

Entwicklung und Charakterisierung von Schutzfolien aus nachwachsenden Rohstoffen

Dissertation

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

vorgelegt dem

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

von

Frau Dipl.-Ing. (FH) Isabell Sommer
geb. am 01. Juli 1972 in Siegen, Deutschland

Gutachter

1. Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Prof. Dr. Thomas Hirth

Tag der Verteidigung: 10. Oktober 2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Isabell Sommer, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines durch die deutsche Bundesstiftung Umwelt DBU geförderten Projektes. Ich möchte an dieser Stelle all den Menschen ganz herzlich danken, die mich während der Doktorarbeit auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. P.M. Kunz für die initiale Anregung, das Projekt zu einem Promotionsthema zu machen. Ganz besonders möchte ich mich hiermit auch für den großen Freiraum während meiner Arbeit in seinem Team bedanken. Die wertvollen, methodischen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. Außerdem danke ich ihm auch für die Förderung meiner fachlichen, beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens. Von seiner Erfahrung, nicht nur in Hinsicht des wissenschaftlich kritischen Denkens, habe ich sehr viel profitiert.

Nicht weniger zu danken gilt es meinem Doktorvater Prof. M. Pietzsch für die Bereitschaft, mich als FH-Absolventin bei meinem Promotionsvorhaben an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg zu unterstützen und zu begleiten. Ohne die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit wäre diese Dissertation vermutlich nicht zu Stande gekommen. Auch ihm danke ich für die wertvollen Ratschläge zur Ausgestaltung meiner Arbeit.

Darüber hinaus haben viele Mitarbeiter, Studienarbeiter, Diplomanden und Hilfswissenschaftler am Institut für Biologische Verfahrenstechnik der Hochschule Mannheim in unterschiedlichster Weise entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Zunächst seien Dipl.-Ing. Jan Benra und Dipl.-Ing. Stephanie Ledji-Ngouffo für die konstruktive Zusammenarbeit und die unermüdliche Kollagenmassen- und Folien-Produktion gedankt. Auch wäre diese Arbeit nicht ohne die Unterstützung von Herrn Tilmann Zapf in diesem Umfang möglich gewesen. Herr Florian Gokel hat überdies einen entscheidenden Beitrag zur Realisierung der Spritzbarkeit der Massen geleistet. Ein herzliches Dankeschön allen Beteiligten hierfür. Ebenso gilt mein Dank Herrn Jens Peter für die Hilfestellungen bei den Weiterreiß-Tests. Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Kristin Riedel von der Universität Halle für die Durchführung der Durchstoßversuche.

Der Firma Naturin Viscofan GmbH danke ich für die engagierte Kooperation und hier vor allem Herrn Dr. Franz Maser für die vielen wichtigen Inputs und hilfreichen Antworten auf meine Fragen sowie Herrn Christian Link und allen involvierten Mitarbeitern für die Bereitstellung der unterschiedlichen Kollagenmassen und die Durchführung der Zugfestigkeits-Messungen.

Nicht versäumen will ich, mich bei der Firma Wieland, Mannheim und insbesondere hier bei Herrn Sven Kunkel für die Durchführung der Bewitterungstests bzw. die Bereitstellung der Testanlagen zu bedanken.

Allen weiteren nicht namentlich erwähnten Personen danke ich für ihre wertvolle Kritik, Beantwortung meiner wissenschaftlichen Fragen oder auch ihre motivierenden Worte, die nicht unwesentlich zur Steigerung der Qualität meiner Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Mann dafür bedanken, dass er mir während der gesamten Zeit versucht hat, „den Rücken“ frei zu halten.

"Wer will, dass die Welt so bleibt, wie sie ist, der will nicht, dass sie bleibt."

Erich Fried (1921-1988)

für meine Familie

IV

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	6
II. Definitionen	7
1 Einleitung.....	8
2 Zielsetzung, Methodik und struktureller Aufbau	10
3 Stand des Wissens	12
3.1 Das Biopolymer Kollagen	13
3.1.1 Vorkommen und Struktur	13
3.1.2 Kollagenmassen-Herstellung.....	16
3.1.3 Abgrenzung Kollagen – Gelatine	16
3.1.4 Stand der Technik.....	17
3.2 Vernetzung von Kollagen - Einfluss auf die Wasserbeständigkeit	18
3.2.1 Bildung von Vernetzungen auf natürlichem Wege	19
3.2.2 Bildung von Vernetzungen auf künstlichem Wege	21
3.2.3 Einflussfaktoren auf den Grad der Vernetzung.....	26
3.2.4 Bestimmung der Wasserbeständigkeit	27
3.3 Verarbeitung von Kollagenmassen zu Folien oder Überzügen.....	28
3.3.1 Einfluss der Viskosität (Zähflüssigkeit)	29
3.3.2 Applikationsverfahren	31
3.4 Anwendungsgrenze synthetischer Folien bei der Neufahrzeug-Konservierung.....	39
3.4.1 Folgen eines unzureichenden Fahrzeugschutzes	39
3.4.2 Aktuelle Endkonservierungsmethoden und ihre Vor- und Nachteile	40
3.4.3 Anforderungen an den Fahrzeugschutz [Bartel, 2010]	45
4 Publikationen.....	47
4.1 Improving the water resistance of biodegradable collagen films	48
4.2 Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions	63
4.3 Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films	74
5 Diskussion.....	91
5.1 Eignung von hinsichtlich Wasserbeständigkeit und Verarbeitbarkeit verbesserten Kollagenfolien für die Konservierung von Neufahrzeugen.....	91
5.2 Fehlerbetrachtung	94
5.3 Ausblick	97
5.3.1 Weiterführende Lösungsansätze.....	97
5.3.2 Lang- und kurzfristige Ziele	98
6 Zusammenfassung.....	100
7 Literaturverzeichnis.....	102
8 Anhang.....	113
8.1 Lebenslauf Dipl.-Ing. (FH) Isabell Sommer	113
8.2 Publikationsliste	114

I. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% w/w	Gewichtsprozent
% w/w TK	Gewichtsprozent bezogen auf den Trockenkollagengehalt in g
°C	Grad Celsius
AA	Acyl-Azid-Methode
C	Kohlenstoff
CO	Carbonyl-
CO ₂	Kohlendioxid
Abb.	Abbildung
bar	Maßeinheit des Drucks
DBU	Deutsche Bundesstiftung Umwelt
d.h.	das heißt
DIN	Deutsche Industrie Norm
DM	Deutsche Mark
EDC	Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid
E	Extinktion
EN	Europäische Norm
Et. al.	et alii, et aliae, et alia: und andere
FA	Formaldehyd
g	Erdbeschleunigung
G2	Glyoxal
G5	Glutaraldehyd
GFK	Glasfaser-verstärkter Kunststoff
Gly-X-Y	Charakteristische Sequenz des Kollagens mit Glycin an jeder dritten Stelle. X und Y stehen für andere Aminosäure (oft Prolin oder Hydroxyprolin)
h	Stunde
HDPE	High Density Polyethylen
ISO	International Organization for Standardization
k.A.	keine Angabe
kg	Kilogramm
KK	Konstantklima
LKW	Lastkraftwagen
m	Gewicht [g oder kg]
m ²	Quadratmeter
max.	maximal
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mPa*s	Milli-Pascal-Sekunden
Mrd.	Milliarde
Mio.	Million
n.b.	nicht bestimmt
NH	Amino-
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
o.g.	oben genannt

Pa*s	Pascal-Sekunden
PE	Polyethylen
pH	pH-Wert
PP	Polypropylen
PV	Prüfverfahren
r	water resistance (Wasserbeständigkeit) [%]
R	Korrelationskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro min (engl.: rotation per minute)
s	Standardabweichung
s.	siehe
SDSPAGE	Sodium Dodecylsulfat Polyacrylamid Gel Electrophorese
sin	mathematische Funktion Sinus
t	Zeit [s], [min], [h], [d] bzw. [a]
t	Tonne
T [°C]	Temperatur [°C]
TK	Trockenkollagenanteil
TU	Technische Universität
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Geschwindigkeit
VDA	Verband der Automobile
vgl.	vergleiche
VW	Volkswagen
x	Filmdicke
z.B.	zum Beispiel
α	alpha (Neigungswinkel zu Horizontalen)
ε	Epsilon
€	Euro
η	dynamische Viskosität
ρ	Rho (Lackdichte)
μ	Mikro-

II. Definitionen

Folien: In Anlehnung an „Meyers Großes Taschenlexikon“ [Meyer, 1992] werden in der vorliegenden Arbeit als Folien Materialien meist aus Kunststoff oder Metall von sehr geringer Dicke und großer Fläche bezeichnet, mit denen man Gegenstände verpacken, abdecken oder isolieren kann.

Filme: Im Vergleich zu Folien werden mit Filmen dünne, festhaftende Überzüge/Schichten im μm -Bereich auf einem Trägermaterial bezeichnet, die sich nicht unversehrt von dem Trägermaterial ablösen lassen.

Wasserbeständigkeit: Die Wasserbeständigkeit ist die Eigenschaft von Folien und Filmen, sich bei Berührung mit Wasser nicht oder nur zu einem bestimmten Prozentsatz aufzulösen.

1 Einleitung

Kunststoff-Verpackungsfolien sind ein unverzichtbarer Teil des täglichen Lebens geworden. Man findet sie in vielen technischen Bereichen aber auch nahezu bei allen Konsumgütern, ob in der Elektronik, bei Automobilen, Lebensmitteln, Hygieneprodukten bzw. Hobby- oder Haushaltsgeräten [Rähse, 2010]. In der Landwirtschaft oder bei Mülldeponien werden Kunststoff-Folien ebenfalls in großen Mengen verwendet [Wortberg, Busmann, 2007]. Die Mikroelektronik und die Medizintechnik liefern Beispiele, für sehr anspruchsvolle Anwendungsgebiete [Wortberg, Busmann, 2007]. Kunststoffe stellen nach Stahl (über 1 Mrd. t pro Jahr) die mengenmäßig am häufigsten eingesetzten Werkstoffe dar. 38% der im Jahr 2008 produzierten 245 Millionen Tonnen Kunststoffe gingen in die Verpackungsindustrie [Rähse, 2010], [Plastics Europe, 2009]. Dort sind sie ein wesentlicher oder sogar unverzichtbarer Bestandteil nahezu jeder Verpackung in Form von Folien, Beuteln, Flaschen oder Tüten [Wortberg, Busmann, 2007].

Aufgrund der schlechten/fehlenden Abbaubarkeit mineralölbasierender Kunststoffe und den damit einhergehenden Entsorgungsproblemen sowie der Verknappung der Erdölressourcen gewinnen Folien aus nachwachsenden Rohstoffen eine immer größere Bedeutung [European Bioplastics, 2010]. Auch wenn diese in Zukunft vermutlich nicht alle auf Erdöl basierenden Kunststoffe ersetzen werden, können sie in bestimmten Anwendungsbereichen den Mineralölverbrauch reduzieren. Basierend auf der großen wirtschaftlichen Bedeutung synthetischer Kunststoffverpackungen und dem Bestreben nach ökologischer Nachhaltigkeit sowie der Möglichkeit, mit Hilfe von Verarbeitungshilfsmitteln, Funktionsadditiven, Stabilisierungsadditiven, Farben und Füllstoffen [Salchinger, 2009] die funktionellen Eigenschaften von Biokunststoff-Folien gezielt auf Anforderungen einstellen zu können, ergibt sich das große Potential der Biopolymere [European Bioplastics, 2010].

Für die Herstellung biobasierender Kunststoffe wurden bereits zahlreiche nachwachsende Rohstoffe pflanzlicher und tierischer Herkunft getestet [Rhim et. al., 1998]. So gibt es z.B. über Filme und Folien aus Gelatine zahlreiche Untersuchungen [Langmaier et. al., 2008], [Akin et. al., 1995], das Potential von nativem Kollagen als biologisch abbaubare Folie für Verpackungen außerhalb der Fleischindustrie blieb hingegen bisher nur wenig erforscht [Wolf et. al., 2006]. Dies verwundert, da Wursthüllen aus Kollagen als die kommerziell am erfolgreichsten Proteinfolien gelten [Embuscado et. al., 2009], [Han, 2005]. Es wird geschätzt, dass ca. 80% aller Wursthüllen aus tubulären Kollagenfolien bestehen [Amin, Ustunol, 2007], [American Meat Institute, 2000]. Neben seiner natürlichen Herkunft, Erneuerbarkeit und biologischen Abbaubarkeit bietet Kollagen den Vorteil, dass es als Beiprodukt der Leder-Produktion gut verfügbar, physiologisch unbedenklich und für die Nahrungsmittelindustrie zugelassen ist [Yamada, 1995].

Als Gründe für die Frage, warum das Potential dieses Materials bisher nicht stärker ausgeschöpft wurde bzw. weitere Anwendungsfelder für Kollagenfolien erschlossen wurden, werden zwei spezifische Eigenschaften des Materials angesehen: Zum einen die Tatsache, dass Kollagen, genauso wie andere Proteine, eine geringe Beständigkeit gegenüber Wasser aufweist, zum anderen, dass Kollagenmassen aufgrund ihrer tripelhelicalen Struktur hochviskos sind und sich daher nur schwer verarbeiten lassen. Die Verarbeitung wird überdies auch noch durch die in den Suspensionen enthaltenen Fasern erschwert.

Bezüglich der erstgenannten Problematik gibt es zwar Studien, die sich mit dem Effekt der Wasserabsorption auf mechanische Eigenschaften beschäftigen [Tanioka, et.al., 1973] oder

die die Wasserlöslichkeit von Kollagenfolien untersuchten [Amin, Ustuno, 2007], eine Literaturrecherche zeigte jedoch, dass es keine Studie gibt, welche systematisch versuchte, die Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien zu erhöhen.

Bei einem Kontakt mit Wasser verändern sich die Eigenschaften, was bis hin zur vollständigen Zerstörung der Folie führen kann. Für dieses Verhalten sind u.a. die alkalischen Aminogruppen sowie die Hydroxyl- und Carboxylgruppen verantwortlich [Reich, 1966], [Kanagy, 1950]. Durch chemische oder physikalische Modifizierung ist es möglich, diese unterschiedlichen Seitengruppen der Aminosäuren zu verändern und so die Eigenschaften der Proteinfohlen zu beeinflussen. Für eine Erhöhung der Wasserbeständigkeit durch eine inter- und intramolekulare Vernetzung kommen unterschiedliche Agenzien in Betracht, wie z.B. Aldehyde [Rhim et. al., 1998], [Amin, Ustuno, 2007], [Galiotta et. al., 1998] und Carbodiimide [Han, 2005]. Aber auch physikalische Methoden wie die UV- [Embuscado et. al., 2009] und dehydrothermale Vernetzung [Amin, Ustuno, 2007] wurden bereits angewendet. Angesichts dieser Tatsache verwundert es, dass es keine publizierten Untersuchungen gibt, die sich gezielt mit der Erhöhung der Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien beschäftigen.

Aufgrund der zweiten genannten Problematik, der schwierigen Verarbeitbarkeit von Kollagenmassen aufgrund ihrer hohen Viskosität, werden die meisten Kollagenfolien derzeit durch Extrusion einer Kollagensuspension in ein neutralisierendes Koagulationsbad erzeugt [Wang, Padua, 2003], [Krochta, 2002]. Auch Gießen und Tauchen sind denkbare Herstellungsmethoden. Die Herstellung von Folien und Überzügen aus nativem Kollagen mittels einer Sprühapplikation wurde bisher jedoch noch nicht untersucht bzw. publiziert und ist auch nicht Stand der Technik [Maser, 2010], Erk [2010]. Dies verwundert, da in vielen Anwendungsbereichen eine Applikation der Kollagenmassen durch Sprühen diverse Vorteile bieten würde. So ist zum Beispiel das Aufbringen von gleichmäßigen Überzügen auf große Geometrien nur mit Hilfe einer Sprühapplikation möglich.

Durch Kollagenfolien mit einer verbesserten Wasserbeständigkeit sowie einer neuartigen Applikationstechnik könnten neue Anwendungsgebiete erschlossen werden. Ein Beispiel für ein potentielles Anwendungsgebiet, in dem man nach neuartigen Lösungen als Alternative zu den bisher eingesetzten synthetischen Folien sucht, ist die Konservierung des Lackes von Neufahrzeugen für den Zeitraum des Transportes vom Hersteller bis zum Kunden. Neben einer Konservierung mit Wachs, die eine hohe Umweltbelastung beim Abwaschen mit sich bringt, haben sich hierzu vor allem Polyolefinfolien durchgesetzt [Braess, Seiffert, 2007]. Die Kosten für das manuelle Aufkleben der Folien betragen rund 35-40 Euro pro Auto. Die Audi AG würde allein 120 Mitarbeiter in drei Schichten benötigen, um alle Fahrzeuge, die in Ingolstadt produziert werden, abzukleben [Cordshagen, 2002], [Bartel, 2010]. Hinzu kommt der hohe Arbeitsaufwand beim Abziehen der Folien, was überdies die Gefahr des Verkratzens des Autolackes birgt. Eine sprühbare Folie, die mittels einer warmen Enzymlösung wieder abgewaschen werden kann, wäre hier die Lösung [Kunz, 2009].

Motivation für die in dieser Dissertation dargestellten Untersuchungen war die Entwicklung einer Kollagenfolie mit einer erhöhten Beständigkeit gegenüber Wasser, die darüber hinaus auch noch sprüh-applizierbar ist. Als Anwendungsbeispiel wurde eine Transportschutzfolie aus der Automobilindustrie gewählt, da hier Interesse besteht, die derzeitigen Schutzfolien durch natürliche Alternativen zu ersetzen [Bartel, 2010]. Anhand des konkreten Anwendungsbeispiels sollten die generierten Folien hinsichtlich ihrer chemischen und mechanischen Eigenschaften mit einer konventionellen, mineralölbasierenden Folie verglichen werden.

2 Zielsetzung, Methodik und struktureller Aufbau

In der Einleitung wurden potentielle Ursachen für das nur eingeschränkte Anwendungsfeld für biologisch abbaubare Folien auf Basis von nativem Kollagen genannt. Daraus ergaben sich zwei offene, wissenschaftliche Fragenstellungen. Als erstes stellte sich die Frage, in wie weit durch eine Vernetzung Einfluss auf die Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien genommen werden kann. Dies könnte ein wichtiger Schritt hin zur Erschließung neuer Anwendungsfelder außerhalb der Fleischindustrie darstellen. Zum zweiten stellte sich die Frage, ob es möglich ist, Kollagenmassen auch mittels eines Spritzverfahrens zu verarbeiten. Hierdurch würde u.a. die Erzeugung von Überzügen ermöglicht, was ebenfalls zur Erschließung neuer Anwendungsfelder führen könnte.

Übergeordnetes Ziel der vorliegenden Arbeit und der darin enthaltenen Publikationen war es, einen Beitrag zur Erschließung neuer Anwendungsfelder für Kollagenfolien außerhalb der Fleischindustrie zu finden. Hierzu sollte die Wasserbeständigkeit von Kollagen bzw. Kollagenfolien verbessert bzw. neue Verarbeitungsmethoden neben dem bisher dominierenden Extrusionsverfahren gefunden werden.

Thematisch bauen die im Rahmen der Dissertation erstellten Untersuchungen/Publikationen wie folgt aufeinander auf:

Publikation 1: *„Improving the water resistance of biodegradable collagen films“*.

Anlass für die unter diesem Titel veröffentlichten Untersuchungen waren die nur geringe Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien sowie die als lückenhaft zu bezeichnende Forschung hinsichtlich der gezielten Optimierung dieser Eigenschaft. Die Untersuchungen widmeten sich der Evaluierung geeigneter Maßnahmen zur Erhöhung der Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien unter Beibehaltung der biologischen Kompostierbarkeit. Methodisch umfassten sie zunächst die Bestimmung der durch den Werkstoff Kollagen vorgegebenen Beständigkeit von Kollagenfolien gegenüber Wasser. Im Folgenden wurden Möglichkeiten zur gezielten Einflussnahme auf die Wasserbeständigkeit auf Basis verschiedener Additive und Parameter beim Folienbildungsprozess evaluiert. Als Werkzeug zur Beurteilung der Wasserbeständigkeit wurden zwei Verfahren ausgewählt und miteinander verglichen bzw. die Grenzen dieser Verfahren herausgearbeitet.

Publikation 2: *“Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions”*

Der zweite Abschnitt befasst sich mit der Sprühbarkeit von faserhaltigen, nativen und viskosen Kollagensuspensionen. Die Entwicklung von neuen Verarbeitungstechnologien ist einer der Schlüssel zum Erfolg hinsichtlich der Substitution von herkömmlichen, synthetischen Kunststoffen durch biologisch abbaubare Materialien. Begründet wird dies mit den deutlichen Vorteilen, die Sprühapplikationen in vielen Bereichen mit sich bringen. Aufgrund der relativ hohen Viskosität von Kollagensuspensionen und der darin enthaltenen Fasern ist die Herstellung von Kollagenfolien bisher auf Extrusionsmethoden beschränkt. Daher wurde die Sprühbarkeit von Kollagensuspensionen verschiedener Viskositäten und Trockensubstanzgehalte mit unterschiedlichen Sprühgeräten und Düsengeometrien untersucht.

Publikation 3: „ *Physical and chemical properties of a packaging film based on collagen for non-food applications - A Comparison with a Conventional Plastic*”

Schließlich wurden Kollagenfolien anhand der gewonnen Erkenntnisse mit einer optimierten Rezeptur hergestellt. An einem konkreten Anwendungsbeispiel wurde Ihre Eignung zur Konservierung von Neufahrzeugen getestet und mit herkömmlichen Kunststofffolien verglichen. Hierzu wurden zunächst die Anforderungen an Folien bei der Endkonservierung von Neufahrzeugen in der Automobilindustrie sowie die derzeit eingesetzten Konservierungsmethoden herausgearbeitet. Die hergestellten Kollagenfolien wurden hinsichtlich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften anhand von DIN-Prüfmethoden untersucht. Die Ergebnisse der Charakterisierung der Kollagenfolien, sowie einer auf die gleiche Weise charakterisierten erdölbasierenden Kunststofffolie aus dem Transportschutz für Automobile, sind Bestandteil der dritten Publikation.

Abschließend werden die in den einzelnen Publikationen erhaltenen Ergebnisse übergreifend diskutiert und weitere Möglichkeiten zur Erreichung des übergeordneten Ziels vorgeschlagen sowie Perspektiven für weitere Arbeiten gegeben.

3 Stand des Wissens

Die Forderung nach biologischer Abbaubarkeit in ungiftige Endprodukte auf der einen Seite sowie die Verknappung der Erdölressourcen und die steigenden Abfallmengen auf der anderen Seite führen dazu, dass der Verpackungsfolien-Markt nach Alternativen zu herkömmlichen, synthetischen Kunststoffen sucht. Man rechnet damit, dass rund 90% der aus Öl bzw. Gas hergestellten Kunststoffe auf erneuerbare Rohstoffe umgestellt werden könnten [European Bioplastics, 2010]. Kunststoffe auf Basis nachwachsender Rohstoffe bezeichnet man als Biokunststoffe. Eine allgemein anerkannte Definition des Begriffs Biokunststoff existiert jedoch nicht. Die European Bioplastics unterscheiden zwei Biokunststoff-Klassen [European Bioplastics, 2010]:

1. Kunststoffe, die auf Basis nachwachsender Rohstoffe hergestellt werden, aber nicht notwendigerweise biologisch abbaubar bzw. kompostierbar sein müssen. Der Anteil an nachwachsenden Rohstoffen muss dabei mindestens 20 % betragen.
2. Alle nach EN 13432 / EN 14995 biologisch abbaubaren Kunststoffe, wobei die Abbaubarkeit von vollständig bis schwer abbaubar reichen kann. Diese Definition schließt auch bestimmte biologisch abbaubare, erdölbasierende Kunststoffe ein.

Als alternative Rohstoffbasis für die Produktion von Verpackungsfolien neben fossilen Rohstoffen können chemisch auf Basis von erneuerbaren Ressourcen synthetisierte oder aber durch Mikroorganismen produzierte Substanzen sowie direkt extrahierbare Substanzen (Polysaccharide, Lipide oder Proteine pflanzlicher, mikrobieller oder tierischer Herkunft) genutzt werden (s. Abb. 1) [Warken-Kopatz, 2007] [Schneider et. al., 2005].

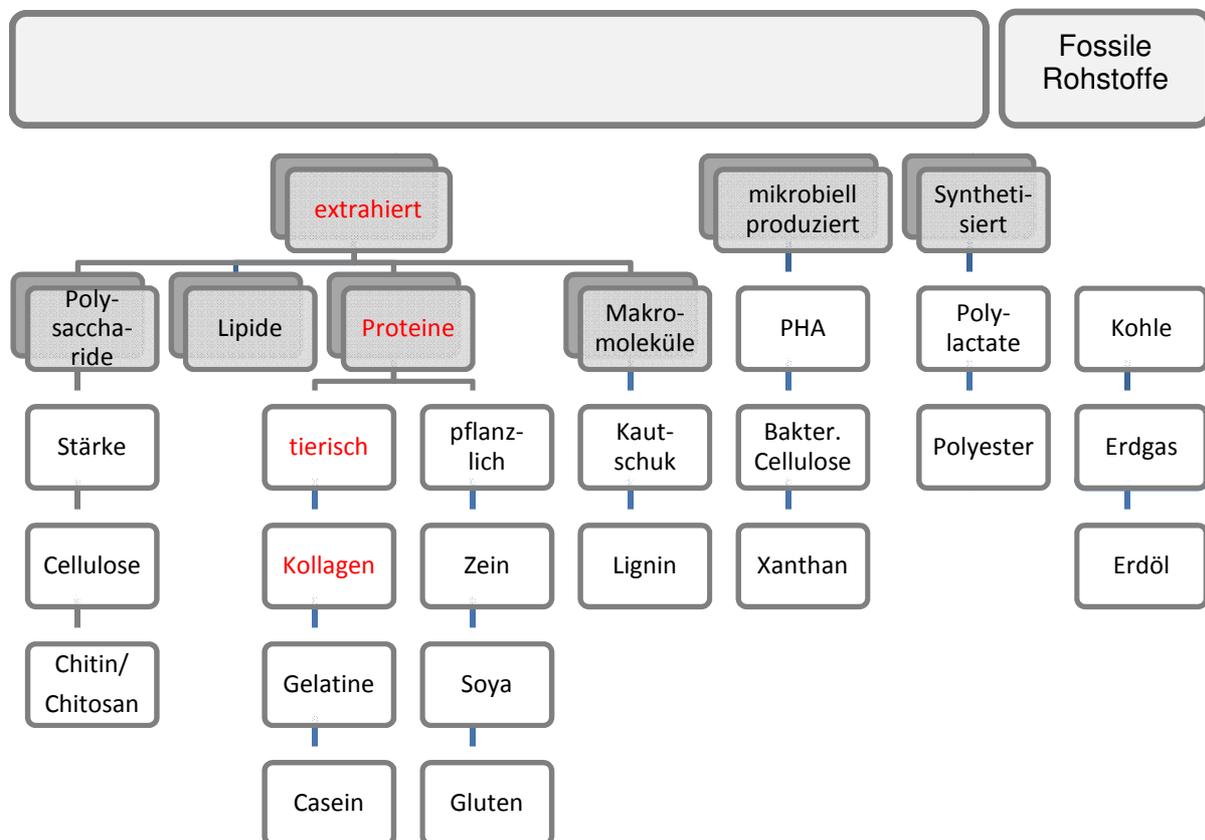


Abbildung 1: Rohstoffe für die Biokunststoffproduktion [nach European Bioplastics, 2010]

Am Markt gibt es Biokunststoffe [European Bioplastics, 2010], die sich weder von ihren Gebrauchseigenschaften noch von ihrem Aussehen von den Mineralöl-basierenden Massenkunststoffen (Polyethylen, Polypropylen oder Polystyrol) unterscheiden. Ihre technischen Eigenschaften können sich stark voneinander unterscheiden. Im Verpackungssektor, so die Studie weiter, sind bereits kompostierbare Bioabfallbeutel aus Polymilchsäure oder Stärke verbreitet, im medizinischen Bereich sind vor allem Implantate und Operationsmaterial zu nennen, im Garten- und Landschaftsbau bieten Biokunststoffe durch ihre Kompostierbarkeit einen Mehrwert gegenüber herkömmlichen Materialien, wo hingegen die industrielle Nutzung von Proteinen bisher hauptsächlich auf die Lebensmittelindustrie konzentriert ist [European Bioplastics, 2010].

3.1 Das Biopolymer Kollagen

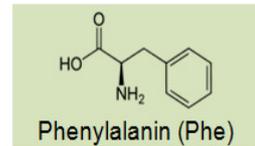
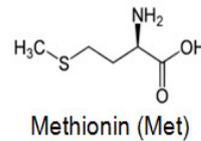
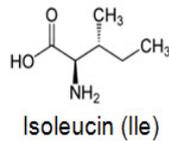
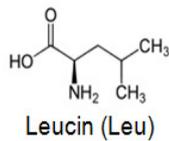
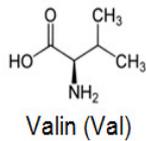
Eine Rohstoffgruppe mit stark wachsendem wissenschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse stellen die Proteine dar. Welches Potential dabei das Protein Kollagen mit sich bringt, soll im Folgenden näher erläutert werden.

3.1.1 Vorkommen und Struktur

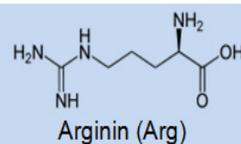
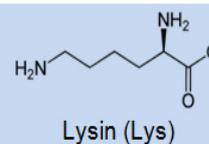
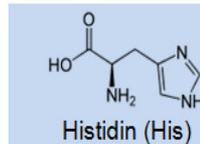
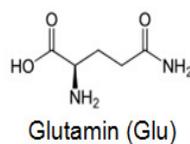
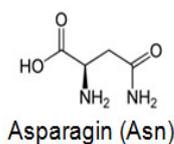
Kollagen ist der wichtigste Faserbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Zähnen [Abke, 2003], [Stryer, 1990], [Nimni, 1995], [Bailey, Paul, 1998]. Es gibt mehr als 25 verschiedene Arten von Kollagenen [Reich, 1966], [Maser, 2010]. Die Grundstruktureinheit des Kollagens, das Tropokollagen, besteht aus einer dreisträngigen Helix, die sich aus drei alpha-helikalen Peptidketten etwa gleicher Größe zusammensetzt. Tropokollagen ist ein Stäbchenmolekül von etwa 300 nm Länge und einer Dicke von etwa 1,5 nm. Die Zusammensetzung hängt vom Typ des Kollagens ab. Das in der Arbeit verwendete Kollagen des Typs 1 besteht aus zwei unterschiedlichen Ketten, von denen eine doppelt vorhanden ist. Die Ketten setzen sich aus 20 über Peptidbindungen verknüpfte, natürlich vorkommende Aminosäuren mit unterschiedlichen Seitengruppen (hydrophil, hydrophob, neutral, aromatisch) zusammen (siehe Abb. 2). Diese Aminosäuren spielen eine entscheidende Rolle bei der Vernetzung von Kollagenmolekülen (siehe hierzu Kapitel 3.2). Die Reihenfolge der Aminosäuren bezeichnet man als Sequenz (Primärstruktur). Charakteristisch für das Kollagenmolekül ist der hohe Anteil an Glycin (an jeder dritten Stelle) und Prolin sowie das Vorkommen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin in der Aminosäuresequenz (siehe Abb. 1) [Reich, 1966]. Der hohe Anteil an der Aminosäure Glycin (fast ein Drittel) begründet u.a. die kompakte Struktur des Kollagens. Aufgrund unterschiedlicher Anziehungskräfte und Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carbonylsauerstoff einer Peptidbindung und Aminogruppe einer um 4 Positionen entfernten Peptidbindung) bildet sich aus dieser Primärstruktur die Sekundärstruktur (α -Helix) (s. Abb. 3). Drei dieser α -Helices winden sich umeinander und bilden die sogenannte Triple-Helix (Tertiärstruktur). Diese wird durch die Ausbildung von kovalenten und nicht-kovalenten Bindungen (Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den peptidischen CO- und NH-Gruppen, hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen) stabilisiert (s. Abb. 3). Schließlich kommt es zur Ausbildung der Quartärstruktur aufgrund von Wechselwirkungen zwischen Proteinmolekülen (s. Abb. 3 und 4) [Damodaran, 1997]. Die übergeordnete Struktureinheit des Kollagens, die Kollagenfaser oder Kollagenfibrille entsteht dabei aus

vielen Tropokollagenmolekülen durch eine gestaffelte Anordnung, wie sie in Abbildung 1 zu sehen ist. In einer Reihe sind die einzelnen Moleküle durch 40 nm breite Lücken voneinander getrennt und zur benachbarten Reihe um 68 nm versetzt, was zu den charakteristischen Querstreifen führt [Abke, 2003], [Stryer, 1990], [Nimni, 1995], [Bailey, Paul, 1998].

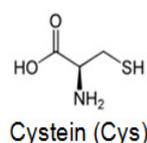
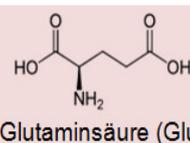
Aminosäuren mit hydrophoben Resten



Aminosäuren mit hydrophilen Resten

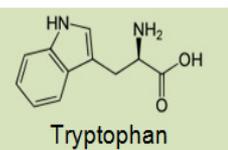
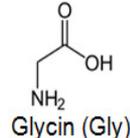
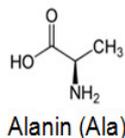


Basische Aminosäuren



Saure Aminosäuren

Neutrale Aminosäuren



Aromatische Aminosäuren

Abbildung 2: natürlich vorkommende Aminosäuren mit ihren charakteristischen Seitenketten, die bei der natürlichen und künstlichen Vernetzung genutzt werden (nach [www.zum.de, 2012])

Neben den Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt bei den Kollagenfasern eine zusätzliche Stabilisierung durch kovalente Quervernetzungen, die nach der Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle gebildet werden (s. Abb. 3) [Abke, 2003], [Stryer, 1990], [Nimni, 1995], [Bailey, Paul, 1998]. Die resultierenden chemischen Strukturen sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt [Abke, 2003], [Stryer, 1990], [Nimni, 1995], [Bailey, Paul, 1998].

Ab einer bestimmten Temperatur beginnen die Bindungen aufzubrechen und aus den stäbchenförmigen Molekülen entstehen ungeordnete Knäuel. Man bezeichnet die Temperatur, bei der 50 % der Struktur zerstört ist, als Schmelztemperatur T_m oder Denaturierungstemperatur [Abke, 2003], [Maser, 2010], [Stryer, 1990], [Nimni, 1995], [Bailey, Paul, 1998].

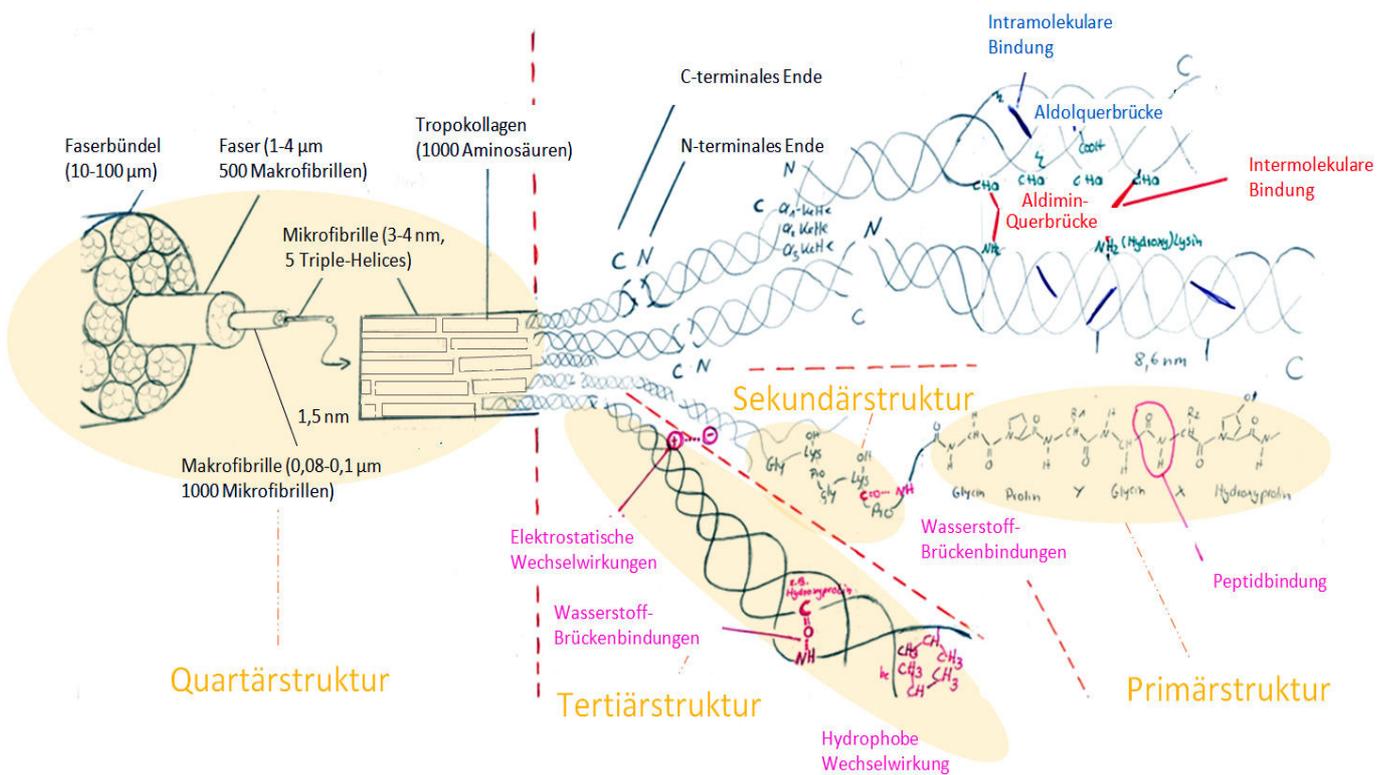


Abbildung 3: Kollagenstruktur: Ausbildung von Bindungen und Interaktionen (nach [Zhang, Zeng, 2008], [Frohberg, 2010], [Zeeman, 1998], [Friess, 1997], [www.unifr.ch, 2012])

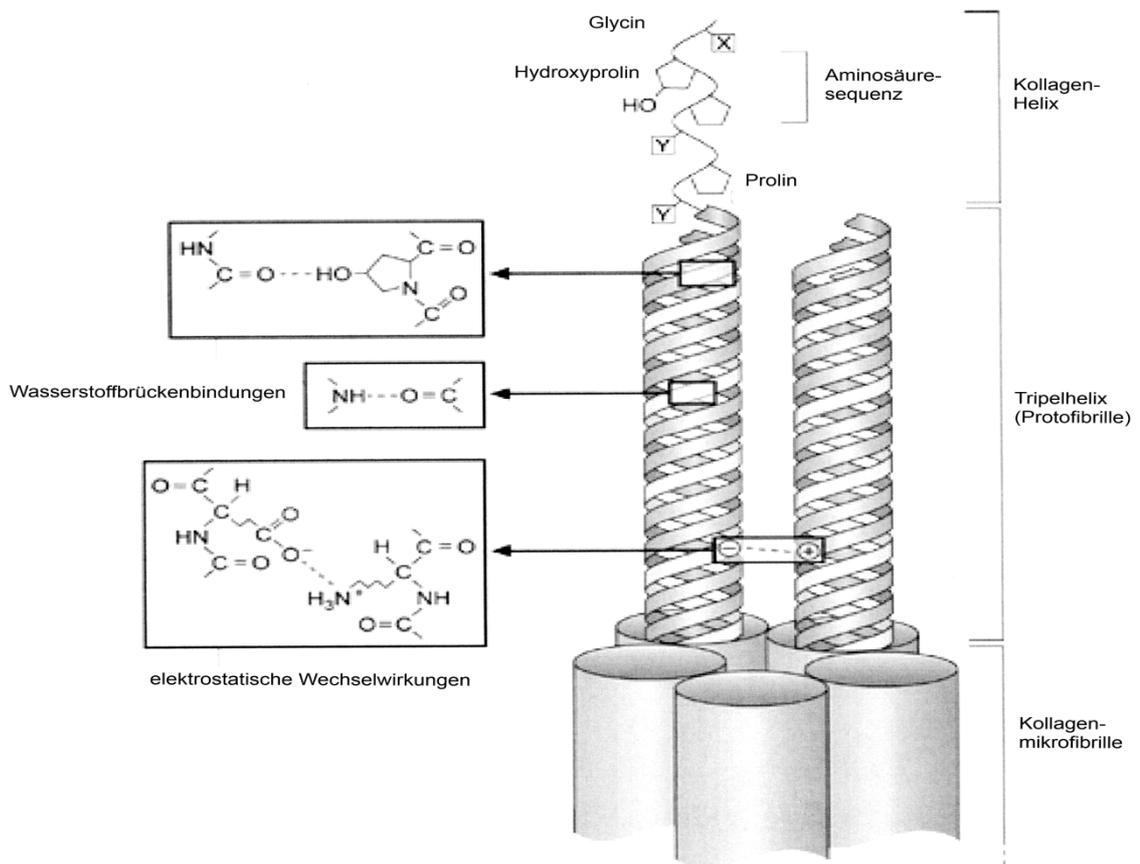


Abbildung 4: Kollagenstruktur [Fehlberg, 2009]

3.1.2 Kollagenmassen-Herstellung

Kollagengrundmassen können gebrauchsfertig von der Firma Naturin bezogen werden. Diese Massen haben folgende Aufbereitungsschritte durchlaufen: zunächst werden die Häute im Schlachthof von den Tierkörpern abgezogen. In der Gerberei werden die Häute enthaart, dabei wird die Rinderhaut zur sogenannten „Blöße“. Außerdem findet dort ein mechanisches Spalten der Blöße in ihrer Fläche in den haarseitigen Narbenspalt und den fleischseitigen Fleischspalt (Abb. 5) statt. Ersterer wird in der Lederindustrie weiterverarbeitet, letzterer geht nach einer Prüfung durch einen Veterinär überwiegend in die Lebensmittelindustrie zur Gelatine bzw. Kollagen-Wursthüllenherstellung. Für die Wursthüllenherstellung wird der Spalt zunächst gewaschen. Es folgt ein alkalischer Aufschluss mit Natronlauge von 16 h bis 1 Woche. Durch die anschließende Säuerung mit HCl (auch andere Säuerungen mit Milch- bzw. Phosphorsäure sind möglich) wird der Hautaufschluss abgebrochen und der pH-Wert auf ca. pH 3 eingestellt. Bei dem resultierenden Material spricht man von „Schwarten“. Darauf folgt eine mechanische Zerkleinerung (siehe Abb. 6) sowie das Einstellen eines definierten Trockenstoffgehaltes (siehe Abb. 8) und Zugeben von Zusatzstoffen, wie z.B. Glycerin als Feuchthaltemittel [Maser, 1996].

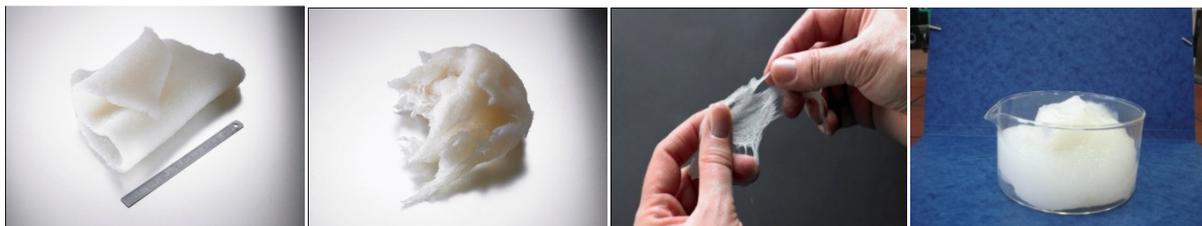


Abbildung 5 bis 8: Rinderspalt, gewolfte Masse (TK = 12%), Demonstration der Faserstruktur, Kollagengrundmasse mit eingestelltem TK [Naturin, 2010]

Das aufbereitete Material ist ein viskoelastisches Gel mit faserigen Bestandteilen (siehe Abb. 7), das die Zähigkeit eines Teiges oder eines dünnflüssigen Sirups hat und weitestgehend aus nativem (intakte Tripelhelixstruktur) Kollagen besteht. Die Farbe ist weißlich-opak. Das Material wird zu Folien extrudiert und getrocknet [Maser, 1996].

3.1.3 Abgrenzung Kollagen – Gelatine

Prinzipiell ist es schwierig, zwischen „sehr weit aufgeschlossenem“ Kollagen und Gelatine zu unterscheiden. Von Gelatine spricht man bei denaturiertem bzw. hydrolysiertem Kollagen. Je nach Herstellungsverfahren unterscheidet man zwischen Gelatine vom Typ A bzw. B. Während für die Herstellung von Gelatine des Typs B ca. 4-monate lang Kollagenspalt in 1 %-iger NaOH aufgeschlossen wird und sich daran das sogenannte "Sudkochen" und Extraktion bei Temperaturen zwischen 50 und 100 °C anschließen, wird bei der Aufbereitung von Kollagenmassen die Temperatur immer unter 30 °C gehalten und der Aufschlussprozess dauert nur 16 h bis max. 1 Woche. Das so behandelte Kollagen gilt als weitgehend nativ, da die tripelhelikale Struktur weitgehend (wenn auch wahrscheinlich nicht zu 100 %) erhalten ist [Maser, 2010].

Aus den unterschiedlichen Aufbereitungsschritten ergeben sich die folgenden Unterschiede [Maser, 2010]: Über die oben beschriebene Hydrolyse des Kollagens entsteht Gelatine, ein heterogenes Gemisch aus Proteinfractionen mit einem Molekulargewicht von ca. 15.000–

250.000 g/mol [Falbe, Regnitz, 1989-1992]. Man unterscheidet „hochbloomige“ von „niederbloomigen“ Gelatinen, erstere können noch Tropokollagen-Moleküle enthalten, wobei fraglich ist, inwieweit die Tripelhelix in diesen Trimeren noch über den gesamten Bereich intakt ist [Maser, 2010].

Gelatinen sind in warmem Wasser löslich, währenddessen intaktes Rinderhautkollagen sich weder in warmem Wasser noch in irgendeinem anderen Lösungsmittel unzerstört lösen lässt. Vor allem bei junger Haut gibt es allerdings doch geringe lösliche Anteile, die mit zunehmendem Alter aufgrund fortschreitender Quervernetzung immer weniger werden. In heißem Wasser wird es allmählich zerstört und vollzieht den Übergang zur Gelatine.

Aufgrund der Unlöslichkeit des Kollagens lässt sich keine klassische Molekulargewichtsbestimmung durchführen und man spricht von Suspensionen anstelle von Lösungen [Maser, 2010].

Im Bezug auf die Wursthüllen bietet Kollagen durch die Kollagenfasern einer Art Armierung, die zu einer guten mechanischen Festigkeit der Folien führt. Dies lässt sich auch mit Hilfe einer künstlichen Quervernetzung mit Gelatinen nicht erreichen, weswegen bei der Wursthüllen-Herstellung keine Gelatine zum Einsatz kommt. Außerdem hat Kollagen eine wesentlich höhere hydrothermale Stabilität, so dass es sogar Brühprozesse übersteht [Maser, 2010]. Ein weiterer Unterschied besteht in der schlechteren mikrobiellen Angreifbarkeit von Kollagen bedingt durch die intakte tripelhelikale Struktur.

3.1.4 Stand der Technik

Neben der Verarbeitung von Kollagen bei der Lederherstellung [Abke, 2003] wird Kollagen als Rohstoff für die Herstellung von Wursthüllen, Klebstoffen und Gelatineprodukten eingesetzt. Zunehmend wird es auch für biomedizinische Produkte und in der Medizin als chirurgisches Nahtmaterial, Transplantationsmaterial bzw. in Form von Schwammgebilden bei der Wundabdeckung und Kosmetika [Bräumer, 1974], [Ponten, Nordgaard, 1976], [Abke, 2003], [Nimni, 1995], [Li, 1993], [Henry et. al., 2007], [Hsiu-Ho et. al., 2010] angewendet. Schwerpunkt ist aber seit den 1920er Jahren die Herstellung von Lebensmitteln, insbesondere essbarer Folien für die Verpackung von Fleischprodukten [Krochta, De Mulder, 1997], [Chvapil, 1977]. Seit den 1960ern gibt es essbare Kollagenüberzüge [Grennadios, 2002], die in tubulärer Form als „Wursthülle“ (Abb. 9) oder als Flachfolie (Abb. 10) bei der Herstellung von gekochtem Schinken im Netz genutzt werden [Naturin, 2010], [Fabryka Oslonek, 2010].



Abbildung 9 und 10: Kollagenfolien als Wursthüllen [Naturin, 2010] und für die Schinkenherstellung

3.2 Vernetzung von Kollagen - Einfluss auf die Wasserbeständigkeit

Kollagen weist eine hohe Affinität zu Wasser auf [Yamada et. al. 1995]. Bei einem Kontakt nimmt Kollagen das Wasser in Form von gebundenem Wasser (Kristallwasser) und Kapillarwasser auf [Hamaguchp et. al., 2003]. Durch die Wasseraufnahme verändern sich die Eigenschaften von aus Kollagen hergestellten Folien, was bis zur vollständigen Zerstörung der Folien führen kann. Verantwortlich für dieses Verhalten sind basische Aminogruppen und Hydroxylgruppen sowie Carboxylgruppen (siehe Abb. 2) [Reich, 1966], [Kanagy, 1950].

In der Literatur werden unterschiedliche Begriffe für das Verhalten von Kollagen bei Kontakt mit Wasser verwendet, wie z. B. Wasserbeständigkeit [Hamaguchp et. al., 2003], [Pena et. al., 2010], Wasserlöslichkeit [Sothornvit et. al., 1985], [Kim et. al., 2001], Galiotta et. al., 1998], Wasserabsorption [Tanioka et. al., 1973], [Reich, 1966], Wasser-Abstoßung [Sothornvit et. al., 1985] oder Wasser-Permeabilität [Pena et. al., 2010], Pol et. al., 2002], [Liu et. al., 2006], [Sobral et. al., 2001], die darüber hinaus oftmals nicht klar definiert werden. In dieser Arbeit wurde daher der Begriff Wasserbeständigkeit wie folgt definiert:

Die Wasserbeständigkeit ist die Eigenschaft von Folien und Filmen, sich bei Berührung mit Wasser nicht oder nur zu einem bestimmten Prozentsatz aufzulösen.

Tanioka et. al. (1973) haben den Effekt der Wasserabsorption auf die mechanischen Eigenschaften bzw. Amin und Ustunol (2007) die Löslichkeit von Kollagenfolien untersucht. Pukhova et. al. (1978) erforschten den Einfluss von Cr_2O_3 auf die Wasserbeständigkeit von Kollagenfasern während des Spinn-Prozesses. Forschungsarbeiten mit dem Ziel einer systematischen Erhöhung der Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien existieren jedoch nicht.

Neben einer Erhöhung der Wasserbeständigkeit von Proteinfohlen über das Einarbeiten von hydrophoben Materialien [Kim, Ustunol, 2001], wie z.B. Olivenöl [Liu et.al., 2006] und das Coating mit Zein [Pol et.al., 2002] kann vor allem durch unterschiedliche chemische oder physikalische Modifizierungen, basierend auf den verschiedenen Aminosäuren mit unterschiedlichen Seitengruppen (siehe Abbildung 2 und 3) Einfluss auf die Eigenschaften, wie die Affinität zu Wasser, genommen werden.

Für eine Erhöhung der Wasserbeständigkeit durch eine inter- und intramolekulare Vernetzung kommen unterschiedliche Agenzien in Betracht, wie z.B. Aldehyde [Rhim et. al, 1998], [Embuscado, Huber, 2009], [Amin, Ustunol, 2007], [Galiotta et. al., 1998] und Carbodiimide [Han, 2005]. Durch diese Reagenzien kommt es zur Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks aufgrund kovalenter Brücken zwischen den Proteinketten. Aber auch physikalische Methoden wie die UV- [Embuscado, Huber, 2009] und dehydrothermale Vernetzung [Amin, Ustunol, 2007] werden zur Erzeugung von künstlichen Vernetzungen angewendet. Diese führen jedoch zu weniger stabilen Bindungen [Stachel et. al., 2010].

