

# **Herstellung und Charakterisierung von Fasern aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen und deren potentielle Applikationen**

Von der Fakultät für Ingenieurwissenschaften  
der Universität Bayreuth  
zur Erlangung der Würde eines  
Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)  
genehmigte Dissertation

von  
Dipl.-Ing. (Univ.) Gregor Lang  
aus  
Singen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Scheibel

Zweitgutachter: Prof. Dr.-Ing. Volker Altstädt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2015

Lehrstuhl Biomaterialien

Universität Bayreuth

2015



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Biopolymere.....	1
1.1.1	Biopolymere – Einführung.....	1
1.1.2	Biopolymere – Definition.....	2
1.1.3	Proteine als natürliche Biopolymere .....	4
1.2	Spinnenseide.....	5
1.2.1	Radnetzspinnen und ihre Seide .....	6
1.2.2	Eigenschaften der großen Ampullenseide ( <i>Dragline</i> ).....	7
1.2.3	Herstellung rekombinanter Spinnenseidenproteine .....	9
1.2.4	Eigenschaften rekombinanter Spinnenseidenproteine .....	10
1.3	Elektrostatisches Spinnen .....	11
1.3.1	Vergleich mit anderen Faserherstellungsverfahren .....	12
1.3.2	Vorteile und potentielle Anwendungen .....	14
1.3.3	Funktionsweise des elektrostatischen Spinnprozesses .....	15
1.3.4	Parameter beim elektrostatischen Spinnen .....	17
1.3.4.1	Einfluss der Spinnlösung beim elektrostatischen Spinnen .....	17
1.3.4.2	Prozessparameter beim elektrostatischen Spinnen .....	20
1.3.4.3	Zusammenfassung der Parameter beim elektrostatischen Spinnen.....	22
1.4	Nassspinnverfahren .....	22
1.5	Zielsetzung .....	24
<b>2</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.1	Materialien.....	26
2.1.1	Proteine und Polymere für die Faserherstellung.....	26
2.1.2	Chemikalien .....	26
2.1.3	Geräte .....	27
2.1.4	Sonstige Materialien .....	29
2.1.5	Fibroblasten für Zellkulturexperimente.....	30
2.1.6	Computerprogramme .....	30
2.2	Methoden .....	31
2.2.1	Konstruktion mittels CAD ( <i>Computer-Aided Design</i> ).....	31
2.2.2	Herstellung von Spinnlösungen .....	31
2.2.2.1	Organische Lösungen für das elektrostatische Spinnen .....	32
2.2.2.2	Wässrige Lösungen für das Nassspinnen.....	32

2.2.3	Rheologische Untersuchung .....	33
2.2.4	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FT-IR).....	35
2.2.5	Mikroskopie .....	37
2.2.5.1	Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	37
2.2.5.2	Rasterkraftmikroskopie ( <i>Atomic Force Microscopy</i> : AFM) .....	38
2.2.5.3	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	41
2.2.6	Zugversuche .....	42
2.2.7	Zellkulturexperimente .....	45
2.2.7.1	Zellkulturmedium und Inkubationsbedingungen .....	45
2.2.7.2	Zelladhäsionsversuch .....	46
2.2.7.3	Zellproliferationsversuch .....	46
2.2.8	Luftdurchlässigkeitsmessung .....	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
3.1	Konzeption und Umsetzung einer Anlage zum elektrostatischen Spinnen.....	50
3.1.1	Aufbau einer Anlage zum elektrostatischen Spinnen.....	50
3.1.2	Einfluss der Abschirmungen und Elektrodengeometrie .....	52
3.1.3	Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit der Kollektorrolle .....	57
3.2	Herstellung elektrostatisch gesponnener Fasern .....	58
3.2.1	Einfluss der Spinnlösung auf die Fasermorphologie .....	58
3.2.1.1	Rheologische Charakterisierung von Spinnlösungen.....	58
3.2.1.2	Einfluss der Konzentration auf die Faserdurchmesser .....	62
3.2.1.3	Zusammenhang zwischen Viskosität und Faserdurchmesser.....	65
3.2.2	Nachbehandlung der Proteinfasern.....	67
3.2.2.1	Experimenteller Aufbau zur Ermittlung geeigneter Nachbehandlungsparameter... 67	
3.2.2.2	Einfluss einwertiger Alkohole auf die Proteinsekundärstruktur.....	68
3.2.2.3	Morphologische Stabilität nachbehandelter Fasern in Wasser.....	71
3.2.2.4	Optimiertes Nachbehandlungsverfahren .....	73
3.3	Mechanische Untersuchung von Protein-/Polymer-Garnen, natürlicher <i>Dragline</i> und nassgesponnenen Fasern.....	74
3.3.1	Vorgehensweise bei der Präparation und Charakterisierung von Garnen.....	74
3.3.2	Zugversuche von Protein-/Polymer-Garnen und natürlicher Spinnenseide .....	76
3.3.3	Herstellung und mechanische Charakterisierung nassgesponnener Proteinfasern.....	83
3.3.4	Mechanische Messungen elektrostatisch gesponnener Einzelfasern mittels AFM .....	85
3.3.5	Dynamische Belastungstest von Protein-/Polymer-Garnen .....	87
3.3.6	Superkontraktionsverhalten von Protein-/Polymer-Garnen und natürlicher Seide .....	91

3.4	Anwendungen elektrostatisch gesponnener Spinnseidenvliese .....	95
3.4.1	Medizintechnische Anwendung von Spinnseidenproteinvliesen .....	96
3.4.2	Technische Anwendung von Spinnseidenproteinvliesen in der Filtration .....	99
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>102</b>
4.1	Etablierung eines Prozesses zum elektrostatischen Spinnen .....	102
4.1.1	Umgebungsbedingungen beim elektrostatischen Spinnen .....	102
4.1.2	Einstellung des elektrischen Feldes beim elektrostatischen Spinnen .....	103
4.1.3	Elektrostatisches Spinnen ausgerichteter Fasern .....	105
4.2	Einfluss der Spinnlösung und der Nachbehandlung auf morphologische und strukturelle Eigenschaften elektrostatisch gesponnener eADF4-Fasern. ....	107
4.2.1	Rheologische Charakterisierung der Spinnlösungen .....	107
4.2.2	Einfluss der Eigenschaften der Spinnlösung auf die Fasermorphologie .....	109
4.2.3	Sekundärstrukturanalyse elektrostatisch gesponnener eADF4-Fasern.....	111
4.2.3.1	Einfluss der Verarbeitung auf die Proteinsekundärstruktur .....	111
4.2.3.2	Einfluss der Nachbehandlung auf die Proteinsekundärstruktur.....	113
4.3	Mechanische Eigenschaften von Garnen aus elektrostatisch gesponnenen Fasern.....	117
4.3.1	Beurteilung der mechanischen Messmethode anhand von Polymergarnen .....	117
4.3.2	Mechanische Eigenschaften von eADF4(C16)-Garnen .....	121
4.3.2.1	Einfluss der Verarbeitungsmethode .....	121
4.3.2.2	Einfluss der Nachbehandlung und Luftfeuchtigkeit.....	123
4.3.2.3	Vergleich von eADF4-Fasern mit natürlicher <i>Dragline</i> -Seide .....	127
4.4	Potentielle Anwendungen elektrostatisch gesponnener Seidenproteinfasern .....	131
4.4.1	Medizinische Anwendungen.....	131
4.4.2	Technische Anwendung in der Filtration .....	133
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>140</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>142</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>160</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>161</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>163</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>165</b>
<b>12</b>	<b>Erklärung.....</b>	<b>167</b>



## 1 Einleitung

### 1.1 Biopolymere

#### 1.1.1 Biopolymere – Einführung

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Studien über das weltweite Konsumverhalten des Menschen in Bezug auf fossile Rohstoffe und den sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Umwelt veröffentlicht. Induziert durch spürbare klimatische Veränderungen und das mediale Interesse an der Thematik entwickelte sich insbesondere in den letzten Jahren ein neues gesellschaftlich-ökologisches Bewusstsein. Prozesse des Umdenkens und die Suche nach umweltverträglichen Alternativen beschränken sich dabei nicht allein auf die Energiewirtschaft, sondern greifen auf alle denkbaren industriellen Zweige über. Längst kursieren Begriffe wie das „Cradle to Cradle Design“,<sup>[1]</sup> welche die Notwendigkeit und die Realisierbarkeit der nachhaltigen zyklischen Ressourcennutzung proklamieren. In großem Stil wird in diesem Zusammenhang vor allem die Problematik der Entsorgung von Plastikabfällen thematisiert. Weltweit werden jährlich ca. 288 Millionen Tonnen Plastik produziert (Abbildung 1). Bei der Abfallentsorgung werden ca. 26,3 % recycelt, 35,6 % zur Energiegewinnung verwendet und 38,1 % auf Mülldeponien gesammelt.

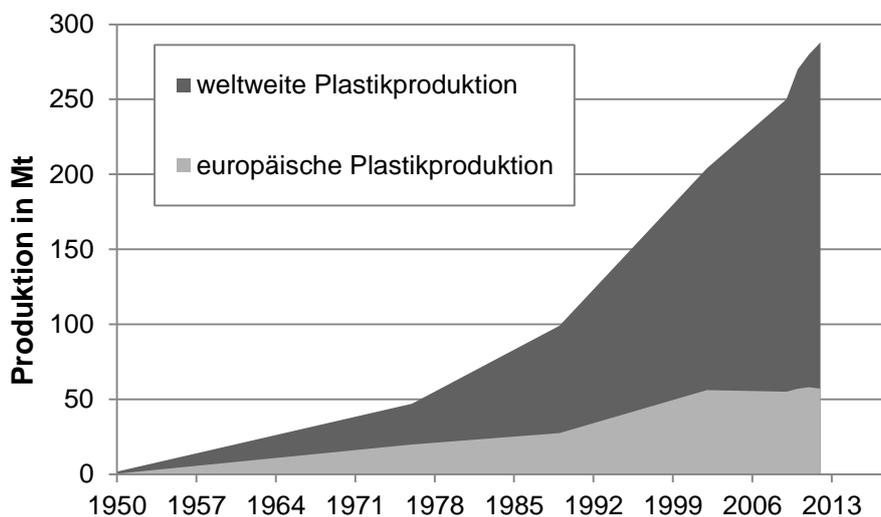


Abbildung 1: Entwicklung der jährlichen Plastikproduktion in Europa und weltweit.<sup>[2]</sup>

Ein vielversprechender Ansatz für den nachhaltigen Einsatz von Kunststoffen besteht in der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen, also den sogenannten Biopolymeren oder Biokunststoffen, anstelle von auf Rohöl basierenden Kunststoffen. Der Marktanteil solcher Biopolymere wird laut einer Studie, die der European Bioplastics e.V. im Dezember 2013 veröffentlichte, in den kommenden Jahren stark zunehmen (Abbildung 2).

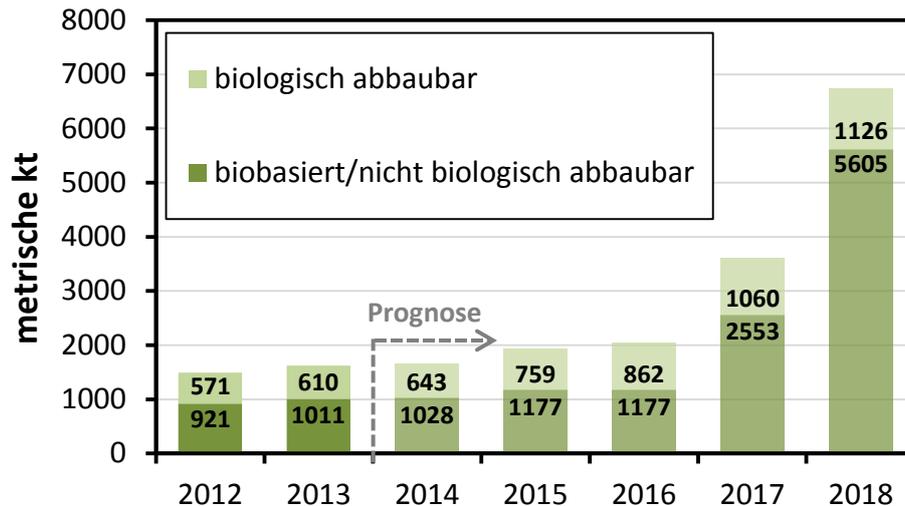


Abbildung 2: Marktentwicklung biologisch abbaubarer und biobasierter Polymere: jährliche Produktion in Kilotonnen.<sup>[3]</sup>

Bei den biologisch abbaubaren Biopolymeren, die in dieser Studie betrachtet wurden, handelt es sich beispielsweise um Zellulose-Derivate, regenerierte Zellulose, Polymilchsäure und andere biologisch abbaubare Polyester (z.B. Polybutyrat, Polyhydroxyalkanoat und diverse Stärkeblends).

### 1.1.2 Biopolymere – Definition

Der Begriff Biopolymer umfasst eine sehr breit gefächerte Klasse an Materialien, welche in unterschiedlichsten Anwendungen zum Einsatz kommen. Aus diesem Grund wird die Bezeichnung „Biopolymer“ häufig missverständlich verwendet und muss zunächst geklärt werden. In einem technischen Bericht (TR: *technical report*) des Europäischen Komitees für Normung (CEN: *Comité Européen de Normalisation*) CEN/TR 15932 wird die Klassifizierung von Biopolymeren in folgende Kategorien empfohlen (Abbildung 3).

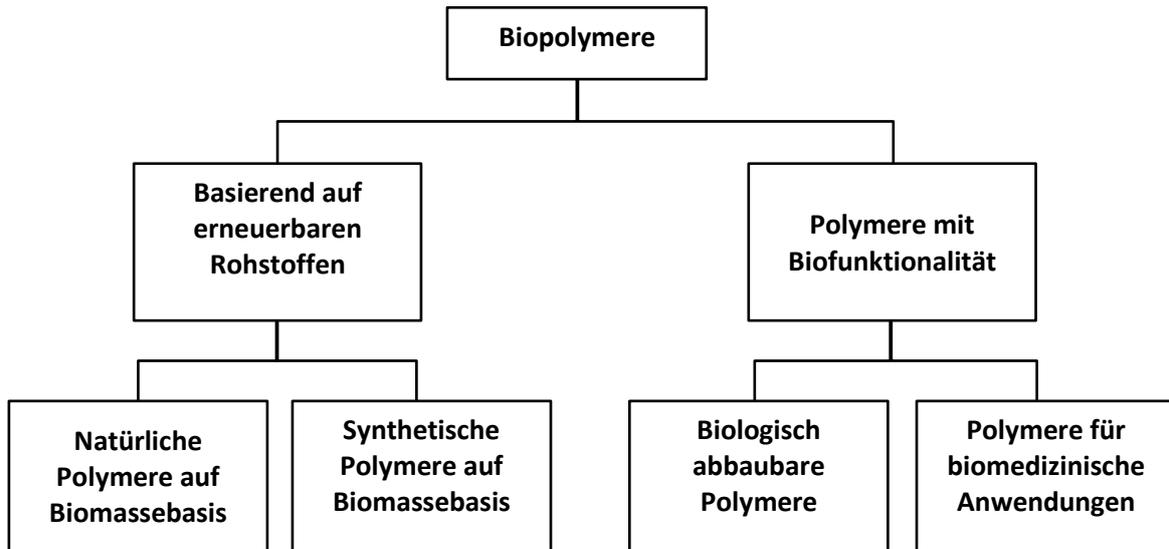


Abbildung 3: Klassifizierung von Biopolymeren nach CEN/TR 15932.<sup>[4]</sup>

Die Bezeichnungen der letzten hierarchischen Ebene aus Abbildung 3 können folgendermaßen spezifiziert werden:

- **Natürliche Polymere auf Biomassebasis**

Von Lebewesen (Tiere, Pflanzen, Algen, Mikroorganismen) hergestellte Polymere (z.B. Chitin, Zellulose, Stärke, Proteine, bakterielle Polyhydroxyalkanoate).

- **Synthetische Polymere auf Biomassebasis**

Monomere werden aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen und anschließend so chemisch transformiert, dass sie polymerisiert werden können (z.B. Polymilchsäure, Ethylen, Polyamid).

- **Biologisch abbaubare Polymere**

Polymere, die nach Erfüllung ihrer Anwendung (z.B. Verpackungsmaterial) biologisch organisch verwertet werden können.

- **Polymere für biomedizinische Anwendungen**

Polymere, die aufgrund ihrer Eigenschaften (z.B. Bioresorbierbarkeit, antimikrobielle Eigenschaften, Biokompatibilität) für den medizinischen Einsatz (z.B. als Implantatmaterial, Wirkstoffreservoir) geeignet sind (z.B. Polycaprolacton).

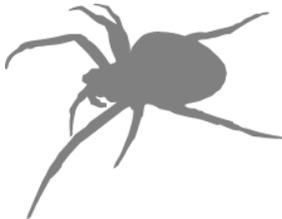
### 1.1.3 Proteine als natürliche Biopolymere

Analog zur klassischen Polymerindustrie haben sich auch im jungen Feld der Biopolymere bereits marktorientierte Anforderungsprofile entwickelt. Für Verpackungen beispielweise sind große Mengen Material zu einem möglichst niedrigen Preis erforderlich, während die Nachfrage im Bereich der Medizintechnik auf Biopolymere mit hochspezifischen funktionellen Eigenschaften abzielt.

Aufgrund ihres vielseitigen Einsatzes in biologischen Systemen sind bei der Entwicklung solcher Hochleistungsbiopolymere in den letzten Jahren vor allem Proteine in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Für gewöhnlich sind Proteine aus zwanzig natürlich vorkommenden L-Aminosäuren aufgebaut, welche durch Peptidbindungen linear miteinander verknüpft werden. Im Stoffwechsel lebender Organismen übernehmen Proteine in Form von Hormonen, Enzymen oder Antikörpern hochspezifische Aufgaben, wobei eine klar definierte räumlich Faltung der Aminosäureketten für die Funktionalität erforderlich ist.<sup>[5]</sup> Strukturproteine hingegen sind Proteine, die meist als Bausteine für biologisches Gewebe dienen und dabei in erster Linie zur mechanischen Stabilisierung beitragen. Zu den bekanntesten dieser Proteinklassen zählen beispielsweise Kollagen (Bindegewebe und extrazelluläre Matrix)<sup>[6]</sup>, Elastin (erhöht Elastizität in Haut, Lunge, Arterien und Herz)<sup>[7]</sup> und Keratin (Haare, Nägel, Federn)<sup>[8,9]</sup>. Es gibt jedoch auch Strukturproteine, die außerhalb des Organismus eingesetzt werden. Zu diesen zählen beispielsweise Fibroin und Sericin, welche von einer Vielzahl Insekten und Spinnen als Bausteine ihrer Seide verwendet werden. Die bekannteste Seidenart ist die Kokonseide des Maulbeerspinners (*Bombyx mori*), die vor allem bei der Herstellung hochwertiger Textilien verwendet wird. Es gibt jedoch noch eine Vielzahl anderer Organismen, die im Laufe ihrer Evolution die Fähigkeit entwickelt haben, Seide für hochspezifische Anforderungen herzustellen. In Tabelle 1 sind einige solcher Seidenproduzenten exemplarisch aufgeführt.

Tabelle 1: Beispiele für Organismen, die Seidenproteine für unterschiedliche Aufgaben herstellen und einsetzen.

Spezies	Einsatz der Seide
 Maulbeerspinner ( <i>Bombyx mori</i> )	Die Larve des Maulbeerspinners verwendet ein Doppelfilament aus Fibroin, welches mit Sericin verklebt ist, um einen Kokon zu spinnen, der sie während ihrer Metamorphose schützen soll. <sup>[10]</sup>

	<p>Köcherfliegen (<i>Trichoptera</i>)</p>	<p>Köcherfliegenlarven leben unter Wasser und nutzen ihre Seide zum Bau eines Schutzgehäuses sowie um Netze für den Beutefang herzustellen. Die Fäden, die sie dabei verwenden bestehen im Kern aus Fibroin und sind mit Sericin ummantelt.<sup>[11,12]</sup></p>
	<p>Florfliegen (<i>Chrysopidae</i>)</p>	<p>Um ihre Eier vor Fressfeinden zu schützen legen Florfliegen einen Tropfen Seidenlösung ab, heben dann ihr Abdomen und ziehen so einen Faden aus der Lösung an dessen Ende ein Ei geklebt wird. Bereits nach wenigen Sekunden ist der Faden ausgehärtet und hält das Ei durch seine biegesteifen Eigenschaften vom Boden fern. Außerdem nutzen Florfliegen ebenfalls Seide um sich während ihrer Metamorphose durch einen Kokon zu schützen.<sup>[13,14]</sup></p>
	<p>Webspinnen (<i>Araneae</i>)</p>	<p>So vielfältig wie sich der Artenreichtum von Webspinnen entwickelt hat ist auch der Einsatz ihrer Seide. Sie nutzen die Proteine für verschiedenste Beutefangstrategien<sup>[15-17]</sup>, zur Selbstsicherung<sup>[18]</sup>, als Kleber<sup>[19,20]</sup>, beim Spinnen ihrer Kokons<sup>[21,22]</sup>, beim Bau von Erdlöchern<sup>[23]</sup>, als Tauchglocke um Luft zu speichern<sup>[24]</sup> und sie verwenden Fäden sogar als Windsegel um zu fliegen<sup>[25]</sup>.</p>

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Eigenschaften, die im Folgenden erörtert werden, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Nutzung von Spinnenseide als Hochleistungsbiopolymer.

