



BACHELORARBEIT

Herr
Mirko Weber

**Etablierung eines Verfahrens zur
Herstellung von
Keratinhydrolysat aus Rinder-
und Pferdehaaren**

Mittweida, 2017

Fakultät Angewandte Computer- und
Biowissenschaften

BACHELORARBEIT

Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von Keratinhydrolysat aus Rinder- und Pferdehaaren

Autor:
Herr

Mirko Weber

Studiengang:
Biotechnologie / Bioinformatik

Seminargruppe:
BT14wM-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Dr. Ines Stachel

Einreichung:
Mittweida, 16.08.2017

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2017

BACHELOR THESIS

**Development of a method for the
production of keratin hydrolysate
from bovine and equine hair**

author:

Mr.

Mirko Weber

course of studies:

Biotechnology / Bioinformatics

seminar group:

BT14wM-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

second examiner:

Dr. Ines Stachel

submission:

Mittweida, 16.08.2017

defence/ evaluation:

Mittweida, 2017

Bibliografische Beschreibung:

Weber, Mirko: Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von Keratinhydrolysat aus Rinder- und Pferdehaaren. - 2017. – 68 Seiten Inhalt, 18 Seiten Deckblätter und Verzeichnisse, 7 Seiten Anhang

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2017

Kurzbeschreibung:

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung unterschiedlich stark abgebauter Keratinhydrolysate aus Rinder- und Pferdehaaren. Dafür wurden verschiedene aus der Literatur bekannte Extraktionsmethoden angewendet und deren Eignung unter Variation der Inkubationstemperatur, der Inkubationsdauer und der Konzentration der eingesetzten Chemikalien untersucht. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Charakterisierung der gewonnenen Hydrolysate. Weiterhin wurde eine Aminosäureanalyse sowie eine Bestimmung freier Thiolgruppen mittels Ellman's Reagenz durchgeführt.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Michael Stoll und Dr. Michael Meyer bedanken, dass sie mir am Forschungsinstitut für Leder und Kunststoffbahnen gGmbH Freiberg die Möglichkeit gegeben haben, meine Bachelorarbeit anzufertigen.

Ein weiterer Dank gebührt meiner betrieblichen Betreuerin Dr. Ines Stachel für die vielen Ratschläge und Information, sowie den einen oder anderen Denkanstoß.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Sascha Adler und Michael Kramer bedanken, mit denen ich den Laboralltag ohne Probleme bewältigen konnte.

Ebenfalls bedanke ich mich bei meiner Betreuerin, Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus, für die Unterstützung seitens der Hochschule.

Ebenso gilt ein großer Dank meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während der Studienzeit. Außerdem danke ich Sarah Krautwurst für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I

Abbildungsverzeichnis.....IV

Tabellenverzeichnis VI

Abkürzungsverzeichnis VII

1 Einleitung..... 1

 1.1 Aufbau von Keratin 2

 1.2 Funktionsvielfalt 5

 1.3 Keratinextraktion 11

 1.3.1 Alkalische Extraktion von Keratin 11

 1.3.1.1 Shindai-Solution 12

 1.3.1.2 Natronlauge..... 13

 1.3.1.3 Mercaptoessigsäure / Kaliumcyanid / Natriumsulfid 13

 1.3.2 Saure Extraktion von Keratin 13

 1.3.3 Enzymatische Extraktion von Keratin 14

 1.4 Verwendung von Keratinhydrolysaten 16

 1.4.1 Keratinhydrolysate in der Kosmetikindustrie 16

 1.4.2 Biomedizinische Verwendung von Keratinhydrolysaten 17

 1.4.3 Andere Verwendungsmöglichkeiten von Keratinhydrolysaten..... 18

2 Zielstellung 19

3 Material..... 20

 3.1 Chemikalien 20

 3.2 Biologisches Material 21

 3.3 Material 21

 3.4 Geräte 22

4 Methoden 23

 4.1 Delipidisierung..... 23

 4.2 Solubilisierung 23

 4.2.1 Alkalische Extraktion mittels Shindai-Solution 23

 4.2.2 Alkalische Extraktion mittels Natriumhydroxid..... 25

 4.2.3 Saure Extraktion mittels Peroxyessigsäure 26

4.2.4 Enzymatische Extraktion mittels Proteinase K und Keratinase.....	26
4.3 Dialyse, Zentrifugation und Gefriertrocknung	27
4.4 SDS-PAGE	28
4.5 Aminosäureanalyse	29
4.5.1 Herstellen der Lösungen	30
4.5.2 Probenvorbereitung.....	30
4.5.3 Chromatografie	30
4.5.4 Auswertung	31
4.6 Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz	31
5 Ergebnisse	33
5.1 Ausbeute an Keratinhydrolysat.....	33
5.1.1 Keratinausbeute mittels Shindai-Solution	33
5.1.2 Keratinausbeute mittels Natriumhydroxid.....	35
5.1.3 Keratinausbeute mittel Peroxyessigsäure	37
5.1.4 Überblick der Ausbeuten an Keratinhydrolysat.....	39
5.2 Elektrophoretische Charakterisierung der Keratinhydrolysate.....	41
5.2.1 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Shindai-Solution gewonnenen Keratinhydrolysate.....	41
5.2.2 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Natriumhydroxid gewonnenen Keratinhydrolysate.....	45
5.2.3 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Peroxyessigsäure gewonnenen Keratinhydrolysate.....	47
5.2.4 Elektrophoretische Charakterisierung der nach enzymatischer Hydrolyse gewonnenen Keratinhydrolysate.....	49
5.3 Aminosäurenanalyse	50
5.4 Bestimmung der Konzentration freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz	57
6 Diskussion	59
6.1 Vergleich der Ausbeuten an Keratinhydrolysat aus allen Extraktionsansätzen....	59
6.2 Löslichkeit der Keratinhydrolysate.....	60
6.3 Auswertung der gelelektrophoretischen Charakterisierung der Hydrolysate	61
6.4 Auswertung Aminosäureanalyse	62
6.5 Bestimmung freier Thiolgruppen mittels Ellman's Reagenz.....	63

7 Ausblick	64
8 Zusammenfassung	65
9 Summary.....	67
Anhang.....	VIII
Literaturverzeichnis	XV
Selbstständigkeitserklärung.....	XX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Molekulare Struktur von α -Keratin und Aufbau eines Intermediärfilaments [Wang, 2016]	2
Abbildung 2 Molekulare Struktur eines β -Faltblatts und Aufbau eines β - Keratinfilaments [Wang, 2016]	3
Abbildung 3 Aufbau eines Haares [URL-1]	4
Abbildung 4 Aufbau einer Wollfaser [McKittrick, 2012]	6
Abbildung 5 Aufbau des Horns eines Dickhornschafes [McKittrick, 2012].....	7
Abbildung 6 Aufbau eines Fingernagels von Primaten [McKittrick, 2012].....	8
Abbildung 7 REM-Aufnahmen und Aufbau einer Vogelfeder [McKittrick, 2012]	10
Abbildung 8 Spaltung einer Disulfidbrücke mit 2-Mercaptoethanol [URL-3]	12
Abbildung 9 Schematischer Ablauf zur Herstellung von Keratinhydrolysat durch enzymatische Spaltung [Krejci, 2011]	15
Abbildung 10 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	33
Abbildung 11 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	33
Abbildung 12 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff	34
Abbildung 13 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff	35
Abbildung 14 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit NaOH.....	35
Abbildung 15 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit NaOH	36
Abbildung 16 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Peroxyessigsäure	37
Abbildung 17 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Peroxyessigsäure.....	37
Abbildung 18 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare alle Extraktionsansätze.....	39
Abbildung 19 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare alle Extraktionsansätze	40
Abbildung 20 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	41

Abbildung 21 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	42
Abbildung 22 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff	43
Abbildung 23 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff	44
Abbildung 24 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Natriumhydroxid.....	45
Abbildung 25 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Natriumhydroxid.....	46
Abbildung 26 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Peroxyessigsäure	47
Abbildung 27 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Peroxyessigsäure	48
Abbildung 28 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinder- und Pferdehaaren aus der Extraktion mit Proteinase K und Keratinase	49
Abbildung 29 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren ohne Thioharnstoff.....	53
Abbildung 30 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren mit Thioharnstoff	54
Abbildung 31 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren mit Natriumhydroxid	55
Abbildung 32 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaare mit Peroxyessigsäure	56
Abbildung 33 Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung freier Thiolgruppen	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Parameter für die Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff.....	24
Tabelle 2 Parameter für die Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff.....	24
Tabelle 3 Parameter für die Extraktion mit Natriumhydroxid.....	25
Tabelle 4 Parameter für die Extraktion mit Peroxyessigsäure.....	26
Tabelle 5 Parameter für die Extraktion mit Proteinase K und Keratinase.....	26
Tabelle 6 Einwaagen für Aminosäureanalyse	29
Tabelle 7 Trennprogramm für die chromatografische Aminosäureanalyse	30
Tabelle 8 Gehalte wichtiger Aminosäuren der Rinderhaar-Extraktionsansätze.....	50
Tabelle 9 Verteilung wichtiger Aminosäuren der Pferdehaar-Extraktionsansätze.....	51
Tabelle 10 Ergebnisse der Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz	57
Tabelle 11 Einwaagen und Masse an Keratinhydrolysat von Rinderhaare aller Ansätze aus Punkt 4.2.....	VIII
Tabelle 12 Einwaagen und Masse an Keratinhydrolysat von Pferdehaaren aller Ansätze aus Punkt 4.2.....	IX
Tabelle 13 Aminosäureverteilung Rinderhaare PN 1 - PN 12.....	XI
Tabelle 14 Aminosäureverteilung Rinderhaare PN 13 - PN 24.....	XII
Tabelle 15 Aminosäureverteilung Pferdehaare PN 1 - PN 12	XIII
Tabelle 16 Aminosäureverteilung Pferdehaare PN 13 - PN 24	XIV

Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
kDa	Kilodalton
NaOH	Natriumhydroxid
M	mol pro Liter
mM	millimol pro Liter
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (molecular weight cut off)
PN	Probennummer
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylpolyacrylamidgelelektrophorese
(v/v)	Volumenprozent

Übersicht Aminosäuren und Dreibuchstabencode

Aminosäure	Dreibuchstabencode
Asparagin	Asp
Hydroxyprolin	Hyp
Threonin	Thr
Serin	Ser
Glutaminsäure	Glu
Cystein	Cys
Prolin	Pro
Glycin	Gly
Alanin	Ala
Lanthionin	Lan
Valin	Val
Methionin	Met
Isoleucin	Ile
Leucin	Leu
Tyrosin	Tyr
Phenylalanin	Phe
Hydroxylysin	Hyl
Ornithin	Om
Lysin	Lys
Histidin	His
Arginin	Arg

1 Einleitung

Keratine sind nach Kollagen die wichtigsten Strukturproteine in Lebewesen. Sie kommen häufig in der Haut von Wirbeltieren vor und besitzen eine große Vielfalt an Funktionen und Formen. Diese reichen von einfachen wasserabweisenden Schichten von Schildkrötenpanzern bis hin zu robusten und widerstandsfähigen Hörnern der Nashörner. Keratine, sowie auch Kollagene, besitzen α -Helix Polypeptidketten mit einer definierten Abfolge von strukturell kleinen Aminosäuren, wie zum Beispiel Alanin und Glycin, die in der Lage sind, eine α -Helix Struktur auszubilden. In Keratin verdrillen sich zwei α -Helix Polypeptidketten zu einem *coiled coil*, wohingegen sich bei Kollagen drei α -Helix Polypeptidketten verdrillen und eine Kollagenfibrille bilden [McKittrick, 2012].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen Kollagen und Keratin ist, dass Keratin im Gegensatz zu Kollagen Bestandteil von totem Gewebe ist. Keratinozyten, die für die Bildung von Keratin zuständig sind, besitzen eine ca. einmonatige Lebensdauer. Nachdem Keratinozyten Keratin in ausreichender Menge gebildet haben, wird von der Zelle die Apoptose eingeleitet. Die meisten Materialien, die aus Keratin bestehen, bilden somit eine dichte und robuste Oberfläche aus mehreren, einzelnen Schichten Keratin [Lippens, 2005].

Ein weiterer Unterschied zu Kollagen ist, dass Keratin als ein Gemisch angesehen werden kann, dessen amorphes Keratingerüst mit kurzen Keratinfasern verstärkt ist. Diese kurzen Fasern werden als kristallines Keratin bezeichnet und befinden sich im Zentrum des Gerüsts. Sie sind unlöslich in Wasser und bilden somit eine stark wasserabweisende Schicht. Im Gegensatz dazu ist das äußere amorphe Keratingerüst in der Lage, viel Wasser zu absorbieren und zu quellen [Feughelman, 1959].

Keratine weisen eine Vielzahl von Cysteinresten auf, die eine Mercaptogruppe besitzen. Mercaptogruppen können starke, kovalente Disulfidbrücken ausbilden, die Polypeptidketten miteinander verknüpfen und somit Matrixmoleküle untereinander verbinden. Diese Eigenschaft wird für eine Klassifizierung in weiche bzw. harte Keratine genutzt. Harte Keratine besitzen eine hohe Anzahl von Disulfidbrückenbindungen und kommen häufiger in Hörnern oder Hufen von Tieren vor. Weiche Keratine sind wiederum meist Bestandteil der Epidermis und besitzen eine geringere Anzahl von Disulfidbrücken [McKittrick, 2012].

1.1 Aufbau von Keratin

Die grundlegenden Makromoleküle, aus denen Keratin besteht, sind kettenförmige Polypeptide. Diese können entweder in einer verdrehten Form, den α -Helices, oder in einer Faltblattstruktur nebeneinander, den β -Faltblättern, vorliegen. Säugetiere besitzen schätzungsweise 30 verschiedene α -Keratinarten, die ein Grundbestandteil von Haaren, Nägeln, Hufen, Hörnern, Stacheln und der Oberhaut sind. Krallen, Schuppen, Federn und Schnäbel von Reptilien oder Vögeln besitzen im Gegensatz dazu vermehrt β -Faltblattstrukturen. Diese sind robuster und widerstandsfähiger als die α -Keratine [McKittrick, 2012].

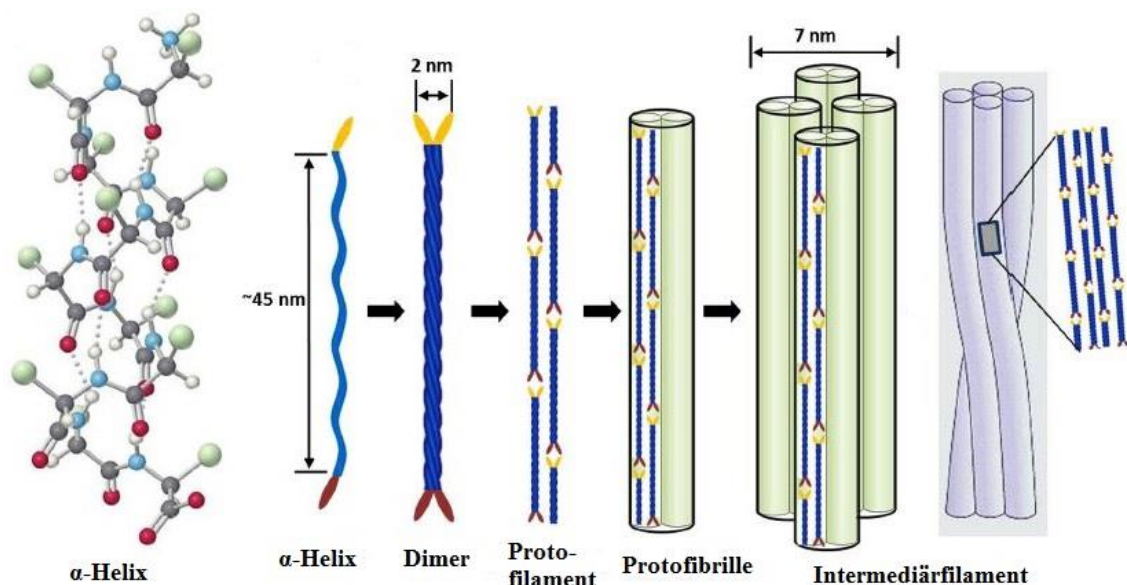


Abbildung 1 Molekulare Struktur von α -Keratin und Aufbau eines Intermediärfilaments [Wang, 2016]

In Abbildung 1 ist der Aufbau von α -Keratin zu erkennen. Die α -helikale Struktur wird durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert. Die Zusammenlagerung von zwei α -Helices führt zur Bildung eines Dimers mit einem Durchmesser von 2 nm. Die Bildung des Dimers wird dabei durch hydrophobe Wechselwirkungen der Aminosäurereste und von Disulfidbrücken, die aus Cysteinresten resultieren, unterstützt. Dimere besitzen einen C- und einen N-Terminus, die unter Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken die Möglichkeit einer Zusammenlagerung mehrerer Dimere zu einem Protofilament bieten. Zwei Protofilamente bilden wiederum eine Protofibrille aus. Vier

Protofibrillen lagern sich zu einem Intermediärfilament zusammen, das einen Durchmesser von 7 nm besitzt [McKittrick, 2012], [Wang, 2016].

Bestimmt werden die chemischen Eigenschaften durch polare und unpolare Aminosäuren. Intermediärfilamente sind außerdem in einer amorphen Keratinmatrix eingelagert. Auch hier unterscheidet man zwischen zwei verschiedenen Keratinmatrizen, die entweder einen hohen Schwefelgehalt durch Cysteinreste oder einen hohen Glycin-Tyrosin-Gehalt besitzen [Parry, 1998].

In Abbildung 2 ist der Aufbau eines β -Keratinfilaments auf molekularer Ebene zu sehen.

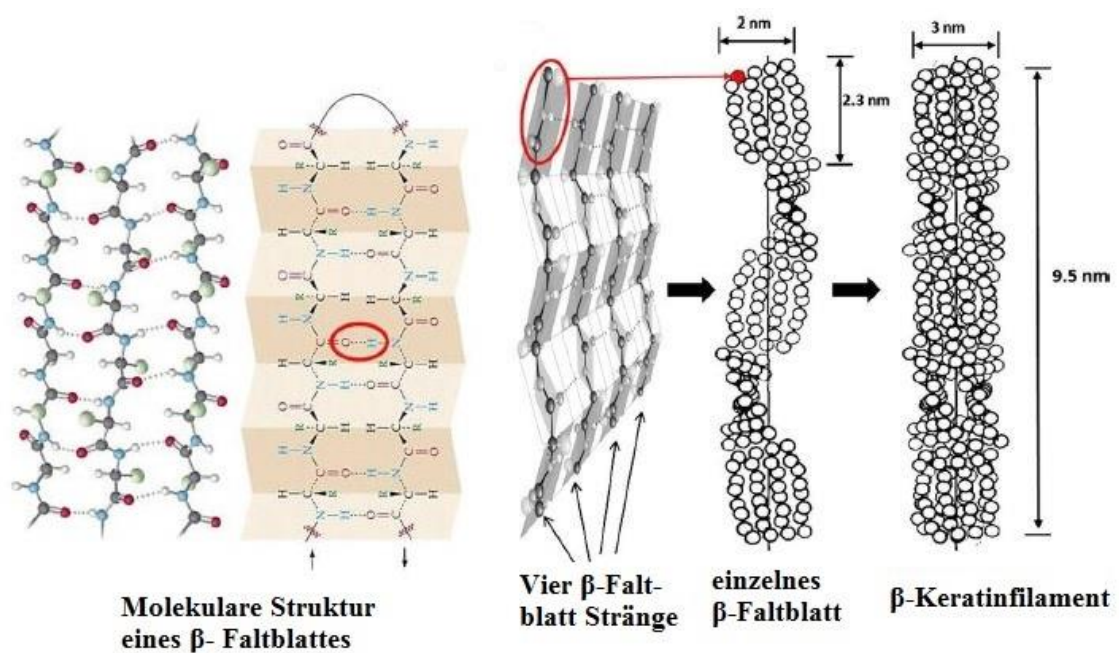


Abbildung 2 Molekulare Struktur eines β -Faltblatts und Aufbau eines β -Keratinfilaments [Wang, 2016]

Die molekulare Struktur eines β -Keratinfilaments besteht aus einzelnen β -Strängen, die sich parallel oder antiparallel zusammenlagern. Die β -Stränge bilden wie α -Keratin Wasserstoffbrückenbindungen aus, die neben den für die Faltung verantwortlichen Peptidbindungen die Stabilisierung des β -Faltblattes ermöglichen. Vier β -Stränge bilden ein β -Faltblatt, welches wiederum mit einem weiteren β -Faltblatt ein β -Keratinfilament formt. Die C- und N-Termini (nicht in Abbildung 2 dargestellt) winden sich um die β -Keratinfilamente und bilden eine amorphe Keratinmatrix. [Wang, 2016], [McKittrick, 2012].

Die Darstellung des Zusammenspiels von α -Keratin und β -Keratin lässt sich sehr gut am Beispiel eines Haares zeigen (Abbildung 3). Haare bestehen aus drei grundlegenden Kompartimenten. Die Kutikula bildet die äußere Schicht des Haares. Sie besteht aus sehr flachen, überlappenden Zellen und enthält zum größten Teil β -Keratine, die für den Schutz vor äußeren physischen sowie chemischen Einwirkungen zuständig sind. Der Hauptkörper des Haares ist der Kortex. Er besteht aus vielen spindelförmig geformten Zellen, die Keratinfilamente (Mikrofibrillen, Makrofibrillen) enthalten. Dabei unterscheidet man auch hier wieder kristalline Fasern, die einen niedrigen Schwefelgehalt besitzen und die amorphe Matrix, die einen hohen Schwefelgehalt enthält. Die kristallinen Fasern, bestehend aus α -Keratinen, bilden Intermediärfilamente aus, die für die Robustheit und einheitliche Konformität des Haares zuständig sind. Der Anteil an α -Keratinen im Haar beträgt dabei ca. 50-60%. Die amorphe Keratinmatrix, mit einem Anteil von ca. 20-30% β -Keratin im Haar, dient zur Ausbildung einer stabilen cysteinreichen Matrix, die für die Stabilisierung der α -Keratine zuständig ist. β -Keratine werden auch als sogenannte „KAPs“ (*keratin associated proteins*) bezeichnet. Im Zentrum des Haares befindet sich die Medulla, die aus schwach miteinander verbundenen Keratinozyten besteht [Rouse, 2010].

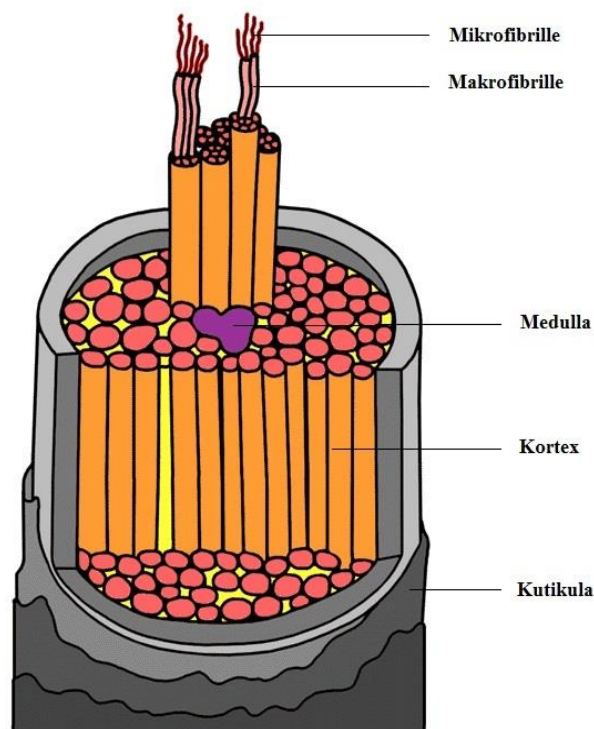


Abbildung 3 Aufbau eines Haares [URL-1]

Insgesamt besitzt das menschliche Genom 17 Gene, die für die Bildung des menschlichen Haares zuständig sind und 85 KAP-Gene, die für die Ausbildung der amorphen Keratinmatrix fungieren [Rogers, 2006].

1.2 Funktionsvielfalt

Keratine oder keratinisierte Materialien verfügen über eine starke Schutzfunktion in allen Lebewesen. Sie kommen in der äußersten Schicht der Haut, in Haaren, Federn, Stacheln und in Form von Schuppen vor. Die äußerste Schicht der menschlichen Haut bezeichnet man auch als *stratum corneum*, die eine Dicke von 30µm bei den Augenlidern, bis hin zu 1mm an den Fußsohlen erreichen kann [Park, 1972]. Sie dient zur Abschirmung der darunterliegenden Gewebe vor Infektionen durch Krankheitserreger, vor Dehydrierung und chemischen bzw. mechanischen Einflüssen. Die *stratum corneum* gehört zu den weichen Keratinen und besitzt locker gelagerte Intermediärfilamente (α -Keratine), die in eine amorphe Schicht Keratin mit starken Disulfidbrücken eingelagert sind. Die Belastbarkeit der *stratum corneum* reicht nach dem Elastizitätskoeffizienten von 0,01GPa bis 9GPa bei 27°C (Vergleichswerte: Kautschuk bis 0,05GPa; Holz ca. 10-15GPa) [Park, 1972].

Eine weitere Schutzfunktion bieten Haare, Felle und Wolle, deren Schäfte aus toten Keratinozyten im Haarfollikel hervorgehen. Dabei bilden sich die drei grundlegenden Haarstrukturen Kutikula, Kortex und Medulla aus, die in Abbildung 3 bereits veranschaulicht wurden.

Wollfasern besitzen eine leicht elliptische Struktur mit einem Durchmesser von 15µm bis 50µm. Sie zersetzen sich erst bei ca. 130°C und wachsen im Durchschnitt 10cm pro Jahr, was dem Haarwachstum des menschlichen Kopfhaares entspricht [Papir, 1975]. Außerdem kann Wolle bis zu 18% Wasser in die amorphe Keratinmatrix aufnehmen. Die Keratinfilamente sind in Zellen eingelagert, die durch eine lipidreiche Matrix zusammengehalten werden. Da Keratine aus lebendigen Zellen hervorgehen, die nach der Keratinisierung absterben, verbleiben Zellreste bzw. tote Zellmaterialien in den Fasern. [Park, 1972], [Papir, 1975]. Der Aufbau einer Wollfaser ist in Abbildung 4 dargestellt. Mehrere Keratinmoleküle bestehend aus α -Helices bilden eine Protofibrille, die wiederum eine Mikrofibrille formen. Mikrofibrillen lagern sich zu Makrofibrillen zusammen, die Bestandteil von Kortexzellen sind. Kortexzellen bilden dabei ca. 90% des Haargewebes [McKittrick, 2012]. Die restlichen 10% sind abgestorbene Zellen bzw.

verhornte Zellen der Kutikula, die auch hier die äußerste Schicht bildet. Die Medulla ist vor allem in dünnen Haaren bzw. Fasern nicht vorhanden, weshalb sie auch in der Abbildung nicht dargestellt wurde [McKittrick, 2012].

