

Schlussbericht zum Vorhaben

Zum Vorhaben

Thema:

Multifunktionale, sprühfähige und biologisch abbaubare Folien auf Basis nachwachsender Rohstoffe im landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau

Zuwendungsempfänger und ausführende Stelle:

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Zentrum für Umweltwissenschaften UZU

Förderkennzeichen:

22010307 (07NR103)

Projektleiter: **Prof. Dr. Marcus Glomb**

Laufzeit:

15.10.2008 bis 31.3.2012

Datum der Veröffentlichung:

Halle, März 2012

Gefördert durch:



Bundesministerium für
Ernährung, Landwirtschaft
und Verbraucherschutz

aufgrund eines Beschlusses
des Deutschen Bundestages

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV) über die Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (FNR) als Projektträger des BMELV für das Förderprogramm Nachwachsende Rohstoffe unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Schlussbericht zum Forschungsvorhaben

Multifunktionale, sprühfähige und biologisch abbaubare Folien auf Basis nachwachsender Rohstoffe im landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau, FKZ 22010307 (07NR103)

Projektgruppen:

Institut für Chemie, Professur für Lebensmittelchemie (MLU-C)

Prof. Dr. Marcus Glomb
Robert Spanneberg

Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Professur für Kunststofftechnik (MLU-IW)

Prof. Dr. Hans-Joachim Radusch
Dr. Werner Anton
Dr. Igor Kolesov

Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften (MLU-IAEW)

Prof. Dr. Reinhold Jahn
Dr. Sabine Tischer
Alexandra Boritzki

Gliederung

0.	Vorbemerkungen	1
I. Ziele		
I.1.	Aufgabenstellung sowie wissenschaftliche und technische Arbeitsziele	1
I.2.	Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens	3
I.3.	Planung und Ablauf des Vorhabens	4
I.4.	Stand der Technik	5
I.5.	Zusammenarbeit mit anderen Stellen und Kooperationspartnern	6
II. Ergebnisse		
II.1	Wissenschaftlich-technische Ergebnisse	7
II.1.1.	Rezeptentwicklung gelatinebasierter Sprühfolien - chemisch-physikalische Grundlagen (Projektgruppe Lebensmittelchemie)	7
II.1.2.	Charakterisierung der Filmbildungsprozesse und der resultierenden Folieneigenschaften im Labormaßstab (Projektgruppe Ingenieurwissenschaften)	16
II.1.3.	Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen den entwickelten Folien und dem Boden (Projektgruppe Agrar- und Ernährungswissenschaften) Anhang der Projektgruppe Zentrum für Ingenieurwissenschaften: Anhang MLU-ZIW.pdf Anhang der Projektgruppe Institut für Agrar- und Ernährungswissen- schaften, Anhang MLU-IAEW.pdf	23
II.1.4.	Wissenschaftlich-technische Nebenergebnisse	31
II.2.	Verwertung der Ergebnisse	32
II.3.	Erkenntnisse von Dritten	33
II.4.	Veröffentlichungen	34
	Anlage MLU-Poster	

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen		Seite
1	Löslichkeit chem.-mod. Gelatinefolien	10
2	E-Modul chem.-mod. Gelatinefolien	10
3	Bildungsmechanismus wichtiger Lysin- und Argininmodifikationen	10
4	Gelierzzeit chem.-mod. FFS	12
5	Geleigenschaften chem.-mod. FFS	12
6	Wasserdampfpermeabilität chem.-mod. Folien	13
7	Sauerstoffpermeabilität chem.-mod. Folien	13
8	Vorversuch acht Tage nach dem Aufbringen der FFS	14
9	Vergleich der Viskosität von Gelatinesuspensionen im Bereich 32-39 °C	17
10	Viskositätsveränderung einer Gelatinesuspension während der Lagerzeit	18
11	Labormischer	19
12	Beispiele für die Phasenbildung in vernetzten Gelatinesuspensionen	20
13	Graswuchs nach 4 Wochen ohne Abdeckung	21
14	Graswuchs nach 4 Wochen Abdeckung der Gelatinesuspension mit Zell-Leim als Bindemittel	21
15	Wasserdampfpermeabilität verschiedener Gelatinefolien	22
16	Eindringung der Varianten HEC+Gly40, Gel C Mod 6_10-4-22ZIW2, Gel+HCl und Gel+HCl+Gly im Vergleich zur Kontrolle ohne Folie in den RefeSol	24
17	Mikrobielle Biomasse (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen	26
18	Mikrobielle Biomasse (n=4) der Bodenproben vor Versuchsbeginn und zum Versuch (n=4) in zwei Tiefenstufen	29
19	Beispiel für vernetzten Schaum als Abdeckung im Labormaßstab	31
Tabellen		
1	Aminosäurezusammensetzung von Gelatine und Collagen [Reste pro 1000 Aminosäuren] (1)	8
2	Bestimmung und Bedeutung der untersuchten Folienparameter	9
3	Wichtige Rezepturen für weitere anwendungsbezogene Untersuchungen	13
4	Kennwerte ausgewählter Gelatinefolien	19
5	Mechanische Kennwerte von Gelatinefolien ohne und mit Zell-Leim als Bindemittel	20

0. Vorbemerkungen

Das Projekt wurde vom Oktober 2008 bis März 2012 als Verbundprojekt wissenschaftlicher Einrichtungen mit der Biofol Film GmbH Unseburg als Projektkoordinator realisiert.

Antragsteller

Teilvorhaben	Name der Organisation	Abkürzung
1	Fachhochschule Osnabrück <ul style="list-style-type: none">• Fakultät: Ing. Wissenschaften und Informatik• Fakultät: Agrarwissenschaften und Landschaftsarchitektur	OS-I&I OS-A&L
	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg , Universitätszentrum für Umweltwissenschaften <ul style="list-style-type: none">• Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften• Institut für Chemie, Lebensmittelchemie und Umweltchemie• Zentrum für Ingenieurwissenschaften	MLU-UZU MLU-AE MLU-C MLU-IW
3	Deutsches Institut für Lebensmitteltechnik e.V. <ul style="list-style-type: none">• Arbeitsgruppe Prof. Figura	DIL
4	Thüringisches Institut für Textil- und Kunststoff-Forschung Abteilung Native Polymere und chemische Forschung	TITK

Der vorliegende Endbericht wurde gemeinsam erarbeitet und abgestimmt. Die Sachberichte der wissenschaftlichen Einrichtungen konzentrieren sich auf die wissenschaftliche Darstellung der arbeitsteilig bearbeiteten Lösungswege für die jeweils abgestimmten Basisrezepturen der entwickelten Suspensionen und beinhalten die Ergebnisse aus den dafür durch die Verbundpartner durchgeführten Untersuchungen.

I. Ziele

I.1. Aufgabenstellung sowie wissenschaftlich und technische Arbeitsziele

Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens war die Entwicklung und Erprobung von multifunktionalen, sprühfähigen und biologisch abbaubaren Folien für den landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenanbau auf Basis einheimischer, nachwachsender Rohstoffe. An die zu entwickelnden Folien werden folgende Anforderungen gestellt:

1. Die Folien sollen zum Mulchen beim Anbau von Gemüse im Freiland und im Gewächshaus geeignet sein.
2. Durch die Folie soll Bodenerosion verhindert werden.
3. Die Folie soll zur Förderung des Pflanzenwachstums und zur Erhöhung der Ernteerträge beitragen.
4. Die Folie soll dazu beitragen, den Einsatz von Herbiziden und Bioziden zu reduzieren.
5. Die Verweilzeiten der Folien sollen den jeweiligen Standortanforderungen angepasst werden können und durchschnittlich 60-180 Tage betragen.
6. Die Folie ist vollständig biologisch abbaubar. Mehrjährige Anwendung darf die Mikrobiologie des Bodens nicht negativ verändern.
7. Die für die Herstellung der Folien eingesetzten Rohstoffe müssen in Wasser löslich oder dispergierbar und vollständig biologisch abbaubar sein sowie der Bundesbodenschutzverordnung (BBodSchV, 1999) und den Bodenschutzverordnungen der Länder genügen.

Mit der Projektrealisierung wurden die Anforderungen an die Sprühfähigkeit, die Eigenschaften und Wirkung im Boden präzisiert sowie quantifiziert.

Die spritztechnische Anforderungen sind definiert durch eine maximale Viskosität von 200 mPas. Das Sprühen erfolgt mit einem Druck von 2–5bar und soll bei einer Temperatur von 5°C–20°C möglich sein sowie in einem Arbeitsgang erfolgen. Die Suspension soll homogen sein, so dass keine Ausfällung von Rezepturbestandteilen erfolgt. Die Aushärtung der Suspension, also die Bildung der Folie, sollte, je nach Witterungsbedingungen, nach 2-3 Tagen abgeschlossen sein.

Die mechanische Festigkeit der Folie muss eine Widerstandsfähigkeit gegen Regen und Hagel sowie durch die Druckbelastung von Tieren aufweisen. Orientierungswerte für die Belastung durch Regen sind eine Festigkeit von 1,4kJ/m², durch Hagel 34kJ/m² und durch Tiere 50kN/m². Die Funktionen der Folie sind für eine Haltbarkeit von 12–20 Wochen im Temperaturbereich von 5°C–50°C zu gewährleisten. Die Unkrautunterdrückung soll im Bereich von PAR: 400-700nm erfolgen. Die Folienstärke wird durch die erreichbaren Eigenschaften und die Kosten bestimmt. Die Folienstärke kann zwischen 12µm –200 µm betragen. Über die Unkrautunterdrückung hinaus muss der Wasser- und Gashaushalt (Sauerstoff, Kohlendioxid) gewährleistet sein.

Der biologische Abbau der Folien ist definiert auf die Nutzungsdauer für die Gemüsearten und verschiedene Böden einzustellen. Durch die Abbauprozesse ist eine Versauerung des Bodens zu vermeiden. Ein pH-Wert von 4 –8 ist zu gewährleisten. Weiterhin darf keine toxische Wirkung auf Bodenorganismen eintreten.

Ausgehend von den bisher bei den Projektpartnern durchgeführten Arbeiten zur Nutzung nachwachsender Rohstoffe, wurden im vorliegenden Projekt folgende Rohstoffe für die Entwicklung der sprühfähigen Folien genutzt:

1. Bioglyceride in Kombination mit Wasserglas
2. Stärke und modifizierte Stärke
3. Cellulosederivate, Stärkederivate
4. Proteine (Gelatine und Getreidemehle).

I.2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens

Mit den Untersuchungen wurden der Vernetzungsmechanismus der Gelatine und Einflussfaktoren sowie die Wirkung auf Funktionseigenschaften einer durch Sprühen hergestellten Folie vertiefend aufgeklärt. Nachgewiesen wurde ebenfalls, dass eine auf modifizierter Gelatine basierende Bodenabdeckung mit ihrem Abbau den Nährstoffgehalt des Bodens, insbesondere durch den Eintrag von Stickstoff, erhöht, aber zu einer umweltunbedenklichen Veränderung der bodenmikrobiologischen Aktivitäten führt und ein rückstandsfreier Abbau erfolgt und damit keine Belastung im Sinne des Bodenschutzgesetzes (BBodSchG) eintritt. Die Ergebnisse zu den Möglichkeiten der Gelatinevernetzung (Vernetzung bei Temperaturen bis 60 °C, Vernetzung bei Raumtemperaturen), den erreichbaren mechanischen Kennwerten (Zugwerte, Durchstoßfestigkeit) und weiteren Funktionseigenschaften, insbesondere die Aufnahme von Feuchte, Permeabilität von Wasserdampf, Sauerstoff und Kohlendioxid, zum Abbauverhalten und den mikrobiologischen Aktivitäten sind nicht nur eine Grundlage für die Bewertung der Eignung für den im Projekt angestrebten Einsatzzweck, sondern auch für die Präzisierung anderer Anwendungsmöglichkeiten bzw. der Möglichkeiten und Grenzen von auf Gelatine basierender, sprühfähiger Folien.

Durch die Einstellung der Viskosität einer vernetzten, sprühfähigen Gelatinesuspension, die biologisch abbaubar ist, ergeben sich aus den Untersuchungen auch wissenschaftlich-technische Ergebnisse für Anwendungen als Gelatineschicht, durch die z.B. die hohe Sperrwirkung von Sauerstoff bzw. Kohlendioxid ausgenutzt wird. Zusätzlich ist darauf zu verweisen, dass eine effiziente, umweltverträgliche Gelatinemodifizierung erarbeitet wurde, die gegenüber der ursprünglichen umweltbedenklichen Vernetzung und Nutzung für die Einbindung von Funktionsmaterialien auf Zelluloseacetaten (Filmen) weitere industrielle Anwendungen ermöglicht.

I.3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Kooperationspartner verfügten mit Projektbeginn über umfangreiche wissenschaftliche Ergebnisse sowie die technische Ausstattung für die Analyse und Modifizierung (Vernetzung) der Naturstoffe. Bei der Versuchsplanung wurde die bisherige Konzentration auf Stoffgruppen berücksichtigt. Die Biofilm GmbH stellte Kenntnisse aus der praktischen Anwendung der Suspensionen mit Bioglyceriden und Wasserglas zur Verfügung, die als Erosionsfolie Anwendung finden. Das betrifft auch die Präzisierung und Quantifizierung der Anforderungen an die Folie sowie der technisch-technologischen Bedingungen durch die angestrebte Nutzung herkömmlicher Sprühtechnik.

Die zwischen den wissenschaftlichen Einrichtungen abgestimmten Entwicklungswege, die innerhalb dieser interdisziplinär erfolgten, konzentrierten sich auf die Rezeptur und die Herstellungs- bzw. Verarbeitungsverfahren für die Modifizierung und Ausbringung der Suspensionen. Die chemische Vernetzung der Proteine (Gelatine) bzw. proteinreicher Stoffe (Getreidemehle) wurde an der Martin-Luther-Universität untersucht. Die Untersuchungen zur Vernetzung und Filmbildung von Polysacchariden erfolgten an der FH Osnabrück. Der Arbeitsschwerpunkt des TITK lag auf dem Gebiet der chemischen Modifizierung (Derivatisierung) von Cellulose. Auf den gemeinsamen Projektberatungen (halbjährlich) und durch die fachlichen Abstimmungen zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen der Einrichtungen erfolgte die Auswertung und Diskussion der Erkenntnisse zu den Vernetzungsmechanismen, zur Gel- und Filmbildung, den erreichbaren Funktionen und der Gewährleistung der Sprühfähigkeit.

Um die im Labor erarbeiteten Lösungen für die Vernetzung der Suspensionen auf die Ausbringungstechnik übertragen zu können, wurden die vorgesehenen Untersuchungen realisiert:

- mögliche industrielle Mischtechniken in Abhängigkeit von der Viskosität der Suspension (Einsatzrichtlinien und -grenzen)
- mögliche industrielle Mischtechnik in Abhängigkeit von der Einbringung von Zusatzstoffen (z.B. Zellulose und modifizierte Getreidemehle)
- Untersuchung von Nutzungszeiten der hergestellten Suspension (Verweilzeitproblematik)
- Untersuchung zur optimalen Lagermöglichkeit der Suspension

Ein weiterer Schwerpunkt war die industrielle Ausbringungsmöglichkeit der Suspension. Hierbei richteten sich die Untersuchungen auf die Schwerpunkte:

- Nutzungsmöglichkeit von bereits praktizierten Ausbringungstechniken im Gemüsegroßanbau und Gartenbau
- mögliche notwendige technische Veränderungen der Ausbringungstechnik
- Einfluss der Verweilzeitproblematik bei der Ausbringungstechnik
- Möglichkeiten der Steuerung des Aushärteprozesses vor und während der Ausbringung

Die Prüfung der Gebrauchseigenschaften der Folien und der anwendungstechnischen Eigenschaften erfolgten durch die Arbeitsgruppen der Projektpartner selbst (mechanische Kennwerte) sowie, wie im Projektantrag vorgesehen, für die entwickelten Suspensionen.

Die Permeabilitätsmessungen an den Folien (Wasserdampf, Sauerstoff, Kohlendioxid) erfolgte durch das Deutsche Institut für Lebensmitteltechnik e.V. Die bodenanalytischen und ökologischen Untersuchungen konzentrierten sich auf:

- die Veränderung des Nährstoffgehaltes, insbesondere von Stickstoff (N_t , N_{min}), Kalium, Phosphor (DL-löslich) sowie in der Gleichgewichtsbodenlösung (Kalium, Magnesium und Phosphor)
- Untersuchungen an gestörten Bodenproben: Wirkung auf den C_{org} -Gehalt und bodenmikrobiologische Aktivitäten (mikrobielle Biomasse) im Boden, Bestimmungen zur mikrobiellen Diversität mit Hilfe von Biomarkern (PLFA, metabolischer Fingerprint), sowie
- Analyse der Folienbildung und Unterdrückung des Unkrauwachstums.

Diese erfolgten abgestimmt an der Hochschule Osnabrück und der Martin-Luther-Universität. Die Feldversuche im Gewächshaus und im Freiland wurden planmäßig an der Hochschule Osnabrück mit den vorgesehenen analytischen Untersuchungen realisiert.

I.4. Stand der Technik

Die Projektidee basiert auf den vorhergehenden Forschungs- und Entwicklungsarbeiten zu den Vernetzungsmöglichkeiten von Naturstoffen in einer Suspension und den erreichbaren Folienqualitäten, die den Unkrautbewuchs im landwirtschaftlichen und gärtnerischen

Kulturpflanzenbau reduzieren bzw. sogar vermeiden. Die grundsätzlichen Vernetzungsmechanismen und erreichbare Funktionseigenschaften (mechanische Festigkeiten, Permeabilität von Gasen) waren im Labormaßstab aufgeklärt bzw. ermittelt. Die Reduzierung der Wasserlöslichkeit und damit die Einstellung des biologischen Abbaus nach der differenzierten Nutzungsphase für die Gemüsearten und Böden erschienen möglich. Mit der Zielstellung, herkömmliche Sprühtechnik für die Ausbringung der Suspension zu nutzen, waren die dafür technischen-technologischen Bedingungen (minimale und maximale Viskosität, Druck, Durchmesser und Länge der Leitungswege) definiert. Für die Funktionsfähigkeit der Flüssigfolie war es jedoch notwendig Lösungen für:

- die Vernetzung der Naturstoffe in industriellen Herstellungs- bzw. Modifizierungsverfahren zu erarbeiten,
- die Folienfunktionen zu präzisieren und möglichst zu quantifizieren, sowie
- die Herausbildung von Folienqualitäten auf dem Boden durch eine geringst mögliche Eindringtiefe der Suspension in den Boden sowie für eine hohe Abdeckwirkung bei unebener Bodenfläche mit kurzen Aushärtezeiten bei unterschiedlichen Witterungsbedingungen zu gewährleisten.

Die Sicherung der Multifunktionalität der Folien und der Restriktionen für die Ausbringung der Suspensionen erfolgte durch die vorgesehenen Lösungsansätze, beinhaltete aber auch ein hohes Risiko der Forschungs- und Entwicklungsarbeiten, da einheimische Naturstoffe als Ausgangsmaterialien eingesetzt wurden. Die wissenschaftlich-technischen Arbeiten wurden planmäßig realisiert. Eine Präzisierung der Kriterien und Parameter für die Vernetzung und Ausbringung der Suspension war jedoch notwendig.

I.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen und Kooperationspartnern

Bereits bei der Erarbeitung des Projektantrages wurde die Zusammenarbeit mit externen Kooperationspartnern zur Nutzung vorliegender Kenntnisse und Erfahrungen organisiert. Dazu gehört die Zusammenarbeit mit der Gesellschaft für Kunststoffe im Landbau e.V. (GKL) und mit der Landesanstalt für Landwirtschaft, Gartenbau und Forstwirtschaft Sachsen-Anhalt. Im Projekt war die Zusammenarbeit mit der Wolfen Polymer GmbH auf dem Industriepark Bitterfeld-Wolfen vorgesehen, die in Lösung vernetzte Stärke entwickelte. Zusätzlich wurde, basierend auf dem intensiven Kontakt mit der Gelita AG, die Gelatine und weitere fachtechnische Beratung kostenfrei bereit gestellt, die Kooperation mit dem Institut für

Energie und Umwelttechnik (IUTA e.V.) aufgebaut. Im Institut wurde ein Verfahren für die Schäumung einer Gelatinesuspension entwickelt. Die Erzeugung eines Schaumes bei der Ausbringung vernetzter Suspensionen war ein Erfolg versprechender Weg, ist jedoch mit der herkömmlichen Sprühtechnik und bei natürlichen Witterungsbedingungen nicht unmittelbar umsetzbar. Sie kann jedoch in Gewächshäusern Anwendung finden, in denen das Sprühen von Gelatinesuspensionen oberhalb der Geliertemperatur und mit Kleinsttechnik technisch-technologisch und wirtschaftlich beherrschbarer ist.

II.1. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis

II.1.1. Rezepturentwicklung gelatinebasierter Sprühfolien

- chemisch-physikalische Grundlagen (Projektgruppe Lebensmittelchemie)

Gelatine wurde als Kleber bereits vor 8000 Jahren von den Höhlenbewohnern des Mittleren Ostens verwendet. Auch die alten Ägypter nutzten nachweislich diese Eigenschaft des Biopolymers. Am Hof des englischen Königs Henry VIII (1491-1547) wurden eingelegte Gerichte mit „glitzerndem Kalbsfußgelee“ serviert und während der Napoleonischen Ära diente Gelatine als Proteinquelle der französischen Armee. Aufgrund der herausragenden Eigenschaften haben sich die Einsatzgebiete stetig erweitert. Die Produktion erfolgt heute großindustriell (1), wobei ca. 63 % in der Lebensmittel-, 27 % in der Pharmaindustrie und 5 % für technische Anwendungen genutzt werden (2).

Gelatine ist ein hochmolekulares Polypeptidgemisch, das durch partielle Hydrolyse aus Collagen gebildet wird. Letzteres ist als Skleroprotein Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen und Bindegewebe und macht 25-30 % des menschlichen Gesamtproteins aus. Durch zwei verschiedene Aufschlussverfahren werden die Quervernetzungen des Haut- und Knochencollagens von Schweinen, Rindern und Fischen gespalten, so dass das zunächst unlösliche Protein in der Folge mit Wasser extrahiert werden kann. Anschließend werden die erhaltenen Gelatinelösungen entsalzt, konzentriert und sterilisiert, und nach der Trocknung als Pulver oder in Blattform in den Handel gebracht. Die durch Säureaufschluss (Acidic) hergestellte Typ A-Gelatine unterscheidet sich aufgrund dieses Behandlungsverfahrens von der durch Laugen (Basic) extrahierten Typ B-Variante in ihrer Aminosäurezusammensetzung und der Molekulargewichtsverteilung der Polypeptidketten (1, 3). Tabelle 1 zeigt die Gehalte wichtiger Aminosäuren in den in den beiden Gelatinesorten und im Rohstoff Collagen.

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung von Gelatine und Collagen [Reste pro 1000 Aminosäuren] (1)

Aminosäure	Gelatine Typ A	Gelatine Typ B	Collagen (Rind)
Arginin	49	48	51
Asparagin	16	-	16
Asparaginsäure	29	46	29
Cystein	-	-	-
Glutamin	25	-	25
Glutaminsäure	48	72	48
Hydroxyprolin	91	93	104
Hydroxylysin	6,4	4,3	5,4
Lysin	27	28	28
Tryptophan	-	-	-

2005 wurden ca. 305.000 Tonnen Gelatine in Deutschland produziert (1). Aufgrund der teilweise einzigartigen Eigenschaften wird dieses Biopolymer vielfältig verwendet und ist z.B. in der Analogfotografie als Schutzkolloid unersetzlich. In kosmetischen Präparaten und in der Lebensmittelindustrie dient Gelatine aufgrund der Oberflächenaktivität als Stabilisator, Emulgator oder Klärungs- bzw. Schönungsmittel. Eine der bedeutendsten Eigenschaften ist der Einfluss auf die Textur eines Lebensmittels durch Ausbildung thermoreversibler Gele (4-6). Populäre Beispiele sind Gummibärchen, Tortenguss und „Wackelpudding“ (1). Auch in der Medizin und pharmazeutischen Industrie findet Gelatine umfangreich Verwendung. Schwämme aus Gelatine wirken blutstillend und ermöglichen die Migration neuer Gewebszellen (1). Wirkstoffe werden durch Gelatine kapseln oder -umhüllungen (Coatings) vor Sauerstoff, Licht und mikrobiellen Befall geschützt und vermeiden einen bitteren Geschmack bei oraler Applikation (7). Wie auch bei technischen Anwendungen (Korrosionsschutz von Metallen) und in der Lebensmittelindustrie („Essbare Folien“) ist vor allem die Fähigkeit der Filmbildung ausschlaggebend. Allgemein besteht hierbei die Möglichkeit, erdölbasierende Kunststofffolien durch erneuerbare, biologisch abbaubare Biopolymere zu ersetzen (1, 8). Wichtige anwendungsbezogene Merkmale sind vor allem die Barriereigenschaften (9) gegenüber Wasserdampf, Sauerstoff oder Aromastoffen und die Beständigkeit gegenüber Lösungsmitteln oder mechanischer Beanspruchung (10). Um diese Eigenschaften gezielt zu beeinflussen werden die Proteine entweder enzymatisch oder chemisch modifiziert. Als Modifier dienen bifunktionelle Strukturen wie Glutaraldehyd (11), Glyoxal (12) oder Diisocyanate (13) sowie andere aminosäurereaktive Substanzen wie Genipin (14) oder Formaldehyd (12). Die zuvor beschriebene chemische aber auch die enzymatische Vernetzung mit Transglutaminase reduzieren das Quellvermögen sowie die Löslichkeit und erhöhen die Steifigkeit der Folien (12).

Im Zuge des Verbundprojektes sollten am Standort Halle sprühfähige, biologisch abbaubare Gelatinefolien für den Einsatz in der Landwirtschaft entwickelt werden. Im Bereich der Lebensmittelchemie fand die Rezepturenentwicklung und –optimierung statt, die die Grundlage für die ingenieurwissenschaftlichen und bodenbiologischen Arbeiten legten. Als Voraussetzung für die Anwendung der Gelatine wurden wässrige Systeme mit umweltunbedenklichen Chemikalien und möglichst niedrigen Kosten definiert. Es sollten wasserunlösliche Folien aus wässrigen Gelatinelösungen hergestellt werden. Da die in der Literatur beschriebenen Vernetzer entweder enzymatisch (12), und damit relativ teuer, oder umweltschädlich (11) sind, wurde das Konzept der Proteinquervernetzung durch Intermediate der Maillard-Reaktion angewendet. Die Herstellung der Folien erfolgte unter definierten Bedingungen (Temperatur, Zeit), wobei eine 4 %-ige (w/v) Gelatinelösung mit unterschiedlichen Glyoxal (GL)- bzw. Glycolaldehyd (GLC)-Konzentrationen umgesetzt wurde. Durch definierte Trocknung dieser Lösungen wurden im Rahmen des Projektes Folien erzeugt, die anschließend physikalisch, mechanisch und chemisch charakterisiert wurden. Die Ergebnisse der Rezepturenentwicklung sind in zwei Publikationen im *Journal of Agricultural and Food Chemistry* und im *Journal Soft Matter* festgehalten. Eine Übersicht der verschiedenen Untersuchungsparameter zeigt Tabelle 2. Die genauen Versuchsbedingungen sind in der ersten Veröffentlichung „*Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde*“ (15) am Ende dieses Abschnittes aufgeführt.

Durch den Einsatz von GL als auch von GLC wird die Wasserlöslichkeit der Folien stark reduziert. Obwohl ein geringerer Gewichtsverlust (Abbildung 1) bei Verwendung von GLC gemessen wurde, war die Zunahme der Steifigkeit (Abbildung 2) der Folien weniger stark ausgeprägt als bei GL-Vernetzung.

Tabelle 2: Bestimmung und Bedeutung der untersuchten Folienparameter

Parameter	Kenngröße	Bedeutung	Methode
physikalisch	Wasserabsorption	Quellvermögen	gravimetrische Bestimmungen nach Wasserlagerung der Folien unter definierten Bedingungen
	Gewichtsverlust	Löslichkeit	
mechanisch	E-Modul	Steifigkeit	Aufnahme der Spannungs-Dehnung-Kurven durch Zugversuch der Folien
	Zugdehnung	Dehnbarkeit	
chemisch	Arginin, Lysin	Gehalt unmodifizierter AS	Aminosäureanalytik mit RP-HPLC
	Imidazolinon, CML	Modifizierungsgrad (Arg., Lys.)	
	GOLD	Grad der Quervernetzung	
	GL, GLC	Gehalt an unreaktiertem Vernetzer	

Diese Unterschiede sind auf die verschiedenen Vernetzungsmechanismen der verwendeten Verbindungen zurückzuführen. Die Bestimmung der chemischen Parameter bestätigten diese Ergebnisse auf molekularer Ebene. Während durch Analyse des freien GLCs in den Folien eine nahezu vollständige Reaktion der Carbonylverbindung beobachtet wurde, reduzierte sich

der prozentuale GL-Umsatz mit steigender Vernetzerkonzentration. Der Anstieg des Gewichtsverlusts in GL-modifizierten Folien (Abbildung 1) kann somit durch das Herauslösen von freiem bzw. reversibel gebundenem α -Dicarbonyl während der Wasserlagerung erklärt werden.

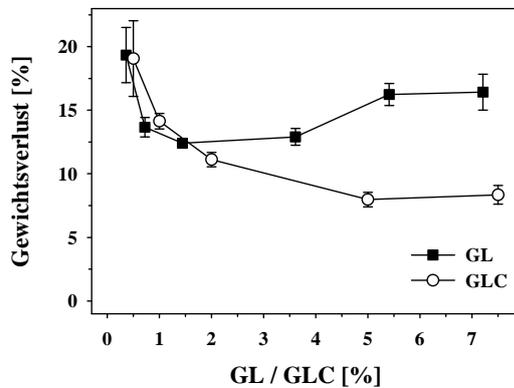


Abbildung 1: Löslichkeit chem.-mod. Gelatinefolien

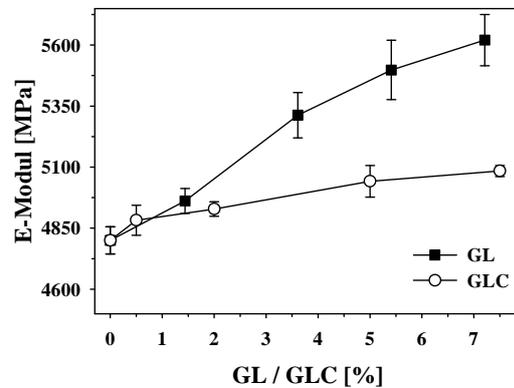


Abbildung 2: E-Modul chem.-mod. Gelatinefolien

Die quantitativen Bestimmungen von GL und GLC müssen allerdings auch kritisch diskutiert werden, da sich die jeweiligen Derivatisierungsmethoden unterscheiden. So wird bei der Reaktion mit o-PD zusätzlich reversibel gebundenes GL (z.B. als GL-Imin) mit erfasst. Weitere Unterschiede in der Modifizierung und des Vernetzungsmechanismus ergeben sich durch die Analyse der wichtigsten im Zuge der Maillard-Reaktion modifizierten Aminosäuren Lysin und Arginin und deren quantitativ bedeutendsten Folgemodifikationen N^{ϵ} -Carboxymethyllysin (CML) und 5-(2-Imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (Imidazolinon). Das Glyoxal-Lysin-Dimer (GOLD) ist eine bivalente Proteinquervernetzung zwischen zwei Lysinseitenketten und spiegelt somit unmittelbar den Vernetzungsgrad wieder. Die Strukturen und Bildungsmechanismen werden in Abbildung 3 gezeigt.

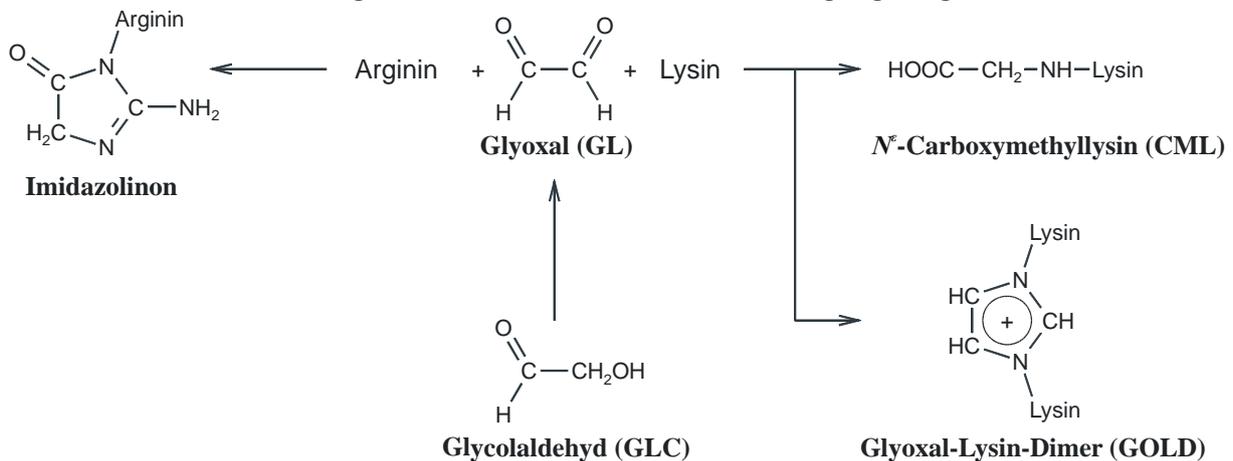


Abbildung 3: Bildungsmechanismus wichtiger Lysin- und Argininmodifikationen

Während die Zunahme der Steifigkeit in GL-modifizierten Folien eindeutig mit dem Gehalt der Lysinquervernetzung GOLD korrelierte, kann wiederum die gleichbleibende Zugdehnung in GLC-Folien durch das Fehlen dieser Verbindung erklärt werden. Allgemein können in GL-Folien 50 % der modifizierten Lysin/Arginin-Reste als CML, GOLD und Imidazolinon identifiziert werden. In GLC-modifizierten Folien beschreiben diese Kenngrößen lediglich 10 %. Aufgrund der höheren Kosten, des stärkeren Einflusses auf die Steifigkeit und der

ungenügenden Beschreibung der Modifizierung durch die gewählten Analyten in GLC-Folien, wurden die nachfolgenden Untersuchungen zur Rezepturoptimierung nur noch mit GL als Vernetzer durchgeführt.

