

Innovative Verfahren
zur enzymatischen Abnahme von schädigenden
Caseinüberzügen auf Wandmalereien

vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

genehmigte Dissertation

von
Dipl.-Chem. Sascha Beutel
geboren am 30. Mai 1971 in der Freien und Hansestadt Hamburg

Hannover, 2000

Hauptreferent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl

Tag der Promotion: 20.11.2000

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Dezember 2000

Sascha Beutel

Abstract

Beutel, Sascha

Der fortschreitende Verfall kulturell und historisch bedeutsamer Wandmalereien führt zu immer neuen Versuchen der Restaurierung und Konservierung dieser Objekte. Vielfach müssen auch Schäden, die durch falsche restauratorische Maßnahmen entstanden sind, behoben werden. So beschreibt die vorliegende Arbeit eine neue, schonende Methode zur kontrollierten Abnahme schädigender Caseinüberzüge, die im Rahmen einer Konservierungsmaßnahme Mitte letzten Jahrhunderts auf die Wandmalereien aufgetragen wurden. Aufgrund ihrer klimaabhängigen, reversiblen Quellung und Trocknung setzen diese Caseinschichten die Wandmaleroberfläche unter starke Spannung, was letztlich zu ihrem Abplatzen führt, wobei die pigmenttragende Schicht der Wandmalerei mitgerissen wird. In der entwickelten Applikation kommen für den Restaurator gesundheitlich unbedenkliche Enzyme zur Anwendung, die in immobilisierter Form über ein Membrankissen mit der Wandmaleroberfläche in Kontakt gebracht werden, wo sie die Hydrolyse der Caseine katalysieren. Die Abbauprodukte der Caseinzerersetzung werden dann mit einem Pufferträgerstrom von der Oberfläche weggeführt, damit sie den vielfach die Oberflächen besiedelnden Mikroorganismen nicht als Nahrungsgrundlage dienen können. Eine geeignete nicht invasive Oberflächenanalytik, die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, wurde zur Kontrolle des Abbaus eingesetzt. So wurde die Oberflächenbeladung anhand der caseingebundenen, fluorophoren Tryptophanreste quantifiziert. Die mechanistische Beschreibung der Abbaureaktion mit der optimierten Anwendung gelingt mit Hilfe verschiedener RP-HPLC-Analysenmethoden, die durch Isolierung ausgewählter Abbaufragmente auch eine Charakterisierung mit Maldi-MS ermöglichen. Weiterhin werden Untersuchungen zu den Schichtdicken der Überzüge, zu Beeinflussungen der Oberflächenpigmentierungen, sowie zur Anwendung unter komplexen Bedingungen, wie bei Salzausblühungen oder mikrobieller Besiedelung vorgestellt, bevor die Methode letztlich an ausgesuchten Wandmalereien getestet wird.

Schlagworte:

Enzymatischer Caseinabbau,

Wandmalereirestauration,

2D-Fluoreszenzspektroskopie auf Oberflächen

Abstract

Beutel, Sascha

The continuous damage of important cultural and historical wallpaintings led to more and more attempts in the restoration and the conservation of these objects. Often damages caused by earlier restoration attempts must be repaired. This PhD-thesis shows a novel, gentle method for a controlled enzymatic removal of damaging casein layers on the wallpaintings' surface. The casein layers were painted on the wallpaintings in the fifties of the last century as a protective layer and cause now great damages because of their climate dependent swelling and shrinkling. This effects cause at last a flaking off together with the pigment layers. The method developed uses enzymes with no adverse health effects for the operator; the enzymes are immobilized on a membrane and fixed on a membrane cushion contacting the wallpaintings' surface. The catalytical hydrolysis of the casein molecules is carried out in an aqueous carbonate buffer medium, which is pumped through the cushion and is moistening the surface. The buffer stream removes the fragments of the degradation process so they can not act as a nutritiant for micro-organisms growing on the wallpaintings. As a suitable, non invasive analytical device the 2D-fluorescence spectroscopy was used, monitoring the casein amount on the surface by the quantitative internal fluorescence of tryptophan residues bound in the casein. Further mechanistic analysis of the catalytical digestion of casein was carried out with different RP-HPLC methods, which also enabled the isolation of several digestion fragments for a detailed characterisation with Maldi-MS. Investigations concerning the thickness of the casein layers or the influence of the enzymatic method on typical pigments for wallpaintings were made and the method was tested under complex surface conditions like salt cristallisation or high microbial population. This newly developed method was tested for controlled enzymatic removal of damaging casein layers on several historical wallpaintings carefully chosen by the Lower Saxony curators of monuments.

Keywords:

enzymatic removal of casein layers,

restoration of wallpaintings,

2D-fluorescencespectroscopy on surfaces

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von August 1997 bis Juli 2000 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Für die interessante Themenstellung, für optimale Arbeitsmöglichkeiten, zahllose Hilfestellungen und uneingeschränkte Unterstützung möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Karl Schügerl möchte ich für die Übernahme des Korreferates danken.

Für die langjährige kompetente Betreuung meiner Arbeiten schon seit meiner Schwerpunktarbeit 1996, für kreative Anregungen und für die Projektkoordination im Caseinprojekt möchte ich weiterhin Herrn Dr. Roland Ulber herzlich danken.

Für anregende und produktive Zusammenarbeit möchte ich den Restauratoren des Niedersächsischen Landesamtes für Denkmalpflege, insbesondere Frau Kerstin Klein und Herrn Dr. Peter Königfeld danken, sowie Frau Dr. Karin Petersen und Frau Gabi Knobbe von der AG Geomikrobiologie ICBM, Universität Oldenburg. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Ing. Helmut Berling vom Institut für Gebäude- und Solartechnik, TU Braunschweig, Herrn Rüdiger Lilge, Dokumentar, sowie Herrn Tobias Trapp, Fotograf für die uneingeschränkte Kooperation danken.

Für die Unterstützung bei verschiedenen Analysen möchte ich Herrn Dr. Feretti, Institut für Halbleitertechnologie und Werkstoffe der Elektrotechnik, Universität Hannover, und dem Institut für Anorganische Chemie, Universität Hannover herzlich danken. Den Angestellten der Kirche St. Alexander, Wildeshausen und des Klosters Wienhausen möchte ich für die wiederholte, tatkräftige Hilfe beim Transport des schweren Messgerätes danken; ohne sie wären viele Untersuchungen an den Wandmalereiobjekten nicht möglich gewesen.

Besonderer Dank gilt auch allen denjenigen, die durch ihre wissenschaftlichen Untersuchungen im Rahmen von Schwerpunkt- und Diplomarbeiten zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben: Marc Laroche, Yvonne Münstermann, Frank Mönkeberg, Volker Steinmann und Martin Kaduszkiewicz. Außerdem sei dem ganzen MCM-Labor für das tolle Arbeitsklima gedankt, und hier insbesondere Herrn Florian

Irtel für kurzweilige Kaffeepausen, anregende Diskussionen und seine freundschaftliche Verbundenheit. Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Martina Weiß, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand, sowie bei der Mechanikwerkstatt des TCI und insbesondere Herrn Wilhelm Behnsen, ohne deren unermüdlichen, mitunter staubigen Einsatz viele Untersuchungen nicht möglich gewesen wären. Der gesamten aktuellen und auch der Ex-TCI-Belegschaft bin ich für lockeres und angenehmes Arbeiten, sowie für unzählige Anregungen und fachliche Hilfestellungen zu Dank verpflichtet.

Meinen Freunden Stefan und Denise, Guido und Heike, Kris und Petra, Udo, Schändi, Kai und Corinna und allen Anderen möchte ich für die vielfältigen Zerstreuungen, angenehmen Abwechslungen und netten Abende während meines gesamten Studiums danken: Ich werde diese Zeit niemals vergessen.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich dafür, dass sie immer für mich da waren und mich vorbehaltlos unterstützt haben: Endlich ist es vollbracht und es gibt zum ersten Mal einen Doktor in der Familie. Meiner Schwiegerfamilie, der ganzen Schilling'schen Schar sei ebenso gedankt: Ihr habt mich immer wie euer eigenes Kind behandelt, auch wenn ich eure Tochter raubte.

Meiner geliebten Frau Maria gilt der größte Dank: Du bist so weite Wege mit mir gegangen und hast immer zu mir gestanden, bis zum heutigen Tag. Du bist der größte Reichtum meines Lebens.

Seit einiger Zeit gibt es da noch jemand anderes, dem ich einfach dafür danken möchte, dass er da ist, obwohl ich selbst nicht ganz unschuldig daran bin: meinem Sohn Tim-Jonas. Ich kann mir gar kein Leben mehr ohne dich vorstellen, so sehr hast du alles Bisherige auf den Kopf gestellt. Es ist so gut, dass es dich gibt. Danken möchte ich auch dafür, dass uns gerade ein weiteres Kindlein geboren wurde, unsere Tochter Anna-Marie, die alles was passiert ist, im Bauch miterlebt hat und jetzt die Welt mit ihren strahlenden Augen entdeckt.

Für Tim-Jonas und Anna-Marie

„Die Natur hat uns das Schachbrett gegeben, aus dem wir nicht hinaus
wirken können noch wollen, sie hat uns die Steine geschnitzt, deren
Wert, Bewegung und Vermögen nach und nach bekannt werden:
nun ist es an uns, Züge zu tun (...).“

Johann Wolfgang von Goethe (1749 – 1832)

Inhaltsverzeichnis

Abstracts.....	I
Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
2. Casein.....	4
2.1 Allgemeines.....	4
2.2 Verwendung von Casein.....	5
2.3 Casein in Wandmalerei und Restaurierung.....	6
3. Wandmalereien.....	7
3.1 Maltechniken auf der Wand.....	7
3.2 Objekte.....	7
3.2.1 Objektbeschreibung Wildeshausen.....	8
3.2.1.1 Schadensbild.....	9
3.2.2 Objektbeschreibung Wienhausen.....	10
3.2.2.1 Schadensbild.....	11
4. Enzyme.....	12
4.1 Screening ausgewählter Proteasen.....	12
4.1.1 Bradford-Proteinassay.....	15
4.1.2 Charakterisierung der Alkalase®.....	17
4.1.2.1 EPE-Methode.....	17
4.2 Korrelation mit Gelelektrophorese.....	20
5. Immobilisierung.....	24
5.3.1 Ausgesuchte Trägermaterialien.....	24
5.3.2 Immobilisatscreening.....	26
5.3.3 Charakterisierung der Sartobind Epoxymembran 18706.....	28
6. Membrankissenkonstruktion.....	30
6.1 Anwendungsvorgaben für einen Oberflächeneinsatz.....	30

6.2 Design eines Membrankissens.....	30
7. Prüfkörper.....	33
7.1 Herstellung der Kalkputzprobeplatten.....	33
7.2 Pigment- und Caseinbeschichtung.....	33
7.3 Künstliche Alterung in der Klimakammer.....	35
8. Caseinschichtdickenanalytik.....	37
8.1 Schichtdickenbestimmung.....	37
8.2 Enzymatischer Abbau von Caseinschichten.....	40
9. Charakterisierung der Abbaureaktion mittels RP-HPLC.....	42
9.1 Aminosäureanalytik.....	42
9.2 Peptidanalytik.....	44
9.2.1 Trennfähigkeit der stationären Phase.....	46
9.2.2 Fingerprint des nativen Caseinabbaus.....	47
9.2.3 Abbauprofile ausgesuchter Fragmente.....	48
9.2.4 Abbau mit Immobilisaten.....	51
9.2.5 RP-HPLC im Trägerstromabfluss.....	53
9.2.6 Isolierung einzelner Fragmente.....	55
9.3 Charakterisierung der Fragmente mittels Maldi-MS.....	56
10. Nicht-invasive Oberflächenanalytik.....	60
10.1 Vergleich verschiedener Analysenmethoden.....	60
10.2 2D-Fluoreszenzspektroskopie.....	62
10.2.1 Detektion von Casein.....	62
10.2.2 Transfer zur Messung auf Oberflächen.....	63
10.2.3 Abhängigkeiten der Fluoreszenzaktivität.....	64
10.2.3.1 Einfluss des Oberflächenmaterials.....	65
10.2.3.2 Einfluss der Caseinbeschichtung.....	68
10.2.3.3 Einfluss der Pigmentierung.....	69
10.2.3.4 2D-Fluoreszenzkalibrationen der Prüfkörperober- flächen.....	70
10.2.3.5 Einfluss der Festigersubstanzen.....	72
10.2.4 2D-Fluoreszenz zur Dokumentation von Abbaureaktionen....	74

10.2.4.1 Standardisierte Abbaukurven.....	77
11. Pigmentuntersuchungen.....	84
11.1 Pigmentauswaschverhalten.....	84
11.2 Verfärbungen in Folge des Abbaus.....	85
12. Mikrobiologische Untersuchungen.....	89
12.1 Anwendungsvorgaben bei mikrobieller Oberflächenbesiedelung.....	89
12.2 Mikroorganismen auf Wandmalereien.....	90
12.3 2D-Fluoreszenzanalyse verkeimter Oberflächen.....	90
12.4 Abbauntersuchungen an verkeimten Oberflächen.....	92
12.5 Biozideinsatz während des Abbaus.....	93
13. Salzausblühungen auf Wandmaleroberflächen.....	95
13.1 Untersuchungen an salzbelasteten Prüfkörpern.....	95
14. Anwendung an den Objekten.....	99
14.1 Erfassung des Oberflächenstatus.....	99
14.2 2D-Fluoreszenzuntersuchung der Objekte.....	101
14.2.1 Probleme durch Proteinalterungsreaktionen.....	103
14.3 Abbaureaktionen auf Wandmalereien.....	105
14.3.1 Abbaureaktionen am Wandmalereiobjekt Wienhausen.....	105
14.3.2 Abbaureaktionen am Wandmalereiobjekt Wildeshausen.....	107
15. Diskussion und Ausblick.....	110
16. Anhang.....	115
16.1 Herstellung Kalkputzprobepplatten.....	115
16.2 Sequenzen relevanter Caseine mit Fragmentschnittgrenzen.....	115
16.3 Caseinstandardlösung.....	116
16.4 Bradford-Proteinassay.....	117
16.5 Enzymaktivitätstests der Hersteller.....	118
16.6 EPE-Methode zur Bestimmung der Proteasenaktivität.....	118
16.7 Gelelektrophorese mit dem PhastSystem.....	119
16.7.1 Benötigte Lösungen.....	119

16.7.2 Gelvorbehandlung.....	120
16.7.3 Probenvorbereitung.....	120
16.7.4 Probenaufgabe.....	120
16.7.5 Trennmethode.....	120
16.7.6 CoomassieBlue-Färbung.....	121
16.8 Immobilisierung.....	121
16.9 BCA-Proteinassay.....	122
16.10 RP-HPLC zur Peptidanalytik.....	122
16.10.1 Eluenten.....	122
16.10.2 Gradient.....	122
16.10.3 Reinheit des Eluenten.....	122
16.10.4 Probenvorbereitung.....	123
16.10.5 Kalibration der Grundlinie der Spektren.....	123
16.10.6 Kalibrationsgeraden der kommerziellen Isolate.....	123
16.10.7 Isolierung der Peptidfragmente.....	124
16.11 MALDI-MS.....	124
16.11.1 Probenvorbereitung.....	124
16.11.2 Spektren der Matrixsubstanzen.....	124
16.12 RP-HPLC zur Aminosäureanalytik.....	125
16.12.1 OPA-Reagenz.....	125
16.12.2 Eluenten.....	125
16.12.3 Gradient.....	125
16.12.4 Probenvorbereitung.....	125
16.12.5 Zuordnung der Aminosäuren.....	126
16.13 Geräteparameter des 2D-Fluoreszenzspektroskops.....	126
16.14 Kalibration der Trägerstromflussrate.....	127
16.15 Abkürzungsverzeichnis.....	128
16.16 Geräteverzeichnis.....	128
16.17 Chemikalienverzeichnis.....	129
16.17.1 Enzyme.....	129
16.17.2 Feinchemikalien.....	129
17 Literatur.....	131
Lebenslauf.....	136

1. Einleitung

Die moderne Biotechnologie hält schon heute Einzug in immer mehr Lebensbereiche. Dass sie sogar einen Beitrag zum Erhalt historischer Wandmalereien zu leisten vermag, soll in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, deren Thema die Entwicklung einer enzymatischen Methode zur kontrollierten Abnahme schädigender Caseinüberzüge auf Wandmalereien ist.

Freilegung und Restaurierung historischer Wandmalereien haben seit der Mitte des 19. Jahrhundert zur Rückgewinnung vieler bedeutender Kulturdenkmale geführt. Seit dieser Zeit wurden viele Methoden entwickelt, restaurierte Wandmalereien dauerhaft zu erhalten, um diese für die Kunst- und Kulturgeschichte wichtige Denkmalgattung als historisches und edukatives Kulturgut für spätere Generationen zu konservieren. Doch konnte trotz einer enormen Bandbreite eingesetzter Substanzen, wie Kunststoffen, Wachsen oder organischen Überzügen, bis heute kein idealer und dauerhafter Schutz für diese Kulturgüter gefunden werden. Neue Konservierungsmethoden wurden darüber hinaus oft übereilt und ohne fundiertes Wissen über die Langzeitwirkungen an den Wandmalereien eingesetzt, so dass sich heute vielfach eine Verschlechterung der Wandmalereisituation durch diese Konservierungsmaßnahmen zeigt [1, 2]. Es treten starke Schädigungen durch Verfärbungen, mikrobielle Besiedelung oder Abplatzen der Malschichten auf, die die Sanierung der Wandmalereien erschweren. So müssen objektspezifische Sanierungsstrategien erarbeitet werden, die die durch frühere Konservierungsmaßnahmen hervorgerufenen Veränderungen der Wandmalerei berücksichtigen. Besondere Probleme bereiten den Restauratoren heute Caseinschichten, die zur Fixierung der Wandmalereien aufgetragen wurden [3].

Diese Caseinbeschichtungen wurden in der Mitte des letzten Jahrhunderts in ganz Europa auf Wandmalereien aufgebracht, als Casein als probates Mittel zum Schutz der Wandmalereien galt, da es ein verbreitetes Pigmentbindemittel ist. Heute verursachen gerade diese Caseinschutzüberzüge starke Schäden an der Malsubstanz, da sie die Malschicht vergilben lassen und die Oberflächen der Wandmalerei unter Spannung setzen und aufplatzen lassen, um dann in Schollen mit der Malschicht abzurollen. Darüber hinaus bietet das Protein Casein Bakterien und Pilzen eine optimale Nahrungsgrundlage. So siedeln die Mikroorganismen in dichten Biofilmen, die dann als Schleier über der Wandmalerei liegen [4].

Diese durch falsche restauratorische Maßnahmen verursachten Schäden sind immens und beschleunigen den natürlichen Verfall der Wandmalereien um ein Vielfaches. Daher

ist verständlich, dass schon viele Versuche zur Abnahme dieser Überzüge durchgeführt wurden. Es zeigte sich aber, dass die meisten der Substanzen, mit denen eine Entfernung der Caseinüberzüge erreicht werden kann, toxisch sind. Sie dürfen daher nur unter Einhaltung der Richtlinien für Laboratorien (GUV 16.17) und unter Verwendung geeigneter Schutzkleidung eingesetzt werden - Bedingungen, die an den Wandmalereien nicht einzuhalten sind. Tabelle 1 zeigt die maximalen Arbeitsplatzkonzentrationen (MAK-Werte) für verschiedene, zur Abnahme von Caseinüberzügen geeignete Chemikalien.

Tab.1: MAK-Werte von Chemikalien zur Abnahme von Caseinüberzügen auf Wandmalereien [5]

Substanz	MAK-Wert [ppm]
Ameisensäure	5
Ethanol abs. (96 %)	1000
DMF - Dimethylformamid	10
Morpholin	20
Dichlormethan	100
Trichlorethan	350
Ammoniak	35

Um eine gesundheitliche Gefährdung der Restauratoren zu vermeiden, sollten diese Substanzen daher nicht zur Abnahme der Caseinschichten eingesetzt werden. Weitere für einen Einsatz getestete Substanzen, wie alkalische Gemische, sind zwar gesundheitlich unbedenklich, zeigen aber oft unerwünschte Effekte auf den Salzhaushalt der Wandmalerei, so dass auch sie nicht zu empfehlen sind [6]. Eine bessere Alternative bietet der Einsatz von Enzymen, da sie nicht toxisch sind und insbesondere bei Fixierung an einem geeigneten Träger unbedenklich und kontrollierbar einzusetzen sind.

Der Einsatz von Enzymen wurde schon mehrfach erprobt [7-9], jedoch wurden stets native Enzymlösungen eingesetzt, die nach der Anwendung auf der Oberfläche verblieben, wodurch wiederum ein unberechenbarer Risikofaktor an der Wandmalerei eingebracht wurde. Denn Enzyme sind wie das Casein Proteine und können somit auch als Nährsubstrate für Mikroorganismen dienen. Auch wurden keine Untersuchungen hinsichtlich der Anwendungsparameter Enzymart, Konzentration, Methodik, Abbauverhalten, Abbaumechanismus oder Restbelastung durchgeführt. Das von der Deutsche Bundesstiftung Umwelt (DBU) geförderte Projekt, in dessen Rahmen die vorliegende

Arbeit angefertigt wurde, setzt genau an diesem Punkt an und stellt daher den ersten Versuch dar, den Einsatz von Enzymen zur Entfernung von schädigenden Caseinüberzügen auf Wandmalereien naturwissenschaftlich zu untersuchen, zu bewerten und zu optimieren. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen soll eine Methode entwickelt werden, die eine kontrollierte, effektive und schonende Abnahme dieser Überzüge gewährleistet. Dies kann einerseits durch eine Immobilisierung der Enzymkomponenten erreicht werden, die auf diese Weise leicht wieder von den Oberflächen der Wandmalereien zu entfernen sind und auch den Restaurator nicht gesundheitlich gefährden. Andererseits kann eine geeignete Analytik zur Dokumentation des Abbaus die Reaktionsabläufe anschaulich machen, so dass unerlässliche Erkenntnisse z.B. über die nötige Anwendungsdauer und den Mechanismus der Reaktion erhalten werden. Da für eine gezielte Forschungsarbeit auf diesem Gebiet das Fachwissen verschiedener Fachrichtungen benötigt wird, wurde das Projekt in enger Zusammenarbeit von Denkmalpflegern, Geomikrobiologen und Technischen Chemikern durchgeführt. Nur diese interdisziplinäre Kooperation gewährleistet die Berücksichtigung aller relevanten Aspekte und ermöglicht eine umfassende Dokumentation der Problematik. Als Industriepartner engagierten sich die Firmen Novo Nordisk, Dänemark, Sartorius AG, Göttingen, und Eppendorf, Nethler & Hinz, Hamburg in diesem Projekt und stellten Material in großem Umfang zur Verfügung.

Entsprechend dem notwendigen systematischen Vorgehen beim Aufbau einer enzymatischen Anwendung zur kontrollierten Abnahme der schädigenden Caseinüberzüge auf Wandmalereien ist die Arbeit wie folgt in verschiedene Bereiche gegliedert:

- Allgemeine Informationen zu Casein und dessen Anwendung in der Wandmalerei, sowie zu Wandmaltechniken und den für Anwendungsversuche ausgewählten Wandmalereiobjekten,
- Entwicklung der enzymatischen Abnahmemethode: Enzymauswahl – Immobilisierung – Instrumentenentwicklung,
- Etablierung verschiedener Abbauanalytiken zur qualitativen und quantitativen Dokumentation der Abbaureaktionen, sowie Optimierung der Oberflächenanwendung der enzymatischen Abnahmemethode anhand der ermittelten Daten,
- Test der etablierten Anwendung unter komplexen und realen Bedingungen, wie auf Salzausblühungen, auf mikrobieller Besiedelung und an den Wandmalereiobjekten,
- Zusammenfassung der Ergebnisse, Ausblick und Empfehlung.

2. Casein

2.1 Allgemeines

Casein ist ein Phosphoproteingemisch mit einer durchschnittlichen molaren Masse von $M = 24492,44$ Da und stellt den wichtigsten Eiweißbestandteil der Milch dar (76 – 86 % (v/v)). Durch Ansäuern der Milch auf pH 4,6 bei $T = 20^\circ \text{C}$ werden die Caseine aus der Milch ausgefällt, in der über 96 % des Caseins in kolloidaler Form suspendiert sind. So wird Casein als ein weiß-gelblicher hygroskopischer Feststoff erhalten, der im Alkalischen löslich ist [10].

Die kolloidale Form des Caseins in der Milch besteht aus selbstassoziierten Micellen, in der die polaren Domänen dem wässrigen Medium zugewandt sind, während die hydrophoben Bereiche im Inneren liegen. Diese Micellen haben einen durchschnittlichen Radius von $r = 70$ nm und bestimmen maßgeblich die optischen Eigenschaften der Milch; so verursachen sie deren weiße Farbe. Die treibende Kraft der Selbstassoziation liegt in den besonderen Strukturmerkmalen des Caseins begründet. Es verfügt über ausgedehnte hydrophobe Bereiche, da die polaren Aminosäuren, wie das phosphatbindende Serin in eng begrenzten Domänen lokalisiert sind (Aminosäuresequenzen der Caseine s. Anhang 16.2). Der hohe Prolingehalt im Casein verhindert darüber hinaus den Aufbau einer komplexen räumlichen Struktur, wie auch das Fehlen von Thiolgruppen und Disulfidbrücken, den typischen Strukturelementen globulärer Proteine. Aufgrund der starken Polaritätsunterschiede zwischen verschiedenen Domänen haben Caseine ein großes Bestreben ihre hydrophoben Bereiche gegen das wässrige Medium abzuschirmen. Initiiert wird die Micellenbildung durch Ca^{2+} -Kationen, die die Phosphoserinreste der Caseine verbrücken und so die Selbstassoziation auslösen. Neben Calcium und Phosphat werden auch Begleitkationen wie Magnesium und Citrat gefunden, die aber nicht an der Micellenbildung beteiligt sind [11, 12].

Die Caseine liegen in vier Hauptstrukturvarianten vor, α_{S1} -, α_{S2} -, β - und κ -Casein, die in unterschiedlichen Anteilen in der Milch enthalten sind. Die Gehalte variieren nicht nur in Abhängigkeit von der Art des Milchlieferanten (Mensch, Kuh, Ziege, etc.), sondern auch in Abhängigkeit der Herkunft und des örtlichen Nahrungsmittelangebotes. Tabelle 2 zeigt die wesentlichen Merkmale der vier Hauptcaseinvarianten. Es existiert noch eine Vielzahl von Unterfraktionen und genetischen Varianten, die z.B. aufgrund des Phosphorylierungsgrades unterschieden werden, die aber wegen ihres geringen Gehaltes nicht berücksichtigt werden. α_{S2} -Casein ist mit einem hohen Phosphatanteil von bis zu

13 seryl- und threonylgebundenen Phosphatgruppen das hydrophilste Casein, während β -Casein das hydrophobste Casein darstellt, mit nur einem kleinen N-terminalen Sequenzbereiches, in dem alle 5 Phosphoserinreste gebunden sind.

Tab.2: Charakteristische Daten der verschiedenen Caseine [13]

Casein	α_{S1}	α_{S2}	β	κ
Anzahl Aminosäuren (AS)	214	222	224	190
Molare Masse M [Da]	24529	26019	25107	21269
Anteil in bovinem Casein [%]	43 - 45	10 - 12	28 - 37	10 - 15
Isoelektrischer Punkt pI	4,1	4,1	4,5	3,7

Auffällig ist auch der hohe Anteil von 35 Prolinresten im β -Casein, die aufgrund ihrer Ringstruktur die Proteinfaltung erheblich behindern. κ -Casein ist zwar die kleinste Caseinvariante, nimmt aber eine Schlüsselposition ein, da es aufgrund seiner hydrophilen Kohlenhydratreste Caseinmicellen gegen Ausfällung stabilisieren kann und auch durch seine Fähigkeit zur Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken die Selbstassoziation der Caseine fördert.

2.2 Verwendung von Casein [14]

Casein ist seit dem Altertum bekannt und geschätzt, da seine Vielseitigkeit verschiedenste Einsatzmöglichkeiten eröffnet. So ist reines Casein nicht nur in der Nahrungsmittelindustrie als Calcium-, Phosphor- und Eiweißlieferant vor allem in Säuglings-, Sportler- und Diätahrung verbreitet, sondern auch in der Medizin, wo es z.B. als Nährpräparat für Diabetiker eingesetzt wird. Weitere Verbreitung findet Casein auch in der Holz- und Papierindustrie, wo es z.B. als Klebemittel eingesetzt wird, und in der Kunststoffindustrie, in der formaldehyd-gehärtetes Casein als Kunststoff Verwendung findet. Auch die Malerei kennt seit altersher Casein als Bindemittel für Pigmente und Grundierungen.

2.3 Casein in Wandmalerei und Restaurierung

Die Verwendung von Casein in der Wandmalerei, vor allem als Pigmentbindemittel und Zuschlag von Grundierungen, lässt sich bis zu Jahrtausende alten hebräischen Schriften zurück verfolgen, in denen die Bauern aufgefordert werden, „(...) den Quarg für den Herbstbesuch des Malers aufzuheben (...)“ [15]. Heute ist Casein als natürlicher Leim und Aquarellbinder gebräuchlich und wird wegen seiner hervorragenden Haftkraft geschätzt. Die langen Traditionen zur Verwendung von Casein in der Wandmalerei machen nachvollziehbar, dass Casein den Restauratoren Mitte des letzten Jahrhunderts als Konservierungsmittel der Wahl erschien [16]. So fanden im europäischen Raum vor allem mit Ammonium- und Calciumcarbonat aufgeschlossene Caseine Verwendung und wurden als transparente Schutzbeschichtung auf die Wandmalereien aufgetragen. Positiver Nebeneffekt dieser Caseinschichten war ein Glanzeffekt, der den alten Malereien vielerorts eine neue Leuchtkraft verlieh. Da Casein hygroskopisch ist, neigt es jedoch klimabedingt zur reversiblen Aufnahme von Wasser, wodurch es in seiner Struktur immer wieder aufquillt und eintrocknet. Dieses dynamische Verhalten übt einen starken Druck aus, der die sich spannende Caseinschicht zum Aufplatzen bringt, wobei die unterliegende, pigmenttragende Malschicht mitgerissen wird. Da Casein darüber hinaus als Nährsubstrat für Mikroorganismen dienen kann, sind die durch die Caseinschichten verursachten Schadensbilder immens. Trotzdem wird Casein auch heute noch von einigen Restauratoren eingesetzt, die die positiven Auswirkungen höher bewerten, als die durch das Casein verursachten Schäden.

3. Wandmalereien [17]

Wandmalereien gehören zu den ältesten bildlichen Darstellungen. In jeder Epoche wurden Wandflächen bemalt, wobei der große Vorteil der Wandmalerei die sehr lange Haltbarkeit der Malereien ist. Die ältesten bekannten Wandmalereien sind die Höhlenmalereien der Steinzeit, die schon Tausende von Jahren überdauert haben.

3.1 Maltechniken auf der Wand

Es gibt verschiedenste Techniken, um Wandmalereien herzustellen, z.B. Fresko-, Kalk- oder Seccomalerei und viele mehr:

- Für ein Fresco buono werden die Pigmente in Wasser gelöst, mit geringen proteinhaltigen Zusätzen, und dann auf dem frischen, allerdings bereits druckfesten Kalkputz vermalt. Die Pigmente werden beim Abbindeprozeß des Putzes, bei dem Wasser entweicht und Kohlensäure aus der Luft aufgenommen wird, durch das entstehende Calciumcarbonat gebunden.
- Bei der Herstellung einer Kalkmalerei wird der gleiche Abbindeprozeß wie bei einem Fresco buono genutzt. Allerdings werden die in Wasser oder Kalksinterwasser angesetzten Pigmente direkt auf der frisch aufgetragenen Kalkschicht vermalt.
- Unter Seccomalerei sind alle anderen Maltechniken zu verstehen, bei denen die Pigmente mit organischen Bindemitteln wie Leim, Casein, Öl, Harz usw. gebunden werden.

Die Beständigkeit der Wandmalereien beruht also vor allem auf der Tatsache, dass die Pigmente vor oder während dem Abbindeprozeß des Kalkputzes aufgemalt werden und so in der Putzschicht mitgebunden werden.

3.2 Objekte

Die zu entwickelnde Applikation zum enzymatischen Caseinabbau auf Wandmaleroberflächen muss letztlich auch unter realen Bedingungen getestet werden. Daher wurden zwei Wandmalereiobjekte zur Untersuchung ausgewählt. Die Auswahlkriterien waren hierbei:

1. die nachgewiesene Beschichtung der Wandmalerei mit Casein,
2. das allgemeine Schadensbild der Wandmalerei und
3. die geographische Lage des Wandmalereiobjektes (Niedersachsen).

Anhand dieser Vorgaben wurden vom Niedersächsischen Landesamt für Denkmalpflege (NLD) die Wandmalereien im Kapitelsaal des ehemaligen Remters der Kirche St. Alexander in Wildeshausen und die Ausmalungen der Allerheiligenkapelle im Kloster Wienhausen als Testobjekte ausgewählt. Bei beiden Wandmalereien handelt es sich um freskal gebundene Kalkmalereien mit Seccopartien.

3.2.1 Objektbeschreibung Wildeshausen [18, 19]

Die erste ausgewählte Malerei hat sich im Kapitelsaal der Stiftskirche St. Alexander in Wildeshausen erhalten, einem mit Bandrippen gewölbten Raum aus dem 13. Jahrhundert. Die Kalkmalereien zeigen in einer jüngeren Ausmalung einen Zyklus von gerahmten Bildern über das Leben Jesu Christi, der vermutlich von einer westfälischen Werkstatt zu Beginn des 15. Jahrhunderts geschaffen wurde.



Abb. 1: Frontalansicht der Westwand, Kapitelsaal St. Alexander Wildeshausen (Fotos T. Trapp), große Aufnahme: Tageslicht, kleine Aufnahme: UV-Bestrahlung

In einer älteren Schicht sind Reste einer Ausmalung der Legende der "Falkenjagd - Die Begegnung der Lebenden und der Toten" aus der Zeit um 1300 erhalten. Abbildung 1 zeigt einen Blick auf die Westwand, wo der großflächige Bilderzyklus sehr gut erhalten

ist und auch die freigelegten Teile der älteren Ausmalung zu sehen sind. Direkt über der Tür im Bild sind die drei Edelleute zu Pferde auf der Falkenjagd zu erkennen. Die Wandmalereien wurden 1892 teilweise aufgedeckt, nach 1953 vollständig freigelegt und aufwendig restauriert. Zur Putzfestigung und Oberflächenfixierung wurde Kalkcasein verwendet. Die kleine Aufnahme in Abbildung 1 zeigt denselben Wandmalereiausschnitt wie die große Aufnahme unter UV-Bestrahlung. Unter diesen Bedingungen leuchtet die Caseinbeschichtung aufgrund seiner UV-Aktivität und so lässt sich die intensive und großflächige Caseinbeschichtung an der Wandmalerei qualitativ visualisieren.

3.2.1.1 *Schadensbild*

Die heute als Folge dieser Konservierungsmaßnahme zu beobachtenden Schadensbilder am Wandmalereiobjekt sind:

1. Vergilbung der Malschicht(s. Abb. 2 A),
2. Weißschleier durch mikrobiellen Bewuchs (s. Abb. 2 B),
3. abrollende und abreißende Casein- und Farbschichten (s. Abb. 2 A + B).



A

B

Abb. 2: A: Nahaufnahme einer Kalkweißschicht mit Vergilbung und aufstehenden Farbschichten (Foto T. Trapp)

B: Nahaufnahme einer Eisenoxidrot-Bordüre mit mikrobiellem Weißschleier und aufstehenden Farbschichten (Foto T. Trapp)

Die durch die Caseinbeschichtung verursachten Schäden sind vielfältig und bedrohen die originale Malereisubstanz stark. Die Schäden können differenziert werden in direkte Schäden, die wie das Abreißen der Malschichten direkt von der Caseinschicht ausgelöst werden und indirekte Schäden, wie die Förderung des mikrobiellen Bewuchses durch die Caseinschicht. Neben diesen Schäden existieren noch weitere Wandmalereischäden, die nicht in Zusammenhang mit der Caseinbeschichtung stehen, wie z.B. die Ausblühung

anorganischer Salze auf den Oberflächen, die aber Einfluss auf eine enzymatische Abnahme der Caseinschichten nehmen können.

3.2.2 Objektbeschreibung Wienhausen [20, 21]

Die zweite Malerei befindet sich in der Allerheiligenkapelle im Kloster Wienhausen bei Celle. Um 1300 als Kalkmalerei ausgeführt, wurde sie im 15. Jahrhundert neu ausgemalt. Um diese Neugestaltung ausführen zu können und optische Beeinträchtigungen durch die darunterliegende Malerei auszuschließen, wurde die ältere Schicht mit einer leimgebundenen Kreide vollständig abgedeckt.



Abb. 3: Ansicht des nördlichen Deckengewölbes, Allerheiligenkapelle, Kloster Wienhausen (Foto T. Trapp)

Die jüngere Malerei enthielt das gleiche Bindemittel wie diese Kreideschicht. Abbildung 3 zeigt die Aufsicht auf das nördliche Deckengewölbe, auf dem die Ausmalungen besonders gut erhalten sind. Auffällig ist die häufige Verwendung eines grünlichen Pigmentes, bei dem es sich vermutlich um Paratacamit, beziehungsweise um Zersetzungsprodukte dieses Pigmentes handelt [17]. Aufgrund dieses Befundes wurde das Pigment Paratacamit (s. Tab. 5, Kap. 7) für die Abbauuntersuchungen auf pigmentierten

Oberflächen ausgewählt, da es als instabiles Pigment eine Anwendung unter erschwerten Bedingungen ermöglicht. Unmittelbar nach einer ersten Restaurierung der Ausmalungen in der Allerheiligenkapelle 1952, bei der eine Fixierung mit einem unbekanntem wachshaltigen Konservierungsmittel durchgeführt worden war, traten erneute Schäden auf. Daher wurden die Wandmalereien mit Kalkcasein nachgefestigt. Als Folge dieser letzten Konservierungsmaßnahme zeigt sich heute eine starke Schädigung der Malsubstanz an dieser Wandmalerei.

3.2.2.1 Schadensbild

Das Schadensbild ist ähnlich vielfältig, wie am Objekt Wienhausen. Neben großflächigen Grauschleiern durch aufliegende Biofilme, sind starke Schäden durch abrollende Farbschichten zu sehen (s. Abb. 4).



Abb. 4: Nahaufnahme der Wandmaleroberfläche mit aufstehenden Malschichten und Grauschleiern durch mikrobielle Besiedelung (Foto T. Trapp)

Weiterhin zeigen sich Blauverfärbungen des Grünpigmentes und weiße Gipsschleier durch Salzausblühungen. Die Schädigungen sind soweit fortgeschritten, dass sich an den stärker geschädigten Wänden der Allerheiligenkapelle kaum noch Details der Ausmalung erkennen lassen.

4. Enzyme

Enzyme sind die katalytisch aktiven Biomoleküle, die die vielfältigen Reaktionsabläufe in Organismen unter milden physiologischen Bedingungen ermöglichen. Sie sind in der Regel Proteine mit Molekulargewichten von $M = 10 - 100$ KDa, Ausnahmen bilden wenige katalytisch aktive mRNA-Einheiten. Die Enzyme tragen ein aktives Zentrum und katalysieren an diesem je nach Art spezifische Reaktionsabläufe, z.B. Oxidationen und Reduktionen (Oxidasen, Reduktasen), Substitutionen (Transferasen), Additionen und Eliminierungen (Lyasen), Isomerisierungen (Isomerasen), Synthesen (Synthasen) oder Hydrolysen (Hydrolasen) [22].

4.1 Screening ausgewählter Proteasen

Die Zersetzung eines Proteins, wie Casein, erfordert die hydrolytische Spaltung der die Aminosäuren verknüpfenden Peptidbindung, also den Einsatz von Hydrolasen, genauer Peptidhydrolasen. Peptidhydrolasen oder Proteasen können aufgrund verschiedener Aspekte ihrer Wirkmechanismen kategorisiert werden [23]:

1. Unterscheidung des Angriffsortes: Exo- / Endoproteasen

Exoproteasen greifen Substratmoleküle immer terminal an, wobei eine weitere Differenzierung in bezug auf einen Angriff vom C- bzw. N- terminalen Ende her erfolgen kann.

Endoproteasen greifen Substratmoleküle an internen Peptidbindungen an und erzeugen so spezifische Peptidverteilungen im Produktgemisch (Fingerprints). Endoproteasen eignen sich für eine Totalhydrolyse wie den Caseinabbau besser, da sie weniger selektiv und somit schneller als Exoproteasen reagieren.

2. Unterscheidung des Spaltmechanismus: Serin-, Cystein-, Aspartat-, Metalloproteasen

Die Differenz im Spaltmechanismus wird durch die Anordnung der Aminosäuren am aktiven Zentrum bedingt. Namensgebend ist der Aminosäurerest, der die Schlüsselposition im Katalysemechanismus einnimmt.

3. Unterscheidung aufgrund der Herkunft: Säuger-, Bakterienproteasen

Die Klassen der Serin- und Metalloproteasen werden in je zwei Herkunftsfamilien unterschieden, deren aktive Zentren sich zwar gleichen, deren dreidimensionale Struktur aber differiert.

Vorversuche ergaben, dass bei den Untersuchungen der Abbaureaktion von Casein eine Beschränkung auf die Klasse der Serinproteasen erfolgen kann, da nur diese signifikante Abbauresultate erzielen. Serinproteasen sind ausnahmslos Endoproteasen. Ihre Aktivität beruht auf einer katalytischen Triade im Reaktionszentrum, bestehend aus Asp, Ser und His (Abkürzungsschlüssel Aminosäuren s. Anhang 16.12.5). Die aus Säugetieren isolierten Serinproteasen (z.B. Elastase, Trypsin) tragen das aktive Zentrum in Position Asp¹⁰², Ser¹⁹⁵ und His⁵⁷. In aus Bakterien isolierten Serinproteasen (z.B. Subtilisin, Esperase) ist das aktive Zentrum hingegen in Position Asp³², Ser²²¹ und His⁶⁴ lokalisiert. Der Mechanismus der katalytischen Hydrolyse der Peptidbindung erfolgt wie in Abbildung 5 dargestellt in 4 Schritten.

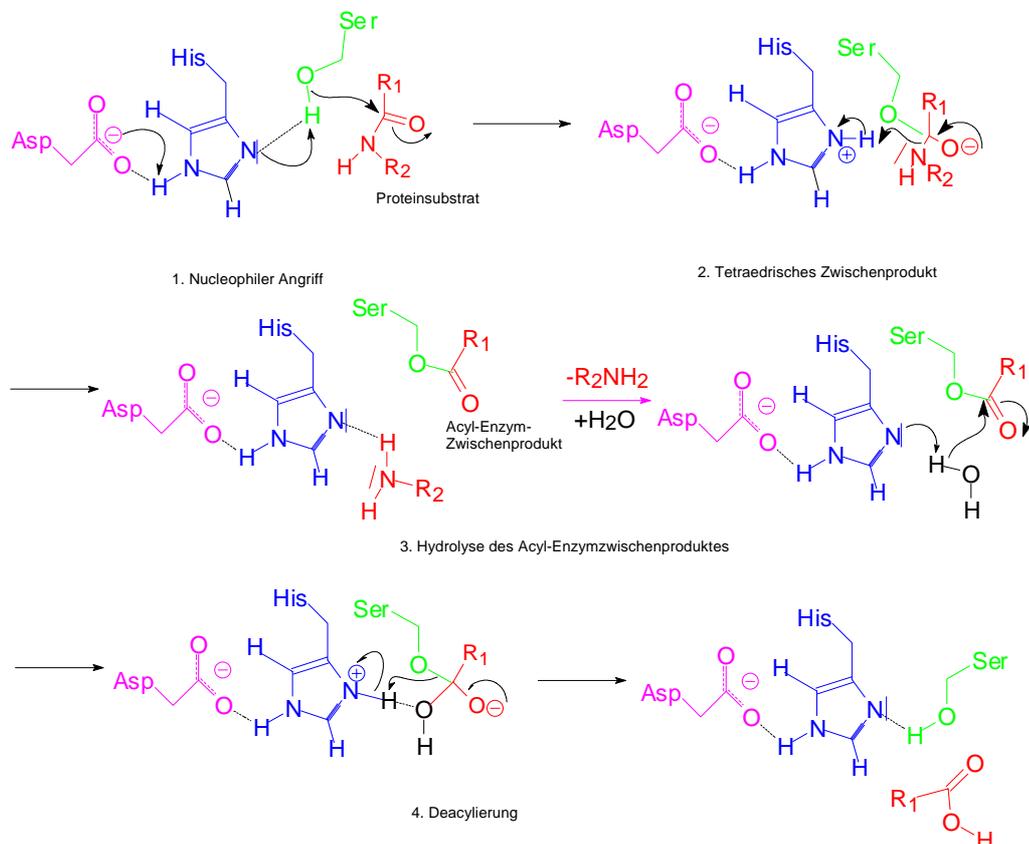


Abb. 5: Reaktionsmechanismus der Serinproteasen, die katalytische Triade [24]

Die Selektivität des aktiven Zentrums wird maßgeblich durch die räumliche Struktur der direkten molekularen Umgebung bestimmt. So zeigen die aus Bakterien isolierten Serinproteasen nur eine geringe Selektivität zu Gunsten hydrophober Aminosäuren; sie neigen zur unspezifischen Totalhydrolyse des Proteinsubstrates. Sie finden daher vor allem in der Reinigungsmittelindustrie als proteinabbauende Zusätze eine breitere

Verwendung. Die Serinproteasen, die aus Säugetieren isoliert wurden, hingegen verfügen über sehr ausgeprägte Selektivitäten, wie in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Verwendete Enzyme und Zubereitungen [25-34]

Enzym / Zubereitung	Bemerkung	E.C.- Nummer	spez. Aktivität a_{sp} (Herstellerangaben)	Selektivität
Alkalase® 2,4 L	technische Reinheit	3.4.21.62	$2,4 \cdot 10^{-3}$ AU/mg ^(*1)	hydrophobe AS
Alkalase® 2,5 DX L	flüssig	3.4.21.62	$2,5 \cdot 10^{-3}$ AU/mg	
Alkalase® 2,5 DX L	granuliert	3.4.21.62	$2,0 \cdot 10^{-3}$ AU/mg	
α -Chymotrypsin	bovin	3.4.21.1	350 U/mg	Tyr, Trp, Phe, Leu
Elastase	porkin	3.4.21.36	30,0 U/mg	Ala, Val, Ile, Leu, Gly
Esperase®	flüssig	3.4.21.62	$8,0 \cdot 10^{-4}$ KNPU/mg ^(*2)	--
Esperase®	granuliert	3.4.21.62	$4,0 \cdot 10^{-3}$ KNPU/mg	hydrophobe AS
Savinase®	flüssig	3.4.21.62	$1,6 \cdot 10^{-2}$ KNPU/mg	
Savinase®	granuliert	3.4.21.62	$1,2 \cdot 10^{-2}$ KNPU/mg	
Subtilisin A	technische Reinheit	3.4.21.14	$6,0 \cdot 10^{-4}$ AU/mg	hydrophobe AS
Trypsin	bovin	3.4.21.4	40 U/mg ^(*3)	Arg, Lys
Enzymreiner N	Proteasengemisch in Gelatine, Vernetzung durch Triton 100	--	$1,4 \cdot 10^{-2}$ AU/mg	--
Flavourzyme™	Gemisch aus Exo- und Endopeptidasen	--	$1,16 \cdot 10^3$ LAPU/mg ^(*4)	--
Protease K	Gemisch aus Trypsin, α -Chymotrypsin, Peptidasen, Amylasen	--	$4,0 \cdot 10^{-2}$ AU/mg	--

mit: *¹AU/g = Anson Units; *²KNPU/g = Kilo Novo Protease Units; *³ U/mg = Units; *⁴LAPU/g = Leucin Aminopeptidase Units s. Anhang 16.5.

Aufgrund ihrer ausgeprägten Selektivitäten werden diese Säugerproteasen zu vielfältigen Zwecken in Forschung und Industrie eingesetzt, wie z.B. α -Chymotrypsin zur gezielten Peptidsynthese und Trypsin zum Peptidmapping [23].