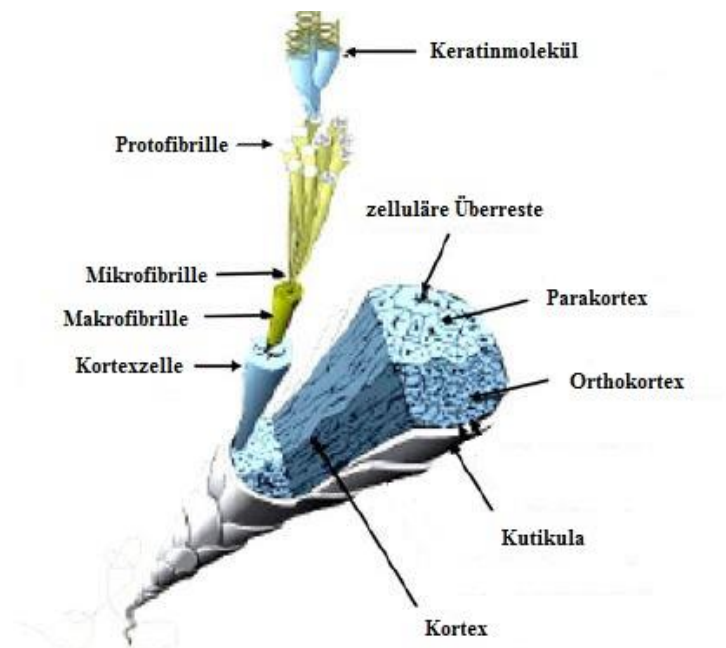


Abbildung 4 Aufbau einer Wollfaser [McKittrick, 2012]

Schematische Darstellung des Aufbaus einer Wollfaser

Die Stacheln von Stachelschweinen, Igel, Echidnas, und Tenreks stellen ein weiteres keratinreiches Material dar, welches für eine Schutzfunktion zuständig ist. Insgesamt existieren ca. 30 Stachelschweinarten, die über fast alle Breitengrade verteilt vorzufinden sind. Alle Arten besitzen kleine Muskeln an den Stachelansätzen, die den Stacheln erlauben, sich aufzurichten und in Form zu bleiben. Die Größe der Stacheln variiert zwischen einer Länge von 8cm bis 50cm je nach Stachelschweinart. Nordamerikanische Ursons besitzen eher kleinere Borsten, wohingegen altweltliche Stachelschweinstacheln eine Länge bis ca. 50cm erreichen können. Der Elastizitätskoeffizient der Stacheln bei Stachelschweinen liegt im Bereich von 5,6GPa bis 6GPa. Die Eigenschaften der Dornen sind sehr abhängig von der Temperatur, Feuchtigkeit und Hydratation. Der Aufbau hingegen ist bei allen Stachelschweinarten gleich. Sie besitzen einen festen, unelastischen äußeren Kortex und ein nachgiebiges, konformes, porenartiges Gewebe. Der Kortex dient zum Schutz vor Zerschneiden bzw. Abknicken der Stacheln bei hoher Krafteinwirkung, wohingegen das innere Gewebe als

elastische Grundlage des Kortex dient und dessen Beschädigung dämmt. Die Stacheln von Igeln sind denen der Stachelschweine sehr ähnlich, besitzen dennoch einen kleinen Unterschied: An den Stachelansätzen sind die Stacheln pilzförmig geformt und in ein sehr sanftes Gewebe eingebettet und verankert. Der Schaden eines Sturzes aus großer Höhe oder durch den Angriff von Raubtieren kann somit gemindert und eingeschränkt werden. Eine ähnliche Funktion bieten auch die Schuppen von Schuppentieren, die hauptsächlich in Asien und Afrika vorkommen. Die Schuppen machen 20 % des Körpergewichts aus. Bei Gefahr können sich die Tiere einrollen und erzeugen somit einen Schutzmantel aus sehr scharfen Kanten [Gibson, 1995], [McKittrick, 2012].

Keratin dient auch als molekulare Grundlage für zahlreiche Lebewesen, die Körperteile zur Verteidigung und zum Angriff benötigen. Darunter gehören Tiere der Gattung *Bovidae* (Hornträger), Tiere mit Klauen und Nägeln, und die Schnäbel von Vögeln. Unter die Familie der Hornträger zählen Schafe, Ziegen und Rinder. Hörner sind in ihrer Struktur sehr robust, widerstandsfähig und können großen Kräfteinwirkungen standhalten.

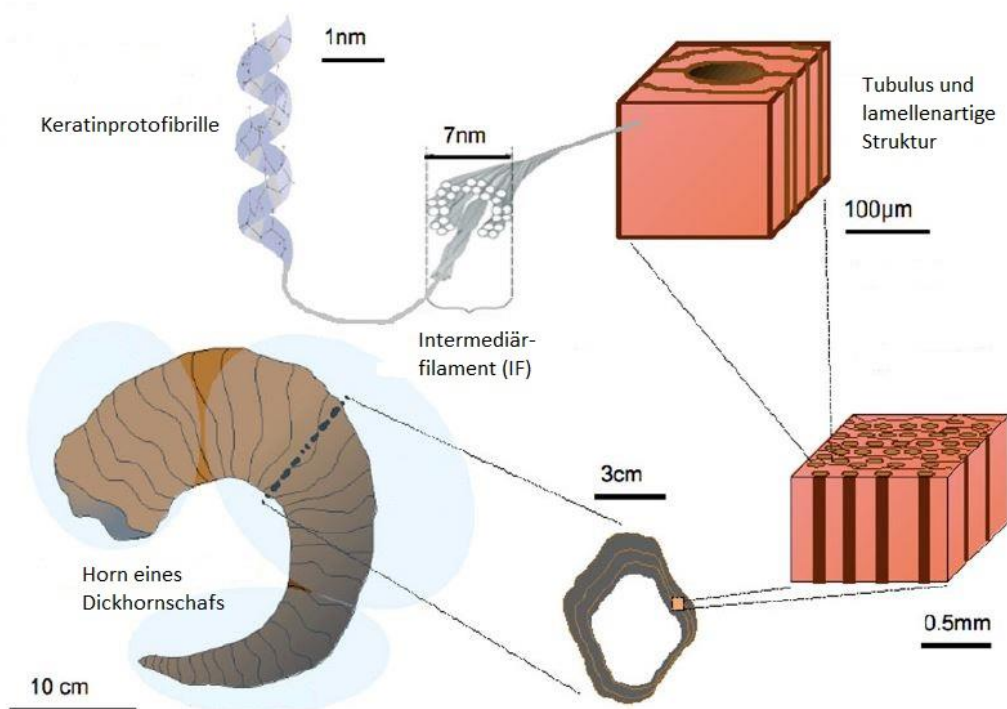


Abbildung 5 Aufbau des Horns eines Dickhornschafes [McKittrick, 2012]

Der Aufbau des Horns eines Dickhornschafes ist in Abbildung 5 dargestellt. Dieses setzt sich aus Keratinlamellen und Tubuli zusammen. Die Keratinlamellen bestehen aus vielen Intermediärfilamenten, die wiederum aus Keratinprotofibrillen aufgebaut sind. Dabei umgeben die Intermediärfilamente die Tubuli, die für die Verlängerung bzw. Vergrößerung des Horns zuständig sind [McKittrick, 2012].

Nach Kitchener und Vincent [Kitchener, 1973] beträgt der Elastizitätskoeffizient der Hörner der Familie der Hornträger ca. 6,1 GPa für nicht hydratisierte Hörner. Der Hydratisierungsgrad mindert den Elastizitätskoeffizienten jedoch stark, sodass bei hoher Hydratisierung der Elastizitätskoeffizient auf bis zu 1,8 GPa sinken kann, das Horn aber dadurch sehr dehnbar und elastisch wird. Die Hydratisierung kann nur in der amorphen Keratinmatrix stattfinden und dort Wasserstoffbrückenbindungen zerstören und somit den Elastizitätskoeffizienten senken [Kitchener, 1973].

Nägel und Klauen sind ebenfalls keratinreiche Materialien. Nach Taylor besitzen die Klauen von Sträußen einen Elastizitätskoeffizienten von ca. 1,8 GPa in axialer Richtung. In transversaler Richtung hingegen besitzen sie einen Elastizitätskoeffizienten von ungefähr 1,33 GPa, welcher im Gegensatz zu anderen keratinreichen Materialien (z.B. Pferdehaare) groß ist. Diese Eigenschaft wird auf die Anisotropie der Klauen zurückgeführt, sodass bei multiaxialen Belastungen die Klauen schneller brechen können, als bei axialen Belastungen einer Richtung [Taylor, 2004], [McKittrick, 2012]. Auch Fingernägel bestehen aus Keratinfilamenten, die transversal angeordnet sind. Sie verhindern das Zurückrollen der Haut an der Fingerspitze und sind nützlich zum Aufbrechen von Objekten bzw. im Kampf zum Kratzen. Die Fingernägel von Primaten bestehen aus drei verschiedenen Schichten, die in Abbildung 6 veranschaulicht sind.

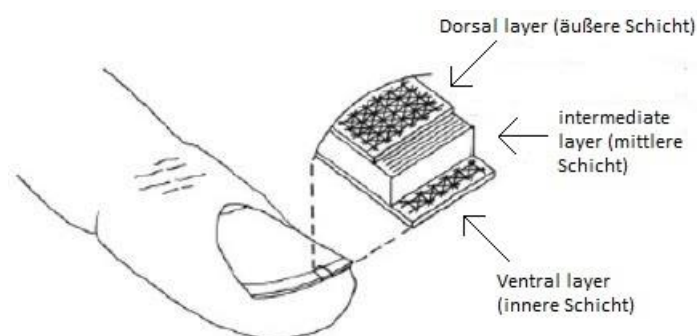


Abbildung 6 Aufbau eines Fingernagels von Primaten [McKittrick, 2012]

Die äußerste Schicht (dorsal layer) besteht aus einer dünnen, amorphen Keratinschicht mittlerer Härte. Die innere Schicht (ventral layer) ist ebenfalls sehr dünn, besitzt aber sehr weiches Keratin mit einem geringen Schwefelgehalt. Die mittlere Schicht (intermediate layer) ist eine sehr dicke Keratinschicht bestehend aus transversal angeordneten Intermediärfilamenten. Die Anordnung der Keratinfilamente der äußeren und inneren Schicht zeigen dagegen keine spezifische Ausrichtung. Die transversale Ausrichtung der Keratinfilamente der mittleren Schicht schützt den Nagel bei starker Belastung in longitudinaler Richtung. Die innere und äußere Schicht dient zur Stabilität, falls der Nagel einer ungleichmäßigen Belastung ausgesetzt ist [Farren, 2004], [McKittrick, 2012].

Keratin spielt auch bei der Fortbewegung von Lebewesen eine wichtige Rolle. Dabei dient es als Grundlage für Hufe von Pferden und für die Federn aller Vogelarten.

Der Aufbau von Pferdehufen ähnelt sehr stark dem Aufbau des Horns der Dickhornschafe (s. Abbildung 5). Auch Hufe besitzen Tubuli, die in vertikaler Richtung und parallel zum Bein ausgerichtet sind und von Keratinlamellen umgeben werden. Die Tubuli dienen dabei der Stabilisierung der Hufe und verhindern somit eine erhöhte Abnutzung bzw. Zerstörung dieser, die gewaltige Kräfte in Form von Aufprallen und Stößen abfangen und neutralisieren müssen [Kasapi, 1998].

Den Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die mechanische Funktion der Pferdehufen haben Bertram und Gosline ausführlich untersucht. Der Elastizitätskoeffizient von Pferdehufe reicht dabei von 0,4 GPa bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100 % bis zu 14,6 GPa bei einer RH von 0 %. Bei einer sehr hohen Luftfeuchtigkeit durchdringt das Wasser die einzelnen Keratinfasern und verringert die Dichte und Härte des Keratins. Der größte Elastizitätskoeffizient wurde bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 75 % gemessen [Bertram, 1987].

Federn bieten eine riesige Vielfalt an Funktionen und zählen zu den komplexesten Strukturen von Wirbeltieren. Sie dienen zum Fliegen, zur Tarnung, sowie als optischer Bestandteil von Balztänzen, sind Wasser abweisend und unterstützen die Wärmeisolation. Sie entstehen aus dem Follikel in der Epidermis und werden durch Häutung regelmäßig erneuert. Federn können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Konturfedern und Daunenfedern. Konturfedern, die für wissenschaftliche Analysen häufig benutzt werden, belaufen sich auf Schwanz- und Schwungfedern. Daunenfedern

dagegen bilden das Unterkleid der Vögel. Federn bestehen aus β -Keratin und geringen Mengen von Melanin, die für die Federfarbe bestimmend sind. Der Aufbau einer Konturfeder ist in Abbildung 7 dargestellt [McKittrick, 2012].

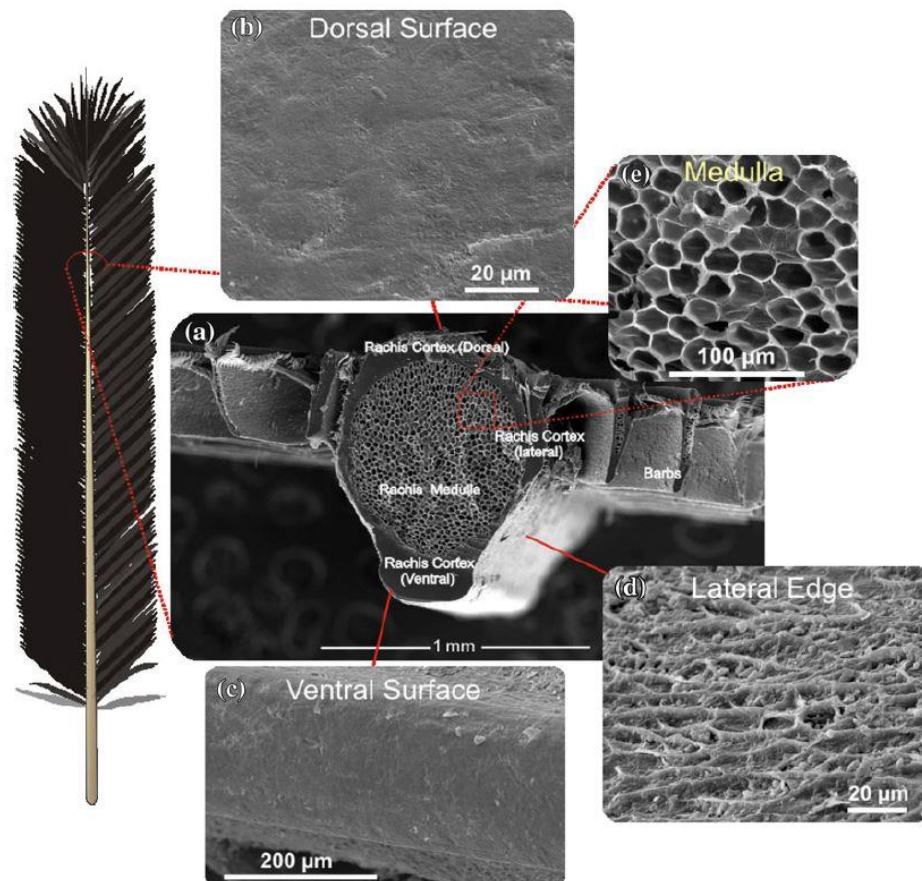


Abbildung 7 REM-Aufnahmen und Aufbau einer Vogelfeder [McKittrick, 2012]

Wie bei den Fingernägeln gibt es auch bei Federn ein „Ventral Surface“ (nach innen gerichtete Oberfläche) und ein „Dorsal Surface“ (nach außen gerichtete Oberfläche). Diese bestehen ebenfalls aus amorphen Keratinschichten, die zum äußeren Schutz des Federschaftes beitragen. Beide Oberflächen zählen zum Kortex, der bei Federn mit der Medulla den Hauptbestandteil bildet. Die Medulla bildet den zellulären Kern der Feder mit gleichmäßig geformten Zellen mit einem Durchmesser von etwa 20 μm . Neben der dorsalen und ventralen Oberfläche existiert außerdem eine laterale Oberfläche, an der sich Haken der Federäste befinden. Von den Federästen ausgehend bilden Bogen- und Hakenstrahlen die Innen- und Außenfahne der Federn und somit das typische Vernetzungsmuster der Fahnen [Bodde, 2011].

1.3 Keratinextraktion

Keratin ist ein stark hydrophobes, cysteinreiches Strukturprotein höherer Wirbeltierarten, welches sich durch seine hohe mechanische Belastbarkeit auszeichnet. Um Keratin und seine einzigartigen Funktionen nutzen zu können, müssen zunächst Disulfidbrückenbindungen gespalten und ein Hydrolysat hergestellt werden. Der größte Anteil Biomasse an Keratin wird von Rinder-, Ziegen- und Schafshäuten gewonnen. Ebenfalls können verschiedenste Anhänge wie Nägel, Haare, Federn, Wolle, Hufe und Schuppen für die Extraktion genutzt werden. In den USA werden zum Beispiel pro Jahr 2 Millionen Tonnen [Sharma, 2016] und in Europa 3,1 Millionen Tonnen Federn [URL-2] verworfen, die für die Produktion von Keratinhydrolysaten genutzt werden könnten.

Die Keratinextraktion kann in vier große Prozessschritte eingeteilt werden: Delipidisierung, Solubilisierung, Dialyse und Gefriertrocknung. Die Delipidisierung des keratinreichen Materials ist der erste Prozessschritt und wird oft mittels Soxleth-Extraktion unter Verwendung verschiedener Lösungsmitteln, wie z.B. Dichlormethan, Hexan oder Petrolether durchgeführt. Bevor jedoch die Soxleth-Extraktion genutzt werden kann, müssen die zu extrahierenden keratinreichen Materialien getrocknet vorliegen. Der zweite Extraktionsschritt, die Solubilisierung, kann durch eine alkalische, eine saure oder durch eine enzymatische Hydrolyse erreicht werden. Ein Überblick über die Methoden der Solubilisierung ist in den nachfolgenden Unterpunkten festgehalten und beschrieben. Nach der Solubilisierung des Keratins folgt eine Dialyse, um niedermolekulare Substanzen von den Proteinen zu trennen. Bei der abschließenden Gefriertrocknung wird durch Sublimation Wasser aus dem Keratinhydrolysat entfernt und das Hydrolysat somit schonend getrocknet. Nach der Gefriertrocknung kann das Keratinhydrolysat in einem Tiefkühlschrank aufbewahrt werden [Lee, 2014].

1.3.1 Alkalische Extraktion von Keratin

Die alkalische Extraktion von Keratin beruht auf der Reduktion von Disulfidbrücken. Durch den Einsatz von Reduktionsmitteln werden während der alkalischen Hydrolyse die Disulfidbrücken zu Thiolgruppen reduziert. Zusätzlich werden auch Wasserstoffbrückenbindungen unter alkalischen Bedingungen gebrochen, sodass eine partielle Entfaltung des Keratins stattfindet. Es ist bekannt, dass unter alkalischen

Bedingung die Sekundärstruktur von Keratin nicht beschädigt oder zerstört wird [Lee, 2014]. Es können verschiedene basische Extraktionsmittel verwendet werden, die in nachfolgenden Absätzen vorgestellt werden.

1.3.1.1 Shindai-Solution

Die in der Literatur in den letzten Jahren am häufigsten beschriebene Methode, wurde von Nakamura et al. 2002 erstmals veröffentlicht. Die dabei verwendete Lösung trägt den Namen „Shindai-Solution“ und besteht aus 25mM Tris-HCL, 2,6M Thioharnstoff, 6M Harnstoff und 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol. Thioharnstoff und Harnstoff sind hauptsächlich für das Auflösen von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Keratinfasern zuständig. Sie erleichtern das Brechen der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol (s. Abbildung 8) und die Bildung von Thiolgruppen. Tris-HCL ist für die pH-Wert Justierung auf ca. 8,5 notwendig. Der pH-Wert wurde von Nakamura niedriger als 10 gewählt, um eine Zerstörung der Polypeptidketten des Keratins auszuschließen. Außerdem wäre es bei einem pH-Wert über 10 möglich, dass Aminosäuren wie zum Beispiel Asparagin oder Glutamin zu Asparaginsäure und Glutaminsäure reagieren.

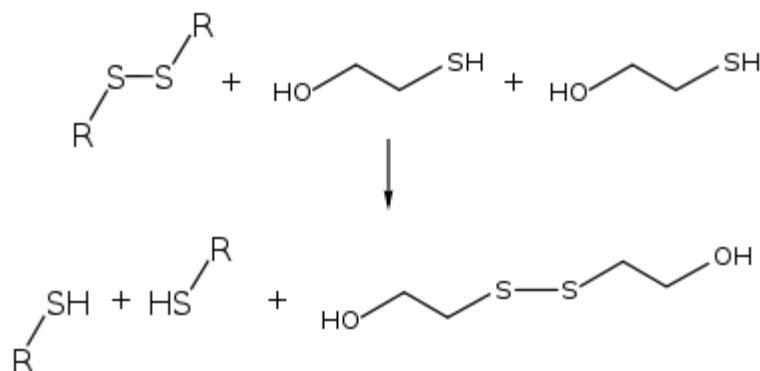


Abbildung 8 Spaltung einer Disulfidbrücke mit 2-Mercaptoethanol [URL-3]

Die Shindai-Solution wird mit dem keratinreichem Material für ungefähr 2-4 Tage bei ca. 50 °C inkubiert und die entstehende Substanz bzw. Lösung anschließend mithilfe einer Dialyse gereinigt und zum Abschluss gefriergetrocknet und gelagert. Entstehende Keratinfragmente besitzen eine Größe von 110-135 kDa (Dimere) und 45-60 kDa (α -Keratin) [Lee, 2014], [Nakamura, 2002], [Fujii, 2004].

1.3.1.2 Natronlauge

Die Extraktion von Keratin mit Natronlauge ist eine sehr schnelle, aber weniger schonende Variante im Gegensatz zur Verwendung der Shindai-Solution. Cardamone et al. untersuchten vier verschiedene Ansätze mit Natronlauge plus weiteren Zusätzen, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid, Natriumborhydrid, Harnstoff und Bleichmittel. Die Proben wurden alle bei 65 °C für 2-5 Stunden inkubiert. Die von Cardamone benutzte Wolle wurde in allen Proben vollständig aufgelöst und es ließen sich Keratinfragmente einer Größe von 6,5-18 kDa nachweisen. Dies unterstützt ebenfalls die Aussage von [Lee, 2014], dass zu hohe pH-Werte, Polypeptidketten auflösen bzw. zerstören [Cardamone, 2009].

1.3.1.3 Mercaptoessigsäure / Kaliumcyanid / Natriumsulfid

Die Reduktion von Disulfidbrücken mit Mercaptoessigsäure, Kaliumcyanid und Natriumsulfid wurde von Gupta et al. untersucht und veröffentlicht. Alle Proben bestanden aus 50 g Federn und 2 l der oben erwähnten Chemikalien mit einer Konzentration von 0,5 mol/l. Die Proben wurden bei 30 °C für 6 h inkubiert und der pH-Wert mit Natronlauge auf 10-13 justiert. Die Federn lösten sich komplett in Natriumsulfid und nur teilweise in Mercaptoessigsäure und Kaliumcyanid auf. Um Proteine und somit Keratinfragmente nachzuweisen, wurde der Biuret-Test verwendet. Natriumsulfid zeigte die stärkste Proteinausbeute, wohingegen Mercaptoessigsäure die geringste aufwies. Die tatsächlichen Proteinmengen, die durch die Extraktion erreicht wurden, beliefen sich bei Natriumsulfid auf 26,5 g, bei Kaliumcyanid auf 14,86 g und bei Mercaptoessigsäure auf 4,42 g von 50 g verwendeten Hühnerfedern. Es wird vermutet, dass das Lösen von Keratin bei Mercaptoessigsäure auf die Natronlauge zurückzuführen ist, die in wahrscheinlich ausreichenden Mengen für die pH-Wert Anpassung verwendet wurde [Gupta, 2012].

Nach [Lee, 2014] sind für Natriumsulfid Keratinfragmente in einer Größenordnung von 45-50 kDa zu erwarten (α -Keratin) und für Mercaptoessigsäure Keratinfragmente einer Größe von 45-50 kDa (α -Keratin) und 10-16 kDa (γ -Keratin).

1.3.2 Saure Extraktion von Keratin

Die saure Extraktion von Keratin beruht auf der Oxidation der Disulfidbrücken. Diese wird fast ausschließlich mit Perameisensäure oder Peroxyessigsäure durchgeführt. Nach

der Zugabe der Säuren werden die Disulfidbrücken zu Sulfonsäurederivaten oxidiert, die Keratin eine hydrophile Eigenschaft verleihen. Nach Earland et al. konnten α -Keratin und β -Keratin von Wolle mittels Peroxyessigsäure extrahiert werden, jedoch wurden einzelne Aminosäurekomponenten bzw. Nebengruppen teilweise zerstört. Außerdem wurden eine Vielzahl von Disulfidbrücken nicht gespalten oder es bildeten sich Sulfonsäurederivate, die im Gegensatz zu Thiolgruppen irreversibel sind. Bei der Verwendung von Perameisensäure wurden keine Aminosäuren beschädigt und eine Vielzahl von Disulfidbrücken gespalten. Somit ist Perameisensäure für die Oxidation von Disulfidbrücken die bevorzugte Variante bei der Extraktion von Keratin [Earland, 1955], [Yamauchi, 1996].