Ziel des Projektes war der Einsatz sprühfähiger Lösungen. Da beim Abkühlen durch thermoreversible Gelierung die Viskosität stark ansteigt, wurden Möglichkeiten erarbeitet den Gelierpunkt zu verschieben. Die Bestimmung des Gelpunktes der filmbildenden Gelatinelösung (FFS) und die Charakterisierung der gebildeten Hydrogele erfolgten mittels deformationskontrollierter Oszillationsrheometrie. Diese Messmethode erlaubt Aussagen über die strukturelle Anordnung und das Verhalten der Polymerketten innerhalb des Gels (16-18). Da es sich bei einem Gel um eine viskoelastische Substanz handelt, sind der Speicher (G')- und der Verlustmodul (G'') wichtige Parameter, wobei G' den elastischen und G'' den viskosen Anteil darstellt. Der Sol-Gel-Übergang ist die Umwandlung einer Substanz mit überwiegend viskosen Eigenschaften in eine mit vornehmlich elastischen. Als Maß zur Bestimmung des Gelpunktes dient $G' = G''$ (19). Durch das Abkühlen der Gelatine lagern sich einzelne Proteinketten zu Triplehelices ähnlich dem des Collagens zusammen (17) und bilden dadurch ein thermoreversibles dreidimensionales Netzwerk (20). Dieses ist in der Lage Wasser zu immobilisieren. Durch partielle Hydrolyse und gezielte Acetylierung der Gelatine im Vorfeld der chemischen Vernetzung mit GL konnten sowohl die rheologischen Eigenschaften der FFS als auch die physikalischen und chemischen Parameter der resultierenden Folien systematisch beeinflusst werden. Die genauen Vorschriften der chemischen Modifizierung durch Hydrolyse mit konzentrierter Salzsäure (HCl) und Acetylierung mit Essigsäureanhydrid (AAH) sind in der zweiten Veröffentlichung „*Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films*“ (21) am Ende dieses Abschnittes aufgeführt. Die anschließende Vernetzung mit Glyoxal entsprach den Versuchen im zuvor beschriebenen Untersuchungskomplex. Temperaturprofil und Dauer der rheologischen Messungen wurden der chemischen Vernetzung und den Bedingungen der Anwendung als Sprühfolie angepasst.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, verzögerte sich die Gelierzeit mit dem Grad der Hydrolyse bzw. der Acetylierung. Bei der chemischen Modifizierung mit AAH ist vor allem der pH-Wert von großer Bedeutung, da dieser die Reaktivität der entsprechenden Aminosäure bestimmt. Bei pH 2 lagen die ϵ -Aminogruppen des Lysin protoniert vor und AAH reagierte daher überwiegend mit den Hydroxylgruppen des Hydroxyprolins und Hydroxylysins. Mit steigendem pH-Wert wurden zusätzlich die ϵ -Aminogruppen des Lysins acetyliert, was entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Triplehelices hatte. Dies wird zusätzlich durch das Verhältnis von viskosem zu elastischem Anteil ($\tan \delta$) im resultierenden Gel bestätigt, da dieser Parameter sowohl bei Hydrolyse als auch bei pH 7-Acetylierung zunimmt. Wichtige Informationen über die Eigenschaften eines chemisch-modifizierten Gels lieferte $\tan \delta$ nach Vernetzung der Gelatine. Hierfür wurden unbehandelte (UTG), partiell hydrolysierte (HG) und acetylierte (AG-pH 2, AG-pH 7) FFS mit GL vernetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen FFS wurde in Abbildung 5 $\tan \delta$ auf den Wert ohne GL normalisiert. Bis auf die bei pH 7 acetylierten Proben sank dieser Parameter mit steigender GL-Konzentration und kann mit der Ausbildung zusätzlicher kovalenter

Bindungen erklärt werden (16, 17). Weiterhin konnte in den hydrolysierten und acetylierten Proben eine Zunahme der Gelierzeit durch Reaktion mit GL beobachtet werden.

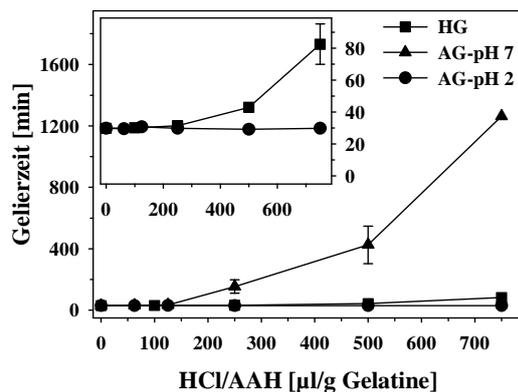


Abbildung 4: Gelierzeit chem.-mod. FFS

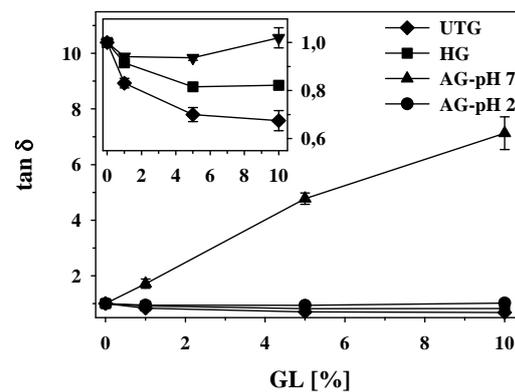


Abbildung 5: Geleigenschaften chem.-mod. FFS

Für die chemisch-physikalischen Untersuchungen wurde die unterschiedlich vorbehandelte Gelatine (HG, AAH) mit 5 % GL vernetzt, da diese Vernetzerkonzentration in den zuvor beschriebenen Untersuchungen (Abbildung 1, Abbildung 2) die besten Ergebnisse lieferte. Durch die Reaktion mit AAH bei pH 7 waren die Lysinseitenketten für die Vernetzung mit GL blockiert und die Bildung von Quervernetzungen wurde verhindert. Dies bestätigten die physikalischen und chemischen Kenngrößen der resultierenden Folien, da die CML- und GOLD-Gehalte sehr gering bzw. nicht nachweisbar und die Folien in Wasser löslich waren. Auch in den hydrolytisch vorbehandelten Gelatinefolien wurden diese Parameter maßgeblich durch die molekular-strukturellen Eigenschaften des ursprünglichen Hydrogels bestimmt. Die Zunahme der Wasserabsorption und des Gewichtsverlusts mit steigender Hydrolyse konnten durch weniger Triplehelices und höheren viskosen Anteil erklärt werden. Gleichzeitig ist durch die längere Gelierzeit eine gesteigerte GOLD-Bildung durch die erhöhte Mobilität der Polypeptidketten im Gel zu beobachten.

Das die chemische Modifizierung ein leistungsstarkes Werkzeug der gezielten Proteinfunktionalisierung ist, zeigt auch der Einfluss der Hydrolyse oder Vernetzung auf die Barriereigenschaften. Die Wasserdampf- und Sauerstoffpermeabilität korrelierten mit den Merkmalen der filmbildenden Lösungen. Wie in Abbildung 6 ersichtlich reduzierte die Vernetzung mit GL die Wasserdampfpermeabilität der unbehandelten Folien um ca. 50 %. Durch die Verwendung von Glycerin als Weichmacher wurde das freie Volumen des Systems vergrößert, die Dichte des Netzwerks reduziert und dieser Effekt ausgeglichen. Da durch die partielle Hydrolyse die resultierenden Folien sehr spröde waren, konnte durch Glycerin außerdem die Flexibilität dieser Folien erhöht werden. Weiterhin wurde die Wasserdampfdurchlässigkeit durch Hydrolyse und Acetylierung erhöht, was die strukturellen Merkmale des ursprünglichen Hydrogels wieder spiegelt. Interessanterweise beeinflusste die Acetylierung der Hydroxygruppen durch niedrigen pH-Wert die Barriereigenschaften nur geringfügig, obwohl das Quellvermögen dieser Folien stark verringert werden konnte. Die chemische Vernetzung hat auf die Sauerstoffpermeabilität einen nur geringen Einfluss (Abbildung 7). Einzig die Behandlung der Gelatine mit HCl erhöhte diesen Parameter leicht.

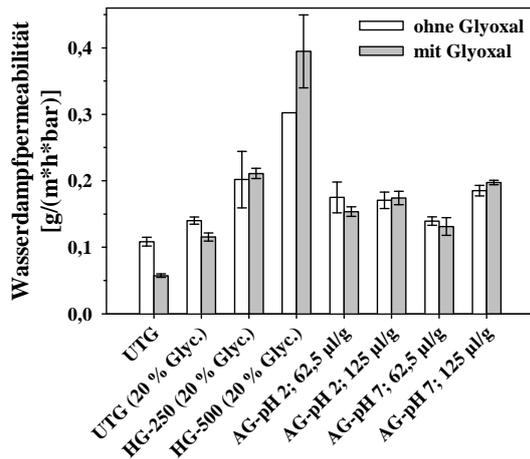


Abbildung 6: Wasserdampfpermeabilität chem.-mod. Folien

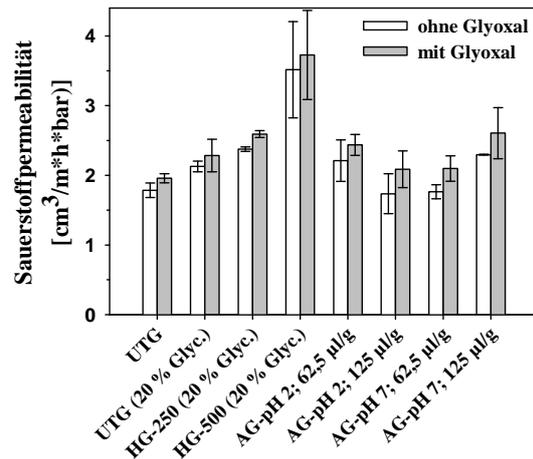


Abbildung 7: Sauerstoffpermeabilität chem.-mod. Folien

Für den Einsatz als sprühhfähige Rezeptur bei Temperaturen unterhalb der Geliertemperatur nativer Gelatine muss ein Kompromiss zwischen Wasserlöslichkeit und Gelierzeit eingegangen werden. Da mit gesteigerter Hydrolyse und anschließender Vernetzung die Gelierzeit zunimmt aber gleichzeitig wasserunlösliche Folien mit guter Wasserdampfdurchlässigkeit gebildet wurden, erfolgten die bodenmikrobiologische Charakterisierungen und die Anwendung im Feldversuch mit partiell hydrolysierte Gelatine im Vergleich zur unbehandelten Gelatine. Die untersuchten Rezepturen sind im Detail in Tabelle 3 dargestellt. Wichtiges anwendungsbezogenes Merkmal ist der Verbleib der FFS in den oberen Bodenschichten. Dazu wurden Bleieindringungsversuche durchgeführt, deren Ergebnisse an entsprechender Stelle wiedergegeben werden.

Tabelle 3: Wichtige Rezepturen für weitere anwendungsbezogene Untersuchungen

Bezeichnung	Vorbehandlung	Gelatine [%] ^a	Glyoxal [%] ^b	Glycerin [%] ^b
UTG	unbehandelt	4	-	20
UTG-GL	unbehandelt	4	5	20
HG-500	Hydrolyse mit 500 µl HCl/g Gelatine	4	-	20
HG-500-GL	Hydrolyse mit 500 µl HCl/g Gelatine	4	5	20

^a Verhältnis Mass/Volumen

^b bezogen auf Gelatineeinwaage

Weiterhin wurden bodenmikrobiologische Kenngrößen im Labormaßstab bestimmt. Dies erfolgte für die Rezepturen HG-500 und HG-500-GL, da diese Rezepturen vielversprechende Abdeckungseigenschaften bei Vorversuchen im Gewächshaus lieferten (Abbildung 8).



Abbildung 8: Vorversuch acht Tage nach dem Aufbringen der FFS

Der abschließende Feldversuch wurde ebenfalls mit den hydrolysierten Varianten mit und ohne GL-Vernetzung durchgeführt. Als Vergleich wurde die unbehandelte Gelatine mitgeführt. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt durch die entsprechenden Projektpartner.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Gelatinefolien durch maillard-induzierte Quervernetzung hinsichtlich ihrer mechanischen, physikalischen und Barriereigenschaften anwendungsgerichtet funktionalisiert werden können. Im Zuge der Untersuchungen wurden chemische Parameter identifiziert, die die makroskopischen Merkmale auf molekularer Ebene beschreiben. Zusätzliche Modifizierungen durch partielle Hydrolyse oder Acetylierung der Gelatine im Vorfeld der Vernetzung zeigen Möglichkeiten auf, die Gelierzeit den Anforderungen der technischen Realisierung anzupassen oder gezielt die Eigenschaften des entstehenden Hydrogels zu beeinflussen. Dabei wurden erstmals die Zusammenhänge zwischen den strukturellen Merkmalen des Gels mit den physikochemischen Eigenschaften der resultierenden Folien auf wissenschaftlicher Ebene korreliert.

Relevante Literatur zum Abschlussbericht der Projektgruppe Lebensmittelchemie:

- (1) Schrieber, R.; Gareis, H. *Gelatine Handbook: Theory and Industrial Practice*; 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2007.
- (2) www.gelita.com **2012**.
- (3) Babel, W. Gelatin. A multipurpose biopolymer. Manufacture, application, and chemical modification. *Chem. Unserer Zeit* **1996**, *30*, 86-95.
- (4) Joly-Duhamel, C.; Hellio, D.; Ajdari, A.; Djabourov, M. All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir* **2002**, *18*, 7158-7166.
- (5) Joly-Duhamel, C.; Hellio, D.; Djabourov, M. All gelatin networks: 1. Biodiversity and physical chemistry. *Langmuir* **2002**, *18*, 7208-7217.
- (6) Nijenhuis, K. T. *Thermoreversible networks - Viscoelastic properties and structure of gels*; 1 ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1997.
- (7) Digenis, G. A.; Gold, T. B.; Shah, V. P. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *J Pharm Sci* **1994**, *83*, 915-921.
- (8) Antoniewski, M. N.; Barringer, S. A. Meat Shelf-life and Extension using Collagen/Gelatin Coatings: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2010**, *50*, 644-653.
- (9) Miller, K. S.; Krochta, J. M. Oxygen and aroma barrier properties of edible films: A review. *Trends Food Sci. Technol.* **1997**, *8*, 228-237.
- (10) Sobral, P. J. A.; Menegalli, F. C.; Hubinger, M. D.; Roques, M. A. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 423-432.
- (11) Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* **2001**, *22*, 763-768.
- (12) de Carvalho, R. A.; Grosso, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase, glyoxal and formaldehyde. *Food Hydrocolloids* **2004**, *18*, 717-726.
- (13) Rault, I.; Frei, V.; Herbage, D.; Abdul-Malak, N.; Huc, A. Evaluation of different chemical methods for crosslinking collagen gel, films and sponges. *J. Mater. Sci. : Mater. Med.* **1996**, *7*, 215-221.

- (14) Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4827-4832.
- (15) Spanneberg, R.; Osswald, F.; Kolesov, I.; Anton, W.; Radsch, H. J.; Glomb, M. A. Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3580-3585.
- (16) Babin, H.; Dickinson, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermo reversible gelation of gelatin. *Food Hydrocolloids* **2001**, *15*, 271-276.
- (17) Giraudier, S.; Hellio, D.; Djabourov, M.; Larreta-Garde, V. Influence of Weak and Covalent Bonds on Formation and Hydrolysis of Gelatin Networks. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1662-1666.
- (18) Van den Bulcke, A. I.; Bogdanov, B.; De Rooze, N.; Schacht, E. H.; Cornelissen, M.; Berghmans, H. Structural and rheological properties of methacrylamide modified gelatin hydrogels. *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 31-38.
- (19) Mezger, T. *Ras Rheologie Handbuch: Für Anwender von Rotations- und Oszillations-Rheometern*; 1 ed.; Vincentz Verlag: Hannover, 2000.
- (20) Guo, L.; Colby, R. H.; Lusignan, C. P.; Howe, A. M. Physical gelation of gelatin studied with rheo-optics. *Macromolecules* **2003**, *36*, 10009-10020.
- (21) Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Stechmann, H.; Figura, L.; Glomb, M. A. Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films. *Soft Matter* **2012**, *8*, 2222-2229.

II.1.2. Charakterisierung der Filmbildungsprozesse und der resultierenden Folieneigenschaften im Labormaßstab (Verarbeitungstechnische Untersuchungen der Projektgruppe Ingenieurwissenschaften)

Für die Bewertung der Folieneigenschaften wurden die Zugprüfung und Durchstoßfestigkeit an Folien (siehe Anhang MLU-ZIW, Anlage Methoden der Folienprüfung) angewendet. Die an den Folien ermittelten Kennwerte waren dabei bereits eine Grundlage für die Rezepturentwicklung.

Durch die verarbeitungstechnischen Untersuchungen wurden vor allem die Einstellung der Viskositäten und der Einfluss der Herstellungs-/Verarbeitungsbedingungen auf die Folienqualitäten heraus gearbeitet.

Die die Sprühfähigkeit beeinflussenden Faktoren (Sollviskosität maximal 200 mPa s bzw. 0,2 Pa s) wird durch den Konzentrationsgrad und die Intensität der Scherung bei der Vernetzung beeinflusst. Die Vernetzung erfolgte dabei nach der Lösung der Gelatine bei 60 °C nach der Abkühlung auf 40 °C. Die Gelatinefolien erreichten Zug-E-Module zwischen 2.000 und 5.000 MPa, Reißspannungen zwischen 50 und 160 MPa sowie Reißdehnungen von 2-8 % bei teilweise sehr hohen Standardabweichungen. Reproduzierbare Werte der mit 5 % Glyoxal vernetzten Proben erreichen E-Module von 5.000 MPa, Reißspannungen von 100 MPa und Reißdehnungen von 4 %.

Der Konzentrationsgrad der Gelatinelösung (14 % bei 6 g Wasser je g Gelatine, 7,7 % bei 12 g, 3,8 % bei 25 g und 1,96 % bei 50 g) hat dabei nur einen geringen Einfluss auf die erreichbaren mechanischen Kennwerte und deren Streuung (Anhang MLU-ZIW, Anlage Zugwerte von Gelatine Folien), da die Steuerung der Herstellungs-/Verarbeitungsbedingungen eine entscheidendere Wirkung haben. Für die Reproduzierbarkeit stabiler Folien, u.a. durch eine geringe Standardabweichung, für andere Anwendungen, z.B. technischen Folien, sind jedoch die Herstellungs- und Verarbeitungsbedingungen zu untersetzen, da auch die sich einstellende Feuchte, die Abkühlungsbedingungen (Abkühlung bei Raumtemperatur oder im Wärmeschrank) sowie die Art der Prüfkörper die Zugwerte beeinflussen.

Aufgrund der oberhalb der Außentemperaturen liegenden Gelierungstemperaturen (23 bis 27 °C) und der geringen Gelierungszeiten bei Abkühlung (siehe auch Abschnitt II.1.1.) ist die Aufbringung der Suspension mit herkömmlicher Sprühtechnik nicht möglich. Eine Ausbringung in Gewächshäusern bei definierter Temperaturführung (Warmhaltung der Suspension oberhalb der Geliertemperatur) ist jedoch möglich. Dabei ist die Viskosität durch den Konzentrationsgrad und die Erwärmungstemperatur einstellbar, wie die ausgewählten

Beispiele zeigen. Die Viskositätsmessungen erfolgten am Rotationsrheometer als Oszillationsmessung bei 1 Hz (Platte/Platte). Durch die definierte Einstellung der Viskosität wird auch der für die Herstellung notwendige Wasserverbrauch sowie mögliche Eindringtiefe in den Boden beeinflusst. Die Viskosität liegt bei der Vernetzungstemperatur von 40 °C, unabhängig der gewählten Konzentrationsgrade der Suspension, weit unter der maximalen Viskosität von 200 mPas. So haben Proben mit 25 g Wasser je g Gelatine bei 39 °C ca. 6 mPa s, aber mit 6 g 30-40 mPas.

Mit Abkühlung reduziert sich die Fließfähigkeit, insbesondere in Abhängigkeit des Konzentrationsgrades der Suspension (Abbildung 9).

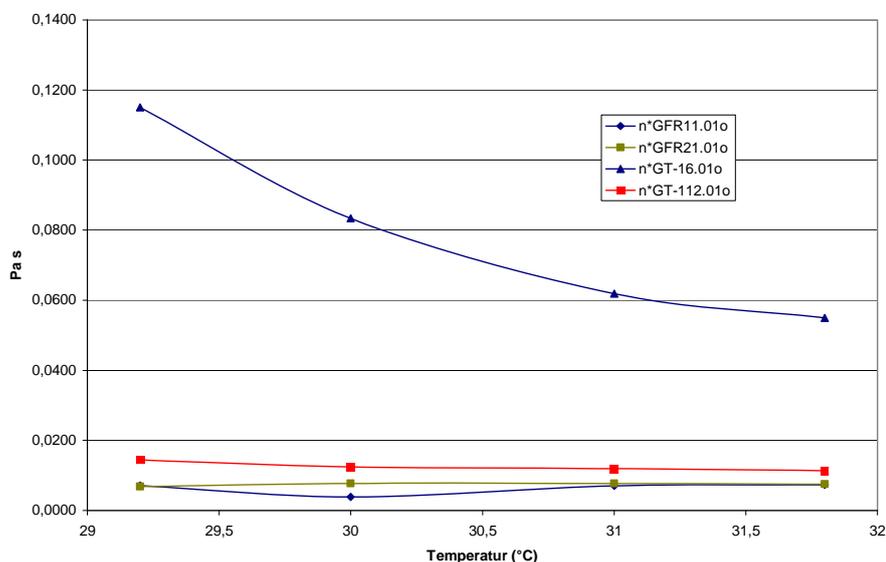


Abbildung 9: Vergleich der Viskosität von Gelatinesuspensionen im Bereich 32-39 °C

Die Proben GFR11 und GFR112 wurden mit 25 g Wasser je g Gelatine hergestellt und erreichen bei unmittelbarer Abkühlung auch bei 29 °C geringe Viskositäten (unter 20 mPa s). Auch die Probe GT-112 (mit 12 g Wasser je g Gelatine) weist noch eine geringe Viskosität auf, während die Probe GT-16 mit 6 g Wasser bei 30 °C bereits 120 mPa s erreicht. Alle Proben liegen noch über der Geliertemperatur. Bei der Einstellung der Konzentrationsgrade und der Temperaturführung für die Ausbringung im Gewächshaus sind jedoch die Zeiträume für die Ausbringung zu beachten, da die sich die Gelierungstemperaturen und Viskositäten während Warmhaltephase verändern (Abbildung 10).

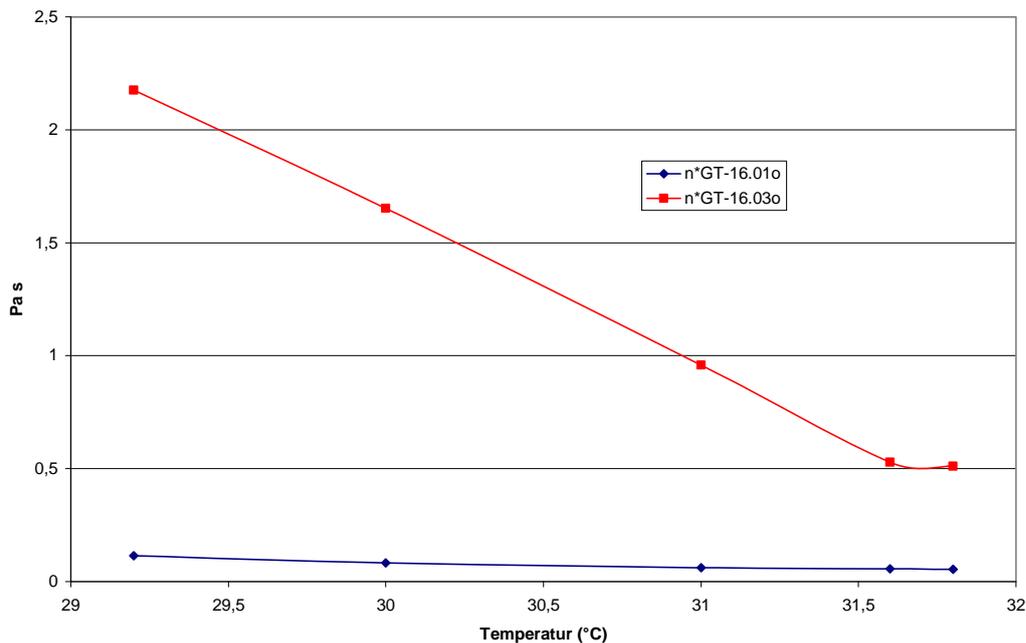


Abbildung 10: Viskositätsveränderung einer Gelatinesuspension während der Lagerzeit

Die Probe GT-16 (6 g Wasser je g Gelatine) wurde unmittelbar nach der Herstellung von 40 °C auf Raumtemperatur abgekühlt (GT-16.01o) und eine 2. Probe aus der zwischenzeitlich bei 40 °C warm gehaltenen Probeflüssigkeit gemessen. Die 2. Messung erfolgte nach ca. 60 Minuten. Bei 32 °C wird bereits die maximale Viskosität von 200 mPa s überschritten, die bei 32,8 °C erreicht wurde. Durch den Konzentrationsgrad der Suspension kann eine geringere Reduzierung der Fließfähigkeit eingestellt werden.

Für die Ausbringung der Suspension auf Gemüseanbauflächen im Freiland wurde zusätzlich zur Veränderung der Gelierungszeit (siehe Abschnitt II.1.1.) die Vernetzung der Gelatine bei Raumtemperatur untersucht. Der Vernetzungsgrad und die erreichbaren Kennwerte (Zugwerte, Durchstoßfestigkeit, Wasseraufnahme und Masseverlust) sind sowohl von der Teilchengröße der Gelatine als auch von den Mischparametern abhängig. Um die Sprühfähigkeit zu gewährleisten wurde der Konzentrationsgrad der Suspension mit 45 g Wasser je g Gelatine eingestellt.

Für die Versuche wurde ein Labormischer verwendet, der eine intensive Mischung ermöglicht (Abbildung 11). Für die Folienherstellung wurde die Suspension in Formen gegossen oder gesprüht (Verwendung üblicher Handsprüher aus dem Gartenbereich).



Abbildung 11: Labormischer

Durch die Vernetzung bei Raumtemperatur werden ein geringerer chemischer Vernetzungsgrad, eine höhere Wasseraufnahme, ein größerer Masseverlust und geringere mechanische Kennwerte (Zugwerte, Durchstoßfestigkeit) als bei hoch gelöster Gelatine erreicht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kennwerte ausgewählter Gelatinefolien

Probe	E_{\max}^{sp} kJ/m ³	E-Modul MPa	Reißspannung MPa	Reißdehnung %	Folienstärke µm
Bei 60 °C vernetzt 1)	1.540±250	4.417±654	107,9±14,2	3,9±1,0	84±6,9
GelCMod12_09-1	53±34	2.786±423	30,3±5,2	1,2±0,3	154,8±18,6
GelCMod12_09-2	244±84	2.974±461	55±11	2,2±0,4	118,4±14,3
GelCMod12_09-3	132±33	3.382±287	54,3±5,8	1,9±0,3	104,2±14,5

Legende:

E_{\max}^{sp} : Durchstoßfestigkeit je m³

Vergleichswerte von Proben mit 25 g Wasser je g Gelatine, die mit 5 % Glyoxal bei 60 °C vernetzt wurden (siehe auch Anlage)

GelCMod12_09-1: Gelatine Typ A, LF21516, Teilchengröße <500 µm, 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod12_09-2: Gelatinetyp A, LF21516, Teilchengröße 100-500 µm, 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod12_09-3: Gelatinetyp A, LF21516, Teilchengröße <250 µm, 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

Herstellung: Labormischer-Schneebeesen 20 Min., 30 Min. mit Glyo., Suspension in die Form gegossen.

Durch die weitere Reduzierung der Teilchengröße und Erhöhung der Mischungsintensität konnten die mechanischen Kennwerte weiter erhöht werden (Tabelle 5).

Die Lösung der Gelatine bei Raumtemperatur führt jedoch nicht zu typischen Gelstrukturen, sondern nur zu einer partiellen Lösung, damit zur Phasenbildung (Abbildung 12).

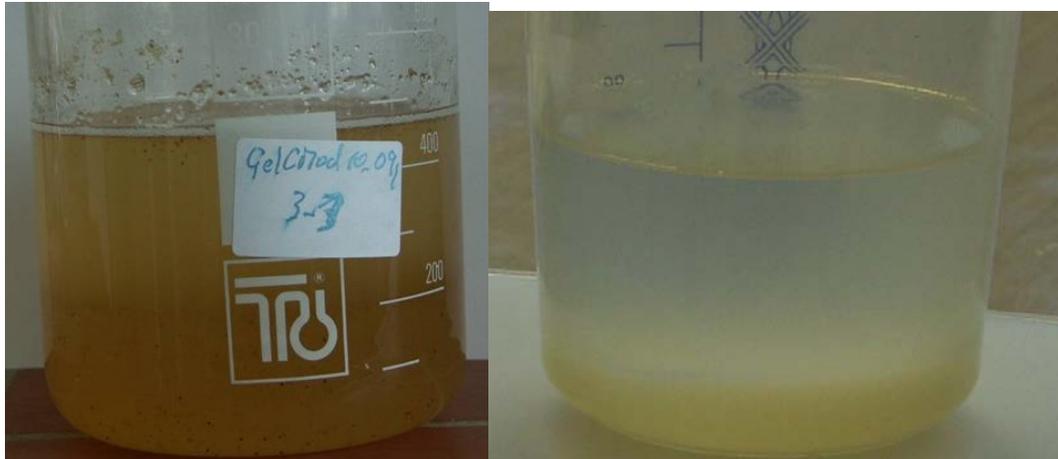


Abbildung 12: Beispiele für die Phasenbildung in vernetzten Gelatinesuspensionen

Die Bildung einer hochviskosen (hoch gelösten) Phase und einer Sinkfraktion (Gelpartikel) ermöglicht eine Ausbringung durch Sprühtechnik, erfordert jedoch gleichzeitig eine ständige Durchmischung der Suspension und führt bereits beim Sprühen zur Phasentrennung. Damit verbunden ist eine höhere Eindringtiefe in den Boden. Gleichzeitig haften Gelpartikel an den Wänden der Misch- und Sprühtechnik, die eine intensive Reinigung nach Abschluss der Arbeiten erfordern. Durch die Untersuchung anorganischer und organischer Bindemittel wurde Carboxymethylzellulose (Zell-Leim) als geeignet nachgewiesen. Die mechanischen Kennwerte reduzieren sich jedoch, werden aber durch Teilchengröße des Ausgangsmaterials und die Herstellungsbedingungen beeinflusst (Tabelle 4).

Tabelle 5: Mechanische Kennwerte von Gelatinefolien ohne und mit Zell-Leim als Bindemittel

Probe	E_{\max}^{SP} kJ/m ³	Folienstärke µm	Wasseraufnahme %	Masseverlust %
GelCMod12_09-1	53±34	154,8±18,6	160	7,4
GelCMod12_09-2	244±84	118,4±14,3	180	6,3
GelCMod12_09-3	132±33	104,2±14,5	175	8,4
GelCMod6_10-2	1000±308	110±30	201	5,9
GelCMod4_10-6ZL	567±166	106±10	676	17,5

Legende:

E_{\max}^{sp} : Durchstoßfestigkeit je m^3

GelCMod12_09-1: Gelatine Typ A, LF21516, Teilchengröße $<500 \mu m$, 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod12_09-2: Gelatinetyp A, LF21516, Teilchengröße 100-500 μm , 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod12_09-3: Gelatinetyp A, LF21516, Teilchengröße $<250 \mu m$, 25 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod6_10-2: Gelatine Typ A, LF21516, Teilchengröße $<100 \mu m$, 45 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

GelCMod4_10-6ZL: Gelatine Typ A, LF21516, Teilchengröße $<100 \mu m$, 45 g Wasser/g Gelatine, 5 % Glyo.

Mit Zell-Leim als Bindemittel

Trotz reduzierter mechanischer Kennwerte bildet sich durch die geringere Eindringtiefe eine stärkere Folienschicht auf dem Boden und ermöglicht eine bessere Abdeckwirkung (Abbildung 13 und 14).



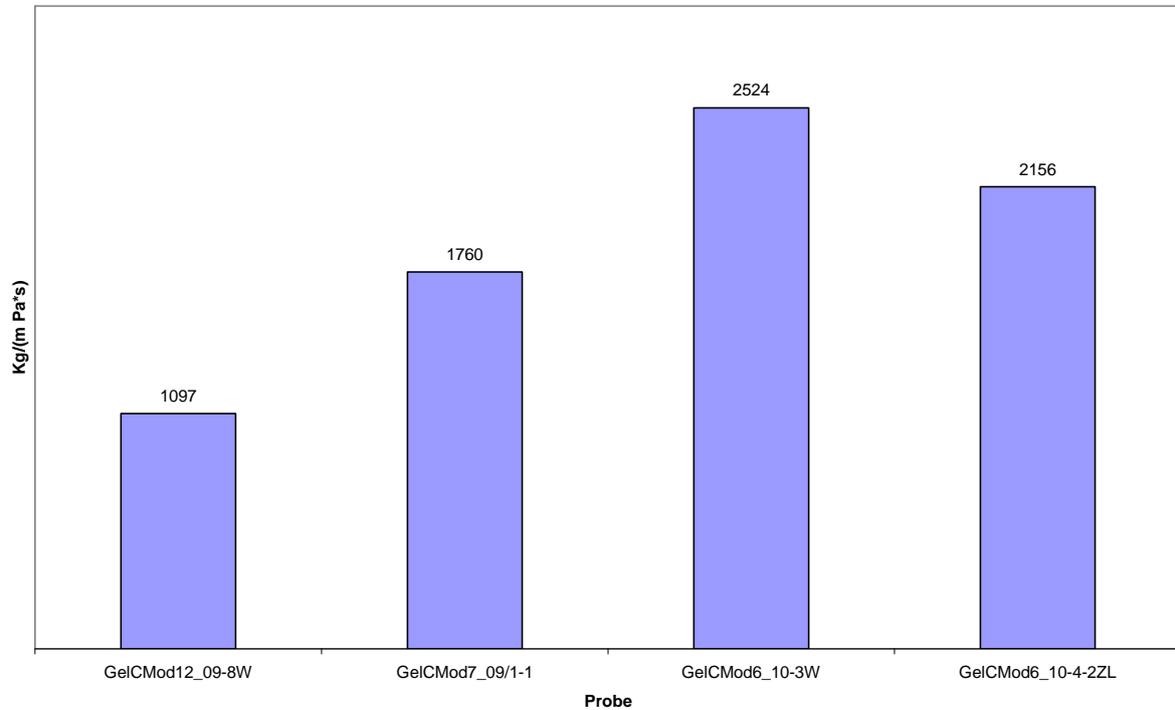
Abbildung 13: Graswuchs nach 4 Wochen ohne Abdeckung



Abbildung 14: Graswuchs nach 4 Wochen Abdeckung der Gelatinesuspension mit Zell-Leim als Bindemittel

Die Wirkung der entwickelten Suspensionen und Folien auf die Bodenmikrobiologie ist nachgewiesen und zeigt keine negativen Einflüsse (siehe II.1.3.)