3.2.1 Bildung von Vernetzungen auf natürlichem Wege

Bei einer Vernetzung auf natürlichem Wege wandelt das Enzym Lysyloxidase bestimmte Aminogruppen (Lysin, Hydroxylysin) des Kollagenmoleküls in Aldehydgruppen (s. Abb. 11) um [Kling, 2009].

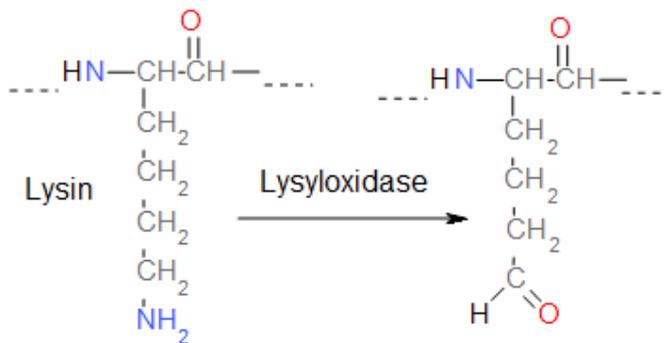


Abbildung 11: Umwandlung von Lysin-Amino- in Aldehydgruppen durch Lysyloxidase (nach [Kling, 2009])

Die Lysin- und Hydroxylysin-Reste reagieren entweder a) mit ϵ -Aminogruppen von Aminosäuren unter Aldiminbildung (intermolekular) oder b) spontan mit benachbarten Aldehydgruppen in einer Aldolkondensation (intramolekular) (siehe Abb. 3) [Hollmach, 2000], [Stryer, 1990], [Patent DE68927525T2, 1997].

a) Aldiminbildung

Intermolekulare Vernetzungen werden zwischen peptidgebundenen Aldehyden und Aminogruppen anderer Lysin- und Hydroxylysin-Reste gebildet (s. Abb. 3 und 12). Die Quervernetzung führt zur Bildung von unlöslichem Kollagen (unterhalb von Temperaturen von 80 °C) [Fehlberg, 2010], [Maser, 2010].

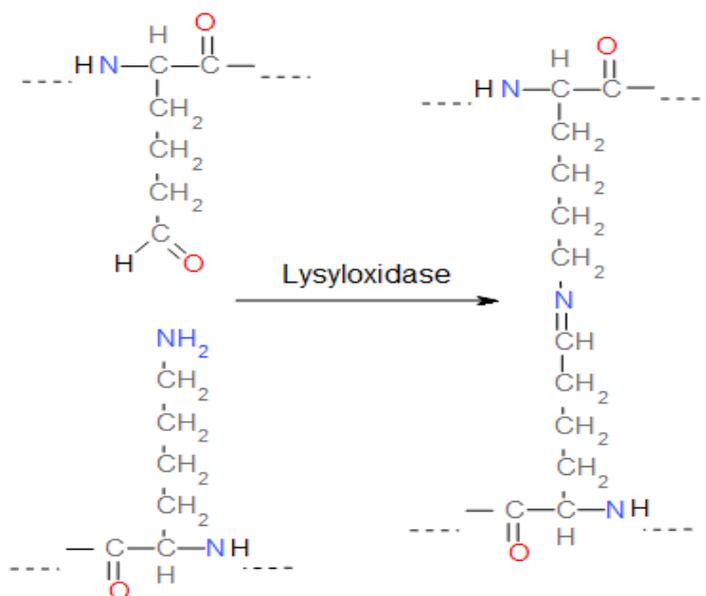


Abbildung 12: Vereinfachte Darstellung der Aldiminbildung (nach [Kling, 2009])

b) Aldolkondensation

Zunächst findet eine oxidative Desaminierung von Lysin- und Hydroxylysin-Resten zu peptidgebundenen Aldehyden statt. Die tatsächliche Vernetzungen erfolgt spontan über eine nicht-enzymatische Aldol-Kondensation, bei der die Lysin-Reste, zu Aldehyden umgewandelt werden (s. Abb. 3 und 13)) [Hollmach, 2000], [Stryer, 1990], [Patent DE68927525T2, 1997].

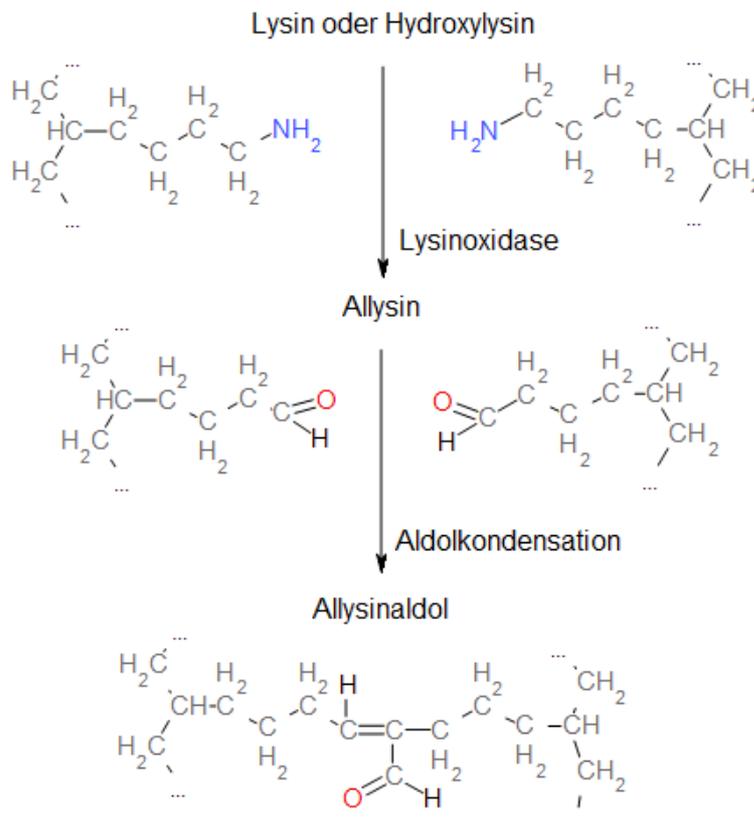


Abbildung 13: Natürliche Quervernetzungen im Kollagen, intramolekular (nach [Abke, 2003], [Nimni, 1995], [Li, 1993])

Während in vielen anderen Proteinen über Disulfid-Brücken kovalente Verbindungen entstehen sind im Kollagen Lysin- und Histidin-Reste kovalent miteinander verknüpft. Durch die Reaktion von Allysine mit Histidin (s. Abb. 15) können bis zu vier Seitenketten kovalent miteinander verbunden werden (s. Abb. 14). Diese Verknüpfungen treten besonders häufig an den Enden der Kollagen-Moleküle auf [www.chemgapedia.de, 2010].

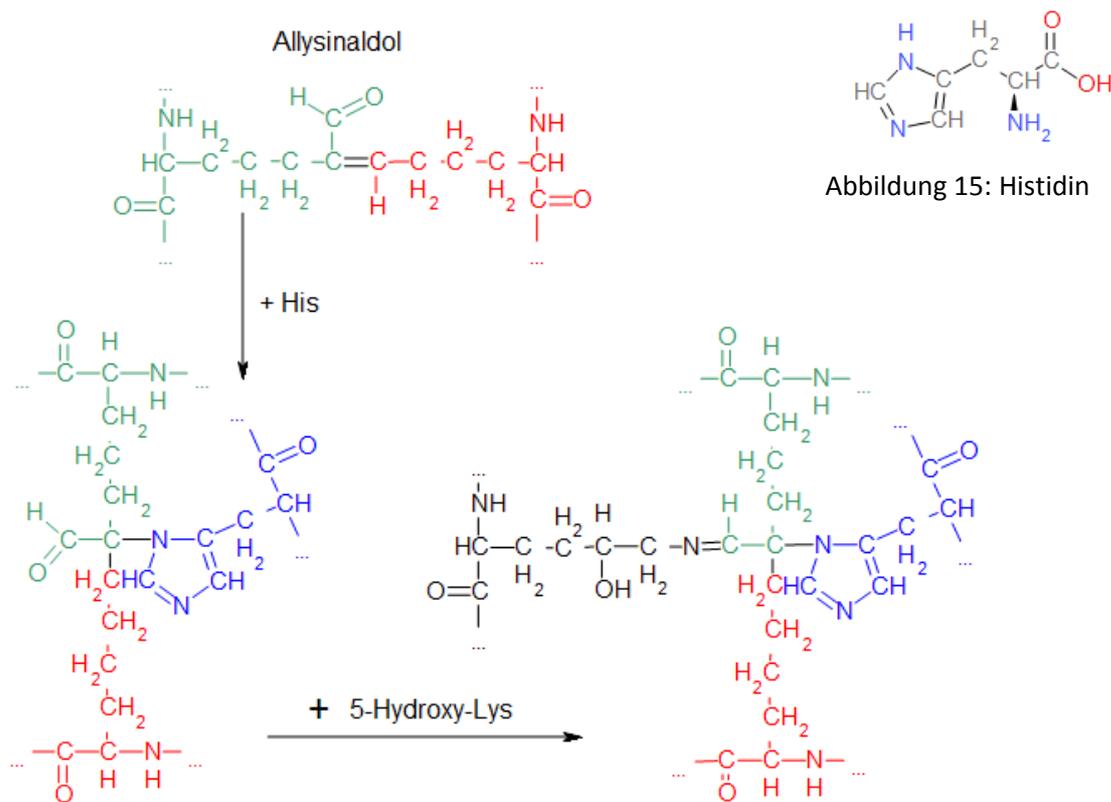


Abbildung 14: Die kovalenten Verknüpfungen im Collagen [www.chemgapedia.de, 2010]

3.2.2 Bildung von Vernetzungen auf künstlichem Wege

Im Falle eines Kontakts der Folien mit Feuchtigkeit in Form von Regen, Schnee, Hagel, Nebel oder Luftfeuchtigkeit wird das Wasser teils chemisch als Hydratwasser und teils kapillar als Kapillarwasser [Hamaguchp et. al., 2003] aufgenommen, wodurch sich die Eigenschaften der Folien ändern und die Folie als solche vollständig zerstört werden kann [Audic, Chaufer, 2010]. Mit dieser Zerstörung geht sogleich die Schutzwirkung der Folien verloren.

Für die Hydrophilie des Roh-Kollagens sind basische Aminogruppen sowie Carboxyl- und Hydroxylgruppen verantwortlich (siehe Abb. 2) [Reich, 1966], [Kanagy, 1950]. Gerade diese unterschiedlichen Seitengruppen können jedoch dazu genutzt werden, über chemische, physikalische oder enzymatische Vernetzungsverfahren die Wasserbeständigkeit zu verbessern [Reich, 1966], [Audic, Chaufer, 2010], [Rhim et. al., 1998], [Embuscado, Huber, 2009]. Letzteres Verfahren konnte jedoch bisher nur bei partiell oder vollständig denaturiertem Kollagen erfolgreich angewendet werden [Stachel et al., 2010].

In der recherchierten Literatur existieren keine vergleichenden Untersuchungen gängiger Quervernetzungsmethoden für Kollagen mit identischen Bedingungen und Ausgangsmaterialien, deren Fokus darüber hinaus auf der Erhöhung der Wasserbeständigkeit liegt [Abke, 2003].

Die den unterschiedlichen Vernetzungsverfahren zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen sollen in den folgenden Abschnitten dargestellt werden.

3.2.2.1 Vernetzung von Kollagen durch physikalische Methoden

Zu den physikalischen Vernetzungsverfahren zählen [Abke, 2003], [Khor, 1997], [Bubnis, Ofner, 1992], [Weadock et.al., 1995]:

- a) Vernetzung durch ionisierende Strahlung
- b) Vernetzung durch UV-Strahlung (254 nm)
- c) Thermische Vernetzung (Dehydrothermalverfahren) bei 100-110°C unter Vakuum

Zu a) Ionisierende Strahlung

Die Folgen ionisierender Strahlung sind zum einen Vernetzungen von Imin- und Aldolbindungen aufgrund einer oxidativen Desaminierung, sowie die Bildung freier Radikale, die kovalente Brücken erzeugen können. Bei zu hoher Energiezufuhr kann es zu Hydrolyse- oder Denaturierungseffekten kommen [Ganieu, 1998].

Zu b) UV-Strahlung

Durch die UV-Strahlung werden in den aromatischen Resten von Phenylalanin und Tyrosin (siehe Abb. 2), (Aminosäuren, die nur selten im Kollagen vorkommen) freie Radikale gebildet, die untereinander zu Quervernetzungen abreagieren. Diese Reaktion läuft sehr schnell ab. Es besteht die Gefahr der Fragmentierung [Abke, 2003], [Khor, 1997], [Bubnis, Ofner, 1992], [Weadock et.al., 1995]

Zu c) Temperatur

Genau genommen wird die dehydrothermale Vernetzung von chemischen Reaktionen begleitet. Beim Dehydrothermalverfahren wird dem Kollagen unter Vakuum bei erhöhter Temperatur Wasser entzogen. Dadurch entstehen aus freien Carbonsäuren und Aminogruppen neue Amidbindungen, die zu einer Stabilisierung des Moleküls führen. Um eine vollständige Umsetzung zu erreichen ist allerdings eine Reaktionszeit von mehreren Tagen notwendig [Abke, 2003], [Khor, 1997], [Bubnis, Ofner, 1992], [Weadock et.al., 1995], [Weadock et. al, 1983-1984].

Eine alternative Route wird in der Bildung von Lysinoalanin durch Addition der ϵ -Aminogruppe eines Lysylrestes an die Doppelbindung von Dehydroalanin, das wiederum zuvor durch Wasserabspaltung aus Serin entstanden ist, gesehen. Es gibt aber auch Hinweise auf andere Mechanismen [Kopp, et al, 1989], [Gorham, et al, 1992]. Etwa 745 der 3156 Reste des Kollagenmoleküls sind an diesen Reaktionen beteiligt [Weadock et. al., 1983-84].

Bewertung:

Vorteil der physikalischen Vernetzung ist vor allem, dass keine physiologisch bedenklichen Substanzen eingesetzt werden [Abke, 2003], [Khor, 1997], [Bubnis, Ofner, 1992], [Weadock et.al., 1995]. Makroskopisch kommt es dabei zu einer Zunahme der mechanischen Festigkeit und einer verbesserten hydrothermalen Beständigkeit. Bei falscher Prozessführung kann es jedoch auch zu Hydrolyse- Denaturierungs- und Fragmentierungseffekten kommen [Maser, 2010], [Ganieu, 1998], [Abke, 2003]. Während Vernetzungsreaktionen mittel Strahlung sehr schnell ablaufen, sind bei dem Dehydrothermalverfahren lange Reaktionszeiten erforderlich.

3.2.2.2 Chemische Vernetzung von Kollagen

Angriffspunkt für die meisten chemischen Vernetzungen (inter- und intramolekulare Vernetzungen) sind die ϵ -Aminogruppen der Lysin- und Hydroxylysinreste (s. Abb. 16a) und die Carboxylgruppen der Asparagin- (s. Abb. 16b) und Glutaminsäure (s. Abb. 16c) [Abke, 2003].

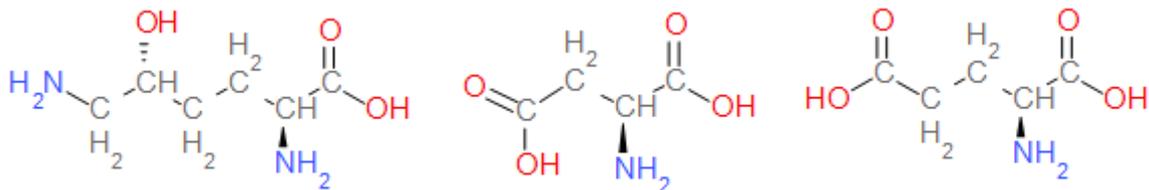


Abbildung 16 a-c: Hydroxylysin

Asparaginsäure

Glutaminsäure

Eine chemische Vernetzung kann dabei durch folgende Reagenzien erfolgen:

- Reagenzien, die eine Bindung zwischen zwei freien Aminogruppen oder auch Amid- oder Guanidinogruppen ermöglichen. Zu diesen Reagenzien gehören Aldehyde. Meist werden zwei Aminogruppen oder eine Amino- und eine Amidgruppe miteinander über unterschiedlich lange Brücken des im Polypeptid verbleibenden Vernetzers verknüpft [Renner, 2003], [Abke, 2003], [Khor, 1996].
- Reagenzien, die durch Aktivierung der freien Carboxylgruppen zu einer Neubildung von Amidbindungen führen (z.B. Carbodiimide)
- Reagenzien, die durch eine Komplexbildung mit den Carboxylgruppen des Kollagens eine Vernetzung bewirken (z.B. Gerben mit Chrom-(III)-Salzen).

Zu a) Reagenzien, die eine Bindung zwischen zwei freien Aminogruppen ermöglichen

Primär verantwortlich für die Vernetzung von Kollagen mit Aldehyden sind die freien Lysin- ϵ -Amino-Gruppen, die zur Bildung von Schiff'schen Basen (Aldimin-Vernetzungen, s. Abb. 11) führen, neben anderen Bindungen mit untergeordneter Relevanz [Marquie', 2001], [Kling, 2009], [Patent DE68927525T2, 1997]. Die Vernetzung von Kollagen mit Aldehyden wurde in der Literatur bereits vielfach beschrieben. Bowes und Cater vernetzten z.B. Kollagen mit Formaldehyd, Glyoxal und Glutaraldehyd. Aldehyde werden darüber hinaus erfolgreich zur Vernetzung anderer Proteine eingesetzt, wie z.B. Gluten [Micard et. al., 2000], und Molkenprotein [Galiotta et al. 1998]. Bowes und Cater [1968] beobachteten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Stabilität der eingeführten Bindungen bei der Vernetzung von Kollagen mit den genannten Aldehyden unter optimalen pH-, Konzentrations- und Temperaturbedingungen [Bowes, Cater, 1968], [Tibbet et. al., 2004].

Formaldehyd (Aldehyd)

Formaldehyd ist das am längsten verwendete und bekannteste Reagenz zur Vernetzung von Kollagen [Khor, 1996]. Es reagiert als Methylenglycol (Formaldehyd in Wasser) Lysin-

unspezifisch [Marquie', 2001] mit einem freien Amin des Kollagens (siehe Abb. 2 und 3) zu Kollagen-Imin und dann weiter mit einem Amid oder einem weiteren Amin. Es verbleibt eine C1-Brücke im Polypeptid (siehe Abb. 17). Die Vernetzung verläuft sehr langsam (Tage) und resultiert in instabilen, teilweise reversiblen Verknüpfungen [Renner, 2004], [Khor, 1996]. Bedino [2003] beobachtete eine steigende Reaktivität des Formaldehyds mit sinkendem pH-Wert, vor allem bei pH-Werten von 6,5 oder weniger.

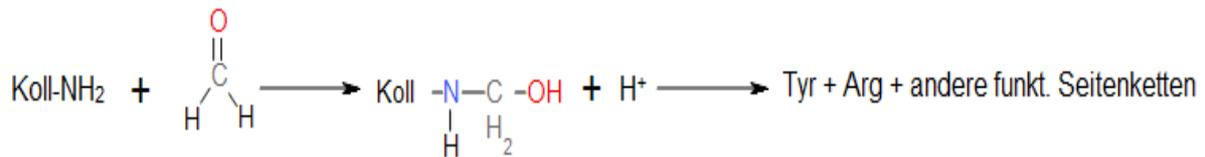


Abbildung 17: Vernetzung von Kollagen mit Formaldehyd [Maser, 2010]

Glutaraldehyd und Glyoxal (Dialdehyde)

Dialdehyde wie Glyoxal und Glutaraldehyd verknüpfen zwei freie Aminogruppen (siehe Abb. 2 und 3) durch Bildung einer Schiff'schen Base über unterschiedlich lange Kohlenstoffbrücken (C-Brücken). Im Fall des sehr reaktiven Glutaraldehyds entsteht dabei eine C5-Brücke [Naumburger, 2007] [Abke, 2003]. Die Vernetzung erfolgt sehr schnell innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden.

Rein theoretisch existieren etwa siebenmal mehr Möglichkeiten zur Bildung von Amidbindungen als für die Verknüpfung von zwei Aminogruppen [Abke, 2003], [Gendler et al., 1984], [Moczar et al., 1994], [Wiebe et al., 1988]. Dennoch ist Glutaraldehyd (GA) der wichtigste und am häufigsten eingesetzte Vernetzer. Obwohl es in wässrigen Lösungen meist nicht als Monomer vorliegt, sondern zu unterschiedlich langen Ketten polymerisiert, bleibt die Reaktionsfähigkeit bei. Dadurch können weiter voneinander entfernte Aminogruppen verknüpft werden, es besteht aber auch die Gefahr einer Hydrolyse [Abke, 2003], [Gendler et al., 1984], [Moczar et al., 1994], [Wiebe et al., 1988]. Im Folgenden sind die Reaktionen stark vereinfacht dargestellt. Aufgrund der Reaktion als Oligomer gibt es eine Reihe weiterer Reaktionsmöglichkeiten zwischen den ϵ -NH₂-Gruppen von Lysin-Resten und den CHO-Gruppen des Glutaraldehyds (siehe Abb. 18). Der Reaktionsmechanismus ist dabei stark von der Konzentration an Glutaraldehyd abhängig. Cheung und Nimni beobachtete die Bildung von intramolekularen Bindungen bei geringen Glutaraldehyd-Konzentrationen während höhere Konzentrationen aufgrund der langen Glutaraldehyd-Polymerketten zur Bildung von intermolekularen Bindungen führen. Die langen Ketten sind nicht oder nur sehr langsam in der Lage, in das Material einzudringen, wodurch nur die Oberfläche vernetzt werden kann [Cheung, Nimni, 1982], [Weadock et al., 1983-1984].

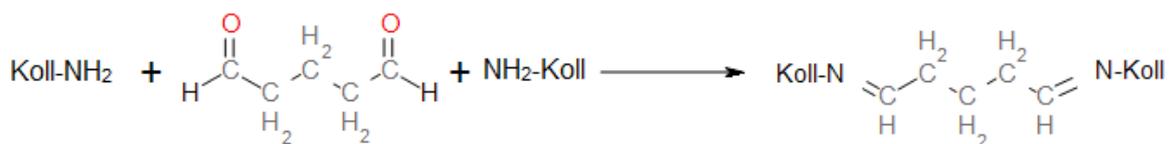


Abbildung 18: Kovalente Quervernetzung durch Glutaraldehyd [Abke, 2003]

Bei Glyoxal wurde die folgende Konzentrationsabhängigkeit beobachtet. Wird Glyoxal im Überschuss zugegeben, so verbleibt ein Teil des Reagenzes ungebunden, was zu einem verringerten Zusammenhalt der Polymermatrix und zu verringerten intermolekularen Kräften führt [Marquie´, 2001]. Abbildung 19 stellt den Reaktionsmechanismus für Glyoxal dar:

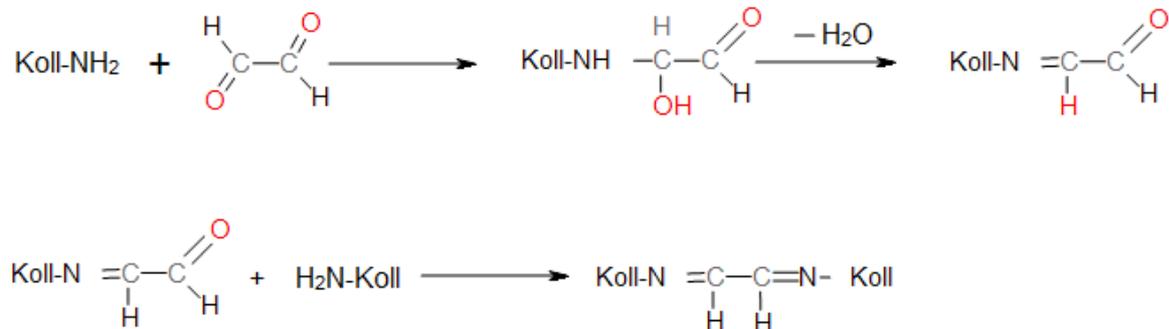


Abbildung 19: Vernetzung von Kollagen mit Glyoxal [Davis, Tabor, 1963]

Im Gegensatz zu Formaldehyd reagiert Glyoxal bevorzugt bei basischen pH-Werten, vergleichbar mit Glutaraldehyd, welches eine steigende Aktivität mit steigendem pH-Wert im Bereich von pH 4 bis 9 zeigt, mit einem Maximum bei pH 8 [Bedino, 2003], [Marquie´, 2001]. Beide Dialdehyde reagieren sehr viel schneller und stabiler als Fomaldehyd [Renner, 2003], [Gratzer, 1996], [Jayakrishnan, 1996], [Burness, 1977].

Weitere Aldehyde

Weitere Amin-vernetzende Reagenzien, die bei der Kollagenvernetzung zum Einsatz kommen sind, Malon-, Succin- und Adipdialdehyd, Vinylsulfon [Renner, 2004], Hexamethylendiisocyanat [Anke, 2003], Poly-(Di-) Epoxyverbindungen (eine sehr langsame, industrielle nicht eingesetzte Methode) [Maser, 2010] und Hydroxy-Dichlor-Triazin [Renner, 2004], [Gratzer, 1996], [Jayakrishnan, 1996], [Burness, 1977].

Zu b) Reagenzien, die zu einer Neubildung von Amidbindungen führen

Um neue Amidbindungen zwischen freien Carboxyl- und Aminogruppen einzuführen verwendet man entweder die Acyl-Azid-Methode (AA) oder ein wasserlösliches Carbodiimid, wie z.B. Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC). In beiden Fällen erfolgt eine Aktivierung der Carbonsäure, die anschließend mit sterisch zugänglichen Aminogruppen reagiert. Bei der EDC-Quervernetzung setzt man zusätzlich noch N-Hydroxysuccinimid (NHS) als Hilfsreagenz zu. Es bildet mit der aktivierten Carboxylgruppe ein ebenfalls aktives, aber hydrolysestabileres Zwischenprodukt, und unterdrückt damit eine unerwünschte Umlagerung der aktivierten Carbonsäure zu einem stabilen N-Acylharnstoff. In beiden Fällen dienen die Reagenzien nur zur Aktivierung und werden nicht in das Kollagen eingebunden [Abke, 2003]. Da die Aktivierungsreaktion sehr schnell vonstattengeht, ist eine Vernetzung in wässrigen Lösungen ungünstig. Die Aktivatoren werden daher in der Regel über den Gelatine- oder Kollagenfilm gegossen [Himmelman, 1977], [Renner, 2004]. Eine Vernetzung mit EDC ist sehr kostenintensiv, langwierig und kompliziert [Maser, 2010].

Zu c) Reagenzien, die durch eine Komplexbildung mit den Carboxylgruppen des Kollagens eine Vernetzung bewirken

Das wichtigste Gerb-Verfahren nutzt Chromsalz. Die Gerbung mit Chrom bei einem pH-Wert von 3,5-4,2 und Temperaturen über 40°C über mindestens 6 Stunden führt zu Komplex-Bindungen mit den Carboxylgruppen des Kollagens. Auch Metallsalze wie das Aluminium-, Titan- oder Zirkonsalz werden zum Gerben genutzt [Friess, 1998]. Nachteil des Verfahrens ist die aufwendige Abwasserbehandlung.

Bewertung:

In der Literatur findet man leider keine vergleichenden Untersuchungen aller gängigen Quervernetzungsarten mit identischen Bedingungen und Ausgangsmaterialien [Abke, 2003]. Einige wichtige Unterschiede ergeben sich jedoch:

Aufgrund der Tatsache, dass für technische Anwendungen nicht zwingend auf physikalisch unbedenkliche Substanzen bei der Herstellung von Kollagenfolien zurückgegriffen werden muss, bietet eine chemische Vernetzung einige Vorteile gegenüber den physikalischen Verfahren. Chemische Vernetzungen führen in der Regel zu deutlich stabileren Folien [Stachel et. al., 2010] als UV- oder dehydrothermale Vernetzungen und bergen nicht die Gefahr einer partiellen Denaturierung. Weadock et. al. konnten überdies zeigen, dass eine Vernetzung mit Glutaraldehyd zu einer deutlich verbesserten Kollagenasestabilität führt als eine dehydrothermale oder UV-Vernetzung [Weadock et. al. 1983-1984].

Unter den chemischen Vernetzern sind Formaldehyd und Glutaraldehyd die am weitesten untersuchten und am häufigsten eingesetzten Reagenzien. Während Formaldehyd zwar sehr langsam reagiert [Renner, 2004], [Khor, 1996], bietet es den Vorteil, dass seine Reaktivität mit sinkendem pH-Wert (< 6,5) steigt [Bedino, 2003], was vor allem für die Kollagenmassen mit einem pH von 2,8 interessant ist. Dem hingegen ist Glutaraldehyd aufgrund seiner steigenden Reaktivität mit steigendem pH-Wert (>4) [Bedino, 2003], [Marquie´, 2001] weniger geeignet und Glyoxal mit einem pH-Optimum im basischen Bereich sogar eher ungeeignet. Beide Dialdehyde reagieren jedoch sehr viel schneller und stabiler als Formaldehyd [Renner, 2003], [Gratzer, 1996], [Jayakrishnan, 1996], [Burness, 1977]. Andere Vernetzer wie Poly-(Di-) Epoxyverbindungen reagieren entweder äußerst langsam und wurden bisher industriell nicht eingesetzt [Renner, 2004] oder reagieren wiederum so schnell, wie im Falle von Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid, dass sie für wässrige Lösungen eher ungeeignet sind [Renner, 2004], [Himmelman, 1977].

3.2.3 Einflussfaktoren auf den Grad der Vernetzung

Die Aufbereitung des Rohkollagens, die Art der Vernetzung (physikalisch oder chemisch) und die Vernetzerkonzentration [Carvalho and Grosso, 2005], [Marquie et.al., 1997 and 2001], [Renner, 2003] bzw. pH-Wert, Temperatur und Einwirkzeit beeinflussen den Grad der Vernetzung (siehe Abbildung 20). Der Vernetzungsgrad berechnet sich aus dem Quotient der Molzahl vernetzter Grundbausteine und der Molzahl der insgesamt in dem makromolekularen Netzwerk vorhandenen Grundbausteine [www.chemgapedia.de, 2012].

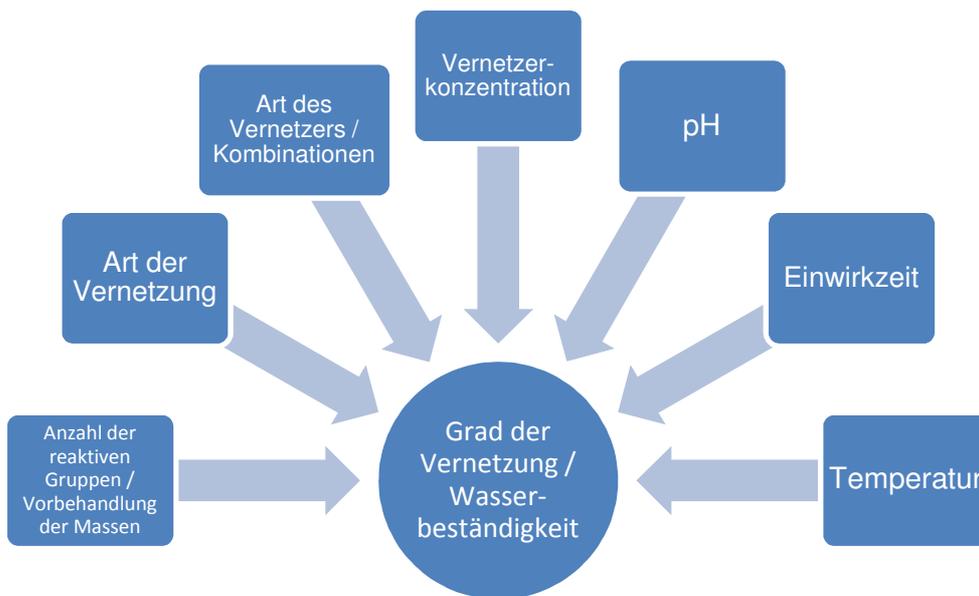


Abbildung 20: In der Dissertation untersuchte Einflussfaktoren auf die Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien

3.2.4 Bestimmung der Wasserbeständigkeit

Eine erhöhte Wasserbeständigkeit als Folge einer Vernetzung basiert auf der Bildung von zusätzlichen kovalenten Bindungen. Diese konnten durch Amin et. al. [2007] mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) nachgewiesen werden. Als weitere analytische Methode wurde die Änderung der Viskosität und der optischen Drehung durch Courts and Homan [1972] beschrieben. Dem hingegen bestimmten Carvalho und Grosso [2005] die Anzahl an freien Aminogruppen in den modifizierten Massen im Vergleich zu nativen Massen, als Indikation für eine aufgetretene Polymerisation. Sing et. al. untersuchte hingegen die Wasserlöslichkeit von Folien. Dieses Verfahren quantifiziert zwar nicht den Grad der Vernetzung auf molekularem Level und liefert auch keine Informationen hinsichtlich der ablaufenden Reaktions-Mechanismen, es ermöglicht aber eine grobe Abschätzung des Vernetzungsgrades, aufgrund der Tatsache, dass die Löslichkeit linear mit dem Grad der Vernetzung korreliert. Auch Carvalho und Grosso [2005] bestimmten den Löslichkeitsgrad basierend auf dem Gewichtsverlust von Folien.

Da in der vorliegenden Arbeit weniger die ablaufenden Reaktionsmechanismen während einer Vernetzung interessierten als vielmehr die tatsächlich erreichbare Wasserbeständigkeit, wurde für die Bewertung der Gewichtsverlust der Folien nach Einwirkung von Wasser bzw. der Gehalt an löslichem Kollagen mittels Sirius Red [Bicolor, 2010] bestimmt.

3.3 Verarbeitung von Kollagenmassen zu Folien oder Überzügen

Bei der konventionellen Kunststoffverarbeitung kommen vor allem thermoplastische Verfahren zur Anwendung. Hierbei werden die Kunststoffe soweit erwärmt, bis sie eine gummiartige Konsistenz haben und in Formen gepresst werden können. Beim anschließenden Abkühlen erhalten Sie ihre endgültige Form [Krochta, 2002].

Viele biobasierender Polymere, wie auch das Kollagen, können bisher jedoch nicht thermoplastisch verarbeitet werden. Sie werden mit Hilfe eines auf einem Lösungsmittel basierenden Prozesses verarbeitet. Hierbei wird das Rohmaterial in einem geeignetem Lösungsmittel (Wasser, Ethanol) gelöst oder dispergiert und anschließend mittels Gießen, Sprühen, Tauchen oder Extrusion in eine bestimmte Form gebracht und dann getrocknet (s. Abb. 21) [Osburn, 2002].

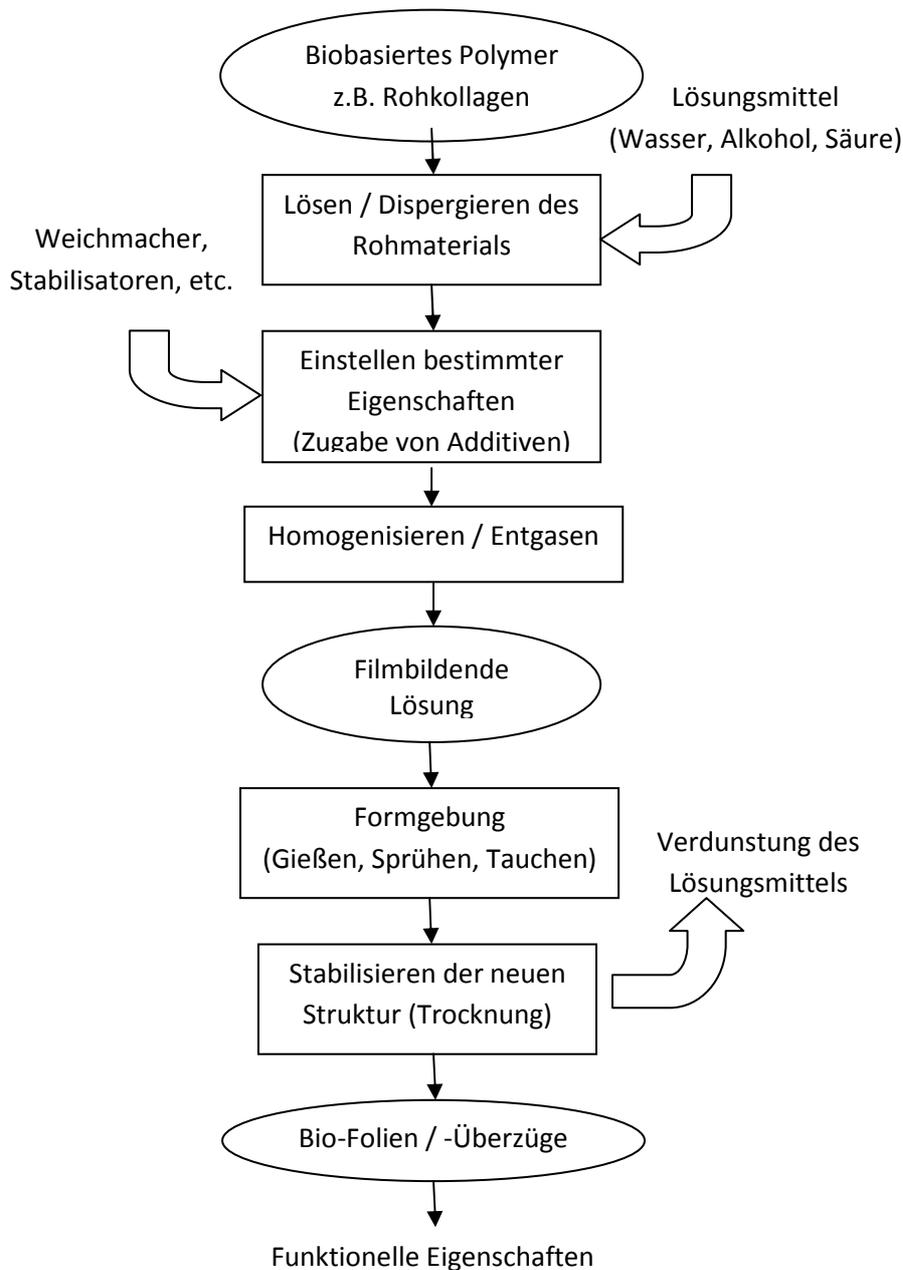


Abbildung 21: Fließschema zur Herstellung biobasierender Folien und Überzügen in Anlehnung an Osburn (2002)

Alle bisher kommerziell erhältlichen Kollagenfolien werden durch Extrusion einer Kollagensuspension in ein neutralisierendes Koagulationsbad (Salzlake) erzeugt [Wang, Padua, 2003], [Krochta, 2002]. Die Form der Extrusion hat den Nachteil, dass mit diesem Verfahren nur freistehende Folien aber keine Beschichtungen z.B. auf großen, profilierten Flächen realisiert werden können. Eine Sprühapplikation wurde bisher noch nicht publiziert und ist auch nicht Stand der Technik [Füßer, 2011], [Erk, 2010].

Generell ist das Sprühen von Proteinen zur Erzeugung von Folien und Beschichtungen noch nicht sehr weit verbreitet [Wang, Padua, 2003]. Neben Gelatine ist Mais Zein eines der wenigen Proteine, das gesprüht und kommerziell genutzt wird [Mallikarjunan et. al., 1997]. Viele der publizierten Sprühapplikationen befinden sich erst in der Entwicklungsphase (gesprühter Gelatine-Film als Überzug für Fleisch zur Reduktion der Ölaufnahme während des Bratens [Olson, Zoss, 1985], Sprühen von Gelatine bzw. Natrium-Caseinat zur Erzeugung von Mulch-Filmen [Yusuf et. al., 2004], [Ulrich et. al., 2009], gesprühte Protein-Filme als Schutz von Lebensmitteln vor Krankheitserregern [www.researchfrontiers.uark, 2011]).

3.3.1 Einfluss der Viskosität (Zähflüssigkeit)

Bei der Verarbeitung von Kollagenmassen spielt die im Vergleich zu anderen Proteinlösungen relativ hohe Viskosität (bedingt durch die tripelhelicale Struktur) sowie die Temperaturempfindlichkeit des Kollagens eine ausschlaggebende Rolle. Die Verarbeitung wird überdies durch die in den Massen enthaltenen Fasern (Verstopfen der Düsen) erschwert. Die Viskosität / rheologischen Eigenschaften einer Beschichtungslösung (Lacke, Farben, Proteinlösungen, etc.) beeinflussen dabei nicht nur die Dicke der erzeugten Schichten sondern auch das Verfahren, mit dem die Massen verarbeitet werden können [Glawe, Giessmann, 2010]. Sehr dünne Schichten können in der Regel nur mit niedrigviskosen Beschichtungsmedien erzielt werden [Glawe, Giessmann, 2010].

Kollagenmassen mit einem Trockenkollagenanteil von 0,5-1,5% haben Viskositäten von 25 - 150 mPas. Anhand von Tabellen für wertmäßige Viskositätsbeurteilungen würde dies am ehesten Motoröl mit einem in der Literatur angegebenen Wert von 100-500 mPas [Glawe, Giesmann, 2010] entsprechen. Im Vergleich dazu sind Gelatinelösungen deutlich weniger viskos. Gelatinelösungen mit einer vergleichbaren Viskosität haben einen Trockenanteil von 10-12 % [Parmentier, 2011].

Hinsichtlich ihrer viskoelastischen Eigenschaften lassen sich pastenförmige und flüssige Medien wie folgt unterscheiden [Glawe, Giessmann, 2010]:

- a) Newtonisch: Viskosität bleibt unabhängig von der Schergeschwindigkeit konstant (z. B. Wasser)
- b) Dilatant: Viskosität nimmt mit steigender Schergeschwindigkeit zu (z. B. Stärke)
- c) Pseudoplastisch: Viskosität sinkt mit steigender Schergeschwindigkeit und mit sinkender Schergeschwindigkeit baut sie sich reproduzierbar auf (z. B. Tomatenmark, Mayonnaise, Dispersionsfarben)

- d) Thixotrop: Viskosität sinkt mit steigender Schergeschwindigkeit aber mit sinkender Schergeschwindigkeit baut sie sich langsamer wieder auf = Viskosität abhängig von Zeit und Schergeschwindigkeit (z. B. Lack, Joghurt)

Kollagenmassen zeigen ein pseudoplastisches/strukturviskoses Verhalten, ähnlich wie Tomatenmark oder Mayonnaise. Die Viskosität sinkt abhängig von der Scherrate infolge von aufgebrochenen Wasserstoffbrückenbindungen, während die Schubspannung mit steigender Scherrate wächst [TU Darmstadt, 2011]. Für den Verarbeitungsprozess wirkt sich dieses Verhalten positiv aus, da die Kräfte bzw. Drücke zur Aufrechterhaltung einer Strömung nur begrenzt ansteigen [TU Darmstadt, 2011].

Im Vergleich zu Kollagenmassen ist das Verhalten von Lacken thixotrop und damit ähnlich dem Verhalten von pseudoplastischen/strukturviskosen Medien wie der Kollagenmasse. Je länger man eine thixotrope Flüssigkeit umrührt, desto dünnflüssiger wird sie. Nach Beendigung der Scherbelastung steigt die Viskosität zeitabhängig wieder an, während sich bei strukturviskosen Medien bei konstanter Scherbeanspruchung die Viskosität nicht weiter abbaut [Academic dictionaries, 2011].

Bei einer Sprühapplikation ist hinsichtlich der Viskosität zu beachten, dass die Masse aus einem Vorratsbehälter durch Schläuche und durch die Düse gefördert werden muss. Je höher viskos die Masse dabei ist, desto schwieriger wird es, das Material zu fördern, allerdings darf die Masse auch nicht zu niederviskos sein, da dadurch ein Ablaufen der Masse an senkrechten Flächen verursacht werden würde. Anders verhält es sich bezüglich der geforderten Schichtdicke; je dicker die Beschichtungsdicke sein soll, desto höher viskos muss in der Regel die Beschichtungslösung sein, um ein Ablaufen zu verhindern, umgekehrt lassen sich mit hoch viskosen Lösungen keine dünnen Schichtdicken erzielen [Glawe, Giesmann, 2010]. Da die Fließgeschwindigkeit mit zunehmender Schichtdicke stark ansteigt (siehe Formel 1), führen Unebenheiten des Films, die sich nie ganz vermeiden lassen, zusammen mit lokalen Viskositätsunterschieden zu ungleichmäßigen Fließgeschwindigkeiten und damit zu sogenannten Nasen oder Läufern [Mischke, 2007]. Eine Erhöhung der Viskosität z.B. durch Antrocknen wirkt dem Ablaufen entgegen. Auch das Zumischen von Verdickungsmitteln kann ein Ablaufen in gewissen Grenzen verhindern [Mischke, 2007].

$$V_{\max} = \frac{g \rho x^2 \sin \alpha}{2\eta}$$

- V_{\max} = Fließgeschwindigkeit der Filmoberfläche
- g = Erdbeschleunigung
- ρ = Lackdicke
- α = Neigungswinkel zu Horizontalen
- η = dynamische Viskosität
- x = Filmdicke

Formel 1: Abhängigkeit der Fließgeschwindigkeit von der Filmdicke und der der Viskosität [Mischke, 2007]

Außerdem können schwankende Umgebungs- und Materialtemperaturen zu Viskositätsänderungen und somit zu Verlaufsstörungen in Form von Orangenhaut oder Läufern führen. Höheren Viskositäten kann durch Erwärmen der Beschichtungslösung

entgegengewirkt werden, niedrigeren Viskositäten durch eine Reduktion des Druckes. Für sämtliche Sprühverfahren gilt jedoch, dass sich die Austrittsöffnung des Beschichtungsmaterials an der Sprühpistole (d.h. der Durchmesser der Düsenöffnung) nach der Viskosität des Materials richtet [Goldschmidt, Streiberger, 2002].

Darüber hinaus hat die Viskosität (Trockensubstanzanteil) einen Einfluss auf die Lösungsmittelabgabe beim Trocknen.

3.3.2 Applikationsverfahren

Prinzipiell können Applikationsverfahren in zwei Arten unterteilt werden, je nachdem, ob das Beschichtungsmaterial zum Objekt geführt wird oder umgekehrt [Goldschmidt, Streiberger, 2002]. Wenn das Beschichtungsmaterial zum Objekt geführt wird, kann man wiederum zwei verschiedene Verarbeitungsprinzipien unterscheiden. Zu den direkten Verfahren, bei denen das Material ohne Umwege mit hoher Materialnutzung auf das Objekt geführt wird, gehört das Streichen und Rollen. Bei indirekten Verfahren, wie dem Sprühen, gelangt das Material über einen Umweg zum Objekt, indem es zunächst fein verteilt wird [Goldschmidt, Streiberger, 2002].

3.3.2.1 Tauchen (Objekt zum Beschichtungsmaterial)

Das Tauchen ist ein einfaches und schon lange angewendetes Applikationsverfahren [Goldschmidt, Streiberger, 2002]. Beim Tauchen wird der zu beschichtende Körper vollständig oder teilweise in die meist niedrig-viskose Beschichtungslösung getaucht (vgl. Abb. 22). Beim Herausheben verbleibt eine dünne Schicht aufgrund von Adhäsionskräften auf dem Körper zurück, das restliche Material tropft ab [Goldschmidt, Streiberger, 2002]. Nach dem Durchlaufen der Abtropfstrecke folgt bei wässrigen Beschichtungslösungen eine beheizte Abblaszone [Goldschmidt, Streiberger, 2002].

Bei einer Tauchbeschichtung kann durch eine geeignete Wahl der Eintauchgeschwindigkeit das Eintragen von Luftblasen in die Beschichtungslösung verhindert werden. Ferner ist das Verhältnis der Dichte des Werkstoffes und der Beschichtungslösung entscheidend, um ein Aufschwimmen des Werkstückes zu vermeiden [Westkämper, Warnecke, 2006]. Der Viskositätsbereich, mit dem ein Beschichtungsmaterial appliziert werden kann, liegt bei 1 – 10.000 mPas [Glawe, Giessmann, 2010].

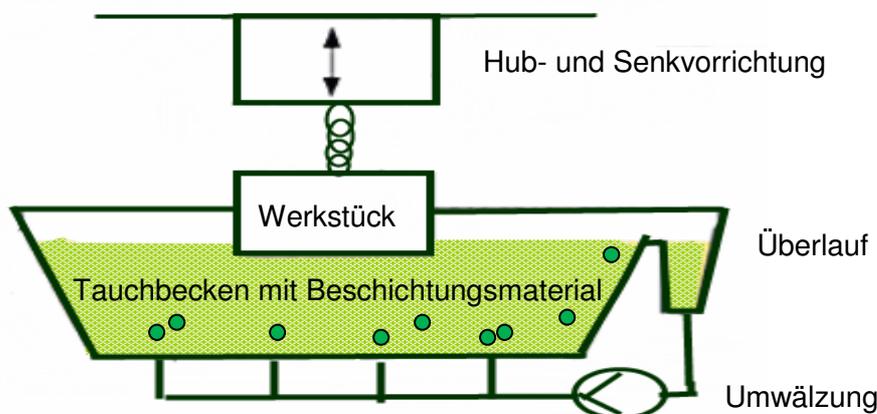


Abbildung 22: Verfahrensschema einer konventionellen Tauchanlage nach [Goldschmidt, Streiberger, 2002]

Im Vergleich zu anderen Verfahren, wie z.B. dem Streichen, hat das Tauchverfahren den Vorteil, dass es ein kontaktloses Verfahren ist, d.h. dass die Oberfläche nach erfolgter Beschichtung nicht mehr in Kontakt mit einem Pinsel oder ähnlichem kommt. Auf diese Weise sind sehr glatte Oberflächen erreichbar [Carlowitz, 1990]. Trotzdem findet dieses Verfahren vor allem bei weniger anspruchsvollen Teilen seine Anwendung. Durch den Tauchvorgang ist es nicht möglich, eine Schicht zu erzeugen, die überall gleich dick ist, auch Läufer und Tropfen lassen sich meist nicht vollständig verhindern. Darüber hinaus ist die Kantenbeschichtung nur gering (= Kantenflucht → physikalischer Effekt führt dazu, dass die Beschichtung an Kanten dünner ist als auf ebenen Flächen). Das Tauchverfahren ist vor allem für kleine Teile geeignet, größere Teile erfordern große Material-Vorlagehälter (ggf. Problem hinsichtlich Haltbarkeit und Kontamination der Beschichtungslösung) [Moeller, 2008]. Neben dem einfachen Tauchverfahren existieren noch Varianten wie das Elektrotauchlackieren [Goldschmidt, Streiberger, 2002].

Im Folgenden sind einige Beispiele für durch Tauchen in Proteinlösungen hergestellte Schutzüberzüge dargestellt. Leider enthalten die entsprechenden Literaturquellen nur unvollständig Angaben zu Konzentrationen und Viskositäten der Beschichtungslösungen, bzw. zu den erzeugten Schichtdicken bzw. Trocknungszeiten, -temperaturen und -dauer, etc..

- Hart-Gelatine-Kapseln (durch 12 s Tauchen von Stahl-Pins in Gelatine-Lösungen und anschließendem Trocknen bei 22-28 °C über 45 min hergestellt) [Bowmann, Offner, 2002]
- Überzüge auf Früchten und Gemüse [Skurtys et. al., 2010]
- Beschichtung von Popcorn mit Zein (30-100 g/L in Ethanol) [Wu and Schwartzberg, 1992]

Keine dieser Arbeiten basiert jedoch auf einem standardisierten Verfahren z.B. hinsichtlich des Herstellungs-, Ablöse- bzw. Trocknungsverfahrens, aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Proteine.

3.3.2.2 Streichen / Rollen (Beschichtungsmaterial zum Objekt)

Das Streichen mit einem Pinsel gilt als das älteste und eines der am häufigsten eingesetzten Beschichtungsverfahren [Glawe, Giessmann, 2010]. Schon bei der Höhlenmalerei vor 20.000 Jahren wurde es angewendet [www.christiani.de, 2011]. Beim Streichen wird das Beschichtungsmaterial mit Hilfe eines Pinsels oder einer Rolle auf den zu beschichtenden Körper aufgebracht. Eine Streichapplikation mittels einer Rolle ist auch in großtechnischem Maßstab realisierbar. Hierzu wird das Werkstück unter einer Farbauftragsrolle hindurch geführt. Über den Spalt zwischen Rolle und Werkstück lässt sich die Auftragsmenge steuern. [Goldschmidt, 2002]. Beim Rollen ist der Auftrag allerdings auf plane Oberflächen beschränkt [Goldschmidt, Streiberger, 2002].