Neben reinen, nativen Enzymen wurden auch verschiedene Enzymmischungen und Zubereitungen für einen Einsatz getestet. Diese sind kommerziell erhältliche Zubereitungen, die vom Hersteller für eine besondere Eignung in der Malerei (Enzymreiniger N) oder für Anwendungen unter milden Bedingungen (Flavourzyme™) ausgewiesen sind.

4.1.1 Bradford-Proteinassay

Um effektiv das für die Hydrolyse des Caseins geeigneteste Enzymsystem zu ermitteln, muss bei einem Screening Casein direkt als Substrat eingesetzt werden. Daher bieten sich zur Analyse des Caseinabbaus photometrische Assays mit Farbkomplexierung der Proteine (z.B. BCA-Proteinassay) oder spezifischer Gruppen (z.B. Ninhydrin-Test) an, die schnell und direkt Auskunft über Substratkonzentrationen und Abbaugeschwindigkeiten liefern. Aufgrund seiner einfachen Handhabbarkeit, guter Reproduzierbarkeit der Daten und der geringen Fehler wurde der Bradford-Proteinassay zur Dokumentation des Enzymscreenings ausgewählt [35, 36] (s. Anhang 16.4).

Das Färbereagenz enthält die Substanz Coomassie Brilliant Blue, die Proteine quantitativ bindet und bei der Kopplung eine Verschiebung seines Absorptionsmaximums von $\lambda = 465 \text{ nm}$ nach $\lambda = 595 \text{ nm}$ erfährt. Die über das Lambert-Beer'sche Gesetz

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d,$$

mit E: Extinktion, ϵ : Extinktionskoeffizient, c: Konzentration, d: Schichtdicke

der Restproteinkonzentration direkt proportionale Extinktion erlaubt bei zeitabhängiger Probenahme die Beschreibung der enzymatischen Abbauperläufe der Caseinzersetzung. Als Substrat wurde eine 2 g/L Caseinlösung, pH 8,3 gemäß Anhang 16.3 eingesetzt. Abbildung 6 A + B zeigen einen Vergleich der Abbauperläufe der getesteten Serinproteasen, wobei in Abb. 6 A die effizienteren und in Abb. 6 B die schwächeren Serinproteasen zusammengestellt sind.

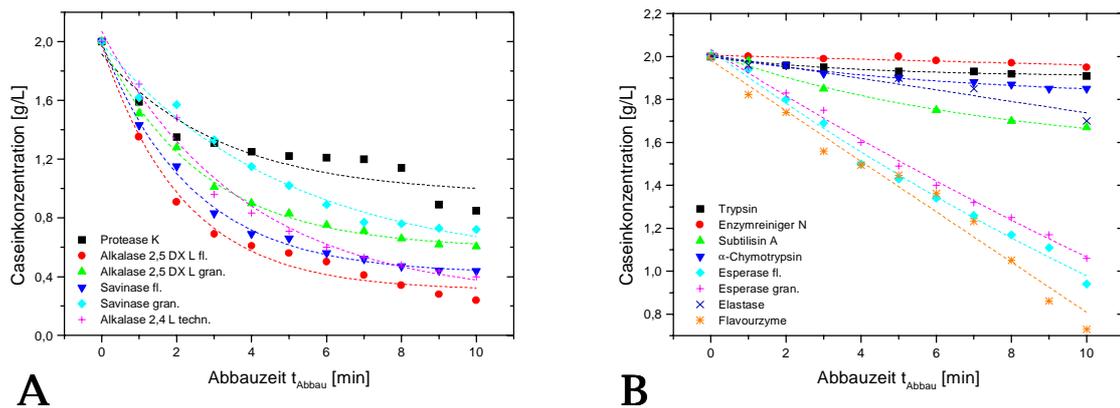


Abb. 6: Vergleich der Abbauläufe für verschiedene Serinproteasen (Reaktionsbedingungen: Abbauezeit

$t_{\text{Abbau}} = 10 \text{ min}$, $T = 25^\circ \text{ C}$, 10 mL Substrat $c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}$, $c_{\text{Enzym}} = 0,1 \text{ \% (v/v)}$, 750 rpm) [37, 38]

A: Serinproteasen mit hohen Abbauleistungen

B: Serinproteasen mit geringen Abbauleistungen

Alle Säugerproteasen zeigen aufgrund ihrer hohen Selektivität nur geringe Abbaugeschwindigkeiten von bis zu $v_{\text{max}} = 3,5 \cdot 10^{-2} \text{ g/L} \cdot \text{min} \pm 6,47 \text{ \%}$ (s. Abb. 6 B), wobei lineare Abbauläufe vorliegen. Auch die Serinproteasen mit mittleren Abbaugeschwindigkeiten von bis zu $v_{\text{max}} = 0,13 \text{ g/L} \cdot \text{min} \pm 9,13 \text{ \%}$ zeigen lineare Abbauläufe, während die Serinproteasen mit hohen Abbaugeschwindigkeiten von bis zu $v_{\text{max}} = 0,18 \text{ g/L} \cdot \text{min} \pm 7,82 \text{ \%}$ für Alkalase® 2,5 DX L, flüssig (s. Abb. 6 A) exponentielle Abbauläufe aufweisen. Dieser exponentielle Abfall der Abbaugeschwindigkeit beruht auf einer ausgeprägten Produktinhibierung, die diese Serinproteasen während der Reaktion erfahren. Denn sie setzen aufgrund ihrer geringen Selektivität auch die primären Produkte der Abbaureaktion, die Peptidfragmente um. Da deren Konzentration während der Reaktion exponentiell zunimmt, üben sie einen zunehmenden Einfluss auf die Abbauleistung der Proteasen bezüglich dem Substrat Casein aus und bewirken so die Abweichung vom linearen Verhalten.

Die Produktinhibierung der Serinproteasen mit den höchsten Abbaugeschwindigkeiten, insbesondere Alkalase® 2,5 DX L, flüssig, stellt kein Hindernis für einen Einsatzes an den Wandmalereiobjekten dar, da die Abbauprodukte der Caseinzersetzung im Trägerstrom kontinuierlich von der Oberfläche weggeführt werden und so nicht als Inhibitoren dienen können. Auch die Ermittlung kinetischer Daten ist bei Auswertung der Abbauläufe über die Anfangssteigung möglich.

Für den Aufbau der enzymatischen Abnahmemethode wurde die Serinprotease Alkalase® 2,5 DX L, flüssig ausgewählt, die die höchsten Abbauleistungen bezüglich des

Substrates Casein aufweist. Auch die geringer aufgereinigte Variante mit sogenannter technischer Reinheit, Alkalase® 2,4 L, flüssig, mit einer Abbauleistung von $v_{\max} = 0,16 \text{ g/L} \cdot \text{min} \pm 8,36 \%$ wurde als kostengünstige Alternative weiter untersucht.

4.1.2 Charakterisierung der Alkalase® [25]

Alkalase® ist eine Serinendoprotease, die aus dem *Bacillus licheniformis* isoliert wird und zur Gruppe der Subtilisine zählt. Die optimalen Reaktionsbedingungen liegen bei $T = 60^\circ \text{ C}$ und $\text{pH } 8,5$. Alkalase® zeichnet sich durch eine hohe Aktivität bezüglich der Zersetzung von Eiweißen aus, und wird daher in der Waschmittelindustrie als Zusatz eingesetzt, der unlösliche Proteinflecken in lösliche Peptide überführt. Es besitzt eine schwach ausgeprägte Selektivität zu Gunsten hydrophober Aminosäuren, die aufgrund des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren im Casein den Abbau begünstigt. Alkalase® kann durch Di-isopropyl-fluorophosphat und Phenyl-methyl-sulfonylfluorid inhibiert werden und erfährt eine Produktinhibierung aufgrund seiner geringen Selektivität. Kommerziell ist Alkalase® in verschiedenen Aktivitäts-, bzw. Reinheitsstufen (hochaufgereinigt, food grade, technisch rein), und Modifikationen (flüssig, granuliert, lyophilisiert) erhältlich. Bei den Untersuchungen empfahlen sich besonders die flüssigen Varianten aufgrund ihrer hohen Aktivitäten für eine eingehende Untersuchung und spätere Anwendung.

4.1.2.1 EPE-Methode

Zur Ermittlung kinetischer Daten für die Alkalase® wurde ein einfacher und schneller proteolytischer Aktivitätstest, die EPE-Methode (Esterolytische Protease Einheiten), ausgewählt [39, 40], die eine kontinuierliche Dokumentation der Abbaureaktion ermöglicht. Der Vorteil gegenüber der Untersuchung von Casein liegt in der Homogenität des Substrates, da in diesem Assay ein definierter Aminosäureester, der N-CBZ-L-Valin-p-nitrophenyl-ester, proteolytisch zersetzt wird. Ausgenutzt wird in diesem proteolytischem Assay die Querempfindlichkeit von Proteasen zu Esterbindungen; es wird die esterolytische Nebenaktivität bestimmt. Die Spaltung des Substrates führt zur Freisetzung von p-Nitrophenol, das ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 340 \text{ nm}$ besitzt. Um den Einfluss der Eigenabsorption der Alkalase® auf die Messungen zu minimieren, wird die Dokumentation bei einer optimalen Wellenlänge von $\lambda_{\text{opt}} = 353 \text{ nm}$ durchgeführt (Durchführung EPE-Methode und Kalibration p-Nitrophenol s. Anhang 16.6). Es wird für die Auswertung die Gültigkeit der Michaelis-Menten-Beziehung und ihrer Annahmen vorausgesetzt [41], so dass nach doppelt reziproker Umformung die Line-

weaver-Burk-Beziehung resultiert, die eine direkte Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der Michaeliskonstante aus Steigung und Ordinate erlaubt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}},$$

mit v : Reaktionsgeschwindigkeit, $[S]$: Substratkonzentration, K_M : Michaelis-Menten-Konstante.

Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} gemäß:

$$v_{\max} = k_{\text{Diss}} \cdot [E_o], \text{ für } [S] \gg K_M,$$

mit k_{Diss} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des Enzym/Produkt-Komplexes, E_o : eingesetzte Enzymkonzentration

nur bei Substratüberschuss bestimmt werden kann, wurde in Vorversuchen die Substratsättigungskonzentration bestimmt (s. Abb. 7 A). Diese liegt für Alkalase® 2,5 DX L, flüssig bei $[S] = 4,172 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ und einer spezifischen Aktivität von $a_{A-2,5DXL} = 3,065 \cdot 10^6 \text{ U/L}$ mit einem relativen Fehler von $z_{\text{rel}} = 11,23 \%$, während sie für die technisch reine Alkalase® 2,4 L etwas höher bei $[S] = 4,846 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ liegt, bei einer geringeren spezifischen Aktivität von $a_{A-2,4L} = 3,87 \cdot 10^5 \text{ U/L}$ mit $z_{\text{rel}} = 7,46 \%$.

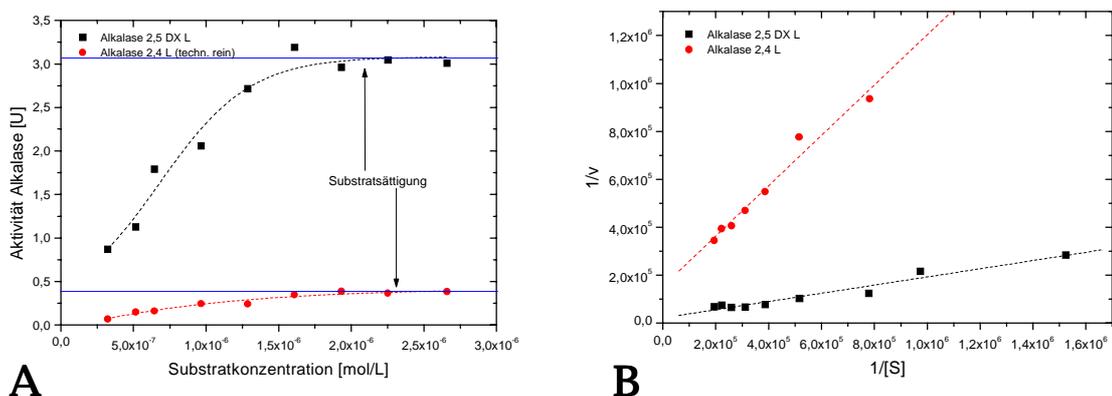


Abb. 7: A: Aktivitätsentwicklung bei Variation von $[S]$ zur Ermittlung der Substratsättigungskonzentration, Reaktionsbedingungen: $t_{\text{Abbau}} = 1 \text{ min}$, $T = 25^\circ\text{C}$, $0,1 \%$ (v/v) Alkalase®, 750 rpm
 B: Lineweaver-Burk-Darstellung der Abbaudaten für Alkalase® 2,5 DX L, flüssig und Alkalase® 2,4 L zur Ermittlung kinetischer Daten

Die kinetischen Daten der Serinproteasen Alkalase® 2,5 DX L, flüssig und Alkalase® 2,4 L ergeben sich aus Abbildung 7 B. Alkalase® 2,5 DX L, flüssig weist eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit von $v_{\max} = 5,116 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L} \cdot \text{s} \pm 23,04 \%$ und eine Michaelis-

Konstante von $K_M = 7,317 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L} \pm 7,85 \%$ auf. Für Alkalase® 2,4 L ergibt sich eine Erniedrigung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 8 auf $v_{\max} = 6,439 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L*s} \pm 18,93 \%$ bei einer im Rahmen der Fehler übereinstimmende Affinität zum Substrat, beschrieben durch die Michaelis-Konstante von $K_M = 6,870 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L} \pm 12,03 \%$. Die Verringerung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit für technisch reine Alkalase® 2,4 L beruht auf den starken Verunreinigungen der Lösung, die eine Verdünnung der Alkalase® und somit einen Aktivitätsverlust verursachen. Die geringe Affinität zum Substrat hat ihre Ursache in der zu spaltenden Esterbindung, da die Peptidhydrolase Alkalase® spezifisch Peptidbindungen spaltet. Bezüglich der, der Peptidbindung verwandten, Esterbindungen weist sie hingegen nur eine Nebenaktivität auf. Die Affinität zu Casein konnte mit Hilfe des Bradford-Testes zu $K_M = 2,402 \cdot 10^{-9} \text{ mol/L} \pm 11,79 \%$ bestimmt werden und ist im Vergleich um den Faktor 300 größer.

Da besonders proteolytische Enzyme Zersetzungsreaktionen, wie Selbstverdau unterworfen sind, ist die Langzeitstabilität der Enzyme eine wichtige Kenngröße. Denn die Zersetzungsreaktionen können durch eine Temperaturabsenkung bei der Lagerung zwar verlangsamt, aber nicht aufgehalten werden. Der Alterungsprozess der Alkalase® 2,5 DX L, flüssig wurde über einen Zeitraum von 4,5 Jahren verfolgt (s. Abb. 8), in der die Aktivität der Alkalase® auf 2,62 % der Ausgangsaktivität absank.

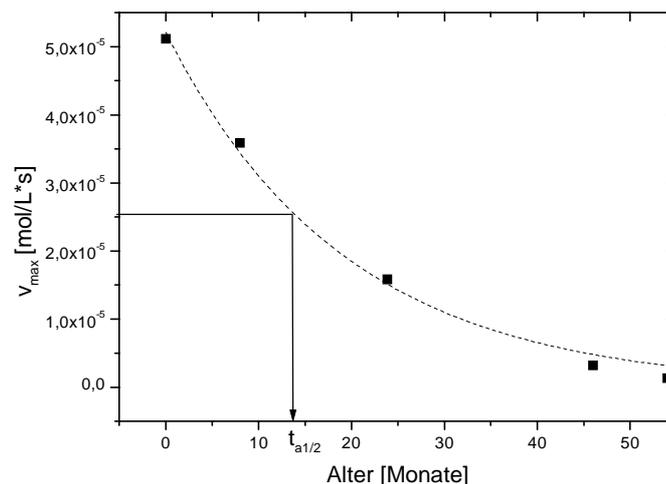


Abb. 8: Langzeitstabilität der Aktivität von Alkalase® 2,5 DX L, flüssig [42]

Die Halbwertszeit der Aktivität ergibt sich zu $t_{a \ 1/2} = 13,7$ Monate. Aus diesen Ergebnissen folgt, dass Alkalase® 2,5 DX L, flüssig-Chargen nur bis zu einem Alter von

6 Monaten eingesetzt werden sollten, da sonst die Aktivität des Enzyms soweit abgesunken ist, dass keine vergleichbaren Abbauuntersuchungen mehr durchgeführt werden können. Weiterhin ist eine Lagerung bei $T = 4^{\circ}\text{C}$ nötig.

4.2 Korrelation mit Gelelektrophorese

Die Korrelation der aus den photometrischen Abbauuntersuchungen erhaltenen Daten wurde mit einer quantitativen Gelelektrophoresemethode für Casein durchgeführt [13]. Die eingesetzte Methode ist die Disk-Gelelektrophorese-Methode nach Laemmli, bei der die Trennung der Analytmoleküle nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis erfolgt [43]. Es wurde das automatisierte PhastSystem verwendet, mit kommerziellen Urea-PAGE-Gradientengelen 8 – 25 % [44, 45] und CoomassieBlue-Färbung (Durchführung s. Anhang 16.7). Die densitometrische Auswertung der Banden unter Verwendung des Programms Optimas 5 erlaubt eine Quantifizierung des Caseins [46]. Bei dieser Technik wird eine Abtastung der Farbintensitäten der Banden auf den eingescannten Gelen durchgeführt, die vom Programm in Gauß'sche Verteilungsfunktionen umgerechnet und auf die Konzentrationen bezogen werden. Abbildung 9 A zeigt ein Kalibrationsgel für die

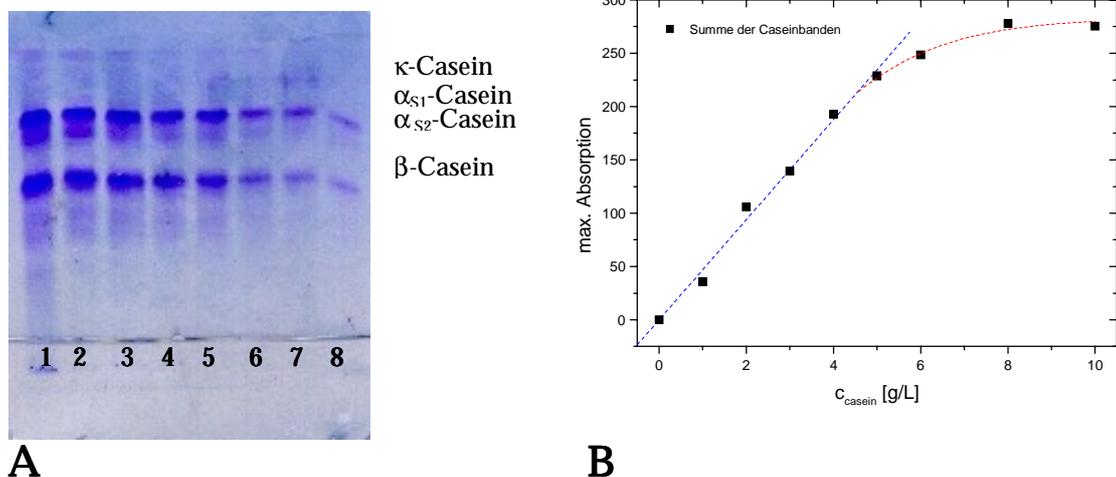


Abb. 9: A: Urea-PAGE-Gradientengel mit CoomassieBlue-Färbung, Casein in Urea/Tris/Acetat-Puffer, pH 6,4: 1) $c_{\text{Casein}} = 10,0 \text{ g/L}$, 2) $8,0 \text{ g/L}$, 3) $6,0 \text{ g/L}$, 4) $5,0 \text{ g/L}$, 5) $4,0 \text{ g/L}$, 6) $3,0 \text{ g/L}$, 7) $2,0 \text{ g/L}$, 8) $1,0 \text{ g/L}$ [13]

B: Kalibration der Caseinkonzentration aus den mittleren maximalen Absorptionswerten der Banden von α_{S1} -Casein, α_{S2} -Casein und β -Casein

Caseinkonzentration mit von links nach rechts sinkenden Caseinkonzentrationen. Die Lauflinien zeigen die Auftrennung der Caseine α_{S1} -Casein mit $R_f = 0,778$, α_{S2} -Casein mit R_f -Werten von $R_f = 0,709$ und β -Casein mit $R_f = 0,548$. κ -Casein mit $R_f = 0,896$ zeigt nur

eine sehr schwache Bandenintensität und wird daher bei der densitometrischen Auswertung nicht berücksichtigt. Die densitometrische Kalibration der Caseinkonzentration ergibt einen linearen Zusammenhang bis zu einer Konzentration von $c_{\text{Casein}} = 5,0 \text{ g/L} \equiv 2,04 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L} \pm 2,35 \%$, bevor eine Sättigung der Bandenfarbenintensitäten und somit eine hyperbolische Abweichung resultiert (s. Abb. 9 B).

Die Dokumentation einer enzymatischen Caseinabbaureaktion mit Alkalase® 2,5 DX L wird durch zeitliche Verfolgung der Bandenintensitäten der Caseine erreicht. Abbildung 10 A zeigt ein Abbaugel mit von links nach rechts zunehmender Abbauzeit des Caseinabbaus. Schon in Lauf 2 sind nach $t_{\text{Abbau}} = 1 \text{ min}$ die Caseinbanden nur noch schwach, während eine Vielzahl von Abbauprodukten, Peptidfragmente, mit R_f -Werten von 0,85 – 1,0 entstanden sind.

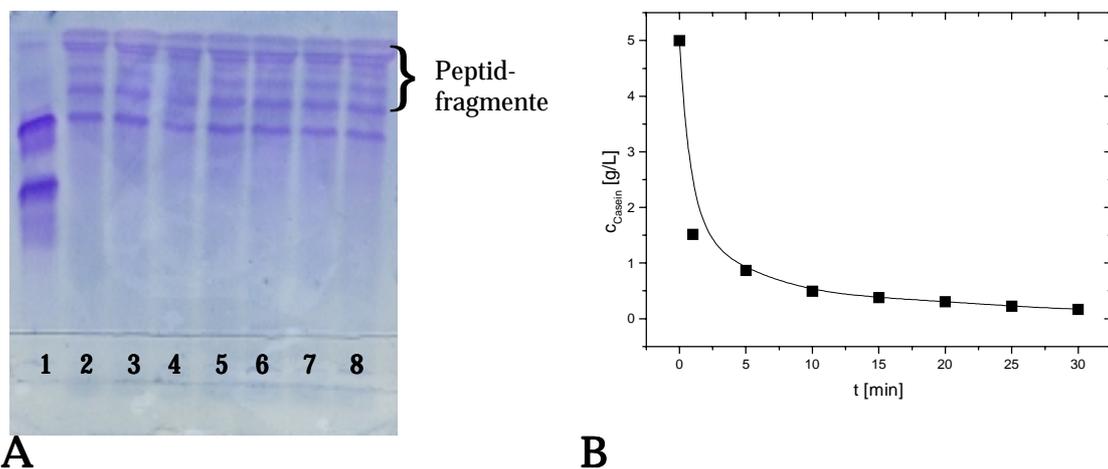


Abb. 10: A: Urea-PAGE-Gradientengel mit CoomassieBlue-Färbung, Caseinabbau mit

$c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07 \text{ U/mL}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 750 rpm : 1) $c_{\text{Casein}} = 5,0 \text{ g/L}$, t_{Abbau} : 2) 1 min, 3) 5 min, 4) 10 min, 5) 15 min, 6) 20 min, 7) 25 min, 8) 30 min [13]

B: Darstellung des densitometrisch ausgewerteten Abbauverlaufes, $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$, $c_{\text{Casein}} = 5,0 \text{ g/L}$, $c_{\text{A-2,5 DX L}} = 3,07 \text{ U/mL}$, $T = 25^\circ\text{C}$, 750 rpm

Dieses Bild zeigt auch der densitometrisch ermittelte Abbauverlauf der proteolytischen Caseinzersetzung (s. Abb. 10 B). Die stark negative Anfangssteigung von $v_{\text{Abbau}} = 2,42 \text{ g/L} \cdot \text{min} \pm 17,36 \%$ belegt die hohe Affinität der Alkalase® zum Casein.

Die Daten des Bradford-Proteinassay lassen sich mit der Gelelektrophorese korrelieren, wenn wie beim Bradford-Proteinassay die Auswertung anhand der Abnahme der Substratkonzentration durchgeführt wird. Die Korrelation der Analysenverfahren wird anhand von Abbaugraphiken mit einer Substratkonzentration von $c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}$ dargestellt (s. Abb. 11 A). Die Daten korrelieren zu Beginn der Abbaureaktion bis

$t_{\text{Abbau}} = 3 \text{ min}$ im Rahmen der relativen Fehler der Messmethoden, die mittlere Abbaugeschwindigkeit ergibt sich zu $v_{\text{Abbau}} = 0,177 \text{ g/L} \cdot \text{min}$ mit einem relativen Fehler von $z_{\text{rel}} = 9,35 \%$. Im weiteren Verlauf der Abbaureaktion nimmt die Korrelation der Abbaudaten allerdings stetig ab, so dass eine systematische Abweichung resultiert. Diese liegt in den Unterschieden der Analysenmethoden begründet. Denn beim Bradford-Proteinassay werden auch Makropeptide, die Primärprodukte der enzymatischen Abbaureaktion mitgefärbt und ausgewertet, so dass scheinbar höhere Restsubstratkonzentrationen vorliegen, als bei der Gelelektrophorese, wo nur die Substratbanden in eine Auswertung einbezogen werden.

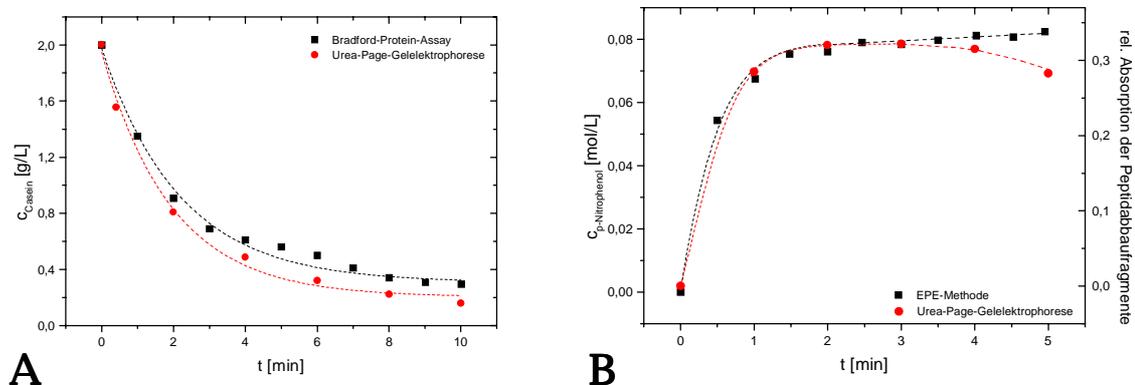


Abb.11: A: Korrelation der Messdaten des Bradford-Proteinassays und der Urea-Page-Gelelektrophorese,

Reaktionsbedingungen: $10 \text{ mL } c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}$, $c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07 \text{ U/mL}$, $t_{\text{Abbau}} = 10 \text{ min}$,

$T = 25^\circ \text{ C}$, 750 rpm

B: Korrelation der Messdaten von EPE-Methode und Urea-Page-Gelelektrophorese, Reaktions-

bedingungen: Substrat: $c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}$ bzw. $c_{\text{Valerster}} = 5 \text{ g/L}$, $c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07 \text{ U/mL}$,

$t_{\text{Abbau}} = 5 \text{ min}$, $T = 25^\circ \text{ C}$, 750 rpm

Die Korrelation der EPE-Methode lässt sich ebenfalls mit der Urea-Page-Gelelektrophorese erreichen, wenn wie bei der EPE-Methode die Auswertung anhand der zeitlichen Entwicklung der Produktkonzentrationen durchgeführt wird (s. Abb. 11 B). Es zeigt sich auch hier eine gute Korrelation der Daten bis zu einer Zeit von $t_{\text{Abbau}} = 3 \text{ min}$, anschließend nehmen die Konzentrationen der bei der Gelelektrophorese ausgewerteten Primärabbauprodukte, der Makropeptide ab, während bei der EPE-Methode eine kontinuierliche Weiterbildung des Produktes p-Nitrophenol stattfindet. Mit Alkalase® 2,5 DX L, flüssig wurde ein sehr effektives Enzym ermittelt, dass in kurzer Zeit eine vollständige Zersetzung aller Caseine in Abbaufragmente vollzieht. Es wurden vollständige kinetische Daten für dieses Enzym bestimmt und die

Abbauergebnisse der photometrischen Analysenverfahren mit einer Gelelektrophoresemethode korreliert. Den nächsten Schritt beim Aufbau einer kontrollierten enzymatischen Abnahmemethode für Caseine stellt die Immobilisierung der Protease auf einem geeigneten Trägersystem dar, um das Risiko eines Enzymeintrages an die Wandmaleroberfläche zu minimieren.

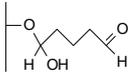
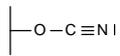
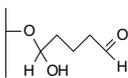
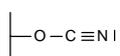
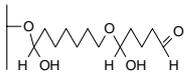
5. Immobilisierung [47]

Die Immobilisierung der Alkalase® 2,5 DX L auf einem geeigneten Trägersystem ermöglicht die Kontrolle des enzymatischen Abbaus, steigert die Wiederverwendbarkeit der Protease und schließt den Eintrag von Enzymmolekülen auf die Wandmaleroberfläche aus. Dieser stellt bei einer Anwendung eines der Hauptrisiken dar, da die Alkalase® wie das Casein ein Protein ist und langfristig auch die Oberfläche schädigen kann. Denn auch wenn die Alkalase® nach Anwendung nicht als geschlossene Schicht auf der Oberfläche aufliegt und daher keine Spannungsschäden verursacht, so kann es doch Mikroorganismen als Nahrungsgrundlage dienen und einer Oberflächenbesiedelung Vorschub leisten. Daher muss jeglicher Eintrag von Enzym auf die Wandmaleroberfläche verhindert werden. Eine Immobilisierung ermöglicht dies und bietet darüber hinaus den Vorteil, dass der Anwender nicht in direkten Kontakt mit dem Enzym kommt.

5.1 Ausgesuchte Trägermaterialien

Die Auswahl eines geeigneten Trägermaterials erfolgt unter verschiedenen Gesichtspunkten. Einerseits soll eine hohe Enzymbeladung des Trägers erreicht werden und die Aktivität der Alkalase® 2,5 DX L durch die Immobilisierung möglichst wenig beeinträchtigt werden, andererseits muss sich das Immobilisat der stark strukturierten Oberfläche der Wandmalerei optimal anpassen. Es wurden verschiedene Trägersysteme auf ihre Eignung getestet, wobei wattige Materialien wie Baumwolle (Cellulose) und Lammfell (Ceratin) nach vorheriger Aktivierung eingesetzt wurden, aber auch kommerzielle, funktionalisierte Trägermembranen. Tabelle 4, S. 25 stellt die verschiedenen angewandten Trägersysteme gegenüber. Die Funktionalisierungen der eingesetzten Oberflächen variieren in der Art des Bindungstypus bei Immobilisierung des Enzyms von ionisch bis kovalent, wobei verschiedenste Linkerfunktionen getestet wurden, wie z.B. Epoxide, Cyanate, Aldehyde oder Sulfonate. Als Träger der Linkerfunktionen wurden vor allen Dingen die bewährten Cellulosederivate Methylcellulose und Celluloseacetat verwendet, sowie nicht derivatisierte Cellulose und Lammfell, da sie über eine Vielzahl endständiger Hydroxidgruppen verfügen, die sich für eine Aktivierung anbieten. Lammfell [48] besteht überwiegend aus dem gerüstbildenden, stäbchenförmigen Protein Ceratin und erwies sich trotz vielversprechender Aktivierungs- und Immobilisierungsversuche als instabiler Träger, da die Alkalase® 2,5 DX L das Ceratin trotz Immobilisierung innerhalb weniger Tage zersetzte.

Tab. 4: Getestete Immobilisierungsträgersysteme für Alkalase® 2,5 DX L

Nr.	Träger	Typ	Aktivierung	Funktionalisierung	Bemerkung	
1	Baumwolle (Watte)	Cellulose	Glutaraldehyd [49]	Aldehyd: 	kovalente Bindung des Enzyms	
2			Epichlorhydrin [50, 51]	Epoxid, Oxiran: 		
3			Bromcyan [52]	Cyanat: 		
4	Lammfell	Ceratin	Glutaraldehyd [49]	Aldehyd: 		
5			Epichlorhydrin [50, 51]	Epoxid, Oxiran: 		
6			Bromcyan [52]	Cyanat: 		
7	T60 A - Membran	Celluloseacetat	Hersteller, Fa. Sartorius AG	Aldehyd :	Sehr polare, kovalente Bindung des Enzyms	
8	T103 - Membran			Aldehyd + Spacer :		
9	Epoxid-Membran 18706			Epoxid, Oxiran :		
10	Periodat-Membran 19306			Periodat :		
11	Sartobind S - 18842	Methylcellulose		Sulfonsäure :	Kationentauschermembran	
12	Sartobind Q - BJ 61/2			Trimethylammonium:		Anionentauschermembran

So konnte Ceratin als Träger für Alkalase® 2,5 DX L schon nach den Vorversuchen ausgeschlossen werden [53].

Die Immobilisierung wurde standardisiert mit 2 mL 5 % (v/v) Alkalase® 2,5 DX L in 0,1 M Kaliumhydrogenphosphatpuffer (KPP), pH 7,5 durchgeführt, wobei jeweils 1 cm² Membran oder 100 mg Träger eingesetzt wurden. Die weiteren Immobilisierungsparameter waren $t_{\text{Immobilisierung}} = 24 \text{ h}$, $T = 40^\circ\text{C}$, 750 rpm. Nach der Immobilisierung wurde das Immobilisat mit 3 x 0,01 M KPP, pH 7,5 gewaschen und in 2 mL 0,1 M KPP, pH 7,5 bei $T = 4^\circ\text{C}$ bis zur Weiterverwendung gelagert.

5.2 Immobilisatscreening

Das Screening der Immobilisate wurde mit der EPE-Methode durchgeführt (s. Anhang 16.6), wobei in diesem Fall kein Küvettentest angewendet werden konnte, da das Immobilisat den Strahlengang verdeckte. Daher wurde eine Umlaufapparatur aufgebaut (s. Abb. 12), in der die Immobilisate in einer Durchflusskartusche vom Substrat umströmt wurden. Die photometrische Messung in einer Durchflussküvette wurde über das ans Photometer angeschlossene Analysenprogramm CAFCA (Computer assisted flow control analysis) erfasst.

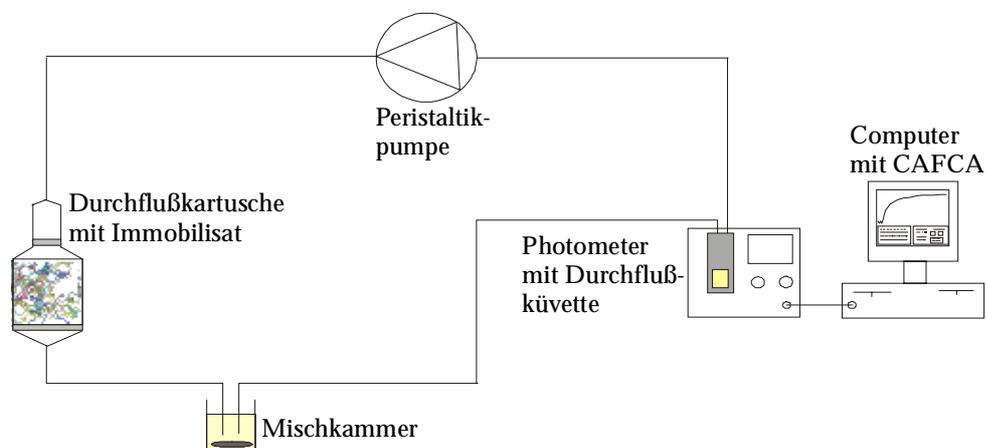


Abb. 12: Umlaufapparatur zur Bestimmung der Immobilisataktivität, Standardreaktionsbedingungen:

$$V_{\text{Tot}} = 5 \text{ mL}, c_{\text{Valerster}} = 1,77 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}, RT, \text{ Immobilisat : } 1 \text{ cm}^2 \text{ Membran bzw. } 100 \text{ mg Träger},$$

$$t_{\text{Abbau}} = 10 \text{ min}$$

Die Immobilisate mit den Membranen Sartobind S und Sartobind Q zeigten keinerlei Abbau des Substrates, und auch die Peridotmembran zeigte nur geringe Abbauraten von $v_{\text{Abbau}} = 4,35 \cdot 10^{-11} \text{ mol/L} \cdot \text{s} \pm 14,35 \%$. Da alle Immobilisate mit kovalenten Bindungen

zwischen Linker und Enzym höhere Abbauraten zeigen, kann eine Bevorzugung der kovalenten Bindungsknüpfung für die Alkalase® 2,5 DX L bei der Immobilisierung konstatiert werden. Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten, die mit Immobilisaten der verschiedenen Trägermaterialien erzielt werden konnten.

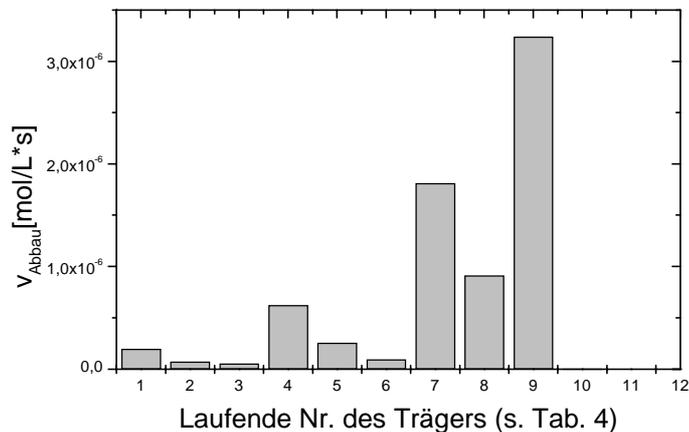


Abb. 13: Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten verschiedener Immobilisatrräger, Standardreaktionsbedingungen

Es zeigt sich die höchste Abbaugeschwindigkeit für die Epoxidmembran (9) mit $v_{\text{max}} = 3,24 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L*s} \pm 13,19 \%$. Ebenfalls gute Abbauergebnisse werden für die aldehydfunktionalisierten Membranen T60 A (7) und T103 (8) mit $v_{\text{max}} = 1,81 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L*s} \pm 16,41 \%$ bzw. $v_{\text{max}} = 9,12 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L*s} \pm 16,78 \%$ ermittelt. Auch die unterschiedlich aktivierten Ceratinträger (4 - 6) zeigen gute Abbauergebnisse von bis zu $v_{\text{max}} = 6,25 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L*s} \pm 14,64 \%$, scheiden aber wegen der oben beschriebenen proteolytischen Zersetzung des Trägers aus. Die aktivierten Cellulose-träger zeigen nur schwache Abbauergebnisse. Die hohen relativen Messfehler beruhen auf dem großen Totvolumen der Umlaufapparatur $V_{\text{Tot}} = 5 \text{ mL}$, das eine erhebliche Verdünnung des umgesetzten Substrates, eine Verringerung der Absorptionswerte und somit letztlich eine Erhöhung der Messwertstreuung verursacht. Die epoxidfunktionalisierte Celluloseacetatmembran Sartobind Epoxymembran 18706 [54] wurde aufgrund ihrer herausragenden Abbauergebnisse für eine weitere Verwendung ausgewählt, die Immobilisierung der Alkalase® 2,5 DX L wurde optimiert und charakteristische Daten des Immobilisates erstellt.

5.3 Charakterisierung der Sartobind Epoxymembran 18706

Die Sartobind Epoxymembran 18706 verfügt über eine Porengröße von 0,45 μm und eine Dicke von 270 μm . Laut Herstellerangaben hat die Membran eine allgemeine Bindungskapazität von $k_B = 29 - 110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Protein ($k^{\text{spez}}_B = 50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ bovines Serum Albumin (BSA)). In einem Immobilisierungsscreening wurden zum einen die Kapazität der Membran bezüglich Alkalase® 2,5 DX L und zum anderen die optimal einzusetzende Menge Enzym bei der Immobilisierung ermittelt (s. Abb. 14). Die Enzymbeladung der Membranen wurde unter Verwendung des BCA(Bicinchoninic acid)-Proteinassays (Durchführung s. Anhang 16.9) bestimmt, indem das Protein quantitativ von einem Cu-Farbkomplex gebunden wird, der eine photometrische Analyse bei $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ ermöglicht. Dieser Assay wird im Mikromaßstab auf Mikrotiterplatten mit einer internen Kalibration mit BSA durchgeführt [55].

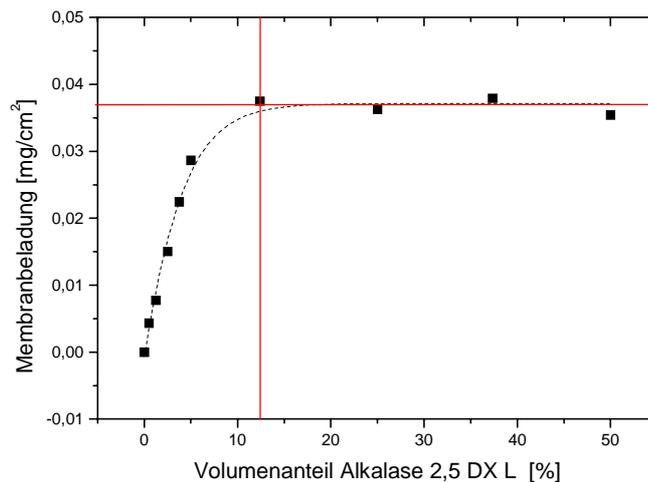


Abb. 14: Immobilisierungsscreening zur Ermittlung der Bindungskapazität für Alkalase® 2,5 DX L und des optimalen Enzymvolumenanteils bei der Immobilisierung

Die Bindungskapazität, die für die Epoxymembranimmobilisate ermittelt werden konnte, liegt mit $k_B^A = 37,25 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 5,37 \%$ im Bereich der Herstellerangaben. Für die optimale Immobilisierung empfiehlt sich ein Anteil von 12,4 % (v/v) Alkalase® 2,5 DX L bei der Immobilisierung, das entspricht 361 U/mL.

Die mit der EPE-Methode ermittelten kinetischen Daten ergeben sich zu $v_{\text{max}} = 8,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol}/\text{L} \cdot \text{s} \pm 12,35 \%$ und $K_M = 1,7 \cdot 10^{-6} \pm 13,70 \%$, und liegen somit bei 15,83 % der Abbauleistung nativer Alkalase® 2,5 DX bei Vergleich von 1 μL nativer und 1 cm^2 immobilisierter Alkalase®. Das entspricht einer Aktivität von $a_{\text{Im-A}} = 0,485 \text{ U}/\text{cm}^2$

± 13,03 %. Die Affinität zum Substrat ist um den Faktor 2,75 erniedrigt. Die weitere Optimierung der Immobilisierung ergab die Notwendigkeit zur Verwendung von Carbonat- statt KPP-Puffern als Wasch- und Lagerungslösungen der Immobilisate, da eine Einschleppung von Phosphaten für den mikrobiellen Befall essentiell ist. Die optimierte Standardimmobilisierungsvorschrift ist in Anhang 16.8 dargestellt.

6. Membrankissenkonstruktion

6.1 Anwendungsvorgaben für den Oberflächeneinsatz

Große Bedeutung bei der Durchführung der enzymatischen Abnahme der Caseinüberzüge hat die Art, wie die Membranimobilisate mit der Oberfläche in Kontakt gebracht werden. Denn die Hauptproblematik beim Einsatz von Enzymen auf Wandmalereien ist der Wassereintrag in die Oberfläche. Dieser verursacht im Putz und im Mauerwerk die Lösung von Salzen, welche daraufhin zur Oberfläche wandern können, um dort auszublühen [17]. Dies schädigt die Wandmalerei nachhaltig – daher muss der Feuchtigkeitseintrag in die Wandmaleroberfläche kontrolliert und minimiert werden. Ein Verzicht auf ein wässriges Medium ist nicht möglich, da die Caseinschicht für den Abbau angelöst werden muss, und auch die Aktivität des Enzyms von einer wässrigen Umgebung abhängig ist.

Weiterhin muss der Abtransport der Abbaufragmente des enzymatischen Caseinabbaus erreicht werden, damit keine Nährsubstrate für eine mikrobielle Besiedelung nach der Anwendung verbleiben. Und nicht zuletzt soll eine geeignete Analytik auch die Geschwindigkeit und die Produktzusammensetzung eines Oberflächenabbaus ermitteln, so dass ständig Proben aus dem wässrigen Medium gezogen werden müssen. Durch die Verwendung eines pufferdurchströmten Membrankissens können diese Vorgaben verwirklicht werden, wobei die Flussrate des Pufferträgerstrom über eine Pumpe gesteuert werden kann.

6.2 Design eines Membrankissens

Das für die gezielte und kontrollierte Abnahme der Caseinüberzüge entwickelte Membrankissen besteht aus einem einseitig geöffneten Metallzylindergehäuse. Es ist ca. 10 cm hoch mit einem Radius von $r = 2,5$ cm und verfügt über Zu- und Ablaufanschlüsse für den Trägerstrom. In dieses Gehäuse wird ein 20 cm langer Schaumstoffblock eingelassen, der dann zur offenen Gehäusesseite hin Druck ausübt. Hier werden daraufhin die Membranen fixiert, die durch den druckausübenden Schaumstoffblock eine kissenartige, gewölbte Oberfläche erhalten (s. Abb. 15 A).

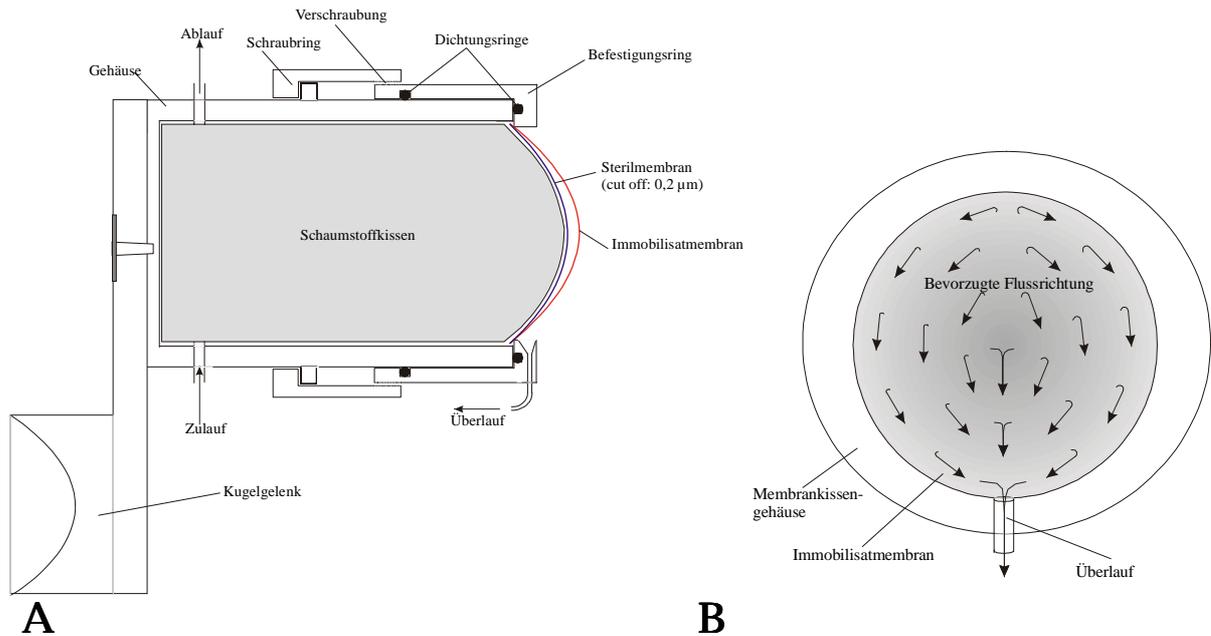


Abb.15: A: Schematischer Aufbau des Membrankissens (Querschnittszeichnung)

B: Flussrichtung des Trägerstromes

Die Fixierung erfolgt durch einen Konterschraubring am Gehäuse; mehrere Dichtungsringe verhindern das Auftreten von Leckagen an dieser Verschraubungsstelle. Die Konterverschraubung verfügt weiterhin über einen Überlaufstutzen, der den Abtransport des Produktträgerstromes ermöglicht (s. Abb. 15 B). Die kissenartige, gewölbte Membranoberfläche ist in der Lage, sich beim Aufpressen den Unebenheiten einer Wandmaleroberfläche optimal anzupassen. Unter der Immobilisatmembran wird eine Hydrosartsterilmembran Typ 18607 (cut off = $0,2 \mu\text{m}$) fixiert, die einerseits einen gewissen Staudruck auf den Trägerstrom ausübt, wodurch eine vollständige Befüllung des Gehäuses und somit eine gleichmäßige Durchfeuchtung der Membranoberfläche gewährleistet wird. Andererseits verhindert sie auch das Eintreten von Mikroorganismen in das Membrankissen, wodurch die Gefahr einer Verschleppung eines mikrobiellen Befalls von einer Abbaustelle zur nächsten verringert wird.