Abdeckungen mit vernetzter, sprühfähiger Gelatinesuspension haben eine sehr hohe Sperrwirkung gegenüber Sauerstoff (ca. $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ m}/(\text{m}^2 \text{ h Pa})$) und Kohlendioxid (1×10^{-7} bis $6 \times 10^{-8} \text{ cm}^3 \text{ m}/(\text{m}^2 \text{ h Pa})$), aber eine hohe Wasserdampfdurchlässigkeit (Abbildung 15). In Abhängigkeit der Rezepturen und des Herstellungsverfahrens differiert die Permeabilität.



Angaben in kg/(mPa s)

Abbildung 15: Wasserdampfpermeabilität verschiedener Gelatinefolien

Legende:

Vernetzung bei 60 °C

GelCMod12_09-8W: A, LF21516, 25 g Wasser/g, 5 % Glyo., Magnet- und Blattrührer, auf 60 °C erwärmt, 15 Min. gemischt., 2,5 h bei 40 °C gelagert.

Vernetzung bei Raumtemperaturen

GelCMod7_09/1-1: Gelatinetyp A, <100, 25 g Wasser/g, 5 % Glyo., Herstellung mit dem Labormischer
 GelCMod6_10-3W: Gelatinetyp A, <100 µm, 45g Wasser/g, 5% Glyo., Labormischer, Geschw. 5, 20, 30Glyo., Geschw. 5

GelCMod6_10-4-2ZLW: Gelatinetyp A, <100 µm, 45g/g H₂O, 5% Glyo., Zell-Leim (1:0,15), Labormischer, Geschw. 5, 20, 30Glyo., 20BM, Geschw. 5

II.1.3. Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen den entwickelten Folien und dem Boden (Untersuchungen der Projektgruppe Agrar- und Ernährungswissenschaften)

Untersuchung der Eindringtiefe in den Boden

Versuchsbeschreibung

Zur Untersuchung der Eindringtiefe von verschiedenen Sprühfolienrezepturen wurden Gefäße mit zwei Modell-Böden, RefeSol (Braunerde, 01-A) und Schwarzerde gefüllt. Um möglichst naturnahe Bedingungen zu schaffen, wurde jeder Boden am Vortag auf 40 % seiner maximalen Wasserkapazität angefeuchtet. In den Folienflüssigkeiten wurde Blei(II)-nitrat als Tracer gelöst und auf die Bodenoberfläche aufgebracht (Anhang MLU-IAEW, Abbildung 1). Die Gefäße wurden ca. sieben Tage unter Laborbedingungen (22 °C) zum Abtrocknen aufgestellt. Der Versuch wurde mit dem RefeSol in dreifacher Wiederholung für insgesamt 19 Rezepturen angesetzt (Anhang Tabelle 1). Das Eindringen in die Schwarzerde wurde ausschließlich mit vier der vielversprechendsten Folienrezepturen getestet (in Tabelle fett markiert). Nach den sieben Tagen wurde der Boden schichtweise (0 bis 0,5; 0,5 bis 1; 1 bis 1,5; 1,5 bis 2; 2 bis 3; 3 bis 4; 4 bis 6 und 6 bis 9 cm) aus den Gefäßen entnommen, getrocknet und staubfein gemörsert. Anschließend wurde der Königswasseraufschluss nach DIN ISO 11466 durchgeführt und der Bleigehalt der einzelnen Schichten ermittelt.

Ergebnisse

Die Daten wurden mit Hilfe der statistischen Modellbildung (SAS: Statistical-Analysis-System, Version 9.2) ausgewertet. Die Abbildung 16 und im Anhang Abbildung 3 zeigen das Eindringen von vier ausgewählten Rezepturen, bei denen das meiste Folienmaterial in den oberen Bodenschichten des RefeSols verbleibt. Ab einer Tiefe von zwei Zentimetern können keine gesicherten Unterschiede mehr zwischen den Folienflüssigkeiten festgestellt werden. Bei fünf Zentimetern Tiefe ist das Niveau der Kontrolle erreicht. Nach Gewächshausversuchen in Osnabrück erwiesen sich die Gel+HCl-Varianten als vorteilhaft, da ein verringerter Auflauf des Welschen Weidelgrases festgestellt wurde (siehe Bericht der FH Osnabrück). Die vier Rezepturen wurden für den Klimakammerversuch 2010 verwendet.

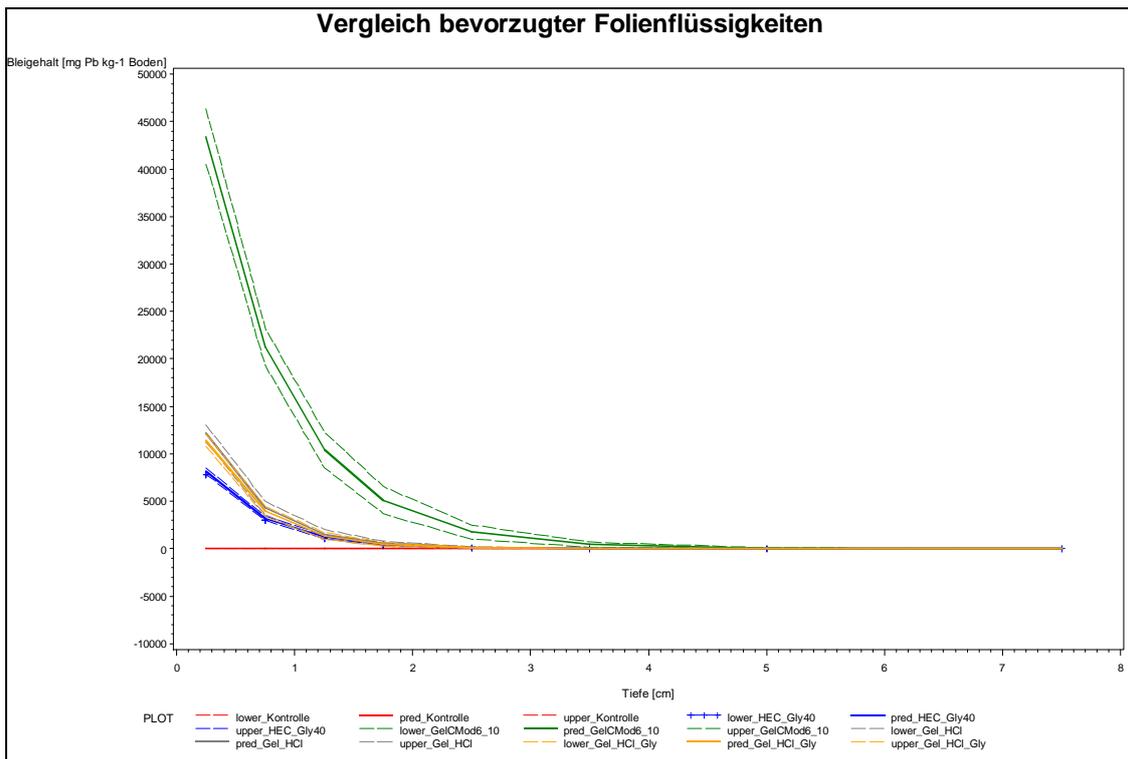


Abbildung 16: Eindringung der Varianten HEC+Gly40, Gel C Mod 6_10-4-22ZIW2, Gel+HCl und Gel+HCl+Gly im Vergleich zur Kontrolle ohne Folie in den RefeSol

Gefäßversuch I (Braunerde)

Versuchsbeschreibung

Auf Grundlage der zuvor beschriebenen Voruntersuchungen wurden Gefäßversuche angelegt. Zur Anwendung kam zunächst ein **Referenzboden** (RefeSol, Braunerde, 01-A, Anhang Tabelle 2), der auf 40 % seiner maximalen Wasserkapazität eingestellt wurde. Zur Reaktivierung wurde er sieben Tage vor Versuchsbeginn bei 22 °C vorinkubiert. Die mit Boden gefüllten und mit Folie (Anhang Tabelle 3) besprühten Gefäße verblieben 14 und 28 Tage in einem **Klimasimulationsraum** (22 °C, 70 % Luftfeuchte) bei regelmäßiger Bewässerung. Zu Versuchsende wurde der Boden in drei Schichten (0-1, 1-3, 3-5 cm) aus den Gefäßen entnommen. Die Proben wurden bis zu den Untersuchungen (Anhang Tabelle 4) bei -20 °C gelagert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Gefäßversuches sind der Abbildung 17 und im Anhang in der Abbildung 3 sowie in den Tabellen 5 bis 15 dargestellt. Die Anwendung der verschiedenen Sprühfolienrezepturen führt zu einer leichten pH-Wert-Erhöpfung nach 14 Tagen (Anhang Tabelle 5). Die Gelatinefolien bewirken einen erheblichen N-Eintrag, aber nur eine mäßige C-Zufuhr (Anhang Tabellen 6 und 7). Das C/N-Verhältnis verengt sich dementsprechend signifikant in der oberen Bodenschicht (Anhang Tabelle 8). Es konnten keine signifikanten Veränderungen der bodenchemischen Kennwerte nach 28 Tagen abgeleitet werden. Die Variante Gel+HCl+Gly bewirkt das höchste C_{mic}/C_{org} -Verhältnis und den höchsten Gehalt an umsatzaktiver organischer Substanz (Anhang Tabelle 9). Mit Hilfe des Leuchtbakterientests war keine toxische Wirkung der Folienflüssigkeiten nachweisbar, da die Toxizitätsgrenze von 20 bei keiner Probe erreicht wurde (Anhang Tabelle 11).

Die mikrobielle Biomasse der Gelatinefolien war nach 14 Tagen zum Teil 7fach höher als die der Kontrolle, nach 28 Tagen aber nur noch 3fach höher (Abbildung 17). Die PLFA-Gesamtgehalte sowie die pilzlichen, und die bakteriellen PLFAs nahmen bei den Gelatinevarianten in den oberen Bodenschichten signifikant zu (Anhang Abbildung 3 und Tabelle 12). Das erhöhte Pilz/Bakterien-Verhältnis lässt auf ein angeregtes Pilzwachstum schließen (Anhang Tabelle 13). Eine Proteaseaktivität war ausschließlich in den oberen Bodenschichten der Gelatinevarianten messbar (Anhang Tabelle 14). Die Cellulaseaktivität hat eine ähnliche Wirkung (Anhang Tabelle 15). Es konnte bei beiden Enzymen ein Aktivitätsrückgang nach 28 Tagen ermittelt werden.

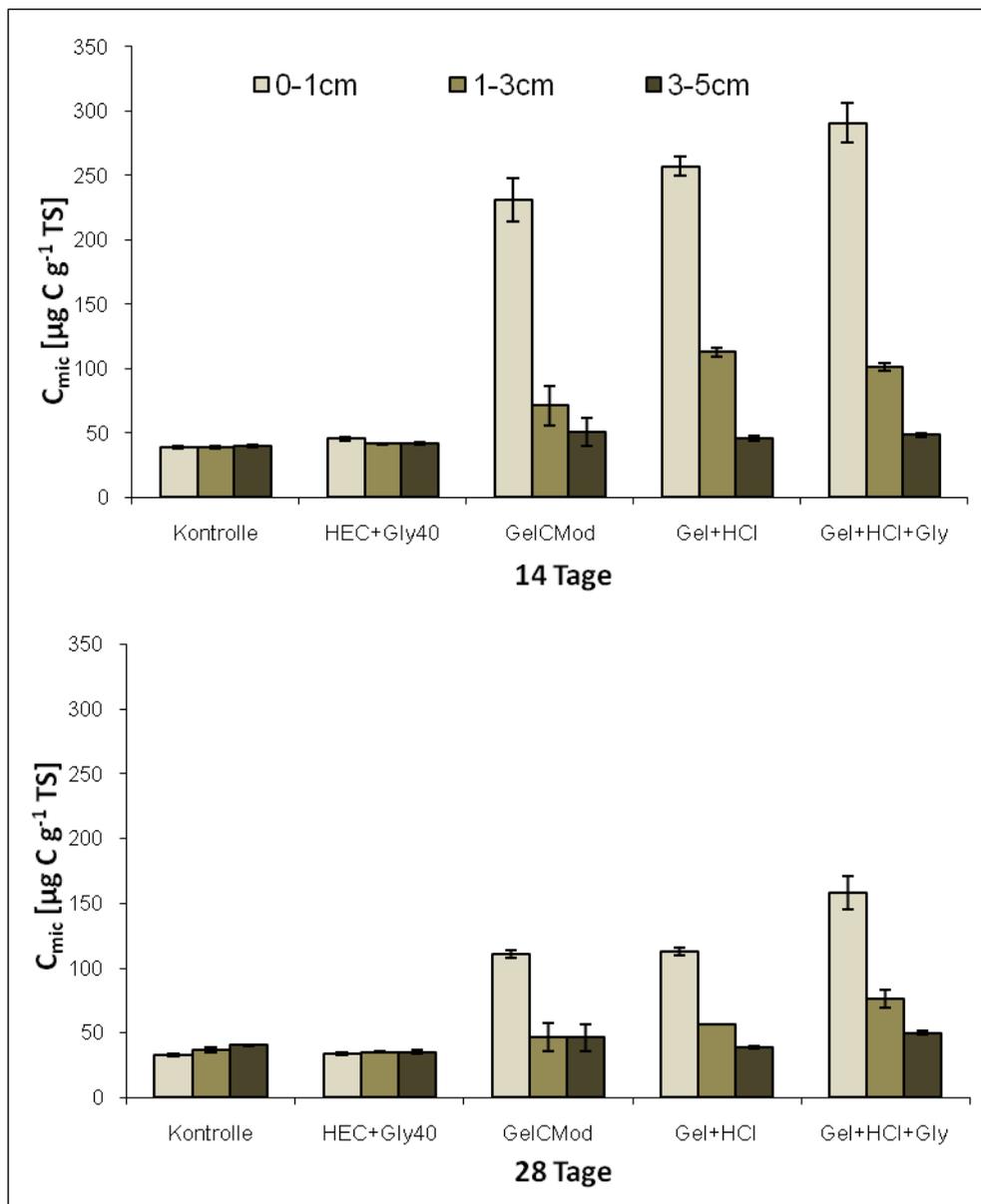


Abbildung 17: Mikrobielle Biomasse (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen

Gefäßversuch II (Schwarzerde)

Versuchsbeschreibung

Der zweite Gefäßversuch wurde analog zu dem ersten Versuch angelegt. Anstatt der Braunerde wurde hier eine Schwarzerde verwendet. Aus der Tabelle 16 im Anhang ist zu entnehmen, dass es sich hierbei um einen Boden handelt, der sich grundlegend von dem im ersten Gefäßversuch verwendeten Boden unterscheidet. Es wurden ebenfalls die für den ersten Gefäßversuch angegebenen Folienflüssigkeiten verwendet (Anhang Tabelle 3) sowie dieselben Untersuchungen an den Proben durchgeführt (Anhang Tabelle 4).

Ergebnisse

Auch bei diesem Versuch werden die Einflüsse der verschiedenen Folienflüssigkeiten auf die bodenchemischen Eigenschaften, wie den pH-Wert, den Gesamtstickstoffgehalt und – kohlenstoffgehalt sowie das C/N-Verhältnis deutlich (Anhang Tabelle 17 bis 20). Die pH-Werte steigen leicht an, die Stickstoffgehalte erhöhen sich enorm bei den Gelatinevarianten, der Kohlenstoffgehalt nimmt aber nur mäßig zu. Das C/N-Verhältnis wird durch die Stickstoffzufuhr der Gelatinefolien enger. Die Variante Gel+HCl+Gly bewirkt die höchsten Gehalte an umsatzaktiver organischer Substanz (C_{mic}/C_{org} -Verhältnis, Anhang Tabelle 21), was sich in den Werten der Basalatmung widerspiegelt, die auch bei dieser Variante am höchsten ausfallen (Anhang Tabelle 22). Die Folie aus Hydroxyethylcellulose (HEC+Gly40) scheint für die Mikroorganismen schwer angreifbar zu sein, da sich die mikrobiologischen Kennwerte bei dieser Variante im Vergleich zur Kontrolle nicht verändern. Die stickstoffreiche Substratzufuhr hat auch in diesem Versuch maßgeblichen Einfluss auf Mikroorganismenwachstum (Anhang Abbildung 4). Dies kann ebenfalls durch die Enzymkennwerte der Protease und der Cellulase nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 23 und 24). Anhand der PLFA-Untersuchung wird deutlich, dass besonders die funktionelle Gruppe der Pilze für die hohen Aktivitäten verantwortlich ist (Anhang Abbildung 5, siehe auch Pilz/Bakterien-Verhältnis, Anhang Tabelle 25 und 26), mit Ausnahme der Variante Gel+HCl, hier sind vorrangig Bakterien aktiv. Das Ergebnis des Toxizitätsscreenings beweist, dass auch in diesem Boden keine der Folienflüssigkeiten eine toxische Wirkung hervorruft (Anhang Tabelle 27).

Mikrobiologische Untersuchung der beim Feldversuch verwendeten Proben

Versuchsbeschreibung

Der Feldversuch wurde in Osnabrück Wallenhorst auf dem landwirtschaftlichen Versuchsbetrieb „Waldhof“ im April 2011 angelegt. Der Bodentyp ist eine Pseudogley-Braunerde. Ihre Kennwerte sind in Tabelle 28 (Anhang) angegeben, die verwendeten Folien in Tabelle 30 (Anhang). Der Versuch wurde als randomisierte Blockanlage in vierfacher Wiederholung angelegt. Vor Beginn des Versuches wurden Mischproben aus den vier Feldwiederholungen erstellt und untersucht. 14 Tage nach dem Folienaufbringen wurden die Hauptproben in zwei Tiefenstufen (0-5 und 5-10 cm) entnommen und die in Tabelle 28 (Anhang) genannten Untersuchungen durchgeführt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse des Feldversuches lassen Einflüsse der Folien auf bodenchemische und bodenbiologische Kennwerte unter Freilandbedingungen erkennen. Die pH-Werte in den oberen Bodenschichten erhöhen sich bei den Varianten Halle 1 bis 4 sowie den Biofol-Folien (Anhang Tabelle 31). Der Gesamtstickstoffgehalt ist wieder durch die Gelatinefolien (Halle 1-4) und die BioFol 1-Folie angestiegen (Anhang Tabelle 32). Der Gesamtkohlenstoffgehalt wurde nur geringfügig beeinflusst (Anhang Tabelle 33). Das C/N-Verhältnis wurde bei Halle 1 bis 4 enger (Anhang Tabelle 34). Ein erhöhter Kohlenstoffanteil in der mikrobiellen Biomasse (höheres C_{mic}/C_{org} -Verhältnis) wurde bei den Varianten Halle 1 bis 4, OSFH 1 und BioFol 1 und 2 erkennbar (Anhang Tabelle 35). Die Gelatinefolien aus Halle verursachen eine starke Erhöhung der mineralisierten Stickstoffgehalte (Nitrat (NO_3) und Ammonium (NH_4^+), (Anhang Tabelle 36). Kaum beeinflusst wird dagegen die Menge der am Sorptionskomplex austauschbar gebundenen Kationen des Bodens (KAK_{pot}), die Menge basisch wirkender Kationen (S-Wert) sowie die Basensättigung (Anhang Tabelle 37).

Ein Einfluss der verschiedenen Folienflüssigkeiten auf die bodenmikrobiologischen Kennwerte ist auch im Feldversuch nachweisbar. Die Basalatmung und die mikrobielle Biomasse steigen bei fast allen Varianten in der oberen Bodenschicht an. Eine Ausnahme bilden die TITK-Varianten und die Variante OSFH 2 (Abbildung 18 sowie Anhang Tabelle 38). Diese Aktivitätssteigerung wird durch die gesteigerte Aktivität der Protease bestätigt (Anhang Tabelle 39).

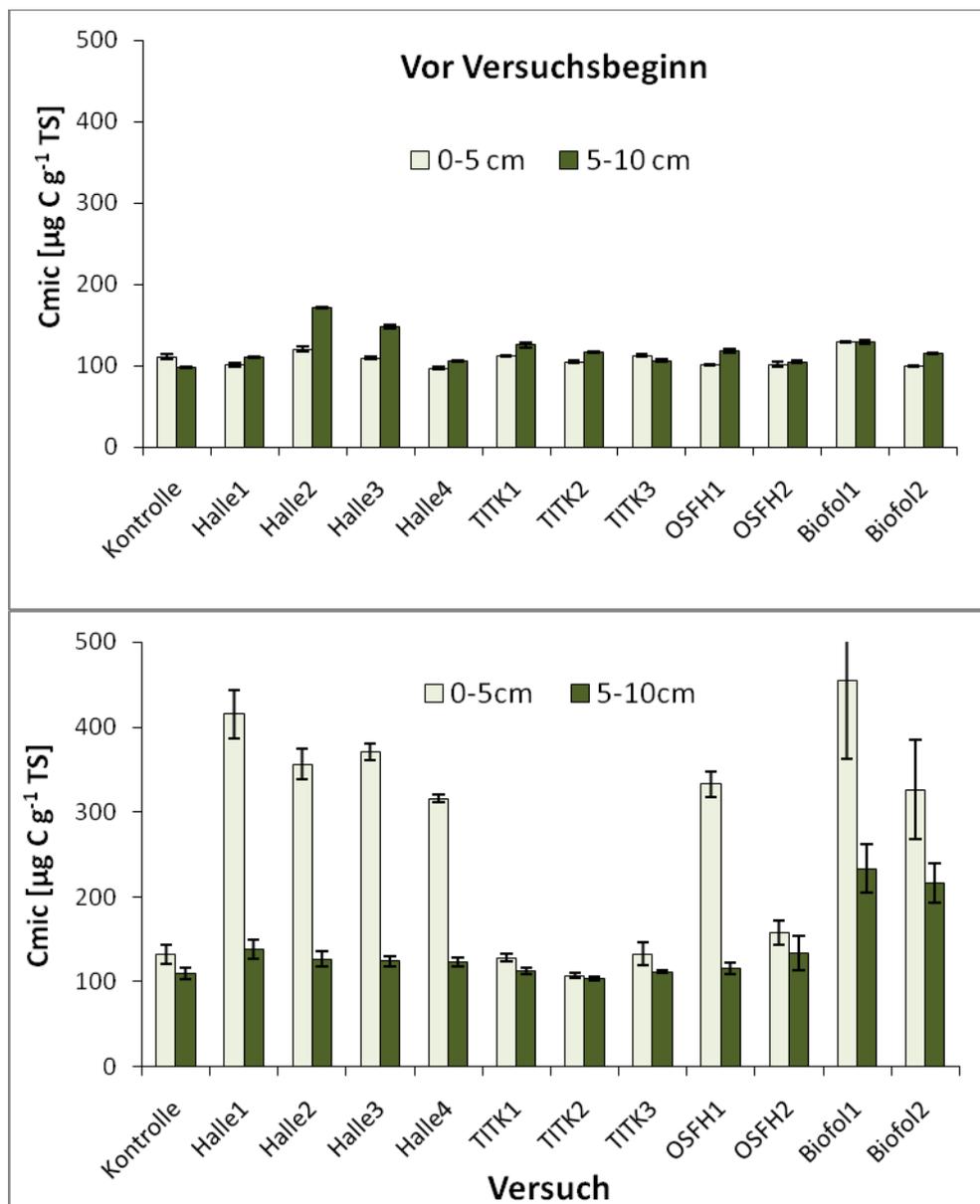


Abbildung 18: Mikrobielle Biomasse (n=4) der Bodenproben vor Versuchsbeginn und zum Versuch (n=4) in zwei Tiefenstufen

Schlussfolgerungen und Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, dass die Folien scheinbar nach 28 Tagen unter Laborbedingungen abgebaut werden (Substrate = Folien verbraucht). Die Gelatinefolien und die damit verbundene stickstoffreiche Substratzufuhr tragen maßgeblich zum Wachstum der Mikroorganismen bei. Alle bodenmikrobiologischen Kennwerte wurden durch diese Varianten nach 14 Tagen signifikant erhöht und nahmen nach 28 Tagen statistisch gesichert wieder ab, wonach das Substrat aus den Folien verbraucht zu sein scheint. Es bleibt zu klären, ob sich durch die Pilz- und Bakterien-Anreicherung im Boden auch bodenbürtige

Krankheitserreger, besonders Pilze, vermehren könnten. Ebenso sind die Folgen für Humus- und Nährstoffhaushalt offen.

Ein Einfluss der Folien konnte auch im Freilandversuch nachgewiesen werden. Beispielsweise erhöhte sich die mikrobielle Biomasse, trotz extremer Trockenheit. Da der Versuch nach 14 Tagen beendet wurde, kann die benötigte Zeit zum Folienabbau nicht abgeleitet werden. Es kann nur vermutet werden, dass der Abbau im Freiland langsamer abläuft, da geringere Temperaturen und keine regelmäßige Bewässerung vorherrschten, also keine optimalen Bedingungen für die Mikroorganismenaktivität. Abschließend bleibt zu klären, ob die festgestellten Beziehungen auch langfristige Auswirkungen haben könnten.

Relevante Literatur zu den Untersuchungen der Projektgruppe MLU-IAEW

- AD-HOC-AG BODEN (2005): Bodenkundliche Kartieranleitung, 5. Auflage, Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Hannover.
- ANDERSON, T. H. & K.-H. DOMSCH (1978): A physiological method for measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215-221.
- ANDERSON, T. H. & K.-H. DOMSCH (1989): Ratios of microbial biomass carbon to total organic-C in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21, 471-479.
- DUNGER, W. & H. J. FIEDLER (1997): Methodenbuch der Bodenbiologie. 2. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Jena.
- FROSTEGÅRD, Å., TUNLID, A. & E. BÅÅTH (1993): Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3605-3617.
- HENDERSHOT, W. H., H. LANLANDE & M. DUQUETTE (2008): Ion exchange and exchangeable cations. p. 197-206; In: CARTER, M. R. & E. G. GREGORICH (2008): Soil sampling and methods of analysis. 2. Ed., CRC Press, Boca Raton.
- HEINEMEYER, O., H. INSAM & E. A. KAISER (1989): Soil microbial biomass and respiration measurements – An automated technique based on infrared gas analysis. *Plant and Soil.* 116, 191-195.
- JÖRGENSEN, G. (2005): Bodenleben und Bodenfruchtbarkeit aus mikrobiologischer Sicht. In: Bodenleben und Bodenfruchtbarkeit, Stand des Wissens und zukünftige Herausforderungen. Tagungsband zur Fachveranstaltung von ilu und GKB am 22. September 2005 in Bonn, Heft 10.
- KAUR, AMRIT., KAUR, AMARJEET, CHAUDHARY, A., CHAUDHARY R & R. KAUSHIK (2005): Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science*, Vol. 89, No. 7, 1103-1112.
- KOLBE, H., BECKMANN, U. & A. MODEL (2003): Einfluss von Futterbau- und Marktfruchtssystemen auf Leistungen der Fruchtfolge, Bodenfruchtbarkeit und Umwelt. In FREYER, B. [Hrsg.]: Beiträge zur 7. Wissenschaftstagung zum Ökologischen Landbau der Zukunft. Wien, 53-56.
- LACZKO, E., RUDAZ, A. & M. ARAGNO (1997): Diversity of anthropogenically influence or disturbed soil microbial communities. In: INSAM, H & A. RANGGER [Eds.]: Microbial communities – Functional versus structural approaches. Springer-Verlag Heidelberg, 57-67.
- MÄDER, P., FLIEBBACH, A., DUBOIS, D., GUNST, L., FRIED, P. & U. NIGGLI (2002): Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science* 296, 1694-1697.
- MÜLLER, G. (1965): Bodenbiologie. Gustav Fischer Verlag Jena.
- ROGASIK, J., FUNDER, U., SCHUNG, E., ROGASIK, H. & M. KÖRSCHENS (2005): Zentrale Stellung des Humus für die Bodenfruchtbarkeit. In: Bodenleben und Bodenfruchtbarkeit, Stand des Wissens und zukünftige Herausforderungen. Tagungsband zur Fachveranstaltung von ilu und GKB am 22. September 2005 in Bonn, Heft 10.
- SCHEFFER, F. & P. SCHACHTSCHABEL (2002): Lehrbuch der Bodenkunde. 15. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
- SCHILLING, G. (2000): Pflanzenernährung und Düngung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- SCHINNER, F. & R. SONNLEITNER (1996 a): Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenzymatik. Bd. 1, Grundlagen, Klima, Vegetation und Bodentyp. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- SPARLING, G.P. (1997): Soil Microbial Biomass, Activity and Nutrient Cycling as Indicators of Soil Health. In: PANKHURST, C. E., DOUBE, B. M. & V. V. S. R. GUPTA: Biological indicators of soil health. CAB International, Wallingford, 265-295.
- TISCHER, S. (2005): Microbial biomass and enzyme activities on soil monitoring sites in Saxony-Anhalt, Germany. *Arch. Agron. Soil Sci.* 51, 673-685.

II.1.4. Wissenschaftlich-technische Nebenergebnisse

Die Ergebnisse aus den komplexen Untersuchungen zwischen den Folieneigenschaften und den Wechselwirkungen mit dem Boden führten auch zur Möglichkeit der Ausbringung von vernetzten Schäumen auf Flächen (Abbildung 19).

Durch einen bei der Ausbringung entstehenden vernetzten Schaumes kann die Aushärtezeit auf 1-2 Tage reduziert werden und es entsteht eine Abdeckung mit ausreichenden mechanischen Festigkeiten, die durch eine größere Flexibilität charakterisiert sind. Mit dem allmählichen Abbau des Schaumes, bedingt aber auch durch die Niederschläge bildet sich diese Abdeckung so zurück, dass eine feste Folie oberhalb des Bodens entsteht. Auch diese wird allmählich abgebaut.



Abbildung 19: Beispiel für vernetzten Schaum als Abdeckung im Labormaßstab

Diese Entwicklung kann jedoch nur als Nebenergebnis gewertet werden, da sie entgegen der Projektzielstellung nicht mit herkömmlicher Sprühtechnik und nur in Gewächshäusern realisierbar ist. Geeignet ist die als Prototyp vom Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. in Duisburg entwickelte Sprühpistole SATAjet®.

Die Anwendung ist jedoch nur für hochvernetzte, komplexe Gelstrukturen bildende Suspensionen geeignet. Bei Raumtemperaturen vernetzte Gelatine, die Phasen und Gelpartikel bilden, ist die Suspension sprühfähig, führt jedoch beim Sprühen nicht zur Schaumbildung.

Für eine breitere Produktpalette in Anwendung dieses Prinzips könnte jedoch die Herstellung von geschäumten und vernetzten Gelatineformkörpern untersucht werden.

Die Ergebnisse zu den Möglichkeiten der Gelatinevernetzung (Vernetzung bei Temperaturen bis 60 °C, Vernetzung bei Raumtemperaturen), den erreichbaren mechanischen Kennwerten (Zugwerte, Durchstoßfestigkeit) und weiteren Funktionseigenschaften, insbesondere die Aufnahme von Feuchte, Permeabilität von Wasserdampf, Sauerstoff und Kohlendioxid, zum Abbauverhalten und den mikrobiologischen Aktivitäten sind nicht nur eine Grundlage für die Bewertung der Eignung für den im Projekt angestrebten Einsatzzweck, sondern auch für die Präzisierung anderer Anwendungsmöglichkeiten bzw. der Möglichkeiten und Grenzen von auf Gelatine basierender, sprühfähiger Folien.

Durch die Einstellung der Viskosität einer vernetzten, sprühfähigen Gelatinesuspension, die biologisch abbaubar ist, ergeben sich aus den Untersuchungen auch wissenschaftlich-technische Ergebnisse für Anwendungen als Gelatineschicht, durch die z.B. die hohe Sperrwirkung von Sauerstoff bzw. Kohlendioxid ausgenutzt wird. Zusätzlich ist darauf zu verweisen, dass eine effiziente, umweltverträgliche Gelatinemodifizierung erarbeitet wurde, die gegenüber der ursprünglichen umweltbedenklichen Vernetzung und Nutzung für die Einbindung von Funktionsmaterialien auf Zelluloseacetaten (Filmen) weitere industrielle Anwendungen ermöglicht.

II.2. Verwertung der Ergebnisse

Die wissenschaftlichen-technischen Untersuchungsergebnisse zu den Vernetzungsmechanismen der Gelatine, den Einflussfaktoren und die Wirkungen auf Funktionseigenschaften einer durch Sprühen hergestellten Folie, einschließlich der bodenmikrobiologischen Wirkung der Bodenabdeckung und ihres Abbaus wurden bereits durch Publikationen ausgewertet und einem breiteren Fachgremium vorgestellt. Die erzielten Ergebnisse für den vorgesehenen Anwendungszweck sind nicht bzw. sollen nicht durch Patente geschützt werden. Dadurch ergibt sich keine Verwertung der Martin-Luther-Universität durch eine Lizenzvergabe. Die Ergebnisse sind jedoch Grundlage für weiterführende Untersuchungen bzw. Forschungsprojekte, die jedoch erst bis Jahresende abgestimmt werden. Das betrifft vor allem die Herstellung von Schäumen bzw. geschäumten Formteilen und die Nutzung als Funktionsschichten.

Die erzielten wissenschaftlich-technischen Ergebnisse rechtfertigen vor allem die Anwendung der entwickelten Lösungen in Gewächshäusern. Dafür sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

Für die Nutzung von vernetzten, sprühfähigen Gelatinesuspensionen auf Freilandflächen ergeben sich auch aus technisch-technologischer Sicht noch Probleme. Das sind vor allem:

- eine geringe Lagerfähigkeit der vernetzten Suspension,
- eine hohe Aushärtezeit bei natürlichen Bedingungen und
- anhaftende Partikel an der Herstellungs- und Ausbringungstechnik bei Vernetzung bei Raumtemperaturen.

Grundsätzlich sollten in Folgeuntersuchungen die Eignung und die Möglichkeit zur Anpassung der im Labor entwickelten Rezepturen durch ausgeweitete Freilandversuche detaillierter untersucht werden. Es bleibt festzustellen, dass dies im Rahmen des vorliegenden Projektes durch z.B. ungünstige Witterungsbedingungen oder entwicklungsstechnisch spätes Bereitstellen der finalen Rezepturen nur äußerst bedingt möglich war.