Im Folgenden sind einige Beispiele für durch Streichen bzw. Rollen von Proteinlösungen hergestellte Überzüge dargestellt. Leider enthalten die entsprechenden Literaturquellen nur unvollständig Angaben zu Konzentrationen und Viskositäten der Beschichtungslösungen, bzw. den erzeugten Schichtdicken bzw. Trocknungszeiten, -temperaturen und -dauer, etc..

- Beschichtung von Papier mit Zein (12-15 %ig in Ethanol mit Glycerin als Weichmacher, 30-60 min Trocknung bei 22-24 °C) [Trezza and Vergano, 1994]
- Beschichtung von Tomaten mit Zein (ca. 200 g/L gelöst in Ethyl-Alkohol oder Isopropanol mit ca. 50g/L Glycerin als Weichmacher) [Park et al., 1994]

Keine dieser Arbeiten basiert jedoch auf einem standardisierten Verfahren z.B. hinsichtlich des Herstell-, Ablöse- bzw. Trocknungsverfahrens, aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Proteine.

3.3.2.3 Gießen (Beschichtungsmaterial zum Objekt)

Die meisten Proteinfolien werden durch Gießen (neben extrudierten Kollagenfolien) hergestellt [Skurtys et. al., 2010]. Hierzu werden die Proteine zusammen mit Weichmachern und anderen Zusätzen in einem geeigneten Lösungsmittel (Wasser oder Wasser-Ethanol-Gemisch) gelöst bzw. suspendiert, der pH-Wert eingestellt, homogenisiert, entgast und auf eine geeignete, flache, nicht haftende, glatte Oberfläche gleichmäßig und eben gegossen und anschließend getrocknet (mit Luft in einem Umluftofen, im Mikrowellenofen oder in einer Infrarot-Trockenkammer) und anschließend abgezogen [Skurtys et. al., 2010], [Tharanathan et.al., 2002], [Kaya, 2000]. Erfolgt die Trocknung zu schnell, kann dies zu Defekten oder zum Aufrollen der Filme führen.

Gießverfahren zeichnen sich durch eine relativ einfache Prozessführung aus und können auch automatisiert werden, wie Abb. 23 zeigt.

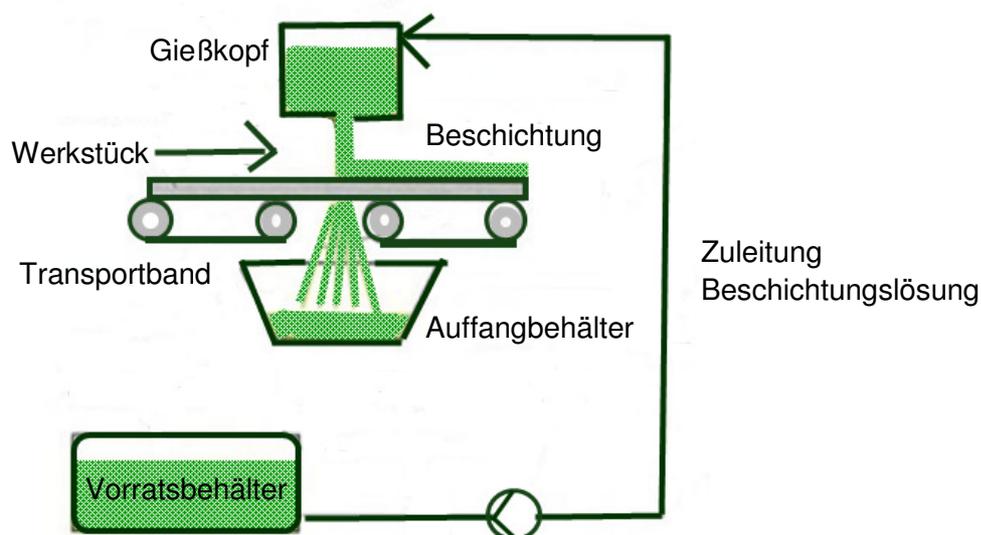


Abbildung 23: Automatisiertes Beschichten durch Gießen nach [Goldschmidt, Streiberger, 2002]

Im Folgenden sind einige Beispiele für durch Gießen von Proteinlösungen hergestellte Überzüge dargestellt. Leider enthalten die entsprechenden Literaturquellen nur unvollständig Angaben zu Konzentrationen und Viskositäten der Beschichtungslösungen, bzw. den erzeugten Schichtdicken bzw. Trocknungszeiten, -temperaturen und -dauer, etc.

- Soja-Proteinfolien (8-10%ig, pH 4,6-6,5, Trocknung bei 80 bis 95 °C für 2 bis 24 Stunden) [Park, et. al., 2002]
- Frischhaltefolien für Lebensmittel aus Zein (gelöst bei 65-85 °C in einer wässrigen Ethanol oder Isopropanol-Lösung, mit Weichmacher, gegossen bei 40-50 °C in eine Glas-Schale, Abziehen nach dem Trocknen) [Aydt et al., 1991]

Keine dieser Arbeiten basiert jedoch auf einem standardisierten Verfahren z.B. hinsichtlich des Herstellungs-, Ablöse- bzw. Trocknungsverfahrens, aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Proteine.

3.3.2.4 Sprühen (Beschichtungsmaterial zum Objekt)

In der industriellen Lackiertechnik ist das Sprühen von Beschichtungslösung mit Hilfe eines Druckzerstäubers (Spritzpistole) kontaktfrei als feine Tröpfchenwolke (Sprühnebel) auf das zu beschichtende Objekt Standard. Das dort gebildete „Tröpfchengebirge“ verläuft anschließend auf der Oberfläche zu einem glatten, geschlossenen Film. Die Erzeugung von Tropfen kann pneumatisch, hydraulisch sowie elektrostatisch bzw. durch Zentrifugalkräfte (Hochrotationszerstäubungs-Technik) erfolgen (s. Abb. 24 [Mischke, 2007] [Goldschmidt, Streiberger, 2002]).

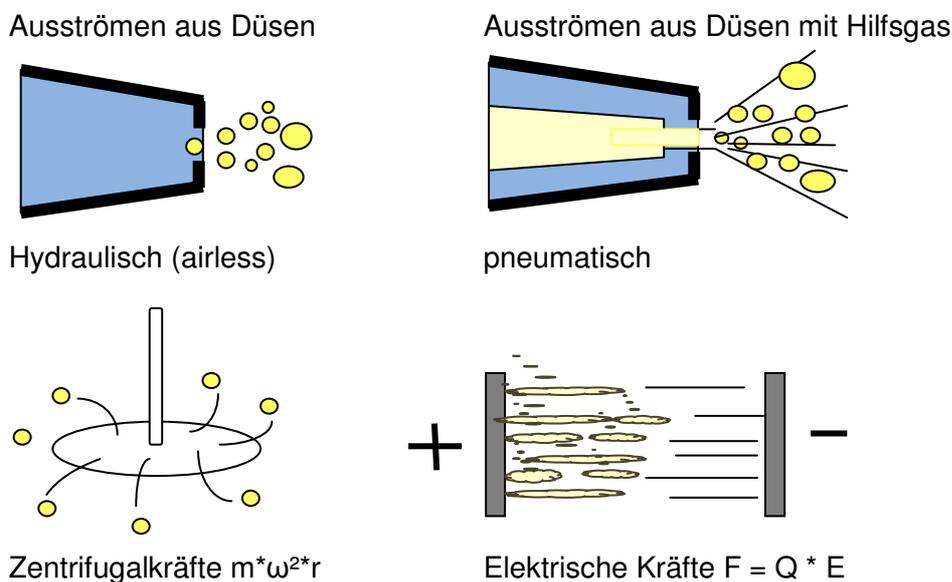


Abbildung 24: Verschiedene Zerstäubungstechniken nach [Goldschmidt, Streiberger, 2002]

- a) Bei pneumatischen Systemen wird der Pistole Druckluft von bis zu 10 bar (0,5-1 bar = Niederdruck bzw. 4-10 bar = Hochdruck) [Goldschmidt, Streiberger, 2002] zugeführt. Der dadurch erzeugte Unterdruck vor der Düse saugt die Beschichtungslösung an und reißt sie mit sich (s. Abb. 25). Durch den Impulsaustausch kommt es zur Zerteilung des Sprühstrahls in einen Strahl mit einer breiten Tröpfchengrößenverteilung. Der Sprühstrahl gelangt mit hoher Geschwindigkeit auf das zu beschichtende Objekt, kleinere Tröpfchen werden durch die abprallende Spritzluft als Overspray fortgetragen [Mischke, 2007]. Dieser Effekt ist beim sogenannten Niederdrucksprühen mit maximal 0,7 bar durch einen geringeren Tröpfchenfeinanteil nicht so ausgeprägt. Diese Systeme sind hauptsächlich zum Versprühen von dünnflüssigen Lacken und ähnlich niederviskosen Massen mit einer kinetischen Viskosität von bis zu $7 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2/\text{s}$ (dynamische Viskosität = 0,02 Pas) konzipiert [McElroy, 1987].

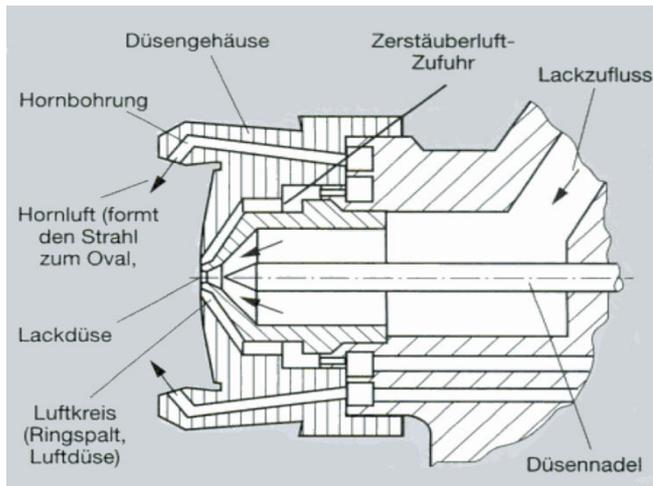


Abbildung 25: Schnitt durch den zerstäubenden Teil einer Hochdruck-Spritzpistole [Mischke, 2007]

- b) Bei hydraulischen (Airless) Systemen wird das Beschichtungsmaterial selbst unter hohem Druck (bis zu 400 bar) durch einen Schlauch in die Spritzpistole gepumpt. Durch die Komprimierung mit anschließender schlagartiger Entspannung kommt es zur Zerstäubung. Der resultierende Spritznebel besteht ausschließlich aus Beschichtungsmaterial, wodurch sich in einem Arbeitsgang höhere Schichtdicken erzeugen lassen. Im Unterschied zu pneumatischen Verfahren hat die Viskosität einen geringeren Einfluss [Goldschmidt, Streiberger, 2002]. Diese Systeme eignen sich für dickflüssigere Farben, Lacke und andere Materialien [McElroy, 1987] und finden ihre Anwendung in der Maler- und Lackierindustrie.
- c) Bei Airmix-Systemen handelt es sich um eine Kombination aus den beiden o.g. Verfahren, bei dem die Nachteile der pneumatischen Verfahren (geringer Wirkungsgrad / hoher Overspray), sowie der hydraulischen Verfahren (benötigter hoher Druck) reduziert werden. Der Materialtransport erfolgt bei geringen Drücken unterstützt durch Druckluft. [Stoye, Freitag, 1996].
- d) Als weitere Sprühverfahren seien noch das Elektrostatische Sprühen sowie die Hochrotationszerstäubung genannt.

Beim Sprühen ist es möglich, eine zweite Komponente im Außenmisch-Verfahren außerhalb der Sprühpistole oder im Innenmisch-Verfahren innerhalb der Sprühpistole zuzumischen (vgl. Abb. 26) [McElroy, 1987].

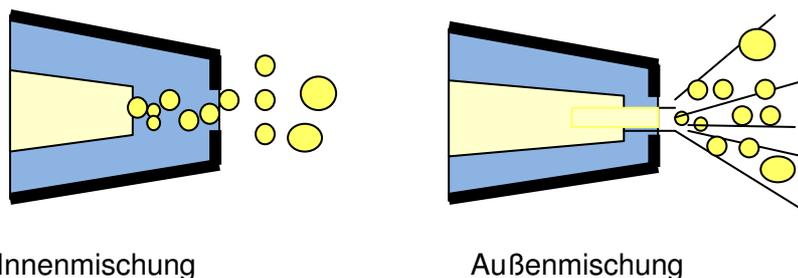


Abbildung 26: Prinzip der Innen- und Außenmischung nach [Goldschmidt, Streiberger, 2002]

Die Tropfengröße und somit die Beschichtungsqualität kann über die Variation der Viskosität und der rheologischen Eigenschaften, die Art der Sprühpistole und der Düse, die Temperatur, Luft- und Beschichtungslösungs-Flussrate sowie die Feuchtigkeit der Luft beeinflusst werden.

Ein kritischer Faktor beim Verarbeiten von Protein-Lösungen ist die Trocknungstemperatur und -zeit [Skurtys et. al., 2010].

Im Folgenden sind einige Beispiele für durch Sprühen aus Proteinen hergestellte Überzüge dargestellt. Leider enthalten die entsprechenden Literaturquellen nur unvollständig Angaben zu Konzentrationen und Viskositäten der Beschichtungslösungen, bzw. den erzeugten Schichtdicken bzw. Trocknungszeiten, -temperaturen und –dauer, etc..

- Gelatine-Überzüge auf Medikamenten (5-25%ig, Bloom-Wert bis 200, Auftragsmenge: 10-75 mg/Tablette, Sprühen bei 60°C mit einem konventionellem Sprüh-Coating-System) [Daher et. al., 2000]
- Einbindung von Zytostatika in Gelatine-Gelen (15%ig in Wasser, Bloom-Wert 180, 2% Zucker, aufgesprühte Menge 0,2g/cm² bzw. 2 L/m²,) [Kaminsky, et. al., 2005]
- Protein-Überzüge zum Schutz von Lebensmitteln vor pathogenen Mikroorganismen (www.researchfrontiers.uark.edu, 2012)
- Gelatine-Überzug auf Fleisch zur Reduktion der Öl-Aufnahme beim Braten (25-35%ige Gelatine-Lösung, Bloom-Wert 25-75, Sprühen bei 32-52°C, Trocknung bei 121 °C) [Olson and Zoss, 1985]
- Mulch-Filme aus Natrium-Caseinat oder Gelatine (gesprüht mit einer Handgeführten Sprühpistole, Trocknung 12-48 h bei Raumtemperatur) [Ulrich et. al., 2009] bzw. Soja-Protein (5-15%ig in 70°C warmen Wasser, pH 10-11, 2-10% Glycerin) [Yusuf et. al., 2004]

Bei keinem der oben genannten Beispiele handelt es sich um kommerziell erhältliche Produkte oder etablierte Verfahren, sondern vielmehr um Ergebnisse aus Forschungsarbeiten bzw. Patenten. Überdies ist aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Proteine sowie der unterschiedlichen Anforderungen durch das Endprodukt keine Standardisierung hinsichtlich des Herstellungs-, Ablöse- bzw. Trocknungsverfahrens möglich.

3.3.2.5 Spezielle Applikationstechniken für hochviskose, faserhaltige Massen: Gelcoat

Als Gelcoat wird ein Hartlack bezeichnet, der später als Schutzschicht, z.B. auf Formteile aus Glasfaserverstärktem Kunststoff (GFK), aufgetragen wird. Er besteht aus einem mit Kieselsäure angedickten Kunstharz (meist ungesättigter Polyester UP) oder Epoxydharz, dem oftmals faserige Bestandteile beigemischt werden. Unmittelbar vor dem Versprühen wird ein Härter zugemischt (siehe Abb. 27) [www.phd-24.de, 2011]

Die Verwendung von Gelcoats stammt ursprünglich aus dem Bootsbau. Mittlerweile findet man Gelcoats auch z.B. beim Bau von Schwimmbädern, Windkraftanlagen sowie Transport- und Nutzfahrzeugen [www.buefa.de, 2011].



Abbildung 27: Versprühen faserhaltiger Massen [www.directindustry.de, 2012]

3.3.2.6 Herstellung von freistehenden / selbsttragenden Folien durch Extrusion

Bei der Extrusion (extrudere (lateinisch) = hinausstoßen) wird die zu extrudierende Masse unter Druck durch eine spezielle Düse gepresst und dabei geformt [Osburn, 2002]. In der Folien-Herstellung konventioneller Kunststoffe ist die Extrusions-Technik weit verbreitet. Auch die in Abbildung 9 und 10 dargestellten Wursthüllen / Kollagenfolien werden auf diese Weise hergestellt. Unterschied ist jedoch, dass das Extrusionsverfahren synthetischer Kunststofffolien auf den thermoplastischen Eigenschaften der Polymere basiert, bei dem die Polymere über ihre Glas-Übergangstemperatur erhitzt und plastifiziert werden. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es Lösungsmittel-frei arbeitet und nach dem Prozess keine Trocknungsschritte erforderlich sind [Skurtys et. al., 2010], [Liu, Kerry, 2006], [Fishman et.al, 2004]. Proteine wie Pectin [Litu et. al., 2006], Stärke [Finkenstadt, Willet, 2004], Soja-Protein [Naga et. al., 1996] und Gelatine [Koeopf et. al., 1994] können nach speziellen Vorbehandlungen ebenfalls thermoplastisch verarbeitet werden. Durch die Vorbehandlung (z.B. Zugabe eines Weichmachers, der die Glasübergangstemperatur senkt) wird bewirkt, dass die Zersetzungstemperatur der Proteine vor der Glasübergangstemperatur erreicht wird [Han, 2005], [Krochta, 2002].

Die thermoplastische Verarbeitung des temperatursensitiven Kollagens wurde bisher nicht thematisiert. Trotzdem wird auch bei der Herstellung von Kollagenfolien von einem Extrusionsprozess gesprochen. Hierzu werden Kollagen-Suspensionen mit einem Trockenkollagenanteil von 4-12% verwendet. Je nach Art der Prozessführung wird bei der Kollagenfolienherstellung zwischen einer sogenannten Trocken- bzw. Nass-Technologie unterschieden. Im Nachfolgenden sind die unterschiedlichen Prozessschritte der beiden Verfahren aufgeführt.

Prozessschritte bei der Trocken-Technologie nach [Osburn, 2002] → führt zu dicken, langen Fasern

- 1) Enthaaren der Rinderhaut
- 2) Trennung von Leder- und Fleischspalt
- 3) Alkalische Behandlung des Fleischspaltes, anschließende Ansäuerung auf pH 3,0 (Quellen der Fasern)
- 4) Zerkleinern zu einem „Kollagen-Teig“ mit einem Feststoffgehalt von > 12%
- 5) Zugabe von Weichmachern und Vernetzern
- 6) Hochdruck-Extrusion in Form tubulärer Wursthüllen
- 7) Trocknen und Konditionierung, Neutralisation und/oder weitere Vernetzung

Prozessschritte bei der Nass-Technologie nach [Osburn, 2002] → führt zu dünneren Fasern

- 1) Enthaaren der Rinderhaut
- 2) Entkalken
- 3) Zerkleinern
- 4) Homogenisieren mit Säure / Einstellen eines Feststoffgehaltes von 4-5%
- 5) Ggf. Zugabe von (Carboxymethyl)-Cellulose → Erhöhung der Festigkeit
- 6) Extrusion
- 7) Koagulation in einer Salzlake
- 8) Waschen
- 9) Zugabe von Weichmachern (Glycerin oder Sorbitol) und Vernetzern (Glutaraldehyd)
- 10) Faltung (wie Akkordeon)
- 11) Trocknung bis zu 13-18% Restfeuchte

Bei einer Kombination der Trocken- und Nass-Technologie, der sogenannten Hybrid-Technologie, wird die Kollagen-Hülle nach der Extrusion mit Ammonium-haltiger Luft gefüllt. Das Ammonium reagiert mit der Säure und führt zur Koagulation der Kollagen-Fibrillen. Durch Schritte wie die Neutralisation und Koagulation kommt es zur Schrumpfung der Kollagen-Fasern und somit zur Ausbildung festen Wursthüllen, die dem Füllprozess standhalten. Oftmals werden die Kollagensuspension auch mit Cellulosefasern co-extrudiert, um Einfluss auf die Zerfall der Hüllen beim Kochprozess nehmen zu können [Osburn, 2002].

3.4 Anwendungsgrenze synthetischer Folien bei der Neufahrzeug-Konservierung

Nicht alle Anforderungen an Verpackungsfolien können mit konventionellen Kunststoffen gelöst werden. Ein konkretes Beispiel für einen Bereich, in dem man nach einer Alternative für Folien aus Polyolefinen sucht, ist die Endkonservierung von Neufahrzeugen vor der Auslieferung vom Hersteller zum Händler oder Endkunden. Während des Transportes wird der frische Lack auf der Karosserie mit einer Schutzschicht versehen, um ihn für eine zeitlich begrenzte Dauer von maximal 6 Monaten vor mechanischen Einwirkungen und aggressiven chemischen und klimatischen Umwelteinflüssen beim See-, Straßen- und Bahntransport zu schützen (siehe Abb. 28).



Abbildung 28: Neuwagentransport per Auto [2T, 2011] Schiff [SPIEGEL 2008] bzw. Zug [N24, 2008]

Dabei soll der Lack u.a. vor folgenden Einflüssen geschützt werden: Kratzer, Steinschlag, Funkenflug, Rußpartikel, Vogelkot, sowie saurer Regen oder Hagelbeulen. Bei einer Händler-Inspektion wurden bei rund 13% der ungeschützt gelieferten Wagen Schäden entdeckt, 59% davon waren Lackschäden, was einem Schadensanteil von 7% entspricht [Tenmark, 2011]. Dies ist sowohl für den Händler als auch für den Kunden inakzeptabel. Der Endkunde verlangt bei der Übergabe ein optisch einwandfreies Fahrzeug mit makellos glänzender Lackoberfläche [Braess, Seifert, 2007]. Kleinste Kratzer oder Lackblößen führen zu Reklamationen.

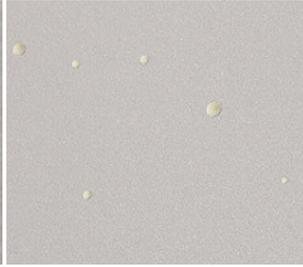
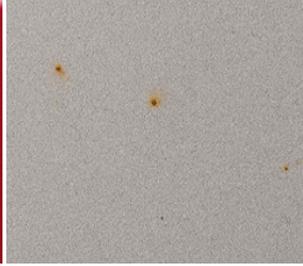
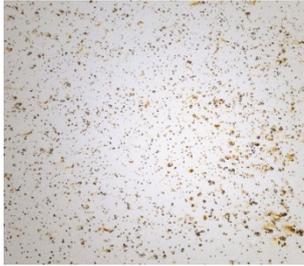
Die Automobilindustrie sucht nach einer ökologisch verträglichen, lösungsmittelfreien und spritzbaren Fahrzeugkonservierung auf Basis nachwachsender Rohstoffe, die für den Luft-, Schienen bzw. Überseetransport geeignet ist und die sich überdies leicht und ohne den Einsatz zusätzlicher, umweltschädlicher Reinigungsmittel entfernen lässt, bei einem Kostenrahmen von 20 Euro pro Fahrzeug [Bartel, 2010].

3.4.1 Folgen eines unzureichenden Fahrzeugschutzes

50% aller Neuwagen-Transporte der deutschen Autohersteller entfallen auf den Bahntransport, der die größte Gefährdung für den Karosserielack darstellt [Schwarz, Leisewitz, 1999]. Der Schienentransport ist der Grund dafür, dass Ford für den Absatz in Deutschland wieder Neufahrzeuge konserviert, nachdem das Unternehmen versucht hatte, innerhalb Europas darauf zu verzichten [Schwarz, Leisewitz, 1999].

Infolge eines unzureichenden Schutzes kann es zu den Lackschäden bzw. Schadbildern kommen, die in Tabelle 2 zusammengestellt sind.

Tabelle 2: Lackschadensbilder aufgrund eines unzureichenden Transportschutzes mit freundlicher Genehmigung der Fa. Spies Hecker (2010)

			
Anätzung durch sauren Regen (schweflige Säure)	Verfärbung oder Auflösung durch Vogelkot (org. Säure)	Anätzungen durch Insektensekrete	Ablagerungen und Anbeizungen durch Baumharz
			
Klebrückstände von Folien	Teerflecken	Farbtonveränderung durch UV-Strahlung	Zerstörung des Lackes durch Rostpartikel
			
Kratzspuren durch unsachgemäßen Transport	Steinschlagschäden	Korrosion nach Steinschlag in Verbindung mit Streusalz/ Feuchtigkeit	

3.4.2 Aktuelle Endkonservierungsmethoden und ihre Vor- und Nachteile

Wenn man die Absatzzahlen für 2011 mit 62 Millionen verkauften Neufahrzeugen weltweit betrachtet [Autogazette, 2010] wird das Potential für biobasierende Folien für den Transportschutz in der Automobilindustrie deutlich. Bisher wurden für den Transportschutz bereits viele Konzepte in der Automobilindustrie getestet. Tabelle 3 listet die verschiedenen, derzeit eingesetzten oder im Test befindlichen Maßnahmen mit Anmerkungen zu Materialbedarf, Kosten sowie Vor- und Nachteilen auf.

Tabelle 3: Ausführungsformen des Transportschutzes von Neufahrzeugen in der Automobilindustrie

Ausführungsform	Material	Materialbedarf [kg/Auto]	Kosten /Auto	Entkonservierung	Nachteile	Vorteile
Paraffinwachs ¹⁰ 	Paraffin in Spezialbenzin als Lösemittel 10-20 µm ²	0,3-0,75 kg ² bis 2,4 kg ¹	<i>Material:</i> 0,5-1 €* ² bis 3 € ⁴ <i>Entkonservierung:</i> 20-30 € ⁴	Wachanlage beim Spediteur 3-6 L 5%iges Lösemittel in 70-85°C heißem Wasser (400-1000 L Wasser),	große Mengen Abwasser, Emissionen und Lösungsmittel bei Auftrag und Entkonservierung ⁵ kein Schutz beim Transport zum Händler, da Spediteur entwachst ³	sprühbar
Acrylatwachs ⁸ 	Acrylat in Wasser z.B: Pfinder Friapol 750	1,2 kg ⁶	0,5-1 €* ²	Waschanlage alkalischer Reiniger notwendig (pH 13,5) ³ 800 L Wasser/PKW	Große Mengen an Abwasser, stark alkalischer Reiniger, hoher CSB des Abwassers erfordert Vorbehandlung des Abwassers, Entfernbarekeit nicht kontaktlos möglich → mechanische Bürsten, die zu Lackkratzern führen können	frei von Kohlenwasserstoffen
Kunststofffolien 	Polyolefin 50-80 µm ²	1kg ⁶ -2kg (5 m ²) ²	18-35 € je nach Fahrzeugtyp ^{3,4}	Manuell durch Händler	Personal-, zeit- und kostenintensiv, Erdölressourcenausbeutung, große Abfallmengen, Zerreißen der Folie beim Abziehen führt zu Lack-Kratzern, senkrechte Flächen meist ungeschützt	Keine Infrastruktur zur Entkonservierung notwendig

Haubenplanen³ 	Polypropylen/ Vinyl + Polyester SOFITEX ⁹	k.A.	<i>Material:</i> 40-45 € ³ <i>Manpower:</i> 10 € ³	Manuell durch Händler	Teuer, werden nicht wiederverwendet	Geringe Nachbearbeitungskosten beim Händler → Geld fließt zurück an Hersteller Applikation: 10 min freie Sicht durch Scheibe, kurze Applikation und Entkonservierung
Teilschutz-Hauben³ 		k.A. Klebebänder sind derzeit preistreibend ³	< Vollschutz- Hauben	Manuell durch Händler	Kein Vollschutz manuelles Aufbringen der Klebebänder	Kosteneinsparung durch Teilschutz
Sprühbare Folien⁴ 	Polyurethan- Dispersion	1,4 ⁶ -1,7 kg ⁴	25 € ⁴	Manuell durch Händler	Aufwendige Trocknung ⁴ „Zebra-Struktur“ auf Lack nach Ablösen ³	
Schrumpffolien⁷ 	PE-Textil- Laminat aus Schrumpf- folie (PE), Schmelz- kleber und Polyester		50 € ⁷	Manuell durch Händler	Teuer in der Herstellung	Vollschutz Einfache Applikation hochwertiges Erscheinungsbild Windschutzscheibe frei, Reißverschluss 3 min zum Aufbringen, 2- 3 min Schrumpfen

Quelle: 1 [Schucker, 1996], 2 [Schwarz, Leisewitz, 1999], 3 [Bartel, 2010], 4 [Jungmann, 2002], 5 [ATZ, 2002], 6 [Volkswagen, 2001] 7 [tenmark, 2011], 8 [Pfinder, 2011], 9 [Carcover, 2011], 10 [Bunting, 2006]

*Preisangabe in DM umgerechnet in Euro

3.4.2.1 Paraffinwachs- und Acrylatwachskonservierung

Wachsbeschichtungen haben zwar den Vorteil, dass sie einfach und blasenfrei aufgesprüht werden können, doch werden zum Auftragen und Entfernen des Wachses große Mengen an Lösungsmitteln benötigt und es fallen enorme Abwassermengen an, die mit Tensiden und Kohlenwasserstoffen belastet sind [ATZ, 2002]. Abbildung 29 zeigt, dass die Wachskonservierung im Vergleich zur Folienkonservierung deutlich höhere Abfall-, Abwasser und Abluftmengen liefert. Abbildung 29 veranschaulicht, dass man durch gewachste Scheiben nicht sehen kann, weshalb das Wachs für Rangierarbeiten von den Scheiben entfernt werden muss. Außerdem sind die Fahrzeuge beim Transport vom Spediteur, der das Wachs abwäscht, bis zum Kunden ungeschützt. Aufgrund dieser Nachteile hat Volkswagen zum Jahresende 2007 Wachs als Endkonservierung aus dem Programm genommen [Volkswagen, 2007].

	Konservieren	→	Transport	→	Entkonservieren
pro Auto	Abfall		Abwasser		Abluft
Paraffin- Wachs	1,2 kg		0,02 m ³		0,550 kg
Hydrowachs	1,2 kg		0,04 m ³		0,040 kg
Folie	1,0 kg		0,00 m ³		0,000 kg
Spritzfolie	1,4 kg		0,00 m ³		0,035 kg



Abb. 29 (links): Abfall-, Abwasser und Abluftmengen bei der Konservierung und Entkonservierung mit unterschiedlichen Konservierungsmethoden nach Volkswagen (2001) und Abb. 30 (rechts): Foto einer „bewachsenen“ Autoscheibe [Bunting, 2006]

3.4.2.2 Kunststofffolien-Konservierung

Vielfach haben sich Polyolefinfolien durchgesetzt, welche jedoch den Nachteil haben, dass das Aufbringen und Entfernen der Klebefolien sehr personal-, zeit-, platz- und kostenintensiv ist. Die Kosten belaufen sich auf rund 18-35 Euro pro Karosserie [Cordshagen, 2002], [Bartel, 2010]. Die Firma Audi stellt in Ingolstadt täglich mehr als 4000 Autos her [Bartel, 2010]. Schon für diese Fahrzeuge wären rund 120 Mitarbeiter im Drei-Schicht-Betrieb beschäftigt, um sie mühsam von Hand zu bekleben [Cordshagen, 2002].

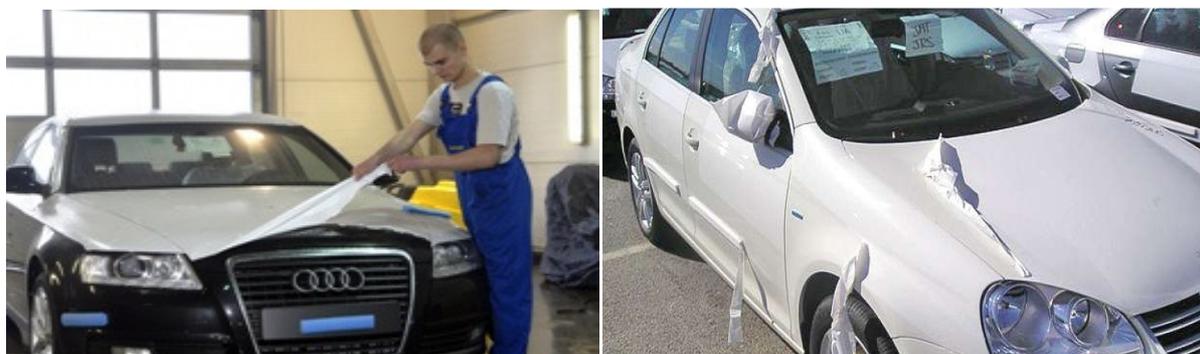


Abbildung 31: Einreißen der Folien bei der Entkonservierung [Kurbads, 2011] und Abbildung 32: Ablösen fehlerhaft applizierter Folien während des Transportes [VW Audi, 2011]

Nach dem Transport können die Folien oftmals nur noch in Fetzen von der Karosserie abgezogen werden (siehe Abb. 31), was erneut sehr zeitaufwendig ist und die Gefahr des Verkratzens des Lackes birgt. Fehlerhaft applizierte Folien führen oftmals zu Haftungsproblemen während des Transportes (siehe Abb. 32). Außerdem entstehen auch bei einer Folienkonservierung mit 1-1,4 kg nicht unerhebliche Mengen an Abfall pro Fahrzeug (siehe Abb. 29) [Volkswagen, 2001].

3.4.2.3 Haubenplanen- und Teilschutzhauben-Konservierung

Die darüber hinaus verwendeten Haubenplanen sind meist Einweghauben, da ein Rücktransport aufgrund zum Teil beträchtlicher Entfernungen und somit eine Wiederverwendung unwirtschaftlich ist [Volkswagen, 2001], [Bartel, 2010]. Somit fallen auch hier zu entsorgende Abfälle sowie ein hoher Energie- und Ressourcenbedarf an. Mittlerweile werden zur Kostenreduzierung meist Teilschutzhauben verwendet, bei denen wiederum die notwendigen Klebebänder zur Fixierung derzeit preisbestimmend sind.

In ihrer aufwendigen Ausarbeitungen liegt der hohe Preis der Haubenplanen begründet. Die Hauben werden von Hand aus einem mehrschichtigen Spezialmaterial genäht (s. Abb. 33), sie benötigen Aussparungen für Auspuff und Kühler, transparente Folien im Bereich der Scheinwerfer und Windschutzscheibe sowie Reißverschlüsse für Tankdeckel und Fahrtür um ein Betanken und Einsteigen zum Verladen zu ermöglichen (Abb. 33). Wie auch bei den Kunststofffolien kommt es bei den Haubenplanen vielfach zu Beschädigungen und zum Abreißen der Hauben während des Transportes.



Abbildung 33: Aufwendige Fertigung der Haubenplanen (Full body cover). Quellen: [Sinoc, 2011], [2T, 2011]

3.4.2.4 Weitere Konservierungsmethoden (Sprühfolien und Schrumpfolien)

Alle weiteren Konservierungsmethoden, wie Schrumpfolien oder sprühbare Schutzfolien, konnten sich bisher aus den verschiedensten Gründen nicht durchsetzen [Bartel, 2010].

3.4.3 Anforderungen an den Fahrzeugschutz [Bartel, 2010]

Bei der Entwicklung eines Transportschutzes sind umfangreiche Anforderungen zu berücksichtigen. Hierzu gehört neben dem Schutz des Lackes vor äußeren Einflüssen, dass die Folie mindestens 6 Monate auf der Karosserieaußenhaut verbleiben können muss, ohne irreversible Oberflächenveränderungen hervorzurufen. Anschließend muss die Folie ohne Zerreißen und vollkommen rückstandsfrei von der Karosserieaußenfläche wieder entfernbar sein. Diesen Vorgang bezeichnet man als Entkonservierung. Der Gebrauchstemperaturbereich beträgt -40 bis +90 °C [Wendel, Becher, Volkswagen, 2005]. Im Folgenden ist das Anforderungsprofil der Firmen VW/AUDI auszugsweise aufgelistet (s. Tab. 6).

Tabelle 4: Anforderungsprofil an eine Neufahrzeug-Konservierung

Anforderung	Vorgaben	Prüfverfahren
Erscheinungsbild	Keine negative Beeinträchtigung	
Gesamtdicke	60-80 µm	DIN 53370
Schutzdauer	6 Monate	
Schutz vor	Ruß- und Insektenablagerungen, Eis, Schnee, Nässe, Flugrost, Stäube, Vogelkot,	
Applikation	Bevorzugt Sprühen bei 10-30 °C, 2-60 bar	
Viskosität	20-25 s (Wachse)	PV 2.11
Trocknung	3-5 min bei 60 °C	
Reißfestigkeit	20-40 N/25mm	DIN ISO 527
Reißdehnung	> 450%	DIN ISO 527-2
Reißkraft (Folie)	> 20N/mm ²	DIN ISO 527-2
Zugfestigkeit	> 20MPa bzw. 40N/5cm (Hauben)	DIN 527-3
Lackverträglichkeit	120 h Kondenswasserkonstantklima	DIN 50017-KK
	3h bei 80 °C Umluftwärmeschrank	
	Zyklus 2 Klimawechsellagerung, 16 h, -40 °C	PV14.06
Verträglichkeit mit	Klarlacken, Anbauteilen	
Chemikalien-	Otto- und Dieselmotorkraftstoff: 10 bzw. 60 min	VDA 621-412
verträglichkeit	Motoröl / Hydrauliköl: 16 h	
	Getriebeöl: 10 min	
	Bremsflüssigkeit und Kühlerfrostschutz: 1 h	
	Scheibenreinigungsflüssigkeit: 10 min	
	Natronlauge /Schwefelsäure: 24 h, 40 °C	
	Baumharz / Pankreatin: 24h, > 35 °C	
Klebkraft	1,0 + 0,2 N/cm	DIN EN ISO 527-2
Transport/ Windkanal	Ausreichende Haftung bei 160 km/h LKW-, Eisenbahn- und Schiffs-tauglich	
	Keine Einschränkung bewegter Teile	
UV-Beständigkeit	600 h	DIN ISO 4892-2
Bewitterung	9 Monate Freibewitterung Mitteleuropa	
	6 Monate Freibewitterung Arizona + Florida	PV 3.13.2

Abschälwiderstand	500 h Florida-Simulation, 72 h KW-KK, Ungealtert, RT nach 5 min: >0,8N/25mm Ungealtert, RT, 72 h: >2, <5 N/25mm ungealtert, -10 °C, 5 min: 1,0 N/25mm	DIN 50017-KK DIN EN 1939
Entfernbarkeit	Rückstandsfrei ohne Zerreißen	
Recycling	recyclebar	
Umweltverträglichkeit	PVC-, Schwermetall- und Brom-frei	
Lagerstabilität	3 Monate bei 5-30 °C	
Wirtschaftlichkeit	20 Euro/Fahrzeug [Bartel, 2010]	

Quellen: [VW, AUDI, 2005-1 bis 3], [VW, AUDI, 2006], [Bartel, 2010], [Pfinder, 2011]

4 Publikationen

Publikation 1

Titel: Improving the water resistance of biodegradable collagen films
doi: 10.1002/app.36461
Journal: Journal of Applied Polymer Science
Bearbeitungsstand: angenommen am 09. November 2011
online veröffentlicht am 03. Februar 2012
abgedruckt in Ausgabe 125 (S2) 2012, Seiten E27-E41

Improving the water resistance of biodegradable collagen films, Journal of Applied Polymer Science, Vol. 125 Issue S2, 2012, pp. E27-E41, online published 3 Feb 2012. Copyright 2012, John Wiley and Sons, Inc.. "This material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc."

Publikation 2

Titel: Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions
Doi: 10.1166/jbmb.2012.1191
Journal: Journal of Biobased Materials and Bioenergy
Bearbeitungsstand: angenommen am 12. Januar 2012
Abdruck in Ausgabe 6, 2012, Seiten 1-11

Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions, Journal of Biobased Materials and Bioenergy, Vol. 6 (2012), Pages 1-11, doi 10.1166/jbmb.2012.1191, American Scientific Publishers. "Reproduced with kind permission from American Scientific Publishers."

Publikation 3

Titel: Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films
doi: 10.1177/8756087911423561
Journal: Journal of Plastic Film and Sheeting
Bearbeitungsstand: angenommen am 30. August 2011,
online veröffentlicht am 23. Oktober 2011
abgedruckt in Ausgabe 28 (1) 2012, Seiten 30-62

This Paper has been published in the Journal of Plastic Film and Sheeting, 28 (1), January / 2012 by SAGE Publications Ltd. / Inc., All rights reserved. ©. Reproduced with kind permission from SAGE Publications Ltd. / Inc..

4.1 Improving the water resistance of biodegradable collagen films

Improving the water resistance of biodegradable collagen films, *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 125 Issue S2], 2012, pp. E27-E41], online published 3 Feb 2012. Copyright 2012, John Wiley and Sons, Inc.. "This material is reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc."

Improving the Water Resistance of Biodegradable Collagen Films

Isabell Sommer, Peter M. Kunz

Department of Chemical Process Engineering, Institute of Biological Process Engineering, Institut für Biologische Verfahrenstechnik, Fakultät für Verfahrens-und Chemietechnik, University of Applied Sciences Mannheim, 68163 Mannheim, Germany

Received 8 June 2011; accepted 9 November 2011

DOI 10.1002/app.36461

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

ABSTRACT: Although collagen-based films have been successfully used for packaging in the meat industry, their potential as a replacement for synthetic packaging films in other industries has not yet been widely investigated. This may be due to the low water resistance of protein films. The objective of this study was to systematically improve water resistance in collagen-based films and to investigate the influence of different crosslinking agents and crosslinker concentration levels. In this study, the film's water resistance was determined gravimetrically as well as by applying the Sircol™ Protocol. Although the reference collagen film produced without any crosslinking agents showed to have almost completely disintegrated after 2 h at 80°C, it was possible to generate chemically crosslinked films, which stayed intact after 2 h at 80°C and even maintained water resistance after 8 h at 60°C. The results of this study showed that thermal crosslinking leads to

weaker bonds than the chemically crosslinking. Both assay methods for the determination of the water resistance yielded almost identical curves, except for films with an added plasticizer, clarifying that the Sircol™ protocol is not suitable to record data as a result of the dissipation of the plasticizer. Furthermore, study results indicated that the water resistance strongly depends on the amount of added crosslinker and reaches a maximum at a concentration of 10% w/w, whereas compostability was nearly 90% at 58°C within 38 days for a chemically crosslinked collagen film plasticized with lecithin. However, increased crosslinking significantly decreased the enzymatic degradability of the investigated films. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 000: 000–000, 2012

Key words: collagen; films; water resistance; crosslinking; biodegradable

INTRODUCTION

Although in the future it may not be possible to entirely replace petroleum-based plastics with bioplastics, biopolymers have shown the potential to reduce the consumption of synthetically produced plastics in certain areas of application.¹ For manufacturing biopolymers, plant- or animal-based polysaccharides, proteins and lipids as well as combinations thereof can be used.² Currently, the food industry uses collagen-based films and casings as a standard. Edible collagen films represent the commercially most successful protein films.^{3,4} It is estimated that ~ 80% of all produced sausage casings are made from tubular collagen films.⁵

The raw material collagen is a natural and renewable resource,⁶ which can be obtained, for example, as a byproduct from leather production⁷ and is therefore readily available.⁶ Furthermore, collagen is

highly biodegradable as opposed to petroleum-based plastics, which are biologically inert for many years or even decades and therefore are not or are only partially compostable.⁸ In addition, collagen as biomaterial is physiologically harmless and approved for the food industry.⁶ Films and coatings can be manufactured by casting, spraying, or extruding.⁹ The fibrous structure of collagen films is responsible for their beneficial mechanical properties.⁴

However, films made from collagen as well as other proteins show a high affinity to water.⁶ In contact with water, collagen chemically absorbs water in the form of bound water and partly as capillary water,¹ which alters the properties of the film and at worst, can lead to destruction of the film altogether.⁹ Alkaline amino groups and hydroxyl groups as well as carboxyl groups have been shown to be responsible for the high degree of hydrophilicity.¹⁰

Studies exist regarding the effects of water absorption on mechanical properties¹¹ as well as studies that determine water solubility⁵ of collagen films, but a subject literature search shows the absence of research on how to systematically improve water resistance of collagen films. One study, Pukhova et al.¹² publicized research done on increasing water resistance of collagen fibers during the spinning

Correspondence to: I. Sommer (i.sommer@hs-mannheim.de).

Contract grant sponsors: DBU Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Naturin Viscofan GmbH, Weinheim (Germany).

Journal of Applied Polymer Science, Vol. 000, 000–000 (2012)
© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

process by the use of Cr_2O_3 . Literature search also showed a remarkable absence of consistent terminology. In similar context, different terms are used such as water resistance,^{1,13} water solubility,^{14–16} water absorption,^{10,12} water repellence,¹⁴ or water permeability^{13,17–19} but often not clearly defined. This study defines water resistance as the film's ability to resist dissolution in contact with water or to dissolve to a certain degree only.

Based on the fact that proteins, thus collagens accordingly, consist of varying amino acids with different side chains, it has been shown possible to modify the properties of protein films through chemical modification of their side chains. The inter- and intramolecular crosslinking with aldehydes, such as glyoxal,² formaldehyde,^{5,16} and glutaraldehyde,^{3,5,16} respectively, as well as carbodiimide⁴ shows positive effects^{3,2,9} regarding water resistance^{5,15,20,21} by forming a water-insoluble three-dimensional network via covalent bridges between protein chains. By comparison, physical treatments, such as UV³- or dehydrothermal (DHT)crosslinking⁵ lead to crosslinked proteins, however, with significantly less stable bonds.²²

With respect to the use of protein films, other than water resistance, attention also needs to be paid to the brittleness, hence the low degree of elastic plasticity of these films.⁹ Plasticizers decrease brittleness by decreasing intermolecular forces between polymer coils, which leads to the loss of density of the protein scaffolding^{9,19} and thus to an increase in material flexibility. However, with increasing levels of plasticizer content, permeability is increased subsequently due to the augmentation of the free volume/intermolecular spacing,⁹ which is why great detail has to be given to this aspect with regards to investigating water resistance.^{9,19} Furthermore, most plasticizers are hygroscopic in nature, which hence increase the water content of films.²³

Finally, an important reason for using renewable resources is their biodegradability. Degradability in this context is to be understood as enzymatic degradability as well as compostability. Increasing water resistance of collagen films by chemical crosslinking may alter degradability and compostability, therefore, it is important to pay attention to these two aspects.

Motivation for this study was the realization that it is most likely the nonbeneficial effect of water on the properties of protein films that is responsible for the limited use of the full potential of collagen films outside the meat processing industry. The object of this study was to systematically examine how to improve water resistance of collagen films. Therefore, a step-by-step approach was chosen for the optimization. Figure 1 shows the individual steps during the optimization process. At first, it was examined whether

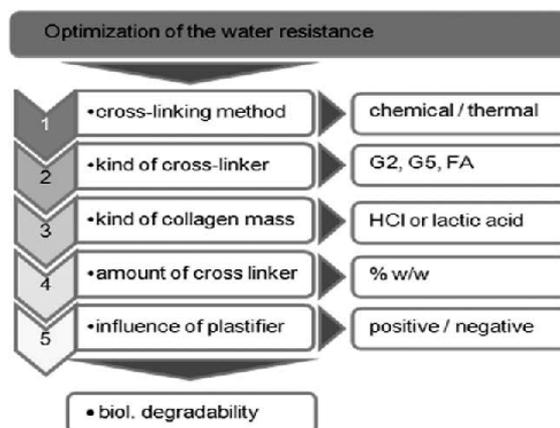


Figure 1 Procedure for optimization of water resistance.

thermal or chemical crosslinking produces more water resistant films. Afterward, three different crosslinking agents and combinations thereof were compared with regards to their capability to produce the most water resistant film. Subsequently, it was tested to what extent the behavior of a collagen suspension acidified with hydrochloric acid (collagen suspension A) would differ from a mass acidified with lactic acid (collagen suspension B). As above, the better result was selected for further testing and the appropriate crosslinker concentration was ascertained. Afterward, the influence of the plasticizer on water resistance was determined. Finally, it was assessed whether the improved water resistance of collagen films negatively affected their compostability.

EXPERIMENTAL

Materials and reagents

Unless specified otherwise, all chemicals were obtained in analytical grade from Roth (Karlsruhe, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), or VWR (Darmstadt, Germany). Collagen film Cobiosh at experimental stage (thermally crosslinked, 7401-4) and hydrochloric acid (collagen compound A) as well as lactic acid (collagen compound B) prepared from a bovine connective tissue collagen matrix with 8.6% (12%) dry collagen content, was provided by Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). Ethanediol (glyoxal, G2) of 40% in aqueous solution for synthesis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Methanal GPR Rectapur (Formaldehyde, FA) 36% was purchased from VWR (Darmstadt, Germany) and Pentane-1.5-dial(glutaraldehyde, G5) was provided by Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). Aluminum sulfate hydrate crystals and lecithin >97% for the biochemistry was obtained from Roth (Karlsruhe, Germany). Methyl 3-hydroxybenzoate 99%,

trans, trans-2,4-acid potassium salt hexadienoic (99%) and ethyl 4-hydroxybenzoate 99% as a preservative were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Deionized water was obtained from an in-house supply. Pronase from *Streptomyces griseus* with an activity 4,000,000, PU/g was obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Trypsin (2500 USP-U/mg) was purchased from VWR (Darmstadt, Germany), protease A-01 and A-08 (500 U/mg or mL) was purchased from ASA Spezialenzyme (Wolfenbüttel, Germany). Phosphate buffered saline (PBS) BDH Prolabo, pH 7.2 was purchased from VWR (Darmstadt, Germany).

OxiTop with MG 1.0 bottle for soil respiration determination were obtained from WTW Wissenschaftlich Technische Werkstätten (Weinheim, Germany). TESA Polyolefinfolie Bodyguard® 50530 PV7 (with EVA polyethylene-adhesive layer) was obtained from FN Klebe und Schleifprodukte GmbH (Ergolding, Germany). Compost with a grain size of 1–10 mm was purchased from a local composting plant, Wagner GmbH (Frankenthal, Germany). Cellulose for thin layer chromatography (< 20 µm) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany).

Preparation of chemically crosslinked collagen films

Unless otherwise stated, all concentration specifications are provided in % w/w (weight portion) and are referring to the collagen dry matter content. For the production of 350 g collagen suspension with a dry collagen fraction of 2.5% (unless indicated otherwise), 73 g (91.5 g) with a meat grinder minced collagen suspension A (collagen suspension B) were added to 274 g aluminum sulfate²⁴ solution (0.015% w/w) and homogenized on Level 2 for 20 min with homogenizer (Ultraturrax T50 Basic, Ika-Werke, Staufen, Germany). Aluminum sulfate was used following a recipe of Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). It reduces the viscosity of the collagen suspension through reduction of the hydration shell (reduces swelling) and therefore enables the use of higher collagen contents, which further minimize the drying time.²⁴ The collagen was left to soak overnight. The following day, additives such as plasticizers were added to the collagen suspensions according to test requirements (see corresponding experimental section for more details). After mixing all additives, the pH value was adjusted to 2.8 with 90% lactic acid or hydrochloric acid. The resulting mass was homogenized with the homogenizer on Level 2 for an additional 30–45 min. To produce a film, it was proven to be necessary to work with a level of 3 mm filled into the casting molds (Teflon dishes, $d = 13$ cm, VWR, Darmstadt, Germany or PP wells, manufacturer unknown) and mixed with (if not stated otherwise) 10 g of a crosslinker solution (corresponds to 10%

w/w) and further degasified in a vacuum cabinet (WTB Binder GmbH, Tuttlingen, Germany) at 5 mbar for 20 min. The degassed compounds were dried overnight in a warm-air compartment dryer (custom built). Figure 4 shows the finished film. As reference film, a collagen film manufactured out of a collagen suspension without the addition of crosslinkers was used.