Darüber hinaus ist das Membrankissen aus V2A-Stahl gefertigt, damit es vollständig autoklavierbar ist, so dass es vor der Anwendung sterilisiert werden kann und keine fremden Keime an der Abbaustelle eingetragen werden (s. Abb.16).



Legende:

- 1: Membrankissengehäuse
- 2: Konterverschraubung mit Überlauf
- 3: Schaumstoffinlet
- 4: Stativverbinder mit Kugelgelenk
- 5: Dichtungsringe
- 6: Immobilisat- und Sterilmembran
- 7: Pumpschläuche

Abb. 16: Photographie des Membrankissenzubehörs

Als wässriges Medium wird ein basischer 0,1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer, pH 9,0 verwendet, der keinen wachstumsfördernden Einfluss auf die Abbaustelle für einen folgenden mikrobiellen Bewuchs ausübt. Die Basizität des Puffers ermöglicht eine gute Anlösung der schwerlöslichen Caseinschicht und bietet der Alkalase® 2,5 DX L ein optimales Arbeitsmedium.

Der Trägerstrom wird über eine Peristaltikpumpe gesteuert, wobei sich eine Flussrate von $f_v = 1,3955 \text{ mL/min}$ als idealer Kompromiss zwischen ausreichender Membrandurchfeuchtung und schädigendem Flüssigkeitseintrag in die Oberfläche erweist (Pumpenkalibration s. Anhang 16.14).

Da das Membrankissen auf den zumeist stark strukturierten Oberflächen historischer Wandmalereien, die sich zum Teil sogar in Gewölbebögen befinden, eingesetzt werden soll, wurde das Membrankissen über ein Kugelgelenk mit einem eigenen Stativ verbunden, so dass bis zu einem Neigungswinkel der Wand von 30° gearbeitet werden kann.

7. Prüfkörper

Der Transfer der bisher erhaltenen Ergebnisse zur Anwendung der Enzymimmobilisate auf Oberflächen kann durch den Einsatz von geeigneten Prüfkörpern, wie Kalkputzprobepplatten erreicht werden. Diese Prüfkörper dienen als Modell für eine Wandmalerei und müssen daher möglichst authentisch der Wandmaleroberfläche nachempfunden werden. So kann bis zur vollständigen Etablierung der Abnahmemethode an diesen Modelloberflächen auf einen Einsatz direkt am Objekt verzichtet werden, damit die wertvollen Wandmalereien vor übereilten, unter Umständen schädigenden Eingriffen geschützt werden.

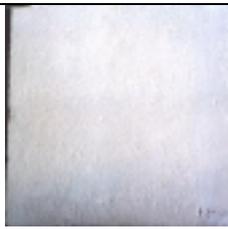
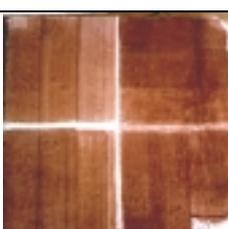
7.1 Herstellung Kalkputzprobepplatten

Die Herstellung der Kalkputzprobepplatten wurde durch das Niedersächsische Landesamt für Denkmalpflege koordiniert und von Herrn Prof. Emmenegger, Schweiz durchgeführt. Die Probepplatten wurden gemäß DIN 1164 Teil 7 hergestellt (s. Anhang 16.1) und zur Gewährleistung eines vollständigen Abbindeprozesses mehrere Wochen mit CO₂ begast, bevor sie der weiteren Verwendung zugeführt wurden. Es wurden für die verschiedenen Versuchsreihen insgesamt 150 Probepplatten mit den Dimensionen 30 x 30 x 2 cm hergestellt.

7.2 Pigment- und Caseinbeschichtung

Die Probepplatten wurden in einem ersten Schritt mit einem Kalkweißanstrich grundiert. Auf dieser Grundierung wurde eine Farbschicht aufgespritzt, wobei vier verschiedene, historische Pigmente ausgewählt wurden (s. Tab. 5). Weiterhin wurde das Pigment Eisenoxidrot, entsprechend der unterschiedlichen Varianten an den Objekten Wienhausen und Wildeshausen, einmal mit Leim und einmal mit Casein gebunden, wobei eine helle und eine dunkle Tönung resultierte, die eine leichte Unterscheidung ermöglichten. Die Pigmente Eisenoxidrot (Fe(III)oxid) [56] und Kalkweiß (Calciumcarbonat) [57] haben eine lange Tradition und werden seit dem Altertum in der Malerei verwendet. Das Pigment Mennige ist ein früher gebräuchliches Blei(II,IV)oxid-Pigment [58], wird aber aufgrund seiner Giftigkeit heute nicht mehr verwendet. Paratacamit ist ein seltenes, natürliches und instabiles Kupfer(II)-Pigment [59], dessen historische Verwendung auf den norddeutschen Raum beschränkt war.

Tab. 5: Pigmente zur Beschichtung der Kalkputzprobeplatten

Name des Pigmentes	Farbe	Probeplattenbeispiel (Fotos T. Trapp)	Chemische Formel	Bindemittel
Kalkweiß	weiß		CaCO_3	-
Mennige	orange		$\text{Pb}_3\text{O}_4 = 2\text{PbO} \cdot \text{PbO}_2$	Leim
Paratacamit (Atelit)	grün-türkis		$\gamma\text{-CuCl}_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{OH})_2$	
Eisenoxidrot	hellbraun		Fe_2O_3	
	dunkelbraun			Casein

Nach der Trocknung wurde auf die Farbschicht, wie bei den geschädigten Wandmalereiobjekten, eine Caseinschicht als Schutzüberzug aufgebracht. Hierbei wurden zwei verschiedene Suspensionsverfahren für das Casein unterschieden; zum einen wurde das Casein in einer gesättigten Kalklösung suspendiert, entsprechend der historischen Herstellung von Sumpfkalkcasein (KC), zum anderen wurde eine Suspension in gesättigter Ammoniumcarbonatlösung hergestellt, sogenanntes Ammoniumcasein (AC). Diese Caseinsuspensionen wurden mit einem Pinsel auf die

Kalkputzprobepplatten aufgetragen, wobei auf jeder Probeplatte die linke Seite einfach und die rechte Seite zweifach beschichtet wurde.

Die so entstandenen Oberflächen der Kalkputzprobepplatten sind den Wandmaleroberflächen detailgenau nachempfunden; einzig das durch die Alterung der Caseinüberzüge verursachte Schadensbild fehlt hier noch auf den Prüfkörpern.

7.3 Künstliche Alterung in der Klimakammer

Die Alterung der Caseinüberzüge wurde durch eine gezielte Simulation der jahreszeitlichen Witterungszyklen in einer Klimakammer künstlich erzeugt. Im Institut für Gebäude- und Solartechnik, Braunschweig wurden die Kalkputzprobepplatten in einem solchen, autark klimatisierten Raum behandelt, wo sie einer dem Ablauf der Jahre entsprechenden Variation von Temperatur und Luftfeuchtigkeit unterzogen wurden [60]. Die verwendeten thermisch hygri-schen Belastungsparameter wurden anhand von Langzeituntersuchungen am Objekt Kapitelsaal, St. Alexanderkirche Wildeshausen erarbeitet [60]. Anschließend wurden die Belastungsparameter bei Probepplattenversuchen in Klimaschränken optimiert, bevor sie in mehreren Stufen an den Probepplatten in der Klimakammer nachvollzogen wurden (s. Tab. 6, S. 36). In den dreitägigen Belastungsintervallen ist die tageweise sprunghafte Änderung von Luftfeuchtigkeit und Temperatur zu erkennen, die den beschleunigten Alterungsprozess der Probepplatten verursachen. Innerhalb weniger Monate konnte so das Entstehen der altersbedingten Schäden durch



Abb. 17: Schadensbild durch Casein auf Probeplatte 100, Mennige, Kalkcasein nach Alterung (Foto T. Trapp)

die aufplatzenden und abrollenden Caseinschichten erzeugt werden (s. Abb. 17), welche sich sonst erst im Verlauf mehrerer Jahrzehnte einstellen.

An den auf diese Weise künstlich gealterten Probplatten konnten dann einerseits die von den Restauratoren des NLD für einen späteren Einsatz ausgewählten Festigersubstanzen Klucel E und Plextol B 500 getestet werden und andererseits die enzymatische Abnahmemethode etabliert werden.

Tab. 6: Belastungskurven der thermisch hygri-schen Probplattenbelastungen in der Klimakammer [60]

Belastungs- kurven	Belastungs- dauer [d]	Belastungsparameter Luftfeuchtigkeit [%]	Belastungsparameter Temperatur [°C]
1	0-1	90	29
	1-2	25	6
	2-3	90	29
2	0-1	25	29
	1-2	90	6
	2-3	25	29
3	0-1	25	29
	1-2	90	
	2-3	25	
4	0-1	25	6
	1-2	90	
	2-3	25	
5	0-1	90	29
	1-2		6
	2-3		29
6	0-1	25	29
	1-2		6
	2-3		29

8. Caseinschichtdickenanalytik

Ein wichtiger Faktor zur Beschreibung einer enzymatischen Abbaureaktion ist die Schichtdicke des Caseinüberzuges, da diese Informationen über die nötige Anwendungsdauer der Abnahmemethode liefert. Zur Bestimmung solcher Schichtdicken stehen verschiedene Analysenverfahren zur Verfügung, die sich in der prinzipiellen Methodik unterscheiden:

- Profilometrie – Flächenabtastung mit Nadel (Auflagekraft 20 mg/mm^2), Ermittlung eines Oberflächenprofils an der Beschichtungskante, Auflösung 10 nm [61]
- Spektroskopische Ellipsometrie – Optische Analyse von Absorptions- und Brechungsverhalten, Modellierung der Schicht anhand ermittelter Parameter, Voraussetzung: Kenntnis der optischen Eigenschaften des Untergrundmediums, Auflösung $0,1 \text{ nm}$ [62-66]
- Mechanische Verfahren – z.B. Mikrometerschraube, Differenzbestimmung durch Schichtmessung vor und nach Caseinbeschichtung, Auflösung 100 nm

Da der Caseinüberzug als dünner, transparenter Film aus organischem Material ein komplexes Substrat ist, und vergleichbare Untersuchungen in der Literatur fehlen, wurden alle Verfahren auf eine Eignung zur Bestimmung der Caseinschicht getestet.

8.1 Schichtdickenbestimmung

Die starke Strukturierung der Oberflächen von Kalkputzprobepplatten und Objekten verhindert die direkte Bestimmung der Caseinschichtdicken auf diesen Oberflächen. Nur unter Verwendung von Modellsystemen mit ebenen Oberflächen (z.B. Glasträger, Siliziumwaver) gelingt die Beschreibung der Schichtdicke. Die resultierenden Schichtdicken nach Beschichtung mit Caseinsuspensionen von $c_{\text{Casein}} = 10 \text{ g/L}$ zeigen eine Abhängigkeit von der Art des Beschichtungsverfahrens, mit dem die Schichten auf die Träger aufgetragen wurden (s. Tab. 7). So sind alle Schichten, die mit dem spin-off-Rotations-Verfahren aufgespint wurden um den Faktor 100 dünner als Schichten, die auf herkömmliche Weise mit einem Pinsel aufgetragen wurden. Somit sind es vor allem die Schichtdicken, die auf bepinselten Glasträgern ermittelt wurden, die näherungsweise auf die Kalkputzoberflächen übertragen werden können, auch da per spin-off aufgetragene Caseinschichten nur wenig der realen Situation auf den Wandmalereien entsprechen. Die aufgebepinselten Caseinschichten liegen im Bereich von $d_{\text{Schicht}} = 14 - 15 \text{ }\mu\text{m}$ ($z_{\text{rel}} = 0,71 \%$).

Tab. 7: Verschiedene Verfahren zur Bestimmung der Caseinschichtdicken [42]

Messverfahren	Träger	Beschichtungsverfahren	Casein-Schichtdicke d_{Schicht} [nm]	Rel. Fehler z_{rel} [%]	Bemerkung
Profilometrie	Si-Waver	spin-off	129	7,75	-
	Glasträger	Pinsel	-	-	Nicht messbar
Spektroskopische Ellipsometrie	Si-Waver	spin-off	170	0,06	-
			122	0,08	Nach 3 Wochen UV-Alterung
	Glasträger	Pinsel	-	-	Nicht messbar
Mechanisch, Mikrometerschraube			1400-1500	0,71	-
	Si-Waver	spin-off	100-200	100	Nicht aussagefähig

Die Messverfahren Profilometrie und spektroskopische Ellipsometrie lassen sich nur unter Verwendung des spin-off-Verfahrens und der sehr ebenen Siliziumwaver-Oberflächen anwenden. Herkömmliche Materialien und Beschichtungen erzeugen zu strukturierte Oberflächen und können einzig mit mechanischen Messverfahren, wie der Mikrometerschraube, erfasst werden. Dieses Verfahren wiederum ist aufgrund seiner geringen Auflösung ungeeignet, mit dem spin-off-Verfahren hergestellte Schichten zu erfassen, da Fehler von bis zu $z_{\text{rel}} = 100$ % resultieren.

Wie in Tabelle 7 weiterhin zu sehen, führt eine dreiwöchige UV-Bestrahlung der Oberfläche zu einer Verringerung der Schichtdicke von $d = 170$ nm um 28,2 % auf $d = 122$ nm. Ursächlich hierfür ist, dass Casein reversibel Wasser in seine Struktur einlagern und wieder an die Umgebung abgeben kann. Die durch die UV-Bestrahlung verursachte Wasserabgabe aus einer frisch hergestellten Caseinschicht führt zu einer Abnahme der Schichtdicke. Darüber hinaus treten innerhalb der Schicht Spannungen auf, die zu Rissen führen können. Besonders bei reversibler Wasseraufnahme und -abgabe über einen langen Zeitraum entsteht dieser Effekt, der dem an Caseinschichten auf Wandmalereien und Probelplatten beobachteten Abrollen der Malschichten entspricht.

Da Daten über die Caseinschichtdicken auf Kalkputzoberflächen nicht direkt zugänglich sind, wurde zur genaueren Beschreibung der Schichten die Caseinbeladung der Prüfkörper mit Hilfe des BCA-Proteinassays untersucht. Hierzu wird von der Oberfläche

eine dünne Schicht ($d \approx 50 \mu\text{m}$) mit 1 cm^2 Fläche abgetragen und die Proteinkonzentration der Probe nach Lösung der Proteine in $2 \text{ mL } 1 \text{ M NaOH}$ und Farbkomplexierung photometrisch bei $\lambda = 560 \text{ nm}$ bestimmt. Abbildung 18 zeigt einen Vergleich der Zunahme der Caseinbeladung bei wiederholter Beschichtung für Glaträger und Probeplatten, wobei als Beispiel Probeplatte 139 mit Eisenoxidrot (Wienhausen)-Pigmentierung, Ammoniumcasein ausgewählt wurde.

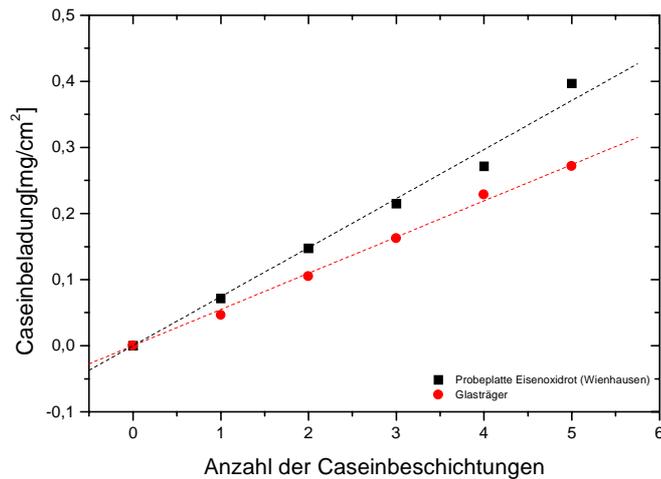


Abb.18: Entwicklung der Caseinbeladung mit steigender Beschichtungshäufigkeit für verschiedene Oberflächen [42]

Es resultiert eine höhere Caseinbeladung für die Probeplattenoberfläche als für die Glaträger. Diese wird einerseits durch die starke Unebenheit der Oberfläche im Vergleich zum Glaträger bedingt, da sich Casein in den Oberflächenmulden der Probe sammeln kann. Andererseits nimmt das Probeplattenmaterial Feuchtigkeit auf, so dass die Caseinsuspension teilweise in die Oberfläche eingetragen wird, anstatt nur als Schicht auf der Oberfläche aufzuliegen. Der invasive BCA-Proteinassay erfasst auch dieses eingetragene Casein, so dass die Differenz der beiden Oberflächenverläufe die Menge des eingetragenen Caseins widerspiegelt. Die durchschnittliche Caseinbeladung pro Beschichtung ergibt sich zu $B_{\text{cas}} = 0,054 \text{ mg/cm}^2$, wobei der zusätzliche, einmalige Anteil von in die Probeplattenoberfläche eingetragenen Casein bei $B_{\text{Eintrag}} = 0,027 \text{ mg/cm}^2$ liegt. Der relative Fehler der Einzelmessung ergibt sich zu $z_{\text{rel}} = 13,76 \%$.

8.2 Enzymatischer Abbau von Caseinschichten

Die Bestimmung der Abnahmegeschwindigkeit einer Caseinschicht während eines enzymatischen Caseinabbaus kann messtechnisch nicht an einer Probeplattenoberfläche

verwirklicht werden. Denn im wässrigem Medium der enzymatischen Abbaureaktion lassen sich die herkömmlichen Schichtdickenanalytiken nicht anwenden, da sie entweder die gequollene Caseinschicht nicht erfassen oder den Flüssigkeitsfilm als Überzug fehlinterpretieren. Nur an makroskopischen geometrischen Körpern können diese Parameter mit Hilfe der Mikroskopie bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden daher konzentrierte Caseinsuspensionen ($c_{\text{Casein}} \cdot 180 \text{ g/L}$) 2 Wochen an der Luft ausgehärtet und aus der resultierenden kunststoffartigen Formmasse Würfel mit der Kantenlänge 2 mm geschnitten (s. Abb. 19 A). Die sehr homogene und ebene Oberfläche dieser Casein-Würfel, die einen gleichmäßigen enzymatischen Angriff ermöglicht, ist in Abbildung 19 B zu erkennen.

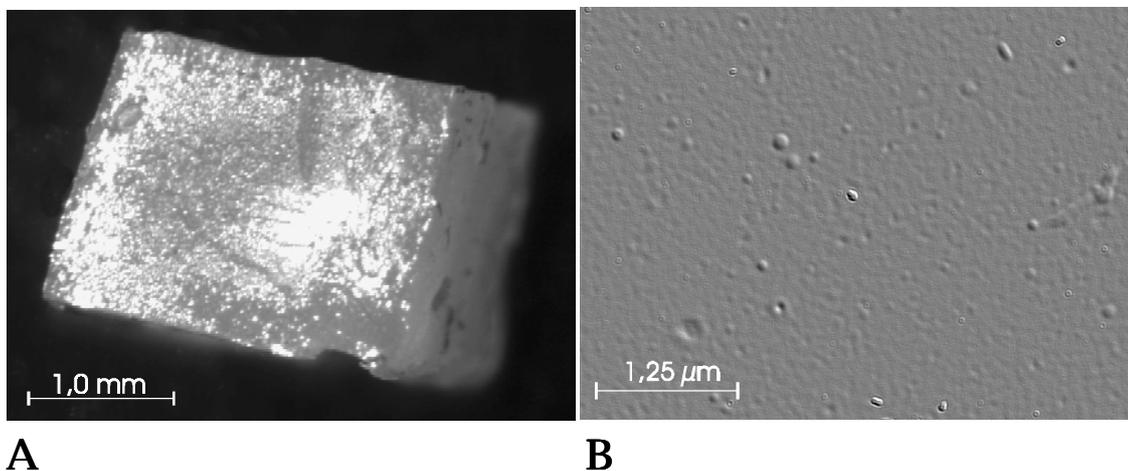


Abb.19: Mikroskopische Aufnahmen von Würfeln aus getrocknetem Casein zur Bestimmung der Schichtdickenabnahme­geschwindigkeit: A: 20-fache Vergrößerung; B: 800-fache Vergrößerung

Da bei einem Abbau in nativer Lösung der enzymatische Angriff von allen Seiten des Würfels gleichberechtigt erfolgt, ergibt sich die zu untersuchende Schichtdicke zu $d = 1 \text{ mm}$, der halben Würfelmantellänge. Die mikroskopische Verfolgung der zeitlichen Entwicklung der Würfelmantel zeigt eine lineare Abnahme der Caseinschichtdicke in Abhängigkeit von der eingesetzten Enzymkonzentration (s. Abb. 20 A). Diese Linearität des Abbauperlaufes wird dadurch verursacht, dass die zeitliche Schichtdickenabnahme im Gegensatz zur zeitlichen Volumenabnahme unabhängig von der Größe der Oberfläche ist, unter der Voraussetzung, dass das Enzym im Überschuss vorliegt. Der relative Fehler der Einzelmessung liegt bei $z_{\text{rel}} = 2,05 \%$.

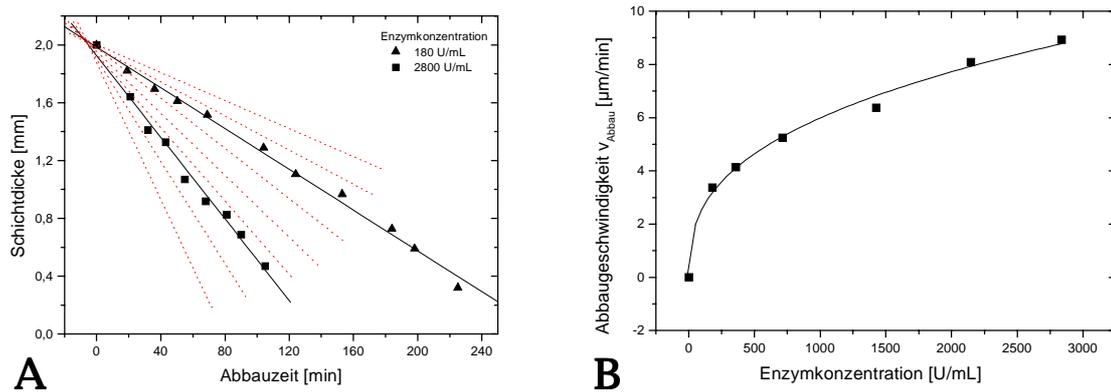


Abb.20: A: Caseinschichtdickenabnahme während des enzymatischen Caseinabbaus bei Variation der Enzymkonzentration ($c_{\text{A-2,5DXL}}$: 1. 180 U/mL; 2. 2800 U/mL) [42]

B: v_{Abbau} in Abhängigkeit der Enzymkonzentration von $c_{\text{A-2,5DXL}} = 0 - 2800 \text{ U/mL}$ [42]

Aus den Steigungen der Geraden lassen sich die Abbaugeschwindigkeiten ermitteln. Da die Abbaugeschwindigkeit durch den Faktor 2 dividiert werden muss, um das Quellverhalten der Casein-Würfel in der Reaktionslösung zu berücksichtigen, ergibt sich eine maximale Abbaugeschwindigkeit von $v_{\text{max}} = 8,93 \mu\text{m}/\text{min}$ für die eingesetzte native Alkalase® 2,5 DX L (s. Abb. 20 B), bei einem relativen Fehler von $z_{\text{rel}} = 6,29 \%$. Die Abbaugeschwindigkeit immobilisierter Enzyme kann, wenn man den Aktivitätsverlust von 74 % durch die Immobilisierung des Enzyms (s. Kap. 6) berücksichtigt, zu maximal $v_{\text{max}} = 2,32 \mu\text{m}/\text{min}$ für den enzymatischen Abbau von Casein auf Oberflächen mit Immobilisat kalkuliert werden.

9. Charakterisierung der Abbaureaktion mittels RP-HPLC

Die Produktzusammensetzung der Proteolyse von Casein kann mit Hilfe der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) qualitativ und quantitativ analysiert werden.

In einem polaren Laufmittel (mobile Phase) wird eine Probe unbekannter Zusammensetzung beim Lauf über eine Säule mit unpolarer Funktionalisierung (stationäre Phase) aufgetrennt. Diese Auftrennung beruht auf der jeweiligen Interaktion der verschiedenen Probemoleküle mit stationärer und mobiler Phase in Abhängigkeit ihrer Polarität und Masse. Nach verschiedenen Retentionszeiten erreichen die Probenmoleküle den Säulenausgang und können mit einer nachgeschalteten Analytik detektiert werden, z.B. Zucker mit Brechungsindex-Detektoren, Peptide mit UV-Detektoren oder derivatisierte Aminosäuren mit Fluoreszenzdetektoren [67].

9.1 Aminosäureanalytik

Unverzichtbar für eine umfassende Dokumentation der proteolytischen Caseinzersetzung ist die genaue Kenntnis der Freisetzung der Aminosäuren aus den Caseinmolekülen, da diese die Endprodukte der Abbaureaktion sind. Wertvolle Hinweise für die Ermittlung von Geschwindigkeiten, Produktverteilung und Mechanismus der Hydrolyse können durch Art und Zeitpunkt des Auftretens der Aminosäuren erhalten werden. Die als Aminosäureanalytik verwendete RP-HPLC-Applikation mit Methanol/H₂O-Gradient, sowie OPA-Derivatisierung und Probenvorbereitung werden im Anhang 16.12 beschrieben. Abbildung 21, in der jeder Peak einer Aminosäure entspricht, zeigt die HPLC-Spektren der Abbaureaktion einer 2,0 g/L Caseinlösung mit $c_{A-2,5DXL} = 3,07 \text{ U/mL}$, die bei Abbauezeiten von $t_{\text{Abbau}} = 0 - 53,6 \text{ h}$ aufgenommen wurden. Die genauen Retentionszeiten und Kapazitätsfaktoren der einzelnen Aminosäuren finden sich im Anhang 16.12.5, Tabelle 20. Die zeitliche Entwicklung der Aminosäurekonzentrationen belegt eine späte Freisetzung der Aminosäuren aus den Caseinmolekülen, die erst nach über $t_{\text{Abbau}} = 24 \text{ h}$ sprunghaft einsetzt. Vor diesem Zeitpunkt werden nur einzelne Aminosäuren, wie Trp, Ser und Lys, in geringem Maße freigesetzt.

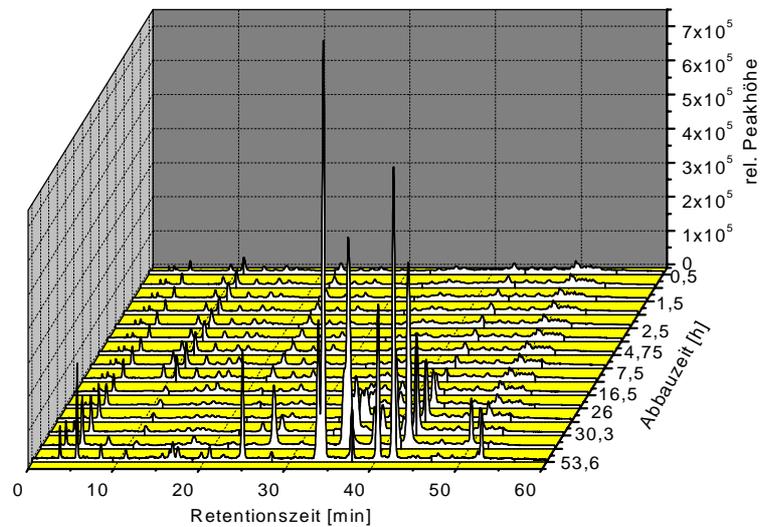


Abb.21: Zeitliche Entwicklung der Aminosäurekonzentration während des Caseinabbaus [42]

Abbildung 22 A verdeutlicht diesen Aspekt. Sie zeigt die Massenbilanz der Aminosäuren in der Reaktionslösung. Im Zeitraum von $t_{\text{Abbau}} = 2 - 8$ h kommt es zu einer ersten Freisetzung von Aminosäuren bis zu einer Gesamtkonzentration von $0,2 \text{ g/L}$ ($\equiv 10\%$ Abbau). Anschließend kommt dieser Prozess bis zu einer Abbauzeit von $t_{\text{Abbau}} = 25$ h zum Erliegen. Bei $t_{\text{Abbau}} = 25$ h setzt dann die vermehrte Freisetzung von Aminosäuren ein, die erst nach $t_{\text{Abbau}} \geq 72$ h (3 Tage) bei Abschluss der Totalhydrolyse zum Erliegen kommt. Nach dieser Zeit ist alles in der Lösung vorhandene Casein in einzelne Aminosäuren zerlegt ($\equiv 100\%$ Abbau). Die Konzentrationsverläufe der einzelnen Aminosäuren (s. Abb. 22 B) zeigen für Trp, Lys und Ser einen frühen Konzentrationsanstieg, der auf der Spaltung der von der Alkalase bevorzugten Bindungen beruht. Der nahezu konstante Bereich von $t_{\text{Abbau}} = 8 - 25$ h markiert das Gebiet der Peptidspaltung ohne bestimmte Präferenzen, indem große Peptidfragmente in immer kleinere Bruchstücke überführt werden.

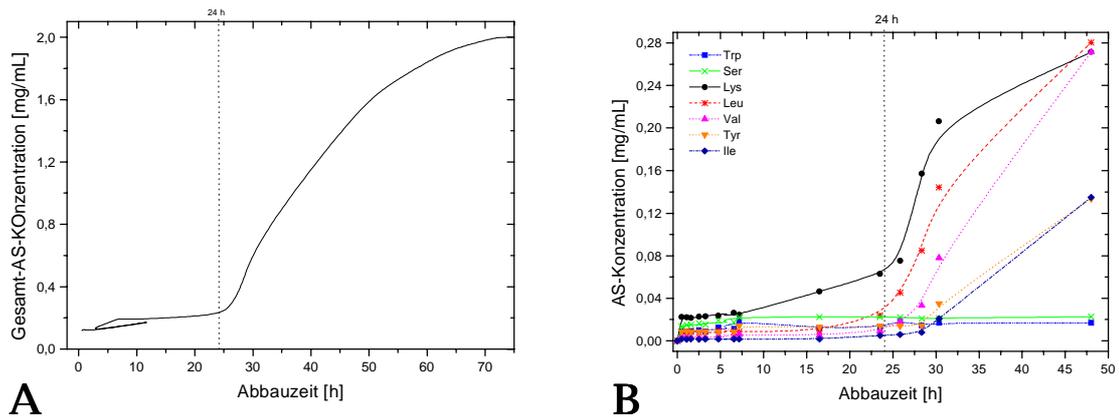


Abb. 22: A: Massenbilanz der Aminosäuren bei enzymatischem Caseinabbau

B: Konzentrationsverläufe der Aminosäuren Trp, Leu, Lys, Ser, Val, Tyr, Ile im Abbauzeitraum von $t_{\text{Abbau}} = 0 - 50$ h.

Erst nach $t_{\text{Abbau}} = 25$ h ist dieser Prozess abgeschlossen und es kommt zum Bruch der letzten Peptidbindungen, was eine vermehrte Freisetzung der Aminosäuren zur Folge hat. Die Konzentrationen der in der Aminosäuresequenz von Caseinen häufig auftretenden Aminosäuren Ile, Tyr, Val, Leu und Lys steigen daher ab diesem Zeitpunkt stark an.

Aufgrund der späten Freisetzung der Aminosäuren ist die Aminosäureanalytik nicht zur schnellen Dokumentation des enzymatischen Caseinabbaus geeignet.

9.2 Peptidanalytik

RP-HPLC-Applikationen zur Peptidbestimmung ermöglichen die Dokumentation der Abbauprodukte des Caseinabbaus. Tabelle 8 zeigt eine Auswahl der in der Literatur beschriebenen Anwendungen für diesen Zweck. Die Variationen der Methodenparameter in diesen Anwendungen sind nur gering:

- C-18 Säulen haben sich bewährt, seltener auch polarere C-8 Säulen. Die Korngrößen der Füllkörper liegen zwischen 5 – 10 μm , wobei 5 μm -Füllungen bessere Trennergebnisse liefern. Die Säulenlängen und –durchmesser variieren stark.
- Es zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede bei der Eluentenwahl.
- Die Flussraten variieren zum Teil stark, je nach Zielsetzung der Analyse. Es gibt eine Tendenz zu niedrigen Flussraten, wie $f_v = 0,2$ mL/min, die eine bessere Auflösung der Produktpeaks bewirken.
- Die UV-Detektion bei $\lambda = 214$ nm ist optimal.

Tab. 8: RP-HPLC-Applikationen zur Peptidanalytik von Caseinabbauprodukten (Die optimierte, in diesem Projekt eingesetzte Applikation ist grau unterlegt)

Säule	Eluent	Flussrate f_v [mL/min]	UV-Detek- tion [nm]	Litera- tur
C-18 Milli-Waters RCM μ Bondpak, 10 μ m, 25*100 mm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 0,1 % (v/v) TFA + 80 % (v/v) Acetonitril	44,0	214	[68]
C-8 Zorbax 300 SB, 5 μ m, 150*2,1 mm			280	[69]
C-18 Supersphere 100, 5 μ m, 150*2,1 mm		0,2	214	[70]
C-18 Nucleosil AB, 5 μ m, 125*2,1 mm				
C-18 Deltapak 300 Å, 150*2,0 mm, 5 μ m				
C-18 Waters μ Bondpak, 10 μ m, 300*3,9 mm	A: 0,115 % (v/v) TFA B: 0,1 % (v/v) TFA + 60 % (v/v) Acetonitril	2,0		[71]
C-18 LiChrosorb, 5 μ m, 250*4 mm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 0,1 % (v/v) TFA + 100 % (v/v) Acetonitril	1,0	215	[72]
C-8 Apex 120 Å	A: 0,1 % (v/v) TFA, pH 2,1 B: 0,08 % (v/v) TFA + 50 % (v/v) Acetonitril, pH 2,3	0,8	206	[73]
C-18 Nucleosil AB, 5 μ m, 100*2,1 mm	A: 0,1 % (v/v) TFA B: 0,1 % (v/v) TFA + 80 % (v/v) Acetonitril	0,3	214	-

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Applikationen wurde die in dieser Arbeit verwendete, optimierte Methode erarbeitet (s. Tab. 8 + Anhang 16.10). Der Einsatz des toxischen Acetonitril (MAK-Wert: 40 ppm) ist aufgrund der geringeren Viskosität im Vergleich zu Methanol angezeigt, wodurch ein Arbeiten bei geringen Drücken ermöglicht wird, was eine höhere Selektivität zur Folge hat. Der optimierte Elutionsgradient ist in Anhang 16.10.2 dargestellt. Die Detektion erfolgt im UV-Bereich bei $\lambda = 214$ nm, wo

zum einen die Eigenabsorption des Lösemittels Acetonitril gering und zum anderen das Absorptionsmaximum der Peptidbindung nahe ist ($\lambda_{\max} = 195 \text{ nm}$).

9.2.1 Trennfähigkeit der stationären Phase

Die Trennfähigkeit der stationären Phase lässt sich durch Analyse verschiedener Standardlösungen von Oligopeptiden ermitteln. Tabelle 9 zeigt die Oligopeptidauswahl, die für diese Versuche verwendet wurden.

Tab. 9: Peptidstandards zur Trennfähigkeitsanalyse

Peptid	Aminosäuren	Molmasse [Da]	Retentionszeit t_R [min]
L-Alanyl-glycin	2	146,1	2,5
Glycyl-L-prolin		172,2	
L-Prolyl-glycin		160,2	
L-Alanyl-L-alanin		189,2	
Glycyl-glycyl-glycin	3	303,3	
Pentaglycin	5	766,1	7,8
α -Caseinfragment 100-105	6	772,0	18,6
β -Casomorphin 75-81	7		

Es zeigt sich, dass Oligopeptide aufgrund ihrer hohen Polarität erst ab einer Größe von Hexapeptiden eine Wechselwirkung mit der Säule eingehen. Die in Hinblick auf die Analyse der Caseinabbauprodukte gewählten Peptide α -Caseinfragment und β -Casomorphin sind kommerzielle Isolate aus dem enzymatischen Caseinabbau und empfehlen sich daher besonders für den Einsatz. Abbildung 23 zeigt das Spektrum einer Standardmischung dieser Peptide.

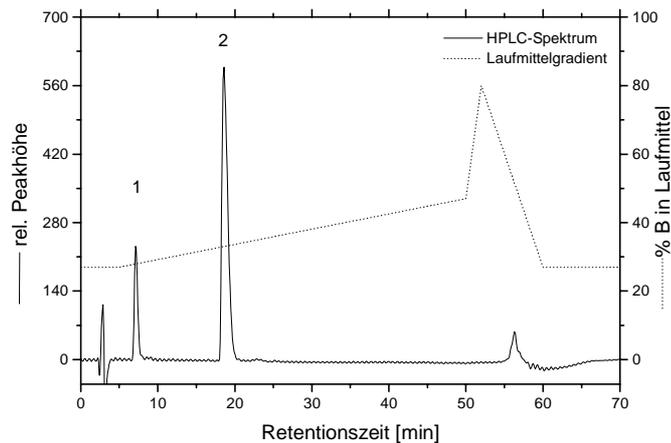


Abb. 23: Spektrum von α -Caseinfragment $c = 8,16 \cdot 10^{-6}$ mol/L (Peak 1) und β -Casomorphin $c = 7,72 \cdot 10^{-6}$ mol/L (Peak 2) mit eingezeichnetem Laufmittelgradienten [42]

Es wird eine vollständige Auftrennung der beiden Peptidkomponenten erreicht; das polare α -Caseinfragment eluiert dem Laufmittelgradienten entsprechend mehr als 10 min vor β -Casomorphin von der Säule.

Wesentlichen Einfluss auf die Trennung der Abbaufragmente hat die Flussrate des Eluenten. Entgegen Literaturangaben [69, 70], in denen Flussraten von $v = 0,2$ mL/min bevorzugt werden, zeigt sich eine optimale Trennung der Peptide bei $v = 0,3$ mL/min.

9.2.2 Fingerprint des nativen Caseinabbaus

Die Reaktionszeit des enzymatischen Caseinabbaus hat den wohl größten Einfluss auf die Produktzusammensetzung. Abbildung 24 zeigt die Spektren der Abbauprodukte für enzymatische Caseinabbaureaktionen in Lösung mit nativer Alkalase® 2,5 DX L. Die Reaktionen wurden standardisiert gemäß Anhang 16.10.4 durchgeführt. Dargestellt sind die Produktspektren der Abbaueiträume zwischen $t_{\text{Abbau}} = 5 - 1800$ s.

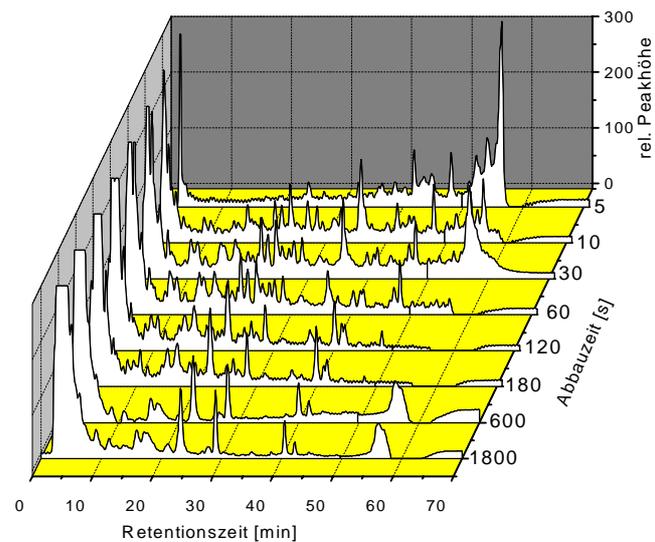


Abb. 24: Spektren der Caseinabbauprodukte in Abhängigkeit von der Abbauzeit; $c_{\text{Casein}}=2,0 \text{ g/L}$;
 $c_{\text{A-2,5DXL}}=3,07 \text{ U/mL}$ [42]

Zu Beginn der Abbaureaktion überwiegen große und unpolare Makropeptide, die spät von der Säule eluieren ($t_R = 50 - 60 \text{ min}$), aber diese werden schnell weiter zersetzt und sind nach $t_{\text{Abbau}} = 60 \text{ s}$ gänzlich verschwunden. Die Retentionszeiten der Produkte werden mit fortschreitendem Abbau immer kleiner, da die Alkalase® die Peptide in immer kleinere und polarere Fragmente zerlegt. So sind nach $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$ fast keine Peptide mehr vorhanden, die mit der Säule interagieren. Auffällig ist die frühe Bildung von kleinen Peptiden, die nicht mit der Säule wechselwirken. Diese Peptide stammen aus gut zugänglichen, z.B. terminalen Bereichen der Caseine und Bereichen mit bevorzugten Bindungen.

9.2.3 Abbauprofile ausgesuchter Fragmente

Der Mechanismus der proteolytischen Caseinzersetzung lässt sich durch die zeitliche Konzentrationsentwicklung ausgesuchter Abbaufragmente beschreiben. Die kommerziellen Isolate α -Caseinfragment und β -Casomorphin werden auch im Caseinabbau mit Alkalase® gebildet (s. Abb. 25 A) und ermöglichen es, diese Abbaufragmente zu quantifizieren. Aus der zeitlichen Verfolgung der Konzentrationsänderung ergeben sich Konzentrationsprofile für die Fragmente (s. Abb. 25 B) (Kalibrationsgeraden α -Caseinfragment und β -Casomorphin s. Anhang 16.10.6).

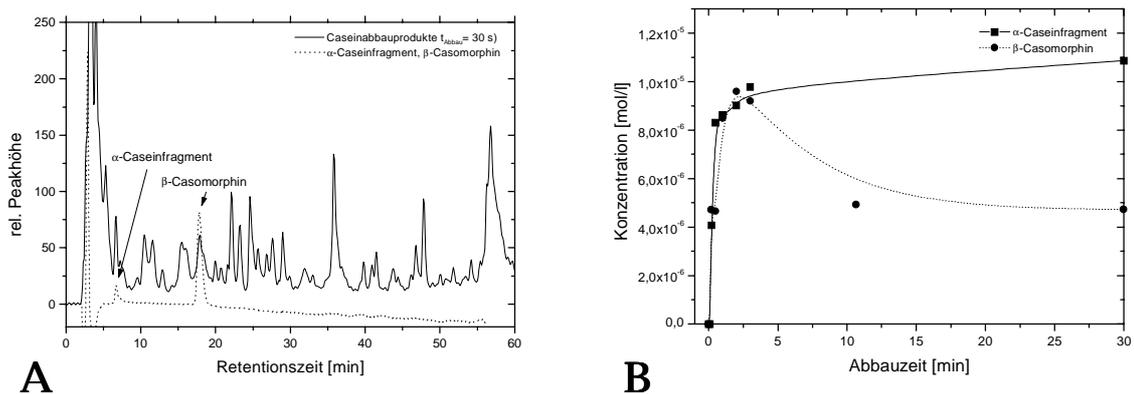


Abb. 25: A: Qualitativer Vergleich eines Laufs kommerzieller Isolate mit einer Abbauprobe

$$(c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}, c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07 \text{ U/mL}, t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ s}) \quad [42]$$

B: Konzentrationsprofile der Fragmente α -Caseinfragment und β -Casomorphin [42]

Beide Fragmente werden sehr schnell freigesetzt und liegen schon nach $t_{\text{Abbau}} = 1 \text{ min}$ in einer Konzentration von $c = 9,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ vor. Dann wird in der Folge das β -Casomorphin zügig abgebaut, während das α -Caseinfragment im betrachteten Zeitraum von $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$ konstant weiter gebildet wird bis zu einer Konzentration von $c = 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$. Nachdem das Substrat Casein vollständig in Peptidfragmente zersetzt ist, schwächt sich aber auch für das α -Caseinfragment die anfänglich sehr hohe Bildungsgeschwindigkeit ab. Die trotz Substratmangels fortwährende Bildung dieses Fragmentes, die sich im Konzentrationsprofil zeigt, ist auf die Freisetzung des α -Caseinfragmentes aus anderen Peptidfragmenten zurückzuführen. Deren Freisetzungsgeschwindigkeit ist zwar geringer, dauert aber solange an, bis alle beteiligten Peptidfragmente vollständig zersetzt sind.

Für eine weitere Charakterisierung der Abbaureaktion wurden verschiedene Abbaufragmente ausgewählt, deren Profile nicht quantifiziert werden konnten, da keine reinen Isolate zur Verfügung standen. Ausgewählt wurden 5 Abbaufragmente mit Retentionszeiten von I: $t_{\text{R}} = 22,7 \text{ min}$; II: $t_{\text{R}} = 28,8 \text{ min}$; III: $t_{\text{R}} = 36,0 \text{ min}$; IV: $t_{\text{R}} = 40,0 \text{ min}$; V: $t_{\text{R}} = 41,7 \text{ min}$. Die der Konzentration direkt proportionale relative Peakhöhe in den Spektren zeigt bei zeitlicher Verfolgung, der Konzentration entsprechende Profile der Abbaufragmente (s. Abb. 26).

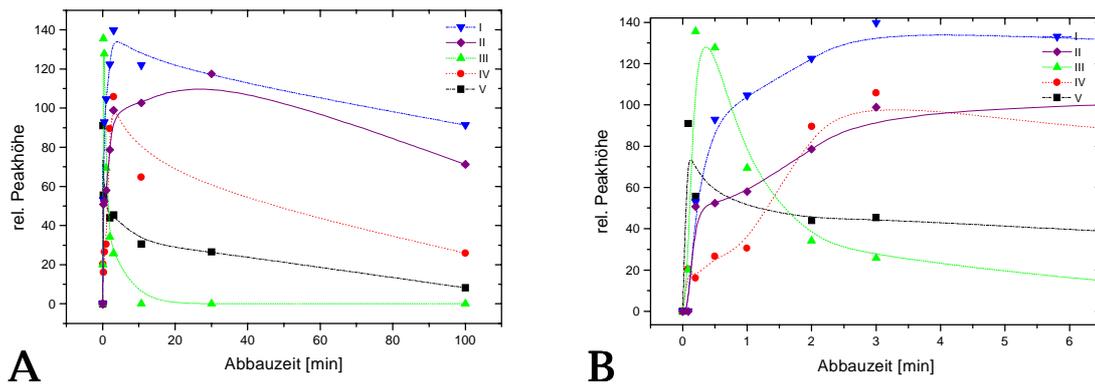


Abb. 26: A: Abhängigkeit der relativen Peakhöhe ausgesuchter Fragmente von der Abbauzeit [42]
 B: Vergrößerung des Abschnittes bis $t_{\text{Abbau}} = 6 \text{ min}$ [42]

Es ergibt sich ein differierendes Bild für die verschiedenen Peptidfragmente. Während alle Fragmente schon nach wenigen Sekunden nachzuweisen sind, sinkt die Konzentration einiger Peptide (III, V) schnell wieder ab, während andere (I, II) lange in hohen Konzentrationen nachzuweisen sind. Ursache hierfür ist wohl die schwach ausgeprägte Selektivität der Alkalase®-Immobilisate gegenüber hydrophoben Aminosäureresten, die in den Fragmenten III und V vorhanden sind und einen Angriff begünstigen, was zu einer hohen Zersetzungsgeschwindigkeit der Fragmente führt. So lassen auch die hohen Retentionszeiten auf große, unpolare Peptide schließen, die zu Beginn der Abbaureaktion gebildet werden. Deren Bildungsgeschwindigkeit nimmt aufgrund schwindender Caseinkonzentration schnell ab, so dass schon nach $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ s}$ die Zersetzung dieser Peptide überwiegt und im Konzentrationsprofil die stark positive Anfangssteigung nach Durchlaufen eines Maximums in eine exponentiell abfallende Abbaukurve übergeht (s. Abb. 26 B). Kleinere und polarere Fragmente, wie I und II, werden langsamer aus dem Casein freigesetzt, bleiben aber über längere Zeiträume in hohen Konzentrationen erhalten. Diese Peptidfragmente sind stabil und werden zum Teil aus verschiedenen Makropeptiden gleichzeitig freigesetzt; Indizien hierfür sind auch die auftretenden Terrassenpunkte in den Profilen.