Im Projektantrag ist die Bereitstellung wissenschaftlich-technischer Ergebnisse für die wirtschaftliche Verwertung durch die Biofol Film GmbH Unseburg vorgesehen. Dafür erfolgt auch durch die Martin-Luther-Universität, soweit notwendig, die Unterstützung. Diese kann weitere Forschungsarbeiten und Beratungsleistungen umfassen. Dafür erfolgen gesonderte Abstimmungen. Aus den wissenschaftlich-technischen Ergebnissen könnte eine wirtschaftliche Verwertung vor allem durch die Anwendung in Gewächshäusern möglich sein. Zu beachten ist jedoch die möglicherweise zusätzlich Ausstattung mit der entsprechenden Herstellungstechnik in Gewächshauskomplexen, da eine Lagerung und ein Transport der vernetzten, sprühfähigen Suspension begrenzt ist.

II.3. Erkenntnisse von Dritten

Von Dritten liegen keine neuen Erkenntnisse zur Herstellung multifunktionaler, sprühfähiger und biologisch abbaubarer Folien auf Basis nachwachsender Rohstoffe im landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau vor. Die in II.1.4. dargestellten wissenschaftlich-technischen Nebenergebnisse sind keine grundsätzlich neue Erkenntnis, da bereits bei den Laborversuchen Schäume erzeugt wurden. Die Anwendung einer entwickelten Sprüheinrichtung betrifft eine mögliche, bisher nicht verwendete Sprühtechnik.

II.4. Publikationen

Spanneberg, R.; Osswald, F.; Kolesov, I.; Anton, W.; Radusch, H.-J.; Glomb, M. A. Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 3580-3585.

Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Stechmann, H.; Figura, L.; Glomb, M.A. Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films, *Soft Matter* **2012**, *8*,: 2222-2229.
_2010.pdf

Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Stechmann, H.; Figura, L.; Glomb, M.A. Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films, *Soft Matter* **2012**, *8*,: 2222-2229.

Spanneberg, R.; Schymanski, D.; Glomb, M.A. Modifizierung von Biopolymeren und deren Anwendung in der Landwirtschaft, *Posterbeitrag zum Deutschen Lebensmittelchemikertag 2010*.

Boritzki, A., Tischer S., Anton, W. & R. Jahn: Einfluss von bioabbaubaren Materialien auf bodenmikrobiologische Kennwerte, *Posterbeitrag zum Symposium der Messe für nachwachsende Rohstoffe -Naro.tech, 10.09.2010, Erfurt*.

Glomb M., Jahn R., Radusch H.-J., Anton W., Boritzki A., Kolesov I., Spanneberg R. & S. Tischer: Entwicklung einer sprühfähigen und biologisch abbaubaren Folie auf Basis nachwachsender Rohstoffe für den landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau, *Posterbeitrag zur 14. Internationalen Fachtagung "Polymerwerkstoffe" am 15.-17.09.2010 in Halle*.

Boritzki, A., Tischer, S. & R. Jahn: Einfluss biologisch abbaubarer Sprühfolien auf bodenmikrobiologische Eigenschaften in einem Referenzboden, *Posterbeitrag zur Jahrestagung der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft (DBG), 2011 in Berlin*.

Model Studies on Chemical and Textural Modifications in Gelatin Films by Reaction with Glyoxal and Glycolaldehyde

ROBERT SPANNEBERG,[†] FRANZISKA OSSWALD,[†] IGOR KOLESOV,[‡] WERNER ANTON,[‡]
HANS-JOACHIM RADUSCH,[‡] AND MARCUS A. GLOMB^{*†}

[†]Institute of Chemistry, Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg,
Kurt-Mothes-Strasse 2, 06120 Halle/Saale, Germany, and [‡]Center of Engineering Sciences,
Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Strasse 1, 06120 Halle/Saale, Germany

The present study investigated chemically modified gelatin biopolymer films. Gelatin solutions were treated with glyoxal and glycolaldehyde, respectively, at concentrations ranging from 0.25 to 7.5 wt % based on gelatin. From these solutions, films were produced under defined conditions and characterized with different chemical and physical methods. *N*^ε-carboxymethyllysine (CML), glyoxal-derived lysine dimer (GOLD), and 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone) were analyzed as chemical parameters for protein modification by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and fluorescence detection after post-column *o*-phthaldialdehyde derivatization. An increase in the content of these substances with increasing concentrations of carbonyl modifiers correlated with the loss of available free lysine and arginine residues. Swelling, solubility, and mechanical properties (Young's modulus, stress and strain at break) showed the relationship with the degree of monovalent modification and cross-linking as well. The determination of unreacted glyoxal and glycolaldehyde suggested a different mechanism of cross-linking induced by glyoxal versus glycolaldehyde as reactive intermediates in Maillard chemistry.

KEYWORDS: Biopolymer film; gelatin; chemical modification; glyoxal; glycolaldehyde; *N*^ε-carboxymethyllysine; glyoxal-derived lysine dimer; Young's modulus

INTRODUCTION

The reaction of reducing sugars and their degradation products with amino groups of amino acids, peptides, and proteins is called the Maillard reaction or non-enzymatic browning. During this complex series of reaction pathways, proteins will be multi-modified to result in material of novel characteristics and functionalities (1, 2). Glyoxal (GL) and glycolaldehyde (GLC) are known to be reactive intermediates toward nucleophilic amino acid residues of proteins (3). The carbonyl group reacts with the ϵ -amino group of lysine and forms the most important monovalent modification *N*^ε-carboxymethyllysine (CML) (4). The cross-link glyoxal-derived lysine dimer (GOLD) between two lysine residues can be used as a direct parameter of the covalent connection of proteins (5). After the formation of a Schiff base and an Amadori rearrangement (6), the reaction of GLC with amine residues involves an additional radicalic pathway (7) to result in the development of colored compounds and cross-links. A major arginine modification is 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone), arising from conversion of *N*⁷-carboxymethylarginine and dihydroxyimidazolidine under strong acidic conditions (8). Similar to CML, imidazolinone presents a general quantitative important parameter for monovalent amino acid modification.

Beside unintentional modifications of proteins during the processing of food or under physiological conditions, the Maillard reaction was widely used to affect or create novel properties of different proteins. Sugars, such as ribose, glucose, or lactose, and polysaccharides, such as galactomannan, chitosan, and maltodextrin, were used to influence emulsions, foaming, gelling, and solubility of whey proteins, ovalbumin, and β -lactoglobulin (9–13).

In the food industry, gelatin is used as a technical additive or ingredient, and in the pharmaceutical industry, gelatin is used as soft and hard capsules or gelatin sponges (14). Gelatin forms biodegradable polymer films, which have been widely studied (15–18). To affect and control the mechanical properties of gelatin films, different cross-linking techniques and agents were applied. Beside thermal treatment, chemical and enzymatic cross-linking was performed in both solutions and films; e.g., modification with glutaraldehyde (19) led to an increase of stiffness with an increasing dicarbonyl concentration. Other amino-acid-reactive substances, such as genipin (20) or diisocyanates (21), reduced swelling behavior or increased the resistance against collagenases.

In the literature, chemically modified gelatin films are characterized almost exclusively on the basis of their resulting physical properties, with little or no knowledge of the underlying mechanisms or modifications. Because the possibility to tailor fit the solubility and mechanical, thermal, and barrier characteristics of gelatin is highly desirable, the present study for the first time correlates chemical parameters and mechanical properties of

*To whom correspondence should be addressed. Fax: ++49-345-5527341. E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de.

gelatin films modified by GL and GLC. Quantification of CML, GOLD, and imidazolinone allowed for deeper insights into the mechanism of protein Maillard modification.

MATERIALS AND METHODS

Materials. Chemicals of the highest quality available were obtained from Aldrich (Taufkirchen, Germany), Fluka (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany), and Sigma (Taufkirchen, Germany), unless otherwise indicated.

CML and GOLD were synthesized according to Glomb and Pfahler (22), and imidazolinone was synthesized according to Glomb and Lang (8).

Film Preparation. Biopolymer films were obtained from gelatin gels by drying under defined conditions. Gelatin (type A, GELITA AG, Ebersbach, Germany) was dissolved in distilled water for 20 min at 60 °C. The gelatin content of the solution was 4% (w/v). GL and GLC were added, respectively, at concentrations ranging from 0.25 to 7.5 wt % related to gelatin and were stirred for further 15 min at 60 °C. Aliquots of these solutions were applied to rectangular forms. After jellification for 2 h at room temperature, the gels were dried for 20 h at 30 °C. The mass per unit area of the resulting films was 0.01 g/cm². Chemical, physical, and mechanical properties were determined from gelatin films produced by four independent replications for each carbonyl concentration.

Swelling Properties and Water Solubility. A piece of gelatin film with defined dimensions (5 × 5 cm) was stored in water at 40 °C for 30 min. After centrifugation and subsequent removal of the liquid, the gelatin film was weighed. The swelling properties were calculated from the increase in weight. After drying the hydrated gelatin films at 30 °C to a constant mass, the weight loss was calculated from the difference between the initial and resulting weight (see eqs 1 and 2).

$$\text{WA (\%)} = 100\% \frac{m_W}{m_F} - 100\% \quad (1)$$

$$\text{WL (\%)} = 100\% - \frac{m_D}{m_F} 100\% \quad (2)$$

where WA is the water absorption (%), WL is the weight loss (%), m_F is the mass of gelatin film before water storage (g), m_W is the mass of gelatin film after water storage (g), and m_D is the mass of gelatin film after drying (g).

Determination of Lysine, Arginine, CML, GOLD, and Imidazolinone. The content of the amino acids and the amino acid modifications was obtained after acid hydrolysis of the gelatin films. A total of 5 mg of gelatin films was dissolved in 2 mL of 6 N HCl and heated for 20 h at 110 °C after the removal of oxygen by degassing with argon. Volatiles were removed in a vacuum concentrator, and the residues were diluted with 0.1 N HCl to concentrations appropriate for high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Quantitative results were obtained from external calibration (coefficient of determination > 0.99) with commercially available amino acids or synthesized reference material. Contents of amino acids showed standard deviations < 0.03 mmol/g of gelatin film, resulting in coefficients of variation < 5%. Contents of amino acid modifications showed standard deviations < 40 mmol/mol of lysine, resulting in coefficients of variation < 30%.

Determination of GL. Free and reversibly bound GL in modified gelatin films was determined as quinoxaline after derivatization with *o*-phenylenediamine (*o*-PD). A total of 50 mg of powdered gelatin film was dissolved in 2 mL of 0.1 M *o*-PD solution, and 0.6 M perchloric acid (pH 2.3) was added to give a total volume of 5 mL. The solution was kept at room temperature (RT) for 5 h (conversion of dicarbonyls to quinoxalines under this reaction conditions was 100% in line with ref 23). After centrifugation and filtration, an aliquot of the filtrate was diluted with H₂O for HPLC analysis. Quantitative results were obtained from external calibration (coefficient of determination > 0.99) with commercially available quinoxaline. Contents of GL showed standard deviations < 18 μmol/g of gelatin film, resulting in coefficients of variation < 13%.

Determination of GLC. Free GLC in the gelatin films was extracted as *O*-benzylhydroxyloxime after derivatization using *O*-benzylhydroxylamine (BH). A total of 20–50 mg of powdered gelatin films with 2 mL of 50 mM BH solution and 0.5 mL of 1 mM phenylacetaldehyde (PAA)

solution as the internal standard was incubated in 10 mL of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4) for 3 h at 37 °C. A total of 250 μL of 6 M HCl was added to the sample solution, and BH oxime derivatives were extracted with diethyl ether. The extracts were concentrated to dryness, and the residues were reacted with 100 μL of *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) in 100 μL of pyridine for silylation of the OH groups. A total of 1 μL of the pyridine–BSA solution was injected into gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). Quantitative results were obtained from external calibration (coefficient of determination > 0.99) using different volumes of a GLC solution with a known amount of analyte instead of the powdered gelatin film. Contents of GLC showed standard deviations < 10 μmol/g of gelatin film, resulting in coefficients of variation < 35%.

HPLC. For determination of the amino acids and their modifications, a Jasco (Gross-Umstadt, Germany) ternary gradient unit 980-PU-ND with a degasser DG-980-50, an autosampler 851-AS, a column oven set at 15 °C, and a fluorescence detector FP-920 was used. Chromatographic separations were performed on stainless-steel columns (VYDAC 218TP54, 250 × 4.6 mm, RP18, 5 μm, Hesperia, CA) using a flow rate of 1.0 mL/min. The mobile phase used was water (solvent A) and MeOH/water [7:3 (v/v); solvent B]. To both solvents (A and B), 1.2 mL/L of heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. For determination of lysine, arginine, imidazolinone, and CML, samples were injected at 2% B and run isocratic for 25 min and the gradient then changed to 100% B in 5 min, was held at 100% for 10 min, then changed again to 2% B in 5 min, and was held for 20 min. For determination of GOLD, samples were injected at 10% B and run isocratic for 10 min and the gradient then changed to 18% B in 50 min, then changed to 100% B in 5 min, was held at 100% for 20 min, then changed again to 10% B in 5 min, and was held for 15 min. The fluorescence detector was attuned to 340 nm for excitation and 455 nm for emission. Prior, a post-column derivatization reagent was added at 0.5 mL/min. This reagent consisted of 0.8 g of *o*-phthalaldehyde, 24.73 g of boric acid, 2 mL of 2-mercaptoethanol, and 1 g of Brij35 in 1 L of H₂O adjusted to pH 9.75 with KOH.

For determination of GL quinoxaline, a Jasco PU-2089 Plus quaternary gradient pump with a degasser was used combined with a Jasco AS-2055 Plus autosampler. The column oven was set at 20 °C, and a UV detector Jasco UV-2075 Plus was used (all Jasco, Gross-Umstadt, Germany). Chromatographic separation was carried out on a stainless-steel column (Knauer Eurospher 100-5 C18, 250 × 4.6 mm, Berlin, Germany) using a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase used was water (solvent A) and water/MeOH [3:7 (v/v), solvent B]. To both solvents, 0.6 mL/L of HFBA was added. Samples were injected at 20% B gradient, changed linear to 30% B in 35 min, changed to 40% B in 5 min, changed to 70% B in 15 min (held for 5 min), changed to 100% B in 30 min (held for 10 min), and then changed to 20% B in 5 min (held for 15 min). The UV detector was attuned to 320 nm.

GC. GLC samples were analyzed on a Thermo Finnigan Trace GC Ultra coupled to a Thermo Finnigan Trace DSQ (both Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen, Germany). The GC column was a HP-5 (30 m × 0.32 mm; film thickness, 0.25 μm; Agilent Technologies, Palo Alto, CA) with the following conditions: injector, 220 °C; split ratio, 1:10; and transfer line, 250 °C. The oven temperature program was as follows: 100 °C (0 min), 5 °C/min to 200 °C (0 min), and 10 °C/min to 270 °C (10 min). Helium 5.0 was used as the carrier gas in a constant flow mode (linear velocity, 40 cm/s; flow, 1 mL/min). Mass spectra were obtained with EI at 70 eV (source, 210 °C) in full-scan mode (mass range, m/z 50–650). Quantifications were performed in SIM mode using m/z 117 for silylated GLC BH oxime and m/z 225 for PAA BH oxime. The dwell time was 100 ms in each case.

Tensile Test. Stress–strain curves of strip-shaped (10 mm wide, with thickness around 75 μm) films were recorded using a testing machine ZWICK 1425 (Zwick GmbH and Co. KG, Ulm, Germany) with a load cell 2 kN after DIN EN ISO 527-1-3 at a cross-head speed of 1 mm/min. The initial distance between the clamps was 70 mm. The Young's modulus, E , the stress at break, σ_b , and strain at break, ϵ_b , were evaluated on the basis of six measurements for each concentration of cross-linking agent.

RESULTS AND DISCUSSION

Physical and Mechanical Properties. Swelling properties of the gelatin films were accessed by storing pieces of films in water

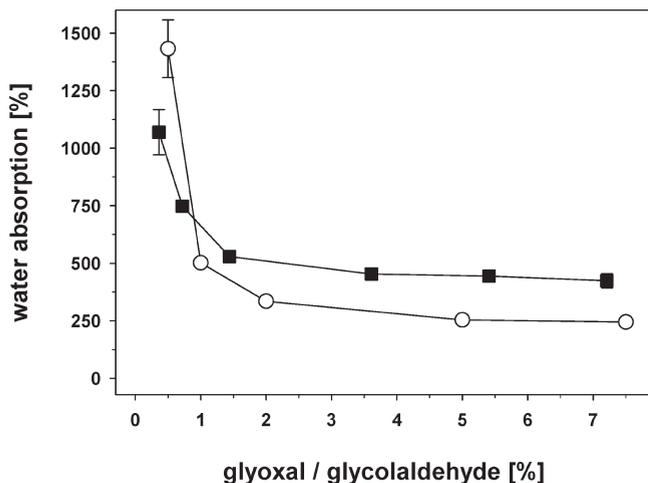


Figure 1. Swelling properties of chemically modified gelatin films after storing in water at 40 °C for 30 min (■, GL; ○, GLC).

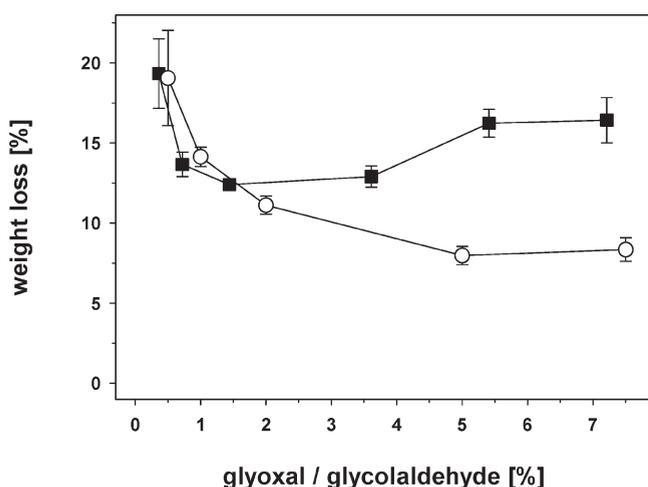


Figure 2. Solubility of chemically modified gelatin films after storing in water at 40 °C for 30 min (■, GL; ○, GLC).

under defined conditions and subsequent differential weighing. The water solubility was determined by drying the same specimen. Gelatin films produced without any GL/GLC were completely dissolved in water under the given experimental settings. **Figure 1** shows the decrease in weight, designated as water absorption, in relation to carbonyl modifier. With increasing GL and GLC concentrations, the ability to absorb water decreased significantly to reach a minimum at about 2% carbonyl concentration. However, significant differences between GL- and GLC-modified gelatin films could be observed. While GL reduced the water absorption to 424%, GLC reached a value of 244%. Further differences between GL- and GLC-modified films are shown in **Figure 2**. Whereas the loss of weight of GLC films decreased with an increasing GLC concentration to 8%, films with GL reached a minimum of 12% at a GL concentration of 1.44% relative to gelatin. With an increasing GL concentration, the loss of weight increased again to 16%. The effect of the reduced gelatin swelling ability with increasing carbonyl concentrations was already observed, e.g., glutaraldehyde, and showed a similar relationship (19). However, a comparison of absolute values is not possible because of different experimental settings. In the present paper, the increase in the carbonyl reagent led to an increase in covalent bonds between gelatin chains. The covalent cross-linking of the protein network increased stiffness and

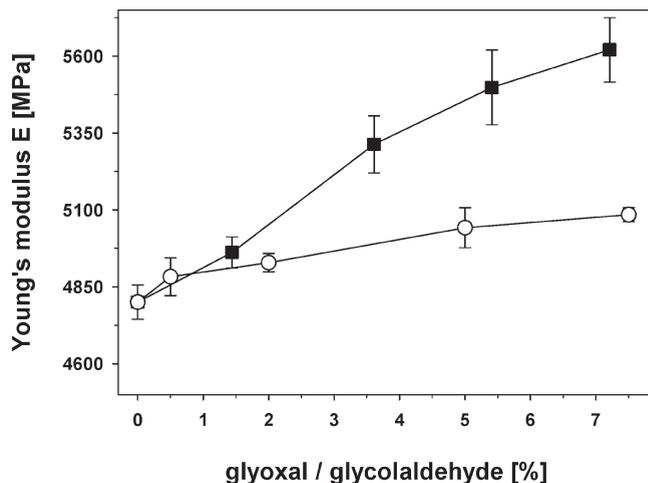


Figure 3. Young's modulus of chemically modified gelatin films (■, GL; ○, GLC).

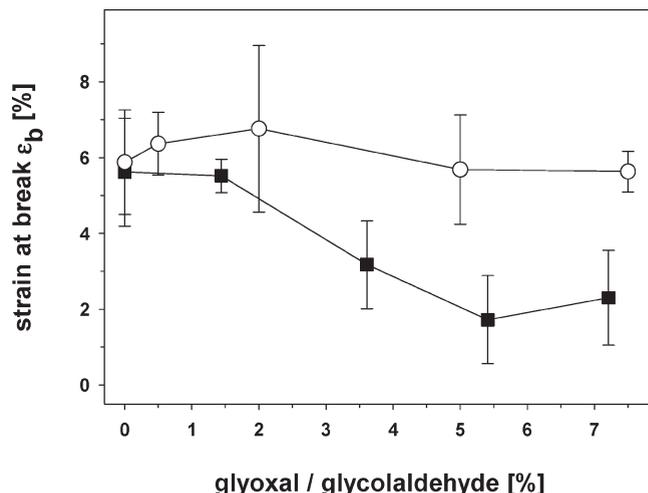


Figure 4. Strain at break, σ_b , of chemically modified gelatin films (■, GL; ○, GLC).

reduced the ability to incorporate water and resulted in a decrease of swelling properties. This can also be seen in the change of solubility, which, in comparison to unmodified gelatin films, was significantly repeated. The presence of a minimum with GL films and a later increase at a higher modifier concentration was exactly covered by the release of excess unreacted or reversibly bound GL (e.g., 4% of free GL in 7.21% film). In contrast, the modification of gelatin with GLC led to irreversible binding of the carbonyl reactant to the biopolymer matrix.

The carbonyl-induced protein modification was further visualized by recording the stress–strain curves of modified gelatin films. Important characteristics are the Young's modulus and stress and strain at break. The Young's modulus, which characterizes the stiffness of material, increased as expected with an increasing carbonyl content of the films (**Figure 3**). The Young's modulus of GL-modified films rose by 17%. In contrast, the modulus of GLC-modified films increased by only 6%. Despite high variations in the values of stress and strain at break, which are typical for brittle foils, the results point to the tendency of decreasing strain at break with an increasing GL content of the films (**Figure 4**). The decrease of the strain at break with an increasing cross-linking agent was more pronounced in GL-modified films than in GLC-modified films. This result correlated with the stronger increase of the Young's modulus of GL films

Table 1. GL and GLC Lead to Gelatin Modification

	added carbonyl		lysine	arginine	CML	GOLD	imidazolinone	free/reversibly bound carbonyl	carbonyl conversion (%)	
	(%) ^a	($\mu\text{mol/g}$)	amino acids ^b	carbonyls ^c						
native	0	0	258.0	438.4	nd ^d	nd ^d	nd ^d	0	0	0
	0.72	125.1	247.1	370.2	10.3	0.3	28.1	33.6	63	73
GL	3.61	625.5	212.4	156.6	50.9	2.1	120.6	320.7	52	49
	7.21	1251.0	192.7	72.9	64.1	2.8	153.1	702.5	34	44
GLC	0.50	83.3	233.5	376.1	2.5	nd ^d	2.7	1.0	104	99
	2.00	333.1	199.5	376.8	4.7	nd ^d	6.7	4.0	36	99
	7.50	1249.0	134.6	363.4	8.6	nd ^d	7.2	23.5	16	98

^a Relative to gelatin. ^b Calculated from the sum of modified lysine and arginine related to added carbonyl. ^c Calculated from free carbonyl related to added carbonyl. ^d nd = not detectable.

than GLC films. In comparison to the literature, the determined Young's modulus of unmodified gelatin films showed higher values. This difference must be attributed to the usage of glycerin as a plasticizer (24) or a prior immersion and swelling of the specimen in a mixture of water/ethanol (16). The general effects of cross-linking reagents on the mechanical properties (increase of E and decrease of ϵ_b with an increasing modifier content) have already been published for glutaraldehyde (19), but no distinct explanation on a molecular basis was given. The different increases of the Young's modulus in GL versus GLC films and swelling and solubility characteristics implied a different mechanism of modification.

Chemical Properties. This conclusion was first supported on a molecular basis by the determination of unreacted carbonyls in the films. Because of their different chemical nature, two analytical strategies were applied. GL was quantified as a quinoxaline after derivatization with *o*-PD by HPLC. GLC was measured as the silylated BH oxime by GC. The results of the analysis are given in Table 1. With an increasing GL concentration, the rate of carbonyl conversion decreased. In films produced with a GL concentration of 0.72% (125.1 $\mu\text{mol/g}$), an unreacted carbonyl concentration of 33.6 $\mu\text{mol/g}$ of gelatin film was determined, which relates to reacted carbonyl of about 73%. At 7.21% (1251.0 $\mu\text{mol/g}$), GL resulted in a carbonyl conversion of 44%. Consequently, 702.5 $\mu\text{mol/g}$ was detected by the *o*-PD method, which correlates to a weight of 4.1%. This was exactly matched by the difference between the weight loss (16.4%) of films using 7.21% GL and the minimum (12.4%) at 1.44% GL. Thus, the increase of the weight loss in GL films has to be explained by the release of free and reversibly bound GL during the swelling process.

In unmodified films, a lysine content of 258 $\mu\text{mol/g}$ and an arginine content of 438 $\mu\text{mol/g}$ were determined. The good correlation of carbonyl conversion based on the sum of free lysine and arginine related to that of unmodified films strongly suggested lysine and arginine to be the most preferred amino groups targeted. In contrast, in GLC-modified films, there was only about 1–2% unreacted GLC detectable, while the carbonyl conversion based on modified amino acids reduced from almost 100 to only 16%. However, these departing results from GL and GLC quantification could be generated from the derivatization reaction itself. While *o*-PD forms stable quinoxalines even from reversibly bound α -dicarbonyls (23), the formation of BH oxime might be limited to available free carbonyl. In the case of modified gelatin films, GL imines could have reacted to GL quinoxaline and lysine during derivatization, while BH was not able to form oximes from GLC imines. These considerations therefore underline the impact of analytical methods on carbonyl determination and might relativate a critical discussion on quantitative carbonyl data. The method of amino acid quantification focused on lysine, arginine, and respective modifications also allowed for alternative

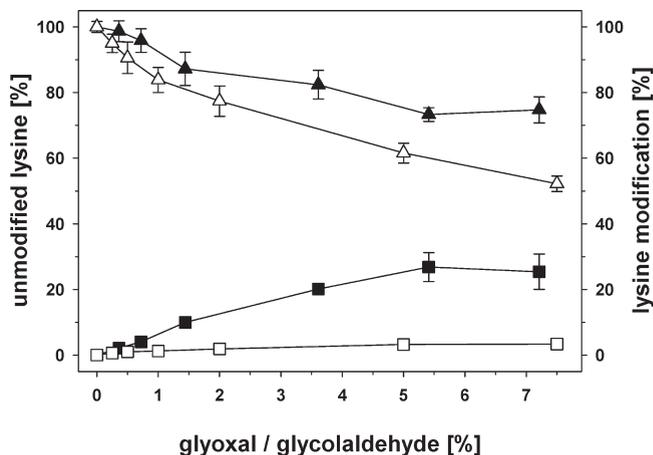


Figure 5. Ratio of unbound lysine and their modifications CML and GOLD (\blacktriangle and \triangle , unbound lysine related to the lysine content of native gelatin; \blacksquare and \square , lysine modifications as the total of CML and GOLD related to the lysine content of native gelatin; \blacktriangle and \blacksquare , GL films; \triangle and \square , GLC films).

explanations. Higher concentrations of GLC might lead to increasing reactivity toward other amino acids or labile lysine/arginine compounds, resulting in unmodified amino acids under the present conditions of acid protein hydrolysis.

Table 1 depicts that with GL about 50% of the total modified lysine/arginine residues were identified as CML, GOLD, and imidazolinone. With GLC, the specific parameters described only 10% of the modification. These results were analyzed in more detail. In Figure 5, the content of unmodified lysine and related modifications is plotted against the carbonyl concentration. The degree of lysine modifications was calculated as the sum of CML and GOLD and related to the lysine content of unmodified gelatin film. The amount of unmodified lysine was calculated likewise. It is obvious that in GL films lysine modifications can be quantitatively described as CML and GOLD after acid hydrolysis. The Maillard reaction of GL also leads to other cross-links, such as GODIC (5) and GOLA (22). However, beside their minor relevance, these substances cannot be analyzed in proteins after acid hydrolysis because of their chemical composition. Model reactions showed GOLD to be the most important GL–lysine–lysine cross-link. The formation of GOLD in comparison to other cross-links was dependent upon the GL/lysine ratio (22). It is evident that an increase in GL promotes the formation of GOLD. Our investigations confirmed these results. In gelatin films produced at low GL concentrations (0.36%), the CML/GOLD ratio was 149:1, while at a concentration of 7.21% GL, the ratio decreased to 46:1. In contrast, in GLC gelatin films, GOLD could not be detected. The CML concentration in these films was about a 10th of the concentration compared to GL-modified films. These results confirmed the mechanical properties described

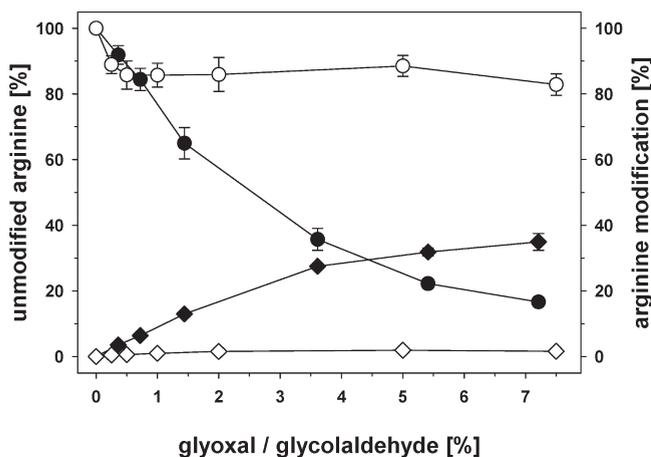


Figure 6. Ratio of unbound arginine and their modification imidazolinone (● and ○, unbound arginine related to the arginine content of native gelatin; ◆ and ◇, arginine modification imidazolinone related to the arginine content of native gelatin; ● and ◆, GL films; ○ and ◇, GLC films).

above. The formation of GOLD correlated directly with the stiffness of the protein network. The absence of this cross-link and the lack of a decrease of strain at break in GLC films must therefore be attributed also to a low level of other covalent cross-links. In contrast, cross-linking of RNase by GLC was reported (6), and resulting covalent lysine structures elucidated as pyrazinium radical cations (25). On the other hand, incubation of bovine serum albumin with GL and GLC, respectively, led to higher concentrations of CML for GL (3). The reason must be the additional prerequisite step to oxidize GLC or GLC imines to GL or derivatives. Beside the low concentration of measured lysine modifications in GLC films, the amounts were far from accounting for the loss of unmodified lysine. This discrepancy clearly indicates the presence of other GLC-specific lysine modifications, which are currently not described in the literature and are obviously of monovalent nature. The lower content in cross-link structures compared to GL films should lead to higher triple-helix formation during renaturation and, thus, resulted in lower water absorption, as shown in **Figure 1**. The correlation of higher triple-helix content to decreased water absorption has been shown before (16).

Differences in the mechanism of protein modification between GL and GLC also became obvious in the conversion of arginine (**Figure 6**). While GL strongly modified arginine residues up to 80%, in GLC gelatin films there were independent of the GLC content about 85% unmodified arginine detectable. The detection of acid-induced imidazolinone confirmed these differences (**Table 1**). While in GL films up to 35% of modified arginine was analyzed as imidazolinone, in GLC films, only 2% imidazolinone was determined. The constant content of unmodified arginine and the low level of modification in films modified with GLC again strongly emphasized the oxidation of GLC to GL as a necessary step toward arginine conversion. Beside the occurrence of other arginine modifications, explanations for the discrepancy between the decrease of unmodified arginine and the formation of imidazolinone in GL films are given in the literature (8, 26). Imidazolinone is a parameter for the overall extent of GL–arginine modifications formed under acidic conditions from dihydroxyimidazolidine and *N*⁷-carboxymethylarginine. However, under the conditions of acid protein hydrolysis, imidazolinone was not stable and partly degraded to arginine.

On the basis of these results and the literature, it can be stated that arginine is the major target to be modified by GL (27), while GLC almost exclusively reacts with lysine and other amino

groups. Small losses of free arginine and the detection of imidazolinone in GLC-modified gelatin films must be due to the oxidation of GLC to GL. This was confirmed by the determination of 1–2% GL based on added GLC (**Table 1**). We were able to show that, in the case of GL, all modified lysine residues could be detected as CML and GOLD. While the GLC reaction with lysine was even more intensive, it must be explained by other structures. Arginine modification in GL-modified films could at least in part be related to the formation of imidazolinone.

In conclusion, our investigation clearly proves the possibility to affect physical and mechanical properties of gelatin films by chemical modification with GL and GLC. Because these are important intermediates of the Maillard reaction, the results can be extended to the degradation of higher sugars in a broader sense. We could unequivocally display the dependency of water solubility and stiffness on the carbonyl concentration. Chemical analysis of the films provided insights to the mechanism of cross-linking reactions and allowed for a plausible correlation to mechanical properties. While the modification of gelatin films with GL could be elucidated in detail by the determination of different known lysine and arginine modifications, GLC-induced modification showed great discrepancy in these parameters. Further investigations are needed to understand the mechanism and structure of GLC protein modifications.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by a grant of the FACHAGENTUR FÜR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE e.V., FKZ 07NR103 (22010307), BMELV/Germany.

LITERATURE CITED

- (1) Ledl, F.; Schleicher, E. The Maillard reaction in food and in the human body—New results in chemistry, biochemistry and medicine. *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 597–626.
- (2) Oliver, C. M.; Melton, L. D.; Stanley, R. A. Creating proteins with novel functionality via the Maillard reaction: A review. *Crit. Rev. Food Sci.* **2006**, *46*, 337–350.
- (3) Glomb, M. A.; Monnier, V. M. Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 10017–10026.
- (4) Thorpe, S. R.; Baynes, J. W. CML: A brief history. *Int. Congr. Ser.* **2002**, *1245*, 91–99.
- (5) Lederer, M. O.; Klaiber, R. G. Cross-linking of proteins by maillard processes: Characterization and detection of lysine–arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2499–2507.
- (6) Acharya, A. S.; Manning, J. M. Reaction of glycolaldehyde with proteins—Latent crosslinking potential of α -hydroxyaldehydes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1983**, *80*, 3590–3594.
- (7) Hofmann, T.; Bors, W.; Stettmaier, K. Studies on radical intermediates in the early stage of the nonenzymatic browning reaction of carbohydrates and amino acids. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 379–390.
- (8) Glomb, M. A.; Lang, G. Isolation and characterization of glyoxal–arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1493–1501.
- (9) Matemu, A. O.; Kayahara, H.; Murasawa, H.; Nakamura, S. Importance of size and charge of carbohydrate chains in the preparation of functional glycoproteins with excellent emulsifying properties from tofu whey. *Food Chem.* **2009**, *114*, 1328–1334.
- (10) Medrano, A.; Abirached, C.; Panizzolo, L.; Moyna, P.; Anon, M. C. The effect of glycation on foam and structural properties of β -lactoglobulin. *Food Chem.* **2009**, *113*, 127–133.
- (11) O'Regan, J.; Mulvihill, D. M. Preparation, characterisation and selected functional properties of sodium caseinate–maltodextrin conjugates. *Food Chem.* **2009**, *115*, 1257–1267.
- (12) Rich, L. M.; Foegeding, E. A. Effects of sugars on whey protein isolate gelation. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 5046–5052.

