

Magdalena Tendl, BSc

# Kombination biologischer Abbaubarkeit und antimikrobieller Ausrüstung von Biopolymeren

**MASTERARBEIT**

zur Erlangung des akademischen Grades

Diplom-Ingenieurin

Masterstudium Technische Chemie

eingereicht an der

**Technischen Universität Graz**

Betreuer

Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Franz Stelzer

Institut für Chemische Technologie von Materialien

Graz, August 2016

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Das in TUGRAZonline hochgeladene Textdokument ist mit der vorliegenden Masterarbeit identisch.

---

Datum

---

Unterschrift

# Danksagung

Die vorliegende Masterarbeit wurde am Institut für Chemische Technologien von Materialien an der Technischen Universität Graz unter der Leitung von Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr.techn. Franz Stelzer erstellt. Ihm und meinem Co-Betreuer Mag.rer.nat. Dr.rer.nat Stefan Spirk gebührt mein besonderer Dank für die Anregungen, Erklärungen und die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können.

Weiters möchte ich mich auch besonders bei Klaus Luef und Katrin Jammernegg für ihre fachlichen Expertisen und ihre Unterstützung bedanken.

Auch gebührt mein Dank Clemens Kittinger und seinem Team des Instituts für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Med Uni Graz, für die Ermöglichung und die Bemühungen bei der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Ebenso bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Chemische Technologien von Materialien für das gute Arbeitsklima, insbesondere bei Josefine Hobisch für diverse analytische Messungen und Petra Kaschnitz für die Aufnahmen von NMR-Messungen.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Manuel Hollauf, Franz Pirolt, Denise Bacher, Simone Strasser, Christina Wappl und Mathias Eisenhut für die schöne Zeit, ihre Unterstützung und Freundschaft.

Bei meiner Familie und allen meinen Freundinnen und Freunden bedanke ich mich für ihre Liebe, ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und ihre aufbauenden Worte in schwierigen Zeiten.

# Kurzfassung

Im Rahmen dieser Masterarbeit wurden Polymerblends aus einem bioziden Polymer (partiell hydrolysiertes Poly(2-oxazolin), pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) und ausgewählten Biopolymeren (PHB, PHBV und PLA) hergestellt, um eine mögliche Kombination von biologischer Abbaubarkeit und antimikrobieller Oberflächenaktivität zu ermitteln.

Die Herstellung des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> verlief über drei Stufen, die Monomersynthese aus Ethanolamin und Dodecansäure zu 2-Nonyl-oxazolin, dessen mikrowellenunterstützte Polymerisation und die anschließende saure, partielle Hydrolyse. Für den erwünschten Hydrolysegrad von 75% wurden die entsprechenden Reaktionsbedingungen (Zeit und Temperatur) ermittelt. Die Charakterisierung des bioziden Polymers erfolgte mittels <sup>1</sup>H-NMR- und ATR-FTIR-Messungen. Die für die spätere Verarbeitung nötige Temperaturstabilität des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> wurde anhand von DSC- und STA-Messungen gezeigt.

Zur Herstellung der Polymerblends (mit 5 wt% pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) wurden verschiedene Verarbeitungsverfahren getestet. Das Mischen im Microcompounder und anschließendes Pressen zu Folien in der Vakuumplattenpresse zeigte das beste Ergebnis.

Um Aufschluss über die Verteilung des bioziden Polymers in der Biopolymermatrix zu erhalten wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, die freien Oberflächenenergien bestimmt und ATR-FTIR-Messungen durchgeführt. Zur Ermittlung einer kontaktbioziden Wirkung wurde eine Bestimmung in Anlehnung an ISO 22196:2007 durchgeführt. Die biologische Abbaubarkeit wurde mittels eines enzymatischen Abbauersuchs mit PHB-Depolymerase festgestellt.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten eine nicht ausreichende homogene Verteilung des bioziden Polymers in der Biopolymermatrix. Deshalb konnte auch nur bedingt eine antimikrobielle Oberflächenaktivität gegen *E. coli* und *S. aureus* gezeigt werden. Der enzymatische Abbauersuch lies zudem auf ein Herauslösen des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> aus der Biopolymermatrix schließen.

Eine Kombination von biologischer Abbaubarkeit und antimikrobieller Oberflächenaktivität konnte mit dem verwendeten System nicht erfolgreich gezeigt werden.



# Abstract

The present master thesis deals with the preparation of a polymer blend of a biocidal polymer (partial hydrolyzed poly(2-oxazoline), pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) and selected biopolymers (PHB, PHBV and PLA), to determine a potential combination of biodegradability and antimicrobial surface activity.

The synthesis of pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> was done in three steps, the monomer synthesis of ethanolamine and dodecanoic acid to 2-nonyl-oxazoline, the microwave-assisted polymerization and the subsequent acidic partial hydrolysis. The appropriate reaction conditions (time and temperature) for the desired degree of hydrolysis of 75% were determined. The characterization of the biocidal polymer was done by <sup>1</sup>H-NMR- and ATR-FTIR-measurements. The required temperature stability of pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> for the subsequent processing was shown by STA and DSC.

To prepare the polymer blends (using 5 wt% pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) different processing methods were tested. The best result was achieved by mixing the compounds in a microcompounder, followed by film preparation via a vacuum plate press.

To get information on the distribution of the biocidal polymer in the biopolymer matrix, light microscope images were taken, the free surface energies were determined and ATR-FTIR measurements were done. The determination of a contact biocidal activity was carried out in accordance with ISO 22196:2007. The biodegradability was established by an enzymatic degradation test with PHB depolymerase.

Investigations carried out, showed an insufficient homogenous distribution of the biocidal polymer in the biopolymer matrix. Therefore, antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus* was only shown partly. Furthermore the enzymatic degradation test showed a possible leaching of the pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> from the biopolymer matrix.

A combination of biodegradability and antimicrobial surface activity could not be successfully demonstrated with the used system.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
2	Theoretischer Hintergrund .....	10
2.1	Biopolymere .....	10
2.1.1	Polyhydroxyalkanoate - PHAs .....	11
2.1.2	Polylactid - PLA .....	17
2.1.3	Biologische Abbaubarkeit .....	21
2.2	Antimikrobielle Oberflächen .....	29
2.2.1	Einteilung und Arten.....	29
2.2.2	Wirkungsweise.....	33
2.2.3	Partiell hydrolysiertes Poly(2-oxazolin) .....	36
3	Experimenteller Teil.....	38
3.1	Materialien .....	38
3.2	Verwendete Geräte und Analysemethoden.....	39
3.3	Synthese .....	42
3.3.1	2-Nonyl-2-oxazolin.....	42
3.3.2	Poly(2-nonyl-2-oxazolin).....	43
3.3.3	Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid) .....	44
3.4	Verarbeitung.....	45
3.5	Ermittlung der kontaktbioziden Wirkung .....	46
3.6	Enzymatischer Abbauersuch.....	47
4	Ergebnisse und Diskussion.....	49
4.1	Biozidsynthese .....	49
4.1.1	Monomersynthese .....	49

4.1.2	Polymerisation .....	50
4.1.3	Partielle Hydrolyse .....	51
4.1.4	Charakterisierung .....	55
4.2	Herstellung und Charakterisierung der Folien .....	61
4.2.1	Verarbeitungsverfahren .....	61
4.2.2	Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix.....	64
4.3	Kontaktbiozide Wirkung .....	75
4.4	Biologische Abbaubarkeit .....	78
5	Zusammenfassung und Schlussfolgerung.....	83
6	Anhang.....	86
6.1	Abkürzungen und Symbole .....	86
6.2	Messergebnisse und Spektren.....	88
6.3	Referenzen.....	98

# 1 Einleitung

Biologisch abbaubare Polymere aus nachwachsenden Rohstoffen haben in den letzten Jahren aufgrund eines steigenden Umweltbewusstseins, der sinkenden Verfügbarkeit von fossilen Rohstoffen und politisch gesetzten Maßnahmen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Diese sogenannten Biopolymere zeigen großes Potential in absehbarer Zeit einen wesentlichen Anteil von konventionellen Kunststoffen aus fossilen Rohstoffen zu ersetzen. Die aktuell vielversprechendsten Biopolymere sind Polyhydroxyalkanoate (Poly(3-hydroxybutyrat), PHB und Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat), PHBV), sowie Polylactide (PLA). Sie finden bereits Anwendung in diversen Bereichen wie Verpackungsmaterialien, Medizintechnik oder Haushaltsartikeln. PHAs und PLA sind laufend Thema der Forschung. In erster Linie wird versucht ihre Herstellung und Aufbereitung weiter zu optimieren, um Kosten zu senken und somit ihre Konkurrenzfähigkeit zu steigern. Für die Wissenschaft ist aber nicht nur ihre Herstellung von Interesse, sondern auch die Verbesserung und Gestaltung ihrer Eigenschaften, um dadurch neue Anwendungsbereiche zu ermöglichen und eine noch attraktivere Alternative zu konventionellen Kunststoffen bieten zu können.

Ein besonderes Augenmerk der Materialchemie liegt aktuell auf der Entwicklung antimikrobieller Oberflächen. Sie sollen eine nachhaltige Lösung von Problemen durch Kontaminationen von Mikroorganismen, wie Biofouling (ungewünschte Anlagerungen von Mikroorganismen), Beschädigung von Materialien, Infektionen durch pathogene Mikroorganismen in der Medizin, Verderb von Lebensmitteln uvm. darstellen.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, Biopolymere mit einer antimikrobiellen Oberflächenaktivität auszustatten.

Die Arbeitsgruppe Wiesbrock entwickelte bereits Polymercompounds aus Polypropylen (PP) und unterschiedlichen (partiell) hydrolysierten Poly(2-oxazolin)en und konnte damit eine kontaktbiozide Oberflächenaktivität zeigen. Die besten Ergebnisse wurden mit partiell hydrolysierten Poly(2-nonyl-2-oxazolin)en mit einem Hydrolysegrad von 50% und 75%

(pN<sub>50</sub>A<sub>50</sub> und pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) ermittelt. Die hergestellten Proben beinhalteten 5 wt% des antimikrobiellen Polymers.<sup>1</sup>

Auf Basis dieser vorangegangenen Arbeit war die konkrete Zielsetzung, entsprechende Polymercompounds mit PHB, PHBV und PLA herzustellen und eine mögliche Kombination kontaktbiozider Wirkung und biologischer Abbaubarkeit zu zeigen.

Folgende Aufgabenstellungen wurden definiert:

- Synthese von Poly(2-nonyl-2-oxazolin)
- Ermittlung der Reaktionszeit der partiellen, sauren Hydrolyse für einen Hydrolysegrad von 75%
- Synthese und Charakterisierung des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>
- Herstellung von Polymerblends mit den Biopolymeren und 5 wt% pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> und Verarbeitung zu Folien
- Charakterisierung der Polymerblends hinsichtlich der Verteilung des bioziden Polymers in der Biopolymermatrix
- Überprüfung der antimikrobiellen Oberflächenaktivität
- Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit im Zuge eines enzymatischen Abbaueversuchs mit PHB-Depolymerase

## 2 Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Biopolymere

Kunststoffe sind aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Aufgrund der Vielfältigkeit ihrer Eigenschaften finden sie in unzähligen Bereichen Anwendung. Der Großteil der Kunststoffe wird aus fossilen Rohstoffen hergestellt. Sie sind einfach und günstig herzustellen. Aufgrund ihrer Beständigkeit und mangelnder Abfallwirtschaft in vielen Ländern unserer Erde, wurden sie zu einem Umweltproblem. Strände voller Müll und riesige Müllstrudel in den Weltmeeren sind heute längst Realität und führen zum Sterben vieler Meeresbewohner. Durch äußere Umwelteinflüsse zerfallen sie zu kleinen Kunststoffteilchen und akkumulieren sich so in unserem Ökosystem.

Der steigende Rohölpreis und ein wachsendes ökologisches Bewusstsein führten zu einem großen Interesse an biologisch abbaubaren Polymeren aus nachwachsenden Rohstoffen. Diese Biopolymere können unter definierten Temperatur-, Sauerstoff, und Feuchtigkeitsbedingungen innerhalb einer festgeschriebenen Zeit in Anwesenheit von Mikroorganismen oder Pilzen zu Biomasse, Wasser und  $\text{CO}_2$  (oder  $\text{CH}_4$ ) abgebaut werden.<sup>2</sup> Nicht außer Acht zu lassen ist, dass Biopolymere zwar das Umweltproblem minimieren, aber nur politische Maßnahmen und eine Änderung in unserem Konsum- und Wegwerfverhalten eine langfristige Lösung bieten können.

Ein großer Nachteil von Biopolymeren ist, dass ihre Produktionskosten im Vergleich zu konventionellen Kunststoffen relativ hoch sind. Somit ist es Ziel der Forschung, unter Berücksichtigung einer "grünen Chemie", die Herstellungskosten von Biopolymeren zu minimieren. Intensiv wird auch an der Optimierung und der Erweiterung des Einsatzfeldes der, teils bereits in Verwendung befindlichen, Biopolymere geforscht.

Biopolymere können wie folgt eingeteilt werden:

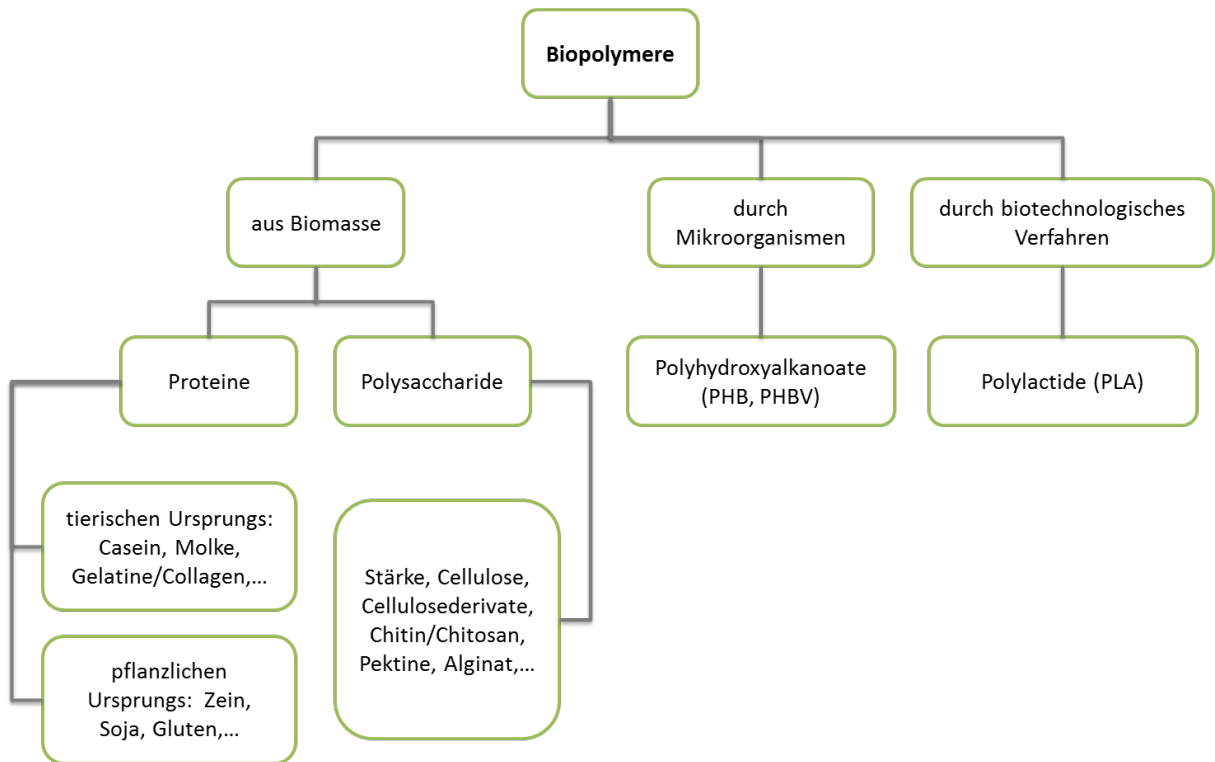


Abbildung 1 – Einteilung der wichtigsten Biopolymere

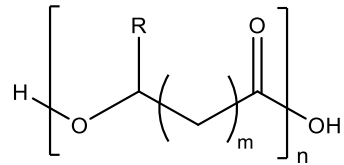
Im Weiteren wird detaillierter auf die in der Arbeit verwendeten Biopolymere eingegangen.

### 2.1.1 Polyhydroxyalkanoate - PHAs

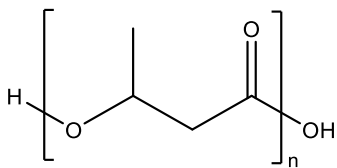
Polyhydroxyalkanoate werden von Mikroorganismen produziert und zählen zu erneuerbaren und biologisch abbaubaren Polyestern. Abhängig von der verwendeten Art der Mikroorganismen und Substrate können Struktur, Molekulargewicht und Zusammensetzung gesteuert werden.<sup>3</sup> Bestimmte Bakterien produzieren bei einem Mangel an Nährstoffen und einem Überschuss an Kohlenstoff PHAs als Kohlenstoff- und Energiereserve, welche in den Zellen gespeichert werden.<sup>4</sup>

Strukturen der wichtigsten Polyhydroxyalkanoate:

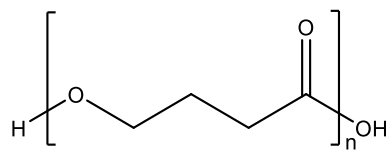
allgemeine Struktur von Polyhydroxyalkanoate



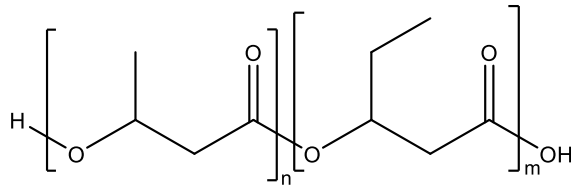
Poly(3-hydroxybutyrat) – P3HB (PHB)



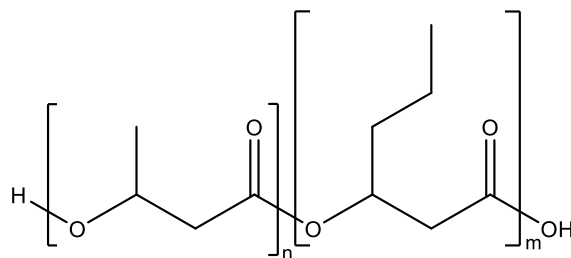
Poly(4-hydroxybutyrat) – P4HB



Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat) – P3HB-co-3HV (PHBV)



Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyhexanoat) – P3HB-3HHx



Der wichtigste Vertreter der PHAs ist Poly(3-hydroxybutyrat)<sup>5</sup>. PHB und PHBV sind die einzigen zwei kommerziell erhältlichen Polymere.<sup>6</sup>



## Herstellung

Eine der Besonderheiten von PHAs ist die Vielzahl an möglichen Rohstoffen die zur biotechnologischen Herstellung genutzt werden können. Als Substrat können einfache Kohlenstoffquellen, wie Kohlehydrate bis zu komplexen Abwasser-Abfällen eingesetzt werden.<sup>12</sup>

Durch Wahl des Bakterienstammes, des Substrats und Einsatz eines möglichen Cosubstrats können Polyester mit unterschiedlicher monomerer Zusammensetzung unter kontrollierten Bedingungen hergestellt werden.<sup>7</sup> Neben einer großen Anzahl bestimmter Bakterien gibt es auch Pflanzenzellen die PHAs produzieren können, allerdings sind diese nicht so effektiv wie Bakterien, welche bis zu 90% ihres Trockenzellgewichtes an PHA produzieren können.<sup>8,9</sup> Der meist verwendete und intensivst erforschte Bakterienstamm ist *Cupriavidus necator* (früher: *Ralstonia eutropha* oder *Alcaligenes eutrophus*).<sup>10,11</sup>

Die biotechnologische Herstellung mittels Fermentation verläuft über einen zweistufigen Fed-Batch-Prozess. In der ersten Stufe, der Wachstumsphase, wird ein nährstoffangereichertes Medium verwendet, um ausreichend Biomasse zu produzieren. Darauf folgt die Produktbildungsphase in einem stickstoff-armen Medium. Nach der Fermentation muss das intrazellulär gebildete PHA abgetrennt werden. Im ersten Schritt erfolgt eine mechanische und/oder chemische Vorbehandlung. Anschließend wird das PHA durch Extraktion gewonnen. Folgende Extraktionsmethoden können eingesetzt werden:

- Zellyse (chemischer Aufschluss, enzymatischer Aufschluss oder Kombination beider)
- Extraktion mit superkritischen Flüssigkeiten
- Spontane Freisetzung (mit genetisch modifizierten Zellen)
- Extraktion mit organischen Lösungsmitteln
- Mechanischer Aufschluss (Hochdruck-Homogenisierung, Sprühtrocknung, mechanische Mühlen, Ultraschall-Behandlung, Presse)

Meist wird eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln durchgeführt. Der Einsatz von großen Mengen organischen Lösungsmittels wirkt sich allerdings negativ auf die Ökobilanz des Herstellungsprozesses aus. Grundsätzlich ist die Isolierung und Aufreinigung des PHA teuer und mit einer hohen Abwasserproduktion verbunden. Ziel der Forschung ist es daher

eine möglichst "grüne" und günstige Aufarbeitung zu entwickeln, um eine konkurrenzfähige Alternative zu Kunststoffen aus fossilen Rohstoffen zu gewährleisten.<sup>12</sup>

### **Eigenschaften**

Die physikalischen Eigenschaften sind vom Molekulargewicht des Polymers abhängig. Dieses wird vom eingesetzten Bakterienstamm, den Produktionsbedingungen (Fermentationsdauer, Wachstumsrate, Konzentration der Kohlenstoffquelle, etc.) und der Extraktionsmethode beeinflusst.<sup>12</sup> Das mittlere Molekulargewicht liegt üblicherweise zwischen  $2 \cdot 10^5$  und  $2 \cdot 10^6$  Da.<sup>13</sup>

PHAs sind thermoplastisch, wasserunlöslich und relativ gut beständig gegenüber hydrolytischem Abbau, sie besitzen eine gute UV-Beständigkeit, haben eine schwache Beständigkeit gegenüber Säuren und Basen und sind löslich in Chloroform und anderen Chlorkohlenwasserstoffen. Weiters sind sie ungiftig, biokompatibel und werden im menschlichen Körper nur sehr langsam abgebaut, weshalb sie für medizinische Anwendungen geeignet sind. Da sie schwerer als Wasser sind wird ein anaerober Abbau in Sedimenten begünstigt.<sup>14,15</sup>

PHB ist hochkristallin, mit einer Kristallinität von über 50%. Es ist sehr brüchig und degradiert bereits knapp über der Schmelztemperatur.<sup>16</sup>

Das Copolymer PHBV ist weniger brüchig und besitzt eine geringere Steifigkeit. Mit steigendem Hydroxyvaleratanteil sinkt die Schmelztemperatur und die Duktilität wird besser. Ein weiterer Vorteil von PHBV ist der größere Verarbeitungsbereich.<sup>5</sup>

Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick der thermischen und mechanischen Eigenschaften:

**Tabelle 1 – Vergleich der Eigenschaften von PHAs mit “kommerziellen“ Kunststoffen<sup>16,17</sup>**

Polymer	T <sub>m</sub> [°C]	T <sub>g</sub> [°C]	E-Modul [GPa]	Zugfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]
PHB	180	4	3,8	40	5
PHBV (11% HV)	157	2	3,7	38	5
PHBV (20% HV)	114	-5	1,9	26	27
PHBV (28% HV)	102	-8	1,5	21	700
PHBV (34% HV)	97	-9	1,2	18	970
PP	176	-10	1,7	38	400
LDPE	130	-30	0,2	10	620

PHB zeigt sehr ähnliche Eigenschaften wie PP, allerdings besitzen sie unterschiedliche chemische Eigenschaften. PHB hat eine geringere Lösungsmittelbeständigkeit und eine schlechtere Bruchdehnung, aber ist besser UV-beständig. Vor allem ist PHB steifer und brüchiger als PP. PHBV zeigt diesbezüglich bessere Eigenschaften und ist deshalb für kommerzielle Anwendungen besser geeignet.<sup>13</sup>

## **Anwendung**

PHAs bieten die Möglichkeit synthetische nicht biologisch abbaubare Kunststoffe in vielen Anwendungsbereichen zu ersetzen.<sup>18</sup> So finden sie in folgenden Bereichen Anwendung: Verpackung (vor allem für Lebensmittel), Agrartechnik, Hygienartikel, Pharmazie, Medizin und Biomedizin (chirurgische Fäden, Wundverbände, Blutgefäße, Gewebekonstruktion, Implantate, Knochenbruchfixierungsplatten, Orthopädie), Elektrotechnik.<sup>2,4</sup>

## **Biologische Abbaubarkeit**

Eine bemerkenswerte Eigenschaft von PHAs ist deren biologische Abbaubarkeit in unterschiedlichsten Medien. In der Natur kommt eine Vielzahl von Mikroorganismen vor die PHA-Depolymerase ausscheiden. Diese hydrolysieren PHA zu wasserlöslichen Oligomeren und Monomeren, welche in weiterer Folge den Mikroorganismen wieder als Nährstoff dienen.<sup>19</sup>

PHA wird in Umgebungen wie Böden, Abwässern, Meerwasser und Seen abgebaut. Die biologische Abbaubarkeit ist von vielen Faktoren, wie mikrobielle Aktivität im Medium, Feuchtigkeit, Temperatur, pH, und Molekulargewicht abhängig. Ebenfalls wird die Abbaurate von folgenden Materialeigenschaften beeinflusst:<sup>12</sup>

- Stereochemie, nur R-Konfiguration wird von der Depolymerase hydrolysiert
- Kristallinität, Abbaurate sinkt mit steigender Kristallinität
- Molekulargewicht, Polymere mit kleinerem Molekulargewicht werden schneller abgebaut
- Monomere Zusammensetzung

Die Abbaurate von PHA liegt im Bereich von ein paar Tagen (in Böden) bis zu Jahren (im Meerwasser).<sup>12,20</sup> Die enzymatische Hydrolyse findet an der Oberfläche statt und das Molekulargewicht bleibt durch die Degradation weitgehend unverändert.<sup>16</sup>

## 2.1.2 Polylactid - PLA

PLA zählt wie PHA zu biologisch abbaubaren aliphatischen Polyestern. Es ist eines der wenigen Polymere, bei welchem die stereochemische Struktur auf einfachem Wege modifiziert werden kann. Durch Polymerisation einer definierten Zusammensetzung von L- und D-Isomeren können Molekulargewicht und Morphologie beeinflusst werden. Die als Ausgangsstoff benötigte Milchsäure kann durch Fermentation von Kohlehydraten aus nachwachsenden Rohstoffen oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

### Herstellung

Ausgangsstoff ist Milchsäure, eine natürlich vorkommende organische Säure. Um sie in ausreichender Menge zu gewinnen wird sie durch chemische Synthese oder Fermentation hergestellt.