Die Abbauergebnisse der RP-HPLC-Untersuchungen lassen sich mit den Daten der photometrischen Untersuchungen korrelieren, wenn wie bei der EPE-Methode die zeitliche Entwicklung der Produktverteilung bestimmt wird. Da die Molmassen der freigesetzten Abbaufragmente nicht bekannt sind, wurde die Korrelation gegen die mittlere, relative Peakhöhe, die der Konzentration direkt proportional ist, durchgeführt (s. Abb. 27).

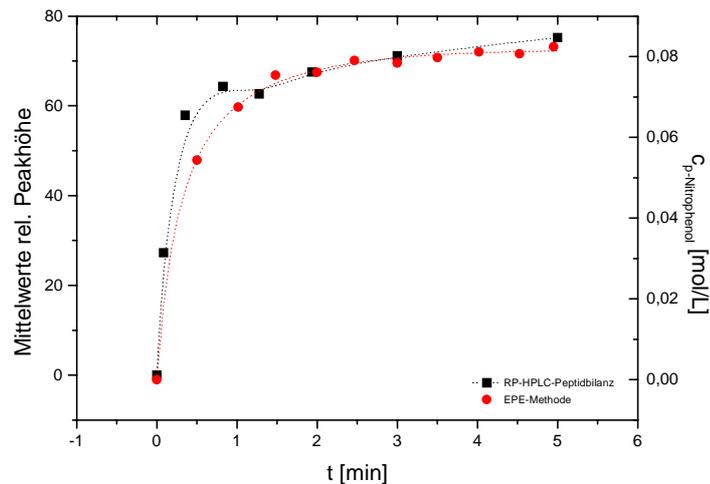


Abb. 27: Korrelation der RP-HPLC mit der EPE-Methode, Reaktionsbedingungen: Substrat:

$$c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L bzw. } c_{\text{Valester}} = 5 \text{ g/L, } c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07 \text{ U/mL, } t_{\text{Abbau}} = 5 \text{ min, } T = 25^\circ\text{C, } 750 \text{ rpm}$$

Es zeigt sich eine gute Korrelation der Abbauergebnisse, wobei die Abweichungen innerhalb der Fehlergrenzen liegen. Eine signifikante Abweichung existiert bei $30 \text{ s} < t_{\text{Abbau}} < 1 \text{ min}$, wo die RP-HPLC-Daten aufgrund der beim Abbau schnell freigesetzten Makropeptide ein intermediäres Maximum durchlaufen, während bei der kontinuierlichen Zersetzung des Valinestersubstrates ein konstanter hyperbolischer Verlauf resultiert.

Insgesamt gesehen ist der enzymatische Caseinabbau mit Alkalase sehr effektiv; das gesamte Casein ist nach wenigen Sekunden in Peptide überführt. Diese zerfallen ihrerseits auf spezifische Art und Weise kaskadenartig in immer kleinere Peptidfragmente. Einige Peptide erweisen sich als stabil und werden aus verschiedenen Eduktfragmenten gebildet, andere zerfallen so schnell wie sie entstanden sind. Diese charakteristischen Muster finden ihren Ausdruck in den Spektren, die so Fingerprints für verschiedene Abbauzeitpunkte darstellen. Diese Fingerprints sind Momentaufnahmen des Caseinabbaus und zur Beurteilung des Fortganges der enzymatischen Zersetzung eine große Hilfe.

9.2.4 Abbau mit Immobilisaten

Die Produktverteilung einer enzymatischen Caseinzersetzung wird durch die Immobilisierung des Enzyms beeinflusst, da in Folge einer Immobilisierung die Abbaugeschwindigkeit stark abnimmt. So differieren die Fingerprints für Abbaureaktionen mit nativen Enzymen von denen mit Immobilisaten. In Abbildung 28

sind die Abbauspektren einer Caseinabbaureaktion mit auf Epoxidmembran immobilisierter Alkalase® dargestellt.

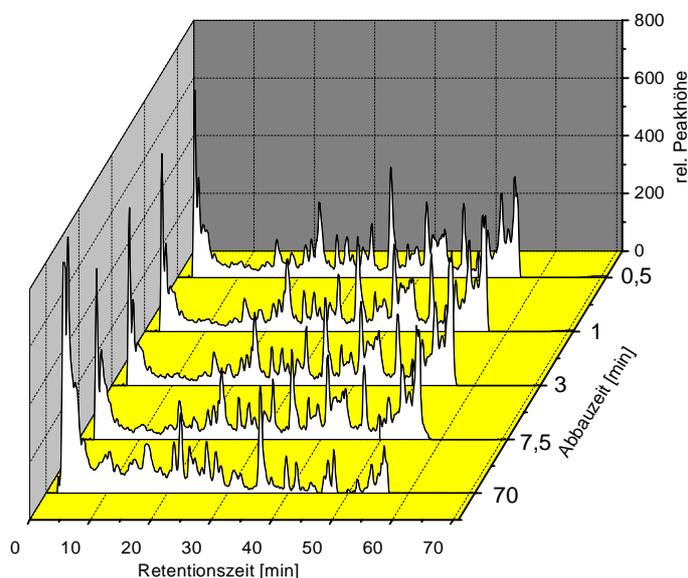


Abb. 28: Produktverteilungen eines Caseinabbaus mit immobilisierter Alkalase® ($t_{\text{Abbau}} = 0,5 - 70$ min,

$$c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L, } 1 \text{ cm}^2 \text{ Alkalase}^{\circledR}\text{-Epoxy-Immobilisat} \equiv 0,485 \text{ U) [42]}$$

Gut zu erkennen ist die stark verlangsamte Abbaureaktion, die sich in der Konstanz der verschiedenen Produktpeaks über Zeiträume größer $t_{\text{Abbau}} = 1$ h niederschlagen. Die Reaktionslösung verarmt nur langsam an den großen unpolaren Makropeptiden, die bei hohen Retentionszeiten eluieren. Bis zu $t_{\text{Abbau}} = 7,5$ min zeigen sich nur geringe Veränderungen in der Produktverteilung, da hier Bildungs- und Zersetzungsgeschwindigkeiten der Peptidfragmente im Gegensatz zum Abbau mit nativer Alkalase gleich groß sind. Ein direkter Vergleich der Produktverteilung von nativer und immobilisierter Alkalase (s. Abb. 29) verdeutlicht dies. Die Ursache für die Veränderung des Abbaumechanismus liegt zum einen in der kovalenten Bindung des Enzyms am Träger, der einen erheblichen konformativen Stress für das Enzym bedeutet, zum anderen müssen die Substratmoleküle zum immobilisierten Enzym diffundieren, um abgebaut zu werden. Während beim Abbau mit nativer Alkalase® die Reaktionslösung schnell an Caseinmolekülen verarmt und dann der Abbau der Makropeptide dominiert, bleiben diese beim Abbau mit Immobilisaten länger erhalten und bestimmen den Abbau mechanistisch.

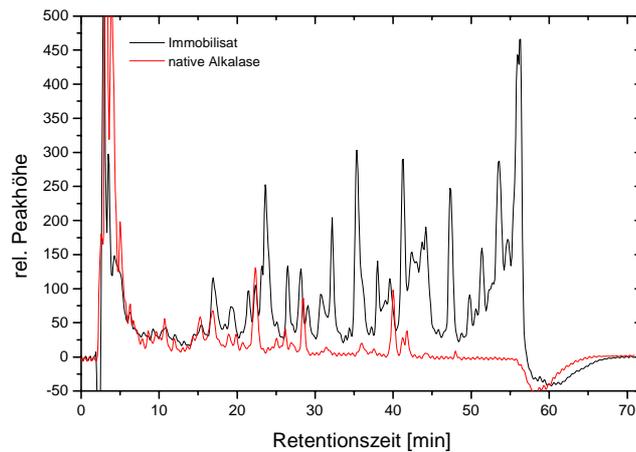


Abb. 29: Vergleich des Caseinabbaus mit nativer und immobilisierter Alkalase ($t_{\text{Abbau}} = 3 \text{ min}$) [42]

Nach $t_{\text{Abbau}} = 3 \text{ min}$ zeigen sich für Abbaureaktionen mit immobilisierter Protease hohe Fragmentkonzentrationen, während für Abbaureaktionen mit nativer Alkalase® kaum noch Abbaufragmente, die mit der stationären Phase wechselwirken, nachzuweisen sind; der Abbau mit nativer Alkalase® ist also schon fast abgeschlossen.

9.2.5 RP-HPLC im Trägerstromabfluss

Die RP-HPLC-Analytik ermöglicht den Nachweis der Produkte beim enzymatischen Abbau auf Oberflächen. Die Analytik wird hierzu in den Trägerstromabfluss eingekoppelt (s. Abb. 30), so dass Proben aus dem Trägerstrom direkt in die HPLC injiziert werden können.

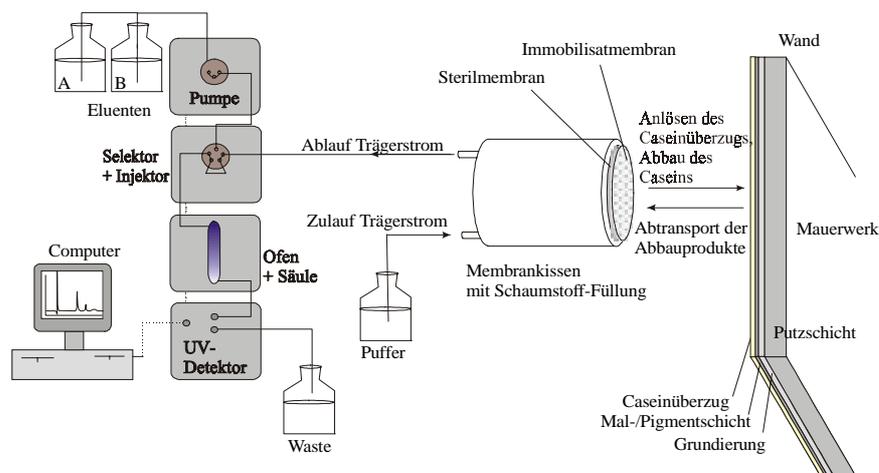


Abb. 30: Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus zur Probenanalyse beim enzymatischen Caseinabbau auf Probepplatten

Aufgrund der hohen Verdünnung empfiehlt sich jedoch das Auffangen größerer Fraktionen (3,45 mL \equiv 5 min) und eine Anreicherung der Produkte durch Lyophilisierung. Die resultierenden Produktspektren der Abbaureaktionen auf Probeplattenoberflächen mit $t_{\text{Abbau}} = 0 - 30$ min sind in Abbildung 31 dargestellt.

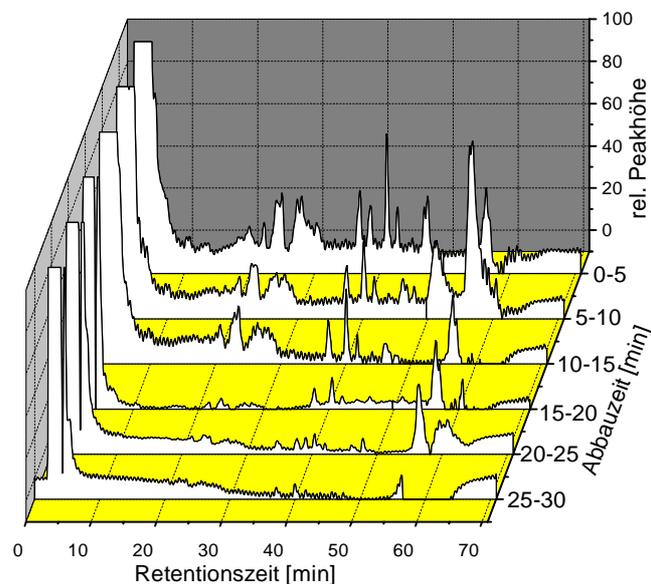


Abb. 31: Produktspektren der Caseinabbauprodukte auf einer Probeplatte ($t_{\text{Abbau}} = 0 - 30$ min) [42]

Es zeigt sich eine gleichmäßige Konzentrationsabnahme sowohl großer als auch kleiner Fragmente während des gesamten Abbaus. Wesentlich für die Veränderung im Abbaumechanismus ist hier die kontinuierliche Abführung der Produkte von der Abbauoberfläche, wodurch eine weitere Reaktion dieser Abbaufragmente verhindert wird. So bleibt die Produktverteilung nahezu konstant, während die Konzentrationen immer geringer werden, sobald die Oberfläche an Caseinmolekülen verarmt. Ein Vergleich der Produktspektren des Caseinabbaus mit Immobilisat auf Oberflächen und in Lösung (s. Abb. 32 A) bestätigt den großen Verdünnungseffekt, der durch den Trägerstrom hervorgerufen wird. Die zur eingehenden Untersuchung ausgewählten Fragmente I - V werden während der Abbaureaktion auf Oberflächen kontinuierlich gebildet, die Peakhöhen nehmen in den Profilen (s. Abb. 32 B) exponentiell ab, gemäß der exponentiellen Abnahme der Caseinkonzentration auf der Oberfläche.

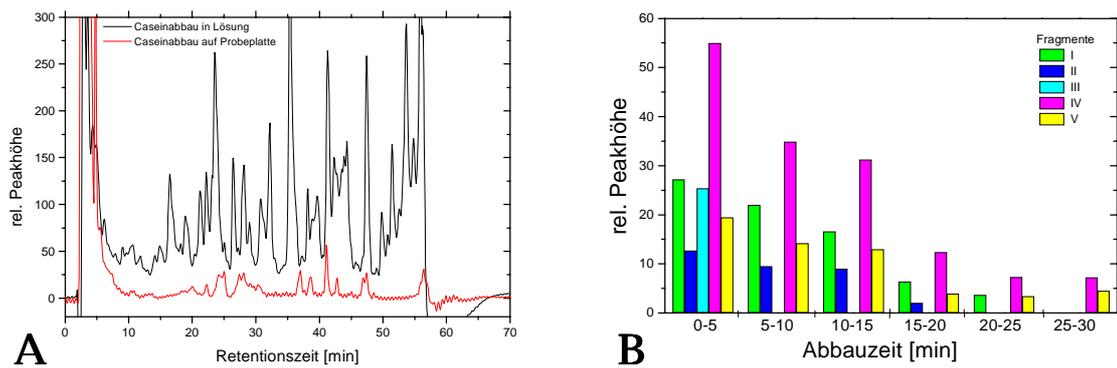


Abb. 32: A: Vergleich der Produktspektren des Caseinabbaus mit Immobilisat in Lösung ($t_{\text{Abbau}} = 30$ s) und auf Oberflächen ($t_{\text{Abbau}} = 0 - 5$ min) [42]
 B: Peakhöhenprofile der Fragmente I – V [42]

Nach $t_{\text{Abbau}} = 30$ min ist die Konzentration des Caseins auf der Oberfläche soweit abgesunken, dass auch die Konzentrationen der Abbaufragmente unter der Nachweisgrenze liegen; die quantitative Proteolyse von Casein auf der Oberfläche ist abgeschlossen.

9.2.6 Isolierung einzelner Fragmente

Eine Charakterisierung der Abbaufragmente I – V wird durch Isolierung und Bestimmung der Molmassen der Fragmente erreicht. Mit einem an die HPLC gekoppelten Fraktionensammler können Fraktionen aus dem Ablauf entnommen werden (Durchführung s. Anhang 16.10.7). Die Schnittgrenzen der Fragmente I – V sind in Abbildung 33 A + B dargestellt.

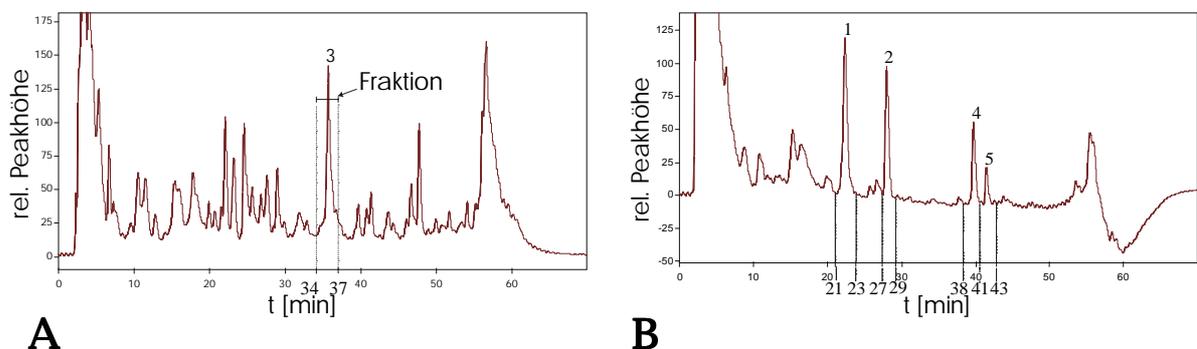


Abb. 33: A: Produktspektrum des Caseinabbaus nach $t_{\text{Abbau}} = 30$ s mit Schnittgrenzen für das Fragment III [42]
 B: Produktspektrum des Caseinabbaus nach $t_{\text{Abbau}} = 10$ min mit Schnittgrenzen für die Fragmente I, II, IV und V [42]

Für Fragment III wurde eine Isolierung nach einer Abbauzeit von $t_{\text{Abbau}} = 30$ s gewählt, da das Verhältnis zwischen maximaler Konzentration und vollständiger Auflösung des Peaks (Abwesenheit von Verunreinigungen durch Fragmente ähnlicher Retentionszeiten) hier optimal ist. Die Konzentrationen der Fragmente I, II, IV und V sind nach einer Abbauzeit von $t_{\text{Abbau}} = 10$ min maximal und gut aufgelöst, so dass eine reine Isolierung der Fragmente erreicht werden kann. Nach Lyophilisierung der isolierten Fragmente können ausreichende Mengen zur Bestimmung der Molmassen mit Hilfe der Maldi-MS erhalten werden.

9.3 Charakterisierung der Fragmente mittels Maldi-MS [74-79]

Die Bestimmung der Molmassen der isolierten Fragmente bedarf einer Probenvorbereitung gemäß Anhang 16.11. Es wurden verschiedene Matrixsubstanzen auf ihre Eignung zur Analyse getestet, wobei sich α -Cyano-4-hydroxymizsäure und Sinapinsäure als geeignete Matrices empfohlen. Die Kalibration der Spektren erfolgte durch Bestimmung der charakteristischen Sinapinsäurepeaks bei $M = 207$ Da und $M = 224$ Da. Die Fragmentsequenzen wurden computergestützt über die bestimmten Massen aus den vollständigen Caseinsequenzen (s. Anhang 16.2) ermittelt.

Abbildung 34 A zeigt das Maldi-MS-Spektrum des Fragmentes I, indem ein einzelner scharfer Peak bei $m/z = 1525$, sowie weitere, kleine Fragmentierungspeaks bei $m/z = 1596$ und $m/z = 1639$ zu erkennen sind. Durch Abgleich der Caseinsequenzen und anhand von Literaturvergleichen [68] lässt sich dieser Molekülpeak als einfach geladenes Fragment β -Casein 8-21 ($M = 1525,0$ g/mol) identifizieren (Sequenz s. Tab. 10). Die Fragmentierungen entsprechen den Abspaltungen der terminalen Aminosäuren Ala⁷ ($M = 71,1$ g/mol) und Asn²² ($M = 114,1$ g/mol).

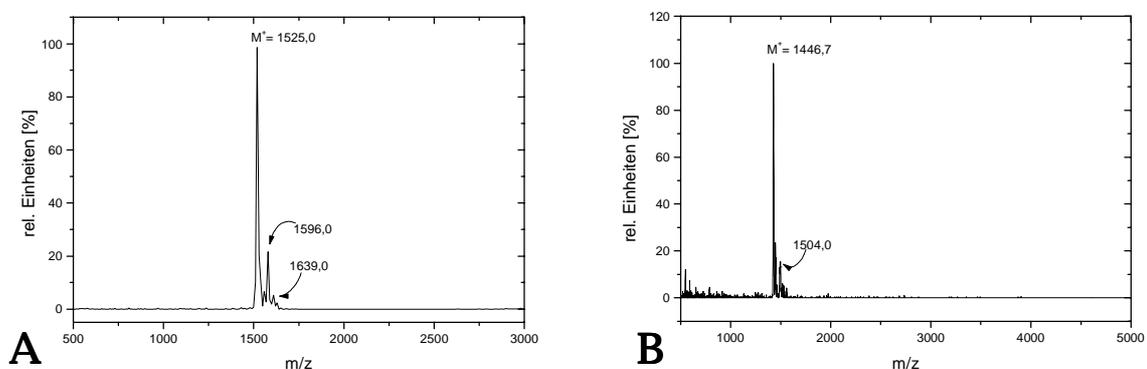


Abb. 34: A: Maldi-MS-Spektrum Fragment I (0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril, Matrix Sinapinsäure)
B: Maldi-MS-Spektrum Fragment II (0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril, Matrix Sinapinsäure)

Abbildung 34 B zeigt das Maldi-MS-Spektrum von Fragment II, indem wiederum nur ein scharfer Peak bei $m/z = 1446$, sowie ein Fragmentierungspeak bei $m/z = 1504$ zu sehen sind. Die Fragmentierung entspricht der Abspaltung eines Glycins ($M = 57,1$ g/mol). Der somit einfach geladene Molekülpeak (M^+ -Peak) kann zwei Fragmenten zugeordnet werden, α_{S1} -Casein 142-154 ($M = 1446,7$ g/mol) und β -Casein 29-42 ($M = 1446,7$ g/mol) (Sequenzen s. Tab. 10). Aufgrund der Fragmentierung lässt sich das Fragment als α_{S1} -Casein 142-154 identifizieren, da nur dieses Glycin terminal bindet (Gly¹⁴¹).

Das Maldi-MS-Spektrum von Fragment III in Abbildung 35 A zeigt drei Peaks bei $m/z = 2186$, $m/z = 2557$ und $m/z = 5114$, sowie zwei Fragmentierungspeaks bei $m/z = 2274$ und $m/z = 2608$. Die Berechnungen ergeben das Vorhandensein von zwei Fragmenten:

1. Fragment III A: M^{2+} -Peak bei $m/z = 2557$, M^+ -Peak bei $m/z = 5114$, Fragmentierungspeak bei $m/z = 2608$
 $\Rightarrow \alpha_{S2}$ -Casein 1-52, $M = 5114,0$ g/mol mit einer Fragmentierung des terminalen Thr⁵³ ($M = 101,1$ g/mol) (Sequenz s. Tab. 10).
2. Fragment III B: M^+ -Peak bei $m/z = 2187$, Fragmentierungspeak bei $m/z = 2274$
 $\Rightarrow \alpha_{S1}$ -Casein 41-60, $M = 2186,7$ g/mol mit einer Fragmentierung des terminalen Ser⁶¹ ($M = 87,1$ g/mol) (Sequenz s. Tab. 10).

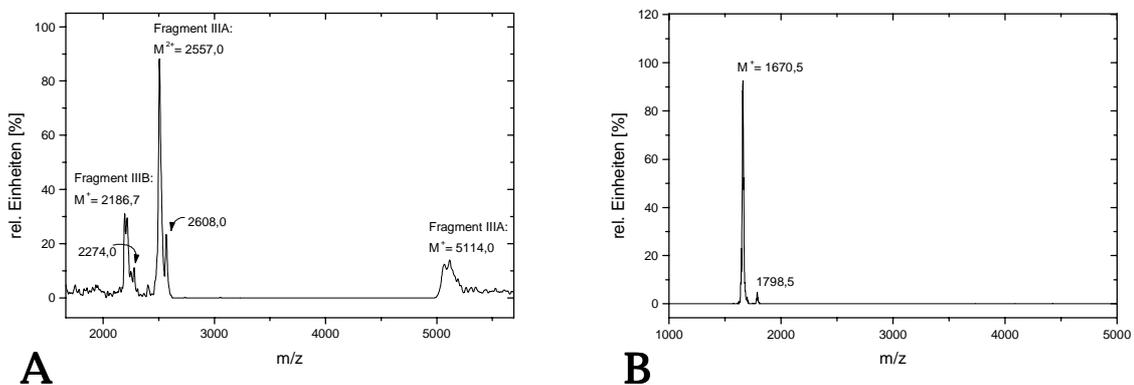


Abb. 35: A: Maldi-MS-Spektrum Fragmente III A, III B (0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril, Matrix α -Cyanozimtsäure)

B: Maldi-MS-Spektrum Fragment IV (0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril, Matrix α -Cyanozimtsäure)

In Abbildung 35 B ist das Maldi-MS-Spektrum von Fragment IV dargestellt, dass nur einen scharfen Molekülpeak bei $m/z = 1670$ und ein Fragmentierungspeak bei $m/z = 1708$ aufweist. Der Molekülpeak lässt sich dem M^+ -Peak von α_{S2} -Casein 1-15, $M = 1670,4$ g/mol zuordnen (Sequenz s. Tab. 10), einem Hydrolysat von α_{S2} -Casein 1-52

(Fragment III A). Die Fragmentierung entspricht der Abspaltung des terminalen Lys¹⁶ (M = 128,1 g/mol).

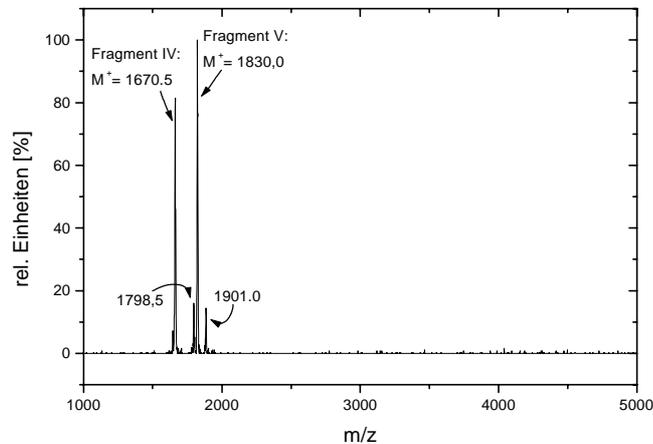


Abb. 36: Maldi-MS-Spektrum der Fragmente IV und V (0,1 % (v/v) TFA in Acetonitril, Matrix α -Cyanozimtsäure)

Das Fragment V ließ sich nicht in Reinsubstanz darstellen und enthält als Verunreinigung α_{S2} -Casein 1-15 (Fragment IV). Das Maldi-MS-Spektrum (s. Abb. 36) zeigt neben dieser Verunreinigung einen scharfen Molekülpeak bei $m/z = 1830$ mit einer Fragmentierung bei $m/z = 1901$. Die Berechnungen identifizieren das Fragment V als α_{S1} -Casein 42-57, (M = 1830,2 g/mol) (Sequenz s. Tab. 10), einem Hydrolysat von α_{S1} -Casein 41-60 (Fragment III B). Als Fragmentierung ist die Abspaltung des terminalen Ala⁴¹ (M = 71,1 g/mol) zu erkennen.

In Tabelle 10 sind die ermittelten charakteristischen Daten der untersuchten Peptidfragmente, sowie deren Sequenzen dargestellt. Die Caseinsequenzen mit den Fragmentschnittgrenzen sind im Anhang 16.2 dargestellt. Berücksichtigt man die durch die Maldi-MS-Analytik initiierten Fragmentierungen, so zeigen sich nur schwache Selektivitäten der enzymatischen Caseinzersetzung mit Alkalase® 2,5 DX L, flüssig. Überdurchschnittlich oft sind die Aminosäuren Valin (aliphatisch, unpolar), Alanin (aliphatisch, unpolar) und Asparagin (ungeladen, polar) direkt an der gebrochenen Bindung beteiligt, so dass die leichten Präferenzen der Hydrolyse von Alkalase® 2,5 DX L, flüssig zu Gunsten unpolarer und somit hydrophober Aminosäuren (s. Kap. 4) bestätigt werden.

Tab. 10: Charakteristische Daten und Sequenzen der Fragmente I-V (1-Letter-Systematik der Aminosäuresequenzierung s. Tab. 20, Anhang 16.12.5)

Fragment-Nr.	Molmasse [Da]	Retentionszeit t_R [min]	Kapazität k	Aminosäuresequenz (1-Letter-Systematik)	Herkunft
α -Casein-fragment	766,1	7,9	2,29	RYLGYL	α_{S1} -Cas 100-105
β -Casomorphin	772,0	18,6	6,75	YPFPG PI	β -Cas 75-81
I	1525,0	22,7	8,46	CLVAL ALARE LEEL	β -Cas 8-21
II	1446,7	28,8	11,0	IHAQQ KEPMI GVN	α_{S1} -Cas 142-154
				ESLSS SEESI TRIN	β -Cas 29-42
III A	5114,0	36,0	14,0	MKFFI FTCLL AVALA KNTME HVSSS EESII SQETY KQEK N MAINP SKENL CS	α_{S2} -Cas 1-52
III B	2186,7			APFPE VFGKE KVNEL SKDIG	α_{S1} -Cas 41-60
IV	1670,5	40,0	15,67	MKFFI FTCLL AVALA	α_{S2} -Cas 1-15
V	1830,2	41,7	16,38	PFPEV FGKEK VNELS K	α_{S1} -Cas 42-57

Die nach $t_{\text{Abbau}} = 10$ min isolierten Fragmente IV und V sind Hydrolyseprodukte der Fragmente III A bzw. III B, welche schon nach $t_{\text{Abbau}} = 30$ s isoliert wurden. So bestätigt sich anhand dieser Daten, dass eine Hydrolyse der Abbauprodukte stattfindet und die auftretenden Primärprodukte zügig wieder abgebaut werden.

10. Nicht invasive Oberflächenanalytik

10.1 Vergleich verschiedener Analysemethoden

Höchste Priorität beim Umgang mit historischen Wandmalereien hat die Unversehrtheit des Objektes. Daher muss jede Analytik zur Messung des Caseins auf der Oberfläche ohne eine Probenahme arbeiten, das heißt nicht invasiv sein. Diese Vorgabe erfüllen nur optische Analysemethoden, wie IR-, UV/VIS- und Lumineszenzspektroskopie. Von der Anwendung der IR-Spektroskopie musste wegen des hohen apparativen und Kostenaufwandes abgesehen werden.

Die UV/VIS-Spektroskopie [80] eignet sich nicht, da die Produkte der proteolytischen Caseinzerlegung höhere Absorptionskoeffizienten als Casein haben, wodurch die Dokumentation der Abbaureaktion gestört wird. Es zeigt sich bei $\lambda = 280$ nm ein Maximum in der enzymatischen Abbaukurve, das den schon bei der RP-HPLC-Analyse ermittelten Gleichgewichtspunkt zwischen Bildungs- und Zerfallsgeschwindigkeit größerer Peptidfragmente markiert (s. Abb. 37). Die Lage dieses Maximums ist von der eingesetzten Substratkonzentration abhängig; je höher die Substratkonzentration, desto steiler ist die Anfangssteigung und desto später wird das Maximum durchlaufen.

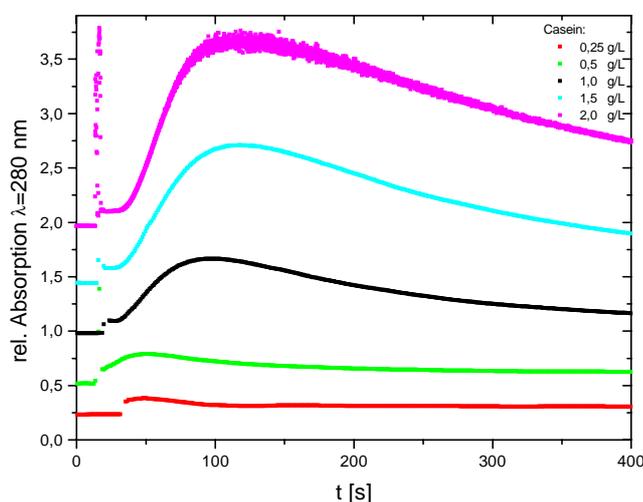


Abb. 37: Zeitliche Veränderung der UV-Absorption ($\lambda = 280$ nm) für den enzymatischen Abbau verschiedener Caseinkonzentrationen ($c_{A-2,5DXL} = 3,07$ U/mL, $t_{\text{Abbau}} = 6,5$ min)

In der Folge sinkt die UV-Aktivität wieder auf ihren Anfangswert. Da die UV-Aktivität der Caseinabbaufragmente erst abnimmt, wenn nach $t_{\text{Abbau}} = 25$ h die Freisetzung von

Aminosäuren einsetzt (s. Kap. 9), eignet sich diese Analytik nicht zur Dokumentation von enzymatischen Caseinabbaureaktionen.

Luminenszenzspektroskopie fasst die Phänomene der verzögerten Lichtemission, wie Phosphoreszenz und Fluoreszenz zusammen. Die Relaxation eines in einen höheren Energiezustand angeregten Elektrons erfolgt hier unter Abstrahlung eines Photons, wobei sich die Wellenlänge des abgestrahlten Photons im Vergleich zum anregenden Photon rotverschiebt, also einen geringeren Energiegehalt aufweist [81]. In der Bioanalytik hat sich besonders die 2D-Fluoreszenzspektroskopie bewährt, da eine Fülle biologisch aktiver Moleküle, wie Vitamine, Cofaktoren und einige Aminosäuren, fluorophore Eigenschaften besitzen oder Gruppen mit fluorophoren Eigenschaften binden. Tabelle 11 zeigt eine Auswahl intrinsischer oder biogener Fluorophore, die zur Analytik biologischer Komponenten geeignet sind.

Tab. 11: Intrinsische Fluorophore zur Analyse biologischer Komponenten [82]

Fluorophor	Exzitations- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]
ATP, ADP, Adenin, Adenosin	272	380
Coenzym F ₄₂₀	420	470
Flavinmononucleotid	370 / 436	520
NADH, NADPH	340	456
Phenylalanin	260	282
Pyridoxin (Vitamin B ₆)	324	390
Riboflavin (Vitamin B ₂)	370 / 455	520
Tryptophan	288	336
Tyrosin	275	303
Vitamin A (Retinol)	372	510
Vitamin B ₁₂ (Folsäure)	275	305

Die fluorophoren, ausschließlich aromatische Seitenketten tragenden Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ermöglichen als Bestandteile von Proteinen deren qualitative und quantitative Analyse und somit letztlich auch die Analyse von Biomasse.

10.2 2D-Fluoreszenzspektroskopie

10.2.1 Detektion von Casein

Die 2D-Fluoreszenzspektroskopische Detektion von Casein beruht auf der fluorophoren Aminosäure Tryptophan, die im Casein gebunden ist [83]. α_{S1} - und α_{S2} -Casein enthalten je 2 Tryptophanreste in ihrer Aminosäuresequenz (Trp¹⁶⁴, Trp¹⁹⁹), während β -, κ - und γ -Casein nur 1 Trp-Rest enthalten. Das Maximum dieser intrinsischen Trp-Fluoreszenz liegt in Lösung bei einem Wellenlängenpaar von Exzitation : Emission von $\lambda = 288 \text{ nm} : 336 \text{ nm}$, wie in Abbildung 38 für eine 2,0 g/L Casein-Lösung, pH 8,3 dargestellt ist. Die Darstellung A zeigt den gesamten sichtbaren Spektralbereich von $\lambda = 250 - 800 \text{ nm}$, in dem Fluoreszenzerscheinungen auftreten können, B zeigt eine Ausschnittsvergrößerung des relevanten Messbereiches. Die Standardgeräteparameter des verwendeten 2D-Fluoreszenzspektroskops finden sich im Anhang 16.13, S. 126.

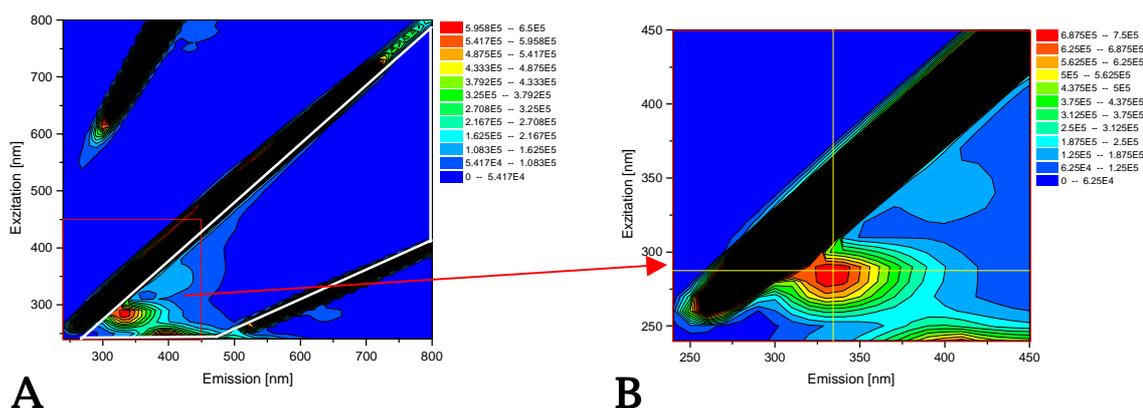


Abb. 38: A: 2D-Contourplot der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan in Lösung,

$c(\text{Casein}) = 2,0 \text{ g/L}$, λ_{max} bei Ex : Em = 288 : 336 nm

B: Ausschnittsvergrößerung 2D-Contourplot Abb. 38 A

Der Fluoreszenzbereich zwischen den Reflexionsbanden (weiß umrandet) zeigt die Anwesenheit einer weiteren fluorophoren Gruppe bei Ex : Em = 345 : 410 nm, die aber aufgrund ihrer geringen Intensität die Trp-Messung nicht stört. Die Intensität der Trp-Fluoreszenz ist konzentrationsabhängig und direkt proportional zur Caseinkonzentration, so dass eine quantitative Dokumentation ermöglicht wird (s. Abb. 39):

$$F = I_0 \cdot \phi \cdot (2,303 \cdot \varepsilon \cdot c \cdot d),$$

mit F: Fluoreszenzintensität, I_0 : Intensität des eingestrahlenen Lichtes, ϕ : Fluoreszenzausbeute, ε : molarer Absorptionskoeffizient, c: Konzentration, d: Schichtdicke;

$$\epsilon_{\text{Casein}, 280 \text{ nm}} = 24024,8 \text{ L/mol*cm [23]}$$

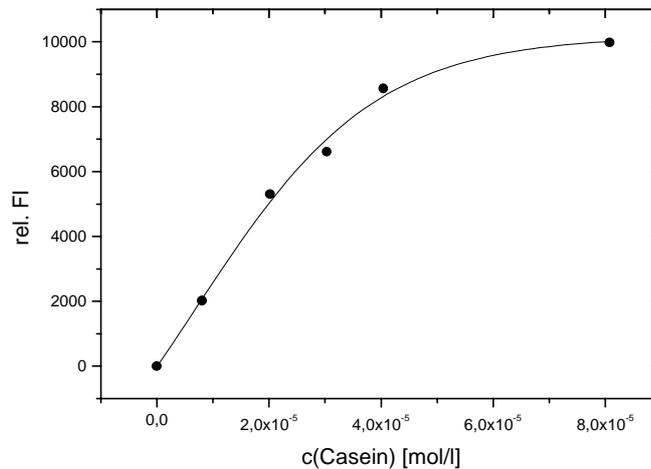
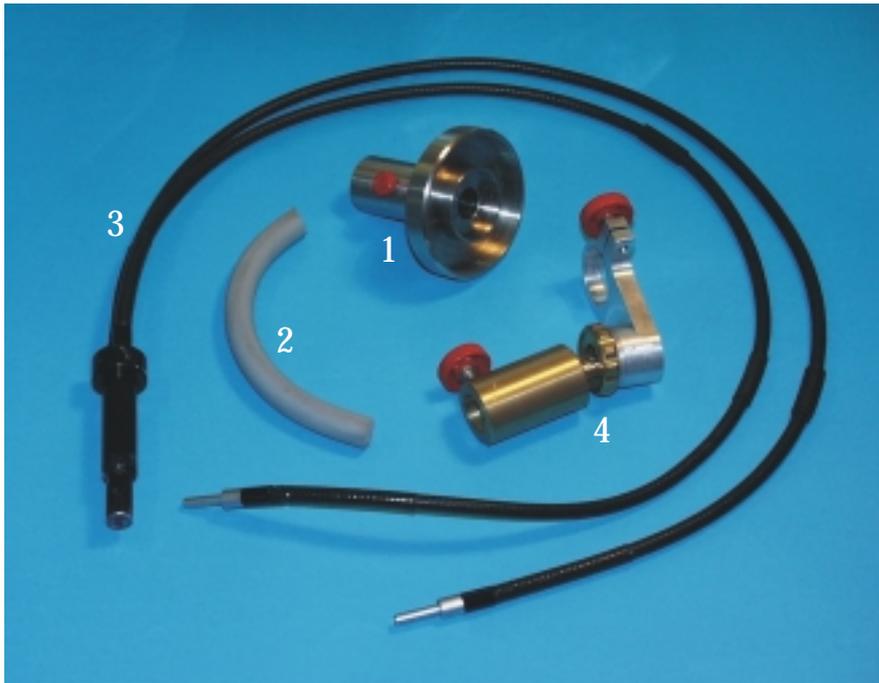


Abb. 39: Kalibration der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan in Lösung
(Ex : Em = 288 : 336 nm)

Bei sehr hohen Substratkonzentrationen tritt eine zusätzliche Rotverschiebung der Emission auf, da eine Fluoreszenzlöschung durch Energieübertragung von einem Molekül zum nächsten erfolgen kann, der angeregte Zustand also strahlungslos deaktiviert wird. Außerdem neigt Casein zur Ausbildung von Molekülaggregaten, wie Micellen, die besonders bei hohen Konzentrationen einsetzt und die Fluoreszenzausbeute absenkt. So weist die Kalibrationskurve der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan ab $c = 4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L}$ Casein eine hyperbolische Abweichung von der idealen linearen Form auf. Die Einzelmessungen sind mit einem relativen Fehler von $z_{\text{rel}} = \pm 5,1 \%$ behaftet.

10.2.2 Transfer zur Messung auf Oberflächen

Die Messung der Fluoreszenz von Caseinschichten auf Oberflächen gelingt unter Verwendung eines 2-Kanallichtleiters [84] und eines speziellen Messstutzens zur exakten Positionierung auf der Oberfläche. Dieser verfügt über eine Dichtung, $d = 1,0 \text{ cm}$, die ein lichtdichtes Aufsetzen des Lichtleiters auf der Oberfläche gewährleistet, da einfallendes Tageslicht die Fluoreszenzmessung stört. Der ideale Abstand zwischen Lichtleiterausgang und Oberfläche wurde zu $d = 0,5 \text{ cm}$ bestimmt. Zur Vermeidung der Verschleppung von Mikroorganismen über den Messstutzen ist er aus V2A-Stahl gefertigt und vollständig autoklavierbar (s. Abb. 40).



Legende:

- 1: Fluoreszenzmessstutzen
- 2: Dichtung
- 3: 2-Kanal-Lichtleiter
- 4: Stativverbinder mit Kugelgelenk

Abb. 40: Photographie des Messzubehörs für Fluoreszenzmessungen auf Oberflächen

10.2.3 Abhängigkeiten der Fluoreszenzaktivität

Fluoreszenzerscheinungen auf Oberflächen sind von einer Vielzahl von Faktoren, wie z.B. Oberflächenmaterial, -beschaffenheit und Schichtdicken abhängig. Das auf einer Oberfläche auftreffende Licht wird vom oberflächenbildenden Material reflektiert, gestreut und teilweise absorbiert, nur ein Bruchteil trifft direkt auf Moleküle, die zur Fluoreszenz angeregt werden können. Diese strahlen ihre Photonen völlig ungerichtet ab, was zu erheblichen Verlusten der messbaren Fluoreszenzausbeute führt. Denn es können nur die Photonen detektiert werden, die das Emissionslichtfenster des Detektors erreichen, das heißt die annähernd senkrecht zur Oberfläche abgestrahlt werden. Im Idealfall, wie im vorliegenden des Caseins, bilden die fluoreszierenden Moleküle eine aufliegende, geschlossene Schicht aus. Anhand dieser lassen sich die möglichen spektroskopischen Übergänge bei einer Fluoreszenzanregung auf einer Oberfläche beschreiben (s. Abb. 41). Da die Fluorophorschicht im Fall der Caseinschicht transparent ist, muss auch die darunterliegende Pigmentschicht in die Betrachtungen mit einbezogen werden.

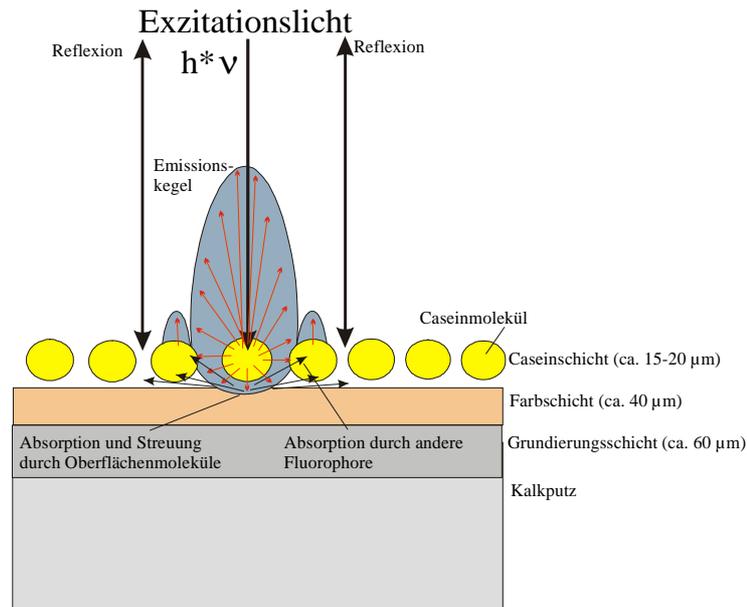


Abb.41: Prinzip der Fluoreszenz auf Oberflächen

Das Emissionslicht wird von allen Oberflächenmolekülen absorbiert, reflektiert und gestreut, ebenso wie das wesentlich intensivere Exzitationslicht. Ein Teil der von den Fluorophoren abgestrahlten Photonen trifft auf Oberflächenmoleküle wie Pigment- oder Bindemittelbestandteile, wodurch die Beschaffenheit der Oberfläche und die Art der Pigmentierung einer Wandmalerei zu wichtigen Faktoren für die Messung werden. Ein anderer Teil der abgestrahlten Photonen trifft auf weitere Caseinmoleküle, die ihrerseits zur Fluoreszenz angeregt werden. So entstehen zusätzliche Kaskadeneffekte, die immer höherwellige Fluoreszenzerscheinungen verursachen, die Intensität des Fluoreszenzmaximums aber verringern. Die Streuung der Photonen an Oberflächenmolekülen wiederum kann der Fluoreszenzausbeute zu gute kommen.

10.2.3.1 Einfluss des Oberflächenmaterials

Ein weiterer Effekt, der den starken Einfluss des Oberflächenmaterials deutlich macht, ist die Lage des Maximums der Trp-Fluoreszenz. Je nach Beschaffenheit des Untergrundes und Pigmentierung der Oberfläche variiert die Lage des Fluoreszenzmaximums um 15 nm auf der Exzitationsseite und um 20 nm auf der Emissionsseite (s. Abb. 42 A + B).