- (13) Sun, Y.; Hayakawa, S.; Ogawa, M.; Fukada, K.; Izumori, K. Influence of a rare sugar, D-psicose, on the physicochemical and functional properties of an aerated food system containing egg albumen. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 4789–4796.
- (14) Schrieber, R.; Gareis, H. *Gelatine Handbook*, 1st ed.; Wiley-VHC Verlag GmbH and Co. KG: Weinheim, Germany, 2007.
- (15) Achet, D.; He, X. W. Determination of the renaturation level in gelatin films. *Polymer* **1995**, *36*, 787–791.
- (16) Bigi, A.; Panzavolta, S.; Rubini, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials* **2004**, *25*, 5675–5680.
- (17) Dai, C. A.; Liu, M. W. The effect of crystallinity and aging enthalpy on the mechanical properties of gelatin films. *Mater. Sci. Eng., A* **2006**, *423*, 121–127.
- (18) Limpisophon, K.; Tanaka, M.; Weng, W. Y.; Abe, S.; Osako, K. Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 1993–2000.
- (19) Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Roveri, N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. *Biomaterials* **2001**, *22*, 763–768.
- (20) Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubini, K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4827–4832.
- (21) Rault, I.; Frei, V.; Herbage, D.; Abdul-Malak, N.; Huc, A. Evaluation of different chemical methods for crosslinking collagen gel, films and sponges. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **1996**, *7*, 215–221.
- (22) Glomb, M. A.; Pfahler, C. Amides are novel protein modifications formed by physiological sugars. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 41638–41647.
- (23) Glomb, M. A.; Tschirnich, R. Detection of α -dicarbonyl compounds in Maillard reaction systems and in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 5543–5550.
- (24) Cao, N.; Fu, Y. H.; He, J. H. Preparation and physical properties of soy protein isolate and gelatin composite films. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 1153–1162.
- (25) Hofmann, T.; Bors, W.; Stettmaier, K. Radical-assisted melanoidin formation during thermal processing of foods as well as under physiological conditions. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 391–396.
- (26) Schwarzenbolz, U.; Henle, T.; Haebner, R.; Klostermeyer, A. On the reaction of glyoxal with proteins. *Z. Lebensm.-Unters. -Forsch. A* **1997**, *205*, 121–124.
- (27) Schwarzenbolz, U.; Mende, S.; Henle, T. Model studies on protein glycation: influence of cysteine on the reactivity of arginine and lysine residues toward glyoxal. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1126*, 248–252.

Received for review November 12, 2009. Revised manuscript received February 5, 2010. Accepted February 16, 2010.

Cite this: *Soft Matter*, 2012, **8**, 2222

www.rsc.org/softmatter

PAPER

Glyoxal modification of gelatin leads to change in properties of solutions and resulting films

Robert Spanneberg,^a Darena Schymanski,^a Hanna Stechmann,^b Ludger Figura^b and Marcus A. Glomb^{*a}

Received 1st September 2011, Accepted 5th December 2011

DOI: 10.1039/c2sm06659a

The influence of different pretreated film forming solutions (FFSs) on the physical, chemical and barrier properties of gelatin films was studied. Hydrolyzation with hydrochloric acid and acetylation with acetic acid anhydride at different pHs were performed. Subsequently, gelatin was crosslinked with glyoxal to result in biopolymer films with properties predetermined by the rheological behavior of the respective FFS. Gel time, storage modulus and $\tan \delta$ of FFSs were obtained from small-strain oscillatory measurements and were correlated with swelling and solubility of the resulting films as well as with chemical analysis of lysine and arginine and the respective amino acid modifications *N*^ε-carboxymethyllysine (CML), glyoxal derived lysine dimer (GOLD) and 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone). In general, chemical modification reduced the storage modulus whether it was hydrolyzation, acetylation or modification with glyoxal. Treatment by hydrolyzation or acetylation led to differences in gel time and in the ratio between viscous and elastic portion of the different hydrogels, also affecting the relationship between monovalent amino acid modification and bivalent crosslinking after glyoxal addition. Thus, the structural character of FFS hydrogels and of the protein network of films both determined the physical and barrier properties of chemically modified gelatin films.

1. Introduction

Gelatin as a renewable and biodegradable polymer offers a wide field of applications for instance in food and pharmaceutical industry.^{1,2} Here, the exceptional ability to form thin film layers similar to petroleum-derived plastics makes gelatin a material of particular interest. To alter or create novel properties of these films, several modifications were applied. The usage of plasticizers like glycerin, sorbitol or polyethylene glycol affected mechanical properties as well as vapor permeability.^{3–5} Swelling behavior and solubility were reduced by modification with transglutaminase,⁶ genipin⁷ and glutaraldehyde.⁸ Glyoxal as a highly reactive α -dicarbonyl compound and an intermediate of the Maillard reaction led to chemical crosslinking of the protein network and resulted in the loss of lysine and arginine and in an increase of stiffness of the resulting gelatin films.⁹ The amino acid modifications *N*^ε-carboxymethyllysine (CML), glyoxal derived lysine dimer (GOLD) and 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone) were used as chemical parameters to

characterize the degree of amino acid modification and as a direct correlation to changes in the protein network.⁹

Gelatin films are usually prepared from solutions containing biopolymer contents of 1–12%.^{3,10} First, gelatin is solubilized at an elevated temperature around 60 °C. Subsequently, solutions are cast into an appropriate vessel and cooled down. After evaporation to dryness gelatin films remain. Additional enzymatic and chemical crosslinking is performed in the film forming solution (FFS)⁹ or by storing the pre-assembled films in solutions of crosslinking agents.⁶ Hereby, the treatment of FFS prior to film preparation determined the properties of the resulting gelatin films.¹¹

When cooling down a gelatin solution, the random coiled state of peptide and protein chains undergoes a transition to ordered triple helices reminiscent of the native collagen. These junction zones form a thermally reversible network, which immobilizes water and results in a physical gel.^{12–14} The triple helix content of a gelatin gel influences the renaturation level of resulting films after drying and also determines their mechanical properties.¹⁵ To characterize the process of gelation, dynamic oscillatory measurements with a rheometer were performed and showed to be a powerful tool to get knowledge of the structural arrangement and behavior of the polymer chains within the gel.^{16–18}

In the literature interest is focused solely either on the properties of gelatin hydrogels and the molecular elucidation of the gelation process or on the physical, mechanical and chemical characters of gelatin films. Therefore, the purpose of the present

^aInstitute of Chemistry—Food Chemistry, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, Kurt-Mothes-Str. 2, 06120 Halle/Saale, Germany. E-mail: marcus.glomb@chemie.uni-halle.de; Fax: +49-345-5527341; Tel: +49-345-5525784

^bFaculty of Agricultural Sciences and Landscape Architecture, University of Applied Sciences Osnabrück, Oldenburger Landstraße 24, 49090 Osnabrück, Germany

paper was to bring both aspects together and to study the influence of diversely modified gelatin FFSs on the properties of resulting biopolymer films. For this, gelatin was minimally hydrolyzed with hydrochloric acid or acetylated with acetic acid anhydride, respectively. Comparable to our previous work,⁹ the pretreated gelatin was subsequently crosslinked with glyoxal to give biopolymer films. The visco-elastic properties of FFSs were determined and were correlated with selected physical and chemical parameters of resulting films.

2. Experimental

2.1. Materials

Chemicals of highest quality available were obtained from Aldrich (Taufkirchen, Germany), Fluka (Taufkirchen, Germany), Merck (Darmstadt, Germany), Roth (Karlsruhe, Germany) and Sigma (Taufkirchen, Germany), unless otherwise indicated.

N^ε-Carboxymethyllysine (CML) and glyoxal derived lysine dimer (GOLD) were synthesized according to Glomb and Pfahler,¹⁹ 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone) according to Glomb and Lang.²⁰

2.2. Methods

Preparation of film forming solutions (FFSs). Gelatin (type A, GELITA AG (Ebersbach, Germany)) was dissolved in distilled water for 20 min at 60 °C. Protocol of gelatin treatment is described below. After that the solution was diluted with distilled water to obtain a gelatin content of 4% (w/v). The influence of glyoxal (GL) on the rheological properties of FFSs was determined by adding the dicarbonyl at concentrations ranging from 1.0 to 10.0 wt% related to gelatin and stirring for further 15 min at 60 °C.

Untreated gelatin (UTG). After solubilization of gelatin the solution (pH 5.4) was adjusted to pH 7 and distilled water was added to a gelatin concentration of 4% (w/v).

Partially hydrolyzed gelatin (HG). To hydrolyze the gelatin, concentrated hydrochloric acid (37%) was added to the gelatin solution at concentrations ranging from 100 to 750 μL g⁻¹ gelatin during solubilization (20 min at 60 °C). Subsequently, the solution was adjusted to pH 7 with 2 N NaOH and distilled water was added to a gelatin concentration of 4% (w/v).

Acetylated gelatin (AG). For acetylation of gelatin, the biopolymer was dissolved as described above. Acetic acid anhydride (99%) was added at concentrations ranging from 62.5 to 750 μL g⁻¹ gelatin and the solution was adjusted to pH 2 and pH 7, respectively. Acetylation was carried out at 10 °C for 20 h. Subsequently, the solution was adjusted to pH 7 with 2 N NaOH and distilled water was added to a gelatin concentration of 4% (w/v).

Pretreatments of gelatin and their abbreviations used in this study are summarized in Table 1.

Dynamic rheological measurement. The small-strain oscillatory rheometry was performed with a controlled deformation Anton

Paar Physica MCR 301 rheometer using a plate/plate measuring system (diameter 50 mm, $\gamma = 5\%$, $\omega = 10 \text{ rad s}^{-1}$, gap = 0.4 mm). All samples were measured within the linear viscoelastic region and prepared in tripled replication. The storage (G') and loss (G'') moduli were recorded as a function of time. The sol–gel transition (gel point) was determined when $G' = G''$. The hot (60 °C) FFSs were allocated on the plate and the temperature was linearly ramped down from 60 °C to 20 °C in 30 min. Subsequently, the temperature was held until 120 min after the sol–gel transition time.

Film preparation. Biopolymer films were obtained from FFSs by drying under defined conditions. Glyoxal was added to hot (60 °C) FFSs at 5.0 wt% related to gelatin and was stirred for 15 min at 60 °C. Aliquots of these solutions were applied to rectangular forms. After jellification for 2 h at room temperature the gels were dried for 20 h at 30 °C. The mass per unit area of the resulting films was 0.01 g cm⁻². Chemical, physical and barrier properties were determined from gelatin films produced by three independent replications.

Swelling properties and water solubility. A piece of gelatin film with defined dimensions (5 × 5 cm) was stored in water at 40 °C for 30 min. After centrifugation and subsequent removal of the liquid the gelatin film was weighed. The swelling properties were calculated from the increase in weight. After drying of the hydrated gelatin films at 30 °C to constant mass, the weight loss was calculated from the difference between the initial and the resulting weight (see formula (1) and (2)).

$$\text{wa}(\%) = 100\% \times \frac{m_w}{m_f} - 100\% \quad (1)$$

$$\text{wl}(\%) = 100\% - \frac{m_d}{m_f} \times 100\% \quad (2)$$

wa [%] = water absorption, wl [%] = weight loss, m_f [g] = mass of the gelatin film before water storage, m_w [g] = mass of the gelatin film after water storage, and m_d [g] = mass of the gelatin film after drying.

Determination of lysine, arginine, CML, GOLD and imidazolinone. The content of the amino acids and the amino acid modifications was obtained after acid hydrolysis of the gelatin films. Five milligrams of gelatin films were dissolved in 2 mL of 6 N HCl and heated for 20 h at 110 °C after removal of oxygen by degassing with argon. Volatiles were removed in a vacuum concentrator and the residues were diluted with 0.1 N HCl to concentrations appropriate for HPLC analysis.

Quantitative results were obtained from external calibration (coefficient of determination > 0.99) with commercially available amino acids or synthesized reference material. Contents of amino acids showed standard deviations <0.03 mmol g⁻¹ gelatin film, resulting in coefficients of variation <5%. Contents of amino acid modifications showed standard deviations <40 mmol mol⁻¹ lysine, resulting in coefficients of variation <30%.

High performance liquid chromatography (HPLC). For determination of the amino acids and their modifications a Jasco (Groß-Umstadt, Germany) ternary gradient unit 980-PU-ND with a degasser DG-980-50, autosampler 851-AS, column oven

Table 1 Gelatin pretreatments

Abbreviation	Pretreatment of gelatin film forming solution
UTG	Untreated gelatin, FFS adjusted to pH 7
HG-250	Partially hydrolyzed gelatin using 250 μL HCl per g gelatin, FFS subsequently adjusted to pH 7
HG-500	Partially hydrolyzed gelatin using 500 μL HCl per g gelatin, FFS subsequently adjusted to pH 7
AG-pH 2	At pH 2 acetylated gelatin, FFS subsequently adjusted to pH 7
AG-pH 7	At pH 7 acetylated gelatin, FFS subsequently adjusted to pH 7

set at 15 °C and a fluorescence detector FP-920 was used. Chromatographic separations were performed on stainless steel columns (VYDAC 218TP54, 250 \times 4.6 mm, RP18, 5 μm , Hesperia, USA) using a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The mobile phase used was water (solvent A) and MeOH/water (7 : 3 v/v; solvent B). To both solvents (A and B) 1.2 mL L⁻¹ heptafluorobutyric acid (HFBA) was added. For determination of lysine, arginine, imidazolinone and CML samples were injected at 2% B and run isocratic for 25 min, the gradient then changed to 100% B in 5 min and was held at 100% for 10 min, then changed again to 2% B in 5 min and was held for 20 min. For determination of GOLD samples were injected at 10% B and run isocratic for 10 min, the gradient then changed to 18% B in 50 min, to 100% B in 5 min and was held at 100% for 20 min, then changed again to 10% B in 5 min and was held for 15 min. The fluorescence detector was attuned to 340 nm for excitation and 455 nm for emission. Prior, a post-column derivatization reagent was added at 0.5 mL min⁻¹. This reagent consisted of 0.8 g *o*-phthalaldehyde, 24.73 g boric acid, 2 mL of 2-mercaptoethanol and 1 g Brij35 in 1 L of H₂O adjusted to pH 9.75 with KOH.

Water and oxygen permeation. Gravimetric measurement of water vapor permeability (WVP) was determined according to ref. 21. Permeability of oxygen was determined according to ref. 22 and 23. During measurement of WVP a cup is filled with silica gel and closed by the film. Exteriorly, constant temperature and relative humidity exist. As standard conditions a temperature of 20 °C and a relative humidity of 75.5% r.h. are defined. The mass increase over time is recorded. Gravimetric permeability coefficient P can be calculated with the following equation:

$$P(\text{g m h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1}) = \frac{\Delta m d}{\Delta t A \Delta p} \quad (3)$$

$$\Delta p [\text{bar}] = (\varphi_{\text{outside}} - \varphi_{\text{inside}}) p_s \quad (4)$$

$P(\text{g m h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ bar}^{-1})$ = gravimetric permeability coefficient

Δm [g] = difference of mass, d [m] = thickness of the sample, Δt [h] = difference of time, A [m²] = testing area of the sample, Δp [bar] = partial pressure difference, φ [—] = relative humidity, and P_s = saturation vapour pressure.

For measurement of oxygen permeability, suitable equipment has been developed. This equipment consists of two chambers, which are separated by the film that has to be characterized. Carrier gas (100% N₂) is pumped into the right measurement chamber. During the process, it circles from the right chamber to gas sensor (PA O₂/CO₂ from Witt Gasetechnik GmbH & Co. KG) without discharge or new feed. Process gas (10% O₂ + 10% CO₂ + 80% N₂) (% in (cm³/100 cm³)) streams continuously into

the left measurement chamber. Diffused volume of O₂ and CO₂ into the right chamber is recorded as a function of time. Volumetric permeability coefficient can be calculated with the following equation:

$$P(\text{cm}^3 \text{ m m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}) = \frac{\Delta V d}{\Delta t A \Delta p} \quad (5)$$

$$\Delta p [\text{bar}] = (\varphi_{\text{outside}} - \varphi_{\text{inside}}) p_s \quad (6)$$

$P(\text{cm}^3 \text{ m m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1})$ = volumetric permeability coefficient

ΔV [cm³] = diffused gas volume, d [m] = thickness of the sample, Δt [h] = difference of time, A [m²] = testing of the sample, and Δp [bar] = partial pressure difference.

3. Results and discussion

3.1. Pretreatment of film forming solutions (FFSs) by hydrolyzation or acetylation

Film preparation included solubilization and modification of gelatin at 60 °C, cooling down and subsequent evaporation of FFSs to dryness. To characterize the rheological properties of FFSs small-strain oscillatory measurements were performed. In Fig. 1 the storage (also elastic or real) modulus G' and the loss (also viscous or imaginary) modulus G'' versus time of an untreated 4 wt% gelatin solution (UTG-FFS) are shown.

The gel time was determined when $G' = G''$. Since gelling of gelatin is a non-equilibrium process and time scales of some experiments were different, the storage and loss moduli at the end (the last 15 minutes of measurement) of the experiments were plotted against 1/time to extrapolate to infinite time.²⁴ As shown in the inset of Fig. 1 the y-intercept of the linear regression gave G'_{infinite} . The ratio of viscous and elastic fraction of gels at infinite time was calculated as:

$$\tan \delta_{\text{infinite}} = \frac{G''_{\text{infinite}}}{G'_{\text{infinite}}} \quad (7)$$

In the present study first hydrolyzation (HG) and acetylation (AG) of gelatin were investigated and compared to unmodified gelatin (UTG). With increasing hydrochloric acid (HCl) concentration during solubilization protein chains were hydrolyzed and gel time was increased (inset of Fig. 2A). Additionally, the storage modulus at infinite time G'_{infinite} was decreased. Since the loss modulus G''_{infinite} was decreased to a lesser extent (data not shown) the ratio between viscous and elastic fraction of the hydrogel, designated as $\tan \delta_{\text{infinite}}$, increased with increasing HCl concentration (Fig. 2B). The gel became softer and more liquid-like. Acetylation with acetic acid anhydride (AAH) was

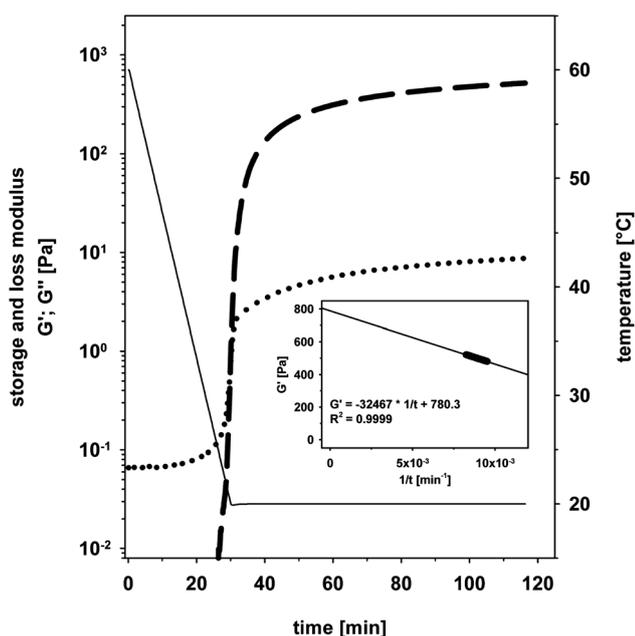


Fig. 1 Storage modulus G' (---) and loss modulus G'' (···) of a 4% (w/v) untreated gelatin-FFSs at a definite temperature profile (—). Time of sol-gel transition was determined when $G' = G''$. The inset shows the extrapolation to G'_{∞} .

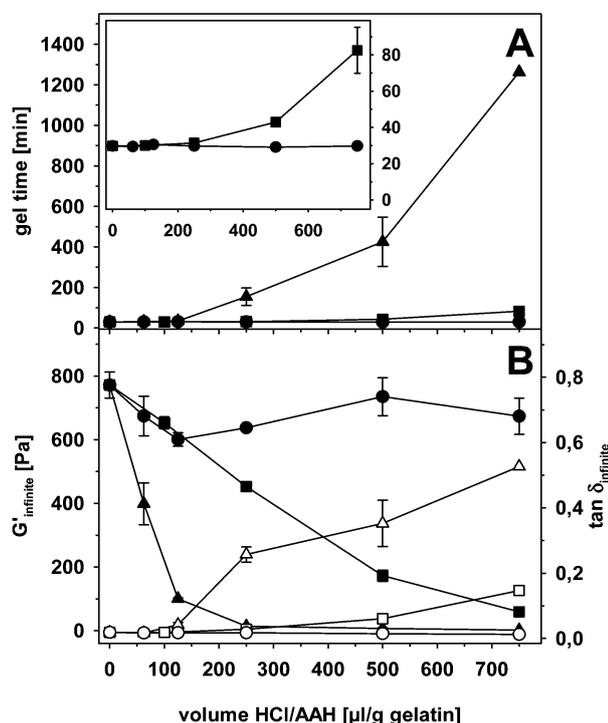


Fig. 2 Gel properties (A—gel time; B— G'_{∞} (full symbols) and $\tan \delta_{\infty}$ (open symbols)) of HCl hydrolyzed (—■—) and acetylated (—▲— pH 7; —●— pH 2) gelatin FFSs. The inset shows the same graph enlarged for small gel time.

performed at pH 2 and pH 7, respectively. Whilst acetylation at pH 7 strongly affected gel time and properties of the resulting hydrogel, reaction of FFS with increasing AAH concentrations

at pH 2 had absolutely no impact. There was neither an increase of gel time and $\tan \delta_{\infty}$ nor a decrease of G'_{∞} (Fig. 2). The gelation of gelatin solutions upon cooling has been elucidated with the reorientation of the protein coils to triple helices reminiscent of native collagen.¹⁷ These collagen-like sequences or junction zones are separated by regions of single chains assembling a fibrous thermally reversible network.²⁵ Hydrolyzation prevented renaturation of triple helices due to the shortening of protein chains. However, in the present study the extent of cleaved peptide bonds had to be low since there was no significant increase of primary amino groups as determined *via* *o*-phthaldialdehyde and ninhydrin reaction, respectively (data not shown). On the other hand, acetylation of gelatin at pH 7 inhibited the formation of junction zones, too. Incubation of gelatin solutions with AAH modifies hydroxyl groups of hydroxyproline²⁶ changing the steric and stereo-electronic properties of this important secondary amino acid.²⁷ Furthermore AAH is able to react with α -amino groups of proteins and peptides, and the ϵ -amino group of lysine and hydroxylysine. This reaction depends on pH. Because of protonation of amino groups at pH 2, exclusively hydroxyl groups of hydroxyproline are modified whilst at pH 7, additionally the ϵ -amino groups of lysine are acetylated. This notion is further supported by the pI of type A-gelatin which ranges between 7.5 and 9.3. Only at increased pH approaching the pI the more nucleophilic amino structures become available for the reaction with acetic acid anhydride. Acetylation of lysine leads to significant changes in electrostatic interactions and thus hinders the formation of renaturated collagen sequences. As a consequence in the present study AG modification of lysine at pH 7 dramatically increased gel time and the viscous fraction, and softened the resulting gel (Fig. 2). This important impact of lysine on the formation of junction zones and the visco-elastic properties of hydrogels is in line with the findings of Persikov *et al.*²⁸ Their research on the triple-helix stability of collagen identified lysine as an important amino acid for electrostatic interactions. On the other hand, acetylation at pH 2, with modification of especially hydroxyproline, hardly impacted triple helices formation in gelatin FFSs.

3.2. Modification of FFSs by glyoxal

In our previous work the α -dicarbonyl compound glyoxal was used as a chemical crosslinker to generate gelatin biopolymer films with enhanced mechanical properties.⁹ In the present work this concept of chemical crosslinking was applied to selected pretreated FFSs (HG and AG) and compared with the untreated gelatin (UTG) solution. The respective FFSs were heated to 60 °C. Glyoxal was added and the solutions kept at this temperature for further 15 minutes. Subsequently, the rheological behavior was determined as described above. For better comparison between different FFSs the gel parameters were normalized to values without glyoxal (Fig. 3). The infinite storage modulus (G'_{∞}) of untreated gelatin (UTG) was decreased with increasing glyoxal concentration (Fig. 3A and Table 2).

This must be explained by the formation of monovalent modifications of amino acid residues, especially of lysine and arginine in protein chains, resulting in hindered formation of a physical network with lower gel strength. Van den Bulcke *et al.*

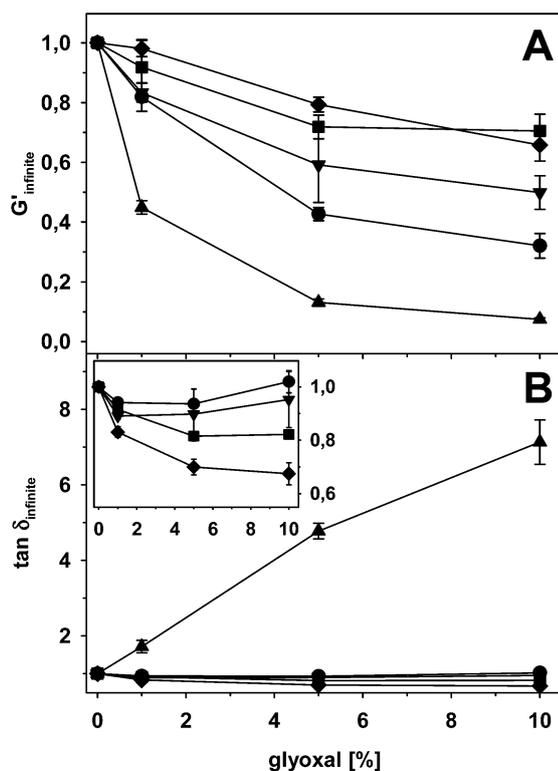


Fig. 3 Gel properties (A— G'_{infinite} ; B— $\tan \delta_{\text{infinite}}$) of untreated (— \blacklozenge —) and pretreated gelatin FFS (— \blacksquare —250 μl HCl per g gelatin; — \blacktriangledown —500 μl HCl per g gelatin; — \blacktriangle —pH 7 125 μl AAH per g gelatin; — \bullet —pH 2 125 μl AAH per g gelatin) after reaction with glyoxal at 60 °C for 15 minutes. The inset shows the same graph enlarged for small $\tan \delta_{\text{infinite}}$. All values were normalized to uncrosslinked FFS.

showed that an enhanced modification of ϵ -amino lysine groups in gelatin hydrogels with methacrylamide also decreased G' modulus.¹⁸ However in contrast to the experiments without glyoxal, the ratio between viscous and elastic fraction of the gel only increased for AG-pH 7 gelatin solutions, but decreased for all other conditions as well as for UTG-gelatin (inset of Fig. 3B). This decreasing $\tan \delta_{\text{infinite}}$ effect was already observed in enzymatically crosslinked gelatin hydrogels and was elucidated by the formation of additional covalent crosslinks between protein chains to make the gel network more flexible and resonant.^{16,17} At the same time enzymatic crosslinking with transglutaminase prior to physical gelation increases the storage modulus G' .²⁹

This suggests that modification with glyoxal first of all resulted in an extensive formation of monovalent amino acid modifications to affect the properties of the resulting gel. Nevertheless, reaction of UTG-FFS with glyoxal led to covalent crosslinks improving the elastic character of the protein network (inset of Fig. 3B). In contrast to UTG-FFS, when adding 5% glyoxal to a HG-FFS hydrolyzed with 250 μl HCl per g gelatin or 500 μl HCl per g gelatin gel time was extended by 19% and 29%, respectively (Table 2) which means that the reassembling of triple helices was hindered and the mobility of protein chains was enhanced. Increasing glyoxal concentration decreased G'_{infinite} to the same extent as UTG-FFS (Fig. 3A). However, the decrease of $\tan \delta_{\text{infinite}}$ with increasing glyoxal concentration was less pronounced in HG-FFS than in UTG-FFS (inset of Fig. 3B) suggesting minor formation of covalent bonds contributing to the elastic character of the gel network. To summarize these results, glyoxal modification affected gel properties at infinite time but increased time of gel formation only in pretreated gelatin. It can be assumed that the velocity of network formation was only decreased by modification of amino acid side chains when the gelling process was already inhibited (Fig. 2 and Table 2).

The reaction of acetylated gelatin with glyoxal also affected gel time and gel properties at infinite time. As shown in Table 2 gel time was increased by 17% for AG-pH 2 modified with 5% glyoxal whilst gel time of AG-pH 7 was increased by 60%. Additionally, G'_{infinite} decreased with increasing glyoxal concentration. Here, film forming solutions acetylated at pH 7 showed a larger decrease (Fig. 3A). Major differences between different pre-acetylated FFSs are shown in Fig. 3B. The ratio of viscous and elastic fraction in AG-pH 2-FFS was barely varied by glyoxal addition. On the other hand, $\tan \delta_{\text{infinite}}$ of AG-pH 7-FFS significantly increased with increasing glyoxal concentration. The gel became softer and the liquid character was more pronounced. Obviously, glyoxal reacted with the remaining unacetylated lysine residues to form monovalent modifications and prevented triple-helix re-orientation and formation of junction zones, respectively. In AG-pH 2-FFS there were a major part of unacetylated lysine residues available to form bivalent crosslinks like GOLD enhancing the elastic character of the gel.

3.3. Physical and chemical properties of gelatin films

The impact of different pretreated FFSs on the physical and chemical properties of gelatin films was exemplarily determined

Table 2 Gelling properties of FFSs is dependent on pretreatment with 250 μl HCl g^{-1} and 500 μl HCl g^{-1} gelatin (HG) and 125 μl AAH g^{-1} gelatin (AG—acetylation was performed at pH 2 and pH 7, respectively) and subsequent crosslinking with 5 wt% glyoxal

FFS	Glyoxal (%)	Gel time/min	$G'_{\text{infinite}}/\text{Pa}$	$G'_{\text{infinite}}/\text{Pa}$	$\tan \delta_{\text{infinite}}$
UTG	0	29.9	771	14	0.018
	5	30.4	598	8	0.013
HG-250	0	33.2	467	12	0.025
	5	39.5	335	7	0.020
HG-500	0	44.9	233	11	0.049
	5	59.5	141	6	0.044
AG-pH 2	0	29.7	676	11	0.016
	5	34.8	288	4	0.015
AG-pH 7	0	34.5	142	5	0.036
	5	81.2	18	4	0.169

for films crosslinked with 5 wt% glyoxal relative to gelatin (Table 3). Swelling behaviors were accessed by storing pieces of gelatin films in water under defined conditions and subsequent differential weighing. The water solubility was determined by drying the same specimen. Since lysine and arginine are the main targets for reaction with glyoxal chemical analysis was focused on the determination of these amino acids and their quantitatively most important modifications *N*^ε-carboxymethyllysine (CML), glyoxal derived lysine dimer (GOLD) and 5-(2-imino-5-oxo-1-imidazolidinyl)norvaline (imidazolinone). The contents of amino acid modifications were related to the respective amino acid concentration of gelatin films produced without glyoxal.

Water solubility of gelatin films produced after partial hydrolyzation with HCl (Table 3, HG-FFS) and subsequent crosslinking with glyoxal was increased. With stronger hydrolyzation (HG-500), additionally the water absorption was increased, too. The possibility to incorporate water into the protein network is defined by its density and hydrophilic properties. On the one hand, the network density is affected by the triple-helix content. Bigi *et al.* correlated the triple-helix content of gelatin films with swelling ability and solubility.¹⁵ Films with a high Bloom value and a high renaturation level possessed reduced water absorption. Since the triple-helix content of the hydrogel is the prerequisite for the renaturation level of films, the rheological parameters directly correlate with swelling behavior.

Therefore as shown in Table 2 and Fig. 2, the decrease of G'_{infinite} and increase of $\tan \delta_{\text{infinite}}$ with enhanced hydrolyzation predefined the increase of water absorption of films. On the other hand, network density is also affected by chemical crosslinks. In the previous work water absorption and weight loss were reduced with increasing crosslinking *via* glyoxal.⁹ Therefore, the resulting crosslink GOLD should have decreased with increasing hydrolyzation. In contrast, GOLD formation was significantly intensified compared to untreated FFS (Table 3). This contradiction can be elucidated with increased mobility of protein chains in HG-FFS (Table 2) associated with extended gel times. This easier accessibility of ϵ -amino lysine residues leads to enhanced inter- and intramolecular peptide-GOLD formation. However, low molecular crosslinked gelatin fragments are not involved in the gel network and are presumably easily dissolved during water storage. This assumption was further supported by a smaller decrease of $\tan \delta_{\text{infinite}}$ and an increased water solubility in HG-250-FFS compared to UTG-FFS (inset of Fig. 3B and Table 3). Additionally, with increased hydrolyzation the ratio between the

monovalent lysine modification CML and the bivalent crosslink GOLD changed from 51 : 1 for UTG film to 25 : 1 for HG films. CML is the major lysine modification in glyoxal crosslinked gelatin films⁹ and is mainly responsible for the decrease of G'_{infinite} of glyoxal modified FFSs (Fig. 3). CML formation was only influenced at high HCl concentrations. CML in HG-500 films compared to UTG films was reduced by 23% (Table 3) and must be explained by competitive reactions of glyoxal with an increased pool of α -amino groups. This effect was also valid for imidazolinone which is the only analytically determinable arginine modification after protein total hydrolysis.^{9,20}

The physical and chemical properties of films produced from acetylated gelatin correlated with the rheological behavior of film forming solutions, too. Swelling and solubility of crosslinked gelatin films were also affected by the pH of acetylation (Table 3). In general, water absorption and weight loss of AG-pH 2 films were lower compared to AG-pH 7 films. Additionally, lysine modification of CML and GOLD in AG-pH 7 films was also significantly reduced. Acetylation at higher pH values leads to blockage of especially lysine and prevents subsequent modification by glyoxal. Thus, in AG-pH 7 films acetylated with 62.5 μl AAH g^{-1} only 48% CML and 82% GOLD related to UTG films were determined. Furthermore, in films pretreated with 125 μl AAH g^{-1} only traces of CML and no GOLD were detectable and films totally dissolved during water storage. This is expected, as acetylation under these conditions will lead to almost complete derivatization of ϵ -amino lysine residues. As a result of no crosslinking FFSs were high in viscous fraction (Fig. 3B) and films were soluble reminiscent of native UTG gelatin. In support with increased lysine acetylation whether initiated through AAH concentration (AG-pH 2) or acetylation conditions (AG-pH 7), the reaction with glyoxal led to increased arginine modifications *i.e.* imidazolinone (Table 3). Interestingly at AG-pH 2, the water absorption of gelatin films decreased with increasing AAH concentration. This strongly suggests that preferred acetylation of hydroxyl groups paralleled by crosslinking of lysine residues by glyoxal (GOLD) significantly increased the stability of the resulting hydrogels.

