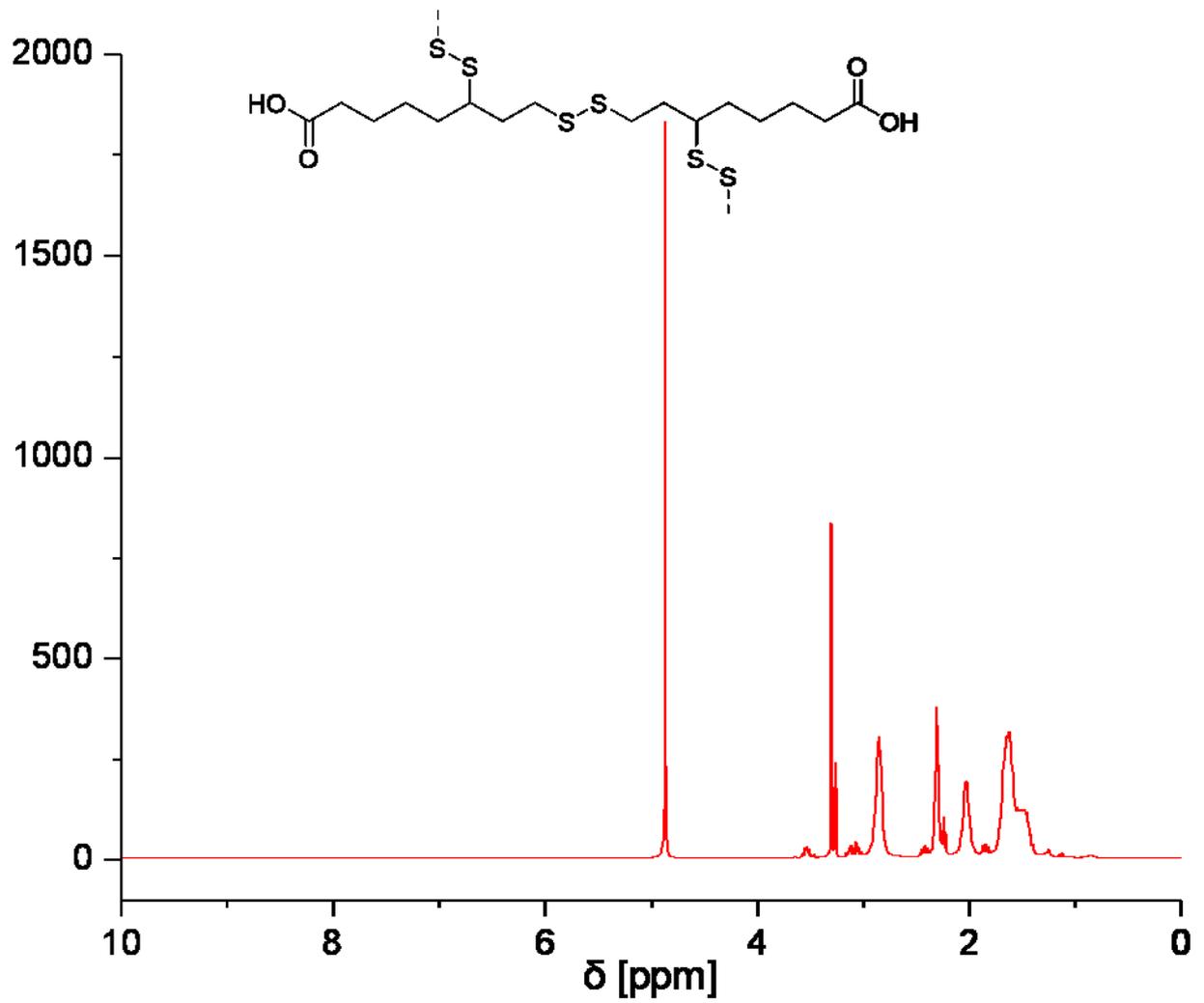


Abbildung X.1-36: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von Polyliponsäure.