## 1.2 Spinnenseide

Spinnen sind hochspezialisierte Jäger, die im Laufe ihrer 400 Millionen Jahre langen Evolutionsgeschichte verschiedenste Lebensräume erschlossen.<sup>[26]</sup> Es gibt Spinnen, die unter Wasser (aquatil), im Erdreich (subterran), sowie auf dem Boden (terricol) oder in Büschen und Bäumen (arboricol) leben. Zu letzteren zählen unter anderem Radnetzspinnen, die sich darauf spezialisiert haben, Fluginsekten zu fangen. Zu diesem Zweck bauen sie Netze aus Seidenfäden, die durch eine einzigartige Kombination aus Festigkeit und Elastizität in der Lage sind die hohe kinetische Energie einfliegender Insekten zu dissipieren.<sup>[27]</sup>

### 1.2.1 Radnetzspinnen und ihre Seide

Der Begriff Spinnenseide umfasst eine Vielzahl unterschiedlicher Seidentypen, da jede Seidenspinnenspezies über ihr individuelles Seidenrepertoire verfügt. Radnetzspinnen verwenden im Gegensatz zum Maulbeerspinner *Bombyx mori* (*B. mori*) über bis zu sieben verschiedene Seidenarten, die hochspezifisch für unterschiedliche Aufgaben adaptiert sind und sich deshalb in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften deutlich unterscheiden. Jede dieser Seidenarten wird in einer separaten Drüse produziert, wobei die Spinne allein für die Konstruktion ihres Netzes bis zu fünf verschiedene Seidenarten nutzt (Abbildung 4).<sup>[28]</sup> Für die Rahmenkonstruktion und die Speichen, welche das stabile Grundgerüst des Netzes bilden, verwendet die Spinne die sogenannte große Ampullenseide (*Dragline*). Diese zeichnet sich durch eine hohe mechanische Stabilität aus und wird von der Spinne ebenfalls zur Selbstsicherung eingesetzt. Die Spinne verfügt über paarige Spinndrüsen mit denen sie ein Doppelfilament verspinnt, wodurch bei der Konstruktion und der Selbstsicherung ein hohes Maß an Sicherheit gewährleistet wird. Bevor sie die eigentliche Fangspirale anbringt, stabilisiert die Spinne die Konstruktion durch eine Hilfsspirale, die aus der sogenannten kleinen Ampullenseide besteht. Für die Fangspirale verwendet sie hingegen ihre Flagelliformseide, die aufgrund ihrer hohen Dehnbarkeit in der Lage ist, die kinetische Energie eines einfliegenden Insekts aufzunehmen ohne dabei zu reißen. Um zu verhindern, dass die Beute vom Netz abrallt werden die Fäden der Fangspirale mit klebriger Aggregatseide beschichtet. Zum Verkleben der Fasern untereinander und zur Befestigung der Fäden an Oberflächen verwendet die Spinne ihre Piriformseide.<sup>[29]</sup>

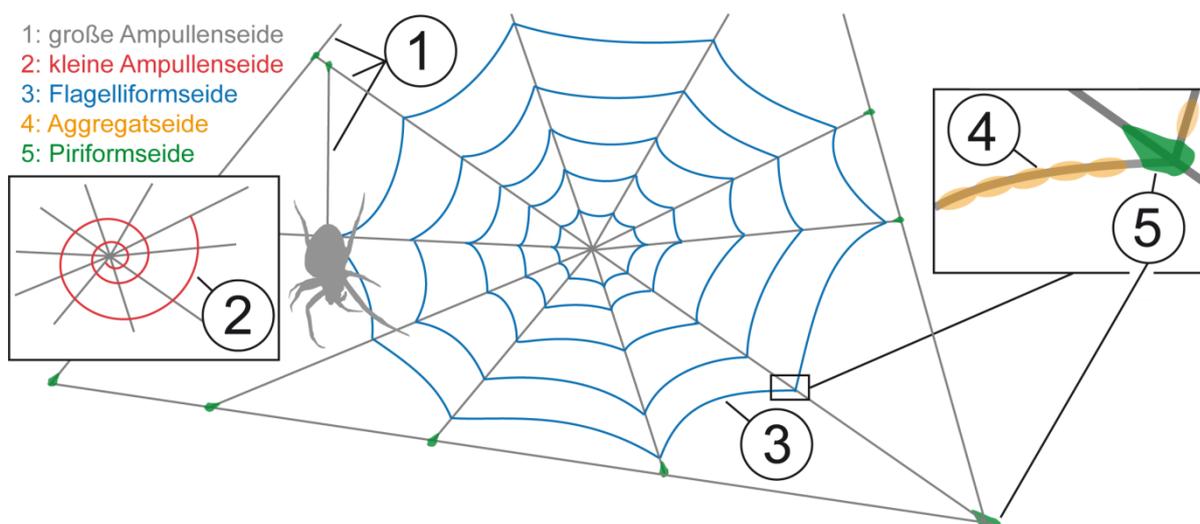


Abbildung 4: Einsatz verschiedener Seidentypen beim Bau eines Spinnennetzes.<sup>[30]</sup>

## 1.2.2 Eigenschaften der großen Ampullenseide (*Dragline*)

Aufgrund ihrer außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften ist besonders die *Dragline*-Seide von Interesse für technische Anwendungen. Sie weist eine hohe Zugfestigkeit bei großer Bruchdehnung auf, was dazu führt, dass sie im Vergleich zu anderen Materialien sehr viel Energie aufnehmen kann, bevor es zum Materialversagen kommt (Tabelle 2). Zudem ist *Dragline*-Seide biokompatibel und kann im Körper abgebaut werden.<sup>[31-33]</sup> Aufgrund der Kombination dieser Eigenschaften besteht auch im medizinischen Bereich großes Interesse an der Nutzung dieser Seide.

Tabelle 2: Mechanische Kennwerte – Spinnenseide im Vergleich mit anderen Materialien.<sup>[34]</sup>

Material	Elastizitätsmodul E (GPa)	Zugfestigkeit $\sigma_{\max}$ (GPa)	Bruchdehnung $\epsilon_{\max}$ (%)	Zähigkeit (MJm <sup>-3</sup> )
<i>A. diadematus Dragline</i>	10	1,1	27	160
<i>B. mori</i> Kokonseide	7	0,6	18	70
Nylonfaser	5	0,95	18	80
Kevlar 49 Faser	130	3,6	2,7	50
Synthetischer Gummi	0,001	0,05	850	100
Hochfester Stahl	200	1,5	0,8	6

Für die Herstellung ihrer *Dragline* verfügt die Spinne über spezielle Zellen, die in der Lage sind, große repetitive Seidenproteine (200-350 kDa)<sup>[35-37]</sup> zu synthetisieren und diese in die Spinndrüse zu sekretieren. Aufgrund ihrer amphiphilen Eigenschaften formieren sich die Proteine zu Mizellen und können auf diesem Weg hochkonzentriert (bis zu 50 % w/v) in wässriger Lösung gespeichert werden.<sup>[38]</sup> Dabei spielen vor allem die nicht-repetitiven Termini der sonst hochgradig repetitiv aufgebauten Proteinketten eine entscheidende Rolle. Aufgrund ihres hydrophilen Charakters inhibieren die amino- und carboxyterminale Domäne die unkontrollierte Proteinaggregation. Die carboxyterminale Domäne führt durch Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer Dimerisierung der Moleküle.<sup>[39,40]</sup> Dies ist entscheidend für die Vorassemblierung der Proteine in eine flüssigkristalline (lyotrope) nematische Phase.<sup>[41,42]</sup> Bei der Faserherstellung durchwandert die Lösung den Spinnkanal, wobei es durch einen Abfall des pH-Wertes zur nicht-kovalenten Dimerisierung der aminoterminalen Domäne kommt, sowie durch Ionenaustausch und Dehydratation bei gleichzeitigem Auftreten von Scherkräften und unter Ausrichtung kristalliner Regionen die Faserassemblierung stattfindet (Abbildung 5).<sup>[43]</sup>

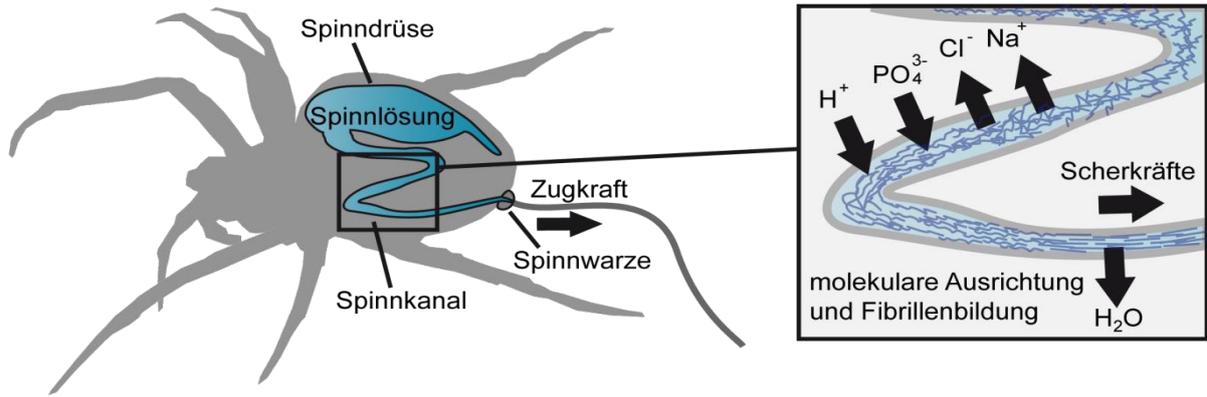


Abbildung 5: Schematische Darstellung des natürlichen Spinnprozesses. Durch den Austausch von Ionen, sowie einer Senkung des pH-Werts und die auftretenden Scherkräfte kommt es beim Durchlaufen der hochkonzentrierten Spinnlösung im Spinnkanal zur Assemblierung der Seidenproteine.<sup>[30]</sup>

Die Struktur der natürlichen *Dragline*-Seide unterliegt einem hierarchisch organisierten Aufbau, der als Voraussetzung für ihre mechanische Funktionalität gilt (Abbildung 6).<sup>[44]</sup> Der Faden hat einen Durchmesser von ca. 3-5  $\mu\text{m}$  (bei *A. diadematus*) und besteht aus einer Mantel-Kern-Struktur. Die äußere Schicht ist aus Lipiden, Glykoproteinen und anderen Seidenproteinen aufgebaut,<sup>[45]</sup> wohingegen der Kern durch ausgerichtete Proteinfibrillen ( $\varnothing$  20-100 nm)<sup>[46]</sup> gebildet wird. Zur Ausbildung von Fibrillen kommt es durch intra- und intermolekulare Assemblierung von kristallinen  $\beta$ -Faltblättern, die in einer amorphen Matrix aus *Random Coils*,  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Schleifen eingebettet sind. Diese Sekundärstrukturen entstehen durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Ketten, wobei die Primärstruktur der Proteine entscheidend ist. Stabile  $\beta$ -Faltblätter enthalten primär die unpolaren hydrophoben Aminosäuren Alanin und Glycin, während sich amorphe Bereiche durch einen hohen Anteil an Prolin in Kombination mit Glycin auszeichnen.<sup>[47,48]</sup>

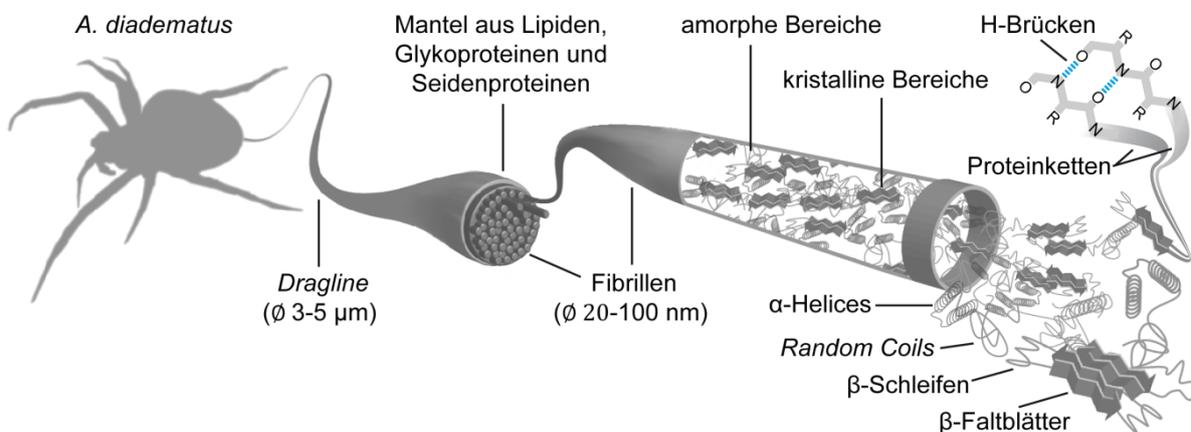


Abbildung 6: Schematische Darstellung des hierarchischen Aufbaus von *A. diadematus* *Dragline*-Seide.

Die hohe Zähigkeit der Spinnenseidenfasern basiert also auf der Verknüpfung von hydrophilen und hydrophoben Blöcken innerhalb und zwischen den Einzelmolekülen, die sich zu amorphen und kristallinen Bereichen anordnen. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften können Seidenproteine folglich als Copolymere betrachtet werden. Im Belastungsfall verformen sich zunächst die amorphen Bereiche, nehmen also Energie auf, während die kristallinen Bereiche eine hohe Zugfestigkeit gewährleisten.

### 1.2.3 Herstellung rekombinanter Spinnenseidenproteine

Da Seidenspinnen aufgrund ihres stark territorialen Verhaltens nicht in großem Stil gezüchtet werden können und die Seidengewinnung aufwändig ist, wurde ein biotechnologisches Verfahren entwickelt, um Seidenproteine rekombinant herzustellen (Abbildung 7).

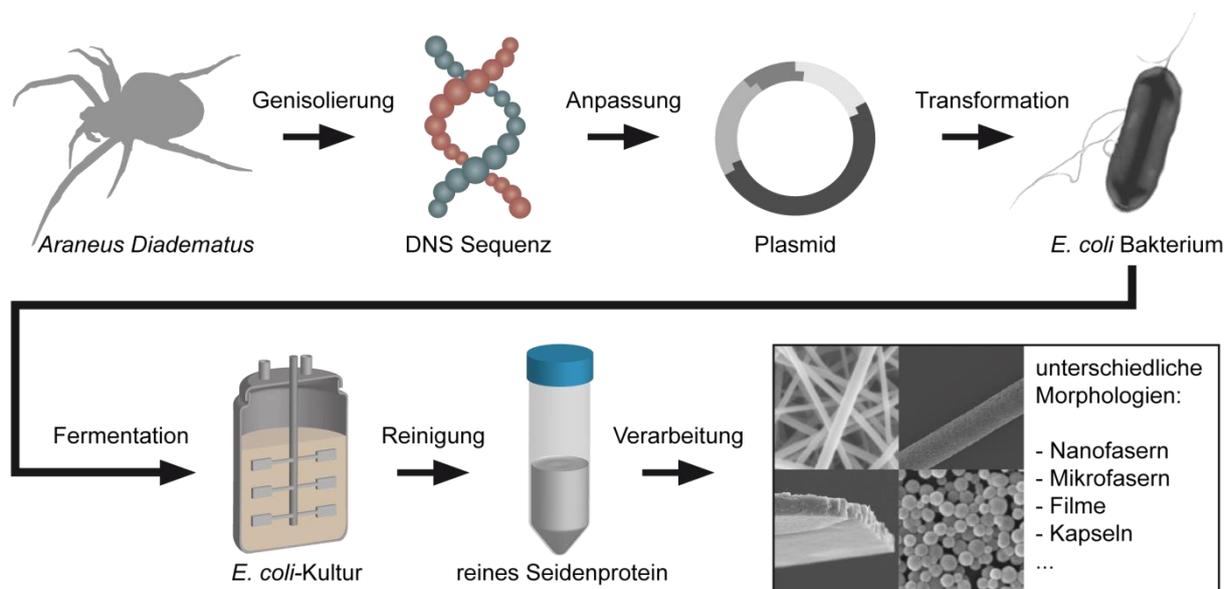


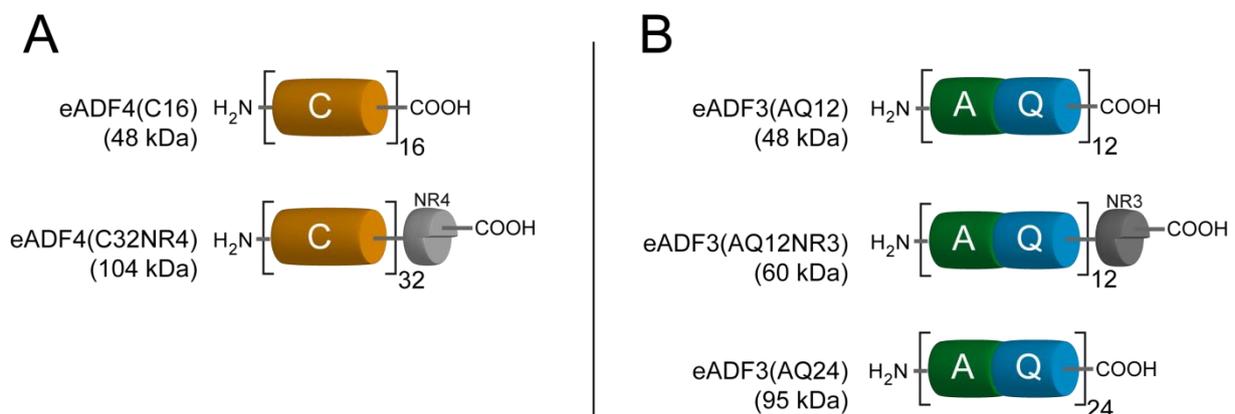
Abbildung 7: Schematische Vorgehensweise auf dem Weg vom natürlichen Vorbild zur technischen Anwendung.<sup>[30]</sup>

Zu diesem Zweck wurde ein Prozess etabliert, bei dem *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien als Wirtsorganismen für die rekombinante Proteinproduktion eingesetzt werden.<sup>[49]</sup> Dabei wurden zunächst repetitive Motive der Kernsequenz von *Dragline*-Proteinen der europäischen Gartenkreuzspinne *Araneus diadematus* (*A. diadematus*) identifiziert und auf deren Basis analoge Konsensussequenzen erstellt. Um zu gewährleisten, dass die genetische Information für die Translation in *E. coli*-Bakterien geeignet ist, wurden die Sequenzen für die entsprechende Kodonverwendung angepasst. Diese Sequenzmodule wurden durch Klonierung multimerisiert und in

einen geeigneten Expressionsvektor integriert.<sup>[50]</sup> Nach Transformation in *E. coli* wurden etablierte Fermentationsprozesse eingesetzt, um die Bakterien in Bioreaktoren zu vermehren. Das Seidenprotein wird intrazellulär produziert, weswegen die Bakterien nach der Fermentation aufgeschlossen und die freigesetzten Seidenproteine von Zelltrümmern und bakteriellen Proteinen gereinigt werden müssen. Hierfür wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, das mehrere hitze- und salzinduzierte Fällungen beinhaltet, wodurch komplett auf kostenintensive chromatographische Schritte verzichtet werden kann. Nachdem die Seidenproteine gereinigt und getrocknet sind, können sie in Lösung gebracht und verarbeitet werden.<sup>[51]</sup>

### 1.2.4 Eigenschaften rekombinanter Spinnenseidenproteine

In dieser Arbeit wurde eADF4 (*engineered A. diadematus Fibroin 4*) durch elektrostatisches Spinnen und eADF3 (*engineered A. diadematus Fibroin 3*) durch Nassspinnen verarbeitet. Wie ihre natürlichen Vorbilder, die MaSp2-Proteine (*Major Ampullate Spidroin 2*) der *Dragline*-Seide von *A. diadematus*, sind auch die rekombinanten Proteine aufgrund der Aneinanderreihung gleicher Motive (C, AQ) hochgradig repetitiv aufgebaut (Abbildung 8). Die molekulare Masse der jeweiligen Proteine ergibt sich aus der Anzahl der modularen Wiederholungen und der Addition von nicht-repetitiven Termini. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem der Einfluss der carboxyterminalen Domänen NR4 (bei eADF4) und NR3 (bei eADF3) untersucht, welche durch Ausbildung von Disulfidbrücken zur Dimersierung der Polymerketten führen (Kapitel 1.2.2).



**Abbildung 8: Modularer Aufbau rekombinanter Spinnenseidenproteine, unterteilt in eADF4- (A) und eADF3-Proteine (B). Die angegebenen Molekulargewichte beziehen sich auf die Monomere. Proteine mit carboxyterminaler Domäne können dimerisieren, was zu einer Verdopplung des angegebenen Molekulargewichts führt.**

Für die Verarbeitung werden die Proteine in Lösung gebracht, wobei unterschiedliche Lösungsmittel wie Hexafluor-2-Propanol (HFIP), Ameisensäure (*Formic Acid*: FA) oder wässrige Systeme verwendet werden können. Es wurde gezeigt, dass sich organische Lösungsmittel (HFIP, FA) eignen, um hohe Proteinkonzentrationen >20 % w/v zu erzielen.<sup>[49]</sup> Bei der Herstellung wässriger Lösungen sind hingegen nur geringere Konzentrationen realisierbar, wobei die Proteine zunächst in einer chaotropen Salzlösung (z.B. 6 M Guanidiniumthiocyanat) gelöst, und anschließend gegen wässrigen Puffer (z.B. Ammoniumhydrogencarbonat, Tris/HCl) dialysiert werden müssen.<sup>[52]</sup> Die Wahl des Lösungsmittels hat zugleich einen starken Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine nach der Verarbeitung. HFIP ist ein sehr gutes Lösungsmittel, welches  $\alpha$ -Helices induziert. Dadurch weist die Proteinstruktur nach dem Austrocknen nur verhältnismäßig geringe kristalline Anteile auf, wohingegen Wasser und Ameisensäure zu höheren kristallinen  $\beta$ -Faltblatt-Anteilen führen.<sup>[53]</sup> Die Sekundärstruktur ist vor allem in Hinsicht auf weiterführende Anwendungen von Bedeutung, da die Ausbildung kristalliner Bereiche zur Wasserunlöslichkeit der Proteine führt. Eine derartige Stabilisierung der Proteine kann jedoch auch nachträglich durch Behandlung der Seiden-Formkörper induziert werden. Bei Seidenproteinen wurde gezeigt, dass sich dafür kosmotrope Salzlösungen (z.B. Phosphatpuffer)<sup>[54,55]</sup>, Hitze<sup>[56]</sup> und Druck<sup>[57]</sup>, mechanisches Dehnen<sup>[58-60]</sup>, Wasserdampf<sup>[61-63]</sup>, sowie einwertige Alkohole wie Methanol<sup>[52,64,65]</sup>, Ethanol<sup>[66-68]</sup> oder 2-Propanol<sup>[58,69]</sup> eignen. Nach der Behandlung ist die Seidenstruktur wasserfest und kann für entsprechende Anwendungen (z.B. Implantate, Filter etc.) eingesetzt werden.

### 1.3 Elektrostatisches Spinnen

Der Begriff des elektrostatischen Spinnens umfasst eine Klasse von Prozessen, bei denen durch gezielten Einsatz elektrostatischer Kräfte Fasern erzeugt werden. Das Verfahren ist eng mit der vielseitig eingesetzten Methode des Elektrospühens verwandt, bei der elektrostatische Kräfte zur Generierung feiner Flüssigkeitstropfen eingesetzt werden (Anwendungen: Lackverarbeitung, Tintenstrahldrucker, Massenspektrometrie, Brennstoffeinspritzung)<sup>[70-72]</sup>. In der Literatur erschien das elektrostatische Spinnen erstmals im Jahre 1902.<sup>[73]</sup> Zwischen 1934 und 1944 wurden einige Patente von Anton Formhals angemeldet, in denen er den experimentellen Aufbau zur Faserproduktion durch die Injektion gelöster Polymere in ein elektrisches Feld beschrieb.<sup>[74-77]</sup> In den wissenschaftlichen Fokus rückte die Methode allerdings erst in den 1990ern, wobei sich insbesondere die Gruppe um Reneker et al. hervortat.<sup>[78,79]</sup> Angetrieben von der Entwicklung neuer synthetischer Materialien und der Erschließung moderner Anwendungsgebiete, wie beispielsweise

die Nanotechnologie oder Medizintechnik, nahm in den letzten zehn Jahren das wissenschaftliche Interesse am elektrostatischen Spinnprozess stetig zu.

### 1.3.1 Vergleich mit anderen Faserherstellungsverfahren

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Prozesse zum Faserspinnen verschiedener Materialien entwickelt, die meistens auf der Verarbeitung von Schmelzen oder Lösungen basieren (Ausnahme: Emulsionen). Dabei spielen vor allem die physikochemischen Eigenschaften des zu verspinnenden Polymers eine wichtige Rolle. Je nachdem, ob das Material aus einer Schmelze oder Lösung verarbeitet werden kann, kommen verschiedene Spinnverfahren in Frage (Abbildung 9).