3.4. Barrier properties of gelatin films

In addition to mechanical characteristics the gas barrier properties of biopolymer films are important parameters for future

Table 3 Physical and chemical properties of gelatin films obtained from different pretreated film forming solutions and crosslinked with 5 wt% glyoxal (relative to gelatin)

FFS	Physical parameters			Chemical parameters		
	(HCl/AAH ^a)/ μl g^{-1}	Water absorption (%)	Weight loss (%)	CML/mmol mol^{-1} lysine	GOLD/mmol mol^{-1} lysine	Imidazolinone/mmol mol^{-1} arginine
UTG	—	392	13	242	4.7	414
HG	250	341	31	247	10.2	404
	500	538	44	186	7.2	383
AH-pH 2	62.5	223	22	229	12.3	397
	125	177	28	202	9.8	456
AH-pH 7	62.5	710	30	116	3.9	490
	125	Dissolved	Dissolved	Traces	n.d. ^b	491

^a Relative to gelatin. ^b Not detectable.

applications. In Fig. 4 the water vapor permeability (WVP) and oxygen permeability of gelatin films of different pretreated FFSs are shown in relation to chemical modification by glyoxal (grey bars).

The process of permeation involves the thermodynamic dissolution of permeant molecules and the subsequent diffusion through the film. Both mechanisms are affected by the nature of macromolecules, degree of crosslinking, crystallinity, orientation and free volume of the protein network.^{30,31} Furthermore, permeability depends on membrane porosity, surface absorption, relative humidity and the usage of plasticizers. Additionally, chemical modification restricts the ability of aggregates to relax and to shift their structure, and results in a hindered diffusion of water molecules.³² In the present study this effect was observed when UTG-FFSs were chemically modified with 5 wt% glyoxal.

WVP decreased to about 50% (Fig. 4A). This is in line with the findings of de Carvalho and Grosso⁶ and Hernandez-Munoz *et al.*,³² reporting on decreased WVP of biopolymer films in relation to increased crosslinking by transglutaminase and glyoxal, respectively. Because of brittleness, films obtained from partially hydrolyzed gelatin had to be plasticized with 20% glycerol related to gelatin. As an immediate effect the WVP of uncrosslinked UTG was increased by about 30% with addition of the plasticizer and differences in glyoxal modification were

almost depleted. Several investigations confirm these findings.^{3–5} Incorporation of hygroscopic plasticizers into the protein matrix increases the free volume of the system and the network becomes less dense. Additionally, because of the hygroscopic character of the plasticizer the water content of the film was increased and the moisture barrier was further reduced.³³ WVP was increased with partial hydrolysis of gelatin using higher concentration of HCl (HG-500). As described above, with increasing HCl concentration during the preparation of FFS the physical network of the gel became weaker and more liquid like (Fig. 2). This structural property was sustained in the resulting films. Hydrolysis led to a porous network with improved water diffusion associated with enhanced water absorption and solubilities (Table 3).

In contrast to hydrolyzation, acetylation of gelatin with AAH hardly affected WVP (Fig. 4A). Compared to UTG films, there was only a slight increase. Whilst WVP of AG-pH 7 films increased significantly with increasing AAH concentration, films produced from AG-pH 2-FFSs did not change their moisture permeability. As mentioned above, acetylation at pH 2 mainly modified hydroxyl groups of hydroxyproline and hydroxylysine. Acetylation of these amino acids obviously had a marginal influence on the WVP (Fig. 4A) but a significant impact on the swelling properties (Table 3) of glyoxal cross-linked biopolymer films. In contrast, acetylation of amino groups at pH 7 increased the viscous portion of the thermoreversible gel (Fig. 2). As with HCl this correlates with a more porous design of the film accompanied with an increase of WVP.

In the literature, an increase of oxygen permeability with increased covalent crosslinking of gelatin chains with transglutaminase³¹ and glutaraldehyde,³⁴ respectively, was reported before. Yi *et al.* elucidated the loss of oxygen barrier properties with reduced formation of triple-helix structures associated with decreased crystallinity caused by new intra- and intermolecular covalent bonds.³¹ This is in contrast to data depicted in Fig. 4B, where crosslinking of gelatin by glyoxal did not have a significant effect. However as for WVP, hydrolyzation of gelatin also increased oxygen permeability. Taken together for HG-FFSs this means that low G' and high $\tan \delta_{\text{infinite}}$ result in films of high WVP and oxygen permeability. For acetylated gelatin films there were no significant differences in oxygen permeability.

4. Conclusion

In conclusion, our investigations clearly support the relationship of gelation behavior of film forming solutions (FFSs) to chemical, barrier and physical properties of resulting films. The rheological properties of FFSs, determined with small-strain oscillatory measurements, were affected by pretreatment of gelatin by hydrolyzation and acetylation as well as by subsequent crosslinking *via* the reactive α -dicarbonyl glyoxal. Additionally, rheological measurements allowed insights into the molecular mechanisms of gelation and possibilities of targeted manipulation. Analysis of chemical and physical parameters of resulting gelatin films confirmed the results from hydrogel characterization and provided additional information about the protein network. The present study thus provides tools to affect the technology of gelatin film production. Skillful pretreatment of gelatin modifies the gelling process; chemical crosslinking reduces the permeability of the final film.

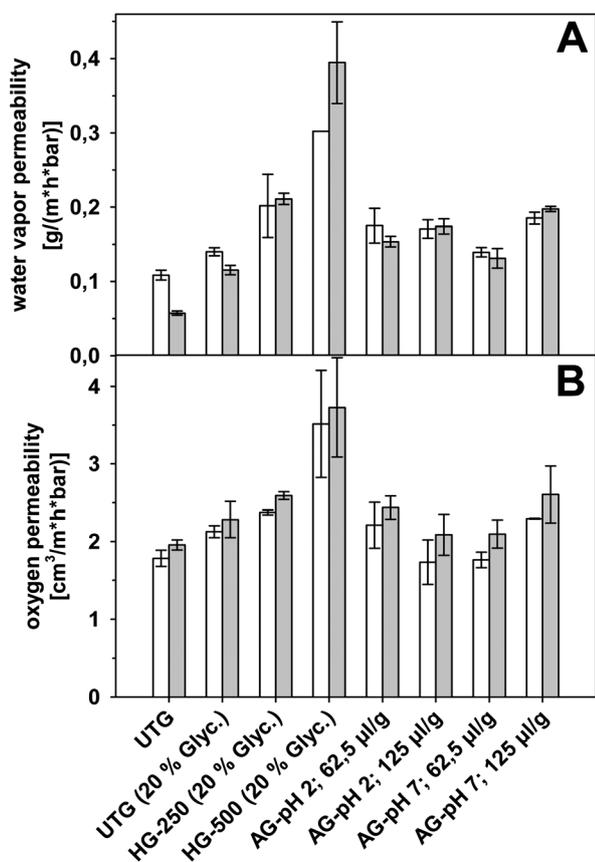


Fig. 4 Barrier properties (A—water vapor permeability $P_{\text{H}_2\text{O}}$ in $\text{g h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$; B—oxygen permeability P_{O_2} in $\text{cm}^3 \text{h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{bar}^{-1}$) of untreated (UTG) and different pretreated gelatin films (HG, AG). Grey bars show barrier properties after 5 wt% glyoxal modification.

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the FACHAGENTUR FÜR NACHWACHSENDE ROHSTOFFE e.V., FKZ 07NR103 (22010307), BMELV/Germany. The authors would like to thank Gesche Graf and Prof. Dr Alfred Blume, Institute of Chemistry—Physical Chemistry, for the use of their rheometer and assistance to interpret dynamic rheological measurements.

References

- 1 M. N. Antoniewski and S. A. Barringer, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2010, **50**, 644.
- 2 G. A. Digenis, T. B. Gold and V. P. Shah, *J. Pharm. Sci.*, 1994, **83**, 915.
- 3 N. Cao, X. M. Yang and Y. H. Fu, *Food Hydrocolloids*, 2009, **23**, 729.
- 4 A. Jongjareonrak, S. Benjakul, W. Visessanguan and M. Tanaka, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, **222**, 229.
- 5 F. M. Vanin, P. J. A. Sobral, F. C. Menegalli, R. A. Carvalho and A. M. Q. B. Habitante, *Food Hydrocolloids*, 2005, **19**, 899.
- 6 R. A. de Carvalho and C. R. F. Grosso, *Food Hydrocolloids*, 2004, **18**, 717.
- 7 A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, N. Roveri and K. Rubini, *Biomaterials*, 2002, **23**, 4827.
- 8 A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini and N. Roveri, *Biomaterials*, 2001, **22**, 763.
- 9 R. Spanneberg, F. Osswald, I. Kolesov, W. Anton, H. J. Radusch and M. A. Glomb, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3580.
- 10 K. Limpisophon, M. Tanaka, W. Y. Weng, S. Abe and K. Osako, *Food Hydrocolloids*, 2009, **23**, 1993.
- 11 M. S. Hoque, S. Benjakul and T. Prodpran, *J. Food Eng.*, 2010, **96**, 66.
- 12 C. Joly-Duhamel, D. Hellio and M. Djabourov, *Langmuir*, 2002, **18**, 7208.
- 13 C. Joly-Duhamel, D. Hellio, A. Ajdari and M. Djabourov, *Langmuir*, 2002, **18**, 7158.
- 14 K. T. Nijenhuis, *Thermoreversible Networks—Viscoelastic Properties and Structure of Gels*, Springer-Verlag, Berlin, 1st edn, 1997.
- 15 A. Bigi, S. Panzavolta and K. Rubini, *Biomaterials*, 2004, **25**, 5675.
- 16 H. Babin and E. Dickinson, *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**, 271.
- 17 S. Giraudier, D. Hellio, M. Djabourov and V. Larreta-Garde, *Biomacromolecules*, 2004, **5**, 1662.
- 18 A. I. Van den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen and H. Berghmans, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 31.
- 19 M. A. Glomb and C. Pfahler, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 41638.
- 20 M. A. Glomb and G. Lang, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 1493.
- 21 Deutsches Institut für Normung, DIN 53 122-1, 2001.
- 22 Deutsches Institut für Normung, DIN 53 536, 1992.
- 23 Deutsches Institut für Normung, DIN 53 380-3, 1998.
- 24 I. J. Haug, K. I. Draget and O. Smidsrød, *Food Hydrocolloids*, 2004, **18**, 203.
- 25 L. Guo, R. H. Colby, C. P. Lusignan and A. M. Howe, *Macromolecules*, 2003, **36**, 10009.
- 26 J. Bello and J. R. Vinograd, *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, **78**, 1369.
- 27 M. D. Shoulders and R. T. Raines, *Annu. Rev. Biochem.*, 2009, **78**, 929.
- 28 A. V. Persikov, J. A. M. Ramshaw, A. Kirkpatrick and B. Brodsky, *Biochemistry*, 2005, **44**, 1414.
- 29 D. Hellio-Serughetti and M. Djabourov, *Langmuir*, 2006, **22**, 8516.
- 30 K. S. Miller and J. M. Krochta, *Trends Food Sci. Technol.*, 1997, **8**, 228.
- 31 J. B. Yi, Y. T. Kim, H. J. Bae, W. S. Whiteside and H. J. Park, *J. Food Sci.*, 2006, **71**, 376.
- 32 P. Hernandez-Munoz, A. Kanavouras, J. M. Lagaron and R. Gavara, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 8216.
- 33 P. J. A. Sobral, F. C. Menegalli, M. D. Hubinger and M. A. Roques, *Food Hydrocolloids*, 2001, **15**, 423.
- 34 B. S. Chiou, R. J. Avena-Bustillos, P. J. Bechtel, H. Jafri, R. Narayan, S. H. Imam, G. M. Glenn and W. J. Orts, *Eur. Polym. J.*, 2008, **44**, 3748.

Beschreibung der Methoden zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Folien im Rahmen des Projektes zum Thema:

„Multifunktionale, sprühfähige und biologisch abbaubare Folien auf Basis nachwachsender Rohstoffe im landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzenbau“

Bearbeiter: Dr. Igor Kolesov, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Zentrum für Ingenieurwissenschaften, Professur für Kunststofftechnik

Alle unten skizzierten Versuche sollen mit Hilfe der Zugprüfmaschine Zwick 1425 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm) durchgeführt werden. Als Ergebnis der Messungen werden die Kraft-Verformungs-Diagramme ermittelt auf deren Basis die relevanten Kennwerte berechnet werden.

1. Zugversuch (Spannungs-Dehnungs-Diagramme)

Der Zugversuch wird in Anlehnung an die DIN-Norm „Kunststoffe, Bestimmung der Zugeigenschaften, speziell Teil 3: Prüfbedingungen für Folien und Tafeln (EN ISO 527-3)“ realisiert. Als Prüfkörper werden 10 mm breite Streifen (Probekörper Typ 2) mit einer Dicke von ca. 0,7 mm eingesetzt. Der Anfangsabstand der Einspannklemmen und einer Traversengeschwindigkeit betragen jeweils 70 mm bzw. 50 mm/min.

Für die Bestimmung des Elastizitätsmoduls (E-Moduls) beträgt die Traversengeschwindigkeit im Anfangsbereich (Dehnung von 0,5% bis 2,5%) nur 1 mm/min. Da es sich um steife und dünne Folien mit einer sehr glatten Oberfläche handelt, werden die Versuche mit rutschfesten Spannklemme und ohne Wegaufnehmer durchgeführt. Ein Beispiel der ermittelten Spannungs-Dehnungs-Diagramme und deren Auswertung ist im Bild 1 dargestellt.

Die wichtigsten Kennwerte, die aus dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm ermittelt werden, sind:

- E-Modul (E) (Steigung der Abhängigkeit der Spannung von Dehnung im Bereich kleiner Dehnungen (ca. 1%)
- Bruch- oder Reißdehnung (ε_R) (Grenzdehnung bei der die Probe zerstört wird)
- Bruch- oder Reißspannung (σ_R) (Spannungswert bei maximaler Dehnung ε_R erreicht)
- Streckgrenze (zeigt sich bei spröden und hochkristallinen Kunststoffen als ein scheinbarer Peak im Spannungs-Dehnungs-Diagramm; Einschnürung der Probe beginnt).

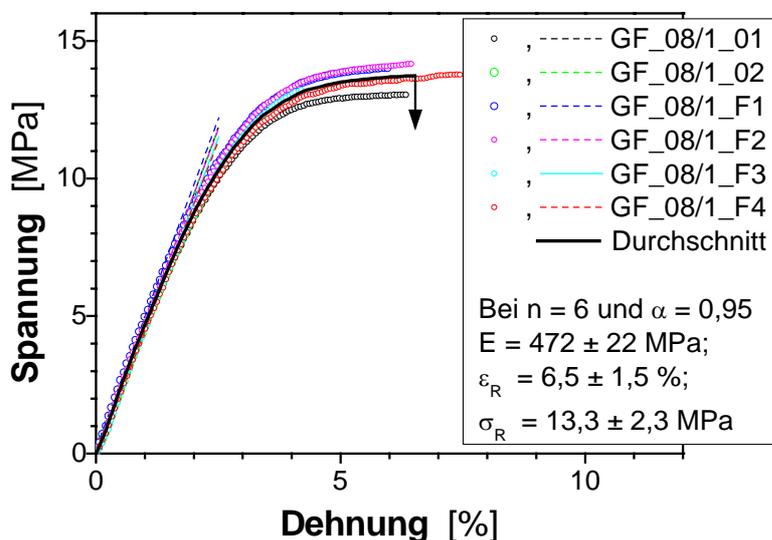


Bild 1. Typische Spannungs-Dehnungs-Diagramme einer biologisch abbaubaren Folie auf Basis von Gelatine.

2. Instrumentierter Durchstoßversuch

Der instrumentierte Durchstoßversuch nach DIN EN ISO 6602-3 bzw. ISO 7765-2 wird zur Bestimmung des mehrachsigen Stoßverhaltens von festen Kunststoffen bzw. Folien verwendet. Für die experimentelle Durchführung wird normalerweise das Fallwerk mit einer Auswahl an Stoßkörpern genutzt.

Der instrumentierte Durchstoßversuch stellt eine messtechnische Erweiterung des konventionellen Durchstoßversuches dar und wird angewendet, wenn für die Charakterisierung ein Kraft-Verformungs-Diagramm bzw. Messgrößen aus diesem Diagramm erforderlich sind. Die Aufzeichnung der Kraft-Verformungs-Diagramme wird durch die Instrumentierung des Stoßkörpers ermöglicht.

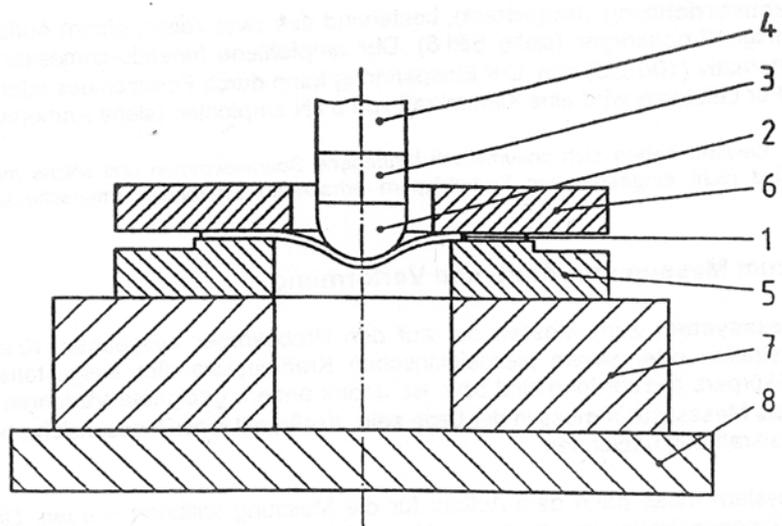
Während der Prüfung wird eine Folie, die zwischen zwei Einspannringen mit einem Innendurchmesser von 4 cm befestigt ist (siehe Bild 2 **a** und **b**), senkrecht zu seiner Oberfläche bei konstanter Geschwindigkeit mit dem Stoßkörper durchstoßen und gleichzeitig das Kraft-Verformungs-Diagramm aufgezeichnet. Dieses Diagramm wird herangezogen, um das Werkstoffverhalten unter Stoßbeanspruchung zu bewerten. Es kann anhand der Diagrammform (siehe Bild 3) spröde, zähe oder sehr zähe Brüche voneinander unterschieden werden.

Nach DIN-Norm soll sich der Stoßkörper mit einer Geschwindigkeit von 4,4 mm/s (264 mm/min) bewegen. Dabei soll der Stoßkörper eine polierte, halbkugelförmige Stoßfläche mit einem Durchmesser von 20 bzw. 10 mm haben. Unter Berücksichtigung der Wachstumsgeschwindigkeit und der Form der Spitze des Unkrautes lässt sich schlussfolgern, dass die nach DIN-Norm festgelegten Parameter weit von den realen, zu simulierenden Bedingungen entfernt sind. In diesem Zusammenhang ist die Geschwindigkeit und Form des Stoßkörpers zu diskutieren (z.B. Geschwindigkeit von 1 mm/min und kegelförmiger Stoßkörper, deren Spitze mit einem Durchmesser von 1 mm abgerundet ist).

Vergleiche zwischen den einzelnen Werkstoffen können bei diesem Verfahren nur gemacht werden, wenn die Prüfkörperherstellung, Prüfkörperabmessungen, Oberflächenbeschaffenheit und Prüfbedingungen vergleichbar sind. Insbesondere die Foliendicke spielt hier eine sehr wichtige Rolle. Im Ergebnis des Durchstoßversuches können als wichtige Ergebnisse die Mittelwerte folgender Messgrößen angegeben werden:

- Maximalkraft F_M ,
- Maximalverformung l_M ,
- Energie bis zur Maximalkraft E_M .

a



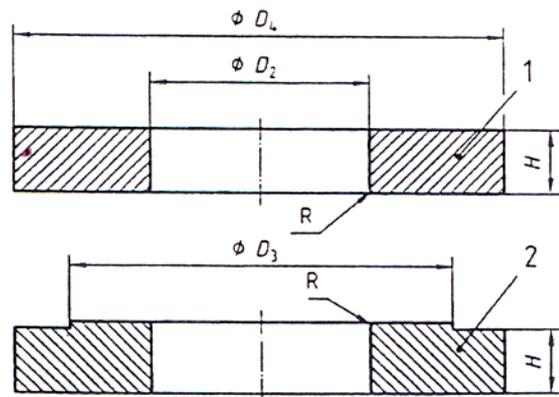
Legende

- | | | | |
|---|---|---|------------------------------|
| 1 | Probekörper | 5 | Probekörperauflage |
| 2 | Stoßkörper mit halbkugelförmiger Spitze | 6 | Einspannring (freigestellt) |
| 3 | Kraftmessdose (bevorzugte Anordnung) | 7 | Grundplatte |
| 4 | Schaft | 8 | Schalldämmung (freigestellt) |

b

Maße in Millimeter

Art des Probekörpers	Seite von Quadrat oder Scheibendurchmesser	
	60	140
D_2	40 ± 2	100 ± 5
D_3	60	140
D_4	≥ 90	≥ 200
H	12	12
R	1	1



Legende

- | | |
|---|-----------------------------|
| 1 | Einspannring (freigestellt) |
| 2 | Probekörperauflage |

Bild 2. Beispiel einer Prüfeinrichtung (a) und Einspannvorrichtung (b).

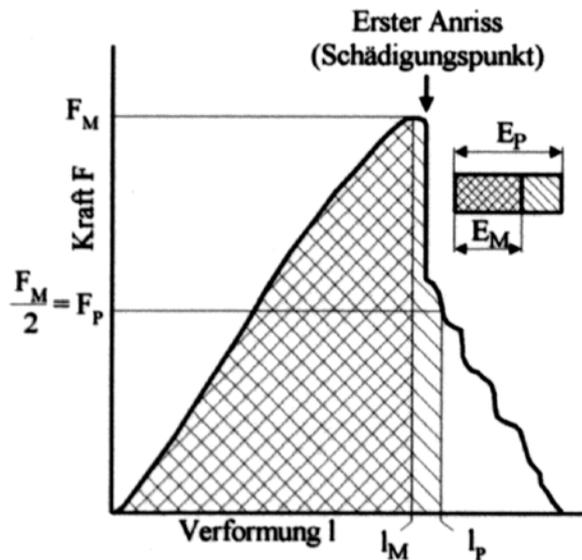


Bild 3. Schematische Darstellung eines Diagramms aus dem instrumentierten Durchstoßversuch mit typischen Messgrößen F_M - Maximalkraft, l_M - Maximalverformung, E_M - Energie bis zur Maximalkraft, E_P - Durchstoßenergie (entspricht Fläche unter der Kurve bis zum Kraftwert F_P ($F_P = F_M/2$))

3. Weiterreißversuch

Eine in der Praxis bewährte Methode zur Charakterisierung des Reißverhaltens von Folien stellt die Bestimmung des Weiterreißwiderstandes T_S unter quasistatischen Versuchsbedingungen dar.

Für diese Prüfungen kann die oben erwähnte Universalprüfmaschine Zwick 1425 eingesetzt werden. Zur Ermittlung der Weiterreißwiderstandes werden nach DIN 53363 Trapezprüfkörper verwendet (siehe Bild 4), die mittig über einen Einschnitt verfügen, von dem aus durch die wirkende Kerbspannung der Reißprozess initiiert wird. Die Länge L dieser Trapezprüfkörper an der langen Seite beträgt 120 mm, die Breite W 50 mm.

Während der Beanspruchung des Prüfkörpers wird das Kraft-Verlängerungs-Diagramm (Beispiel siehe Bild 5) aufgezeichnet.

Der Weiterreißwiderstand T_S wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$T_S = F / B$$

F - Maximalkraft bzw. Median der Kraft

B - Prüfkörperdicke

In Abhängigkeit vom Werkstoffverhalten wird für F das Maximum der Kraft (wie im Bild 5 a gezeigt) oder der Median der Kraft aus dem Kraft-Zeit- bzw. Kraft-Verlängerungs-Diagramm verwendet. Der mit dieser Methode ermittelte Kennwert lässt jedoch nur relative Vergleiche zwischen verschiedenen Werkstoffen zu. Er ist bei Kunststoffen insbesondere abhängig von:

- der Werkstoffgüte und dem Behandlungszustand,
- der Vorzugsrichtung infolge des Verarbeitungsprozesses bei Thermoplasten,
- der Vulkanisationsdauer bei Elastomeren und
- der Prüftemperatur und der Verformungsgeschwindigkeit

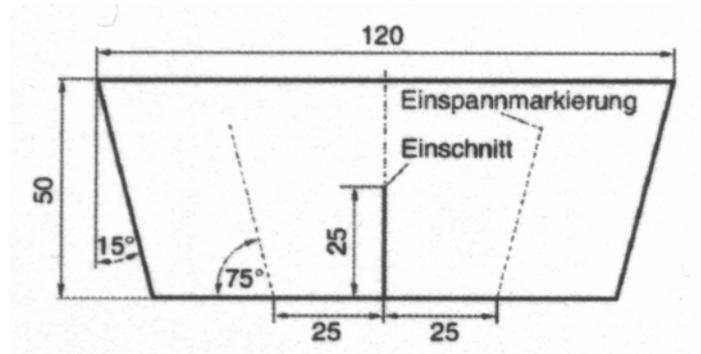


Bild 4. Trapezprüfkörper für den Weiterreißversuch nach DIN 53363

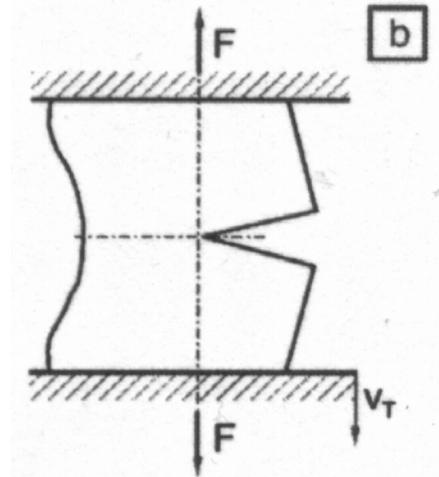
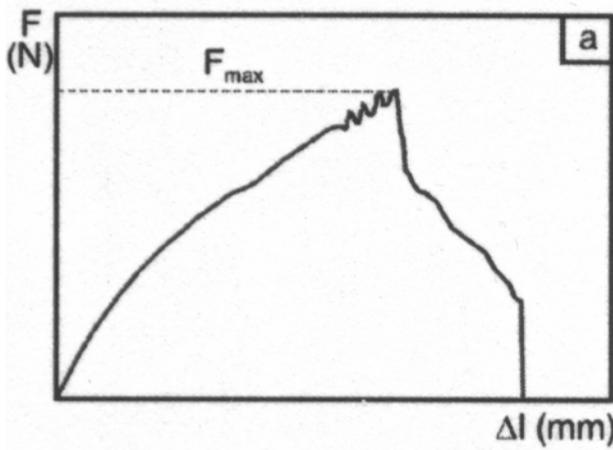


Bild 5. Typisches Kraft-Verlängerungs-Diagramm einer PA-Folie (a) und eingespannter Trapezprüfkörper (b).

Instrumentierter Durchstoßversuch

DIN EN ISO 6603-2 „Kunststoffe. Bestimmung des Durchstoßverhaltens von festen Kunststoffen. Teil 2: Instrumentierter Schlagversuch“

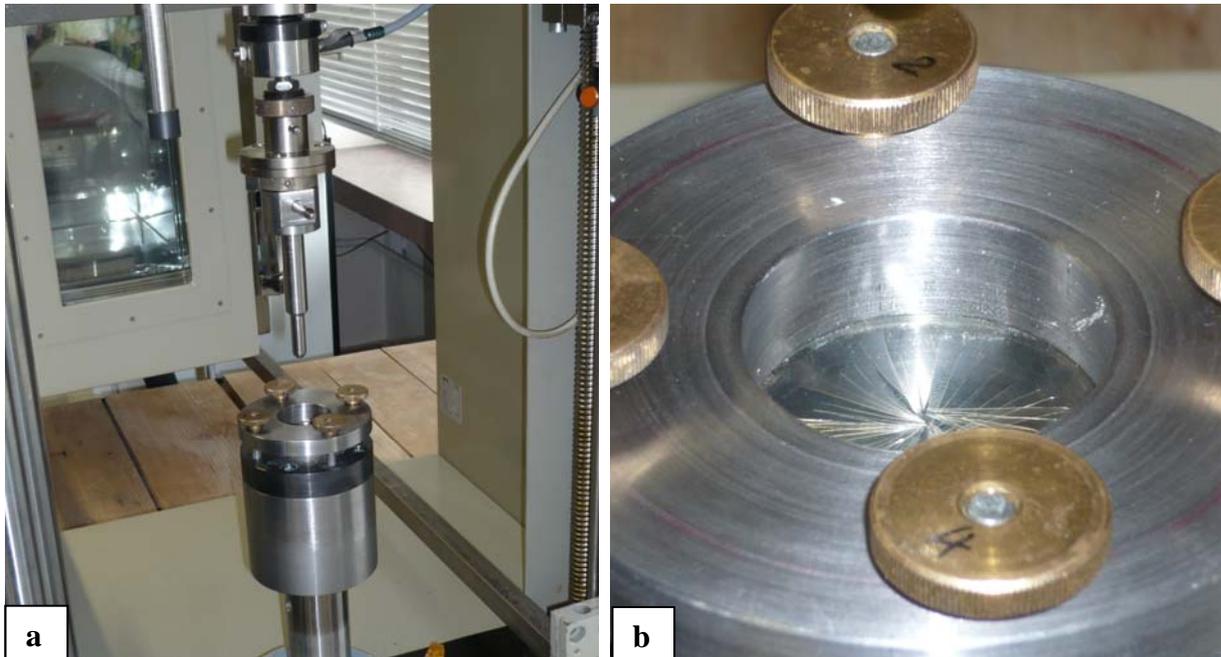


Abb. 1. Versuchsanordnung – Probenhalter (unten) und Standard-Stoßkörper (oben) - (a) sowie die durchgestoßene Probe im Probenhalter (b).

Spannringsen mit einem Innendurchmesser von 40 mm

Standard-Stoßkörper: polierte halbkugelförmige Stoßfläche
mit einem Durchmesser von 10 mm

Traversengeschwindigkeit von 1 mm/min

Anlage: Zugwerte von Gelatine-Folien

Probe	Verarbeitung	E-Modul	Bruchspannung	Bruchdehnung
		MPa	MPa	%
Unvernetzte Proben mit 6 g Wasser je g Gelatine				
GelFol1_1	Magnetrührer	3075±586	93,8±21,3	3,25±1,37
GelFol5_0	Blattrührer 100 1/s	2198±980	92,1±16,7	5,97±2,82
GelFol5_0T	GelFol5_0 getrocknet	3125±1342	160,7±18,5	5,44±2,45
Unvernetzte Proben mit 12 g Wasser je g Gelatine				
GelFol1_4	12 g, Magnetrührer	2853±464,9	55,1±28,3	1,84±0,99
GelFol6_0 1)	Blattrührer 100 1/s	2461±1236	92,1±5	3,53±1,13
GelFol6_0	GelFol getrocknet	2207±1629	131,7±7,1	3,97±0,49
GelRheo1_0	Blattrührer 200 1/s	4005±582	90,6±24,3	3,88±1,89
GelRheo1_0T	GelRheo1_0 getrocknet	3319±541	100±5,5	5,43±1,15
Unvernetzte Proben mit 25 g Wasser je g Gelatine				
GF2_08/1 1)	Magnetrührer	3755±69	119,6±4,3	6,02±1,59
GF3_08/1	Magnetrührer	3342±1431	121,2±2,2	5,58±1,41
GelRheo2_08 1)	Magnet- und Spiralrührer	3318±875	111,9±4,6	8,00±1,30
GF1_08/1 1)	Magnetrührer	4719±87	133±9	6,5±0,54
Unvernetzte Proben mit 50 g Wasser je g Gelatine				
GF4_08/1 1)	Magnetrührer	4194±1226	122,8±6,2	5,0±1,24
Mit 5 % Glyoxal vernetzte Proben, 6 g Wasser je g Gelatine				
GelCFol5_3	Blattrührer 100 1/s	3751±117	138,1±7,8	4,41±0,79
GelCFol5_3T	GelCFol5_3 getrocknet	2887±1586	108±61,8	2,89±1,77
Mit 5 % Glyoxal vernetzte Proben, 12 g Wasser je g Gelatine				
GelCFol1_8	Magnetrührer	3116±231	54,4±17,3	1,84±0,67
GelCFol6_3	Blattrührer 100 1/s	2140±2346	51,5±56,6	3,09±0,61
GelCFol6_3	GelCFol6_3 getrocknet	2390±1176	95,7±41,4	2,19±0,91
GelCFol4_1/2	Blattrührer 200 1/s	4046±116	102,5±2,7	3,43±0,26
GelCFol4_1/2T	GelCFol4_1/2 getrocknet	4690±47	142,2±4,6	4,89±0,68
Mit 5 % Glyoxal vernetzte Proben, 25 g Wasser je g Gelatine				
GF2_08/5 1)	Magnetrührer	4200±139	128,7±25,7	4,0±1,2
GF3_08 1)	Magnetrührer	5564±165	118,8±31,7	3,1±1,1
GelRheo1_082b	Magnetrührer	2119±1340	65,8±41,1	1,8±1,0
GelRheo2_08/2 1)	Magnet- und Spiralrührer	4417±654	107,9±14,2	3,9±1,0
GelRheo2_08/2 2)	Magnet- und Spiralrührer	5027±1780	85,8±30,3	1,7±0,8
Mit 5 % Glyoxal vernetzte Proben, 50 g Wasser je g Gelatine				
GF1_08/5 1)	Magnetrührer	4289±202	141,0±17,2	4,0±0,71
GF4_08/5 1)	Magnetrührer	4917±842	82,8±38,0	1,8±0,96

1) Prüfkörper 70x10 mm, 2) Schulterprüfstäbe 51x4 mm

Anlage: Definitionen untersuchter Kennwerte

Der **pH-Wert** ist ein wichtiges Kriterium für die Reaktivität eines Bodens und beeinflusst andere chemische, physikalische und biologische Bodeneigenschaften sowie direkt oder indirekt auch das Pflanzenwachstum (KA5, AD-HOC-AG Boden, 2005). Weiterhin hat er in besonderem Maße Auswirkungen auf das Bodengefüge (Wasser- und Lufthaushalt, Lebensbedingungen der Bodenorganismen, Verfügbarkeit von Nährstoffen, Stoffumsetzungen, Verwitterung, Tonbildung und –zerstörung, Auftreten von toxischen Aluminium- und Schwermetallionen in der Bodenlösung). Ein pH-Wert zwischen 5,4 und 7,0 gilt für das Pflanzenwachstum, den Humusgehalt und die Nährstoffverfügbarkeit eines Bodens als optimal (SCHILLING, 2000).