**Spektren aus dem Experimentalteil:**

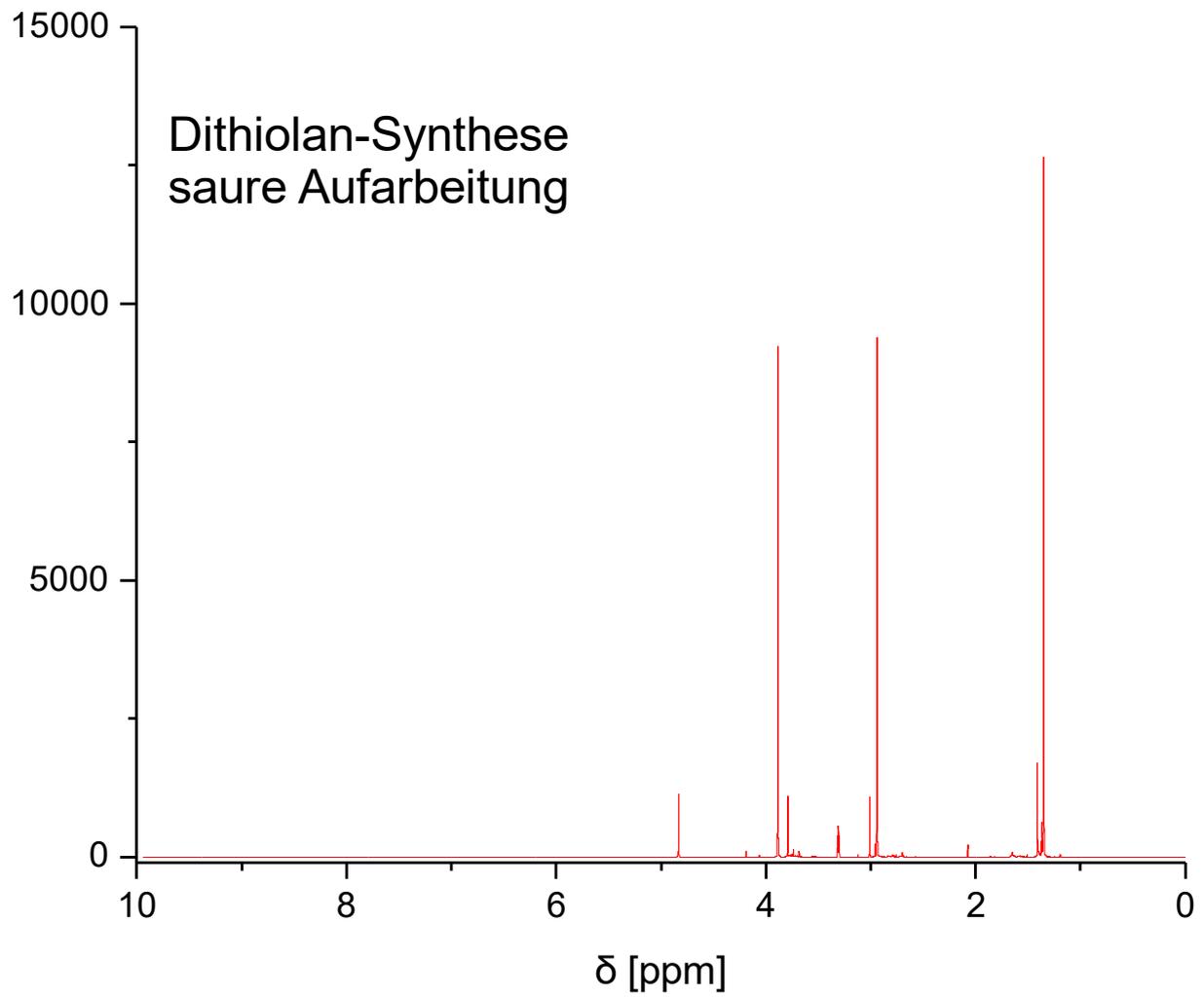


Abbildung X.1-37:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol nach saurer Aufarbeitung.

