

Gassam A. Morisseau-Leroy<sup>1</sup>, Rafael Valbuena<sup>1</sup>, Gudrun Scholz<sup>2</sup>, Michael Burkhardt<sup>3</sup> und Günter Westphal<sup>1</sup>

## Vernetzung von Proteinen und Polysacchariden aus nachwachsenden Rohstoffen

### 1. Mitteilung

#### 1. Problemstellung

Organische Polymere natürlicher bzw. synthetischer Herkunft werden in allen Bereichen der Wirtschaft in großtonnartigem Umfang verwendet. Gegenwärtig werden reaktive niedermolekulare organische Moleküle auf der Basis fossiler Rohstoffe gewonnen und die Monomere nachfolgend mit Hilfe verschiedener Verfahren polymerisiert und/oder polykondensiert. Die Bereitstellung solcher Rohstoffe verteuert sich aus den hinreichend bekannten Gründen dramatisch, nicht zuletzt auf Grund der dabei entstehenden Umweltprobleme. Daher wächst die Bedeutung nachwachsender Rohstoffe zusehends, zumal Biopolymere über ihre reaktiven Gruppen gegenüber den synthetischen Polymeren deutliche Vorteile aufweisen. Diese Tendenz korreliert mit der Suche nach neuen und preiswerten, ‚abfallenden‘ Rohstoffen.

Wir zielen mit unserem Beitrag nicht auf eine Konkurrenz zur Nahrungsgüterproduktion, sondern wollen bei der Lebensmittel- und Futtermittelproduktion anfallende Reststoffe nutzen. Unter diesem Aspekt bietet sich auch die Biodieselproduktion als zusätzlich nutzbare Quelle an: Bisher werden viele Reststoffe aus der Primärproduktion zwecks Energiegewinnung entweder durch (direkte) Verbrennung oder (indirekt) über die Biogasfermentation genutzt. Xylane unterschiedlicher Herkunft (Maisspindeln, Haferspelzen, Birkenholz und -rinde) sowie Proteine der (nicht verkehrsfähigen) Milch, Kaseine und massenhaft mit der Biodieselherstellung anfallende Rapsproteine zählen zu den aktuell wenig beachteten Biopolymeren.

Xylane sind in Abhängigkeit von ihrer Herkunft dominierend hydrophil, die Proteine ebenso, allerdings kann deren Entfaltung gezielt hydrophobe Bereiche freilegen. Für chemische Wechselwirkungen beider Rohstoffgruppen stehen auf Grund ihrer nucleophilen Eigenschaften vor allem  $\text{NH}_2$ - der Proteine und OH-Funktionen der Kohlenhydrate zur Verfügung. Die makromolekularen funktionellen Eigenschaften nutzend, haben wir die benannten Proteine und die Xylane mit polaren Doppelbindungssystemen in Form von isolierten, konjugierten und kumulierten Dicarboxylverbindungen umgesetzt. Als Vertreter von Dicarboxylverbindungen mit mehreren C-C-Bindungen zwischen den C=O-Funktionen wählten wir das Glutaraldehyd (GdA) aus. In der vorliegenden Mitteilung berichten wir über Ergebnisse der Vernetzung beider Polymere mit GdA. Mit den ermittelten analytischen Daten, besonders aus der  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, wird die

1 Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte (IASP) an der Humboldt-Universität zu Berlin

2 Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Chemie

3 Beuth Hochschule für Technik Berlin, Fachbereich II - Pharma- und Chemietechnik

gewollte Vernetzung belegt. Danach laufen zunächst Additionsreaktionen, die ihre Fortsetzung in nachfolgenden Kondensationsschritten finden, ab.