1.3.3 Enzymatische Extraktion von Keratin

Die enzymatische Extraktion von Keratin ist durch eine Vielzahl von Enzymen möglich. Dabei wird Keratin entweder mit einem alkalischen Zusatz und einer Protease gespalten oder direkt durch Keratinasen. Keratinasen sind Enzyme, die sowohl Disulfidbrücken als auch Polypeptidketten enzymatisch spalten können. Sie werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie zum Beispiel *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Thermoanaerobacter keratinophilus*, *Actinomyces* und Pilzen gebildet und arbeiten in einem neutralen pH-Bereich. Die Spaltung von Keratin kann sich je nach Menge an Keratin und Konzentration der Keratinase über einen Zeitraum von sechs Stunden bis zu mehreren Tagen und Wochen strecken. Der wesentliche Vorteil der Nutzung von Keratinasen ist die schonende Wirkung auf die Aminosäuren der Polypeptidketten. Diese werden nicht wie bei einem Großteil der alkalischen und sauren Extraktionsmethoden zerstört. Der Nachteil hingegen ist die Isolation der Keratinasen aus den Mikroorganismen bzw. deren notwendige Kultivierung [Gupta, 2006], [Cai, 2008].

Ein Abbau von Keratin kann auch durch alkalische Behandlung mit anschließender Spaltung der Polypeptidketten durch Proteasen erreicht werden. Ein Überblick über eine mögliche Verfahrensweise für die Extraktion von Keratin mittels alkalischer Hydrolyse und anschließender enzymatischer Behandlung ist in Abbildung 9 dargestellt. In einer Studie von Krejci et al. wurde die verwendete Wolle vor der alkalisch/enzymatischen Spaltung zuerst gewaschen und mit dem Enzym „Lipex 100T“ von der Firma *Novozymes* entfettet. Die entfettete Wolle konnte anschließend durch Calciumhydroxid

alkalisch gespalten werden. Der pH-Wert wurde mit HCL auf 9 eingestellt, um den optimalen Wirkungsbereich der nachfolgenden enzymatischen Hydrolyse mittels Esperase 6.0 T von *Novozymes*, einem dem Subtilisin A ähnlichen proteolytischen Enzym, zu erreichen. Nach der enzymatischen Spaltung wurde der flüssige Überstand mit Keratinhydrolysat gewonnen und die Esperase durch eine Temperaturerhöhung auf 90 °C inaktiviert. Es schloss sich eine Trocknung des Keratinhydrolysat über 48 h an. Zum Schluss wurde das gewonnene Hydrolysat pulverisiert. Die Ausbeute an Keratin war unter anderem abhängig von der Konzentration des Calciumhydroxids und der verwendeten Temperatur für die alkalische Hydrolyse.

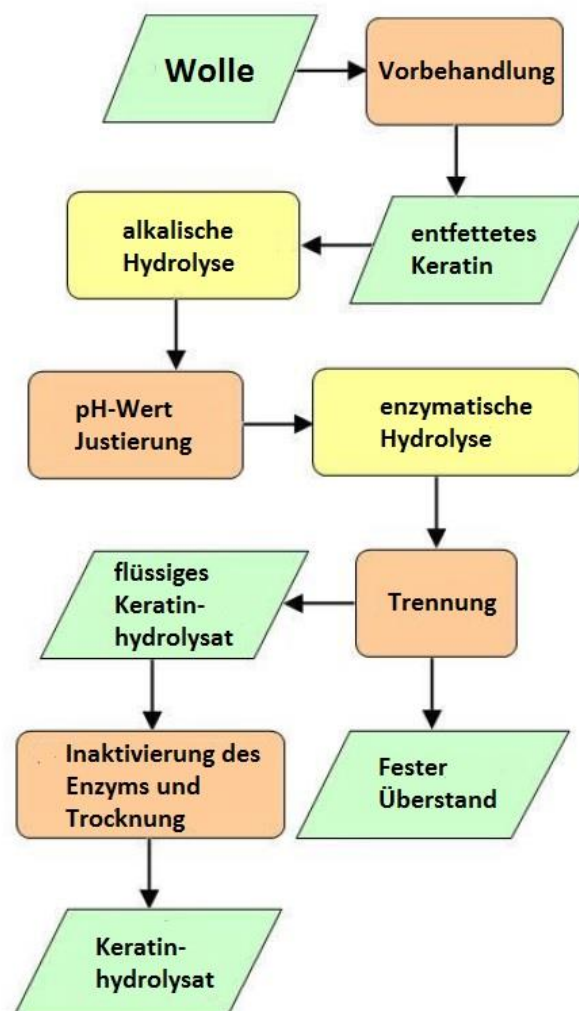


Abbildung 9 Schematischer Ablauf zur Herstellung von Keratinhydrolysat durch enzymatische Spaltung [Krejci, 2011]

Der dritte entscheidende Parameter war die Temperatur, bei der die Esperase über einen Zeitraum von 24 h eingesetzt wurde. Die beste Ausbeute konnte bei einer Konzentration

von 0,18 M Calciumhydroxidlösung und einer Temperatur von 80 °C, sowie einer Temperatur von 60°C für die Spaltung mit Esperase, erreicht werden, wodurch bis zu 6 g Keratin aus 10 g Ausgangsmaterial und Keratinfragmente in der Größenordnung von 6,5 kDa bis 116 kDa gewonnen werden konnten [Krejci, 2011].

1.4 Verwendung von Keratinhydrolysaten

Keratin und seine Hydrolysate sind durch deren Vielzahl an Funktionen heutzutage in der Pharmazie, Medizin, Kosmetikindustrie oder auch Biotechnologie von großem Interesse. Aus Keratin bestehende Materialien können in den verschiedensten Formen, wie zum Beispiel als Schäume, Schwämme, Matten, Filme, Gele und Mikrofasern hergestellt und als bio-basierte Materialien in biologischen Systemen benutzt werden. Darunter zählen Anwendungsbereiche wie Wundversorgung, Gewebeerneuerung, Zellwachstum und Zellvermehrung sowie Arzneimittelabgabe. Als Film- und Gewebeimplantat kann Keratin sehr gut von umliegenden Gewebe integriert werden und trotzdem seine Funktion als starkes, strukturverleihendes Material beibehalten [Cardamone, 2010].

1.4.1 Keratinhydrolysate in der Kosmetikindustrie

Keratinhydrolysate spielen in der Kosmetikindustrie eine bedeutende Rolle und sind meist Bestandteil von Haarpflegeprodukten. Sie eignen sich als Zusatz für Pflegespülungen und Haarconditioner und dienen dort zur Stärkung von Haarfasern. Zusätzlich sollen mögliche Haarbrüche reduziert werden. Oligopeptide mit einer molekularen Masse von weniger als 1 kDa sind in der Lage den Kortex des Haares zu durchdringen. Dies wird häufig bei der Färbung von Haaren oder Kalt- bzw. Warmwellen genutzt. In diesem Fall dient Keratinhydrolysat zur Kräftigung und zum Schutz des Haares. In Tönungsmitteln unterstützt Keratinhydrolysat die gleichmäßige Aufnahme der Farbe und die anschließende Versiegelung der Haarstruktur. Die dabei am meisten benutzten Ressourcen zu Gewinnung von Keratin sind Nägel, Hörner und Wolle [Vazquez Villa, 2013]. Keratinhydrolysate können in Kombination mit Kollagen, Elastin, Crotein, Chitosan und Seidenproteinen verwendet werden. Hydrolysate mit einem hohen Molekulargewicht sind dank ihrer hydrophilen, filmbildenden Eigenschaft auch für die Hautpflege geeignet und werden in Cremes und Lotionen eingesetzt, wo sie der Haut einen geschmeidigen und weichen Charakter verleihen [Sionkowska, 2015].

1.4.2 Biomedizinische Verwendung von Keratinhydrolysaten

Keratinhydrolysate haben in den letzten Jahren dank ihrer ausgezeichneten Biokompatibilität, biologischen Abbaubarkeit und Zellinteraktion in der Biomedizin neben Kollagen, Hyaluronsäure, Gelatine und Chitosan an großer Aufmerksamkeit gewonnen. Menschliche Haare bieten dabei eine herausragende Grundlage für die Gewinnung der Hydrolysate, die bei einer Implantation nur geringe immunologische Abwehrreaktionen zeigen. Keratinisierte Biomaterialien werden bereits für einen Großteil von biomedizinischen Anwendungen, zum Beispiel für die Nervenregeneration, als Filme oder Hydrogele für die Wundversorgungen, als Hämostasemittel und für die Geweberekonstruktion verwendet [Lee, 2014].

Für die periphere Nervenregeneration werden unter anderem Hydrogele auf Kollagen- und Chitosanbasis benutzt. Sie dienen dabei als Füllmaterial des Lumens von Nervenzellen und unterstützen die Signalweiterleitung in Nervenzellen [Jin, 2013], [Saul, 2011]. Hydrogele, die auf Basis von menschlichem Haarkeratin erzeugt wurden, zeigten eine neuroinduktive Proliferation und Migration von Schwannschen Zellen sowie eine Regulation von neuronaler Genexpression in in-vitro Experimenten [Lin, 2012]. Nach [Sierpinski, 2008] wurde ein Hydrogel, welches als Luminafüllmittel diente, aus der Extraktion von Keratin mittels 15%iger Peroxyessigsäure gewonnen und anschließend in Phosphat gepufferter Saline rehydriert. Das Hydrogel konnte erfolgreich in das Neurolumina eines Modellorganismus injiziert werden und unterstützte die Regeneration des Nervs.

Die Wundheilung ist ebenfalls ein sehr komplexer, biologischer Prozess, der weit gefächerte Interaktionen zwischen Zellen, extrazellulärer Matrix und Wachstumsfaktoren benötigt. Biomaterialien, die für die Wundheilung verwendet werden können, sind unterteilt in synthetische, biologische und zusammengesetzte Materialien. Für die Wundheilung sind besonders biologische Materialien von Vorteil. Sie unterstützen durch Zellinteraktion die Zellproliferation, Zellmigration und somit die Wundgenesung. Keratine sind außerdem Teil der Hautmorphogenese und der Wundheilung [Lee, 2014].

Die Forschergruppe um Yamauchi et al. [Yamauchi, 1996] untersuchte als eine der ersten Forschungsgruppen die Verwendung von Keratin zur Herstellung biomedizinischer Materialien und beschrieb so die physikalisch-chemischen

Eigenschaften von Keratinfilmern. Für eine praktische Anwendung erwies sich die Nutzung von Keratinhydrolysaten mit Glycerol, um einen transparenten, biologisch abbaubaren, starken sowie flexiblen Film zu bilden. Keratinhydrolysate weisen leider ohne Zusätze eine zu geringe mechanische Flexibilität für die Verwendung als Film auf, wodurch der Fokus der Forschung auf der Verbindung von Keratin mit natürlichen bzw. synthetischen Zusätzen liegt, die die physikalische Stärke, Flexibilität und kontrollierte biologische Abbaubarkeit unterstützen. Eine von Tanabe [Tanabe, 2002] veröffentlichte Studie beschreibt den Zusatz von Chitosan zu den von Yamauchi hergestellten Keratin-Glycerol Filmen. Damit konnte die mechanische Stärke der Filme erhöht werden. Zudem besitzt Chitosan eine hohe Biokompatibilität und wirkt stark antibakteriell, was besonders nützlich für Zellkulturen ist.

1.4.3 Andere Verwendungsmöglichkeiten von Keratinhydrolysaten

Keratin ist als Protein eine sehr gute Stickstoffquelle und wird unter anderem für die Produktion von Düngemitteln eingesetzt [Reddy, 2015]. Da Keratin durch seine vielen Disulfidbrückenbindungen schlecht biologisch abbaubar ist, werden den Düngemitteln für die Zersetzung der keratinreichen Materialien Bakterien und Pilze beigelegt. Mikroorganismen bilden Keratinasen (siehe Abschnitt 1.1.3) welche die Disulfidbrücken spalten und das Keratin abbauen. Die daraus resultierenden kurzen Fragmente können dann von den Pflanzen aufgenommen werden. Anwendung findet Keratin als Düngemittel bereits auf Bananenplantagen und Weidelgrasfeldern [Sharma, 2016].

Federhydrolysate, die durch chemisch-thermische Hydrolysen aus Hühnerfedern gewonnen werden, sind reich an Aminosäuren und Polypeptiden. Sie besitzen eine ähnliche Zusammensetzung, wie Sojaproteine oder Baumwollsaatprotein und werden daher als Nahrungsergänzungsmittel für Wiederkäuer verwendet. Eine enzymatische Modifikation des Hydrolysats zur Anreicherung mit Lysin kann zusätzlich die Nahrungsqualität erhöhen [Sharma, 2016].

2 Zielstellung

Keratine sind Proteine höhere Wirbeltierarten und kommen beispielsweise in Form von Federn, Schuppen, Hörnern, Haaren und als Bestandteil von Epithelzellen vor. Besonders in der Lebensmittelindustrie, in Schlachthäusern und im Wollgewerbe fallen allein in der USA, Brasilien und China bis zu 40 Millionen Tonnen Biomasse Keratin pro Jahr an. Obwohl Keratin bereits Verwendung findet, werden erhebliche Mengen des Proteins als Nebenprodukt immer noch entsorgt. Auch bei der Lederherstellung werden Haare von Tierhäuten entfernt. Dieser Prozessschritt wird Äschern genannt und bestimmt maßgeblich die Eigenschaften des Leders. In Europa wird der Äscherungsprozess mit Natriumsulfid, Calciumhydroxid oder Thioglykolsäure durchgeführt. Die daraus resultierenden Abwässer sind jedoch umweltschädlich und benötigen eine aufwendige Aufreinigung in Klärwerken [Sharma, 2016], [URL-4].

Seit vielen Jahren wird daher nach Alternativen gesucht, den reduktiven Sulfidäscher zu ersetzen. Hier bietet sich der Einsatz von Keratinhydrolysaten an. Sie besitzen freie Thiolgruppen, die bei hohen pH-Werten effektive Reduktionsmittel darstellen. Zudem könnten die Gerbereien, die bei sich anfallenden Haarabfälle sofort wieder für die Gewinnung der Keratinhydrolysate verwerten.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Gewinnung unterschiedlich stark abgebauter Keratinhydrolysate aus Rinder- und Pferdehaaren durch die Nutzung alkalischer, saurer und enzymatischer Extraktionsmethoden unter Variation der Konzentration der eingesetzten Chemikalien, der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit. Anschließend erfolgt eine elektrophoretische Charakterisierung, eine Aminosäureanalyse und eine Quantifizierung freier Thiolgruppen der erhaltenen Keratinhydrolysate.

3 Material

3.1 Chemikalien

- 2-Mercaptoethanol, Charge: S4673340(637), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Bromphenolblau LOT: 377322(847), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- DensiStain Blue G Färbelösung, LOT: P160328, SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Dichlormethan, Charge: 396242735, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat, Charge:224214625, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- EDTA, Charge: 063192957, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Ellmans Reagenz, LOT: SC242529, Thermo Fischer Scientific, Karlsruhe, Deutschland
- Essigsäure, LOT: 206244000, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ethylenglykol, LOT: 266244576, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Glycerin, LOT: 160231, SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Harnstoff, Charge: 203193819, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Hydrindantin-Dihydrat, LOT: 1348213, aber GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Lithium-citrat Puffer, laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland
- Natriumacetat-Trihydrat, Charge: 113190468, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumdihydrogenphosphat, Charge:35787136, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumhydroxid, LOT: B0964298(342), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Methanol, LOT: 1626710012, J.T Baker, 7418 Deventer, Niederlande

- Peroxyessigsäure, LOT: 7K011321, PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Salzsäure, LOT: Z0409518 645, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- SDS, LOT: 131305 SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Thioharnstoff, LOT: S4930191(831), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Trichloressigsäure: LOT: 1106601011, J.T Baker, 7418 Deventer, Niederlande
- Tris-HCL, LOT: SZBE0190V, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Trizma, LOT: 131345 SERVA, Heidelberg, Deutschland

3.2 Biologisches Material

- Cystein, LOT: 423122/1 53801, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Cystin, LOT: 417815/1 53801, Sigma-Aldrich, München, Deutschland
- Homocystein, LOT: 10190557, ThermoFischer, Karlsruhe, Deutschland
- Keratinase, LOT: SLBR6277V, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Pferdehaare einer Pferdemähne (Dezember 2016, tiefgefroren), Roßschlächterei Vogt, Freiberg, Deutschland
- Proteinase K, Charge: 123198612, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Proteinstandard, LOT: 121142, SERVA Unstained SDS-PAGE Protein Marker 6,5-200 kDa liquid mix, SERVA, Heidelberg, Deutschland
- Rinderhaare von säurebehandelten Kalbshäuten (Januar 2016, tiefgefroren) bereitgestellt von GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH, Wald-Michelbach, Deutschland

3.3 Material

- Dialyseschläuche LOT: 151448, MWCO=12-14 kDa, SERVA POR dialysis tubing 21mm diameter
- Dialyseschläuche LOT: 150800, MWCO=1000 Da, SERVA POR HMF dialysis tubing 28mm diameter
- Fertiggele, LOT: V170047, SERVA TG Prime 4-20% 12 sample wells, Heidelberg, Deutschland
- Indikatorpapier, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland

3.4 Geräte

- Aminosäureanalysator: Biochrom 30+ mit PEEK-Trennsäule HP physiologisch 200mm x 4,6 mm, laborservice Onken GmbH, Gründau, Deutschland
- Elektrophoresekammer: SERVA BV 104, Heidelberg, Deutschland
- Gefriertrockner: Christ Alpha 1-2, Osterode am Harz, Deutschland
- Gel-Scanner: SERVA Microtek Bio-5000plus, Heidelberg, Deutschland
- Heizplatte: Heidolph MR3001K, Schwabach, Deutschland
- pH-Messgerät: Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
- Photospectrometer: Thermo Scientific Evolution 201 UV-Visible, Karlsruhe Deutschland
- Soxleth-Apparatur: Behr Labor-Technik GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Spannungsquelle MBT Brand EV231, München, Deutschland
- Thermoschüttler: CellMedia Thermoschüttler Pro, Elsteraue, Deutschland
- Thermoschüttler: Eppendorf Thermomixer comfort, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
- Vakuumzentrifuge, Christ RVC 2-18, Osterode am Harz, Deutschland
- Vortexer: Scientific Industries Vortex-Genie 2, New York, USA
- Waage: Sartorius MC1, Göttingen, Deutschland
- Waage: XS205 DualRange Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
- Wippschüttler: Grant Bio PMR-30, Cambridge, UK
- Zentrifuge: Sigma 4-16KS (Rotorenblatt 12174 Sigma), Osterode am Harz, Deutschland

4 Methoden

Die in den Versuchen verwendeten Rinder- und Pferdehaare stammten von säurebehandelten Kalbshäuten der Firma GfN Herstellung von Naturextrakten GmbH sowie von einer Pferdemaße der Roßschlächtereier Vogt. Nach dem Entfernen der Haare von den Kalbshäuten bzw. der Pferdemaße wurden die Haare 3x gründlich mit deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

4.1 Delipidisierung

Für die Delipidisierung der Rinder- und Pferdehaare wurde eine Soxhlet-Apparatur mit Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet. Dafür wurden Extraktionshülsen mit Rinder- bzw. Pferdehaaren befüllt und mit Watte abgedichtet. Die Delipidisierung wurde sechs Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die entfetteten Haare 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

4.2 Solubilisierung

Für die nachfolgenden Ansätze wurden jeweils 50 ml der Extraktionslösung zu 500 mg Rinder- bzw. Pferdehaaren hinzugegeben und unter den aufgeführten Bedingungen und schütteln inkubiert. Eine Ausnahme bildeten die Ansätze mit Keratinase. Diese beinhalteten nur 200 mg Rinder- bzw. Pferdehaare. Die genauen Einwaagen sind im Anhang in Tabelle 11 und 12 aufgeführt.

4.2.1 Alkalische Extraktion mittels Shindai-Solution

Die Shindai-Solution wurde nach Nakamura et al. aus 25 mM Tris-HCL, 2,6 M Thioharnstoff, 6 M Harnstoff und 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol hergestellt. Der pH-Wert wurde anschließend mit Salzsäure auf 8,5 eingestellt. Für eine weitere Extraktionsmethode wurde die Shindai-Solution ohne Thioharnstoff hergestellt. Der pH-Wert wurde ebenfalls mit Salzsäure auf 8,5 eingestellt. Die verwendeten Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Konzentrationen der Stoffe sind in den nachfolgenden Tabellen (Tabelle 1 und 2) zusammengefasst.

Tabelle 1 Parameter für die Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff

Lösung	Inkubationsdauer	Inkubations- temperatur	Probennummer
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	2 Tage	50 °C	1
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	3 Tage	50 °C	2
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	4 Tage	50 °C	3
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	2 Tage	70 °C	4
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	3 Tage	70 °C	5
Shindai-Solution ohne Thioharnstoff	4 Tage	70 °C	6

Tabelle 2 Parameter für die Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff

Lösung	Inkubationsdauer	Inkubations- temperatur	Probennummer
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	2 Tage	50 °C	7
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	3 Tage	50 °C	8
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	4 Tage	50 °C	9
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	2 Tage	70 °C	10
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	3 Tage	70 °C	11
Shindai-Solution mit Thioharnstoff	4 Tage	70 °C	12

4.2.2 Alkalische Extraktion mittels Natriumhydroxid

Die Alkalische Extraktion mit Natriumhydroxid wurde mit 0,5 M und 1 M Natriumhydroxidlösung, bei 50 °C und 70 °C, für vier Stunden und 24 Stunden durchgeführt. Die genutzten Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Konzentrationen der Extraktionslösungen wurden in nachfolgender Tabelle (Tabelle 3) zusammengefasst.

Tabelle 3 Parameter für die Extraktion mit Natriumhydroxid

Chemikalie	Inkubationsdauer	Inkubations- temperatur	Probennummer
0,5 M Natriumhydroxid- lösung	4 Stunden	50 °C	13
1 M Natriumhydroxid- lösung	4 Stunden	50 °C	14
0,5 M Natriumhydroxid- lösung	4 Stunden	70 °C	15
1 M Natriumhydroxid- lösung	4 Stunden	70 °C	16
0,5 M Natriumhydroxid- lösung	1 Tag	50 °C	17
1 M Natriumhydroxid- lösung	1 Tag	50 °C	18
0,5 M Natriumhydroxid- lösung	1 Tag	70 °C	19
1 M Natriumhydroxid- lösung	1 Tag	70 °C	20

4.2.3 Saure Extraktion mittels Peroxyessigsäure

Die saure Extraktion wurde mit 1%iger Peroxyessigsäure bei 37 °C und 50 °C, für 6 Stunden und 24 Stunden durchgeführt. Die verwendeten Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Konzentrationen der Säure sind in nachfolgender Tabelle (Tabelle 4) aufgeführt.

Tabelle 4 Parameter für die Extraktion mit Peroxyessigsäure

Chemikalie / Lösung	Inkubationsdauer	Inkubations- temperatur	Probennummer
1%ige Peroxyessigsäure	6 Stunden	37 °C	21
1%ige Peroxyessigsäure	1 Tag	37 °C	22
1%ige Peroxyessigsäure	6 Stunden	50 °C	23
1%ige Peroxyessigsäure	1 Tag	50 °C	24

4.2.4 Enzymatische Extraktion mittels Proteinase K und Keratinase

Die enzymatische Extraktion von Keratin wurde mit Proteinase K und Keratinase in einem Phosphatpuffer (50 mM Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) bei einem pH-Wert von 7,5 oder 10, bei einer Temperatur von 37°C für 24h inkubiert. Tabelle 5 gibt einen Überblick über den verwendeten pH-Wert und das verwendete Enzym, sowie die verliehenen Probennummern.

Tabelle 5 Parameter für die Extraktion mit Proteinase K und Keratinase

Enzym	pH-Wert des Puffers	Haarart	Probennummer
Proteinase K	7,5	Rinderhaare	25
Proteinase K	7,5	Pferdehaare	26
Proteinase K	10	Rinderhaare	27
Proteinase K	10	Pferdehaare	28

Keratinase	7,5	Rinderhaare	29
Keratinase	7,5	Pferdehaare	30
Keratinase	10	Rinderhaare	31
Keratinase	10	Pferdehaare	32

4.3 Dialyse, Zentrifugation und Gefriertrocknung

Die in den Punkten 4.2.1 – 4.2.4 beschriebenen Ansätze wurden nach der Inkubation filtriert, um die Lösung von Haarrückständen zu befreien.

Die Dialyse wurde für die Rinderhaare mit Dialyseschläuchen durchgeführt, die einen MWCO von 12-14 kDa besitzen, die Pferdehaare hingegen mit Dialyseschläuchen mit einem MWCO von 1000 Da.

Die Schläuche für die Rinderhaare wurden zunächst auf das gewünschte Endvolumen zurechtgeschnitten. Danach wurden die Schläuche 30min in einer 10mM EDTA-Lösung aufgeköcht. Der pH-Wert wurde mit 0,5 M Natriumhydroxidlösung auf 7,5 eingestellt. Zum Schluss wurden die Dialyseschläuche noch einmal 30min in Wasser abgekocht. Die Dialyseschläuche für die Pferdehaaransätze sowie die enzymatischen Rinderhaaransätze waren ohne Vorbereitung nutzbar.

Nach der Vorbereitung der Lösungen und der Dialyseschläuche wurden die Dialyseschläuche mit den Probenlösungen befüllt und in 2l-fassenden Gefäßen dialysiert. Die Dialyse wurde mehrere Tage unter täglichem Wasserwechsel durchgeführt, bis die verwendeten Chemikalien, wie Harnstoff, Thioharnstoff, 2-Mercaptoethanol, Tris-HCL, Natriumhydroxid und Peroxyessigsäure aus der Proteinlösung entfernt wurden. Dies wurde mit einer Leitfähigkeitsmessung des Dialysewassers kontrolliert.

Die Proteinlösungen der Rinderhaaransätze wurden daraufhin bei Raumtemperatur für 20min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets über zwei Tage gefriergetrocknet, um Wasserrückstände aus dem Hydrolysat zu entfernen. Die Proteinlösungen der Pferdehaaransätze wurden direkt gefriergetrocknet. Die Menge an Keratinhydrolysat wurde anschließend für alle Ansätze ausgewogen. Die genauen Auswaagen sind im Anhang in Tabelle 11 und 12 zu finden. Anschließend wurden die Hydrolysate bzw. Proteinlösungen in einer Gefriertruhe aufbewahrt.

Eine Dialyse, Zentrifugation und Gefriertrocknung wurde nicht für die enzymatischen Ansätze durchgeführt.