Preparation of thermally crosslinked collagen films

The thermally crosslinked collagen film (Cobiosh 7401-4) was provided by Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). The film was prepared from a bovine collagen (Type I) through extrusion. After drying at 50°C for 24 h in a circulating air oven, the film was DHT crosslinked at 105°C for about 1 h.

Determination of water resistance of the collagen films in accordance with DIN EN ISO 175

The water resistance of the test films was determined in accordance with DIN EN ISO 175,²⁵ Plastics determination of the effects of immersion in liquid chemicals. Diverging from DIN EN ISO 175 for the test 100 mg of collagen film (see corresponding experimental section for more detailed information regarding amount of crosslinkers) was incubated in 8 mL deionized water for 1 h and 2 h, respectively (see experimental section), at 20°C, 40°C, 60°C, and 80°C. At the end of the test period, undissolved film was separated from the test fluid by centrifugation with a centrifuge (J2-HC, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany) at 10,000 rpm for 2 min, and the dissolved collagen content was determined. For the determination of the dissolved collagen fraction, two methods were used. For one, the spectrometric assay of soluble collagen by using Sirius Red dye reagent according to the Sircol™ Protocol by Biocolor Ireland²⁶ and furthermore by gravimetric determination of decrease in weight of the collagen.

Sircol™ protocol

Collagen content in the supernatant was determined according to the Sircol™ Protocol by Biocolor Ireland.²⁶ Instead of dissolving the dye in picric acid, deionized water was used according to Lee et al.,²⁷ and the pH was adjusted to 2.0 with 1M HCl.²⁷ The extinction was measured in a photometer (CADAS 200, Hach Lange GmbH, Düsseldorf, Germany).

To determine the collagen concentration of the supernatant, a calibration curve was created. The collagen content of the probes was calculated according to eq. (1), and the water resistance was calculated according to eq. (2).

$$\text{collagen content } c \text{ [mg/100 mL]} = \frac{E[555 \text{ nm}] + 0.0142}{0.0186} \quad (1)$$

where c is the collagen content in mg/100 mL and E is the extinction at 555 nm [].

Gravimetric detection

The gravimetric determination of the difference between the collagen suspensions before and after treatment was performed referring to T_{int}^{28} with a Precision Scale (II-150, SNUG Jadever Scale Co., Markham Ontario, Canada). For evaluation, the film test specimens were weighted out precisely to 0.0005 g (m_1) at the beginning of the assay and then weighed again (m_2) after incubation, decanting of test fluid, rinsing, and drying. After quintuple determination, the average value was calculated out of individual measurements.

Water resistance r was determined as follows [eq. (2)]

$$\text{water resistance } r = m_2/m_1 * 100 \quad (2)$$

where r is the water resistance in [%] and m_1 and m_2 are the weights at the beginning, respectively, at the end.

Compostability

Aerobic biodegradability of the collagen films was investigated following the DIN EN ISO 14855-1,²⁹ 2007 protocol (Regulations for thorough aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions), with the polyolefin film as reference material. After adjusting the water content of the compost with tap water, the dry matter content was determined at 49.73% with a moisture analyzer (MA 35, Sartorius, Göttingen, Germany). The ash, or respectively, the organic dry substance was determined with an incinerator (ULTRA X 05, a&p Instruments, Detmold, Germany) at 3.05/10 g and 1.93/10 g. Glass jars were used as composting containers with an inserted metal grille so that the compost could be ventilated evenly through a hose attached at the bottom. The ventilation was performed with CO₂-free air (which was produced via induction into a 4M sodium hydroxide-filled wash bottle as a trap. Diverging from DIN EN ISO 14855-1 first, 100 g of the wetted compost was placed onto the ventilation grille of each container, then each of the test films were placed onto the compost and finally covered with another layer of 100 g of compost and sealed with a lid. The collagen films used in the composting experiments were prepared from the collagen suspension B. The suspensions contained 2.5% dry-collagen, 20% w/w lecithin, 20% w/w glycerol, 0.015% w/w aluminum sulfate, and 15% w/w gelatin. Diverging from DIN EN ISO 14855-1, the films used had a diameter of 7.5 cm and a thick-

TABLE I
Information on the Soil

Parameter	Value
Soil type	Compost
Soil grain size	1–10 mm
Soil density	2 kg/L
Soil volume	50 mL/100 g

ness of 110–124 μm (80 μm polyolefin). The incubation was performed in a drying cabinet (FT 420 K, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Germany) at 58°C ± 2°C in the dark. Once per day, the mixtures were stirred up, the films removed, rinsed with deionized water, gently dried, and their appearance (size, color, swelling, and decomposition) documented.

Due to the fact that the experiments described above only prove disintegration, which can be the result of dissolution without degradation, the percentage of biodegradation based on the CO₂ production as definite proof of composting was investigated in parallel. Therefore, 1 L glass vessels were filled with 100 g of the prepared compost (49.73% dry matter content). Table I shows some characteristic information on the soil and the testing parameters.

The collagen films used in these experiments were prepared from the collagen suspension B. The lecithin film contained 2.5% dry-collagen, 20% w/w lecithin, 20% w/w glycerol, 0.015% w/w aluminum sulfate, and 15% w/w gelatin. The noncrosslinked film was prepared with the collagen suspension B (2.5% dry-collagen). Furthermore, the Cobiosh film (thermally crosslinked film) was investigated (for detailed information concerning film composition see Table II).

The film samples were positioned in the middle of the soil. With the used sample sizes of 4.2 × 4.2 cm² (9.4 × 9.4 cm² for the chemically crosslinked film), it was ensured that the oxygen content of the free gas volume of each test device was sufficient to enable a 100% degradation of the films. The theoretical CO₂ content (ThCO₂) (see Table II) produced by total oxidation of the material was calculated from²⁹

$$\text{ThCO}_2 = \text{TS} * C_{\text{tot}} * \frac{44}{12} \quad (3)$$

²⁹where TS is the total dry matter (g) of the film component in the film, C_{tot} is the proportion of TOC in film component TS (g/g), 44 is the molecular mass of CO₂ (g/mol), and 12 is the atomic mass of C (g/mol).

In each bottle, a beaker containing 100 mL 1M NaOH as CO₂-absorber was placed, and the vessels were closed air-tight. The samples were incubated in an incubation cabinet (FT 420 K, Heraeus Holding

TABLE II
Film Composition and ThCO₂

Film	Film component	Dry matter content (g)	Molecular formula	C _{tot} (g/g)	ThCO ₂ (g)	ThCO ₂ (mol)
Noncrosslinked	Collagen	0.13	(C ₁₂ H ₂₄ N ₃ O ₄)	0.48	0.225	0.005
Thermally crosslinked	Collagen	0.21	(C ₁₂ H ₂₄ N ₃ O ₄)	0.48	0.362	0.008
Chemically crosslinked	Collagen	0.10	(C ₁₂ H ₂₄ N ₃ O ₄)	0.48	0.175	
	Lecithin	0.03	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ P	0.67	0.065	
	Glycerin	0.03	C ₃ H ₈ O ₃	0.39	0.038	
	Gelatin	0.02	(C ₁₀₂ H ₁₅₁ O ₃₉ N ₃₁)	0.50	0.037	
	Glyoxal	0.01	C ₂ H ₂ O ₂	0.41	0.020	
	Total				0.335	0.008
Cellulose	Cellulose	0.23	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	0.42	0.350	0.008

GmbH, Hanau, Germany) at a temperature of 58°C ± 2°C. To maintain sufficient aerobic conditions, vessels were flushed every 3–4 days for 10 min with air, and the NaOH was replenished. The produced carbon dioxide was absorbed in the sodium hydroxide solution and determined every 3–4 days by titration with 1M HCl to phenolphthalein end point after addition of 20 mL 0.5 mL BaCl₂ solution. Quantity of carbon dioxide was calculated according eq. (4).³⁰

$$n\text{CO}_2 = \frac{1}{2} V_{\text{NaOH}} \times \left(c_{\text{NaOH-init}} - \frac{c_{\text{HCl}} * V_{\text{HCl}}}{V_{\text{NaOH-titr}}} \right) \quad (4)$$

³⁰where $n\text{CO}_2$ is the mass quantity of captured CO₂ (mol), V_{NaOH} is the volume of NaOH as absorber (100 mL), $c_{\text{NaOH-init}}$ is the NaOH concentration in absorber before test (1 mol/L), c_{HCl} is the concentration of HCl solution (1 mol/L), V_{HCl} is the consumed HCl solution in titration (mL), and $V_{\text{NaOH-titr}}$ is the volume of NaOH absorber for titration (100 mL).

Percentage of biodegradation D_T was calculated from accumulated amount of CO₂ using the following formula (5). Respiration of a compost blank was subtracted from the values of the sample.

$$D_T = \frac{n(\text{CO}_2)_{\text{film sample}} - n(\text{CO}_2)_{\text{soil blank}}}{n\text{ThCO}_2} \times 100 \quad (5)$$

³⁰where D_T is the percentage of biodegradation according to produced CO₂ (%), $n(\text{CO}_2)_{\text{film sample}}$ is the accumulated CO₂ quantity released by the film (mol), $n(\text{CO}_2)_{\text{soil blank}}$ is the accumulated CO₂ quantity generated from soil (mol), and $n\text{ThCO}_2$ is the level of theoretical CO₂ quantity (mol).

Enzymatic degradability

Enzymatic degradability of collagen samples was tested according to a modified protocol described in

the literature by Angele et al.³¹ and Junqueira et al.³² To determine the degradability, 40 g collagen suspension B with a collagen content of 2% were weighed into a 13 cm Teflon dish (VWR, Darmstadt, Germany) and mixed with 8 mL deionized water, respectively, with 8 mL crosslinker solution. The crosslinker solution was prepared by bringing 2.5 g glutaraldehyde (40%), 2 g glyoxal (50%), and 2.7 g formaldehyde (37%) to 100 mL volume with deionized water and another one with only 2.5 g glutaraldehyde (40%) to 100 mL volume with deionized water, respectively (see experimental section). Using 8 mL of this solution on 40 g collagen suspension resulted in a concentration of 10% w/w based on the collagen dry matter content. For the lower crosslinker concentrations, a 1 : 10 and a 1 : 100 diluted solution were each prepared. All collagen suspensions were dried in a warm-air (custom built) at 37°C for a 24 h period. Enzyme solutions with an enzymatic activity of 6 U were prepared in 60 mL PBS buffer and adjusted by addition of 1M sodium hydroxide solution (trypsin and pronase → pH 7.5; proteases → pH 10). For the degradability studies, 200 mg of dried collagen (m_1) were weighed into an Erlenmeyer flask, mixed with 60 mL enzyme solution, and incubated at 40°C (proteases, pronase) and 25°C (trypsin), respectively, with the incubator shaker KS4000i (IKA-Werke, Staufen, Germany) at 100 rpm for 2 h. The enzymatic reaction was stopped by cooling to 4°C in a centrifuge (J2-HC, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Germany) at 10,000 rpm for 10 min during which the undissolved collagen film was separated. Subsequently, the pellet (undegraded collagen film) was washed with deionized water twice, centrifuged once more, and then according to the gravimetric determination procedure by Tint²⁸ left to dry overnight in compartment dryer (custom built) at 37°C and weighed (m_2). The degradability was determined (%) according to eq. (6). The decrease in weight of the corresponding film masses that were incubated at 40°C for 2 h in PBS buffer without enzyme addition (blank value)

were subtracted from the determined dry weight of the collagen film after enzymatic degradation.

$$\text{degradability} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} * 100 \quad (6)$$

where d is the degradability in (%) and m_1 and m_2 are the weights at the beginning, respectively, after 2 h (each blank value adjusted).

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of crosslinking method on water resistance of collagen films

Water or moisture can change the properties of collagen films and lead to their destruction. Minimal research on how to systematically improve water resistance of collagen films to increase the potential of collagen films outside of the meat processing industry has been published. As there is no universally agreed on definition, the term water resistance is defined for this study as the film's ability to resist dissolution in contact with water or to dissolve to a certain degree only. In this study, a step-by-step approach was chosen for the optimization of the water resistance of collagen films.

At first, it was examined whether thermal or chemical crosslinking produces more water resistant films (see Fig. 1 Step 1), because Lew et al.³³ and Abke³⁴ reported that thermal crosslinking in comparison with chemical crosslinking leads to proteins, however, with significantly less stable bonds. Therefore, water resistance of a commercially available collagen film (Cobiosh) compared with an untreated collagen film (reference film made from collagen suspension A) was tested as described in the materials and methods section.

Figure 2 shows water resistance of the thermally crosslinked collagen film in comparison with the reference collagen film at different temperatures, measured after 2 h by SircolTM protocol and gravimetrically. Both assay methods for the determination of the chemical resistance yielded almost identical curves.

Within the testing period, films produced from a collagen suspension without the addition of any crosslinking agents (reference film made from collagen suspension A) were, up to a water temperature of 37°C–40°C, almost 100% water resistant. Initially, the resistance documented showed little change but decreased significantly after exceeding the denaturation temperature of >40°C (Fig. 2).

These findings may be explained by the gradual loss of the triple-helical structure during gelatinization as a consequence of a decrease of intra- and intermolecular bindings with rising temperatures

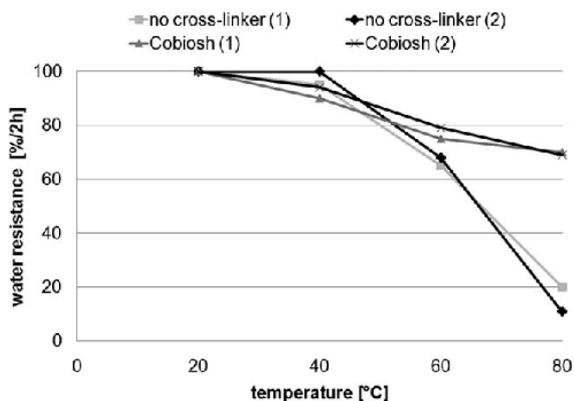


Figure 2 Water resistance of a thermally crosslinked collagen film (Cobiosh) in comparison with the reference collagen film at different temperatures after 2 h, measured gravimetrically (1) and by SircolTM protocol (2).

above the denaturation temperature.¹⁰ The helix-coil conversion leads to the breakage of hydrogen bonds between polypeptide chains, resulting in individual chains or dimers and an increased solubility.³⁵ Below the denaturation temperature, the triple helical structure of collagen (produced under mild conditions) is almost intact.³⁵ However, at water temperature of 80°C, the reference film was fully disintegrated within 2 h.

The water resistance of the Cobiosh collagen film showed an almost 100% water resistance at 20°C (after 2 h). This result was found to be in good accordance with values reported in the literature by Amin and Ustunol.⁵ For instance, Amin and Ustunol⁵ reported a solubility of natural collagen casings (Brecht Co., Chesterfield, MI) of 6.58% after immersing in deionized water containing 0.02% w/v sodium azide as biozid for 24 h at 20°C–23°C (about 0.5% in 2 h). With rising temperatures above 20°C, the resulting data of the Cobiosh film indicated an almost linear correlation between resistance values and temperature. With a resistance of 70% at 80°C after 2 h, the Cobiosh film was much more resistant than the reference film.

Although the mechanism of DHT collagen crosslinking is not completely understood, the improved water resistance of the Cobiosh film is thought to be related to the removal of water from collagen³⁶ and the formation of amide crosslinks between amine and carboxyl groups. An alternative crosslinking route is through the formation of lysino-alanine following dehydration of serine residues and subsequent reaction of the resultant dehydroalanine with the ϵ -amino-group of lysine.³⁷ About 745 of the 3156 residues on the collagen molecule are involved in the reaction, such as residues of aspartic acid, glutamic acid, serine, threonine, arginine, and lysine.³⁶

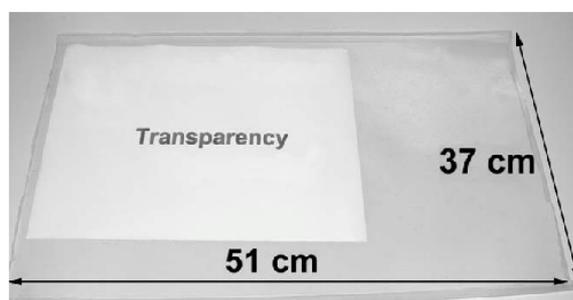


Figure 3 Casted collagen film prepared with collagen suspension A, dried at 37°C.

Sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of heat cured collagen showed high-molecular weight aggregates and a decreased solubility in water at 80°C.³⁸ Determination of the number of free carboxyl and amino groups after DHT treatment showed diminishing values.³⁶

After that a collagen film (made from collagen suspension A) crosslinked with a combination of G2, G5, and FA (10% w/w) was prepared and tested as described in the materials and methods section. Figure 3 illustrates such a casted collagen film. The films were stable, pale yellow, transparent and had a thickness of 150 µm.

Primarily responsible for the crosslinking of collagen with aldehydes are the free ε-amino-groups of lysine, beside some others with minor significance.³⁴ Assuming that a collagen molecule (Type 1) has about 100 ε-amino-groups³⁹ and that one molecule hardener crosslinks two amino-groups, the theoretically necessary amount of crosslinker is about 0.8% referring to dry matter content. Bowes and Cater⁴⁰ used a significantly higher concentration. They crosslinked collagen with formaldehyde (20% w/w), glyoxal (10% w/w), and glutaraldehyde (12% w/w) referring to dry matter content. On the basis of this, an initial crosslinker concentration of 10% w/w referring to dry matter content for this study was chosen.

Figure 4 contrasts the water resistance of the differently crosslinked collagen films (untreated, thermally and chemically crosslinked) after 2-h testing periods at different temperatures measured by Sircol™ Protocol. Compared with the results presented in Figure 2, a chemical crosslinking with the crosslinker combination consisting of G2, G5, and FA (each 10% w/w) and the collagen suspension A produced collagen films, which were almost completely resistant to water even after a 2-h incubation at 80°C, hence showing significantly improved resistance compared with the thermally crosslinked film. The inter- and intramolecular crosslinking with aldehydes shows positive effects regarding water resistance^{5,15,20,21} by forming a water-insoluble three-

dimensional network via covalent bridges between protein chains.

Kopp et al.⁴¹ observed a decrease in solubility as a function of crosslinking in collagenous material provoked by a decrease in the water binding capacity. A 7% decrease in solubility was reported by Micard et al.,⁴² who crosslinked gluten-films with formaldehyde and compared it with unmodified films. Galiotta et al.⁴³ observed the same reduction in solubility for whey protein-based films.

Previous studies have shown that thermal crosslinking such as DHT drying produces weaker bonds, when compared with chemical crosslinking^{33,34} although approximately seven times as many residues of the collagen are available for crosslinking using dehydration procedures, when compared with glutaraldehyde crosslinking.^{34,36} Abke reported studies, in which the results of thermal crosslinking were compared with the results of chemical crosslinking. Unfortunately, these investigations were difficult to compare among themselves due to the different procedures used (differently prepared basic material, different concentrations, temperatures, and methods of determination to evaluate the degree of crosslinking). Abke reported on the investigations of Weadock et al., who compared the collagenase stability of differently crosslinked (UV, DHT, glutaraldehyde) bovine collagen among each other. Thermal crosslinking led only to slightly improved collagenase stability, whereas glutaraldehyde significantly improved the collagenase stability. Abke also mentioned the studies of Pieper et al., who crosslinked bovine collagen (Type 1) through DHT respective chemical (with) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The DHT treatment did not show any influence on the collagenase stability in contrast to the chemical crosslinking.³⁴

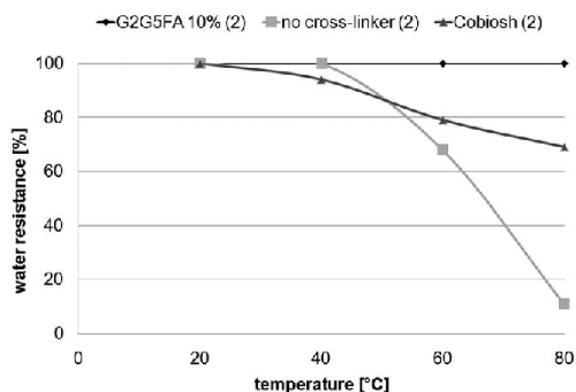


Figure 4 Comparison of water resistance of differently crosslinked collagen films (made from collagen suspension A) after 2-h testing period at different temperatures measured by Sircol™ Protocol (2), FA = formaldehyde, G2 = Glyoxal, G5 = glutaraldehyde, each 10% w/w.

Due to the risk of collagen denaturation, resulting in materials that are more susceptible to solution at the same time, it is difficult to produce more bonds through increasing the exposure time.³³

As a result, it can be stated and confirmed that it is possible to increase the water resistance of collagen films by crosslinking as previously reported by Courts and Homan⁴⁴ or Amin and Ustunol.⁵ The increased water resistance is attributed to the formation of additional covalent bonds, as Amin and Ustunol⁵ confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Even Singh et al. [2001] investigated gelatin crosslinking by measuring the solubility of the films. This procedure does not quantify the degree of crosslinking at the molecular level and does not provide information about the mechanism or interactions. Nevertheless, it gives a crude idea about the degree of crosslinking due to the fact that solubility is linearly correlated to the extent of crosslinking.⁴⁵ Besides water resistance measurements^{46,47} and SDS-PAGE,⁵ further analytical methods have been reported in previous literature. Courts and Homan⁴⁴ verified the crosslinking of gelatin with improved water resistance by measuring the changes in viscosity and optical rotation. However, Carvalho and Grosso⁴⁸ determined the number of free amino groups in the modified films, when compared with the native film as indication for the occurrence of polymerization.

Influence of crosslinking agent on water resistance of collagen films

To study the influence of various chemical crosslinking agents on water resistance (see Fig. 1 Step 2), films made from collagen suspension A were prepared as described in the materials and methods section. For the crosslinking procedure, aldehydes such as formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal, respectively, and combinations of these crosslinkers were used in a concentration of 10% w/w. Therefore, first the amount of crosslinker of 10% w/w was selected following Bowes and Cater,⁴⁰ who crosslinked collagen with formaldehyde, glyoxal, and glutaraldehyde with amounts in a range from 10% to 20% w/w. The water resistance was measured at 80°C after 2 h gravimetrically as described above.

Table III summarizes the water resistance (%/2 h) of crosslinked collagen films with different crosslinkers. All crosslinkers, used in a concentration of 10% w/w, resulted in an increased water resistance from 25% (reference film without the addition of a crosslinking agent) to 92% after an 2 h incubation at 80°C water temperature (Table III).

Results show no significant difference between the individual crosslinkers and their combination. However, the reason for the similar water resistances

TABLE III
Water Resistance of Crosslinked Collagen Films (Collagen Suspension A) with Different Crosslinkers Measured Gravimetrically After 2 h at 80°C, FA = Formaldehyde, G2 = Glyoxal, G5 = Glutaraldehyde, Each 10% w/w

Crosslinker	Water resistance (%)
Reference	24.8
G2G5FA	94.0
G2FA	93.5
G5FA	92.4
G2G5	93.2
G2	94.0
G5	92.7
FA	92.7

obtained in this study is unclear, and the results were not expected as Bowes and Cater reported a considerable difference in the aldehydes ability to crosslink collagen at optimal pH, concentration and temperature with regard to the number of crosslinks introduced, stability of the crosslink and the bond energy.^{36,40} Generally, it is difficult to predict the effectiveness of these crosslinkers as it is influenced by many different factors. Primary responsible for the crosslinking of collagen with aldehydes are the free lysine- ϵ -amino-groups forming bonds similar to Schiff base, beside some others with minor significance.³⁴ Marquié et al.,⁴⁷ however, reported that formaldehyde for example reacts not lysine specific. Hence, the number of available residues in the collagen molecule plays an important role.³⁶ Even the reaction rate distinguishes them from each other. Formaldehyde, for example, reacts in two different rapid reaction steps.⁴⁷ In addition, the amount of crosslinker is of vital importance. With excessive amounts of glyoxal, it was observed that part of the reagent remains unbound resulting in a decreased cohesion of the polymer matrix and reduced intermolecular forces and thus in a reduced resistance.⁴⁷ Weadock et al. reported a production of intramolecular crosslinks in collagen at low concentrations of glutaraldehyde while higher concentrations produced intermolecular crosslinks, due to the formation of long polymeric glutaraldehyde chains. The long chains cannot penetrate into the material. That is why only the surface of the material is crosslinked.³⁶ Moreover, the pH affects the reaction efficiency. Glyoxal reacts preferentially at alkaline pH,³⁶ similar to glutaraldehyde, which shows an increasing activity with rising pH from pH 4 to pH 9, with a maximum around pH 8.^{47,49} However, Bendino⁴⁹ reported an increasing reactivity of formaldehyde with increasing acidity, particularly at pHs of 6.5 and less.

Due to its lower toxicity, glyoxal was selected as crosslinking agent for subsequent studies.

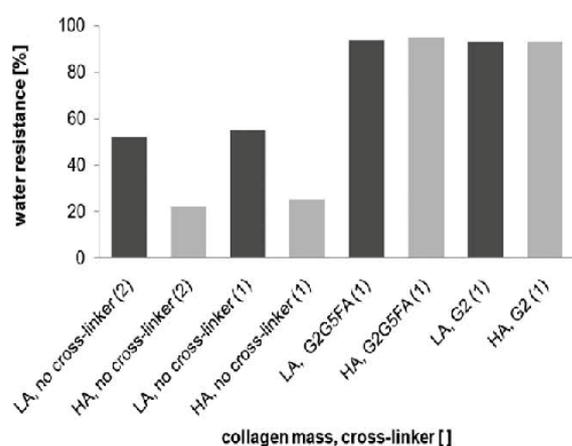


Figure 5 Comparison of water resistance of different collagen suspension (LA = lactic acid, HA = hydrochloric acid) measured gravimetrically (1) and by Sircol™ Protocol (2) after 2 h at 80°C, FA = formaldehyde, G2 = Glyoxal, G5 = glutaraldehyde, each 10% w/w.

Influence of collagen suspension preparation on the water resistance of collagen films

The next step (see Fig. 1 Step 3) examined whether there was a difference in water resistance between differently pretreated collagen suspensions (collagen suspension A acidified with hydrochloric acid and collagen suspension B acidified with lactic acid). Films were prepared from these two masses as described in the materials and methods section, one film each per mass untreated, one crosslinked with a combination of the crosslinking agents G2, G5, and FA (each 10% w/w referring to the collagen dry matter content) and one crosslinked with G2 (10% w/w) after resistance of the crosslinked films was measured gravimetrically. With the samples of the untreated films, both methods of determination were used. Figure 5 enables a direct comparison of the water resistance of untreated or crosslinked collagen suspension A with collagen suspension B. The comparison of a mass treated with hydrochloric acid (collagen suspension A) and a mass prepared with lactic acid (collagen suspension B) produced without the addition of a crosslinking agent, showed a remarkably higher resistance of 55% for the collagen suspension B, compared with collagen suspension A with only ~ 20%–25%. However, the reason for this is unclear. It is suspected resulting from a more severe predamage of the collagen suspension A due to the hydrochloric acid than the lactic acid and the automated manufacturing process (the collagen suspension B is not a standard product and therefore has been produced manually), respectively, a longer interim storage. However, these differences seem to be of no consequence in case of the crosslinked films as no differences concerning the water resistance

could be observed. This might be due to the surplus amount of crosslinker (Fig. 5).

Based on these results and the fact that the collagen suspension B possesses a lower corrosion potential, which is relevant when applied in contact with metals, collagen suspension B was chosen for all further experiments.

Influence of crosslinker concentration on the water resistance of collagen films

Next, it was investigated how crosslinker concentrations affect the water resistance of collagen films (see Fig. 1 Step 4). For this purpose, collagen film prepared from collagen suspension B was crosslinked with glyoxal in different concentrations and the water resistance was measured by Sircol™ protocol as described in the materials and methods section.

Figure 6 outlines the water resistance of collagen crosslinked with different glyoxal concentrations after 1 h at 80°C measured by Sircol™ Protocol. With higher crosslinker concentrations, the water resistance, determined by the Sircol™ protocol at different crosslinking degrees, was increased and reached asymptotically 100% at crosslinker concentrations of 10% w/w or more (Fig. 6).

Unfortunately, the findings are difficult to compare with results reported previously in literature, due to the different procedures used (different basic materials, different crosslinker concentrations, temperatures, and methods of determination to evaluate the degree of crosslinking). Nevertheless, attempts will be made to discuss the results. Marquié et al.,^{47,50} who examined the lysine content and the percentage of soluble matter of cottonseed flour crosslinked with increasing amounts of glyoxal and formaldehyde, reported a similar dependency on the

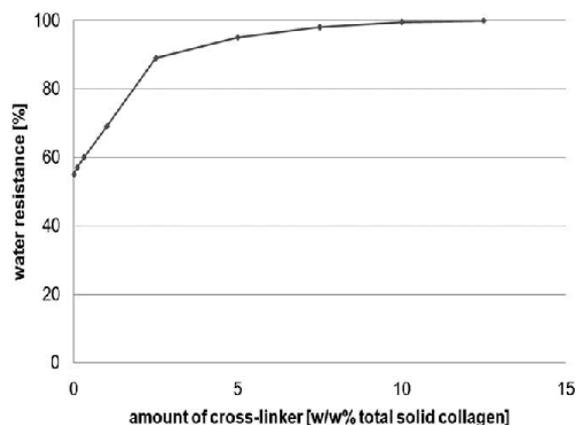


Figure 6 Water resistance of collagen B crosslinked with different glyoxal concentrations after 1 h at 80°C measured by Sircol™ Protocol.

crosslinker concentration, just like Renner [2003], who investigated the crosslinking of gelatin with vinylsulfon (0.1%–10% concerning the dry matter content).⁵¹ With increasing degree of crosslinking, the number of available hydrophilic groups lowers, resulting in a decreased solubility.⁵² Another possible reason for the found relations was discussed by Moll et al.,⁵³ who observed that crosslinking of gelatin molecules is short term in the first stage. Due to this fact, far-off molecules cannot react instantly. He proposed the thesis that higher initial concentrations of the crosslinking agent have improved access to reactive groups. Furthermore, Carvalho and Grosso examined the water resistance of crosslinked gelatin films dependent on the amount of added crosslinker (formaldehyde and glyoxal). They reported decreased water solubility (after 24 h at 25°C) with increasing amount of crosslinker.⁴⁶

Because of the brittleness of the films, the influence of a plasticizer was investigated next.

Influence of plasticizer on water resistance of collagen films

The difficulty caused by the application of a plasticizer to improve plasticity of collagen films is that with increasing levels of plasticizer content, permeability is increased subsequently due to the augmentation of the free volume/intermolecular spacing.^{9,19} Furthermore, most plasticizers like glycerine are hygroscopic, hence increase the water content of films.²³ Whether this is also true for lecithin as an example was examined in the next step (see Fig. 1 Step 5). For these investigations, a collagen suspension B was mixed with lecithin (20% w/w), and films were prepared from this mass by crosslinking with G2 (10% w/w) as described in the materials and methods section. Water resistance was determined gravimetrically by Tint, respectively, according to the SircolTM protocol.

Figure 7 shows a comparison of water resistance curves of a plastified collagen film after a 2-h cooking at different temperatures measured by SircolTM Protocol and gravimetrically. The determination of the resistance of these films at different temperatures showed a clear downward trend or shift paralleled in both gravimetric determination and the resulting curve determined by SircolTM Protocol. This shift can be explained by the fact that the plasticizer was released from the film during the cooking process, which leads to a decrease in weight that was not caused by the collagen material as it was previously described for other plasticizers such as gelatin. The detected loss of protein was significantly lower than the loss of weight.⁵³

Lecithin is a phospholipid consisting of a backbone of glycerol with two fatty acids and a choline

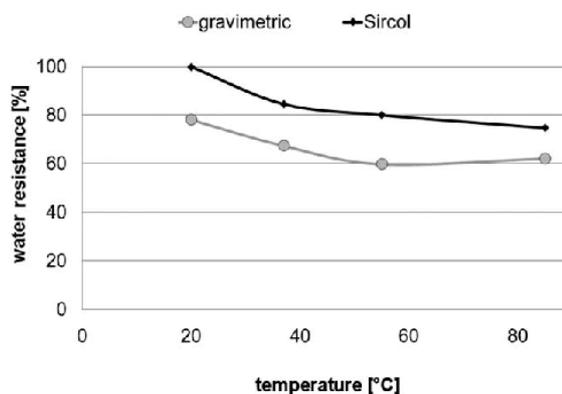


Figure 7 Comparison of water resistance curves of a plastified collagen film (made from collagen suspension B) after a 2-h cooking at different temperatures measured by SircolTM Protocol and gravimetrically, lecithin (20% w/w), Glyoxal (10% w/w).

phosphate group, which makes it water-soluble.^{54,55} Possibly excess of lecithin, which is not chemically incorporated into the polymer structure can cause the fast release into water. The dissipation of lecithin was not detected by the SircolTM Protocol (Fig. 7). The analysis of the SircolTM results implies that this procedure is not suitable to record data as a result of the dissipation of the plasticizer and is therefore limited to the detection of the collagen's water resistance only.

In search of elastic films with a high water resistance, other plasticizers need to be investigated. Plant-based plasticizers, such as castor oil or larch resin⁵⁶ may possibly come into question here.

General: Comparison of water resistance of differently crosslinked films depending on reaction time

Finally, the chemical resistance of different collagen films depending on their crosslinking type and concentration as well as their reaction time in water at 60°C was examined. To evaluate the film's behavior for an extended testing period, this study was conducted at 60°C deliberately. At a water temperature of 80°C, the reference film would have already been completely disintegrated after 2 h. For this purpose, the thermally crosslinked collagen film Cobiosh, the untreated reference film made from collagen suspension B and collagen films prepared from collagen suspension B crosslinked with 10% w/w G2G5FA, respectively, 10% w/w G2 (for details see material and methods section) were immersed in water for 7 h at 60°C, and the water resistance was measured after 1 to 7 h gravimetrically as described in the materials and methods section.

Figure 8 shows the water resistance as function of the incubation period for differently crosslinked

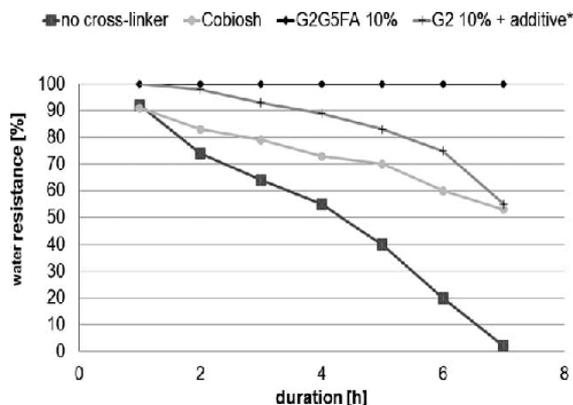


Figure 8 Comparison of water resistance of differently crosslinked collagen films depending on the exposure time at 60°C, measured gravimetrically, FA = formaldehyde, G2 = Glyoxal, G5 = glutaraldehyde (each 10% w/w), additive = lecithin (20% w/w).

collagen films. The untreated collagen film was completely destroyed within 7 h, whereby the resistance declined proportionately to exposure time. The film crosslinked with a G2 solution (10% w/w) and the thermally crosslinked collagen film showed a similar resistance of ~ 55% after 7 h. However, the decrease in resistance of the Cobiosh film proceeded almost linearly with increasing exposure time, whereas the resistance of chemically crosslinked films decreased more rapidly with longer reaction time. The films crosslinked with the crosslinker combination consisting of G2, G5, and FA (10% w/w) stayed stable even after 7 h incubation period at 60°C. As there was no change in resistance observed within the study period, it is assumed that this film may as well resist exposure far longer than 8 h and that the resistance may be substantially higher at lower temperature, respectively.

The results showed once again that it is possible to increase the water resistance of collagen films by crosslinking and that the degree of increase is affected by the type of crosslinking and the amount of crosslinker in case of a chemical crosslinking. Through crosslinking, the formation of covalent bridges between protein chains leads to a water-insoluble three-dimensional network. Depending on the kind of crosslinking procedure and the amount of crosslinker, this network is more or less resistant to solubility.

Further studies are planned to explore the mechanical properties of the films after treatment with water.

Compostability of differently crosslinked collagen films

As compostability can be a decisive criterion for the usage of biomaterials, it was examined to what

extent improved water resistance (increased degree of crosslinking) affects the film's biodegradability. Therefore, collagen films from collagen suspension B with different amounts of G2 as crosslinker (0%, 1%, and 10% w/w) were prepared as described in the materials and methods section and tested in accordance with DIN EN ISO 14855-1²⁹ modified as aforementioned. In the same manner, the compostability of the reference material (cellulose) was examined.

Collagen films produced from collagen suspension B showed rapid disintegration independently of applied crosslinker concentrations. The reference film as well as films with a crosslinker concentration of 1% w/w was already fully disintegrated after 1 day only. The crosslinked films (10% w/w) had significantly shrunk and were severely swollen after 1 day of composting and were completely disintegrated after another day. In this context, the results have shown that increased crosslinker concentrations and improved water resistance do not affect the disintegration of films decisively.

Due to the fact that the experiments described above only prove disintegration, which can be the result of dissolution without degradation, the percentage of biodegradation based on the CO₂ production as definite proof of composting was investigated as described in the materials and methods section in parallel. The results are shown in Figure 9. Independently from the film samples the substances were degraded very rapidly in the first 4 days. This result confirmed the monitored rapid dissolutions of the films. In the following days, the rate of biodegradation decreased significantly. The native, noncrosslinked collagen film showed a percentage of biodegradation of 40% after 38 days at 58°C. According to the DIN-CERTCO list (2004) concerning the degradation properties of biopolymers and their derivatives, collagen is aerob and anaerob biodegradable,⁵⁷ but it is known as relatively resistant to decomposition on the other hand.⁵⁸ The proteolysis

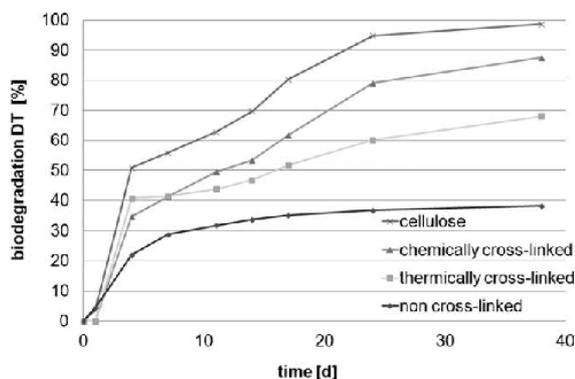


Figure 9 Biodegradability of differently crosslinked collagen films.

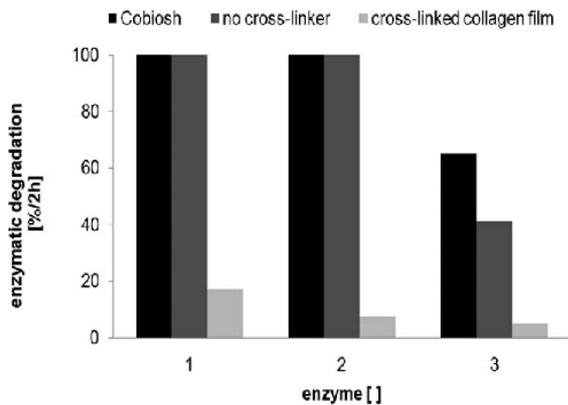


Figure 10 Enzymatic degradation by protease A-01 (1), protease A-02 (2), and trypsin (3) of untreated (no cross-linker), thermally (Cobiosh), and chemically crosslinked (10% w/w Glyoxal) collagen B, measured gravimetrically, protease A-01 and A-08 (500 U/mg or mL, 180 mg/60 mL PBS buffer, pH 10, 40°C), trypsin (2500 USP-U/mg, 185 mg/60 mL PBS buffer, pH 7.5, 25°C).

rate depends beside others on moisture, temperature, and microorganism activity.⁵⁸ In soil, the proteolysis of collagen into proteoses, peptones, polypeptides, and amino acids results from bacteria, enzymes, and fungi. Examples for proteolytic bacteria are pseudomonas, bacillus, and micrococcus.⁵⁸ Continuing proteolysis leads to low or moderate molecular weight substances and gases such as carbon dioxide. Carter et al.⁵⁹ investigated the cadaver decomposition in a controlled setting and found a mass loss of 80% in 28 days at 29°C. In comparison with the relatively moderate biodegradability of the noncrosslinked collagen film, the biodegradability of the thermally crosslinked film was significantly higher (70%). This effect could be explained by the fact that DHT crosslinking entails the risk of partial denaturation/gelatinization of the collagen⁵ characterized by a gradual loss of the triple-helical structure¹⁰ and a better biodegradability.⁶⁰ The even better biodegradability of the chemically crosslinked collagen film (about 90% after 38 days) is a result of the rapid biodegradability of the lecithin and glycerol in this film.^{61,62} The experimental data for the reference material indicated that cellulose is readily biodegradable within 38 days. When interpreting the data, one should keep in mind that estimation of decomposition by determining the CO₂-production ignores C immobilized into the soil microbial biomass and lost as partially degraded intermediates.⁶³ As such, CO₂-respiration is not a direct measure of degradation.⁶³

Enzymatic degradability of collagen films

As enzymatic treatment is another option for degradation of films and therefore a good point for the

usage of renewable resources, the optimized films with improved water resistance were then compared with the thermally crosslinked films, and respectively, the reference film. For enzymatic degradation, four different enzymes were selected in this study: First, trypsin, a common digestive enzyme that degrades proteins in the small intestines. Second, pronase,⁶⁴ the proteolytic activity of this nonspecific protease is targeted toward native as well as denatured protein, which typically consists of neutral proteases, chymotrypsin, trypsin, carboxypeptidase, and aminopeptidase. And finally, the two alkaline proteases A-01 and A-08, enzymes derived out of the detergent industry, which are capable of degrading insoluble proteins.⁶⁵ Latter mentioned enzymes are particularly interesting in areas of application, where the protection film can be removed simply by washing off the collagen with enzymatic solutions. Initially the enzymatic degradability by protease A-01, A-08, and trypsin of untreated, thermally cross-linked and chemically crosslinked collagen films made from collagen suspension B was tested as described in the materials and methods section. The enzymatic degradability by the different enzymes depending on the crosslinking, measured by SircolTM Protocol and gravimetrically, is shown in Figures 10 and 11.

The study clearly supports a correlation between the crosslinking and the enzymatic degradability of collagen films. Both, the reference film without the added crosslinker as well as the thermally cross-linked film were degradable by the enzymes protease A-01 and A-08. Once again this is evidence for the weaker bonds of thermally crosslinked collagen

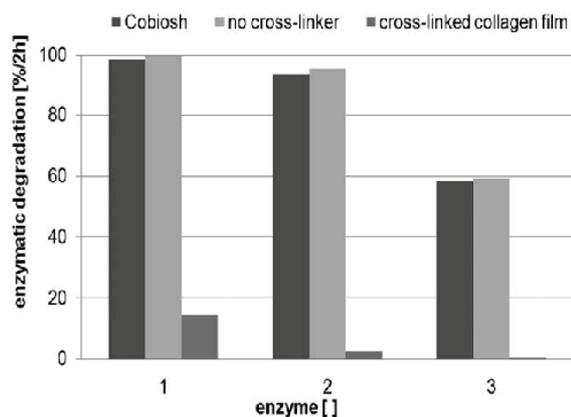


Figure 11 Enzymatic degradation by protease A-01 (1), protease A-02 (2), and trypsin (3) of untreated (no cross-linker), thermally (Cobiosh), and chemically crosslinked (10% w/w Glyoxal) collagen B, measured by SircolTM Protocol, protease A-01 and A-08 (500 U/mg or mL, 180 mg/60 mL PBS buffer, pH 10, 40°C), trypsin (2500 USP-U/mg, 185 mg/60 mL PBS buffer, pH 7.5, 25°C).

in comparison with chemically crosslinked collagen.^{33,34}

Trypsin showed a significantly lower degradation at only 40%–60% in case of the reference film and the thermally crosslinked film. The reduced degradation by the enzyme trypsin can be explained by the fact that collagen of Type I is highly resistant to the proteolytic activity of trypsin.⁶⁶ Nevertheless, trypsin was able to slightly degrade the reference film and the thermally crosslinked films. This result can be explained by the fact that possibly the films were slightly denaturated during their production due to the high temperatures used in this process.³³ Trypsin, however, requires denaturation of collagen before it becomes active.^{36,66–68}

The crosslinked films, however, showed significantly lower degradation rates by using the enzyme solutions (18% for the protease A-01 and less than 10% for the other two enzymes). The increased stability of the chemically crosslinked collagen film is based on the formation of a stable network by inter- and intramolecular crosslinks.^{38,22,67} This crosslinking inhibits the proteolytic enzymes by sterically restricting them from reaction sites. In addition, crosslinks inhibit permeation of the enzyme into the film.³⁶

The two different methods (gravimetric determination (Fig. 10) and determination by the Sircol™ Protocol (Fig. 11) resulted in almost identical values.

As degradability of collagen films treated with the enzymes protease A-01, A-08, and trypsin was comparatively low (see Figs. 10 and 11), pronase was used for further testing. It was suggested that pronase, due to its composition of different proteolytic enzymes, would deliver better levels of degradation. Pronase consists of an aminoprotease, which cleaves several amino acid residues from the N-terminus of the collagen, carboxypotease, which cleaves several amino acids residues from the C-terminus of the collagen and endoproteases like chymotrypsin, which hydrolyses peptide bonds inside the molecule (at least three amino acids residues far away from the terminus).⁶⁹ The following figure (Fig. 12) illustrates the correlation between the enzymatic degradation by pronase, depending on the crosslinking degree.

With an increasing degree of crosslinking, adjusted by the amount of added crosslinking agent, enzymatic degradation was clearly decreased. The same effect was observed using both the crosslinker combination as well as an individual crosslinker, however, was more pronounced for the crosslinker combination. Likewise, the treatment of the 10% w/w G2G5FA crosslinked film with pronase did not result in a better degradability. It is suggested that the optimizing procedure to improve water resistance is responsible for this phenomenon. Angele et al.³¹ examined the enzymatic degradability of

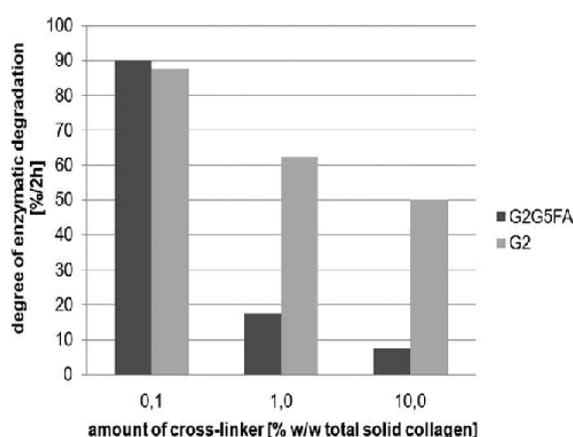


Figure 12 Enzymatic degradation of crosslinked collagen by pronase E from streptomyces griseus (4,000,000 PU/g; 125 mg/60 mL PBS buffer; pH 7.5) within 2 h at 40°C, crosslinked with different amounts of glyoxal, respectively, a combination of formaldehyde (FA), Glyoxal (G2), and glutaraldehyde (G5) (0.1%, 1.0%, and 10% w/w collagen based on dry matter content).

EDC-crosslinked bovine collagen by collagenase. They observed a similar relationship between the enzymatic degradability and the content of crosslinker.

With increasing the degree of crosslinking by increasing the amount of crosslinker, a more and more stable network is formed by the inserted inter- and intramolecular crosslinks.^{22,38,67} This leads to a progressive inhibition of the enzyme by sterically restricting them from reaction sites and by reducing the number of specific cleavage sites as well as decreasing penetration of the enzyme into the film.^{36,38}

The decreased enzymatic degradability of films with improved water resistance clarify that both factors are mutually exclusive.

CONCLUSION

In this study, the dependency of water resistance of collagen films on different processing factors during crosslinking was investigated. Although a collagen film without crosslinking was almost completely disintegrated after a 2-h cooking period at 80°C (water resistance of 10%–20% after 2 h at 80°C), a thermally crosslinked film (DHT, 1 h, 105°C) showed a significantly higher resistance to water (water resistance of up to 70% after 2 h at 80°C). Chemically crosslinking of collagen with glutaraldehyde, glyoxal, and/or formaldehyde (10% w/w based on the dry matter content), however, led to the highest water resistance (water resistance of up to 100% after 2 h at 80°C). It can be assumed that these films may even resist far longer exposure times. For lower temperatures, these results might even turn out more

obvious, as the correlation between temperature and resistance was demonstrated. With increasing temperature, the water resistance decreases significantly. However, at a concentration level of 10% w/w, no difference between the tested glyoxal, glutaraldehyde, and formaldehyde, respectively, combinations of this crosslinking agents was observed. Significantly increased water resistances of noncrosslinked films prepared from collagen suspensions treated with lactic acid compared with films prepared from hydrochloric acid treated masses were observed. The type of acidifying makes no differences in case of crosslinked collagen films. Glyoxal concentrations below levels of 10% led to a significant decrease of water resistance.

The two selected methods for determining the resistance of the films (gravimetric and Sircol™ Protocol) clearly demonstrated a problem occurring when using a plasticizer such as lecithin in terms of measuring water resistance. The gravimetric determination yielded much lower resistance values than the Sircol™ process in which the dissipation of the plasticizer could not be detected during measuring process.

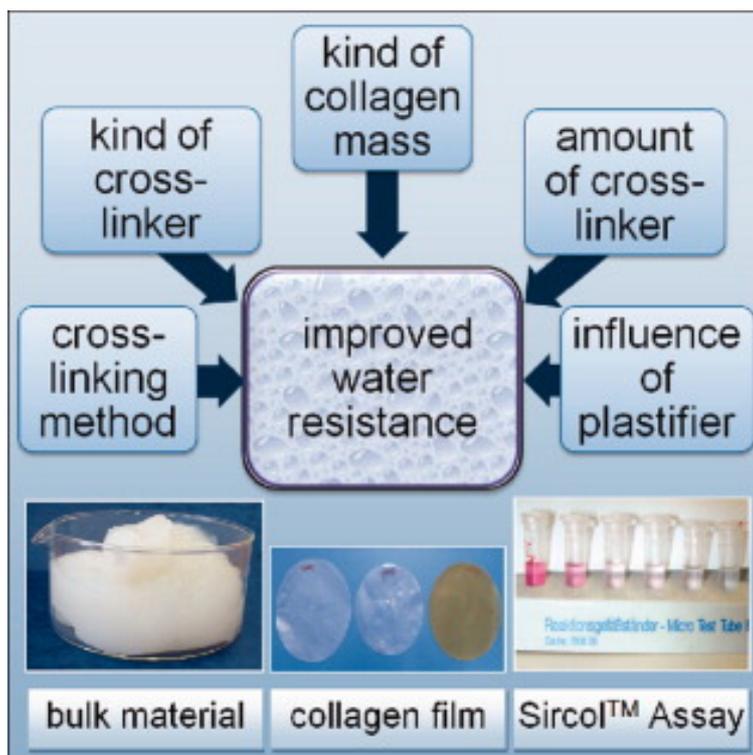
Finally, it was shown that the improvement of water resistance of the collagen films by chemical crosslinking did affect their degradability by enzyme solutions. The degradability of chemically crosslinked collagen films with lecithin as plasticizer was nearly 90% at 58°C within 38 days.

The authors are very thankful to Dr. F. Maser and Chr. Link for manufacturing of the collagen bulk material.