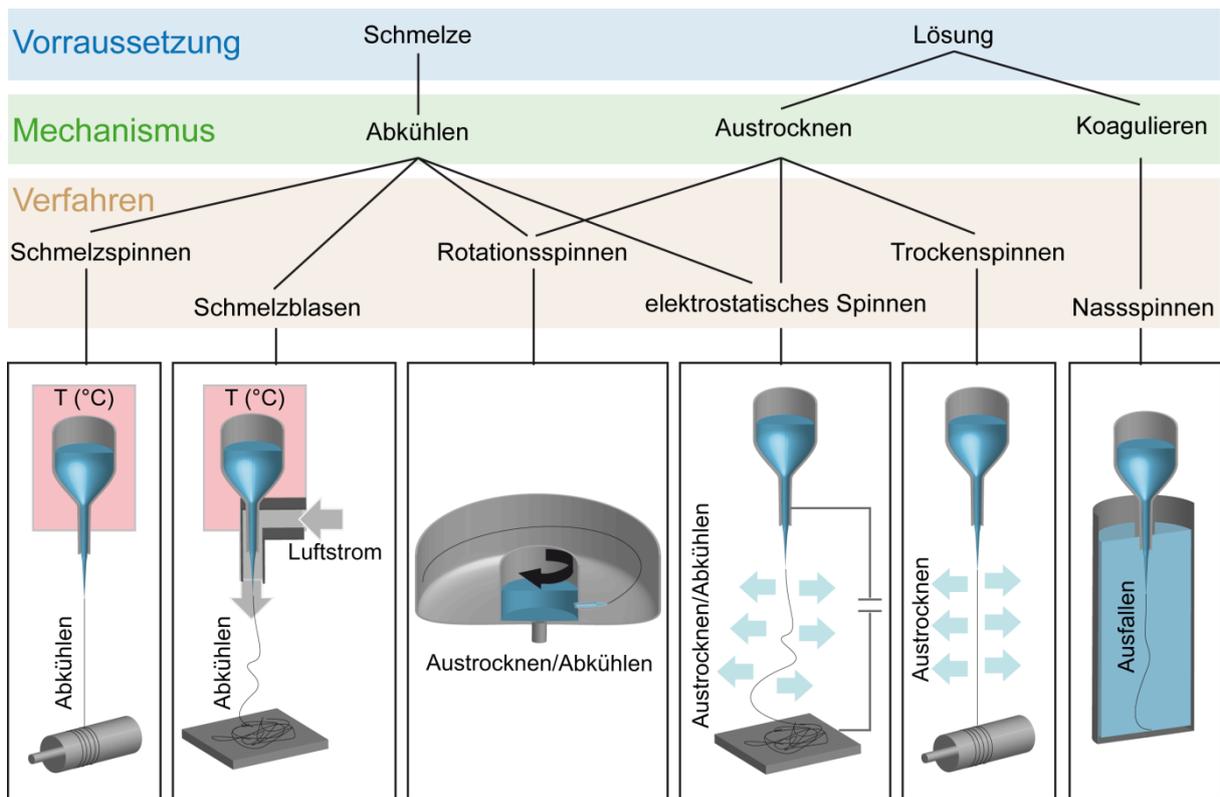


Abbildung 9: Einordnung verschiedener Faserspinnverfahren in die zugrundeliegenden Verarbeitungsmechanismen von Schmelzen (Aushärten durch Abkühlen) und Lösungen (Aushärten durch Austrocknen oder Koagulation).

Makromoleküle aus linearen oder verzweigten Ketten, deren zwischenmolekulare Wechselwirkungen durch Wärmezufuhr gelöst werden können nennt man Thermoplaste. Sie werden in der Regel aus einer Schmelze verarbeitet, da auf diesem Weg auf den Einsatz von

Lösungsmitteln verzichtet werden kann. Schmelzen werden durch Schmelzspinnen,<sup>[80]</sup> Schmelzblasen,<sup>[81]</sup> Rotationsspinnen<sup>[82]</sup> und elektrostatisches Spinnen<sup>[83]</sup> zu Fasern verarbeitet. Im großen Maßstab kommerzialisiert wurde beispielsweise das Schmelzspinnen von Polyamidfasern (Nylon) und Polyester.<sup>[84]</sup>

Polymere die nicht oder lediglich unter Zersetzung schmelzen können, sofern sie sich lösen lassen, aus Lösungen verarbeitet werden. Derartige Lösungen werden durch Austrocknen oder Koagulieren versponnen. Um ersteres zu erreichen, kann das Rotationsspinnen (Nutzung von Fliehkräften zur Strahlbildung),<sup>[85]</sup> das elektrostatische Spinnen<sup>[86]</sup> oder das Trockenspinnen<sup>[87]</sup> eingesetzt werden, wohingegen für das Koagulieren der Lösungen ein Fällbad verwendet wird und somit nur das Nassspinnverfahren in Frage kommt.<sup>[87]</sup> Das prominenteste Beispiel für die großindustrielle Umsetzung derartiger Verfahren sind Viskosefasern (Rayon), die durch Nassspinnen chemisch behandelte Cellulose aus Natronlauge hergestellt werden.<sup>[88,89]</sup>

Die Wahl des Verfahrens hängt zudem von der gewünschten Fasermorphologie ab (Abbildung 10). Um Einzelfasern mit Durchmessern im Mikrometerbereich herzustellen eignen sich Schmelz-, Trocken- und Nassspinnverfahren. Ferner können durch Verwendung geeigneter Spindüsen mehrere Fasern versponnen und direkt zu Garnen verdrillt werden.<sup>[87]</sup> Durch elektrostatisches Spinnen, Rotationsspinnen und Schmelzblasen können Einzelfasern oder Vliesstoffe mit Faserdurchmessern im Mikro- bis Nanometerbereich produziert werden.

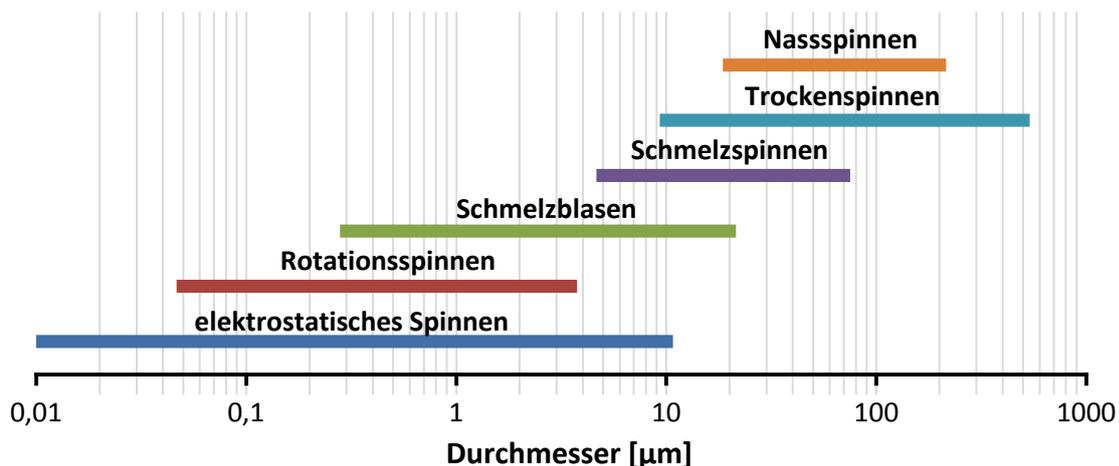


Abbildung 10: Übersicht über erzielbare Faserdurchmesser verschiedener Spinnverfahren: elektrostatisches Spinnen,<sup>[79]</sup> Rotationsspinnen,<sup>[90]</sup> Schmelzblasen,<sup>[91]</sup> Schmelzspinnen,<sup>[92]</sup> Trockenspinnen,<sup>[93]</sup> Nassspinnen<sup>[93]</sup>.

### 1.3.2 Vorteile und potentielle Anwendungen

Bei vielen Anwendungen wie etwa der Filtration<sup>[94]</sup>, der Katalyse<sup>[95]</sup>, der Sensorik<sup>[96]</sup> sowie der Herstellung medizinischer Produkte<sup>[97]</sup> ist es erforderlich, über Fasern mit Durchmessern im Submikro- oder Nanometerbereich zu verfügen. Für die Verarbeitung von Polymerlösungen in derartige Fasern kommen primär das elektrostatische Spinnen oder das Rotationsspinnen in Frage, wobei ersteres einige Vorteile bietet. Das Basissetup besteht beim elektrostatischen Spinnen lediglich aus einer Pumpe, einer Kapillare und einer Hochspannungsquelle (Kapitel 1.3.3) und funktioniert ohne aufwändige mechanische Bauteile, wie zum Beispiel dem Rotor beim Rotationsspinnen. Ferner können beim elektrostatischen Spinnen aufgrund des einfachen Aufbaus zahlreiche spezifische Modifikationen des Prozesses vorgenommen werden. So ist es beispielsweise möglich, komplexe Strukturen wie Kern-Mantel-, Hohl- oder Janusfasern herzustellen.<sup>[98-100]</sup> Außerdem können durch Verwendung von speziellen Kollektorsystemen anstelle von ungeordneten Vliesen ausgerichtete Fasern versponnen werden.<sup>[101]</sup> Das elektrostatische Spinnen ermöglicht dabei die schnelle Herstellung (bis zu mehrere hundert Meter Faser pro Sekunde)<sup>[102]</sup> kontinuierlicher Fasern mit kleinen Durchmessern von bis zu wenigen Nanometern.<sup>[103,104]</sup> Die Einstellung gewünschter Faserdurchmesser erfolgt auf einfache Weise über die Konzentration der Lösung (Kap.1.3.4.1). Zur Veranschaulichung der großen Bandbreite realisierbarer Faserdurchmesser beim elektrostatischen Spinnen sind in Abbildung 11 die Größenordnungen verschiedener Fasertypen zum Vergleich aufgeführt.

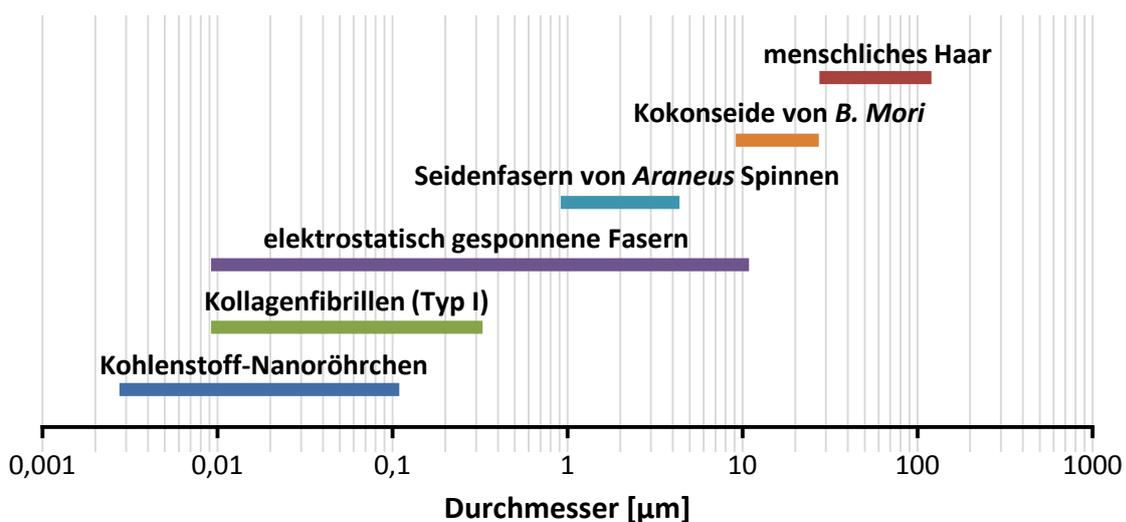


Abbildung 11: Größenordnungen von: Kohlenstoff-Nanoröhrchen<sup>[105]</sup>, Kollagenfibrillen<sup>[106]</sup>, elektrostatisch gesponnenen Fasern<sup>[107]</sup>, *Araneus (diadematus, sericatus, gemma)* Seidenfäden<sup>[108]</sup>, *B. Mori* Kokonseide<sup>[108]</sup>, menschlichen Haaren<sup>[109]</sup>.

Das Verfahren ist für nahezu alle Materialien, die gelöst oder geschmolzen werden können, einsetzbar. Aus der Literatur wurde entnommen, dass bereits über 50 verschiedene Polymere, meist aus Lösung, elektrostatisch versponnen wurden.<sup>[101]</sup> Es wurden synthetische und natürliche Polymere, Polymermischungen und mit Chromophoren, Nanopartikeln oder medizinischen Wirkstoffen beladene Polymere zu Fasern verarbeitet.<sup>[110,111]</sup> Durch die Flexibilität des Verfahrens öffnet sich sowohl im technischen als auch im medizinischen Bereich ein weites Feld potentieller Applikationen (Abbildung 12).

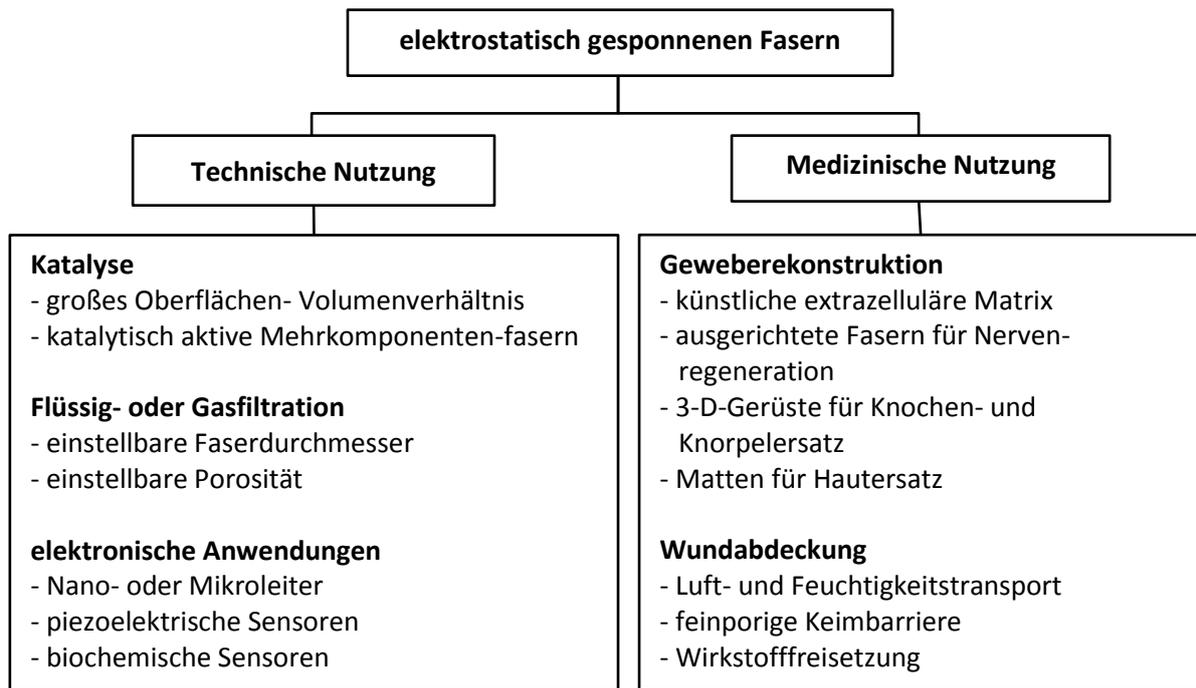


Abbildung 12: Anwendungsgebiete für elektrostatisch gesponnene Fasern im technischen (Katalyse<sup>[112-114]</sup>, Filtration<sup>[67,115,116]</sup>, Elektrotechnik<sup>[117-119]</sup>) sowie im medizintechnischen Bereich (Geweberekonstruktion<sup>[120-124]</sup>, Wundabdeckung<sup>[125]</sup>).

### 1.3.3 Funktionsweise des elektrostatischen Spinnprozesses

Dem elektrostatischen Spinnen liegt ein relativ einfaches Funktionsprinzip zugrunde – aus einem Reservoir (z.B. Spritze) wird mittels einer Pumpe (z.B. Spritzenpumpe) eine Lösung (oder Schmelze) zu einer leitfähigen Kapillare (z.B. Kanüle) gefördert, die mit einer Hochspannungsquelle verbunden ist (üblicher Spannungsbereich: 0-30 kV)<sup>[126]</sup>. Auf der gegenüberliegenden Seite ist im Abstand von einigen Zenti- bis Dezimetern ein Kollektor (z.B. einfache Metallplatte) positioniert, der entweder geerdet oder entgegengesetzt geladen ist (Abbildung 13, A). Somit bildet sich aufgrund der

Ladungsdifferenz ein elektrisches Feld zwischen der Kapillare und dem Kollektor aus, welches zur elektrostatischen Ladung der Lösung an der Phasengrenze Lösung/Luft führt.<sup>[127]</sup> Durch die hohe Ladungsdichte an der Phasengrenze kommt es zu gegenseitigen Ladungsabstoßungen, während zudem eine Coulomb-Kraft aufgrund des externen elektrostatischen Feldes auftritt.<sup>[128]</sup> Diesen Kräften entgegengesetzt wirken die Oberflächenspannung und die Elastizität der Flüssigkeit.<sup>[129]</sup> Mit zunehmender Feldstärke kommt es zu einer Verformung der hemisphärischen Oberfläche der Lösung in eine konische Form, dem sogenannten Taylor-Konus, benannt nach dem britischen Mathematiker und Physiker Geoffrey Ingram Taylor.<sup>[130]</sup> Durch weitere Erhöhung der Feldstärke erreicht die Ladungsdichte einen kritischen Wert bei dem die elektrostatischen Kräfte überwiegen, was zur Instabilität des Konus und Ablösung eines Flüssigkeitsstrahls an dessen Spitze führt (Abbildung 13, B).<sup>[131-133]</sup>

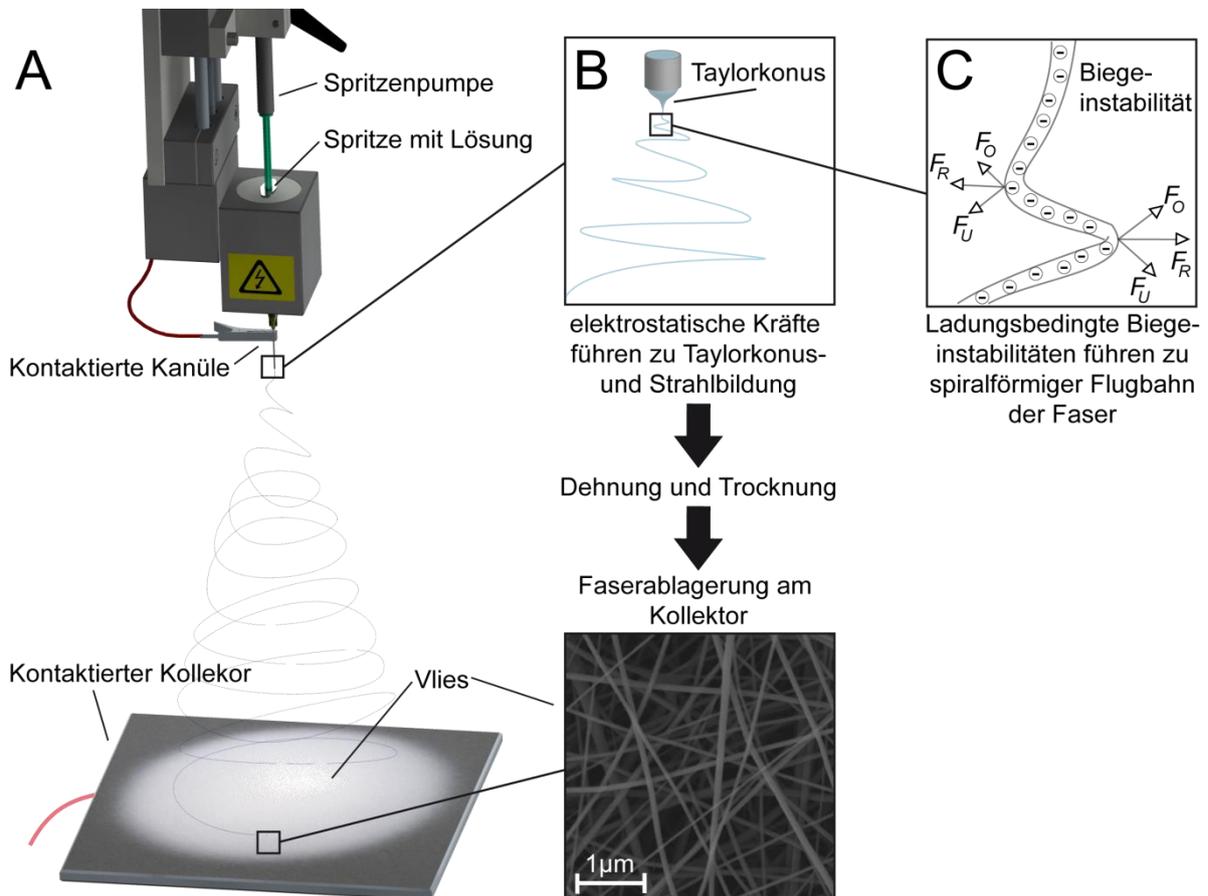


Abbildung 13: Aufbau zum elektrostatischen Spinnen, bestehend aus Spritzenpumpe mit befüllter Spritze und kontaktierter Kanüle, sowie Kollektorplatte (A). Bei ausreichend hoher Spannung kommt es an der Spitze des Taylor-Konus zum Ablösen eines Lösungsstrahls, der auf seiner Flugbahn zum Kollektor gedehnt wird und austrocknet (B). Aufgrund von Coulomb-Abstoßungen innerhalb der Faser treten Biegeinstabilitäten auf, die zu einer spiralförmigen Flugbahn und verstärkten Dehnung der Faser führen (C).

Im weiteren Verlauf wird der Strahl im elektrischen Feld beschleunigt und gedehnt. Dabei treten aufgrund von Biegeinstabilitäten Abstoßungen zwischen den gleich geladenen Segmenten des Strahls auf (Abbildung 13, C).<sup>[134]</sup> An seiner Biegung erfährt der Strahl durch die Ladungen im darüber liegenden Segment eine Kraft  $F_U$  nach unten und außen, wohingegen die Ladung des Segments unterhalb der Biegung eine Kraft  $F_O$  nach oben und außen bewirkt. Es resultiert eine radiale Kraft  $F_R$ , welche mit der zunehmenden Krümmung des Strahls ansteigt, wobei der Strahl immer stärker gedehnt wird. Dieser Prozess kann auf mehreren Ebenen stattfinden, was zum Auftreten weiterer Spiralen innerhalb der vorhergehenden Spiralen führen kann. Gleichzeitig verdampft das Lösungsmittel aus dem Strahl und die Viskosität der Lösung nimmt zu, bis der Faden schließlich komplett ausgetrocknet ist und sich als ungeordnetes Vlies auf der Kollektorplatte ablegt.