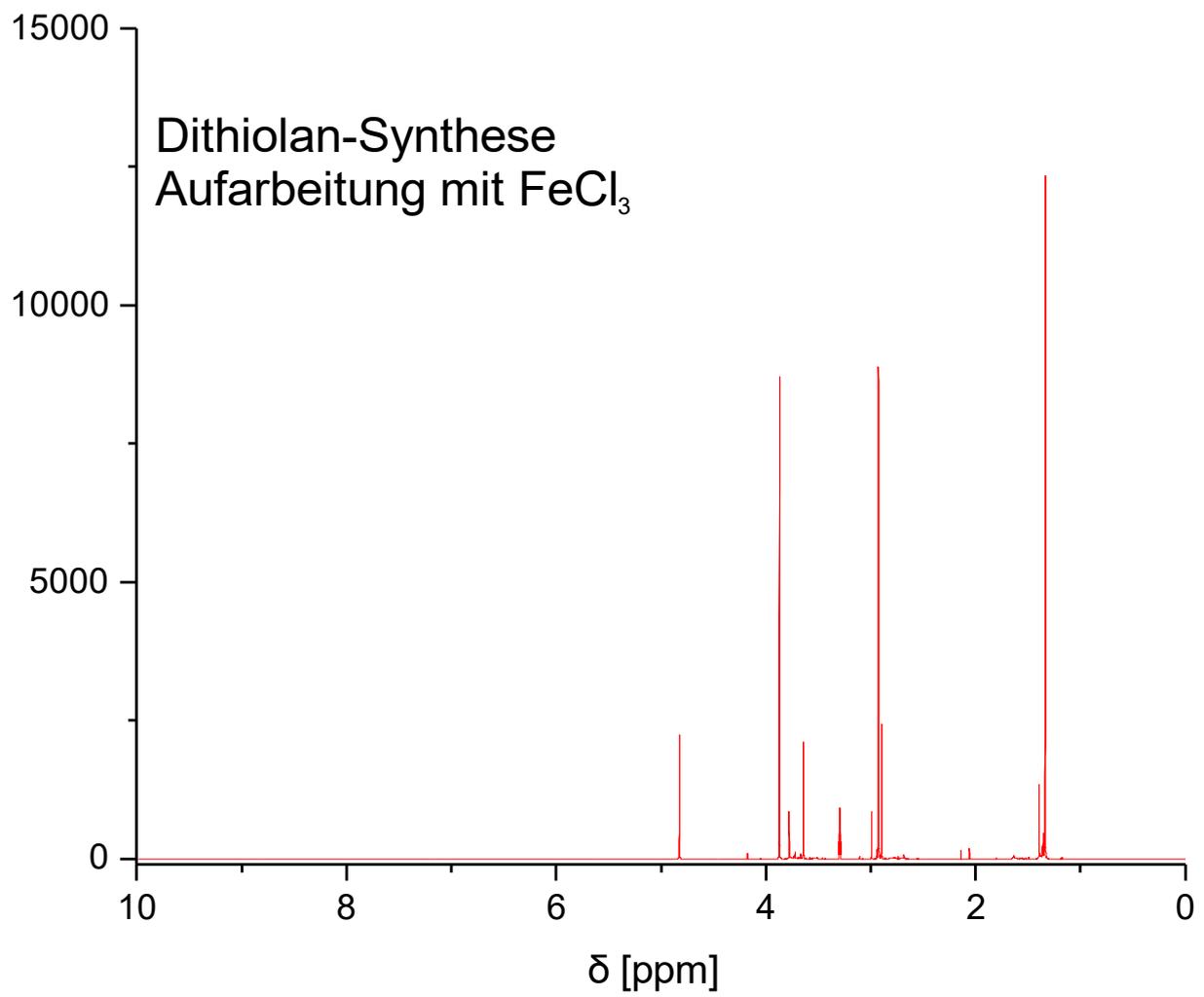


Abbildung X.1-38:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (1,2-Dithiolan-4,4-diyl)dimethanol nach Aufarbeitung mit  $\text{FeCl}_3$ .

## XI. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Laura Hartmann bedanken, für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit sowie ihre stets freundliche Unterstützung. Zudem gilt mein Dank auch Prof. Dr. Constantin Czekelius für seine Funktion als Mentor und seine bereitwillige Hilfe, wann immer es nötig war.

Weiterhin möchte ich mich bei den Leitern der *Bio-Renewable Materials* Plattform, Dr. Adrian Brandt und Dr. Horst Beck, in deren Gruppe ich meine Arbeit durchführen konnte bedanken. Ebenfalls muss ich mich bei meinen Kooperationspartnern vom Fraunhofer IGB für die Zusammenarbeit und natürlich das Bereitstellen der KHPs bedanken.

Weiterhin danke ich dem Henkel Analytik-Department für ihre stets hilfsbereite Zusammenarbeit und ihre Unterstützung durch fachliche Expertise. Besonders hervorheben möchte ich dabei Dr. Oliver Seiler sowie Karin Mally-Hill.

Am wichtigsten bei einer solchen Arbeit ist das direkte Umfeld. Daher danke ich Alexander Kux, Kerstin Schröder, Andrea Hoffman und Patric Sielaf für ihren Beitrag zu einer stets angenehmen Arbeitsatmosphäre. Alissa Besler danke ich für ihre hilfsbereite Art sowie unsere Unterhaltungen zum Thema Labor-Organisation.

Many thanks go to Kamela Myrtollari for sharing the burden with me and for many funny lost-in-translation moments. Your unyielding positivity and your kindness made it a pleasure working with you.

Meinem Zellengenossen (bald Dr.) Marlo Kropff danke ich ebenfalls von Herzen für seine Unterstützung sowohl bei der Arbeit als auch im Privaten. Ohne seine Hilfe, sei es in zahlreichen Foren, beim gegenseitigen Zurufen von Durchhalteparolen oder im Kampf gegen Ungeheuer, wäre es schwer geworden, diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Extra großer Dank geht an die beste Laborpartnerin, die man sich wünschen kann – Astrid Angenvoort. Danke für deine Unterstützung im Labor, beim Erklären neuer Geräte oder in anderer Form und danke vor allem für dein stets offenes Ohr, deine gutherzige Art und natürlich für das Verleihen des Doktors in Plapperwissenschaften.

## XI. Danksagung

Natürlich ist eine Doktorarbeit auch nicht ohne die Unterstützung aus dem privaten Umfeld zu überstehen. Daher bedanke ich mich bei allen meinen Freunden für ihre Hilfe – besonders jedoch bei Toni Figueroa Bietti und Saveh Djalali, mit dem mich die Vision von den fetten Jahren verbindet.

Das wichtigste im Leben ist die Familie, insbesondere, wenn man davon nicht allzu viel hat. Daher geht der größte Dank an meine Familie; speziell an zwei Menschen, ohne deren Unterstützung und zahllose Entbehrungen ich niemals dort wäre, wo ich nun im Leben stehe: Meine Großmutter Irene Rieche und besonders meine Mutter Reinhilde Rieche, auch wenn sie das Ende leider knapp verpasst hat.

*„Was du mit Geld nicht bezahlen kannst, das bezahle wenigstens mit Dank.“* – Deutsches Sprichwort