References

- Hamaguchp, P. Y.; Shiku, Y.; Tanaka, M. *Pack Sci Technol* 2003, 12, 271.
- Rhim, J. W.; Gennadios, A.; Weller, C. L.; Cezeirat, C.; Hanna, M. A. *Ind Crop Prod* 1998, 8, 195.
- Embuscado, M. E.; Huber, K. C. *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Springer: Dordrecht, Heidelberg, London New York, 2009.
- Han, J. H. *Innovations in Food Packaging*; Elsevier, Academic Press: San Diego, California, 2005.
- Amin, S.; Ustunol, Z. *Int J Dairy Technol* 2007, 60, 149.
- Yamada, K.; Takahashi, H.; Noguchi, A. *J Food Sci Technol* 1995, 30, 599.
- Jones, M. W.; Whitmore, R. A. *J Am Leather Chem Assoc* 1975, 70, 91.
- Haroun, A. A. *J Appl Polym Sci* 2010, 115, 3230.
- Audic, J.-L.; Chaufer, B. *J Appl Polym Sci* 2010, 117, 1828.
- Reich, G. *Kollagen, Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*; Theodor Steinkopff: Dresden, 1966.
- Tanioka, A.; Jojima, E.; Miyahsaka, K.; Ishikawa, K. *J Polym Sci* 1973, 11, 1502.
- Pukhova, Z. I.; Vasil'ev, M. P.; Kotetskii, V. V.; Vol'f, L. A. *Fibre Chem* 1978, 10, 264.
- Peña, C.; de la Caba, C.; Eceiza, A.; Ruseckaite, R.; Mondrago, I. *Bioresour Technol* 2010, 101, 6836.
- Sothornvit, R.; Olsen, C. W.; McHugh, T. H.; Krochta, J. M. *J Food Sci* 2004, 68, 1985.
- Kim, S. J.; Ustunol, Z. *J Agric Food Chem* 2001, 49, 4388.
- Galiotta, G.; Di-Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. *J Dairy Sci* 1998, 81, 3123.
- Pol, H.; Dawson, P.; Acton, J.; Ogale, A. *J Food Sci* 2002, 67, 212.
- Liu, L.; Kerry, J. F.; Kerry, J. P. *Int J Food Sci Technol* 2006, 41, 295.
- Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. A.; Roques, M. A. *Food Hydrocolloids* 2001, 15, 423.
- Gennadios, A.; Ghorpade, V. M.; Weller, C. L.; Hanna, M. A. *ASAE Publ* 1996, 39, 575.
- Perez-Gago, M. B.; Krochta, J. M. *J Food Sci* 2001, 66, 705.
- Stachel, I.; Schwarzenbolz, U.; Henle, T.; Meyer, M. *Biomacromolecules* 2010, 11, 698.
- Orban, J. M.; Wilson, L. B.; Kofroth, J. A.; El-Kurdi, M. S.; Maul, T. M.; Vorp, D. A. *J Biomed Mater Res* 2004, 68, 76.
- Maser, F. *Oral Information on Aluminiumsulfate; Naturin Viscofan GmbH: Weinheim, Germany, 2011.*
- DIN EN ISO 175, 1999.
- Biocolor Sircol™ Soluble Collagen Assay, Internet manual downloaded from www.biocolor.co.uk, 2010.
- Lee, D. A.; Assoku, E.; Doyle, V. *J Mater Sci: Mater Med* 1998, 9, 47.
- Tint, H. *Arch Biochem Biophys* 1961, 92, 154.
- DIN EN ISO 14855-1, 2007.
- Hoffmann, J.; Řezníčková, I.; Kozáková, J.; Růžička, J.; Alexy, P.; Bakoš, D.; Precnerová, L. *Polym Degrad Stab* 2003, 79, 511.
- Angele, P.; Abke, J.; Kujat, R.; Faltermeier, H.; Schumann, D.; Nerlich, M.; Kinner, B.; Englert, C.; Ruszczak, Z.; Mehrl, R.; Mueller, R. *Biomaterials* 2004, 25, 2831.
- Junqueira, L. C. U.; Bignolas, G.; Brentani, R. R. *Anal Biochem* 1979, 94, 96.
- Lew, D.-H.; Liu, P.; Orgill, D. *J Biomed Mater Res* 2007, 82B, 51.
- Abke, J. *Dissertation: Verbesserung der Biokompatibilität metallischer Implantate durch kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht; Naturwissenschaftliche Fakultät—Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg, Germany, 2003.*
- Zhang, Z.; Li, G.; Shi, B. *J Soc Leather Technol Chem* 2006, 90, 23.
- Weadock, K.; Olson, R. M.; Silver, F. *Biomater Med Devices Artif Organs* 1983-84, 11, 293.
- Bello, J.; Riese-Bello, H. *Sci Ind Photogr* 1985, 29, 361.
- Gorham, S. D.; Light, N. D.; Willins, M. J.; Bailey, A. J.; Wess, T. J.; Leslie, N. J. *Int J Biol Macromol* 1992, 14, 129.
- Shu-Tung, L. *Pat. DE69626979T2*, Regen Biologics Inc., Menlo Park, CA, USA (2004).
- Bowes, J. H.; Cater, C. W. *Biochem Biophys Acta* 1968, 168, 341.
- Kopp, J.; Bonnet, M.; Renou, J. P. *Matrix Biol* 1989, 9, 443.
- Micard, V.; Balamri, R.; Morel, M. H.; Guilbert, S. *Agric Food Chem* 2000, 48, 2948.
- Galiotta, G.; Di-Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. *J Dairy Sci* 1998, 81, 3123.
- Courts, A.; Homan, P. *J Appl Chem Biotechnol* 1972, 22, 1253.
- Singh, S. et al. [2001]; Rama Rao, K. V.; Venugopal, K.; Manikandan, R. *Pharm Technol* 2002, 4, 36.
- Marquié, C.; Aymard, C.; Cuq, J.-L.; Guilbert, S. *J Agric Food Chem* 1995, 43, 2762.
- Marquié, C.; Tessier, A. M.; Aymard, C.; Guilbert, S. *J Agric Food Chem* 1997, 45, 922.
- Carvalho, R. A.; de Grosso, C. R. F. *Braz J Chem Eng* 2005, 23, 45.
- Bendino, J. H. *Champion—An Expanding Encyclopedia of Mortuary Practices, Vol.649; Reseach and Education Department: The Champion Company, Spring field, OH45501, 2003; p 2514.*

50. Marquié, C. *J Agric Food Chem* 2001, 49, 4676.
51. Renner, M. U. Inaugural-Dissertation: Gelatinefilme als Arzneistoffträger; Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2003.
52. Patzsch, K.; Riedel, K.; Pietzsch, M. *Chem Ing Tech* 2010, 82, 87.
53. Moll, F.; Rosenkranz, H.; Himmelmann, W. *J Photogr Sci* 1974, 22, 255.
54. Poeggel, G. *Kurzlehrbuch Biologie*; Thieme Verlag: Stuttgart, 2009.
55. Rassow, J.; Hauser, K.; Netzer, R.; Deutzmann, R. MLP Duale Reihe, *Biochemie*; Thieme Verlag: Stuttgart, 2008.
56. Felo-Werkzeugfabrik Holland-Letz GmbH, Pat. DE102008010755A1 (2009).
57. Amlinger, F.; Fritz, I. *Biokunststoffe nachhaltig einführen—erfassen—verwerten*; Amt der Niederösterreichischen Landesregierung; St. Pölten, 2008.
58. Dent, B. B.; Forbes, S. L.; Stuart, B. H. *Environ Geol* 2004, 45, 576.
59. Carter, D. O.; Yellowlees, D.; Tibbett, M. *Appl Soil Ecol* 2008, 40, 129.
60. Anonymous, Leonardo da Vinci Program: environmentally degradable plastics. Contract Report, Contract No. 1/098/2/05261/PI/IL1.1b/CONT, 1999.
61. Danhong, S.; Qiang, H.; Wenjum, Z.; Liu, X.; Bi, S. *J Soc Leather Technol Chem* 2008, 92, 14.
62. Anonymous, OECD Screening Information Data Sheet SIDS Glycerol, UNEP Publications 1, Paris, 2002.
63. Tibbett, M.; Coartars, D. O.; Haslam, T.; Major, R.; Haslam, R. *J Forensic Sci* 2004, 49, 1.
64. Roche Applied Science, Pack insert Pronase Cat. No. 10165921001, downloaded from www.roche-applied-science.com, 2011.
65. ASA Spezialenzyme GmbH, Pack insert Protease A-01, EC 3.4.21.62, downloaded from www.asa-enzyme.de, 2011.
66. Gries, G. *Z Gesamte Exp Med* 1967, 142, 145.
67. Huang, C.; Yannas, V. *J Biomed Mater Res* 1977, 8, 137.
68. Haurowitz, F.; Tunca, M.; Schwerin, P.; Göksu, V. *J Biol Chem* 1944, 157, 621.
69. Arnold, U. Habilitationsschrift, Limitierte Proteolyse zur Analyse lokaler und globaler Änderungen der Proteinstruktur am Beispiel von Ribonucleasen; Martin-Luther Universität: Halle-Wittenberg, 2007.



4.2 Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions

Preparation of bio-based films and coatings by spraying of native, fibrous and viscous collagen suspensions, *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, Vol. 6 (2012), Pages 1-11, doi 10.1166/jbmb.2012.1191, American Scientific Publishers. "Reproduced with kind permission from American Scientific Publishers.



Copyright © 2012 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

*Journal of
Biobased Materials and Bioenergy*
Vol. 6, 1–11, 2012

Preparation of Bio-Based Films and Coatings by Spraying of Native, Fibrous and Viscous Collagen Suspensions

Isabell Sommer^{1,*}, Peter M. Kunz¹, and Florian Gokel²

¹University of Applied Sciences Mannheim, Institute of Biological Process Engineering,

Paul-Wittsack-Str. 10, 68163 Mannheim, Germany

²Karl – Ladenburg Str. 38, 68163 Mannheim, Germany

The development of new processing technologies is one of the keys to success in research focusing on substituting commercially available synthetic plastics with biodegradable materials made from renewable resources. Due to the relatively high viscosity of native, fibrous collagen suspensions, the generation of films and coatings by spraying is not common, although it can be advantageous in many fields of application. This study examined the sprayability of collagen suspensions utilizing different viscosities, dry matter contents, pressures, nozzle sizes and spraying units. For comparison purposes, a gelatin solution was sprayed. The best results were obtained from a gel coat spraying unit working with a pressure of 180 bar, however spraying with an easy-to-use cup gun at 3–4 bar was also possible. When mixing the collagen with lecithin as a plasticizer, imperfections such as craters in the film surface were observed. However, the quality of the films, run-off behavior and drying times are strongly dependent on the viscosity, or rather the dry matter content. High collagen concentrations ($>25 \text{ g kg}^{-1}$ dry matter content) congest the nozzles, while lower concentrations ($<15 \text{ g kg}^{-1}$ dry matter content) tend to run off the coated surface. It is generally possible to spray viscous collagen suspensions (up to $700 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, 20 g kg^{-1} dry matter content) to prepare coatings and films even on vertical surfaces.

Keywords: Spraying, Collagen, Coatings, Films, Viscosity.

1. INTRODUCTION

Substituting commercially available synthetic plastics with biodegradable materials made from renewable resources has become a significant field of research.^{1,2} The research focuses on developing new materials and film-forming methods, enhancing film properties and evaluating potential applications.³ Numerous proteins, lipids and polysaccharides or combinations of these materials have been used for the production of biodegradable plastics for many years.^{1,2} These materials are characterized by their film-forming ability, renewable nature and biodegradability over a reasonable time period.¹⁻⁴ However, only a few proteins have been developed for commercial use. Among these proteins, collagen is a promising material which possesses a series of interesting features for producing packaging films and protective coatings.²

The food industry uses collagen-based films and casings as standard to prevent shrinkage loss and to increase juiciness and permeability of smoke.⁵ Collagen casings are the most commercially successful of the protein films. In medical applications, collagen is an interesting material for use as a drug delivery system or in tissue engineering due to its biodegradability and weak antigenicity.⁶

Today more than 25 different types of collagen are described in literature. Throughout the article the word "collagen" refers to bovine hide collagen consisting mainly of type I and small amounts of type III collagen (Maser F, pers. comm.).

Collagen is a fibrous, water-insoluble protein composed of a triple-helical bundle of three parallel, left-handed helices, each consisting of approximately 300 repeats of the trimer sequence (Glycine-X-Y), where X is often the amino acid proline and Y is often hydroxyproline. A typical characteristic is the high content of glycine (1/3), proline and hydroxyproline, which together define the architecture of the triple helix.^{3,7} The structural unit

*Author to whom correspondence should be addressed.
Email: I.Sommer@hs-mannheim.de

of collagen (“tropocollagen”) has a molecular weight of about 360 kDa⁸ and a density of 1.3–1.4 g cm⁻³ (dried in air).⁹ Collagen is produced from a by-product of the meat industry (flesh split)¹⁰ under mild conditions so that it is predominantly native, which means that the triple-helical structure is virtually unchanged and the resulting fibrillar structure produces films with beneficial mechanical properties.¹¹ Yet without the addition of plasticizers, these films are brittle due to the extensive interactions between protein chains through hydrogen bonding, electrostatic forces and hydrophobic interaction.^{4,12} With increased hydration they become increasingly flexible.¹³ Extruded collagen films are transparent with slight opacity.¹³ In low relative humidity environments they have good oxygen barrier properties which are, however, substantially lower than those of numerous plastic films.^{2,14} They exhibit high water vapor permeabilities and can serve as a carrier for flavor and antimicrobials.² In addition, collagen is physiologically harmless and approved for the food industry.¹⁵

Most free-standing collagen films are formed by extrusion of the viscous collagen suspension with a dry matter content of 44–100 g kg⁻¹ in a neutralizing coagulation bath, followed by washing and drying. Examples are collagen casings and wraps for meat products.¹³ In addition, coatings can be applied by solvent casting^{3,4,13}, dipping^{3,13,16,17} or brushing^{3,13,16} of the dispersed material and subsequent drying/solvent evaporation and solidifying. During this process the structures associate through hydrogen, ionic, hydrophobic and covalent bonding to form protein films.^{2,3} However, all these methods have several advantages and disadvantages depending on the application. Casting, for example, harbors the risk of sedimentation effects when drying fluids containing particles, resulting in non-uniform films.¹⁸ Dipping and brushing methods make it difficult to maintain a consistent quality.¹³ Spraying, though, results in more uniform films and is possible for dual applications (subsequent coating with a cross-linker).¹⁶

However, besides the spray coating of drugs with gelatin solutions, only limited information is available on spraying protein solutions to produce films and only a few applications have been successfully implemented.¹³ Besides gelatin, corn zein is one of just a few proteins which are sprayed and used commercially.¹⁹

Another example is reported by Hettiarachchy (Hettiarachchy N (<http://researchfrontiers.uark.edu/7630.php>)), who investigated sprayed protein film as a protective film against food pathogens. Olson and Zoss (1985) patented a sprayed gelatin film for meat which reduced oil absorption upon frying.²⁰ Other studies deal with mulch films based on sodium-caseinate or gelatin sprayed with a hand-held system.^{21,22}

The motivation for the present study was that the sprayability of collagen suspensions can be advantageous for applications of collagen films in or outside the meat processing industry, where, for example, products have to be

protected from physical, chemical or biological damage; thin and uniform layers are needed; only one part or side of a product or a large area is to be coated; and where a contactless application is needed.¹⁷ In addition, spray applications show promise due to their effectiveness, low material consumption, economy and the high quality of the layers achieved. Furthermore, it is possible to use patterns and to coat difficult-to-access areas. The object of this study was to investigate the sprayability of fibrous collagen suspensions under different conditions. Therefore, the influence of different spray guns, nozzles, pressures, viscosities and dry matter contents was investigated.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

2.1. Collagen Suspension Preparation

Raw collagen material from cattle split (130 g kg⁻¹ type-1 dry collagen content with minimal type-3 content) prepared with the following processing steps: washing of the flesh split; sodium-hydroxide treatment (16–170 hours); acidification with hydrochloric acid (pH 2.8–3.0) → rind, mechanical grinding; was purchased from Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). For the production of the collagen suspensions with different dry matter contents (see Table I), minced raw collagen material was added to deionized water containing aluminum sulfate and lecithin and glycerol as a plasticizer (for detailed information see Table I). Aluminum sulfate was used according to a recipe from Naturin Viscofan GmbH. It reduces the viscosity of the collagen suspension and therefore enables the use of higher collagen contents, which will further minimize the drying time (Maser F, pers. comm.). The suspension was homogenized at level 2 for 20 min at 200 rpm using a homogenizer. After overnight swelling the pH value was adjusted to 2.8 with hydrochloric acid. The resulting suspension was homogenized using the homogenizer at level 2 for an additional 30–45 min and further degasified in a vacuum cabinet at 5 mbar for 20 min. The total dry matter content was identified using a moisture analyzer. Five measurements were conducted for each suspension and the arithmetic mean value of the results was reported.

2.2. Gelatin Solution Preparation

To produce the gelatin solution with a dry matter content of 120 g kg⁻¹, 60 g gelatin (200 g Bloom, pH 5.8, viscosity 3.0 mPa*s at 60 °C and 66.7 g kg⁻¹, Gelita AG, Eberbach, Germany) was dissolved while stirring for 30 minutes in 500 ml deionized water at a temperature of 70 °C. The solution was degasified in a vacuum cabinet at 5 mbar for 20 min at 50 °C. The temperature of the solutions was maintained at 50 °C in a warm-air compartment dryer until spraying.

Table I. Composition of the collagen suspensions with different dry matter contents.

Composition	Suspension no.						Reference
	1	2	3	4	5	6	
Collagen (130 g kg ⁻¹) [g]	159.0	106.0	90.8	79.5	70.6	63.6	192
Lecithin (990 g kg ⁻¹) [g]	4.1	2.8	2.4	2.1	1.8	1.7	0
Aluminum sulfate (>970 g kg ⁻¹) [g]	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
Glycerol (850 g kg ⁻¹) [g]	4.7	3.2	2.7	2.4	2.1	1.9	0
Deionized water [g]	832.0	887.9	904.0	915.9	925.4	932.7	798
Total mass [g]	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Total dry matter content [g kg ⁻¹]	29	20	17	15	13	12	25
Collagen dry matter content [g kg ⁻¹]	21	14	12	10	9	8	25

2.3. Film Thickness Measurement

The thickness of the dried films was measured after drying in a warm-air compartment dryer using a micrometer screw. The thickness of the wet films was measured using a caliper (0.01 mm resolution). Five measurements were conducted for each film and the arithmetic mean value of the results was reported.

2.4. Viscosity Measurement

The viscosity at variable shear rates from 1 to 1000 s⁻¹ of the collagen suspension and gelatin solutions with different dry matter contents was measured using a rotational viscometer in accordance with DIN 53019 DIN²³ (167 rpm, shear velocity 1000 s⁻¹) at 25 °C. 100 measuring points were taken in each case and the mean value was established from these values.

2.5. Spray Application

Spraying tests were conducted using a Spraymaster RP (SATA GmbH & Co. KG, Komwestheim, Germany) cup gun and a gel coat spraying unit with an airless spray gun (Wolfangel GmbH, Ditzingen, Germany) at different pressures and with different nozzle sizes (see Table II). For the spraying tests with gelatin the paint cup was heated to approx. 70 °C in a warm-air compartment dryer to prevent gelation from occurring prematurely. The suspensions were sprayed onto a silver-grey metallic painted Volkswagen Golf hood and onto painted test plates (John Deere, Mannheim, Germany). For the two-component spraying tests, glyoxal G2 (ethandial) was used as a hardener (10 g kg⁻¹ in water).

Table II. Spraying conditions.

Parameter	Cup gun (SATA) ²	Gel coat unit (wolfangel) ²⁴
Principle	Pneumatic	Hydraulic (airless)
Spray gun	Spraymaster RP	2KAF08
Nozzle type	Two-component nozzle	One component nozzle
Nozzle opening size	1.3 and 1.7 mm	Vario nozzle
Pressure	0.1–1.7 bar (3–4 bar ³)	180 bar
Feed tank	Pessurized paint cup	External
Special features		External mix with second component possible

2.6. Drying Time Evaluation

The drying time of the collagen films was determined using a moisture analyzer. For evaluation, the volume of a collagen suspension with a dry matter content of 25 g kg⁻¹ which is necessary for a wet film level of 1 (6.7 ml), 1.5 (10 ml) or 3 mm (20 ml) was filled into an aluminum tray and the suspensions were then dried to a constant weight at 37, 45, 60 or 80 °C.

3. RESULTS AND DISCUSSION

In order to evaluate the sprayability of collagen suspensions, different influencing factors such as viscosity, dry matter content, nozzle size and pressure were tested.

3.1. Dependency of Viscosity on Dry Matter Content

The viscosity, based on the concentration of dry matter content and the related rheological behavior, has a decisive influence on the processability of collagen suspensions and the quality of sprayed films. On one hand, viscosity must be low enough to prevent the risk of blocking the nozzle and to enable pumping and uniform mixing.¹⁶ On the other hand, the situation differs with respect to the desired film thickness: The thicker the film should be, the more viscous the coating solution has to be in order to prevent the material from running off vertical surfaces.¹⁶ Moreover, the viscosity influences the stability of the solution (ability to keep insoluble ingredients in suspension) and the formation of smooth and uniform film surfaces.¹⁶ A minimum and maximum concentration need to be set to produce intact and mechanically stable films. Therefore, the viscosity of collagen suspensions with different total solid contents at a shear rate of 500 s⁻¹ was examined in accordance with DIN 53019²³ as described in the experimental section. The dependency of viscosity on the total collagen solid content is illustrated in Figure 1. It was observed that increasing the percentage of dry collagen leads to a proportional increase in the viscosity (Fig. 1). Based on their viscosity value and appearance, collagen suspensions with a dry content of 5–20 g kg⁻¹ most resemble motor oil with 0.5 Pa*s.²⁵ In comparison, gelatin solutions are less viscous. Gelatin solutions with a comparable viscosity

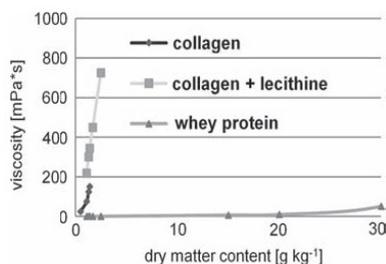


Fig. 1. Dependency of the viscosity [mPa*s] of collagen suspensions (pH 2.8) and whey protein (pH 6.5)²⁶ on the dry matter content [g kg⁻¹] measured with a rotational viscometer Rheometer Physica UDS 200 at a shear rate of 500 s⁻¹ and at a temperature of 25 °C.

have a dry matter content of 10–25%, depending on the Bloom value, temperature, pH and shear rate (Parmentier GmbH (<http://www.parmentier.de/gelatine/kennzahl.htm>)). By comparison, Alizadehfard (1995) reported a viscosity of a whey protein solution (dry matter content of 300 g kg⁻¹) of 52 mPa*s at a shear rate of 500 s⁻¹.²⁶ For most cast edible films in the literature, dry matter contents of about 200–350 g kg⁻¹ with viscosities of 1–10 mPa*s are reported.¹⁶ The viscosity of a collagen suspension (700 mPa*s, dry matter content of 12 g kg⁻¹) at a shear rate of 100 s⁻¹ is three times higher than the viscosity of a sprayable powder-slurry clear coat with 200–250 mPa*s.³¹ As such, it should even be possible to spray collagen using painting robots from the automotive industry.

In addition to viscosity the solid content also influences the dry and wet film thickness. For example, if a solution with a dry matter content of 100 g kg⁻¹ is sprayed in a thickness of 500 μm, a dry film thickness of 50 μm is achieved.¹⁶ With the same dry film thickness and a 500 g kg⁻¹ solution, the desired wet film thickness of 100 μm is too low to guarantee good process controllability. Figures 2 and 3 depict the shear stress depending on the shear rate. Unfortunately, it was not possible to measure the viscosity of the collagen suspension with

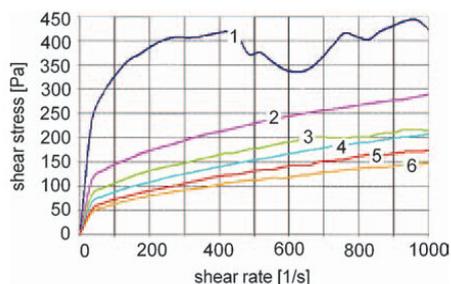


Fig. 2. Shear stress [Pa] depending on the shear rate of collagen suspensions with different dry matter contents (1 = 29 g kg⁻¹, 2 = 20 g kg⁻¹, 3 = 17 g kg⁻¹, 4 = 15 g kg⁻¹, 5 = 13 g kg⁻¹, 6 = 12 g kg⁻¹) measured with a rotational viscometer Rheometer Physica UDS 200 at a temperature of 25 °C.

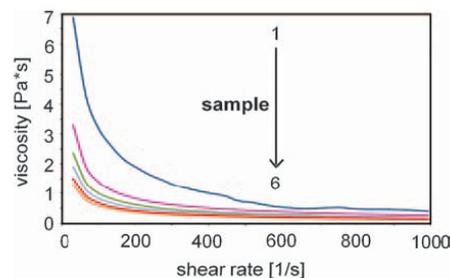


Fig. 3. Viscosity [Pa*s] depending on the shear rate of collagen suspensions with different dry matter contents (from top to bottom: sample 1 = 29 g kg⁻¹, sample 2 = 20 g kg⁻¹, sample 3 = 17 g kg⁻¹, sample 4 = 15 g kg⁻¹, sample 5 = 13 g kg⁻¹, sample 6 = 12 g kg⁻¹) measured with a rotational viscometer Rheometer Physica UDS 200 at a temperature of 25 °C.

the highest dry matter content (25 g kg⁻¹) because collagen fibers and clusters were pressed out of the cone-plate measuring system. The suspensions exhibited a structural viscous/pseudo-plastic behavior, comparable with mayonnaise or tomato puree.²⁷ Viscosity decreased with increasing shear rate as a result of broken hydrogen bonds, whereas the shear stress increased. This has a positive impact on the spraying process as the pressure, which is needed to maintain the fluid flow, rises only slightly.²⁷

3.2. Sprayability and Maximum Layer Thickness Before Run-Off Depending on Viscosity

The maximum wet layer thickness on vertical surfaces is mainly defined by the viscosity of the sprayed suspension (among other factors such as surface tension and density).²² In order to determine the maximum film thickness before run-off, collagen suspensions of different collagen dry matter contents were sprayed with a cup gun at a pressure of 1.7 bar and a nozzle size of 1.7 mm onto a silver-grey metallic painted Volkswagen Golf automobile hood. Thickness measurements were conducted as described in the Experimental section. Figure 4 shows the maximum layer thickness before run-off was examined.

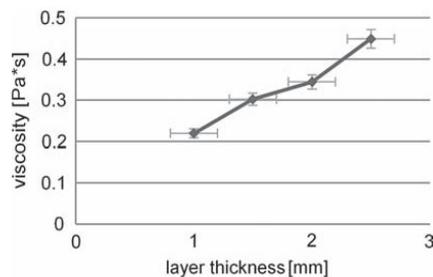


Fig. 4. Maximum layer thickness of a sprayed collagen film on a vertical surface before run-off was examined depending on the viscosity of the collagen suspension.

With increasing viscosity the maximum layer thickness increased almost proportionally. Collagen solutions with a viscosity of approximately 0.2 Pa*s (13 g kg⁻¹ total dry matter content) could be applied to a maximum thickness of 1 mm before run-off was observed, whereas doubling the viscosity (20 g kg⁻¹ dry matter content) led to an increase in layer thickness by a factor of 2.5 before run-off was observed. According to equation 1 (dependency of flow velocity on viscosity and film thickness), at an identical flow velocity a maximum layer thickness of about 1.8 mm was expected. The deviation can be explained by the measurement uncertainty during layer thickness determination.

$$V_{\max} = \frac{g\rho x^2 \sin \alpha}{2\eta} \quad (1)$$

V_{\max} = flow velocity of the film surface

g = gravity

ρ = density

α = angle of inclination to the horizontal

η = dynamic viscosity

x = film thickness

Nevertheless, the equation clearly shows the following relationship (see Eq. (1)). With increasing film thicknesses, the flow velocity of the film surface increases excessively. Local differences in viscosity, always with attendant surface irregularities, lead to unequal flow velocities and hence to what are known as runs and lips (TU Darmstadt (http://kunststofftechnik.tu-darmstadt.de/files/skript_tutorium_kunststofftechnik_dki.pdf)). Such run-off behavior of collagen suspensions with different dry matter contents is shown in Figure 4. For the purposes of investigation, collagen suspensions with decreasing viscosities were sprayed with a Spraymaster RP cup gun at a pressure of 1.7 bar and a nozzle size of 1.7 mm onto a silver-grey metallic painted Volkswagen Golf automobile hood. The run-off behavior was examined ten minutes after spraying. Figure 5 illustrates the run-off behavior of sprayed collagen film depending on the viscosity. In terms of the quality of the sprayed films and the risk of run-off, the best results were obtained with collagen suspensions with

a dry matter content of 17–20 g kg⁻¹. An increase in viscosity through slight surface drying counteracts this effect. If this is not sufficient, thickeners can prevent run-off to a certain extent (TU Darmstadt (http://kunststofftechnik.tu-darmstadt.de/files/skript_tutorium_kunststofftechnik_dki.pdf)).

3.3. Dependency of the Dried Collagen Layer Thickness on the Application Volume

Film thickness can modify film properties such as barrier performance or mechanical properties. After the films are dry, different layer thicknesses are therefore required depending on the field of application. Based on the low dry matter content and the high viscosities of the collagen suspensions, relatively thick layers have to be sprayed on the surface in order to achieve a sufficient minimum thickness after drying. In order to determine the correlation between application volume and resulting dry layer thickness, different amounts of a collagen suspension with a dry matter content of 25 g kg⁻¹ were sprayed with a Spraymaster RP cup gun at a pressure of 1.7 bar and a nozzle size of 1.7 mm onto painted steel test plates. Film thicknesses were measured after drying in a warm-air compartment dryer as described in the Experimental section. Figure 6 shows how the dry layer thickness depends on the wet layer thickness. The dry layer thicknesses increase proportionally as the wet layer thicknesses increase. In order to achieve a collagen layer thickness of 150 μm after drying, it was necessary to spray a layer with a thickness of approximately 3 mm of a collagen suspension with a dry matter content of 25 g kg⁻¹ onto the surface. Theoretically, only a dry layer thickness of 75 μm was expected (wet film thickness multiplied by the percentage of the solids).¹⁶ Embuscado et al.¹⁶ reported an ideal wet film thickness for biopolymer films in the range of 250–760 μm depending on the viscosity and polymer solution, resulting in a final dry film thickness of 38–76 μm . Thinner dry films are difficult to produce (difficulty obtaining a uniform coating, risk of over-drying) and difficult to handle after drying

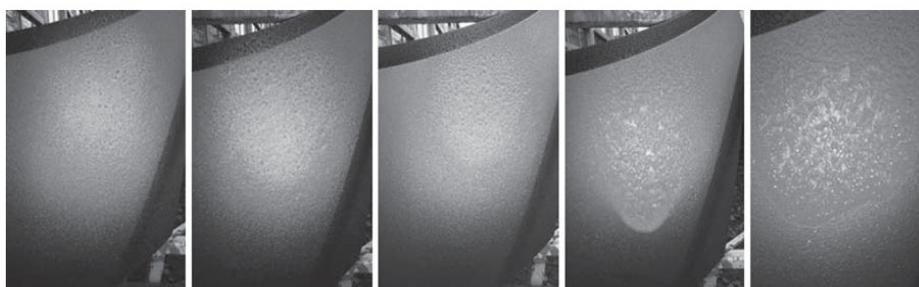


Fig. 5. Run-off of a sprayed collagen film depending on the viscosity (from left to right: 20 g kg⁻¹, 17 g kg⁻¹, 15 g kg⁻¹, 13 g kg⁻¹, 11 g kg⁻¹), photos taken 10 minutes after spraying.

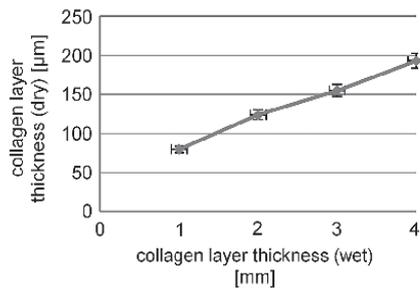


Fig. 6. Dependency of the dry layer thickness on the wet layer thickness of a sprayed collagen suspension with a dry matter content of 25 g kg^{-1} after drying at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ over night.

(weak and fragile films, not enough strength to peel them off in one piece).¹⁶

As the processed, dried films require a minimum thickness, it must be considered that with increasing water content and decreasing dry collagen concentration while retaining an equal film thickness, larger volumes must be sprayed onto the surface and dried, causing longer drying times. Doubling the film thickness results in quadruple drying times due to the twofold quantity of water and the twofold length of diffusion path according to Fick's method (TU Darmstadt (http://kunststofftechnik.tu-darmstadt.de/files/skript_tutorium_kunststofftechnik_dki.pdf)).

3.4. Drying Time Depending on the Film Thickness and Dry Matter Content

As the results showed, spraying of native fibrous collagen suspensions is only possible with a water content of approximately 980 g kg^{-1} (20 g kg^{-1} dry matter content). In order to achieve a certain dry film thickness, large volumes have to be sprayed onto the surface. Drying these films results in long drying times and potentially higher costs.¹⁶ The drying time of collagen films (3 mm wet layer thickness) at different temperatures was investigated according to the methods described in the Experimental section. Figure 7 shows the drying times for a 3 mm-thick film at different drying temperatures. With increasing temperature, the required drying time decreased significantly (from about 7 hrs at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ to less than 3 hrs at $80 \text{ }^\circ\text{C}$). However, increasing the temperature above $37 \text{ }^\circ\text{C}$ resulted in a growing number of dark colored, brittle, uneven and shrunken films, as previously observed by Gennadios (1995).¹⁴ When collagen is heated, the intramolecular hydrogen bonds which stabilize the native structure are dissociated, resulting in the transition from helix to coil.²⁸ Consequently, it is not possible to increase the drying temperature to more than $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (denaturation temperature)⁶ due to the risk of denaturation of the collagen molecule.

Figure 8 depicts the drying time depending on the wet layer film thickness. Doubling the film thickness (from

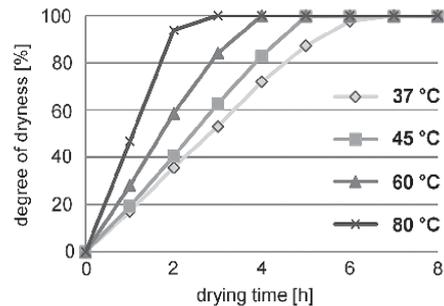


Fig. 7. Drying time of a collagen film with 3 mm thickness prepared from a 25 g kg^{-1} collagen suspension at different drying temperatures (37 , 45 , 60 and $80 \text{ }^\circ\text{C}$).

1.5 to 3 mm) resulted in quadruple drying times (from about 3.75 to 7.5 hrs) due to the twofold quantity of water and the twofold length of diffusion path according to Fick's method (TU Darmstadt (http://kunststofftechnik.tu-darmstadt.de/files/skript_tutorium_kunststofftechnik_dki.pdf)). In comparison, solvent-based coatings have significantly shorter drying times based on the fact that ethanol, for example, is more volatile than water.¹⁴ Gennadios (1995) reported drying times for ethanol-based coatings of 20–30 min at ambient temperatures, whereas water-based films required drying times of 16–24 h.¹⁴

3.5. Quality of Sprayed Collagen Films Depending on the Spraying Device and the Pressure

Besides viscosity and other factors such as surface tension, the quality of a sprayed film also depends on the process pressure, nozzle shape and nozzle design, as they affect the flow rate, size of droplets and spraying distance, among other factors.¹⁶ In order to examine the sprayability of collagen suspensions with two different devices and different pressures, a collagen suspension containing lecithin and glycerol as plasticizers (dry matter content of 20 g kg^{-1}) was produced as described in the Experimental section. At

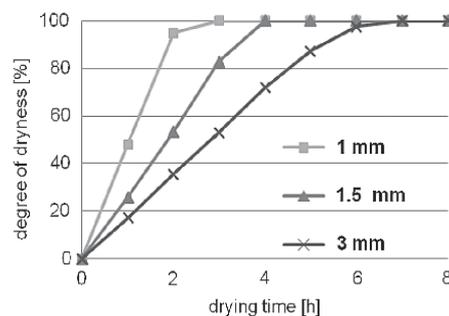


Fig. 8. Drying time of a collagen film with 1, 1.5 or 3 mm thickness prepared from a 25 g kg^{-1} collagen suspension at a drying temperatures of $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

first the sprayability was tested using a Spraymaster RP cup gun at a pressure of 0.5–1.7 bar and a nozzle size of 1.3 or 1.7 mm respectively. In the tests a two-component nozzle with external mixing was used, as it is described as particularly suitable for viscous fluids and is not susceptible to clogging.^{29,30} This nozzle type is self-priming, which is advantageous when working with viscous fluids as the fluid does not need to be accelerated. Pneumatic spraying systems use the energy of the pressure gas to atomize the fluid. The fineness of the spray jet is affected by the ratio of gas and fluid mass flow.³¹

Nevertheless, spraying at pressures of less than 1.7 bar and respective nozzle sizes of less than 1.7 mm resulted in clogged nozzles, inhomogeneous spray jets and unsatisfactory surface qualities. These findings can be explained as follows. The collagen bulk material used (120 g kg⁻¹ dry matter content) consists of dispersed and suspended fibers in water. Because of its relatively high viscosity it was very difficult to dilute with water, mix with other components such as lecithin (plasticizing agent) and achieve homogenous suspensions with standard laboratory instruments. The temperature sensitivity of collagen was a crucial problem. During homogenization, care needs to be taken to ensure that only slight energy (heat) is generated to prevent denaturation of the collagen. The denaturation temperature of collagen depends, among other things, on the water content of the sample, the pH and the tissue from which the collagen was extracted. Denaturation effects have been observed by Zhang et al.⁶ from 37.5 °C on.⁶ Despite intensive and careful mixing efforts it was not possible to achieve homogenous collagen-lecithin suspensions. The remaining inhomogeneities in the form of clusters resulted in clogged nozzles and craters (see Fig. 9). When these clusters strike the layer applied, the liquid coating material migrates away from the impact site and a crater is generated.³² The clogging behavior is affected by the inhomogeneities, energy input and ratio of minimum cross flow-section to average droplet size.³³

Figure 10 (top, left) depicts the appearance of the sprayed film (pressure = 1.7 bar, nozzle size = 1.7 mm) on a painted test plate. Due to the inhomogeneities (fiber

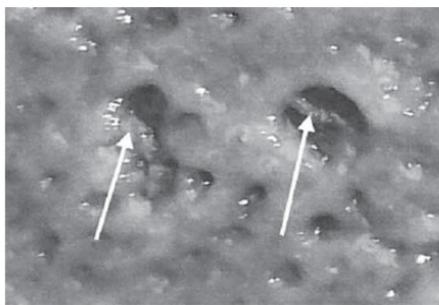


Fig. 9. Craters in the sprayed collagen film caused by inhomogeneities (collagen-lecithin clusters) in the suspension.

and lecithin clusters) present in the suspension and the relatively low pressure of 1.7 bar, the quality of the sprayed film was unsatisfactory. There were many crater-like holes on the surface, which lower the protective effect and the mechanical resistance of the resulting film enormously. Lecithin was chosen as a result of another study, the objective of which was to improve the water resistance of collagen films. In achieving this objective, common plasticizers such as glycerine are obstructive due to their good water solubility and their hygroscopic nature. If water resistance plays a tangential role, many of the problems reported, such as inhomogeneous suspensions and films (“craters”), could be avoided by using glycerine as a plasticizer.³⁴

Even varying the spray jet (wide spread (see Fig. 11 left) and standard spray jet (see Fig. 11 right)) did not cause a significant improvement in the quality of films. With a wide-spread spray jet, the differences in the applied fluid volume between the center and the edge are smaller.³⁵

Based on these poor results, spray experiments with the cup gun and a pressure of 3–4 bar (according to the manufacturer’s specifications the pressure is limited to 1.7 bar (SATA GmbH & Co. KG (http://sata.com/uploads/tx_pxspecialcontent/27508.pdf)) and a collagen suspension without the cramping lecithin were conducted with the support of Wolfangel GmbH. The resulting quality of the film surface is shown in Figure 10 (top right). The film exhibited an orange-peel effect but the number of craters was significantly reduced and close to zero.

As a next step the sprayability of the collagen-lecithin suspensions (20 g kg⁻¹ dry matter content) was tested with a hydraulic (airless) gel coat spraying unit and a spray gun with a one-component variable nozzle (Wolfangel GmbH, Ditzingen, Germany) at a pressure of 180 bar. With this system, which is suitable for viscous paints, lacquers and materials, the fluid is pumped without an additional pressure gas.³⁶ As the suspension leaves the nozzle it expands due to the high energies, resulting in the formation of small drops (H. Rohenkohl, A. Mechelhoff, D. Jansen (http://veu.de/files/abschlussbericht_99z.pdf)). One advantage of this system is that the drops of fluid strike the surface with a lower impact velocity (most of the energy is required to atomize the fluid).³⁷ The results of these experiments are shown in Figure 10, bottom. The picture on the left shows the quality of the layer achieved after one-component spraying of a collagen-lecithin suspension. Due to the higher pressure of the gel coat spraying unit and the variable nozzle size, the quality of the sprayed collagen layer was again improved. Clusters were transported with the spray jet, thus preventing clogging of the nozzle. Although there were again more craters caused by the lecithin-collagen clusters, the overall appearance of the film was much better. The surface showed no orange-peel effect and was therefore much smoother and more

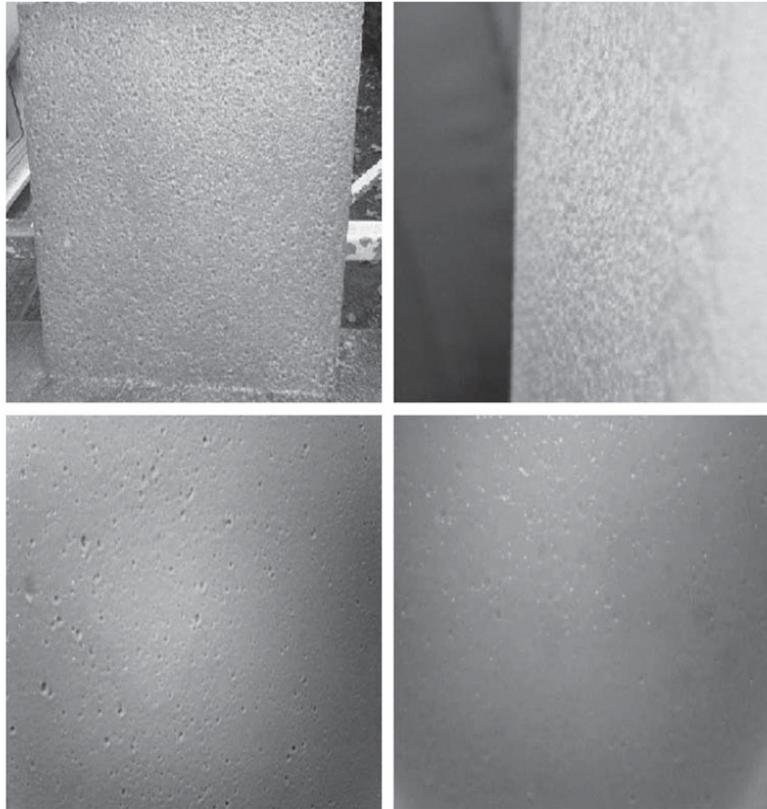


Fig. 10. Top: Test plate coated with a cup gun Spraymaster RP and a nozzle size of 1.7 mm. Left: collagen-lecithin suspension (15 g kg^{-1} total dry matter content), pressure = 1.7 bar. Right: collagen suspension without lecithin (20 g kg^{-1} total dry matter content), pressure = 3–4 bar. Bottom: Test plate coated with a collagen-lecithin suspension (15 g kg^{-1} total dry matter content) with a gel coat spraying unit and an airless spray gun, pressure = 180 bar, vario nozzle. Left: 1-component spraying. Right: 2-component spraying (second component = 10 g kg^{-1} Glyoxal solution).

RESEARCH ARTICLE

uniform. The variable nozzle made it possible to adjust the nozzle opening during the spraying process. Blockages in the nozzle were cleared by opening the nozzle briefly by hand. The simultaneous spraying of a second component (10 g kg^{-1} glyoxal solution) with a round-jet nozzle (externally mixed) led to very smooth and uniform films

without craters, as depicted in Figure 10 (bottom right). Collagen-lecithin clusters were removed from the spray jet by the spray jet of the second component. The result is expected to improve further if the collagen compounds are sieved first to avoid heterogeneities or if a different plasticizer is used. Lecithin was chosen as a result of another



Fig. 11. Standard spray jet (left) and wide spread spray jet (right).

study, the objective of which was to improve the water resistance of collagen films.

3.6. Quality of Sprayed Gelatin Films as a Comparison

By way of comparison, a gelatin solution with a dry matter content of 120 g kg^{-1} was prepared and sprayed with a Spraymaster RP cup gun at a pressure of 1.7 bar with a nozzle size of 1.7 mm onto a silver-grey metallic painted Volkswagen Golf automobile hood, as described in the Experimental section. Figure 12 (left and right) shows the spraying process and reveals the problem of spraying gelatin solutions due to the effect of gelation. Although the paint cup was heated to approx. $70 \text{ }^\circ\text{C}$ in a warm-air compartment dryer to prevent early gelation before being filled with the $50 \text{ }^\circ\text{C}$ gelatin solution, the gelatin spray mist gelled in the air (air temperature was about $15 \text{ }^\circ\text{C}$), resulting in a white, spongy and porous film as depicted in Figure 13 (left and right). The gelation during cooling is a result of the formation of triple helices which are stabilized by hydrogen bonds.³⁷ Depending on the gelatin concentration, the gelation temperature is in the range of $18.5\text{--}28.4 \text{ }^\circ\text{C}$ for a 100 g kg^{-1} gelatin solution.³⁷

During spraying/gelation air bubbles are trapped in the gelatin droplets resulting in the white color of the films

(see Fig. 13 left). These findings may be explained by the fact that the air bubbles reflect the light completely.³⁸ Aside from requiring more from the spraying technique due to the aforementioned risk of gelation, gelatin has the advantage that run-off is prevented through the gelation of the solution on the surface; moreover, heating the suspension accelerates the drying process. The surface of the sprayed gelatin film was relatively uneven due to gelation of the droplets in the air before striking the surface (compare Fig. 13 right).

3.7. Quality of Peeled-Off Gelatin and Collagen Films

After drying the sprayed collagen and gelatin films it was possible to peel the films off the coated surface. The appearance of the resulting free-standing films is shown in Figure 14. The collagen films were transparent with slight opacity and much thinner and smoother than the gelatin films, which were white, spongy, and porous. The white color of the gelatin is based on the fact that the film contained air bubbles which reflect the light completely.³⁸ Compared to the collagen film, the gelatin film was significantly thicker. Due to the fact that the gelatin films did not contain a plasticizer, they were much more brittle than the collagen films. Mechanical properties such as tensile strength have not yet been investigated due

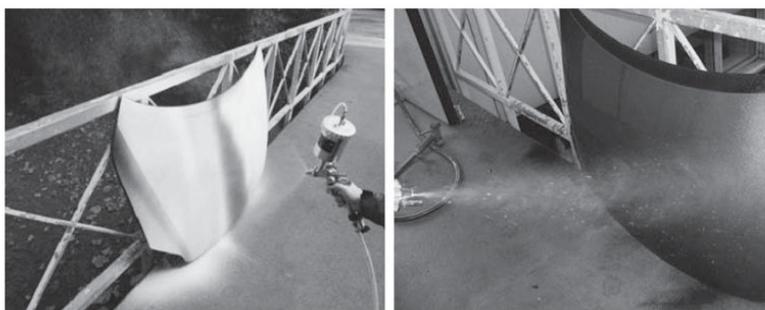


Fig. 12. Gelling of a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ hot gelatin solution (120 g kg^{-1} dry matter content) during spraying with a preheated cup gun Spraymaster RP (SATA GmbH & Co. KG, Kornwestheim, Germany) at a pressure of 1.7 bar and a nozzle size of 1.7 mm onto a silver-grey metallic painted Volkswagen Golf automobile hood.

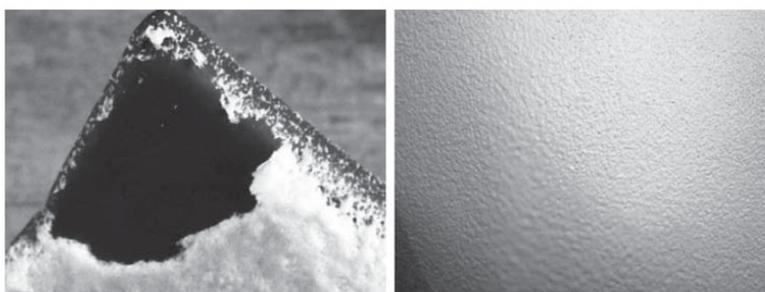


Fig. 13. White, spongy and porous gelatin film after drying (left) and uneven surface quality of the sprayed gelatin film (right).

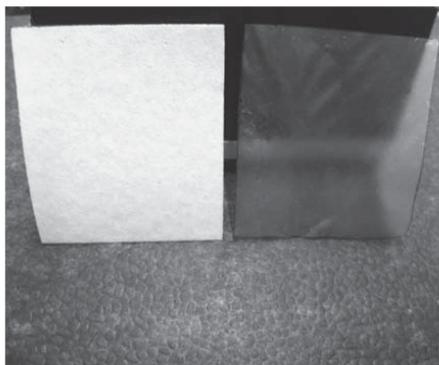


Fig. 14. Appearance of the peeled-off gelatin (left) and collagen (right) film after spraying with a cup gun Spraymaster RP at a pressure of 1.7 bar and a nozzle size of 1.7 mm and drying at room temperature.

to the imperfections of the collagen films caused by the inhomogeneities of the suspensions.

4. CONCLUSION

The results indicate that it is possible to spray native fibrous collagen suspensions plasticized with lecithin with a total dry matter content of 12–20 g kg⁻¹ and a viscosity of 200–700 mPa·s for the preparation of films.

However, due to the relatively high viscosities of the native collagen suspensions combined with their temperature sensitivity, it was difficult to homogenize the suspensions and to dry the resulting films without any denaturation defect. Furthermore, residual inhomogeneities such as lecithin or collagen fiber clusters lead to craters in the film surface.

The outcomes made clear that the use of native collagen suspensions implies numerous limitations in terms of homogenizing (high viscosities of the suspensions), preparing the suspension and drying the films formed after spraying (preventing denaturation). The problems described could be solved by using denaturated collagen and different plasticizers. Collagen in a native state, however, has the advantage of being more stable in terms of microbial degradation (it is highly resistant to the proteolytic activity of trypsin³⁹ and it is known to be relatively resistant to decomposition⁴⁰ compared with denaturated collagen).⁴¹ Moreover, the resulting films prepared with native collagen possess improved mechanical properties due to their fibrillar structure.¹¹

A further problem and a major cause of the inhomogeneities and poor quality of the films was the use of lecithin as an additive. Lecithin was added to the suspension in order to improve the suppleness of the resulting films, according to another study which aimed to improve the water resistance of collagen films. The result of this study was that common plasticizers such as glycerine are obstructive to achieving the objective due to

their good water solubility and their hygroscopic nature. In application fields where the water resistance plays a tangential role, it is possible to avoid the problems reported (“craters” and “clogging”) by using glycerine as a plasticizer.³⁴

With regard to the possible film layer thickness for a collagen suspension of 20 g kg⁻¹ dry matter content on a vertical surface (painted steel) before run-off was observed, values of approximately 2.5 mm were measured (resulting in a dry layer thickness of about 130 μm).

The high water content of the collagen films (about 980 g kg⁻¹) caused long drying times of approximately 6 hrs at 37 °C for a layer thickness of 2.5 mm. Due to the temperature sensitivity of the collagen it is not possible to increase the drying temperature.

By comparison, a gel coat spraying unit working with a pressure of 180 bar and a variable nozzle with a cup gun at a pressure of 3–4 bar and a nozzle size of 1.7 mm produced the best results among the gel coat systems. After drying sprayed collagen and gelatin films it was possible to peel the films off the coated surface. The resulting collagen films were transparent with slight opacity and much thinner and smoother than the gelatin films, which were white, spongy, and porous due to gelation of the gelatin solution in the air during spraying. Because the gelatin films did not contain a plasticizer, they were much more brittle than the collagen films.

In summary, spraying collagen suspensions to achieve protective collagen films on difficult-to access surfaces is an promising approach with some limitations, such as their susceptibility to microbiological attack, smell upon decomposition, low water resistance and long drying times.