4.4 SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden Laufpuffer x10, Auftragspuffer x2 und die Färbelösung vorbereitet und hergestellt. Der Laufpuffer x10 bestand aus 36 g Glycin, 7,5 g Tris-HCl und 2,5 g SDS, die in 200 ml deionisierten Wasser gelöst und auf 250 ml aufgefüllt wurden. Vor der Verwendung wurde der Laufpuffer 1:10 mit deionisierten Wasser verdünnt. Für den Auftragspuffer x2 wurden 6,25 ml Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 6,8), 25 ml SDS-Lösung (10 %ig), 10ml Glycerin und 3,75 ml Bromphenolblau-Lösung gemischt. Die Färbelösung besteht aus 50ml DensiStain Blue G Färbelösung und 50ml deionisierten Wasser.

In die Gelelektrophoresekammer wurde das entsprechende SERVA Fertiggel so eingesetzt, dass die ausgeschnittene Seite der Gelkassette dem Innenraum zugewandt war. Danach wurden 700 ml des Laufpuffers hinzugegeben und der Kamm langsam und gleichmäßig aus dem Gel gezogen. Bevor die Probenlösungen in die Geltaschen pipettiert werden konnten, mussten diese in Auftragspuffer gelöst und inkubiert werden. Dabei wurden ca. 0,5 mg Probe Keratinhydrolysat in 500 µl Auftragspuffer gelöst und für 30 min bei 95 °C inkubiert. Ausnahme hierbei bildet der Rinderhaaransatz mit der PN 21. Hier wurden 0,4 mg Probe in 400 µl Auftragspuffer gelöst. Anschließend wurden je 20 µl Probe mittig in die Probetaschen aufgetragen. Links und rechts von den Proben befanden sich jeweils 5 µl eines entsprechenden Protein-Standards. Die restlichen Probetaschen wurden mit 20 µl Auftragspuffer beladen, der 1:1 mit deionisierten Wasser verdünnt wurde. Im Anschluss wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und mit der Spannungsquelle verbunden. Für ca. 15min wurde die Stromstärke auf 15 mA gestellt, bis eine gleichmäßige Pufferfront zu beobachten war. Danach wurde die Stromstärke auf 20 mA erhöht. Die Spannung betrug dabei maximal 300 V und die Leistung 10 W. Unter diesen Bedingungen betrug die Elektrophoresedauer 2-3 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Spannungsquelle abgeschaltet, das Gel aus der Kammer genommen und aus der Gelkassette entfernt. Anschließend wurde das Gel in die Färbelösung gelegt, für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und auf einem Wippschüttler bei mäßiger Umdrehungszahl geschüttelt. Abschließend wurde das Gel mind. 5x mit deionisiertem Wasser gewaschen.

4.5 Aminosäureanalyse

Für die qualitative und quantitative Analyse der Aminosäureverteilung wurden entsprechende Mengen Keratinhydrolysat aus den alkalischen und sauren Extraktionen (ca. 1mg/ml, bezogen auf Trockensubstanz) eingewogen. Die genauen Einwaagen sind in Tabelle 6 zu sehen. Die Analyse wurde nach der Arbeitsanweisung des FILK Code: FILK-AA-751.22 durchgeführt.

Tabelle 6 Einwaagen für Aminosäureanalyse

Probennummer	Rinderhaare (m in mg)	Pferdehaare (m in mg)
1	3,35	5,56
2	3,60	4,43
3	1,33	6,03
4	1,74	4,93
5	4,35	7,66
6	1,90	5,05
7	1,40	7,52
8	2,87	5,67
9	5,77	7,30
10	5,63	6,69
11	6,05	7,86
12	5,74	7,20
13	5,53	5,99
14	5,58	6,27
15	4,83	7,82
16	5,97	5,25
17	6,91	7,14
18	5,96	6,98
19	6,45	5,59
20	4,95	6,35
21	-	-
22	2,69	1,85
23	1,22	-
24	6,10	6,19

4.5.1 Herstellen der Lösungen

Natriumacetat-Puffer:

In einem 2000 ml Maßkolben wurde 400 ml sterilfiltriertes, deionisiertes Wasser fast zum Sieden gebracht. Über einen Trichter wurde langsam 1088 g Natriumacetat-Trihydrat (4 M) zugegeben. Dabei ist zu beachten, dass sich die Lösung nicht zu stark abkühlt. Im Anschluss wurde 400 ml Essigsäure hinzugegeben. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde der Maßkolben bis zur Markierung mit sterilfiltriertem, deionisiertem Wasser aufgefüllt.

Ninhydrin-Lösung:

In einer 2000 ml SCHOTT-DURAN-Flasche wurden zuerst 1400 ml Ethylenglykol und 500 ml Natriumacetat-Puffer vorgelegt. Die Lösung wurde rührend ca. 5 min mit Stickstoff begast. Danach wurden über einen Trichter 25 g Ninhydrin und 3,56 g Hydrindantin-Dihydrat sowie 199 ml Methanol in die rührende Lösung gegeben. Anschließend wurde die Ninhydrin-Lösung weiter für ca. 5 min mit Stickstoff begast. Zum Schluss wurde die Flasche verschlossen und die Lösung über Nacht gerührt.

4.5.2 Probenvorbereitung

Die Proben wurden mit 1000 µl 6 M Salzsäure und ca. 1-2 µl 2-Mercaptoethanol in einem 2,0 ml Schraubdeckelaufschlussgefäß bei 110 °C für 20h im Heizblock erhitzt und anschließend in der Vakuumzentrifuge bei 60 °C getrocknet.

4.5.3 Chromatografie

Die Probenpellets wurden in Lithiumcitrat-Puffer pH 2,2 gelöst und über einen Spritzenvorsatzfilter 0,2 µm filtriert. Das Injektionsvolumen betrug 30 µl. In Tabelle ist das verwendete Trennprogramm zu sehen.

Analysensequenz:

Tabelle 7 Trennprogramm für die chromatografische Aminosäureanalyse

Schritt	Zeit in min	Temperatur in °C	Lithium-citrat pH-Wert	Flussrate in ml/h
1	26	37	3,00	25
2	9	48	3,15	25
3	15	58	3,15	25
4	13	58	3,50	25

5	10	58	3,55	25
6	27	90	3,55	25
7	6	90	3,55	25
8	4	90	2,80	25
9	16	70	2,80	33
10	11	37	2,80	27
11	3	37	2,80	25
12	3	37	3,00	25

Die Nachsäulenderivatisierung erfolgte mit Ninhydrin bei 135 °C.

4.5.4 Auswertung

Primäre Aminosäuren wurden bei 570 nm, sekundäre Aminosäuren bei 440 nm, detektiert und ausgewertet. Die externe Kalibrierung erfolgte mit Hilfe einer Aminosäurestandardlösung.

4.6 Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz

Für die Bestimmung von freien Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz wurde die Arbeitssanleitung von Thermo Fisher Scientific verwendet.

Herstellen des Reaktionspuffers:

In einem 250 ml Maßkolben wurde 0,1 M Natriumphosphatpuffer mit 1 mM EDTA in destillierten Wasser gelöst, anschließend der pH-Wert mit Salzsäure auf 8,0 eingestellt und mit destillierten Wasser bis zur Markierung aufgefüllt.

Herstellen der Kalibriergerade:

Als Standard wurde eine 3 mM Cysteinlösung in einem 10 ml Maßkolben hergestellt und auf sechs unterschiedliche Konzentration, 0,2 mM, 0,4 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM verdünnt.

Herstellen der Ellman's Reagenz Lösung:

Für die Ellman's Reagenz Lösung wurden 4 mg Ellman's Reagenz in 1 ml Reaktionspuffer gelöst.

Herstellen der Probenlösungen:

Die verwendeten Probenlösungen wurden unverdünnt oder zum Teil mit Natriumphosphatpuffer und 6 M Harnstoff verdünnt. Letztere sind in Tabelle 10 im

Unterpunkt 5.4 als solche gekennzeichnet. Ausnahme bei den Proben bildeten die Ansätze aus der sauren Extraktion mit Salzsäure und Peroxyessigsäure, die vorerst mit NaOH auf einen neutralen pH-Wert eingestellt wurden. Außerdem wurde eine 0,2 mM Cystein- und eine 3mM Homocysteinlösung hergestellt und als Probelösung mit im Test verwendet.

Zur Herstellung der Messlösung wurde jeweils 20 μ l Ellman's Reagenz, 1 ml Reaktionspuffer und jeweils 100 μ l Kalibrier-, Probe- oder Cystein- und Homocysteinlösung in einen Test-Tube pipettiert und gevortext.

Auswertung:

Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem UV-Visible Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm.

5 Ergebnisse

5.1 Ausbeute an Keratinhydrolysat

5.1.1 Keratinausbeute mittels Shindai-Solution

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat für Rinder- und Pferdehaare nach Extraktion mittels Shindai Solution ohne Thioharnstoff ist in nachfolgenden Abbildungen zu sehen.

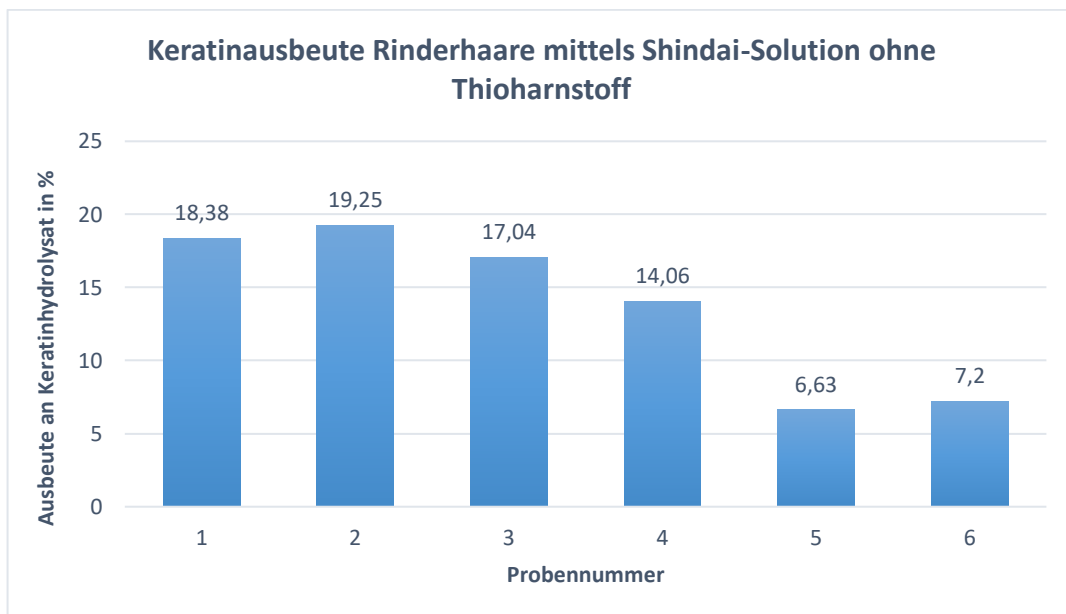


Abbildung 10 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff

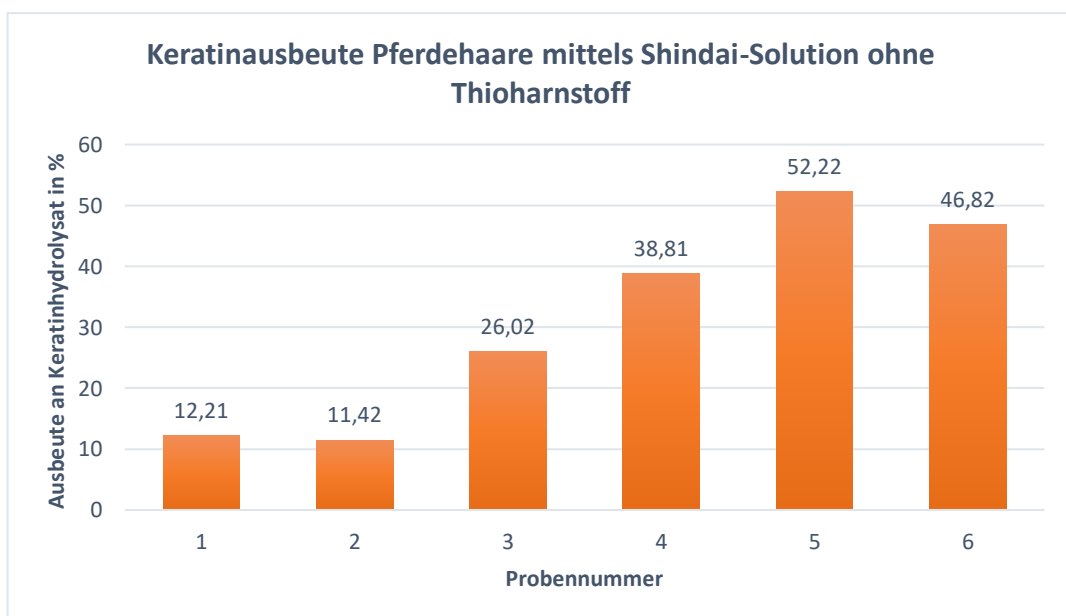


Abbildung 11 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff

Die höchste Ausbeute an Keratinhydrolysat bei Rinderhaaren konnte mit PN 2 erreicht werden. Die dabei an Hydrolysat gewonnene Menge bezogen auf die Masse an Ausgangsmaterial betrug 19,3 %. Auch die Proben 1 und 3 lagen mit 18,4 % und 17,0 % in einem ähnlichen Größenbereich. Bei einer Temperaturerhöhung von 20 °C konnte bei den Proben 4, 5 und 6 deutlich weniger Hydrolysat gewonnen werden. Die Ausbeute an Keratinhydrolysat bei Pferdehaaren ist deutlich höher als die Ausbeuten der Rinderhaare. PN 5 erzielte die höchste Ausbeute aller Ansätze ohne Thioharnstoff mit 52,2 %. Die Proben 1, 2 und 3 zeigten hingegen eine ähnliche Ausbeute wie die Ansätze der Rinderhaare

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat für Rinder- und Pferdehaare nach Extraktion mittels Shindai Solution mit Thioharnstoff ist in den beiden nächsten Abbildungen dargestellt.

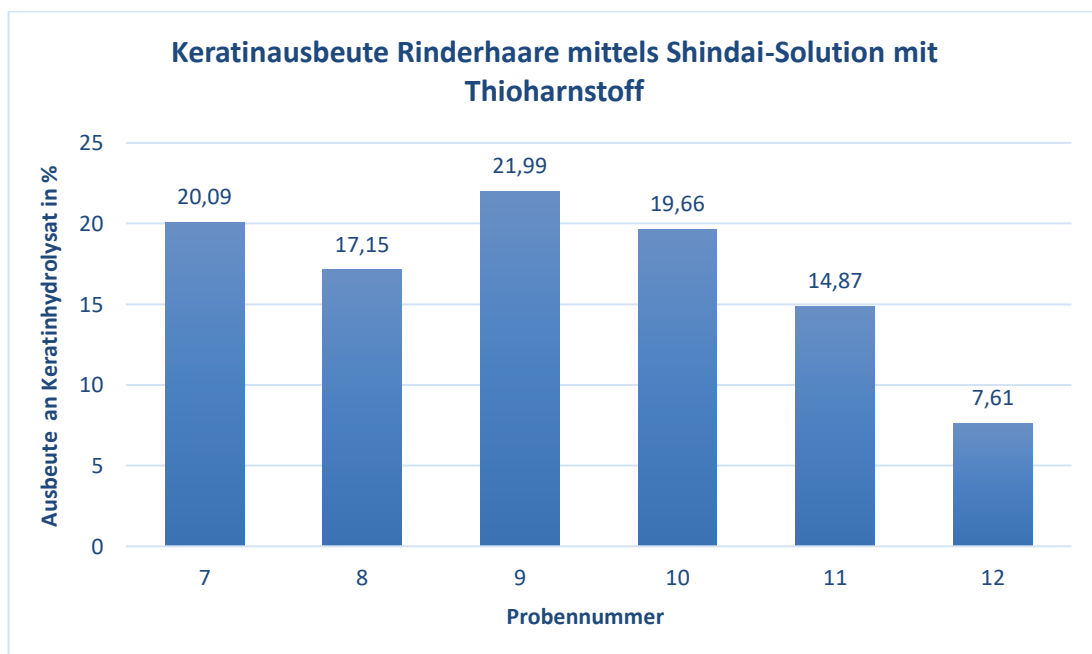


Abbildung 12 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff

Bei der Verwendung der Shindai-Solution mit Thioharnstoff bei Rinderhaaren konnte die höchste Ausbeute bei PN 9 mit 22,0 % Hydrolysat erreicht werden. Alle anderen Werte außer PN 12 befinden sich in einer ähnlichen Größenordnung. Die geringste Ausbeute bei Pferdehaaren hingegen liegt bei 34,5 %, welche viel größer ist als bei Rinderhaaren. Hier konnte bei PN 11 auch die größte Ausbeute aller Extraktionsansätze mit 61,8 % erreicht werden. Insgesamt ist zu erkennen, dass eine lange Inkubationsdauer und höhere Temperatur zu kleineren Fragmenten führt. Dies ist an den

sinkenden Ausbeuten der Rinderhaaransätze zu erkennen, da kleine Keratinfragmente bei der Dialyse unter den MWCO der verwendeten Dialyseschläuche liegen.

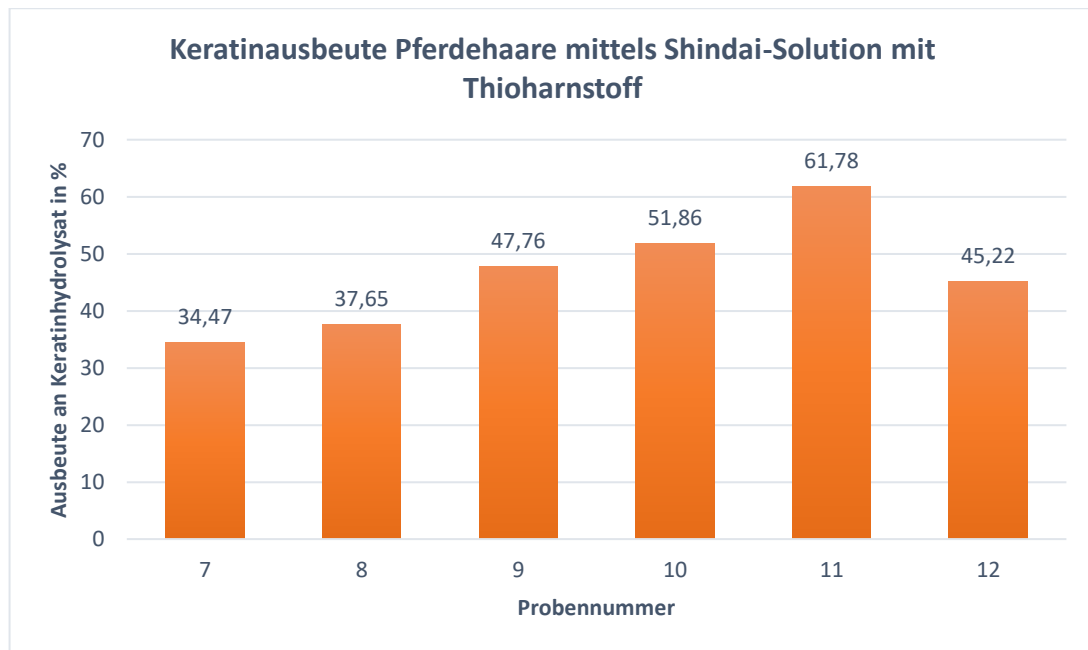


Abbildung 13 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff

5.1.2 Keratinausbeute mittels Natriumhydroxid

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat für Rinder- und Pferdehaare nach Extraktion mittels NaOH ist in den nachfolgenden Diagrammen veranschaulicht.

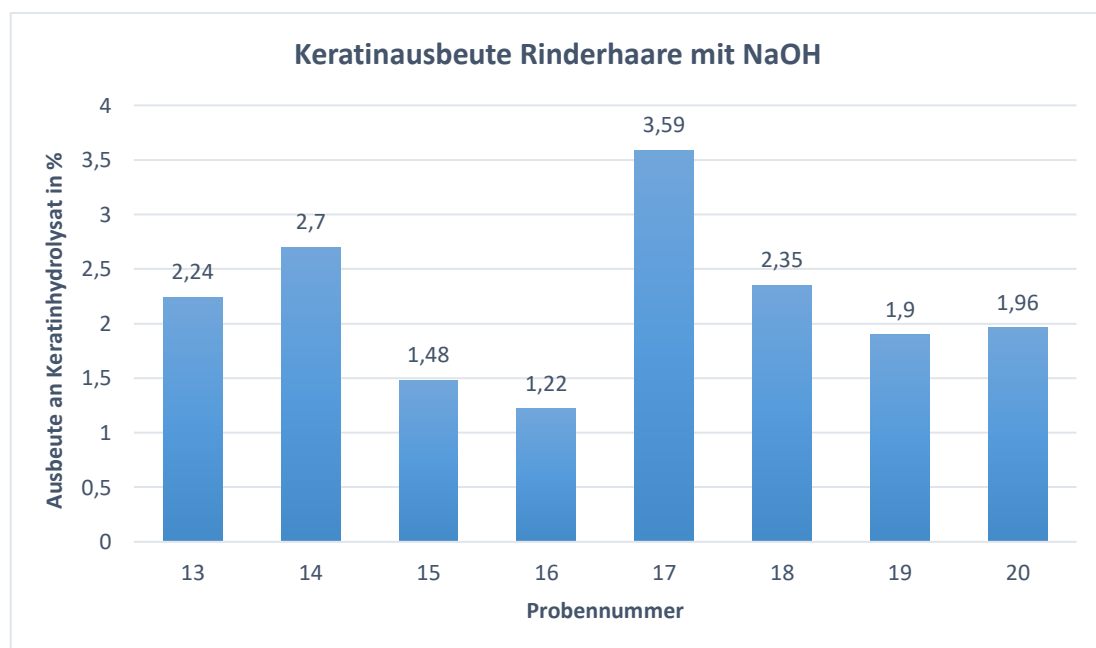


Abbildung 14 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit NaOH

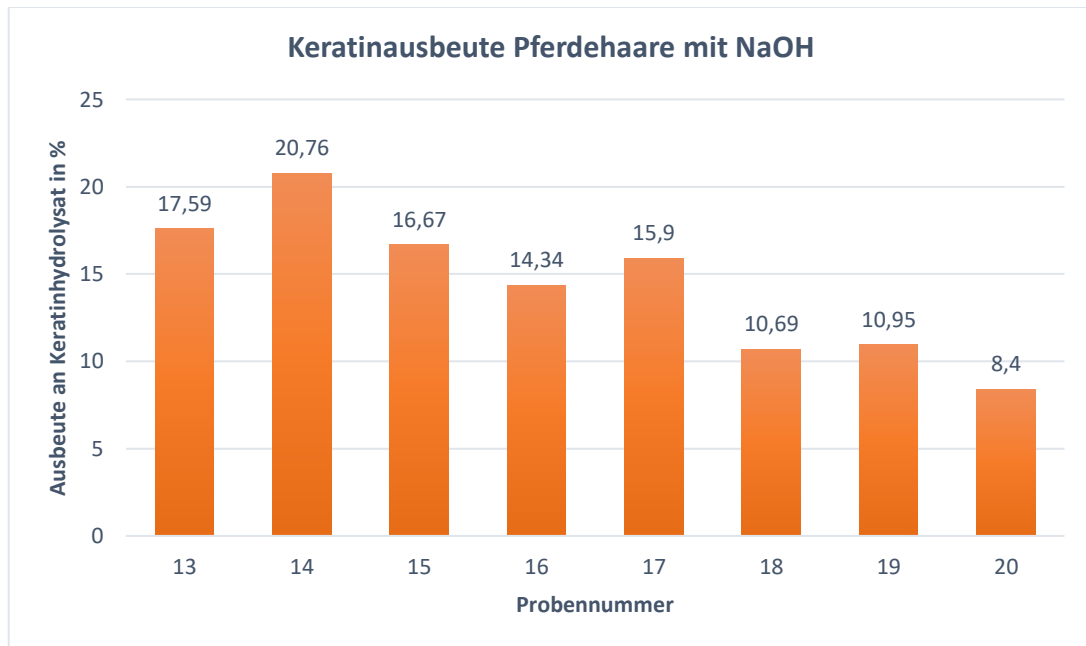


Abbildung 15 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit NaOH

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat erreicht bei Rinderhaaren maximal 3,6 % (PN 17) und minimal 1,2 % (PN 16). Im Gegensatz zu den Rinderansätzen besitzt die Extraktion mit Pferdehaaren deutlich höhere Ausbeuten. Minimal sind hier 8,4 % Ausbeute zu verzeichnen. Maximal konnten sogar 20,8 % Keratinhydrolysat (PN 14) extrahiert werden.

5.1.3 Keratinausbeute mittel Peroxyessigsäure

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat für Rinder- und Pferdehaare nach Extraktion mittels Peroxyessigsäure ist in den beiden folgenden Diagrammen zu sehen.