Der Vorgang der Strahlbildung und Auslenkung aufgrund von Biegeinstabilitäten wurde in zahlreichen Arbeiten mathematisch modelliert und simuliert. So wurden beispielsweise lineare (Shin et al.<sup>[135]</sup>), und nichtlineare Modelle (Hohman et al.<sup>[132]</sup>, Reneker et al.<sup>[136]</sup>, Yarin et al.<sup>[137]</sup>) für die Biegedynamik des Lösungsstrahls im elektrischen Feld aufgestellt, ein allometrischer Zusammenhang zwischen Elektrodenabstand und Faserdurchmesser beschrieben (He et al.<sup>[138]</sup>), sowie das parallele Verspinnen mehrerer Fasern (Theron et al.<sup>[139]</sup>) modelliert. Es wurde gezeigt, dass experimentelle Beobachtungen durch die Modelle in guter Korrelation beschrieben werden können.<sup>[131,133,136,137,140]</sup>

### 1.3.4 Parameter beim elektrostatischen Spinnen

Beim elektrostatischen Spinnverfahren können sowohl Lösungen als auch Schmelzen versponnen werden. Da in dieser Arbeit mit Protein- und Polymerlösungen gearbeitet wurde, werden im Folgenden primär die Parameter beim Verspinnen von Lösungen erörtert.

#### 1.3.4.1 Einfluss der Spinnlösung beim elektrostatischen Spinnen

Die Eigenschaften der Spinnlösung werden, sofern keine zusätzlichen Additive beigefügt sind, im Wesentlichen durch das zu verarbeitende Polymer und das Lösungsmittel bestimmt. Für die Formation eines Strahls muss beim elektrostatischen Spinnen zunächst die Oberflächenspannung der Lösung überwunden werden, welche primär vom verwendeten Lösungsmittel abhängt. Ein häufig beobachtetes Problem ist dabei das Auftreten von sphärischen Ausprägungen in den Fasern, welche darauf zurückgeführt werden, dass es aufgrund der kapillaren Kräfte der Oberflächen-

spannung zu Fließinstabilitäten und somit Kontraktion des Strahls kommen kann (Abbildung 14).<sup>[141,142]</sup>

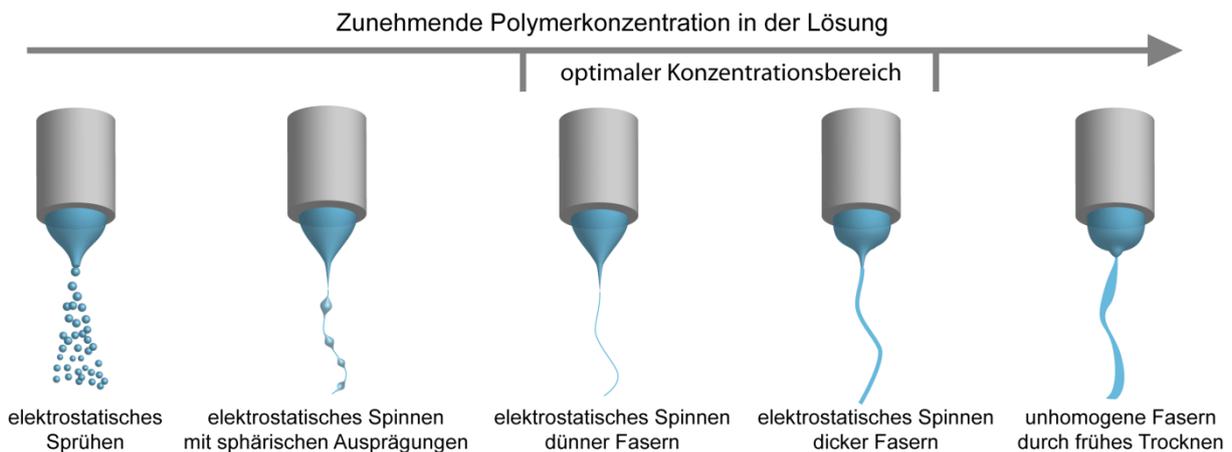


**Abbildung 14:** Auftreten sphärischer Ausprägungen beim elektrostatischen Spinnen: Im Idealfall wird aufgrund elektrostatischer Kräfte  $F_{el}$  eine stabile Strömung des Strahls erreicht, die zu Fasern mit homogenen Durchmessern führt (A). Bei hoher Oberflächenspannung kann es jedoch aufgrund kapillarer Kräfte  $F_{kap}$  zur Kontraktion der Faser kommen, was in Fasern mit sphärischen Ausprägungen resultiert (B).

Yang et al.<sup>[143]</sup> zeigten den Einfluss der Oberflächenspannung beim Verspinnen konstanter Konzentrationen von Polyvinylpyrrolidon (PVP) aus Ethanol, Dichlormethan (DMC) und Dimethylformamid (DMF), wobei mit Ethanol aufgrund der niedrigen Oberflächenspannung homogene Faserdurchmesser versponnen wurden, während es bei DMC und DMF zur Ausbildung sphärischer Ausprägungen kam. Somit stellt die Oberflächenspannung der Lösung eine entscheidende Randbedingung beim elektrostatischen Spinnprozess dar.<sup>[144]</sup> In wässrigen Systemen wurde die Oberflächenspannung beispielsweise durch Zugabe von Ameisensäure herabgesetzt und auf diese Weise geeignete Bedingungen für das elektrostatische Spinnen geschaffen.<sup>[145]</sup>

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Leitfähigkeit der Lösung. Wie in Kapitel 1.3.3 beschrieben wird die Lösung durch das elektrische Feld geladen, was aufgrund der coulombschen Abstoßungen zur Bildung des Taylor-Konus und Strahlablösung führt. Je höher also die Leitfähigkeit der Lösung ist, desto größer ist die Oberflächenladungsdichte an der Phasengrenze, was die Ausbildung des Taylor-Konus begünstigt.<sup>[146]</sup> Durch Einsatz von ionisierbaren Salzen als Additive kann die Leitfähigkeit der Lösung erhöht werden, wobei in der Literatur zwei Folgeeffekte beschrieben wurden. Einerseits kann es aufgrund einer Erhöhung der Flussrate am Taylor-Konus zu einer Vergrößerung der Faserdurchmesser kommen.<sup>[141,147-149]</sup> Dementgegen wirkt jedoch, dass im darauf folgenden Verlauf der Faserbildung eine höhere Ladung des Strahls zur stärkeren Dehnung im elektrischen Feld führt, was wiederum kleinere Faserdurchmesser zur Folge haben kann.<sup>[150,151]</sup> Ferner wurde gezeigt, dass durch Salzzugabe die Formation sphärischer Ausprägungen reduziert werden kann.<sup>[152,153]</sup>

Einer der wichtigsten Parameter beim elektrostatischen Spinnen ist die Viskosität, da sie einen entscheidenden Einfluss auf die Fasermorphologie hat.<sup>[154,155]</sup> Sie wird vorwiegend durch die Konzentration der Lösung und das Molekulargewicht des Polymers bedingt. Bei der Faserbildung ist eine ausreichende Verstrickung der Polymerketten im Lösungsstrahl erforderlich um stabile Fließbedingungen zu schaffen. Diese ist maßgeblich von der Länge der Polymerketten abhängig. Gupta et al.<sup>[156]</sup> zeigten anhand von Polymethylmethacrylat, welches unter Variation des Molekulargewichts (12,5 – 365,7 kDa) bei konstanter Konzentration versponnen wurde, dass es bei niedrigem Molekulargewicht zum Strömungsabriss und somit elektrostatischen Sprühen kam, wohingegen mit großen Molekulargewichten bei gleichen Prozessparametern Fasern hergestellt werden konnten. Das am besten geeignete Mittel zur Kontrolle über die Fasermorphologie ist jedoch die Konzentration der Spinnlösung (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Einfluss der Polymerkonzentration beim elektrostatischen Spinnen aus Lösungen: Ist die Konzentration zu niedrig kommt es zum elektrostatischen Sprühen. Durch Konzentrationssteigerung können zunächst Fasern mit sphärischen Ausprägungen und schließlich homogene Fasern hergestellt werden. Ist die Konzentration zu hoch, kommt es zum vorzeitigen Austrocknen der Lösung und es entstehen keine oder inhomogene Fasern.**

Wenn die Konzentration zu niedrig ist kommt es aufgrund der unzureichenden molekularen Verstrickung der Polymerketten zum Strömungsabriss am Taylor-Konus und es tritt elektrostatisches Sprühen auf.<sup>[157]</sup> Durch Erhöhung der Konzentration können zunächst Fasern mit sphärischen Ausprägungen generiert werden, wohingegen durch weitere Konzentrationssteigerung homogene Fasern hergestellt werden können.<sup>[101,158]</sup> In diesem Bereich kann die Konzentration der Lösung zur Kontrolle über die resultierenden Faserdurchmesser genutzt werden, da höhere Konzentrationen mehr Polymermasse enthalten und zudem schneller Austrocknen, wodurch der Strahl im Feld weniger gedehnt wird.<sup>[126]</sup> Wird die Konzentration jedoch zu hoch, so destabilisiert sich die Strömung

aufgrund zu schnellen Austrocknens und es kommt zur Ausbildung inhomogener Fasern oder sogar zum Abriss der Strömung und Fragmentierung der Fasern.<sup>[154,159,160]</sup> Somit spielt also auch die Flüchtigkeit des Lösungsmittels eine entscheidende Rolle beim elektrostatischen Spinnen. Wenn das Lösungsmittel zu langsam verdunstet entsteht keine stabile Faser und der Strahl zerfließt beim Auftreffen auf den Kollektor.<sup>[161]</sup> Um ideale Bedingungen zu schaffen werden deshalb präferentiell leicht flüchtige Lösungsmittel eingesetzt und, wenn erforderlich, durch Beimischen von weniger flüchtigen Lösungsmitteln die Trocknungsgeschwindigkeit optimiert.<sup>[162]</sup>

### 1.3.4.2 Prozessparameter beim elektrostatischen Spinnen

Die Grundvoraussetzung beim elektrostatischen Spinnen ist ein elektrisches Feld, welches ausreichend stark ist, um die nötige Kraft zur Überwindung der Oberflächenspannung der Lösung zu induzieren. Der Einfluss der elektrischen Feldstärke auf die resultierenden Faserdurchmesser wurde in der Literatur jedoch kontrovers beschrieben und scheint vom jeweiligen Polymer/Lösungsmittel-System abzuhängen. So wurde beispielsweise beim Verspinnen von Polymethylmethacrylat (PMMA) aus Dimethylformamid/Dichlormethan (DMF/DCM) und beim Verspinnen von wässriger Polyvinylalkohollösung kein signifikanter Einfluss der angelegten Spannung registriert.<sup>[163,164]</sup> Beim elektrostatischen Spinnen von Polyacrylnitril aus DMF hingegen wurde eine Zunahme des Faserdurchmessers mit der Höhe der angelegten Spannung verzeichnet.<sup>[165]</sup> Vergleichbare Ergebnisse wurden mit anderen Polymer/Lösungsmittel-Systemen ermittelt, wobei die Zunahme der Faserdurchmesser auf einen erhöhten Volumenstrom durch größere elektrostatische Kräfte zurückgeführt wurde.<sup>[128,166,167]</sup> Der gegenteilige Effekt wurde beim Verspinnen von Polycaprolacton (PCL) in Methanol/DCM (mit 0,06 % NaCl) registriert, da hier durch Erhöhung der Spannung kleinere Fasern entstanden.<sup>[168]</sup> Auch dieses Phänomen wurde vielfach beschrieben, wobei als Ursache eine größere Dehnung der Faser aufgrund der größeren elektrostatischen Kräfte zugrunde gelegt wurde.<sup>[169-171]</sup> Aus den Veröffentlichungen lässt sich schließen, dass es bei Erhöhung der elektrischen Feldstärke zu zwei kompetitiven Phänomenen, nämlich einer Zunahme des Volumenstroms bei gleichzeitig verstärkter Dehnung des Strahls, kommt. Die Flussrate muss dabei an die Feldstärke angepasst werden, da sonst ab einer kritischen Feldstärke der Volumenstrom am Taylor-Konus die Flussrate übersteigt, wodurch mehr Lösung abgezogen als nachgeliefert wird. In diesem Fall treten wiederum Fließinstabilitäten auf, die zu sphärischen Ausprägungen der Fasern oder gar Strömungsabriss führen können.<sup>[172,173]</sup>

Der Einfluss der Flussrate wurde von verschiedenen Gruppen untersucht, die stets eine Zunahme der Faserdurchmesser mit steigender Flussrate verzeichneten.<sup>[174,175]</sup> Dabei muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass eine Anpassung der Spannung erforderlich ist, um den Taylor-Konus zu stabilisieren.<sup>[176]</sup> Die Flussrate ist also kein Parameter, um den Prozess aktiv zu kontrollieren, sondern sollte den übrigen Prozessparametern angepasst werden.

Der Abstand zwischen Kapillare und Kollektor spielt eine entscheidende Rolle beim elektrostatischen Spinnen, da er die Flugdauer der Faser vor der Ablage auf dem Kollektor bestimmt. Der Abstand muss groß genug sein, um das Austrocknen der Faser vor Erreichen des Kollektors zu ermöglichen. Dies ist besonders bei Lösungen mit weniger flüchtigen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel wässrigen Lösungen, von Bedeutung.<sup>[145]</sup> Ferner kann eine Vergrößerung des Abstands zu einer Verjüngung der Fasern führen, da sie länger den Kräften im elektrostatischen Feld ausgesetzt sind.<sup>[177]</sup> Die Feldstärke verhält sich invers zum Spinnabstand, wodurch bei Vergrößerung der Distanz eine Anpassung der Spannung erforderlich ist, um die Stabilität des Taylor-Konus aufrecht zu erhalten.<sup>[178]</sup>

Als leitfähige Kapillaren werden häufig einfache medizinische Kanülen eingesetzt. Untersuchungen der resultierenden Faserdurchmesser unter Verwendung von Kanülen mit unterschiedlichen Innendurchmessern ergaben, dass die Faserdurchmesser tendenziell zunahm, der Einfluss jedoch meist nur gering oder vernachlässigbar war.<sup>[179-181]</sup>

Auch die Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit können einen direkten Einfluss auf die Vorgänge beim elektrostatischen Spinnen haben. Dabei spielt vor allem die Sensitivität des Polymer/Lösungsmittel-System auf Veränderungen der Umgebung eine entscheidende Rolle. De Vrieze et al.<sup>[182]</sup> versponnen Polyvinylpyrrolidon (PVP) aus Ethanol sowie Celluloseacetat (CA) aus 2:1 Aceton:Dimethylacetamid unter Variation der Luftfeuchtigkeit und Temperatur. Die Faserdurchmesser von PVP nahmen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ab, was auf die Wasseraufnahme der Lösung aus der Umgebung zurückgeführt wurde. Somit verlangsamte sich der Trockenvorgang der Fasern und sie wurden länger im elektrischen Feld gedehnt. Bei CA hingegen führte die Luftfeichtigkeitsaufnahme zur Verdünnung des Lösungsmittels, was das Ausfallen von CA und somit die Assemblierung der Faser beschleunigte. In diesem Fall entstanden dickere Fasern, da die Dauer der Dehnung durch die Luftfeuchtigkeit verkürzt wurde. Für die Temperatur wurden zwei kompetitive Phänomene beschrieben - zum einen beschleunigt die höhere Temperatur die Trocknung der Faser, was die Dehnung reduziert, auf der anderen Seite kann sie jedoch zur Reduzierung der Viskosität und somit stärkeren Dehnung der Lösung führen. Es wurde also gezeigt, dass der Einfluss der Umgebungsbedingungen stark von den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lösung abhängt.

### 1.3.4.3 Zusammenfassung der Parameter beim elektrostatischen Spinnen

In Kapitel 1.3.4.1 und 1.3.4.2 wurden die wichtigsten Parameter beim elektrostatischen Spinnen erörtert. Die Einflüsse lassen sich in drei Kategorien einteilen: Es gibt Parameter, die zur Ausbildung dünner Fasern beitragen und solche, die eine Zunahme der Faserdurchmesser bewirken. Die dritte Kategorie besteht aus Parametern, die systemspezifisch sowohl eine Verdickung als auch eine Verjüngung von Fasern herbeiführen können. Hierbei treten kompetitive Phänomene auf, deren resultierender Effekt hochgradig von den physikalisch-chemischen Eigenschaften des jeweiligen Polymer/Lösungsmittel-Systems abhängt (Abbildung 16).

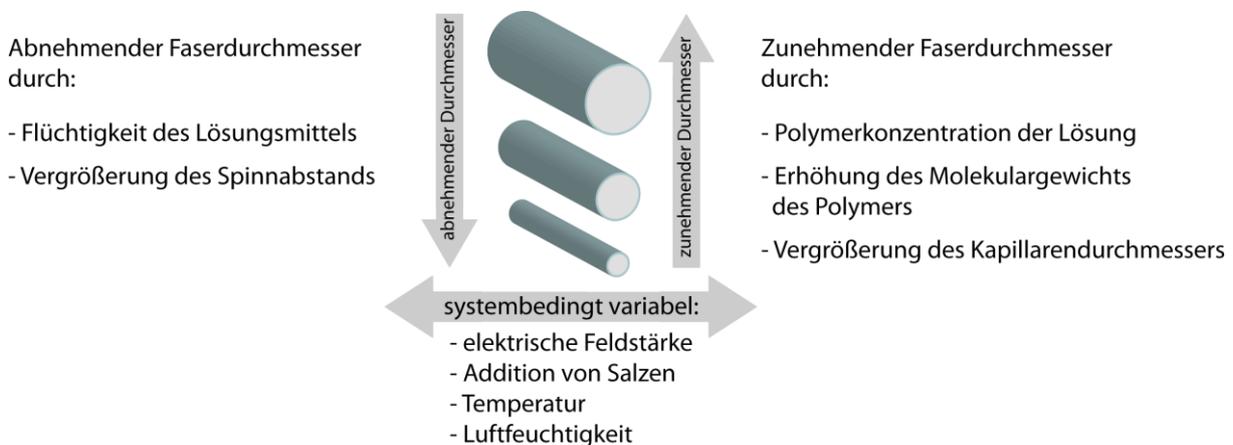
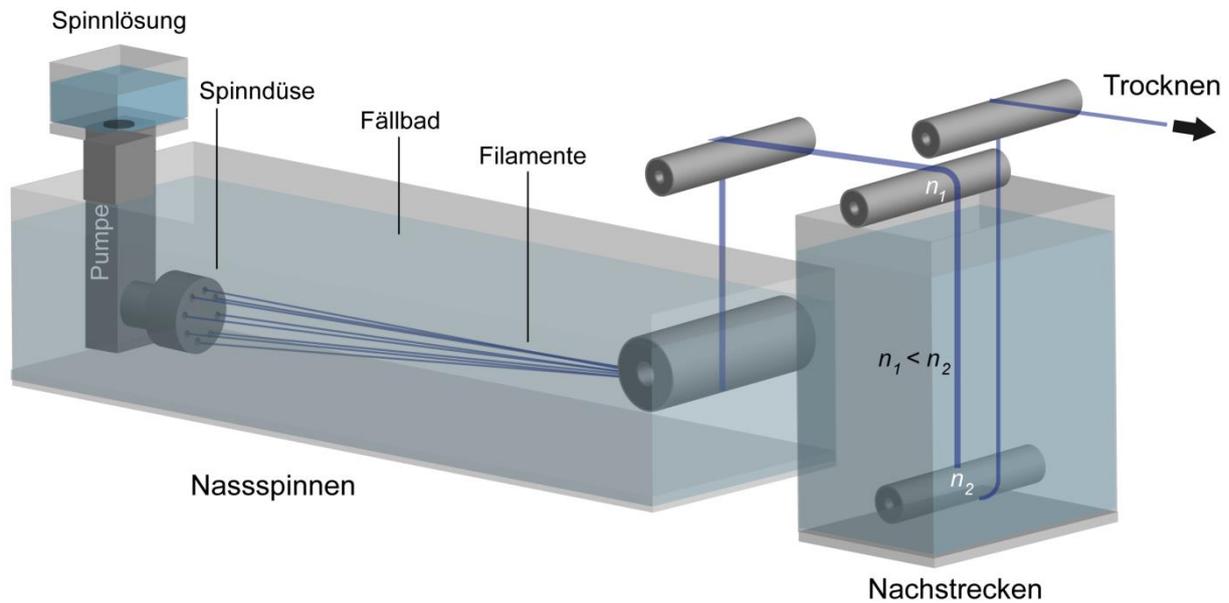


Abbildung 16: Auswirkungen der verschiedenen Parameter auf die Faserdurchmesser bei elektrostatischen Spinnen.

## 1.4 Nassspinnverfahren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem weiteren Ansatz rekombinante Seidenproteine auch durch ein Nassspinnverfahren zu Mikrofasern verarbeitet. In Abbildung 17 ist der schematische Aufbau eines typischen Nassspinnverfahrens gezeigt. Eine Spinnlösung wird durch eine Spinndüse, die eine oder mehrere Öffnungen hat, in ein Fällbad extrudiert. Das Fällbad führt zur Assemblierung der Lösung in Filamente, die durch eine Rolle abgezogen werden. Häufig werden die Fasern vor dem Trocknen in einem weiteren Schritt nachgestreckt, wobei die molekulare Ausrichtung der Polymerketten in Faserachsenrichtung erhöht werden kann. Das Nachstrecken hat sich als geeignetes Mittel erwiesen, um die Fasermechanik signifikant zu verbessern. Beim Nassspinnen von Polyacrylnitril wurde beispielsweise gezeigt, dass die Fasern mit zunehmender Dehnrates kompakter

und homogener wurden, wobei der Kristallisationsgrad zunahm und die Zugfestigkeit, der Elastizitätsmodul sowie die Zähigkeit gesteigert wurden.<sup>[183]</sup>



**Abbildung 17:** Schematische Darstellung eines Nassspinnverfahrens: Die Spinnlösung wird über eine Pumpe durch eine Spinndüse ins Fällbad extrudiert. Während das Polymer ausfällt werden die entstehenden Filamente über eine Rolle abgezogen und vor dem Trocknen in einem weiteren Schritt nachgestreckt.

Neben der Verarbeitung nicht schmelzbarer synthetischer Kunststoffe wie Acryl<sup>[184,185]</sup> und Aramid<sup>[186,187]</sup> findet das Nassspinnverfahren vor allem bei der Verarbeitung von Biopolymeren Anwendung. So wurden in der Vergangenheit unter anderem Fasern aus Cellulose,<sup>[188,189]</sup> Alginat,<sup>[190]</sup> Chitosan,<sup>[191,192]</sup> Kollagen<sup>[193,194]</sup> sowie regeneriertem *B. mori* Fibroin<sup>[195-197]</sup> und rekombinanter Spinnenseide<sup>[49,198]</sup> erfolgreich gesponnen.