Acknowledgment: This research was supported by the DBU Deutsche Bundesstiftung Umwelt and Naturin Viscofan GmbH, Weinheim (Germany). The Authors are very thankful to Dr. F. Maser and Chr. Link for the manufacturing of the collagen bulk material. The author wishes also to acknowledge help by Mr. Grebe with measuring the viscosity. Furthermore the authors are very thankful to Mr. Ruppel (Wolfangel GmbH, Ditzingen, Germany) for supporting the spray experiments with the gel coat spraying unit and the spray gun at higher pressures.

References

1. A. Jerez, P. Partal, I. Martinez, C. Gallegos, and A. Guerrero, *Theol. Acta* 46 (2007).
2. S. Hewage and S. M. Vithanarachchi, *J. Nat. Sci. Foundation Sri Lanka* 37, 1 (2009).
3. T. Bourtoom, *Int. Food Res. J.* 15, 3 (2008).
4. J.-W. Rhim, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47, 4 (2007).
5. S. W. Ruban, *Vet. World* 2, 2 (2009).
6. Z. Zhang, G. Li, and B. Shi, *J. Soc. Leather Technol. Chem.* 90, 1 (2006).

7. M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Adv. Exp. Med. Biol.* 611, 4 (2009).
8. G. P. Talwar and L. M. Srivastava, *Textbook of Biochemistry and Human Biology*, Prentice-Hall of India Pvt. Ltd., New Delhi (2003).
9. V. Podrazký and V. Sedmerová, *Cell. Mol. Life Sci.* 22, 12 (1966).
10. J. Kanagaraj, K. C. Velappan, N. K. Chandra Babu, and S. Sadulla, *J. Sci. Ind. Res.* 65, 7 (2006).
11. K. L. Wolf, P. J. A. Sobral, and V. R. N. Telis, Characterizations of Collagen Fibers for Biodegradable Film Production, 13th World Congress of Food Science & Technology, Food is life, Nantes, France, September (2006).
12. R. Sothornvit and J. M. Krochta, *J. Food Sci.* 65, 4 (2000).
13. Y. Wang and G. W. Padua, *Macromol. Mater. Eng.* 288, 11 (2003).
14. A. Gennadios, M. A. Hanna, and L. Kurth, *Food Sci. Technol.* 30, 4 (1997).
15. K. Yamada, H. Takahashi, and A. Noguchi, *J. Food Sci. Technol.* 30, 5 (1995).
16. M. E. Embuscado and K. C. Huber, *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York (2009).
17. E. A. Baldwin, *Handbook of Food Preservation*, edited by M. S. Rahman and F. L. Boca Raton, CRC Press (2007), pp. 477–507.
18. A. Obara and J. W. McGinity, *Pharm. Res.* 11, 11 (1994).
19. P. Mallikarjunan, M. S. Chinnan, V. M. Balasubramaniam, and R. D. Phillips, *Food Sci. Technol.* 30, 7 (1997).
20. S. Olson and R. Zoss, Fried foods of reduced oil absorption and methods of preparation employing spray of film forming agent. U.S. Patent 4,511,583, April (1985).
21. J. Ulrich, M. Pietzsch, P. Froberg, and K. Patzsch, Method for improving the physical-chemical properties of biodegradable materials, W.O. Patent 2009/155895, December (2009).
22. V. Yusuf Ali, R. Ghorpade, M. Weber, and Y. Hanna, Method for mulching an agricultural soil bed using a biodegradable protein material and a mulched agricultural crop growing plot produced thereby, U.S. Patent 6,672,001, January (2004).
23. DIN 53019, Determination of viscosity and flow curves with rotational viscosimeters – Part 2: Viscosimeter calibration and determination of the uncertainty of measurement (2008).
24. Technical data sheet: Gelcoat-Spritzanlagen, Wolfangel GmbH, Ditzingen, Germany (2011).
25. A. Glawe and A. Giessmann, *Kautsch. Gummi Kunstst.* 6 (2010).
26. M. R. Alizadehfard and D. E. Wiley, *Iran. J. Polym. Sci. Technol.* 4, 2 (1995).
27. A. Goldschmidt and H.-J. Streitberger, *BASF Handbuch Lackiertechnik*, Vincentz Verlag, Hannover (2002).
28. H. Hörmann and H. Schlebusch, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 349, 1 (1968).
29. G. Wozniak, *Zerstäubungstechnik: Prinzipien, Verfahren, Geräte*, Springer Verlag, Berlin (2003).
30. H. P. Schuchmann and H. Schuchmann, *Lebensmittelverfahrenstechnik: Rohstoffe, Prozesse, Produkte*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2005).
31. T. Richter, *Zerstäuben von Flüssigkeiten: Düsen und Zerstäuber in Theorie und Praxis*, Expert Verlag, Renningen (2004).
32. P. Mischke, *Filmbildung in Modernen Lacksystemen*, Verlag Vincentz Network, Hannover (2007).
33. T. Walzel, *Chem. Ing. Tech.* 80, 9 (2008).
34. J. M. Orban, L. B. Wilson, J. A. Kofroth, M. S. El-Kurdi, T. M. Maul, and D. A. Vorp, *J. Biomed. Mater. Res.* 68, 4 (2004).
35. G. Kutz and A. Wolff, *Pharmazeutische Produkte und Verfahren*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2007).
36. W. McElroy, *Painter's Handbook*, Craftsman Book Company, Carlsbad (1987).
37. A. M. Tosh and A. G. Marangonia, *Appl. Phys. Lett.* 84, 21 (2004).
38. W. Jung, *Fischer Kolleg: Physik*. Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt (1985).
39. G. Gries, *Z. Gesamte Exp. Med.* 142 (1967).
40. B. B. Dent, S. L. Forbes and B. H. Stuart, *Environ. Geol.* 45 (2004).
41. Anonymous, Leonardo da Vinci Program: environmentally degradable plastics, Contract Report, Contract No. 1/098/2/05261/PI/II. 1.1b/CONT (1999).

Received: 4 December 2011. Revised/Accepted: 12 January 2012.

4.3 Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films

This Paper has been published in the Journal of Plastic Film and Sheeting, 28 (1), Jan. / 2012 by SAGE Publications Ltd. / Inc., All rights reserved. ©. Reproduced with kind permission from SAGE Publications Ltd. / Inc..



Journal of Plastic Film & Sheeting
28(1) 30–62
© The Author(s) 2011
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/0756087911423561
jpf.sagepub.com
SAGE

Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films

Isabell Sommer and Peter M Kunz

Abstract

The potential use of collagen as packaging film was investigated. Various chemical properties (permeability, resistance to chemicals, and weathering) and physical properties (resistance to puncture impacts, tearing, and temperature) of cast films were compared with those of a polyolefin (polypropylene block copolymer) car body paint protection film. The collagen films showed excellent resistance to nonpolar substances (oil and fuel mix) and they had tensile strengths (27 N/mm^2) similar to those of polyolefin films (38 N/mm^2). The collagen films tested, however, were brittle (elongation at break = 34%) and exhibited a high solubility in polar substances like deionized water (total soluble matter = 20 wt% at 20°C , 40 wt% at 60°C after 1 h). Due to the low water resistance their usage as packaging films is anticipated to be restricted to indoor applications or to applications which require water solubility.

Keywords

collagen film, polyolefin film, mechanical properties, chemical properties, packaging film, nonfood

Institut für Biologische Verfahrenstechnik, Fakultät für Verfahrens- und Chemietechnik, University of Applied Sciences Mannheim, Paul-Wittsack-Straße 10, 68163 Mannheim, Germany.

Corresponding author:

Isabell Sommer, Institut für Biologische Verfahrenstechnik, Fakultät für Verfahrens- und Chemietechnik, University of Applied Sciences Mannheim, Paul-Wittsack-Straße 10, 68163 Mannheim, Germany
Email: i.sommer@hs-mannheim.de

Sommer and Kunz

31

Introduction

The range of requirements and functions (protection, inertness, lightweight, transparency, versatility, etc.) that packaging films have to meet is very extensive and, in some cases, diverging.¹ The functions are dictated, among other things, by the films themselves, the storage and transport methods, market forces, consumer behavior, and the environmental concerns.² The necessary functions include inter alia the protection against physical, chemical, or biological phenomena, depending on the area of the use.² The duration of the protective effect extends from production to the end use. In addition, food packaging films have to meet particularly tough requirements in terms of optical, gas barrier, and microbiological properties, as well as physical handling properties, such as abilities to be easily welded and sealed.^{1,2} Other industries usually place greater importance on other properties as well, such as chemical resistance, mechanical properties, or service life.³ Conventional plastics may not meet all packaging requirements. Application of body paint protection films for new vehicles during transportation is a field which needs new films alternative to the conventional polyolefins. In this application, the body is covered with a protective film against potential paint damage by mechanical or environmental factors.⁴ Polyolefins are commonly used as paint protection films, in addition to special waxes, which can have an environmental impact, such as waste water generation and emission of surfactants and hydrocarbons when washed off. Most importantly, the paint protection films require high application and labor costs, which are estimated to be around €35–40 per car (the application of the films requires high labor costs as well. A total of 120 workers working in three shifts were needed to manually cover the vehicles produced only in Ingolstadt, Germany, facility of Audi AG).^{5,6} The films have to be later manually peeled off from the car body, which is very time-consuming and risks the paint being scratched. Adhesion problems are also commonly observed, especially if the films were applied incorrectly. A sprayable liquid film prepared from renewable resources and which can be stripped off with warm water can be very useful in addressing the above-mentioned technical and environmental challenges and can reduce the labor cost.⁶

Collagen films are biodegradable, sprayable, and they possess a series of interesting features for the production of packaging films. Collagen is a fibrous protein consisting of a triple-helical bundle of three parallel, left-handed helices. Each strand consists of approximately 300 repeats of the trimer sequence (glycine-X-Y), where X is often the amino acid proline and Y is often hydroxyproline. Characteristic is the high glycine content of 33%. The ring structure of proline and hydroxyproline prevents rotation.⁷ The molecular weight is about 360 kDa⁸ and the density of collagen dried in air

varies from 1.3–1.4 g/cm³.⁹ Collagen substances produced under mild conditions are predominantly native, which means that the triple-helical structure is virtually unchanged and the resulting fibrillar structure results in films with improved mechanical properties.¹⁰ Without addition of plasticizers, these films are brittle due to the extensive interactions between protein chains through hydrogen bonding, electrostatic forces, and hydrophobic interaction.¹¹

Suspended collagen fibrils are almost insoluble in cold and warm water. Noncross-linked collagen films tend to swell in humid environments. Collagen chemically absorbs water in the form of hydration water and partly as capillary water.¹² Responsible for the high degree of hydrophilicity are the alkaline amino groups and acidic hydroxyl groups as well as carboxyl groups.¹³ Based on the fact that collagen consist of varying amino acids with different side chains, it is possible to at least partially overcome the low water resistance by forming covalent bonds by chemical or physical cross-linking.^{14–16} Other properties can also be tuned with additives such as processing agents, functional additives, stabilizing agents, dyes, and fillers.¹⁷ Moreover, protein films made from collagen are impermeable to nonpolar substances.¹⁸ Besides, collagen is also a leather industry by-product and is therefore readily available.¹⁹ Although numerous studies have already been carried out on gelatin and films made from gelatin,^{20,21} the potential of collagen as packaging film outside the meat industry has not yet been widely researched¹⁰ although collagen is widely used in meat packaging.²²

The objective of this study was to investigate the potential of collagen films as packaging films in the automotive industry. Conditioned bovine collagen acidified with lactic acid was cast into films and coatings following the addition of stabilizing additives and cross-linking agents. The main focus was on improving the water insolubility of the collagen films. After drying, the chemical and physical properties were examined in accordance with European standard (Europäische Norm), International Organization for Standardization (EN ISO) testing procedures and compared with a polyolefin film (polypropylene block copolymer) used in car paint protection.

Materials and methods

Collagen bulk material prepared with lactic acid from cattle split (8.6% type 1 dry collagen (DC) content with minimal type 3 content) was purchased from Naturin Viscofan GmbH, Weinheim, Germany. Crystalline aluminum sulfate hydrate and lecithin (>97%) for biochemistry were obtained from Roth (Karlsruhe, Germany). Lactic acid (90%), glycerol (85%), hydrochloric acid 1 mol/L, and sodium hydroxide (NaOH) were obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Methyl 3-hydroxybenzoate (99%) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Glyoxal G2 40% in water for synthesis

was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and all other chemicals were analytical grade and purchased from Roth, Merck, or VWR. Polyolefin film (polypropylene block copolymer) Bodyguard[®] 50530 PV7 with polyethylenevinylacetate (EVA) adhesive layer (from TESA) was obtained from FN Klebe und Schleifprodukte (Ergolding, Germany) and used as the benchmark film, the properties of which are presented in Table 1. Vehicle transmission oil (MTF-LT.2), hydraulic oil (CHF 11S, 83290429576), and engine oil (SAE 0-W-40 Quality Longlife-04, purchased from BMW AG, Munich, Germany) were mixed in equal volumes to produce the test fluid 1 (oil mixture). Equal volumes of super unleaded petroleum as per DIN EN 228 and

Table 1. Characteristic values of the polyolefin (TESA Bodyguard[®] 50530 PV7) benchmark film^{23,24}

Parameter ^a	Value
Basic material	About 50 μm . a. 50% block copolymer Daplen FFC 2012 (PCD; 12% ethylene content). b. 25% homopolymer Daplen KF 201 (PCD). c. 6.3% Lupolen 1840 H (low density polyethylene). d. 8.4% titanium dioxide. e. 0.3% tinuvin (UV-stabilizer additive).
Adhesion promoter	Melt index = 5 (a) ^b , 8 (b) ^b , 1.5 (c) ^c g/10 min About 5–10 μm . Novolen 2309 L and EVAc copolymer Escorene Ultra UL 00728
Adhesive layer	About 20–25 μm . Polyethylenevinylacetate. Melt index = 3 g/10 min ^c
Thickness	80 μm
Adhesion force on steel	0.8 N/cm
Elongation at break	800%
Tear-out force	30.4 N/cm
Tensile strength	38 N/mm ²
UV-resistance ^d	36 weeks

^aUnfortunately, it was not possible to get more detailed information concerning the molecular weight, distribution, density, and tinuvin grade from TESA SE, Hamburg (Germany). For further information, see Patent DE 19923780.²⁴

^bTest temperature = 230°C, weight = 2.16 kg.

^cTest temperature = 190°C, weight = 2.16 kg.

^dXenotest 1200, 55°C, 3000 h.

diesel fuel as per DIN EN 590 (from a Shell gas station) were mixed to produce the test fluid 2 (fuel mixture). Deionized water was used as the test fluid 3. Test fluid 4 '1% NaOH solution' was produced from NaOH purum p.a. (pro analysi) 98% obtained from Roth (Karlsruhe, Germany) in deionized water and test fluid 5 '1% sulfuric acid (H_2SO_4)' was produced from 90% H_2SO_4 , Rodipuran[®] obtained from Roth (Karlsruhe, Germany).

Production of the collagen test specimens

To produce 1200 g collagen suspension, 0.095 g hydrated aluminum sulfate²⁵ (0.015 w/w% (DC) and 3.4 g glycerin (plasticizer 1) were dissolved in 50 g deionized water and 3 g lecithin (plasticizer 2, 20% w/w {DC}) was dissolved in 100 g deionized water. A total of 0.758 g methyl-para-hydroxybenzoic acid (preservative, 10% w/w (DC)) was dissolved in 50 g deionized water and all three solutions mixed together and homogenized with 195.75 g water using an Ultraturrax T50 basic homogenizer (IKA Werke, Staufen, Germany). Aluminum sulfate was used following a recipe of Naturin Viscofan GmbH (Weinheim, Germany). It reduces the viscosity of the collagen suspension and therefore enables the use of higher collagen contents, which will further minimize the drying time.²⁵ Added to this solution was 174.4 g minced collagen, prepared from cattle split using a special procedure and acidified with lactic acid, with a DC content of 8.6%. The pH value was set to 2.8 (pH-meter 763 Multi-Calimatic, Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) with 90% lactic acid solution and left to swell overnight.

The swollen compound was homogenized using an Ultraturrax T50 basic homogenizer (IKA Werke, Staufen, Germany) at Level 2 (2000 rpm for 30–45 min) and 600 g deionized water was added gradually and the compound was warmed to 35°C. A total of 22.5 mL of 10% gelatin solution (15% w/w in relation to the DC content) was produced as an adhesive agent, allowed to swell for 40 min and then dissolved at 80°C. After cooling to 28–35°C, the gelatin solution was homogenized with the collagen for 20–30 min at Level 2 (2000 rpm). The collagen–gelatin compound was degassed in a vacuum cabinet WTB (Binder, GmbH, Tuttlingen, Germany) at 36°C and 5 mbar for 20 min and had a final DC content of 1.25%.

To produce films, the volume required to give a fill level of 3 mm was poured into casting moulds (Teflon dishes, $d = 13$ cm, VWR, Darmstadt, Germany or PP basins, manufacturer unknown) and the cross-linking agent (glyoxal G2) with 10% w/w in relation to the DC content was stirred in the form of a 1% solution. The compound was dried for 24 h at 37°C in a warm-air drying cabinet (built in-house). The test specimens were cut from the finished films using a cutter (9 mm).

For coating the painted test plates (John Deere, Mannheim, Germany), an area of 6×6 cm² was taped off using sealing tape (9 × 5 mm, JES Collection, J. E. Schum GmbH, Würzburg, Germany) in order to create an edge boundary for the compounds and a type of trough. The collagen compound required to generate a 3 mm fill level was mixed with the cross-linking agent (glyoxal G2) with 10% w/w in relation to the DC content in the form of a 1% solution and poured onto the test sheets. After drying in the warm-air drying cabinet (built in house) at 37°C over 24 h, a cutter (9 mm) was used to cut carefully along the edge of the sealing tape and the tape was removed. To produce reference plates, a 6×6 cm² polyolefin film was cut out using a cutter, applied to the plates without creating any bubbles, and pressed down firmly.

Film thickness

The film thickness was measured with a micrometer screw (Hommel Hercules Werkzeughandel GmbH & Co. KG, Viernheim, Germany). Five measurements were conducted for each film and the arithmetic mean value of the results was reported.

Weight per unit area

The weight per unit area of the films (g/m²) was determined by weighing five 10×10 cm² films with a laboratory scale SNUG II-150 (Jadever Scale CO., Markham, Ontario, Canada). The arithmetic mean of the measurements was reported.

Permeability or retention to test fluids in accordance with ISO 6179

The impermeability or the retention to the test fluids was determined gravimetrically in accordance with ISO 6179 for elastomer films.^{26,27} In contrast to the procedure outlined in ISO 6179, a piece of collagen film (7×7 cm²) was stuck to a permanently elastic sealing tape (Patafix Propower, UHU, Bühl, Germany) on the bottom edge of a reducer (glass) and placed on absorbent laboratory paper (7×7 cm²). The reducer was filled with 10 mL test fluid. Figure 1 illustrates the test setup. The fluid contact area was about 7 cm².

The weight (m_1) of the filled vessel + Patafix and film was recorded to an accuracy of 0.0005 g. The flask was placed with the film facing downward on absorbent laboratory paper at room temperature and prevented from tipping over by affixing it to a stand. The weight of the lost test liquid was recorded after 1 h (t) by weighing the flask with the film and liquid again (m_2) and examining the blotting paper (dry/damp/wet) and the test film (dissolved,

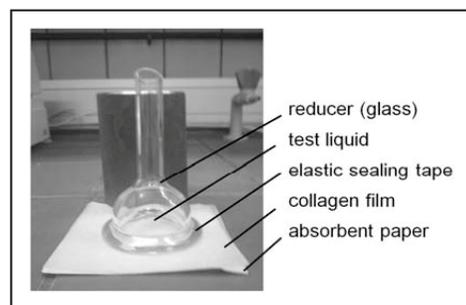


Figure 1. Test setup for determination of water permeability of collagen film.

swollen, wet).^{26,27} All substances were tested with the collagen films and the polyolefin benchmark films. The tests were repeated five times and the arithmetic mean value of the test results was reported. The relative permeability p was calculated as follows (Equation (1)):

$$p = \frac{(m_1 - m_2)}{t \times A} \quad (1)$$

Where:

p	=	Relative permeability	($\text{mg}/\text{m}^2 \times \text{h}$)
m_1	=	Weight at the beginning	(mg)
m_2	=	Weight after 1 h	(mg)
t	=	Test period	(h)
A	=	Area	(mm^2)

It should be noted that the influence of the film thickness was not taken into account.

Film solubility of the test films (total soluble matter) to test fluids in accordance with EN ISO 175

The solubility of the test films (total soluble matter) was determined in accordance with EN ISO 175.²⁸ The film solubility was determined by immersing the film in different test fluids and weighing the remaining film after drying (note: solubility of the film does not include solubility of the collagen fibrils). The total insoluble matter (TIM; insolubility) of the films

was defined as the ability of the films not to dissolve or only to dissolve to a certain percentage upon contact with the test fluid. In contrast to the procedure outlined in EN ISO 175 for the test, a 6×6 cm film of those dried at 37°C over 24 h in an oven was weighed to an accuracy of 0.0005 g (m_1) and immersed for 1 h at different temperatures (20°C , 37°C , 55°C , and 85°C) in 10 mL of the test fluid in an oven under air. Note that no testing at temperatures higher than 20°C was performed with the fuel-mix due to the highly inflammable nature of the test substance. In order to approximate the thermal effects, one specimen was stored at higher temperatures without being immersed in a test fluid. After the immersion test, the test liquid was centrifuged out (at 5000 rpm for 5 min) and the specimen was rinsed with deionizer water (in the case of the oil-mixture test substance, petroleum was used for rinsing). The films were then dried at 37°C and weighed (m_2). Five specimens were tested and the arithmetic mean value was reported. The percentage of TIM (wt%) of the film was calculated from a following equation (Equation 2):

$$TIM = m_2/m_1 \times 100 \quad (2)$$

Where:

TIM	=	Total insoluble matter (wt%)
m_1	=	Weight at the beginning of the test (mg)
m_2	=	Weight after 1 h (mg)

According to this definition, a film with TIM = 100% would be the most insoluble film and TIM = 0% would mean the most solubility.

In addition, a qualitative assessment of the change in the films' visual appearance was carried out (none, barely noticeable, small, moderate, large change). In addition, a filter paper soaked with the respective test fluid was laid on the coated test plates for 1 h at 23°C . The filter paper and coating film were then removed and the plates rinsed with deionized water, after which the paint surface was assessed using the FTM 16 FINAT test method no. 16 chemical resistance – spot method (none, small, moderate, large change to the condition of the paint).²⁹

Weathering in salt spray mist in accordance with EN ISO 9227 or alternating climate in accordance with EN ISO 6270-2

The salt spray tests (saline solution with 1 g/mL sodium chloride (NaCl) and a conductivity of <20 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH value 7) were conducted with a coated, painted test plate or a coated glass plate and a free-hanging collagen film in

a salt spray cabinet at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ in accordance with EN ISO 9227³⁰ over 2 weeks in a salt spray chamber S 1000 A-TR (Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld, Germany). Every 24 h the plates and coatings were visually examined and a photo was taken.

The alternating climate tests were carried out in an alternating climate cabinet in accordance with EN ISO 6270-2³¹ KFW or EN ISO 50017 AHT over 2 weeks in a alternating climate cabinet KSE 300 (Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld, Germany). The cycles consisted of: (a) 8 h $40 \pm 3^\circ\text{C}$ at 100% relative humidity, then the heating was switched off and the cabinet opened, (b) 16 h with the climate cabinet open at $18\text{--}28^\circ\text{C}$, relative humidity below 100%, (c) new cycle. Every 24 h the plates and coatings were visually examined and a photo was taken.

Temperature resistance based on the tensile strength, breaking force, and elongation at break (N/mm^2) in accordance with EN ISO 527-3

The temperature resistance of the films was assessed based on the tensile strength and elongation at break in accordance with EN ISO 527-3.³² Breaking force is considered as the force required to break the films, which are subjected to a certain tensile force. The tensile strength is a material characteristic, which specifies the maximum tensile force achieved in relation to the original cross section of the material. The elongation at break, also known as the ultimate elongation, specifies the percentage by which the films elongate before they break.

The measurements were taken using a universal testing machine UTS 3 as per ISO 5893 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Germany). A piece of collagen film was placed in a freezing cabinet ECC-1085-5 V12 (Buddeberg, Mannheim, Germany) for 72 h at -40°C or in a drying cabinet (Haraeus FT 420 K) at 70°C . In addition, one film was exposed to ultraviolet (UV) radiation in accordance with ISO 4892-2. In contrast to the procedure outlined in EN ISO 4892-2 a UV lamp Ultra-Vita Lux Osram 300W (Osram GmbH, Munich, Germany) was used for 72 h at room temperature (25 cm irradiation distance). After 24 h stored at room temperature, the specimens were stored overnight in a climate cabinet at 20°C and 60% relative humidity. Subsequently, 10 dog bone-shaped test specimens with the dimensions specified in Figure 2 were punched out of the films.

The tensile strength (N/mm^2), breaking force (N/cm) and elongation at break (%) were measured with a test velocity of 100 mm/min and compared with the values of an untreated film.

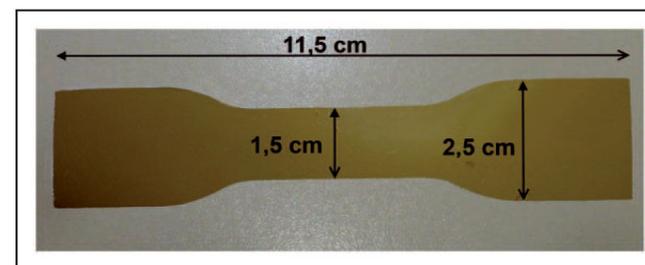


Figure 2. Dimensions of a punched test specimen for determining the tensile strength.

Adhesion in accordance with EN ISO 2409: Paints and varnishes – crosscut test

The adhesion was tested in accordance with the testing standard EN ISO 2409: paints and varnishes – crosscut test.³³ It is used to assess the resistance of a coating to separation from a substrate when a right-angle lattice pattern is cut into the coating. The collagen and polyolefin coated test plates (see production of the collagen test specimens) were used for this after temperature exposure at -40°C in a freezing cabinet ECC-1085-5 V12 (Buddeberg, Mannheim, Germany) and 70°C in a drying cabinet (Haraeus FT 420 K) at 70°C for 72 h. A cutter (9 mm) was used to make six vertical and six horizontal cuts into the coating, penetrating through to the substrate. The distance between the cuts was approximately 2 mm. Adhesive tape (25 mm) was then affixed to the lattice pattern of cuts, pressed down firmly, and torn off again at an angle of 60 degrees. The testing standard defines five crosscut classifications, which were used to assess the appearance of the surface after the test.

Instrumented puncture test (puncture resistance) in accordance with EN ISO 6603-2 or ISO 7765-2

The puncture resistance was determined using a drop impact tester of the type Fractovis (Ceast GmbH, Martinsried, Germany), in accordance with EN ISO 6603-2 or ISO 7765-2.^{34,35} For testing the behavior of the material under impact stress, test specimens were cut to 60×60 mm. The force-deformation diagram was recorded during puncturing of the film with a striker (1.89 kg) with a constant velocity of 4.4 m/s and the data were analyzed with the software DAS4Win. The height of fall was 0.99 m and the potential energy of the striker was 18.3 J. As important results of the puncture test, the mean values

of the following measurements were specified: maximum force (N), deformation at maximum force (mm), and puncture energy (J).

Tear resistance in accordance with EN ISO 53363

The tear resistance test in accordance with EN ISO 53363³⁶ was conducted using a universal testing machine 1456 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Germany) as per EN ISO 7500-1. The method can be used to determine the tear behavior of predamaged films based on the tear resistance (T_s) under tensile stress and quasi-static test conditions. Trapezium-shaped test specimens as per EN ISO 53363 were cut out with a cutter and a slit was cut in the center perpendicular to the direction of the force. The specimens were placed in a climate cabinet overnight at 20°C and 60% relative humidity. The test was conducted at $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and a testing velocity of $100 \pm 10\text{ mm/min}$. Five tests were conducted for each of the two film types and the mean value of the results was taken. The tear resistance was calculated as T_s (N/mm) = force F (N)/specimen thickness (mm).

Results and discussion

Collagen test specimens

In order to evaluate the mechanical and physical properties of collagen films and coatings, conditioned bovine collagen with added stabilizing additives and cross-linking agents was cast into films and coatings followed by drying in a warm air compartment dryer as described in the materials and methods section. The 150 μm thick collagen film featured a relatively good see-through clarity as shown in Figure 3. Figure 4 shows an example of the collagen and polyolefin coating on the painted test plate. The bottom-most layer is a metal plate painted in color green. There appears to be five collagen films (sample 1–4 and 6) on the metal plate. The white-colored square sample is the polyolefin film (sample 5; Figure 4).

The collagen formed stable films or coatings, which contained no bubbles or imperfections and therefore could be used for the chemical and mechanical characterization.

Film thickness

The knowledge of the film thickness is important for the calculation and evaluation of several mechanical film parameters. Table 2 summarizes the thicknesses of the test specimens used for the individual test methods. The thicknesses of the individual collagen test specimens varied considerably in

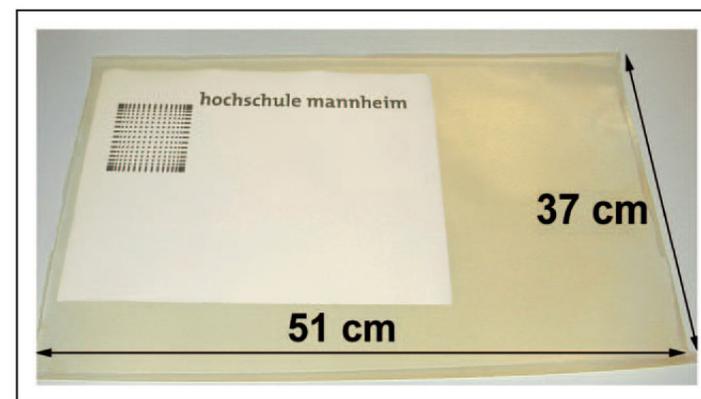


Figure 3. Cast collagen film (collagen film on top of the university logo).

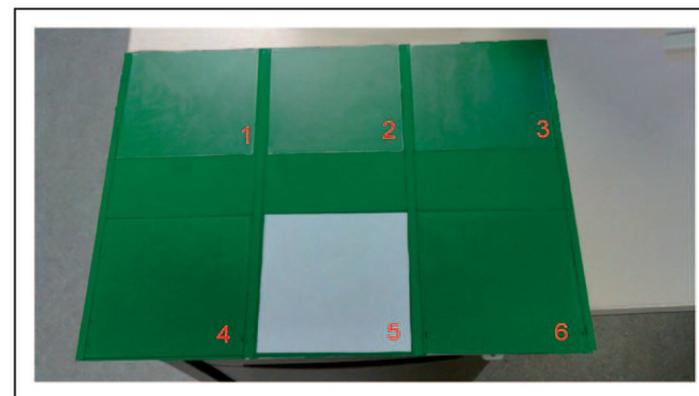


Figure 4. Painted test plate coated with collagen film (sample 1–4 and 6) and polyolefin film (sample 5).

Table 2. Thicknesses of the test films used for the different test methods (data in all rows, except the first row (polyolefin), relate to the collagen films)

	Thickness, d (μm)	Standard deviation, σ (μm)
Polyolefin film		
Used for the different test methods	80	1
Collagen films		
Tensile test		
UV-light	149	29
-40°C	188	24
23°C	157	28
70°C	151	32
Puncture test	170–182	9–15
Tear resistance	200	13
Permeability and resistance test	151	13
Weathering		
Alternating climate (painted test plate)	100	13
Alternating climate (glass plate)	116	5
Alternating climate (film)	149	12
Salt spray cabinet (painted test plate)	86	7
Salt spray cabinet (glass plate)	110	12
Salt spray cabinet (film)	140	4

some instances. The lack of thickness uniformity was attributed to four factors:

- the oven shelves, where cast films were placed for drying, were not totally level thus causing settling toward the lower section during drying,
- a stream of warm air was used for drying, which blew over the damp collagen compound from one side, forcing the compound to the other side,
- the polypropylene casting mold was concave,
- there were individual heterogeneities in the collagen fiber composites. The collagen compounds will be sieved first to avoid this in future.

Basis weight

The film basis weight can be used to determine the film thickness or yield. The collagen film basis weight was measured as described in the Materials and

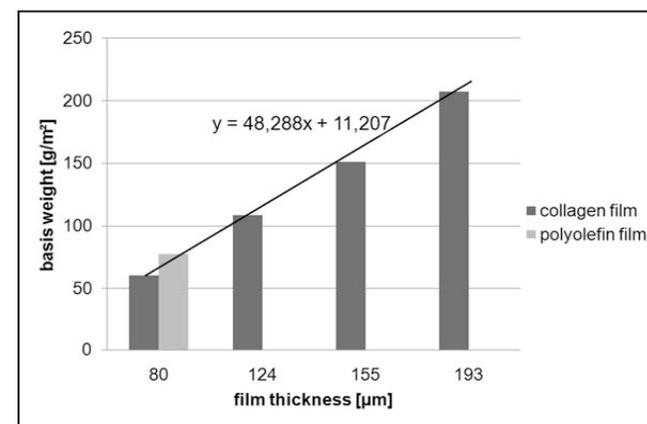


Figure 5. Basis weight of collagen and polyolefin films with different film thicknesses.

methods section. Figure 5 shows the basis weight of the collagen films in accordance with EN ISO 53370 (23°C) depending on the film thickness compared with the basis weight of the polyolefin film.

The collagen film and the polyolefin film basis weights were determined for a film thickness of approximately 80 μm . The cast collagen film density (0.759 g/cm^3) was significantly lower than the polyolefin film density (0.970 g/cm^3) or other plastics (polypropylene = 0.85–0.92 g/cm^3 , low density polyethylene = 0.89–0.93 g/cm^3 , and high density polyethylene = 0.94–0.98 g/cm^3).³⁷ The determined collagen film density is different from the results of Podrazký, who reported a 1.3–1.4 g/cm^3 density for air-dried collagen.⁹ These findings may be explained by the various additives in the film-forming solution.

Permeability or retention to test substances in accordance with ISO 6179

Impermeability or retention is the ability to prevent certain test substances from permeating through the films. To protect the new vehicles paint from chemical impact, the impermeability of the protecting films is important. Furthermore, the film mechanical properties can change due to absorption of test liquids. That is why the impermeability/permeability of the collagen films and the polyolefin film was tested as described in the Materials and methods section. The test liquids were selected based on the automotive

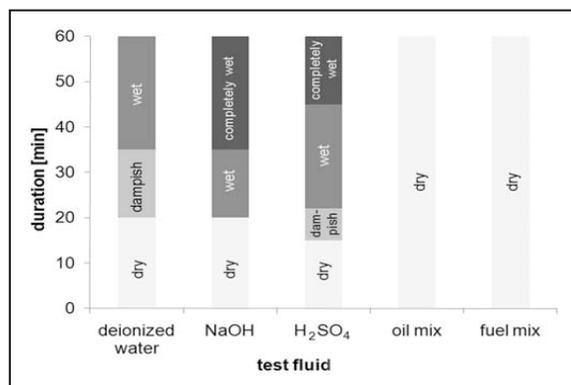


Figure 6. Visual inspection of the collagen film during the permeability test with different test fluids at 20°C, sodium hydroxide (NaOH; 1%), sulfuric acid (H₂SO₄; 1%).

industry requirements. Figure 6 shows the results of the visual inspection of the collagen film during the permeability test with different test fluids.

While the blotting paper was still completely dry in the permeability tests of the collagen films immersed in the oil mixture and the fuel mixture, polar substances such as NaOH, sulfuric acid, and deionized water permeated after around 20 min. For the acid and alkaline substances, the blotting paper was completely wet after around 35 and 50 min, respectively (Figure 6). The polyolefin film (only half as thick as the collagen film) was completely impermeable to all test substances during test period.

Figure 7 illustrates the permeability ($\text{mg}/\text{m}^2 \times \text{h}$) of a collagen and polyolefin film for different test fluids. The gravimetric determination of the permeability values for the collagen film gave the highest permeability values for the screen wash and deionized water at $260\text{--}340 \text{ g}/\text{m}^2 \times \text{h}$. The permeability for a 1% NaOH solution was $140 \text{ g}/\text{m}^2 \times \text{h}$ and for the 1% sulfuric acid solution it was $30 \text{ g}/\text{m}^2 \times \text{h}$. The polyolefin film (only half as thick as the collagen film) also exhibited complete impermeability here (Figure 7).

While the collagen films showed very good impermeability to nonpolar substances, their impermeability to polar substances was limited, what restricts their use outdoors without further optimization but makes them very interesting for use in contact with nonpolar substances. These results confirm the published statements concerning the impermeability of collagen to nonpolar substances¹⁸ and its affinity to water.³⁸

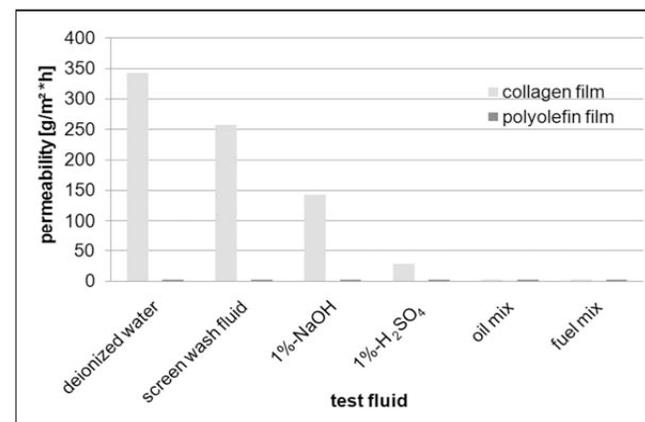


Figure 7. Permeability ($\text{mg}/\text{m}^2 \times \text{h}$) of a collagen and polyolefin film for different test fluids at 20°C, sodium hydroxide (NaOH; 1%), sulfuric acid (H₂SO₄; 1%).

Film insolubility/solubility of the test films (total insoluble/soluble matter) to test substances in accordance with EN ISO 175

Another important requirement for the usage of collagen films as packaging material is their insolubility in chemicals. So far there are no data published in the literature concerning the solubility of collagen films. The TIM was examined in accordance with EN ISO 175²⁸ with the above mentioned amendments. Figure 8 illustrates the TIM of the collagen and polyolefin film against the different test fluids after testing 1 h at 20°C.

While the TIM of the collagen films at 20°C for the oil mixture and the fuel mixture was more than 95 or 90%, respectively, the TIM to all other test substances was only around 80%. The polyolefin film also exhibited a weight loss of up to 10% for the oil mixture, fuel mixture, screen wash, and sulfuric acid, which was probably caused by the film adhesive layer dissolving or detaching, as no changes to the film itself were noted (Figure 8).

Figure 9 depicts the visual appearance of the collagen films after treatment with different test fluids for 1 h. Visually, the collagen film changed most markedly if immersed in deionized water, screen wash, and NaOH solution. After 1 h of soaking time, the film had turned pale yellow/opaque (Figure 9).

In addition to that Figure 10 shows the TIM of the collagen film in different test fluids at different temperatures.

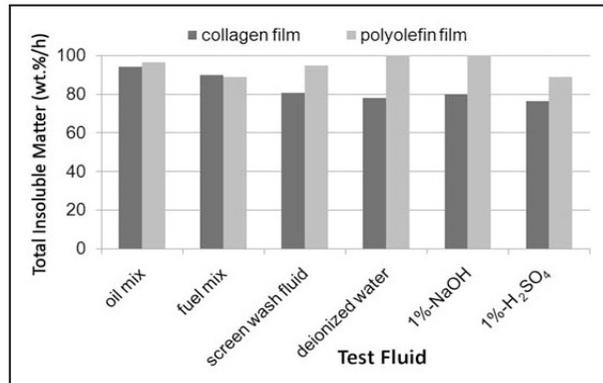


Figure 8. Total insoluble matter (%wt/h) of a collagen and polyolefin film at 20°C in different test fluids, sodium hydroxide (NaOH; 1%), sulfuric acid (H₂SO₄; 1%).



Figure 9. Collagen film after treatment with different test fluids for 1 h (from left to right: control film [without treatment], oil-mix, fuel-mix, screen wash fluid, deionized water, sodium hydroxide [NaOH; 1%], sulfuric acid [H₂SO₄; 1%]).

When investigating the temperature dependency of the solubility to the different test substances, it was found that the TIM of the collagen films decreased for all polar test substances as the temperature increased (only around 60% TIM after 1 h). The TIM to the oil mixture, however, remained unchanged at more than 95% (Figure 10). At 55°C, the collagen films darkened and rolled in on themselves after treatment.

Figure 11 shows in comparison the TIM of the polyolefin film in different test fluids at different temperatures. Compared to the collagen film, the polyolefin film also exhibited rising solubility as the temperature rose (Figure 11). As mentioned above, these observations were probably caused by the EVA adhesive layer or the adhesion promoter, which is part of the film, dissolving or detaching, as no changes to the film itself were noted.

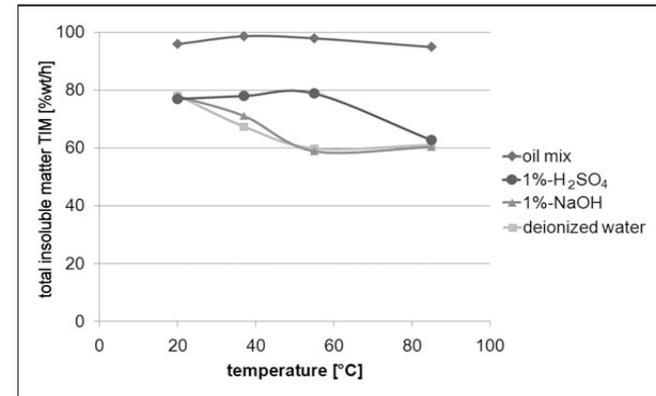


Figure 10. Total insoluble matter of the collagen film in different test fluids at different temperatures, sodium hydroxide (NaOH; 1%), sulfuric acid (H₂SO₄; 1%).

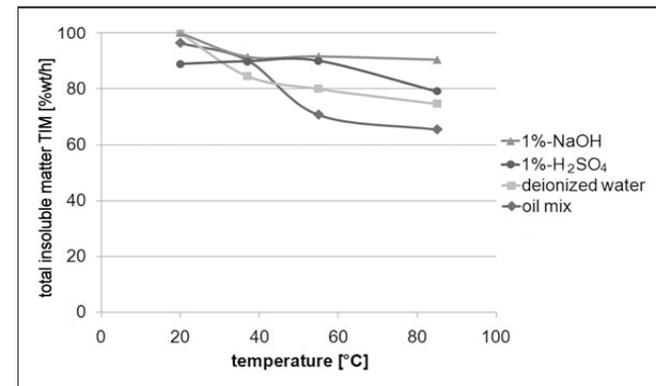


Figure 11. Total insoluble matter of the polyolefin film in different test fluids at different temperatures, sodium hydroxide (NaOH; 1%), sulfuric acid (H₂SO₄; 1%).

However, in the resistance tests on the coated, painted plates, no changes to the paint beneath the collagen or polyolefin coating were observed for any of the tested substances. Unfortunately, there are no comparable data published concerning the resistance of collagen against technical fluids.

The resistance tests confirmed the results of the permeability tests, which supposed that the use of collagen in the presence of polar substances is restricted without further optimization, although it appeared to be resistant against the nonpolar substances.

Weathering tests – salt spray test in accordance with EN ISO 9227

To simulate realistic climatic conditions, such as they would be during transportation during winter under the influence of deicing, salt weathering tests in a salt spray chamber were conducted in accordance with EN ISO 9227.³⁰ Figure 12 images the appearance of the polyolefin film at the start (left) and after 11 days in a salt spray cabinet (right). As expected, the polyolefin film exhibited no changes during the 2-week period in the salt spray cabinet. This result is not surprising as the polyolefin film is used as a body paint protection film against salt impacts, beside others, for several weeks.⁴

Figure 13 shows in comparison the test plate coated with collagen (top), glass plate (center), or free-hanging collagen film (bottom) after 0, 1, 4, 7, and 11 days (from left to right) in a salt spray cabinet. While the polyolefin film exhibited no changes, the collagen coatings underwent a considerable change after just 1 day, swelling up and turning white (Figure 13). From the 7th day onward, the collagen gradually peeled off completely, starting at the edges. After 11 days the test was stopped. The free-hanging collagen film had also swelled badly after 1 day and rolled in on itself. After 11 days, it had dissolved completely (Figure 13).

The results appear rather surprising as sausages in collagen casings are stored in salt brines for several months. However, the reason for this is

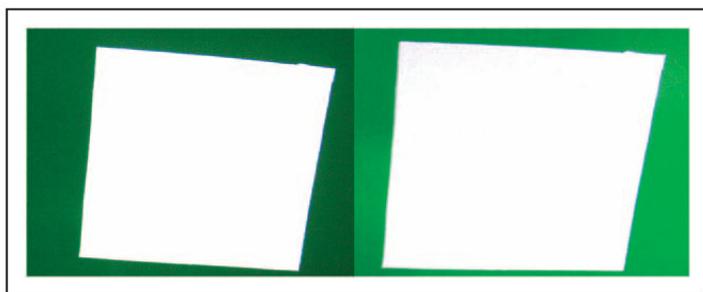


Figure 12. Polyolefin film at the start (left) and after 11 days in a salt spray cabinet (right) in accordance with DIN EN ISO 9227.

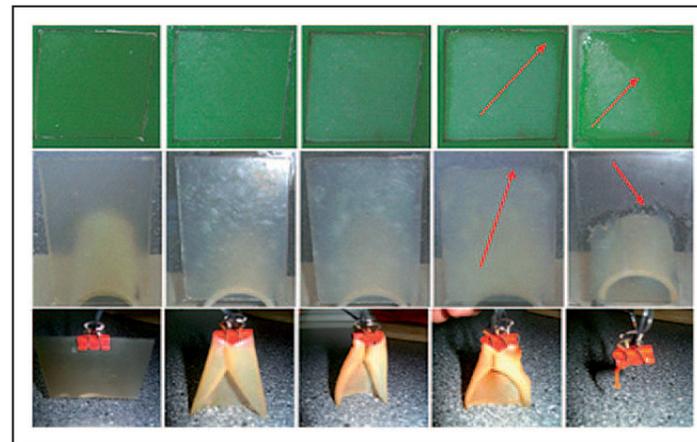


Figure 13. Test plate coated with collagen (top), glass plate (center), or free-hanging film (bottom) after 0, 1, 4, 7, and 11 days (from left to right) in a salt spray cabinet in accordance with DIN EN ISO 9227.

unclear, it may be due to the added lecithin in the subject collagen films or the differing cross-linking methods (edible sausage casings are thermally cross-linked). This supposition needs to be tested in further investigations.

Alternating climate test in accordance with EN ISO 6270-2 KFW

To simulate realistic climatic conditions without the influence of salt weathering tests in an alternating climate cabinet in accordance with EN ISO 6270-2 KFW³¹ over 2 weeks were conducted. As expected, the polyolefin films exhibited no changes during the alternating climate tests. In comparison to Figure 14 that shows the appearance of the test painted plates coated with collagen (top), glass plate (center), or free-hanging film (bottom) after 0, 1 (only bottom row), 7, 14, and 20 days (from left to right) in an alternating climate. The painted plates coated with collagen withstood the treatment for approximately 1 week, although the mechanical properties changed during this time: the films became softer and less resistant.

Patzsch³⁹ also examined the resistance to weathering of enzymatically cross-linked gelatin films at 12–20°C and 60–70% relative humidity. Even these films were only resistant for 5 days and moreover got moldy. For the collagen films, the latter could have been prevented by adding biocides. In the

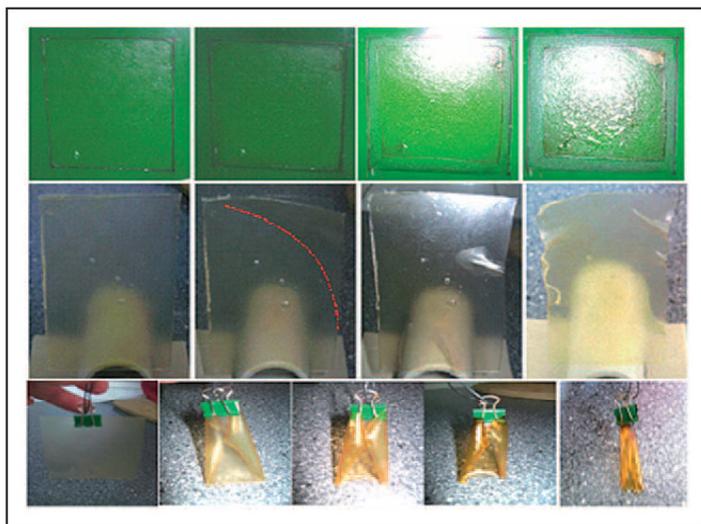


Figure 14. Test plate coated with collagen (top), glass plate (center), or free-hanging film (bottom) after 0, 1 (only free hanging film), 7, 14, and 20 days (from left to right) in an alternating climate in accordance with DIN EN ISO 6270-2 KFW.

literature thymol, for example, has been added successfully to polycaprolactone as an antimicrobial additive.⁴⁰

The results showed that plates coated with collagen can withstand weathering, at least for a short time (~7 days). The mechanical properties of weathered films need to be tested in individual cases. Currently, the collagen films are not suitable for longer storage periods outdoors.

Beside Figure 14, the shrinkage of collagen films on glass or painted sheet steel under alternating climate is illustrated as a function of time in Figure 15. Whereas almost no shrinkage was noticed during the first 7 days, the films shrank rapidly from the 7th day onward. After 14 days, the collagen coatings had shrunk by 15% but were still adhering to the plate. After 21 days, the shrinkage had progressed further and one corner had become unattached. It was a different case with the coated glass plate: here the adhesion was not as intense as on the painted plate, meaning that shrinkage was observed from the first day. After just 7 days, the adhesion had been lost completely in some places. The film became very wavy and lay in folds on the substrate. The free-hanging film had rolled up after just 1 day. This process continued until the

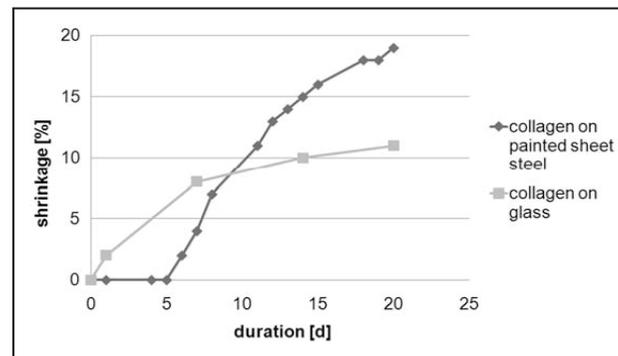


Figure 15. Shrinkage of collagen films on glass or painted sheet steel under alternating climate.

end of the treatment and the film discolored over time to a dark yellow-orange (Figures 14 and 15).

Mechanical properties – temperature resistance based on the tensile strength, breaking force, and elongation at break (N/mm²) in accordance with EN ISO 527-2

Figure 16 shows the stress–strain diagram of the reference collagen film, stored at 23°C. In the tensile tests on collagen films with different pretreatment (storage temperature) the stress–strain diagrams for the collagen films exhibited an almost linear curve shape. In terms of their behavior, the collagen films were brittle (Figure 16).

Figure 17 shows the stress–strain diagram of the polyolefin film in comparison to Figure 16. The polyolefin films exhibited the typical flow characteristics of plastics with very high strain values, which tend to stretch (Figure 17). Comparing Figure 16 with Figure 17, it is noticeable that the breaking strain of collagen film (about 12%) is similar to the strain at yield (peak) of the polyolefin film.⁴¹

Figure 18 illustrates the tear-out force and tensile strength of differently treated collagen films compared with a polyolefin film. To estimate the influence of temperature and UV-light on the mechanical properties, the tensile strength of the films was measured according with EN ISO 527-2³² after storage at different temperatures, respectively, after UV-radiation. The breaking force of the collagen test specimens stored at 23°C or those stored at 70°C determined from the stress–strain diagrams was 41 N/cm – approximately

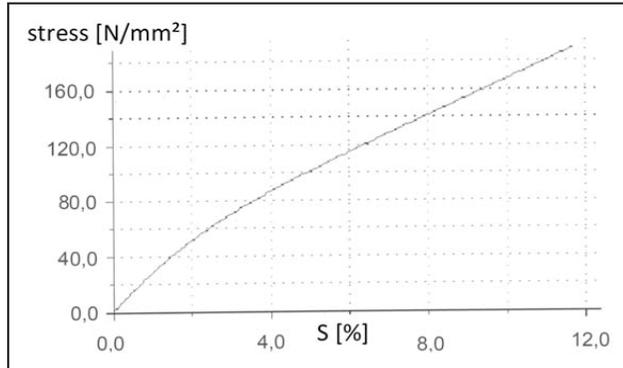


Figure 16. Stress–strain diagram of the collagen film (23°C storage) measured in accordance with DIN EN ISO 527-2.