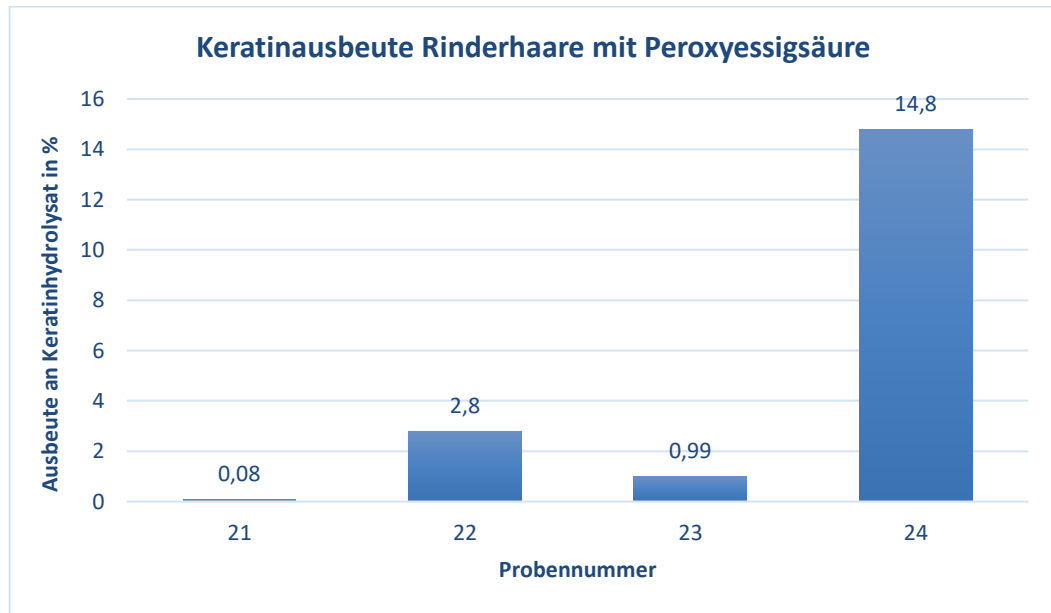


Abbildung 16 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare mit Peroxyessigsäure

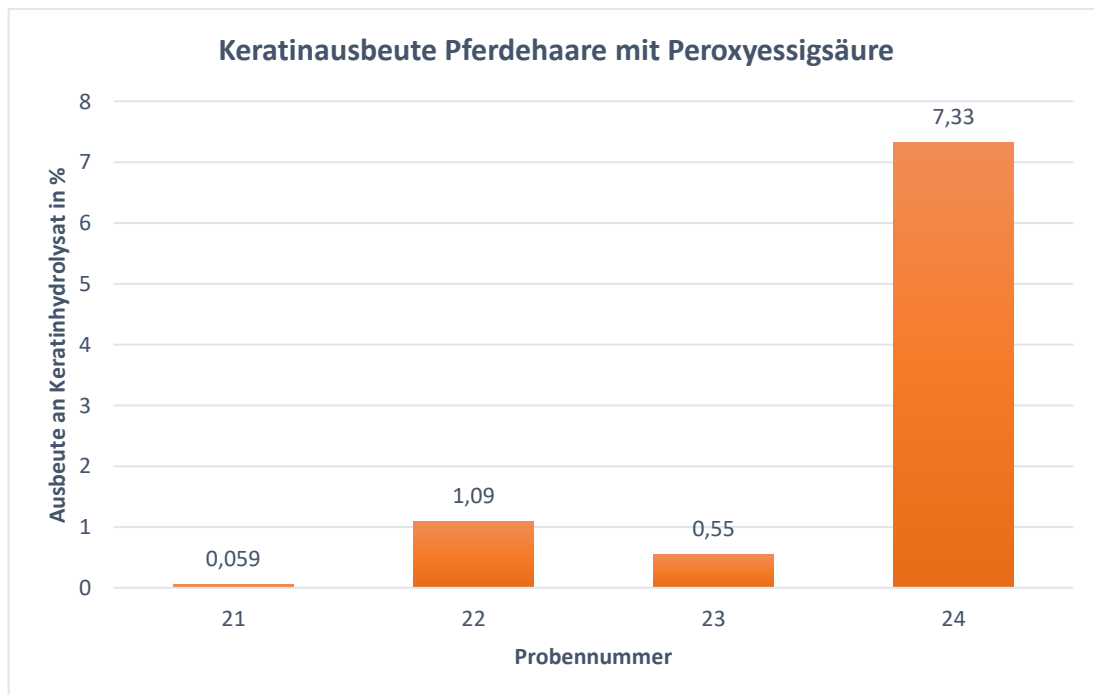


Abbildung 17 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare mit Peroxyessigsäure

Die Ausbeuten an Keratinhydrolysat bei Rinder- und Pferdehaaren nach der sauren Extraktionsmethode mit Peroxyessigsäure sind sehr ähnlich ausgefallen. PN 21 und 23 zeigten jeweils die geringsten Ausbeuten mit unter 1 % bezogen auf die Einwaage an Ausgangsmaterial. PN 24 besitzt jeweils die höchste Ausbeute mit 14,8 % (Rinderhaare) und 7,3 % (Pferdehaare).

In den nachfolgenden Diagrammen 18 und 19 sind alle Ausbeuten an Keratinhydrolysat für Rinder- und Pferdehaare zusammenfassend dargestellt.

5.1.4 Überblick der Ausbeuten an Keratinhydrolysat

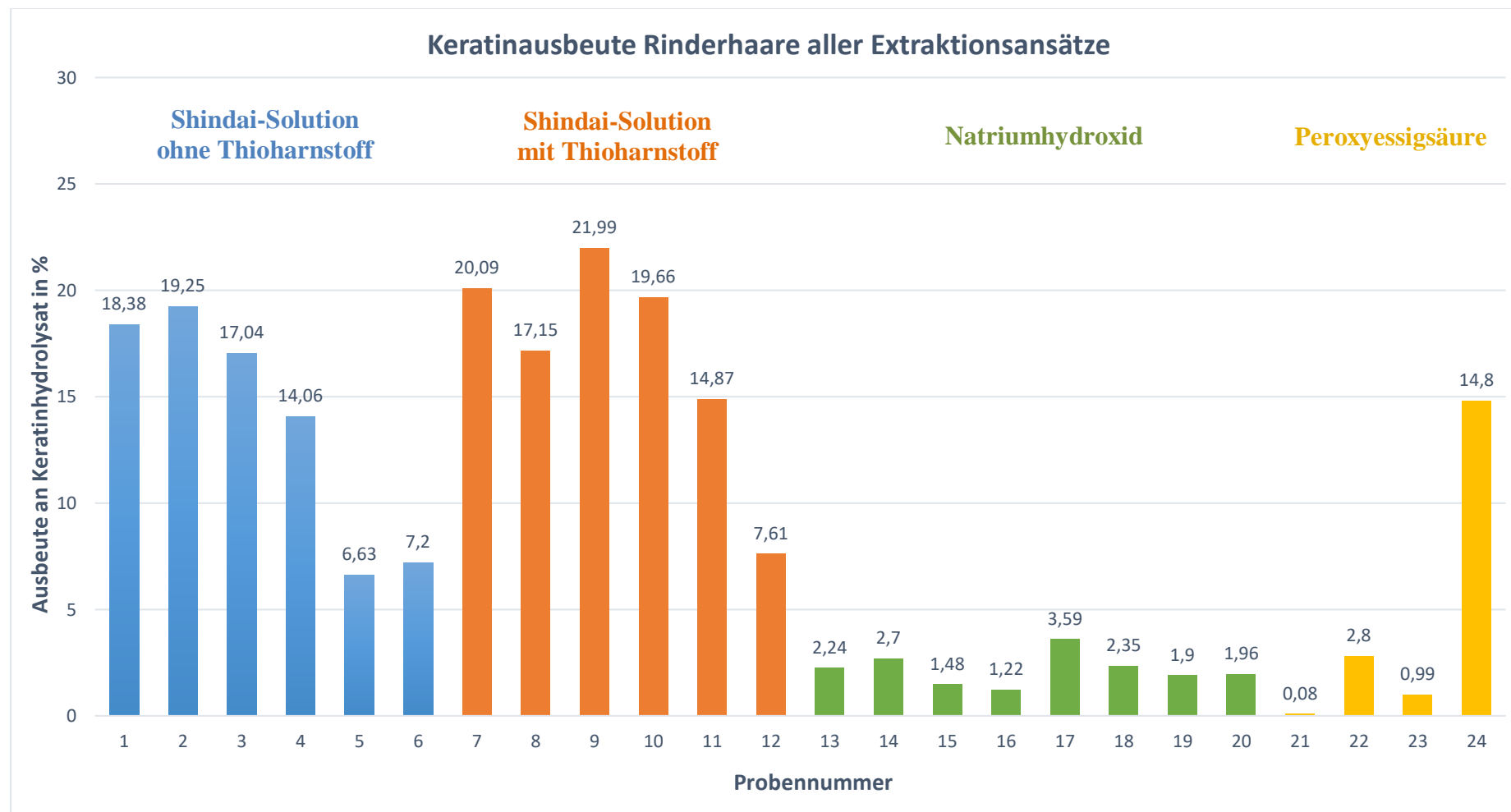


Abbildung 18 Ausbeute Keratinhydrolysat - Rinderhaare alle Extraktionsansätze

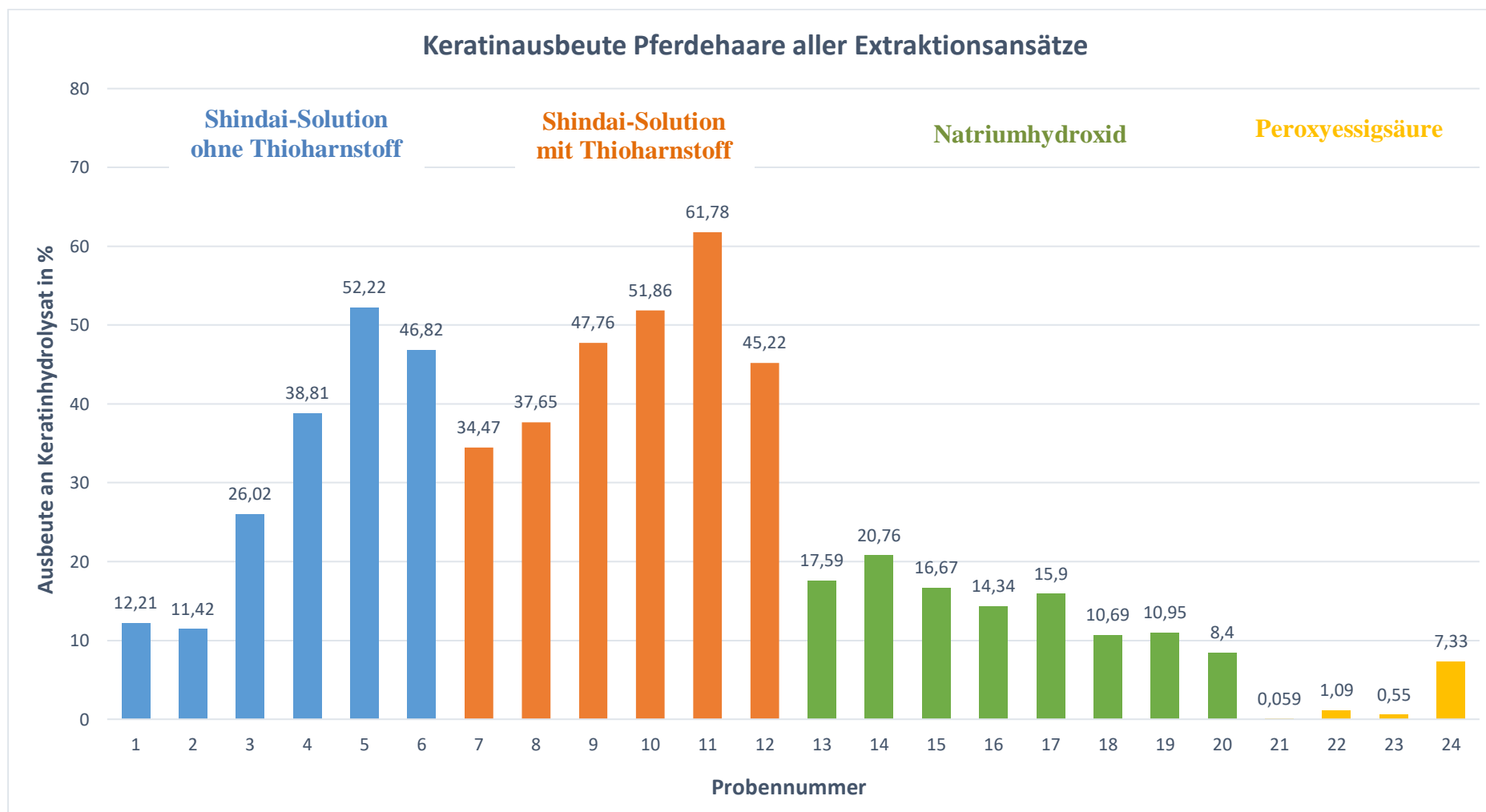


Abbildung 19 Ausbeute Keratinhydrolysat - Pferdehaare alle Extraktionsansätze

5.2 Elektrophoretische Charakterisierung der Keratinhydrolysate

Die elektrophoretische Charakterisierung wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE durchgeführt. In den folgenden Abbildungen sind auf den äußersten Spuren Proteinstandards aufgetragen. Zwischen den Standards befinden sich die aufgetragenen Proben, die mit den jeweiligen Probennummern gekennzeichnet sind.

5.2.1 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Shindai-Solution gewonnenen Keratinhydrolysate

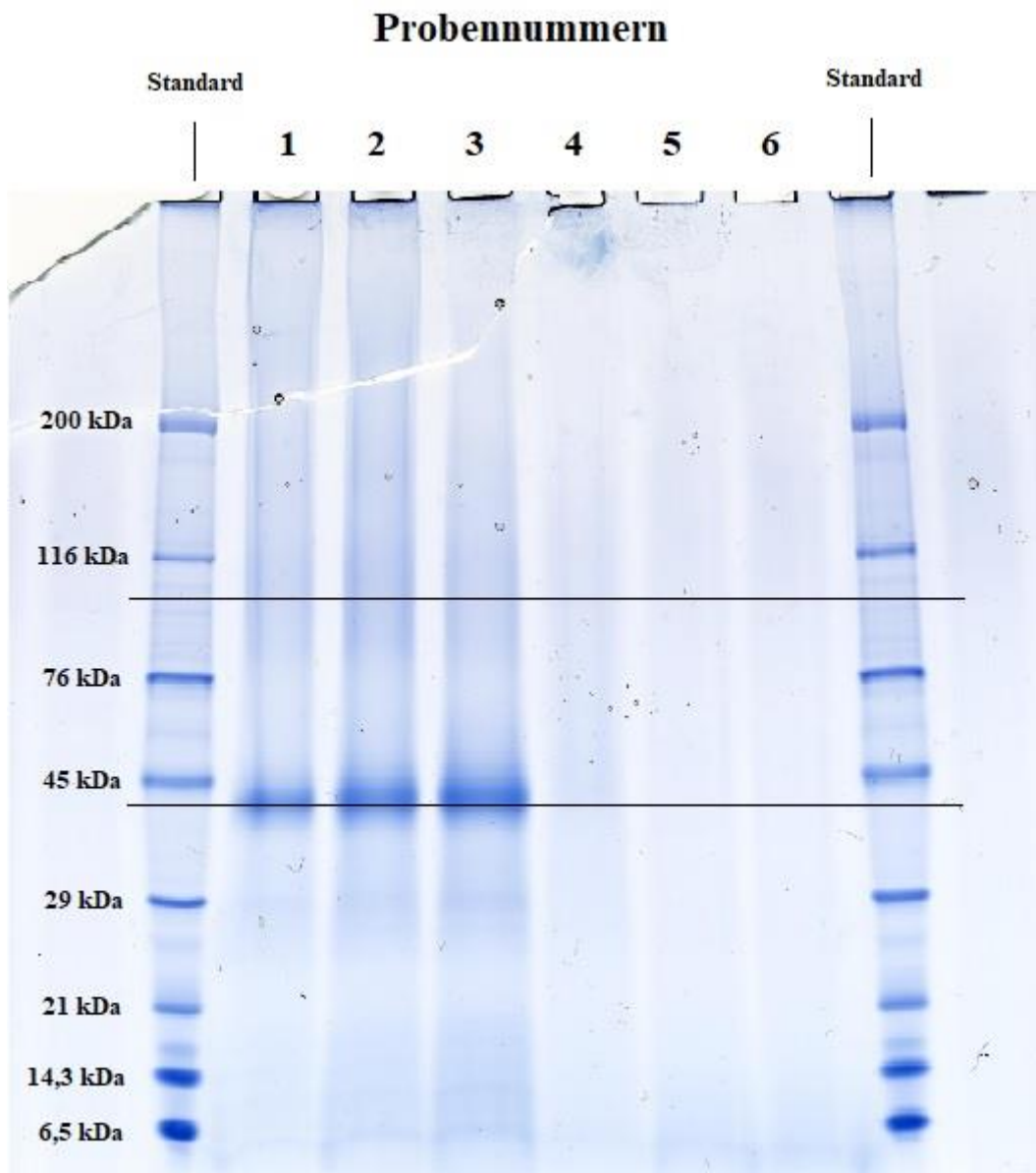


Abbildung 20 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff

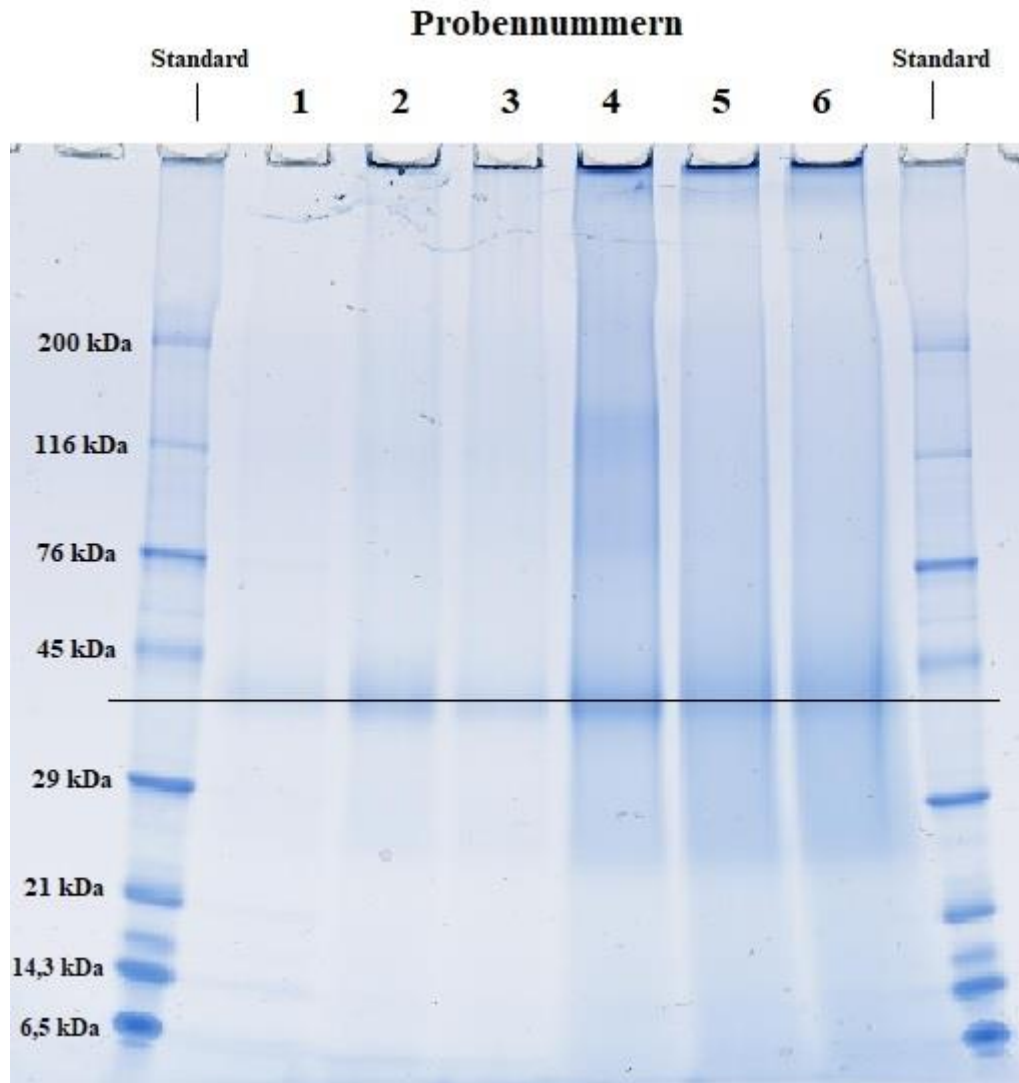


Abbildung 21 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution ohne Thioharnstoff

In Abbildung 20 sind deutlich Banden bei den Proben 1, 2 und 3 zu erkennen. Diese befinden sich in einem Bereich zwischen 40-45 kDa. Auch im Bereich zwischen 100-110 kDa sind ganz schwach Banden zu erkennen. In Abbildung 21 hingegen sind bei allen Proben Banden im Bereich zwischen 40-45 kDa vorhanden. Außerdem sind bei den Proben 4-6 stärkere Färbungen zu verzeichnen.

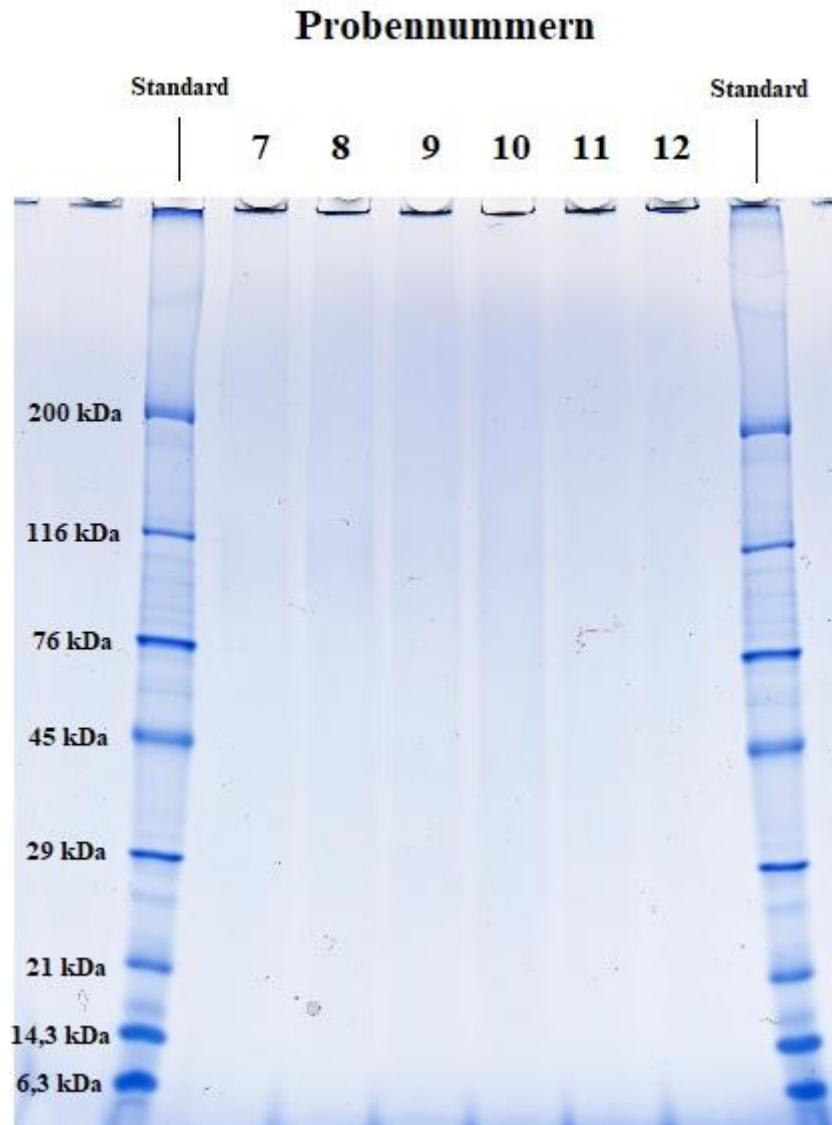


Abbildung 22 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff

In Abbildung 22 sind keine Banden zu verzeichnen. Abbildung 23 hingegen zeigt bei allen Proben eine Bande zwischen 40-45 kDa. Ebenfalls sind leichte Blaufärbungen unter 40 kDa und über 45 kDa zu beobachten. Auch im Bereich von 100-116 kDa sind bei den Proben 8, 9 und 10 Banden mit einer intensiveren Färbung zu erkennen. In Spur 7 konnte die Probe vermutlich nicht ordnungsgemäß durch das Gel wandern, wodurch eine sehr starke Blaufärbung im Bereich um die Proben tasche zu verzeichnen ist.