In einer späteren Mitteilung werden wir mit dem Blick auf geplante praktische Anwendungen über experimentelle Ergebnisse bei der Ermittlung technofunktionaler Eigenschaften – wie Löslichkeit, Adhäsivität, Bildung und Stabilität von Suspensionen, Gelen, Schäumen, Filmen – und des thermischen bzw. Thermodruck-Verhaltens für biokompatible Verpackungs- und Industrieformen-Materialien zusammenfassend berichten. Dabei kann zugleich der Einfluss des jeweiligen Vernetzungsmittels auf die skizzierten Eigenschaften diskutiert werden. Von den Rohstofflieferanten wurde bereits Interesse signalisiert.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

Xylan wurde nach einem patentierten Verfahren [1, 6] aus Haferspelzen durch die Firma Wolff Cellulosics GmbH & Co. KG und durch das Fraunhofer-Institut für Angewandte Forschung Potsdam-Golm (IAP) isoliert und uns in dieser Form übergeben. Das feine Maisspindelgranulat, bekannt unter dem Handelsnamen EU-Grits GM100, das allgemein als feuchtigkeitsaufsaugendes Streumittel für Straßen oder Werkstätten dient, wurde von der Paderborner Firma Wilderich Freiherr von Haxthausen geliefert.

Die verwendeten Proteine – Kasein, Kaseinhydrolysate und Puratein – sind unterschiedlicher Herkunft. Das Säurekasein wurde bei der Firma Ballyragget CO. Kilkenny, Irland, erworben. Kaseinpepton (AN/TN<sup>4</sup> 30,7 %) und Kaseinhydrolysat (AN/TN<sup>4</sup> 69 %) wurden von der Firma Roth bezogen. Das globuläre Rapsprotein Kruziferin, auch bekannt unter dem Handelsnamen Puratein stellte die Firma Burcon NutraScience Corp., Canada, zur Verfügung. Die Reagenzie Dimethylsulfoxid (99 % p.a.) wurde von Sigma Aldrich bezogen, Glutaraldehyd (50 %) sowie Natriumtetrahydroborat von Fluka.

### 2.2 Methoden zur Struktur-Charakterisierung der Biopolymeren

Die Charakterisierung der Rohstoffe und der vernetzten Biopolymere erfolgte anhand spektroskopischer Methoden (UV, IR, NMR) sowie mittels Elementaranalyse (Stickstoffbestimmung mit der Kjeldahl-Methode).

Die UV-Messungen wurden mit dem UV-Spektrometer Thermofischer Scientific Helios, die IR-Untersuchungen mit einem Perkin Ellmer Spektrum 100 durchgeführt. Die Proben wurden mittels ATR-Technik vermessen. Die NMR-Untersuchungen erfolgten an einem hochauflösenden Festkörper-NMR-Spektrometer der Firma Bruker. Die Aufnahmen der <sup>1</sup>H- <sup>13</sup>C-NMR-Spektren konnten mit der MAS- bzw. CP-MAS-Technik in 4 mm ZrO<sub>2</sub>-Rotoren realisiert werden.

Der Stickstoffgehalt wurde mit der Kjeldahl-Methode bestimmt – die N-Werte lassen Rückschlüsse auf den prozentualen Anteil von ‚gebundenen‘ Proteinen in den vernetzten Produkten zu, gestützt durch die Ermittlung des Wassergehaltes mittels Karl-Fischer- Titration.

### 2.3 Verfahren zur Vernetzungsreaktion von Polysacchariden mit Proteinen

Für die Vernetzung von Xylan und Kasein mittels Glutaraldehyd wurden drei Verfahren entwickelt:

#### Präparation A:

0,5 g Xylan wurden in 20 ml Natriumacetat-Puffer suspendiert. Nach 5 min. Rührzeit wurden 5 ml Ethanol hinzugegeben. Nach 30 min. Rührzeiten wurden 0,5 g Protein hinzugefügt und die gesamte Mischung so lange gerührt, bis sich eine homogene Suspension ausbildete. Nach Zugabe von 10 ml Glutaraldehyd zeichnete sich ein leichter bis starker Temperaturanstieg und eine Farbänderung der Mischung ab, je nachdem, welches Protein in der Mischung vorhanden war. Nach 2 Std. Reaktionszeit wurde die flüssige Phase von der festen Phase des Reaktionsgemisches durch Zentrifugation abgetrennt. Beide Phasen wurden tiefgefroren und anschließend im Gefriertrockner getrocknet. Ferner wurde zu Vergleichszwecken 1 g Xylan unter denselben Bedingungen mit Glutaraldehyd zur Reaktion gebracht, genauso ließ sich 1 g Casein mit GdA zur Reaktion bringen. Die so entstandenen Produkte wurden für die weitere Analyse vorbereitet.