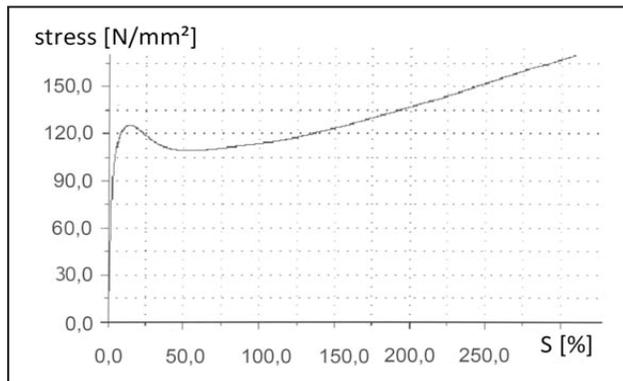


Figure 17. Stress–strain diagram of a polyolefin film (23°C storage) measured in accordance with DIN EN ISO 527-2.

25% higher than that of the polyolefin test specimens at 30 N/cm as given by the manufacturer (compare Table 1²³). The UV exposure of the collagen films caused the breaking force to decrease to 29 N/cm, while storage at –40°C led to an increase of almost 20% in the breaking force to 50 N/cm for the collagen films.

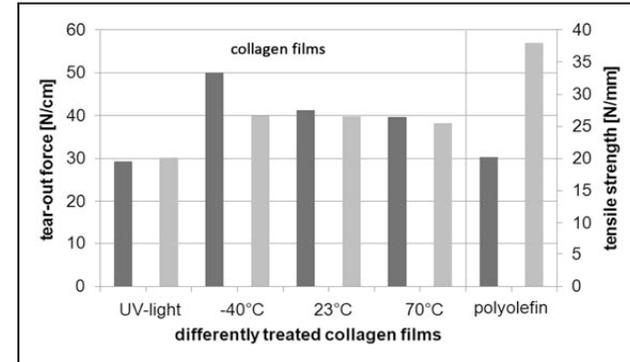


Figure 18. Tear-out force and tensile strength of differently treated collagen films compared with the polyolefin film (black columns = tear-out force, grey columns = tensile strength) measured in accordance with DIN EN ISO 527-2.

Table 3. Elongation at break, tear-out force, and tensile strength of treated collagen films compared with those of a benchmark polyolefin film

Treatment	Elongation at break (%)	Tear-out force (N/cm)	Tensile strength (N/mm ²)
UV	19	29	20
–40°C	33	50	27
23°C	34	41	27
70°C	16	40	26
Polyolefin	800 ¹⁵	30 ¹⁵	38 ¹⁵

Storage at +70°C and –40°C had no effect on the tensile strength of the collagen film test specimens. However, the tensile strength of 27 N/mm² was 29% lower than that of the polyolefin film at 38 N/mm² as stated by the vendor (compare Table 1²³). Because of the high elongation (800%) of the polyolefin film, it was not possible to determine the tensile strength with the present universal testing machine.

The UV-light exposure reduced the tensile strength by around 25% to 20 N/mm² (Figure 18 and Table 3). Additionally, it was noticed that the temperature treatment at 70°C led to a discoloration of the collagen films

ranging from pale yellow to dark orange. The breaking force and the tensile strength of the collagen films were of a similar order of magnitude to those of the polyolefin film.

Table 3 summarizes the elongation at break, tear-out force, and tensile strength of treated collagen films compared with a polyolefin film. The elongation at break of collagen films (~19%) were significantly lower than that of the benchmark polyolefin film (~800%) (compare Table 1²³). After UV-light exposure or storage at 70°C, the elongation at break of collagen films dropped to around 2% (Table 3).

One approach to overcome the brittleness of the collagen films is to add plasticizers to the film forming solution.¹¹ Plasticizers reduce the intermolecular forces along the polymer chains and increase the polymer chain mobility and the film flexibility.⁴² However, in the present work the main focus was on the water resistance of the collagen films. The use of plasticizers such as glycerin is undesirable when the water insolubility of the films is to be improved.^{11,39,42} This is the reason why only a small amount of plasticizer was used.

Adhesion in accordance with EN ISO 2409: Paints and varnishes – crosscut test

Figure 19 shows the appearance of the collagen films after crosscutting (top) and polyolefin films after crosscutting and peeling off the adhesion tape (bottom), 70°C treatment (left) and -40°C treatment (right). Neither the collagen films nor the polyolefin films exhibited sufficient adhesive strength in the crosscut tests. While the collagen films peeled away from the substrate when the cuts were made and achieved a crosscut classification of five in accordance with EN ISO 2409 (Figure 19 top), the polyolefin film became detached and removed (Figure 19 bottom). Most of the paint was also removed in the process (crosscut classification 4). This effect was observed more strongly at the high testing temperature than with the specimen stored in the freezer. The reason for this might be an increase of adhesion force after high-temperature treatment of the polyolefin film²⁴ and a decrease of paint adhesion on the steel surface (painting could have been of less quality due to a manual painting process).

In retrospect, the crosscut test seems to be too hard to fulfill since the polyolefin film failed the test, as well. The adhesion force on steel is stated to be 0.8 N/cm for the polyolefin film as given by the vendor (compare Table 1).²³ Unfortunately, no comparable values for the collagen film can be provided.

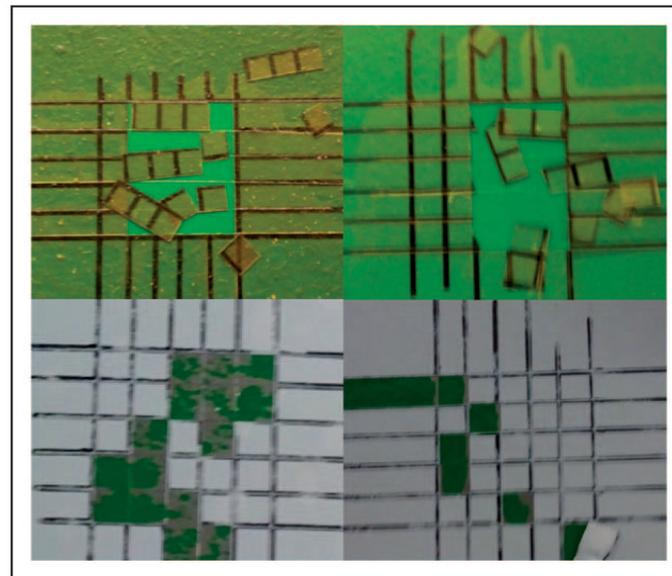


Figure 19. Appearance of the collagen films after crosscutting (top) and polyolefin films after crosscutting and peeling of the adhesion tape (bottom), 70°C treatment (left) and -0°C treatment (right).

Instrumented puncture test (puncture resistance) in accordance with EN ISO 6603-2 resp. ISO 7765-2

Table 4 summarizes the puncture impact behavior of the collagen films and Figure 20 depicts the appearance of the collagen film (left) and polyolefin film (right) after instrumented puncture test. The results of the puncture test showed that in case of the polyolefin film the height of drop of 0.99 m was not sufficient to puncture the film due to its very high elasticity. Only a deformation of the film could be caused (Figure 20 right). Without puncturing the film and the sudden drop in force it is not possible to evaluate the puncture test. Nevertheless, it can be said that the necessary puncture force of the collagen films (1133 N/mm) was only slightly lower than those of a low density polyethylene (LDPE) film with 10 µm thickness (1333 N/mm) as given by Otto et al.⁴³ Figure 20 shows the instable crack formation of the brittle collagen film. Moreover, remarkably for the biofilms was the statistical

Table 4. Puncture impact behavior of collagen films

Max. force (N/mm)	1133
Deformation at max. force (mm)	6.27
Puncture energy (J/mm)	2.4

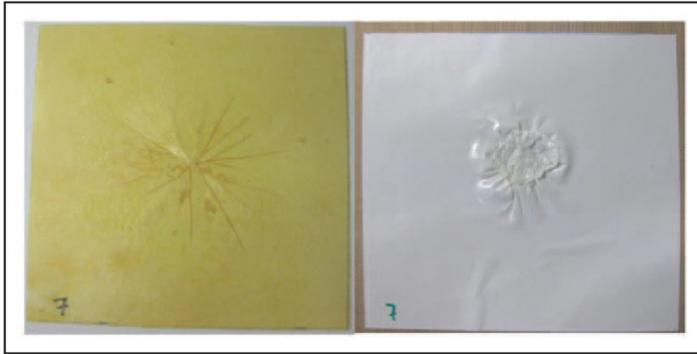


Figure 20. Collagen film (left) and polyolefin (TESA Bodyguard® 50530 PV7) film (right) after instrumented puncture test with a striker (1.89 kg) with a constant velocity of 4.4 m/s and a height of fall of 0.99 m.

spreading of the specific mechanical values caused by the heterogeneity of the material.

As a result, collagen films are only slightly more sensitive to impact loadings caused by objects with small dimensions such as stone-chipping than LDPE films. Surprisingly, the automotive industry does not specify a puncture resistance for their protective films.⁴⁴

Tear resistance in accordance with EN ISO 53363

Figure 21 illustrates the force–strain diagram for collagen films ($d = 200 \mu\text{m}$) determined during the tear resistance test. Figure 22 shows the force–strain diagram for the polyolefin film ($d = 80 \mu\text{m}$) in comparison to Figure 23. The typical tear behavior of a brittle film in the tear resistance test using the collagen film as an example is shown in Figure 23. Lastly, Table 5 summarizes the tear resistances of the films.

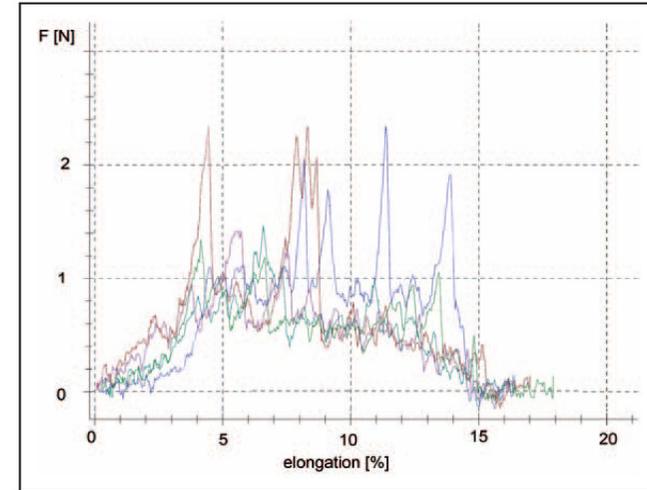


Figure 21. Force–strain diagram for collagen films, when determining the tear resistance in accordance with DIN 53363.

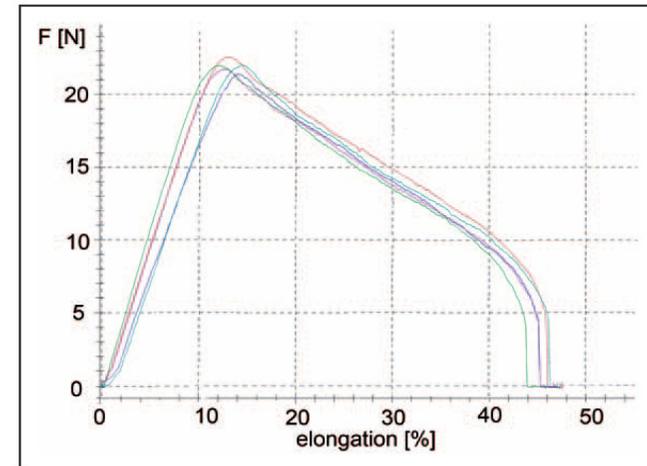


Figure 22. Force–strain diagram for polyolefin film ($d = 80 \mu\text{m}$), when determining the tear resistance in accordance with DIN 53363, different color codes = multiple test specimens of same sample lot.

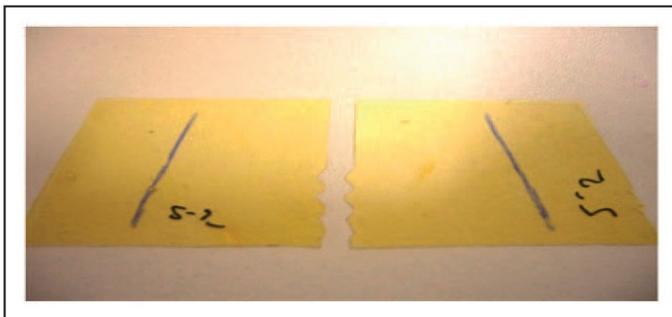


Figure 23. Typical tear behavior of a brittle film in the tear resistance test using the collagen film as an example.

Table 5. Tear resistance of a collagen and polyolefin film

Film	Tear resistance (N/mm)
Collagen	8.8
Polyolefin	271.7

The results showed that considerably less force is required to tear a collagen film (Figure 21) than the polyolefin film (Figure 22). The tear resistance of the collagen films was 8.8 N/mm, only 3% of that of the polyolefin film (Table 5). Concerning the tear resistance even Patzsch³⁹ determined relatively low values for different protein films (35 N/mm).⁴⁵ The measured polyolefin film tear resistance is in partial contrast to the results of Nentwig,⁴⁶ who reported a tear resistance of 8–20 N/mm for polyolefin films.⁴⁶ The higher tear resistance of the Bodyguard polyolefin film from TESA is most probably due to the specific composition, the processing conditions and the orientation.⁴⁶

The stress–strain diagram of the collagen films showed large fluctuations caused by the irregularities within the films (Figure 21).

Conclusion

Due to the high requirements of the automotive industry and the brittleness and limited resistance of the collagen films to polar substances their usage as body paint protection films for new vehicles during the transportation is

restricted without further optimization. However, other applications are conceivable, where a good dissolving or stripping behavior with water, sprayability, biodegradability, or resistance to nonpolar substances is needed.

Acknowledgment

The authors are very thankful to Dr. F. Maser and Chr. Link for the manufacturing of the collagen bulk material and the measurement of the tensile strength. The authors wish also to acknowledge help by Mr. J. Peter with measuring the tear resistance and by Mr. S. Kunkel with carrying out the weathering test. Furthermore, the authors are very thankful to Mrs. K. Riedel for measuring the puncture resistance and to the Wieland GmbH, Mannheim, for providing their weathering devices.

Funding

This research was supported by the DBU Deutsche Bundesstiftung Umwelt and Naturin Viscofan GmbH, Weinheim (Germany).

References

1. Johnson R. An overview of degradable plastics. *Journal of Plastic Film and Sheeting* 1988; **4**: 155–170.
2. Buchner N. *Funktionen der Verpackung, Verpackung von Lebensmitteln, Lebensmitteltechnologie, Verpackungstechnik und mikrobiologische Grundlagen*. Berlin, Heidelberg, New York, NY: Springer, 1999, pp. 1–12.
3. Lörcks J and Wenig B. *Produkte für Garten- und Landschaftsbau, Biologisch abbaubare Werkstoffe*. Gülzow: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2006.
4. Braess H-H and Seiffert U. *Oberflächenschutz, Handbuch Kraftfahrzeugtechnik*. 5. Auflage. Wiesbaden: Vieweg, 2007, pp. 401–402.
5. Cordshagen J. 'Innovations Report, Transportschutz zum Aufsprühen,' <http://www.innovations-report.de> 2002. Accessed on May 2011.
6. Bartel H-J. *Mündliche Information*. Ingolstadt: AUDI, 2010.
7. Shoulders MD and Raines RT. Modulating collagen triple-helix stability with 4-chloro, 4-fluoro, and 4-methylprolines. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2009; **611**(4): 251–252.
8. Srivastava LM and Talwar GP. *Textbook of biochemistry and human biology*. 3rd edn. Prentice-Hall of India Pvt. Ltd, 2003, p. 53.
9. Podrazký V and Sedmerová V. Densities of collagen dehydrated by some organic solvents. *Experientia* 1966; **22**(12): 792.
10. Wolf KL, Sobral PJA and Telis VRN. Characterizations of collagen fibers for biodegradable film production, 13th World Congress of Food Science & Technology, Food is Life, Nantes, France, 17–21 September 2006.
11. Sothern R and Krochta JM. Water vapor permeability and solubility of films from hydrolyzed whey protein. *Journal of Food Science* 2000; **65**(4): 700–703.
12. Hamaguch PY, Shiku Y and Tanaka M. Property improvement of fish water soluble protein films by dialdehyde starch (DAS) and/or sodium dodecylsulfate

- (SDS) treatments. *Journal of Packaging Science & Technology* 2003; **12**(5): 271–282.
13. Reich G. *Kollagen: Eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*. Dresden: Theodor Steinkopf, 1966.
 14. Audic J-L and Chaufer B. Caseinate based biodegradable films with improved water resistance. *Journal of Applied Polymer Science* 2010; **117**(3): 1828–1836.
 15. Rhim JW, Gennadios A, Weller CL, Cezeirat C and Hanna MA. Soy protein isolate-dialdehyde starch films. *Industrial Crops and Products* 1998; **8**(3): 195–203.
 16. Embuscado ME and Huber KC. *Edible films and coatings for food applications*. Dordrecht, Heidelberg, London, New York, NY: Springer, 2009.
 17. Salchinger S. Biokunststoffe: Anwendungsgebiete und Potentiale von Biopolymerwerkstoffen in der Architektur [Diplomarbeit]. Wien: Institut für Architektur und Entwerfen, Technische Universität, 2009.
 18. Lima AM, Cerqueira MA, Souza BWS, Santos ECM, Teixeira JA, Moreira RA and Vicente AA. New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – influence on fruits gas transfer rate. *Journal of Food Engineering* 2010; **97**(1): 101–109.
 19. Kanagaraj J, Velappan KC, Chandra Babu NK and Sadulla S. Solid wastes generation in the leather industry and its utilization for cleaner environment – a review. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2006; **65**: 541–548.
 20. Langmaier F, Mokrejs P, Kolomaznik K and Mladek M. Biodegradable packing materials from hydrolysates of collagen waste proteins. *Waste Management* 2008; **28**(3): 549–556.
 21. Akin H and Hasirci N. Preparation and characterization of cross-linked gelatin microspheres. *Journal of Applied Polymer Science* 1995; **58**: 95–100.
 22. Deiber JA, Peirrotti MB and Ottone ML. Rheological characterization of edible films made from collagen colloidal particle suspensions. *Food Hydrocolloids* 2011; **25**(85): 1382–1392.
 23. TESA Produktinformation. <http://www.tesa.de>, bodyguard_50530_pv7 (2010, accessed July 11, 2011).
 24. Unverstreckte Oberflächenschutzfolie aus Polypropylenblockcopolymer. Patent DE 19923780. 2000.
 25. Maser F. *Personal communication*. Weinheim: Naturin Viscofan GmbH, 2011.
 26. Röthemeier F and Sommer F. *Flüssigkeitsdurchlässigkeit, Kautschuktechnologie: Werkstoffe, Verarbeitung, Produkte. 2. Auflage*. München: Hanser, 2006, pp. 526–528.
 27. EN ISO 6179:2010–08. Rubber, vulcanized or thermoplastic – rubber sheets and rubber-coated fabrics – determination of transmission rate of volatile liquids (gravimetric technique).
 28. EN ISO 175:2000. Plastics – methods of test for the determination of the effects of immersion in liquid chemicals.
 29. Jack A. *FINAT-Testmethode 16, FINAT Technisches Handbuch. 6. Auflage*. Netherlands: Hague, 2001, pp. 36–37, 41–42.
 30. EN ISO 9227:2006–10. Corrosion tests in artificial atmospheres – salt spray tests.

31. EN ISO 6270–2:2005–09. Paints and varnishes – determination of resistance to humidity – Part 2: procedure for exposing test specimens in condensation-water atmospheres.
32. EN ISO 527–2:1996–07. Plastics – determination of tensile properties – Part 2: test conditions for moulding and extrusion plastics.
33. EN ISO 2409:2007–08. Paints and varnishes – cross-cut test.
34. EN ISO 6603–2:2000. Plastics – determination of puncture impact behavior of rigid plastics – Part 2: instrumented puncture test.
35. Reincke K. *Werkstoffprüfmethoden zur mechanischen und bruchmechanischen Untersuchung von Kunststoff-Folien*. Merseburg: Polymer Service GmbH, 2009.
36. EN ISO 53363:2003–10. Testing of plastic films – tear test using trapezoidal test specimen with incision.
37. Braun D. *Erkennen von Kunststoffen: Qualitative Kunststoffanalyse mit einfachen Mitteln*, 4th edn. München and Wien: Hanser Verlag, 2003, p. 34.
38. Yamada K, Takahashi H and Noguchi A. Improved water resistance in edible zein films and composites for biodegradable food packaging. *Journal of Food Science Technology* 1995; **30**: 599–608.
39. Patzsch K. Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen [Dissertation], Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2010.
40. Sanchez-Garcia MD, Ocio MJ, Gimenez E and Lagaron JM. Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. *Journal of Plastic Film and Sheeting* 2008; **24**(3–4): 239–251.
41. Geck A. Zug-/Druckversuch Metalle, Werkstoffkunde Praktikum, Fachbereich Krankenhaus- und Medizintechnik, Umwelt- und Biotechnologie, University of Applied Sciences, Giessen-Friedberg, Germany, 2008.
42. Bourtoom T, Jantawat P and Sanguandeeikul R. Effect of plasticizer type and concentration on the properties of edible film from water-soluble fish proteins in Surimi wash-water. *Science and Technology International* 2006; **12**(2): 119–126.
43. Otto S, Borg H, Schnabel R, Anton W and Jank M. Biologisch abbaubare Abfallbeutel zur Bioabfallsammlung. *Untersuchungen zur mechanischen Stabilität, Müll und Abfall* 2000; **11**: 660–666.
44. Fehlau, Richter and Woll. *Qualitätsanforderungen Folie selbstklebend QP R015*. Wolfsburg: Volkswagen AG, 2006.
45. Ajji A and Zhang X. Correlations between orientation and some properties of polymer films and sheets. *Journal of Plastic Film and Sheeting* 2002; **18**: 105–116.
46. Nentwig J. *Kunststoff-Folien, Herstellung, Eigenschaften, Anwendung*, 3rd edn. München and Wien: Hanser Verlag, 2006.

Biographies

Isabell Sommer I. Sommer is laboratory assistant at the Institute of Biological-Process Engineering of the University of Applied Sciences in Mannheim, Germany. She obtained her diploma in Biotechnology from the University of Applied Sciences in Gießen, Germany, and worked at the Institut für Mikrotechnik in Mainz, Germany, for 3 years as an engineer and at the febit AG in Mannheim, Germany, for 5 years as team manager of the microtechnology team. She is currently a PhD student at the University Halle-Wittenberg, Germany. Her project is focusing on the development and characterization of protection films made of renewable resources.

Peter M. Kunz Peter M. Kunz is a professor for Basic and Applied Process Engineering in the Department of Chemical Process Engineering since 1987 and head of the Institute for Biological-Process-Engineering at the University of Applied Sciences in Mannheim, Germany, since 1988. He studied Domestic Water Research and Resources Management as well as Chemical Process Engineering/Biotechnology at Technical University of Karlsruhe, Germany. He graduated to Dr. rer.pol. at the Faculty of Economic Research at Technical University Karlsruhe, Germany. Topic of his PhD thesis was the process control of waste water treatment plants – technical–economical optimization on the example of the biological preclarification. He worked for 7 years as scientific research assistant at Fraunhofer-Institut for Systems Technology and Innovation Research in Karlsruhe, Germany. He has been highly active for over 30 years in research on industrial and municipal process optimization. More than 20 patents are the result of a wide range of innovation projects in companies and the university. He works in the field of metal-biology.

5 Diskussion

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, über die in den angefertigten Publikationen enthaltenen Diskussionen hinaus, ganzheitlich gewürdigt und die Fehlerbehaftung, der Zielerreichungsgrad und ein Ausblick für weitere Forschungs- und Entwicklungsarbeiten betrachtet.

5.1 Eignung von hinsichtlich Wasserbeständigkeit und Verarbeitbarkeit verbesserten Kollagenfolien für die Konservierung von Neufahrzeugen

Aufgrund steigender Erdölpreise sowie der bestehenden Entsorgungsproblematik herkömmlicher Kunststoffe gewinnen Biokunststoffe immer mehr an Bedeutung. Ein Beispiel für einen solchen Biokunststoff sind die in der Fleischindustrie schon bereits seit Jahrzehnten erfolgreich bei der Herstellung von Würstchen und Schinken verwendeten Kollagenfolien. Als Ursachen, warum diese Folien nicht auch in anderen Bereichen eingesetzt werden, werden ihre geringe Wasserbeständigkeit sowie eine auf die Extrusion beschränkte Verarbeitbarkeit angesehen. Aus dieser Einschränkung ergaben sich zweit offene, wissenschaftliche Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollten, und die als wesentlich für die Erschließung neuer Anwendungsfelder von Kollagenfolien außerhalb der Fleischindustrie angesehen werden. Zum Einen sollte die Wasserbeständigkeit durch eine geeignete Vernetzungstechnik verbessert und zum Anderen die Verarbeitung zu Folien und Überzügen mittels einer Sprühapplikation evaluiert werden. Die Praxistauglichkeit dieser Folien wurde anhand des konkreten Beispiels der Neufahrzeugkonservierung bewertet.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Kollagenfolien einen hohen Anzahl von Anforderungen der Automobilindustrie, zum Teil zur Überraschung einiger Experten, genügen, einige Anforderungen konnten jedoch nicht erfüllt werden: gravierend war dabei der Salzsprühtest, bei dem sich die Folien innerhalb kürzester Zeit auflösten. Viele Erkenntnisse und Erfahrungen können jedoch bei der Erschließung anderer Anwendungsfelder hilfreich sein.

Tabelle 5 zeigt, welche Anforderungen in welchem Maße erfüllt werden konnten, bzw. wo die Schwächen und noch weiterer Optimierungsbedarf liegen. Nicht alle Vorgaben der Automobilindustrie konnten im Rahmen der Arbeit geprüft werden. Diese sind durch den Eintrag n. b. (nicht bestimmt) gekennzeichnet.

Tabelle 5: Anforderungen an eine Transportschutzfolie zur Konservierung von Neufahrzeugen sowie Erfüllungsgrad durch Kollagenfolien

Prüfkriterium	Vorgabe [VW/AUDI 2005, 2006]	erfüllt?	Erreichter Wert
Applikation	Sprühen Vollschutz	Ja Ja	
Trocknungszeiten	3-6 min	Nein	24 h
Erscheinungsbild	hochwertig, faltenfrei	(Ja) Ja	opak
Beständigkeit			
Kraftstoffe	60 min, RT	(Ja)	> 90%
Mineralöle	10 min, RT	(Ja)	> 95%

Scheibenreiniger	10 min, RT	(Ja)	> 80%
Natronlauge	24 h, 40 °C	Nein	< 29% nach 60 min
Schwefelsäure	24 h, 40 °C	Nein	< 22% nach 60 min
Witterungsbeständigkeit	6-9 Monate	Nein	< 1 Woche
Lackverträglichkeit	k.A.	Ja	
Mechanische Kennwerte			
Festigkeit	8-16 N/cm	Ja,	41 N/cm
Reißkraft	> 20N/mm ²	Ja	27 N/mm ²
Dehnung	> 450%	Nein	19 %
Haftung	1,0 + 0,2 N/cm	n. b	
Weiterreißfestigkeit	k. A.	Nein.	8,8 N/mm
Entkonservierung	automatisch	n. b.	
Umweltverträglichkeit	kompostierbar nachwachsend nicht toxisch	Ja Ja Ja	> 80% in 38 Tagen
Kosten	< 20-30 € /Auto	Ja	< 20 € *
Lagerstabilität	3 Monate, 5-30 °C	n. b.	

* s. Tabelle 7

Im Folgenden werden nochmals die künftigen „Herausforderungen“ gewürdigt.

1. Trocknungszeiten

Der hohe Wasseranteil der Kollagenmassen erfordert eine hohe Trocknungsleistung. Beispielsweise müssen zur Erzeugung einer 1 m² großen und 100 µm dicken Folie rund 3 L Kollagenmasse (3 mm Dicke im feuchten Zustand) aufgetragen werden. Bei einem Trockenanteil der Kollagenmassen von 2,5 % entspricht dies rund 2,9 L Wasser, die abgeführt werden müssen. Hochleistungstrockner z.B. aus dem Bereich der Bautrocknung, die in einem ähnlichen Temperaturbereich arbeiten (Arbeitsbereich von 0-40 °C) schaffen eine Entfeuchtungsleistung von bis zu 120 L/ 24 h (5L/h) [KS Technische Austrocknung GmbH, 2012]. Für die Trocknung einer 1 m² großen Kollagenfolie wären also ca. 30 min notwendig. Trocknungszeiten von 3-6 min, wie sie im Anforderungsprofil von VW und AUDI gefordert werden, sind daher allein durch Verwendung eines Hochleistungstrockners nicht zu erreichen. Eine weitere Reduzierung der Trocknungszeit könnte jedoch durch Trocknungshilfsstoffe und eine kontinuierliche Erhöhung der Trocknungstemperatur während des Trocknungsprozesses erreicht werden, da bekannt ist, dass die Denaturierungstemperatur des Kollagens mit abnehmendem Feuchtegehalt steigt [Kopp et.al. 1989], [Maser, 2010].

2. Beständigkeit gegen polare Substanzen und Witterungsbeständigkeit

Die Wasserbeständigkeiten unvernetzter bzw. kommerziell erhältlicher, thermisch vernetzter Kollagenfolien (Cobiosh) lagen bei 0 % bzw. rund 55% nach einer siebenstündigen Inkubation in 60 °C heißem Wasser. Durch eine chemische Vernetzung mit einer Kombination von drei Vernetzern (Formaldehyd, Glutaraldehyd und Glyoxal (10 % bezogen auf den Trockenkollagenanteil) konnte in der vorliegenden Arbeit die Wasser-Beständigkeit

auf knapp 100 % (nach einer siebenstündigen Inkubation in 60°C warmen Wasser) erhöht werden. Dies entspricht annähernd einer Verdoppelung der Wasserbeständigkeit bezogen auf die thermisch vernetzte Folie (s. Abb. 34).

Trotz dieser deutlichen Steigerung machen die Bewitterungsergebnisse (siehe Publikation 3) deutlich, dass ein wesentlicher Bestandteil weiterer Forschungsaktivitäten die Erhöhung der Beständigkeit von Kollagenfolien sowie die Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften nach einer Bewitterung umfassen muss, sofern nicht andere Anwendungsfelder gesucht werden, in denen die Löslichkeit der Folien eine untergeordnete Rolle (Innenbereich) spielt, oder aber gewünscht ist.

Da die durch die Automobilindustrie vorgegebene Witterungsbeständigkeit zu weniger als 3% erreicht wurde, scheint es jedoch eher unrealistisch, allein auf Basis von Kollagen die Vorgaben erfüllen zu können.

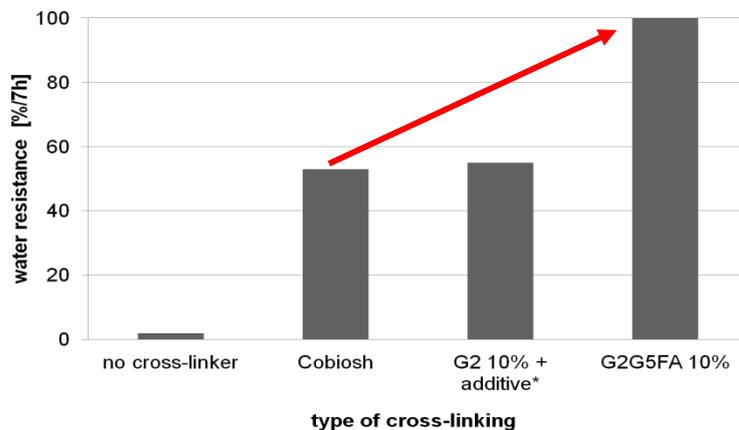


Abbildung 34: Verbesserung der Wasserbeständigkeit durch eine chemische Vernetzung im Vergleich zu unvernetzten bzw. thermisch vernetzten Kollagenfolien nach 7 h bei 60°C

3. Dehnung

Die Kollagenfolien erreichten mit einer Bruchdehnung von 19% nur 4 % der Bruchdehnungswerte der Polyolefinfolie. Es wird jedoch vermutet, dass die in dem Anforderungsprofil geforderten Dehnbarkeiten auf den materialtypischen Werten der Polyolefinfolie basieren, ohne dass diese zwingend erforderlich sind.

4. Weiterreißfestigkeit

Bezüglich des Weiterreißwiderstandes konnten die Kollagenfolien mit 8,8 N/mm nur 3 % des Wertes der Polyolefinfolien erreichen. In dem Anforderungsprofil von VW und AUDI werden jedoch keine Angaben zur Weiterreißfestigkeit der Folien gemacht, obwohl eine mangelnde Weiterreißfestigkeit bei den derzeit eingesetzten Polyolefinfolien beanstandet wird [Bartel, 2010]. Die Erfüllung einer bestimmten Weiterreißfestigkeit ist allerdings nur dann notwendig, wenn die Folien von Hand bei der Entkonservierung abgezogen werden müssen. Da an andere Lösungen, wie ein Abwaschen mittels einer Enzym-haltigen Waschlösung gedacht ist, spielt die Weiterreißfestigkeit keine Rolle.

In Form einer Verbundfolie bzw. durch das Ausrichten der Fasern, wie es bei extrudierten Folien gemacht wird [Osburn, 2002], bzw. in Analogie zu faserverstärkten Kunststoffen, durch das Einarbeiten von Jute- oder Zellulosefasern, könnte der Weiterreißwiderstand verbessert werden.

5.2 Fehlerbetrachtung

Auch bei sorgfältiger Planung und Bestimmung von physikalischen Größen kommt es zu mehr oder weniger großen Messabweichungen (Messfehlern). Trotz Mehrfachbestimmung werden die gemittelten Werte sehr wahrscheinlich vom „wahren Wert“ abweichen. Der Fehler eines Messwertes ist immer identisch mit der Abweichung vom wahren Wert [Bantel, 2000]. Für die Bewertung eines Messergebnisses ist es wichtig, die Aussagekraft der Messung anhand der Fehlerquellen zu kennen. Mit Hilfe der Fehlerbetrachtung soll eine bestmögliche Annäherung an den „wahren Wert“ (Messergebnis) erreicht und das Maß der Abweichung (Messunsicherheit) ermittelt werden [Naumann, 1991]. Der wahre Wert liegt mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit innerhalb des durch die Messunsicherheit definierten Bereiches [Bantel, 2000].

Große Fehler können durch eine sorgfältige Planung der Untersuchungen, Bedienung und Überprüfung der Messgeräte sowie Protokollierung der Messdaten, aber auch eine Plausibilitätskontrolle weitestgehend ausgeschlossen werden. Die daneben existierenden systematischen Fehler wurden durch Maßnahmen, wie der Vermeidung von mangelhaften Kalibrierungen oder Nullpunkteinstellung, bestmöglich minimiert. Zur Reduzierung zufälliger Fehler wie Einstell- und Ableseungenauigkeiten wurden Mehrfachbestimmungen ($n > 5$) durchgeführt und aus den Messwerten der arithmetische Mittelwert bestimmt [Naumann, 1991].

Bezüglich der beiden ausgewählten Messmethoden zur Bestimmung der Wasserbeständigkeit ist Folgendes anzumerken. Die Sircol-Bestimmung dient laut Protokoll der Bestimmung von Säure- oder Pepsin-löslichem Kollagen des Typs 1 bis 5. Der Farbstoff bindet dabei an Gly-X-Y in der Helix unabhängig vom Kollagen Typ. Es ist jedoch nicht geeignet für die Bestimmung von unlöslichem Kollagen. Im Falle des zur Folienherstellung verwendeten Kollagenmaterials handelt es sich jedoch zum größten Teil um unlösliches Kollagen. Nur ein geringer Prozentsatz in den Massen ist löslich. Der Anteil an löslichem Kollagen in den Folien dürfte jedoch homogen verteilt gewesen sein. Die Messung der relativen Änderung der Konzentration an löslichem Kollagen in dem bei der Inkubation verwendeten Wasser bzw. enzymhaltigen Puffer dürfte daher eine Aussage über den Zerstörungsgrad der Folien zulassen. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass die nach dem Sircol-Protokoll ermittelten Werte denen der gravimetrischen Messungen mit einem Fehler von maximal 11 % (bezogen auf den Mittelwert) entsprachen. Bei dem Vergleich der beiden Messverfahren fiel jedoch auf, dass die Messwerte des Sircol-Protokolls grundsätzlich etwas geringer waren, als die gravimetrisch ermittelten Werte. Dies könnte seine Ursache darin haben, dass eine thermische Denaturierung laut Sircol-Protokoll zu einer verringerten Bindung des Farbstoffes an das Kollagen führt [Blocolor, 2010]. Es wäre aber auch denkbar, dass mit der gravimetrischen Methode auch das Herauslösen anderer Komponenten aus den Folien (z.B. Vernetzer) mit erfasst wurde.

Fehler bei der Durchführung des Sircol-Protokolls konnten anhand der gefundenen Messwerte bei der Bestimmung der Kalibriergerade ausgeschlossen werden. Hierzu wurden entsprechend dem Protokoll Doppelbestimmungen durchgeführt. In dem Protokoll wird der notwendige Waschschrift als Hauptfehlerquelle bei unzureichender Übung angegeben. Die ermittelten Messwerte wichen jedoch um weniger als 5% vom Mittelwert ab und entsprachen

somit dem empfohlenen Wert von $< 5\%$ [Biocolor, 2010]. Die Regressionsrechnung lieferte für die Kalibriergerade ein sehr hohes Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9969$.

Dem hingegen sind die Abweichungen der Messergebnisse vom Mittelwert (bis zu 15% bezogen auf dem Mittelwert) bei der gravimetrischen Bestimmung der Wasserbeständigkeit vermutlich dem Spülprozess zuzuordnen. Beim Spülen wurden die übrig gebliebenen Folienreste nach dem Inkubieren der Folien aus dem Wasser entnommen und vorsichtig gespült, um anhaftende Reste abzuspielen. Es ist nicht auszuschließen, dass dabei teilweise kleinste, noch feststehende Partikel von der Folie gelöst wurden.

Bei der Berechnung der theoretisch möglichen CO_2 -Bildung bei der Kompostierung der Kollagenfolien wurde von einem mittleren Gesamtkohlenstoffgehalt der Kollagenmassen von 48% ausgegangen. Dies ist nur ein Schätzwert. Außerdem wurde bei der Interpretation der Abbaubarkeit über die ermittelte CO_2 -Produktion der Anteil an Kohlenstoff, der in der Biomasse immobilisiert wurde bzw. in partiell abgebaute Zwischenprodukte umgewandelt wurde, nicht mit erfasst. Die tatsächlichen Abbaugrade dürften daher etwas höher liegen. Schließlich könnte es auch trotz sorgfältiger Berechnung des theoretischen Sauerstoffbedarfs und der entsprechenden Anpassung des freien Gasvolumens zu einer Limitierung der Sauerstoffversorgung gekommen sein, da das freie Gasvolumen nur alle 3-4 Tage ausgetauscht wurde. Ein weiterer, minimaler Fehler ist durch die Tatsache entstanden, dass das freie Gasvolumen mit Raum-Luft ausgetauscht wurde und nicht mit CO_2 -freier Luft. Der Fehler beläuft sich jedoch aufgrund des CO_2 -Gehaltes der Luft auf maximal 0,04 %. Die DIN-Norm sieht eigentlich eine Belüftung des Bodens durch ein Gitter mit CO_2 -freier Luft vor.

Bei der Bestimmung der Viskosität der Kollagenmasse mit dem höchsten Trockenkollagengehalt wurden die Grenzen der Anwendbarkeit eines Rotationsviskosimeters zur Viskositätsmessung erreicht. Es kam zu einem „Herausdrücken“ der faserhaltigen Massen aus dem Kegel-Platte-Messspalt und somit zu stark fehlerbehafteten Scherspannungen (Abweichungen $> 25\%$) bei hohen Scherraten.

Die größten Fehler bei der Beurteilung der Sprühbarkeit der Massen beruhten jedoch einerseits auf der Subjektivität der Beurteilung der Schichtqualitäten sowie andererseits auf der Bestimmung der Schichtdicken im ungetrockneten Zustand. Hier lagen die Abweichungen der Messwerte untereinander bei bis zu 40 % bezogen auf den Mittelwert.

Bei der Bestimmung der Schichtdicke nach dem Trocknen gab es deutliche Abweichungen vom erwarteten Wert. Das Trocknen einer 3 mm dicken Schicht mit einem Trockenanteil von 2,5% führte zu einer Endsichtdicke von 150 μm . Theoretisch wäre eine Foliendicke von 75 μm zu erwarten gewesen (= Nassfilmdicke * Trockensubstanzanteil). Dies entspricht einer Abweichung von 100%. Neben der Messunsicherheit bei der Bestimmung der Nass- und Trockenfilmdicke können auch in der Folie enthaltene Hohlräume die Ursache sein.

Auch bei dem Vergleich der Kollagenfolien mit einer Polyolefinfolie aus dem Transportschutzbereich variierten die ermittelten Foliendicken innerhalb einzelner Versuchsreihen sehr stark (siehe Tabelle 7). Innerhalb einer Folie der Größe von 51cm x 37cm kam es zu Abweichungen von bis zu 32 μm (21%). Hierfür gibt es die folgenden Gründe. Die Böden im Trockenschrank, auf denen die Gussformen zum Trocknen platziert wurden, waren nicht vollständig nivelliert. Außerdem führte der Warmluftstrom, der von einer Seite zur anderen über die zu trocknenden Massen blies, zu einer Mitbewegung des Materials. Teilweise waren auch die Gussformen leicht konkav geformt. Schließlich führten

auch individuelle Heterogenitäten in den Kollagenmassen bedingt durch Faser-Agglomerate zu diesen Schwankungen.

Betrachtet man die Foliendicke aller hergestellten Prüffolien so ergibt sich mit einer mittleren Foliendicke von 144 µm eine Abweichung von 6 µm (4%) (bereinigt um den Ausreißer „Salzsprühkammer lackiertes Blech“) von der theoretisch erwarteten Foliendicke von 150 µm. Die Abweichung der Foliendicken untereinander lag bei 23 % (bereinigt um den Ausreißer „Salzsprühkammer lackiertes Blech“). Die Ursachen für diese großen Abweichungen wurden bereits beschrieben. Hinzu kommt, dass beim Beschichten der Bleche durch Abkleben mit einem Dichtungsband Guss-Formen generiert wurden, deren tatsächliches Volumen nicht genau bestimmt werden konnte.

Tabelle 7: Foliendicken und Abweichungen der einzelnen Prüfkörper

Versuchsreihe	Dicke [µm]	Abweichung [%]
Zugfestigkeit		
UV	149	20
-40 °C	188	13
23 °C	157	18
70 °C	151	21
Durchstoßfestigkeit	176	7
Permeabilität und Beständigkeit	151	9
Bewitterung		
Wechselklima (lackiertes Blech)	100	13
Wechselklima (Glasplatte)	116	4
Wechselklima (freistehend)	149	8
Salzsprühkammer (lackiertes Blech)	86	8
Salzsprühkammer (Glasplatte)	110	11
Salzsprühkammer (freistehend)	140	3

Auf der Inhomogenität der Probenkörper basieren auch die Fehler der Messungen der mechanischen Eigenschaften, wie Zugfestigkeit, Bruchdehnung, Durchstoßfestigkeit und Weiterreißfestigkeit. Zu ihrer Ermittlung wurden jeweils 5-10 Probekörper vermessen und aus den Messwerten das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Die Abweichungen betragen hier bis zu 35% (die Werte wurden jedoch nicht um Ausreißer bereinigt). Auch die Inhomogenität der Foliendicke bzw. Lufteinschlüsse in Form von Blasen sowie unsaubere Schnittkanten können die Messungen beeinträchtigt haben, da dünnere Stellen Schwachstellen darstellen.

Schließlich unterlag die Bewertung der Witterungsbeständigkeit, der Gitterschnittprüfung und der Permeabilität der Kollagenfolien einer subjektiven Betrachtung. Da die Bewertung jedoch nur von einer einzigen Person vorgenommen wurde, ist eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse legitim.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Charakterisierung der Kollagenfolien und -überzüge trotz der genannten Fehler und Fehlerquellen für das in der Arbeit verfolgte Ziel als ausreichend genau angesehen werden. Die erzielten Erkenntnisse wurden dadurch nicht unverhältnismäßig beeinträchtigt.

5.3 Ausblick

5.3.1 Weiterführende Lösungsansätze

Die Arbeit zeigt Wege zur Verbesserung der Eigenschaften von Kollagenfolien bzw. zur Erschließung neuer Anwendungsfelder auf. Tabelle 8 listet konkrete Vorschläge und Lösungsansätze für weiterführende Forschungs- und Entwicklungs-Themen auf (ohne Anspruch auf Vollständigkeit und Praxistauglichkeit).

Tabelle 8 Lösungsansätze zur Verbesserung der Kollagenfolien

Problematik	Lösungsansätze
Wasserbeständigkeit	Vernetzer aus Fototechnik testen, wenn gute Beständigkeit gefordert Anwendungsfelder für Folien mit guter Wasserlöslichkeit suchen Andere Weichmacher evaluieren Einarbeiten von hydrophoben Materialien wie z.B. Olivenöl Coating mit hydrophoben Schichten wie z.B. Zein oder Bienenwachs
Homogenisieren	Verwendung von Glycerin als Weichmacher Verwendung von denaturiertem Kollagen Vorgeschaltete Siebung der Massen Kühlvorrichtung beim Homogenisieren
Trocknungszeiten	Sukzessive Anhebung der Trocknungstemperatur, Verwendung von Trocknungshilfsstoffen Verwendung von denaturiertem Kollagen
Kosten	Anderer Weichmacher, z.B. Glycerin

Im Hinblick auf die Erhöhung der Wasserbeständigkeit kann die Einarbeitung von hydrophoben Materialien, wie Kim (2001) und Liu (2006) bei Proteinfohlen mit Hilfe von Olivenöl realisiert haben, bzw. das Coating mit Zein oder Bienenwachs, wie es von Pol (2002) bzw. Patzsch (2010) angewendet wurde, ein Lösungsansatz sein. Lirong et. al. (2011) vernetzten Kollagenlösungen erfolgreich mit Procyanidin, einem Pflanzenphenol und konnten eine abnehmende Wasserdampfdurchlässigkeit der Folien bewirken [Lirong et. al., 2011]. Die Wasserdampfdurchlässigkeit korrespondiert mit der Wasserbeständigkeit in der Weise, dass der Permeationsprozess des Wassers durch einen Lösungs-Diffusions-Prozess beschrieben werden kann. Das permeierende Wasser löst sich auf der einen Seite der Folie, diffundiert hindurch (bei den absorbierten Wassermolekülen handelt es sich um gelöstes und gebundenes Wasser) und evaporiert auf der anderen Seite [Warken-Kopatz, 2007], [Debeaufort et.al., 1998]. Weitere Forschungsansätze bestehen in der Verwendung von Vernetzern, die bei fotografischen Aufzeichnungsmaterialien auf Basis von Gelatine angewendet werden [Jerens, 1991].

Bisher wurde lediglich die Wasserbeständigkeit der Folien bewertet, nicht aber die mechanischen Eigenschaften nach einem Kontakt mit Wasser. Bei einem Kontakt mit Wasser diffundieren Wassermoleküle in das Innere der Folien und bewirken Kettenspaltungen. Dies führt zu einem Verlust der mechanischen Eigenschaften [Otto et. al., 2000]. Je nach Anwendungsfall müssen daher die mechanischen Eigenschaften bewitterter Folien geprüft werden.

Lecithin stellt hinsichtlich der Filmherstellungskosten den teuersten Rohstoff dar. Es wurde als Weichmacher zugegeben, da in einer anderen Studie im Rahmen eines DBU-Projektes gezeigt werden konnte, dass es die Geschmeidigkeit der Folien verbesserte ohne die Wasserbeständigkeit der Folien in dem Maße herabzusetzen, wie es z.B. durch Glycerin, aufgrund seiner guten Wasserbeständigkeit und hygroskopischen Eigenschaften die Folge ist. Später wurde Lecithin jedoch als einer der Hauptursachen für die schlechte Qualität der Oberflächen nach dem Sprühen ausgemacht. Für eine Sprühapplikation sind andere Weichmacher sinnvoller, die sich einfacher in die Kollagenmatrix einarbeiten lassen, so dass die Bildung von Clustern in der Beschichtungslösung bzw. Kratern in den resultierenden Filmen ausbleibt. Im Falle von Folien, die keine gute Wasserbeständigkeit aufweisen müssen, spricht nichts gegen die Verwendung von z.B. Glycerin.

Die in der Arbeit gemachten Erfahrungen, im Umgang mit Kollagenmassen verdeutlichen, dass der Gebrauch von nativen Kollagen-Suspensionen zahlreiche Limitierungen hinsichtlich der Herstellung der Massen und der Trocknung der resultierenden Folien sowie des Handlings hochviskoser Massen mit sich bringt. Native Massen haben eine hohe Viskosität, was sich bei der Verarbeitung vielfach als nachteilig erwies, auch der Trockensubstanzgehalt kann durch die Viskosität der Massen nur sehr gering gewählt werden, was zu enormen Trocknungszeiten führt. Diese können jedoch durch eine sukzessive Erhöhung der Trocknungstemperatur während des Trocknens verringert werden, da die Denaturierungstemperatur von Kollagen mit abnehmendem Wassergehalt steigt [Kopp et. al., 1989]. Reduziertere Wassergehalte ermöglichen eine dichtere Annäherung der Kollagenfasern und schützen so vor deren Zusammenfall in Hohlräume [Miles et. al., 2005].

Auch die Verwendung von Trocknungshilfsstoffen ist ein weiterer Ansatz. Während natives Kollagen die Vorteile bietet, dass es beständiger gegen eine mikrobielle Abbaubarkeit ist und aufgrund seiner Fasern zu mechanisch stabileren Folien führt, könnten durch die Verwendung von denaturiertem Kollagen die Problematiken, die sich aus den hohen Viskositäten bei niedrigem Trockensubstanzgehalt ergeben, gelöst werden.

5.3.2 Lang- und kurzfristige Ziele

Die genannten Maßnahmen könnten entscheidend dazu beitragen, in Zukunft neue Anwendungsfelder für Kollagenfolien zu finden. Die Realisierung einer Transportschutzfolie im Automobilbereich auf Basis von Kollagen ist jedoch aufgrund der unzureichenden Witterungsbeständigkeit der Folien langfristiger anzusiedeln.

Anwendungsfelder im Innenbereich oder aber, in denen eine gute Wasserlöslichkeit und Kompostierbarkeit der Folien erforderlich ist, scheinen schneller und mit einem geringeren Optimierungsaufwand realisierbar.

Bereiche, in denen eine gute Wasserlöslichkeit und Kompostierbarkeit der Folien erforderlich ist, findet man z.B. in der Landwirtschaft in Form von verrottbaren Mulchfolien, Saatbändern, Saatgutverpackungen oder Anzuchtschalen, aber auch überall dort, wo wasserlösliche Etiketten eingesetzt werden (z.B. Mehrwegflaschenetikettierung, Preisetiketten, etc.). Durch den Einsatz von Kollagenfolien könnte in diesen Bereichen ein Zusatznutzen gegenüber den herkömmlichen Folien geschaffen werden, weil sich z.B. der Ablöseprozess der Etiketten bei den Mehrwegflaschen vereinfacht und umweltfreundlicher gestaltet (Waschlösung enthält nur warmes Wasser statt NaOH). Saatbänder aus Kollagen hätten den Vorteil, dass sie einen Dünger darstellen und der Auflösungsprozess beschleunigt werden würde. Ferner

können Kollagenfolien für wasserlösliche Verpackungen (z.B. als Waschmittel-Dosierhilfe) genutzt werden. Die gute Beständigkeit der Folien gegen Fette und Öle kann Verpackungen von fettigen Lebensmitteln auf Basis von Silikon- oder Paraffin-beschichteten Papieren ersetzen (z.B. Chipstüten, Hähnchentüten oder Konfektpapier).