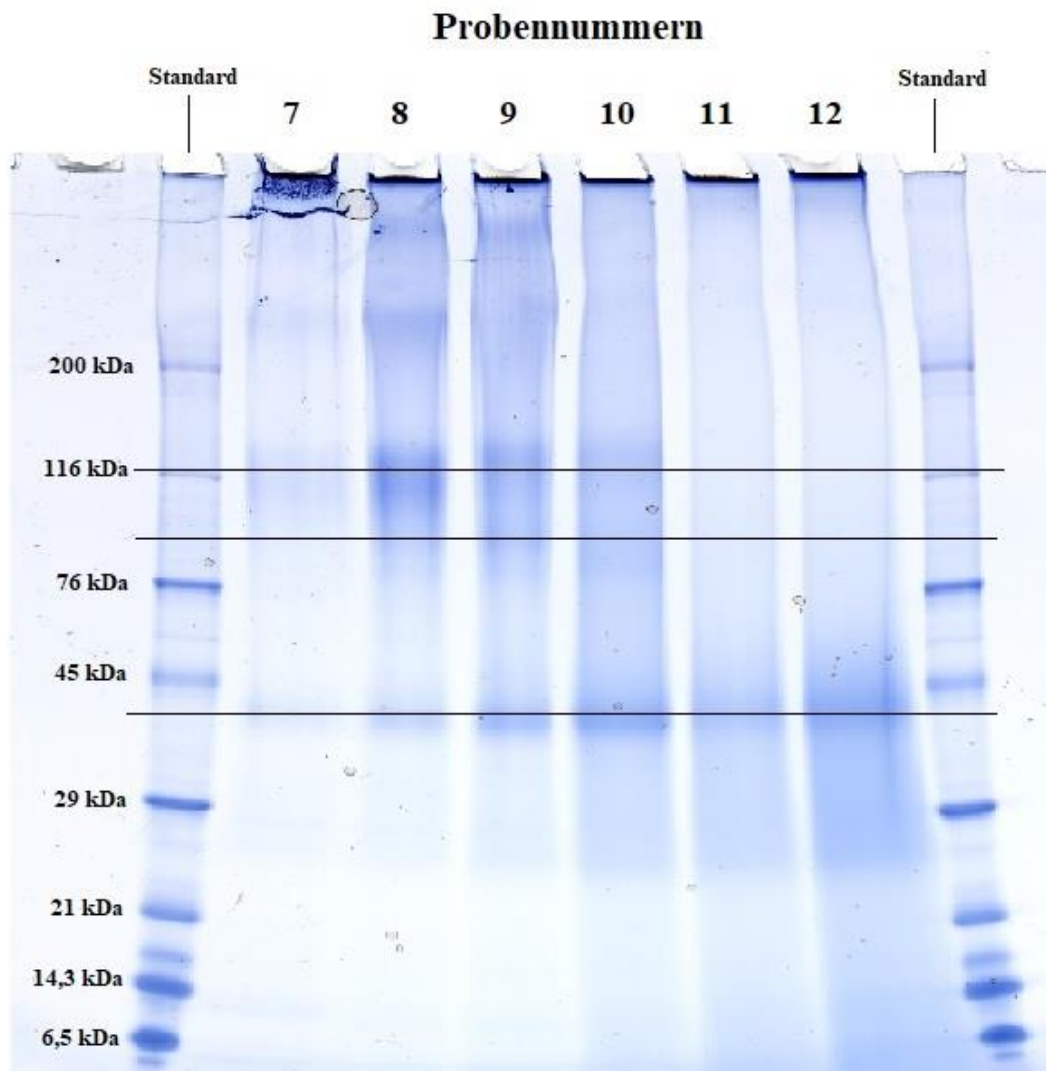


Abbildung 23 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Shindai-Solution mit Thioharnstoff

5.2.2 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Natriumhydroxid gewonnenen Keratinhydrolysate

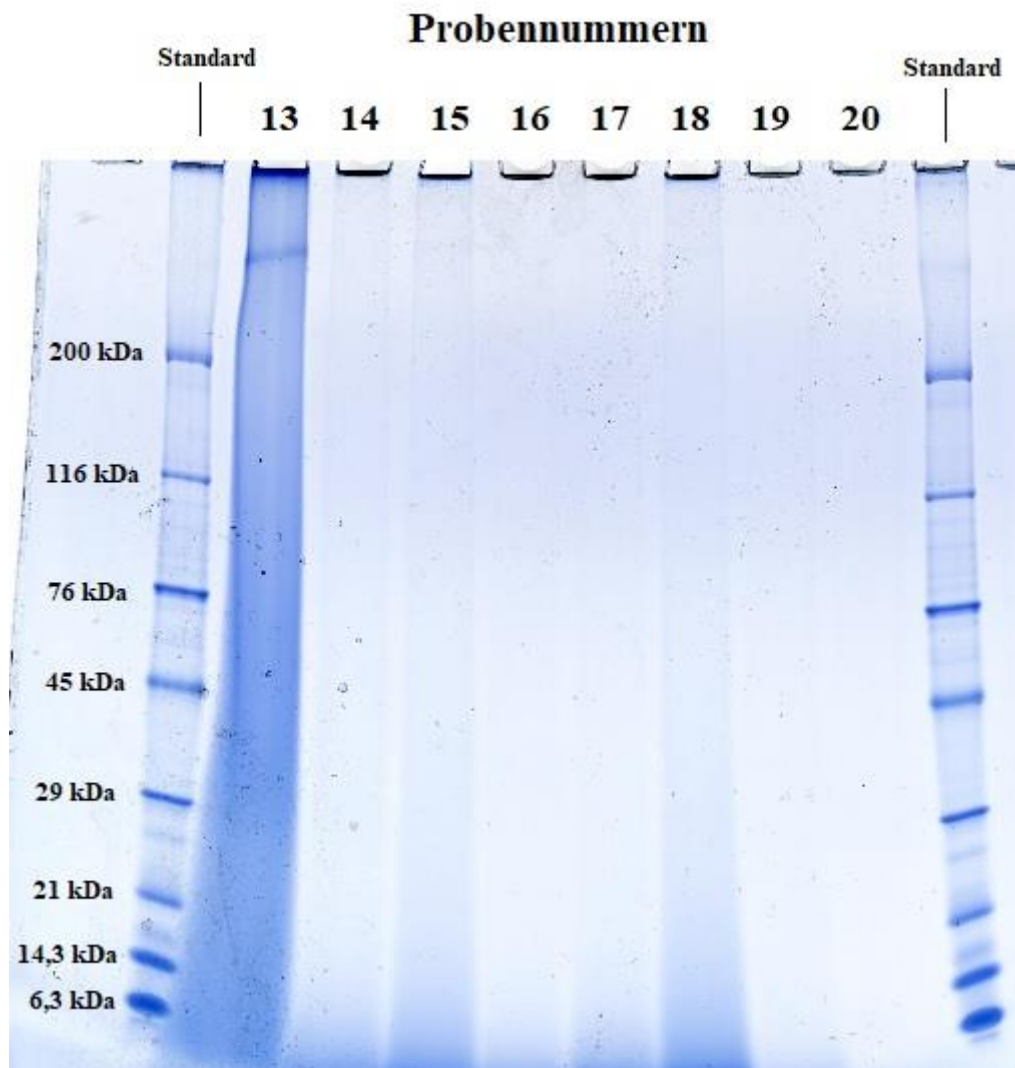


Abbildung 24 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Natriumhydroxid

In Abbildung 24 ist in der Spur mit Probe 13 eine intensive Blaufärbung über die ganze Spur zu sehen. In den Spuren der Proben 14-18 sind leichte Blaufärbungen im Bereich unter 14,3 kDa zu beobachten. In Abbildung 25 ist ein ähnliches Ergebnis zu verzeichnen. Auch hier ist bei Probe 13 eine Färbung der kompletten Spur zu erkennen. Alle anderen Probenspuren besitzen Banden im Bereich unter 29 kDa.

5.2.3 Elektrophoretische Charakterisierung der mit Peroxyessigsäure gewonnenen Keratinhydrolysate

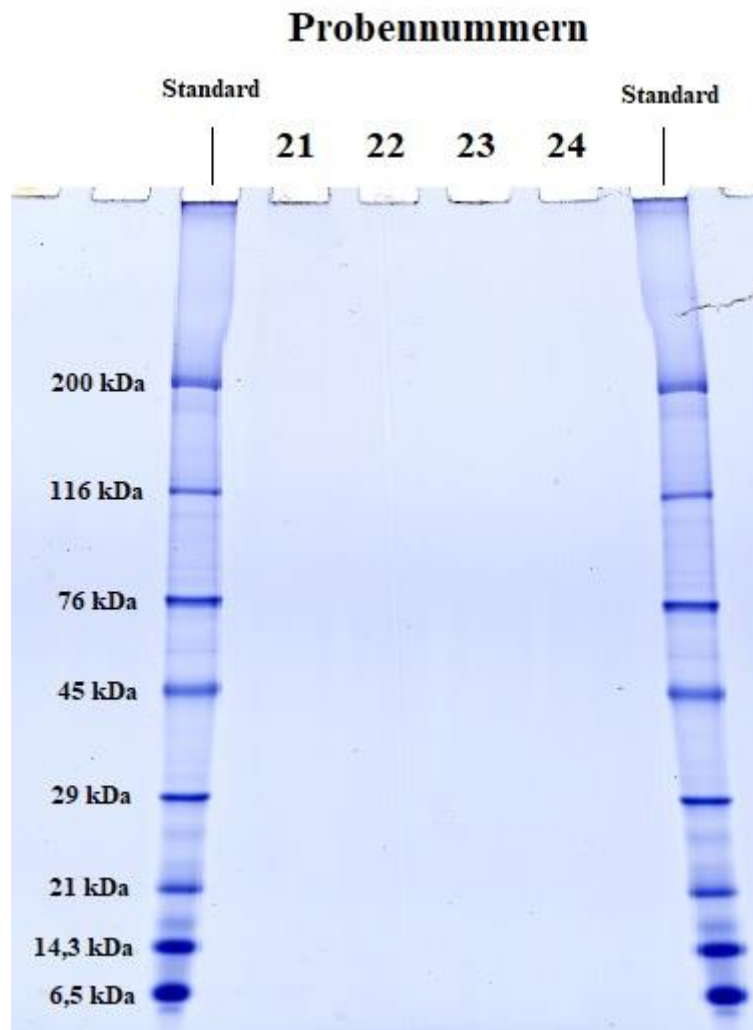


Abbildung 26 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren aus der Extraktion mit Peroxyessigsäure

Bei der gelelektrophoretischen Charakterisierung der Keratinhydrolyysate aus der Extraktion mit Peroxyessigsäure konnten keine Banden beobachtet werden (Abbildung 26 und 27). Die schwachen Banden auf Spur 21 in Abbildung 27 sind vermutlich auf Verunreinigungen der Probe mit dem Proteinstandard zurückzuführen.

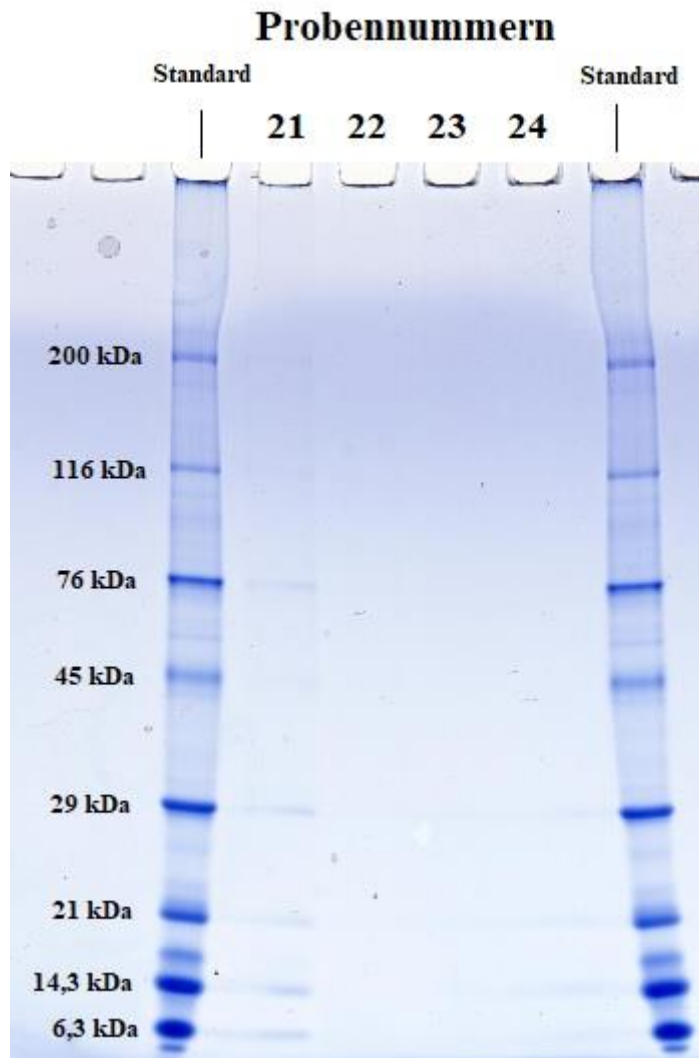


Abbildung 27 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Pferdehaaren aus der Extraktion mit Peroxyessigsäure

5.2.4 Elektrophoretische Charakterisierung der nach enzymatischer Hydrolyse gewonnenen Keratinhydrolysate

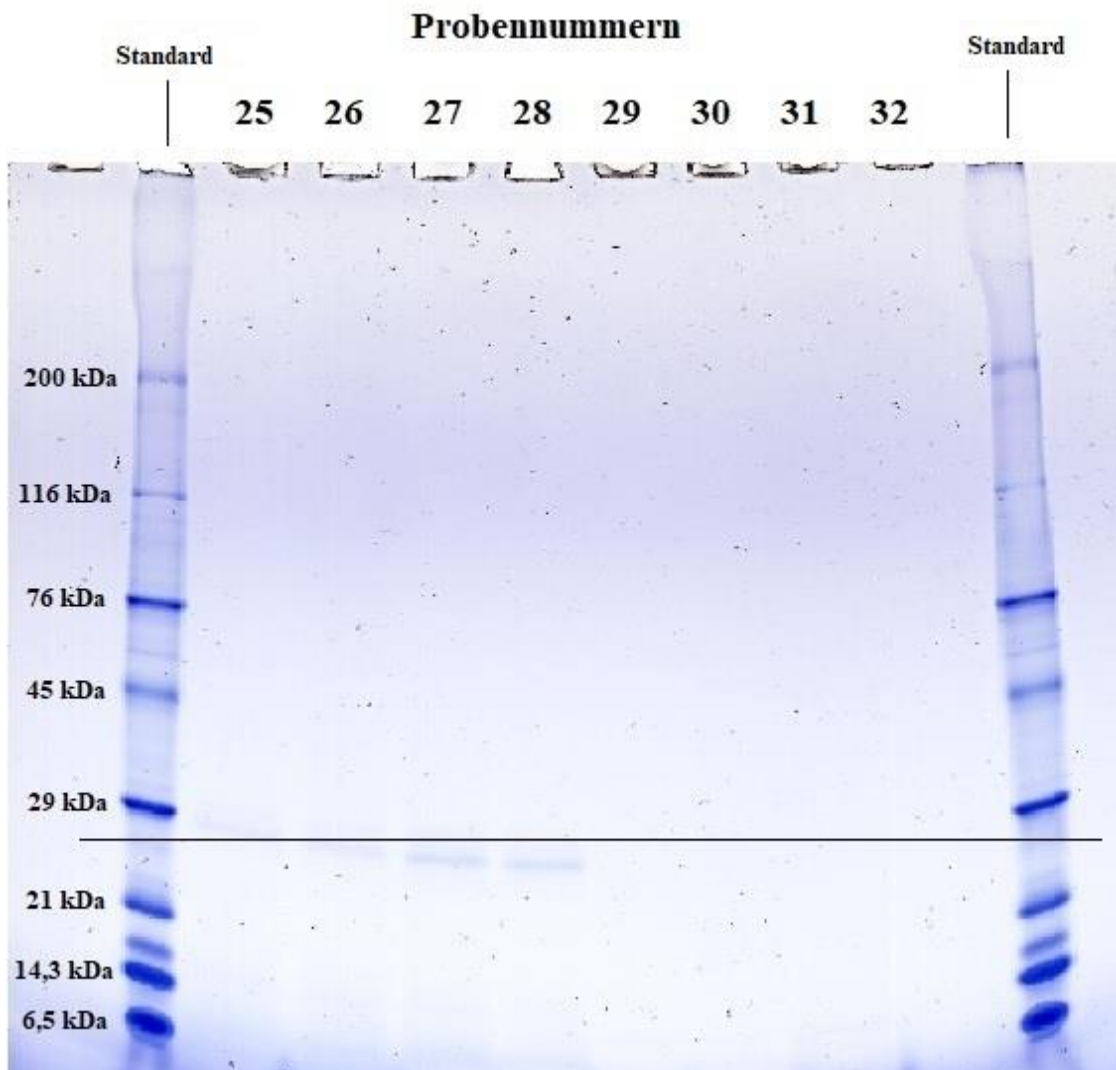


Abbildung 28 Gelelektrophoretische Trennung der Keratinhydrolysate von Rinder- und Pferdehaaren aus der Extraktion mit Proteinase K und Keratinase

In Abbildung 28 sind auf den Spuren 25-28 ganz schwach Banden in der Größenordnung von ca. 28 kDa zu erkennen. Dies entspricht der molekularen Größe der verwendeten Proteinase K und stellt somit keine Keratinbande dar. Ansonsten sind keine weiteren Banden zu beobachten.

5.3 Aminosäurenanalyse

Aminosäuren, die im Falle von Keratinhydrolysat besonders von Interesse sind belaufen sich auf Cystein, Cystin, Lanthionin, Arginin und Ornithin. Die Gehalte dieser Aminosäuren nach der Extraktion des Keratins sind in den beiden nachfolgenden Tabelle 8 und 9 veranschaulicht. Die komplette Aminosäurezusammensetzung aller extrahierten Keratinhydrolysate befinden sich im Anhang (Tabelle 12-15).

Tabelle 8 Gehalte wichtiger Aminosäuren der Rinderhaar-Extraktionsansätze

	Cystein in (%)	Cystin in (%)	Lanthionin in (%)	Arginin in (%)	Ornithin in (%)
PN 1	0	15,5	0,4	9,4	0,2
PN 2	0	15,1	0,5	9,7	0,2
PN 3	0	15,1	0,6	9,7	0,3
PN 4	0	11,6	1,3	10,8	0,3
PN 5	0	8,0	1,4	11,8	0,3
PN 6	0	7,7	1,4	11,8	0,3
PN 7	0	14,6	0,4	9,7	0,2
PN 8	0	15,0	0,5	10,0	0,2
PN 9	0	14,8	0,5	10,0	0,3
PN 10	0	12,5	1,0	10,6	0,2
PN 11	0	9,1	1,3	11,2	0,3
PN 12	0	8,3	1,3	11,5	0,3
PN 13	0	1,6	2,7	10,1	0,4
PN 14	0	0,3	2,9	14,9	1,3
PN 15	0	0,6	1,0	15,7	3,2
PN 16	0	0,8	2,3	16,0	2,0
PN 17	0	0,7	5,4	12,1	2,7
PN 18	0	0,5	0,9	11,4	3,9
PN 19	0	0,7	1,2	7,4	7,5
PN 20	0	0,4	0	3,2	8,2
PN 21	-	-	-	-	-
PN 22	0	0	0	10,1	0,4

PN 23	0	0	0	9,1	0,5
PN 24	0	0	0	11,2	0,3

Tabelle 9 Verteilung wichtiger Aminosäuren der Pferdehaar-Extraktionsansätze

	Cystein in (%)	Cystin in (%)	Lanthionin in (%)	Arginin in (%)	Ornithin in (%)
PN 1	0	16,4	0,4	10,1	0,3
PN 2	0	15,3	0,5	10,0	0,2
PN 3	0	15,0	0,5	10,2	0,3
PN 4	0	9,9	0,7	10,5	0,4
PN 5	0	6,9	0,9	10,6	0,4
PN 6	0	6,3	0,8	10,3	0,4
PN 7	0	11,3	0,3	10,3	0,3
PN 8	0	10,9	0,3	10,4	0,3
PN 9	0	10,0	0,4	10,4	0,3
PN 10	0	8,8	0,6	10,6	0,3
PN 11	0	6,4	0,8	10,7	0,3
PN 12	0	6,5	0,8	10,7	0,4
PN 13	0	2,3	4,4	9,5	0,4
PN 14	0	2,2	2,7	8,6	0,6
PN 15	0	2,1	2,0	7,5	1,5
PN 16	0	1,8	1,2	7,2	1,6
PN 17	0	2,0	2,2	7,4	1,6
PN 18	0	1,3	0,8	5,5	2,4
PN 19	0	1,1	1,0	2,0	4,9
PN 20	0	0,8	0,5	1,6	4,8
PN 21	-	-	-	-	-
PN 22	0	0	0	11,4	0,3
PN 23	-	-	-	-	-
PN 24	0	0	0	12,0	0,3

In beiden Tabellen ist auffällig, dass keine freien Cysteinreste gefunden wurden. Die Proben 21-24 enthalten außerdem kein Cystin bzw. Lanthionin. Bei der Behandlung mit

NaOH wird mehr Lanthionin und Ornithin gebildet als bei der Shindai-Methode. Die Bildung von Ornithin ist bei der sauren Extraktion sehr gering. Aus den Tabellen wird ersichtlich, dass bei der Extraktion mit Natriumhydroxid nur sehr wenig Cystin im Gegensatz zu der Extraktion mit Shindai gebildet wurde. Trotzdem besitzen die Natriumhydroxidansätze mehr Lanthionin als bei der Extraktion nach Shindai.

Nachfolgend ist für jede basische und saure Extraktionsmethode der Rinderhaaransätze ein Chromatogramm in den Abbildungen 29-32 dargestellt. Zu erkennen sind die Peaks der einzelnen Aminosäuren nach unterschiedlichen Retentionszeiten. Dabei ist der Peak für Cystin nach 56 min, der Peak für Lanthionin nach 48 min und der Peak für Ornithin nach 89 min bzw. der Peak für Arginin nach 107 min zu sehen. Bei der Extraktion mit Peroxyessigsäure ist direkt nach einer Retentionszeit von 4 min ein großer Peak zu vernehmen. Dies könnte an der Bildung eines Sulfonsäurederivats bei der sauren Extraktion liegen.

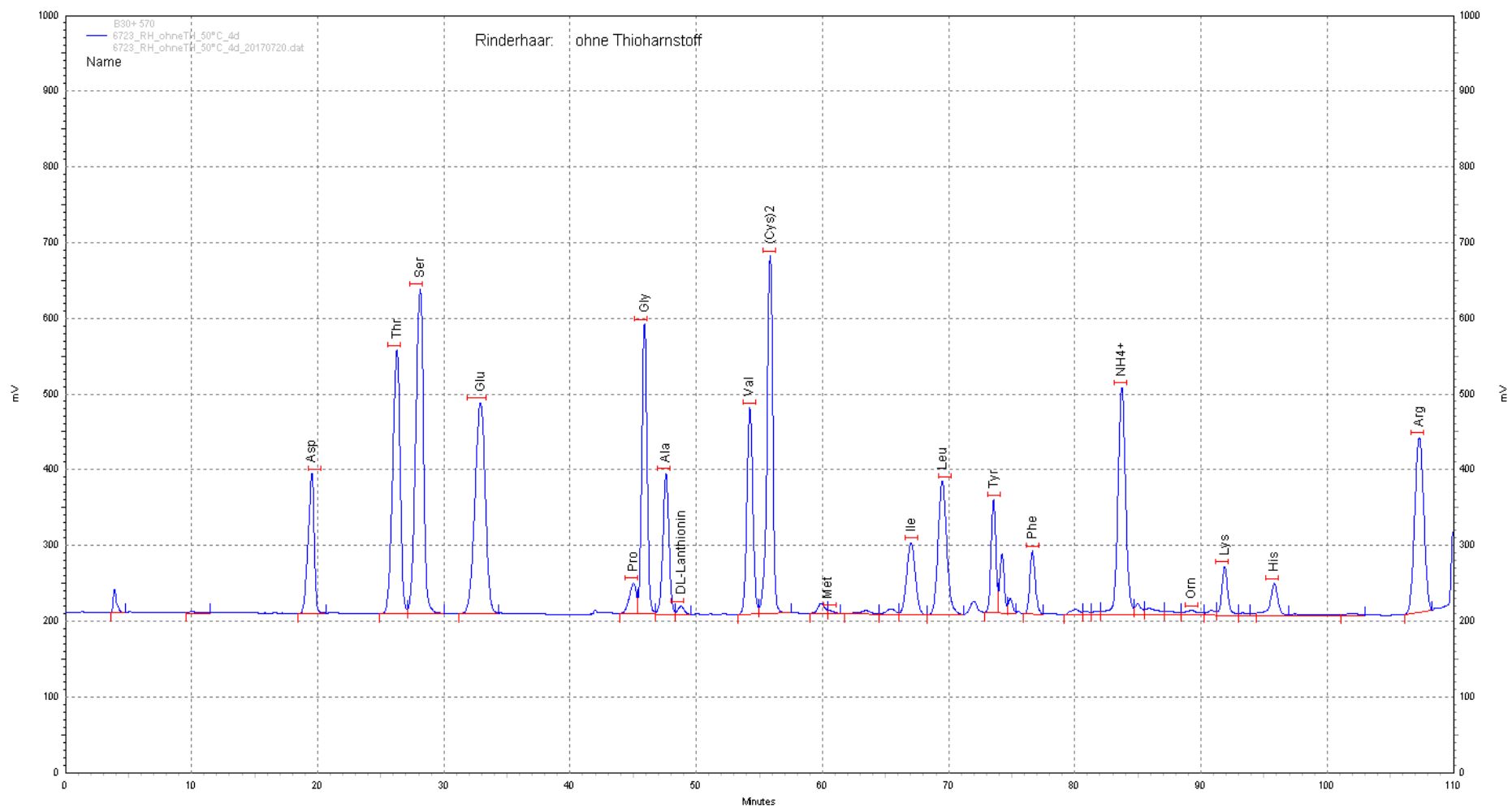


Abbildung 29 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren ohne Thioharnstoff

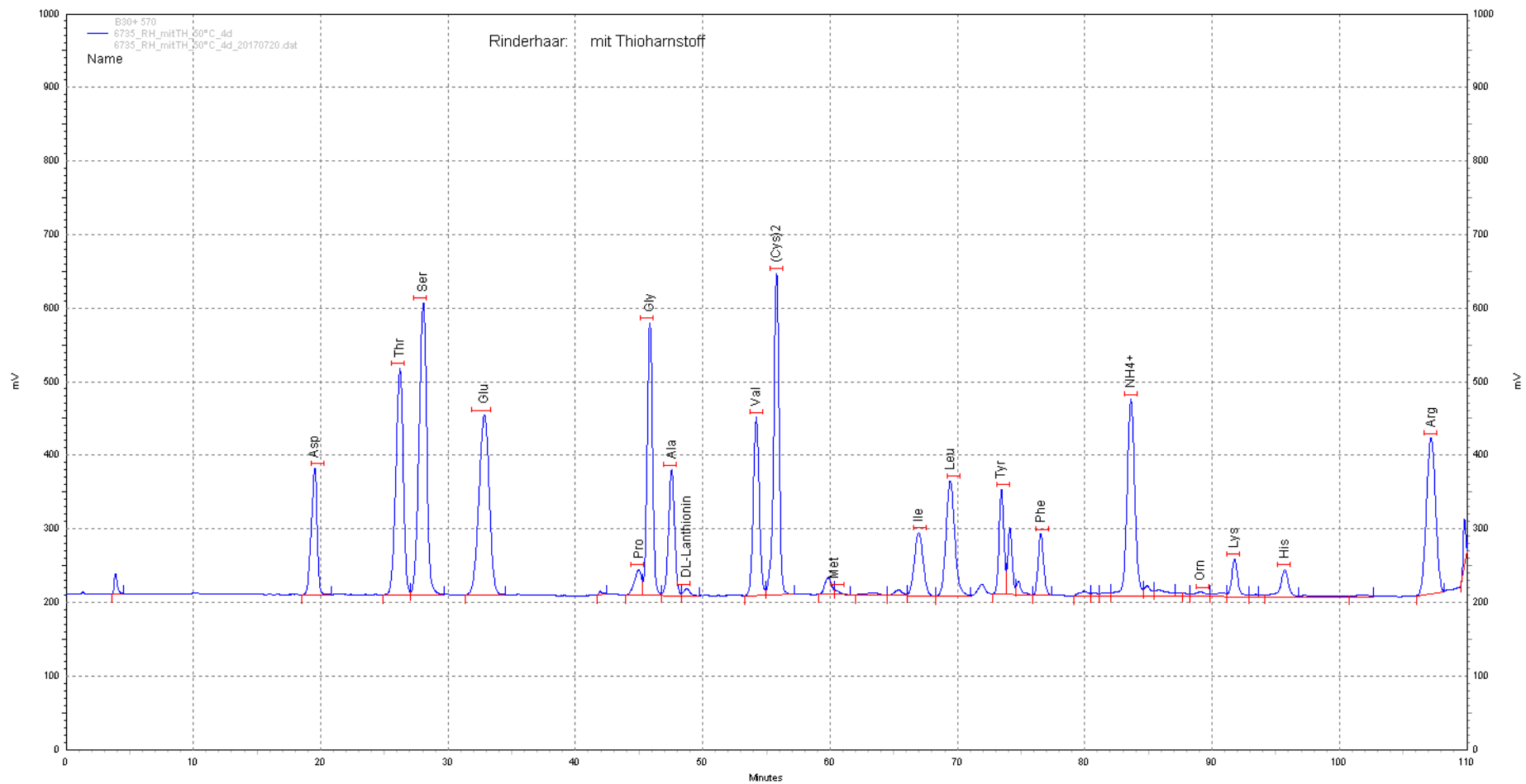


Abbildung 30 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren mit Thioharnstoff