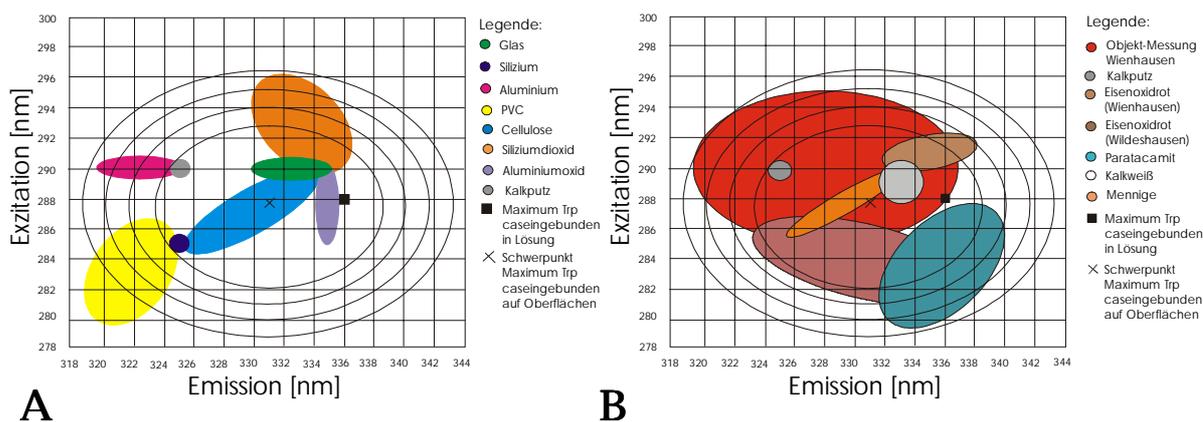


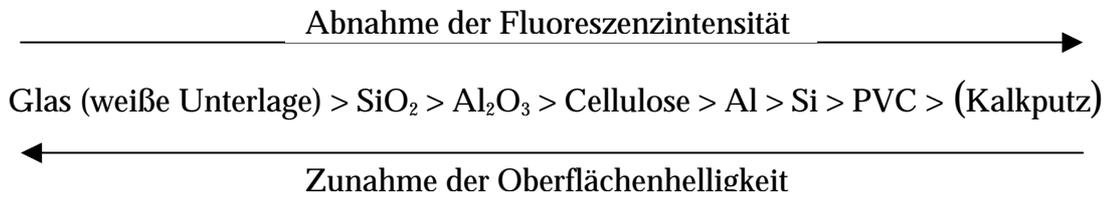
Abb. 42: A: Relative Lage des Maximums der Trp-Fluoreszenz für verschiedene Oberflächenmaterialien (Caseinbeladung $B_{\text{cas}} = 0,11 \text{ mg/cm}^2$)

B: Relative Lage des Maximums der Trp-Fluoreszenz für verschiedene Pigmentierungen (Caseinbeladung $B_{\text{cas}} = 0,11 \text{ mg/cm}^2$)

Die Lage des Fluoreszenzmaximums verändert sich in Abhängigkeit des Materials [85], so dass für Materialien, wie Aluminium, Silizium, Kalkputz und PVC deutlich niedrigere Emissionswellenlängen gefunden werden, als für Materialien wie Siliziumdioxid, Aluminiumoxid, Glas und Cellulose. Ursache für diese Verschiebung ist die Polarität des Lösemittels, bzw. Untergrundmaterials. Denn polare Untergründe, wie die Oxidoberflächen können durch die fluoreszierende Gruppe induziert, ihre Elektronenverteilung umorientieren und einen energetisch günstigeren Zustand einnehmen; diese Energieabsenkung führt zur Abstrahlung eines Photons höherer Wellenlänge. Weiterhin ist die unterschiedlich starke Streuung der Maxima für verschiedene Oberflächen auffällig. Während homogene Oberflächen, wie die Silizium- und die Kalkputzoberfläche konstante Maxima aufweisen, kommt es besonders bei pigmentierten Oberflächen zu starken Schwankungen der Lage des Maximums. Dies ist bedingt durch die nicht homogene Oberfläche, da die Pigmentierungen mit einem Pinsel aufgetragen wurden, und so starke Schwankungen in der Farbigkeit des Untergrundes resultieren. Extrem sind diese Schwankungen vor allem auf den Oberflächen der Wandmalereien, deren Streuverhalten am Beispiel Wienhausen in Abb. 42 B dargestellt ist. Die Inhomogenität des Untergrundes, gegeben durch unterschiedliche Pigmentierungen und Strukturierungen der Oberfläche, Salzausblühungen, mikrobiellen Bewuchs und viele weitere Faktoren, führt zu einer erheblichen Streuung der Lage des Maximums. Um trotzdem einen einheitlichen Bezug der Messungen zueinander herstellen zu können, wurde aus mehreren hundert Messungen der Schwerpunkt der Lage des Fluoreszenzmaximums für caseingebundenes Tryptophan auf Oberflächen ermittelt, der

bei einem Wellenlängenpaar von $Ex : Em = 288 : 331$ nm liegt, und allen weiteren Oberflächenfluoreszenzmessungen zugrunde gelegt wurde.

Betrachtet man die Fluoreszenzintensitäten, die für diese Oberflächen ermittelt wurden, so findet sich ein Anstieg der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Helligkeit der Oberfläche:



Dies beruht auf dem größeren Reflexionsvermögen heller Oberflächen, die auch das Emissionslicht stärker reflektieren, wodurch eine Erhöhung der Fluoreszenzausbeute resultiert. Einen Sonderfall stellt hierbei die poröse Kalkputzoberfläche dar, die sehr geringe Fluoreszenzintensitäten aufweist, da ein erheblicher Anteil der aufgetragenen Caseinlösung in die Oberfläche eindringt, und so nicht zur messbaren Fluoreszenz beiträgt. Dieses Eindringen des Caseins in die Oberfläche findet auch auf allen pigmentierten Flächen statt, wobei die Ausprägung von der Versiegelung der Oberfläche durch die Pigmentschicht abhängig ist. Abbildung 43 zeigt Tiefenprofile der zur Caseinkonzentration proportionalen Fluoreszenzintensität, die durch vorsichtiges Abschleifen der Probplattenoberflächen ermittelt werden konnten.

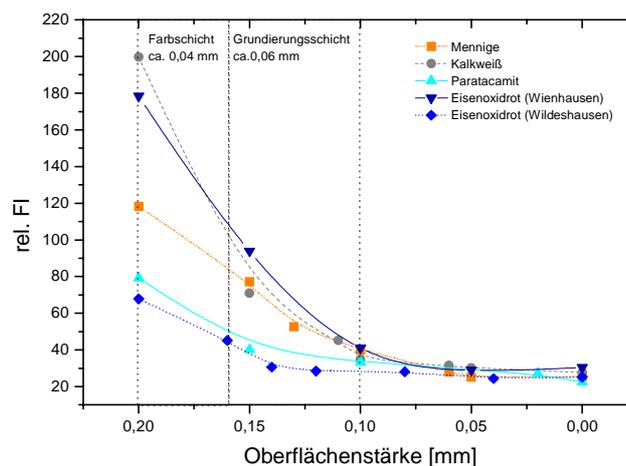


Abb. 43: Tiefenprofile der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan auf verschiedenen pigmentierten Oberflächen (Caseinbeladung $B_{cas} = 0,11$ mg/cm², $Ex : Em = 288:331$ nm)

Es zeigt sich für alle Pigmentierungen bis auf Eisenoxidrot (Wildeshausen) eine hohe Porosität, da ein Eintrag des Caseins durch Pigment- und Grundierungsschicht bis in den

Kalkputzuntergrund stattfindet. Dies entspricht einer Eindringtiefe von mindestens $d_{\text{Eintrag}} = 100 \mu\text{m}$ in die Oberfläche bei einem relativen Fehler von $z_{\text{rel}} = \pm 9,31 \%$. Nur das caseingebundene Pigment Eisenoxidrot (Wildeshausen) versiegelt die Oberfläche signifikant und lässt Casein nur bis zu $d_{\text{Eintrag}} = 70 \mu\text{m}$ Tiefe eindringen. Dies bedeutet, dass durch die nicht invasive 2D-Fluoreszenzmessung nicht die gesamte Caseinbeladung einer Oberfläche bestimmt werden kann, und somit die Korrelation der Fluoreszenzdaten mit den Daten invasiver Analyseverfahren erschwert wird. Da der Anteil des Caseins, das in die Oberfläche eindringt, nicht zum Schadensbild der Wandmalereien beiträgt – Casein ist seit Jahrhunderten ein gebräuchliches Bindemittel für Pigmente – behindert er aber nicht die Detektion des schadensrelevanten Caseins, welches als Überzug auf der Oberfläche aufliegt.

10.2.3.2 Einfluss der Caseinbeschichtung

Die in Form der Caseinsuspension zu unterscheidenden Caseinüberzüge aus Sumpfkalk- und Ammoniumcasein haben Auswirkungen auf die intrinsische Fluoreszenzintensität. So zeigt sich bei einer Zunahme der Beschichtungen, also einer Erhöhung der Caseinbeladung, dass zwar für beide Caseinvarianten der hyperbolische Verlauf einer Sättigungskurve resultiert, dass aber die Fluoreszenzintensität von Sumpfkalkcasein gegenüber der von Ammoniumcasein um den Faktor 3 erniedrigt ist (s. Abb. 44).

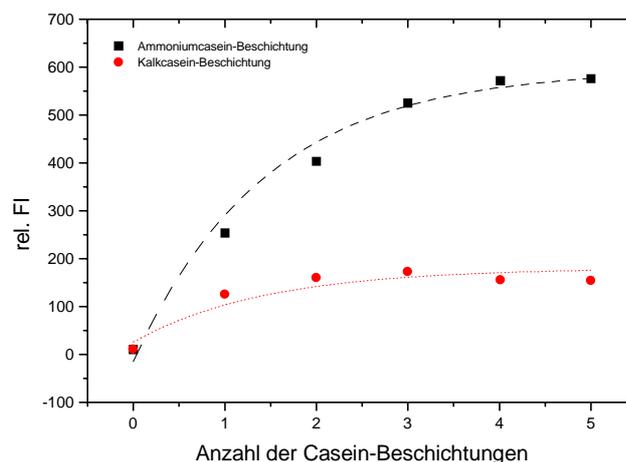


Abb. 44: Vergleich der Fluoreszenzverläufe verschiedener Caseinvarianten auf Oberflächen (Pigment Eisenoxidrot Wildeshausen, mittlere Caseinbeladung pro Schicht $B_{\text{cas}} = 0,054 \text{ mg/cm}^2$)

Die Erniedrigung der Fluoreszenzintensität bei Suspension des Caseins mit CaCO_3 beruht auf den Wechselwirkungen der Caseinmoleküle mit den Ca^{2+} -Kationen. Diese begünstigen die Micellenbildung von Casein, da sie als Bindeglied der Casein-

phosphatgruppen dienen. Mit der [Casein - PO_4^{3-} - Ca^{2+} - $^{3-}\text{PO}_4$ - Casein] – Brückenbindung wird die Polymerisation des Caseins zu Micellen initiiert, die einen durchschnittlichen Radius von $r = 70$ nm aufweisen. Diese Molekülaggregate haben eine kompakte Form mit polaren Oberflächen, die ihre Löslichkeit ermöglichen, verfügen aber ebenso über ausgedehnte hydrophobe Bereiche. Die Micellen verändern die optischen Eigenschaften der Lösung, so verursachen sie z.B. die weiße Färbung der Milch. Einen Caseinüberzug auf einer Oberfläche beeinflusst die Micellenbildung hingegen durch eine verstärkte Abschirmung der Fluoreszenz.

10.2.3.3 Einfluss der Pigmentierung

Die Pigmentierung einer Oberfläche hat nicht nur Auswirkungen auf die Lage des Fluoreszenzmaximums und den Caseineintrag in die Oberfläche, sondern auch auf die messbare Fluoreszenzintensität. So zeigen schon pigmentierte Oberflächen, die ohne einen Caseinüberzug vorliegen, unterschiedliche Intensitäten der Grundfluoreszenz. Denn da die Pigmente kein einheitliches Reflexions- und Absorptionsverhalten zeigen, unterscheiden sich auch ihre Resonanzen mit dem Exzitationslicht und so resultieren voneinander abweichende Grundfluoreszenzen (s. Abb. 45 A). Zur Verdeutlichung der Einflussnahme des Absorptionsverhaltens der Pigmente auf das Fluoreszenzverhalten sind die Absorptionseigenschaften in Abbildung 45 B dargestellt.

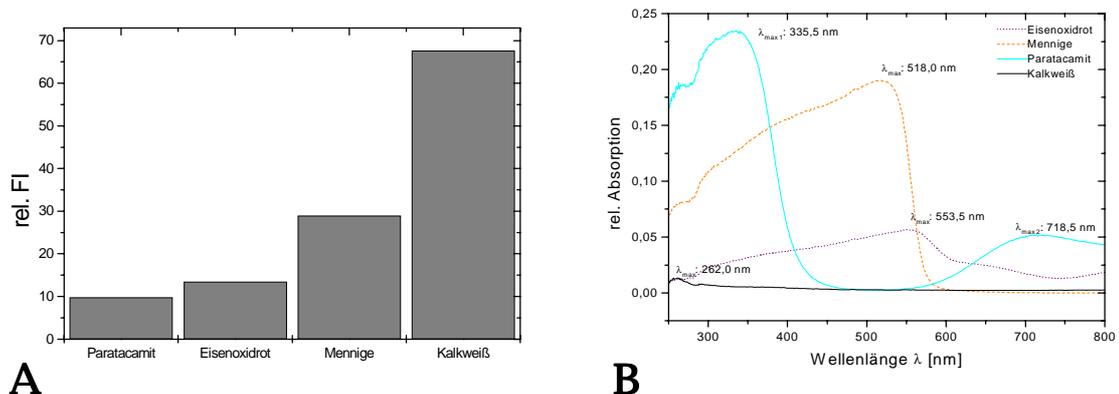


Abb. 45: A: Vergleich der Grundfluoreszenz bei unterschiedlicher Pigmentierung (Ex : Em = 288 : 331 nm)

B: Absorptionsverhalten der Pigmente im UV/VIS-Bereich von $\lambda = 250 - 800$ nm

Paratacamit-Oberflächen weisen immer die geringsten Fluoreszenzintensitäten auf, bei unbeschichteter und bei caseinbeschichteter Oberfläche, obwohl es sich um ein helles Pigment handelt. Die Ursache hierfür ist das große Absorptionsvermögen des Pigmentes. Es verfügt über zwei Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich bei $\lambda_{\text{max } 1} = 335,5$ nm und $\lambda_{\text{max } 2} = 718,5$ nm, die viel Grundstrahlung absorbieren. Besonders $\lambda_{\text{max } 1}$ liegt in

unmittelbarer Nähe zum Maximum der zu detektierenden Trp-Fluoreszenzemission bei $\lambda_{\text{em,max}} = 331,0$ nm und absorbiert einen großen Teil der abgestrahlten Photonen. So sind alle Fluoreszenzen auf dieser Oberflächenvariante stark erniedrigt. Das Pigment Kalkweiß hingegen zeigt sehr hohe Grundstrahlungen und Fluoreszenzintensitäten, da es ein hohes Reflexionsvermögen ($R_{187\text{ nm}} = 11 - 14\%$) besonders im Bereich der UV-Strahlung aufweist [57]. Die weiße Farbe des Pigmentes Kalkweiß weist auf sein sehr geringes Absorptionsvermögen hin, ein schwaches Absorptionsmaximum zeigt sich im UV bei $\lambda_{\text{max}} = 262,0$ nm. Die Pigmente Eisenoxidrot und Mennige zeigen ähnliche Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max}} = 553,5$ nm bzw. $\lambda_{\text{max}} = 518,0$ nm, die die braune und orange Farbe der Pigmente verursachen. Die durch charge-transfer-Übergänge verursachten Absorptionsmaxima sind breit und klingen nur langsam zu kleineren Wellenlängen hin ab. Dadurch werden auch Teile der Strahlung im Bereich des Trp-Fluoreszenzmaximums absorbiert und es resultieren mittlere Intensitäten der Fluoreszenz.

10.2.3.4 2D-Fluoreszenzkalibration der Prüfkörperoberflächen

Die Differenzen der optischen Eigenschaften der Pigmente machen eine unabhängige Fluoreszenzkalibration jedes Pigmentes nötig, sowie eine Unterscheidung der Caseinbeschichtungen. Die für die Fluoreszenzkalibration benötigte Caseinbeladung einer Oberfläche kann mit Hilfe des BCA-Proteinassays bestimmt werden. Hierzu wird von der Oberfläche eine dünne Schicht ($d \approx 50\ \mu\text{m}$) des gesamten vom Fluoreszenzlichtleiter erfassten Bereiches abgetragen und die Proteinkonzentration der Probe nach Lösung der Proteine im Alkalischen (10 mL 1 M NaOH) und Farbkomplexierung photometrisch bei $\lambda = 560$ nm bestimmt (s. Kap. 5).

Exemplarisch für die resultierenden Kalibrationsgeraden sind in Abbildung 46 A + B die Kalibrationen für die Pigmente Kalkweiß und Paratacamit dargestellt, da diese in ihrem Verhalten am meisten differieren. Denn der lineare Zusammenhang von Caseinbeladung und relativer Fluoreszenzintensität, der den Bereich quantitativer Aussagen über die Caseinbeschichtung darstellt, zeigt bei diesen Oberflächenbeschichtungen die größten Unterschiede. Kalkweiß zeigt hohe Fluoreszenzintensitäten schon bei niedrigen Caseinbeladungen. Die Erniedrigung der Fluoreszenzintensität von Kalkcaseinbeschichtung im Vergleich zu Ammoniumcaseinbeschichtung wird durch den Steigungsfaktor s_F beschrieben, der das Verhältnis der Kalibrationsgeraden der Fluoreszenzintensität zueinander darstellt; bei Kalkweißpigmentierung fluoresziert Ammoniumcasein um

$s_F = 2,71$ stärker (s. Abb. 46 A). So resultiert für Ammoniumcasein ein deutlich schmalerer linearer Bereich, der schon ab einer Caseinbeladung von $B_{cas} = 0,081 \text{ mg/cm}^2$ verlassen wird. Quantitative Aussagen sind daher für die Beschichtung Kalkweiß, Ammoniumcasein nur bei geringen Caseinbeladungen möglich, während bei der Beschichtung Kalkweiß, Sumpfkalkcasein bis zu einer Caseinbeladung von $B_{cas} = 0,144 \text{ g/cm}^2$ gemessen werden kann (s. Tab. 12).

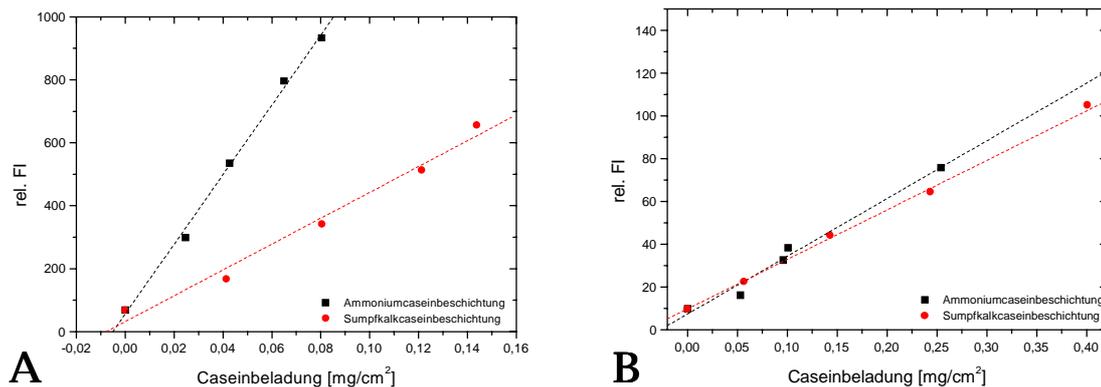


Abb. 46: A: Kalibration der Caseinbeladung für Ammonium- und Sumpfkalkcasein auf Kalkweiß pigmentierter Oberfläche (Ex : Em = 288 : 331 nm)

B: Kalibration der Caseinbeladung für Ammonium- und Sumpfkalkcasein auf Paratacamit pigmentierter Oberfläche (Ex : Em = 288 : 331 nm)

Paratacamit erweist sich als problematisches Pigment, da es sehr geringe Fluoreszenzintensitäten verursacht, nur 11 % der Fluoreszenzintensität von Kalkweiß (s. Abb. 46 B). Dies führt zu hohen Messgrenzen der Caseinbeladung mit $B_{cas} = 0,254 \text{ mg/cm}^2$ für Ammoniumcasein und $B_{cas} = 0,401 \text{ mg/cm}^2$ für Sumpfkalkcasein, während sich der relative Messfehler z_{rel} auf fast 5 % erhöht (s. Tab. 12). Weiterhin führt das hohe Absorptionsvermögen des Paratacamits zu einer so starken Absenkung der Fluoreszenzintensitäten der beiden Caseinbeschichtungsvarianten, dass die Erhöhung der Fluoreszenzintensität von Ammoniumcasein nur noch $s_F = 1,17$ beträgt. Die Oberflächenbeschichtungen auf Mennige, beziehungsweise Eisenoxidrot (Wienhausen) und (Wildeshausen) zeigen ein mittleres, zwischen diesen beiden Extremen liegendes Fluoreszenzverhalten. Der Vergleich der Messgrenzen maximaler Caseinbeladung, der relativen Fehler der Einzelmessungen und der Verhältnisse der relativen Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Caseinbeschichtungsvarianten, gegeben durch den Steigungsfaktor s_F anhand von Tabelle 12, S. 72, verdeutlicht die Unterschiede der verschiedenen Pigmentierungen und Beschichtungen und deren Auswirkungen auf

Fluoreszenzmessungen. Da die durchschnittliche Caseinbeladung einer Caseinschicht bei $B_{\text{cas}} = 0,054 \text{ mg/cm}^2$ liegt, ergibt sich für alle Oberflächenbeschichtungen ein linearer Zusammenhang der Trp-Fluoreszenzentwicklung mit der Caseinbeladung bis zu mindestens 1,75 aufgetragenen Caseinschichten (Kalkweiß, Ammoniumcasein).

Tabelle 12: Vergleich der Messgrenzen maximaler Caseinbeladung und relative Fehler der Einzelmessungen der Kalibrationen

Pigmentierung	Caseinbeschichtung	Messgrenze maximale Caseinbeladung B_{cas} [mg/cm ²]	rel. Fehler z_{rel} [%]	Steigungsfaktor s_F (Verhältnis der rel. FI von AC : KC)
Kalkweiß	AC	0,081	4,20	2,71 : 1
	KC	0,144	0,85	
Mennige	AC	0,102	1,68	3,58 : 1
	KC	0,216	1,38	
Eisenoxidrot (Wildeshausen)	AC	0,107	2,21	2,05 : 1
	KC	0,110	1,02	
Eisenoxidrot (Wienhausen)	AC	0,163	5,41	1,76 : 1
	KC	0,281	3,01	
Paratacamit	AC	0,254	4,95	1,17 : 1
	KC	0,401	4,74	

Während die Pigmentierungen durch ihre Absorptions- und Reflexionsverhalten vor allem die Messgrenzen der Caseinbeladung beeinflussen, wirken sich die verschiedenen Beschichtungen auch auf die relativen Messfehler aus, so dass für Ammoniumcaseinbeschichtungen immer höhere Fehler resultieren als für Sumpfkalkcaseinbeschichtungen. Diese Unterschiede im Verhalten von Pigmenten und Beschichtungen machen eine differenzierte Bestimmung des Oberflächenstatus unabdingbar, bevor mit der Fluoreszenzanalyse quantitative Angaben zur Caseinbeladung gemacht werden.

10.2.3.5 Einfluss der Festigersubstanzen

Die Untersuchung des Einflusses der für den Einsatz ausgewählten Festigersubstanzen auf die Fluoreszenzdetektion zeigt, dass sogar bei einer vollständigen Beschichtung der Oberfläche mit Festigersubstanz nur geringe Einflüsse auf die Fluoreszenzintensität resultieren. Es wurden von den Restauratoren des Niedersächsischen Landesamtes für

Denkmalpflege zwei Festigersubstanzen für die Anwendung an den Wandmalereiobjekten ausgewählt:

1. Klucel E [86]– Cellulose-2-Hydroxypropylether, nichtionischer thermoplastischer Celluloseether, $M_{MW} \cdot 80 \text{ kDa}$, weißes Pulver, 10%ige Lösung in H_2O : Viskosität: 300-700 $\text{mPa}\cdot\text{s}$
 \Rightarrow Hohe Thermoplastizität, Grenzflächenaktivität, gute Verdickungs- und Stabilisierungseigenschaften, sowie die Löslichkeit in Wasser und polaren organischen Lösemitteln empfehlen Klucel E für einen Einsatz als Festigungssubstanz aufstehender Malschichten.
2. Plextol B 500 [87]– wässrige Dispersion eines thermoplastischen Acrylpolymeren auf Basis von Ethylacrylat und Methylmethacrylat, Feststoffgehalt 50 %, weiße Flüssigkeit, Viskosität: 1100 – 4500 $\text{mPa}\cdot\text{s}$
 \Rightarrow Sehr hohe Thermoplastizität und Viskosität, sowie gutes Haft- bzw. Bindevermögen und Pigmentverträglichkeit empfehlen Plextol B 500 für einen Einsatz als Festigungssubstanz aufstehender Malschichten.

Der Einfluss der Festiger auf die messbare Fluoreszenzintensität wurde durch Messung der Fluoreszenzintensitäten vor und nach der vollständigen Beschichtung der Oberfläche mit 10%igen wässrigen Lösungen der Festigersubstanzen bestimmt. Exemplarisch wurde eine mit Eisenoxidrot Wienhausen pigmentierte Oberfläche untersucht (s. Abb. 47 A + B).

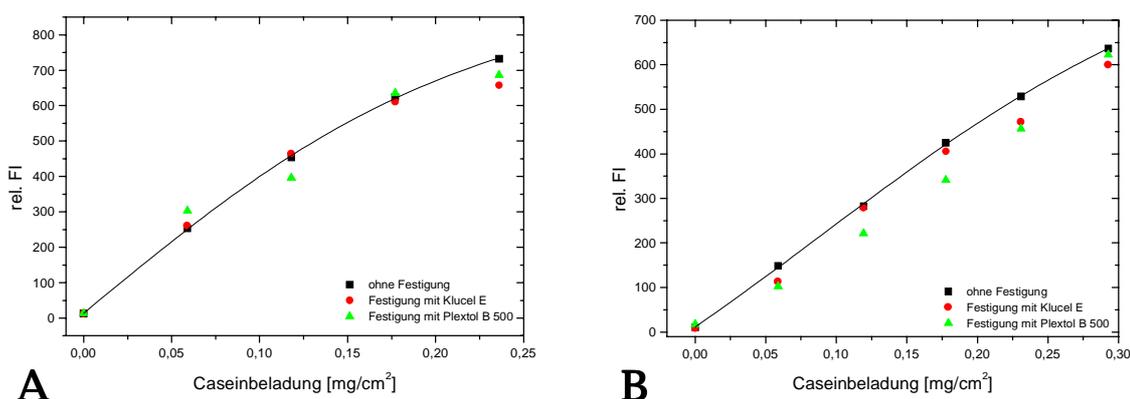


Abb. 47: Pigment Eisenoxidrot Wienhausen, Ex : Em = 288 : 331 nm

A: Messabweichung durch Festigerzusatz für mit Ammoniumcasein beschichtete Oberflächen

B: Messabweichung durch Festigerzusatz für mit Sumpfkalkcasein beschichtete Oberflächen

Die Messungen zeigen, dass sich durch Auftragen einer kompakten Schicht aus Festiger nur eine geringe Beeinflussung der Fluoreszenzintensitäten ergibt, wobei die Abweichungen für Plextol B 500 größer sind, als für Klucel E. Weiterhin sind die relativen Messfehler auf mit Ammoniumcasein beschichteten Oberflächen kleiner. Es kommt hier durch die Festigerschicht zu einer Verdopplung der Messfehler, während für Sumpfkalkcasein beschichtete Oberflächen sogar eine Vergrößerung des Fehlers um den Faktor 3 bzw. 6 resultiert. Tabelle 13 zeigt die relativen Fehler der Einzelmessungen für die verschiedenen Oberflächen und Festigungssubstanzen.

Tab. 13: Relativer Fehler der Fluoreszenzmessung durch Festigersubstanzen

Pigment	Caseinbeschichtung	Festigersubstanz	rel. Fehler z_{rel} [%]
Eisenoxidrot Wienhausen (leimgebunden)	AC	-	5,41
		Klucel E	10,22
		Plextol B 500	12,76
	KC	-	3,01
		Klucel E	10,86
		Plextol B 500	19,87

Da bei der realen Anwendung der Festigersubstanzen nur im ungünstigsten Fall von einer aufliegenden geschlossenen Festigerschicht ausgegangen werden muss, kann der Einfluss generell vernachlässigt werden, wobei im Einzelfall eine genaue Bestimmung des Oberflächenstatus immer hilfreich ist.

10.2.4 2D-Fluoreszenz zur Dokumentation von Abbaureaktionen

Die Beschreibung einer enzymatischen Caseinabbaureaktion durch Detektion der Fluoreszenzentwicklung am Maximum der intrinsischen Trp-Fluoreszenz gelingt aufgrund der besonderen Umgebung des im Casein gebundenen Tryptophans. Denn im α_{S1} -Casein sind die Tryptophangruppen Trp¹⁶⁴ und Trp¹⁹⁹ in sehr hydrophoben Bereichen gebunden, was eine hohe Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Da α_{S1} -Casein die Hauptkomponente in bovinem Casein ist (Anteil 43-45 %, s. Kap. 2), trägt allein das Trp¹⁶⁴ 50 % der Fluoreszenzintensität bei, das Trp¹⁹⁹ noch einmal 20 %. Werden diese Tryptophangruppen bei einem enzymatischen Abbau dem hydrophilen Medium immer stärker ausgesetzt, so verändert sich deren Fluoreszenzaktivität stark [88]. Dieser Vorgang kann als Maß für den Fortschritt des enzymatischen Abbaus dienen und erlaubt eine

umfassende Dokumentation der Abbaureaktionen [89]. Die in Abbildung 48 A dargestellten Abbaukurven zeigen den typischen exponentiellen Verlauf eines Caseinabbaus mit Alkalase® in Lösung, die Anfangssteigung erlaubt kinetische Aussagen.

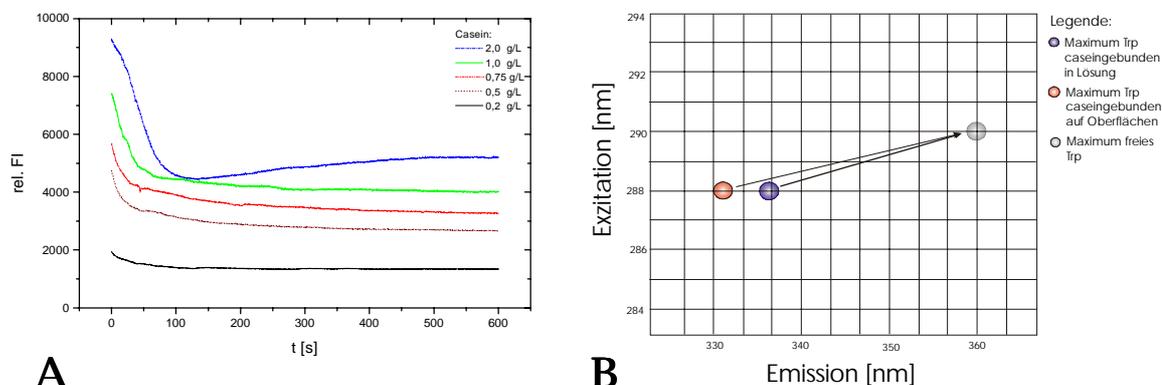


Abb. 48: A: Abbaukurven für den enzymatischen Abbau gelösten Caseins ($c_{A-2,5DXL} = 3,07 \text{ U/mL}$, $t_{\text{Abbau}} = 10 \text{ min}$, RT, Ex : Em = 288 : 336 nm)

B: Verschiebung der Lage des Maximums der Trp-Fluoreszenz beim Übergang vom gebundenen in den freien Zustand

Auffällig ist, dass die Fluoreszenzintensität bei keinem Abbau bis auf Null absinkt, und dass beim Abbau höherer Substratkonzentrationen nach Durchlaufen eines Minimums sogar ein leichter Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen ist. Dies beruht auf einer Verschiebung der Lage des Trp-Fluoreszenzmaximums beim Übergang vom gebundenen in den freien Zustand (s. Abb. 48 B). Denn in Folge der Freisetzung des Tryptophans aus der hydrophoben Umgebung in der Caseinstruktur verringert sich nicht nur die Fluoreszenzaktivität, das Maximum wandert auch um 25 – 30 nm auf der Emissionsseite zu höheren Wellenlängen und liegt dann bei einem Wellenlängenpaar von Ex : Em = 290 : 360 nm. Da das neue Maximum nicht weit von den Maxima der im Protein gebundenen Trp-Gruppen liegt, kommt es zu einem störenden Einfluss dieses neuen Maximums bei Verfolgung der Fluoreszenzentwicklung eines enzymatischen Abbaus. In Abbildung 49 A ist am Beispiel des Abbaus einer 2,0 g/L Caseinlösung die reine Abbaukurve, sowie die Störungskurve durch das freie Tryptophan dargestellt, die zusammen den resultierenden Fluoreszenzverlauf ergeben. Es ist ein mit der Zeit hyperbolisch ansteigender Einfluss durch das Maximum freien Tryptophans zu erkennen, dessen Auswirkungen bei Auswertung über die Anfangssteigung der Abbaukurve aber vernachlässigt werden können.

Abbildung 49 B zeigt die Abhängigkeit dieses Störeinflusses von der Substratkonzentration. Da aus einer höheren Substratkonzentration auch mehr Tryptophan freigesetzt werden kann, ergibt sich die erwartete Korrelation mit der Fluoreszenzkalibration für gelöstes Casein mit einem Korrelationsfaktor von $k = 2,05$.

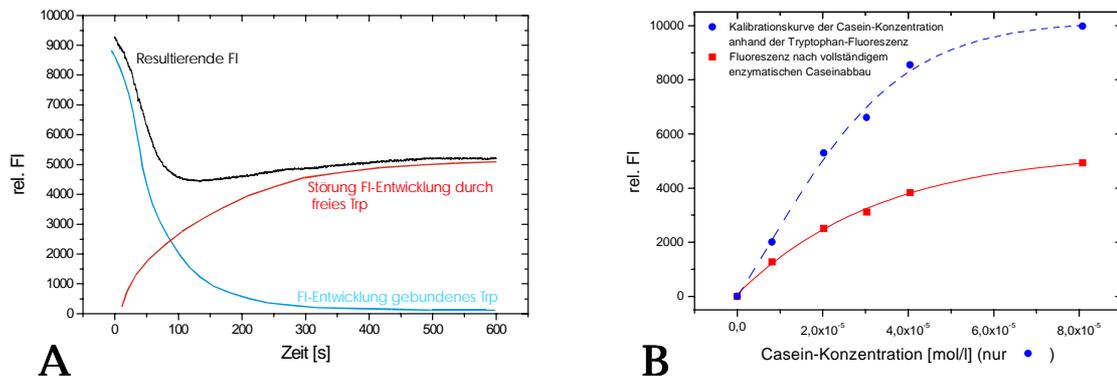


Abb. 49: A: Darstellung der Abbaukurve für $c_{\text{Casein}} = 2,0 \text{ g/L}$ mit Differenzierung in Abbau- und Störungskurve (Ex : Em = 288 : 336 nm)

B: Gegenüberstellung der Fluoreszenzkalibration Casein in Lösung mit der Fluoreszenzverteilung nach vollständigem Caseinabbau (Ex : Em = 288 : 336 nm)

Der Störeinfluss der Fluoreszenz freien Tryptophans auf die Abbaumessung beschränkt sich auf Systeme mit gelöstem Casein, da nur hier das umgesetzte Substrat in der Reaktionslösung verbleibt, während es bei mit der Membrankissenapplikation durchgeführten Abbaureaktionen auf Oberflächen kontinuierlich von der Abbaustelle abtransportiert wird. Der Abtransport der Abbaufragmente von einer Oberfläche ist daher nicht nur aus mikrobiologischen Gesichtspunkten, sondern auch aus messtechnischen Gründen angezeigt.

Die Korrelation der ermittelten Abbausergebnisse lässt sich anhand des Bradford-Proteinassays erreichen, da auch hier die zeitliche Entwicklung der Restsubstratkonzentration verfolgt wird (s. Abb. 50). Der dargestellte Fluoreszenzverlauf ist die vom Störeinfluss freien Tryptophans bereinigte Abbaukurve. Die Daten korrelieren im Rahmen der relativen Messfehler.

Die nicht invasive Dokumentation der Caseinabbaureaktion lässt sich mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie problembezogen verwirklichen. Einzig bei der Ermittlung kinetischer Daten in Lösung zeigen sich Störungen des Abbauverlaufes durch Abbauprodukte, die aber leicht herauszufiltern sind, wie die Korrelation mit dem Bradford-

Proteinassay zeigt. Hingegen zeigen Caseinabbaureaktionen auf Oberflächen mit der entwickelten Membrankissenmethode, für die die 2D-Fluoreszenzanalytik etabliert wurde,

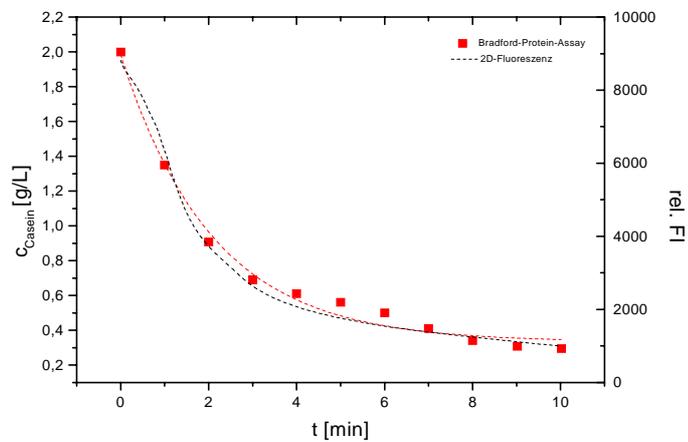


Abb. 50: Korrelation von Bradford-Proteinassay und 2D-Fluoreszenzspektroskopie, Reaktionsbedingungen: 10 mL $c_{\text{Casein}} = 2,0$ g/L, $c_{\text{A-2,5DXL}} = 3,07$ U/mL, $t_{\text{Abbau}} = 10$ min, $T = 25^\circ\text{C}$, 750 rpm

keinerlei Beeinflussung durch die fluorophoren Eigenschaften von Abbauprodukten, da sie nach ihrer Freisetzung umgehend mit dem Pufferträgerstrom von der Oberfläche weggeführt werden. Die Analysenmethode ist daher uneingeschränkt für die Dokumentation von Oberflächenabbaureaktionen geeignet.

10.2.4.1 Standardisierte Abbaukurven

Die 2D-fluoreszenzspektroskopische Analyse der enzymatischen Abbaureaktionen auf caseinierten Probelplatten ermöglicht die nicht invasive Dokumentation der Caseinzersetzung. Da Probelplattenoberflächen herstellungsbedingt sehr inhomogen sind, mussten Oberflächen u.a. anhand von Farbdichte, Schadensbild und Glanzeffekten vor der Bearbeitung sorgfältig ausgewählt werden. Um Vergleich- und Reproduzierbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden die Abbaureaktionen anhand festgelegter Parameter unter Standardreaktionsbedingungen durchgeführt:

- Trägerstrom 0,1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer pH 9,0
- Trägerstromflussrate $f_V = 1,3955$ mL/min
- Immobilisat: Alkalase® 2,5 DX L auf 4x4 cm Epoxycelluloseacetat, $a_{\text{Im-A2,5DXL}} = 0,485$ U/cm²
- Abbaubereich 7,07 cm² Kreisfläche
- Gesamtabbauzeit $t_{\text{Abbau}} = 30$ min, 3 Intervalle je $t_{\text{Abbau}} = 10$ min

- 3 min Oberflächentrocknung nach jedem Abbauintervall
- Trp-Fluoreszenzmaximum λ_{\max} -Ex : Em = 288 : 331 nm, 4 Messungen bei $t_{\text{Abbau}} = 0 \text{ min}, 10 \text{ min}, 20 \text{ min}, 30 \text{ min}$

Um eine oberflächenspezifische Standardisierung der ermittelten Abbaukurven zu erreichen, wurden auf jeder der zu unterscheidenden Oberflächen je drei Abbaureaktionen bei zwei verschiedenen Caseinbeladungen der Oberfläche durchgeführt. Anhand dieser Dreifachbestimmung wurden dann die Schwerpunkte des Abbauverlaufs als standardisierte Abbaukurven ermittelt. Tabelle 14, S. 79 f zeigt die Ergebnisse der Abbauuntersuchungen für alle Oberflächenbeschichtungen.

Wie schon bei den Kalibrationen zeigen sich auch bei den Abbauverläufen starke Unterschiede zwischen den Oberflächen, die sich auch auf die Effektivität der Abbaureaktion auswirken. Der Abbau der Caseinschichten findet auf allen Oberflächenbeschichtungen statt, wobei Paratacamit-Oberflächen mit Abbauresultaten von $R_A = 100 \%$ hervorstechen. Ein nahezu vollständiger Abbau wird weiterhin auf den Oberflächen Kalkweiß, Sumpfkalkcasein und Eisenoxidrot (Wildeshausen) erreicht. Die schlechtesten Abbausergebnisse für auf Oberflächen aufliegende Caseinschichten zeigen sich auf den Pigmentierungen Mennige und Eisenoxidrot (Wienhausen), bei denen nur Abbauresultate von $R_A = 56 - 75 \%$ Entfernung der Caseinschicht nach $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$ erzielt werden; der Abbau auf allen anderen Pigmentierungen ist effektiver. Insgesamt kann also eine Entfernung von mindestens 56 % der Caseinschicht nach $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$ auf jeder Oberfläche erreicht werden. Hieraus folgt, dass die Abbauezeiten für Mennige- und Eisenoxidrot (Wienhausen)-Pigmentierungen auf $t_{\text{Abbau}} = 45 \text{ min}$ ausgedehnt werden sollten, um die Effektivität dieser Abbaureaktionen zu erhöhen. Die relativen Fehler der Messergebnisse liegen - entsprechend den Fehlern der Kalibrationen - für Oberflächen mit geringen resultierenden Fluoreszenzintensitäten, wie z.B. Paratacamit, höher als bei Oberflächen mit hohen resultierenden Fluoreszenzintensitäten, wie z.B. Kalkweiß. Aufgrund der Mittelwertbildung der Abbaureaktionen sind im Vergleich mit den Kalibrationen die Fehler um ca. 50% erhöht, wobei alle relativen Fehler $< 10 \%$ bleiben. Der Vergleich zwischen Abbaureaktionen bei unterschiedlicher Caseinbeladung auf gleicher Oberfläche zeigt eine Erhöhung der Abbauresultate für geringere Oberflächenbeladungen. Dies beruht auf der Festlegung des Abbaueiterraumes zu $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$, in dem der Abbau einer dünneren Caseinschicht weiter fortschreitet als der einer dickeren.

Tab.14: Standardisierte Abbaukurven für enzymatischen Caseinabbau auf Oberflächen

Pigmentierung	Caseinvariante	Probenplatten Nr.	Mittlere Caseinbeladung [mg/cm ²]	Abbauresultat nach 30 min R _A [%]	Rel. Fehler Z _{rel} [%]	Standardisierte Abbaugraphik
Kalkweiß	Ammonium	27, 31, 32	8,63*10 ⁻²	71,61	7,35	
			6,03*10 ⁻²	84,63	5,19	
	Sumpfkalk	35, 39, 40	1,92*10 ⁻¹	94,77	1,49	
			9,48*10 ⁻²	93,28	1,07	
Mennige	Ammonium	91, 92, 95	2,85*10 ⁻²	56,31	2,94	
			9,23*10 ⁻³	87,32	2,08	
	Sumpfkalk	99, 103, 154	1,14*10 ⁻¹	56,05	2,42	
			6,64*10 ⁻²	57,02	1,77	
Eisenoxidrot (Wildeshausen)	Ammonium	123, 124, 125	2,49*10 ⁻²	82,75	3,87	
			2,06*10 ⁻²	92,51	2,76	

Fortsetzung Tab.14: Standardisierte Abbaukurven für enzymatischen Caseinabbau auf Oberflächen

Pigmentierung	Caseinvariante	Probenplatten Nr.	Mittlere Caseinbeladung [mg/cm ²]	Abbaureultat nach 30 min [%]	Rel. Fehler Z _{rel} [%]	Standardisierte Abbaugraphik
Eisenoxidrot (Wildeshausen)	Sumpfkalk	131, 132, 133	$6,76 \cdot 10^{-2}$	96,89	1,79	
			$5,13 \cdot 10^{-2}$	96,67	1,44	
Eisenoxidrot (Wienhausen)	Ammonium	107, 108, 111	$6,64 \cdot 10^{-2}$	62,34	9,47	
			$3,79 \cdot 10^{-2}$	74,09	6,77	
	Sumpfkalk	115, 116, 119	$1,21 \cdot 10^{-1}$	60,44	5,27	
			$1,07 \cdot 10^{-1}$	74,99	3,76	
Paratacamit	Ammonium	64, 65, 148	$1,07 \cdot 10^{-1}$	99,71	8,63	
			$2,82 \cdot 10^{-2}$	100,00	7,80	
	Sumpfkalk	69, 72, 73	$2,74 \cdot 10^{-1}$	100,00	8,22	
			$5,79 \cdot 10^{-2}$	100,00	7,36	

Abschließend kann keine genaue Erklärung für die Differenzen der Abbauperläufe auf verschiedenen Oberflächen gegeben werden, da zu viele Faktoren auf diesen stark inhomogenen Substraten Einfluss auf den Abbau nehmen. Deutlich wird aber eine bessere Abbaurrate für mit Sumpfkalkcasein beschichtete Oberflächen im Vergleich zu ammoniumcaseinierten Oberflächen. Die Ursache hierfür kann nur in einer Verbesserung des Löseverhalten der Caseinmoleküle durch die die Micellenbildung fördernden Ca^{2+} -Kationen liegen.

Um einen Effektivitätsvergleich der kontrollierten enzymatischen Abnahmemethode für Caseinüberzüge mit anderen, herkömmlichen Abnahmemethoden zu erreichen, wurden Caseinüberzüge auf ausgewählten Probenplatten mit verschiedenen Verfahren behandelt, wobei der Anwendungserfolg mit der 2D-Fluoreszenzanalytik dokumentiert wurde. Von den in Tabelle 1, S. 2 aufgeführten, für eine Abnahme geeigneten Chemikalien, wurden die drei Substanzen mit der geringsten Toxizität ausgewählt: Ethanol, Trichlorethan und Ammoniumhydrogencarbonat. Diese Methoden wurden in der gebräuchlichen Form eingesetzt: Mit gesättigten, bzw. reinen Lösungen getränkte Wattestäbchen wurden wiederholt vorsichtig über die Oberfläche gerollt, um die Ablösung der Caseinschicht bei bestmöglicher Schonung der Oberfläche zu erreichen. Abbildung 51 zeigt die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen zur Caseinabnahme, wobei die Effektivität der verschiedenen Methoden in Relation zur standardisierten, enzymatischen Abnahmemethode gesetzt wurden. Es zeigt sich, dass die enzymatische Anwendung die effektivste der untersuchten Abnahmemethoden ist, da sie nicht nur wie die herkömmlichen Verfahren auf eine reine Anlösung der Caseinüberzüge zielt, sondern darüber hinaus die Caseinmoleküle hydrolysiert und von der Oberfläche abführt. Eine gezieltere Anwendung mit der Möglichkeit zur Kontrolle der Anwendungsparameter sollte daher auch für die herkömmlichen Anwendungsverfahren durch eine Verwendung der Membrankissenapplikation zu erreichen sein. Hierfür müssten geeignete, inerte Membranen und Schaumstoffe ermittelt werden, die eine Verwendung ermöglichen, so dass auch bei diesen Verfahren z.B. der kritische Flüssigkeitseintrag in die Oberfläche kontrolliert werden könnte und auch gelöste Caseine von der Oberfläche abgeführt würden.