#### Präparation B: Aminierung des Xylans

Um seine Reaktivität gegenüber GdA zu erhöhen, wurde Xylan nach der Methode von Likhoshertov [2, 5] aminiert. Hinweise für die gelungene Aminierung lieferten UV- und IR-Messungen. 1 g des aminierten Xylans und 1 g Kasein, suspendiert in Natriumacetat-Puffer, wurden in einem 1-Schritt-Prozess mit GdA zur Reaktion gebracht (Reaktionsbedingungen: Raumtemperatur, pH 4,5). Nach etwa 2 Std. Rührzeit wurde das Gemisch eingefroren und anschließend lyophilisiert.

#### Präparation C: Vernetzung in Kasein-Boraxlösung

10 g Xylan wurden zunächst in 10 ml Wasser aufgequollen. Dazu fügte man dieselbe Menge an Glutaraldehyd. Parallel dazu wurde eine Kasein-Borax-Lösung (pH 7,8) hergestellt: in 100 ml warmes H<sub>2</sub>O wurden 10 g Kasein aufgelöst und bei 50 °C (120 min.) erwärmt. Zu dieser Lösung wurden 1,42 g Borax gegeben und danach 7 min. auf 80 °C erwärmt. Nach Abkühlen der trüben Lösung wurde das Gemisch Xylan-Glutaraldehyd hinzugefügt und bei Raumtemperatur kräftig gerührt. Nach 2,5 Std. wurde das Präparat eingefroren und anschließend lyophilisiert.

#### D: Aufarbeitung der Proben

Die Farbänderung des Reaktionsgemisches (von weiß über gelb zu rot) lässt auf mögliche Azomethin-Bildungen in den Proben schließen. Diese Farbänderung ist weniger ausgeprägt in den mit Rapsprotein vernetzten Proben.

Um GdA-Reste zu entfernen, wurden die bereits gefriergetrockneten Proben 2mal mit H<sub>2</sub>O und dann mit einer Mischung aus H<sub>2</sub>O:EtOH (50:50) gewaschen. Die Proben wurden anschließend an der Luft getrocknet. Vor jeder IR-Messung wurde 30 min. bei etwa 50 °C vakuumgetrocknet.

#### Präparation E: Verfahren zur Vernetzungsreaktion mit Maisspindeln als Polysaccharid-Matrix

In Abbildung 1 ist ein Verfahrensflißschema zur Vernetzung von Maisspindeln (Mss) und Proteinen (Kasein oder Rapsprotein) bei einem Masseverhältnis Kasein:Mss:GdA (1:1:2) mittels GdA dargestellt:

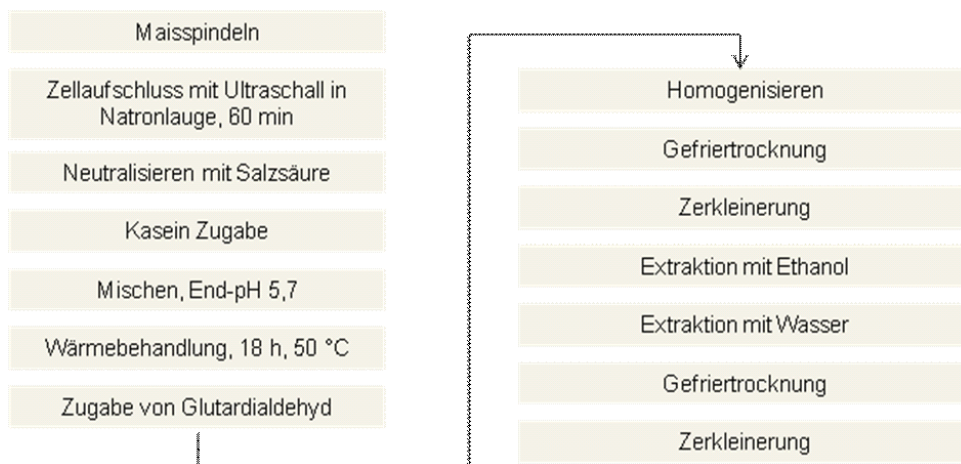


Abb. 1: Verfahren zur Vernetzung von Maisspindeln und Kasein mit Glutaraldehyd

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Präparationen

Frühere Erfahrungen haben gezeigt, dass es vorteilhaft ist, Xylan mit dem Glutaraldehyd in einem *ersten Schritt* zu vernetzen und in einem *zweiten Schritt* das Protein (Milchprotein oder Rapsprotein) unter milden Bedingungen (pH 8-7) hinzuzufügen; die gewählte Reihenfolge berücksichtigt die unterschiedliche Nucleophilie der OH- und NH<sub>2</sub>-Funktionen.

Im ersten Schritt findet eine Addition der Xylose-OH-Gruppe(n) im Xylanmolekül – vornehmlich in 2-Position des Pyranoserings, an das Carbonyl-C-Atom des Glutaraldehyds – statt. Die Addition führt zur Bildung von Halbacetal-Funktionen. Im zweiten Additionsschritt greifen die Amino-Reste des Proteins nucleophil die zweite Carbonylgruppe des GdA unter Bildung einer Halbaminalfunktion an. In Zuge nachfolgender Kondensationsschritten entstehen stabilere Produkte mit Enol- bzw. Azomethinfunktionen. Die diskutierten Reaktionsschritte sind in Abbildung 2 dargestellt. Konkurrierende Produkte können das Resultat von Vernetzungen Xylan-Xylan bzw. Protein-Protein sein.

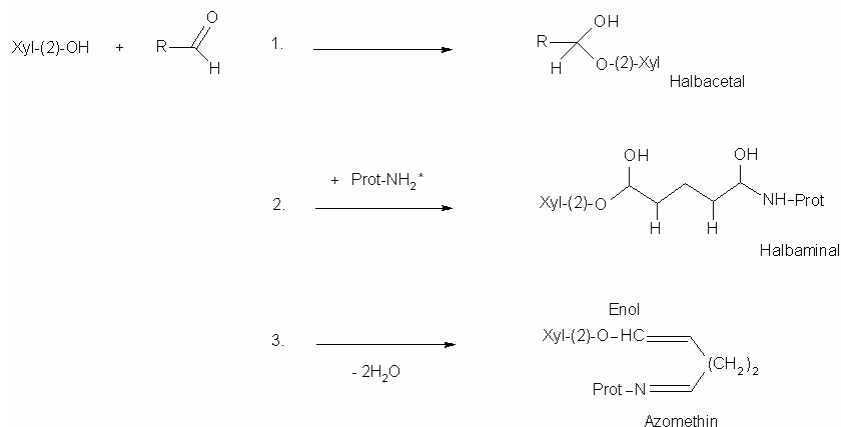


Abb. 2: Reaktionsmechanismus zur Umsetzung mit Glutaraldehyd

### 3.2 Spektroskopische Befunde

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen belegen die gelungene Vernetzung der ausgewählten Polysaccharide mit Proteinen mittels GdA. Abbildung 3 zeigt die Signale und deren Zuordnung des vernetzten Produktes. Zum Vergleich sind Signale der bloßen Mischungen beider Makromoleküle dargestellt.