Die Bodenkundliche Kartieranleitung (AD-HOC-AG Boden, 2005) definiert die organische Substanz (**C_{org}-Gehalt**) als Gesamtmenge an abgestorbenen pflanzlichen und tierischen Stoffen und deren organische Umwandlungsprodukten. Sie ist je nach Boden aus 50 % Kohlenstoff, 5 % Stickstoff, 0,5 % Phosphor, 0,5 % Schwefel, 39 % Sauerstoff und 5 % Wasserstoff zusammengesetzt und bildet damit die Nährstoffquelle für Mikroorganismen, Bodentiere und Pflanzen (ROGASIK, 2005).

Stickstoffverbindungen werden dem Boden durch tierische, menschliche und pflanzliche Abfälle, durch Ausscheidungen von Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen sowie ihrer abgestorbenen Masse, durch organische und anorganische Düngemittel und durch symbiotische und nichtsymbiotische Stickstofffixierung zugeführt (BEER et al., 1990). Der organisch gebundene Stickstoff wird während der Stickstoffmineralisierung in anorganische pflanzenverfügbare Formen überführt. Die Ammonifikation setzt den Stickstoff als Ammonium (NH_4^+) frei. Durch die Nitrifikation wird Ammonium-N erst in Nitrit (NO_2^-) und dann in Nitrat (NO_3^-) umgewandelt (SCHILLING, 2000).

Das **Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnis** (C/N-Verhältnis) wird als das Massenverhältnis von organisch gebundenem Kohlenstoff (C_{org}) und dem Gesamtstickstoff (N_t) im Boden angegeben. Es dient der Charakterisierung der Bodenfruchtbarkeit, der Humusqualität und zur Einschätzung der biologischen Aktivität in Böden (KA5, AD-HOC-AG Boden, 2005). Je nach Zusammensetzung der in den Boden ein- bzw. aufgebraachten Substanzen verändern sich die Nährstoffverhältnisse im Boden und das C/N-Verhältnis kann sich verengen oder erweitern. Wenn Zersettermikroorganismen beispielsweise kohlenstoffreiche Substrate verwerten kommt es zur Immobilisierung von Stickstoff. Ist dieser nicht ausreichend im

Boden verfügbar, kann der Substrat-C nicht vollständig mineralisiert werden und das C/N-Verhältnis im Boden steigt an (KOLBE et al., 2003).

Austauschbare Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , NH_4^+ , H^+ , Al^{3+}) bilden den Kationenbelag im Boden und ihre Summe die Kationenaustauschkapazität (KAK). Sie wird durch die Art und Menge der Tonminerale und Huminstoffe bedingt. Die **potentielle KAK** ist diejenige, die bei einem definierten pH-Wert von 8,2 vorliegt, bei dem die Protonen aller Säuregruppen der Huminstoffe austauschbar sind (KA5, AD-HOC-AG Boden, 2005). Die Kationen können erst dann verlagert oder von Pflanzenwurzeln aufgenommen werden, wenn sie gegen andere in der Bodenlösung ausgetauscht werden. Der Kationenaustausch ist somit wichtig für die Nährstoffversorgung der Pflanzen und den Stoffhaushalt von Böden (SCHEFFER & SCHACHTSCHABEL, 2002).

Die **Basalatmung** eines Bodens ist die CO_2 -Abgabe durch die lebende, metabolisierende Bodenorganismengesellschaft (Bakterien, Pilze, Algen und Protozoen) im vegetativen Stadium (DUNGER & FIEDLER, 1997). Die Basalatmung spiegelt damit die mikrobielle Aktivität im Boden wider. Besonderes Interesse besteht in der Landwirtschaft im Einfluss verschiedener Landnutzungsformen auf das mikrobielle Bodenleben. Hierzu zählen Unterschiede in Menge und Qualität zugeführter organischer Substanz (MÄDER et al., 2002).

Die Vielfalt der Mikroorganismenarten ist sehr groß, daher eignet sich die **Biomasse der Mikroorganismen** als zentrale Messgröße (JÖRGENSEN, 2005). Zu den Bodenmikroorganismen zählen Bakterien und Pilze, aber auch Protozoen, Algen und Viren. Die wichtigste Funktion der Mikroorganismen besteht in der Rückführung der in abgestorbener Pflanzensubstanz enthaltenen Kohlenstoff- und Nährstoffmengen in die biologischen Kreisläufe (JÖRGENSEN, 2005). Die mikrobielle Biomasse wird als Körpersubstanz lebender Mikroorganismen definiert. Sie zeigt zudem eine schnellere Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen als der organische Kohlenstoff (SPARLING, 1997).

Aus dem Quotienten der mikrobiellen Biomasse und der organischen Substanz wird das **$C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$ -Verhältnis** gebildet und bezeichnet den prozentualen Anteil des mikrobiell gebundenen Kohlenstoffs am Gesamtkohlenstoff. Es ist ein wichtiger Indikator für die Verfügbarkeit der organischen Substanz für Mikroorganismen im Boden (ANDERSON & DOMSCH, 1989). Des Weiteren ist das $C_{\text{mic}}/C_{\text{org}}$ -Verhältnis ein sensibler Indikator für Veränderungen von Prozessen im Boden, denn die mikrobielle Biomasse reagiert schneller

darauf als der Gesamtkohlenstoff. Damit gilt das C_{mic}/C_{org} -Verhältnis als guter Kennwert für die biologische Aktivität und die C-Anreicherung im Boden (SPARLING, 1997; TISCHER, 2005).

Enzymaktivitäten im Boden entstammen der Aktivität abiotischer und an lebende Zellen gebundener Enzyme (SCHINNER & SONNLEITNER, 1996 a). Diese sind überwiegend mikrobieller Herkunft und katalysieren eine Vielzahl von Stoffumsetzungen der verschiedenen Stoffkreisläufe. **Proteasen**, die von Eiweißzersettern (Bakterien und Pilze) gebildet werden, spalten Eiweiße (Proteine, wie Gelatine bzw. diesen nahestehenden Verbindungen). Sie stellen damit eine leicht mobilisierbare Stickstoffquelle im Boden dar. Der Abbau zu Aminosäuren wird durch Proteasen katalysiert. Kohlenhydrate (z. B. Cellulose) werden von der **Cellulase** im Boden zu Glukose gespalten (Müller, 1965).

Fettsäuren sind Hauptbestandteil der Zellmembranen aller lebenden Zellen. Jede Organismengruppe besitzt charakteristische Phospholipidfettsäuren innerhalb der Membranen. Aus diesem Grund dienen **Phospholipidfettsäuren (PLFAs)** als Biomarker für verschiedene Organismengruppen und zur Beschreibung der strukturellen und funktionellen Diversität der Bodenmikroorganismengemeinschaften, in diesem Fall vor allem für Bakterien und Pilze (LACZKO et al., 1997). Mit Hilfe der PLFA-Analyse und anhand ihrer Zusammensetzung können Umweltstressbedingungen, verursacht durch Schwermetalleinträge, Bodenbearbeitung, Nährstoffmangel, steigende Bodentemperaturen und toxische organische Verbindungen nachgewiesen werden (KAUR et al., 2005).

Der **Leuchtbakterientest** ist ein Biotest und erfasst als Summenparameter die biologische Gesamtwirkung einer Probe, in die alle in der Probe enthaltenen Stoffe gemeinsam eingehen. Er ist ein Kurzzeittest, bei dem ein Modellorganismus (*Vibrio fischeri* NRRL-B-11177) zur Anwendung kommt. Als Messkriterium wird die bakterielle Leuchtintensität erfasst. Unterliegen die Bakterien toxischen Einwirkungen, senden sie weniger Licht aus. Diese verringerte Leuchtintensität korreliert mit dem Ausmaß der Toxizität einer Probe. Eine Hemmung von 20 bis 40 % weist auf eine toxische Wirkung hin (nach Angaben der Firma Dr. Lange).

Anlage: Abbildungen und Tabellen



Abbildung 1: Gefäß gefüllt mit RefeSol und aufgetragener Folie

Tabelle 1: Auf ihre Bodeneindringtiefe untersuchte Rezepturen und Aufwandmengen

Rezepturen	Beschreibung/Aufwandmengen
Kontrolle	Ohne Folie
Glyoxal ⁽¹⁾ 10 %	Lösung aus Glyoxal (10 %) und dest. Wasser, 0,13 g cm ⁻²
HEC+Gly ⁽¹⁾ 20	Lösung aus HEC+Gly20 (25 %) und dest. Wasser, 0,13 g cm ⁻²
HEC+Gly⁽¹⁾ 40	Lösung aus HEC+Gly40 (25 %) und dest. Wasser, 0,13 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-4B1 ⁽²⁾	0,46 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-4B1,5 ⁽²⁾	0,69 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-4B2 ⁽²⁾	0,92 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-5B1 ⁽²⁾	0,46 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-5B1,5 ⁽²⁾	0,69 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-5B2 ⁽²⁾	0,92 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-6B1 ⁽²⁾	0,46 g cm ⁻²
Gel C Mod 12_09-6B1,5 ⁽²⁾	0,69 g cm ⁻²

Rezepturen	Beschreibung/Aufwandmengen
Gel C Mod 12_09-6B2 ⁽²⁾	0,92 g cm ⁻²
Gel C Mod 6_10-4-22ZIW2 ⁽²⁾	0,46 g cm ⁻²
Gelatine ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung, 0,26 g cm ⁻²
Gelatine + Glyoxal ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung + 5 % Glyoxal auf Gelatineeinwaage bezogen, 0,26 g cm ⁻²
Gelatine + Essigsäure ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung + 5 ml Essigsäureanhydrid pro 50 ml, 0,26 g cm ⁻²
Gelatine_Essig_Gly ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung + 5 ml Essigsäureanhydrid pro 50 ml+ 5 % Glyoxal, 0,26 g cm ⁻²
Gelatine_HCl ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung + 1ml HCl pro 50 ml Lösung, 0,26 g cm ⁻²
Gelatine_HCl_Gly ⁽³⁾	4 %ige Gelatine-Lösung + 1ml HCl pro 50 ml Lösung + 5 % Glyoxal, 0,26 g cm ⁻²

- (1) Proben TITK
- (2) Proben MLU-ZIW
- (3) Proben MLU-Chemie

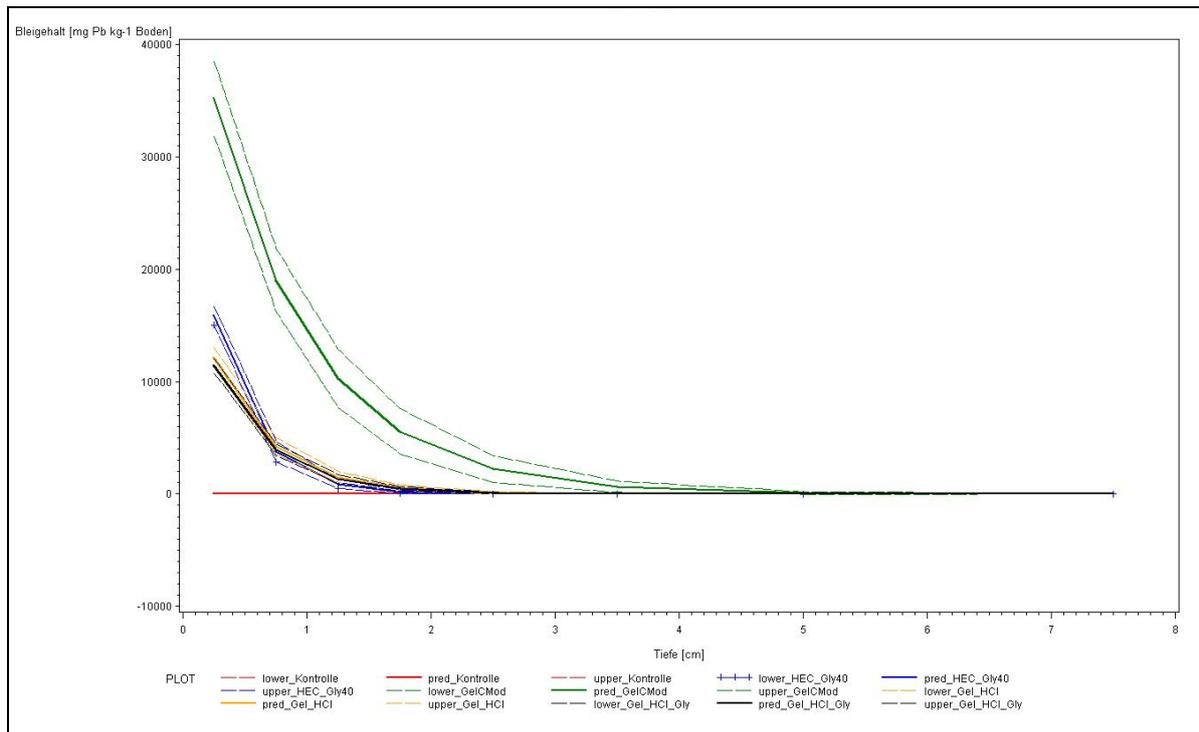


Abbildung 2: Eindringung der bevorzugten Varianten HEC+Gly40, Gel C Mod 6_10-4 22ZIW2, Gel+HCl und Gel+HCl+Gly im Vergleich zur Kontrolle ohne Folie in die Schwarzerde

Tabelle 2: Bodenkennwerte des Referenzbodens RefeSol 01-A

Bodenkennwerte:	
Bodenart:	Schwach lehmiger Sand
Ton:	5 %
Schluff:	24 %
Sand:	71 %
C_{org}:	0,93 %
Gesamt-N:	882 mg kg ⁻¹
pH-Wert:	5,67

Tabelle 3: Beschreibung der Folienvarianten und Aufwandmengen

Variante	Beschreibung
Kontrolle	Ohne Folie
HEC+Gly40	Lösung aus Hydroxyethylcellulose, Glyoxal und dest. Wasser, 0,13 g cm ⁻²
GelCMod11_10ZLW2	Lösung aus Gelatine, 0,4613 g cm ⁻²
Gel+HCl	Lösung aus Gelatine und HCl (500 µl g ⁻¹), 0,3 ml cm ⁻²
Gel+HCl+Gly	Lösung aus Gelatine, HCl und Glyoxal (500 µl g ⁻¹ + 5 % Glyoxal), 0,3 ml cm ⁻²

Tabelle 4: Untersuchte Kennwerte und angewendete Methoden

Kennwert [Einheit]	Methode
pH-Wert	DIN ISO 10390-7
organischer Kohlenstoff (C_{org}) [mg kg⁻¹ TS]	DIN ISO 10694
Gesamtstickstoff (N_t) [mg kg⁻¹ TS]	DIN ISO 13878
Basalatmung (C_{resp}) [CO₂ µg⁻¹ Boden TS h⁻¹]	HEINEMEYER et al. (1989), DIN ISO 16072
mikrobielle Biomasse (C_{mic}) [µg C g⁻¹ TS]	ANDERSON & DOMSCH (1978), DIN ISO 14240-1
Leuchtbakterientest (Toxizitätsscreening)	DIN EN ISO 11348 Teil 2
Phospholipidfattyacid (PLFA) [µg PLFA g⁻¹ TS]	FROSTEGÅRD et al., (1993), modifiziert
Proteaseaktivität [µg Tyrosinäquivalente g⁻¹TS 2h⁻¹]	SCHINNER et al, 1993
Cellulaseaktivität [µg GLC g⁻¹ TS 24 h⁻¹]	SCHINNER et al, 1993

Tabelle 5: pH-Werte (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen
(Standardfehler = SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	5,2 (±0,03)	4,9 (±0,03)	4,8 (±0,03)	4,7 (±0,01)	4,9 (±0,02)	4,9 (±0,00)
HEC+Gly40	5,3 (±0,00)	5,0 (±0,03)	4,9 (±0,01)	4,7 (±0,01)	4,9 (±0,01)	4,9 (±0,01)
GelCMod	6,4 (±0,04)	5,7 (±0,11)	5,3 (±0,03)	4,6 (±0,08)	4,9 (±0,03)	4,8 (±0,01)
Gel+HCl	6,2 (±0,04)	5,9 (±0,02)	5,2 (±0,03)	4,6 (±0,01)	4,8 (±0,01)	4,5 (±0,01)
Gel+HCl+Gly	6,4 (±0,01)	6,1 (±0,02)	5,4 (±0,03)	4,9 (±,02)	4,8 (±0,01)	4,6 (±0,02)

Tabelle 6: Gesamtstickstoffgehalte (N_t in mg kg^{-1} TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	69 (±3,13)	71 (±0,63)	59 (±1,22)	64 (±1,61)	56 (±2,03)	64 (±1,10)
HEC+Gly40	69 (±1,23)	73 (±1,69)	61 (±0,92)	67 (±1,27)	59 (±1,33)	66 (±1,26)
GelCMod	103 (±3,76)	106 (±2,61)	70 (±1,02)	66 (±2,09)	69 (±2,38)	65 (±0,96)
Gel+HCl	121 (±4,15)	120 (±1,41)	85 (±3,60)	77 (±1,25)	78 (±2,86)	69 (±0,55)
Gel+HCl+Gly	120 (±5,08)	127 (±1,13)	84 (±6,19)	81 (±0,37)	62 (±1,76)	70 (±1,57)

Tabelle 7: Gesamtkohlenstoffgehalte (C_t in mg kg^{-1} TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	875 (±16,9)	873 (±9,5)	882 (±12,9)	855 (±8,0)	865 (±15,1)	865 (±14,7)
HEC+Gly40	892 (±5,5)	894 (±11,9)	882 (±9,3)	874 (±9,5)	860 (±3,6)	888 (±20,1)
GelCMod	972 (±16,0)	927 (±9,4)	874 (±10,1)	858 (±6,1)	904 (±13,0)	850 (±11,6)
Gel+HCl	942 (±13,2)	930 (±7,6)	881 (±7,5)	910 (±2,5)	878 (±8,3)	897 (±9,3)
Gel+HCl+Gly	956 (±8,3)	955 (±11,5)	900 (±5,0)	898 (±4,3)	884 (±16,1)	899 (±12,.)

Tabelle 8: C/N-Verhältnis (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	13 (±0,39)	12 (±0,09)	15 (±0,18)	13 (±0,25)	15 (±0,33)	13 (±0,21)
HEC+Gly40	13 (±0,20)	12 (±0,19)	15 (±0,21)	13 (±0,21)	15 (±0,29)	13 (±0,07)
GelCMod	10 (±0,34)	9 (±0,17)	12 (±0,18)	13 (±0,22)	13 (±0,15)	13 (±0,10)
Gel+HCl	8 (±0,19)	8 (±0,09)	10 (±0,43)	12 (±0,18)	11 (±0,53)	13 (±0,23)
Gel+HCl+Gly	8 (±0,37)	8 (±0,08)	11 (±0,66)	11 (±0,03)	14 (±0,36)	13 (±0,20)

Tabelle 9: C_{mic}/C_{org} -Verhältnis (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,4 (±0,02)	0,4 (±0,01)	0,4 (±0,01)	0,4 (±0,02)	0,5 (±0,01)	0,5 (±0,01)
HEC+Gly40	0,5 (±0,02)	0,4 (±0,01)	0,5 (±0,01)	0,4 (±0,01)	0,5 (±0,01)	0,5 (±0,02)
GelCMod	2,4 (±0,19)	1,2 (±0,04)	0,8 (±0,02)	0,5 (±0,04)	0,6 (±0,02)	0,5 (±0,03)
Gel+HCl	2,8 (±0,05)	1,2 (±0,04)	1,3 (±0,04)	0,6 (±0,00)	0,5 (±0,03)	0,4 (±0,01)
Gel+HCl+Gly	3,0 (±0,16)	1,6 (±0,13)	1,1 (±0,03)	0,8 (±0,07)	0,5 (±0,02)	0,6 (±0,02)

Tabelle 10: Basalatmung (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,66 (±0,03)	0,50 (±0,02)	0,52 (±0,02)	0,55 (±0,02)	0,56 (±0,03)	0,52 (±0,01)
HEC+Gly40	0,65 (±0,02)	0,43 (±0,01)	0,56 (±0,01)	0,43 (±0,01)	0,65 (±0,01)	0,43 (±0,02)
GelCMod	3,62 (±0,59)	1,69 (±0,03)	0,64 (±0,02)	0,53 (±0,02)	0,44 (±0,02)	0,45 (±0,02)
Gel+HCl	3,13 (±0,13)	1,51 (±0,11)	1,05 (±0,07)	0,66 (±0,03)	0,61 (±0,03)	0,41 (±0,01)
Gel+HCl+Gly	3,39 (±0,20)	1,84 (±0,10)	0,86 (±0,04)	0,76 (±0,03)	0,52 (±0,02)	0,49 (±0,04)

Tabelle 11: Ergebnisse des Leuchtbakterientests (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	1 (±0,74)	0 (±0,00)	1 (±0,62)	0 (±0,00)	3 (±0,95)	1 (±0,54)
HEC+Gly40	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)
GelCMod	9 (±2,63)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	1 (±0,43)	0 (±0,00)
Gel+HCl	5 (±0,71)	2 (±0,84)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)
Gel+HCl+Gly	2 (±1,95)	3 (±1,42)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)

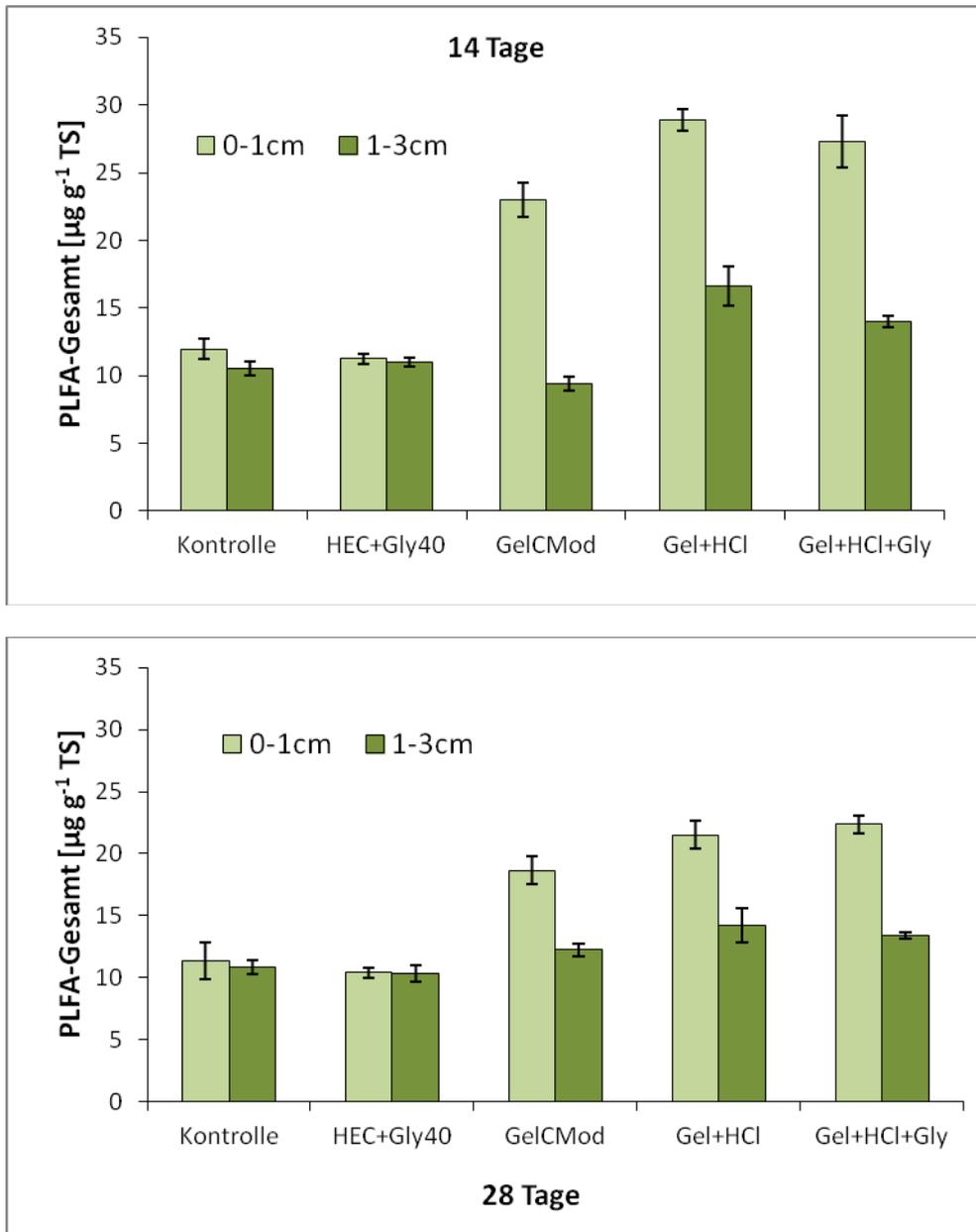


Abbildung 3: PLFA-Gesamtgehalte (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen

Tabelle 12: Weitere PLFA-Kennwerte (in $\mu\text{g g}^{-1}$ TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	Pilze				Bakterien			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	1,56 ($\pm 0,11$)	1,85 ($\pm 0,17$)	1,44 ($\pm 0,10$)	1,94 ($\pm 0,08$)	10,41 ($\pm 0,62$)	9,51 ($\pm 1,26$)	9,08 ($\pm 0,44$)	8,93 ($\pm 0,50$)
HEC+Gly40	1,41 ($\pm 0,04$)	2,09 ($\pm 0,14$)	1,31 ($\pm 0,06$)	1,98 ($\pm 0,06$)	9,84 ($\pm 0,34$)	8,20 ($\pm 0,46$)	9,70 ($\pm 0,26$)	8,24 ($\pm 0,69$)
GelCMod	3,39 ($\pm 0,14$)	4,05 ($\pm 0,26$)	1,14 ($\pm 0,07$)	2,27 ($\pm 0,21$)	19,53 ($\pm 1,14$)	14,56 ($\pm 0,87$)	8,29 ($\pm 0,46$)	9,99 ($\pm 0,40$)
Gel+HCl	3,27 ($\pm 0,23$)	3,47 ($\pm 0,20$)	1,98 ($\pm 0,26$)	2,36 ($\pm 0,19$)	25,51 ($\pm 0,70$)	17,90 ($\pm 1,00$)	14,66 ($\pm 1,35$)	11,78 ($\pm 1,34$)
Gel+HCl+Gly	8,45 ($\pm 1,25$)	7,26 ($\pm 0,27$)	2,75 ($\pm 0,06$)	2,57 ($\pm 0,12$)	18,75 ($\pm 0,86$)	15,10 ($\pm 0,45$)	11,14 ($\pm 0,42$)	10,81 ($\pm 0,33$)
	Gram-positive				Gram-negativ			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	3,09 ($\pm 0,23$)	2,40 ($\pm 0,32$)	2,78 ($\pm 0,25$)	2,23 ($\pm 0,14$)	3,45 ($\pm 0,21$)	2,96 ($\pm 0,31$)	2,90 ($\pm 0,10$)	2,65 ($\pm 0,16$)
HEC+Gly40	3,03 ($\pm 0,08$)	2,06 ($\pm 0,14$)	2,97 ($\pm 0,06$)	2,18 ($\pm 0,15$)	3,26 ($\pm 0,10$)	2,92 ($\pm 0,16$)	2,89 ($\pm 0,10$)	2,81 ($\pm 0,14$)
GelCMod	3,52 ($\pm 0,13$)	2,73 ($\pm 0,11$)	2,58 ($\pm 0,13$)	2,38 ($\pm 0,31$)	8,97 ($\pm 0,67$)	6,12 ($\pm 0,46$)	2,75 ($\pm 0,17$)	3,13 ($\pm 0,15$)
Gel+HCl	11,81 ($\pm 0,67$)	6,15 ($\pm 0,28$)	5,16 ($\pm 0,85$)	3,36 ($\pm 0,45$)	7,99 ($\pm 0,24$)	7,11 ($\pm 0,35$)	4,92 ($\pm 0,41$)	4,25 ($\pm 0,27$)
Gel+HCl+Gly	4,29 ($\pm 0,30$)	2,58 ($\pm 0,09$)	2,76 ($\pm 0,14$)	2,64 ($\pm 0,31$)	7,42 ($\pm 0,42$)	6,65 ($\pm 0,28$)	4,25 ($\pm 0,04$)	3,93 ($\pm 0,07$)

Tabelle 13: Pilz/Bakterien-Verhältnis und Diversitätsindex (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	Pilz/Bakterien-Verhältnis				Diversitätsindex (H')			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,15 ($\pm 0,00$)	0,20 ($\pm 0,01$)	0,16 ($\pm 0,01$)	0,22 ($\pm 0,00$)	2,74 ($\pm 0,01$)	2,73 ($\pm 0,01$)	2,75 ($\pm 0,01$)	2,75 ($\pm 0,00$)
HEC+Gly40	0,14 ($\pm 0,00$)	0,26 ($\pm 0,03$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,25 ($\pm 0,02$)	2,74 ($\pm 0,02$)	2,72 ($\pm 0,02$)	2,77 ($\pm 0,01$)	2,71 ($\pm 0,03$)
GelCMod	0,17 ($\pm 0,01$)	0,28 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,23 ($\pm 0,02$)	2,65 ($\pm 0,03$)	2,70 ($\pm 0,01$)	2,72 ($\pm 0,01$)	2,70 ($\pm 0,03$)
Gel+HCl	0,13 ($\pm 0,01$)	0,19 ($\pm 0,00$)	0,14 ($\pm 0,02$)	0,21 ($\pm 0,03$)	2,67 ($\pm 0,02$)	2,71 ($\pm 0,01$)	2,72 ($\pm 0,02$)	2,71 ($\pm 0,02$)
Gel+HCl+Gly	0,45 ($\pm 0,06$)	0,48 ($\pm 0,01$)	0,25 ($\pm 0,01$)	0,24 ($\pm 0,02$)	2,52 ($\pm 0,09$)	2,51 ($\pm 0,02$)	2,42 ($\pm 0,17$)	2,68 ($\pm 0,03$)

Tabelle 14: Proteaseaktivität (in μg Thyrosinäquivalente g^{-1} TS 2 h^{-1} , $n=4$) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (*SEM*)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HEC+Gly40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
GelCMod	375 ($\pm 53,40$)	146 ($\pm 25,75$)	6 ($\pm 2,26$)	n.n.	1 ($\pm 0,69$)	n.n.
Gel+HCl	330 ($\pm 18,71$)	102 ($\pm 14,85$)	2 ($\pm 1,08$)	3 ($\pm 2,47$)	n.n.	n.n.
Gel+HCl+Gly	1281 ($\pm 52,18$)	145 ($\pm 17,02$)	22 ($\pm 5,59$)	n.n.	n.n.	n.n.