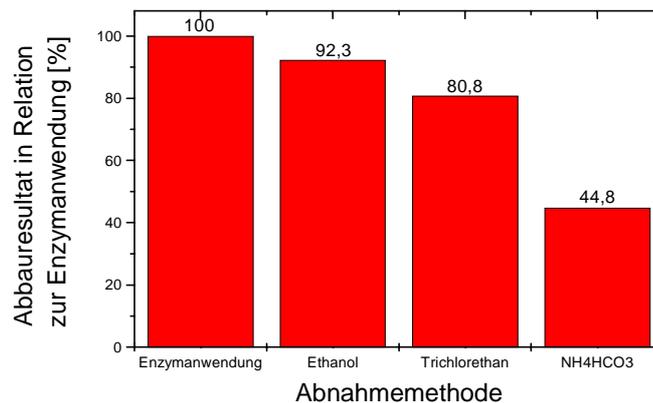


Abb. 51: Effektivitätsvergleich verschiedener Abnahmemethoden

Die Effektivität der enzymatischen Anwendung überzeugt im Vergleich mit anderen Abnahmemethoden trotz der Schwierigkeiten bei der Handhabung der komplexen Substrate, bzw. Oberflächen. Visuell zeigen sich die Auswirkungen der Oberflächenanwendungen oft deutlicher als es die Abbaubilanzen vermuten lassen. Besonders durch weitere Alterungen nach Anwendung der enzymatischen Abnahmemethode können gezielt die Unterschiede im zukünftigen Verhalten der Oberflächen dargestellt werden. Abbildung 52 zeigt den Ausschnitt einer Probeplattenoberfläche, auf der erhebliche Schäden durch Alterung der Caseinüberzüge zu erkennen sind.

Zur Demonstration der starken Auswirkungen der enzymatischen Abnahmemethode wurde eine Beschichtungsvariante mit geringen Abbauresultaten ausgewählt, Eisenoxidrot (Wienhausen), Ammoniumcasein (Abbauresultat: $R_A = 62,34 - 74,09 \%$, s. Tab.14). Die Probeplatte wurde nach einer dreimonatigen Alterung in der Klimakammer im Bereich des weiß umrandeten Kreises für $t_{\text{Abbau}} = 30 \text{ min}$ mit dem Membrankissensystem behandelt und anschließend für weitere 3 Monate gealtert. Auf der linken, unbehandelten Seite zeigt sich ein extremes Schadensbild mit den typischen Glanzeffekten und abrollenden Farbschichten durch die Spannung der Caseinschicht. In dem mit Enzymimmobilisat behandelten Bereich hingegen fehlt das Schadensbild ganz. Die matte Oberfläche und das völlige Fehlen der Spannungserscheinungen durch die aufliegende Caseinschicht belegen deutlich den sehr positiven Effekt der enzymatischen Methode auf die Oberfläche. Die Ausdünnung der Caseinschicht, die auf dieser Oberfläche stattfindet, reicht aus, um die angestrebte Beseitigung des Schadensbildes durch Caseinüberzüge zu erreichen.



Abb. 52: Nahaufnahme Probplattenoberfläche (Probplatte 139, Eisenoxidrot (Wienhausen), Ammoniumcasein), 3 Monate Alterung nach Caseinabbau:

Linke Seite: Probplattenoberfläche ohne Abbau mit abrollender Caseinschicht (glänzende Oberfläche, Abrollen des Caseins mit Pigment-Schicht)

Rechte Seite: Probplattenoberfläche nach 30 min Abbau der Caseinschicht mit Membranimobilisat (kein Glanz, kein Schadensbild)

Eine 30 min dauernde Anwendung führt auf allen Oberflächen zu einer so starken Ausdünnung der Caseinschicht, dass eine folgende Festigung mit einer geeigneteren Festigungssubstanz, wie Klucel E, einen nachhaltigen Schutz der pigmentierten Oberfläche gewährleisten sollte.

So kann die Anwendung der enzymatischen Abnahmemethode auf den Probplattenoberflächen unter diesen „einfachen“ Bedingungen als Erfolg angesehen werden. Da auf Wandmaleroberflächen noch eine Reihe weiterer Faktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Caseinschicht und auch auf den enzymatischen Caseinabbau nehmen, werden auch „komplexere“ Bedingungen, wie eine mikrobielle Besiedelung der Oberfläche, Salzausblühungen durch Salzwanderungen im Mauerwerk und schließlich die reale Wandmaleroberfläche untersucht (s. Kap 12-14).

11. Pigmentuntersuchungen

Ein wesentlicher Aspekt, der bei der Entwicklung einer Anwendung zum enzymatischen Caseinabbau auf Wandmalereien berücksichtigt werden muss, sind die Auswirkungen der Methode auf die Farbschichten. Die Pigmente sind in der ca. 40 µm dicken Farbschicht mit unterschiedlichen Bindemitteln gebunden (s. Tab. 5, Kap. 7.2), direkt über der Farbschicht liegt die Caseinschicht. Durch einen enzymatischen Abbau kann auch das Bindemittel des Pigmentes zersetzt werden, besonders wenn die aufliegende Caseinschicht nicht geschlossen ist. So muss geklärt werden, ob die Pigmente von den Wandmalereien gewaschen werden und ob weitere schädigende Einflüsse durch die Anwendung entstehen.

11.1 Pigmentauswaschverhalten

Die Möglichkeit zur Untersuchung des Auswaschverhaltens der Pigmente ist durch die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) gegeben [90]. Diese Methode ermöglicht den Nachweis kleinster Metallkationenkonzentrationen in Proben. So können die Pigmentkationen durch Probenahme aus dem Abflussstrom des enzymatischen Caseinabbaus auf einer Oberfläche im Trägerstrom nachgewiesen werden. Tabelle 15 zeigt die bei verschiedenen Pigmenten ermittelten Kationenkonzentrationen im Trägerstrom. Es zeigt sich, dass die Pigmente nicht von den Oberflächen abgewaschen werden, da zu keinem Zeitpunkt der Abbaureaktion Pigmentkationen im Trägerstrom nachgewiesen werden können. Einzig das Ca^{2+} -Kation ist in jeder Probe in ähnlicher Konzentration nachzuweisen. Die Ursache hierfür ist die Tatsache, dass Casein ein Calcium bindendes Protein ist, und dieses aus dem abgebauten Casein stammende Calcium in allen Proben vorhanden ist. Da die Calciumkonzentrationen der Proben von Kalkweiß-Probeplatten identisch mit denen der Proben anderer Pigmentierungen ist, lässt sich auch eine Auswaschung des Ca^{2+} -Pigmentes ausschließen. Es kommt somit durch die enzymatische Abbaureaktion zu keiner Beeinträchtigung der Malschicht durch eine Auswaschung der Pigmente. Die Freisetzung geringer Konzentrationen an Pigmentkationen, die unter den Nachweisgrenzen der AAS liegen, kann nicht ausgeschlossen werden, führt aber zu keiner optischen Beeinträchtigung der Wandmalerei.

Tab.15: Im Trägerstrom ermittelte Konzentrationen der Pigmentkationen bei enzymatischem Caseinabbau auf Oberflächen

Pigment	Metallkationen	Absorptionslinie [nm]	Untere Nachweisgrenze [$\mu\text{g/mL}$]	Kationenkonzentration [mg/mL]
Kalkweiß	Ca^{2+}	422,7	0,5	1,2-2,4
Paratacamit	Cu^{2+}	324,8	3,0	-- , Ca^{2+} : 0,9-2,0
Mennige	Pb^{2+} , Pb^{4+}	214,0	20,0	-- , Ca^{2+} : 1,0-2,3
Eisenoxidrot (Wienhausen)	Fe^{3+}	248,3	5,0	-- , Ca^{2+} : 1,1-2,1
Eisenoxidrot (Wildeshausen)				-- , Ca^{2+} : 1,4-2,1

11.2 Verfärbungen in Folge des Abbaus

Ein weiteres Problem, das nur beim enzymatischen Caseinabbau auf mit Paratacamit pigmentierten Oberflächen auftritt, ist die Verfärbung der Farbschicht. Paratacamit, das hellgrün bis türkis ist (s. Abb. 53 A) und zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\text{max } 1} = 335,5 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max } 2} = 718,5 \text{ nm}$ aufweist (s. Kap. 10, Abb. 45 B), verfärbt sich in Folge des Abbaus blau-violett (s. Abb. 53 B) mit einem Absorptionsmaximum von $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$.

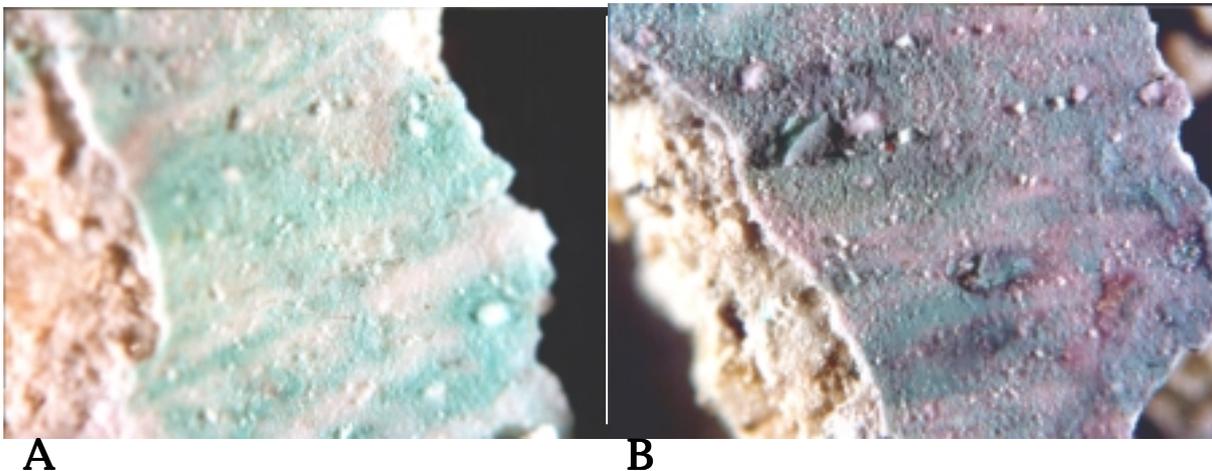


Abb. 53: A: Nahaufnahme einer intakten Paratacamit-Farbschicht, $\lambda_{\text{max } 1} = 335,5 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{max } 2} = 718,5 \text{ nm}$ (Foto K. Klein)

B: Nahaufnahme einer verfärbten Paratacamit-Farbschicht, $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$ (Foto K. Klein)

Derartige Verfärbungen werden auch am Objekt Allerheiligenkapelle Wienhausen gefunden, allerdings ist hier zumeist der Violett-Anteil der Verfärbung geringer (s. Abb. 54).



Abb. 54: Nahaufnahme eines Gewölbebogens mit Blauverfärbung des Grünpigmentes, Objekt Allerheiligenkapelle Wienhausen (Foto T. Trapp)

Die Verfärbungen können entstehen, da das Zentralatom des Pigmentsalzes Paratacamit das Cu^{2+} -Kation ist, ein starker Komplexbildner. Es hat eine hohe Hydratationsenthalpie und geht daher leicht in Lösung, in der es durch Bildung von Oktaederkomplexen als $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ 6-fach (4+2-Koordination) koordiniert vorliegt. Die quadratisch koordinierten H_2O -Liganden können in wässriger Lösung leicht verdrängt werden, im alkalischen Bereich kommt es zur Ausbildung intensiv gefärbter Cu^{2+} -Hydroxykomplexe, sogenannter Cuprite (z.B. $[\text{Cu}(\text{OH})_4]^{2-}$) [91]. Da der pH-Wert des Puffers für den enzymatischen Abbau bei $\text{pH} = 9,0$ liegt, entstehen die Verfärbungen in Folge der Puffereinwirkung während der Abbaureaktion.

Spektroskopisch konnte das Entstehen zweier Farbkomplexe nachgewiesen werden. Diese sind violett ($\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$), beziehungsweise blau ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) und ergeben in Lösung ein Mischspektrum mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$ (s. Abb. 55 A).

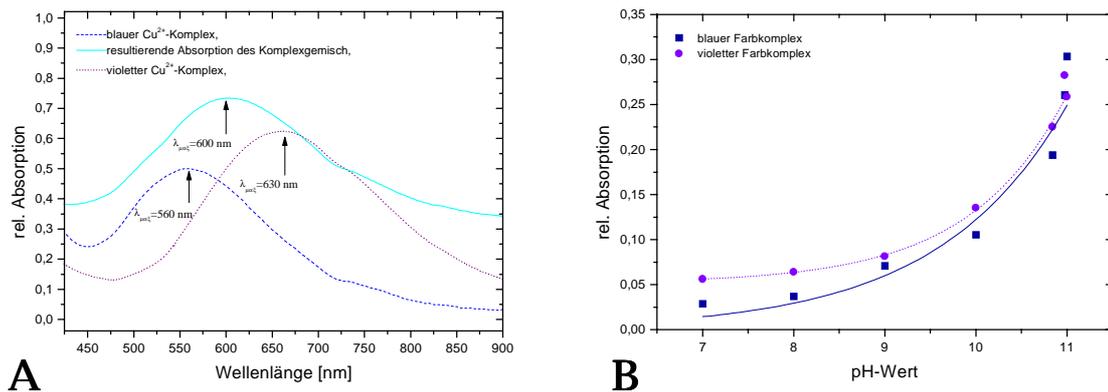


Abb. 55: A: Absorptionsmaxima der beim enzymatischen Caseinabbau bei Anwesenheit von Paratacamit gebildeten Farbkomplexe, 2 % (v/v) Paratacamit in wässriger Lösung, pH 11,0
 B: pH-Abhängigkeit der Farbkomplexbildung im Bereich von pH 7-11

Die Bildung beider Farbkomplexe ist stark pH-abhängig. Abbildung 55 B zeigt den exponentiellen Absorptionsverlauf; die Färbung wird mit steigendem pH-Wert immer intensiver. Daher ist die konsequente Vermeidung einer alkalischen Umgebung im Umgang mit Paratacamit angezeigt. Der Ersatz der alkalischen Pufferlösung (pH 9,0) beim enzymatischen Caseinabbau gegen eine neutrale (pH 7,0) führt zu einer Verminderung der Pigmentverfärbung in Folge des Abbaus. Es verbleibt aber eine sichtbare Restverfärbung, die nur zum Teil durch unvollständig carbonatisierten Kalkputz (pH 12,4) und alkalische Salze, die bei der Caseinsuspension eingesetzt werden, erklärt werden kann.

Bei Variation der Caseinkonzentration zeigt sich für beide Farbkomplexe außerdem die Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (s. Abb. 56 A + B). Es ist sowohl in neutraler, wie auch in alkalischer Lösung eine Zunahme der Absorption mit steigender Proteinkonzentration festzustellen, in alkalischer Lösung ist die Absorption aber dreimal so intensiv. Die Abhängigkeit der Komplexbildung von der Caseinkonzentration weist also auf eine Beteiligung der Proteinkomponenten an der Komplexbildungsreaktion hin. Eine derartige Proteinkomplexbildung durch Kupfer ist durchaus möglich, und wird sogar für analytische Zwecke z.B. in dem in Kapitel 4 beschriebenen BCA-Proteinassay ausgenutzt. Der im BCA-Proteinassay gebildete Cu-Proteinkomplex hat zudem ein Absorptionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$, wie auch einer der Paratacamitfarbkomplexe.

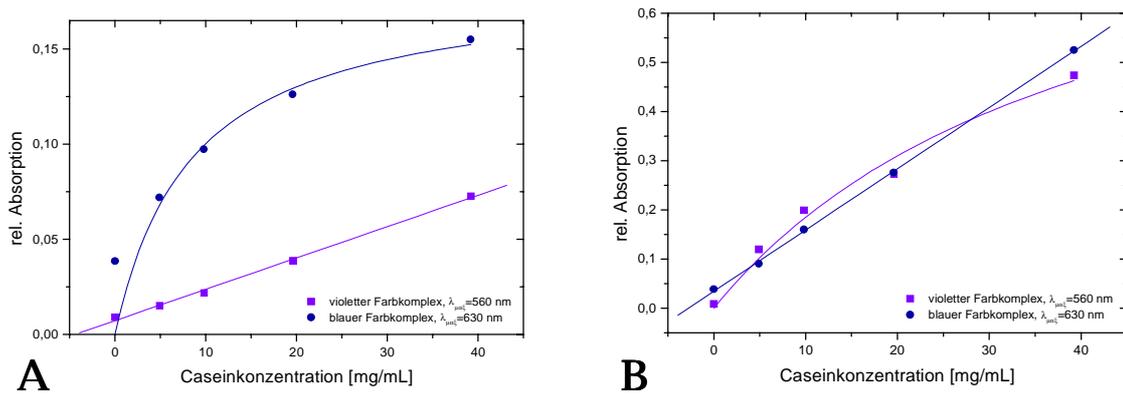


Abb. 56: A: Abhängigkeit der Absorption der Cu^{2+} -Farbkomplexe von der Caseinkonzentration in wässriger Lösung, pH = 7,0

B: Abhängigkeit der Absorption der Cu^{2+} -Farbkomplexe von der Caseinkonzentration in alkalischer Lösung, pH = 9,0

Das Problem der pH-Abhängigkeit kann durch entsprechende Wahl eines neutralen Abbaumediums reduziert werden, während die Abhängigkeit der Farbkomplexbildung von der Proteinkonzentration nicht beeinflusst werden kann, wie auch die Basizität des Untergrundes durch Verunreinigungen, Rückstände oder unvollständigen Abbindeprozeß. Es muss daher eine geringe Verfärbung der Oberfläche bei Abbau auf Paratacamit-Oberflächen in Kauf genommen werden, ein akzeptabler Umstand, da die Verfärbung mit den Jahren langsam verblasst.

12. Mikrobiologische Untersuchungen

Unerlässlich bei der Behandlung von Wandmalereien ist es, auch die mikrobielle Besiedelung der Oberfläche zu berücksichtigen. Denn eine Vielzahl von Mikroorganismen wächst unter den Wachstumsbedingungen auf einer Wandmaleroberfläche, besonders wenn Feuchtigkeit im Mauerwerk und eine ausreichende Nahrungsgrundlage vorhanden ist [92-95]. Diese kann schon durch die Proteinbestandteile der Pigmentbindemittel gegeben sein. Eine Beschichtung der Wandmalerei mit Casein erscheint unter diesem Gesichtspunkt fatal, da auf diese Weise eine optimale Nahrungsgrundlage für einen mikrobiellen Befall geschaffen wird. Diese unfreiwillige Förderung des mikrobiellen Bewuchses führt zu einer an den Objekten Wienhausen und Wildeshausen nachzuweisenden Zerstörung der Wandmalerei. Die Biofilme legen sich in dichten Schleiern über die Wandmalerei, zersetzen Bestandteile der Malschicht und zerstören durch Ausscheidung von Stoffwechselprodukten nachhaltig die originale Malsubstanz.

12.1 Anwendungsvorgaben bei mikrobieller Oberflächenbesiedelung

Bei Etablierung einer enzymatischen Anwendung zur Abnahme der Caseinüberzüge müssen die verschiedenen mikrobiellen Einflüsse berücksichtigt werden, um die Einschleppung und Verschleppung von Mikroorganismen in Folge der Anwendung zu vermeiden. In Zusammenarbeit mit der AG Geomikrobiologie ICBM, Universität Oldenburg wurden hierzu Vorgaben erarbeitet:

- 0,2 µm-Sterilfiltration des nativen Enzyms vor Immobilisierung,
- Immobilisierung unter sterilen Bedingungen,
- Konstruktion des Membrankissens aus Edelstahl zur Gewährleistung vollständiger Sterilisierbarkeit,
- Verwendung einer 0,2 µm Hydrosart-Membran zwischen Immobilisat und Schaumstoffkissen zur Vermeidung der Verschleppung von Mikroorganismen über das Membrankissen,
- Verwendung eines Carbonatpuffers (0,1 M, pH = 9,0) statt eines üblichen Phosphatpuffers, damit eine Phosphatdüngung der Oberfläche ausgeschlossen wird.

Strikte Einhaltung dieser Vorgaben bei Durchführung des enzymatischen Caseinabbaus ermöglicht das saubere Arbeiten ohne das Eintragen neuer Keime und ohne Verschleppung vorhandener Populationen von einer Abbaustelle zur nächsten.

Weiterhin müssen die Auswirkungen einer mikrobiellen Besiedelung auf die Caseinschicht untersucht werden, z.B. das Ausmaß der Caseinzersetzung durch den mikrobiellen Stoffwechsel oder der Einfluss von Stoffwechselprodukten. Angestrebtes Ziel ist es, durch den enzymatischen Abbau eine Verminderung des mikrobiellen Befalls zu erreichen, einerseits durch Entzug des Nährsubstrates Casein und andererseits durch Einsatz eines geeigneten Biozidzusatzes im Trägerstrom, der den vorhandenen mikrobiellen Bewuchs abtötet [96, 97].

12.2 Mikroorganismen auf Wandmalereien [98]

Es konnten verschiedene Mikroorganismen von den Wandmalereien der Objekte Wienhausen und Wildeshausen isoliert und charakterisiert werden. Es finden sich vor allem rosa gefärbte Bakterien verschiedener Gattungen, die teilweise noch unbekannt sind und ungewöhnliche Verhalten wie Formwandlung und Zellwandänderungen in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen zeigen [99]. Es konnten aber auch bekannte gram-positive Eubakterien identifiziert werden, wie *Micrococcus agilis* und *Nocardia corynebacterioides*, die nicht in der Lage sind Casein zu zersetzen und deshalb auf eine alkalische Umgebung angewiesen sind, in der die Caseinmoleküle teilweise hydrolysiert werden. Weiterhin wurden Pilzhyphen z.B. aus der Gattung *Penicillium* gefunden, die intaktes Casein zersetzen können und eine Vergrauung der Oberfläche bewirken. Auf den Wandmalereien zeigt sich ein undifferenziertes Erscheinungsbild, einerseits findet man solitäre Stämme, aber auch Mischpopulationen sind stark verbreitet.

12.3 2D-Fluoreszenzanalyse verkeimter Oberflächen

Eine Besiedelung ausgesuchter Probeplatten mit den isolierten Stämmen soll Aufschluss über die Auswirkungen des mikrobiellen Befalls auf den Caseinüberzug geben. Hierzu wurden von der AG Geomikrobiologie ICBM, Universität Oldenburg Probeplatten aller Pigmentierungen untersucht, um gegebenenfalls auch eine Abhängigkeit von der Pigmentierung zu bestimmen. Es wurden auf jeder Probeplatte je eine Reinkultur von Bakterien und Pilzen angesiedelt, sowie je ein Bakterien- und ein Pilzmix. Es zeigt sich in Folge der Besiedelung mit Mikroorganismen neben der Trp-Fluoreszenz ein neues, unbekanntes Fluorophor mit $\lambda_{\text{max}} - \text{Ex} : \text{Em} = 350 : 420 \text{ nm}$ (s. Abb. 57 A). Es liegt damit im Bereich der Fluoreszenzmaxima von z.B. Zwischenprodukten der biosynthetischen

Umsetzung von Tyrosin zu Melanin, einem natürlichen Farbstoff (λ_{\max} - Ex : Em = 345 : 410 nm). Eine genaue Identifizierung der unbekanntenen fluorophoren Gruppe ist nicht möglich, doch lässt sich die neue Fluoreszenzerscheinung vermutlich auf den mikrobiellen Stoffwechsel zurückzuführen, dem die Caseine als Nährsubstrat dienen. Eine Störung der Fluoreszenzintensität der Trp-Fluoreszenz verursacht diese neue Fluoreszenzerscheinung indes nicht, da die Fluoreszenzmaxima der beiden Fluorophore zu weit auseinander liegen.

Weiterhin ist eine gleichmäßige Abnahme der messbaren Fluoreszenzintensität von ca. 60 % festzustellen. Abbildung 57 B zeigt das Differenzspektrum von unbesiedelter und besiedelter Probepplattenoberfläche, in dem die Intensitätsabnahme des Fluoreszenzmaximums der Trp-Fluoreszenz deutlich wird.

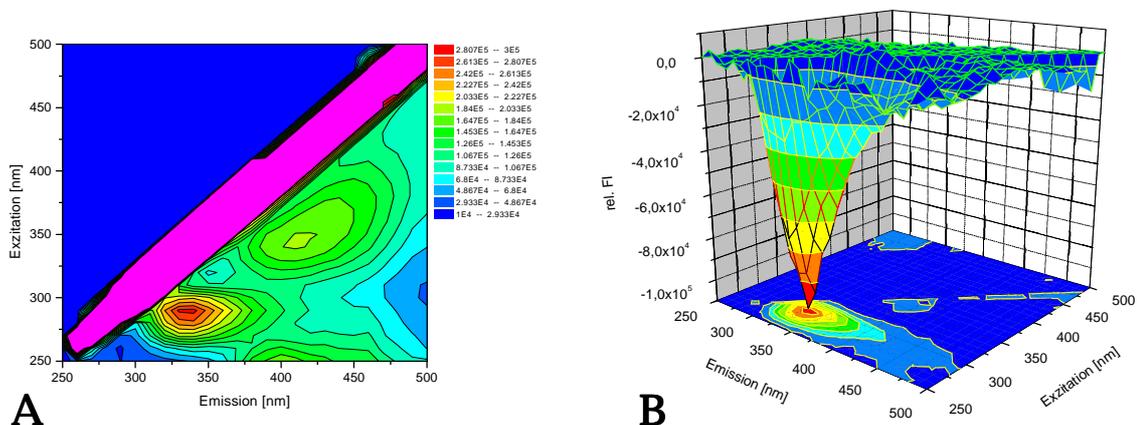


Abb. 57: A: 2D-Fluoreszenz-Contourplot einer mikrobiell besiedelten Probepplatte, Ex/Em: 250 – 500 nm, PP 110: Eisenoxidrot (Wienhausen), Ammoniumcasein
 B: 3D-Darstellung des Differenzspektrums von besiedelter und unbesiedelter Probepplatte Ex/Em: 250 – 500 nm, PP 30: Kalkweiß, Ammoniumcasein

Die starke Abnahme der Fluoreszenzintensität resultiert aus der Umsetzung des Tryptophans im Stoffwechsel der Mikroorganismen, da diese aus der Aminosäure in der Gluconeogenese Zucker synthetisieren können [41]. Diese Zucker wiederum können weiteres Tryptophan in der Maillard-Reaktion zu Melanoidinen [100] umsetzen. Wie auch das Auftreten der neuen internen Fluoreszenz ist also die Verringerung der messbaren Fluoreszenzintensität des Trp-Maximums auf den Abbau der Caseine durch den mikrobiellen Bewuchs zurückzuführen, die die im Casein gebundenen Aminosäuren als Nahrungsquelle nutzen. Die Messbarkeit der Caseinkonzentration durch Bestimmung der Trp-Fluoreszenz wird durch einen aufliegenden Biofilm nicht eingeschränkt, da die 60 % Verlust an Fluoreszenzintensität den Anteil des Caseins repräsentieren, der im

mikrobiellen Stoffwechsel hydrolysiert wurde und somit auch bei einem enzymatischen Abbau nicht als Substrat zur Verfügung steht. Die Mikroorganismen erledigen also einen Teil der „Arbeit“, auch wenn dies aufgrund der von ihnen verursachten Schadensbilder unerwünscht ist.

12.4 Abbauuntersuchungen an verkeimten Oberflächen

An den verkeimten Probelplatten wurden Abbauuntersuchungen mit der Membran-kissenapplikation unter Standardreaktionsbedingungen durchgeführt. Abbildung 58 zeigt den Vergleich zweier Abbaureaktionen auf dem gleichen Substrat in direkter Nähe, wobei die eine Abbaureaktion auf der mikrobiell besiedelten Oberfläche durchgeführt wurde. Die andere Abbaureaktion wurde auf einer unbesiedelten Vergleichsfläche durchgeführt.

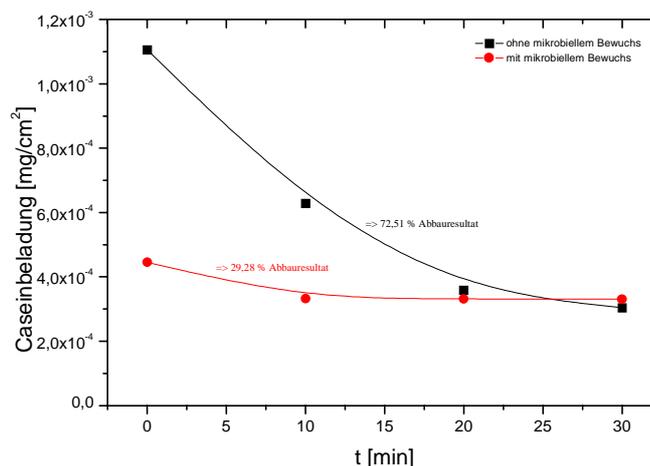


Abb. 58: Vergleich der Abbauperläufe für Abbaureaktionen auf und neben einem mikrobiellen Bewuchs, PP 38: Kalkweiß, Ammoniumcasein, Standardreaktionsbedingungen

Es zeigt sich der beschriebene mindestens 60 %ige Verlust der Fluoreszenzintensität bei allen Abbaureaktionen auf verkeimten Oberflächen, so dass insgesamt sehr niedrige Fluoreszenzintensitäten resultieren, die eine Vergrößerung der relativen Messfehler bewirken. Darüber hinaus zeigt sich eine starke Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Stärke des Bewuchses, so dass die Abbauresultate in Abhängigkeit dieses schwer zu bestimmenden Parameters schwanken. Die Abbauresultate liegen auf den beimpften Probelplatten bei durchschnittlich nur $R_A = 22,62\%$. Die unterschiedlichen Pigmentierungen zeigen einen Einfluss auf die Abbauergebnisse der enzymatischen Casein-

zersetzung. In Tabelle 16 sind die durchschnittlichen Abbauresultate verschiedener Pigmentierungen zusammengefasst.

Tab.16: Abbauresultate bei unterschiedlicher Probepplattenpigmentierung

Pigmentierung	Abbauresultat nach 30 min R_A [%]	Relativer Fehler z_{rel} [%]
Kalkweiß	29,28	27,43
Mennige	20,48	21,36
Eisenoxidrot (Wienhausen)	29,19	17,88
Eisenoxidrot (Wildeshausen)	23,25	20,92
Paratacamit	7,87	44,57

Die Abbauresultate stimmen im Rahmen der relativen Fehler überein. Einzig die Abbaureaktionen auf Paratacamit-Oberflächen fallen durch extrem geringe Abbauresultate auf, die weniger auf einem schlechteren Abbauresultat beruhen, als vielmehr in den geringen Fluoreszenzintensitäten auf diesen Oberflächen ihre Ursache finden, die an der Grenze der Messauflösung liegen und keine korrekten Aussagen mehr ermöglichen. Berücksichtigt man den von den Mikroorganismen verursachten Abbau des Caseins um 60 %, so ergibt sich eine Gesamtabbaubilanz von durchschnittlich 69,05 %. Dass heißt, dass die Membrankissenmethode, trotz der dramatischen Abnahme an Effektivität auf mikrobiell besiedelten Oberflächen, im Zusammenspiel mit der mikrobiellen Besiedelung zu einer, den Abbauresultaten auf unbesiedelten Oberflächen entsprechenden, Verringerung der Caseinschichten und somit zur erfolgreichen Herabsetzung der Spannungserscheinungen durch die aufliegenden Caseinüberzüge führt.

12.5 Biozideinsatz während des Abbaus

Um den Einfluss der Mikroorganismen auf die enzymatische Abbaureaktion herabzusetzen, wurden von der AG Geomikrobiologie ICBM, Universität Oldenburg verschiedene Biozidzusätze auf ihre mikrobizide Wirkung bezüglich der oberflächenbesiedelnden Mikroorganismen und auf eine mögliche Inhibierung der Alkalase® 2,5 DX L hin untersucht [101]. Benzalkoniumchlorid und Clotrimazol erwiesen sich als effektivste Biozide unter diesen speziellen Anwendungsbedingungen, wobei Clotrimazol aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit als Zusatz im Trägerstrom ausschied.

Benzalkoniumchlorid hingegen ist gut wasserlöslich, und zeigt auch in einer gesundheitlich unbedenklichen 1 %igen Lösung gute mikrobizide Wirkung.

Im Carbonatpuffer-Trägerstrom wurde 1 % Benzalkoniumchlorid gelöst und mit diesem modifizierten Puffermedium wurden Abbaureaktionen an verkeimten Probeplatten unter Standardreaktionsbedingungen durchgeführt. Tabelle 17 fasst die Abbauresultate, die bei einem Biozideinsatz von 1 % Benzalkoniumchlorid erzielt werden konnten, zusammen.

Tab.17: Abbauresultate bei Biozidzusatz auf unterschiedlicher Probeplattenpigmentierung

Pigmentierung	Abbauresultat nach 30 min	
	R_A [%]	Relativer Fehler z_{rel} [%]
Kalkweiß	47,42	14,53
Mennige	42,56	16,78
Eisenoxidrot (Wienhausen)	51,73	13,62
Eisenoxidrot (Wildeshausen)	41,89	16,51
Paratacamit	27,87	23,94

Es tritt eine deutliche Verbesserung der Abbauresultate um ca. 20 % ein, die auf der Wirkung des Benzalkoniumchlorides beruht. Das Biozid tötet die Mikroorganismen effektiv ab, so dass die Einflussnahme der Mikroorganismen auf die Abbaureaktion herabgesetzt wird. Durch den Biozidzusatz werden also nicht nur die vorhandenen Keime auf der Oberfläche abgetötet, was das allgemeine Schadensbild der Oberfläche verringert, sondern auch die Reaktionsbedingungen für die enzymatische Hydrolyse des Caseins verbessert. Die Gesamtabbaubilanz liegt bei Berücksichtigung des von den Mikroorganismen abgebauten Caseins bei durchschnittlich 76,92 %, was gegenüber den Abbauresultaten auf unbesiedelten Probeplatten leicht erniedrigt ist. Der Einfluss des Biozidzusatzes kann aufgrund seiner doppelten Wirksamkeit als positiv bewertet werden. Die Membrankissenmethode kann die Caseine abbauen und die Abbaufragmente abtransportieren; sie vermag jedoch nicht die abgetöteten Mikroorganismen von der Oberfläche zu lösen, so dass diese als Belag auf der Oberfläche verbleiben. Die Abnahme dieser toten Biofilme muss in einem Folgeschritt mit alternativen Restaurierungsmethoden durchgeführt werden.

13. Salzausblühungen auf Wandmaleroberflächen

Ein weiteres Problem bei der Bearbeitung von Wandmalereien sind anorganische Salze [17]. In allen Schichten vom Mauerwerk bis zur Pigmentschicht sind eine Vielzahl von anorganischen Salzen, wie Carbonate, Chloride, Sulfate und Nitrate gebunden, die sich durch Feuchtigkeitsschwankungen am Objekt lösen und mit der Feuchtigkeit wandern, um an anderer Stelle wieder auszukristallisieren. Dieser reversible Vorgang führt langfristig zu einer Wanderung dieser Salze bis zur Wandmaleroberfläche, wo sie sich als Kristallausblühungen über die Malschicht legen. So entsteht ein vielfältiges Schadensbild, da die Ausblühungen die Malschicht z.B. durch Schleierbildung (Gipsschleier) überdecken oder die wachsenden Kristalle die Kalkputzschichten sprengen. Auch verändert sich durch die wandernden Salze der Oberflächen-pH-Wert der Wandmalerei, was Auswirkungen auf die Pigmentierungen haben kann, wie z.B. die im Alkalischen einsetzende Verfärbung der Paratacamitschicht (s. Kap. 11). Aufgrund dieser Probleme ist immer eine autarke Klimatisierung der Objekte anzustreben, um den Feuchtigkeitseintrag ins Mauerwerk zu minimieren und zu große klimatische Schwankungen zu vermeiden, da diese die reversiblen Lösungsvorgänge initiieren. In der Realität kann das Ideal einer autark klimatisierten Wandmalerei allerdings nur selten verwirklicht werden, da bautechnische Probleme, sowie öffentliche und edukative Interessen an den historischen Wandmalereien dem Wunsch nach einer Klimakontrolle meistens entgegenstehen.

13.1 Untersuchungen an salzbelasteten Prüfkörpern

Um den Einfluss dieser Salzsäden auf die enzymatische Abnahmemethode für Casein und die 2D-Fluoreszenzbegleitanalytik zu ermitteln, wurde eine Kalkputzprobepalte mit Eisenoxidrot (Wildeshausen)-Pigmentierung (Probepalte 130, Ammoniumcasein) exemplarisch mit einem Salzmedium (gesättigte Lösung aus NaCl, $Mg(NO_3)_2$) behandelt. Durch geeignete klimatische Belastungszyklen wurde dann in einem Klimaschrank am Institut für Solar- und Gebäudetechnik die Wanderung der Salze zur Malschichtoberfläche erreicht. Das resultierende Schadensbild zeigt einen aufliegenden Grauschleier aus Mikrokristallen und ein Abplatzen der Malschicht durch die Kristallblüte (s. Abb. 59 A) [60]. An dieser belasteten Probepalte wurden im Bereich der doppelten Ammoniumcaseinbeschichtung die 2D-Fluoreszenzanalytik und die enzymatische Abnahmemethode getestet (s. Abb. 59 B). Die Anwendung unter Standardreaktionsbedingungen führt zur

Auflösung des aufliegenden Salzrasens und zu einer Aufhellung der Pigmentierung der Abbaustelle.

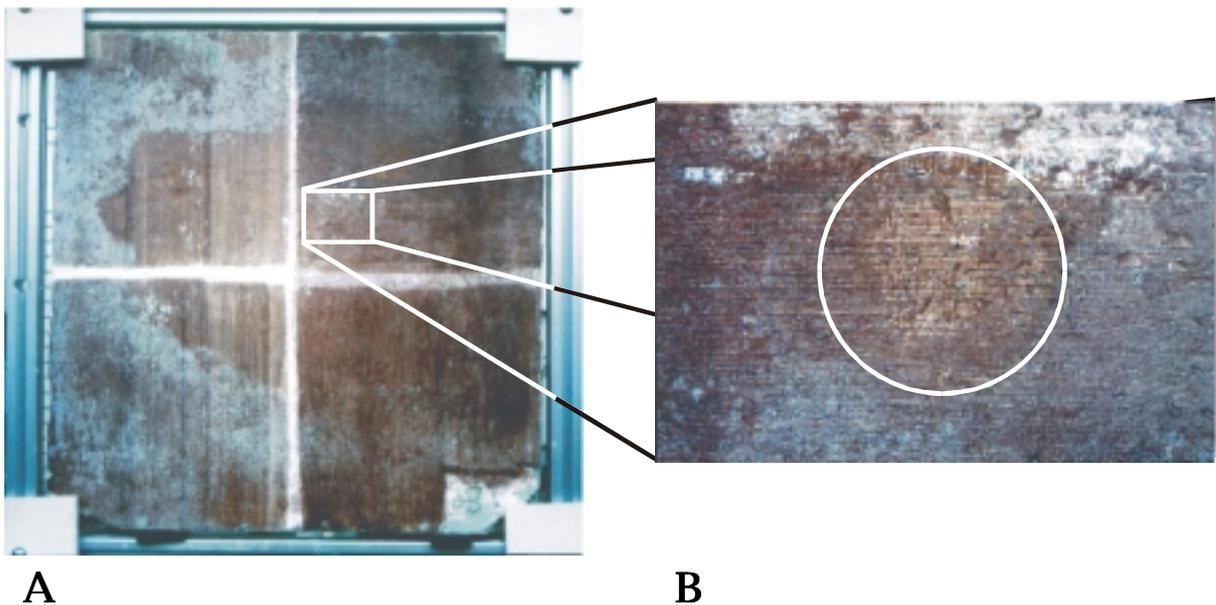


Abb. 59: A: Probestatte 130 (Eisenoxidrot, Wienhausen, Ammoniumcasein) nach Salzbelastung mit aufliegendem Salzrasen (Foto K. Klein)

B: Nahaufnahme der Probestelle nach Abbau unter Standardreaktionsbedingungen, zweifache Ammoniumcaseinbeschichtung (Foto K. Klein)

Die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung der Abbaustellenoberfläche zeigt einen starken Einfluss der Salzkristalle auf die Nachweisbarkeit des Caseins. Abbildung 60 A zeigt den 2D-Contourplot der Abbaustelle vor Anwendung. Es ist keine Fluoreszenzintensität im Bereich der Trp-Fluoreszenz bei $Ex : Em = 288 : 331$ nm nachweisbar, da die Caseinschicht durch die auskristallisierten Salze vollständig abgeschirmt wird. Doch nach kurzer Einwirkzeit der Membrankissenapplikation auf dieser Stelle führt das Puffermedium zu einer Auflösung des Salzrasens und so zu einer Nachweisbarkeit des Caseins an der Abbaustelle (s. Abb. 60 B).

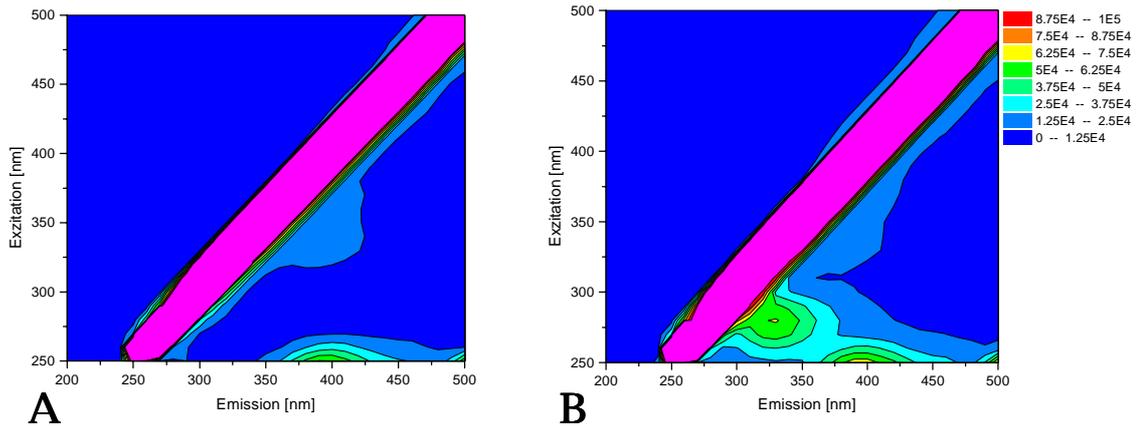


Abb. 60: 2D-Contourplot der Abbaustelle auf Probepatte 130, Ex: 250 – 500 nm, Em: 200 – 500 nm

A: Vor Anwendung, mit aufliegendem Salzrasen

B: Nach $t_{\text{Abbau}} = 5$ min, mit aufgelöstem Salzrasen, Standardreaktionsbedingungen

Nach Auflösung der aufliegenden Salze erfolgt der Caseinabbau ungehindert, das Abbauresultat nach 30 min Abbau liegt bei $R_A = 76,04$ % und $z_{\text{rel}} = 6,19$ % (s. Abb. 61 A). Der exponentielle Abfall der Fluoreszenzintensität durch den Caseinabbau setzt erst nach dem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität ein, der die Dauer der Auflösung des Salzrasens markiert.

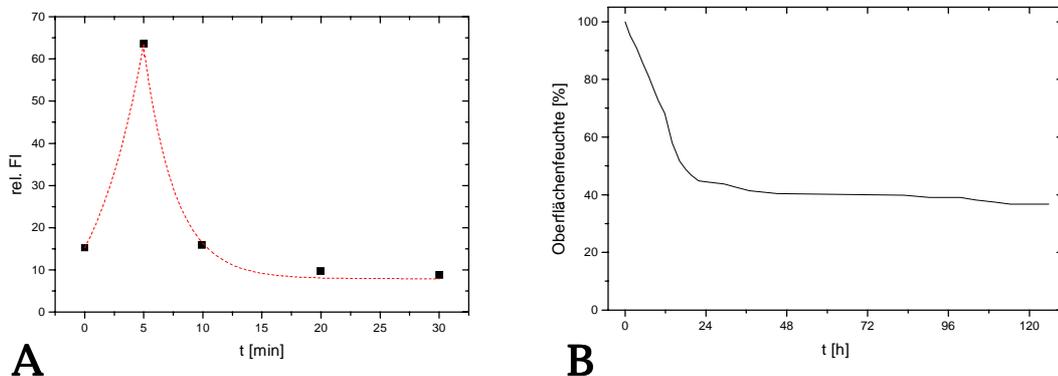


Abb. 61: A: Verlauf der relativen Fluoreszenzintensität der caseingebundenen Trp-Fluoreszenz bei aufliegendem Salzrasen, $\lambda_{\text{max-Ex}} : \text{Em} = 288 : 331$ nm, Standardreaktionsbedingungen

B: Verlauf der Oberflächenfeuchte der Abbaustelle nach $t_{\text{Abbau}} = 30$ min [60]

Die gelösten Salze werden mit dem Pufferträgerstrom fortgespült und zum Teil in die poröse Oberfläche der Probepatte eingetragen. Der Eintrag von Puffermedium in die poröse Oberfläche konnte zu $V_{\text{Eintrag}} = 0,112$ mL/min \pm 12,76 % für alle pigmentierten und caseinierten Oberflächen bestimmt werden, außer der Eisenoxidrot (Wildeshausen)

pigmentierten Oberflächen, die aufgrund ihrer geringeren Porosität (s. Kap. 10) nur $V_{\text{Eintrag}} = 0,072 \text{ mL/min} \pm 8,92 \%$ in die Oberfläche eindringen lassen. Die Feuchtigkeit auf der Oberfläche nach einem Abbau klingt im Laufe der folgenden Tage exponentiell ab, wie in Abb. 61 B dargestellt. Zu Beginn überwiegt der Flüssigkeitseintrag in die Oberfläche, der aber einer Sättigung zustrebt. Die Feuchtigkeitsabnahme durch Verdampfung findet über den gesamten Zeitraum statt und bewirkt eine lineare Feuchtigkeitsabnahme, die den Kurvenverlauf ab ca. 24 h nach Anwendung der enzymatischen Abnahmemethode bestimmt, so dass insgesamt ein exponentieller Verlauf resultiert. Ein Teil der Salze wird also wieder in die Oberfläche eingetragen, so dass die Wanderung zur Oberfläche aufgrund des reversiblen Kristallisationsprozesses wieder verstärkt wird.

Caseinschichten lassen sich nach Auflösung der aufliegenden Salzrasen mit der 2D-Fluoreszenzanalytik nachweisen und auch der Caseinabbau ist erfolgreich; es muss jedoch beim Feuchtigkeitseintrag in die Oberfläche eine vermehrte Salzfracht in Kauf genommen werden, die die Malschicht langfristig wie oben beschrieben schädigen kann.

14. Anwendung an den Objekten

Um die entwickelte Abnahmemethode effektiv zu testen und zu optimieren, ist eine Anwendung an echten Wandmalereien unerlässlich. An den vom Niedersächsischen Landesamt für Denkmalpflege für diesen Zweck ausgewählten Wandmalereiobjekten im Kapitelsaal St. Alexander in Wildeshausen und in der Allerheiligenkapelle im Kloster Wienhausen (s. Kap. 3) wurden wiederholt Untersuchungen durchgeführt, wobei Analytik und Abnahmemethode nur an ausgewählten Abbaustellen angewendet wurden, die von den Restauratoren nach eingehender Begutachtung des Oberflächenstatus vorgegeben wurden. Nur diese enge interdisziplinäre Zusammenarbeit von Chemikern und Restauratoren ermöglicht nachhaltige Resultate der Abnahmemethode, da nur die Restauratoren die Fachkenntnis zur Bestimmung relevanter Schadensflächen und sinnvoller Abbaustellen besitzen.