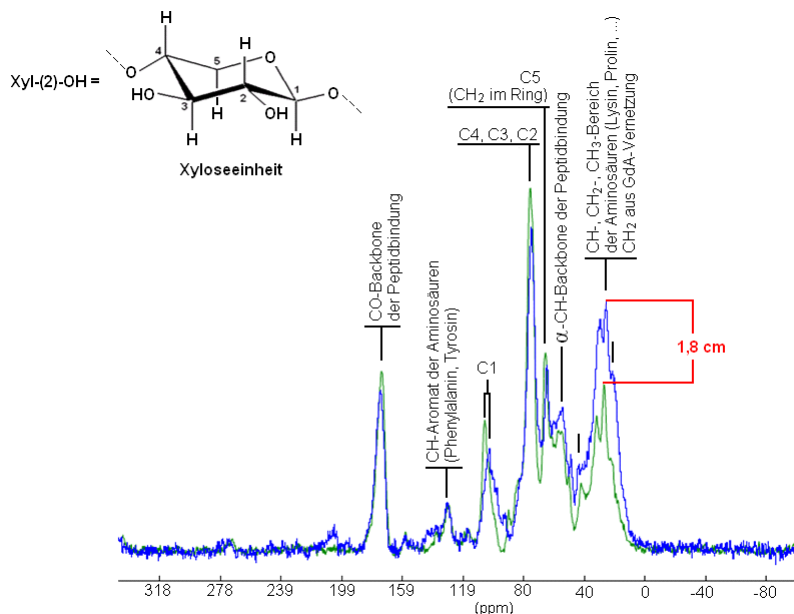


Abb. 3:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen. Blau: Kasein und Xylan mit GdA vernetzt. Grün: physikalische Mischungen aus Kasein und Xylan (1:1, m/m)

Die in Tabelle 1 verwendete Zuordnung der einzelnen Signallagen der Rohstoffe und des Produkts orientiert sich an  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen von Kasein [3] und Xylan [1].

Probe	Chemische Verschiebung in ppm						
	CO- der Peptidbindung	CH- an Aromat der AA <sup>5</sup>	C1	C4,C3, C2	C5 (CH <sub>2</sub> im Ring)	$\alpha$ -CH der Peptidbindung	CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> -Bereich
Kasein	173	128				54	40, 30, 25
Xylan			104	89-74	65		
Produkt (Kasein +Xy-lan+GdA)	173	128	101	74	64	55	40-25

Tab. 1: Chemische Verschiebung der Rohstoffe und der vernetzten Probe anhand  $^{13}\text{C}$ -CP/MAS-Spektren

5 AA: Aminosäuren

In Abbildung 3 ist deutlich zu erkennen, daß die signifikanten C-Atome in beiden Proben – bloße Mischungen der Edukte und deren Vernetzung durch GdA – durch differente chemische Verschiebungen zu charakterisieren sind. Die Signalintensitäten im Bereich 0-40 ppm ist bei der unvernetzten Probe deutlich geringer als bei der vernetzten Probe (Kasein+Xylan+GdA). Der Einfluß des Vernetzungsmittels Gda mit seinen Methylengruppen kommt bei den vernetzten Proben ganz deutlich zum Tragen. In Abbildung 4 ist den Vergleich der IR-Spektren der Edukt-Mischungen und der miteinander vernetzten Polysaccharide und Proteine dargestellt.

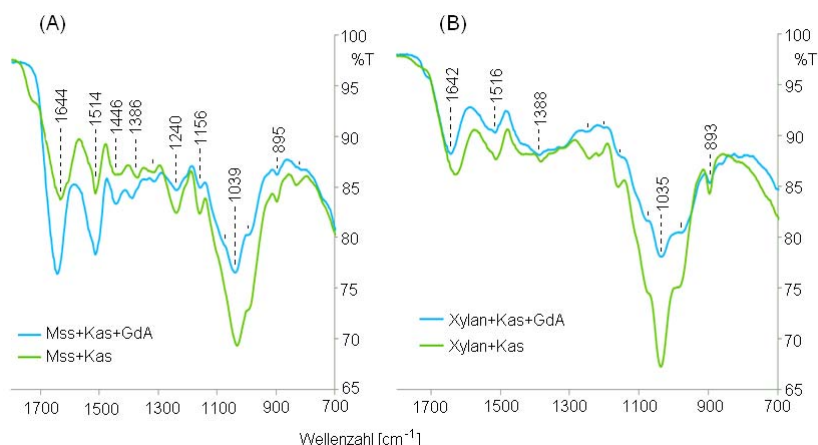


Abb. 4: Vergleich der IR-Spektren der vernetzten Proben mit physikalisch gemischten Rohstoffen. (A): Maisspindeln (Mss) und Kasein (Kas); (B): Xylan aus Haferspелzen und Kasein (Kas)

Die ermittelten Schwingungsspektren unterstützten die aus den NMR-Spektren abgeleiteten Schlußfolgerungen. Von den charakteristischen Banden der Rohstoffe (Xylan bzw. Maisspindeln und Proteine) werden hervorgehoben: die Transmissionskoeffizienten bei  $1645\text{ cm}^{-1}$  und  $1520\text{ cm}^{-1}$  (Peptidbindungen), bei  $1643\text{ cm}^{-1}$  (C=C-Doppelbindungen, Enolstrukturelement), bei  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Azomethinstruktur). Die Glutaraldehydgruppe zeigt eine typische Transmission bei  $1720\text{ cm}^{-1}$ , die in den vernetzten Produkten nicht mehr auftritt.