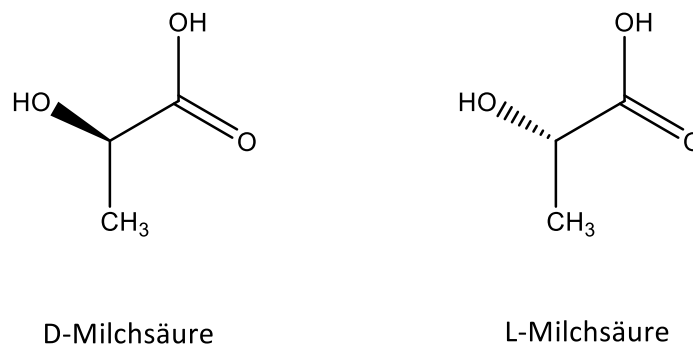


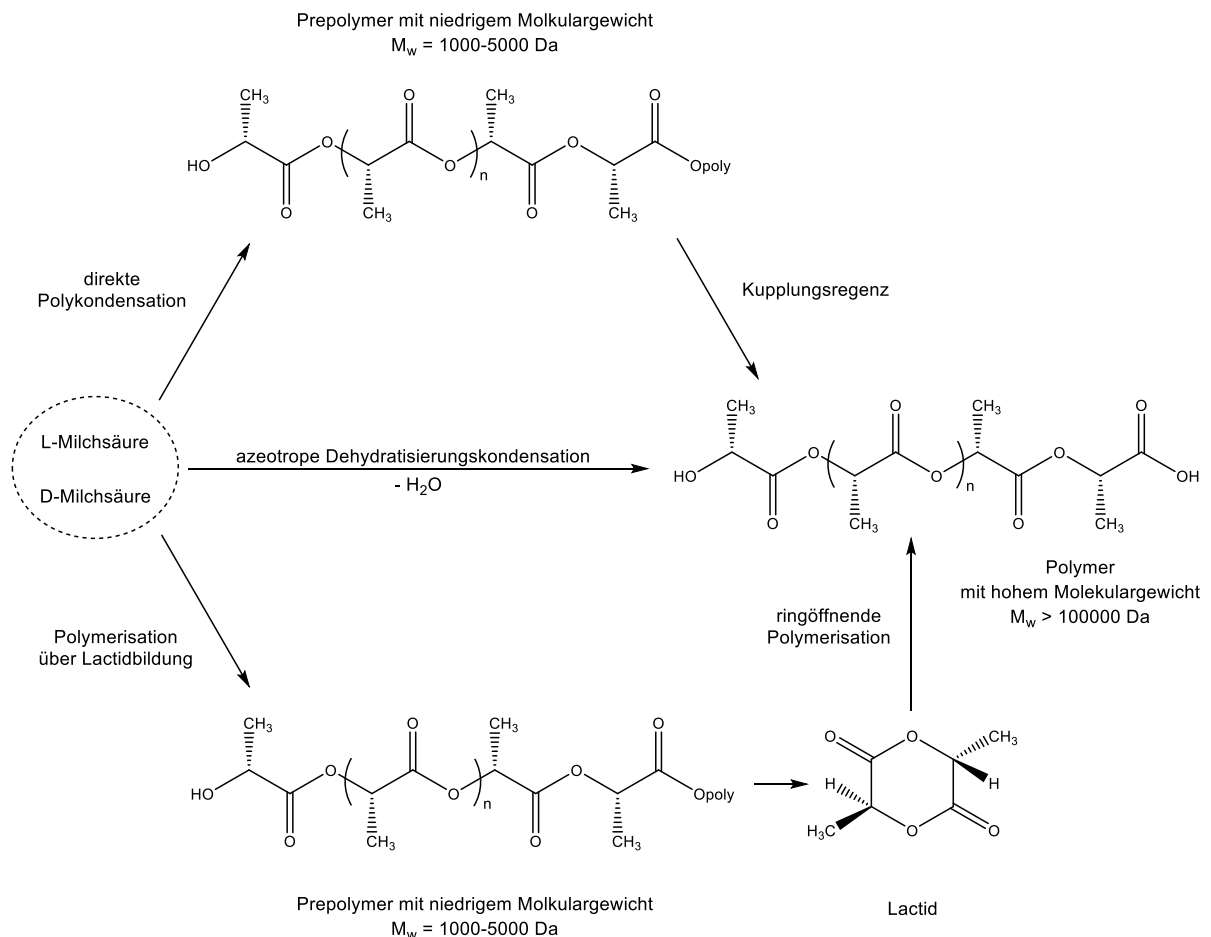
Abbildung 2 – Enantiomere der Milchsäure

Die chemische Synthese verläuft über eine Reaktion von Acetaldehyd mit Blausäure zu Lactonitril und anschließender Hydrolyse zu racemischer Milchsäure. Dieses Verfahren wird nur mehr von einem Großproduzenten (Musashino, Japan) angewendet.<sup>21</sup>

Viel größer ist das Interesse an der fermentativen Herstellung. Durch den Einsatz von erneuerbaren Rohstoffen als Ausgangsmaterial (diverse Kohlenhydrate) bietet sie eine umweltfreundlichere Möglichkeit Milchsäure zu erzeugen. Durch Wahl des Bakterienstammes können chiral reine, als auch racemische Gemische von Milchsäure

gewonnen werden. Nach der Fermentation ist es nötig die Milchsäure abzutrennen und zu reinigen. Weitere Vorteile der biotechnologischen Produktion von Milchsäure sind geringe Substratkosten, niedrige Produktionstemperaturen und ein geringer Energieverbrauch.<sup>22</sup>

Abbildung 3 zeigt drei gängige Synthesemöglichkeiten von PLA:



**Abbildung 3 – Synthesemöglichkeiten von PLA aus D- und L-Milchsäure<sup>23</sup>**

Die Polykondensation ist der Syntheseweg mit den geringsten Kosten, allerdings führt sie zu PLA mit niedrigem Molekulargewicht. Aus diesem Grund werden Kupplungsreagenzien eingesetzt um längere Polymerketten zu erhalten. Dies führt zu höheren Kosten und einem komplexeren Prozess.

Mittels der azeotropen Dehydratisierungskondensation ist es möglich, ohne Kupplungsreagenzien oder Hilfsmittel, PLA mit einem hohen Molekulargewicht ( $>300000 \text{ Da}$ ) herzustellen. Im ersten Schritt muss über Destillation das Kondensationswasser aus der

Milchsäure entfernt werden. Erst anschließend werden Katalysator und hochsiedendes, aprotisches Lösungsmittel zugesetzt und unter Rückfluss und reduziertem Druck polymerisiert.<sup>24</sup> Nachteile dieser Methode sind mögliche Katalysatorreste im Polymer bzw. dessen aufwendige Entfernung.<sup>25</sup>

Die gebräuchlichste Methode ist die Bildung eines Lactids mit anschließender ringöffnender Polymerisation (ROP) zu PLA mit hohem Molekulargewicht. Das Lactid wird durch Polykondensation von Milchsäure und anschließender Depolymerisation hergestellt. Dadurch werden L-Lactid, D-Lactide oder dessen meso-Form erhalten. Die ROP erfolgt, abhängig von der Wahl des Katalysators, ionisch, koordinativ oder radikalisch. Die Herstellung von PLA über diesen Syntheseweg ermöglicht es die Eigenschaften des Produktes über die Zusammensetzung des eingesetzten Lactids (L-, D- oder meso-Form) zu steuern.<sup>24,26,27</sup>

### **Eigenschaften**

Die thermischen und mechanischen Eigenschaften, als auch die biologische Abbaubarkeit werden stark durch Zusammensetzung und Verteilung der Stereomere der Milchsäure in der Polymerkette beeinflusst. Polymere mit einem hohen L-Milchsäure-Anteil sind kristallin, jene mit einem D-Milchsäure-Anteil (>15%) amorph. Kommerzielles PLLA ist teilkristallin, mit einem hohen Schmelzpunkt von ca. 180°C und einer Glasübergangstemperatur im Bereich von 55-60°C. L-PLA und DL-PLA zeigen unterschiedliches Verhalten in den mechanischen Eigenschaften (siehe Tabelle 2), als auch in der biologischen Abbaubarkeit.<sup>26</sup>

**Tabelle 2 – Physikalische Eigenschaften von PLA; Hersteller DURECT Corporation, Birmingham Polymers, AL, USA<sup>26</sup>**

	L-PLA	DL-PLA
$T_g$ [°C]	60-65	50-60
$T_m$ [°C]	184	amorph
$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	1,24	1,25
Zugfestigkeit [MPa]	55,2-82,7	27,6-41,4
Dehnung [%]	5-10	3-10
E-Modul [MPa]	2758-4137	1379-2758
$\eta_{inh}$ [dL/g]	0,90-1,2	0,55-0,75

L-PLA ist hart und transparent. Im Gegensatz dazu ist DL-PLA amorph und besitzt eine schlechtere Zugfestigkeit. Die Eigenschaften sind vom Molekulargewicht, der Kristallinität und der eventuellen Verteilung der Comonomere abhängig. Mit dem Molekulargewicht steigen Schmelz- und Glasübergangstemperatur, als auch Zugfestigkeit und E-Modul. PLA ist in vielen organischen Lösungsmitteln löslich, hat eine sehr hohe Transparenz, ist witterungsbeständig, gut verarbeitbar, besitzt eine niedrige Schmelzviskosität, ist biologisch abbaubar und biokompatibel.<sup>28</sup>

### **Anwendung**

Da PLA das günstigste Biopolymer ist, stellt es die vielversprechendste Alternative zu konventionellen Kunststoffen dar. Es findet bereits vorrangig als Verpackungsmaterial (vor allem für Lebensmittel), der Biomedizin und für Haushaltswaren (Einweggeschirr und –besteck) Anwendung. In der Medizin wird es unter anderem für Knochenbruchfixierungen und chirurgische Nähte verwendet. Ebenfalls wird PLA in pharmazeutischen Präparaten für Wirkstoff-Freisetzungssysteme genutzt.<sup>25,29</sup>



## **Biologische Abbaubarkeit**

PLA wird nur sehr schlecht unter Umgebungsbedingungen in der Natur abgebaut. Unter definierten Bedingungen, wie in industriellen Kompostieranlagen kann PLA sehr gut abgebaut werden.<sup>30</sup> Die biologische Abbaubarkeit ist, wie bei PHAs, stark von der Kristallinität und dem Molekulargewicht abhängig. Weitere Faktoren sind Reinheit, Endgruppen, Wasserdurchlässigkeit des PLA, als auch pH-Wert, Temperatur und Feuchtigkeit der Umgebung.<sup>22</sup> Der biologische Abbau verläuft über zwei Stufen. Im ersten Schritt wird durch Hydrolyse, welche durch Säuren, Basen, Temperatur und Feuchtigkeit beschleunigt wird, das Molekulargewicht verringert. Anschließend erfolgt der Abbau durch Mikroorganismen, diese bauen die oligomeren Milchsäure-Moleküle zu Wasser und CO<sub>2</sub> ab. Dieser zweistufige Prozess kann insofern als Vorteil gesehen werden, da PLA deshalb bei Raumtemperatur und/oder geringer Feuchtigkeit sehr gut lagerstabil ist und sich deshalb besonders für Lebensmittelverpackungen eignet.<sup>31</sup>

### **2.1.3 Biologische Abbaubarkeit**

Biologische Abbaubarkeit ist nicht einheitlich definiert. Von mehreren nationalen und internationalen Normungsgremien und Organisationen wurden bisher diverse Definitionen veröffentlicht.<sup>32</sup>

Nachführende **Tabelle 3** gibt eine Übersicht:

**Tabelle 3 – Übersicht der Definitionen von biologischer Abbaubarkeit und biologisch abbaubaren Kunststoffen<sup>32</sup>**

---

**Biologisch abbaubare DIN FNK 103.2**

**Kunststoffe**

Ein Kunststoff wird biologisch abbaubar genannt, wenn durch einen biologischen Abbauprozess alle organischen Bestandteile vollständig abgebaut werden. Umgebungsbedingungen und biologische Abbauraten sind anhand standardisierter Testmethoden zu ermitteln.

**ASTM sub-committee D20-96**

Sind abbaubare Kunststoffe, bei welchen der Abbau von natürlich vorkommenden Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen oder Algen verursacht wird.

**Japanese Biodegradable Plastics Society**

Polymere Werkstoffe welche zumindest in einer Stufe des Abbauprozesses durch Anwesenheit von natürlich vorkommenden Organismen zu niedermolekularen Verbindungen abgebaut werden.

**ISO 472**

Ein Kunststoff, welcher dafür konzipiert ist, unter spezifischen Umgebungsbedingungen, einer erhebliche Änderung der chemischen Struktur zu unterlaufen, welche zu einem Verlust von Eigenschaften führt, welche mittels Standard-Test-Methoden ermittelt werden. Entsprechend dem Kunststoff wird, unter Anwendung innerhalb eines definierten Zeitraums, ihre Klassifizierung bestimmt. Die Änderung der chemischen Struktur wird durch die Einwirkung von natürlich vorkommenden Mikroorganismen verursacht.

---

	<b>CEN</b>	Ein abbaubares Material, bei welchem der Abbau durch die Einwirkung von Mikroorganismen verursacht wird und schließlich zu einer Umwandlung des Materials zu Wasser, Kohlendioxid und/oder Methan und neuer Zellbiomasse führt.
<b>Biologischer Abbau</b>	<b>DIN FNK 103.2</b>	Biologischer Abbau ist ein durch biologische Aktivität verursachter Prozess, welcher durch Änderung der chemischen Struktur zu einem natürlich vorkommenden Stoffwechselprodukt führt.
	<b>CEN</b>	Biologischer Abbau ist ein Abbau welcher durch biologische Aktivität, vor allem durch enzymatische Einwirkung, zu einer feststellbaren Änderung der chemischen Struktur eines Materials führt.
<b>Inhärente biologische Abbaubarkeit</b>	<b>CEN</b>	Fähigkeit eines Materials biologisch abgebaut werden zu können, was unter Laborbedingungen festgestellt wird.
<b>Vollständiger biologischer Abbau</b>	<b>CEN</b>	Die Aufspaltung einer organischen Verbindung durch Mikroorganismen in der Anwesenheit von Sauerstoff zu Kohlendioxid, Wasser und Mineralstoffen (Mineralisierung) und neuer Biomasse oder in der Abwesenheit von Sauerstoff zu Kohlendioxid, Methan, Mineralstoffen und neuer Biomasse.

## **Kompostierbarkeit CEN**

Kompostierbarkeit ist die Eigenschaft eines Verpackungsmaterials in einem Kompostierungsprozess abgebaut zu werden.

Um Kompostierbarkeit nachzuweisen muss anhand von Standardmethoden eine Abbaubarkeit des Verpackungsmaterials in einem Kompostierungssystem gezeigt werden. Das Endprodukt hat den relevanten Qualitätskriterien eines Komposts zu entsprechen.

---

Der biologische Abbau von unterschiedlichen Kunststoffen verläuft nicht einheitlich. Grundlegende Mechanismen können aber beobachtet werden. Vereinfacht kann der biologische Abbau in drei Stufen eingeteilt werden: biologischer Zerfall, biologische Fragmentierung und Assimilation (unter Berücksichtigung abiotischen Einflusses).<sup>33</sup>

Da Kunststoffe nicht oder nur sehr schlecht wasserlöslich sind, können einzelne Polymermoleküle nicht in die Zellen von Mikroorganismen transportiert werden. Daher besitzen viele Mikroorganismen die Fähigkeit extrazelluläre Enzyme abzusondern, welche Polymere depolymerisieren. So werden die langen Polymerketten zu wasserlöslichen Oligomer- und Monomereinheiten abgebaut, welche in folge dessen von den Zellen aufgenommen werden können. In der Zelle werden sie zu Biomasse, Wasser, Kohlendioxid, und Methan (unter anaeroben Bedingungen) abgebaut. Da extrazelluläre Enzyme zu groß sind, um in den Bulk des Materials einzudringen, findet der Abbau ausschließlich an der Oberfläche statt. In den meisten Abbauprozessen ist die enzymkatalysierte Depolymerisierung die erste Stufe. Wie eingangs erwähnt verläuft der Abbau von unterschiedlichen Kunststoffen nicht einheitlich und deshalb findet, wie im Fall von PLA, zuerst bzw. parallel zum enzymatischen Abbau ein abiotisch chemischer oder physikalischer Prozess statt. Dazu zählen chemische Hydrolyse, thermischer Polymerabbau, Oxidation oder Polymerspaltung durch Strahlung (Photodegradation).

Zu berücksichtigen ist, dass die Umgebungsbedingungen nicht nur den Abbau des Polymers, sondern auch die mikrobielle Population, als auch die Aktivität der unterschiedlichen Mikroorganismen beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen: Feuchtigkeit, Temperatur, pH-Wert, Salzgehalt, An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff und Verfügbarkeit von Nährstoffen.

Diese Parameter sind demnach bei der Ermittlung einer biologischen Abbaubarkeit von Polymeren zu berücksichtigen.<sup>32</sup>

Biologische Abbaubarkeit kann nicht einfach durch chemische Zusammensetzung oder der damit verbundenen physikalischen Eigenschaften ermittelt werden. Die Umgebung in welcher das Material abgebaut wird, hat einen ebenso großen Einfluss auf die Abbaurate. Somit kann nicht anhand einer einzelnen Methode die biologische Abbaubarkeit bestimmt werden. Bei der Auswahl des Tests bzw. der Methode ist stets die Art der Anwendung des Materials, als auch welche Informationen gefragt sind, zu berücksichtigen.

Im Folgenden wird kurz auf gängige Methoden zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Polymeren eingegangen:<sup>34</sup>

### **Enzym-Assays**

Die Polymerprobe wird in diesem Test in eine Pufferlösung oder ein pH-kontrolliertes System mit einem oder mehreren ausgewählten Enzymen eingelegt. Der enzymatische Abbau wird anhand eines Gewichtsverlustes und/oder des gelösten organischen Kohlenstoffs bestimmt. Dadurch kann die Kinetik der Depolymerisierung oder auch die Bildung von Oligomeren und Monomeren unter bestimmten Bedingungen erfasst werden. Enzym-Assays sind schnelle Methoden und liefern quantitative Informationen. Die Mineralisierung kann mittels diesem Test nicht eruiert werden.

### **Platten-Test**

Platten-Tests wurden zur Ermittlung der Bestimmung der Beständigkeit von Polymeren gegen mikrobiellen Abbau entwickelt. Das Prinzip dieser Methode ist die Feststellung einer Wachstumsförderung eines Materials. Dafür wird die Polymerprobe auf einer Agarplatte, ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle, platziert und mit einer Bakterien- oder Pilzkultur besprüht. Nach einer Inkubation für eine bestimmte Zeit bei einer definierten Temperatur wird das Wachstum auf der Probenoberfläche bestimmt. Eine Variation dieser Methode ist der "clear zone"-Test. Für dieses Screening wird eine feine Suspension des Polymers in einem Agargel ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle hergestellt. In Vertiefungen im Agar werden Testimpfstoff-Kulturen gegeben. Nach einer Inkubation zeigt eine "clear-zone", welche optisch oder instrumentell bestimmt wird, eine Verwertung des Polymers an.

## **Respirations-Test**

Eine aerobe mikrobielle Aktivität wird üblicherweise anhand des Sauerstoffverbrauchs ermittelt. Ein aerober biologischer Abbau benötigt Sauerstoff für die Oxidation von Verbindungen zu seinen mineralischen Bestandteilen wie  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_2$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$ , etc. Der verbrauchte Sauerstoff während der Inkubation wird als biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB) bezeichnet. Dieser ist eine Maß für den Grad des biologischen Abbaus. Einige Test-Methoden basieren auf der Messung des BSB, welcher oft als Prozentsatz des theoretischen Sauerstoffbedarfs (TSB) des Probenmaterials angegeben wird. Der TSB entspricht der theoretischen Menge, die für die vollständige Oxidation eines Substrats zu seinen mineralischen Bestandteilen nötig ist. Dieser kann anhand der elementaren Zusammensetzung und der Stöchiometrie der Oxidation oder durch experimentelle Bestimmung über den CSB (chemischer Sauerstoffbedarf) ermittelt werden. Respirations-Tests werden oft als Screening-Tests verwendet, da sie eine relativ einfache und empfindliche Methode sind. Allerdings sind sie nur eine indirekte Bestimmung für die biologische Abbaubarkeit.

## **Gasentwicklungs-Test ( $\text{CO}_2$ oder $\text{CH}_4$ )**

Die Entwicklung von Kohlendioxid oder Methan entspricht einem direkten Parameter für die Mineralisierung und ist daher ein wichtiges Hilfsmittel, um eine biologische Abbaubarkeit von Polymeren nachzuweisen. Dafür wurde eine Vielzahl von Test-Methoden für aeroben biologischen Abbau standardisiert. Beispiele hierfür sind der (modifizierte) Sturmtest und ein Kompostiertest unter kontrollierten Laborbedingungen. Aber auch für die Bestimmung biologischer Abbaubarkeit unter anaeroben Bedingungen wurde Test entwickelt. Hierzu zählen der anaerobe Klärschlamm-Test, wie der anaerobe Gärungstest. Alle Tests verfolgen das gleiche Prinzip, können sich aber in der Zusammensetzung des Mediums, Impfkultur, Substrateinbringung, und der Messmethode der Gasentwicklung unterscheiden. Beim Gasentwicklungs-Test wird die Druckerhöhung und/oder die Volumenzunahme durch die Gasentwicklung bestimmt; üblicherweise kombiniert mit einer gaschromatographischen Analyse der Gasphase. Für eine exakte Bestimmung ist es nötig die gesamte Kohlenstoffbilanz zu berücksichtigen. Der Gasentwicklungs-Test ist eine sehr gängige Methode zur Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit von Kunststoffen, da sie relativ einfach durchzuführen und empfindlich ist. Es kann bei diesem Test ein direktes Maß für die

Mineralisierung bestimmt werden. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit Testbedingungen und Impfkulturen entsprechend der Anwendung bzw. den Umgebungsbedingungen, in welchen der biologische Abbau stattfinden soll, wählen zu können.

### **Radioaktiv markierte Polymere**

Einige Materialien können unter strengen Testbedingungen ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle nur sehr schlecht abgebaut werden. Bei Verwendung einer zusätzlichen, leicht zugänglichen Kohlenstoffquelle, kann nicht mehr unterschieden werden wie viel des produzierten CO<sub>2</sub> oder CH<sub>4</sub> von der Zersetzung des Kunststoffes herrührt. Der Einbau von <sup>14</sup>C in ein synthetisches Polymer ermöglicht dessen Unterscheidung. Somit kann der gewichtsmäßige Anteil des Kohlenstoffes, welcher während des Abbaus mineralisiert wurde bestimmt werden. Nachteil dieser Methode ist, dass dafür eigens ein radioaktiv markiertes Polymer synthetisiert werden muss, wodurch neue Fehlerquellen entstehen können.

### **Simulierte (beschleunigte) Umgebungen im Labormaßstab**

Der biologische Abbau eines Polymers ist üblicherweise mit einer Änderung der physikalischen, chemischen und mechanischen Eigenschaften verbunden. Diese Eigenschaften können als Funktion der Dauer der Einwirkung eines biotischen Mediums gemessen werden und somit Auswirkungen eines Abbauprozesses auf Materialeigenschaften beobachtet werden. Im Labormaßstab können biotische Medien gezielt gestaltet werden um natürliche Systeme zu imitieren. Dabei können wichtige Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, mikrobielle Gemeinschaft, Rührung und Sauerstoffverfügbarkeit kontrolliert werden. Die Regulierung dieser Faktoren erhöht die Reproduzierbarkeit und der Abbau kann beschleunigt werden. Solche Laborsimulationen können sehr gut zur Beurteilung von Langzeit-Effekten herangezogen werden. Anhand dieser Methode ist es möglich einen biologischen Abbau eines Polymers in Meerwasser, Böden, Kompost oder Abfalldeponien im Labormaßstab mit kontrollierten Parametern wie Temperatur oder Feuchtigkeit, nachzuahmen. Der biologische Abbau wird mittels der Änderung mechanischer Eigenschaften, des Molekulargewichts oder des Gewichtsverlustes bestimmt. Mit diesem Test ist es nicht möglich Aussagen über die Mineralisierung zu treffen.

### **Natürliche Umgebungen, Feldversuche**

Die Durchführung von Feldversuchen bietet die beste Möglichkeit die tatsächlichen umweltbedingten Einwirkungen auf einen Kunststoff zu beobachten. Zu berücksichtigen ist, dass die Ergebnisse dieses Tests immer nur für die entsprechende eingesetzte Umgebung gelten und nicht auf andere Umgebungen bzw. Medien übertragen werden können. Ein großer Nachteil dieser Methode ist der zeitliche Rahmen, da der biologische Abbau eines Materials, abhängig von den Umgebungsbedingungen, sehr langsam sein kann (Monate bis Jahre).



## 2.2 Antimikrobielle Oberflächen

Biozide bzw. antimikrobielle Stoffe sind Substanzen die pathogene Mikroorganismen abtöten. Aufgrund von durch mikrobielle Infektionen verursachten Problemen in verschiedensten Bereichen, wie Gesundheit und Hygiene, Lebensmittelverpackung, Wasseraufbereitung, Medizintechnik, Medikamente, Textilindustrie uvm. finden Biozide in unserem Alltag eine breite Anwendung.

Bakterielle Infektionen sind nach wie vor eine der häufigsten Todesursachen.<sup>35</sup> Grund dafür ist heute vielmehr nicht ein Mangel an Hygiene, sondern eine hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit und Ansteckungswahrscheinlichkeit, verursacht durch Globalisierung und steigende Mobilität. Zusätzlich sind vor allem Industrieländer mit Problemen durch multiresistente Bakterien, wie etwa den methicillinresistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) konfrontiert.<sup>36</sup>

### 2.2.1 Einteilung und Arten

Herkömmliche antimikrobielle Wirkstoffe, welche als keimtötende Mittel Verwendung finden sind meist niedermolekulare Verbindungen, wie Halogene, Alkohole, Aldehyde, Phenole, Säuren, Tenside, Organometallverbindungen, oder Antibiotika. Sie haben allerdings die Nachteile einer kurzen Wirkungsdauer, Probleme einer Rückstandstoxizität und einem möglichen Beitrag zur Erhöhung von Resistenzbildung von Bakterien. Einen möglichen Lösungsansatz hierfür findet die Materialchemie durch die Entwicklung von Oberflächen, die entweder mikrobielle Zellen abstoßen oder sie töten. Hierfür werden antimikrobiell-funktionalisierte Gruppen in Polymere eingebracht. Die Vielfältigkeit von Kunststoffen schlägt sich auch hier nieder und bietet unterschiedlichste Methoden antimikrobielle Polymere herzustellen. So kann eine biozide Aktivität durch Einsatz organischer oder anorganischer Additive, durch nachträgliche Modifikation des Polymers, oder durch Synthese eines Monomers mit biozider Funktionalität, welches polymerisiert bzw. mit einem anderen Monomer copolymerisiert wird, erreicht werden.<sup>37</sup> Dadurch

können eine Reduzierung der Toxizität, eine Verbesserung der Aktivität und Selektivität sowie eine erhöhte Lebensdauer erreicht werden. Drei prinzipielle Wirkungsweisen sind hierfür möglich:<sup>38</sup>

### **Biozidfreisetzende Polymeroberflächen**

Hierbei werden Biozide vom Polymer freigesetzt um Mikroorganismen in der Nähe der Oberfläche abzutöten. Grundlegend wird hierbei das Problem der Resistenzbildung nicht gelöst und die antimikrobielle Aktivität ist zeitlich begrenzt. Hierfür wurden Systeme entwickelt, welche einen möglichst langen Wirkungszeitraum besitzen bzw. keine cytotoxischen Substanzen freisetzen.