### 1.5 Zielsetzung

Die herausragenden Eigenschaften natürlicher Spinnenseide in Hinsicht auf ihre Mechanik und Biokompatibilität sind bereits seit einigen Hundert Jahren bekannt. Die Herstellung artifizierender Seidenproteine gelang jedoch erst in jüngster Vergangenheit durch den Einsatz neuer biotechnologischer Verfahren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verarbeitung rekombinanter Spinnenseidenproteine durch verschiedene Spinnverfahren mit einem Hauptaugenmerk auf elektrostatisches Spinnen. Die Aufgabenstellungen, die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitet werden sollten, lassen sich in vier aufeinander aufbauende Bereiche unterteilen (Abbildung 18):

1. Voraussetzungen: Entwicklung einer Elektrospinnanlage und Herstellung geeigneter Spinnlösungen

Für das elektrostatische Spinnen rekombinanter Spinnenseidenproteine wurde zunächst ein Anforderungsprofil erstellt (Spinnen flächiger, homogener Vliese und alignierter Fasermatten, Kontrolle über Umgebungsbedingungen, Prozessüberwachung, Flexibilität) auf dessen Basis eine Anlage für das elektrostatische Spinnen konstruiert und gebaut werden sollte. Gleichzeitig sollten bereits geeignete Spinnlösungen hergestellt und charakterisiert werden.

2. Verfahren: Elektrostatisches Spinnen von Vliesen und Garnen, sowie Nassspinnen von Mikrofasern aus rekombinanten Seidenproteinen

Im zweiten Schritt sollte anhand der Elektrospinnanlage eine Prozessentwicklung durchgeführt werden, um sowohl Vliese als auch Garne effizient (geringer Materialverlust) und reproduzierbar herstellen zu können. Dabei sollten ebenfalls die synthetischen Polymere Polyamid 6 (PA6) und Polycaprolacton (PCL) als Referenzsysteme prozessiert werden. In Voraussicht auf potentielle Anwendungen sollte zudem ein Nachbehandlungsverfahren zur Stabilisierung der Seidenfasern entwickelt werden. Ferner sollte in einem Parallelansatz ein Nassspinnverfahren eingesetzt werden, um Mikrofasern aus wässrigen Seidenproteinlösungen herzustellen.

3. Analytik: Charakterisierung elektrostatisch gesponnener Garne und nassgesponnener Mikrofasern

Im dritten Schritt sollten die Fasereigenschaften untersucht werden. Dabei sollte zunächst der Einfluss der Nachbehandlung auf die strukturellen und morphologischen Eigenschaften elektrostatisch gesponnener Seidenfasern untersucht werden. Darüber hinaus sollten mechanische Prüfverfahren eingesetzt werden, um Proteingarne mit nassgesponnenen Mikrofasern und

natürlicher *Dragline*-Seide vergleichen zu können. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf die Feuchtigkeitssensitivität der Fasern, als eines der Charakteristika natürlicher Seidenfäden, gelegt werden.

#### 4. Anwendungen: Applikationsorientierte Versuche mit Vliesen aus rekombinanter Spinnenseide

Abschließend sollten auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse Anwendungsgebiete erschlossen werden. In Hinsicht auf medizinische Anwendungen sollte das Adhäsion- und Proliferationsverhalten von Fibroblasten *in vitro* untersucht werden. Ferner sollte als technische Applikation die Eignung der Seidenvliese für Filteranwendungen getestet werden. Zu diesem Zweck sollten kommerzielle Filtermaterialien mit Seidenproteinfasern elektrostatisch besponnen, und die daraus resultierende Abscheiderate und Luftdurchlässigkeit untersucht werden.

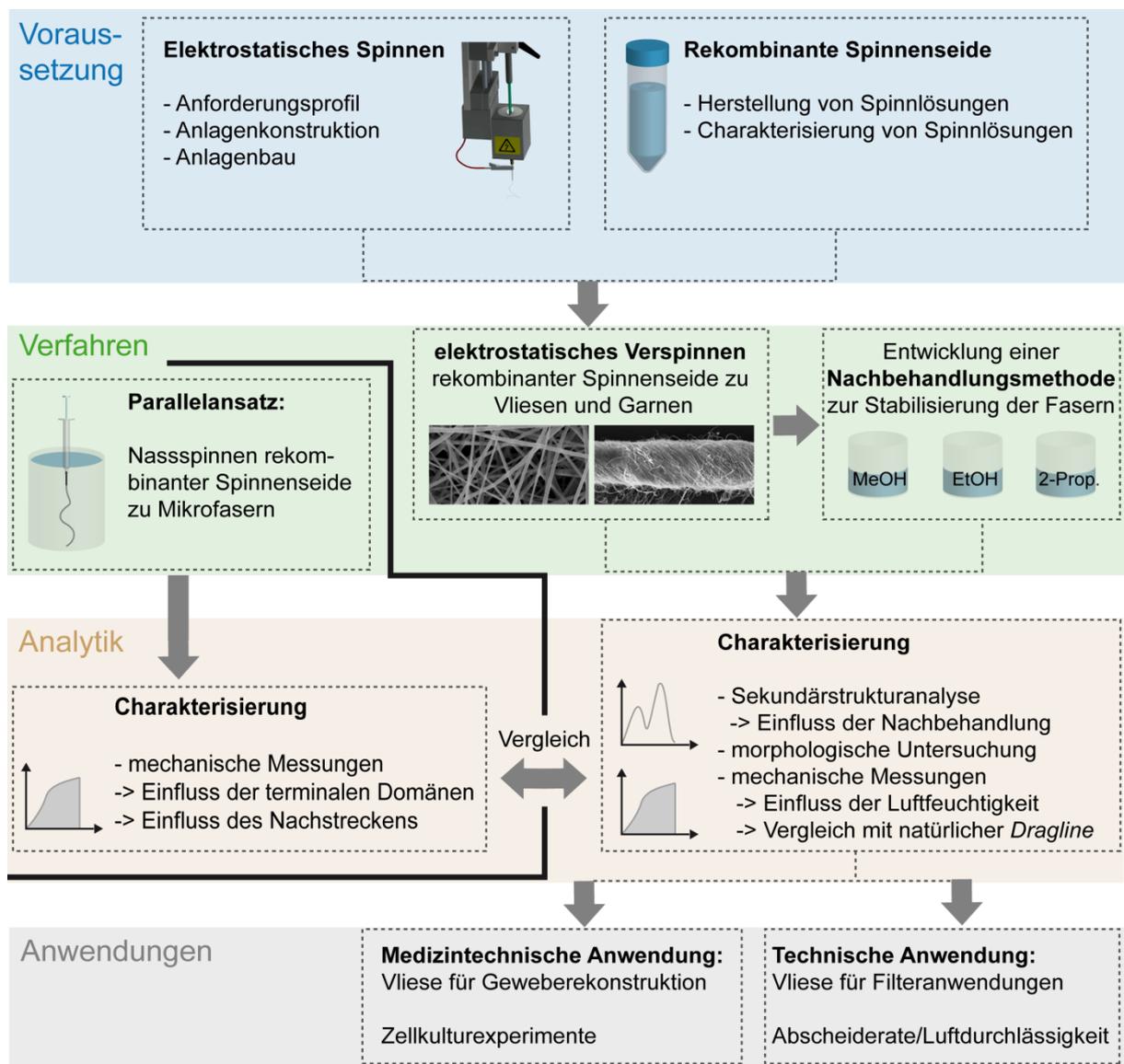


Abbildung 18: Unterteilung der Zielsetzung dieser Arbeit in aufeinander aufbauende Aufgabenbereiche.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Proteine und Polymere für die Faserherstellung

Protein/Polymer	Hersteller	Batch	MW (kDa)
eADF4(C16)	AM Silk, Martinsried, Deutschland	12SSP01_120710	48
eADF4(C32NR4)	AM Silk, Martinsried, Deutschland	12SSP09_009_001_010	104
eADF3(AQ12)	hergestellt am Lehrstuhl Biomaterialien		48
eADF3(AQ12NR3)	hergestellt am Lehrstuhl Biomaterialien		60
eADF3(AQ24)	hergestellt am Lehrstuhl Biomaterialien		95
Polyamid 6 (Nylon 6)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	MKBG2339	10
Polycaprolacton (CAPA®6506)	Perstorp AB, Perstorp, Schweden		50

#### 2.1.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1,1,1,3,3,3 Hexafluor-2-Propanol	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol (≥ 99,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ameisensäure	BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Bisacrylamid (Rotiphorese Gel 40)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CellTiter-Blue	Promega, Madison, WI, USA
Difco™ Agar noble	Becton Dickinson, Sparks, MD, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol (96%)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamicinsulfat	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland
GlutaMAX	GIBCO, Grand Island, NY, USA
Glycidether 100	Serva, Heidelberg, Deutschland

Guanidinthiocyanat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Harnstoff	BDH Prolabo, Darmstadt, Deutschland
Lithiumbromid	Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland
Live/dead® test kit: viability/cytotoxicity	Molecular Probes®, Eugene, OR, USA
Marker Precision Plus Protein	BIO-RAD, München, Deutschland
Methanol	VWR International, Radnor, PA, USA
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
N'-Tetramethylethylenediamin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Osmiumtetroxid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG, 35 kDa)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Uranylacetat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

---

### 2.1.3 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
AFM-Luftfeuchtigkeitssensor	Humidity Sensing Cell	Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA
Elektrospinnanlage	Eigenbau	Universität Bayreuth, Bayreuth, Deutschland
Feinwaage	Discovery	Ohaus, Pine Brook, NJ, USA
Feuchtigkeitsregelung	FR 400	Mytrom, Heilbad Heiligenstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	DMI 3000B	Leica, Wetzlar, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	FluoroMax 3	Horiba, Unterhaching, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer	FP-6500	Jasco, Essex, England
FTIR-Mikroskop	Hyperion	Bruker, Ettlingen, Deutschland
FTIR-Spektrometer	Confocheck	Bruker, Ettlingen, Deutschland
Heizrührer	RCT basic	IKA, Staufen, Deutschland
Kamera	Erlangshen ES500W	Gatan, Pleasanton, CA, USA
Klimakammer für Bose	Eigenbau	Universität Bayreuth, Deutschland
Kollektorzylinder	Eigenbau	Universität Bayreuth, Deutschland
Kritischer Punkt-Trockner	CPD-408	BAL-Tec, Balzers, Liechtenstein
Kritischer Punkt-Trockner	CPD-020	BAL-Tec, Balzers, Liechtenstein
Lichtmikroskop	DM IL-LED	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus IX 71	Olympus, Tokyo, Japan
Lichtmikroskop	DMI3000 B	Leica, Wetzlar, Deutschland

---

## Materialien

---

Luftbefeuchter	Modell 5462	ets®, Glenside, PA, USA
Luftdurchlässigkeitsprüfgerät	Akustron	Thwing-Albert, West Berlin, NJ, USA
Lyophilie	ALPHA 1-2 LD plus	Christ GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Mikromanipulator	MP-285	Sutter Instrument, Novato, CA, USA
Mikrotom	EM UC6	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ofen	OV-SS-00AB	MTI Corporation, Richmond, CA, USA
PH-Meter	Lab 850	Schott instruments, Mainz, Deutschland
Photometer	Genesys 10	Thermo Scientific, Bonn, Deutschland
Photometer	P 330	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Plattenlesegerät	Mythras LB 940	Berthold GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph GmbH, Schwabach, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	LEO 1530	Zeiss, Jena, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop	XL 30 ESEM	Philips, Hamburg, Deutschland
Rasterkraftmikroskop	Nanowizard I	JPK Instruments AG, Berlin, Deutschland
Rasterkraftmikroskop	MFP3D	Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA
Reinstwasseranlage	Q-POD	Millipore (Merck), Darmstadt, Deutschland
Scherrheometer	AR-G2	TA Instruments, New Castle, DE, USA
SDS-Pufferkammer	Hoefer SE250 GE	GE Healthcare, München, Deutschland
Spannungsquelle	Voltcraft VLP 1405 Pro	Conrad Electronic AG, Hirschau, Deutschland
Spannungsquelle	Voltcraft PPS-11360	Conrad Electronic AG, Hirschau, Deutschland
Spritzenpumpe	Pump 33	Harvard, Edenbridge, Großbritannien
Sputtergerät	208HR	Cressington Scientific, Watford, England
Sputtergerät	S150A	Edwards, Crawley, England
Standzentrifuge	Sorvall RC6 Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Stromquelle für SDS	Blue Power 500	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Tauchbeschichter	WPTL5-0.01	MIT, Richmond, CA, USA
Thermogravimeter	TGA/SDTA 861e	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transektronenmikroskop	Zeiss CEM 902	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Transektronenmikroskop	JEM-2100	JEOL Ltd., Tokyo, Japan
Trockenschrank	Heraeus Function Line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Überkopfschüttler	Intelli-Mixer RM-2S	ELMI, Riga, Lettland
Vortexer	VV3S40	VWR International, Radnor, USA
Waage	ALC-3100.2	Acculab, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zugmaschine	ElectroForce® 3200	Bose, Bloomington, Minnesota, USA

---

### 2.1.4 Sonstige Materialien

<b>Material</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Hersteller</b>
Aluminiumklebeband	Scotch Brand	3M, St. Paul, MN, USA
Bechergläser		VWR International, Radnor, PA, USA
Carbon-Klebescheiben	Ø 12 mm	Agar Scientific, Stansted, England
Dialyseschlauch	Spectra/Por 1 (6 - 8 kDa)	Spectrum Labs, Rancho Dominguez, CA, USA
Diamantmesser	Ultra 358	Diatome, Biel, Schweiz
Glassubstrate für AFM		GeSiM, Großberkmannsdorf, Deutschland
Kanülen	18G, 20G, 22G	Terumo, Leuven, Belgien
Kleber	UHU plus endfest 300	UHU, Baden-Baden, Deutschland
Laborflaschen		Duran Group, Mainz, Deutschland
Labortücher	Kimtech Science	Kimberly-Clark, Dallas, TX, USA
Leitfähige Haftaufkleber		Plano, Wetzlar, Deutschland
Messzylinder		VWR International, Radnor, PA, USA
Mikroreaktionsgefäße	0,5/1,0/2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nagellack	Superstay 7, strong	Maybelline, New York City, NY, USA
Cantilever	NSC35	MikroMasch, Sofia, Bulgarien
Parafilm	M	Bemis, Neenah, WI, USA
Petrischalen		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten	1000/200/20/10/2,5 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Probenrahmen, Zugmessung	Eigenanfertigung	Universität Bayreuth, Bayreuth, Deutschland
REM-Probenträger		Agar Scientific, Stansted, England
Rührfische		VWR International, Radnor, PA, USA
Skalpelle		B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Spritzen	Injekt F 1 ml, 50 ml	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
TEM-Objektträger		Agar Scientific, Stansted, England
Trägernetz für TEM	Pioloform-Kupfernetz	Plano, Wetzlar, Deutschland
Vliesprobenträger	CellCrown™12	Scaffdex, Tampere, Finnland
Wägeschälchen		VWR International, Radnor, PA, USA
Well-Platten	96, 24, 6 -well-plate	Nunc, Langenselbold, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	15/50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

### 2.1.5 Fibroblasten für Zellkulturexperimente

Name	Herkunft	Bemerkung	ATCC Nr.	Hersteller
M-MSV-BALB/3T3*	BALB/3T3	<i>Moloney sarcoma</i>	CCL 163.2	European Collection of Cell
	Embryo	Virus transformiert		Cultures, Salisbury, England

### 2.1.6 Computerprogramme

Programm	Hersteller
Adobe Creative Suite 3	Adobe, San Jose, CA, USA
Creo Parametric 2.0	PTC, Needham, MA, USA
EndNote X4	Thomson Reuters, New York City, NY, USA
Finite Element Method Magnetics FEMM 4.2	David Meeker, Waltham, MA, USA
FMOM	Prof. Dr. Jürgen Dankert, HAW, Hamburg, Deutschland
Gatan Digital Micrograph software 1.70.16	Gatan, Pleasanton, CA, USA
Gimp 2.6	Spencer Kimball & Peter Mattis, Berkeley, CA, USA
IGOR Pro 6.1	WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR, USA
ImageJ 1.42q	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
itools Engineering Studio	Eurotherm, Ashburn, VA, USA
Leica Application Suite V4.3	Leica, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
NanoPhotometer Pearl	SERVA GmbH, Heidelberg, Deutschland
Office Professional 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
OPUS Software	Bruker AXS Inc., Madison, WI, USA
OPUS/QUANT	Bruker AXS Inc., Madison, WI, USA
Origin 8.1 G SR4	OriginLab, Northampton, MA, USA
ProtParam	Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz
Rheology Advantage Data Analysis V.5.7.0	TA Instruments, New Castle, DE, USA
Rheology Advantage Instrument Control V.5.7.0	TA Instruments, New Castle, DE, USA
SF Dampfdruck 3.0	Software-Factory, Schifferstadt, Deutschland
Spectra Manager 2.08.04	Jasco, Tokyo, Japan
Wintest 4.1	Bose, Eden Prairie, MN, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Konstruktion mittels CAD (*Computer-Aided Design*)

Zur Konstruktion einer Elektrospinnanlage wurde das 3D CAD-Programm Creo Parametric 2.0 verwendet. Die Methode CAD ist ein Sammelbegriff für das rechnerunterstützte Konstruieren und wird vor allem im Maschinenbau, in der Elektrotechnik und in der Architektur eingesetzt. Bei der Konstruktion der Anlage wurde zunächst auf Basis eines Anforderungsprofils die Mindestgröße der bespinnbaren Fläche als Randbedingung definiert ( $0,5 \text{ m}^2$ ) und die Gesamtgeometrie der Anlage darauf aufbauend entwickelt. Um die Anlage für nachträgliche Umbauten flexibel zu gestalten wurde für die Rahmenkonstruktion ein Profilsystem (Profil 8,  $40 \times 40 \text{ mm}$ ) von ITEM (Solingen, Deutschland) verwendet, da dieses System aufgrund seiner flexiblen Verbindungstechnik die Möglichkeit bietet, Teile nachträglich einfach umzuplatzieren oder anzubauen. Für die Konstruktion des Grundgerüsts wurden die Profildimensionen als CAD-Dateien von ITEM bezogen und die Profillängen in Creo Parametric 2.0 angepasst. Das CAD-Modell der Anlage wurde erstellt, indem zunächst auf Basis maßstabsgetreuer Skizzen einzelne Bauteile konstruiert und anschließend in Baugruppen zu einem Gesamtgefüge zusammengefasst wurden. Teile, die kommerziell bezogen wurden (Mikroskopkamera, Spritze) oder deren Maße erst beim Aufbau durch die Werkstätten (Elektronik- und Mechanikwerkstatt, Universität Bayreuth) definiert wurden (Hochspannungsquelle, 2-D-Plotter), wurden nachträglich in der Konstruktion angepasst, um für die Anlagendokumentation ein maßstabsgetreues Modell zu erhalten. Elektronische Bauteile wie die Mikroskopkamera, die Hochspannungsquellen und Elektromotoren wurden maßstabsgetreu nachkonstruiert, jedoch ohne Berücksichtigung des Innenlebens. Um Abbildungen der Bauteile und Gesamtkonstruktion zu erstellen, wurden Aufnahmen des CAD-Modells durch Rendern mit Photolux bei maximaler Qualität erstellt (Reflexionstiefe: 4, Lichtbrechungstiefe: 6, Genauigkeit: 500, Anti-Aliasing Qualität: hoch, Schatten Genauigkeit: hoch).

### 2.2.2 Herstellung von Spinnlösungen

Im Rahmen der Arbeit wurden Lösungen für das elektrostatische Spinnen von eADF4-Proteinen und synthetischen Polymeren sowie für das Nassspinnen von eADF3-Proteinen hergestellt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, sind alle Konzentrationen in Massenkonzentration (*weight per volume*: w/v) angegeben.

### 2.2.2.1 Organische Lösungen für das elektrostatische Spinnen

Für das elektrostatische Spinnen wurden die Spinnenseidenproteine eADF4(C16) und eADF4(C32NR4), sowie die kommerziell bezogenen synthetischen Polymere Polycaprolacton und Polyamid 6, zu unterschiedlichen Konzentrationen (6, 8, 10, 12 % w/v) in Hexafluor-2-Propanol (HFIP) gelöst. Um lange Lagerungszeiten der Lösungen zu vermeiden, wurden für die Experimente jeweils maximal 1 ml pro Lösung hergestellt, versponnen und erst bei Bedarf wieder eine neue Lösung angesetzt. Dabei wurde die erforderliche Menge Protein/Polymer mit einer Feinwaage in Wägeschälchen abgewogen und in 1 ml- oder 2 ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden entsprechende Mengen HFIP in die Mikroreaktionsgefäße pipettiert und diese mit Parafilm abgedichtet, um dem Ausdampfen von leichtflüchtigem HFIP vorzubeugen. Anschließend wurden die Lösungsansätze mindestens zwei Tage in einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur geschwenkt, um sicherzustellen, dass sich die Proteine/Polymere komplett gelöst hatten. Die klaren Lösungen wurden bis zur Verarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Wässrige Lösungen für das Nassspinnen

Im Rahmen der Betreuung einer Diplomarbeit<sup>[199]</sup> wurde aufbauend auf einer etablierten Standard-Arbeitsanweisung (Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, SOP-Nr. 6-1-2) eine Methode zu Herstellung wässriger Spinnenseidenproteinlösungen entwickelt und weiterführend von Anieli Heidebrecht (Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth) optimiert. Die Proteine eADF3(AQ12), eADF3(AQ12NR3) und eADF4(AQ24) wurden dabei zunächst in 6 M Guanidinthiocyanat (GdmSCN) in Konzentrationen von 2,0 - 2,5 % w/v gelöst und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht gegen 50 mM Tris/HCl Puffer mit 100 mM NaCl bei pH 8 dialysiert. Dabei wurden Dialyseschläuche mit einer Molekulargewichtsdurchlässigkeit von 6-8 kDa und ein Puffervolumen von 5 l verwendet. Ein Teil der Proteine fiel während des ersten Dialyseschritts aus. Die gelöste Fraktion wurde durch anschließende Zentrifugation (8500 rpm, 30 min, 20 °C) und Entnahme des Überstands vom präzipitierten Protein entfernt. Es folgten drei weitere Dialyseschritte gegen 50 mM Tris/HCl Puffer mit 100 mM NaCl bei pH 8. Dabei wurde jeweils ein Puffervolumen von 5 l bei einer Dauer von ca. 5 Stunden eingesetzt. Um die Konzentration der Lösungen zu erhöhen, wurden sie anschließend für ca. 6 Stunden gegen 20 % w/v Polyethylenglycol (PEG, MW: 35 kDa) in wässriger Lösung dialysiert. Auf diesem Weg konnten Proteinkonzentrationen von bis zu 15 % w/v in wässriger Lösung erreicht werden. Die Lösungen wurden bis zur Verarbeitung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

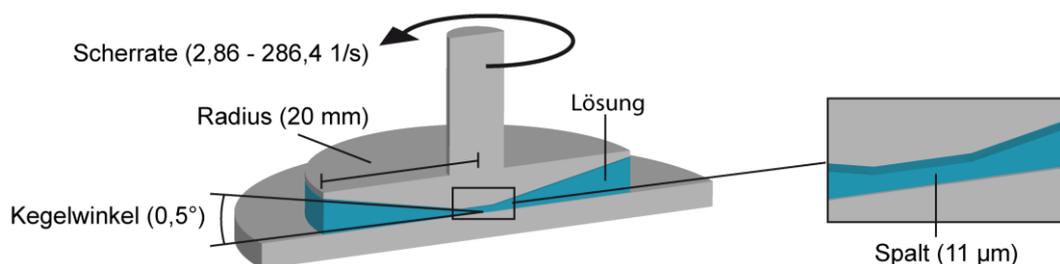
Die Konzentrationen wurden durch UV-Absorptionsspektroskopie (Photometer: P 330, SERVA) ermittelt. Proteine absorbieren elektromagnetische Strahlung im UV-Bereich unter Anregung der aromatischen Seitenketten ihrer Aminosäuren sowie der Peptidbindungen und der prosthetischen Gruppen. Den Hauptbeitrag zur UV-Absorption in Proteinspektren liefern Tryptophan und Tyrosin. Phenylalanin und Cystein weisen hingegen eine vergleichsweise geringe Absorption auf. Anhand der bekannten Proteinsequenzen konnte die Berechnung der molaren Absorptionskoeffizienten verschiedener rekombinanter Spinnenseidenproteine mit dem Online-Tool ProtParam (Swiss Institute of Bioinformatics) durchgeführt werden. Da die Absorption  $A(\lambda)$  bei einer festgelegten Wellenlänge linear von der Konzentration der absorbierenden Substanz abhängt, konnte die Proteinkonzentration  $c$  nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz unter Kenntnis des jeweiligen molaren Absorptionskoeffizienten  $\varepsilon(\lambda)$  folgendermaßen berechnet werden ( $d$  = Schichtdicke in der Küvette):

$$c = \frac{A(\lambda)}{\varepsilon(\lambda) \cdot d} \quad \text{[Formel 1]}$$

Zu Bestimmung der Proteinkonzentration in wässrigen Lösungen wurde das UV-Spektrum im Wellenlängenbereich von 230 - 340 nm aufgenommen und bei der Auswertung nach Formel 1 die Absorption bei 280 nm eingesetzt.