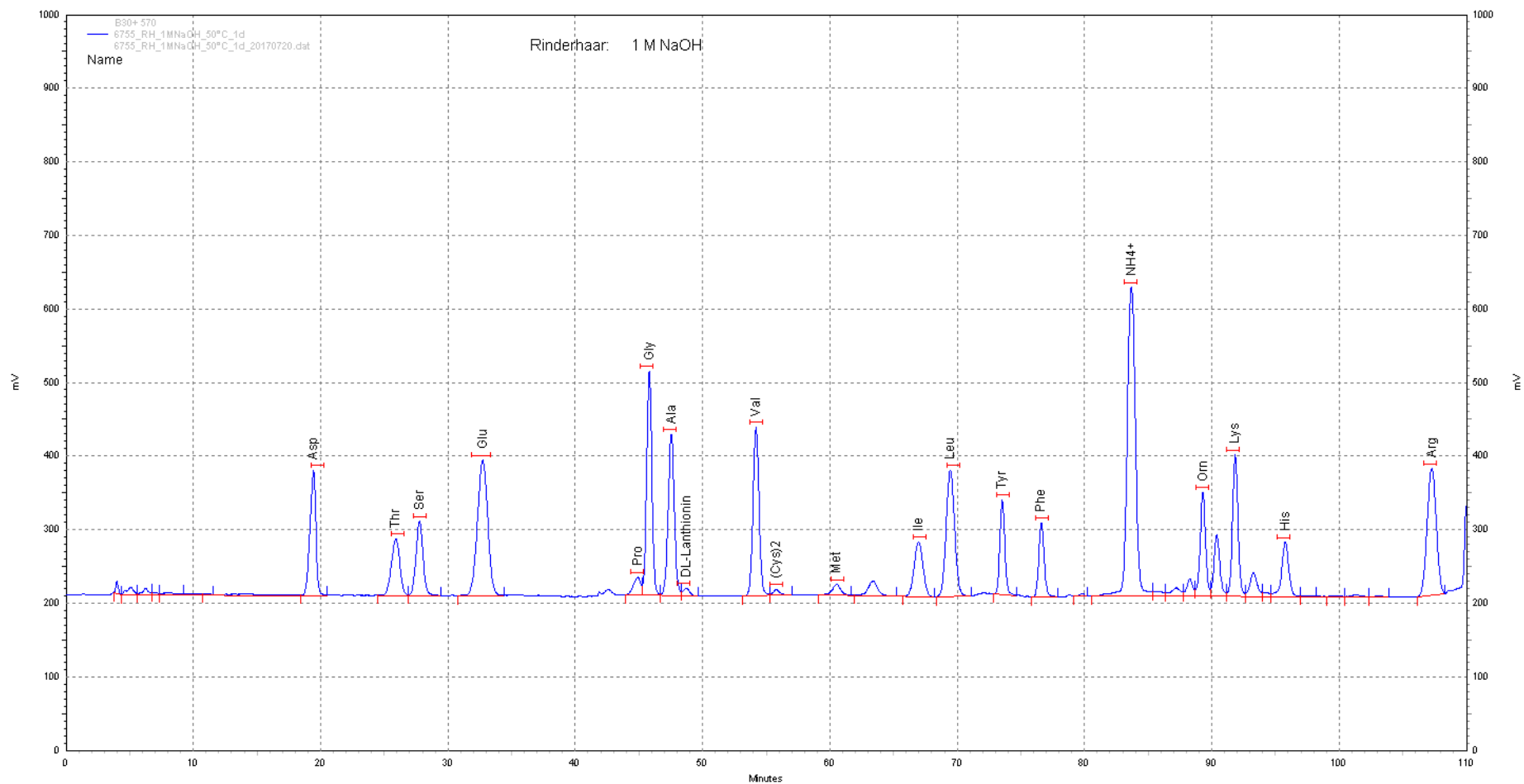


Abbildung 31 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaaren mit Natriumhydroxid

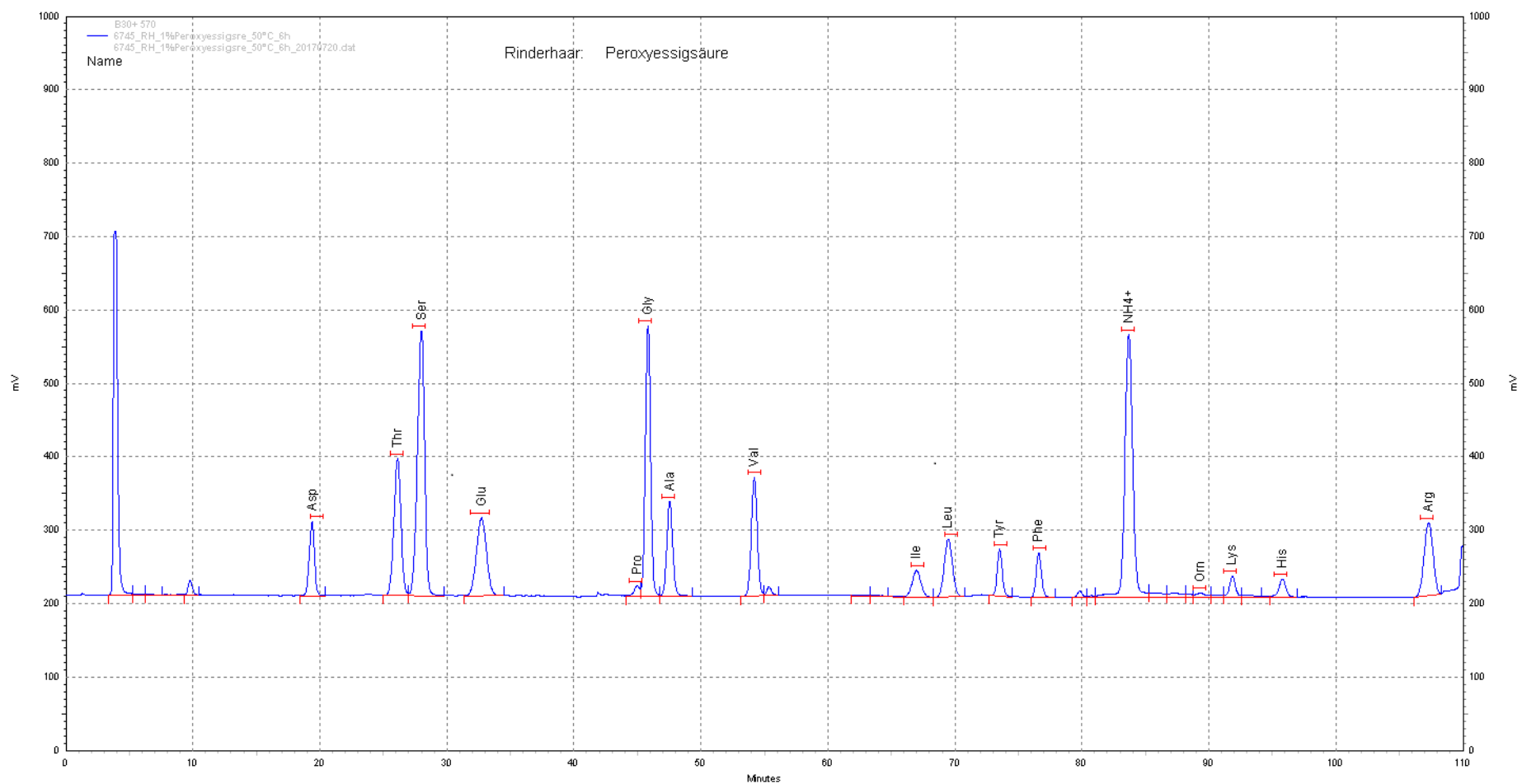


Abbildung 32 Chromatogramm der Aminosäureanalyse - Extraktion von Rinderhaare mit Peroxyessigsäure

5.4 Bestimmung der Konzentration freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz

Da die Aminosäureanalyse keinen Aufschluss über das Vorhandensein von freien Thiolgruppen brachte, wurden mit Hilfe der Ellman's Reagenz freie Thiolgruppen der Proben bestimmt. In folgender Tabelle sind die verwendeten Proben mit dazugehörigen Probennummer, sowie die Messwerte für die Kalibrierung und der Leerwert dargestellt. Die Bestimmung der Konzentration freier Thiolgruppen erfolgte mit den Extraktionsansätzen der Pferdehaare.

Tabelle 10 Ergebnisse der Bestimmung freier Thiolgruppen mit Ellman's Reagenz

Probennummer bzw. verwendete Probe	Extinktion	Konzentration freier Thiolgruppen in mmol/l
Leerwert	0,0174	-
0,2 mM Cystein	0,272	Kalibrierung
0,4 mM Cystein	0,5618	Kalibrierung
0,6 mM Cystein	0,8478	Kalibrierung
0,8 mM Cystein	1,1318	Kalibrierung
1 mM Cystein	1,4152	Kalibrierung
PN 1	0,0193	0,026
PN 2	0,0426	0,042
PN 3	0,1411	0,11
PN 3 (1:1 verdünnt)	0,0707	0,12
PN 4	0,2228	0,17
PN 4 (1:1 verdünnt)	0,1115	0,18
PN 5	0,2254	0,17
PN 5 (1:1 verdünnt)	0,1152	0,19
PN 6	0,2536	0,19
PN 6 (1:1 verdünnt)	0,128	0,20
PN 7	0,0208	0,027
PN 7 (1:1 verdünnt)	0,0256	0,061
PN 8	0,2715	0,20
PN 8 (1:1 verdünnt)	0,1494	0,23
PN 9	0,0746	0,065

PN 10	0,3467	0,25
PN 10 (1:1 verdünnt)	0,1902	0,29
PN 11	0,3753	0,27
PN 11 (1:1 verdünnt)	0,2033	0,31
PN 12	0,405	0,29
PN 12 (1:1 verdünnt)	0,2233	0,33
PN 17	0,048	0,046
PN 18	0,1154	0,093
PN 24	0,0068	niedriger als Leerwert
PN 25	0,0083	niedriger als Leerwert
PN 27	0,0324	0,035
PN 29	0,0464	0,045
PN 31	0,0045	niedriger als Leerwert
3 mM Homocystein pH 8	0,0071	niedriger als Leerwert
3 mM Homocystein pH 12	0,0024	niedriger als Leerwert

Die Konzentration freier Thiolgruppen konnte für alle Probenansätze über die Kalibriergerade ermittelt werden. Für die Proben 24, 25, 31 und den Homocysteinproben konnten keine Konzentration ermittelt werden, da die Extinktion unter dem Leerwert lag.

Die verwendete Kalibriergerade ist in Abbildung 33 dargestellt.

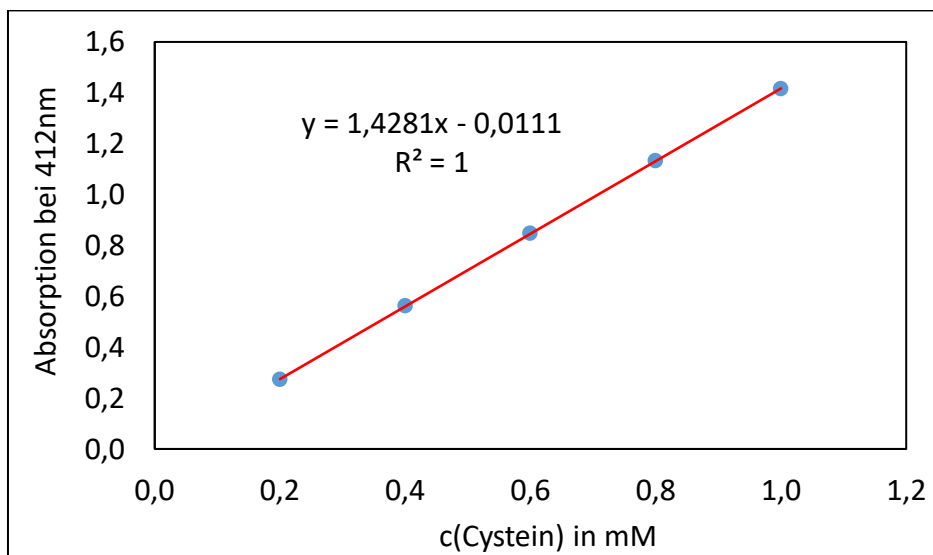


Abbildung 33 Kalibriergerade für die Konzentrationsbestimmung freier Thiolgruppen

6 Diskussion

6.1 Vergleich der Ausbeuten an Keratinhydrolysat aus allen Extraktionsansätzen

Der erste Versuch dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Gewinnung von Keratinhydrolysaten mittels basischer, saurer und enzymatischer Extraktionsmethoden. Dabei ist zu erwähnen, dass bei der Keratinextraktion aus Pferdehaaren auch die Proteinlösungen verwendet wurden und der Schritt der Zentrifugation übersprungen wurde. Außerdem wurden Dialyseschläuche mit einem geringeren MWCO verwendet. Dies spiegelt sich auch in den Ausbeuten aller alkalischen Ansätze wider. Somit konnte bei der Extraktion mit Natriumhydroxid bei Pferdehaaren eine Ausbeute bis zu 20,8 % erreicht werden, wohingegen die Ausbeute bei Rinderhaaren nur maximal 3,6 % betrug. Die Hydrolyse der Disulfidbrücken und Wasserstoffbrückenbindungen beginnt bei Polypeptidketten nach Chiego et al. ab einem pH-Wert von 9,2. Der pH-Wert der hier verwendeten Natriumhydroxidlösungen betrug ca. 14. Somit kann von einer starken Hydrolyse des Keratins und dem Entstehen von kleinen Fragmenten ausgegangen werden. Bei der Verwendung der Shindai-Solution zur Extraktion von Pferdehaaren konnte die größte Ausbeute aller in dieser Arbeit verwendeten Methoden verzeichnet werden. Bei einer Inkubationsdauer von drei Tagen, einer Inkubationstemperatur von 70 °C und der Verwendung von Thioharnstoff im Extraktionspuffer konnte eine Ausbeute von bis zu 61,8 % Keratinhydrolysat erreicht werden. Dies entspricht einer Ausbeute von über 300 mg aus den ursprünglich verwendeten 500 mg Haaren. Bereits Nakamura verwies in seiner Studie darauf, dass dies die optimale Methode für die Keratinextraktion ist. Anscheinend lassen sich mit Thioharnstoff die Wasserstoffbrückenbindungen besser hydrolysieren und es kann somit eine bessere Spaltung der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol ermöglicht werden. Bei den Ansätzen ohne Thioharnstoff konnte eine maximale Ausbeute von 52,2 % erreicht werden. Im Gegensatz dazu betrugen die Ausbeuten bei den Rinderhaaren maximal 22,0 % mit Thioharnstoff und 19,3 % ohne Thioharnstoff. Aus diesem enormen Unterschied lässt sich schließen, dass in den Proteinlösungen nach der Filtration und Zentrifugation eine große Menge an Keratinhydrolysat gelöst vorliegt. Bei der Verwendung von Peroxyessigsäure wurde eine maximale Ausbeute bei der Extraktion mit Rinderhaaren mit 14,8 % erreicht. Die maximale Ausbeute bei Pferdehaaren betrug

dahingegen nur 7,3 %. Im Gegensatz zu den alkalischen Extraktionsmethoden sind die Ausbeuten der sauren Extraktionsmethode sehr gering und für die Extraktion von Keratinhydrolysat eher schlecht geeignet [Chiego, 1942], [Nakamura, 2002].

Für die Ansätze der Shindai-Solution ist zusammenfassend zu sagen, dass ein Optimum der Keratinhydrolyсатаusbeute nach drei Tagen Inkubationszeit und der Verwendung einer Inkubationstemperatur von 70 °C erreicht werden konnte. Auch das Benutzen der Kombination von Thioharnstoff und Harnstoff führte zu höheren Ausbeuten. Die Extraktion mit Natriumhydroxid führt zu kleineren Keratinfragmenten (siehe 6.3), die in Lösung vorliegen. Somit ist der Unterschied der Ausbeuten von Rinder- und Pferdehaaren bei der Verwendung von NaOH sehr groß. Das Optimum der Ansätze ist bei ca. 50 °C und einer Inkubationsdauer von nur vier Stunden. Die Ansätze der Peroxyessigsäure unterscheiden sich sehr stark in ihrer Ausbeute. Nach [Lee, 2014] ist die optimale Inkubationsdauer 12 Stunden und es wurde 2 %ige Peroxyessigsäure bzw. Perameisensäure verwendet. Die Ansätze mit einer sechs stündigen Inkubationsdauer erreichten nur minimale Ausbeuten. Bei einer Inkubationsdauer von einem Tag und 50 °C Inkubationstemperatur konnte die größte Ausbeute erzielt werden. Somit ist eine Inkubationsdauer unter 12 Stunden und eine Inkubationstemperatur unter 50 °C nicht empfehlenswert.

6.2 Löslichkeit der Keratinhydrolysate

Die Löslichkeit der Keratinhydrolysate von Rinderhaaren wurde in Wasser und in SDS-PAGE-Auftragspuffer untersucht. Eine Löslichkeit in Wasser war nicht festzustellen. In Auftragspuffer hingegen ließen sich die Keratinhydrolysate zum Teil lösen. Dies liegt wahrscheinlich an der Verwendung von SDS, das im Auftragspuffer vorhanden ist und Proteine bindet. Es blieben trotzdem ungelöste Mengen an Keratinhydrolysat zurück. Die Proben der Pferdehaare ließen sich besser in Auftragspuffer lösen als die Hydrolysate der Rinderhaare, dennoch war das Lösen in Wasser nicht möglich. Bei der Aminosäureanalyse wurden die Proben mit 6M Salzsäure versetzt und ließen sich gut lösen, jedoch kann man von der Bildung von Sulfonsäurederivaten ausgehen [Earland, 1955].

6.3 Auswertung der gelelektrophoretischen Charakterisierung der Hydrolysate

Die gewonnenen Hydrolysate wurden mithilfe einer SDS-PAGE charakterisiert. Das elektrophoretische Trennmuster der Keratinhydrolysate aus der Extraktion mit der Shindai-Solution ohne Thioharnstoff wies bei Rinder- bzw. Pferdehaaren Banden im Bereich von ca. 40-45 kDa auf. Die Banden des Gels mit Rinderproben besitzen eine intensivere Färbung, als die Banden des Gels mit den Pferdeproben. Jedoch weisen nur die Rinderproben 1, 2 und 3 Banden auf. Die Rinderproben 1, 2 und 3 und die Pferdeproben 4, 5 und 6 besitzen zusätzlich noch Banden im Bereich von ca. 90-100 kDa. Die Banden mit den molekularen Größen von 40-45 kDa, könnten demzufolge α -Keratine (40-60 kDa) darstellen und die Banden mit 90-100 kDa Dimere bzw. Multimere (110-115 kDa, 125-135 kDa). Durch die mangelnde Löslichkeit der Rinderproben im Auftragspuffer lässt sich vermuten, dass die Rinderproben der Spuren 4, 5 und 6 sich nicht gelöst haben und somit keine Banden zu erkennen waren [Lee, 2014].

Die SDS-PAGE der Rinderproben aus der Extraktion mittels Shindai-Solution mit Thioharnstoff weist keine Banden auf. Dies könnte wieder durch die schlechte Löslichkeit der Proben bedingt sein. Bei der Analyse der Pferdeproben wurden dagegen Banden im Bereich von 40-45 kDa und im Bereich der Dimere und Multimere gefunden. Bei den Proben mit einer Inkubationstemperatur von 70 °C konnten außerdem Banden im niedermolekularen Bereich unter 29 kDa erfasst werden, die aus einer hohen Inkubationstemperatur resultieren. Bei den Proben 8 und 9 sind auch Banden über 120 kDa zu erkennen (Multimere), die durch die mildere Inkubationstemperatur noch nicht vollständig gespalten werden konnten.

Das elektrophoretische Trennmuster der Keratinhydrolysate aus der Extraktion mit NaOH besitzt unterschiedlich starke Banden bzw. Färbungen. PN 13 weist eine starke Färbung der gesamten Spur auf. Dies könnte auf unterschiedlich stark abgebaute Keratine hinweisen. Es können somit sehr kleine Molekülmassen von 10 kDa bis hin zu Dimeren und Multimeren mit einer Molekülmasse von 135 kDa vorhanden sein. Alle anderen Proben besitzen Färbungen im niedermolekularen Bereich unter 29 kDa. Dies könnte an hohen NaOH-Konzentration, sowie an langen Inkubationszeiten und hohen Inkubationstemperaturen liegen.

Die gelelektrophoretische Charakterisierung der Peroxyessigsäure-Proben ist im Fall der Rinder- und Pferdehaare nicht geglückt. Durch die wahrscheinlich zu starke Konzentration von Peroxyessigsäure könnten die Keratinfragmente zu stark hydrolysiert worden sein, sodass keine Banden sichtbar sind. Außerdem kann die schlechte Löslichkeit der Proben dazu geführt haben, dass keine Banden zu sehen sind. Ein weiterer Grund könnte die Verwendung von zu wenig Keratinhydrolysat gewesen sein. Die Extraktionsansätze mit Proteinase K und Keratinase weisen ebenfalls keine Banden auf. Proteinase K kann unter neutralen und leicht basischen Bedingungen keine Disulfidbrücken spalten. Anscheinend war die Konzentration des NaOH-Zusatzes zu gering, um Disulfidbrücken spalten zu können. Dies könnte ein Grund sein, dass keine Banden zu verzeichnen sind. Die Keratinase hingegen ist in der Lage Disulfidbrücken zu spalten, jedoch wurden die Extraktionen mit nur 200 mg Haaren durchgeführt. Durch die Verwendung von zu wenig Ausgangsmaterial und zu wenig Enzym wurde somit wahrscheinlich nicht genügend Keratinhydrolysat hergestellt. Dadurch ist auch hier keine Charakterisierung der Fragmente möglich.

6.4 Auswertung Aminosäureanalyse

Durch die Aminosäureanalyse konnte der Gehalt der Aminosäuren in den Proben dargestellt werden. Auffallend ist sofort, dass kein Cystein in den Proben vorhanden ist. Da die Proben in 6 M Salzsäure aufgenommen wurden, konnten die Peptide komplett gespalten werden. Somit können freie Thiolgruppen in Form von Cystein Lanthionin und Cystin bilden. Lanthionin entsteht auch unter alkalischen Bedingungen und Temperaturen im Bereich von ca. 50 °C, was bei der Extraktion mit Shindai und Natriumhydroxid gegeben ist [Rath, 2011]. Arginin und Ornithin wurden ebenfalls in den Ergebnissen genauer betrachtet, da Ornithin auch im basischen Milieu durch die Hydrolyse von Arginin entsteht. Somit konnten keine Cysteinreste und freie Thiolgruppen mit der Aminosäureanalyse bestimmt werden.

Cystin ist bei der Extraktion mittels Shindai-Solution zu ca. 10-15 % bei den Proben, die mit 50 °C behandelt wurden, vorhanden. Bei den Proben, die eine Inkubationstemperatur von 70 °C besaßen, wurde nur ein prozentualer Anteil von ca. 5-10 % erreicht. Je höher die Temperatur, umso stärker werden die Peptide gespalten. Die Bildung von Lanthionin und Ornithin ist in den Proben der Extraktion mit Natriumhydroxid sehr hoch. Dies stimmt mit der These von [Rath, 2011] überein.

Durch einen zu hohen pH-Wert wurde in den NaOH-Proben Arginin zu Ornithin hydrolysiert und Cystin zu Lanthionin. Lanthionin ist im Gegensatz zu Cystin die stabilere Form, jedoch ist es auch irreversibel und kann in zukünftigen Versuchen nicht wieder zu zwei Cysteinresten reduziert werden. Ein entscheidender Faktor ist die Inkubationszeit der Proben, die die Bildung von Lanthionin und Ornithin unterstützen. Somit wird bei einer längeren Inkubationsdauer auch mehr Lanthionin und Ornithin gebildet.

Bei dem Vergleich der Chromatogramme ist besonders auffallend, dass nach 6 min Retentionszeit ein Peak im Chromatogramm der Peroxyessigsäure auftritt. Dieser könnte ein mögliches Sulfonsäurederivat, die bei der sauren Extraktion entstehen können, darstellen.

Insgesamt entspricht die Verteilung der Aminosäuren der Ansätze auch der Verteilung, die in der Literatur anzutreffen ist [Samata, 1988].

6.5 Bestimmung freier Thiolgruppen mittels Ellman's Reagenz

Mittels der Reaktion mit Ellman's Reagenz konnten freie Thiolgruppen in den Proben bestimmt und dargestellt werden, was bei der Aminosäureanalyse nicht möglich war. Anhand der Kalibriergerade, konnten die Konzentrationen der freien Thiolgruppen der Proben ermittelt werden. Die Konzentrationen der Natriumhydroxid-, Peroxyessigsäure- und enzymatischen Ansätze waren sehr gering und lagen unter dem niedrigsten Wert der Kalibriergeraden (0,2mM). Die höchsten Konzentrationen konnten bei Probe 11 und 12 erfasst werden. Diese besitzen eine Konzentration von 0,27 mM und 0,29 mM. Der Extraktionsansatz mit der PN 11 war auch der Ansatz mit der größten Ausbeute an Keratinhydrolysat dieser Arbeit. Im Gegensatz dazu besitzt Natriumhydroxid mit einer Konzentration freier Thiolgruppen von 0,09 mM nur ca. ein Drittel der Konzentration der PN 11 und 12. Der Ansatz der Peroxyessigsäure lag unter dem gemessenen Leerwert, was auch durch die Entstehung von Sulfonsäurederivaten während der Inkubation zu begründen ist.