Ein Beispiel hierfür ist ein pH-veränderndes System mit Molybdäntrioxid ( $\text{MoO}_3$ ), als anorganisches Polymeradditiv oder in Sol-Gel-Beschichtungen. Die antimikrobielle Wirkung wird durch die Freisetzung von Hydronium-Ionen in Anwesenheit von Wasser verursacht.  $\text{MoO}_3$ -modifizierte Materialien zeigen keine Cytotoxizität.<sup>39</sup>

Mit biologisch schaltbaren antimikrobiellen Polymeren ist es möglich durch Abspaltung einer einzelnen funktionellen Gruppe die biozide Wirksamkeit aufzuheben und somit in eine nicht toxische Form zu überführen. Grundlage hierfür ist ein Satellitengruppeneffekt. Dieses System ermöglicht eine Kontrolle der antimikrobiellen Aktivität und der Cytotoxizität.<sup>40</sup>

Eine weitere Möglichkeit bieten Beschichtungen aus N-Halaminen, welche kontrolliert Hypochlorit freisetzen. Diese Filme zeigen einen größeren Wirkungszeitraum und können zudem regeneriert werden.<sup>41</sup>

### **Biozidproduzierende Polymeroberflächen**

Bei biozidproduzierenden Polymeren wird ein antimikrobieller Wirkstoff katalytisch an der Oberfläche hergestellt und führt so zu einer praktisch unerschöpflichen Biozidverfügbarkeit. Dies ist möglich bei photokatalytischen  $\text{TiO}_2$ -Beschichtungen. Diese können durch UV-Einstrahlung hochoxidative Radikale auf der  $\text{TiO}_2$ -Oberfläche bilden, welche zu einer photokatalytischen Peroxidation von Zellmembranen von Mikroorganismen führen können und diese dadurch abtöten.<sup>42</sup>

Ein ähnlicher Mechanismus findet beim Einsatz von organischen Photosensibilisatoren statt. Hierfür werden Porphyrine, Chlorophyll-Derivate oder Farbstoffmoleküle in einem Polymer immobilisiert, welche in der Lage sind durch Anregung mit sichtbarem Licht aus Luftsauerstoff hochreaktiven Singulett-Sauerstoff zu generieren.<sup>43</sup>

Eine gänzlich unterschiedliche Strategie ist die kovalente Immobilisierung von Glykoseoxidase in Polymeren. Dabei wird die Bildung von Wasserstoffperoxid katalysiert, welches cytotoxisch wirkt.<sup>44</sup>

### **Kontaktaktive Polymeroberflächen**

Kontaktaktive Polymeroberflächen besitzen den großen Vorteil keinen Energieeintrag zu benötigen, kein Biozid freizusetzen und somit unerschöpflich zu sein. Anhand biozider Polymere ist es möglich die Toxizität zu reduzieren und die Aktivität und Selektivität zu verbessern. Bei den meisten bioziden Polymeren handelt es sich um positiv geladene Systeme, oft mit amphiphilem Charakter. Ein Problem stellt der Nachweis einer tatsächlichen kontaktbioziden Wirkung dar, da bisher kein eindeutiges Verfahren dafür entwickelt wurde.<sup>38</sup>

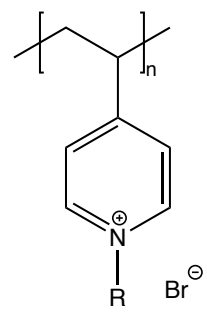
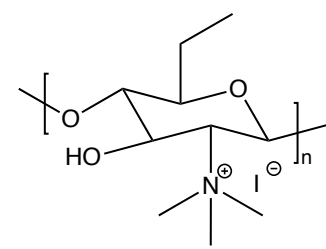
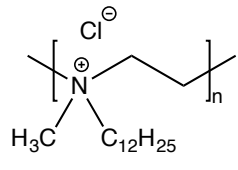
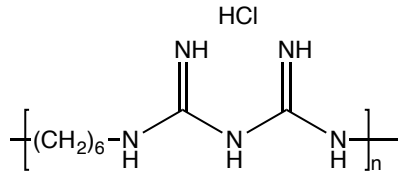
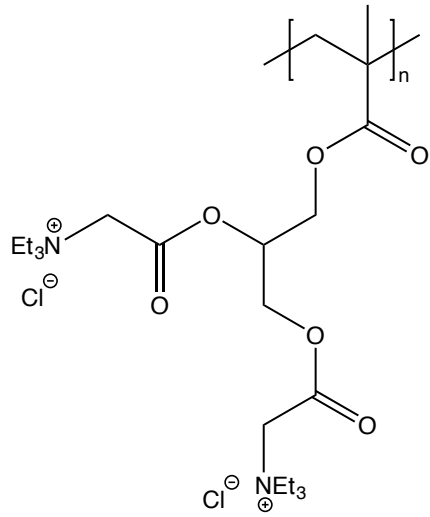
Bisher ist eine Vielzahl biozider Polymere bekannt. Sie können sich in ihrer Herstellung und Wirkungsweise sehr unterscheiden. Grundlegend gibt es drei strukturelle Möglichkeiten: das Vorliegen der antimikrobiellen Funktion in der Hauptkette, einer Seitenkette oder als Endgruppe.

Folgende Herstellungsarten sind möglich.<sup>45</sup>

- Monomereinheit mit antimikrobieller Aktivität
- Immobilisierung antimikrobieller Verbindungen in synthetisch hergestellten Polymeren oder natürlichen Polymeren
- Herstellung von Polymeren mit hydrolysierbaren antimikrobiellen Stellen in der Polymerkette

Der Großteil der bekannten antimikrobiellen Polymere sind Polykationen.<sup>46</sup> **Tabelle 4** gibt einen Überblick:

Tabelle 4 – Beispiele unterschiedlicher biozider kationischer Polymere

	Beispiel
<p>Poly(4-vinyl-N-alkylpyridinium) Salze</p>	
<p>Chitosan mit quaternären Ammoniumgruppen und Cellulosederivate</p>	
<p>quaternisierte Polyalkylenimine</p>	
<p>Polyalkylbiguanidine</p>	
<p>Polyacrylate mit quaternären Ammonium-, Phosphonium- oder tertiären Sulfonium-Gruppen</p>	

Grundlegende Anforderungen für antimikrobielle Polymere sind: (1) einfach und günstig herzustellen, (2) Langzeitstabilität und Temperaturstabilität im Anwendungsbereich, (3) nicht wasserlöslich (für wasser-desinfizierende Anwendungen), (4) darf sich nicht zu toxischen Verbindungen zersetzen bzw. freisetzen, (5) keine toxischen Auswirkungen bei der Verarbeitung, (6) muss ohne Verlust der Aktivität regenerierbar sein und (7) biozide Wirkung gegenüber einer großen Bandbreite an pathogenen Mikroorganismen. Die Aktivität und der Wirkungsmechanismus von antimikrobiellen Polymeren werden von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Dazu zählen das Molekulargewicht, sterische Effekte durch z.B. Spacerlängen, das amphiphile Gleichgewicht und Art des Gegenions.<sup>37</sup>

## 2.2.2 Wirkungsweise

Um einen Einblick in die Wirkungsweise antibakterieller Polymere zu erhalten, wird nun eingangs der Aufbau einer Bakterienzelle, insbesondere dessen Zellwand kurz erläutert. Bakterien sind Prokaryoten und besitzen im Unterschied zu Eukaryoten keinen Zellkern. **Abbildung 4** zeigt den schematischen Aufbau einer Prokaryotenzelle:

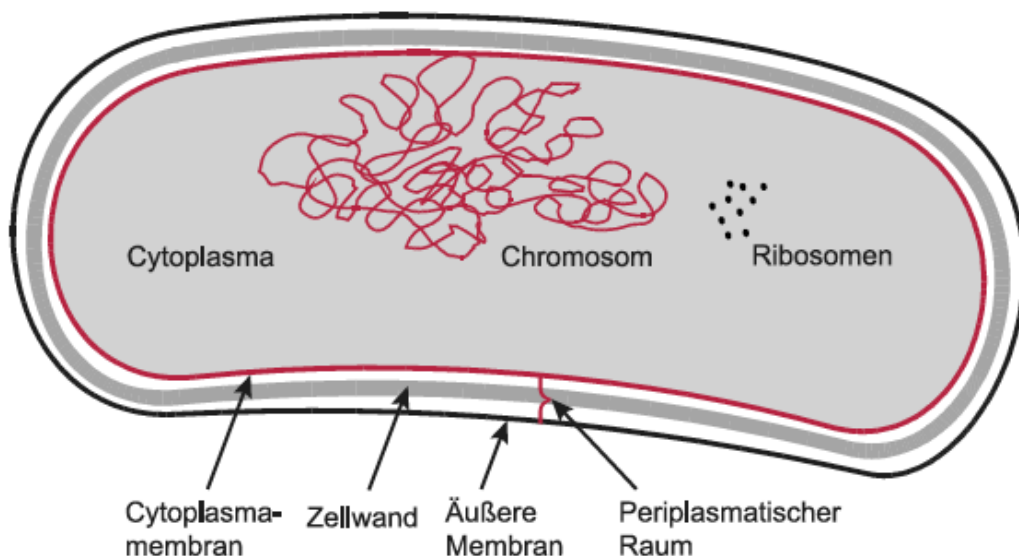


Abbildung 4 – Aufbau einer Prokaryotenzelle<sup>47</sup>

Das ringförmige Chromosom (Nukleoid) liegt frei im Cytoplasma vor. Die Cytoplasmamembran ist verantwortlich für Transport- und Energieumwandlungsprozesse und wird von der Zellwand umgeben. Eine äußere Membran besitzen nur gramnegative Bakterien und ist bei grampositiven Bakterien nicht vorhanden.

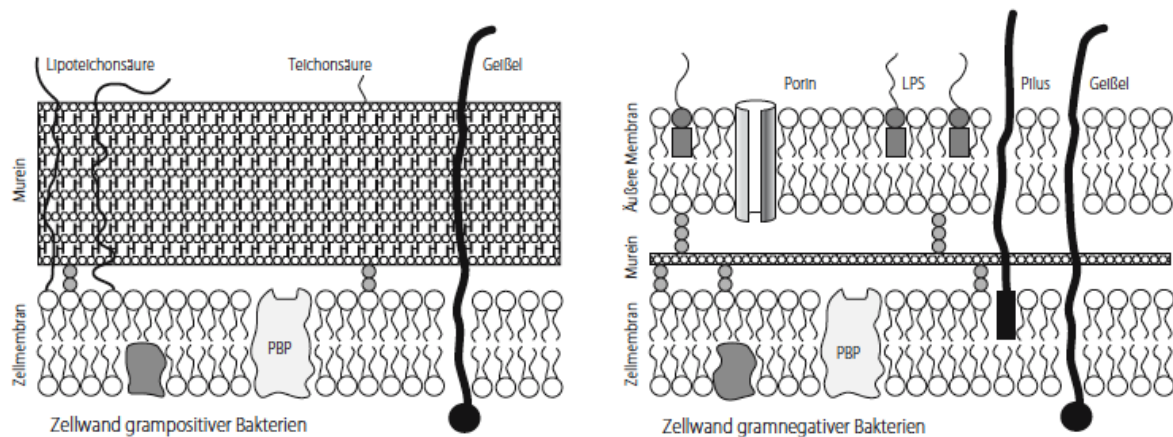


Abbildung 5 – Zellwandaufbau (PBP = Penicillin Bindeproteine, LPS = Lipopolysaccharide)<sup>48</sup>

Bei grampositiven Bakterien ist das Murein aus bis zu 40 Schichten aufgebaut, bei gramnegativen nur aus ein oder zwei. Das Murein grampositiver Bakterien ist mit Teichonsäure aus verketteten Zuckeralkoholen verwoben und bildet meist die äußere Schicht. Im Gegensatz dazu werden gramnegative Bakterien von einer zweiten Zellmembran, der äußeren Membran umschlossen. Diese stellt allerdings keine zweite osmotische Barriere dar, da sie Porine enthält. Die äußere Membran begrenzt den periplasmatischen Raum, in welchem sich verschiedene Proteine, die an Transportprozessen und der Spaltung von Nahrungsmolekülen beteiligt sind, befinden. Zusätzlich befinden sich auf der äußeren Membran Lipopolysaccharide, die für die Pathogenität einiger Bakterien relevant sein können, da sie teils Antigen-Wirkung zeigen, oder als Toxin wirken.<sup>47</sup>

### Mögliche Wirkprinzipien

Wie bereits erwähnt besitzen die meisten antimikrobiellen Polymere einen amphiphilen Charakter und weisen eine starke positive Ladung auf. Bis heute ist die Wirkungsweise

biozider Polymere nicht vollständig geklärt. Grundlegend kann eine bakterienabtötende Wirkung in folgende Schritte eingeteilt werden: (1) Adsorption an der Bakterienzelloberfläche, (2) Diffusion durch die Zellwand, (3) Bindung an die cytoplasmatische Membran, (4) Schädigung der cytoplasmatischen Membran, (5) Austritt cytoplasmatischer Bestandteile, (6) Zelltod.<sup>49</sup>

Von Krumm und Tiller wurden folgende Erklärungsmodelle der Wirkprinzipien zusammengefasst:<sup>38</sup>

- Polymerer Spacereffekt: biozide Gruppen, welche über lange Polymerketten auf einer Oberfläche gebunden sind, erreichen die cytoplasmatische Membran von adhärierenden Bakterienzellen und zerstören diese.
- Bei hydrophoben, quartären Ammoniumverbindungen in bioziden Polymeren, besteht die Möglichkeit, dass diese negativ geladene Phospholipide aus der Zellmembran herausziehen und dadurch die Mikroorganismen töten.
- Für amphiphile Polymere wird eine besonders starke Adhäsion des hydrophoben Teils mit grampositiven Bakterienzellen vermutet, was dessen Deformation bewirkt und somit als Todesursache in Frage kommt.
- Bei kationischen Bioziden wird vermutet, dass sie in Zellwänden gramnegativer Bakterien essenzielle Calciumionen austauschen oder Lipopolysaccharide entfernen und dadurch die Zelle zerstören.
- Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei grampositiven Zellen ablaufen, in dem aufgrund der hohen Ladungsdichte von kationischen Polymeren, Teichonsäuren aus der Zellwand diffundieren und so zum Abbau der Zellwand führen.
- Eine weitere Theorie ist, dass kationische, biozide Polymere das elektrochemische Potential der asymmetrischen bakteriellen Zellmembran stören.

### 2.2.3 Partiiell hydrolysiertes Poly(2-oxazolin)

Von der Arbeitsgruppe Wiesbrock wurden unterschiedliche (partiell) hydrolysierte Poly(2-oxazolin)-Copolymere durch mikrowellenunterstützte Polymerisation und anschließender saurer Hydrolyse hergestellt. Anschließend wurden Polymerblends mit 5 wt% der hergestellten Copolymere und PP zu Plättchen gepresst. Die produzierten Plättchen wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative *E. coli* und *P. aeruginosa*, als auch *C. albicans* vom Hydrolysegrad des Poly(2-oxazolin)-Copolymers abhängig ist. Dahingegen konnte nur von partiell hydrolysierten Poly(2-nonyl-2-oxazolin)en eine antimikrobielle Wirkung gegen grampositiven *S. aureus* gezeigt werden. Die besten Ergebnisse konnten mit partiell hydrolysierten Poly(2-nonyl-2-oxazolin)en mit einem Hydrolysegrad von 50% und 75% gezeigt werden.<sup>1</sup>

2-Oxazolin-Monomere können über drei unterschiedliche Wege hergestellt werden: aus Nitrilen und Aminoalkoholen<sup>50</sup>, aus Fettsäuren und 2-Aminoethanol (Patent von Henkel)<sup>51</sup> oder über eine dreistufige Reaktion ausgehend von 4-Pentensäure und N-Hydroxysuccinimid (für kurzkettige Substituenten).<sup>51</sup> Die ersten beiden Methoden besitzen den Vorteil lösungsmittelfrei geführt werden zu können.

Die Polymerisation erfolgt durch eine mikrowellenunterstützte, kationisch ringöffnende Polymerisation (CROP) zu Poly(2-oxazolin)en.<sup>52</sup>

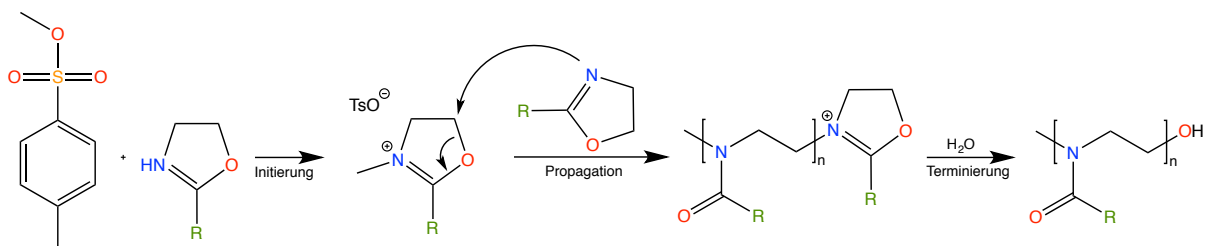
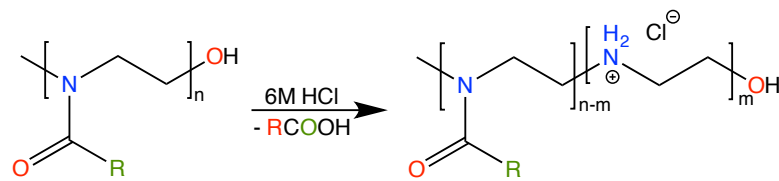


Abbildung 6 – Reaktionsmechanismus der kationisch ringöffnenden Polymerisation eines 2-Oxazolins initiiert durch Methyltosylat



Die CROP verläuft als lebende Polymerisation mit einer Kinetik erster Ordnung. Da die Kettenwachstumsreaktion unter Abwesenheit von irreversiblen Übertragungs- oder Abbruchreaktionen stattfindet, erhält man definierte Polymere mit engen Molmassenverteilungen. Das aktive Kettenende bietet die Möglichkeit der Synthese von Block-Copolymeren.

Eine partielle saure Hydrolyse führt zu Copolymeren aus Poly(oxazolin)en und Poly(ethylenimin)en.



**Abbildung 7 – Reaktionsgleichung der sauren partiellen Hydrolyse von Poly(2-oxazolin)en**

Die partielle Hydrolyse von Poly(2-ethyl-2-oxazolin) wurde bereits intensive erforscht.<sup>53,54,55</sup> Dahingegen wurde die partielle Hydrolyse von Poly(2-nonyl-2-oxazolin) bisher nur von Wiesbrock et al. publiziert.<sup>1</sup> Diese Möglichkeit der Polymermodifikation erweitert den Anwendungsbereich von Poly(oxazolin)en enorm.

# 3 Experimenteller Teil

## 3.1 Materialien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Aldrich, Fluka und Merck bezogen und ohne weitere Behandlung verwendet, ausgenommen das Methyltosylat, welches bereits im Vorfeld über Natriumsulfat destilliert und unter inerten Bedingungen gelagert wurde. Die für die NMR-Spektroskopie verwendeten deuterierten Lösungsmittel stammten von Cambridge Isotope Laboratories Inc..

Die verwendeten Polymere wurden von folgenden Herstellern bezogen:

**Tabelle 5 - Übersicht der verwendeten biologisch abbaubaren Polymere, <sup>a</sup> nur in Vorversuchen verwendet**

Polymer	Name	Firma	Lieferform
PHB	Biomer® P309	Biomer	Granulat
PHB <sup>a</sup>	Biocycle L91	PHB Industrial S.A. (Brazil)	Granulat
PHBV	keine genaueren Angaben vorhanden, 17 % Valeratanteil	PHB Industrial S.A. (Brazil)	Pulver
PLA	PLA 3051D	NatureWorks®	Granulat

Die für den enzymatischen Abbaueversuch verwendete PHB-Depolymerase (5,91 mg/mL) wurde am Institut für Molekulare Biotechnologie der TU Graz (Daniel Schwendenwein, Helmut Schwab) hergestellt. Die PHB-Depolymerase wurde aus *Acidovorax sp.* isoliert und in *E. coli* XL 1 exprimiert. Ausgeführt wurde der Versuch in Well-Cell-Culture-Plates der Firma SPL Life Science.

Die Bestimmung der kontaktbioziden Wirkung wurde in Kooperation mit dem Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Med Uni Graz durchgeführt. Alle verwendeten Reagenzien, Nährmedien und Bakterienkulturen, sowie alle benötigten Geräte wurden dankenswerterweise vom oben angeführten Institut zur Verfügung gestellt.

## **3.2 Verwendete Geräte und Analysenmethoden**

### **Mikrowellenreaktor**

Die mikrowellenunterstützten Reaktionen wurden im Mikrowellenreaktor Initiator 2.5 von Biotage durchgeführt. Als Reaktionsgefäße wurden die dafür vorgesehenen verschließbaren Glasvials, welche für Volumina von 0,2 bis 20 mL erhältlich sind, verwendet.

### **Dünnschichtchromatographie (DC)**

Die Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> auf Aluminiumplatten der Firma Merck und entsprechenden Lösungsmittelgemischen durchgeführt. Die Detektion erfolgte mittels einer 1 %igen KMnO<sub>4</sub>-Tauchlösung.

### **Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)**

Die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurden mit dem NMR-Spektrometer Bruker Avanze 300 MHz bei Raumtemperatur unter Verwendung der entsprechenden deuterierten Lösungsmitteln (CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O) aufgenommen. Bei den Messungen der Polymere wurden ein Delay von 5 s und 64 Scans gewählt, alle anderen Messungen wurden mit den Standardeinstellungen von 1 s Delay und 16 Scans durchgeführt. Als Referenz der chemischen Verschiebung wurden die Signale der Lösungsmittel (CDCl<sub>3</sub> bei 7,26 ppm und D<sub>2</sub>O bei 4,79 ppm) benutzt. Zur Benennung der Peakformen wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), bs (breites Singulett), d (Dublett), t (Triplett), m (Multiplett).

### **Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR)**

Die infrarotspektroskopischen Messungen wurden an einem Bruker Alpha-P FT-IR-Spektrometer mit der ATR-Methode (abgeschwächte Totalreflexion) unter Verwendung

eines Diamant Kristalles durchgeführt. Gemessen wurde im Wellenzahl-Bereich von 4000 bis  $400\text{ cm}^{-1}$ . FT-IR-Spektren wurden vom pulverförmigen Biozid pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> und den hergestellten Folien aufgenommen. Bei den Folien wurde jede Probe an mindestens drei Stellen vermessen.

### **Gelpermeationschromatographie (GPC)**

Mittels der GPC wurden die mittleren Molekulargewichte sowie der Polydispersitätsindex PDI bestimmt. Als Eluent wurde ein Lösungsmittelgemisch aus CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>3</sub>N/2-PrOH (94/4/2) verwendet. Die Messung wurde mit folgendem System durchgeführt: Merck Hitachi L-6000A Pumpe, Trennsäulen von Polymer Standard Service (8 x 300 mm, SDV linear XL, Partikelgröße 5 µm), Differential-Refraktometer Waters 410 Detektor. Die Kalibrierung erfolgte mit Polystyrol-Standards von Polymer Standard Service.

### **Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)**

Die DSC-Messung wurde mittels eines Pyris Diamond DSC von PerkinElmer mit N<sub>2</sub> als Spülgas (20 mL/min) und unter Verwendung von Aluminiumtiegel durchgeföhrt. Etwa 6 g der Probe wurden in zwei Zyklen von 0°C auf 200°C mit einer Heizrate von 20°C/min aufgeheizt und wieder abgeköhlt. Aus den Messdaten des zweiten Zyklus wurde die Glasübergangstemperatur T<sub>g</sub> bestimmt.

### **Simultane Thermische Analyse (STA)**

Für die Simultane Thermische Analyse wurde die STA 449 C der Firma Netzsch, mit He als Spülgas (50 mL/min) und Aluminiumoxid-Tiegel verwendet. Etwa 4 g der Probe wurden von 20°C auf 550°C mit einer Heizrate von 10°C/min aufgeheizt. Anhand der Messergebnisse der Differential-Thermoanalyse wurden die Zersetzungstemperatur T<sub>z</sub>, sowie die Temperaturstabilität ermittelt.

### **Laborplattenpresse**

Die Polymere wurden mittels der Laborplattenpresse P 200 PV von Collin zu Folien verarbeitet. Als Trennfolien dienten eine gewebte Dauerbackfolie und eine glatte PTFE-Folie (Fa. Lactan, d = 0,5 mm). Zur Herstellung der Folien wurden jeweils etwa 3 g Polymer

verwendet. PHB und PHBV wurden bei 175°C und PLA bei 200°C gepresst. Die Herstellung der Folien erfolgte in folgenden zwei Pressschritten zu je drei Profilstufen:

**Tabelle 6 – Prozessparameter für die Herstellung der Folien**

	Stufe	T [°C]	t [s]	p [bar]
<b>erster Pressschritt</b> (mit gewebter PTFE-Folie)	1	175 / 200	300	2
	2	175 / 200	300	6
	3	30	600	6
<b>zweiter Pressschritt</b> (mit glatter PTFE-Folie)	1	175 / 200	300	2
	2	175 / 200	120	6
	3	30	600	6

### Labormischextruder

Zum Mischen der Polymere mit dem Biozid in der Schmelze wurde ein Haake MiniLab CTW5 Microcompounder (Füllmenge 5 g bzw. 7 cm<sup>3</sup>) von ThermoFisher Scientific verwendet. Über einen integrierten Rückflusskanal kann die Probe im Kreislauf extrudiert werden und nach ausreichender Durchmischung über einen pneumatisch geregelten Bypass über eine Düse ausgetragen werden.

Die Polymere wurden bei folgenden Temperaturen verarbeitet:

**Tabelle 7 – Extrusionstemperaturen für die Biopolymer-Biozid-Mischungen**

	T [°C]
PHB	170
PHBV	155
PLA	190 - 195

### **Optische Lichtmikroskopie**

Für die aufgenommenen Bilder wurde das Lichtmikroskop Olympus BX 60 mit einem Mikroskopadapter Olympus E330-ADU1.2x und einer Olympus E-520 Kamera verwendet.

Zur Untersuchung der Folien musste diesen 4 Objektträger untergelegt werden, um eine ausreichende Höhe des Tisches zu erreichen.

### **Kontaktwinkel-Messung**

Die freien Oberflächenenergien der hergestellten Folien wurden mittels einer Tropfenkonturanalyse (Drop shape analysis, DAS) an einem KRÜSS DSA100 bestimmt. Gemessen wurde der statische Kontaktwinkel eines liegenden Tropfens. Als Testlösungen wurden Wasser und Diiodmethan verwendet. Das Tropfenvolumen für Wasser betrug 3  $\mu\text{L}$  und für Diiodmethan 1,5  $\mu\text{L}$ . Es wurden jeweils mindestens fünf Messpunkte aufgenommen. Die freien Oberflächenenergien wurden aus den gemessenen Kontaktwinkeln mittels der Geräte-Software über das Owens-Wendt-Rabel-Kaelbl-Modell (OWRK) direkt ermittelt.

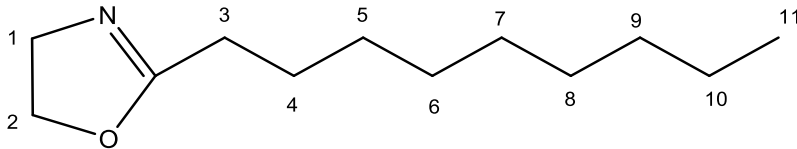
## **3.3 Synthese**

### **3.3.1 2-Nonyl-2-oxazolin**

100 g (580 mmol, 1 äq) Decansäure und 53 mL (878 mmol, 1,5 äq) Ethanolamin wurden in einem 500 mL Dreihalsrundkolben unter  $\text{N}_2$ -Atmosphäre und Rührung bei 130°C auf Rückfluss erhitzt. Es entstand eine klare orangefarbene Lösung. Anschließend wurden über eine Spritze 2 mL (5,9 mmol, 0,01 äq) Titantetrabutanolat zugegeben. Nach etwa 18 h Reaktionszeit wurden weitere 2 mL (5,9 mmol, 0,01 äq) Titantetrabutanolat zugefügt. Die Reaktion wurde nach etwa 24 h beendet, und das entstandene orangefarbene trübe Reaktionsgemisch offen bei 130°C für weitere 24h gerührt, um das Reaktionswasser zu entfernen. Das Produkt wurde mittels Vakuumdestillation ( $p = 1,6 \text{ mbar}$ ,  $T = 185^\circ\text{C}$ ) und anschließender Filtration über eine etwa 20 cm Schicht an Kiesegel (Kieselgel 60, Lösungsmittel:  $\text{CHCl}_3$ ) aufgereinigt.