Xylan und die komplexen Maisspindel-Polysaccharide zeigen typische Absorptionsbanden bei  $1035\text{-}1037\text{ cm}^{-1}$  (für Ring-O-Atom der Xyloseeinheiten) und bei  $893\text{-}895\text{ cm}^{-1}$  (für CH-Bindungen des Ringes) [4]. Die IR-Spektren belegen, dass die Xylose-Ringstrukturen in den Produkten erhalten bleiben.

Probe (0,01 g für 10 ml LM)	Lösungsmittel (LM)	
	DMSO/H <sub>2</sub> O (8:2,v/v)	Phosphatpuffer pH 11 nach Sörensen
Xylan	löslich	unlöslich
Kasein	unlöslich	löslich
Produkt (gemäß Präparation C)	teilweise löslich	unlöslich

Tab. 2: Löslichkeitsverhalten – Vergleich der vernetzten Probe mit den Rohstoffen

Weitere Hinweise auf eine mögliche Vernetzung der Biopolymere durch GdA ergeben Werte über den Proteingehalt im vernetzten Produkt (55 % Protein in 100 g trockener Probe) sowie Untersuchungen zum Löslichkeitsverhalten der Proben. Die vernetzten Polymere sind in herkömmlichen Lösungsmitteln wie DMSO/H<sub>2</sub>O oder Phosphat-Puffer pH 11 unlöslich oder nur teilweise löslich (Tabelle 2).

### Danksagung

Besonderer Dank ergeht an folgende Kooperationspartner: Dr. Joachim Leistner (Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-naturwissenschaftliche-Fakultät II, Berlin-Adlershof) für die durchgeführten Untersuchungen, Dr. Gerd Fabian (Beuth Hochschule für Technik Berlin), Christine Fitzner (Humboldt-Universität zu Berlin, IASP), Dr. Waltraud Kessler (Reutlingen Hochschule) für die Einführung in die Multivariate Datenanalyse, Firma Burcon NutraScience für die Bereitstellung der Rapsproteine sowie die Firma Wolff Cellulosics GmbH & Co. KG und das Fraunhofer-IAP (Potsdam-Golm) für die Bereitstellung von isolierten Xylanen aus Haferspелzen.

### Literatur

- [1] Hettrich, Kay; St. Fischer; N. Schröder; J. Engelhardt; U. Drechsler; F. Loth: *Macromol. Symp.* 2006, 232, 37-48
- [2] Hermanson, Greg T.: *Bioconjugate Techniques*, 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier (2008)
- [3] Kakalis, Lazaros T.; Th. F. Kumosinski; H. M. Farell Jr.: *Biophysical Chemistry*, 38 (1990) 87-98
- [4] Ebringerova, Anna; Th. Heinze: *Macromol. Rapid Commun.* 21, 542-556 (2000)
- [5] Likhoshesterov, L. M.; O. S. Novika; V. A. Derevitskaja; N. K. Kochetkov: *Carbohydr. Res.* 146 (1986) C1-C5
- [6] Wolff Cellulosics GmbH & Co. KG und Peter Kölln KG aA: Verfahren zur Gewinnung von Hemicellulosen aus lignocellulosischem Material; DE 102004060283A1 vom 29.06.2006

[22.04.10]

Anschrift der ersten Autorin:

Dipl.-Chem.Ing. Gassam A. Morisseau-Leroy  
Institut für Agrar- und Stadtökologische Projekte (IASP)  
an der Humboldt-Universität zu Berlin  
Philippstr. 13, Haus 16  
D – 10115 Berlin  
[asefie.morisseau-leroy@agrар.hu-berlin.de](mailto:asefie.morisseau-leroy@agrار.hu-berlin.de)