### 2.2.3 Rheologische Untersuchung

Die Bestimmung der dynamischen Viskosität  $\eta$  der Spinnlösungen erfolgte durch Messungen mit einem Scherrheometer (AR-G2, TA Instruments) im Rotationsmodus unter Verwendung einer Kegel/Platte-Geometrie (Abbildung 19). Für die Messungen wurde jeweils ein Probenvolumen von 200  $\mu\text{l}$  (erforderliches Mindestvolumen: 140  $\mu\text{l}$ ) aufgetragen und es wurden vier Messungen pro Lösung durchgeführt.



**Abbildung 19:** Schematischer Messaufbau beim Kegel/Platte-Rotationsversuch. Die Spitze des Kegels ist begradigt und der Abstand der Schlieffläche von der Platte ist die Spaltbreite (11  $\mu\text{m}$ ).

Bei den Versuchen wurde das stationäre Fließverhalten bei 25 °C in einem Scherratenbereich von 2,86 - 286,4 1/s gemessen, wobei pro Dekade 10 Messpunkte mit einer Messdauer von jeweils 60 s aufgenommen wurden. Die Eigenschaften der Geometrie und die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 3 angegeben:

**Tabelle 3: Geometrische Angaben und Messparameter bei der Durchführung rheologischer Rotationsversuche.**

Geometrie				Messparameter: schrittweise logarithmisch steigende Scherrate			
Material	Ø Kegel	α Kegel	Spalt	Scherrate	Messdauer/Punkt	Punkte/Dekade	Temp.
Stahl	40 mm	0,5°	11 µm	2,86 - 286,4 1/s	60 s	10	20 °C

Die Scherrate  $\dot{\gamma}$  ist vom Achsenabstand  $r$ , der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  und der beim  $r$  auftretenden Spalthöhe  $h$  abhängig, welche sich durch  $r$  und den Kegelwinkel  $\alpha$  ausdrücken lässt. Bei kleinen Winkeln im Bogenmaß kann der Tangens des Winkels durch den Wert des Winkels ersetzt werden, wodurch sich eine Scherrate ergibt, die über den gesamten Spaltradius konstant ist:<sup>[200]</sup>

$$\dot{\gamma}(r) = \frac{r\omega}{h} = \frac{r\omega}{r \cdot \tan\alpha} = \frac{\omega}{\alpha} \quad \text{[Formel 2]}$$

Der Parameter, der durch das Gerät gemessen werden kann, ist das Torsionsmoment  $T$ , das aufgrund des Fließwiderstandes der Probe bei der Rotation auftritt. Es kann durch die Summe der Torsionen infinitesimaler Flüssigkeitsringe der Breite  $dr$  mit radialem Abstand  $r$  zur Rotationsachse ausgedrückt werden und ist das Produkt aus der Schubspannung  $\tau$ , der Kontaktfläche  $2\pi r dr$  und dem Achsenabstand  $r$ . Durch Integration über den gesamten Kegelradius  $R$  kann das resultierende Torsionsmoment  $T$  wie folgt berechnet werden:<sup>[200]</sup>

$$T = \int_0^R 2\pi r^2 \tau dr = \frac{2}{3} \pi R^3 \tau \quad \text{[Formel 3]}$$

Somit kann aus dem gemessenen Torsionsmoment die Schubspannung  $\tau$  ermittelt werden:<sup>[201]</sup>

$$\tau = \frac{3T}{2\pi R^3} \quad \text{[Formel 4]}$$

Auf Basis der vom Rheometer ermittelten Schubspannungswerte bei bekannter Scherrate wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Auswertungsverfahren eingesetzt - der Ansatz nach Ostwald und de

Waele, sowie die Auswertung nach Newton. Um zu untersuchen, inwiefern das Fließverhalten der Spinnlösungen dilatant (scherverdickend) oder strukturviskos (scherverdünnend) ist, wurden die Fließkurven nach dem Potenzgesetz von Ostwald und de Waele gefittet.

$$\tau = k \cdot \dot{\gamma}^m \quad \text{[Formel 5]}$$

Dabei wurde die Scherratenabhängigkeit der Schubspannungen  $\tau$  durch den Konsistenzindex  $k$ , und den Fließindex  $m$  modelliert. Der Konsistenzindex ist zwar temperaturabhängig, jedoch im Gegensatz zur Viskosität unabhängig von der Scherrate. Der Fließindex hingegen ist nicht von der Temperatur abhängig.<sup>[202]</sup> Die Fließindizes wurden im Rahmen dieser Arbeit als Maß der Scherverdickung herbeigezogen, wobei folgende Gesetzmäßigkeiten gelten:<sup>[202]</sup>

- strukturviskoses Fluid:  $m < 1$
- newtonsches Fluid:  $m = 1$
- dilatantes Fluid:  $m > 1$

Ausgehend von der Annahme, dass es sich bei den Spinnlösungen um newtonsche Fluide handelt wurde das Potenzgesetz von Ostwald und de Waele vereinfacht, indem der Fließindex  $m = 1$  gesetzt wurde und der Konsistenzindex die dynamische Viskosität  $\eta$  darstellte:<sup>[202]</sup>

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{[Formel 6]}$$

Die Kurven wurden mit dem Computerprogramm Rheology Advantage Data Analysis V.5.7.0 gefittet und die ermittelten Kennwerte entnommen.

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

Um die Sekundärstruktur der eADF4-Proteine zu untersuchen, wurde eine Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie durchgeführt. Dabei werden durch elektromagnetische Strahlen kovalente Bindungen der Moleküle zu Schwingungen angeregt und die dabei auftretende charakteristische Absorption wird mit einem Michelsen-Interferometer aufgezeichnet. Durch eine Fourier-Transformation wird eine spektrale Zerlegung des Interferenzmusters vorgenommen, wodurch das Signal/Rausch-Verhältnis stark verbessert und die Messdauer verkürzt werden kann.<sup>[203]</sup> In Abbildung 20 ist zu Übersicht ein Ausschnitt des Spektrums elektromagnetischer Strahlung aufgeführt.

## Methoden

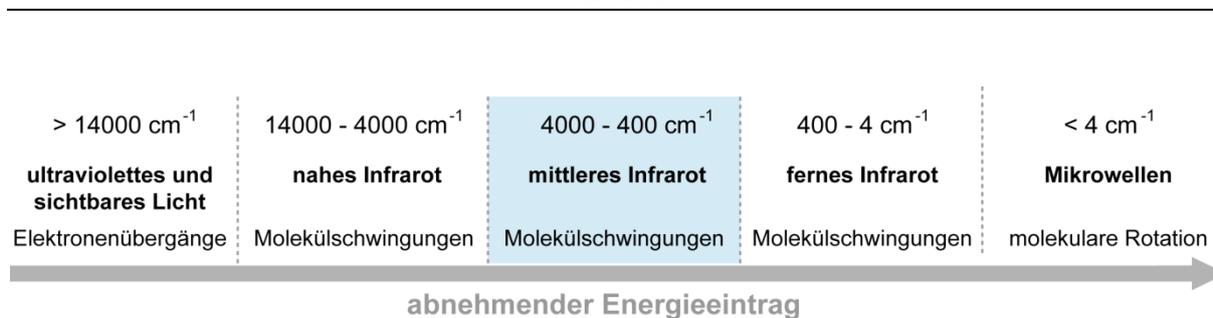


Abbildung 20: Ausschnitt des Spektrums elektromagnetischer Strahlung mit Einteilung in Wellenzahlenbereiche und deren molekulare Anregungsmechanismen (Abbildung nach Literaturquelle)<sup>[204]</sup>.

Für die Sekundärstrukturanalyse von Proteinen ist insbesondere der mittlere Infrarotbereich von Interesse, da im Bereich von  $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  (Amid I-Bande) die C=O-Streckschwingung der Peptidbindung absorbiert. Die Sekundärstruktur der Proteine entsteht durch Ausbildung unterschiedlich starker Wasserstoffbrücken an ihren Peptidbindungen, was wiederum einen direkten Einfluss auf die C=O-Streckschwingung und die damit verbundene Energieabsorption hat. Durch eine Fourier-Selbstentfaltung (*Fourier self-deconvolution*: FSD) können die der resultierenden Amid I-Bande zugrundeliegenden Einzelschwingungen ermittelt und ihren Sekundärstrukturen zugeordnet werden.<sup>[205]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden kontaktfreie FT-IR-Messungen mit einem Hyperion-Mikroskop (Bruker) durchgeführt und mit dem Computerprogramm OPUS ausgewertet. Dabei wurde die Transmission der Strahlung durch trockene eADF4-Vliese im Wellenzahlenbereich von  $4000 - 800 \text{ cm}^{-1}$  mit 60 Einzelmessungen für jedes Spektrum gemessen und gemittelt. Um die Verlässlichkeit der Daten zu gewährleisten wurden pro Probe drei Spektren aufgenommen, die jeweils dreimal mittels FSD ausgewertet wurden. Für die FSD wurde zunächst eine Grundlinienkorrektur durchgeführt, dann wurden die Kurven über 5 Punkte geglättet und eine Rauschunterdrückung von 0,3 (herstellerspezifische Einheit) durchgeführt. Anschließend wurde der Frequenzbereich von  $1705 - 1590 \text{ cm}^{-1}$  ausgeschnitten und eine weitere Grundlinienkorrektur vorgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Wellenzahlen der zu erwartenden Schwingungsbanden nach der Methode von Hu et al.<sup>[206]</sup> eingegeben (Tabelle 4) und die der Amid I-Bande zugrundeliegenden Kurven nach dem *local least square*-Verfahren mit Gauß- und Levenberg-Marquardt-Algorithmen interpoliert.

Tabelle 4: Wellenzahlen bei der Ermittlung von Sekundärstrukturanteilen - die Wellenzahlen der ersten Spalte wurden vorgegeben und auf deren Basis eine FSD durchgeführt. Die resultierenden Banden konnten entsprechend der zweiten Spalte den Strukturen in Spalte drei zugeordnet werden.

vorgegebene Wellenzahl ( $\text{cm}^{-1}$ )	Wellenzahlenbereich	Zuordnung
1611	1605-1615	Tyrosin Seitenketten
1619	1616-1621	$\beta$ -Faltblätter
1624	1622-1627	$\beta$ -Faltblätter
1630	1628-1637	$\beta$ -Faltblätter
1640	1638-1646	<i>Random Coils</i>
1650	1647-1655	<i>Random Coils</i>
1659	1656-1662	$\alpha$ -Helices
1666	1663-1670	$\beta$ -Schleifen
1680	1671-1685	$\beta$ -Schleifen
1691	1686-1696	$\beta$ -Schleifen
1698	1697-1703	$\beta$ -Faltblätter

---

Im letzten Schritt wurden die ermittelten Einzelspektren mit dem Computerprogramm Origin 8.1 integriert und die Flächen zugehöriger Strukturen addiert. Die Sekundärstrukturanteile ergeben sich aus dem Quotienten der addierten Integrale und der Summe aller beteiligten Kurvenintegrale. Die Banden der Tyrosin Seitenketten ( $1605 - 1615 \text{ cm}^{-1}$ ) machten einen Anteil von ca. 5 % aus und wurden bei der Interpretation der Daten vernachlässigt, da sie keine Sekundärstruktur darstellen.

## 2.2.5 Mikroskopie

### 2.2.5.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Zur Untersuchung der Fasermorphologie wurde eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein Elektronenstrahl, üblicherweise im Hochvakuum, über eine Probe gerastert. Durch einen Detektor erfolgt eine orts aufgelöste Abbildung von Sekundärelektronen und rückgestreuten Elektronen, aus der sich ein hoch aufgelöstes Abbild der untersuchten Probe ergibt. Eine Grundvoraussetzung zur Erlangung von Bildern mit ausreichendem Kontrast ist die Leitfähigkeit der zu untersuchenden Probe. Um die Leitfähigkeit von biologischen Materialien zu erhöhen, werden die Proben meist mit einer dünnen Edelmetallschicht versehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden elektrostatisch gesponnene Fasern bei Raumbedingungen getrocknet und

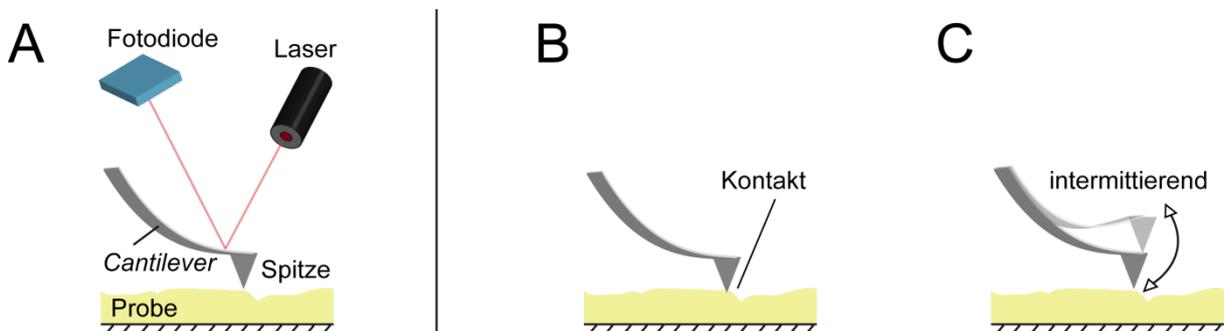
anschließend mit Carbon-Klebescheiben (Agar Scientific) auf REM-Objektträgern (Agar Scientific) fixiert. Zusätzlich wurde an den Randbereichen der Objektträger leitfähiges Aluminiumklebeband (3M) angebracht. Die Beschichtung der Proben und Bedienung des REMs erfolgte durch Johannes Diehl, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth. Die Probenbeschichtung (Schichtdicke ca. 2 nm) wurde mit einem Sputtergerät (Cressington Scientific) durch ein Platinplasma durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in einem LEO 1530 REM (Zeiss) bei einer Spannung von 3 kV untersucht.

Vliesproben, die für Zellkulturexperimente eingesetzt wurden und Fibroblasten enthielten, wurden zunächst mit einem Balzers CPD 020 (Leica) in Kohlenstoffdioxid kritischer Punkt getrocknet und anschließend wie bereits beschrieben auf REM-Objektträgern fixiert. Die Proben wurden dann in einem Sputtergerät (Edwards) mit Gold beschichtet und in einem FEI/Philips XL 30 ESEM (*Environmental scanning electron microscope*) bei einer Spannung von 15 kV untersucht. Das ESEM hat den Vorteil, dass ein niedrigeres Vakuum als beim konventionellen REM eingesetzt werden kann, was insbesondere für die Betrachtung von Zellen interessant ist, da dadurch deren Morphologie besser erhalten bleibt.

### **2.2.5.2 Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy: AFM*)**

Aufgrund ihres geringen Durchmessers und der kleinen Widerstandskräfte konnten elektrostatisch gesponnene Einzelfasern nicht mit der Bose Electroforce Zugmaschine gemessen werden (kleinste Kraftmessdose: 0,49 N). Um dennoch einen Einblick in die Mechanik einzelner elektrostatisch gesponnener Faser zu bekommen wurde ein Prüfverfahren auf Basis von Rasterkraftmikroskopie eingesetzt. Das Rasterkraftmikroskop (engl.: *Atomic Force Microscope: AFM*) ist ein spezielles Rastersondenmikroskop, welches sich zur Messung atomarer Kräfte (pN) und zur mechanischen Abtastung von Oberflächen eignet. Das Messprinzip beruht auf dem Einsatz einer geeichten Blattfeder (*Cantilever*), an deren Ende eine Nadel mit nanoskopischem Spitzenradius fixiert ist. Durch einen piezoelektrischen Scanner wird die Position der Spitze an der Oberfläche der Probe koordiniert. Tritt die Spitze in Wechselwirkung mit der Oberfläche, so kommt es zu einer Auslenkung der Feder. Diese Auslenkung wird über einen Laserstrahl registriert, der an der Blattfeder reflektiert wird und anschließend auf eine Fotodiode trifft (Abbildung 21, A). Sind die Federkonstante und die optische Sensitivität bekannt, so lässt sich aus der gemessenen Federdeformation die einwirkende Kraft bestimmen.

Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen abbildender und kraftspektroskopischer Rasterkraftmikroskopie. Letztere wird im Kontakt-Modus betrieben, wobei die Nadel direkt auf die Probenoberfläche gedrückt wird (Abbildung 21, B). Dabei wird die Kraft gemessen, welche die Probe der mechanischen Belastung durch die Nadel entgegensetzt. Somit können Rückschlüsse auf die mechanischen Eigenschaften der Probenoberfläche gewonnen werden. Im Gegensatz dazu werden abbildende Messungen meist ohne oder nur mit geringem Kontakt zwischen Spitze und Probe im intermittierenden Modus durchgeführt (Abbildung 21, C). Beim intermittierenden Modus wird die Feder durch externe Anregung in eine Schwingung nahe ihrer Resonanzfrequenz versetzt. Durch physikalische Wechselwirkungen zwischen der Nadel und der Oberfläche ändert sich die Resonanzfrequenz, wobei sich auch die Schwingungsamplitude ändert und eine Phasenverschiebung zwischen Anregung und Schwingung auftritt. Abrastern eines vorgegebenen Flächenareals führt dann zur linienweisen Erstellung eines Bildes, welches im Computer zu einem Gesamtbild zusammengesetzt wird. Somit können kontaktfrei und dadurch probenschonend Oberflächen abgebildet und physikalische Wechselwirkungen untersucht werden.



**Abbildung 21: Messprinzip beim AFM (A) und schematische Darstellung der zwei Hauptbetriebsmodi: Kontaktmodus (B) und intermittierender Modus (C).**

Um elektrostatisch gesponnene Einzelfasern mechanisch zu prüfen wurde ein MFP3D AFM (Asylum Research) in Kombination mit einem optischen IX 71 Lichtmikroskop (Olympus) verwendet. Die Messungen wurden von Benedikt Neugirg, Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth durchgeführt. Die trockenen Fasern wurden zunächst auf Glassubstrate (GeSiM) mit definierter Strukturierung (rechteckige Furchen, Tiefe: 2  $\mu\text{m}$ ; Breite: 20  $\mu\text{m}$ ) übertragen (siehe auch Kapitel 3.3.4). Mit einem Mikromanipulator (MP-285, Sutter Instrument) wurden aufliegende Fasersegmente festgeklebt (Kleber: UHU Plus endfest 300), so dass freihängende Faserbereiche für die definierte mechanische Deformation vorlagen. Da die Tiefe der Furchen das Maß an möglicher

Deformation in vertikale Richtung begrenzt und zusätzlich bei lateraler Deformation die Randbedingungen optisch beobachtet werden können, wurden die Fasern senkrecht zur Faserachse in der Substratebene deformiert. Bei solchen Messungen ist eine sorgfältige Kalibrierung (optische Sensitivität und Federkonstante) des *Cantilevers* als Kraftsensor entscheidend. Die optische Sensitivität wurde, wie in der Literatur beschrieben, unabhängig sowohl in vertikaler als auch in lateraler Richtung kalibriert.<sup>[207]</sup> Die vertikale Federkonstante wurde über das thermische Rauschen<sup>[208]</sup> und die Sader-Methode<sup>[209]</sup> kalibriert und über die geometrischen Maße der Feder aus REM-Aufnahmen berechnet. Die laterale Federkonstante wurde aus drei Verfahren gemittelt: Ableitung aus den Werten der vertikalen Federkonstante, Berechnung aus den *Cantilever*-Abmessungen auf Grundlage der Balken-Mechanik<sup>[207]</sup> und Anwendung der torsionalen Sader-Methode<sup>[210]</sup>. Um Schwankungen zu minimieren wurde für alle Messungen derselbe *Cantilever* (MikroMasch) mit einer lateralen Federkonstante von  $202 \pm 14$  N/m verwendet. Bei den Experimenten wurden zunächst die Querschnitte der Fasern und das betreffende freihängende Fasersegment im intermittierenden Modus abgebildet. Anschließend wurde die Spitze des *Cantilevers* neben der Fasermittte (halber Weg zwischen den festgeklebten Faserenden) positioniert und so gesenkt, dass sich das Spitzenende  $1 \mu\text{m}$  unterhalb der Oberkante der Faser befand. Im Anschluss wurde die Spitze senkrecht zur Faserausrichtung gefahren und dabei die Kraft  $F_{\text{Mitte}}$  gemessen, die während des Biegens, Dehnens und Reißens der Faser auftrat. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms IGOR Pro (WaveMetrics) durch Fitten der ermittelten Kraft-Dehnungskurven auf Basis eines Modells von Heidelberg et al.<sup>[211]</sup>:

$$F_{\text{Mitte}} = \frac{192EI}{L^3} \Delta z_{\text{Mitte}} + \frac{8EA}{L^3} \Delta z_{\text{Mitte}}^3 \quad \text{[Formel 7]}$$

Die Querschnittsfläche  $A$  und das Flächenträgheitsmoment  $I$  konnten aus den Faserquerschnitten abgeleitet und berechnet werden. Die Formel beinhaltet zwei mechanische Komponenten – eine lineare und eine kubische Abhängigkeit der Kraft von der lateralen Deformation  $\Delta z_{\text{Mitte}}$ . Beide Komponenten sind abhängig vom Elastizitätsmodul  $E$  und der Faserlänge  $L$ . Die lineare Komponente beinhaltet das Flächenträgheitsmoment  $I$  und repräsentiert die Kraftkomponente der elastischen Biegung der Faser, welche insbesondere bei Deformationen kleiner dem Faserradius ins Gewicht fällt. Mit zunehmender Deformation dominiert schließlich die kubische Komponente, die unabhängig vom Flächenträgheitsmoment, jedoch abhängig von der Querschnittsfläche  $A$  ist. Sie beschreibt die Kraft, die aufgrund der Dehnung der Faser auftritt. Anhand dieser Auswertung konnte der Elastizitätsmodul ermittelt werden und für große Deformationen eine Abschätzung der effektiven Zugfestigkeit, Bruchdehnung und Zähigkeit berechnet werden. Um eine kontrollierte Luftfeuchtigkeit

einstellen zu können, wurden die Versuche in einer Luftfeuchtigkeitszelle (Asylum Research) durchgeführt. Die Luftfeuchtigkeit wurde über einen Zustrom von feuchtem und trockenem Helium angepasst. Die Versuche wurden bei 10, 30 und 80 % r.H. durchgeführt.