Ausbeute: 56,5 g (49,4 %), klare, farblose Flüssigkeit

$^1\text{H-NMR}$  (20°C,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H,  $^3J_{\text{HH}} = 6,7$  Hz,  $\text{CH}_3^{11}$ ), 1,35 – 1,26 (m, 12H,  $\text{CH}_2^{5-10}$ ), 1,64 – 1,57 (m, 2H,  $\text{CH}_2^4$ ), 2,27 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 7,4$  Hz,  $\text{CH}_2^3$ ), 3,82 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,4$  Hz,  $\text{CH}_2^2$ ), 4,22 (t, 2H,  $^3J_{\text{HH}} = 9,4$  Hz,  $\text{CH}_2^1$ ) ppm.

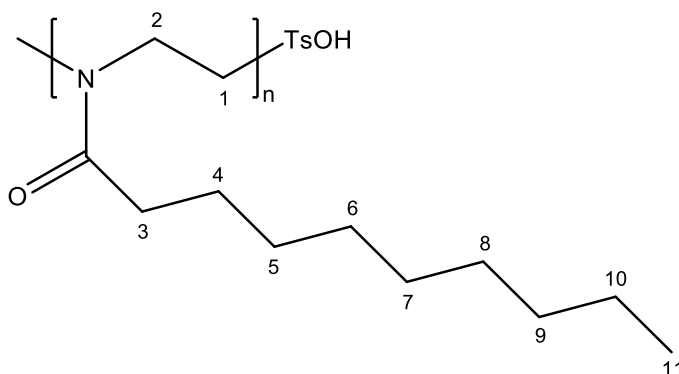


### 3.3.2 Poly(2-nonyl-2-oxazolin)

In einem Mikrowellenvial (10 - 20 mL) wurden 10 g (50,4 mmol, 1äq) NonOx und 939 mg (0,5 mmol, 0,001 äq) Methyltosylat eingewogen und 10 mL Acetonitril zugegeben. Die Polymerisation wurde im Mikrowellenreaktor bei 140°C für 150 min durchgeführt. Das entstandene Polymer wurde in DCM gelöst, das Lösungsmittel am Rotavapor abgezogen und das Produkt mittels Hochvakuum getrocknet.

Ausbeute: 9,93g (99,3 %), gelblich weißer Feststoff

$^1\text{H-NMR}$  (20°C,  $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$  = 0,87 (t, 3H,  $\text{CH}_3^{11}$ ), 1,25 (s, 12H,  $\text{CH}_2^{5-10}$ ), 1,58 (s, 2H,  $\text{CH}_2^4$ ), 2,26 (d, 2H,  $\text{CH}_2^3$ ), 3,43 (s, 4H,  $\text{CH}_2^{1,2}$ ) ppm.



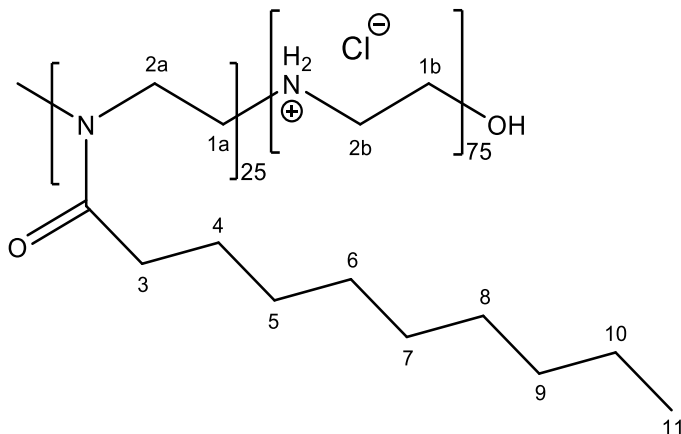
$M_n = 11,8$  kDa, PDI = 1,3

### 3.3.3 Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid)

2 g (10,1 mmol) pulverförmiges pNonOx wurden in ein Mikrowellenvial (10 – 20 mL) eingewogen und 8 mL 6M HCL zugegeben. Die partielle Hydrolyse wurde bei 160°C für 18 min im Mikrowellenreaktor durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde mit ca. 100 mL Aceton im Ultraschallbad gewaschen. Der entstandene weiße Niederschlag wurde über eine D4 Fritte abfiltriert und mittels Hochvakuum getrocknet. Die vollständige Entfernung der abgespaltenen Decansäure wurde mittels DC überprüft (DCM/MeOH = 10/1,  $R_f = 0,75$ ).

Ausbeute: 1,0572 g (95,7%), weißes Pulver

$^1\text{H-NMR}$  (20°C,  $\text{D}_2\text{O}$ , 300 MHz)  $\delta = 0,80 - 1,01$  (bs, 1,5H,  $\text{CH}_3^{11}$ ),  $1,01 - 2,00$  (bs, bs, 7H,  $\text{CH}_2^{4-10}$ ),  $2,17 - 2,90$  (m, 1H,  $\text{CH}_2^3$ ),  $2,90 - 4,40$  (m, 8H,  $\text{CH}_2^{1a,1b,2a,2b}$ ) ppm.



$T_g = 84,8^\circ\text{C}$

$T_z = 350,8^\circ\text{C}$



## 3.4 Verarbeitung

Die Polymere wurden vor der Verarbeitung im Trockenschrank bei etwa 50°C für mindestens 24 h getrocknet. Für alle drei Verarbeitungsverfahren gilt, dass den Polymeren 5 wt% pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> als Additiv zugesetzt wurden.

### Verarbeitungsverfahren 1

Die granulatformigen Polymere PHB und PLA wurden zu groben Pulvern vermahlen, PHBV lag bereits pulverförmig vor. Die Polymere wurden mit dem pulverförmigen Biozid in einem Becherglas gemischt und direkt in der Plattenpresse zu Folien verarbeitet.

### Verarbeitungsverfahren 2

Die Polymer-Biozid-Mischungen wurden in Chloroform bei etwa 60°C unter Rührung gelöst, wobei trübe viskose Lösungen entstanden. Das Chloroform wurde daraufhin am Rotavapor abgezogen und die Polymere mittels Hochvakuum getrocknet. Anschließend wurden sie zerkleinert und in der Plattenpresse zu Folien verarbeitet.

### Verarbeitungsverfahren 3

Die Polymere wurden mit dem Biozid in einem Becher vorgemischt und in den Labormischextruder eingefüllt. Im Extruder wurde die Schmelze bei den entsprechenden Temperaturen für etwa 5 min im Zyklus gefahren. Der gewonnene Polymerstrang wurde zerkleinert und in der Plattenpresse zu Folien verarbeitet.

Von den hergestellten Folien wurden FT-IR-Spektren und Lichtmikroskop-Bilder aufgenommen, sowie die freie Oberflächenenergie bestimmt.

### 3.5 Ermittlung der kontaktbioziden Wirkung

Die Bestimmung der kontaktbioziden Wirkung wurde in Anlehnung an ISO 22196:2007, Plastics – Measurement of antibacterial activity on plastic surfaces, durchgeführt.

#### Herstellung und Bestimmung der Konzentration der Bakteriensuspension

Die im Vorfeld vom Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin (Med Uni Graz) vorbereiteten Bakterienschrägkulturen von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* wurden je mit 1 mL Nährlösung gespült, bis möglichst die gesamte Bakterienkultur in Lösung war. Von der Bakteriensuspension wurden für *E. coli* 0,7 mL und für *S. aureus* 0,6 mL in ein kleines Röhrchen mit 4,5 mL Nährlösung gegeben (Stammlösung  $10^{-1}$ ). Diese Lösung wurde mit Nährlösung dekadisch bis auf  $10^{-9}$  verdünnt, wobei die Verdünnung  $10^{-5}$  als Impflösung für den Test verwendet wurde.

Zur Bestimmung der tatsächlichen Konzentration der Bakterienlösung wurden die Verdünnungen  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  auf Agarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 35°C inkubiert.

Folgende Konzentrationen ergaben sich für die Impflösungen:

Tabelle 8 – Bestimmung der tatsächlichen Konzentration der *E. coli*-Impflösung

<i>E. coli</i>	KBE Platte 1	KBE Platte 2	Mittelwert
$10^{-8}$	550	548	549
$10^{-9}$	52	63	58
Konzentration der Impflösung			$5,6 \cdot 10^5/\text{mL}$

Daraus ergibt sich für *E. coli* eine Probenbeimpfung mit  $2,2 \cdot 10^4$  KBE.

**Tabelle 9 – Bestimmung der tatsächlichen Konzentration der *S. aureus*-Impflösung**

<i>S. aureus</i>	KBE Platte 1	KBE Platte 2	Mittelwert
$10^{-8}$	183	342	263
$10^{-9}$	19	32	26
Konzentration der Impflösung			<b><math>2,6 \cdot 10^5/\text{mL}</math></b>

Daraus ergibt sich *S. aureus* eine Probenbeimpfung mit  **$1,0 \cdot 10^4$  KBE**.

### **Probenbehandlung**

Zur Überprüfung der Wiederfindungsrate (0 h Inkubation) wurde je eine Polymer+Biozid-Probe untersucht. Für den Nachweis der Wirkung nach 24 h wurden je drei Polymer-Biozid-Proben und je eine Probe ohne Biozid behandelt.

Die Probenpräparation wurde in einer Clean-Bench durchgeführt. Die (50 x 50) mm Proben und die Deckfolien wurden mit 70%igem EtOH sterilisiert. Die Proben wurden entsprechend der Norm behandelt und für 0 h und 24 h in einer Feuchtekammer bei 35°C inkubiert. Danach wurden 9,6 mL CSL+Tween-Lösung in die Petrischalen gegeben und 1 min geschwenkt, um die Mikroorganismen von der Oberfläche zu eluieren. Das Tween diente hierbei zur Inaktivierung des Biozids. Aus der 10 mL Testlösung wurden entsprechende dekadische Verdünnungen hergestellt (bis  $10^{-3}$ ), zur Bestimmung der KBE auf Agarplatten ausgestrichen und für 24 h bei 35°C inkubiert. Eine mikrobizide bzw. wachstumshemmende Wirkung wurde anhand der Anzahl der überlebenden KBE bzw. durch optischen Vergleich mit den Agarplatten der reinen Polymerfolien bestimmt.

### **3.6 Enzymatischer Abbauversuch**

Für den enzymatischen Abbauversuch wurde ein Phosphatpuffer (0,2M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2M NaOH, pH 7,4) frisch hergestellt. Dazu wurden 0,6804 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,1569 g NaOH in einen 100 mL Maßkolben eingewogen, mit etwas  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst und anschließend bis zur Marke mit

H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der pH-Wert des Puffers wurde mit einer verdünnten NaOH- bzw. HCl-Lösung auf 7,4 eingestellt. Aus der PHB-Depolymerase wurde eine Stammlösung mit 0,05 mg/mL hergestellt. Dafür wurden 0,08 mL der PHB-Depolymerase (5,91 mg/mL) mit 9,92 mL Pufferlösung verdünnt.

Aus den Folien wurden je neun (10 x 10) mm Proben für eine Dreifachbestimmung ausgeschnitten und abgewogen. Der Abbauersuch wurde in Well-Cell-Culture-Plates durchgeführt, dazu wurden zu den Proben 80 µL PHB-Depolymerase-Stammlösung und 920 µL Pufferlösung zugegeben und für 1 d, 2 d bzw. 5 d im Trockenschrank bei 37°C inkubiert. Die Well-Cell-Culture-Plates wurden regelmäßig geschwenkt und kontrolliert, ob die Proben vollständig mit Lösung benetzt waren. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Proben mit Wasser abgespült, leicht trockengetupft, im Vakuumtrockenschrank bei 80°C über Nacht getrocknet und anschließend gewogen.

Von den Folien wurden nach dem enzymatischen Abbauersuch zusätzlich lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Biozidsynthese

Die Synthese des verwendeten Biozids verlief über drei Stufen, die Monomer-Synthese, dessen kationische ringöffnende Polymerisation und die anschließende partielle Hydrolyse zu einem Copolymer mit einem hydrolysierten Anteil von 75 %.

#### 4.1.1 Monomersynthese

Die Synthese des 2-Nonyl-2-oxazolins erfolgte über eine Kondensationsreaktion von Decansäure und Ethanolamin mit Titan-tetrabutanolat als Katalysator für den Ringschluss.<sup>51</sup>

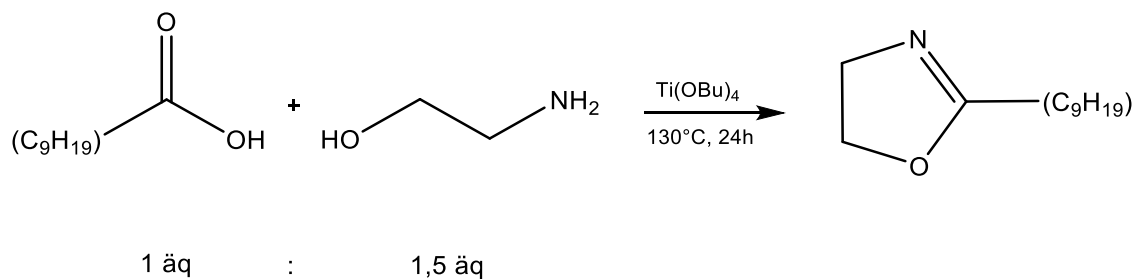


Abbildung 8 – Synthese von NonOx

Das Rohprodukt wurde destilliert, um das überschüssige Ethanolamin zu entfernen und anschließend mittels Flash-Chromatographie gereinigt. Es wurde ein sauberes NonOx mit einer Ausbeute von 50% gewonnen. Der Literaturwert liegt bei einer Ausbeute von 79%.<sup>51</sup> Diese wurde nicht erreicht, da die Ausbeute von der Dauer der Destillation abhängig ist und diese vorzeitig beendet wurde.

### 4.1.2 Polymerisation

Die kationische ringöffnende Polymerisation (CROP) von 2-Nonyl-2-oxazolin wurde im Mikrowellenreaktor durchgeführt, wobei Methyltosylat als Initiator verwendet wurde.

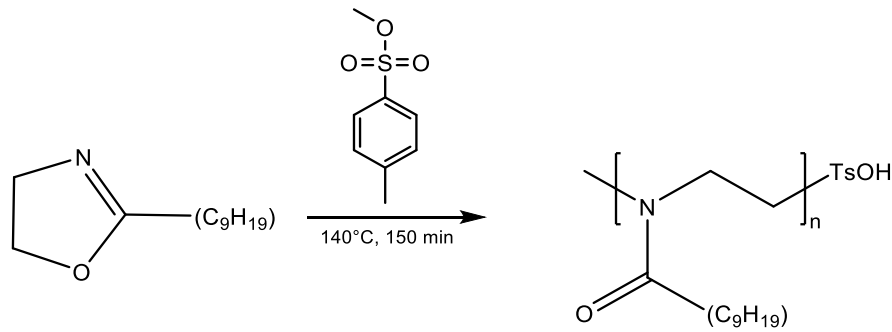


Abbildung 9 – Kationische ringöffnende Polymerisation von NonOx

Mit den gewählten Bedingungen wurde ein Poly(2-nonyl-2-oxazolin) mit einem mittleren Molekulargewicht von 11,8 kDa und einem PDI von 1,3 hergestellt.

Der Vergleich der NMR-Spektren von Monomer und Polymer bestätigte die Umsetzung:

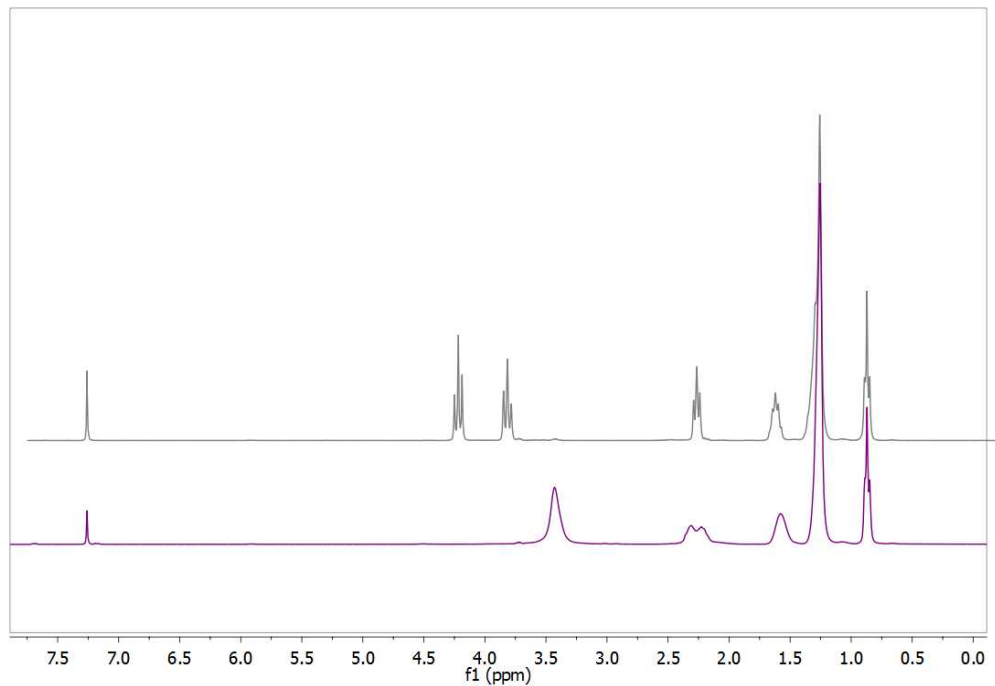


Abbildung 10 – NMR-Spektren des Monomers und des Polymers; grau: NonOx, violett: pNonOx;  
(CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz, 25°C)

Im Bereich von 3,8 bis 4,3 ppm sind die beiden Triplets des Oxazolinrings zu sehen. Durch die Ringöffnung kommt es zu einem breiten Singulett mit einer niedrigeren chemischen Verschiebung, da nun nur mehr das N-Atom direkt benachbart ist.

### 4.1.3 Partielle Hydrolyse

Die partielle Hydrolyse von pEtOx wurde bereits intensiv erforscht.<sup>54,55,56</sup> Die partielle Hydrolyse von Poly(2-nonyl-2-oxazolin) wurde bisher jedoch nur von der Arbeitsgruppe Wiesbrock publiziert.<sup>1</sup> Ein gravierender Unterschied hierbei ist, dass pNonOx, im Gegensatz zu pEtOx nicht in wässriger HCl löslich ist.

Wie zuvor die Polymerisation von 2-Nonyl-oxazolin, wurde auch die partielle Hydrolyse von Poly(2-nonyl-2-oxazolin) im Mikrowellenreaktor durchgeführt.

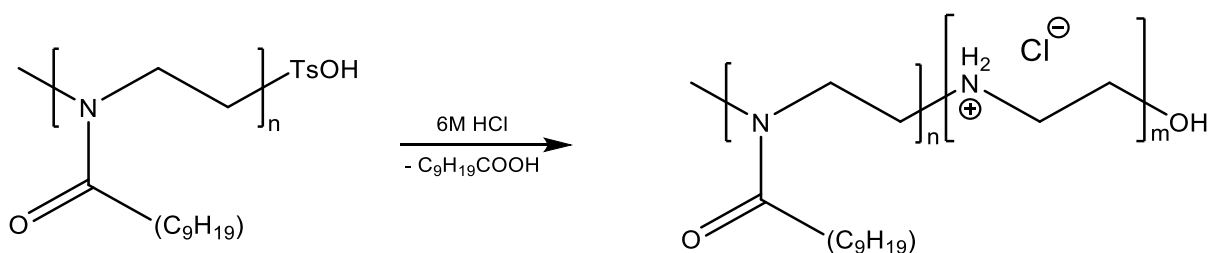


Abbildung 11 – Saure partielle Hydrolyse von pNonOx

Im ersten Schritt war es nötig die Reaktionszeit für den entsprechenden Hydrolysegrad zu ermitteln. Da es sich bei dieser Hydrolyse um eine Reaktion mit einer Kinetik erster Ordnung handelt, steht die Reaktionszeit mit  $\ln(100/(100-\text{Hydrolysegrad}))$  in einem linearen Zusammenhang. Deshalb ist es nötig, zu mindestens drei unterschiedlichen Reaktionszeiten, zu hydrolysieren, um die Reaktionszeit für den gewünschten Hydrolysegrad zu ermitteln. Dieser wird anhand der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aus dem Verhältnis der Integrale der Polymerkette zu denen der Seitenkette bestimmt.

Zu Beginn wurde eine Reaktionstemperatur von **125°C** gewählt. Wie Tabelle 10 zeigt, konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Es wurden Säurekonzentration, Reaktionszeit und Ansatzgröße variiert.

**Tabelle 10 - Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von pNonOx bei 125°C (n. a.: <sup>1</sup>H-NMR nicht auswertbar, n. l.: Produkt nicht löslich)**

Versuch	m [g]	HCl [mol/L]	t [min]	LM	Hydrolysegrad [%]
1	2,5	5	100	CDCl <sub>3</sub>	12
2	2,5	6	100	CDCl <sub>3</sub>	21
3	2,5	6	100	CDCl <sub>3</sub>	n. a.
4	2,5	6,5	100	CDCl <sub>3</sub>	26
5a	1,0	6,5	100	D <sub>2</sub> O	83
5b	1,0	6,5	100	---	n. l.
5c	1,0	6,5	100	CDCl <sub>3</sub>	45
5d	1,0	6,5	100	---	n. l.
6	1,0	6,5	110	---	n. l.
7	2,5	6	60	CDCl <sub>3</sub>	21
8	2,5	6	150	CDCl <sub>3</sub>	31

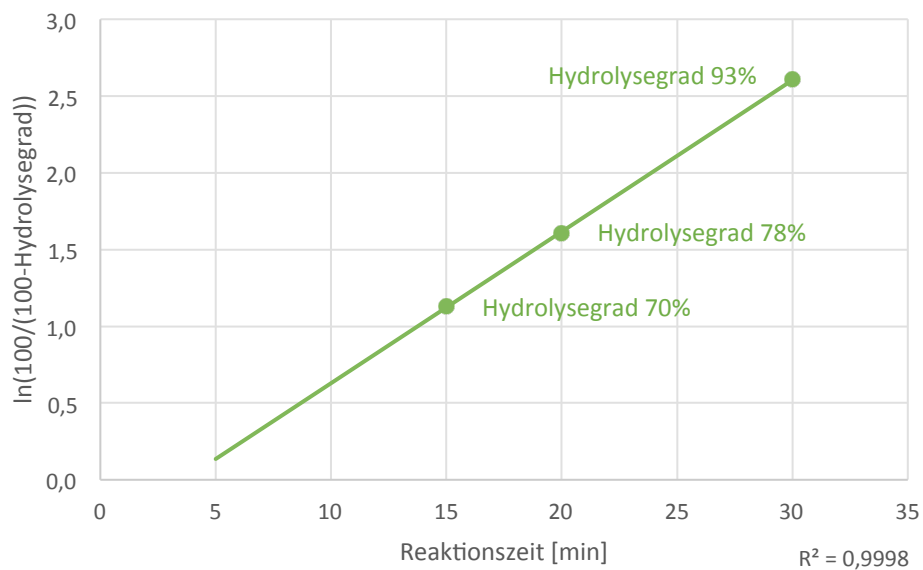
Aus den Ergebnissen geht hervor, dass keine genaue Aussage zu der Abhängigkeit der partiellen Hydrolyse bei 125°C von der Säurekonzentration und der Ansatzgröße getroffen werden kann. Zudem besteht auch die Möglichkeit, dass die Mikrowellenvials bzw. deren Füllhöhe eine Rolle spielen. Bei den Ansätzen mit 1 g Polymer wurden die Vials für 2-5 mL, und bei den Ansätzen mit 2,5 g Polymer die Vials für 10-20 mL, mit den entsprechenden Magnetrührknochen verwendet. Um konkrete Aussagen über diese Einflüsse treffen zu können, wären genauere Untersuchungen nötig.



Die Änderung der Löslichkeit mit dem Hydrolysegrad konnte dabei deutlich beobachtet werden. Bei einem Hydrolysegrad unter 50% lösten sich die Produkte in Chloroform und über 50% in Wasser. Vermutet werden kann, dass es bei einem Hydrolysegrad um 50% einen Graubereich gibt, in welchem die Produkte in den gängigen NMR-Lösungsmitteln nur kolloidale Lösungen ausbilden (siehe Versuche 5b, 5d und 6).

Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit der partiellen Hydrolyse von pNonOx bei 125°C wurde die Reaktionstemperatur im nächsten Schritt erhöht.

Mit einer Reaktionstemperatur von **160°C** und einer Säurekonzentration von **6 mol/L** war es möglich, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen und die Reaktionszeit für einen Hydrolysegrad von ca. 75% zu ermitteln.



**Abbildung 12 - Ermittlung der Reaktionszeit für den entsprechenden Hydrolysegrad, Reaktionskinetik erster Ordnung für die saure Hydrolyse von pNonOx**

Für einen Hydrolysegrad von 75% ergibt sich dadurch eine Reaktionszeit von 18 min. Tabelle 11 zeigt die durchgeführten Reaktionen:

**Tabelle 11 - Ergebnisse der partiellen Hydrolyse von pNonOx bei 160°C, <sup>a</sup> zwei Ansätze zu je 2 g pNonOx wurden gemeinsam aufgearbeitet**

Ansatz	t [min]	m [g]	Hydrolysegrad [%]	Ausbeute [%]
K1	15	1,0	70	93
K2	20	1,0	78	89
K3	30	1,0	93	91
1	18	1,0	73	96
2	18	1,0	73	91
3	18	1,0	78	95
4	18	1,0	75	92
5	18	2,0	74	84
6 <sup>a</sup>	18	4,0	77	72

Die Ansätze 1 – 6 zeigen mit einem Hydrolysegrad von 73-78% durchaus reproduzierbare Ergebnisse. Zuerst wurden die Versuche mit einer Ansatzgröße von 1,0 g pNonOx (in Mikrowellenvials für 2-5 mL) durchgeführt. Hier konnten Ausbeuten von über 90% erzielt werden. Bei einer Ansatzgröße von 2,0 g pNonOx (Ansätze 5 und 6), welche in Mikrowellenvials für 10-20 mL durchgeführt wurden, konnte zwar der zu erwartende Hydrolysegrad erreicht werden, die Ausbeuten fielen allerdings geringer aus. Somit kann hier ebenfalls ein Einfluss der Ansatzgröße bzw. des Mikrowellenvials und dessen Füllhöhe nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.1.4 Charakterisierung

Zur Strukturaufklärung von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> wurden <sup>1</sup>H-NMR-Messungen und ATR-FTIR-Messungen durchgeführt. Anhand der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren wurde, wie bereits erwähnt, aus den Integralverhältnissen der Signale der Hydrolysegrad bestimmt. Um das Molekulargewicht des Copolymers zu ermitteln wurde eine GPC-Analyse durchgeführt. Das thermische Verhalten wurde mittels STA- und DSC-Messungen festgestellt.