14.1 Erfassung des Oberflächenstatus

Bei der Erfassung des Oberflächenstatus müssen verschiedenste Aspekte berücksichtigt werden. Daher sollten zur Erfassung generell immer alle zur Verfügung stehenden Analysemethoden angewendet werden, um eine möglichst differenzierte Dokumentation zu gewährleisten. Die Erfassung des Oberflächenstatus einer Probestelle vor der enzymatischen Anwendung gliedert sich wie folgt:

- ✓ Kriterium 1: Vorhandensein eines Überzuges.
 - Beschaffenheit des Überzuges?
 - Wichtigste Schadenskriterien für Caseinüberzüge:
 - Abrollende Malschicht,
 - Verbräunung,
 - Glanzeffekte,
 - Vergesellschaftung mit mikrobiellem Bewuchs.
- ✓ Kriterium 2: Charakterisierung der Pigmentierung.
 - Pigment identifizierbar?
 - Pigmentbindemittel bekannt?
 - Pigmentveränderungen festzustellen? z.B. Verfärbung, Pudern, etc. (1)

- ✓ Kriterium 3: Schadensbestimmung der Probestelle. (2)
 - Oberflächenbeschaffenheit: Abplatzen, Abrollen, Glanz, Schleier, sonstige Veränderungen
 - Salzausblühungen vorhanden? z.B. Schleierbildung, Salzpusteln, etc. (3)
 - Mikrobieller Bewuchs festzustellen? z.B. Schleierbildung, Verfärbung, Stoffwechselprodukte, etc. (4)
 - ✓ Kriterium 4: Photographische Dokumentation der Probestelle.
 - ✓ Kriterium 5: 2D-Fluoreszenzanalyse mit Oberflächenmesseinheit, andere Analytiken. (5)
- ⇒ Fazit: Abschließende Einordnung der Probestelle und Identifizierung des Überzuges, z.B. Casein, Klucel, Wachsseife, Acrylat, etc.
- (1) Bei Pigmentverfärbungen sollte das Pigment vor Einsatz der Abnahmemethode auf seine Alkalienverträglichkeit getestet werden; bei pH-abhängiger Verfärbung kann, wie in Kapitel 11.2 erarbeitet, der neutrale Alternativpuffer eingesetzt werden. Pudernde Pigmentierungen sind ein Beleg für die fortgeschrittene Zersetzung des Bindemittels der Pigmentschicht. Sie sind ein Hinweis auf organische Bindemittelbestandteile, die durch Mikroorganismen zersetzt werden. Der Nutzen eines Einsatzes der Membrankissenmethode muss an diesen Probestellen genau abgewogen werden, da ein weiterer Abbau der Bindemittelbestandteile befürchtet werden muss.
 - (2) Die Schadensbestimmung beinhaltet die vollständige Erfassung aller schadensrelevanten Details. Fundierte Anleitung zur Schadensbestimmung geben die Restauratoren des NLD [17].
 - (3) Salzausblühungen auf Wandmaleroberflächen (s. Kap. 13) äußern sich oft in Form von Mikrokristallen, die als Schleier auf einer Wandmalerei liegen, wie z.B. die weißlichen Gippschleier am Wandmalereiobjekt Wienhausen. Sie stellen kein Hindernis für eine erfolgreiche Anwendung mit dem Membrankissen dar, beeinflussen aber den Abbaukurvenverlauf bei der 2D-Fluoreszenzmessung. Außerdem muss aufgrund der Auflösung der Salzscheier im Pufferträgerstrom mit einer erhöhten Salzfracht in der Wand gerechnet werden.
 - (4) Ein mikrobieller Bewuchs sollte immer eingehend analysiert werden, da er wichtige Details des Oberflächenstatus verrät. So weisen z.B. große Populationen auf eine reiche Nahrungsgrundlage hin, d.h. sie zeigen große Mengen organischer Komponen-

ten an. Die Art der Mikroorganismen kann weiteren Aufschluss über das organische Nährsubstrat geben und auch ob dieses schon teilweise hydrolysiert wurde.

- (5) Die 2D-Fluoreszenzanalyse der Oberfläche gibt Aufschluss über das Vorhandensein von Casein auf der Wandmalerei. Dennoch sollte am Wandmalereiobjekt eine Mikroprobe aus der Oberfläche entnommen werden und mit einer geeigneten invasiven Spurenanalytik untersucht werden, um den Befund unabhängig zu bestätigen. Geeignete Referenzanalysenmethoden sind die etablierte RP-HPLC-Methode zur Peptidanalytik und der von der AG Geomikrobiologie ICBM der Universität Oldenburg entwickelte Antikörpertest auf Casein [98].

Vor Anwendung der Methode sollten alle aufgezählten Kriterien und Fragen berücksichtigt und beantwortet werden. Da dieser hohe Anspruch in den seltensten Fällen zu verwirklichen sein wird, sollte der Anwender so viele Daten wie möglich über den Oberflächenstatus ermitteln, um sich an diesen zu orientieren. Die Komplexität des Substrates Wandmaleroberfläche legt dies nahe, nicht zuletzt auch damit fundierte Daten über die Restaurierungsversuche für folgende Generationen vorliegen. Denn der Verlust von Archivmaterial und die fehlende oder lückenhafte Dokumentation früherer Restaurierungsmaßnahmen sind heute ein großes Problem bei der Bewertung von Wandmaleroberflächen und ihren Schäden und sollten für die Zukunft vermieden werden.

Die Vor-Ort-Anwendung der Abnahmemethode kann zusätzliche Anforderungen an den Aufbau stellen, da Wandmalereien, wie in der Allerheiligenkapelle, Kloster Wienhausen oft im Deckengewölbe zu finden sind. Auch im Kapitelsaal, St. Alexander Wildeshausen beginnt die Ausmalung erst ab einer Höhe von ca. 1,5 m. Die Anwendung muss daher häufig unter Verwendung eines Gerüsts durchgeführt werden.

14.2 2D-Fluoreszenzuntersuchung der Objekte

Vor der Durchführung der Abnahmemethode auf Wandmalereien ist die Etablierung der nicht invasiven 2D-Fluoreszenzanalytik auf diesem Substrat nötig. Am Objekt Wienhausen zeigt sich, dass mit der 2D-Fluoreszenzspektroskopie die historische verbürgte Auftragung der Caseinüberzüge, die nur partiell in den damals geschädigten Bereichen aufgetragen wurden, nachvollzogen werden kann. Abbildung 62 zeigt das 2D-Fluoreszenzspektrum einer Kalkweiß getünchten, leicht vergilbten Probestelle an der Nordwand. Die historischen Restaurierungsversuche in Wienhausen waren vielfältig, es

wurden außer dem Casein z.B. Wachsseifen und Klucel auf die Wandmalerei aufgetragen. So kommt es an verschiedenen Stellen zu einer Überdeckung der Caseinschicht durch diese weiteren Festigerschichten, welche die Fluoreszenzmessung behindert. Belegt werden konnte dies durch Messung der Fluoreszenzerscheinungen vor und nach Abnahme der Deckschicht, wobei sich besonders unter den Wachsseifenschichten vermehrt Casein nachweisen ließ.

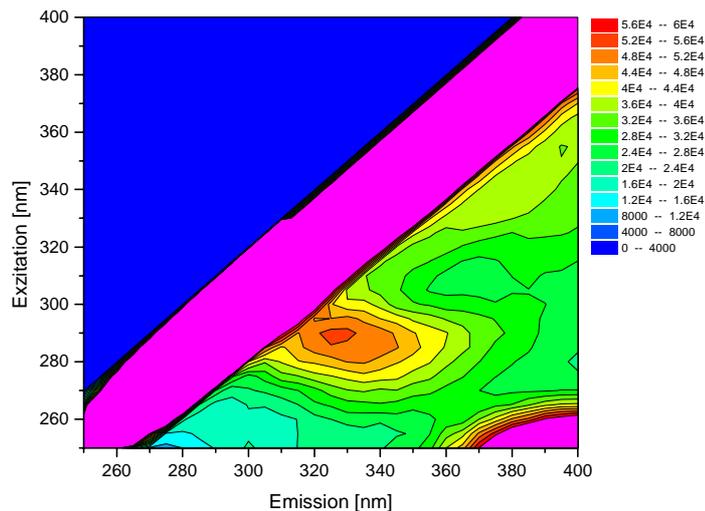


Abb. 62: 2D- Contourplot der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan auf der Nordwand, Allerheiligenkapelle Kloster Wienhausen, $\lambda_{\max} = 290 : 325 \text{ nm}$, (Ex / Em: 250 – 400 nm)

Weiterhin zeigt sich die Tendenz, dass die nachzuweisenden Caseinüberzüge mit großflächigen Biofilmen vergesellschaftet auftreten. Denn immer da, wo Casein nachweisbar ist, tritt auch eine erhebliche Schleierbildung durch Pilz- und Bakterienbefall auf. Dies erklärt sich dadurch, dass Casein ein optimales Nährsubstrat für den mikrobiellen Befall bildet und sich die Mikroorganismen daher in diesen Bereichen bevorzugt ansiedeln. Die Fluoreszenzintensität der Trp-Fluoreszenz ist aufgrund dieser mikrobiellen Besiedelung stark erniedrigt.

Am Objekt Wildeshausen wurden die Wandmalereien wesentlich großflächiger mit den Caseinüberzügen belegt, wie die UV-Aufnahme der Westwand in Abbildung 1, kleine Aufnahme, Kap.3, S. 8 deutlich zeigt, und wie auch qualitative Caseinnachweise mit dem von den Mikrobiologen etablierten Antikörpertest belegen [98]. Trotzdem sind auf den Wandmaleroberflächen nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten der Trp-Fluoreszenz nachzuweisen. Es zeigt sich außerdem hier wieder ein unbekanntes Fluorophor bei Ex : Em = 375 : 445 nm, das höhere Intensitäten als die Trp-Fluoreszenz

aufweist (s. Abb. 63). Aufgrund seiner relativen Lage zum Maximum der Trp-Fluoreszenz stört es den Caseinnachweis aber nicht. Die Trp-Fluoreszenz zeigt sich auch hier aufgrund der mikrobiellen Besiedelung der Oberflächen stark erniedrigt.

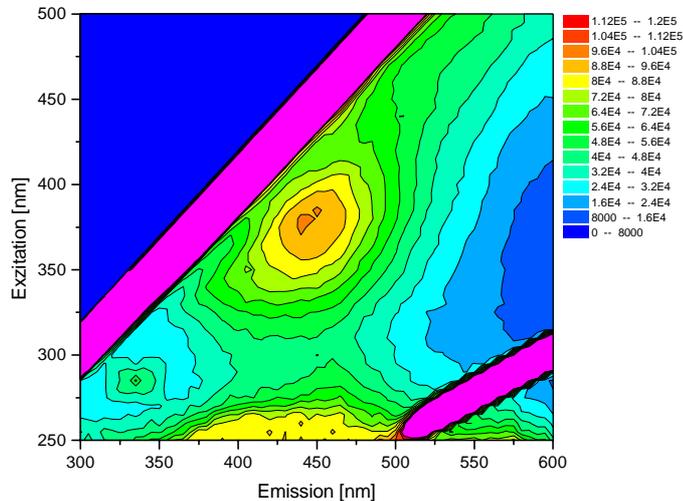


Abb. 63: 2D-Contourplot der Fluoreszenz auf der Westwand, Kapitelsaal St. Alexander, Wildeshausen, Trp-Fluoreszenz: $\lambda_{\max} = 285 : 335$ nm, unbekanntes Fluorophor: $\lambda_{\max} = 375 : 445$ nm, (Ex: 250 - 500 nm, Em: 300 - 600 nm)

Das unbekannte Fluorophor konnte auch nach intensiver Literaturrecherche keiner Substanz eindeutig zugeordnet werden, es liegt aber in der Nähe der mikrobiellen Stoffwechselprodukte Flavinmononucleotid, Retinol und Riboflavin. Da es bei einem Caseinabbau aber ebenfalls einer Erniedrigung unterliegt, könnte es sich auch um ein Fluorophor handeln, das im gealterten Casein enthalten ist. Denn die Alterung von Casein hat nicht nur makroskopische Auswirkungen z.B. auf Quellung und Spannung kompakter Schichten, sondern auch strukturelle Auswirkungen auf die Caseinmoleküle, induziert durch Lichteinstrahlung oder andere Umwelteinflüsse. Letztlich können auch Quench- und andere Verschiebungseffekte die relative Lage eines Fluorophors stark beeinflussen, wie in Kapitel 10 für die verschiedenen Einflüsse der Zusammensetzung des Oberflächensubstrates auf die Fluoreszenz beschrieben.

14.2.1 Probleme durch Proteinalterungsreaktionen

Alterungsreaktionen von Proteinen sind bis heute wenig erforscht. Eine Literaturrecherche über den Zeitraum von 1970 bis heute ergab vereinzelte Veröffentlichungen aus der lebensmittelchemischen Forschung, die die Alterung von Milch und Käse beschreiben, wobei aber nur makroskopische Veränderungen, wie Verfärbungen,

Viskosität oder Micellenbildung, untersucht wurden [102-104]. Eingehendere massenspektroskopische Untersuchungen [105] zeigen, dass vielfältige Zersetzungsreaktionen stattfinden, in denen, wie beim enzymatischen Caseinabbau, Peptide und Aminosäuren entstehen. Es können aber auch einzelne Aminosäurereste angegriffen werden, wie die reaktiven aromatischen Seitengruppen der Aminosäuren Trp, Phe und Tyr [106]. Dies hat unmittelbare Auswirkungen auf die Tertiärstruktur der Proteine, da die raumgreifenden aromatischen Reste einen großen sterischen Einfluss auf die Faltung des Proteins ausüben. Die Oxidation dieser Aminosäurereste kann enzymatisch, radikalisch oder photochemisch ausgelöst werden. Während der enzymatische Abbau im Organismus (z.B. oxidative Desaminierung und Decarboxylierung) bis zu Verbindungen wie Skatolen und Indolen führt [107], münden radikalische und Photooxidation in einen Bruch des Indolrings und Bildung von Ureninderivaten oder einfachen Aminosäuren [108]. Die selektiven Oxidationen der aromatischen Seitenketten haben auch Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften der Caseine. Exemplarisch wurde an verschiedenen Prüfkörpern eine Oberflächenbelastung mit Tageslichtstrahlung durchgeführt. So zeigt sich bei Lagerung unter Lichteinwirkung, dass die Fluoreszenzintensität der Trp-Fluoreszenz von caseingebundenem Tryptophan in Caseinschichten linear mit der Zeit abnimmt (s. Abb. 64 A) und sich auch der Brechungsindex der Schichten stark verändert (s. Abb. 64 B) (bestimmt durch spektroskopische Ellipsometrie, s. Kap. 8).

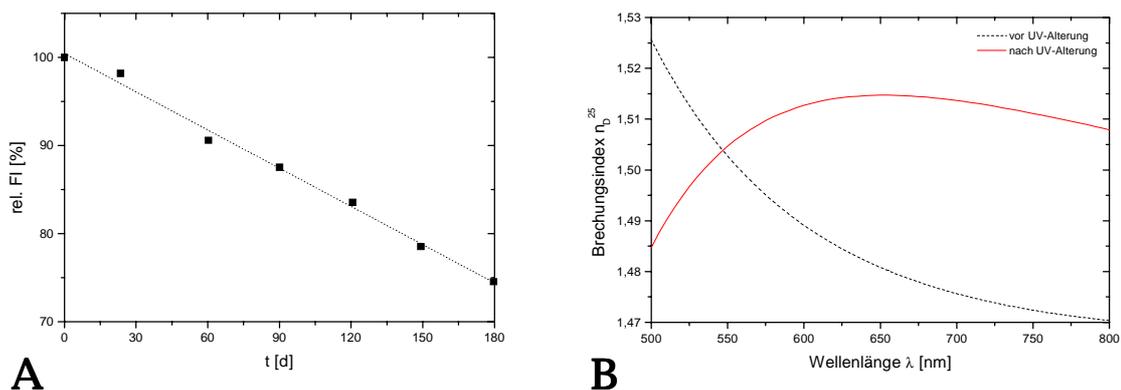


Abb. 64: A: Fluoreszenzentwicklung der Trp-Fluoreszenz unter Lichteinwirkung, Mittelwerte aller Oberflächenbeschichtungen, λ_{\max} - Ex : Em = 288 : 331 nm
 B: Brechungsindex n_D^{25} in Abhängigkeit der Wellenlänge vor und nach 3-wöchiger UV-Bestrahlung (Caseinschicht $d_{\text{Schicht}} = 170$ nm, Si-Waver-Modelloberfläche)

Die Fluoreszenzintensität weist bei andauernder Tageslichteinwirkung (durchschnittlich 160 Lux) [8] eine Halbwertszeit von $t_{1/2} \approx 1$ a auf, so dass sehr hohe Verluste an

messbarer Fluoreszenzintensität über die Jahrzehnte resultieren. Die Auswirkungen der Lichteinwirkung sind auch am Beispiel des Brechungsindex gut zu erkennen, der nach UV-Alterung ein Maximum im Kurvenverlauf aufweist.

Besonders die großen Fenster im Kapitelsaal St. Alexander in Wildeshausen bewirken eine intensive, ganzjährige Lichteinstrahlung, welche die Photooxidation der aromatischen Aminosäuren begünstigt, so dass trotz positiver UV- und Antikörper-nachweise nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten der Trp-Fluoreszenz nachzuweisen sind. Durch RP-HPLC-Untersuchungen mit der in Kapitel 9.1 etablierten Methode zur Aminosäureanalytik konnten die beschriebenen Vorgänge bestätigt werden. Denn Oberflächenproben von den Wandmalereien in Wienhausen und Wildeshausen zeigten zwar eine breite Verteilung von Aminosäuren, was auf den fortgeschrittenen Zersetzungsprozess des Caseins durch mikrobiellen Bewuchs und andere Einflüsse hinweist, wiesen aber nur geringe Spuren ($c_{AS} < 1,0 \cdot 10^{-2}$ mg/L) an aromatischen Aminosäuren auf.

14.3 Abbaureaktionen auf Wandmalereien

Es wurden Abbaureaktionen auf den Wandmalereiobjekten unter Einhaltung der Standardreaktionsbedingungen (s. Kap. 10.2.4.1, S. 77) durchgeführt. Die Anwendung an den ausgewählten Probestellen wurde gemäß den Vorgaben in Kapitel 14.1 mit der 2D-Fluoreszenzanalytik verfolgt, es wurden Abbauproben mit RP-HPLC analysiert, und der Fortschritt des Abbaus wurde von Restauratoren visuell begutachtet, sowie photographisch dokumentiert. So konnte ein sehr kontrollierter, substratspezifischer und schonender Einsatz erreicht werden.

14.3.1 Abbaureaktionen am Wandmalereiobjekt Wienhausen

Die Untersuchungen am Objekt Wienhausen waren zahlreich, nicht zuletzt weil das Objekt ein so vielfältiges Schadensbild aufweist. Neben den üblichen Biofilmen, Salzausblühungen und Verfärbungen finden sich hier auch, wie oben beschrieben, verschiedene alte Festigungsschichten aus Klucel und Wachsseifen, die Einfluss auf die Anwendung nehmen können. So vielfältig das Schadensbild der Oberfläche sich äußert, so vielfältig sind folglich auch die Fluoreszenzverläufe der Trp-Fluoreszenz während des Abbaus. Es werden einerseits unbeeinflusste exponentielle Abbauverläufe gefunden, andererseits aber auch die typischen Fluoreszenzverläufe mit einem Maximum nach Auflösung des Oberflächenbelages, die eine Salzbeladung der Oberfläche belegen. Der aus allen Abbaureaktionen durch Mittelwertbildung kalkulierte Abbauverlauf zeigt eine

lineare Abnahme der Fluoreszenz in Folge der Anwendung, mit einem durchschnittlichen Abbauresultat von $R_A = 36,82\%$, mit $z_{rel} = 27,64\%$ (s. Abb. 65 A).

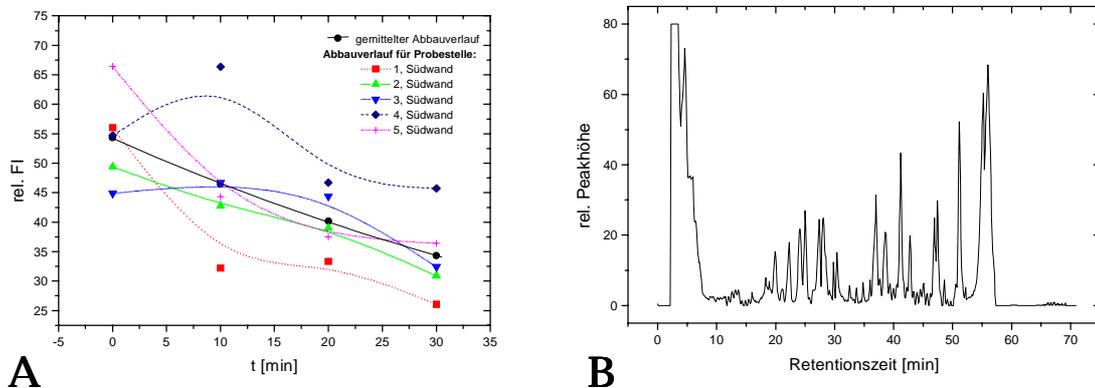


Abb. 65: A: Verläufe der Fluoreszenzintensität bei enzymatischem Caseinabbau am Objekt Wienhausen, Trp-Fluoreszenz λ_{max} -Ex : Em = 290 : 335 nm, Standardreaktionsbedingungen
 B: Exemplarisches RP-HPLC-Spektrum der Abbauprodukte bei Anwendung am Objekt Wienhausen, gepoolte Trägerstromproben, aufkonzentriert

Die RP-HPLC-Untersuchung wurde anhand von Proben aus dem Pufferträgerstrom durchgeführt (Fraktionen à 5 min \equiv 3,45 mL), wobei die Proben vor Einsatz vereinigt, lyophilisiert und in 1 mL 0,1 M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer, pH 9,0 gelöst wurden. Diese stark aufkonzentrierte Lösung zeigt eine breite Verteilung von Abbaufragmenten des enzymatischen Caseinabbaus und ist somit nicht nur ein Beleg für den stattfindenden Caseinabbau, sondern auch für den erfolgreichen Abtransport der Abbauprodukte von der bearbeiteten Oberfläche (s. Abb. 65 B). Auffällig ist ein hoher Anteil von kleinen Abbaufragmenten, die nicht mit der stationären Phase interagieren. Dies ist ein Indiz für den Fortschritt der Caseinzersetzung durch die mikrobielle Besiedelung.

Die visuelle Begutachtung der Abbauprobstellen am Objekt Wienhausen zeigt deutlich positive Auswirkungen auf die Oberflächen. Ausgeblühte Salze in Form von mikrokristallinen Schleiern werden aufgelöst, die Caseinschicht effektiv ausgedünnt und eine Aufhellung der Oberfläche erreicht. Weiterhin kann eine Verringerung der mikrobiellen Besiedelung festgestellt werden. Trotzdem muss auch an diesem Objekt eine differenzierte Untersuchung und Anwendung erfolgen, da Casein nur partiell angewendet wurde und an diesem Objekt sehr viele Faktoren einen Einfluss auf den Abbau nehmen.

14.3.2 Abbaureaktionen am Wandmalereiobjekt Wildeshausen

Die Abbausergebnisse der Anwendung am Objekt Wildeshausen sollen im Folgenden anhand von zwei Fallbeispielen dargestellt werden. Als erstes Fallbeispiel dient die eisenoxidrote Bordüre, die alle Bilder des Zyklus` über das Leben Jesu einrahmt. Das Eisenpigment ist auf diesen Probestellen caseingebunden, so dass ein Abbau des Pigmentbindemittels möglich sein könnte und daher besondere Anforderungen an die Abnahmetechnik gestellt werden. Abbildung 66 A + B zeigen die Nahaufnahme einer Eisenoxidrot-Bordüre, caseingebunden mit Schädigung durch aufstehende Caseinschichten und Kratzspuren.



A

B

Abb. 66: Probestelle Eisenoxidrot-Bordüre, caseingebunden, Objekt Wildeshausen (Fotos K. Klein)

A: vor Anwendung

B: nach 30 min enzymatischem Caseinabbau mit Membrankissen: Ausgedünnte Caseinschicht, Auflösung der Salze, Aufhellung der Oberfläche, Verringerung der mikrobiellen Besiedelung

Die visuelle Begutachtung der Abbaustelle vor und nach dem Abbau zeigt eine Aufhellung der Oberfläche und eine Ausdünnung der Caseinschicht, aus der eine Herabsetzung der Spannungerscheinungen durch Casein resultiert. Leider erweist sich die caseingebundene Pigmentschicht als nicht stabil. Nach ca. $t_{\text{Abbau}} = 15$ min beginnt sich die Pigmentschicht abzulösen und am Membrankissen zu haften. Der enzymatische Abbau wurde daher an diesem Punkt sofort abgebrochen. Das Abbauresultat bei Auswertung des unbekanntes Fluorophors liegt zu diesem Zeitpunkt bei $R_A = 49,12$ %, mit $z_{\text{rel}} = 15,73$ %, bei Auswertung der Trp-Fluoreszenz nur bei $R_A = 11,27$ %, mit

$z_{\text{rel}} = 16,88 \%$. Die Anwendung kann trotz des vorzeitigen Abbruchs als gelungen angesehen werden, da eine sichtbare Ausdünnung der Caseinschicht bei bestmöglicher Schonung der fragilen Oberflächensituation erreicht werden konnte.

Die Photographien in Abbildung 67 A + B zeigen als zweites Fallbeispiel die Nahaufnahme einer verbräunten, Kalkweiß getünchten Probestelle mit feinen Eisenoxidrotlinien. Im Bereich der Abbaustelle (weißer Kreis) zeigt sich nach Anwendung eine deutliche Verbesserung der Oberflächensituation. Die visuelle Begutachtung konstatiert eine Ausdünnung des Caseinüberzuges, eine deutliche Aufhellung der verfärbten Oberfläche, sowie eine Auflösung aufliegender Salze und gibt somit einen positiven Gesamteindruck der Probestelle.

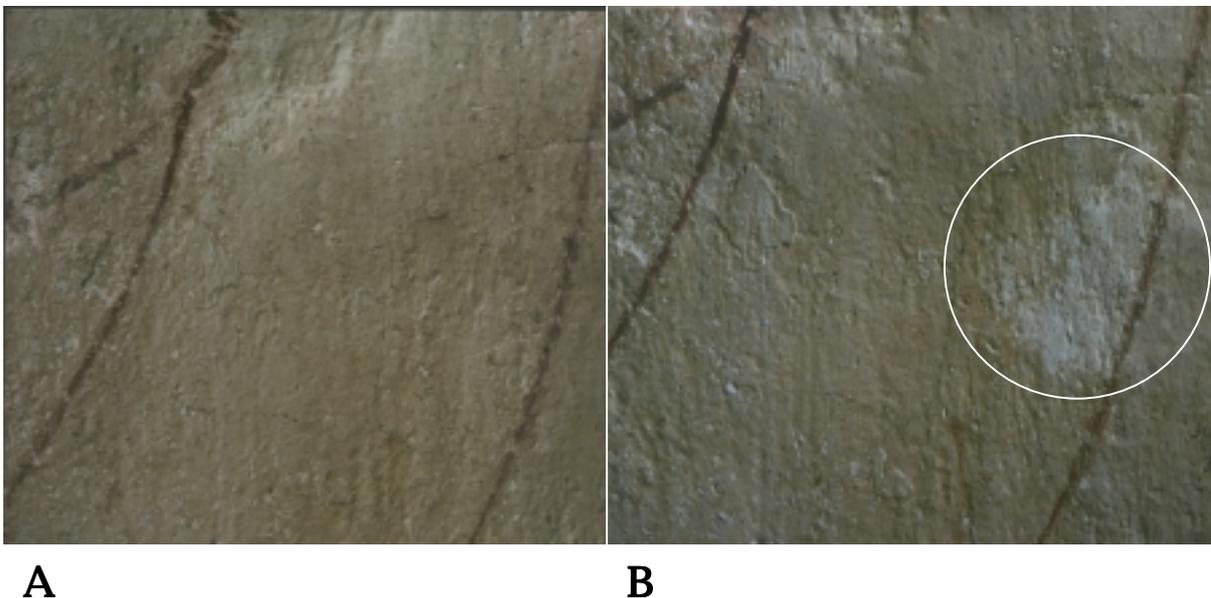


Abb. 67: Probestelle Kalkweiß mit Eisenoxidrot, verbräunt, Objekt Wildeshausen (Fotos K. Klein)

A: vor Anwendung

B: nach 30 min enzymatischem Caseinabbau mit Membrankissen: Ausgedünnte Caseinschicht, Auflösung der Salze, Aufhellung der Oberfläche, Verringerung der mikrobiellen Besiedelung

Die begleitende 2D-Fluoreszenzanalytik zeigt für das unbekannte Fluorophor den üblichen exponentiellen Abbauverlauf, während für das Trp-Maximum ein Verlauf mit schwach ausgeprägtem Maximum bei $t_{\text{Abbau}} = 10 \text{ min}$ resultiert, der dem typischen Verhalten von salz- und mikrobiell belasteten Oberflächen entspricht (s. Abb. 68 A). So differieren auch die Abbauresultate, je nachdem, über welches Fluorophor ausgewertet wird. Bei Auswertung des unbekanntes Fluorophors resultiert ein Abbauresultat von $R_A = 60,26 \%$, mit $z_{\text{rel}} = 17,34 \%$, bei Auswertung der Trp-Fluoreszenz nur $R_A = 20,69 \%$, mit $z_{\text{rel}} = 19,03 \%$.

Das exemplarische RP-HPLC-Spektrum einer Abbaureaktion am Objekt Wildeshausen (s. Abb. 68 B) zeigt eine ähnliche Verteilung, wie das Abbauspektrum der Abbaureaktion am Objekt Wienhausen, wobei eine deutliche Abnahme der größeren, unpolaren Abbaufragmente, die mit der stationären Phase der RP-HPLC interagieren, zu verzeichnen ist. Es fehlen z.B. die Abbaufragmente $t_R = 51,1$ min und $t_R = 55,2$ min, die beim Abbau auf den Wandmalereien in Wienhausen nachzuweisen sind. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Caseinzersetzung durch mikrobiellen Bewuchs und andere Umwelteinflüsse am Objekt Wildeshausen weiter fortgeschritten ist als am Objekt Wienhausen.

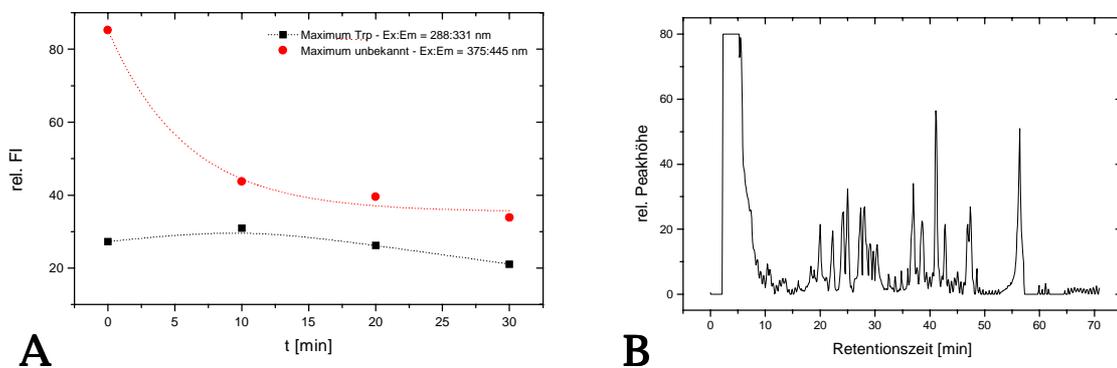


Abb. 68: A: Verlauf der Fluoreszenzintensität bei enzymatischem Caseinabbau am Objekt Wildeshausen, Maximum Tryptophan und unbekanntes Fluorophor, Standardreaktionsbedingungen
 B: RP-HPLC-Spektrum der Abbauprodukte, gepoolte Trägerstromproben, aufkonzentriert

Die Anwendungen am Objekt Wildeshausen gestalten sich zum Teil schwierig, aufgrund der schwachen Trp-Fluoreszenzen und auch wegen der besonderen Wandmalereisituation mit caseingebundenen Pigmenten. Eine Anwendung der enzymatischen Abnahmemethode ist nur unter dem Vorbehalt der sorgfältigen Beobachtung der Probefläche vor, während und nach der Anwendung zu empfehlen, damit jederzeit in den laufenden Prozess eingegriffen werden kann. Die visuelle Begutachtung der Abbauprobstellen am Objekt Wienhausen zeigt wie am Objekt Wienhausen deutlich positive Auswirkungen auf die Oberflächen. Ausgeblühte Salze in Form von mikrokristallinen Schleiern werden aufgelöst, die Caseinschicht effektiv ausgedünnt und eine Aufhellung der Oberfläche erreicht. Weiterhin kann eine Verringerung der mikrobiellen Besiedelung festgestellt werden.

15. Diskussion und Ausblick

Es wurden umfassende Untersuchungen zum enzymatischen Caseinabbau auf Wandmalereien erarbeitet, deren Ergebnisse die Verwirklichung einer proteolytischen Methode zur kontrollierten und schonenden Abnahme aufliegender Caseinschichten ermöglichten. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden die wesentlichen Daten zum Substrat Casein (s. Kap. 2), zu den Wandmalereien (s. Kap. 3), sowie den verwendeten Proteasen (s. Kap. 4) beschrieben. Im Anschluss wurden im zweiten Abschnitt der Arbeit die methodischen Entwicklungsfortschritte zum Aufbau der Anwendung und der Begleitanalytik eingehend dargestellt und in systematischer Abfolge präsentiert (s. Kap. 4 – 10). Der Ermittlung der für das Substrat Casein geeignetsten Protease Alkalase® 2,5 DX L (s. Kap. 4) folgten umfangreiche Untersuchungen zur Immobilisierung, bei denen sich die Celluloseacetatmembran Sartobind Epoxy membran 18706 für einen Einsatz im Rahmen der Abnahmemethode empfahl (s. Kap. 5). Hierauf aufbauend wurde ein Membrankissen konstruiert, welches den optimalen und kontrollierten Einsatz der Immobilisate ermöglicht (s. Kap. 6). Zur Etablierung der Abnahmemethode auf einer Oberfläche wurden im nächsten Schritt caseinbeschichtete Prüfkörper hergestellt, die künstlich gealtert wurden, so dass die Schadensbilder der Oberflächen denen von Wandmalereien entsprachen (s. Kap. 7). An diesen Prüfkörpern wurden dann Oberflächenparameter, wie die Casein- und Pigmentschichtdicken (s. Kap. 8) oder die Eindringtiefe des Caseins in die Oberfläche ermittelt. Mechanistische Details der proteolytischen Abbaureaktion konnten mit Hilfe der RP-HPLC beschrieben werden, sowie Unterschiede im Abbauverhalten von Reaktionen in Lösung oder auf Oberflächen. Ein kaskadenartiger Zerfall des Caseins in immer kleinere und polarere Fragmente während der Proteolyse konnte herausgearbeitet werden, und einige der stabilen Abbaufragmente wurden mit Hilfe der Maldi-MS identifiziert (s. Kap. 9). Die 2D-Fluoreszenzspektroskopie, die mit geeignetem Zubehör aus Lichtleiter und lichtdichtem Messstutzen zur Oberflächenanalyse eingesetzt werden konnte, erwies sich als adäquate, nicht invasive Analytik, die den Nachweis des Caseins über die intrinsische Fluoreszenz des gebundenen Tryptophans ermöglichte. Den komplexen Vorgängen und Einflüssen bei Fluoreszenzerscheinungen auf Oberflächen wurde durch umfangreiche Untersuchungen verschiedener Oberflächen, Pigmentierungen, Beschichtungen, etc. Rechnung getragen (s. Kap. 10). Anhand der ermittelten Erkenntnisse wurde dann die Quantifizierung der 2D-Fluoreszenzanalytik und eine Standardisierung der Reaktionsbedingungen und Abbauverläufe erreicht. Die entwickelte Methode wurde abschließend im dritten

Abschnitt der Arbeit von den Modelloberflächen auf komplexere Systeme übertragen, und es wurden zusätzliche Untersuchungen zu möglichen Auswirkungen der Methode auf die Malsubstanz angestrengt (s. Kap. 11). Es wurden Verfärbungen bei Anwendung auf Paratacamit pigmentierten Oberflächen festgestellt, die durch Veränderung des pH-Wertes des Pufferträgerstroms weitgehend unterdrückt werden konnten. Als eminent wichtig für die Abnahmemethode, wie auch die prozessbegleitende Fluoreszenzanalytik erwiesen sich die Faktoren Salzbelastung (s. Kap. 13) und mikrobielle Besiedelung (s. Kap. 12) der Oberfläche. Sie beeinflussen vor allem die Beschaffenheit der Oberfläche, da sie die Caseinschicht abdecken oder zersetzen. Einen starken Einfluss hat auch eine andauernde Lichteinwirkung auf die Wandmalereien (s. Kap. 14.1.1). Da eine Belastung der Prüfkörper mit UV/VIS-Strahlung aufgrund mikrobiologischer Gesichtspunkte ausgespart wurde, konnten nur qualitativ Auswirkungen auf die nicht invasive 2D-Fluoreszenzbeleganalytik festgestellt werden, da gerade die fluorophoren, aromatischen Aminosäurereste umgesetzt werden, was die Fluoreszenzaktivität des caseingebundenem Tryptophan über die Jahrzehnte stark erniedrigt. Letztlich mündeten alle Untersuchungen in der erfolgreichen Übertragung der Abnahmemethode auf das Substrat Wandmalerei, wobei die Komplexität der Oberflächen von Wandmalereien in der detaillierten Dokumentation und Analytik Berücksichtigung fand (s. Kap. 14).

Generell kann die Anwendung von Enzymen zur Abnahme von Caseinüberzügen auf Wandmalereien empfohlen werden, wobei immer auf die Serinendoprotease Alkalase® 2,5 DX L zurückgegriffen werden sollte, da sie höchste Abbauraten gewährleistet (s. Kap. 4). Weiterhin muss die Enzymkomponente vor dem Einsatz immobilisiert werden, um nicht eine Einschleppung von Proteasemolekülen auf die Wandmaleroberfläche zu verursachen. Außerdem wird durch die Immobilisierung die Wiederverwendbarkeit der Protease erhöht. Der größte Vorteil aber ist die gesundheitliche Schonung des Anwenders, die durch die Fixierung der Biokatalysatoren erreicht wird, da so der Kontakt des Anwenders mit der reaktiven Arbeitsfläche und die Freisetzung der proteolytisch aktiven Substanz in die Luft vermieden werden kann (s. Kap. 5). Die Verwendung der Membrankissenmethode gewährleistet eine Kontrolle des Abbauprozesses, so dass gezielte, reproduzierbare Anwendungen ermöglicht werden und vor allem der kritische Feuchtigkeitseintrag in die Oberfläche minimiert werden kann.

Die entwickelte Abnahmemethode arbeitet unter den optimalen Bedingungen der als Wandmalereimodell dienenden Prüfkörper sehr gut; es findet eine so weitgehende Ausdünnung der Caseinüberzüge auf nahezu jeder untersuchten Oberflächenbeschich-

tung statt, dass nach Anwendung keine durch Casein verursachten Schäden mehr festzustellen sind (s. Kap. 10.2.4.1). Auch an den Wandmalereiobjekten konnte die erfolgreiche Abnahme der Caseinüberzüge erreicht werden, die, unterstützt durch die Umsetzung des Caseins durch die mikrobielle Besiedelung, vergleichbar gute Abbauresultate wie auf den Prüfkörperoberflächen zeigten (s. Kap. 14.2). Schwierigkeiten ergaben sich nur bei der Handhabung des unhandlichen Anwendungsprototyps an den Wandmalereien, da das Gerät auf einem Gerüst angebracht werden musste, um an die schwer zugänglichen Wandmalereien zu gelangen. Dies führte durch die Bewegungen des Operators zu starken Schwingungen des Gerüsts, so dass eine optimale Anwendung erschwert wurde. Sinnvoll wäre daher nicht nur eine Miniaturisierung des Prototyps, um ihn problemlos in jede Höhe transportieren zu können, sondern auch die Entwicklung eines freistehenden Stativs für die Anlage, um störende Schwingungen zu vermeiden. Hierbei ergibt sich allerdings das Problem, für den nötigen Auflagedruck von Fluoreszenzmessstutzen und Membrankissen zu sorgen, da sich dieser mit zunehmender Stativgröße stetig verkleinert.

Die komplexen Oberflächensubstrate führten zu Schwierigkeiten bei der Ermittlung reproduzierbarer Daten. Vielfach konnten, wie bei den Schichtdickenmessungen der Caseinüberzüge (s. Kap. 8), Daten nur unter Verwendung von idealen Modellsystemen erhalten werden, die nur bedingt auf die Wandmalereisubstrate übertragen werden können. Daher kann zu einer Anwendung der enzymatischen Abnahmemethode nur bei genauer und fachkundiger Prüfung des Oberflächenstatus geraten werden. Denn nur so kann gewährleistet werden, dass die Anwendung einzig in den Bereichen durchgeführt wird, in denen tatsächlich eine Schädigung durch kompakte Caseinüberzüge vorliegt, und nicht eine Schädigung mit ähnlichem Schadensbild, hervorgerufen z.B. durch andere Bindemittel wie Klucel. Denn solche Bindemittel können ähnliche Schadensbilder, wie Verbräunungen, Glanzeffekte und mikrobiellen Bewuchs verursachen. Der Anwender sollte vor Durchführung der Abnahmemethode also zweifelsfrei klären, ob die Schäden durch Casein verursacht wurden, wobei sich hier die entwickelte, nicht invasive 2D-Fluoreszenzanalytik für den Oberflächennachweis von Casein empfiehlt. Weiterhin muss der Operator geschult sein, die Anwendungsdauer je nach Pigmentbindemittel variieren zu können, da besonders proteingebundene Pigmente bei längerer Abbauzeit mit abgetragen werden können. Die Möglichkeiten zur Analyse verschiedener Bindemittel sind allerdings bis heute sehr begrenzt [109], so dass sich hier ein großer Bereich zukünftiger, interdisziplinärer Forschung von Restauratoren und Chemikern eröffnet.

Dem Bereich der Proteinalterung, der in diesem Projekt in Form gealterter Caseinüberzüge berührt wurde, der aber auch überaus große Bedeutung in Bereichen wie Medizin oder pharmazeutischer und kosmetischer Industrie hat, sollte in der Forschung ein größerer Stellenwert beigemessen werden, da diese wichtigen Vorgänge bis heute im Dunkeln liegen. In der Literatur sind nur vereinzelte Untersuchungen zur Alterung von Proteinen im Allgemeinen und durch Photooxidation im Besonderen veröffentlicht. Auch mit diesem Bereich eröffnet sich ein neues Forschungsfeld für umfangreiche wissenschaftlichen Untersuchungen.

Die entwickelte Anwendungsmethode inklusive Analytik muss, bevor sie als Standardmethode angewendet werden kann, in ein handliches, industrietaugliches Nutzgerät umgewandelt werden, dass auch in schwer zugänglichen Wandmalereibereichen einzusetzen ist. Eine wesentliche Vereinfachung ist z.B. für die 2D-Fluoreszenzanalyseneinheit möglich, da bei einem Nutzgerät nur einzelne Wellenlängen zur Messung nötig sind und nicht wie bei dem Prototyp weite Wellenlängenbereiche. So verspricht der Einsatz von Dioden zur Exzitation und Photodioden zur Detektion der Emission eine wesentliche Volumenverringering der Analyseneinheit, da auf den raumbeanspruchenden Photomultiplier als Detektionseinheit verzichtet werden könnte. Geeignete Filterkombinationen könnten die Exzitations- und Emissionsstrahlung auf enge Wellenlängenbereiche begrenzen, so dass nur in dem für die Analytik relevanten Fluoreszenzbereich angeregt und detektiert wird. Derartige Modifikationen sind nicht nur in Hinblick auf die Größe dienlich, sondern minimieren auch den technischen Aufwand, die anfallenden Datenmengen und somit letztlich die Kosten erheblich.

Um interessierten Anwendern das für eine gefahrlose Anwendung nötige Know-how an die Hand zu geben, sollten Schulungsseminare erarbeitet werden, die einen detaillierten Überblick über den Stand der Technik, Chancen, Risiken und Grenzen des Enzymeinsatzes, sowie die Handhabung der Anwendung geben.

Eine weitere Perspektive für die Anwendung zur kontrollierten Abnahme von schädigenden Caseinüberzügen auf Wandmalereien ist der Transfer der Methode auf andere Substrate, wie z.B. gefasste Holzobjekte, Textilien oder Papier, auf denen vielfach auch Beschichtungen mit Casein oder anderen proteinhaltigen Leimen durchgeführt wurden. Daher besteht auch in diesen Restaurierungsbereichen Bedarf an einer kontrollierten, schonenden Anwendung zur Abnahme dieser Überzüge. Vielversprech-

ende Voruntersuchungen zum Einsatz von Proteasen auf diesen Oberflächensubstraten finden sich in der Literatur [110, 111].

Als Fazit bleibt festzustellen, dass es aus heutiger Sicht als tragischer Irrtum gewertet werden muss, dass Casein als Schutzüberzug auf Wandmalereien aufgetragen wurde. Denn obwohl Casein ein gebräuchliches Bindemittel ist, und bei Anwendung kurzfristig eine erstaunliche Verbesserung der Wandmaleroberfläche resultiert, so überwiegen langfristig doch die Nachteile. Denn die durch das Casein hervorgerufenen Schäden an der Wandmalerei sind irreparabel und führen zu wesentlich größeren Substanzverlusten der Wandmalerei als ohne Caseinschutzschicht. Das Problem ist hierbei vor allem die hohe Konzentration von Casein im Überzug, da erst eine kompakte, geschlossene Schicht aus Caseinmolekülen zu den makroskopischen Effekten der dynamischen Quellung und Trocknung führt, die letztlich das Aufrollen und Abplatzen der Schicht verursachen. Darüber hinaus wird durch den Caseinüberzug einer mikrobiellen Besiedelung Vorschub geleistet, die ihrerseits die Wandmalereien schädigt. Die Probleme, die langfristig für eine Wandmalerei durch einen Caseinüberzug entstehen, können nur in gezielter Detailarbeit behoben werden; die entwickelte kontrollierte, proteolytische Abnahmemethode kann hierbei einen großen Dienst leisten. Nach der erfolgreichen Entfernung der Caseinüberzüge ist allerdings erst der Status quo wiederhergestellt, der vor der Caseinbeschichtung der Wandmalerei vorlag. Daher bleibt zu hoffen, dass heute kein Restaurator mehr eine Caseinbeschichtung zur Fixierung von Wandmalereien einsetzen wird.

16 Anhang

16.1 Herstellung Kalkputzprobeplatten

Nach DIN 1164 Teil 7:

Bindemittel (BM): Weißkalkhydrat $[\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}]$

Zuschlagstoffe (Z): Sand G 23 $[\text{SiO}_2]$

BM : Z = 1 : 5	⇒ Für 1 kg Putz:	133,6 g $\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$
		666,4 g SiO_2
		133,3 - 200 g H_2O
		+ H_2O aus der Spritzflasche

16.2 Sequenzen relevanter Caseine mit Fragmentschnittgrenzen

α 1-Casein

214 Aminosäuren, M = 24529 Da, 43 – 45 % Anteil in boviner Milch

Sequenz:

Fragment III B
Fragment V
 MKLLILTCLV AVALARPKHP IKHQGLPQEV LNENLLRFFV **APFPEVFGKE**
KVNELSKDIG SESTEDQAME DIKQMEAESI SSSEEIVPNS VEQKHIQKED
α-Caseinfragment 105-110
Fragment II
 VPSERYLGYL **EQLRLKKYK** VPQLEIVPNS AEERLHSMKE **GIHAQQKEPM**
IGVNQELAYF YPELFRQFYQ LDAYPSGAWY YVPLGTQYTD APSFSDIPNP
 IGSENSEKTT MPLW

α 2-Casein

222 Aminosäuren, M = 26019 Da, 10 – 12 % Anteil in boviner Milch

Sequenz:

Fragment III A
Fragment IV
 MKFFIFTCLL AVALA**KNTME** HVSSSEESII SQETYKQEK N MAINPSKENL
CSTFCKEVVR NANEEYSIG SSSEESAEVA TEEVKITVDD KHYQKALNEI
 NQFYQKFPQY LQYLYQGPIV LNPWDQVKRN AVPITPTLNR EQLSTSEENS
 KKTVDMESTE VFTKKTCLTE EEKNRLNFLK KISQRYQKFA LPQYLKTVYQ
 HQKAMKPWIQ PKTKVIPYVR YL

β -Casein

224 Aminosäuren M = 25107 Da, 28 – 37 % Anteil in boviner Milch

Sequenz:

MKVLILACLV ALALARELEE LNVPGEIVES LSSSEESITR INKKIEKFQS
 EEQQQTEDEL QDKIHPPAQT QSLVYPPFGP IPNSLPQNIP PLTQTPVVVP
 PFLQPEVMGV SKVKEAMAPK HKEMPFPKYP VEPFTESQSL TLTDVENLHL
 PLPLLQSWMH QPHQPLPPTV MFPPQSVLSL SQSKVLPVPQ KAVPYPQRDM
 PIQAFLLYQE PVLGPVRGPF PIIV

 κ -Casein

190 Aminosäuren, M = 21269 Da, 10 – 15 % Anteil in boviner Milch

Sequenz:

MMKSFFLVVT ILALTLPLFG AQEQNQEQPI RCEKDERFFS DKIAKYIPIQ
 YVLSRYPYSG LNYYQQKPVA LINNQFLPYP YYAKPAAVRS PAQILQWQVL
 SNTVPAKSCQ AQPTTMARHP HPHLSFMAIP PKKNQDKTEI PTINTIASGE
 PTSTPTTEAV ESTVATLEDS PEVIESPPEI NTVQVTSTAV

16.3 Caseinstandardlösung [112]

Zur Herstellung einer Caseinstandardlösung mit $c = 2,0$ g/L werden 0,1 g Casein unter Rühren in 5 mL 0,1 M Natronlauge vollständig gelöst. Nach Zugabe von 30 mL bidest. H₂O wird der pH-Wert der Lösung mit verd. HCl auf pH 8,3 eingestellt. Anschließend wird mit bidest. H₂O auf 50 mL aufgefüllt.