7 Ausblick

Die Ausbeute an Keratinhydrolysat war bei den Ansätzen mit Pferdehaaren deutlich höher, als bei der Verwendung von Rinderhaaren. Dies lag unter anderem an der Nutzung von Dialyseschläuchen mit einem MWCO von 1000 Da. Für zukünftige Versuche in Labormaßstab sollten möglichst Dialyseschläuche mit einem kleinen MWCO verwendet werden. Die saure Hydrolyse könnte unter weiteren Inkubationsparametern durchgeführt werden. Auch die Verwendung von Perameisensäure ist in Betracht zu ziehen. Die enzymatischen Probenansätze sollten mehr als 1mg Keratinase pro 100 mg Ausgangsmaterial enthalten. Außerdem wäre es sinnvoll für die Proteinase K ein stärker alkalisches Milieu zu wählen, um eine Spaltung von Disulfidbrücken und die Spaltung des Proteins zu gewährleisten. Es könnten ebenfalls längere Inkubationszeiträume für weitere Versuche gewählt werden.

Bei der Aminosäureanalyse könnte eine Doppelbestimmung der Proben durchgeführt werden, um Messfehler zu vermeiden. Außerdem könnten freie Thiolgruppen gezielt oxidiert werden, um deren Anteil bei der Aminosäureanalyse bestimmen zu können.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Probenansätze belaufen sich auf Labormaßstab und müssen als nächstes in größerem Maßstab durchgeführt werden.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde sich mit der Gewinnung von Keratinhydrolysat aus Rinder- und Pferdehaaren beschäftigt. Außerdem erfolgte eine gelelektrophoretische Charakterisierung der gewonnenen Hydrolysate mittels SDS-PAGE und eine Aminosäureanalyse der Proben sowie eine Bestimmung freier Thiolgruppen mittels Ellman's Reagenz.

Die größte Ausbeute an Keratinhydrolysat wurde mit der Extraktion nach Nakamura et al. erzielt. Die mit dieser Methode erreichte Ausbeute an Keratinhydrolysat beträgt 61,8 % ausgehend vom Ausgangsmaterial. Die Inkubationstemperatur betrug 70 °C bei einer Inkubationsdauer von drei Tagen. Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche mit einem MWCO von 1000 Da verwendet, um auch kleinere Keratinfragmente zu gewinnen. Die Verwendung von Thioharnstoff hat nur einen kleinen Einfluss auf die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen. Bei der Extraktion mit Natriumhydroxid konnte maximal eine Ausbeute von 20,8 % erreicht werden. Die Verwendung von Peroxyessigsäure und Proteinase K bzw. Keratinase führte nur zu geringen Ausbeuten. Außerdem entstehen bei der sauren Hydrolyse Sulfonsäurederivate und es liegen keine freien Thiolgruppen vor.

Die gelelektrophoretische Charakterisierung zeigte bei der Methode nach Nakamura et al. Banden im Bereich von 40-45 kDa und ca. 100-116 kDa, was einer molekularen Größe von α -Keratin und Dimeren bzw. Multimeren entspricht. Bei der Verwendung von Natriumhydroxid wurden die Keratinfragmente sehr stark zerkleinert, wodurch die meisten Hydrolysate eine molekulare Masse von weniger als 29 kDa besaßen. Die gelelektrophoretische Charakterisierung der sauren Hydrolyse und der Enzymansätze waren durch die geringe Löslichkeit der Hydrolysate (Peroxyessigsäure) bzw. durch die zu geringe Extraktion von Keratin (Enzyme) nicht möglich.

Die Aminosäureanalyse gab Aufschluss über die Bildung von Cystin, Lanthionin und Ornithin bei der Extraktion mit den verwendeten Extraktionsmethoden. Auch hier ist die Shindai-Solution die mildere Variante für die Extraktion von Keratin. Es entsteht viel Cystin, wenig Lanthionin und Ornithin. Natriumhydroxid bildet im Vergleich weniger Cystin, aber dafür verhältnismäßig mehr Lanthionin und Ornithin. Die

Peroxyessigsäure bildet bei der Extraktion Sulfonsäurederivate, die eine Bestimmung von Cystin und Lanthionin nicht ermöglichen.

Bei der Bestimmung freier Thiolgruppen konnte bei der Shindai-Methode die größte Konzentration an freien Thiolgruppen festgestellt werden.

Der Nachteil der Shindai-Solution ist die große Menge an umweltschädlichen 2-Mercaptoethanol, das für die Extraktionsansätze benötigt wird. Die Extraktion in einem großen Maßstab außerhalb des Labors ist demzufolge mit Natriumhydroxid einfacher und schneller, erzielt aber im Gegensatz zu der Shindai-Methode weniger Ausbeute, besitzt weniger freie Thiolgruppen und bildet mehr Lanthionin und Ornithin. Außerdem wird Keratin in sehr kleine Keratinfragmente gespalten.

9 Summary

This research presents methods for the production of keratin hydrolysate from bovine and equine hair. In addition, a gel electrophoresis and an amino acid analysis was used to show different keratin molecules after extraction and the distribution of all amino acids in keratin. After that, Ellman's reagent was used for the quantification of free thiol groups

The biggest amount of keratin hydrolysate was obtained with the Shindai extraction method according to [Nakamura, 2012]. The amount of keratin hydrolysate obtained by this method is 61.8 % in correlation to the bovine and equine hair used. The incubation temperature was 70 °C and the incubation period of time was three days. For the dialysis, tubes with a MWCO of 1000 Da were used to also retain even the smaller keratin fragments. The use of thiourea has only a small influence on the cleavage of hydrogen bonds. The maximum amount of keratin hydrolysate obtained from extraction with sodium hydroxide was 20.8 %. The use of peracetic acid, proteinase K and keratinase resulted in low amounts of hydrolysates. In addition, sulfonic acid derivates are formed during the acid hydrolysis. SDS-PAGE was used to separate different keratin molecules. Stained bands in the range of 40-45 kDa and 100-116 kDa are related to a molecular size of α -keratin and dimers or multimers. Keratin fragments from the extraction with sodium hydroxide were strongly fragmented, that is why most of the hydrolysates had a molecular mass of less than 29 kDa. The characterization of protein bands was not possible after the extraction of keratin hydrolysates using peracetic acid and the enzymes. Possible reasons for this are the low solubility of the hydrolysates and the insufficient extraction with enzymes. The amino acid analysis revealed the formation of cystine, lanthionine and ornithine during the different extractions. During the extraction with peracetic acid, sulfonic acid derivates are formed, which prevents the formation of cystine and lanthionine. Free thiol groups were best available after the Shindai extraction.

The biggest disadvantage of the Shindai solution is the large amount of environmentally harmful 2-Mercaptoethanol required for the extraction. A large scale process for keratin extraction outside the laboratory is more simple and faster with sodium hydroxide.

However, the extraction with sodium hydroxide has less free thiol groups, forms more lanthionine and ornithine and cleaves the protein in smaller fragments.

Anhang

In den nachfolgenden zwei Tabellen befinden sich alle Einwaagen der Rinder- und Pferdehaare vor dem Hinzugeben der jeweiligen Extraktionsmittel, sowie die Ausbeute an Keratinhydrolysat.

Tabelle 11 Einwaagen und Masse an Keratinhydrolysat von Rinderhaare aller Ansätze aus Punkt 4.2

Probennummer	Einwaage der Ansätze in Punkt 4.2 in mg	Masse an Keratinhydrolysat in mg
1	Nicht vorhanden	91,92
2	Nicht vorhanden	96,25
3	Nicht vorhanden	85,18
4	501,6	70,51
5	499,7	33,13
6	500	36,01
7	Nicht vorhanden	100,96
8	Nicht vorhanden	85,76
9	Nicht vorhanden	109,98
10	504,7	99,27
11	500,9	74,53
12	499,3	37,98
13	497	11,14
14	500,2	13,52
15	503,9	7,44
16	502,7	6,17
17	504,7	18,13
18	499,2	11,72
19	499,4	9,51
20	502	9,83
21	502,5	0,4
22	498,9	13,99

23	502,4	5
24	500,9	74,15
25	499,4	Keine Probenbehandlung
27	499,8	Keine Probenbehandlung
29	202,2	Keine Probenbehandlung
31	200,8	Keine Probenbehandlung

Tabelle 12 Einwaagen und Masse an Keratinhydrolysat von Pferdehaaren aller Ansätze aus Punkt 4.2

Probennummer	Einwaage der Ansätze in Punkt 4.2 in mg	Masse an Keratinhydrolysat in mg
1	499	60,93
2	503,4	57,5
3	497,4	129,41
4	499,8	193,95
5	499,8	260,99
6	500,4	234,3
7	500	172,37
8	495	186,35
9	498,5	238,07
10	499,9	259,23
11	500,3	309,09
12	506,1	228,88
13	498	87,63
14	499,1	103,58
15	503,7	83,97
16	508,8	72,95
17	499	79,35
18	502,2	53,69
19	503,6	55,16
20	507,2	42,63
21	502,6	0

22	503,2	5,5
23	503,1	0,38
24	499,9	36,63
26	500,9	Keine Probenbehandlung
28	499,2	Keine Probenbehandlung
30	200,6	Keine Probenbehandlung
32	199,9	Keine Probenbehandlung

In den folgenden Tabellen (13–16) ist die Aminosäurezusammensetzung der extrahierten Keratinhydrolysate aufgeführt.

Tabelle 13 Aminosäureverteilung Rinderhaare PN 1 - PN 12

	PN 1 in %	PN 2 in %	PN 3 in %	PN 4 in %	PN 5 in %	PN 6 in %	PN 7 in %	PN 8 in %	PN 9 in %	PN 10 in %	PN 11 in %	PN 12 in %
Asp	4,5	4,3	4,1	3,7	3,6	3,6	4,6	4,2	4,0	3,9	3,8	3,6
Hyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Thr	8,5	8,5	8,6	8,7	8,7	8,7	8,1	8,4	8,4	8,6	8,4	8,8
Ser	8,9	9,2	9,3	10,0	10,1	10,2	8,9	9,2	9,3	9,8	10,1	10,5
Glu	12,5	12,3	11,9	10,9	10,0	9,9	12,4	12,0	11,7	11,4	10,3	10,1
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pro	11,3	11,7	11,9	12,2	12,2	12,1	11,1	11,2	11,4	11,9	12,0	12,3
Gly	4,4	4,4	4,6	5,1	5,6	5,7	4,7	4,9	5,0	5,1	5,7	5,7
Ala	2,7	2,7	2,7	3,0	3,1	3,2	2,8	2,8	2,7	3,0	3,2	3,1
Lan	0,4	0,5	0,6	1,3	1,4	1,4	0,4	0,5	0,5	1,0	1,3	1,3
Val	4,7	4,8	4,8	5,3	5,7	5,8	4,7	4,7	4,8	5,1	5,5	5,5
Cystin	15,5	15,1	15,1	11,6	8,0	7,7	14,6	15,0	14,8	12,5	9,1	8,3
Met	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0
Ile	3,0	3,0	3,0	3,1	3,4	3,4	3,1	3,1	3,1	3,2	3,4	3,3
Leu	5,5	5,4	5,2	5,2	5,6	5,6	5,5	5,3	5,2	5,2	5,5	5,4
Tyr	3,4	3,3	3,5	4,1	5,0	5,1	3,7	3,6	3,8	3,8	4,9	4,9
Phe	2,1	2,0	2,1	2,5	3,2	3,2	2,3	2,2	2,3	2,5	3,2	3,1
Hyl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Orn	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3
Lys	1,7	1,4	1,4	0,7	0,8	0,8	1,8	1,3	1,3	0,8	0,8	0,8
His	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,4	1,2	1,3	1,3	1,2	1,2	1,3
Arg	9,4	9,7	9,7	10,8	11,8	11,8	9,7	10,0	10,0	10,6	11,2	11,5

Tabelle 14 Aminosäureverteilung Rinderhaare PN 13 - PN 24

	PN 13 in %	PN 14 in %	PN 15 in %	PN 16 in %	PN 17 in %	PN 18 in %	PN 19 in %	PN 20 in %	PN 21 in %	PN 22 in %	PN 23 in %	PN 24 in %
Asp	8,9	4,5	5,4	4,9	5,3	5,6	7,0	7,8	-	4,2	3,8	3,2
Hyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
Thr	5,2	6,3	3,5	4,8	3,9	3,4	1,8	1,0	-	9,6	10,8	11,8
Ser	5,5	6,2	3,5	5,2	3,7	3,1	2,2	1,2	-	15,9	14,9	13,9
Glu	17,9	12,4	11,4	10,0	19,1	12,4	14,3	18,0	-	9,8	10,9	12,5
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
Pro	5,6	9,8	10,7	10,0	8,0	10,8	9,8	8,1	-	13,4	14,3	15,4
Gly	4,7	6,5	6,5	7,7	5,4	5,7	7,1	4,7	-	9,7	8,2	6,3
Ala	5,2	4,9	4,7	4,6	4,0	5,0	4,9	5,0	-	4,0	3,5	3,2
Lan	2,7	2,9	1,0	2,3	5,4	0,9	1,2	0,0	-	0,0	0,0	0,0
Val	5,1	5,1	5,8	5,1	4,7	6,4	5,8	6,3	-	6,2	6,5	6,6
Cystin	1,6	0,3	0,6	0,8	0,7	0,5	0,7	0,4	-	0,0	0,0	0,0
Met	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	0,8	0,7	0,8	-	0,0	0,0	0,0
Ile	4,2	3,4	3,5	3,4	2,9	3,7	3,1	2,9	-	2,6	2,9	3,3
Leu	9,8	6,3	7,1	6,6	7,7	7,8	8,3	9,3	-	4,9	4,7	4,1
Tyr	4,8	3,6	5,1	5,8	3,4	5,0	5,1	5,7	-	3,5	3,1	2,6
Phe	3,5	4,6	4,1	5,2	3,9	3,9	3,9	3,6	-	3,3	2,9	2,3
Hyl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	0,0	0,0
Orn	0,4	1,3	3,2	2,0	2,7	3,9	7,5	8,2	-	0,5	0,4	0,3
Lys	2,8	3,9	4,7	2,9	4,1	6,3	6,4	10,9	-	1,5	1,4	1,7
His	1,4	2,4	2,9	2,3	2,4	3,5	2,9	3,0	-	1,7	1,7	1,5
Arg	10,1	14,9	15,7	16,0	12,1	11,4	7,4	3,2	-	9,1	10,1	11,2

Tabelle 15 Aminosäureverteilung Pferdehaare PN 1 - PN 12

	PN 1 in %	PN 2 in %	PN 3 in %	PN 4 in %	PN 5 in %	PN 6 in %	PN 7 in %	PN 8 in %	PN 9 in %	PN 10 in %	PN 11 in %	PN 12 in %
Asp	4,0	4,4	4,3	6,4	7,0	7,5	6,5	6,6	6,7	6,9	7,3	7,0
Hyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Thr	7,1	6,8	6,9	6,1	6,1	5,9	5,8	5,8	5,8	5,9	5,9	6,1
Ser	10,9	11,0	11,2	9,7	9,4	9,3	9,0	9,1	9,2	9,3	9,4	9,5
Glu	12,9	13,5	13,3	16,1	16,8	17,6	15,6	15,8	16,0	16,4	16,8	16,4
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pro	11,7	11,3	11,5	8,7	8,1	7,6	8,1	8,1	8,4	8,1	7,8	8,2
Gly	3,9	4,0	4,0	4,1	4,3	4,3	4,1	4,1	4,2	4,2	4,3	4,4
Ala	2,4	2,6	2,6	3,8	4,1	4,3	3,7	3,8	3,9	4,0	4,2	4,2
Lan	0,4	0,5	0,5	0,7	0,9	0,8	0,3	0,3	0,4	0,6	0,8	0,8
Val	4,8	4,8	4,8	5,2	5,5	5,4	4,9	5,0	5,1	5,3	5,5	5,5
Cystin	16,4	15,3	15,0	9,9	6,9	6,3	11,3	10,9	10,0	8,8	6,4	6,5
Met	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3
Ile	3,3	3,2	3,3	3,5	3,7	3,7	3,5	3,5	3,5	3,7	3,8	3,8
Leu	5,0	5,4	5,3	7,4	8,1	8,5	7,4	7,5	7,7	7,9	8,4	8,1
Tyr	1,7	1,8	1,7	2,5	2,9	2,7	2,7	2,7	2,6	2,8	2,9	2,9
Phe	2,2	2,3	2,2	2,6	2,8	2,9	2,6	2,6	2,7	2,8	2,8	2,9
Hyl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Orn	0,3	0,2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
Lys	1,2	1,1	1,1	1,0	1,0	1,1	2,4	1,8	1,7	0,9	1,1	1,0
His	1,8	1,6	1,6	1,3	1,3	1,3	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	1,4
Arg	10,1	10,0	10,2	10,5	10,6	10,3	10,3	10,4	10,4	10,6	10,7	10,7

Tabelle 16 Aminosäureverteilung Pferdehaare PN 13 - PN 24

	PN 13 in %	PN 14 in %	PN 15 in %	PN 16 in %	PN 17 in %	PN 18 in %	PN 19 in %	PN 20 in %	PN 21 in %	PN 22 in %	PN 23 in %	PN 24 in %
Asp	7,8	9,0	9,4	10,4	9,7	11,3	11,7	12,5	-	3,4	-	3,1
Hyp	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0
Thr	5,7	4,7	3,7	3,0	3,7	2,1	1,1	0,7	-	8,4	-	8,9
Ser	7,9	5,9	4,5	3,5	4,1	2,5	1,6	1,0	-	16,4	-	15,8
Glu	18,2	20,8	21,5	23,4	21,8	25,5	26,6	29,4	-	9,4	-	12,0
Cys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0
Pro	7,2	6,7	6,7	5,8	6,7	5,6	5,3	4,6	-	14,5	-	15,8
Gly	4,1	3,3	4,1	3,5	3,7	3,1	3,9	2,7	-	8,4	-	6,3
Ala	5,1	5,2	5,4	5,3	5,4	5,3	5,4	5,1	-	4,1	-	3,6
Lan	4,4	2,7	2,0	1,2	2,2	0,8	1,0	0,5	-	0,0	-	0,0
Val	5,2	5,6	6,0	5,9	6,0	6,3	6,4	6,6	-	7,2	-	7,4
Cystin	2,3	2,2	2,1	1,8	2,0	1,3	1,1	0,8	-	0,0	-	0,0
Met	0,4	0,7	0,8	0,9	0,7	0,7	1,0	1,0	-	0,0	-	0,0
Ile	3,9	4,0	4,0	4,1	4,1	4,2	3,8	3,6	-	3,1	-	3,6
Leu	8,4	9,6	10,2	11,0	10,4	11,8	12,2	12,6	-	4,7	-	4,2
Tyr	3,1	2,8	3,2	3,0	3,4	3,0	3,1	3,0	-	2,1	-	1,7
Phe	2,8	2,7	2,9	2,9	2,9	3,1	3,2	3,2	-	3,8	-	2,7
Hyl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	0,0	-	0,0
Orn	0,4	0,6	1,5	1,6	1,6	2,4	4,9	4,8	-	0,3	-	0,3
Lys	2,2	3,4	2,9	3,9	2,8	4,1	4,2	4,8	-	1,3	-	1,3
His	1,3	1,4	1,5	1,5	1,5	1,6	1,4	1,4	-	1,6	-	1,6
Arg	9,5	8,6	7,5	7,2	7,4	5,5	2,0	1,6	-	11,4	-	12,0

Literaturverzeichnis***Zeitschriftenartikel:***

Bertram, J.E.; Gosline, J.M. (1987): Functional design of horse hoof keratin: the modulation of mechanical properties through hydration effects. *The Journal of experimental biology*. 130:121-136

Bodde, S.G.; Meyers, M.A.; McKittrick, J. (2011): Correlation of the mechanical and structural properties of cortical rachis keratin of restrices of the Toco Toucan (*Ramphastos toco*). *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 5:723-732

Cai, C.G.; Lou, B.; Zheng, X.; (2008): Keratinase production and keratin degradation by a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Zhejiang University Science B*. 9(1):60-67

Cardamone, J.M.; Nunet, A.; Garcia, R.A.; Aldema-Ramos, M.; (2009): Characterizing Wool Keratin. *Research Letters in Materials Science*. 2009

Cardamone, J.M. (2010): Investigating the microstructure of keratin extracted from wool: Peptide sequence (MALDI-TOF/TOF) and protein conformation (FTIR). *Journal of Molecular Structure*. 969:97-105

Chiego, B.; Silver, H. (1942): The Effect of Alkalis on the Stability of Keratins. *Journal of Investigative Dermatology*. 5(2):95-103

Earland, C.; Knight, C.; (1955): Studies on the structure of keratin: I. The analysis of fractions isolated from wool oxidized with peracetic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*.17:457

Farren, L.; Shayler, S.; Ennos, A.R. (2004): The fracture properties and mechanical design of human fingernails. *The Journal of experimental biology*. 207:735-741

Feughelman, M. (1959): A two-phase structure of keratin fibers. *Textile Research Journal*. 29:223

Fujii, T.; Ide, Y.; (2004): Preparation of Translucent and Flexible Human Hair Protein Films and Their Properties. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 27:1433-1436

Gibson, L.J.; Ashby, M.F. et al. (1995): The Mechanical Properties of Natural Materials. II. Microstructures for Mechanical Efficiency. 450

Gupta, R.; Ramnani, P. (2006): Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 70:21

Jin, J.; Limburg, S. et al. (2013): Peripheral nerve repair in rats using composite hydrogel-filled aligned nanofiber conduits with incorporated nerve growth factor. *Tissue Engineering Part A*. 19:2138

Kasapi, M.A.; Gosline, J.M. (1998): Exploring the possible functions of equine hoof wall tubules. *Equine veterinary journal. Supplement*. 26:10

Kitchener, A.; Vincent, J.F.V. (1973): Composite theory and the effect of water on the stiffness of horn keratin. *Journal of Materials Science*. 22: 1385-1389

Lee, H.; Noh, K.; Lee, S.C.; et al. (2014): Human Hair Keratin and Its-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 11:255-265

Lin, Y.; Marra, K.G. (2012): Injectable systems and implantable conduits for peripheral nerve repair. *Biomedical Materials*. 7(2):024102

Lippens, S.; Denecker, D.; et al. (2005): Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell death and differentiation*. 12: 1497–1508

Nakamura, A.; Arimoto, M.; Takeuchi, K.; (2002): A rapid extraction procedure of human hair proteins and identification of phosphorylated species. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 25:569

Feughelman, M. (1959): A two-phase structure of keratin fibers. *Textile Research Journal*. 29: 223

Papir, Y. S.; Hsu, K.-H.; Wildnauer, R. H. (1975): The mechanical properties of stratum corneum: I. The effect of water and ambient temperature on the tensile properties of newborn rat stratum corneum. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)*. 399: 170–180

Park, A. C.; Baddiel, C. B. (1972): Rheology of stratum corneum-I: A molecular interpretation of the stress-strain curve. *Journal of Cosmetic Science*. 23: 3-12

Parry, D. A.; North, A. C. (1998): Hard alpha-keratin intermediate filament chains: substructure of the N- and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. *Journal of structural biology*. 122: 67-75

Reddy, N. (2015): Non-food industrial applications of poultry feathers. *Waste Manage.* 45:91-107

Rouse, J. G.; Van Dyke, M. E. (2010): A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. *Materials*. 3: 999-1014

Rogers, M. A.; Langbein, L. et al. (2006): Human hair keratin-associated proteins (KAPs). *Int. Rev. Cytol.* 251: 209-263

Samata, T.; Matsuda, M. (1988): Studies on the Amino Acid Compositions of the Equine Body Hair and the Hoof. *The Japanese Journal of Veterinary Science*. 50(2):333-340

Saul, J.M.; Ellenburg, M.D. et al. (2011): Keratin hydrogels support the sustained release of bioactive ciprofloxacin. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 98:544

Sharma, S.; Gupta, A.; (2016): Sustainable Management of Keratin Waste Biomass: Applications and Future Perspectives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 59

Taylor, A.M.; Bonser, R.H.C.; Farrent, J.W. (2004): The influence of hydration on the tensile and compressive properties of avian keratinous tissues. *Journal of Materials Science*. 39: 939-942

Sierpinski, P.; Garrett, J.; et al. (2008): The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials*. 29:118

Sionkowska, A.; (2015): The potential of polymers from natural sources as components of the blends for biomedical and cosmetic applications. *Pure and Applied Chemistry*. 87(11-12):1075-1084

Tanabe, T.; Okitsu, N.; et al. (2002): Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials*. 23:817-825

Vazquez Villa, A.L.; Aragão, M.R.S.; et al. (2013): Feather Keratin hydrolysates obtained from microbial keratinases: effect on hair fiber. *BMC Biotechnology*. 13:15

Wang, B.; Yang, W.; et al. (2016): The structural basis of the filament-matrix texture in the avian/reptilian group of hard β -keratins. *Journal of Structural Biology*. 173:391-405

Yamauchi, K.; Yamauchi, A.; Kusunoki, T.; et al. (1996): Preparation of stable aqueous solution of keratins, and physiochemical and biodegradational properties of films. *Journal of Biomedical Materials Research*. 31:439-444

Bücher:

Krejci, O.; Mokrejs, P.; Sukop, S. (2011): Mathematical Methods and Techniques in Engineering & Environmental Science. 1: Catania, Sicily, Italy: WSEAS

Rath, H. (2011) Lehrbuch der Textilchemie: einschließlich der textilchemischen Technologie. 3: Cham, Switzerland: Springer

Internetquellen:

[URL-2] (25.05.2017) Community Research and Development Information Service, cordis.europa.eu, Industrial Feather Waste Valorisation for Sustainable Keratin based Materials, URL: http://cordis.europa.eu/project/rcn/206753_en.html

[URL-4] (22.07.2017) Lederzentrum Instandsetzung & Beratung GmbH & www.colourlock.com, Liming. URL https://www.leather-dictionary.com/index.php/Liming_-_Leather_Tanning

Bildquellen:

[URL-1] (11.07.2017) seilnacht.de, URL: <http://www.digitalefolien.de/biologie/mensch/sinne/haar1.html>

[URL-3] (03.05.2017) lookchem.com, URL: <http://www.lookchem.com/2-Mercaptoethanol>

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Chemnitz, den 16.08.2017

Mirko Weber