#### NMR-Analyse

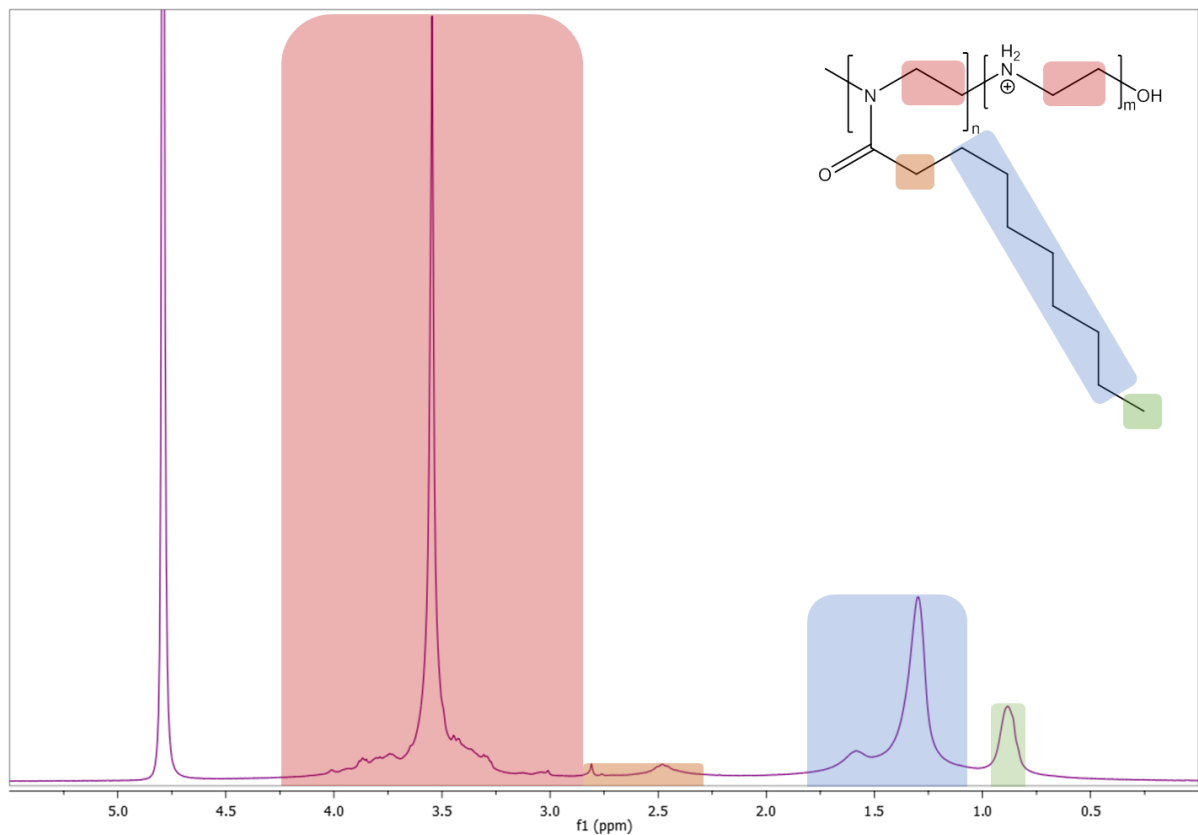


Abbildung 13 - NMR-Spektrum von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> (D<sub>2</sub>O, 300 MHz, 25°C)

Die NMR-Auswertung des Copolymers stellte sich als schwierig heraus. Da pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> nur in Wasser löslich ist, war es nötig die Messungen in D<sub>2</sub>O aufzunehmen. Die Spektren zeigen, im Vergleich zu denen des pNonOx (in CDCl<sub>3</sub>), eine schlechtere Signalauftrennung. Ebenfalls ist die Baseline trotz Korrektur relativ schlecht. Wie in Abbildung 13 zu sehen ist kommt es zu Signalüberlagerungen, die das Integrieren der Signale erschweren. Der Einfluss des

Copolymers und des Aziridinium-Kations führt zudem zu breiten Multipletts der beiden Signale im Bereich von 2,2-2,9 ppm (orange) und von 2,9-4,2 ppm (rot). Diese Sachverhalte führen zu einer eingeschränkten Genauigkeit der Bestimmung des Hydrolysegrades.

### ATR-FTIR-Analyse

Mittels der ATR-FTIR-Messung kann zwar keine genaue Strukturaufklärung durchgeführt werden, sehr wohl dient sie aber zum qualitativen Nachweis funktioneller Gruppen.

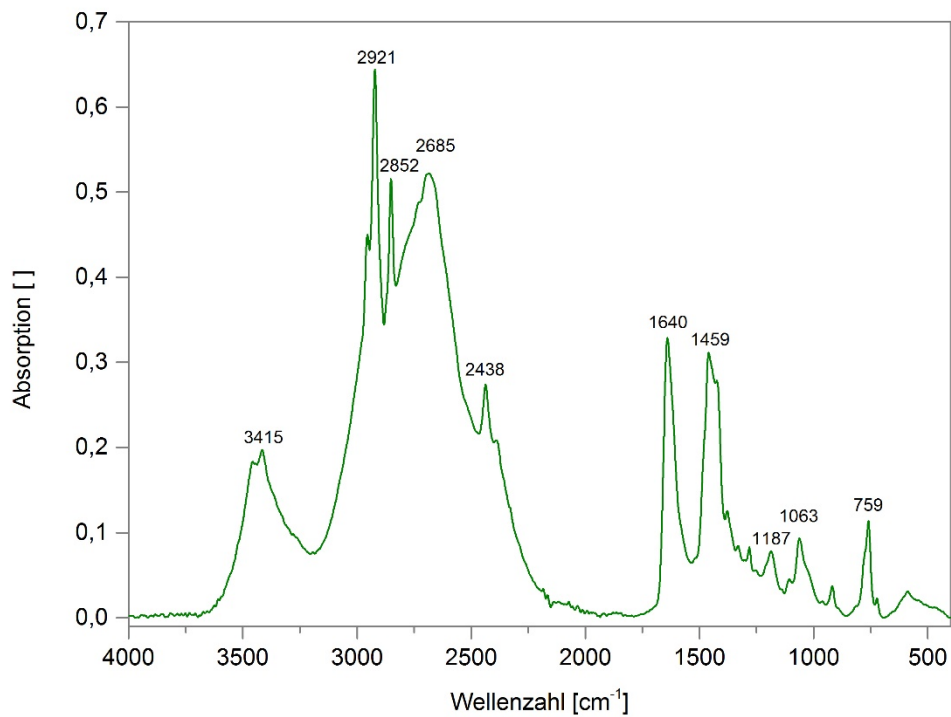


Abbildung 14- ATR-FTIR-Spektrum für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

**Tabelle 12 - Übersicht der charakteristischen IR-Banden von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>**

Wellenzahl [cm <sup>-1</sup> ]	Schwingung
3415	$\nu$ NH
2921 – 2438	$\nu$ NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> , $\nu_s$ N-CH <sub>2</sub> , $\nu_{as}$ CH, $\nu_s$ CH
1640	$\nu$ C=O
1459	$\delta$ CH <sub>2</sub> , $\delta$ NH <sub>2</sub> <sup>+</sup>
1187, 1063	$\nu$ CN
< 1063	$\delta$ CH

Das ATR-FTIR-Spektrum des pulverförmig vermessenen pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> zeigt die zu erwartenden Signale. Die für die Verbindung charakteristischen breiten Valenzschwingungen des Amins zeigen sich im Bereich von 3600 cm<sup>-1</sup> bis 2250 cm<sup>-1</sup>. Bei 1640 cm<sup>-1</sup> ist deutlich das Signal der Oxo-Gruppe zu sehen. Dieses Signal und das Signal der benachbarten Scherschwingung von Methylen überlagern die schwache Deformationsschwingung von NH<sub>2</sub><sup>+</sup>. In den Fingerprint-Bereich fallen die weiteren Deformationsschwingungen der C-H-Bindungen, als auch die der C-N-Bindung.

### GPC-Analyse

Um die Länge der Copolymer-Ketten festzustellen wurde eine Gelpermationschromatographie durchgeführt. Die Messergebnisse zeigten jedoch kein Signal. Dies weist darauf hin, dass es zu einer Wechselwirkung zwischen dem Säulenmaterial (Styrol-Divinylbenzol Copolymer) und dem geladenen Copolymer gekommen ist. Mit dem verwendeten System war es demnach nicht möglich, das mittlere Molekulargewicht des Biozids zu bestimmen.

## DSC- und STA-Analyse

Um das hergestellte Biozid mit den Biopolymeren thermisch verarbeiten zu können, wurden dessen thermische Eigenschaften und Temperaturstabilität ermittelt. Dazu wurden DSC- und STA-Messungen durchgeführt.

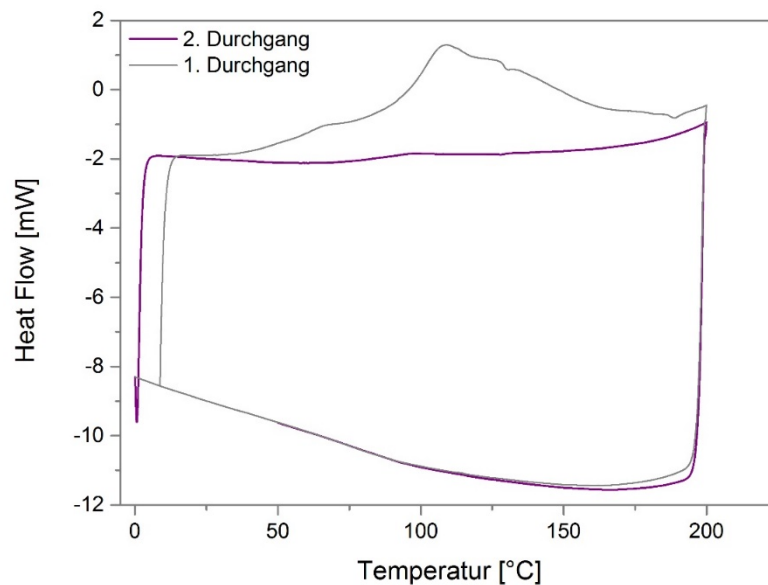


Abbildung 15 - DSC-Messung von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

Aus der dynamischen Differenzkalorimetrie ergibt sich für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> eine Glasübergangstemperatur von 85°C. Die Messkurve des zweiten Durchgangs zeigt keine Peaks und somit keinen Schmelzbereich. Dies zeigt, dass es sich um ein amorphes Polymer handelt.

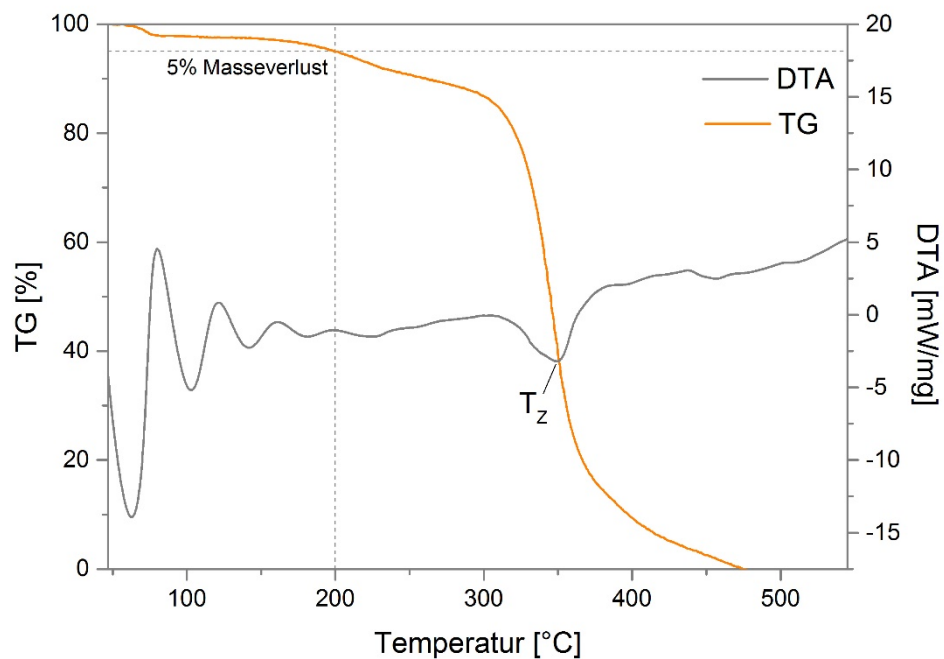


Abbildung 16 - STA-Messung von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

Die Differenz-Thermoanalyse zeigt für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> eine Zersetzungstemperatur von 350°C. Die maximale Verarbeitungstemperatur für die Biopolymere liegt bei 200°C (PLA). Bis zu dieser Temperatur zeigt die Messung der Thermogravimetrie für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> einen Masseverlust von 5%. Dieser ist auf eine mögliche Restfeuchte der Probe zurückzuführen.

Die thermischen Analysen des Biozids zeigen somit die nötige thermische Stabilität für den benötigten Verarbeitungstemperaturbereich.

Zusammenfassend kann zur Biozidsynthese gesagt werden, dass die partielle Hydrolyse von pNonOx einer Optimierung bedarf. Die Reaktionsführung sollte genauer untersucht werden, da das pNonOx, im Gegensatz zu pEtOx, nicht in der wässrigen HCl löslich ist. Für Reaktionen in der Schmelze ist bekannt, dass die Reaktionstemperatur und vor allem die Durchmischung (Rührung) einen großen Einfluss haben. Dieser Sachverhalt erschwert eine exakte Reaktionskontrolle.

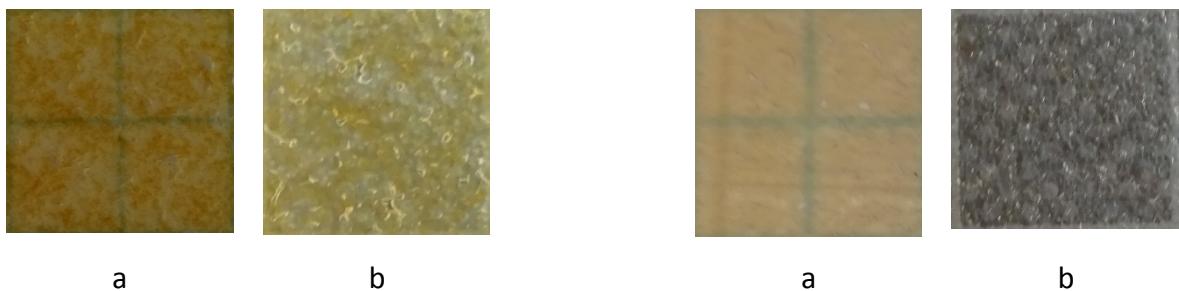
Außerdem muss ein möglicher Polymerabbau durch die harschen Reaktionsbedingungen (160°C, 6M HCl) berücksichtigt werden. Ein Molmassenabbau kann nicht ausgeschlossen werden, da die GPC-Analyse mit dem verwendeten System nicht funktionierte. Hier wäre es notwendig andere Säulenmaterialien zu testen oder das Molekulargewicht mittels MALDI-TOF (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of Flight) Massenspektrometrie zu bestimmen. Wie bereits erwähnt, ist die Bestimmung des Hydrolysegrades mithilfe der NMR-Analyse, aufgrund der schlechten Baseline und der geringen Signalauftrennung in D<sub>2</sub>O, nur mäßig exakt. Auch hier könnte MALDI-TOF-MS, welche eine gute Methode zur Bestimmung von Copolymeren ist, eine Alternative bieten.



## 4.2 Herstellung und Charakterisierung der Folien

### 4.2.1 Verarbeitungsverfahren

Anfänglich wurden Folien, analog zu der Arbeit von Kelly und Wiesbrock, durch einfaches Mischen von pulverförmigem Biozid und gemahlenem Polymer und anschließendem Pressen hergestellt (**Verarbeitungsverfahren 1**).<sup>1</sup> Es wurden Folien mit PHB (Biocycle L91) und 5 wt% pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> hergestellt. Mit dieser Methode konnten jedoch, wie in Abbildung 17 zu sehen ist, keine homogenen Proben hergestellt werden. Die Luftbläschen in den Folien ergaben sich durch nicht optimale Verarbeitungsbedingungen.

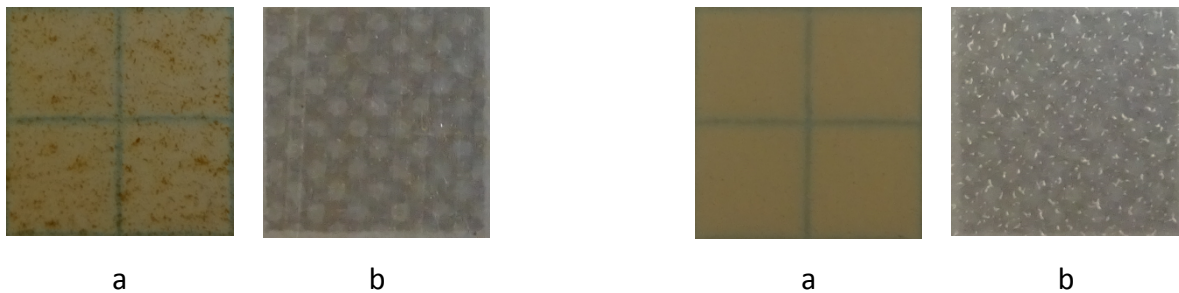


**Abbildung 17 –** Hergestellte Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 1, links: PHB (Biocycle L91) + Biozid, rechts: reines PHB (Biocycle L91); a: Folie auf weißem Untergrund, b: Folie auf schwarzem Untergrund; Aufnahme: 1 cm<sup>2</sup> 3-fach vergrößert

Um eine bessere Durchmischung von Biopolymermatrix und Biozid zu erreichen, wurden beim **Verarbeitungsverfahren 2** Polymer und Biozid unter Rühren in Chloroform gelöst, getrocknet und anschließend gepresst. Rein optisch konnte dadurch aber keine bessere Homogenität erreicht werden.

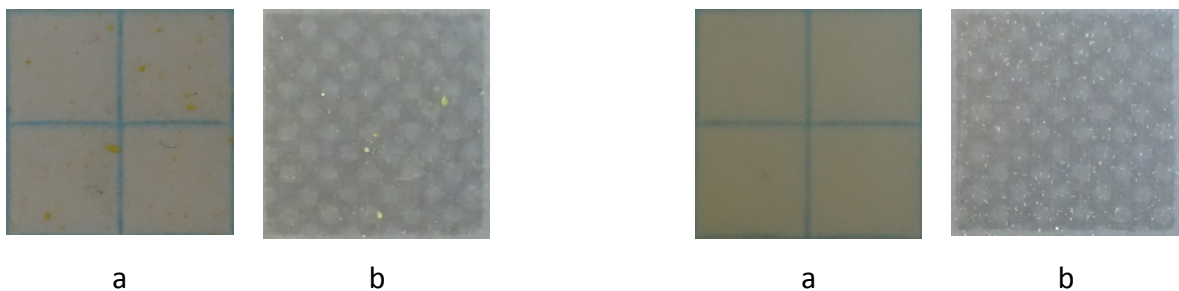
Deshalb wurde das **Verarbeitungsverfahren 3** angewendet, bei dem die Komponenten im Microcompounder in der Schmelze gemischt wurden. Dies würde einem Standard-Kunststoffverarbeitungsverfahren entsprechen, wie es großtechnischen auch Anwendung findet.

Bei den PHB-Proben (Abbildung 18) sind eindeutige Inhomogenitäten zu erkennen, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Biozid zurückzuführen sind. Das hier verwendete PHB von Biomer zeigte besseres Verhalten und ist weniger brüchig, als das zuvor verwendete PHB von PHB Industrial S.A..



**Abbildung 18 – Hergestellte PHB-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 3, links: PHB+Biozid, rechts: reines PHB; a: Folie auf weißem Untergrund, b: Folie auf schwarzem Untergrund; Aufnahme: 1 cm<sup>2</sup> 3-fach vergrößert**

Das Biozid scheint mit PHBV besser mischbar zu sein als mit PHB, trotzdem sind, wie Abbildung 19 zeigt, einzelne Partikel in den Folien zu erkennen.



**Abbildung 19 – Hergestellte PHBV-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 3, links: PHBV+Biozid, rechts: reines PHBV; a: Folie auf weißem Untergrund, b: Folie auf schwarzem Untergrund; Aufnahme: 1 cm<sup>2</sup> 3-fach vergrößert**

Mit PLA konnte das beste Ergebnis erzielt werden (Abbildung 20). Die Folien mit Biozid zeigen eine leichte Trübung und nur vereinzelt sind einige wenige Partikel zu erkennen. Das Biozid scheint mit PLA relativ gut mischbar zu sein.



**Abbildung 20 - Hergestellte PLA-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 3, links: PLA+Biozid, rechts: reines PLA; a: Folie auf weißem Untergrund, b: Folie auf schwarzem Untergrund; Aufnahme: 1 cm<sup>2</sup> 3-fach vergrößert**

Ob die höhere Extrusionstemperatur von PLA (190°C) für die Löslichkeit von pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> verantwortlich ist, ist schwer zu beurteilen. PHBV zeigte eine bessere Mischbarkeit mit dem Biozid als PHB, wobei PHBV bei einer niedrigeren Temperatur extrudiert wurde.

Grundlegend konnte mit dem Verarbeitungsverfahren 3 die beste Mischbarkeit des Biozids mit den Biopolymeren erreicht werden. Die nach diesem Verfahren hergestellten Folien wurden zur Feststellung der Kombination von enzymatischer Abbaubarkeit und antimikrobieller Aktivität herangezogen.

Um Informationen über die Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix zu erhalten wurden lichtmikroskopische Aufnahmen gemacht, die freie Oberflächenenergie bestimmt und ATR-FTIR-Spektren aufgenommen.

## 4.2.2 Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix

### Lichtmikroskopische Aufnahmen

Um genaueren Aufschluss über die Verteilung des Biozids in der Polymermatrix zu erhalten, wurden die hergestellten Folien mittels Lichtmikroskops untersucht. Zum Vergleich wurden Aufnahmen von reinen Polymerfolien gemacht. Hierbei muss angemerkt werden, dass dafür die Polymere nur gepresst wurden und nicht, wie die Proben im Vorfeld, extrudiert wurden. Unter Verwendung eines Polarisationsfilters im Durchlichtmodus konnten teilweise Aussagen über die Polymerkonformation getroffen werden. Diese ist allerdings leicht durch Additive und Verarbeitungsart beeinflussbar. Ebenfalls ist nicht bekannt welche Additive in den gekauften Biopolymeren enthalten sind. Häufig werden Nukleierungsmittel für eine homogene und feinkörnige Kristallitstruktur eingesetzt.<sup>57</sup>

### PHB-Folien

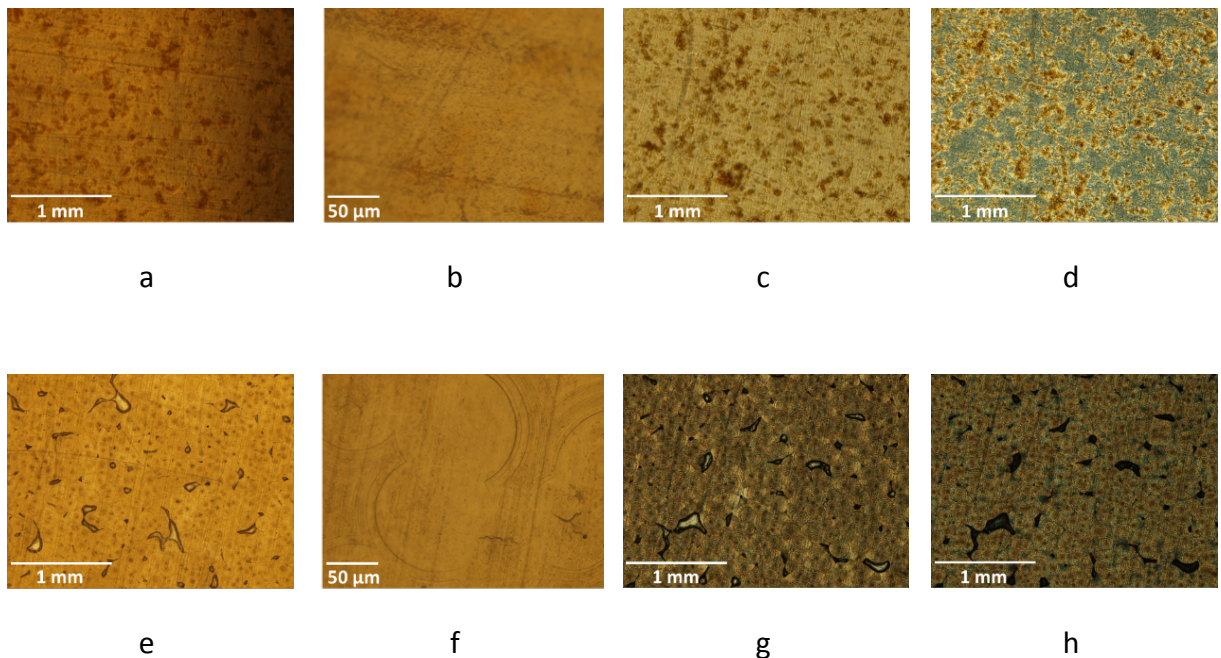


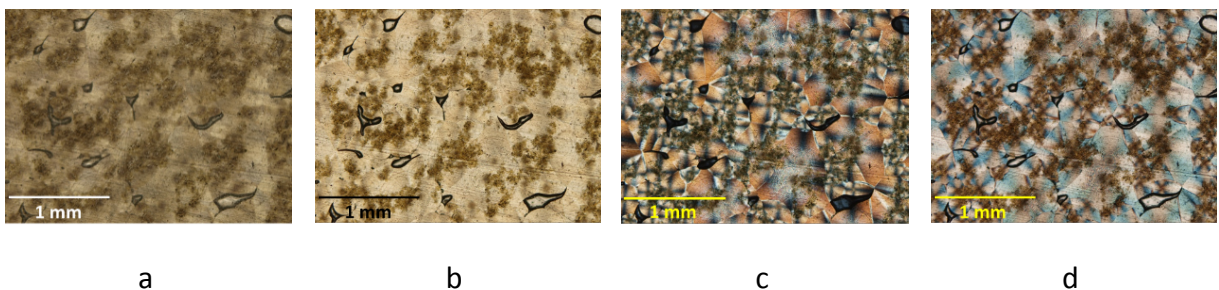
Abbildung 21 – PHB-Folien mit und ohne Biozid im Vergleich; a, b: Auflichtaufnahmen PHB+Biozid-Folie; c, d: Durchlichtaufnahmen PHB+Biozid-Folie mit Polarisationsfilter; e, f: Auflichtaufnahmen reine PHB-Folie; g, h: Durchlichtaufnahmen reine PHB-Folie mit Polarisationsfilter

Die Aufnahmen der PHB+Biozid-Folien (a – d) zeigen ein Zwei-Phasen-System. Das pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> liegt in Form von Partikeln im µm-Maßstab verteilt in der PHB-Matrix vor. Die Durchlichtaufnahmen unter Verwendung eines Polarisationsfilters (c und d) zeigen nochmals deutlich das Vorliegen zweier unterschiedlichen Phasen.

Anhand der Aufnahmen der Referenzfolien (e – h) ist zu erkennen, dass die Verarbeitungsbedingungen nicht optimal gewählt wurden. In den Folien sind Blasen und feine Risse zu sehen. Unter Änderung der Temperatur, der Dauer und/oder des Druckes beim Pressen können diese Effekte verhindert werden. Die Durchlichtaufnahmen (g und h) zeigen

Sphärolithe mit einer Größe von etwa 100 µm der teilkristallinen Struktur. Die PHB+Biozid-Folien zeigen eine feinere teilkristalline Konformation. Verantwortlich dafür sind die unterschiedliche Verarbeitung bzw. das Vorhandensein des Biozids.

Die nach dem Verarbeitungsverfahren 1 hergestellten Folien mit Biozid zeigten in Bezug auf die Kristallinität deutliche Unterschiede, wie in Abbildung 22 zu sehen ist.