Abschließend lässt sich sagen, dass kollagenbasierende Produkte aufgrund der vielen funktionellen Gruppen und der damit verbundenen chemischen Variationsmöglichkeiten sowie der biologischen Herkunft und Abbaubarkeit einen deutlichen Mehrwert gegenüber konventionellen Polymeren und somit das Potential haben, die Produktpaletten in klassischen und neuartigen Anwendungsbereichen zu ergänzen [Bourtoom, 2008], [Krochta, 2002].

6 Zusammenfassung

Das übergeordnete Ziel der vorliegenden Dissertation war es, einen Beitrag zur Substitution mineralölbasierender Kunststofffolien und zur Erschließung neuer Anwendungsgebiete von Kollagen zu leisten. Kollagen fällt in Form von Spalt in großen Mengen bei der Lederherstellung als Nebenprodukt an und wird seit Jahrzehnten erfolgreich in der Fleischindustrie angewendet. Aus nativen Kollagenmassen wurden unter Zugabe von Additiven Folien durch Gießen bzw. Sprühen erzeugt und für eine beispielhafte Anwendung in der Automobilindustrie mit einer Polyolefinfolie verglichen. Polyolefinfolien werden zur Konservierung von Neufahrzeugen beim Transport vom Hersteller zum Händler eingesetzt. Aufgrund der Tatsache, dass diese jedoch von Hand appliziert und auch wieder entfernt werden müssen, wurde in den letzten Jahren vermehrt nach Alternativen gesucht.

Durch die Verbesserung der Wasserbeständigkeit der in der Arbeit erzeugten, chemisch vernetzten Kollagenfolien im Vergleich zu kommerziell erhältlichen, thermisch vernetzten Kollagenfolien sowie durch die Möglichkeit einer Sprühapplikation von Kollagenmassen konnten Erkenntnisse für die Erschließung neuer Anwendungsfelder für Kollagenfolien außerhalb der Fleischindustrie gewonnen werden.

Im Bereich der Fahrzeug-Konservierung können Kollagenfolien aufgrund der hohen Anforderungen hinsichtlich der Witterungsbeständigkeit nicht ohne Weiterentwicklung eingesetzt werden. Dennoch bieten die auf Basis nachwachsender, biologisch abbaubarer Rohstoffe hergestellten Folien einige Vorteile, wie die Möglichkeit der Sprühapplikation, die Abwaschbarkeit mit warmen, wasserbasierenden Waschlösungen sowie die biologische Abbaubarkeit. Einer weiteren Optimierung bedarf es derzeit noch hinsichtlich der Trocknungszeiten sowie der Sprödigkeit der Folien. Für Anwendungsfelder im Innenbereich bzw. bei denen eine gute Wasserlöslichkeit oder eine gute Beständigkeit gegenüber unpolaren Substanzen gefordert wird, sind Kollagenfolien eine äußerst interessante Alternative zu synthetischen Kunststoffen.

Teil 1 „Wasserbeständigkeit“: Vor dem Hintergrund eines 6-monatigen Außeneinsatzes bei der Konservierung von Neufahrzeugen und der nur geringen Wasserbeständigkeit von Kollagenfolien wurden verschiedene Einflussfaktoren auf das Verhalten der Folien gegenüber Wasser anhand des Auflösungsgrades unter definierter Wässerung mit Hilfe zweier Verfahren (gravimetrisch nach Tint [Tint, 1961], Sircol-Protokoll [Biocolor, 2010]) beurteilt. Beide Nachweisverfahren lieferten für Kollagenfolien ohne Weichmacher nahezu identische Ergebnisse. Bei Verwendung eines Weichmachers konnte anhand einer Parallelverschiebung der Kurven beider Verfahren der Nachweis erbracht werden, dass es neben einer Auflösung der Folien zu einem Herauslösen des Weichmachers (Lecithin) kam. Bezüglich des Einflusses verschiedener Vernetzungsparameter konnten folgende Abhängigkeiten beobachtet werden: Durch eine chemische Vernetzung mit einem Aldehyd ($c = 10\% \text{ w/w TK}$) konnte die Beständigkeit einer Kollagenfolie von 0% für eine unvernetzte Folie auf annähernd 100 % erhöht werden (bei einer zweistündigen Inkubation in Wasser bei 80°C). Thermisch vernetzte Handelsware (DHT, 1h, 105°C) erreicht nur eine Beständigkeit von 70%. Ein Unterschied zwischen den unterschiedlich angesäuerten Kollagenmassen bzw. den verschiedenen Aldehyden konnte bei einer Konzentration von 10 % w/w (TK) nicht festgestellt werden. Glyoxal wird jedoch aufgrund der geringeren Toxizität bevorzugt. Unterhalb einer Vernetzerkonzentration von 10 % w/w (TK) nahm die Wasserbeständigkeit

der Folien stark ab. Trotz der erhöhten Wasserbeständigkeit von chemisch vernetzten Kollagenfolien war die Kompostierbarkeit sehr gut (90% bei 58°C in 38 Tagen).

Teil 2 „Sprühbarkeit“: Neben dem bisher ausschließlich zur Herstellung von Kollagenfolien kommerziell etablierten Extrusionsverfahren konnten erstmals Folien aus faserhaltigen, viskosen Kollagenmassen durch Versprühen erzeugt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit Kollagenmassen mit einem Trockenkollagenanteil von 1,2-2,0% und Viskositäten von 200-700 mPa*s mit einer Gelcoatanlage und einem Druck von 180 bar im Airless-Verfahren erzielt. Aber auch mit einer einfachen Becherpistole und einem Druck von 3-4 bar ist die Herstellung von stabilen Folien und Überzügen auf kompliziert geformten Oberflächen möglich. Unterhalb von einem TK-Gehalt von 1,5% liefen die Massen von senkrechten Flächen ab. 2,0%-ige Lösungen konnten bis zu einer Dicke von 2,5 mm aufgesprüht werden, bevor ein Abfließen an senkrechten Flächen auftrat. Nach dem Trocknen waren die Folien rund 130 µm dick und stabil genug, um sie an einem Stück von den beschichteten Blechen abziehen zu können. Probleme bereitete das als Weichmacher zugegebene Lecithin. Die nach dem Homogenisieren verbliebenen Lecithin-Cluster führten bei höher viskosen Massen (TK > 2,5 %) zu Kratern in der Schicht bzw. Verstopfungen der Düsen. Im Vergleich zu den Kollagenfolien (transparent, opak) waren gesprühte Gelatinefolien weiß, deutlich dicker und hatten eine schwammartige, poröse Struktur (bedingt durch ein vorzeitiges Gelieren der Gelatinelösung in der Luft trotz einer Vortemperierung).

Teil 3 „Anwendbarkeit bei der Fahrzeug-Konservierung“: Viele der in dem Anforderungsprofil aufgelisteten mechanischen und chemischen Eigenschaften konnten die Kollagenfolien vergleichbar oder sogar besser als die derzeitig eingesetzten Polyolefinfolien erfüllen. Hierzu zählen u.a. die automatisierbare Applikation eines hochwertigen, faltenfreien Vollschutzes mittels Sprühen, die gute Lack- und Umweltverträglichkeit sowie die Preisvorgabe. Auch die Permeabilität und Beständigkeit gegenüber unpolare Substanzen, wie Öl und Kraftstoff, waren sehr gut. Praxisnähere Bewitterungstests in einer Salzsprüh- bzw. Wechselklimakammer verdeutlichten jedoch, dass die Kollagenfolien ohne eine weitere Optimierung nicht für einen Außeneinsatz mit Salzwasserkontakt geeignet sind. Einem Wechselklima hielten die Folien zumindest kurzzeitig (7 Tage) stand. Eine trockene Bewitterung im Bereich von -40 bis +80°C führte zu keinerlei Dimensionsänderungen. Die mechanischen Prüfungen verdeutlichten, dass zum Zerreißen vorgeschädigter Kollagenfolien eine um 97% geringere Kraft erforderlich ist als für Polyolefinfolien. Eine bereits geschädigte Kollagenfolie ist damit nicht ausreichend stabil gegen ein Weiterreißen verursacht durch den Fahrtwind oder beim manuellen Entkonservieren des Autos. Die Kollagenfolien waren insgesamt wenig elastisch und eher spröde. Die Bruchdehnung lag mit 19% nur bei 4 % der Bruchdehnungswerte der Polyolefinfolie. Auch beim Durchstoßversuch (Steinschlag-Simulation) waren die Kollagenfolien gegenüber einer Stoßbeanspruchung wesentlich empfindlicher als die Polyolefinfolie. Die notwendige Schädigungskraft im Falle der Kollagenfolie war jedoch nur unwesentlich geringer als Literaturwerte für eine 10 µm starke Folie aus LDPE. Die Untersuchung der Zugfestigkeit lieferte mit der Polyolefinfolien vergleichbare Werte (27 bzw. 38 N/mm²), sie verringerte sich jedoch durch eine vorgeschaltete UV-Behandlung, während eine Temperaturbehandlung bei -40°C bzw. 70°C keinen Einfluss hatte.

7 Literaturverzeichnis

- [2T, 2011] Unbekannt (2011). Bildmaterial: Full body cover pag 1/2, 2T Transport Technology Confezioni Andrea Group, Varese, Italien, siehe auch www.carboncover2t.com, 02/2011.
- [Abke, 2003] Abke, J., (2003). Dissertation: Verbesserung der Biokompatibilität metallischer Implantate durch kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht, Naturwissenschaftliche Fakultät - Chemie und Pharmazie, Universität Regensburg.
- [Akin, Hasirci, 10995] Akin, H. and Hasirci, N. (1995). Preparation and Characterization of Cross-Linked Gelatin Microspheres, *Journal of Applied Polymer Sciences*, 58, 95-100.
- [American Meat Institute, 2000] American Meat Institute (2000). *Meat and Poultry Facts*. Mt. Morris, IL: Watt Publishing.
- [Amin, Ustunol, 2007] Amin, S.; Ustunol, Z. (2007). Solubility and mechanical properties of heat-cured whey protein-based edible films compared with that of collagen and natural casings, *International Journal of Dairy Technology* 60 (2), 149.
- [Audic, Chaufer, 2010] Audic, J.-L.; Chaufer, B. (2010). Caseinate based biodegradable films with improved water resistance, *Journal of Applied Polymer Sciences*, 117, 1828-1836.
- [Auto.t-online, 2006] Donnerwetter.de (2006) So heiß wird der Sommer im Auto, www.auto.t-online.de, 02/2011.
- [Autogazette, 2010] unbekannt, (2010). 62 Millionen Verkäufe weltweit: 2011 wird Rekordabsatzjahr für Autohersteller, *Autogazette* 03.12.2010.
- [Aydt, Weller, 1991] Aydt, T.P., Weller, C.L. and Testin, R.F. (1991). Mechanical and Barrier Properties of Edible Corn and Wheat Protein Films, *Trans. ASAE*, 34, 207–211.
- [Bailey, Paul, 1998] Bailey, A.J., Paul, R.G. (1998). *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 82, 104-110.
- [Bantel, 2000] Bantel, M., (2000). *Grundlagen der Messtechnik: Messunsicherheit von Messung und Messgerät*, Fachbuchverlag Leipzig im Carl Hanser Verlag, München, Wien.
- [Bartel, 2010] Bartel, H. - J. (2010). Mündliche Information, AUDI, Ingolstadt.
- [Batania, 2011] Unbekannt (2011). Produktflyer, Batania Direct GmbH, Kulmbach, Deutschland, siehe auch www.batania.com.
- [Bedino, 2003] Bedino, J.H. (2003). *Champion – an expanding encyclopedia of mortuary practices* 649, 2514.
- [Biocolor, 2010] Unbekannt (2010). *Manual: BiocolorSircol™ Soluble Collagen Assay*, Biocolor Ltd, United Kingdom.
- [Bourtoom, 2008] Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties, *Intern, Food Research Journal*, 15, 3, 237-248.
- [Bowes, Cater, 1968] Bowes, J.H., Cater, C.W. (1968). The interaction of aldehydes with collagen, *Biochemica et Biophysica Acta*, 168, 341-352.

- [Bowman, Offner, 2002] Bowman, B. J., Offner, C. N. (2002) Hard Gelatin capsules, in: Protein- Based Films and Coatings, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- [Braess, Seiffert, 2007] Braess, H.-H. und Seiffert, U. (2007). Oberflächenschutz, Handbuch Kraftfahrzeugtechnik, 5. Auflage, Vieweg, Wiesbaden, 401-402.
- [Bräumer, 1974] Bräumer, K. (1974). Das Faserprotein Kollagen, Die Angewandte Makromolekulare Chemie, 4 (41), 485-492.
- [Bubnis, Ofner, 1992] Bubnis, W.A., Ofner, C.M. (1992). Analytical Biochemistry, 207, 129-133.
- [Bunting, 2006] Bunting, D. (2006). Bildmaterial, North American Motoring, siehe auch <http://www.bmwblog.com/2006/12/22/did-you-ever-wonder-what-happens-at-the-port-to-your-car-after-it%E2%80%99s-shipped-from-the-factory/>, 03/2011.
- [Burkhard, 2010] Burkhard, C. (2010). Mündliche Information, Fa. Witzenmann.
- [Burness, 1977] Burness D.M., Pouradier J. (1977). The hardening of gelatin and emulsions, in The Theory of Photographic Process (ed. James T.H.) 51-67, Macmillan + Co., New York.
- [Carcover, 2011] Unbekannt (2011). Bildmaterial: Port area of car shipping, Carcover.it, ECS Engineering srl, Castelfranco Emilia, Italien, <http://www.carcover.it/transport-carcover.htm>, 02/2011.
- [Carlowitz, 1990] Carlowitz, B. (1990). Die Kunststoffe: Chemie, Physik, Technologie, Hanser Verlag, München, Wien.
- [Carl Roth, 2011] Unbekannt (2011). Preisinformation Carl Roth, 03/2011.
- [Carvalho, Grosso, 2006] Carvalho, R.A. de, Grosso, C.R.F. (2005). Properties of chemically modified gelatin films, Brazilian Journal of Chemical Engineering, 23 (1), 45-53.
- [Cheung, Nimni, 1982] Cheung, D.T., Nimni, N.E., (1982). Conn. Tiss. Res. 10, 201.
- [Chvapil, 1977] Chvapil, M. (1977). Collagen sponge: Theory and practice of medical applications, J. Biomed. Mat. Res., 11 (5), 721–741.
- [Cordshagen, 2002] Cordshagen, J. (2002). Innovations Report, Transportschutz zum Aufsprühen, from <http://www.innovations-report.de>.
- [Courts, Homan, 1972] Courts, A.; Homan, P. (1972). Effect of Dialdehydes on the Viscosity and Optical Rotation of Gelatin, J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 1253.
- [Daher et. al., 2000] Daher, L.J., Callahan, T.P., Lonesky, S.M. (2000). Gelatin Spray Coating - Patent 6077540 .
- [Damodaran, 1979] Damodaran, S. (1997). Amino Acids, Peptides, and Proteins, Food Chemistry, 3rded., Marcel Dekker, New York, 322-430.
- [Davis, Tabor, 1963] Davis, P., Tabor, B.E. (1963). Kinetic Study of the Crosslinking of Gelatin by Formaldehyde and Glyoxal, Journal of Polymer Science: Part A, 1, 799-815.
- [Debeaufort et.al., 1998] Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. A. & Voilley, A. (1998). Edible films and coatings: Tomorrow's packagings: A review. In: Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 38 (1998), 4, 299-313.

- [Embuscado, Huber, 2009] Embuscado, M.E.; Huber, K.C. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*; Springer: Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- [Erk, 2010] Erk, G. (2010). Mündliche Information, Naturin Viscofan GmbH, Weinheim, Germany.
- [European Bioplastics, 2010] European Bioplasticse.V. (2010). Definition von Biokunststoffen nach European Bioplastics, abgerufen von www.european-bioplastics.org/index.php?id=5,10/2010.
- [Falbe, Regnitz, 1989-92] Falbe, J.; M. Regnitz (Hrsg.) (1989–92). *Römpp Chemie Lexikon*, 9. erw. und bearb. Aufl., Bd. 1–6, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- [Fehlberg, 2009] Fehlberg, S. (2009). *Medi-Learn Skriptenreihe: Biochemie 4, Molekulargenetik, Binde- und Stützgewebe*, 3. Auflage, Medi-Learn-Verlag, Marburg.
- [Finkenstadt, Willet, 2004] Finkenstadt, V. L., Willett, J. L. (2004). A direct-current resistance technique for determining moisture content in native starches and starch-based plasticized materials, *Carbohydr. Polym.* 55, 149-154.
- [Fishman, 2004] Fishman, M. L., Coffin, D. R., Onwulata, C. I., Konstance, R. P. (2004). *Carbohydr. Polym.* 57, 401-413.
- [FN Klebe und Schleifprodukte, 2012] FN Klebe und Schleifprodukte (2012). Produktinformation zu TESA Bodyguard 50530 PV7, Ergolding.
- [Friess, 1997] Friess, W. (1997). Collagen – biomaterial for drug delivery, *Europ. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, 113-136.
- [Frohberg, 2010] Frohberg, P. (2010). Dissertation: Untersuchungen zur Herstellung und Optimierung proteinogener Biowerkstoffe, Zentrum für Ingenieurwissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [Füßer, 2010] Füßer, H. (2010). Mündliche Information, Naturin Viscofan GmbH, Weinheim, Germany.
- [Gagnieu, 1998] Gagnieu, C. (1998). Patent DE69315483T2: Vernetzbare Kollagenderivate, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Herstellung von Biomaterialien.
- [Galiotta et. al., 1998] Galiotta, G.; Di Gioia, L.; Guilbert, S.; Cuq, B. (1998). Mechanical and thermomechanical properties of films based on whey proteins as affected by plasticizer and cross-linking agents, *Journal of Dairy Sciences*, 81, 3123-3130.
- [Gendler et.al., 1984] Gendler, E., Gendler, S., Nimni, M.E. (1984). *Journal of Biomedical Materials Research*, 18, 727-736.
- [Glawe, Giessmann, 2010] Glawe, A., Giessmann, A. (2010). Einfluss von Viskosität und Beschichtungsdicke auf die Auswahl einer optimalen Beschichtungstechnologie, *Kautschuk Gummi Kunststoffe* 6: 262-266.
- [Goldschmidt, Streiberger, 2002] Goldschmidt, A., Streitberger, H.-J. (2002). *BASF Handbuch Lackiertechnik*, Vincentz Verlag, Hannover, Germany.
- [Gorham, et al, 1992] Gorham, S.D., Light, N.D., et al. (1992). Effect of Chemical Modifications on the Susceptibility of Collagen to Proteolysis, II. Dehydrothermal Crosslinking, 14, 129-138.

- [Gratzer, 1996] Gratzer P.F., Pereira C.A., Lee J.M. (1996). Solvent environment modulates effects of glutaraldehyde crosslinking on tissue-derived biomaterials; *J. Biomed. Mater. Res.* 31, 533-543.
- [Hamaguchp et. al., 2003] Hamaguchp, P.Y.; Shiku, Y.; Tanaka, M. (2003). Property improvement of fish water soluble protein films by dialdehyde starch and/or sodium dodecyl sulfate treatments, *Packaging Technology and Science*, 12 (5), 271-282.
- [Han, 2005] Han, J.H. (2005) *Innovations in food packaging*; Elsevier Academic press, Sand Diego, California.
- [Henry et. al., 2007] Henry, B. G.; Bhansali, S.; Koob, T.J. (2007). Optimization of Collagen Film to be used in the Development of a Biocompatible Interface, 3rd annual USF interdisciplinary graduate research Symposium, University of South Florida.
- [Herzinger, 2010] Herzinger, T. (2010). Mündliche Information, BMW-Group, 2010
- [Himmelmann, 1977] Himmelmann W.: in *Colloquium über Härtung*, Herstal, Agfa Gevaert AG.
- [Hollmach, 2000] Hollmach, S. (2000). *Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer, Herstellung, Anwendung und chemische Modifikation*, Didaktik der Chemie, Universität Bayreuth.
- [Hsiu-Ho, 2001] Hsiu-Ho, H.; Cheng-Wen, L.; Ming-Thau, S. (2001). Diffusion characteristics of collagen film, *Journal of Controlled Release* 77 (1-2), 97-105.
- [Jayakrishnan, 1996] Jayakrishnan A., Jameela S.R. (1996). Glutaraldehyde as a fixative in bioprotheses and drug delivery matrices; *Biomaterials* 17, 471-484.
- [Jerens, 1991] Jerens, H. (1991). Patentanmeldung DE3727293C2, Verfahren zur Härtung gelatinehaltiger Schichten eines photographischen silberhalogenidhaltigen Aufzeichnungsmaterials.
- [Jones, Whitmore, 1975] Jones, M. W.; Whitmore, R. A. (1975). *Journal of American Leather Chemical Association*, 70, 91.
- [Jungmann 2002] Jungmann, T., (2002). Audi entwickelt Flüssigfolie zum Transportschutz, *ATZ online*, siehe auch <http://www.atzonline.de/Aktuell/Nachrichten/1/714/Audi-entwickelt-Fluessigfolie-zum-Transportschutz.html>, 05/2010.
- [Kaminsky, et. al., 2005] Kaminsky, H., Rohenkohl, H., Schrubke, L., et. al. (2005). Entwicklung eines Verfahrens zu physikalischen Einbindung von Zytostatika und anderen hochwirksamen Arzneimitteln mit Hilfe von Gelen und Schäumen zu Dekontamination und Beprobung von Oberflächen, *IGF Forschungsvorhaben*, 99 ZN/2.
- [Kanagy, 1950] Kanagy, J.R. (1950). *J. Amer. Leather Chemists Assoc*, 45, 12.
- [Kaya, 200] Kaya, S.; Kaya (2000). *A. J. Food Eng.* 43, 91-96.
- [Khor, 1996] Khor E. (1996). Methods for treatment of collagenous tissues for bioprotheses; *Biomaterials* 18, 95-105.
- [Kim et. al., 2001] Kim, S.J.; Ustunol, Z. (2001). Solubility and Moisture Sorption Isotherms of Whey-Protein-Based Edible Films as Influenced by

- Lipid and Plasticizer Incorporation, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49, 4388-4391.
- [Kling, 2009] Kling, S., Diplomarbeit: Biomechanical response of normal and cross-linked corneas, Prof. Dr. Grübler GmbH, Isny im Allgäu, 2009.
- [Koepf et. al., 1994] Koepff, P., Braumer, K., Stahl, H., Dick, E. (1994). US Patent 5316717.
- [Kopp, et al, 1989] Kopp, J., Bonnet, M., Renou, J.P. (1989). Effect of Collagen Crosslinking on Collagen-Water Interactions (a DSC Investigation), *Matrix* 9, 443-450.
- [Krochta, De Mulder, 1997] Krochta, J. M.; De Mulder, C. L. (1997). Edible and biodegradable polymer films - challenges and opportunities (A Scientific Status Summary), *Food Technology*, 51(2), 61-74.
- [Krochta, 2002] Krochta, J. M. (2002). Proteins as raw materials for films and coatings: Definitions, current status, and opportunities, in: *Protein- Based Films and Coatings*, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA, 1-41.
- [KS Technische Austrocknung, 2012] KS Technische Austrocknung GmbH, Produktinformation zu Entfeuchter TTK 600, Sonthofen, 2012.
- [Kunz, 2009] Kunz, P. M. (2009). Ideenskizze, Institut für Biologische Verfahrenstechnik, Hochschule Mannheim.
- [Kurbads, 2011] Unbekannt (2011). Bildmaterial, Kurbads & Co GmbH, Riga, Lettland, www.kurbads.lv/?l=4&item_id=9,02/2011.
- [Langmaier et. al., 2008] Langmaier, F., Mokejcs, P., Kolomaznik, K. and Mladek, M. (2008). Biodegradable packing materials from hydrolysates of collagen waste proteins, *Waste Management* 28 (3), 549-556.
- [Li, 1993] Li, S.T. (1993). *Biotechnological Polymers*, 66-81.
- [Lima et. al., 2010] Lima, A.M., Cerqueira, M.A., Souza, B.W.S., Santos, E.C.M., Teixeira, J.A., Moreira, R.A. and Vicente, A.A. (2010). New edible coatings composed of galactomannans and collagen blends to improve the postharvest quality of fruits – Influence on fruits gas transfer rate, *J. of Food Engineering* 97 (1), 101–109.
- [Lirong et.al., 2011] Lirong, H., Changdao, M., Jijabo, S., Qian, Z., Bi, S., Weil, L. (2011). Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin, *Int. J. of Biological Macromolecules* 48, 354–359.
- [Liu, 2006] Liu, L.; Kerry, J. K.; Kerry, J. P. (2006). *Int. J. Food Sci. Tech.* 41, 295-302.
- [Liu, et. al., 2006] Liu, L.; Kerry, J.F.; Kerry, J.P. (2006). Effect of food ingredients and selected lipids on the physical properties of extruded edible films/casings, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 295–302.
- [Mallikarjunan et. al., 1997] Mallikarjunan, P., Chinnan, M. S., Balasubramaniam, V. M., Phillips, R. D. (1997). Edible Coatings for Deep-fat Frying of Starchy Products, *Food Sci. Technol.* 30, 7, 709-714
- [Marquie´, 2001] Marquie´, C. *J Agric Food Chem*, 2001, 49, 4676.
- [Maser, 1996] Maser, F. (1996). Extrakt Vortrag FILK-Kollagen-Symposium .
- [Maser, 2010] Maser, F. (2010). Mündliche Information, Naturin Viscofan GmbH, Weinheim, Germany.

- [Maser, 2011] Maser, F. (2011). Mündliche Information, Naturin Viscofan GmbH, Weinheim, Germany.
- [McElroy, 1987] McElroy, W. (1987). Painter's Handbook, Craftsman Book Company, Carlsbad, Germany.
- [Meyer, 1992] Diverse (1992). Meyers Großes Taschenlexikon, 4. Auflage, BI Taschenbuchverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- [Micard et. al., 2000] Micard, V.; Balamri, R. Morel, M. H.; Guilbert, S. (2000). Properties of chemically and physically treated wheat gluten films, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (7), 2948.
- [Miles et. al., 2005] Miles, C. A., Avery, N. C., Rodin, V. V., Bailey, A. J. (2005). The Increase in Denaturation Temperature Following Cross-linking of Collagen is Caused by Dehydration of the Fibres, *Journal of Molecular Biology* 346 (2), 551-55.
- [Mischke, 2007] Mischke, P. (2007). Filmbildung in modernen Lacksystemen: Technischer Hintergrund / Substratadditive, Verlag: Vincentz Network, Hannover, 43-44.
- [Moczar et.al., 1994] Moczar, M., Mazzucotelli, J. P., Bertrand, P., Ginat, M., Leandri, J., Loisanse, d. (1994). *ASAIO Journal*, 40 M697-M701.
- [Moeller, 2008] Moeller, E. (2008). Handbuch Konstruktionswerkstoffe: Auswahl, Eigenschaften, Anwendung, Hanser Verlag, München.
- [N24, 2008] Unbekannt (2008). Bildmaterial: Krise im Güterverkehr – 8000 Waggons stillgelegt, N24, siehe auch http://www.n24.de/news/newsitem_4246011.html, 03/2011.
- [Naga et. al., 1996] Naga, M., Kirihaara, S., Tokugawa, Y., Tsuda, F., Hirotsuka., M. (1996). US Patent 5569482.
- [Naturin, 2010] Naturin Viscofan GmbH, Produktinformationen und Materialien, Weinheim, Germany, 2010.
- [Naumann, 1991] Naumann (1991). Statistik Skript, FH Gießen-Friedberg.
- [Naumburger, 2007] Naumburger, D. (2007). Dissertation: In vitro Fibrillogenese von Kollagen Typ I in Gegenwart von Polymeren unter gerbereichemischem Aspekt, Mathematik und Naturwissenschaften, Technischen Universität Dresden.
- [Nentwig, 2006] Nentwig, J. (2006). Kunststoff-Folien, Herstellung, Eigenschaften, Anwendung, 3. Auflage, Hanser Verlag, München, Wien.
- [Nimni, 1995] Nimni, M.E. (1995). in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering*, Part A: Materials, Vol. 1, (Ed.: D. L. Wise), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1229-1243.
- [Olson, Zoss, 1985] Olson, S., Zoss, R. (1985). U.S. Patent 4,511,583: Fried foods of reduced oil absorption and methods of preparation employing spray of film forming agent.
- [Osburn, 2002] Osburn, W.N. (2002). Collagen Casings in: *Protein- Based Films and Coatings*, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- [Otto, 2000] Otto, S., Borg, H., Schnabel, R., Anton, W., Jank, M. (2000). Biologisch abbaubare Abfallbeutel zur Bioabfallsammlung -

- Untersuchungen zur mechanischen Stabilität, Müll und Abfall, 11, 660 – 666.
- [Park et. al., 1994] Park, H.J., Chinnan, M.S., Shewfelt, R.L. (1994). Edible Coating Effects on Storage Life and Quality of Tomatoes, *J. Food Sci.*, 59, 568–570.
- [Park et. al., 2002] Park, S. K., Hettiarachchy, N. S., Ju, Z. Y., Gennadios, A. (2002). Formation and Properties of Soy Protein Films and Coatings in: *Protein- Based Films and Coatings*, ed. by Gennadios, A., CRC Press LLC, Boca Raton, USA.
- [Parmentier, 2011] Unbekannt (2011). Gelatine, wichtige Kennzahlen von Gelatine, Gustav Parmentier GmbH, Internetquelle: <http://www.parmentier.de/gelatine/kennzahl.htm>, 03/2011.
- [Patent DE68927525T2,1997] Patent DE68927525T2 (1997). Verfahren zur Vernetzung von Collagen mit chemischen photo-aktivierbaren Vernetzungsmitteln. Anwendungen der so vernetzten Collagen oder Aminosäure enthaltenden Polymere, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, Californien.
- [Patzsch, 2010] Patzsch, K. (2010). Dissertation: Untersuchungen zur Herstellung von Biokunststoffen durch enzymatische Vernetzung von Proteinen aus nachwachsenden Rohstoffen, Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- [Pfinder, 2011] Unbekannt (2011). Bildmaterial: Außenhautkonservierung, siehe auch <http://www.pfinder.de/produkte/korrosionsschutz-konservierung-karosserie/ausenhautkonservierung>, 02/2011.
- [Plastics Europe, 2009] Plastics Europe (2009). *Plastics – the Facts 2010 - An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2009* European Plastics Producers' Association "Plastics Europe".
- [Pol, et. al. 2002] Pol, H.; Dawson, P.; Acton, J.; Ogale, A. J (2002). Soy Protein Isolate/Corn-Zein Laminated Films: Transport and Mechanical Properties, *Journal of food science*, 67 (1), 212-217.
- [Pontén, Nordgaard, 1976] Pontén, B.; Nordgaard, O. (1976). The use of collagen film (cutycol®) as a dressing for donor areas in split skin grafting, *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 10 (3), 237-240.
- [Pukhova et. al., 1985] Pukhova, Z.I.; Vasil'ev , M.P.; Kotetskii, V.V.; Vol'f, L.A. (1978). Collagen fiber waterproofed during the spinning process, *Fibre Chemistry*, 10 (3), 264-265.
- [Rähse, 2010] Rähse, W. (2010). Produktdesign von Kunststoffen für die Waschmittelindustrie, *Chemie Ingenieur Technik*, 82 (12), 2073-2088.
- [Reich, 1966] Reich, G. (1966). *Kollagen, eine Einführung in Methoden, Ergebnisse und Probleme der Kollagenforschung*, Theodor Stinkopff, Dresden.
- [Renner, 2003] Renner, M.U. (2003). Inaugural-Dissertation: Gelatinefilme als Arzneistoffträger, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- [Renner, 2004] Renner, M.U. (2004). Gelatinefilme als Arzneistoffträger, 1. Auflage, Cuviller Verlag, Göttingen.
- [Rhim et. al., 1998] Rhim, J.W., Gennadios, A.; Weller, C.L.; Cezeirat; C.; Hanna, M.A. (1998). Soy protein isolate-dialdehyde starch films, *Industrial Crops and Products*, 8, 195-203.
- [Salchinger, 2009] Salchinger, S. (2009). Diplomarbeit „Biokunststoffe: Anwendungsgebiete und Potentiale von Biopolymerwerkstoffen in der Architektur“, Institut für Architektur und Entwerfen, Technische Universität, Wien.
- [Schneider et. al., 2005] Schneider, F., Lebersorger, S., Tesar, M. and Wassermann, G. (2005). Endbericht WieNaWARO: Beschreibung und praxisgerechte Planung von Umsetzungsprojekten zum Einsatz von Werkstoffen aus nachwachsenden Rohstoffen, Institut für Abfallwirtschaft, Universität für Bodenkultur, Wien.
- [Schwarz, Leisewitz, 1999] Schwarz, W., Leisewitz, A., (1999). Forschungsbericht 297 44 906/2: Stand der Technik und Potentiale zur Senkung der VOC-Emissionen aus Anlagen zur Reinigung von Oberflächen, Öko-RechercheBüro für Umweltforschung und -beratung GmbH, Frankfurt/Main.
- [Sigma, 2010] Unbekannt (2010). Produktinformationen zu Glutaraldehyd, Glyoxal und Formaldehyd, siehe auch www.sigma.com, 02/2010.
- [Sinoc, 2011] Unbekannt (2011). Produktinformationen zu „Full body cover“, Automotive transportation Protections Systems, SINOC Automotive Technology Co., Ltd, Beijing, China, siehe auch <http://www.sinoc-automotive.com>, 02/2011.
- [Skurtys et. al., 2010] Skurtys, O., Acevedo, C., Pedreschi, F., Enrione, J., Osorio, F., Aguilera, J. M. (2010). Food Hydrocolloid Edible Films and Coatings, Nova Science Publishers, Hauppauge NY.
- [Sobral et. al., 2001] Sobral, P.J.A.; Menegalli, F.C.; Hubinger, M.A.; Roques, M.A. (2001). Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films, *Food Hydrocolloids*, 15, 423.
- [Sommer et. al, 2011] Sommer, I., Kunz, P.M., Benra, J., Gokel, F., Ledji-Ngouffo, S., Link, C., Maser, F., Stintzing, T. (2011). Biologisch abbaubare Schutzfolien zum Schutz von unlackierten und lackierten Oberflächen, Aktenzeichen: 26438, DBU - Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück .
- [Sothornvit et. al., 1985] Sothornvit, R.; Olsen CW, McHugh TH, Krochta JM. (2004). Formations conditions, water vapor permeability and solubility of compression-molded whey protein films, *Journal of Food Sciences*, 68 (6),1985-1989.
- [Spiegel, 2008] Unbekannt (2008). Bildmaterial aus SPIEGEL 5/2008.
- [Spies Hecker, 2011] Unbekannt (2011). Bildmaterial Fa. Spies Hecker GmbH, Köln, www.spieshecker.de/portal/de?page=4.1.1.1_Knowledge_Base_Details&category=Fehlstellenkatalog&catid=86111103101108107111116, 02/2011.
- [Stachel et. al., 2010] Stachel, I.; Schwarzenbolz, U.; Henle, T.; Meyer, M. (2010). Cross-Linking of Type I Collagen with Microbial

- Transglutaminase: Identification of Cross-Linking Sites, *Biomacromolecules*, 11, 698.
- [Stoye, Freitag, 1996] Stoye, D., Freitag, W. (1996). *Lackharze, Chemie, Eigenschaften, Anwendung*, Carl Hanser Verlag, München, 1996.
- [Stryer, 1990] Stryer, L. (1990). "Biochemie", 3. Auflage, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 273-286.
- [Tanioka, et.al., 1973] Tanioka, A.; Jojima, E.; Miyahsaka, K.; Ishikawa, K. (1973). Effect of Water on the Mechanical Properties of Collagen Films, *Journal of Polymer Science*, 11, 1502.
- [Tenmark, 2011] Unbekannt (2011), *Bildmaterial: transport protection covers for the automotive industry*, Tenmark, Mölnlycke, Schweden, siehe auch <http://www.tenmark.se/about.html>, 02/2011.
- [Tharanathan et.al., 2003] Tharanathan, R. N.; Srinivasa, P. C.; Ramesh, M. N. (2002). Indian patent 0085/DEL/02.
- [Tint, 1961] Tint, H. (1961). Simple quantitative Test for measuring collagenase activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 92, 154-158.
- [Trezza, Vergano, 1994] Trezza, T.A., Vergano, P.J. (1994). Grease Resistance of Corn Zein Coated Paper, *J. Food Sci.*, 59, 912–915.
- [TU Darmstadt, 2011] Unbekannt (2011). *Tutorium Werkstofftechnik der Kunststoffe, Rheologie: Wichtige Verfahren zur Bestimmung der Fließeigenschaften*, Deutsches Kunststoffinstitut, TU Darmstadt.
- [Ulrich et. al., 2009] Ulrich, J., Pietzsch, M., Froberg, P., Patzsch, K. (2009). W.O. Patent 2009/155895: Method for improving the physical-chemical properties of biodegradable materials.
- [Volkswagen, 2007] unbekannt, (2007). CO₂-Reduzierung im Transportsektor, aus http://www.volkswagenag.com/vwag/nb09bis10/content/de/Ambitionen/Klima_und_Energie/Logistik_optimieren_heisst_die_Umwelt_schonen.html, 02/2011.
- [VW / AUDI 2005-1] Unbekannt (2006). Qualitätsanforderungen Wachskonservierung – wasserverdünnbar mit organischer Entkonservierung QP R008, Volkswagen / AUDI.
- [VW / AUDI 2005-2] Unbekannt (2006). Qualitätsanforderungen Wachskonservierung – lösemittelhaltig mit organischer Entkonservierung QP R001, Volkswagen / AUDI.
- [VW / AUDI 2005-3] Unbekannt (2006). Qualitätsanforderungen Folie selbstklebend QP R015, Volkswagen / AUDI.
- [VW / AUDI 2006] Unbekannt (2006). Qualitätsanforderungen Transportschutzhauben Full Body Cover QP P008, Volkswagen / AUDI.
- [VW, AUDI, 2011] Unbekannt, VW + AUDI Loading Manual, www.carhaulnetwork.net/resources/VW+Audi>Loading+Manual.pdf, 02/2011.
- [VWR, 2009] Unbekannt (2009). Preisinformation aus Laborkatalog VWR.
- [Wang, Padua, 2003] Wang, Y. und Padua, G. W., (2003). Tensile properties of extruded zein sheets and extrusion blown films, *Macromolecular Materials and Engineering* 288, 11 (2003).

- [Warken-Kopatz, 2007] Warken-Kopatz, A. (2007). Dissertation: Einflussfaktoren auf die funktionellen Eigenschaften essbarer Folien bei aquaplastischer Extrusion, Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften, Universität Bonn, Germany, 15-36.
- [Weadock et. al, 1983-84] Weadock, K.; Olson, R.M.; Silver, F. (1983-84). Evaluation of collagen crosslinking Techniques, *Biomater Med Devices Artif Organs*, 1983-84, 11 (4), 293.
- [Weadock et.al., 1995] Weadock, K.S., Miller, E.J., Bellincampi, L.D., Zawadsky, J.P., Dunn, M.D. (1995). *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 1373-1379.
- [Westkämper, Warnecke, 2006] Westkämper, E., Warnecke, H.-J. (2006). Einführung in die Fertigungstechnik, 7. Aufl., Teubner Verlag, Wiesbaden.
- [Wiebe et.al., 1988] Wiebe, D., Megerman, J., L'Italien, G. J., Abbott, W. M. (1988). *Surgery*, 104, 26-33.
- [Wolf et. al., 2006] Wolf, K.L., Sobral, P.J.A. und Telis, V.R.N. (2006). Characterizations of Collagen Fibers for Biodegradable Film Production, 13th World Congress of Food Science & Technology, Food is life, Paris, France.
- [Wortberg, Bussmann, 2007] Wortberg, J., Bussmann, M. (2007). Vielseitige Verpackung, SSC–Essener Unikate 31, Uni Duisburg-Essen, www.uni-due.de/~bys007/ressourcen/pdf_dokumente/31/EU_31_10.pdf, 2007
- [Wu, Schwartzberg, 1992] Wu, P.J., Schwartzberg, H.G. (1992). Popping Behavior and Zein Coating of Popcorn, *Cereal Chem.*, 69, 567–573.
- [www.buefa.de, 2011] www.buefa.de, abgerufen 08/2011.
- [www.chemgapedia.de, 2010] www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/proteine/strukturproteine.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/proteine/funktion_v_prot/struktur/modif_kollagen.vscml.html, abgerufen 02/2010.
- [www.chemgapedia.de, 2012] www.chemgapedia.de/vsengine/popup/vsc/de/glossar/v/ve/vernetzungsgrad.glos.html, 01/2012.
- [www.christiani.de, 2011] www.christiani.de/pdf/75773_probe.pdf, abgerufen 10/2011.
- [www.directindustry.de, 2012] www.directindustry.de/prod/matrasur-composites/glasfaserharz-spritzanlagen-41028-377660.html, Bildmaterial abgerufen 02/2012.
- [www.phd-24.de, 2011] www.phd-24.de/gelcoat.html, abgerufen 08/2011.
- [www.researchfrontiers.uark, 2011] www.researchfrontiers.uark.edu/7630.php: Protein Film Protects Against Food Pathogens, University of Arkansas, abgerufen 11/2011.
- [www.unifr.ch, 2012] www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/bindegewebe/sfa/fasern/d-molekular.php, abgerufen 02/2012.
- [www.zum.de, 2012] www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bs11-7.htm, abgerufen 02/2012.
- [www.zum.de, 2012] <http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/bs11-7.htm>, Bildmaterial abgerufen 02/2012.
- [Yamada, 1995] Yamada, K.; Takahashi, H.; Noguchi, A. (1995). Improved water resistance in edible zein films and composites for biodegradable food packaging, *J. of Food Science Technology*, 30, 599-608.

- [Yusuf et. al., 2004] Yusuf Ali, V., Ghorpade, R., Weber, M., Hanna, Y. (2004). U.S. Patent 6,672,001: Method for mulching an agricultural soil bed using a biodegradable protein material and a mulched agricultural crop growing plot produced thereby.
- [Zeeman, 1998] Zeeman, R. (1970). Dissertation: Cross-linking of collagen-based materials, Universität Twente
- [Zhang, Zeng, 2008] Zhang, L. and Zeng, M. (2008). Proteins as Sources of Materials, Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources, ed. by Belgacem, M. N., Gandini, A., Elsevier Ltd., Oxford, UK, 479-493.

8 Anhang

8.1 Lebenslauf

Dipl.-Ing. (FH) Isabell Sommer

Anebosstraße 1
67240 Bobenheim-Roxheim

Geburtsdatum: 01.07.1972
Geburtsort: Siegen
Geschlecht: weiblich
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Beruflicher Werdegang

01.02.05 - dato Assistentin am Institut für Biologische Verfahrenstechnik an der Hochschule Mannheim

01.02.05 - dato Freiberufliche Nebentätigkeit als Projektingenieurin für diverse Firmen (wie z.B. Naturin, Lamy, BASF; Netzsch, BMW, u.a.)

01.07.04 - 31.01.05 Elternzeit

01.02.00 - 30.06.04 Teammanagerin Microtechnology mit Personalverantwortung bei der febit AG in Mannheim (das Unternehmen hat am 01.07.04 Insolvenz eröffnet), während der Elternzeit ab dem 14.08.02 Managerin „Production&Logistics“ in Teilzeit.

01.12.97 - 31.01.00 Ingenieurin in der Abteilung „Fluidik und Simulation“, Gruppe Biotechnologie am IMM Institut für Mikrotechnik Mainz GmbH

01.07.97 - 30.11.97 arbeitssuchend (private Weiterbildung)

01.10.96 - 30.06.97 Labor-Tätigkeit im Bereich der Umweltanalytik bei der Bio-Data GmbH, Linden. Durchführung von chemischen Analysen von Wasser, Klärschlamm, Boden und Futtermitteln.

Ausbildungsweg und Schule

01.04.09 - Promotion: Entwicklung und Charakterisierung von Schutzfolien aus nachwachsenden Rohstoffen, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg / Hochschule Mannheim

01.03.93 - 23.10.96 Biotechnologie-Studium im Fachbereich Krankenhaus- und Medizintechnik, Umwelt- und Biotechnologie an der FH Gießen-Friedberg, Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologie (Ø 1,1)

20.06.96 - 20.09.96 Diplomarbeit in Kooperation mit der Bio-Data GmbH, Linden und der WTW GmbH, Weilheim: Entwicklung und Prüfung eines neuen Mess-Systems zur Bestimmung der Bodenatmung

1983 - 1992 Wilhelm-von-Oranien Gymnasium, Dillenburg: Abitur: Ø 1,5

1079 – 1983 Mittelpunkt-Grundschule Haiger

8.2 Publikationsliste

1. Platen, H.; **Sommer, I.**, Bestimmung der Atmungsaktivität von Böden, Terra Tech, Vol. 3, S. 23-25, 1997.
2. Platen, H., **Sommer, I.**, Mößner, R., Manometrische Bestimmung der Bodenatmung - Entwicklung eines Messverfahrens unter Verwendung des OxiTop®-Messsystems der Firma WTW. In: Hessen - Hier ist die Zukunft. Präsentation zur Achema 97. Hessisches Ministerium für Wissenschaft und Kunst und Hessische Technologiestiftung (Hrsg.), Wiesbaden, S. 65-66, 1997.
3. Konrad, R., Ehrfeld, W., Hartmann, H.-J., Jacob, P., Pommersheim, R., **Sommer, I.**, Neuman, M., Wolfrum, J., Durchlauf in Rekordzeit, Chip für die Hochdurchsatzanalyse von Biomolekülen, BioTec, Vol. 3, S. 44-46, 1999.
4. Konrad, R., **Sommer, I.**, et.al., Analysenchip für die Anwendungen in den Life Sciences, Innovation, Vol. 11, S.16-17, 1999.
5. Wagler, P., Berg, U., Detemple, P., Ehrfeld, W., Hartmann, H.-J., Konrad, R., Löwack, K., Michel, F., Pommersheim, R., Schwalbe, T., **Sommer, I.**, Weber, L., Zetterer, T., Microdevices for diagnostics, medicine and healthcare, Materials in Medicine (MatMed), 1999.
6. Löwe, H., Konrad, R., Pommersheim, R., **Sommer, I.**, Patent: Vorrichtung zum Transfer und Dosieren von fluiden Proben DE000010013513A1, 2000.
7. Güimil, R., Scheffler, M., Rebscher, H., Funk, J., Wixmerten, A., Baum, M., Hermann, C., Tahedl, H., Moschel, E., Obermeier, F., **Sommer, I.**, Büchner, D., Viehweger, R., Burgmaier, J., Stähler, C.F., Müller, M., Stähler, P.F., Geniom Technology – the benchtop array facility, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22 (5-8), 1721, 2003.
8. Kunz, P.M., Muders, O, Neumann, S., **Sommer, I.**, Easy and low cost disinfection of water in water reservation tanks by electrochemical reactions, Poster-Präsentation, Industrial Water, Dechema, 2005 .
9. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Uhlig, S., Biologischer Korrosionsschutz auf natürlicher Basis aber außerhalb von Fetten und Ölen, Feasibility-Study der Karl-Völker-Stiftung, Mannheim, 2006.
10. **Sommer I.**, Kunz, P.M., Funktionstauglichkeit biologischer Korrosionsschutzmittel, Karl-Völker Stiftung, Machbarkeitsstudie, 2006.
11. Kunz, P.M., Dickbertel, K., **Sommer, I.**, Heißentfettungsanlagen gekoppelt an Membran-Bio-Reaktoren zur Badpflege, Karl-Völker-Stiftungs-Projekt, Membrantage, Gemeinschaftstagung von DVGM und DWA, 2008.
12. Kunz, P.M., **Sommer, I.**; Integrierte Wasser- und Abwasserbehandlung mittels extremophiler Mikroorganismen, 19. Magdeburger Abwassertage, Hach-Lange, 2008.
13. Kunz, P.M., **Sommer, I.**, Einsatz halophiler Mikroorganismen in der Abwasserbehandlung und deren Potentiale, Posterpräsentation, DWA Industrieabwassertage, 2009 .
14. Kunz, P.M., **Sommer, I.**, Behandlung von salzhaltigen Abwässern mittels halophiler Mikroorganismen aus dem Toten Meer, Poster Campus Open, HS Mannheim, 2009.
15. Kunz, P.M., Dickbertel, K., Kugel, M., **Sommer, I.**, Mikroorganismen bei der Oberflächenreinigung, ZVO Oberflächentage, Bremen, 2009.
16. **Sommer, I.**; Kunz, P.M., Benra, J., Maser, F., Projektflyer Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Kollagenfolien zum Schutz von lackierten und unlackierten Oberflächen, 2009.

17. **Sommer, I.**, Manchen kann es nicht salzig genug sein. Einsatz und Potentiale halophiler (extremophiler) Mikroorganismen, orale Präsentation anlässlich eines Besuchs venezuelischer Studenten an der Hochschule Mannheim, 2009.
18. Keßler, K., Kunz, P.M., **Sommer, I.**, Die Fermentation von Sauerkraut in einem Praktikum, BIUZ, Biologie in unserer Zeit, 2 (40), S.122-130, 2010.
19. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Maser, F., Kollagenfolien: hier geht es um die Wurst – und ums Automobil, Präsentation anlässlich des Campus open an der Hochschule Mannheim, 2010.
20. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Kollagenfolien: hier geht es um die Wurst – und noch mehr, Kunststoffmagazin, 5-6, S 42-44, 2010 sowie <http://www.kunststoffmagazin.de/Gruene-Werkstoffe.htm>.
21. Kunz, P.M., Benra, J., Dickbertel, K., **Sommer, I.**, Kugel, M., Biologische Entfettung bei der Oberflächenreinigung, Mikrobieller Abbau von Ölen und Fetten, Industrielle Teilereinigung, JOT Spezial, Journal für Oberflächentechnik, S. 44-46, 2010.
22. **Sommer, I.**, Kollagenfolien: Vielseitig und umweltschonend, CHEManager 13-14, 2010
23. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Link, C., Maser, F., Kollagenfolien: Hier geht es um die Wurst – und vieles mehr, Galvanotechnik 10, 2010, 2408-2414.
24. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Link, C., Maser, F., Hier geht es nicht nur um die Wurst! Über den möglichen Einsatz von neuartigen Kollagenfolien, Horizonte, 36, 2010, 16-19.
25. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Link, C., Maser, F., Hier geht's um die Wurst und um vieles mehr, Plastverarbeiter online, <http://www.plastverarbeiter.de/texte/anzeigen/4531/Kollagenfolien>, 04.08.2010.
26. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Link, C., Maser, F., Verpacken mit Proteinen: Kollagenfolien für die Lebensmittelindustrie, die Die Ernährungs-Industrie, 7/8, 2011, 44-45.
27. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Benra, J., Ledji-Ngouffo, S., Bisher wenig genutzt – Potenzial von Kollagenfolien, Chemie Technik 11/2010.
28. Kunz, P.M., Benra, J., Dickbertel, K., **Sommer, I.**, Inhouse Kläranlage im Metallbetrieb, WWT Wasserwirtschaft Technik, 9, 2011, 25-29.
29. **Sommer, I.**, Kunz, P.M. (2012). Collagen-based packaging films for nonfood applications and their comparison with commercial polyolefin (polypropylene block copolymer) films, Journal of Plastic Film and Sheeting, 28 (1), 30-62.
30. **Sommer, I.**, Kunz, P.M. (2012). Improving the water resistance of biodegradable collagen films, Journal of Applied Polymer Science, 125 (S2), E27-E41.
31. **Sommer, I.**, Kunz, P.M., Gokel, F. (2012). Preparation of Bio-Based Films and Coatings by Spraying of Native, Fibrous and Viscous Collagen Suspensions, Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 6, 1-11.