### 2.2.5.3 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Transmissionselektronenmikroskopie wurde eingesetzt, um die Adhäsionsmechanismen von Fibroblasten auf eADF4-Vliesen zu untersuchen. Die Methode ist eng verwandt mit der Rasterelektronenmikroskopie (Kapitel 2.2.5.1), wobei der Elektronenstrahl bei der TEM eine ausreichend dünne Probe durchdringt und die Elektronen detektiert werden, die durch die Probe hindurchdringen.<sup>[212]</sup> Die Methode eignet sich besonders gut für biologische Proben, da deren Hauptbestandteile Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff Elektronen aufgrund ihrer niedrigen Kernladungszahl nur geringfügig ablenken und sie deshalb verhältnismäßig dick sein dürfen.<sup>[213]</sup>

Für die TEM-Untersuchungen mussten die Proben zunächst fixiert werden. Die Fixierung wurde von Kristin Schacht, Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth, durchgeführt. Dazu wurden die Proben aus dem Zellkulturmedium entnommen und im Fixiermittel (80 mM HEPES, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5 % Glutaraldehyd, pH 7,3) für 20 min bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das Fixiermittel ersetzt und die Proben zunächst 30 min bei Raumtemperatur, und anschließend nach weiterem Austausch des Fixiermittels 60 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei 5 - 10 minütigen Waschschritten mit Fixiermittel wurden die Proben zur Kontrastierung für 60 min in wässrige 1 %ige Osmoniumtetroxidlösung gegeben. Anschließend wurden die Proben dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich in 1 % Difco™ Agar Noble (Becton) eingebettet (die Agarose wurde zum Verflüssigen in einer Mikrowelle aufgeköcht). Nach dem Aushärten wurde die Agarose in kleine Teile geschnitten, die zur Kontrastierung über Nacht bei 4 °C in wässriger 1 %iger Uranylacetatlösung gelagert wurden. Die Dehydrierung wurde mittels Konzentrationsgradienten in Ethanol (30 %, 50 % je 20 min bei 4 °C und 70 %, 90 % sowie 2 x 100 % je 20 min bei -22 °C) mit anschließender Propylenoxidspülung (2 x für 20 min bei -22 °C) durchgeführt. Das Propylenoxid wurde danach im Abzug verdampft und die Agaroseblöckchen für 7 h mit Glycidether 100 (Serva) infiltriert. Anschließend wurden dünne Schichtschnitte (60 - 70 nm) mit einem Ultra 35° Diamantmesser (Diatome) auf einem EM UC6 Ultramikrotom (Leica Microsystems) vorgenommen. Die Schnitte wurden auf Pioloform-Kupfernetzen (Plano) platziert und mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Anschließend konnten die Proben mit einem JEM-2100 TEM (JEOL) bei einer

Spannung von 80 kV untersucht werden (Kamera: Erlangshen ES500W, Gatan; Software: Digital Micrograph Software 1.70.16, Gatan).

### 2.2.6 Zugversuche

Um die mechanischen Eigenschaften von eADF4-, PCL und PA6-Garnen sowie nassgesponnener eADF3-Fasern und natürlicher *A. diadematus Dragline* zu untersuchen, wurden Spannungs-Dehnungskurven mit einer Electroforce 3200 Zugmaschine (Bose) durchgeführt. Beim klassischen Zugversuch wird eine Probe mit definierter Länge  $L_0$  und Querschnittsfläche  $A_0$  kontinuierlich gedehnt und dabei die Kraft  $F$  gemessen, die während der Deformation  $\Delta L$  von der Probe aufgenommen wird. Die dabei auftretende Spannung  $\sigma_E$  und Dehnung  $\varepsilon_E$  können wie folgt berechnet werden (das  $E$  im Subskript steht für *Engineered*):

$$\sigma_E = \frac{F}{A_0} \quad \text{[Formel 8]}$$

$$\varepsilon_E = \frac{\Delta L}{L_0} \quad \text{[Formel 9]}$$

Bei dieser Form der Auswertung werden die Dehnung und Spannung auf Basis der ursprünglichen Länge und Querschnittsfläche der Probe berechnet. Dabei wird jedoch nicht die Verjüngung des Querschnitts während der Messung berücksichtigt. Außerdem wird eine Längenzunahme der Probe während der Messung immer auf die ursprüngliche Länge bezogen, wobei die bereits aufgebrauchte vorhergehende Längenzunahme vernachlässigt wird. Diese Effekte fallen jedoch vor allem bei großen Dehnungen ins Gewicht. Deshalb wurden die Kraft-Deformationskurven im Rahmen dieser Arbeit nach der Methode der wahren Spannung und Dehnung ausgewertet.<sup>[214]</sup> Für die Berechnung der wahren Spannung wird dabei von einem konstanten Probenvolumen während der Messung ausgegangen, weshalb für den Querschnitt  $A$  und die Länge  $L$  der Probe in einem beliebigen Stadium der Messung gilt:

$$A \cdot L = A_0 \cdot L_0 \quad \text{[Formel 10]}$$

Es folgt also unter Einbezug von Formel 8 für die Berechnung der wahren Spannung  $\sigma_w$ :

$$\sigma_w = \frac{F}{A} = \frac{F}{A_0} \cdot \frac{L}{L_0} = \sigma_E(1 + \varepsilon_E) \quad \text{[Formel 11]}$$

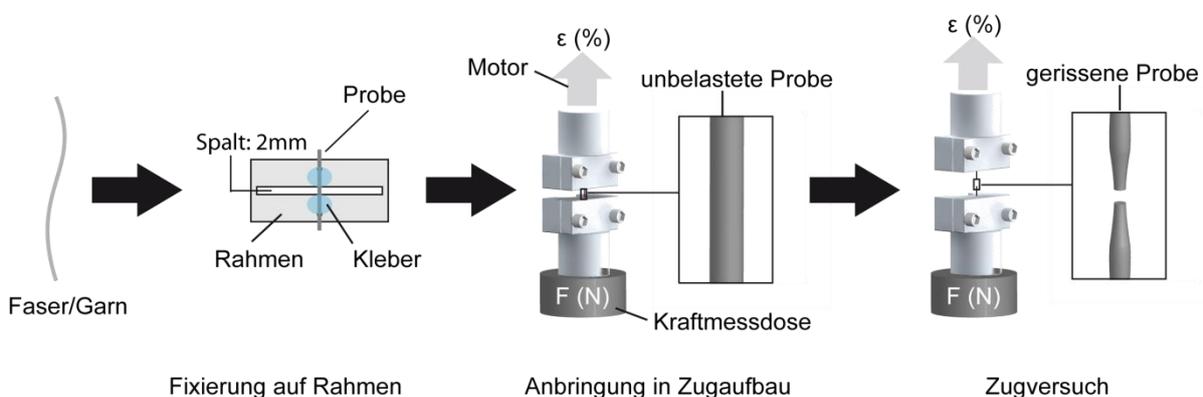
Die wahre Dehnung kann als Summe infinitesimal kleiner Dehnungen  $d\varepsilon$  betrachtet werden, die durch Längenänderungen  $dL$  der aktuellen Probenlänge  $L$  zum Zeitpunkt der Längenänderung zustande kommen:

$$d\varepsilon = \frac{dL}{L} \quad \text{[Formel 12]}$$

Durch Integration von Formel 12 mit der ursprünglichen Länge  $L_0$  und der finalen Länge  $L_F$  als Randbedingungen ergibt sich für die wahre Dehnung  $\varepsilon_w$ :

$$\varepsilon_w = \int d\varepsilon = \int_{L_0}^{L_F} \frac{dL}{L} = \ln\left(\frac{L_F}{L_0}\right) = \ln\left(\frac{L_0 + \Delta L}{L_0}\right) = \ln(1 + \varepsilon_E) \quad \text{[Formel 13]}$$

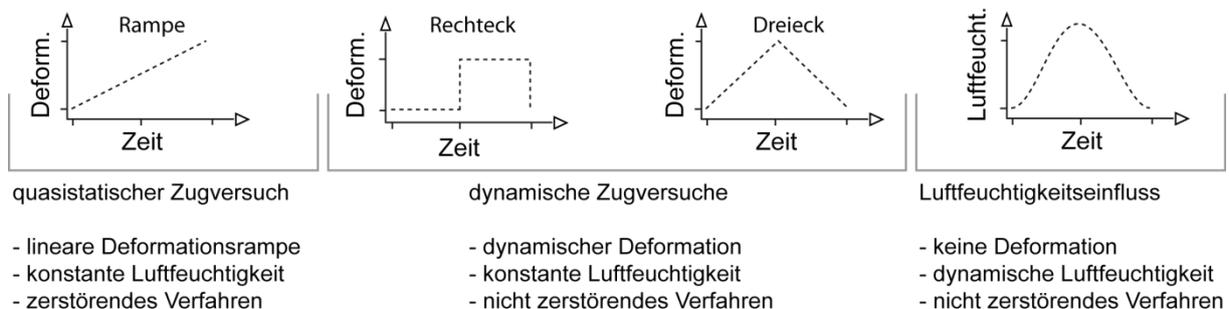
Diese Auswertung von Kraft-Deformationskurven nach der wahren Spannung und Dehnung wurde in der Literatur vielfach zur Bestimmung mechanischer Eigenschaften von Spinnenseide eingesetzt und fand auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung.<sup>[215-218]</sup> Für die Zugversuche wurden trockene Garne/Fasern zunächst in ca. 1 cm lange Segmente geschnitten und mit Nagellack (Maybelline) auf lasergecuttete Rahmen (Spaltbreite: 2 mm) geklebt (Abbildung 22). Die Proben wurden bis zur Messung bei Raumtemperatur gelagert. Für die Zugmessungen wurden die fixierten Fasern in die Klemmbacken der Zugmaschine eingespannt und die Stege der Rahmen durchtrennt. Bei den Kraftmessungen wurden zwei verschiedene Kraftmessdosen (Nennkraft: 0,49 N und 2,45 N) verwendet, die jeweils auf Basis der zu erwartenden maximalen Kraft beim Materialversagen ausgewählt wurden. Die Kraft-Deformationskurven wurden im Computerprogramm Wintest 4.1 (Bose) mit einer Auflösung von 2 Messpunkten pro Sekunde aufgezeichnet und für die weitere Auswertung mit Excel (Microsoft) als Datenpunkttabellen exportiert.



**Abbildung 22: Vorgehensweise bei Zugversuchen:** Zunächst wurden die Fasern/Garne auf Rahmen geklebt und anschließend in den Klemmbacken der Zugmaschine fixiert. Nachdem die Stege des Rahmens durchtrennt wurden, konnten die Proben durch einen Motor gedehnt und die dabei auftretende Kraft bis zum Bruch gemessen werden.

Die Zugversuche wurden unter definierten Feuchtigkeitsbedingungen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Kammer gebaut, die den Messaufbau umschließt und mit einer Luftfeuchtigkeitsregelung (Mytrom) definierte Messbedingungen geschaffen. Die Luftfeuchtigkeit wurde dabei durch einen Ultraschall-Luftbefeuchter erhöht und durch Zuströmen von trockenem Stickstoff reduziert. Die Feuchtigkeitsmessung erfolgte durch zwei Sensoren, die jeweils im Abstand von ca. 2 cm gegenüberliegend an der eingespannten Probe positioniert waren, wobei der zweite Sensor lediglich zur Kontrolle eingesetzt wurde. Die Abweichung der beiden Sensoren betrug im equilibrierten Zustand maximal 2 %. Für Versuche, die unter dynamischen Feuchtigkeitsbedingungen durchgeführt wurden, wurde die Luftfeuchtigkeit am Computer über die Software iTools Engineering Studio aufgezeichnet.

Im Rahmen der Arbeit wurden vier verschiedene Prüfverfahren eingesetzt (Abbildung 23). Zur Ermittlung mechanischer Kennwerte wie Zugfestigkeit, Bruchdehnung, Elastizitätsmodul und Zähigkeit wurde ein quasistatischer Zugversuch durchgeführt (Kapitel 3.3.2.). Ferner wurden dynamische Zugversuche eingesetzt, um das Relaxations- (Rechteck), sowie Ermüdungsverhalten (Dreieck) der Garne/Fasern zu untersuchen (Kapitel 3.3.5). Um das Superkontraktionsverhalten der Proben zu beurteilen wurden sie in einem weiteren Versuch im entspannten Zustand fixiert und ihre mechanische Reaktion auf dynamische Luftfeuchtigkeitsänderungen untersucht (Kapitel 3.3.6).



**Abbildung 23: Überblick über mechanische Prüfverfahren, die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurden.,**

Die individuell verwendeten Messparameter sind im Ergebnisteil bei den jeweiligen Versuchen aufgeführt.

### 2.2.7 Zellkulturexperimente

Um das Wachstumsverhalten von Fibroblasten auf eADF4(C16)-Vliesen mit unterschiedlichen Faserdurchmessern zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Aldo Leal-Egaña (Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth) Adhäsions- und Proliferationsexperimente anhand der Mausfibroblastenzelllinie M-MSV-BALB/3T3 (European Collection of Cell Cultures) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die nachbehandelten Vliese auf ringförmige Rahmen (CellCrown Inserts, Scaffdex) gespannt und in unbehandelten Zellkulturplatten (Nunc) fixiert. Die Zellkulturplatten bieten eine ungeeignete Adhäsionsgrundlage für Fibroblasten, so dass bei den Versuchen davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen ausschließlich auf den Vliesen wuchsen. Als Positivkontrolle wurden analog Fibroblasten auf behandelten Zellkulturplatten (Nunc) kultiviert, die den Zellen eine sehr gute Adhäsionsgrundlage bieten. Die Adhäsion ist für M-MSV-BALB/3T3 Zellen eine Grundvoraussetzung für ihr Überleben und ihre Proliferation. Zellen die nicht adhären sind sterben innerhalb weniger Stunden.

#### 2.2.7.1 Zellkulturmedium und Inkubationsbedingungen

Als Kulturmedium wurde DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Biochrom) verwendet. Zusätzlich wurde dem Medium 10 % v/v FBS (*Fetal Bovine Serum*, Biochrom) zugegeben, um die Proliferation aufgrund der enthaltenen Proteine und Wachstumsfaktoren zu begünstigen. L-Glutamin spielt in der Zellkultur eine wichtige Rolle bei der Energieerzeugung sowie zur Synthese von Nucleinsäuren und Proteinen. In Lösung neigt es jedoch zur Zyklierung, wobei Ammoniak freigesetzt wird. Um zu verhindern, dass toxisches Ammoniak entstand, wurde 1 % v/v GlutaMAX (GIBCO) beigegeben. GlutaMAX enthält eine stabilisierte Dipeptidform von L-Glutamin, nämlich L-Alanyl-L-Glutamin, die auch bei längeren Inkubationszeiten stabil bleibt und kein Ammoniak freisetzt. Außerdem wurden 0,1 % v/v des Breitbandantibiotikums Gentamicinsulfat (Sigma-Aldrich) zugegeben, welches das Wachstum einer Vielzahl sowohl gramnegativer als auch grampositiver Mikroorganismen inhibiert. Somit wurde sichergestellt, dass es zu keiner Bakterienkontamination im Medium kam. Die Zellen wurden für alle Versuche bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % unter Rühren im Brutschrank inkubiert.

### 2.2.7.2 Zelladhäsionsversuch

Bei einem Adhäsionsversuch wird die Fähigkeit von Zellen untersucht, auf einer gegebenen Substratoberfläche zu adhären. Ob eine Oberfläche zum Zellbewuchs geeignet ist hängt maßgeblich von drei physikochemischen Faktoren ab: die chemischen, die morphologischen und die mechanischen Oberflächeneigenschaften.<sup>[219]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden eADF4-Vliese mit unterschiedlichen Faserdurchmessern als Wachstumssubstrate eingesetzt und auf diese Weise die morphologischen Adhäsions- und Proliferationsbedingungen für Fibroblasten variiert.

Für die Adhäsionsversuche wurden nachbehandelte Vliese auf CellCrown Inserts fixiert (Fläche: 0,79 cm<sup>2</sup>) und in unbehandelte 24-Well Zellkulturplatten gegeben. Im Folgenden wurde zunächst 1 ml Kulturmedium (Kapitel 2.2.7.1) und anschließend eine konzentrierte Zellsuspension zugegeben. Die Vorkultur der Zellsuspension wurde von Dr. Aldo Leal-Egaña angesetzt. Bei der Zugabe der Zellen wurde die Menge so gewählt, dass durch Zellsedimentation eine theoretische Zelldichte von ca. 100.000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf der Vliesoberfläche auftrat. Nach 4 h Inkubationszeit wurden zwei Waschschriffe mit PBS-Puffer (Sigma-Aldrich) durchgeführt, um tote und nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Für die analytische Auswertung der Experimente wurden anschließend 10 % v/v CellTiter-Blue (Promega) zugegeben und die Kultur für weitere 2,5 h inkubiert. Während dieser Zeit kam es durch die Fibroblasten zur Metabolisierung des im CellTiter-Blue enthaltenen Resazurins, welches blau und nicht fluoreszierend ist. Dabei entstand Resorufin, was wiederum bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$  zur Fluoreszenz mit einer Wellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$  führt. Je mehr vitale Zellen in der Kultur waren, desto mehr Resorufin wurde also hergestellt. Die quantitative Analyse erfolgte durch Fluoreszenzmessungen in einem Mytras LB 940 Plattenlesegerät (Berthold) mit einer Messdauer von 0,5 s und unter Verwendung von F530- und F600-Filtern für die Anregung und Emission der Strahlung. Bei der Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der Kulturen in behandelten Zellkulturplatten als Positivkontrolle und somit 100 % definiert und die Messwerte der Kulturen auf eADF4-Vliesen anteilmäßig darauf referenziert.

### 2.2.7.3 Zellproliferationsversuch

Beim Proliferationsversuch wurde das Wachstumsverhalten der Zellen über sechs Tage, also über mehrere Teilungszyklen, untersucht. Die verwendeten Fibroblasten bilden Monofilme, so dass das Wachstum der Kultur durch die verfügbare freie Oberfläche limitiert ist. Um zu verhindern, dass unzureichend freie Vliesoberfläche die Proliferation der Zellen während der Versuchsdauer

inhibierte, wurden unbehandelte 6-Well Zellkulturplatten für größere CellCrown-Inserts (5,31 cm<sup>2</sup>) als beim Adhäsionsversuch verwendet. Ferner wurde mit einer geringeren Anfangszellichte (5000 Zellen/cm<sup>2</sup>) bei einem Volumen von 3 ml Kulturmedium gearbeitet. Nach der 4-stündigen Adhäsionsphase wurde zweimal mit PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) gewaschen, um nicht adhären und tote Zellen zu entfernen. Im weiteren Verlauf des Experiments wurde täglich einmal mit PBS gewaschen und die Kultur für 2,5 h in Medium mit 10 % v/v CellTiter-Blue inkubiert. Anschließend wurde, wie im Adhäsionsversuch (Kapitel 2.2.7.2), die Resorufinfluoreszenz als Indikator für die Anzahl vitaler Zellen gemessen. Als Blank wurde die Intensität von Medium mit 10 % v/v CellTiter-Blue ohne Zellen gemessen. Als Positivkontrolle wurde, wie bei den Adhäsionsversuchen, die Fluoreszenzintensität der Medien von Zellkulturen auf behandelten Zellkulturplatten hinzugezogen. Auf Basis der täglich durchgeführten Fluoreszenzmessungen und dem zeitlichen Verlauf der Intensitäten konnte das Wachstum der Kulturen auf unterschiedlichen Substraten verfolgt werden.

Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen zunächst an der Vliesoberfläche adhären, dann eine Adaptionsphase durchlaufen, in der sie ihren Metabolismus an das Medium anpassen, und schließlich in der exponentiellen Phase proliferieren. Das Zellwachstum  $\frac{dX}{dt}$  in der exponentiellen Phase lässt sich mathematisch durch ein Monod-Modell erster Ordnung beschreiben, indem die zeitabhängige Konzentration  $X(t)$  vitaler Zellen, die Inkubationsdauer  $t$ , sowie die Proliferationsrate  $\mu$  und die Sterberate  $K_d$  einbezogen werden:<sup>[220]</sup>

$$\frac{dX}{dt} = X(t) \cdot (\mu - K_d) \quad \text{[Formel 14]}$$

Da es sich bei M-MSV-BALB/3T3 um eine immortalisierte Zelllinie handelt und die Versuchsdauer relativ kurz war (6 Tage), wurde für die Auswertung angenommen, dass die Sterberate  $K_d$  relativ zur Proliferationsrate  $\mu$  vernachlässigbar ist. So ergibt sich die vereinfachte Formel:

$$K_d \ll \mu \rightarrow \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X(t) \quad \text{[Formel 15]}$$

Durch Integration kann die Formel wie folgt umgeschrieben werden:

$$\int \frac{1}{X(t)} dX = \int \mu dt \quad \text{[Formel 16]}$$

$$\ln X(t) = \mu \cdot t + c \quad \text{[Formel 17]}$$

Als proportionales Maß für die zeitabhängige Konzentration der Zellen  $X(t)$  wurde im Rahmen dieser Arbeit der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität verwendet. Die gemessenen Intensitäten  $I(t)$  wurden dabei um den Wert der Blindprobe  $I_B$  korrigiert. Um diese Werte mathematisch auswerten zu können, wurde Formel 17 wie folgt transformiert, wobei  $I_0$  die Intensität am ersten Tag ist:

$$\ln\left(\frac{I(t)-I_B}{I_0-I_B}\right) = \mu \cdot t + c \quad \text{[Formel 18]}$$

Für die Auswertung der gemessenen Kurven wurde Formel 18 verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Verläufe der Fluoreszenzintensitäten aller Proben logarithmisch über die Zeit aufgetragen. Anhand dieser Auftragung konnte der Zeitbereich des exponentiellen Wachstums als linearer Kurvenverlauf identifiziert und in Excel (Microsoft) gefittet werden. Die Steigung der entsprechenden Ausgleichsgeraden spiegelte die Proliferationsrate wieder, auf deren Basis wiederum die Verdopplungszeit  $T_d$  berechnet werden konnte. Dabei handelt es sich um die Zeit, die eine Kultur braucht um ihre Anfangspopulation  $X_0$  um Faktor zwei zu vergrößern:

$$X(T_d) = 2 \cdot X_0 \quad \text{[Formel 19]}$$

$$2 \cdot X_0 = X_0 \cdot e^{\mu T_d} \quad \text{[Formel 20]}$$

$$T_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{[Formel 21]}$$

Somit konnte auf Basis von Formel 18 und Formel 21 das Proliferationsverhalten der Zellen auf unterschiedlichen Substraten charakterisiert werden.