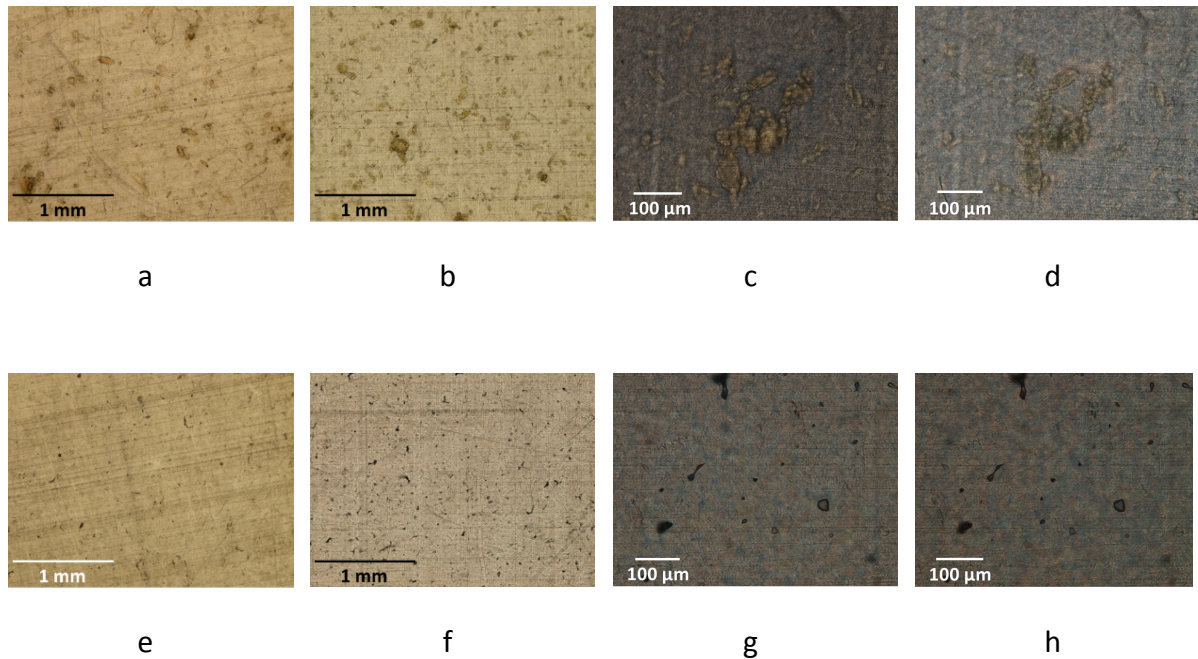


**Abbildung 22 – PHB+Biozid-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 1; a: Auflichtaufnahme; b: Durchlichtaufnahme; c, d: Durchlichtaufnahmen mit Polarisationsfilter**

Die Aufnahmen zeigen größere und unregelmäßiger verteilte Biozidpartikel, im Vergleich zu denen der nach dem Verarbeitungsverfahren 3 hergestellten Folien. Die kristalline Überstruktur in Form relativ großer Sphärolithe ist sehr schön in den Durchlichtaufnahmen mit Polarisationsfilter (c und d) zu sehen. Dass sich diese von denen nach der Verarbeitungsmethode 3 hergestellten PHB-Folien unterscheiden, liegt vermutlich an der Verwendung eines anderen PHBs.



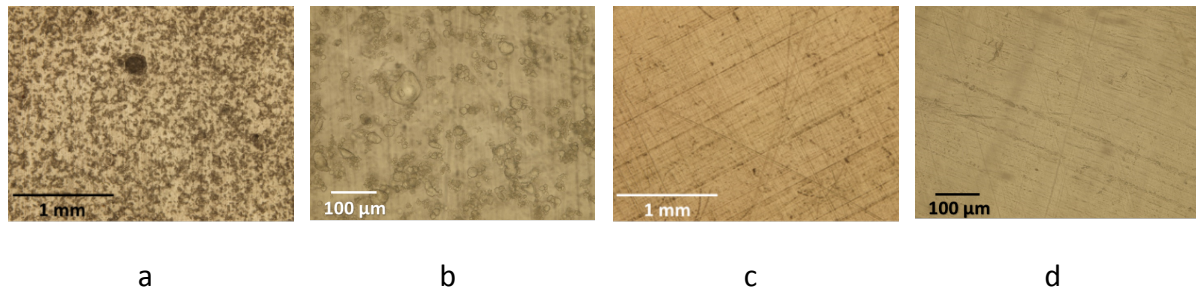
## PHBV-Folien



**Abbildung 23 - PHBV-Folien mit und ohne Biozid im Vergleich; a: Auflichtaufnahme PHBV+Biozid-Folie; b: Durchlichtaufnahme PHBV+Biozid-Folie; c, d: Durchlichtaufnahmen PHBV+Biozid-Folie mit Polarisationsfilter; e: Auflichtaufnahme reine PHBV-Folie; f: Durchlichtaufnahme reine PHBV-Folie; g, h: Durchlichtaufnahmen reine PHBV-Folie mit Polarisationsfilter**

In den Aufnahmen der PHBV+Biozid-Folien (a – d) ist ebenfalls ein Zwei-Phasen-System zu erkennen, jedoch ist es nicht so stark ausgeprägt wie bei den PHB-Proben. Die Durchlichtaufnahmen der Referenzfolie (g und h) zeigen eine schwache Sphärolith-Struktur. Diese ist in den Folien mit Biozid nicht vorhanden. Auch hier kommt der Einfluss der unterschiedlichen Verarbeitungsmethode bzw. der Anwesenheit des Biozids zum Tragen.

## PLA-Folien



**Abbildung 24 – PLA-Folien mit und ohne Biozid im Vergleich; a, b: Auflichtaufnahmen PLA+Biozid-Folie; c, d: Auflichtaufnahme reine PLA-Folie**

Die PLA-Proben zeigen in den Auflichtaufnahmen (a und b) ebenfalls ein 2-Phasen-System. Allerdings scheinen hier, im Vergleich zu den PHB- und PHBV-Proben, keine eindeutigen Partikel vorzuliegen. Unter Verwendung eines Polarisationsfilters bei Durchlichtaufnahmen war der einzige erkennbare Effekt, dass an einer bestimmten Stellung des Filters kein Licht durchgelassen wurde.

Anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen ist es schwer genaue Aussagen über die Verteilung des Biozids zu treffen. Beobachtet werden konnte nur, ob das Biozid fein verteilt oder in Form größerer Partikel vorliegt. Ebenfalls erkennbar war der Einfluss auf die Morphologie durch die Verarbeitungsmethode bzw. das Biozids.

## Bestimmung der freien Oberflächenenergien der Folien

Die Ergebnisse der freien Oberflächenenergien mittels der Kontaktwinkelmessung von Wasser und Diiodmethan sind in Tabelle 13 zu sehen. Abbildung 25 veranschaulicht die Ergebnisse für die freie Oberflächenenergie der einzelnen Proben.

Tabelle 13 – Freie Oberflächenenergien der Polymerfolien mit und ohne Biozid

[mN/m]	Oberflächenenergie	disperser Anteil	polarer Anteil
PHB+Biozid	$38,68 \pm 0,17$	$34,49 \pm 0,12$	$2,19 \pm 0,05$
PHB	$35,61 \pm 0,07$	$32,67 \pm 0,04$	$2,94 \pm 0,03$
PHBV+Biozid	$36,95 \pm 0,13$	$35,68 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,04$
PHBV	$38,56 \pm 0,44$	$35,08 \pm 0,34$	$3,48 \pm 0,10$
PLA+Biozid	$33,55 \pm 0,17$	$32,09 \pm 0,14$	$1,46 \pm 0,04$
PLA	$33,54 \pm 0,04$	$32,49 \pm 0,01$	$1,05 \pm 0,03$

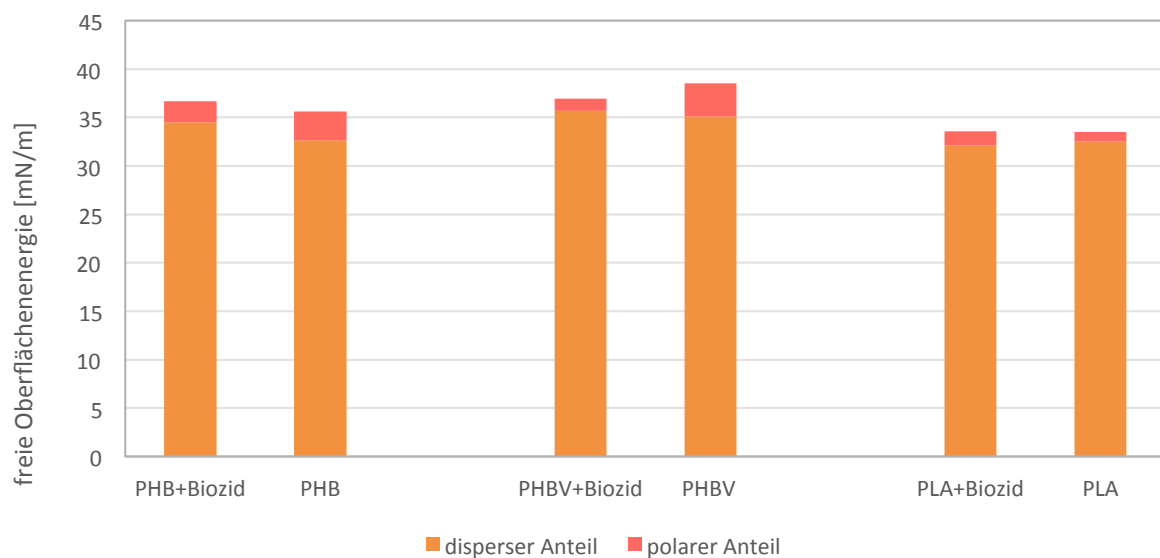


Abbildung 25 – Vergleich der freien Oberflächenenergien der Polymerfolien mit und ohne Biozid



Die Ergebnisse der freien Oberflächenenergie zeigen keine ausschlaggebenden Veränderungen. Grundlegend wäre bei Anwesenheit von Ammonium- und Amin-Gruppen an der Oberfläche eine höhere freie Oberflächenenergie und kleinere Kontaktwinkel mit Wasser zu erwarten. Der Anteil an  $\text{pN}_{25}\text{A}_{75}$  ist allerdings sehr gering und die Kontaktwinkelmessung keine empfindliche Methode. Die detaillierten Messwerte der Kontaktwinkel sind im Anhang zu finden.

## ATR-FTIR

Um festzustellen, ob sich das Biozid an der Oberfläche bzw. im oberflächennahen Bereich der Folien befindet wurden ATR-FTIR-Messungen an drei unterschiedlichen Stellen der Folien durchgeführt. Zum besseren Vergleich der einzelnen Messungen wurde die Absorption der C=O-Valenzschwingung auf 1 normiert. Zur Veranschaulichung wurden in den Abbildungen der Spektren die Bereiche der für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> charakteristischen Signale mit roten Pfeilen markiert.

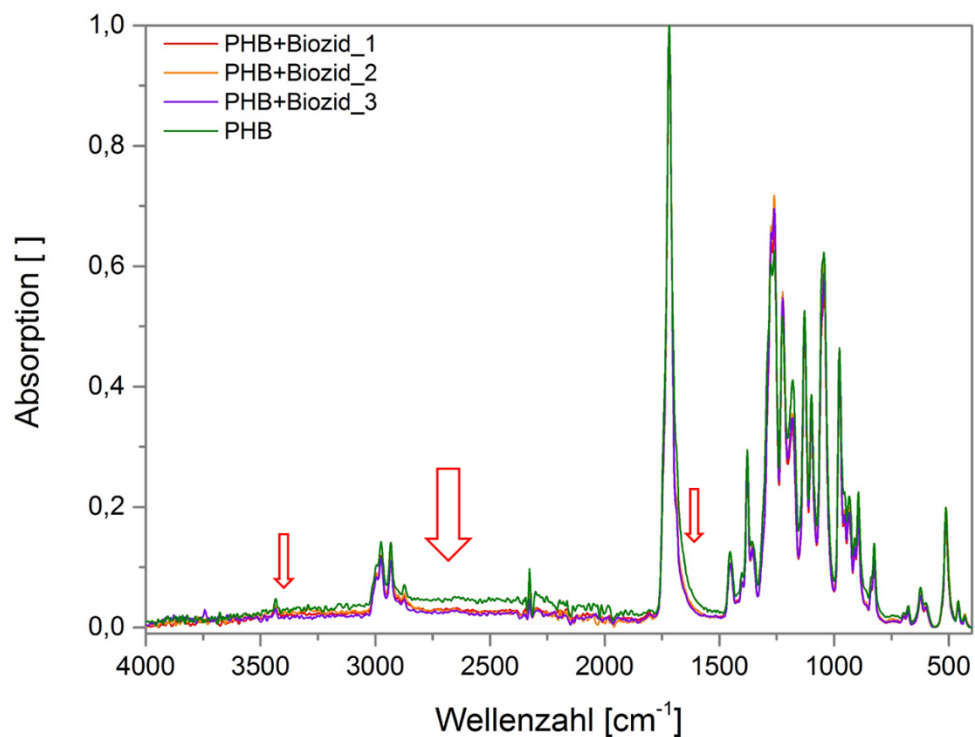
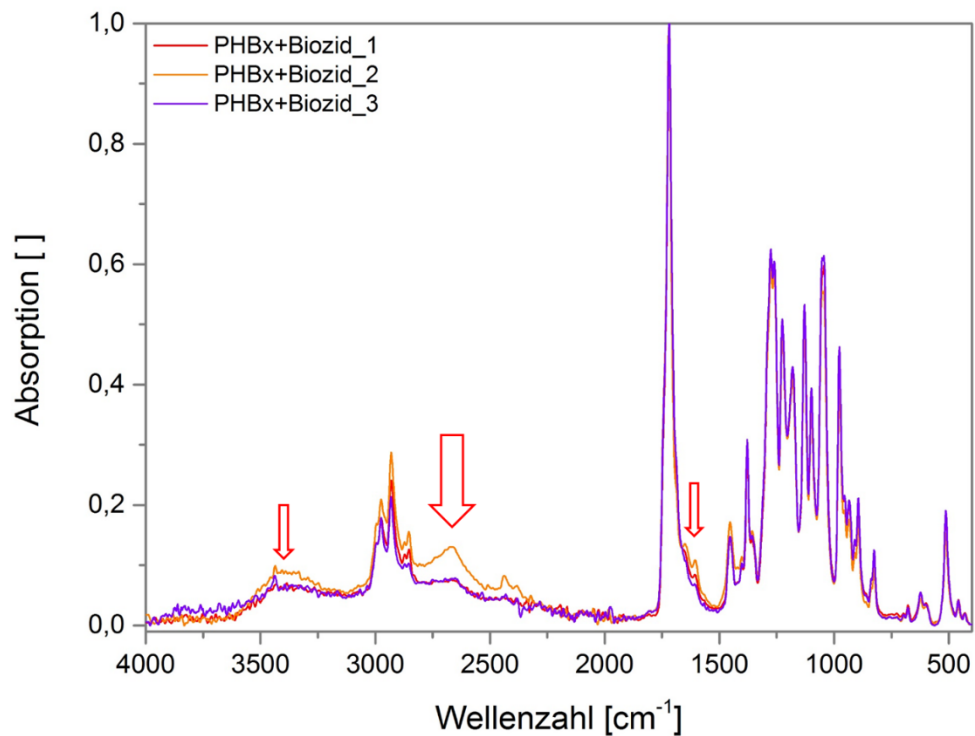


Abbildung 26 - ATR-FTIR-Spektren der PHB-Folien mit und ohne Biozid, Absorption auf 1 normiert

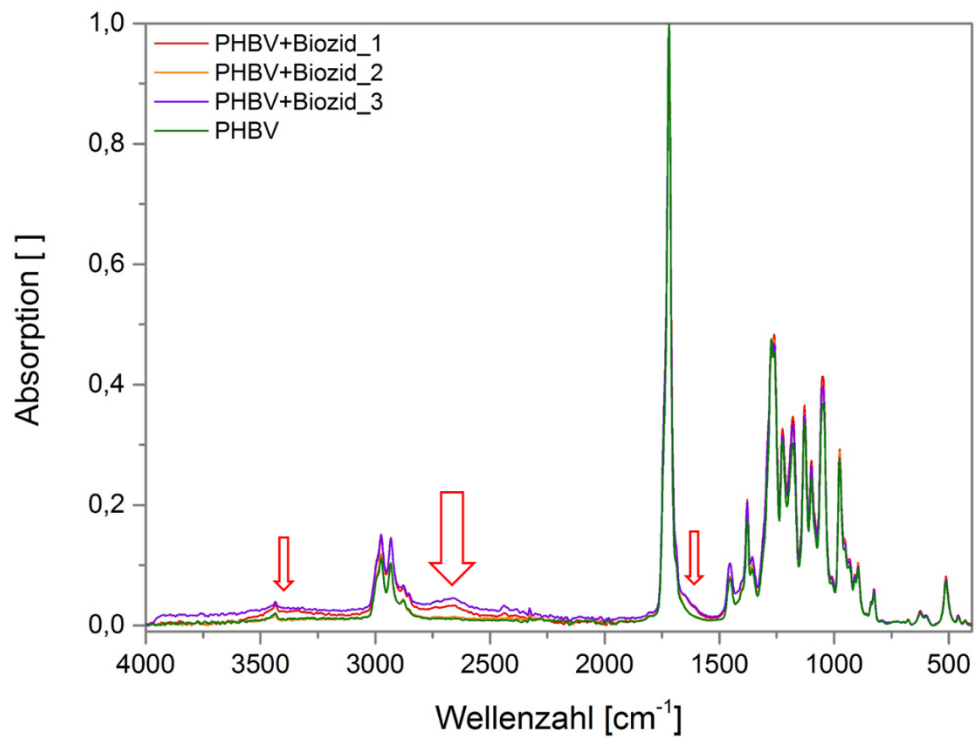
Die Spektren der PHB+Biozid-Folie zeigen an den drei gewählten Messpunkten kein Biozid an der Oberfläche bzw. im oberflächennahen Bereich.



**Abbildung 27 - ATR-FIR-Spektren der PHB-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 1, Absorption auf 1 normiert**

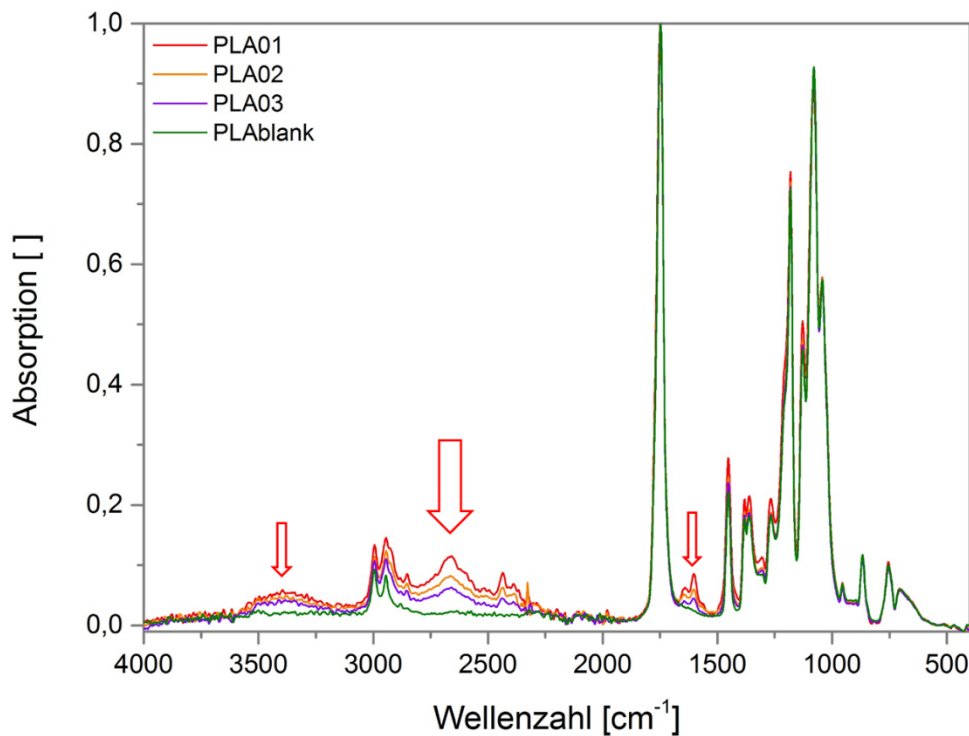
Die ATR-FTIR-Spektren der PHB+Biozid-Folie nach dem Verarbeitungsverfahren 1 zeigen an allen drei Messpunkten deutlich ein Vorhandensein des Biozids an der Oberfläche bzw. im oberflächennahen Bereich.

Der Vergleich mit den Spektren der PHB-Biozid-Folie nach dem Verarbeitungsverfahren 3, lässt auf einen Einfluss der Verarbeitungsmethode auf die Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix schließen.



**Abbildung 28- ATR-FTIR-Spektren der PHBV-Folien mit und ohne Biozid, Absorption auf 1 normiert**

Die ATR-FTIR-Spektren der Messstellen 1 und 3 zeigen Veränderungen in den für das Biozid charakteristischen Signalbereichen. Im Spektrum des Messpunktes 2 sind diese nicht zu erkennen. Dies weist auf eine inhomogene der Verteilung des Biozids in der PHBV-Matrix hin.



**Abbildung 29 - ATR-FTIR-Spektren der PLA-Folien mit und ohne Biozid, Absorption auf 1 normiert**

Die ATR-FTIR-Spektren aller drei Messstellen zeigen die Anwesenheit des Biozids an der Oberfläche bzw. im oberflächennahen Bereich.

Um anhand der ATR-FTIR-Spektren festzustellen, ob das Biozid in den PHBV-Proben inhomogen verteilt ist und ob sich tatsächlich kein Biozid an der Oberfläche bzw. dem oberflächennahen Bereich der PHB-Proben befindet, bedarf es einer Imaging-Methode.

Mittels der optischen Lichtmikroskopie konnte das Vorliegen zweier Phasen sehr gut gezeigt werden. Eine genauere Bestimmung der Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix ist mit dieser Methode allerdings nicht möglich. Die Ermittlung der freien Oberflächenenergie zeigte keine signifikanten Veränderungen. Mit der ATR-FTIR-Spektroskopie konnte das

Vorhandensein des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> an der Oberfläche bzw. dem oberflächennahen Bereich sehr gut gezeigt werden. Für eine fundierte Charakterisierung wäre eine repräsentativere Untersuchung der gesamten Oberfläche nötig.

Grundlegend bedarf es bei der Charakterisierung von Polymerblends einer Kombination mehrerer Methoden. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bzw. zur Verfügung gestandenen Methoden sind jedoch nicht ausreichend, um eindeutige Aussagen über Löslichkeit und Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix zu treffen.

Ergänzend könnte das Zeta-Potential der Folienoberflächen bestimmt werden. Bei Vorhandensein des Biozids an der Oberfläche könnte dieses, aufgrund dessen Ladung mit dieser Methode detektiert werden. Um konkretere Information über die Verteilung zu erhalten, wären diverse mikroskopische Methoden wie zum Beispiel Rasterelektronenmikroskopie (REM) oder Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) in Kombination mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) oder Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) von Interesse.

### 4.3 Kontaktbiozide Wirkung

Die nachfolgende Interpretation der Ergebnisse erfolgte anhand der Anzahl der überlebenden KBE bzw. durch optischen Vergleich mit den Agarplatten der Polymerfolien ohne pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>. Eine biozide Wirkung bedeutet, dass keine bis einzelne wenige zählbare KBE überleben. Von einer wachstumshemmenden Wirkung wird gesprochen, wenn beim optischen Vergleich mit den Agarplatten der Referenzproben erkennbar weniger KBE vorhanden sind. Keine Wirkung ist gegeben, wenn sich die Agarplatten der Referenzproben, der entsprechenden Verdünnungen, mit denen der Proben nicht unterscheiden.

Um sicher zu stellen, dass es bei der Probenbehandlung zu keinem Verlust der eingesetzten Bakterienkonzentration kommt, wurde anhand der nicht inkubierten Proben (0 h) eine Wiederfindungsrate bestimmt. Diese zeigte für *E. coli*, als auch für *S. aureus* eine Veränderung der log-Stufe < 1.

**Tabelle 14 – Übersicht der Ergebnisse der Dreifachbestimmung der antibakteriellen Aktivität der hergestellten Folien gegen *E. coli***

PHB+Biozid			PHBV+Biozid		
1	keine Wirkung	●	1	Wachstumshemmung	●
2	keine Wirkung	●	2	keine Wirkung	●
3	keine Wirkung	●	3	keine Wirkung	●

PLA+Biozid		
1	Wachstumshemmung	●
2	Wachstumshemmung	●
3	biozide Wirkung	●

**Tabelle 15 – Übersicht der Ergebnisse der Dreifachbestimmung der antibakteriellen Aktivität der hergestellten Folien gegen *S. aureus***

PHB+Biozid			PHBV+Biozid		
1	biozide Wirkung	●	1	Wachstumshemmung	●
2	biozide Wirkung	●	2	biozide Wirkung	●
3	biozide Wirkung	●	3	keine Wirkung	●

PLA+Biozid		
1	biozide Wirkung	●
2	Wachstumshemmung	●
3	biozide Wirkung	●

Wie Tabelle 14 – Übersicht der Ergebnisse der Dreifachbestimmung der antibakteriellen Aktivität der hergestellten Folien gegen *E. coli* Tabelle 14 zeigt, konnte für die PHB+Biozid-Proben keine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* festgestellt werden. Dasselbe gilt für die PHBV+Biozid-Folie, hier konnte nur bei einer Probe eine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen werden. Die PLA+Biozide-Folie zeigte gegen *E. coli* noch die besten Ergebnisse. Allerdings konnte nur bei einer Probe eine eindeutige biozide Wirkung festgestellt werden.

Etwas bessere Ergebnisse zeigte die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen *S. aureus* (Tabelle 15). Alle drei PHB+Biozid-Proben töteten die aufgebrauchten Bakterien ab. Aus der Bestimmung der PHBV+Biozid-Folie ging kein klares Ergebnis hervor. Eine Probe zeigte biozide Wirkung, eine Wachstumshemmung und eine keine Aktivität gegen *S. aureus*. Für die PLA+Biozid-Folie konnte eine biozide Wirkung festgestellt werden. Eine Probe zeigte allerdings nur eine Wachstumshemmung der Bakterien.

In einem Vorversuch wurde, mit der nach dem Verarbeitungsverfahren 1 hergestellten, PHB-Folie eine Doppelbestimmung gegen *E. coli* und *S. aureus* durchgeführt. Für den Test



wurden für *E. coli*  $1 \cdot 10^4$  KBE und für *S. aureus*  $5 \cdot 10^3$  KBE auf die Proben aufgebracht. In beiden Fällen konnte eine biozide Wirkung nachgewiesen werden.