(n.n.= nicht nachweisbar)

Tabelle 15: Cellulaseaktivität (in μg GLC g^{-1} TS 24 h^{-1} , $n=4$) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	7 ($\pm 6,30$)	n.n.	4 ($\pm 1,80$)	2 ($\pm 1,45$)
HEC+Gly40	32 ($\pm 6,82$)	6 ($\pm 3,11$)	37 ($\pm 19,80$)	8 ($\pm 5,23$)
GelCMod	202 ($\pm 26,76$)	58 ($\pm 20,94$)	50 ($\pm 9,56$)	15 ($\pm 8,04$)
Gel+HCl	59 ($\pm 13,18$)	35 ($\pm 4,77$)	20 ($\pm 6,52$)	4 ($\pm 1,82$)
Gel+HCl+Gly	99 ($\pm 15,86$)	78 ($\pm 7,72$)	36 ($\pm 15,21$)	16 ($\pm 5,30$)

(n.n.= nicht nachweisbar)

Tabelle 16: Bodenkennwerte der Schwarzerde (Tschernosem)

Bodenkennwerte:	
Bodenart:	Stark toniger Schluff (Ut4)
Ton:	21 %
Schluff:	68 %
Sand:	11,2 %
C_{org}:	2,07 %
Gesamt-N:	0,17 %
pH-Wert:	7,3

Tabelle 17: pH-Werte (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	7,3 (±0,02)	7,3 (±0,03)	7,4 (±0,03)	7,4 (±0,02)	7,4 (±0,02)	7,4 (±0,01)
HEC+Gly40	7,4 (±0,02)	7,3 (±0,01)	7,5 (±0,03)	7,4 (±0,01)	7,5 (±0,00)	7,4 (±0,01)
GelCMod	7,1 (±0,03)	7,0 (±0,02)	7,4 (±0,01)	7,3 (±0,00)	7,5 (±0,01)	7,4 (±0,01)
Gel+HCl	7,7 (±0,02)	7,1 (±0,04)	7,2 (±0,01)	7,1 (±0,01)	7,4 (±0,01)	7,4 (±0,01)
Gel+HCl+Gly	7,7 (±0,04)	7,2 (±0,01)	7,3 (±0,02)	7,2 (±0,01)	7,4 (±0,00)	7,4 (±0,00)

Tabelle 18: Gesamtstickstoffgehalte (N_t in mg kg⁻¹ TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	160 (±6,56)	147 (±2,08)	165 (±8,89)	150 (±1,60)	158 (±1,68)	156 (±1,97)
HEC+Gly40	148 (±3,18)	151 (±0,79)	149 (±1,30)	151 (±0,74)	153 (±1,74)	157 (±1,08)
GelCMod	208 (±0,63)	196 (±2,69)	153 (±1,21)	156 (±1,49)	150 (±1,20)	152 (±0,60)
Gel+HCl	208 (±1,21)	197 (±3,64)	159 (±1,52)	165 (±0,97)	145 (±1,41)	155 (±0,56)
Gel+HCl+Gly	216 (±1,50)	219 (±2,17)	159 (±2,03)	154 (±1,91)	147 (±0,73)	150 (±0,70)

Tabelle 19: Gesamtkohlenstoffgehalte (C_t in g kg⁻¹ TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	1,81 (±0,02)	1,80 (±0,01)	1,80 (±0,01)	1,83 (±0,01)	1,80 (±0,01)	1,80 (±0,01)
HEC+Gly40	1,85 (±0,02)	1,88 (±0,01)	1,84 (±0,01)	1,86 (±0,01)	1,85 (±0,01)	1,83 (±0,01)
GelCMod	1,92 (±0,00)	1,89 (±0,02)	1,85 (±0,00)	1,84 (±0,01)	1,85 (±0,01)	1,83 (±0,02)
Gel+HCl	1,85 (±0,01)	1,86 (±0,01)	1,82 (±0,02)	1,83 (±0,02)	1,81 (±0,02)	1,81 (±0,00)
Gel+HCl+Gly	1,90 (±0,00)	1,89 (±0,00)	1,82 (±0,01)	1,83 (±0,02)	1,80 (±0,00)	1,82 (±0,01)

Tabelle 20: C/N-Verhältnis (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	11 (±0,52)	12 (±0,13)	11 (±0,58)	12 (±0,08)	11 (±0,15)	12 (±0,07)
HEC+Gly40	13 (±0,21)	13 (±0,03)	12 (±0,14)	12 (±0,03)	12 (±0,15)	12 (±0,07)
GelCMod	9 (±0,02)	10 (±0,13)	12 (±0,09)	12 (±0,07)	12 (±0,11)	12 (±0,04)
Gel+HCl	9 (±0,07)	9 (±0,14)	12 (±0,09)	11 (±0,12)	13 (±0,05)	12 (±0,04)
Gel+HCl+Gly	9 (±0,05)	9 (±0,07)	12 (±0,11)	12 (±0,05)	12 (±0,06)	12 (±0,04)

Tabelle 21: C_{mic}/C_{org}-Verhältnis (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,9 (±0,04)	0,9 (±0,03)	0,9 (±0,07)	1,2 (±0,23)	0,9 (±0,04)	1,0 (±0,08)
HEC+Gly40	0,9 (±0,03)	1,0 (±0,03)	0,8 (±0,05)	1,0 (±0,02)	0,9 (±0,04)	0,9 (±0,03)
GelCMod	1,8 (±0,15)	1,6 (±0,10)	1,0 (±0,04)	0,8 (±0,24)	1,0 (±0,10)	0,7 (±0,20)
Gel+HCl	2,1 (±0,06)	1,6 (±0,07)	1,2 (±0,08)	1,1 (±0,03)	0,9 (±0,04)	0,9 (±0,04)
Gel+HCl+Gly	2,3 (±0,14)	1,6 (±0,09)	1,3 (±0,11)	1,4 (±0,03)	1,0 (±0,04)	1,0 (±0,04)

Tabelle 22: Basalatmung (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,61 (±)	0,58 (±)	0,56 (±)	0,42 (±)	0,52 (±)	0,34 (±)
HEC+Gly40	0,77 (±)	0,59 (±)	0,53 (±)	0,37 (±)	0,77 (±)	0,59 (±)
GelCMod	3,52 (±)	1,77 (±)	0,65 (±)	0,55 (±)	0,56 (±)	0,44 (±)
Gel+HCl	3,94 (±)	2,11 (±)	0,94 (±)	0,62 (±)	0,52 (±)	0,38 (±)
Gel+HCl+Gly	4,63 (±)	2,59 (±)	1,19 (±)	0,67 (±)	0,54 (±)	0,37 (±)

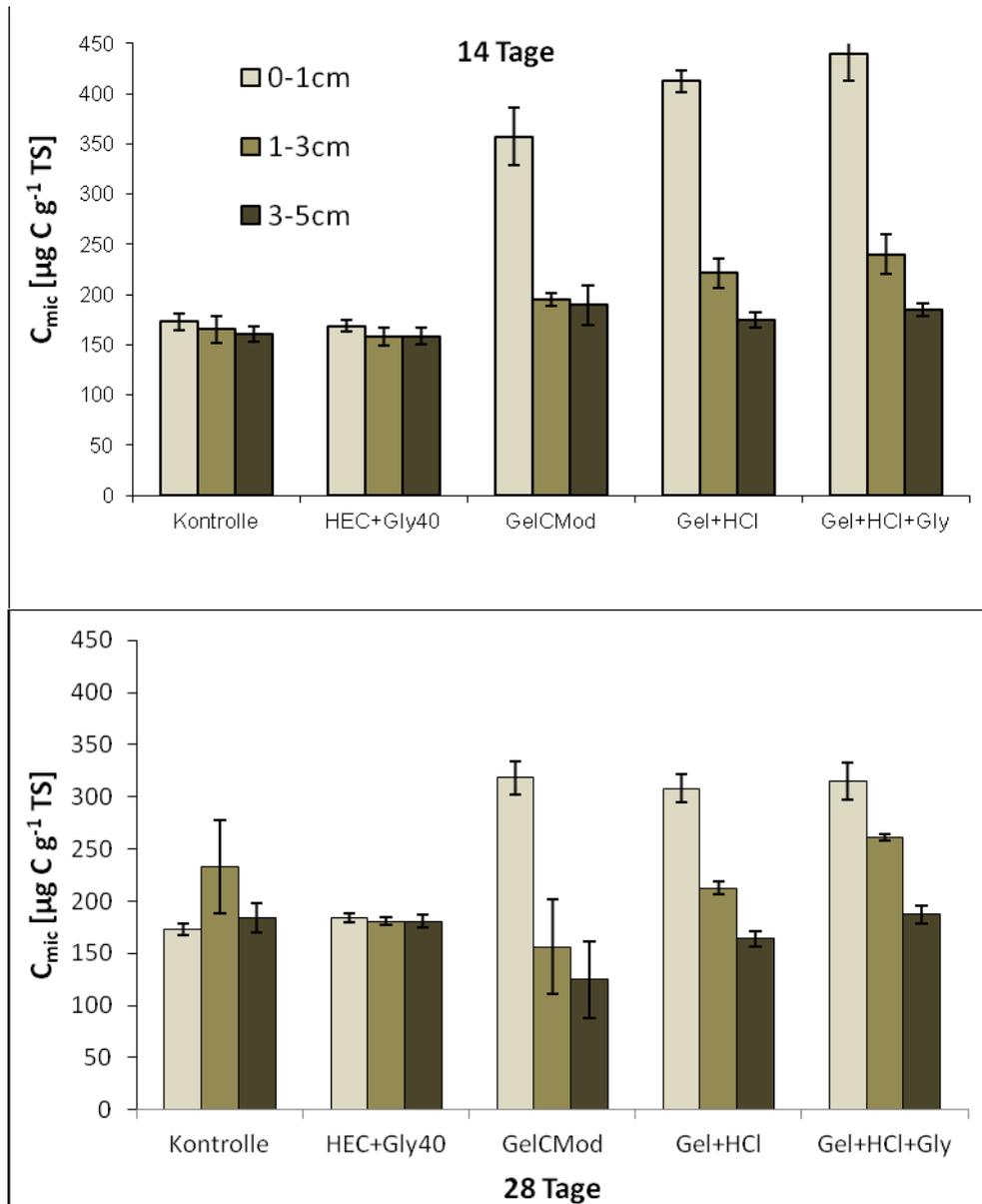


Abbildung 4: Mikrobielle Biomasse (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen

Tabelle 23: Proteaseaktivität (in µg Thyrosinäquivalente g⁻¹ TS 2 h⁻¹, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen (SEM)

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HEC+Gly40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
GelCMod	241 (±13,78)	20 (±9,29)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Gel+HCl	300 (±58,40)	51 (±20,38)	4 (±3,41)	n.n.	n.n.	n.n.
Gel+HCl+Gly	259 (±46,24)	113 (±9,56)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

(n.n.= nicht nachweisbar)

Tabelle 24: Cellulaseaktivität (in $\mu\text{g GLC g}^{-1} \text{TS 24 h}^{-1}$, $n=4$) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	2 ($\pm 1,97$)	n.n.	n.n.	n.n.
HEC+Gly40	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
GelCMod	16 ($\pm 5,05$)	9 ($\pm 3,01$)	n.n.	n.n.
Gel+HCl	26 ($\pm 12,23$)	1 ($\pm 0,76$)	n.n.	n.n.
Gel+HCl+Gly	32 ($\pm 5,60$)	13 ($\pm 1,81$)	1 ($\pm 0,92$)	1 ($\pm 0,53$)

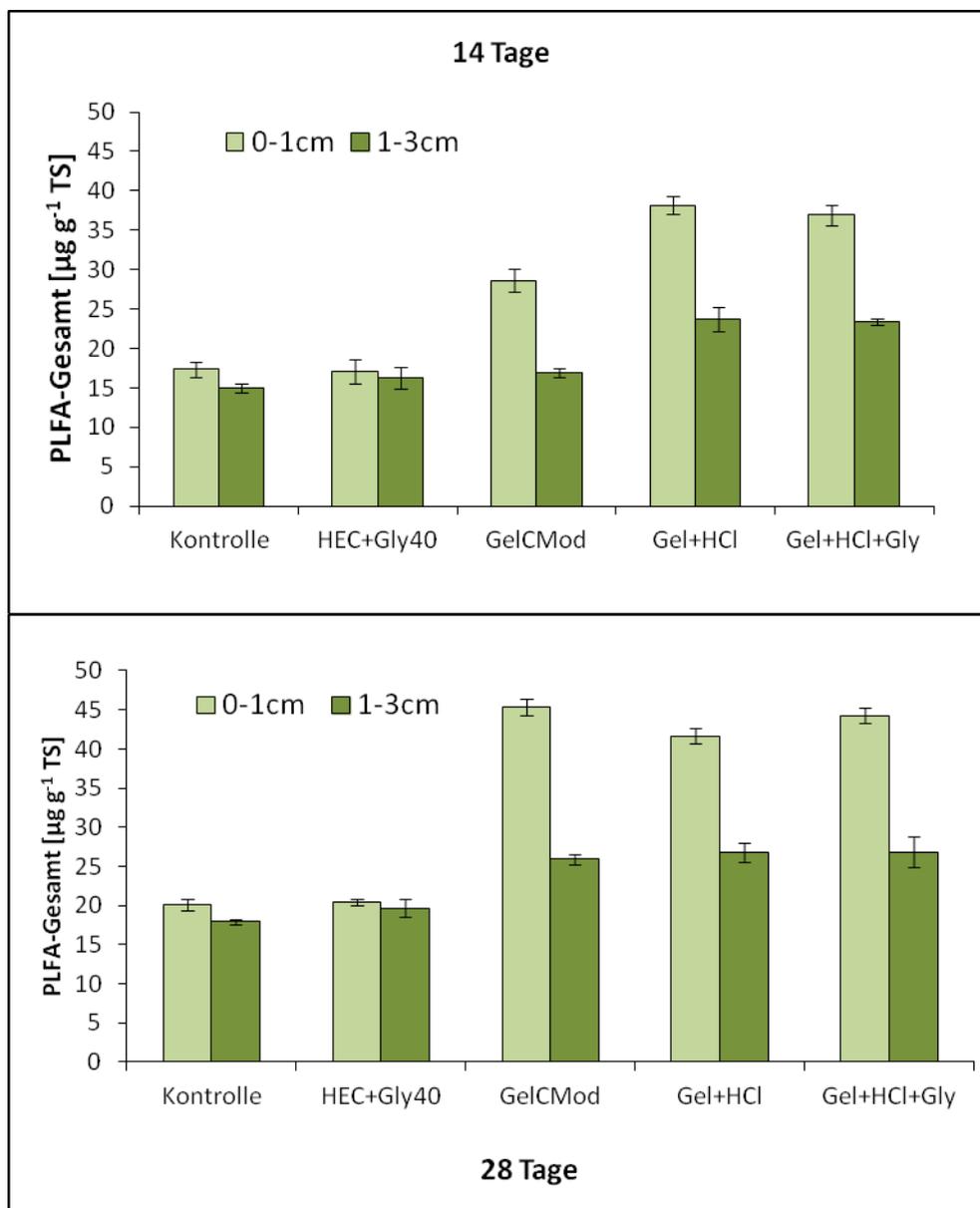
**Abbildung 5:** PLFA-Gesamtgehalte ($n=4$) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen

Tabelle 25: Weitere PLFA-Kennwerte (in $\mu\text{g g}^{-1}$ TS, n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	Pilze				Bakterien			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage						
Kontrolle	2,47 ($\pm 0,13$)	2,47 ($\pm 0,24$)	2,77 ($\pm 0,28$)	1,88 ($\pm 0,06$)	14,88 ($\pm 1,12$)	17,67 ($\pm 0,66$)	12,24 ($\pm 0,44$)	16,07 ($\pm 0,26$)
HEC+Gly40	2,13 ($\pm 0,15$)	2,17 ($\pm 0,04$)	1,97 ($\pm 0,35$)	2,33 ($\pm 0,29$)	14,96 ($\pm 1,43$)	18,24 ($\pm 0,52$)	14,34 ($\pm 1,30$)	17,33 ($\pm 0,92$)
GelCMod	6,54 ($\pm 0,85$)	7,41 ($\pm 0,23$)	2,25 ($\pm 0,07$)	2,75 ($\pm 0,11$)	21,97 ($\pm 0,78$)	37,93 ($\pm 0,99$)	14,66 ($\pm 0,52$)	23,17 ($\pm 0,57$)
Gel+HCl	2,79 ($\pm 0,09$)	3,35 ($\pm 0,02$)	2,38 ($\pm 0,16$)	2,54 ($\pm 0,09$)	35,38 ($\pm 1,10$)	38,26 ($\pm 0,99$)	21,33 ($\pm 1,31$)	24,27 ($\pm 1,12$)
Gel+HCl+Gly	6,78 ($\pm 0,86$)	8,85 ($\pm 0,25$)	2,89 ($\pm 0,25$)	3,06 ($\pm 0,18$)	30,13 ($\pm 1,34$)	35,42 ($\pm 1,09$)	20,44 ($\pm 0,28$)	23,71 ($\pm 1,81$)
	Gram-positiv				Gram-negativ			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage						
Kontrolle	5,61 ($\pm 1,03$)	8,18 ($\pm 0,34$)	4,07 ($\pm 0,08$)	7,45 ($\pm 0,12$)	5,91 ($\pm 0,18$)	6,23 ($\pm 0,23$)	4,81 ($\pm 0,36$)	5,67 ($\pm 0,08$)
HEC+Gly40	6,20 ($\pm 1,01$)	7,69 ($\pm 1,01$)	5,90 ($\pm 0,89$)	7,53 ($\pm 1,10$)	5,65 ($\pm 0,36$)	7,18 ($\pm 0,64$)	5,42 ($\pm 0,33$)	6,62 ($\pm 0,33$)
GelCMod	8,12 ($\pm 0,32$)	17,91 ($\pm 0,52$)	5,45 ($\pm 0,25$)	11,04 ($\pm 0,27$)	7,97 ($\pm 0,20$)	11,88 ($\pm 0,31$)	5,75 ($\pm 0,19$)	7,38 ($\pm 0,20$)
Gel+HCl	21,29 ($\pm 1,12$)	22,84 ($\pm 0,69$)	10,32 ($\pm 0,58$)	11,96 ($\pm 0,66$)	10,11 ($\pm 0,13$)	10,61 ($\pm 0,18$)	7,50 ($\pm 0,53$)	8,04 ($\pm 0,30$)
Gel+HCl+Gly	12,72 ($\pm 0,98$)	16,25 ($\pm 0,75$)	9,18 ($\pm 0,99$)	10,19 ($\pm 1,58$)	11,56 ($\pm 0,49$)	12,57 ($\pm 0,80$)	7,88 ($\pm 0,71$)	8,97 ($\pm 0,68$)

Tabelle 26: Pilz/Bakterien-Verhältnis und Diversitätsindex (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	Pilz/Bakterien-Verhältnis				Diversitätsindex (H')			
	0-1 cm		1-3 cm		0-1 cm		1-3 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0,17 ($\pm 0,02$)	0,14 ($\pm 0,01$)	0,23 ($\pm 0,02$)	0,12 ($\pm 0,00$)	2,62 ($\pm 0,04$)	2,60 ($\pm 0,01$)	2,68 ($\pm 0,02$)	2,60 ($\pm 0,01$)
HEC+Gly40	0,15 ($\pm 0,01$)	0,12 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,03$)	0,13 ($\pm 0,01$)	2,65 ($\pm 0,05$)	2,56 ($\pm 0,02$)	2,67 ($\pm 0,05$)	2,58 ($\pm 0,02$)
GelCMod	0,30 ($\pm 0,03$)	0,20 ($\pm 0,01$)	0,15 ($\pm 0,00$)	0,12 ($\pm 0,00$)	2,70 ($\pm 0,02$)	2,61 ($\pm 0,00$)	2,71 ($\pm 0,01$)	2,60 ($\pm 0,01$)
Gel+HCl	0,08 ($\pm 0,00$)	0,09 ($\pm 0,00$)	0,11 ($\pm 0,00$)	0,10 ($\pm 0,00$)	2,46 ($\pm 0,02$)	2,50 ($\pm 0,01$)	2,56 ($\pm 0,01$)	2,58 ($\pm 0,00$)
Gel+HCl+Gly	0,23 ($\pm 0,03$)	0,25 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,01$)	0,13 ($\pm 0,00$)	2,55 ($\pm 0,01$)	2,52 ($\pm 0,04$)	2,60 ($\pm 0,02$)	2,56 ($\pm 0,02$)

Tabelle 27: Ergebnisse des Leuchtbakterientests (n=4) der Bodenproben nach 14 und 28 Tagen in drei Tiefenstufen

	0-1 cm		1-3 cm		3-5 cm	
	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage	14 Tage	28 Tage
Kontrolle	0 (±0,00)	0 (±0,22)	0 (±0,22)	0 (±0,22)	0 (±0,00)	0 (±0,00)
HEC+Gly40	0 (±0,00)	0 (±0,32)	2 (±1,52)	0 (±0,00)	2 (±0,22)	1 (±0,54)
GelCMod	1 (±0,84)	0 (±0,00)	1 (±0,48)	0 (±0,00)	2 (±0,72)	0 (±0,32)
Gel+HCl	0 (±0,22)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,22)
Gel+HCl+Gly	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	0 (±0,00)	2 (±0,87)	1 (±0,45)

Tabelle 28: Bodenkennwerte des Versuchsfeldes

Bodenkennwerte:	
Bodenart:	Lehmiger Sand
C_{org}:	1,0 %
Gesamt-N:	0,8 %
pH-Wert:	5,0

Tabelle 29: Untersuchte Kennwerte und angewendete Methoden

Kennwert [Einheit]	Methode
pH-Wert	DIN ISO 10390-7
organischer Kohlenstoff (C_{org}) [%]	DIN ISO 10694
Gesamtstickstoff (N_t) [%]	DIN ISO 13878
Basalatmung (C_{resp}) [CO₂ µg⁻¹ Boden TS h⁻¹]	HEINEMEYER et al. (1989), DIN ISO 16072
Mineralisierte Stickstoffgehalte (N_{min}) [mg N 100 g⁻¹ Boden]	VDLUFA
Potentielle Kationenaustauschkapazität (KAK_{pot}) [cmol_c kg⁻¹]	HENDERSHOT et al. (2008)
mikrobielle Biomasse (C_{mic}) [µg C g⁻¹ TS]	ANDERSON & DOMSCH (1978), DIN ISO 14240-1
Proteaseaktivität [µg Tyrosinäquivalente g⁻¹TS 2h⁻¹]	SCHINNER et al, 1993
Cellulaseaktivität [µg GLC g⁻¹ TS 24 h⁻¹]	SCHINNER et al, 1993

Tab. 30: Beschreibung der Folienvarianten des Feldversuches

Variante	Beschreibung
Kontrolle	Ohne Folie
Halle1 ⁽²⁾	4 % Gelatinelösung + 20 % Glycerin + 500 µl HCl/g Gelatine
Halle2 ⁽²⁾	4 % Gelatinelösung + 20 % Glycerin + 500 µl HCl/g Gelatine + 5 % Glyoxal
Halle3 ⁽²⁾	4 % Gelatinelösung + 20 % Glycerin; native Gelatine
Halle4 ⁽²⁾	4 % Gelatinelösung + 20 % Glycerin; native Gelatine + 5 % Glyoxal
TITK1 ⁽¹⁾	8g 2-HEC, 4 g Glyoxal 40%ig und 1,2 g Propantriol
TITK2 ⁽¹⁾	8g 2-HEC, 4 g Glyoxal 40%ig und 0,5 g Propantriol
TITK3 ⁽¹⁾	10 g 2-HEC, 6 g Glyoxal 40%ig und 8 g Propantriol
OS FH 1 ⁽³⁾	Xanthan / Chitosan
OS FH 2 ⁽³⁾	CMC / Stärke
Biofol 1 ⁽⁴⁾	siehe Bericht Biofol Film GmbH Unseburg
Biofol 2 ⁽⁴⁾	siehe Bericht Biofol Film GmbH Unseburg

⁽¹⁾ TITK, Rudolstadt, Hr. Stengel

⁽²⁾ MLU, Halle, Lebensmittelchemie, Hr. R. Spanneberg

⁽³⁾ Fachhochschule Osnabrück

⁽⁴⁾ Biofol Film GmbH Unseburg

Tabelle 31: pH-Werte der Bodenproben vor Versuchsanfang (A) und zum Versuch (V, n=4) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	4,8	4,8 (±0,03)	4,9	4,8 (±0,02)
Halle 1	4,9	5,4 (±0,03)	4,9	4,8 (±0,03)
Halle 2	4,9	5,4 (±0,04)	4,9	4,9 (±0,03)
Halle 3	5,0	5,2 (±0,06)	4,9	5,1 (±0,19)
Halle 4	4,9	5,4 (±0,04)	4,8	4,8 (±0,03)
TITK 1	4,9	4,9 (±0,06)	4,9	4,8 (±0,06)
TITK 2	4,9	4,9 (±0,03)	4,9	4,8 (±0,03)
TITK 3	4,9	4,8 (±0,04)	4,8	4,8 (±0,04)
OSFH 1	5,0	5,0 (±0,05)	4,9	4,8 (±0,04)
OSFH 2	4,9	4,9 (±0,03)	4,9	4,8 (±0,04)
BioFol 1	4,8	5,6 (±0,11)	4,8	4,9 (±0,04)
BioFol 2	5,0	6,0 (±0,06)	4,9	5,0 (±0,05)

Tabelle 32: Gesamtstickstoffgehalte (N_t in mg kg^{-1} TS) der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, $n=4$) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	76,28	82,35 ($\pm 3,19$)	80,70	81,76 ($\pm 1,49$)
Halle 1	80,38	107,24 ($\pm 2,83$)	85,08	85,34 ($\pm 1,77$)
Halle 2	81,32	101,48 ($\pm 2,34$)	95,39	85,88 ($\pm 2,20$)
Halle 3	79,10	105,02 ($\pm 1,90$)	87,64	83,91 ($\pm 1,18$)
Halle 4	76,25	106,72 ($\pm 3,28$)	83,61	85,15 ($\pm 1,20$)
TITK 1	84,21	82,25 ($\pm 1,67$)	73,50	68,38 ($\pm 1,92$)
TITK 2	84,49	81,66 ($\pm 1,84$)	83,48	83,58 ($\pm 1,56$)
TITK 3	80,69	82,58 ($\pm 2,60$)	89,56	82,04 ($\pm 3,05$)
OSFH 1	84,87	86,14 ($\pm 3,28$)	89,86	80,14 ($\pm 2,15$)
OSFH 2	84,20	81,13 ($\pm 0,41$)	80,67	81,31 ($\pm 0,39$)
BioFol 1	85,10	113,51 ($\pm 10,28$)	85,18	105,51 ($\pm 21,89$)
BioFol 2	76,83	82,92 ($\pm 2,42$)	87,24	85,55 ($\pm 1,97$)

Tabelle 33: Gesamtkohlenstoffgehalte (C_t in mg kg^{-1} TS) der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, $n=4$) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	919,38	975,85 ($\pm 22,01$)	972,70	963,43 ($\pm 15,33$)
Halle 1	963,39	1042,81 ($\pm 25,57$)	1025,27	999,87 ($\pm 18,56$)
Halle 2	937,14	987,45 ($\pm 12,99$)	1102,03	1001,11 ($\pm 22,03$)
Halle 3	928,92	1001,21 ($\pm 3,61$)	1032,49	976,74 ($\pm 7,71$)
Halle 4	890,17	1037,88 ($\pm 27,05$)	999,55	992,31 ($\pm 11,71$)
TITK 1	1012,35	1002,04 ($\pm 9,39$)	877,85	970,01 ($\pm 25,63$)
TITK 2	1046,05	953,21 ($\pm 17,01$)	1035,24	979,49 ($\pm 10,48$)
TITK 3	947,73	1011,11 ($\pm 35,52$)	1023,96	972,48 ($\pm 30,53$)
OSFH 1	989,23	1019,77 ($\pm 44,69$)	1024,44	964,05 ($\pm 37,76$)
OSFH 2	1048,38	1016,16 ($\pm 7,31$)	945,60	969,12 ($\pm 3,81$)
BioFol 1	1063,56	1109,73 ($\pm 48,59$)	1010,47	1106,01 ($\pm 67,29$)
BioFol 2	898,62	1116,97 ($\pm 23,87$)	999,78	988,71 ($\pm 8,26$)

Tabelle 34: C/N-Verhältnis der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Hauptversuch (V, n=4) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	12,05	11,88 (±0,19)	12,05	11,79 (±0,05)
Halle 1	11,99	9,73 (±0,15)	12,05	11,72 (±0,08)
Halle 2	11,52	9,74 (±0,10)	11,55	11,66 (±0,13)
Halle 3	11,74	9,54 (±0,17)	11,78	11,65 (±0,12)
Halle 4	11,67	9,73 (±0,05)	11,95	11,66 (±0,17)
TITK 1	12,02	12,20 (±0,25)	11,94	11,53 (±0,07)
TITK 2	12,38	10,44 (±1,07)	12,40	10,20 (±1,53)
TITK 3	11,75	12,24 (±0,14)	11,43	11,87 (±0,11)
OSFH 1	11,66	11,85 (±0,34)	11,40	12,01 (±0,17)
OSFH 2	12,45	12,53 (±0,12)	11,72	11,92 (±0,07)
BioFol 1	12,50	11,38 (±0,47)	11,86	10,71 (±0,77)
BioFol 2	11,70	13,49 (±0,28)	11,46	11,58 (±0,20)

Tabelle 35: C_{mic}/C_{org} -Verhältnis der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, n=4) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	1,20	1,3 (±0,08)	1,00	1,2 (±0,08)
Halle 1	1,04	4,0 (±0,29)	1,06	1,4 (±0,08)
Halle 2	1,28	3,6 (±0,17)	1,54	1,2 (±0,07)
Halle 3	1,17	3,7 (±0,10)	1,42	1,3 (±0,06)
Halle 4	1,08	3,0 (±0,12)	1,05	1,2 (±0,06)
TITK 1	1,10	1,3 (±0,05)	1,42	0,9 (±0,22)
TITK 2	0,99	1,1 (±0,01)	1,12	1,1 (±0,03)
TITK 3	1,18	1,3 (±0,10)	1,03	1,1 (±0,05)
OSFH 1	1,01	2,7 (±0,51)	1,15	1,8 (±0,54)
OSFH 2	0,96	1,5 (±0,14)	1,09	1,4 (±0,21)
BioFol 1	1,21	4,0 (±0,60)	1,27	2,3 (±0,18)
BioFol 2	1,10	2,9 (±0,47)	1,14	2,2 (±0,22)

Tabelle 36: Mineralisierte Stickstoffgehalte der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, n=4) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (*SEM*)

	0-5 cm				5-10 cm			
	A		V		A		V	
	NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃	NH ₄ ⁺	NO ₃	NH ₄ ⁺
Kontrolle	11,92	22,92	60,94 (±3,46)	43,90 (±3,86)	12,23	21,83	36,30 (±1,03)	39,41 (±1,28)
Halle 1	16,16	26,21	99,18 (±10,22)	262,12 (±113,01)	17,65	20,07	45,26 (±2,43)	32,79 (±24,44)
Halle 2	13,78	23,94	74,94 (±7,94)	429,81 (±23,35)	15,58	35,79	27,28 (±3,30)	4,78 (±0,79)
Halle 3	13,34	20,01	80,30 (±7,27)	348,16 (±3,70)	15,63	25,69	22,24 (±4,36)	4,30 (±0,39)
Halle 4	11,62	23,96	57,78 (±4,72)	247,14 (±106,93)	15,61	39,53	26,86 (±4,51)	30,05 (±8,24)
TITK 1	17,16	33,08	33,83 (±12,28)	41,14 (±20,05)	23,64	86,50	34,05 (±3,55)	35,64 (±8,78)
TITK 2	13,32	28,41	54,95 (±2,42)	28,08 (±3,01)	20,20	27,73	29,26 (±3,16)	25,00 (±3,34)
TITK 3	12,76	22,11	54,53 (±6,17)	31,71 (±3,74)	17,99	27,99	39,45 (±6,55)	33,09 (±4,64)
OSFH 1	12,56	21,65	19,55 (±7,08)	25,44 (±6,97)	16,36	21,11	33,23 (±3,68)	17,43 (±1,71)
OSFH 2	13,45	21,06	43,46 (±2,16)	24,39 (±3,84)	12,38	28,68	26,38 (±1,76)	22,11 (±2,21)
BioFol 1	19,17	23,38	1,53 (±0,08)	11,85 (±6,04)	18,34	26,58	33,10 (±7,71)	20,49 (±1,49)
BioFol 2	5,24	19,38	1,04 (±0,08)	0,69 (±0,21)	13,29	38,82	18,12 (±3,57)	17,33 (±5,26)

Tabelle 37: potentielle Kationenaustauschkapazität, S-Wert und Basensättigung der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, n=4) nach 14 Tagen in der obersten Bodenschicht (*SEM*)

	KAK_{pot} [cmol_c/kg]		S-Wert [cmol_c/kg]		Basensättigung [%]	
	A	V	A	V	A	V
Kontrolle	4,40	5,9 (±0,33)	33,29	36,18 (±1,16)	76	64 (±5,13)
Halle 1	4,00	4,8 (±0,12)	31,93	40,76 (±0,97)	80	85 (±2,29)
Halle 2	4,37	5,1 (±0,07)	31,30	40,15 (±0,78)	72	80 (±2,55)
Halle 3	4,00	5,4 (±0,11)	34,52	38,37 (±0,92)	86	71 (±1,00)
Halle 4	3,67	6,0 (±0,14)	31,35	38,71 (±0,84)	85	65 (±1,28)
TITK 1	4,67	5,7 (±0,16)	34,50	39,04 (±0,73)	74	68 (±2,55)
TITK 2	4,42	5,9 (±0,32)	29,23	37,54 (±1,02)	66	65 (±3,04)
TITK 3	4,75	5,9 (±0,01)	29,47	36,66 (±0,38)	62	62 (±0,58)
OSFH 1	4,82	5,3 (±0,34)	30,27	38,13 (±0,76)	63	73 (±4,88)
OSFH 2	4,79	5,2 (±0,09)	29,22	41,43 (±0,79)	61	79 (±1,33)
BioFol 1	5,54	5,6 (±0,13)	29,09	45,61 (±2,23)	53	81 (±2,21)
BioFol 2	5,08	4,9 (±0,27)	30,62	55,92 (±0,31)	60	100 (±0,00)

Tabelle 38: Basalatmung (in $\mu\text{g g}^{-1} \text{TS h}^{-1}$, $n=4$) der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, $n=4$) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	0,83	0,90 ($\pm 0,05$)	0,75	0,77 ($\pm 0,04$)
Halle 1	0,76	1,41 ($\pm 0,16$)	0,75	0,70 ($\pm 0,02$)
Halle 2	0,83	1,31 ($\pm 0,09$)	1,06	0,68 ($\pm 0,05$)
Halle 3	0,73	1,29 ($\pm 0,02$)	0,80	0,67 ($\pm 0,04$)
Halle 4	0,60	1,35 ($\pm 0,05$)	0,66	0,80 ($\pm 0,04$)
TITK 1	0,67	0,82 ($\pm 0,01$)	0,74	0,63 ($\pm 0,03$)
TITK 2	0,66	0,98 ($\pm 0,02$)	0,80	0,86 ($\pm 0,06$)
TITK 3	0,68	1,50 ($\pm 0,15$)	0,71	0,72 ($\pm 0,04$)
OSFH 1	0,58	1,00 ($\pm 0,07$)	0,66	0,62 ($\pm 0,13$)
OSFH 2	0,65	0,72 ($\pm 0,02$)	0,65	0,62 ($\pm 0,04$)
BioFol 1	0,80	2,80 ($\pm 0,36$)	0,78	1,03 ($\pm 0,10$)
BioFol 2	0,56	3,00 ($\pm 0,21$)	0,69	0,94 ($\pm 0,04$)

Tabelle 39: Proteaseaktivität (in μg Thyrosinäquivalente g^{-1} TS 2 h^{-1} , $n=4$) der Bodenproben vor Versuchsbeginn (A) und zum Versuch (V, $n=4$) nach 14 Tagen in zwei Tiefenstufen (SEM)

	0-5 cm		5-10 cm	
	A	V	A	V
Kontrolle	84,24	22,06 ($\pm 4,35$)	74,34	40,39 ($\pm 7,21$)
Halle 1	106,83	187,07 ($\pm 17,06$)	193,78	71,47 ($\pm 9,72$)
Halle 2	84,66	201,04 ($\pm 21,80$)	118,16	49,64 ($\pm 10,03$)
Halle 3	10,62	173,24 ($\pm 10,85$)	113,23	40,92 ($\pm 9,99$)
Halle 4	15,58	254,84 ($\pm 5,04$)	59,21	44,24 ($\pm 4,64$)
TITK 1	58,92	25,18 ($\pm 7,04$)	70,73	41,35 ($\pm 10,61$)
TITK 2	22,70	13,13 ($\pm 4,41$)	49,94	31,83 ($\pm 8,22$)
TITK 3	55,36	12,87 ($\pm 4,21$)	59,55	42,53 ($\pm 8,87$)
OSFH 1	28,10	55,96 ($\pm 4,59$)	67,63	36,57 ($\pm 7,25$)
OSFH 2	36,13	21,69 ($\pm 6,29$)	36,67	22,89 ($\pm 4,36$)
BioFol 1	129,00	94,67 ($\pm 20,60$)	101,10	74,21 ($\pm 17,43$)
BioFol 2	56,40	114,75 ($\pm 7,49$)	73,83	49,00 ($\pm 3,21$)