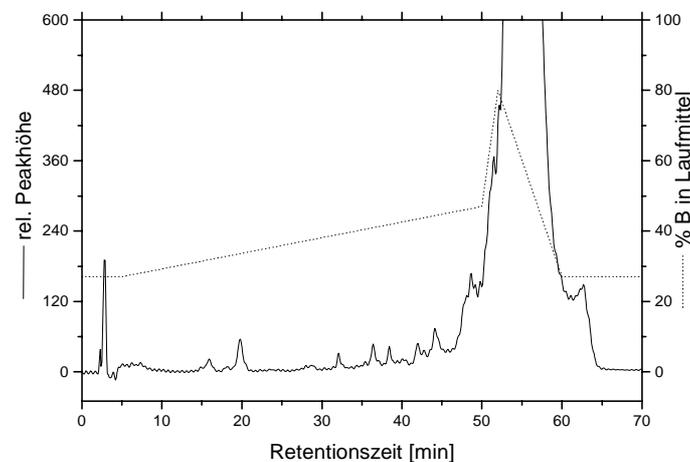


Abb. 69: Spektrum einer Caseinlösung mit $c = 4$ g/L mit Verunreinigungen

Das HPLC-Spektrum zur Untersuchung der Reinheit dieser Caseinlösungen zeigt, dass auch in frisch hergestellten Caseinlösungen in geringem Maße Abbauprodukte nachzuweisen sind. Da ihre Konzentrationen sehr niedrig sind, ist in Abbildung 69 das Spektrum einer hochkonzentrierten Caseinlösung mit $c = 4,0 \text{ g/L}$ abgebildet.

16.4 Bradford-Proteinassay

Bradford-Reagenz: 100 mL enthalten

0.01 % (v/v) \equiv 10 mg CoomassieBlue G-350

4.7 % (v/v) \equiv 5 mL 95 % Ethanol

8.5 % (v/v) \equiv 10 mL 85 % H_3PO_4

+ bidest. H_2O

Aus der Reaktionslösung einer enzymatischen Caseinabbaureaktion werden nach definierten Zeitabständen je 20 μL Probe entnommen, 1 : 100 mit bidest. H_2O verdünnt und anschließend 1 : 1 mit Bradford-Reagenz versetzt. Nach 2 min Inkubationszeit wird die Absorption des Proteinfarbkomplexes bei $\lambda_{\text{max}} = 595 \text{ nm}$ bestimmt.

Die Kalibrationsgerade für Caseinkonzentrationen von $c_{\text{Casein}} = 0 - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$ ist in Abbildung 70 dargestellt.

$$Y = A + B \cdot X,$$

mit $A = 0.081 \pm 9,75 \%$ und $B = 432,392 \text{ L/mol} \pm 3,66 \%$.

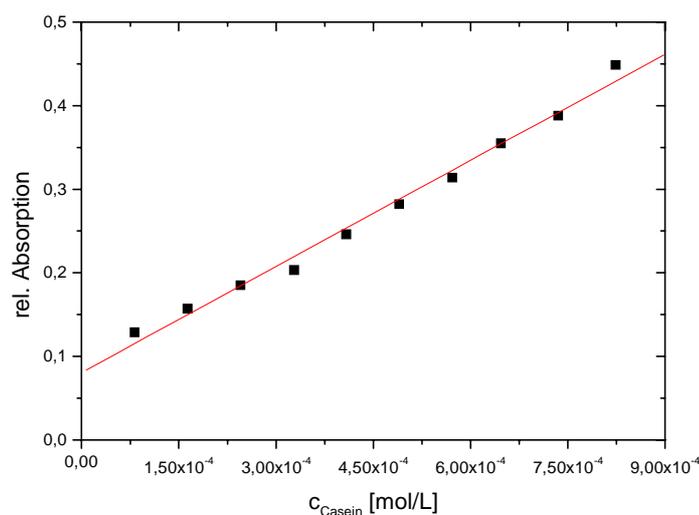


Abb. 70: Kalibrationsgerade der Caseinkonzentration bei $\lambda = 353 \text{ nm}$, Linearität liegt bei

$$c_{\text{Casein}} < 9,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L vor}$$

16.5 Enzymaktivitätstests der Hersteller

- AU/g – Anson Units

1 AU ist die Menge Enzym, die in 10 min soviel Hämoglobin hydrolysiert, dass pro Minute genau die Menge trichloressigsäurelösliches Produkt entsteht, die dieselbe Färbung mit Phenol-Reagenz zeigt wie 1 m-Äquivalent Tyrosin, pH 7,5, T = 37°C.

- KNPU/g – Kilo Novo Protease Units

1 KNPU ist die Menge Enzym, die 1 µmol Dimethylcasein in 1 min hydrolysiert, pH 8,3, T = 50°C.

- LAPU/g – Leucin Aminopeptidase Units

1 LAPU ist die Menge Enzym, die 1 µmol L-Leucin-p-nitroanilid in 1 min hydrolysiert.

- U/mg – Units

1 U ist die Menge Enzym, die 1 µmol Substrat (z.B. N-Acetyl-tri-L-Alanyl-Methylester) in 1 min hydrolysiert, pH 7,5, T = 25°C.

16.6 EPE-Methode zur Bestimmung der Proteasenaktivität

Lösung I

476 mg Natriumacetat * 3 H₂O werden in 35 mL H₂O gelöst und der pH-Wert mit 0,1 M HCl auf pH = 6,0 eingestellt. Anschließend wird mit bidest. H₂O auf 70 mL und mit Aceton auf 100 mL aufgefüllt.

Lösung II

Je nach gewünschter Substratkonzentration werden 2-20 mg N-CBZ-valin-p-Nitrophenylester in 1 mL Aceton gelöst.

Gebrauchslösung

Lösung I und Lösung II werden im Verhältnis 100 : 3,3 gemischt und bei 12000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und als Substratlösung eingesetzt. Die Lösung ist bei RT einen Tag haltbar.

$$Y = B * X,$$

mit B = 4,326 L/mol ± 0,58 %.

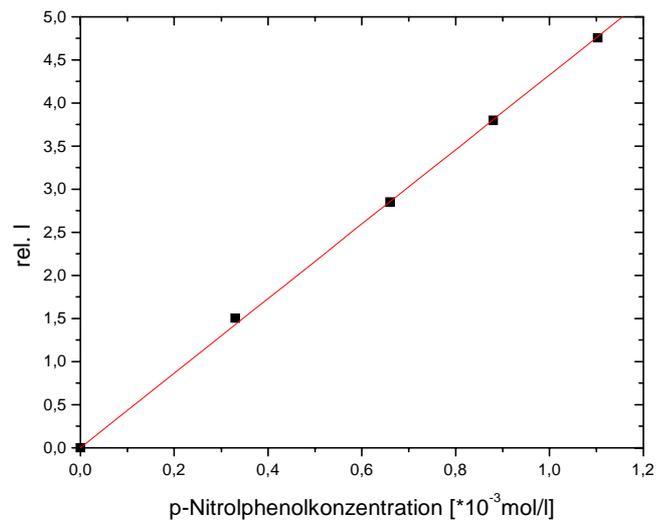


Abb. 71: Kalibrationsgerade p-Nitrophenolkonzentration bei $\lambda = 353$ nm, Linearität liegt bei

$$c_{\text{p-Nitrophenol}} < 9,0 \cdot 10^{-4} \text{ mol/L vor}$$

16.7 Gelelektrophorese mit dem PhastSystem

Das PhastSystem besteht aus einer Trenn- und einer Entwicklungskammer, die jeweils für zwei Gele Platz bieten. Sowohl die Trenn- als auch die Entwicklungsmethode können einprogrammiert werden. Nach dem Ende der Proteintrennung überführt man die Gele mit Hilfe einer Pinzette in die Entwicklungskammer und startet das Programm. Die zur Entwicklung benötigten Lösungen werden zuvor durch Schläuche mit der Kammer verbunden. Die Trennmethode des PhastSystems basiert auf dem Tris-HCl-Glycin-System nach Laemmli. Alle Gele haben eine 13 mm lange Sammel- und eine 32 mm lange Trenngelzone.

Die Trennung der Caseine erfolgt mit einem 8-25%igen Gradientengel unter Verwendung von zwei nativen Pufferstreifen (Pharmacia Biotech) [13, 14].

16.7.1 Benötigte Lösungen

1. 500 mL Urea/Tris/Acetat-Puffer :
6,6 M Urea, 0,112 M Tris, 0,112 M NaAc, mit 6 n HCl auf pH = 6,4 einstellen
2. 2 mL Probenpuffer:
10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, $2,5 \cdot 10^{-3}\%$ (v/v) Bromphenolblau

16.7.2 Gelvorbehandlung

Zur Vorbehandlung der Gele wird eine Petrischale bis zur Hälfte mit dem Urea/Tris/Acetat-Puffer befüllt. Die Gele bleiben vor Beginn der Trennung 15-30 min lang in der Lösung liegen. Anschließend werden sie 3-5 Minuten an der Luft getrocknet, um dann in die Trennkammer überführt zu werden.

16.7.3 Probenvorbereitung

Auf ein Urea-Gel werden 8 Proben aufgegeben.

Verdünnung der Proben mit Urea/Tris/Acetat-Puffer, 5 min Inkubation im Thermomixer, 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren, Behandlung der Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 1:1, 5 min bei 1000 rpm zentrifugieren.

16.7.4 Probenaufgabe

Von jeder Probe wird 1 μL auf den Probenkamm pipettiert. (Als Halterung dient ein Holzstück mit einer Kerbe von der Länge des Probenkamms, in die dieser mit seiner geraden Seite eingespannt wird).

16.7.5 Trennmethode

Die Methode basiert auf dem Prinzip der Proteintrennung nach dem Ladung/Masse-Verhältnis. Der Probenkamm wird bei Schritt 2 des Elektrophoreseprogramms automatisch heruntergelassen, so dass die Proben in Kontakt mit dem Gel kommen. Die Trennzeit beträgt ca. 100 min.

Tab. 18: Trennbedingungen bei der Durchführung von Urea-PAGE

Step	U [V]	I [mA]	Temp. [°C]
1	300	7,5	15
2		5,0	
3		7,5	
4	30	0,2	

16.7.6 CoomassieBlue-Färbung [113]

Tab. 19: CoomassieBlue-Färbemethode für native PAGE

Step	Lösung	Eingang	Ausgang	Zeit [min]	Temp [°C]	Funktion
1	0,1 % CB R-350	1	0	7	50	Färbelösung
2	30 % MeOH, 10 % HAc	2	5	1		Entfärber
3				10		
4				15		
5	13 % Glycerin	3	0	Konservierung		

Ansatz zum Färben nach der CoomassieBlue-Methode (CB R-350)

Die CB R-350-Stammlösung (0,2 %) muss vor Verwendung filtriert werden. Die Verdünnung der Stammlösung mit Essigsäure erfolgt erst unmittelbar vor dem Start der Methode. (Volumen der Trennkammer = 75 mL).

Ansatzberechnung für die CoomassieBlue-Färbung mit dem PhastSystem:

- 400 mL 0,2% (v/v) CB R-350-Stammlösung:
2 Tabletten CB R-350 in 160 mL bidest. H₂O unter Rühren auflösen, mit 240 mL Methanol auffüllen.
- 80 mL 0,1% (v/v) CB R-350:
40 mL 0,2% (v/v) CB R-350, 40 mL 20% (v/v) Essigsäure.
- 300 mL 30% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure:
90 mL Methanol, 30 mL Essigsäure mit bidest. H₂O auf 300 mL auffüllen.
- 1000 mL 13 % (v/v) Glycerin:
130 mL Glycerin mit bidest. H₂O auf 100 mL auffüllen.

16.8 Immobilisierung

1 cm² der epoxidfunktionalisierten Celluloseacetatmembran 18706 CJ 56 (Porendurchmesser: 0,45 µm) wird 24 Stunden bei T = 40°C in 2,0 mL 0,1 M KPP, pH = 7,5, c_{A-2,5DXL} = 12,5 % (v/v) bei 750 rpm gerührt. Anschließend wird die Membran mit 3 x 0,1 M Carbonatpuffer, pH = 9,0 gewaschen. Bis zur Verwendung wird das Immobilisat bei T = 4°C in 0,1 M Carbonatpuffer, pH = 9,0 aufbewahrt.

16.9 BCA-Proteinassay

Lösung I: Kommerzielle 1,0 %ige BCA-Lösung.

Lösung II: Kommerzielle 4 %ige $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung.

Kalibrationsstammlösung: 1 mg/mL BSA in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7,4,

Gebrauchslösung: Lösung I und Lösung II werden unmittelbar vor Verwendung im Verhältnis 50 : 1 gemischt.

Auf einer Mikrotiterplatte werden neben einer Kalibrationsreihe mit der BSA-Stammlösung in Doppelbestimmung je 20 μL Probe unverdünnt, 1 : 10 und 1 : 20 verdünnt aufgegeben und anschließend je 300 μL Gebrauchslösung zugegeben. Nach 60 min Inkubationszeit bei $T = 37^\circ\text{C}$ wird die Absorption des entstehenden Farbkomplexes bei $\lambda_{\text{max}} = 560 \text{ nm}$ im Immunoreader bestimmt. Die Proteinkonzentrationen der Proben werden anhand der internen BSA-Kalibration ermittelt.

16.10 RP-HPLC zur Peptidanalytik

Methodenparameter:

Säulentemperatur $T = 40^\circ\text{C}$

pH-Wert der mobilen Phase $\text{pH} = 2,0$

Flussrate $f_v = 0,3 \text{ mL/min}$

UV-Detektion $\lambda = 214 \text{ nm}$

16.10.1 Eluenten

Eluent A: 0,1 % (v/v) TFA in bidest. H_2O .

Eluent B: 0,1 % (v/v) TFA in 80% (v/v) Acetonitril.

16.10.2 Gradient

0-5 min: 27 % B, -50 min : -47 % B, -52 min : -80 % B, -60 min : -0 % B, -70 min : -0 % B

16.10.3 Reinheit des Eluenten

Abbildung 72 zeigt den Blindgradienten der in dieser Arbeit eingesetzten Laufmittel. Die Grundlinie entspricht aufgrund der Eigenabsorption des Acetonitrils dem Gradientenverlauf.

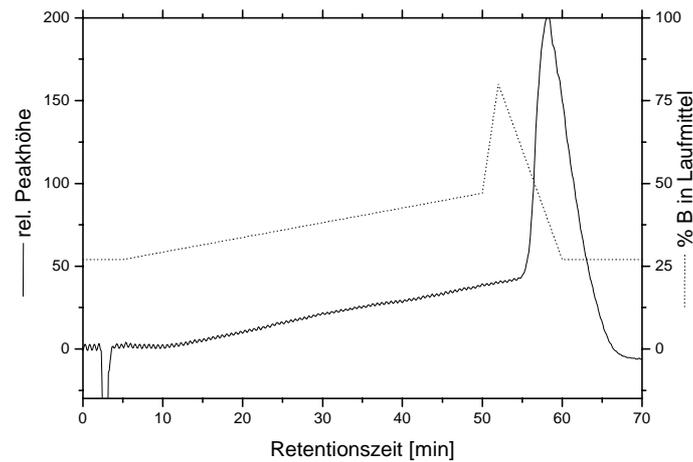


Abb. 72: Blindgradient zur Überprüfung der Lösemittelreinheit

16.10.4 Probenvorbereitung

1 mL einer 2 g/L Caseinstandardlösung wird mit einer definierten Menge Alkalase® 2,5 DX L versetzt. Wenn nicht anders angegeben, werden 1 μL (0,1 % (v/v) = 3,07 U/mL) eingesetzt. Nach Ablauf der jeweils angegebenen Reaktionszeit unter Rühren bei 1000 U/min wird mit 0,5 mL 1 M HCl versetzt, um die Reaktion durch Fällung des nicht umgesetzten Substrates und des Enzyms zu stoppen. Diese Lösung wird vor der HPLC-Analyse für $t = 5$ min bei 12000 rpm zentrifugiert und wie jeweils angegeben verdünnt.

16.10.5 Kalibration der Grundlinie der Spektren

Aufgrund der Eigenabsorption des Acetonitrils entspricht die Grundlinie der aufgenommenen HPLC-Spektren dem Verlauf des Blindgradienten in Abbildung 72.

16.10.6 Kalibrationsgeraden der kommerziellen Isolate

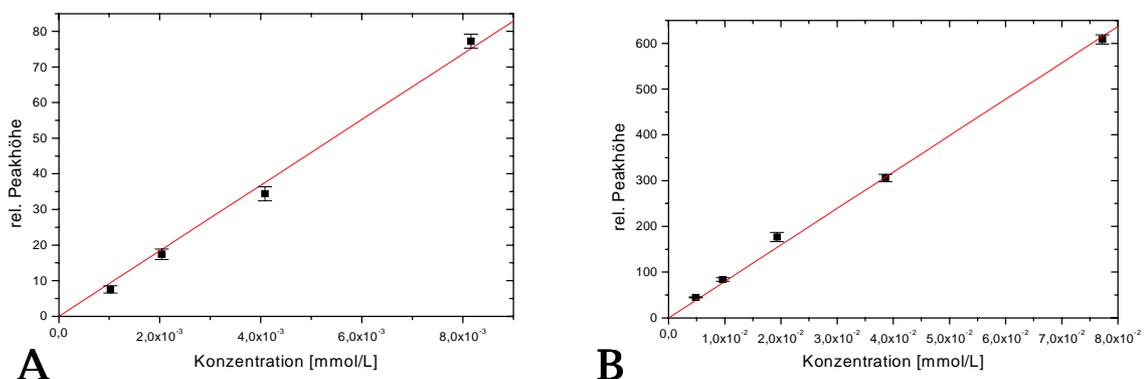


Abb. 73: A: Kalibrationsgerade α -Caseinfragment 100-105, Linearität von $5 \cdot 10^{-3}$ – $8 \cdot 10^{-2}$ mmol/L

B: Kalibrationsgerade β -Casomorphin 75-81, Linearität von $1 \cdot 10^{-3}$ – $8 \cdot 10^{-3}$ mmol/L

16.10.7 Isolierung der Peptidfragmente

Die Reaktionsprodukte des enzymatischen Caseinabbaus werden nach ihrer Trennung mittels RP-HPLC im Anschluss an die UV-Detektion isoliert. Dazu werden die Peptide dem Abflussstrom des Laufmittels unter Verwendung eines Pipetierroboters in Fraktionen zu $t = 2-3$ min entnommen. In den so erhaltenen Proben ist das gewünschte Fragment in einer sehr geringen Konzentration enthalten, die für eine weitere Untersuchung nicht ausreichend ist. Um dennoch eine Molmassenbestimmung mit Maldi-MS durchführen zu können, werden pro Fragment sechs Proben gesammelt, so dass nach der Lyophilisierung der vereinigten Probelösungen 1 mg jedes Peptids in reiner Form gewonnen werden.

16.11 Maldi-MS

16.11.1 Probenvorbereitung

Das Prinzip der Maldi-MS setzt eine Isolierung der Analytmoleküle in einer festen Matrix voraus, so dass intermolekulare Wechselwirkungen zwischen ihnen aufgehoben werden. Auf einen Edelmetalltarget werden 0,5 μL der Matrixlösung (10 g/L Sinapinsäure bzw. 15 g/L α -Cyanozimtsäure in Acetonitril, 0,1 % TFA, 2:1 (v/v)) aufgetragen. Nach Verdampfen des Lösemittels wird dieser Vorgang wiederholt, so dass sich zwei Matrixschichten auf dem Target befinden. Auf diese werden 0,5 μL der Probelösung und schließlich eine weitere Matrixschicht aufgetragen.

16.11.2 Spektren der Matrixsubstanzen

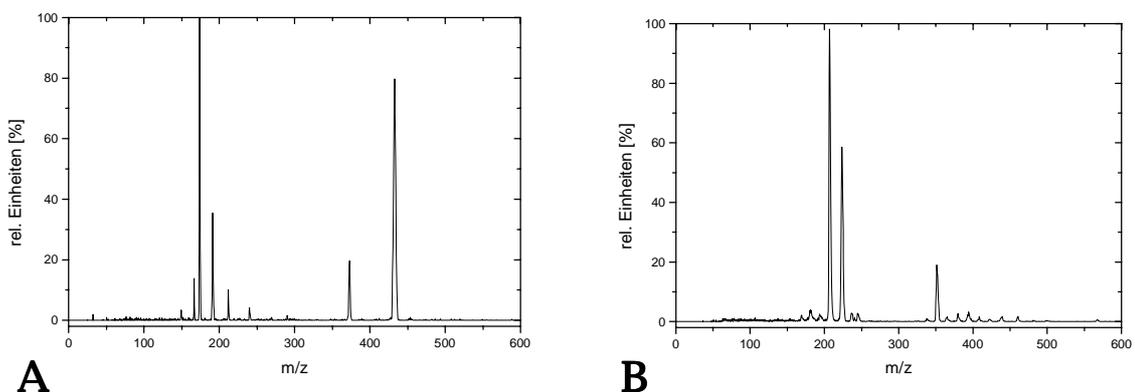


Abb. 74: A: Maldi-MS-Spektrum der α -Cyanozimtsäure

B: Maldi-MS-Spektrum der Sinapinsäure

16.12 RP-HPLC zur Aminosäureanalytik

Aminosäuren besitzen keine Chromophore, so dass ihre Detektion Schwierigkeiten bereiten kann. Daher ist eine Derivatisierung notwendig. Ein dafür geeignetes Verfahren beruht auf der Kopplung mit aromatischen Resten, wie der Umsetzung mit ortho-Phthaldialdehyd. Es reagiert zusammen mit einem Thiol mit primären Aminen innerhalb weniger Minuten zu einem fluoreszierenden 1-alkylthio-2-alkylsubstituierten Isoindol (pH = 9,5; RT). Dieses kann durch UV-Absorption (230 nm) oder Fluoreszenzemission (Ex : Em = 330 : 460 nm) detektiert werden. Dabei tritt keine Störung durch das OPA-Reagenz auf, da es nicht fluoresziert. Allerdings können bei einer Detektion im UV-Bereich UV-absorbierende Verbindungen zu Störungen führen.

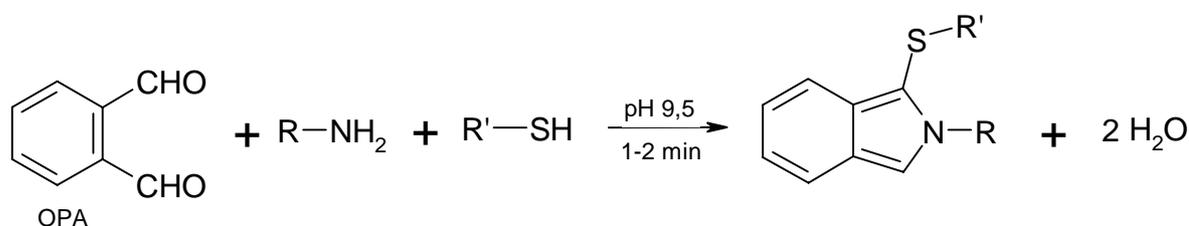


Abb. 75: Derivatisierung eines primären Amins mit OPA in Gegenwart eines Thiols

16.12.1 OPA-Reagenz

270 mg OPA in 5 mL Ethanol lösen

200 μ L Mercaptoethanol hinzugeben und mit 0,4 M Boratpuffer pH = 9,5 auf 50 mL auffüllen. 24 Stunden altern lassen.

16.12.2 Eluenten

Eluent A: 0,05 M Natriumacetat, 0,05 M NaH_2PO_4 , pH = 7

Eluent B: 54% Methanol, 46% H_2O

16.12.3 Gradient

0-50 Minuten: 0-100% B, -60 Minuten: -0% B

16.12.4 Probenvorbereitung

Nach Zugabe von 0,1% (v/v) Alkalase® 2,5 DX L, flüssig (3,07 U/mL) zu einer Caseinstandardlösung mit $c = 2,0\ g/L$ und Ablauf einer definierten Abbauphase wird die Reaktion durch Zugabe von 100% (v/v) Methanol gestoppt. Zur Vorsäulenderivatisierung wird zunächst mit 100% (v/v) 0,4 M Boratpuffer, pH 9,5, schließlich mit

100% (v/v) OPA-Reagenz versetzt. Nach 1,5 min Inkubation erfolgt die chromatographische Analyse der filtrierten Probe.

16.12.5 Zuordnung der Aminosäuren

Tab. 20: Charakteristische Daten und Sequenzierungsschlüssel der Aminosäuren

Aminosäure	3-Letter-Systematik	1-Letter-Systematik	Molmasse M [g/mol]	Retentionszeit t_R [min]	Kapazität k
Alanin	Ala	A	71,1	22,44	13,05
Cystein	Cys	C	103,1	-	-
Asparaginsäure	Asx	D	115,1	2,95	1,72
Glutaminsäure	Glu	E	129,1	6,29	3,66
Phenylalanin	Phe	F	147,2	38,88	22,60
Glycin	Gly	G	57,1	16,08	9,35
Histidin	His	H	137,1	14,73	8,56
Isoleucin	Ile	I	113,2	41,75	24,27
Lysin	Lys	K	128,2	50,15	29,16
Leucin	Leu	L	113,2	42,67	24,81
Methionin	Met	M	131,2	25,34	14,73
Asparagin	Asn	N	114,1	9,56	5,56
Prolin	Pro	P	97,1	-	-
Glutamin	Gln	Q	128,1	13,46	7,83
Arginin	Arg	R	156,2	24,78	14,41
Serin	Ser	S	87,1	11,10	6,45
Threonin	Thr	T	101,1	17,22	10,01
Valin	Val	V	99,1	35,90	20,87
Tryptophan	Trp	W	186,2	36,68	21,33
Tyrosin	Tyr	Y	163,2	27,15	15,78

16.13 Geräteparameter des 2D-Fluoreszenzspektroskops

Geräteparameter und Voreinstellungen des 2D-Fluoreszenzspektroskops Hitachi F4500:

Grundeinstellungen:

Exzitations-/Emissionsintervall 5 nm
 Exzitations-/Emissionsslit 5 nm

Scan speed	1200 nm/min
PMT-Voltage	700 V
Response	automatic
Shutter control	

Variable Einstellungen (Standardwerte; abweichende Einstellungen sind im Text gekennzeichnet):

Exzitation	250 – 350 nm
Emission	300 – 400 nm
Plot:	
Ordinate	0 – 1000 rel. FI
Intervall	10 nm

16.14 Kalibration der Trägerstromflussrate

Kalibration der Pumpflussrate der Peristaltikpumpe IS 1308.

$$Y = B * X,$$

mit $B = 0,028 \text{ mL/min} \pm 0,85 \%$ und einer Standardflussrate des Trägerstromes von $f_v = 1,3955 \text{ mL/min}$.

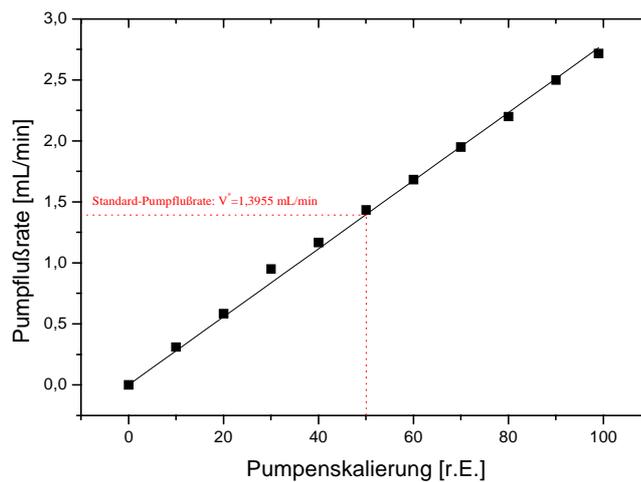


Abb. 76: Kalibrationsgerade der Trägerstromflussrate f_v

16.15 Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenanteil
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
abs.	absolut
AS	Aminosäure(n)
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Da	Dalton
DIN	Deutsche Industrienorm
DMF	Dimethylformamid
E.C.	Enzyme Commission
Em	Emission
EPE	esterolytische Proteaseeinheiten
et al.	und andere
etc.	et cetera
Ex	Exzitation
GUV	Gefahrstoffumgangsverordnung
IR	Infrarot
KPP	Kaliumhydrogenphosphatpuffer
M	molare Masse
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
Maldi-MS	matrix assisted laser desorption/ionization – mass spectroscopy
mRNA	messenger ribonucleic acid
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NaOH	Natronlauge
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PO ₄ ³⁻	Phosphat
ppm	parts per million
RP-HPLC	reversed phase - high performance (pressure) liquid chromatography
rpm	rounds per minute
Si	Silizium
spez.	spezifisch
T	Temperatur
UV/VIS	ultraviolet/visible
z.B.	zum Beispiel

16.16 Geräteverzeichnis

2D-Fluoreszenzspektrometer	F 4500, Hitachi
2-Kanallichtleiter	Lumatec
6-Port-3-Kanal-Injektor	A 1370, Knauer
7-Port-3-Kanal-Selektor	A 1374, Knauer
Autoklav	Integra Biosciences
CAFCA	Analysenprogramm, TCI Hannover
Cleanbench	Gelair Class 100, Gelman Instruments
Computer	486 DX/2-80, BPC; 486 DX/2-66
Degaser	TS 7505, Techlab

Enzymkartuschen	Anasyscon
Flachbettscanner	Hewlett Packard (Auflösung: 300 dpi)
Gradientenpumpe	LCP 4100 III, Techlab
Heißluftfön	Typ 3451, Steinell
Immunoreader	NJ 2000, Intermed
Magnetrührer	Ika-Combimag RET
Maldi-Massenspektrometer	Kompakt-Maldi 3, Kratos Analytical
Mikrometerschraube	Mitutoyo
Mikroskop	Olympus SZW
Optimas 5.0	Optimas Corporation, Seattle, USA
Peristaltikpumpen	IS 1308, Flocon 1003; Perimax 12, Spetec
PhastSystem	Pharmacia Biotech
pH-Elektrode	U-402-M6, Ingold
pH-Meter	632, Metrohm
Photometer	Novaspec II, Pharmacia
Pipetten	Eppendorf, Nethler & Hinz
Pipetierroboter	221 XL, Abimed
Profilometer	Dektak 3030, Veeco
RP-C18-Säule, AS	150*3,9 mm, Waters
RP-C18-Säule, Peptide	Nucleosil 100-5 C18 AB Macherey-Nagel
Spektrales Ellipsometer	SE 800, Sentech
Thermomixer	Compact, Eppendorf, Nethler & Hinz
Thermostat	Julabo C
UV/VIS-Spektrometer	Cary 50, Varian
UV-Detektor	L 7400 LaChrom®, Merck-Hitachi
Vortexer	Genie 2, Bender Hobein AG
Zentrifuge	5415 C, Eppendorf, Nethler & Hinz

16.17 Chemikalienverzeichnis

16.17.1 Enzyme

α -Chymotrypsin	102307	Merck
Alkalase® 2,4 L	--	Novo Nordisk
Alkalase® 2,5 DX L	--	Novo Nordisk
Elastase	124552	Merck
Enzymreiniger N	70950	Kremer Pigmente
Esperase®	--	Novo Nordisk
Flavourzyme™	--	Novo Nordisk
Protease K	7528.2	Roth
Savinase®	--	Novo Nordisk
Subtilisin A	111362	Merck
Trypsin	24579	Merck

16.17.2 Feinchemikalien

α -Caseinfragment 100-105	C1658	Sigma
β -Casomorphin 75-81	C5900	Sigma
α -Cyano-4-hydroxymzimtsäure	97-284	Aldrich
Aceton	A 4206	Sigma
Acetonitril	8825.2	Roth

Ammoniumcarbonat	09716	Fluka
Bicinchoninsäure	BCA-1	Sigma
Bromcyan	16774	Fluka
BSA	82516	Fluka
Calciumcarbonat	12010	Fluka
Calciumchlorid	21101	Fluka
Casein	C 7078	Sigma
CoomassieBlue R 350 Tabletten	17-0518-01	Pharmacia
Dikaliumhydrogenphosphat	04248	Fluka
Eisen(III)oxid	48600	Kremer Pigmente
Epichlorhydrin	45330	Fluka
Essigsäure	A 6283	Sigma
Ethanol	02854	Sigma
Glutaraldehyd	49629	Fluka
Glycerin	49770	Fluka
Glycin	G 7403	Sigma
Glycyl-L-prolin	G3002	Sigma
Gradientengele (Urea-Page) 8 – 25 %	17-0542-01	Pharmacia
Kaliumdihydrogenphosphat	60221	Fluka
Klucel E	63700	Kremer Pigmente
Kupfersulfat-Lösung	BCA-1	Sigma
L-Alanyl-glycin	A0878	Sigma
L-Alanyl-L-alanin	A9502	Sigma
L-Prolyl-glycin	P0880	Sigma
Magnesiumnitrat-Hexahydrat	63084	Fluka
Mennige	42500	Kremer Pigmente
Methanol	65540	Fluka
Native Pufferstreifen für PhastSystem	17-0517-01	Pharmacia
Natriumacetat	71185	Fluka
Natriumcarbonat	71345	Fluka
Natriumchlorid	71379	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	71496	Fluka
Natriumhydroxid	71689	Fluka
n-CBZ-valin-p-nitrophenylester	C6377	Sigma
OPA-Reagenz	111452	Merck
Paratacamit	--	NLD
Pentaglycin	G5755	Sigma
Plextol B 500	75600	Kremer Pigmente
p-Nitrophenol	35836	Fluka
Proteinmarker (wide range)	M 4038	Sigma
Salzsäure konz.	84422	Fluka
Sinapinsäure	D7927	Sigma
Trifluoressigsäure	91707	Fluka
Triglycin	G1377	Sigma
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	108382	Merck

17. Literatur

- [1] P. Raschle, Historische Technologie und Konservierung von Wandmalerei, Vortragstexte der 3. Fach- und Fortbildungstagung der Fachklasse Konservierung und Restaurierung, Schule für Gestaltung Bern, Bern (1985)
- [2] C. Seger-Glocke, Forschungsprojekt Wandmalerei-Schäden, Arbeitshefte zur Denkmalpflege in Niedersachsen 11, Hannover (1994)
- [3] H.-H. Möller, Schäden an Wandmalereien und ihre Ursachen, Arbeitshefte zur Denkmalpflege in Niedersachsen 8, Hameln (1990)
- [4] K. Petersen, Forschungsprojekt Wandmalerei-Schäden, Hameln (1994), pp 134
- [5] Fluka-Chemikalien-Katalog 1999/2000
- [6] E. Fritz, Diplomarbeit Fachhochschule Hildesheim, (1992)
- [7] D. Niokolowa, et al., Restauro 2, (1991)
- [8] H. Pfund, Diplomarbeit Fachhochschule Köln, (1991)
- [9] G. Preuss, Seminararbeit Hochschule für bildende Künste Dresden, (1991)
- [10] Römpp-Chemie-Lexikon, 9.Auflage, Thieme-Verlag, (1998)
- [11] J. Wiley and sons Inc., Encyclopaedia of polymer science and technology, (1964)
- [12] Hrsg. Lebensmittelchemische Gesellschaft, Milchproteine, Behr`s-Verlag, (1991)
- [13] Y. Münstermann, Diplomarbeit Universität Hannover, (1998)
- [14] F. Mönckeberg, Protokoll zum Schwerpunktpraktikum, Universität Hannover, (1995)
- [15] E. Sutermeister, Das Casein, Julius Springer Verlag, Berlin, (1932)
- [16] R. Scherer, Das Casein, U. Hartlebens-Verlag, Wien-Leipzig, (1905)
- [17] K. Klein, Bericht zum laufenden Projekt
- [18] C. Schwens, Die Alexanderkirche Wildeshausen und ihre Baugeschichte, Oldenburger Studien 2, Oldenburg, (1969)
- [19] H.-C. Hoffmann, Evang.-luth. Alexanderkirche Wildeshausen, Schnell Kunstführer 1769, München-Zürich, (1989)
- [20] J. Bühring, et al., Die Kunstdenkmale des Landkreises Celle, Textband, Osnabrück, (1980)
- [21] J. Schwarz, Die gotischen Wandmalereien in der Allerheiligenkapelle von Kloster Wienhausen, Berichte zur Denkmalpflege in Niedersachsen 4, (1996)
- [22] P. Karlson, et al., Biochemie, 14. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, (1994)

-
- [23] F. Lottspeich, et al., *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin, (1998)
- [24] R.W. McGilvery, *Biochemistry, A functional approach*, 3. Auflage, W. B. Saunders Company, (1983)
- [25] Novo Nordisk, Product sheet Alkalase®
- [26] Merck, Produktinformation α -Chymotrypsin
- [27] Merck, Produktinformation Elastase
- [28] Novo Nordisk, Product sheet Esperase®
- [29] Novo Nordisk, Product sheet Savinase®
- [30] Merck, Produktinformation Subtilisin A
- [31] Merck, Produktinformation Trypsin
- [32] Kremer Pigmente, Produktinformation Enzymreiniger N
- [33] Novo Nordisk, Product sheet Flavourzyme™
- [34] Roth, Produktinformation Protease K
- [35] M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry*, 72, (1976), pp 248
- [36] J. J. Sedmak, et al., *Analytical Biochemistry*, 79, (1977), pp 544
- [37] S. Beutel, *Protokoll zum Schwerpunktpraktikum*, Universität Hannover, (1996)
- [38] M. Kaduszkiewicz, *Protokoll zum Schwerpunktpraktikum*, Universität Hannover, (1996)
- [39] A. van Putten, *Dissertation Universität Hannover*, (1995)
- [40] Klein, et al., *Journal Association of Analytical Chemistry*, 72, (1989), pp 881
- [41] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, (1990)
- [42] M. Laroche, *Diplomarbeit Universität Hannover*, (1999)
- [43] R. Westermeier, *Elektrophorese-Praktikum*, VCH-Verlag, Weinheim, (1990)
- [44] Pharmacia Biotech, PhastSystem, High resolution DNA and protein electrophoresis, Bedienungsanleitung
- [45] D. Kosemund, *Protokoll zum Schwerpunktpraktikum*, Universität Hannover, (1997)
- [46] T. Kleinert, *Elektrophoretische Methoden der Proteinanalytik*, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, (1990)
- [47] W. Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, (1986)
- [48] B. Alberts, *Molecular Biology of cells*, 3. Auflage, Garland-Verlag, New York, (1994), pp 940

- [49] T. Nishio, et al., *Archives of biochemistry and biophysics*, 229, 1, (1984), pp 304
- [50] M. Y. Arica, et al., *Biomaterials*, 14, 11, (1993), pp 803
- [51] *Journal of Biochemistry*, Tokyo, 85, 4, (1979), pp 1091
- [52] G. F. Bickerstaff, *Immobilisation of Enzymes and Cells*, Humana Press, Totowa-New Jersey, (1997)
- [53] M. Laroche, *Protokoll zum Schwerpunktpraktikum*, Universität Hannover, (1998)
- [54] Sartorius AG, *Produktdatenblatt Sartobind Epoxy 18706*
- [55] U. Kirchner, *Diplomarbeit Universität Hannover*, (1996)
- [56] *Gmelin Band Eisen, Teil B*, pp 73
- [57] *Gmelin Band Calcium, Teil B*, pp 898
- [58] *Gmelin Band Blei, Teil C*, pp 132
- [59] *Gmelin Band Kupfer, Teil B*, pp 322
- [60] H. Berling, *Bericht zum laufenden Projekt*
- [61] Vogel, I-Lack, *Herberts GmbH*, 11, (1998)
- [62] Jansson, *Spectroscopic Ellipsometry Instrumentation and Applications*, Linköping, (1993)
- [63] Martensson, *Spectroscopic Ellipsometry Characterisation of Thin Organic Films*, Linköping, (1994)
- [64] Tompkins, *A User's Guide to Ellipsometry*, Academic Press, Inc., London, (1993)
- [65] Arwin, *Applied Spectroscopy*, 40, (1986), pp 313
- [66] Chiang, et al., *Analytica Chimica Acta*, 357, (1997), pp 73
- [67] K. K. Unger, *Handbuch der HPLC*, GIT-Verlag GmbH, Darmstadt, (1989)
- [68] Adamson, et al., *Enzyme and Microbial Technology*, 19, (1996), pp 202
- [69] Gaucheron, et al., *Journal of Chromatography B*, 664, (1995), pp 193
- [70] Mollé, et al., *Journal of Chromatography A*, 708, (1995), pp 223
- [71] Lemieux, et al., *Journal of Chromatography*, 519, (1990), pp 299
- [72] McSweeney, et al., *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 199, (1994), pp 429
- [73] Leadbeater, et al., *Journal of Chromatography*, 397, (1987), pp 435
- [74] Cramer, et al., *Analytical Chemistry*, 70, (1998), pp 4939
- [75] Courchesne, et al., *Electrophoresis*, 18, (1997), pp 369
- [76] Righetti, et al., *Biotechnological Progress*, 13, (1997), pp 258
- [77] Yang, et al., *Free Radical Biology and Medicine*, 22, (1997), pp 1235
- [78] Adamson, et al., *Journal of Dairy Research*, 64, (1997), pp 505

- [79] Lehmann, Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum der Wissenschaft Verlag, Heidelberg, (1996)
- [80] C. Dauphin, et al., *Analytica Chimica Acta*, 282, (1993), pp 603
- [81] D. Axelrod, et al., *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 3, 7, (1992), pp 289
- [82] J. M. Hillmer, Dissertation Universität Hannover, (1996)
- [83] J. M. Vanderkooi, *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 3, 3, (1992), pp 113
- [84] Saper, et al., *Analytical Chemistry*, 70, (1998), pp 477R
- [85] S. Balaci, *Analytica Chimica Acta*, 255, (1991), pp 305
- [86] Sicherheitsdatenblatt Klucel gemäß 91/155/EWG, Fa. Dr. Kremer Pigmente, Farbmühle, D-88317 Aichstetten, (1994)
- [87] Sicherheitsdatenblatt Plextol B 500 gemäß 91/155/EWG, Fa. Dr. Kremer Pigmente, Farbmühle, D-88317 Aichstetten, (1995)
- [88] P. Ostoa-Saloma, et al., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1041, (1990), pp 146
- [89] P. Ostoa-Saloma, et al., *Analytical Biochemistry*, 176, (1989), pp 239
- [90] W. J. Price, *Spectrochemical analysis by atomic absorption*, Heyden-Verlag, (1979)
- [91] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, 2. Auflage, Walter de Gruyter Verlag, Berlin-New York, (1990)
- [92] W. E. Krumbein, Sitzung des Arbeitskreises: Naturwissenschaftliche Forschung an Kunstgütern aus Stein, Erlangen, (1983), pp 87
- [93] J. Lehmann, Vortragsmanuskript zum Seminar des deutschen Holz- und Bautenschutzverbandes, Fulda, (1986)
- [94] F. Eckhardt, Konservierung und Restaurierung von verputzten Mauerflächen, Arbeitsheft 45 des Bayerischen Landesamtes für Denkmalpflege, München, (1990)
- [95] G. Weirich, *Zeitschrift für Kunsttechnologie und Konservierung*, Heft 2, Stuttgart, (1988)
- [96] H. Fricke, Diplomarbeit Fachhochschule Hildesheim, (1993)
- [97] K. Achenbach, Diplomarbeit Fachhochschule Köln, (1991)
- [98] K. Petersen, Bericht zum laufenden Projekt
- [99] H. Fölster, Diplomarbeit Universität Oldenburg, (2000)
- [100] K.-H. Bräutigam, Dissertation Universität München, (1973)
- [101] H. Lehmkuhl, Diplomarbeit Universität Oldenburg, (1999)
- [102] D. M. Mulvihill, et al., *International Dairy Journal*, 4, (1994), pp 15
- [103] B. Lieske, *Milchwissenschaft*, 53, 10, (1998), pp 562

-
- [104] A. M. Knoop, *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 27, 4, (1975), pp 315
- [105] E. J. Karjalainen, et al., *Advances in Mass Spectrometry, Progress Report I*, 14, (1998)
- [106] B. Matkovics, *Oxygen Free Radicals and Scavengers in Natural Science, Literary Review*, (1993), pp 167
- [107] Beyer, et al., *Lehrbuch der organischen Chemie*, 21. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, (1988)
- [108] R. S. Asquith, *Biochimica et Biophysica Acta*, 252, (1971), pp 111
- [109] M. P. Colombini, et al., *Studies in Conservation*, 43, (1998), pp 33
- [110] H. Wallner-Holle, *Restauro*, 7, (1998), pp 474
- [111] J. Segal, et al., *Paper Conservator*, 2, (1977), pp 47
- [112] Bergmeyer, et al., *Methods for enzymatic analysis*, 3. Auflage, VCH-Verlag, 5, (1986), pp 295
- [113] Hoefer, *Protein electrophoresis / Applications guide*, Hoefer Science Instruments, USA, (1994)

Lebenslauf

Sascha Beutel

Erderstraße 32
D-30451 Hannover

30.05.1971 geboren in der Freien und Hansestadt Hamburg
Eltern: Bernd Beutel, Zimmerermeister
Christel Beutel, geb. Hauenschild, Hausfrau

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder
Ehefrau: Maria Brigitte Schilling
Kinder: Tim-Jonas Schilling
Anna-Marie Schilling

Schulischer und beruflicher Werdegang

1977 – 1981 Grundschule Alstertal, Hamburg

1981 – 06.1990
06.1990 Gymnasium Oberalster, Hamburg
Abitur

07.1990– 06.1991 Grundwehrdienst
AKP STDST/MFK 602, Heide, Schleswig-Holstein
4.Fernmeldebataillon 620, Flensburg, Schleswig-Holstein
Ausbildung: Richtfunker, GdR

10.1991– 05.1997 Studium Chemie-Diplom an der Universität Hannover, Nieder-
sachsen
04.1994 Vordiplom
04.1997 Diplom
Diplomarbeit mit dem Thema: *Biosensoren mit Transmembran-
proteinen* unter der Leitung von Prof. Dr. T. Scheper

01.1995– 05.1997 Mitarbeiter auf Honorarbasis, Fächer Chemie und Mathematik,
Studienkreis Großburgwedel, Niedersachsen

06.1997– 08.1997 Werksstudent VW-Nutzfahrzeuge, Hannover-Stöcken, Nieder-
sachsen

seit 01.08.1997 Promotionsstudiengang an der Universität Hannover und wissen-
schaftlicher Mitarbeiter unter der Leitung von Prof. Dr. T. Scheper
im Institut für Technische Chemie der Universität Hannover

Hannover, Dezember 2000