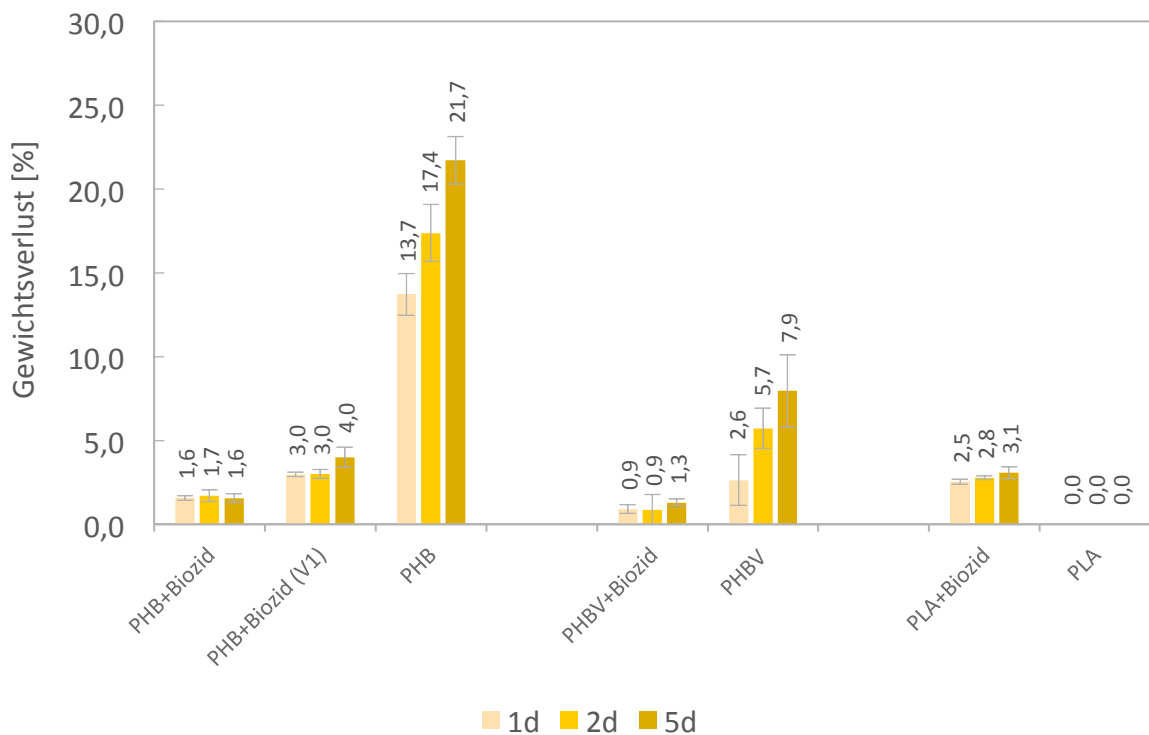
Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der hergestellten Folien lieferte keine signifikanten Ergebnisse. Zwar konnte bei allen Folien eine bessere Wirkung gegen *S.aureus* beobachtet werden, trotzdem zeigen die Ergebnisse innerhalb der Dreifachbestimmungen eine zu hohe Divergenz. Die große Unterschiedlichkeit lässt vielmehr auf eine inhomogene Verteilung des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> in den Biopolymermatrizes schließen.

In der Literatur kann keine einheitliche Aussage zur unterschiedlichen Aktivität von kationischen Ammoniumverbindungen gegen gram-positive und gram-negative Bakterien gefunden werden.<sup>58,59,60</sup> Die Arbeit von Kelly und Wiesbrock zeigte für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> in PP eine höhere Aktivität gegen *E. coli*, als gegen *S. aureus*.<sup>1</sup>

Die Ergebnisse des durchgeführten Vorversuches (mit PHB, Verarbeitungsverfahren 1), weisen auf einen Einfluss des Verarbeitungsverfahrens auf die Anwesenheit des Biozids an der Oberfläche des Biopolymers hin.

## 4.4 Biologische Abbaubarkeit

Da eine genaue Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit aufwendig und zeitintensiv ist, wurde das Verfahren des enzymatischen Abbauversuchs gewählt. Dieser wurde mit einer PHB-Depolymerase durchgeführt, von welcher bekannt ist auch PHBV abzubauen. Die Ergebnisse der Bestimmung mit einer Enzym-Konzentration von  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  sind in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30 – Mittlerer Gewichtsverlust nach dem enzymatischen Abbau mit PHB-Depolymerase nach 1, 2 und 5 Tagen; detaillierte Ergebnisse sind im Anhang zu finden**

Die PHB-Referenzproben zeigen einen deutlichen Masseverlust durch die PHB-Depolymerase. Nach fünf Tagen sind bereits knappe 22% der Probe abgebaut. Anders sieht dies für die Folien mit pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> aus. Sie zeigen einen Masseverlust von unter 4%. Die nach Verarbeitungsverfahren 1 hergestellte PHB+Biozid-Folie zeigt, im Vergleich zu jener nach dem Verarbeitungsverfahren 3 hergestellten, einen leicht höheren Masseverlust.

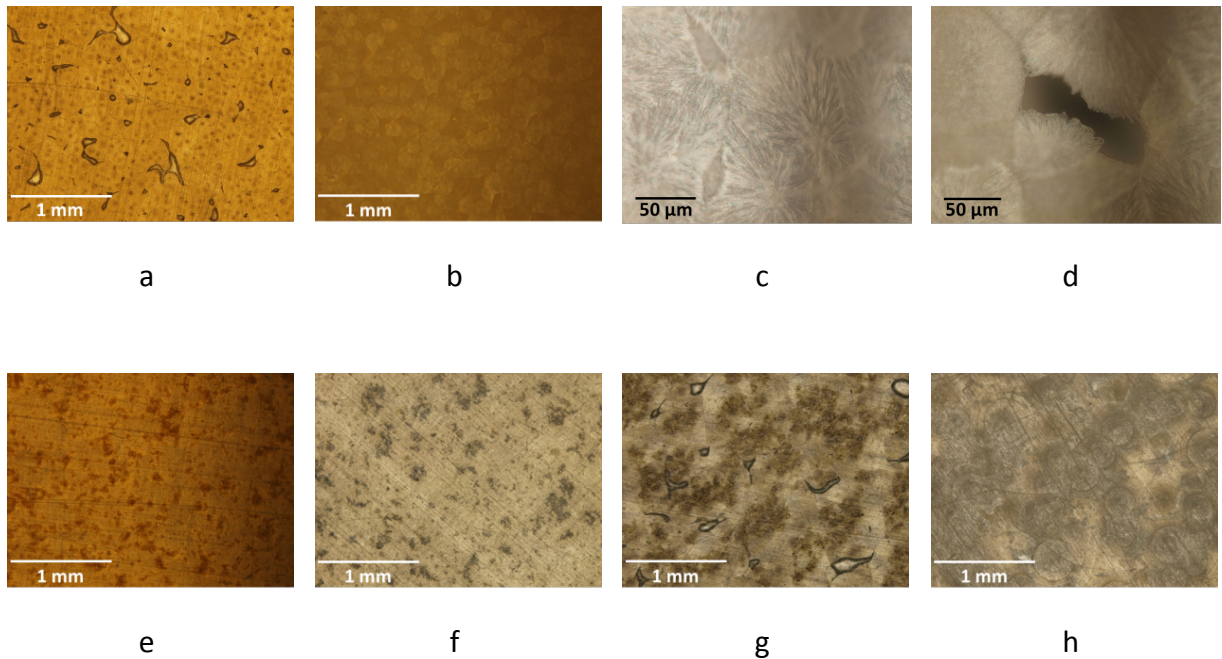
Für PHBV zeigen die Ergebnisse, dass dieses von der eingesetzten PHB-Depolymerase schlechter abgebaut wird als PHB. Nach fünf Tagen waren 8% der PHBV-Referenzproben abgebaut. Bei der Betrachtung der Ergebnisse der PHBV-Folie mit pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> zeigt sich ähnliches Verhalten zu denen der PHB-Proben. Der Masseverlust für die PHBV+Biozid-Folie liegt nach fünf Tagen bei 1,3%.

Zur Kontrolle wurde der Abbauversuch auch mit PLA durchgeführt. Es zeigt sich, wie erwartet, kein Masseverlust für die reine PLA-Folie. Allerdings kann für die PLA+Biozid-Folie nach fünf Tagen ein Masseverlust von 3 % beobachtet werden.

Bei den Ergebnissen ist zu berücksichtigen, dass die Kristallinität, und somit die Verarbeitungsmethode, einen starken Einfluss auf die enzymatische Abbaugeschwindigkeit hat. So werden amorphe Bereiche viel schneller als kristalline abgebaut.<sup>61</sup>

Um mehr Informationen über den enzymatischen Abbau zu erhalten, wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von den Folien nach dem Versuch aufgenommen.

## PHB-Folien

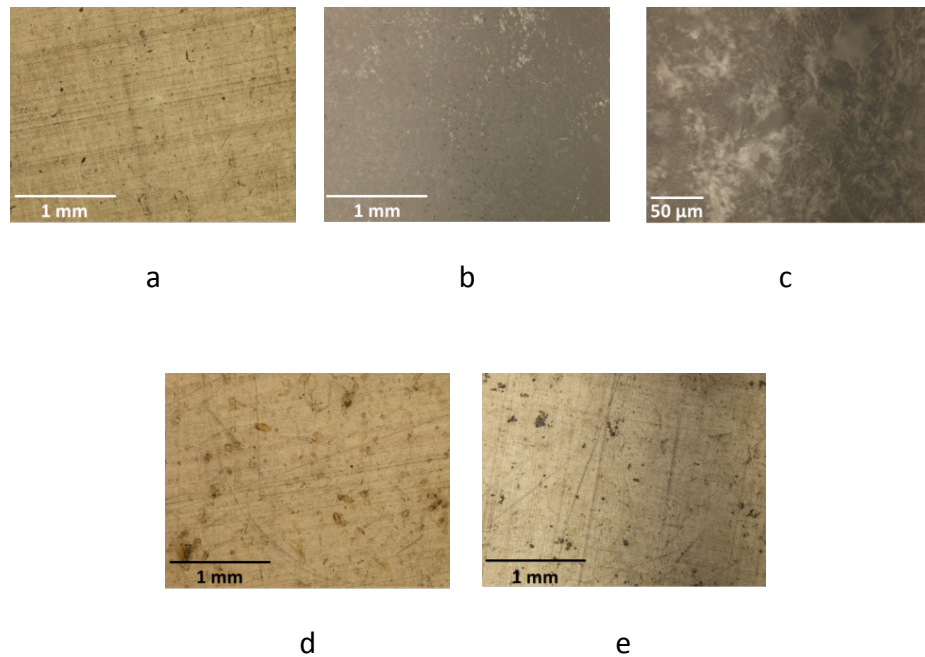


**Abbildung 31 – Auflichtaufnahmen der PHB-Folien, vor und nach dem enzymatischen Abbauersuch im Vergleich; a: reine PHB-Folie, vorher; b, c: reine PHB-Folie nach 1 d; d: reine PHB-Folie nach 5 d; e, f: PHB+Biozid-Folie, vorher und nachher; g, h: PHB+Biozid-Folien nach dem Verarbeitungsverfahren 1, vorher und nachher**

Anhand der Aufnahmen der reinen PHB-Folien ist sehr gut der von Doi et.al. beschriebene Effekt zu erkennen. Amorphe Bereiche werden schneller von PHB-Depolymerase abgebaut, und dabei die kristallinen Bereiche freigelegt (b – d). In Bild Abbildung 31d ist nach 5 Tagen enzymatischen Abbaus ein charakteristisches “Pinhole“ zu sehen, welches bei der Degradation entsteht.

Bei den Biozid-enthaltenden Folien ist in den Aufnahmen zu erkennen, dass die Stellen des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> an der Folienoberfläche nach dem Versuch grau erscheinen.

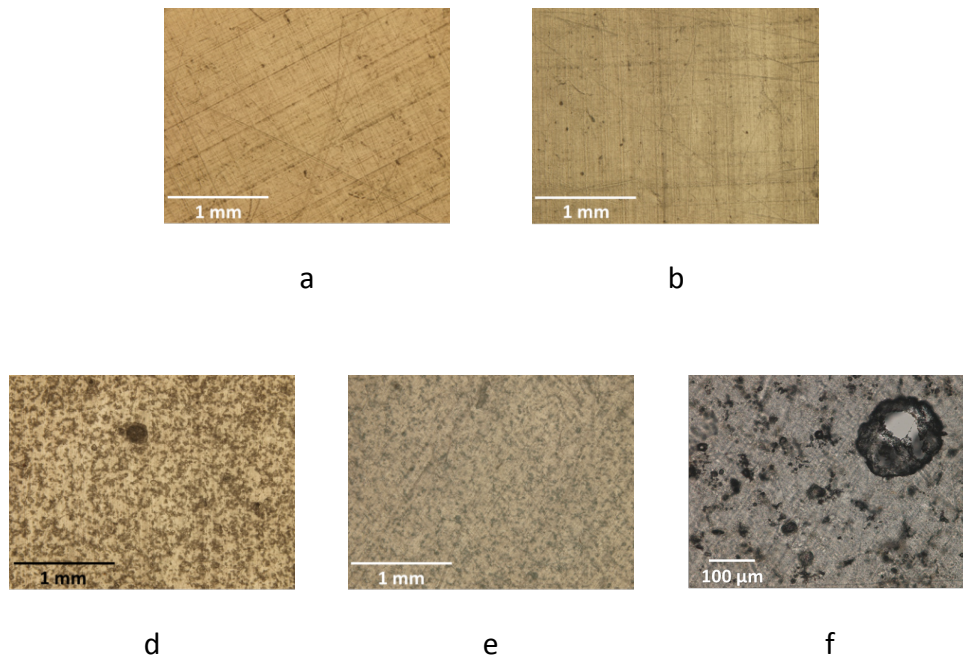
## PHBV-Folien



**Abbildung 32 - Auflichtaufnahmen der PHBV-Folien, vor und nach dem enzymatischen Abbaubersuch im Vergleich; a: reine PHBV-Folie, vorher; b, c: reine PHBV-Folie nachher; d, e: PHBV+Biozid-Folie, vorher und nachher**

Für die PHBV-Folien ist derselbe Effekt wie bei den PHB-Folien zu erkennen. Die Aufnahmen der reinen PHBV-Probe (b, c) zeigen deutlich, dass ein enzymatischer Abbau stattgefunden hat und lassen in Bild Abbildung 32c die kristallinen Bereiche erkennen. Die einzige Veränderung die an den PHBV+Biozid-Folien zu kennen ist, ist ebenfalls das Entstehen grauer Stellen.

## PLA-Folien



**Abbildung 33 – Aufnahmen der PLA-Folien, vor und nach dem enzymatischen Abbaueversuch im Vergleich;**  
a, b: Auflichtaufnahmen reine PLA-Folie, vorher und nachher; d, e: Auflichtaufnahmen PLA+Biozid-Folie,  
vorher und nachher; f: Durchlichtaufnahme der PLA+Biozid-Folie, nachher

Im Fall der PLA-Proben ist bei den reinen, als auch bei denen mit Biozid lediglich in den Aufnahmen eine leichte Trübung zu sehen. Allerdings ist in der Durchlichtaufnahme (f) ein Loch an der Folienoberfläche zu sehen, welches auf ein Herauslösen des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> hinweist.

Der enzymatische Abbaueversuch lieferte zwei signifikante Erkenntnisse:

- Die PHB-Depolymerase wird durch das pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> deaktiviert.
- Die ermittelten Masseverluste lassen darauf schließen, dass oberflächennahes Biozid aus der Folie gelöst wird.

## 5 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung und Charakterisierung von Polymerblends eines bioziden Polymers (partielle hydrolysiertes Poly(2-oxazolin), pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>) und ausgewählten Biopolymeren (PHB, PHBV und PLA). Als Grundlage diente die von Kelly und Wiesbrock vorangegangene Arbeit.<sup>1</sup>

Da pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> nicht kommerziell erhältlich ist, musste dieses selbst hergestellt werden. Die Monomersynthese von 2-Nonyl-2-oxazolin aus Dodecansäure und Ethanolamin, als auch dessen Polymerisation konnten erfolgreich durchgeführt werden.

Für die partielle Hydrolyse wurde anfangs, die von Kelly und Wiesbrock publizierte Reaktionstemperatur von 125°C gewählt. Auf diese Weise konnten aber keine reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Reaktionstemperatur auf 160°C erhöht. Dadurch war es möglich die Reaktionszeit für einen Hydrolysegrad von 75% zu ermitteln. Mit den gewählten Reaktionsbedingungen konnten Ausbeuten von über 90% erreicht werden.

Die Charakterisierung des Copolymers führte zu einigen Herausforderungen. Die Strukturaufklärung mittels NMR, und somit die Bestimmung des Hydrolysegrades gestalteten sich schwierig. Partiiell hydrolysierte Poly(2-nonyl-2-oxazoline) mit einem Hydrolysegrad von über 50% sind wasserlöslich, weshalb die NMR-Spektren in D<sub>2</sub>O aufgenommen werden mussten. Dies führte zu Signalüberlagerungen und einer schlechten Baseline. Aufgrund dessen ist die Genauigkeit der Bestimmung des Hydrolysegrades eingeschränkt. Mit dem für die GPC-Analyse verwendeten System, war es nicht möglich das mittlere Molekulargewicht des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> zu bestimmen, weshalb ein Polymerkettenabbau durch die harschen Bedingungen der Hydrolyse nicht ausgeschlossen werden kann.

Die für die Verarbeitung mit den Biopolymeren nötige thermische Stabilität für pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> konnte mittels DSC- und DTA-Analysen nachgewiesen werden.

Zur Herstellung der Polymerblends wurden drei Verarbeitungsverfahren getestet. Das Extrudieren der Komponenten und anschließende Pressen zu Folien führte zum optisch besten Ergebnis.

Die hergestellten Folien wurden in weiterer Folge auf die Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix untersucht. Alle drei Polymerblends zeigten im Lichtmikroskop ein Vorliegen eines Zwei-Phasen-Systems und ließen im Vergleich mit reinen Biopolymerfolien keine signifikante Änderung der freien Oberflächenenergien erkennen. Die ATR-FTIR Untersuchung der Folienoberflächen wies auf eine sehr unterschiedliche Verteilung des Biozids hin. Hier bedarf es einer Imaging-Methode um klare Aussagen treffen zu können. Für eine exakte Charakterisierung der Verteilung des Biozids in den Biopolymermatrizes ist es nötig weitere Analysemethoden (wie z.B. SEM-EDX) anzuwenden.

Bei der Ermittlung der kontaktbioziden Wirkung konnte nur teilweise eine antibakterielle Aktivität gegen *E. coli* und *S. aureus* nachgewiesen werden. Die Ergebnisse innerhalb der durchgeführten Dreifachbestimmung zeigen eine so starke Divergenz, dass auf eine sehr inhomogene Verteilung des Biozids auf der Biopolymeroberfläche geschlossen werden muss.

Anhand des enzymatischen Abbauersuchs konnte sehr gut der Einfluss der Polymormorphologie auf den enzymatischen Abbau beobachtet werden. Es wurde festgestellt, dass das verwendete Biozid die PHB-Depolymerase deaktiviert. Weiters lässt die Durchführung des enzymatischen Abbauersuchs darauf schließen, dass das pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> aus der Biopolymermatrix gelöst wird. Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob es bei einer Immobilisierung des Biozids in der Biopolymermatrix ebenfalls zu einer Deaktivierung der PHB-Depolymerase kommen würde.



Abschließend können folgende Aussagen getroffen werden:

- Die Verwendung eines Polymerblends aus pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> und PHB, PHBV bzw. PLA, nach dem angewendeten Herstellungsverfahren, ist nicht zur Kombination von biologischer Abbaubarkeit und antimikrobieller Oberflächenaktivität geeignet.
- Voraussetzung für ein heterogenes Polymerblend ist eine stabile Blendmorphologie.<sup>62</sup> Dafür sind eine gleichmäßige Verteilung des Biozids in der Biopolymermatrix, sowie eine gute Phasenadhäsion, als auch eine ausführliche Charakterisierung unerlässlich.
- Um die Mischbarkeit des pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub> mit den Biopolymeren zu erhöhen, wäre die Zugabe von Haftvermittlern oder eine Modifizierung des Biozids möglich.

# 6 Anhang

## 6.1 Abkürzungen und Symbole

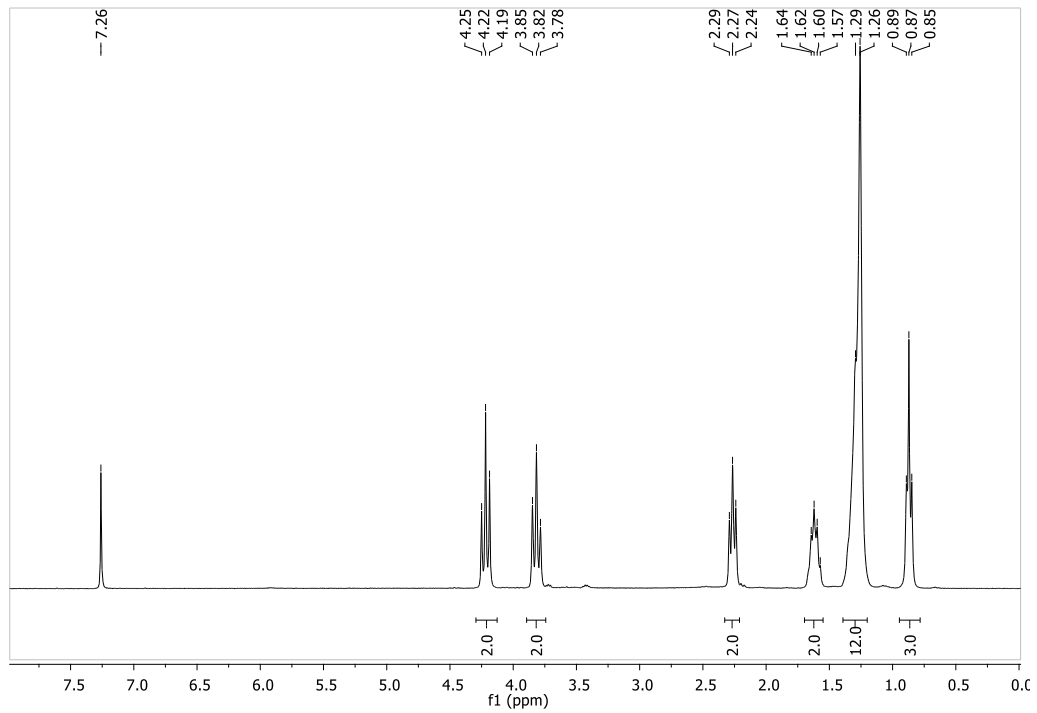
$^1\text{H-NMR}$	Proton nuclear magnetic resonance
2-PrOH	Isopropanol
äq	Äquivalent
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
CSL	Nährlösung aus Casein, Soja, NaCl, Dikaliumhydrogenphosphat und Glukose
d	Dicke
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DSC	Differential Scanning Calorimetry
EDX	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy
$\text{Et}_3\text{N}$	Triethylamin
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
KBE	keimbildende Einheiten
LDPE	Low-density Polyethylen
LM	Lösungsmittel
m	Masse
MeOH	Methanol
$M_n$	mittleres Molekulargewicht
NonOx	2-Nonyl-2-oxazolin
p	Druck
PDI	Polydispersitätsindex
pEtOx	Poly(2-ethyl-2-oxazolin)
PHB	Poly(3-hydroxybutyrat)
PHBV	Poly(3-hydroxybutyrat-co-3-hydroxyvalerat)
PLA	Polylactid

pMeOx	Poly(2-methyl-2-oxazolin)
pN <sub>25</sub> A <sub>75</sub>	Poly(2-nonyl-2-oxazolin) mit einem Hydrolysegrad von 75%
pNonOx	Poly(2-nonyl-2-oxazolin)
PP	Polypropylen
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
SEM	Scanning Electron Microscopy
STA	Simultane thermische Analyse
T	Temperatur
t	Zeit
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur
T <sub>z</sub>	Zerstörungstemperatur
δ	Deformationsschwingung
η <sub>inh</sub>	inhärente Viskosität
ρ	Dichte
v	Valenzschwingung
v <sub>as</sub>	asymmetrische Valenzschwingung
v <sub>s</sub>	symmetrische Valenzschwingung

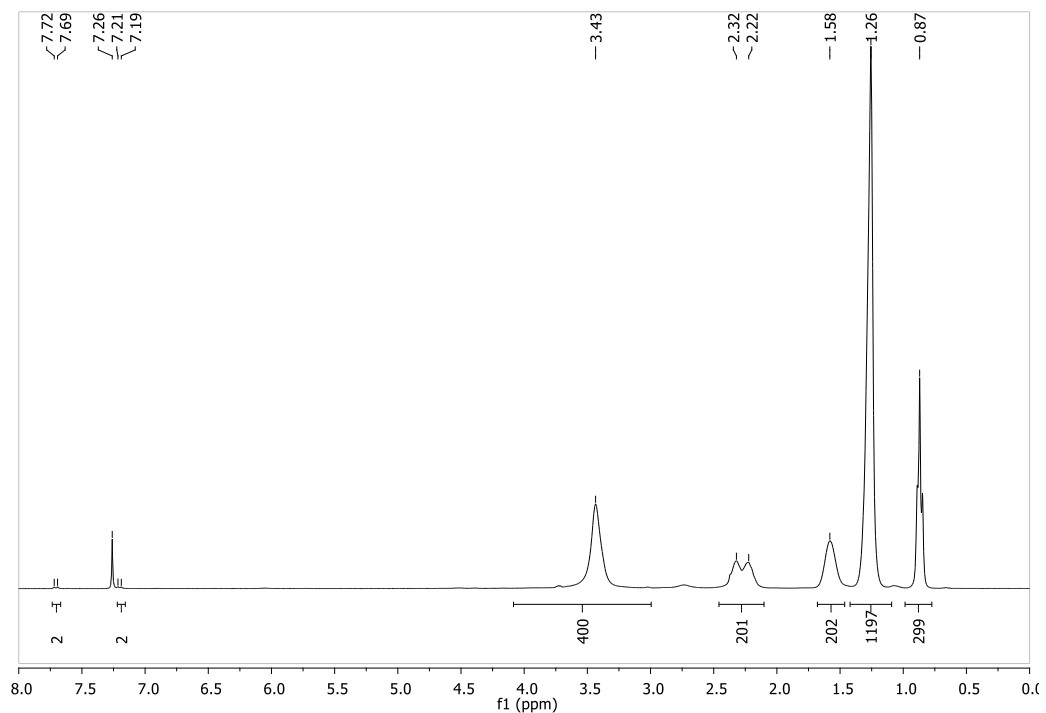
## 6.2 Messergebnisse und Spektren

### NMR-Spektren

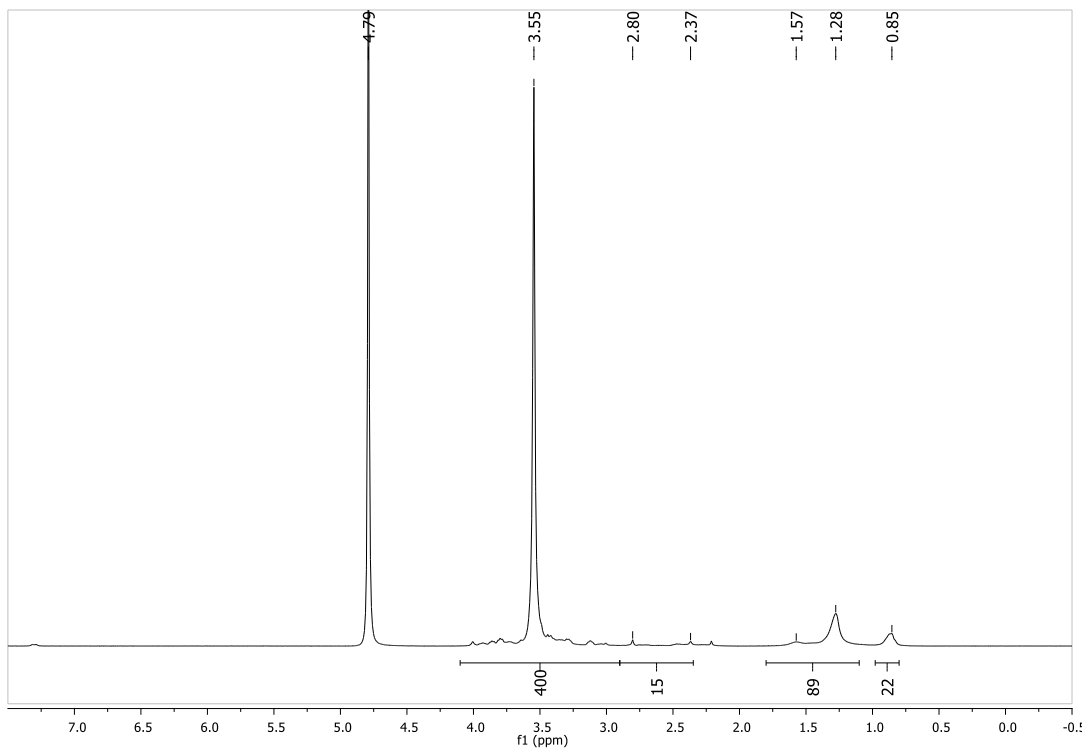
#### 2-Nonyl-2-oxazolin, in CDCl<sub>3</sub>



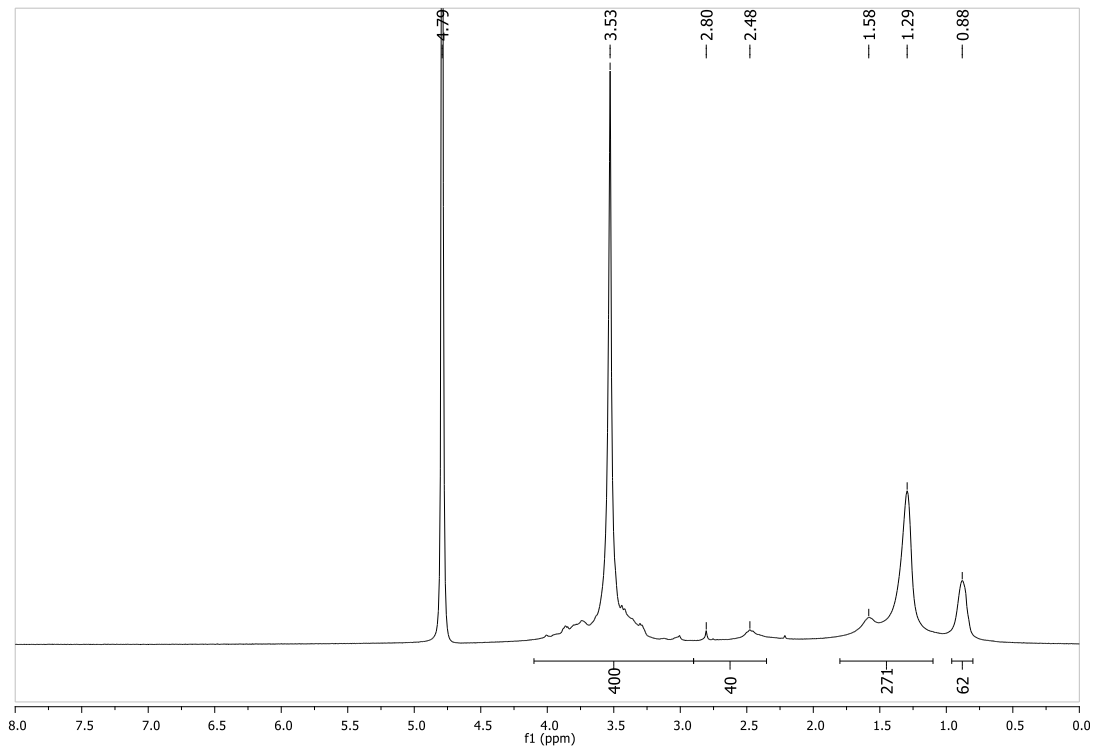
#### Poly(2-nonyl-2-oxazolin), in CDCl<sub>3</sub>



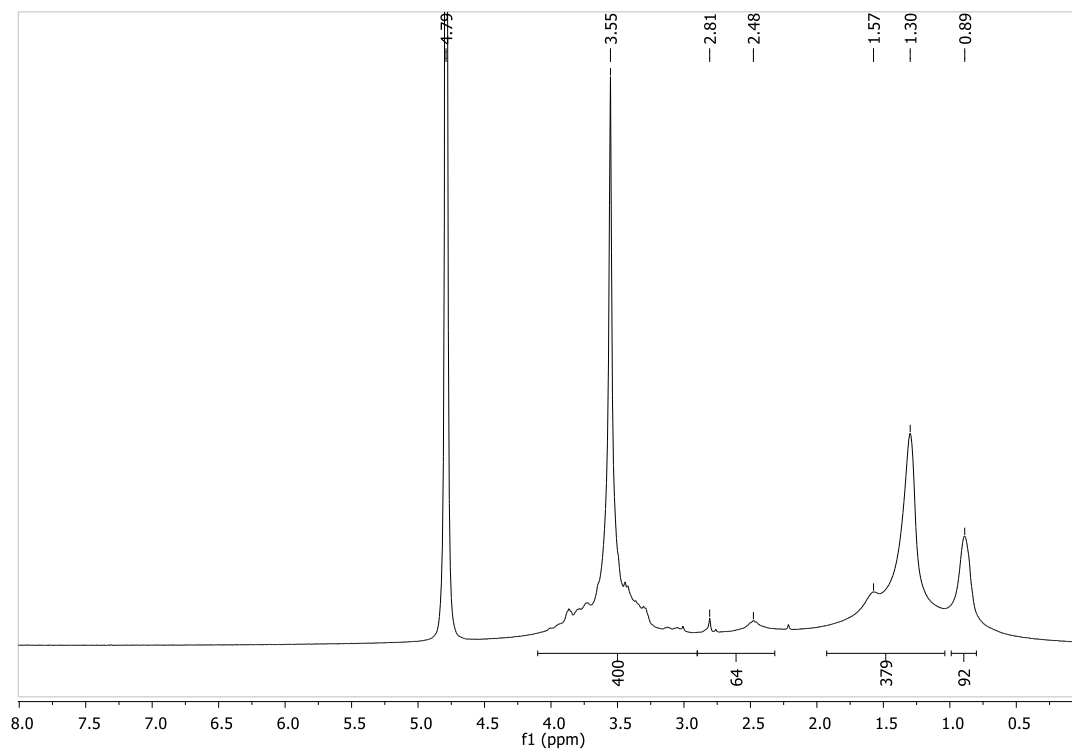
**Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid) – Hydrolysegrad 93% - K1, in D<sub>2</sub>O**



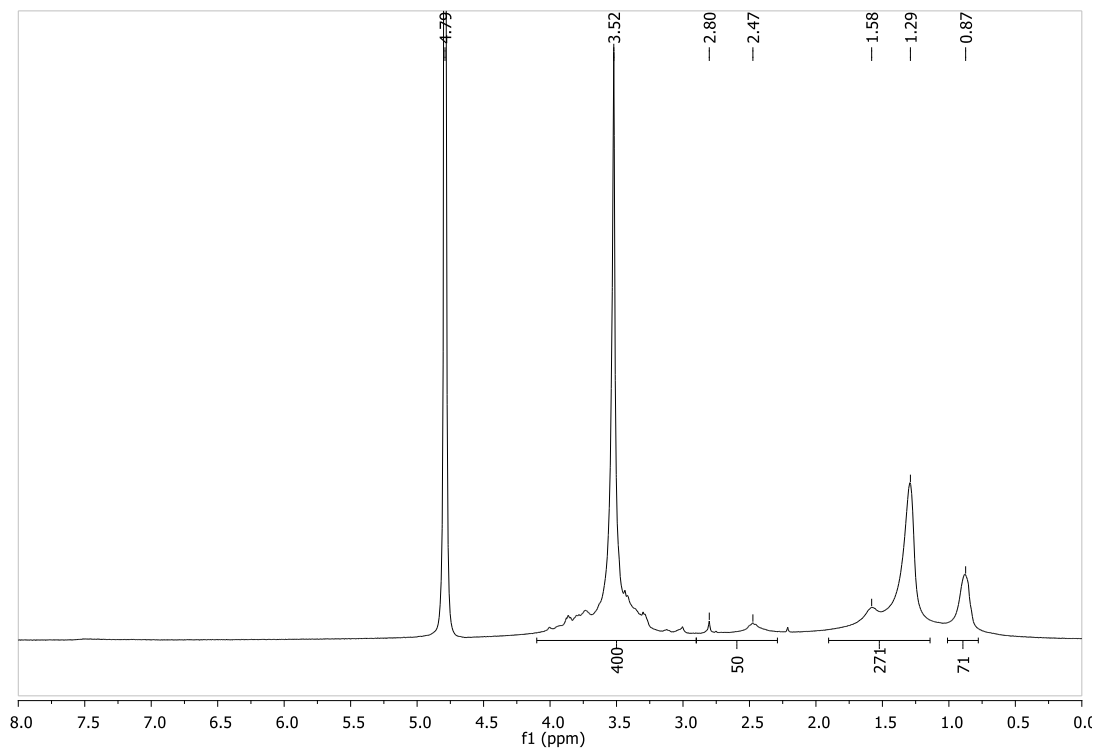
**Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid) – Hydrolysegrad 78% - K2, in D<sub>2</sub>O**



**Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid) – Hydrolysegrad 70% - K3, in D<sub>2</sub>O**



**Poly(2-nonyl-2-oxazolin)-co-(aziridinium chlorid) – Hydrolysegrad 75% - pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>, in D<sub>2</sub>O**



## Kontaktwinkelmessung

### Kontaktwinkel der PHB-Folie mit pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	84,9 ± 0,85	46,5 ± 1,45
2	89,8 ± 1,66	43,6 ± 0,54
3	83,2 ± 2,90	48,1 ± 1,66
4	87,5 ± 0,24	45,5 ± 0,34
5	88,6 ± 0,17	50,4 ± 1,73
6	85,4 ± 1,84	42,8 ± 1,37
7	85,8 ± 0,96	44,7 ± 1,21
8	85,0 ± 4,43	46,0 ± 0,26
<b>Mittelwert</b>	<b>86,3 ± 1,47</b>	<b>46,0 ± 0,57</b>

### Kontaktwinkel der reinen PHB-Folie

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	86,7 ± 1,05	53,5 ± 0,14
2	84,7 ± 3,43	52,7 ± 1,02
3	87,1 ± 1,44	52,4 ± 0,51
4	86,3 ± 2,34	53,9 ± 1,11
5	85,3 ± 1,59	55,2 ± 0,23
6	85,9 ± 0,21	49,5 ± 0,59
<b>Mittelwert</b>	<b>86,0 ± 0,61</b>	<b>52,9 ± 0,21</b>

### Kontaktwinkel der PHBV-Folie mit pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	87,4 ± 0,25	49,0 ± 0,61
2	92,6 ± 0,17	45,5 ± 1,24
3	88,9 ± 2,14	46,4 ± 1,00
4	87,3 ± 0,22	47,0 ± 0,76
5	93,0 ± 2,62	47,9 ± 0,22
6	93,0 ± 2,46	49,0 ± 1,02
7	90,7 ± 1,25	
8	92,8 ± 0,32	
<b>Mittelwert</b>	<b>90,7 ± 1,70</b>	<b>47,5 ± 0,40</b>

### Kontaktwinkel der reinen PHBV-Folie

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	84,0 ± 1,18	48,1 ± 0,79
2	85,3 ± 2,70	47,7 ± 2,60
3	80,8 ± 1,33	49,8 ± 1,00
4	79,3 ± 2,17	42,8 ± 1,01
5	85,7 ± 1,17	46,3 ± 0,23
6	81,7 ± 0,19	51,9 ± 0,23
7		47,9 ± 0,77
8		50,5 ± 1,01
9		50,2
10		50,5 ± 0,77
11		49,7 ± 0,73
12		47,2 ± 0,42
<b>Mittelwert</b>	<b>82,8 ± 1,74</b>	<b>48,5 ± 1,65</b>



### Kontaktwinkel der PLA-Folie mit pN<sub>25</sub>A<sub>75</sub>

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	93,2 ± 0,62	54,0 ± 0,60
2	94,4 ± 2,10	53,7 ± 0,80
3	89,9 ± 0,09	57,9 ± 0,28
4	91,4 ± 1,29	54,7 ± 2,76
5	92,9 ± 1,29	54,6 ± 1,90
6	90,6 ± 2,09	54,0 ± 0,24
7		50,0 ± 0,92
8		52,1 ± 1,07
<b>Mittelwert</b>	<b>92,1 ± 1,15</b>	<b>53,9 ± 0,69</b>

### Kontaktwinkel der reinen PLA-Folie

Messung	Kontaktwinkel <sub>Wasser</sub> [°]	Kontaktwinkel <sub>Diiodmethan</sub> [°]
1	96,7 ± 1,47	52,0 ± 0,68
2	93,4 ± 0,86	52,4 ± 0,58
3	90,9 ± 1,67	55,0 ± 0,58
4	94,8 ± 2,09	52,9 ± 0,39
5	94,4 ± 1,92	53,4 ± 1,02
6	93,1 ± 2,45	53,2 ± 0,82
<b>Mittelwert</b>	<b>93,9 ± 1,30</b>	<b>53,2 ± 0,06</b>

## Kontaktbiozide Wirkung

### Überprüfung der Wiederfindungsrate (0 h Inkubation)

<i>E. coli</i>		Platte 1	Platte 2	KBE/mL	log(KBE/mL)
PHB, 0h	$10^{-2}$	168	134	$1,2 \cdot 10^4$	4,1
	$10^{-3}$	7	12		
PHBV, 0h	$10^{-2}$	103	120	$1,1 \cdot 10^4$	4,0
	$10^{-3}$	8	12		
PLA, 0h	$10^{-2}$	72	107	$9,5 \cdot 10^3$	4,0
	$10^{-3}$	9	11		

Beimpft wurden die Proben mit log(KBE) von 4,3.

<i>St.aureus</i>		Platte 1	Platte 2	KBE/mL	log(KBE/mL)
PHB, 0h	$10^{-1}$	306	283	$2,6 \cdot 10^3$	3,4
	$10^{-2}$	16	27		
PHBV, 0h	$10^{-1}$	663	970	$5,3 \cdot 10^3$	3,7
	$10^{-2}$	24	25		
PLA, 0h	$10^{-1}$	382	398	$3,6 \cdot 10^3$	3,6
	$10^{-2}$	40	25		

Beimpft wurden die Proben mit log(KBE) von 4,0.

## Enzymatischer Abbaueversuch

<b>1 d</b>	$m_0$ [g]	$m_{1d}$ [g]	$\Delta m_{1d}$ [mg]	$\Delta m_{1d}$ [%]
PHB+Biozid	0,01069	0,01054	0,1	1
	0,01044	0,01026	0,2	2
	0,01005	0,00989	0,2	2
PHB <sub>x</sub> +Biozid	0,01265	0,01227	0,4	3
	0,01191	0,01154	0,4	3
	0,01962	0,01907	0,5	3
PHB	0,01222	0,01034	1,9	15
	0,01120	0,00970	1,5	13
	0,01051	0,00921	1,3	12
PHBV+Biozid	0,00923	0,00917	0,1	1
	0,00989	0,00981	0,1	1
	0,00878	0,00867	0,1	1
PHBV	0,01248	0,01227	0,2	2
	0,01389	0,01323	0,7	5
	0,01299	0,0128	0,2	1
PLA+Biozid	0,00554	0,00541	0,1	2
	0,00959	0,00933	0,3	3
	0,01207	0,01176	0,3	3
PLA	0,00825	0,00828	0,0	0
	0,00877	0,00878	0,0	0
	0,00925	0,00923	0,0	0

<b>2 d</b>	$m_0$ [g]	$m_{2d}$ [g]	$\Delta m_{2d}$ [mg]	$\Delta m_{2d}$ [%]
PHB+Biozid	0,01017	0,00995	0,2	2
	0,01004	0,00989	0,2	1
	0,01117	0,01101	0,2	1
PHB <sub>x</sub> +Biozid	0,02057	0,01995	0,6	3
	0,02087	0,02018	0,7	3
	0,02088	0,02032	0,6	3
PHB	0,01064	0,00854	2,1	20
	0,01176	0,00980	2,0	17
	0,01170	0,00986	1,8	16
PHBV+Biozid	0,00905	0,00896	0,1	1
	0,00924	0,00927	0,0	0
	0,00936	0,00918	0,2	2
PHBV	0,01246	0,01192	0,5	4
	0,01335	0,01238	1,0	7
	0,01282	0,01211	0,7	6
PLA+Biozid	0,00793	0,00771	0,2	3
	0,00605	0,00589	0,2	3
	0,01099	0,01067	0,3	3
PLA	0,00870	0,00867	0,0	0
	0,00764	0,00762	0,0	0
	0,00847	0,00842	0,0	1

5 d	$m_0$ [g]	$m_{5d}$ [g]	$\Delta m_{5d}$ [mg]	$\Delta m_{5d}$ [%]
PHB+Biozid	0,00984	0,00970	0,1	1
	0,00982	0,00963	0,2	2
	0,01120	0,01105	0,1	1
PHB <sub>x</sub> +Biozid	0,01824	0,01758	0,7	4
	0,02056	0,01983	0,7	4
	0,01988	0,01892	1,0	5
PHB	0,01126	0,00863	2,6	23
	0,01078	0,00842	2,4	22
	0,01065	0,00853	2,1	20
PHBV+Biozid	0,00968	0,00958	0,1	1
	0,00904	0,00890	0,1	2
	0,00990	0,00977	0,1	1
PHBV	0,01301	0,01236	0,7	5
	0,01319	0,01186	1,3	10
	0,01381	0,01260	1,2	9
PLA+Biozid	0,01156	0,01124	0,3	3
	0,00698	0,00673	0,3	4
	0,01140	0,01107	0,3	3
PLA	0,00899	0,00883	0,2	2
	0,00897	0,00896	0,0	0
	0,00876	0,00876	0,0	0

## 6.3 Referenzen

---

- <sup>1</sup> A.M. Kelly, V. Kaltenhauser, I. Mühlbacher, K. Rametsteiner, H. Kren, C. Slugovc, F. Stelzer,
- <sup>2</sup> M. Niaounakis; *Biopolymers: Reuse, Recycling and Disposal*, First edition, 2013, Elsevier Inc., 77-91
- <sup>3</sup> M. Koller; *Appl. Food Biotechnol.*, **2014**, *1*, 3-15
- <sup>4</sup> I. Chodak; *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, First edition, **2008**, Elsevier Ltd., 451-477
- <sup>5</sup> A. R. Kolahchi, M. Kontopoulou; *Polym. Degrad. Stab.*, **2015**, *121*, 222-229
- <sup>6</sup> I. Vroman, L. Tighzert; *Materials*, **2009**, *2*, 307-344
- <sup>7</sup> G. Braunegg, G. Lefebvre, K. F. Genser; *J. Biotechn.*, **1998**, *65*, 127-161
- <sup>8</sup> K. Bohmert, I. Balbo, G. Tischendorf, A. Steinbüchel, L. Willmitzer; *Plant Physiol.*, **2002**, *128*, 1282-1290
- <sup>9</sup> A. Steinbüchel, T. Lütke Eversloh; *Biochem. Eng. J.*, **2003**, *16*, 81-96
- <sup>10</sup> P. Vandamme, T. Coenye; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2004**, *54*, 2285-2289
- <sup>11</sup> M. Vaneechoutte, P. Kampf, T. De Baere, E. Falsen, G. Verschraegen; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **2004**, *54*, 317-327
- <sup>12</sup> J. L. Ienczak, G. M. F. de Aragão; *Handbook of Biodegradable Polymers: Synthesis, Characterization and Application*, First Edition, **2011**, Wiley-VCH Verlag, 23-44
- <sup>13</sup> A. Anderson, E. A. Dawes; *Microbiol. Mole. Biol. Rev.*, **1990**, *54*, 450-472

- 
- <sup>14</sup> E. Bugnicourt, P. Cinelli, A. Lazzeri, V. Alvarez; *eXpre. Polym. Let.*, **2014**, *8*, 791-808
- <sup>15</sup> C. W. Pouton, S. Akhtar; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **1996**, *18*, 133-162
- <sup>16</sup> K. Sudesh, H. Abe, Y. Doi; *Progr. Polym. Sci.*, **2000**, *25*, 1503-1555
- <sup>17</sup> L. Jiang, J. Zhang; *Handbook of Biopolymer and Biodegradable Plastics*; **2013**, Elsevier Inc., 109-128
- <sup>18</sup> S. Philip, T. Keshavarz, I. Roy; *J. Chem. Technol. Biotech.*, **2007**, *82*, 233-247
- <sup>19</sup> A. L. S. Schneider, D. D. Silva, M. C. F. Garcia, V. H. Grigull, L. P. Mazur, S. A. Furlan, G. F. Aragão, A. P. T. Pezzin; *J. Polym. Environ*, **2010**, *18*, 401-406
- <sup>20</sup> L. L. Madison, G. W. Huisman; *Micriobiol. Mol. Biol. Rev.*, **1999**, *63*, 21-53
- <sup>21</sup> S. P. Chahal, J. N. Starr; *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; **2012**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 219-225
- <sup>22</sup> K. M. Nampoothiri, N. R. Nair, R. P. John; *Biores. Techn.*, **2010**, *101*, 8493-8501
- <sup>23</sup> L.-T. Lim, R. Auras, M. Rubino; *Prog. Polym Sci.*, **2008**, *33*, 820-852
- <sup>24</sup> D. Garlotta; *J. Polym. Environ.*, **2001**, *9*, 63-84
- <sup>25</sup> L. Avérous; *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, **2008**, Elsevier Ltd., 433-450
- <sup>26</sup> T. Maharana, B. Mohanty, Y. S. Negi; *Prog. Polym Sci.*, **2009**, *34*, 99-124

- 
- <sup>27</sup> L. Avérous, E. Pollet; *Environmental Silicate Nano-Biocomposites, Green Energy and Technology*, **2012**, Springer Verlag London, 13-39
- <sup>28</sup> M. Niaounakis; *Biopolymers: Reuse, Recycling and Disposal*, First edition, 2013, Elsevier Inc., 5-21
- <sup>29</sup> L. T. Sin, R. Rahmat, W. A. W. A. Rahman; *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, **2012**, Elsevier Inc., 11-52
- <sup>30</sup> M. Jamshidian, E. A. Tehrany, M. Imran, M. Jacquot. S. Desobry; *Comperen. rev. Food Sci Food Saf.*, **2010**, *9*, 552-571
- <sup>31</sup> E. Rudnik; *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, **2012**, Elsevier Inc., 213-255
- <sup>32</sup> R.-J. Müller; *Biopolymers Online*, **2005**, Wiley-VCH Verlag GmbH, 365-388
- <sup>33</sup> N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre, J.-E. Nava-Saucedo; *Chemoshere*; **2008**, *73*, 429-442
- <sup>34</sup> M. van der Zee; *Handbook of Biodegradable Polymers, Synthesis, Characterisation and Applications*, **2011**, Wiley-VCH Verlag, 263-281
- <sup>35</sup> J. Davis; *Nature*, **1996**, *383*, 219-220
- <sup>36</sup> A. P. Johnson; *J. Antimicrob. Chemother.*, **2011**, *66*, iv43-iv48
- <sup>37</sup> E.-R. Kenawy, S. D. Worley, R. Broughton; *Biomacromol.*, **2007**, *8*, 1359-1384
- <sup>38</sup> C. Krumm, J. C. Tiller; *Nachrichten aus der Chemie*, **2014**, *62*, 984-987



- 
- <sup>39</sup> C. Zollfrank, K. Gutbrod, P. Wechsler, J. P. Guggenbichler; *Mater. Sci. Eng. C*, **2012**, *32*, 47-54
- <sup>40</sup> C. Krumm, S. Harmuth, M. Hijazi, B. Neugebauer, A.-L. Kampmann, H. Geltenpoth, A. Sickmann, J. C. Tiller; *Angew. Chemie*, **2014**, *126*, 3908-3913
- <sup>41</sup> X. Ren, L. Kou, H. B. Kocer, C. Zhu, S. D. Worley, R. M. Broughton, T. S. Huang; *Colloids Surfa. A*, **2008**, *317*, 711-716
- <sup>42</sup> V. Nadtochenko, N. Denisov, O. Sarkisov, D. Gumy, C. Pulgarin, J. Kiwi; *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, **2006**, *181*, 401-407
- <sup>43</sup> S. Noimark, C. W. Dunnill, I. P. Parkin; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, *65*, 570-580
- <sup>44</sup> J. Vartiainen, M. Rättö, S. Paulussen; *Packag. Technol. Sci.*, **2005**, *18*, 243-251
- <sup>45</sup> E.-R. Kenawy, S. D. Worley, R. Broughton; *Biomacromol.*, **2007**, *8*, 1359-1384
- <sup>46</sup> A. M. Bieser, J. C. Tiller; *Macromol. Biosci.*, **2011**, *11*, 526-534
- <sup>47</sup> H. Cypionka; *Grundlagen der Mikrobiologie*, 4. Auflage, **2010**, Springer-Verlag, 15
- <sup>48</sup> H. Hahn, D. Falke, S. H. E. Kaufmann, U. Ullmann; 2005, Springer-Verlag, 172
- <sup>49</sup> T. Ikeda, H. Yamaguchi, S. Tazuke; *Antimicrobio. Agents Chemo.*, **1984**, *26*, 139-144
- <sup>50</sup> H. Witte, W. Seeliger; *Liebigs. Ann. Chem.*, **1974**, *6*, 996-1009
- <sup>51</sup> M. Beck, P. Birnbach, U. Eicken, H. Fischer, W. E. Fristad, B. Hase, H.-J. Krause; *Angew. Makromol. Chem.*, **1994**, *223*, 217-233

- 
- <sup>52</sup> F. Wiesbrock, R. Hoogenboom, M. A. M. Leenen, M. A. R. Meier, U. S. Schubert; *Macromol.*, **2005**, *38*, 5025-5034
- <sup>53</sup> M. L. Lambermont-Thijs, F. S. van der Woerd, A. Baumgaertl, L. Bonami, F. E. Du Prez, U. S. Schubert, R. Hoogenboom; *Macromol.*, **2010**, *43*, 927-933
- <sup>54</sup> L. Tauhardt, K. Kempe, K. Knop, E. Altuntaş, M. Jäger, S. Schubert, D. Fischer, U. S. Schubert; *Macromol. Chem. Phys.*, **2011**, *212*, 1918-1924
- <sup>55</sup> V. R. de la Rosa, E. Bauwens, B. D. Monnery, B. G. De Geest, R. Hoogenboom; *Polym Chem.*, **2014**, *5*, 4957-4964
- <sup>56</sup> H. P. C. Van Kuringen, J. Lenoir, E. Adriaens, J. Bender, B. G. De Geest, R. Hoogenboom; *Macromol. Biosci.*, **2012**, *12*, 114-1123
- <sup>57</sup> Saechtling; *Kunststoff-Taschenbuch*, 28. Ausgabe von K. Oberbach, **2001**, 30-40
- <sup>58</sup> N. Kawabata, M. Nishiguchi; *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, *54*, 2532-2535
- <sup>59</sup> C. J. Waschinski, V. Herdes, F. Schueler, J. C. Tiller; *Macromol. Biosci.*, **2005**, *5*, 149-156
- <sup>60</sup> J. L. Grace, J. X. Huang, S.-E. Cheah, N. P. Truong, M. A. Cooper, J. Li, T. P. Davis, J. F. Quinn, T. Velkov, M. R. Whittaker; *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 15469-15477
- <sup>61</sup> Y. Kumagai, Y. Kanetsawa, Y. Doi; *Makromol. Chem.*, **1992**, *193*, 53-57
- <sup>62</sup> Saechtling; *Kunststoff-Taschenbuch*, 28. Ausgabe von K. Oberbach, **2001**, 48-49