### 2.2.8 Luftdurchlässigkeitsmessung

Um die Luftdurchlässigkeit kommerzieller Filtergewebe nach dem elektrostatischen Besspinnen mit eADF4(C16)-Fasern zu untersuchen, wurden entsprechende Messungen mit einem Akustron Luftdurchlässigkeitstester (Thwing-Albert) durchgeführt. Das Gerät erfüllt die Normen DIN 53887, DIN 53120, ISO 9237 und ASTM D737-96 und eignet sich für einen Messbereich von 30 – 3000 l/m<sup>2</sup>s bei einer Druckdifferenz von 200 Pa. Dabei wird die Probe zwischen zwei Membranen fixiert, die wie bei einem Lautsprecher, mit Schwingspulen in Elektromagneten gekoppelt sind. Die untere Membran wird durch den Elektromagneten aktiv in Schwingung versetzt und erzeugt somit eine oszillierende Luftsäule, die durch die Probe gelangt und die Membran auf der anderen Seite der

Probe in Vibration versetzt. Diese Schwingungen können anhand der resultierenden Induktion in der Spule des Elektromagneten gemessen und somit Rückschlüsse auf die Luftdurchlässigkeit der Probe gezogen werden. Für die Messungen wurden Polyamidgewebe elektrostatisch besponnen und ihre Luftdurchlässigkeit im trockenen Zustand gemessen. Dabei betragen die gemessenen Flächen jeweils 5 x 12 cm.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konzeption und Umsetzung einer Anlage zum elektrostatischen Spinnen

##### 3.1.1 Aufbau einer Anlage zum elektrostatischen Spinnen

Um ein möglichst breites Spektrum an Experimenten zu ermöglichen wurde eine neue Anlage zum elektrostatischen Faserspinnen konzeptioniert und etabliert (Abbildung 24, A). Aufbauend auf dem Systemstandard (Spritzenpumpe, Kapillare und Hochspannungsmodul), sollte die Anlage primär für die Herstellung von einerseits größeren Vliesflächen sowie andererseits für das Spinnen ausgerichteter Fasern geeignet sein. Die Anlage wurde in Zusammenarbeit mit Anja Lauterbach am Lehrstuhl für Biomaterialien entworfen und von der Mechanikwerkstatt der Universität Bayreuth gebaut. Zudem wurde von der Elektronikwerkstatt der Universität Bayreuth eine Software entwickelt, durch die sich die komplette Anlage computersteuern lässt.

Um große Flächen möglichst homogen bespinnen zu können verfügt die Anlage über eine programmierbare X-Y-Steuerung der Spinnvorrichtung (Abbildung 24, B). Der Spinnkopf (bestehend aus Spritze mit Kanüle, Spritzenpumpe und Mikroskopkamera) wird dabei wie bei einem Plotter über zwei Schienen bewegt. Der Bewegungsablauf wird über die Software mit dem Ein- bzw. Abschalten der Hochspannung synchronisiert. Die maximal bespinnbare Fläche beträgt 74 x 94 cm (0,7 m<sup>2</sup>). Die Kanüle ist mit der Hochspannungsquelle verbunden und wird von einer PVC-Röhre (Innendurchmesser: 50 mm, Außendurchmesser: 54 mm, Höhe: 50 mm) in radialer Richtung abgeschirmt. An der Innenseite der Röhre befindet sich eine Ringelektrode (Breite: 10 mm), die mit dem Potential der Kanüle geladen ist (Abbildung 24, C). Um die Ausbildung des Taylor-Konus, sowie Fließinstabilitäten und Vertrocknungserscheinungen an der Kanülenöffnung im Detail beobachten zu können wurde eine Mikroskopkamera an einem Schwanenhals angebracht.

Für das Verspinnen ausgerichteter Fasern wurde ein rotierender Zylinder (∅ 14 cm) angebracht (Abbildung 24, D, links). Dieser wird über einen Elektromotor angetrieben und kann Drehzahlen bis zu 4500 rpm erreichen, wobei die resultierende Oberflächengeschwindigkeit 33 m/s beträgt. Der Zylinder besteht aus PVC, auf das zwei rundumlaufende Kontaktstreifen aus Aluminium geklebt sind. Der erste Streifen (Breite: 1 cm) wird über einen Schleifkontakt mit einer zweiten Hochspannungsquelle verbunden. Über einen querlaufenden Streifen (Breite: 2 mm) wird der zweite Kontaktstreifen (Breite: 2 mm), der als Gegenelektrode fungiert, mit dem Schleifkontakt verbunden. Um, mit Ausnahme der Gegenelektrode, alle kontaktierten Teile (Schleifkontakt, Querkontakt) als unerwünschte potentielle Faserattraktoren abzuschirmen, wurde auf den Zylinder eine PVC-

Verschaltung gesetzt (Abbildung 24, D, rechts). An der Oberseite der Verschaltung befindet sich eine kreisförmige Öffnung (Durchmesser: 45 mm), die exakt über der Gegenelektrode liegt und die Ablage der Fasern an dieser Stelle ermöglicht. Aufgrund der Rotation des Zylinders entsteht an der Öffnung ein Luftzog, der die Ablage der Fasern auf dem Aluminiumstreifen begünstigt. Um kontrollierte Umgebungsbedingungen zu schaffen, ist die Anlage mit einer Luftfeuchtigkeitsregelung (Mytron Feuchtigkeitsregler FR 400) ausgestattet.

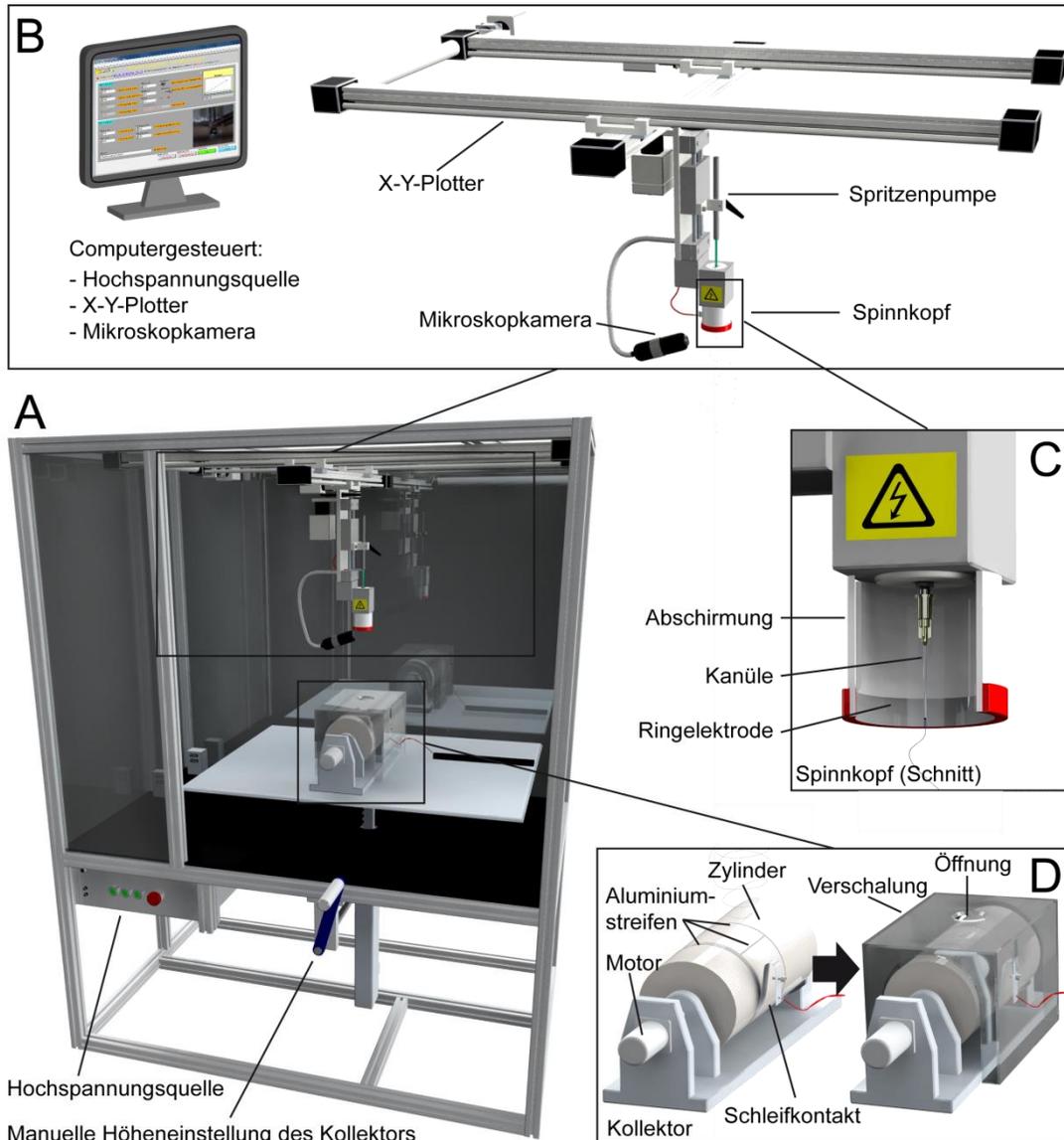
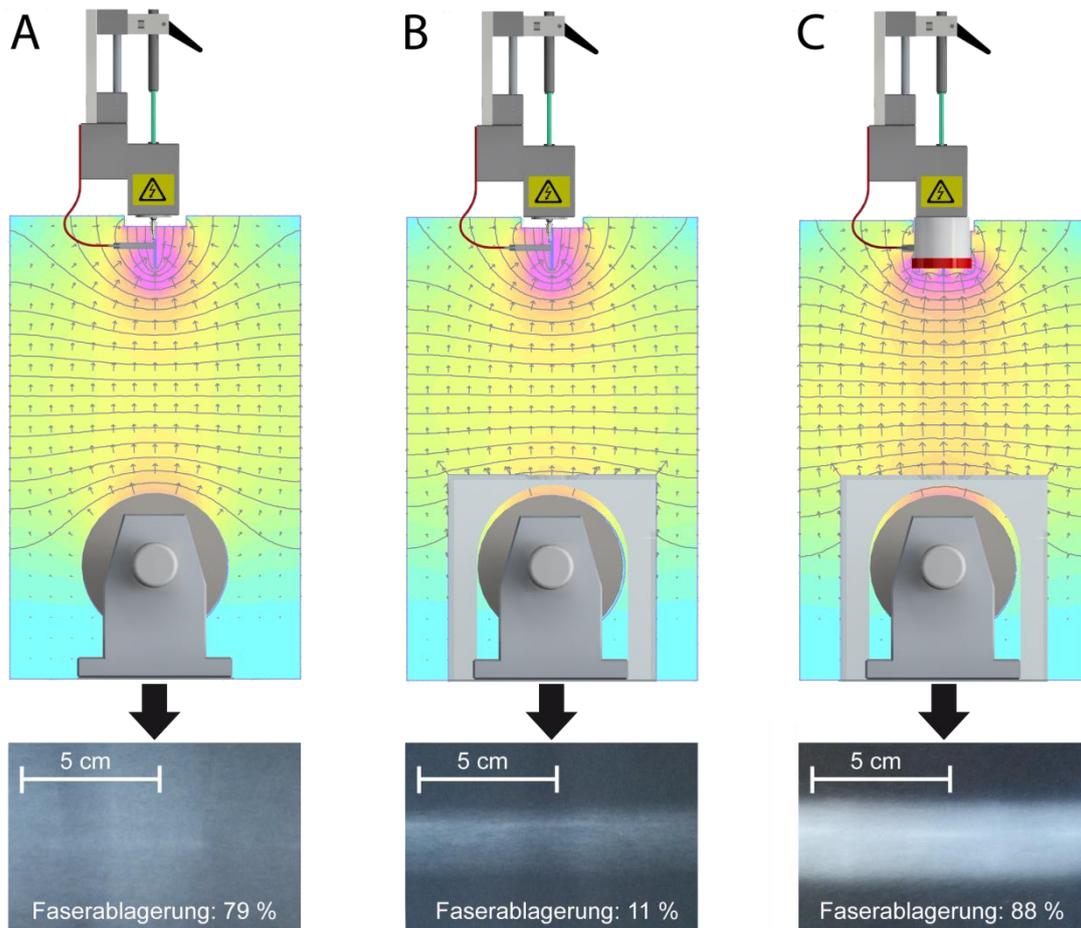


Abbildung 24: CAD-Konstruktion der gesamten Elektrospinnanlage (A). Der Spinnkopf, die Spritzenpumpe und die Mikroskopkamera sind an einem X-Y-Plotter angebracht, der die computergesteuerte Koordination über dem Kollektor ermöglicht (B). Der Spinnkopf besteht aus der kontaktierten Kanüle sowie einer Abschirmung an deren Innenseite eine Ringelektrode angebracht ist, die dasselbe Potential wie die Kanüle trägt (C). Um ausgerichtete Fasern herzustellen wird ein rotierender Zylinder als Kollektor eingesetzt (D). Der Zylinder wird durch einen Elektromotor angetrieben und ist von einer Verschaltung umgeben, die als Feldabschirmung dient und den Einfluss der Luftströmung reduziert. Sie ist mit einer Öffnung versehen, die sich auf Höhe der Gegenelektrode befindet und die Ablagerung der Fasern auf dem Zylinder ermöglicht.

### 3.1.2 Einfluss der Abschirmungen und Elektrodengeometrie

Um eine kontrollierte Ablage der Fasern auf dem Kollektor zu gewährleisten, wurden Abschirmungen sowohl am Spinnkopf als auch am Kollektor angebracht (Abbildung 24, C, D). Die Abschirmungen bestehen aus PVC und wirken im elektrischen Feld als Dielektrikum. Die obere Abschirmung wurde so am Spinnkopf angebracht, dass die radiale Feldkomponente an der Kanüle, und somit die nach außen wirkende Kraft auf geladene Teilchen, reduziert wurde. Zu diesem Zweck wurde an der Innenseite der Abschirmung eine Ringelektrode mit gleichem Potential wie das der Kanüle angebracht, die die Ausrichtung des elektrischen Feldes in vertikale Richtung verstärken sollte. Die Verschalung des Zylinders sollte den Einfluss von Luftverwirbelungen aufgrund hoher Drehzahlen reduzieren und die gezielte Faserablage an der Gegenelektrode begünstigen.

Um Rückschlüsse auf den Einfluss der Abschirmungen zu ziehen, wurden drei Konstellationen betrachtet und die jeweiligen elektrostatischen Felder simuliert. Abbildung 25 zeigt die untersuchten Aufbauten und darunter die in der Praxis erzielten Ergebnisse. Im Hintergrund sind zur Veranschaulichung die simulierten elektrischen Felder abgebildet, auf die nachfolgend genauer eingegangen wird. Die Fasern wurden jeweils aus 10 % w/v eADF4(C16) in HFIP versponnen (Spinnparameter: Drehzahl  $n = 4500$  rpm, Spannung oben  $U_o = -20$  kV, Spannung unten  $U_u = 10$  kV, Flussrate  $\dot{V} = 14$   $\mu\text{l}/\text{min}$ , Spinndauer  $t = 4$  min, Spinnabstand  $d = 20$  cm, Innendurchmesser der Kanüle  $d_k = 0,8$  mm, relative Luftfeuchtigkeit: 50 % r.H.). Auf den Zylinder wurde ein Streifen aus schwarzem Papier geklebt, auf dem die abgelegten Fasern als weißer Niederschlag gut sichtbar waren und sich später einfach abziehen ließen. Der Anteil an Fasern, die sich am Kollektor ablagerten, wurde bestimmt, indem die Fasermatten nach dem Verspinnen vom Papier abgezogen und gewogen wurden. Die jeweilige Masse wurde mit der versponnenen Proteinmenge verglichen und somit ein prozentualer Anteil an abgelagertem Material bestimmt. Beim Aufbau ohne Abschirmungen lagerten sich 79 % des versponnenen Materials in Form von Fasern homogen über der gesamten Fläche des Papiers ab (Abbildung 25, A). Durch Verschalung des rotierenden Zylinders wurde zwar die Ablagerung der Fasern auf einen kleineren Bereich beschränkt, jedoch kam es hier zu einem großen Materialverlust, da nur 11 % der Proteinmasse auf dem Kollektor zu finden waren (Abbildung 25, B). Eine deutliche Verbesserung konnte durch die Ringelektrode am Spinnkopf erzielt werden (Abbildung 25, C), wobei sich 88 % des versponnenen Proteins in Form von Fasern auf einer definierten Breite (ca. 3,5 cm) ablagerten.



**Abbildung 25:** Übersicht über die drei getesteten Aufbauten und die resultierende Faserablage mit Angabe des Proteinmassenanteils, der sich auf dem Kollektor anlagerte: Aufbau ohne Abschirmungen (A), Aufbau mit Verschalung am Kollektor (B) sowie Aufbau mit Ringelektrode am Spinnkopf und Verschalung am Kollektor (C).

Um insbesondere den positiven Effekt der Abschirmungen mit der zusätzlichen Ringelektrode am Spinnkopf theoretisch nachvollziehen zu können, wurden elektrostatische Feldsimulationen durchgeführt. Dabei wurde zur Vereinfachung ein planares 2-D Modell des Spinnbaus angenommen. Die Parameter (Spannung, Abstand, Bemaßungen) wurden entsprechend dem praktischen Versuch eingestellt. Abbildung 26 zeigt die farblich markierte Verteilung der Feldstärke sowie die Feldvektoren (Pfeile) und Äquipotentiallinien (Konturen). Aus den Simulationen geht hervor, dass die Verschalung des Zylinders nur einen geringfügigen Einfluss auf das elektrische Feld hat, der sich auf einen kleinen Bereich oberhalb der Gegenelektrode beschränkt (vergleiche Abbildung 26, A und B). Durch Einbau der Abschirmung mit der Ringelektrode hingegen ist eine deutliche Veränderung der Feldverteilung zu erkennen (Abbildung 26, C). Die Feldstärke nimmt im mittleren Bereich zwischen den beiden Elektroden zu, während die Feldvektoren unterhalb der Kanülenöffnung in vertikaler Richtung umgelenkt werden.

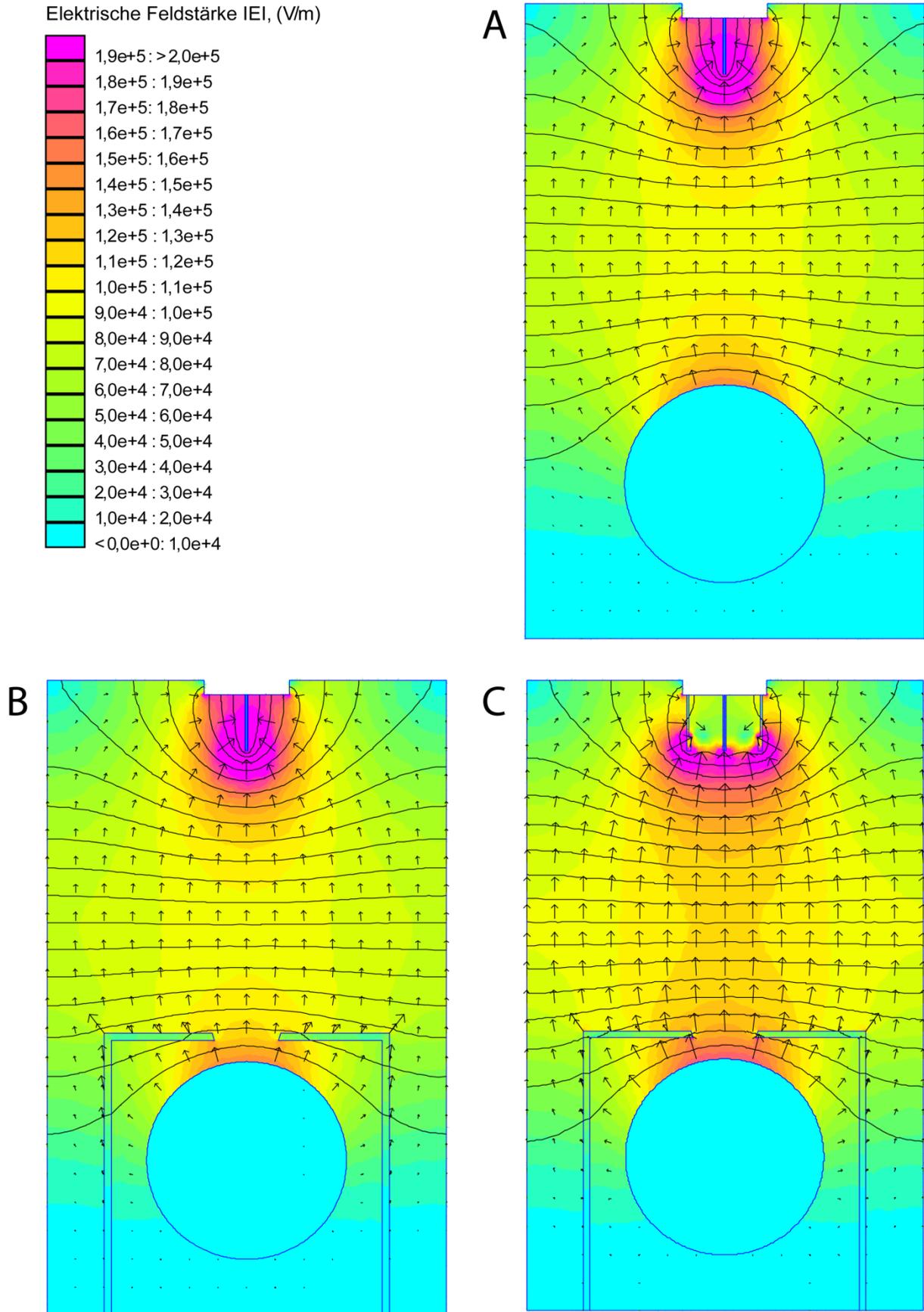


Abbildung 26: Elektrostatische Feldsimulationen der drei verschiedenen Aufbauten: Aufbau ohne Abschirmungen (A), Aufbau mit Verschaltung am Kollektor (B), Aufbau mit Ringelektrode am Spinnkopf und Verschaltung am Kollektor (C).

Da vor allem die Richtung der Feldvektoren entscheidend für die Flugbahn der Fasern ist, wurden im Folgenden die Feldstärkenprofile (von der Mittelachse der Kanüle jeweils 10 cm nach links und rechts) nahe der Kollektorelektrode (vertikale Abstände: 1 mm, 5 mm, 20 mm) betrachtet. Dabei wurden die Feldvektoren in ihre vertikalen und horizontalen Komponenten  $E_v$  und  $E_h$  unterteilt und die resultierenden Feldstärkenprofile für den Aufbau ohne Verschalung (Abbildung 27, A-C) und mit Verschalung (Abbildung 27, D-F) aufgetragen.

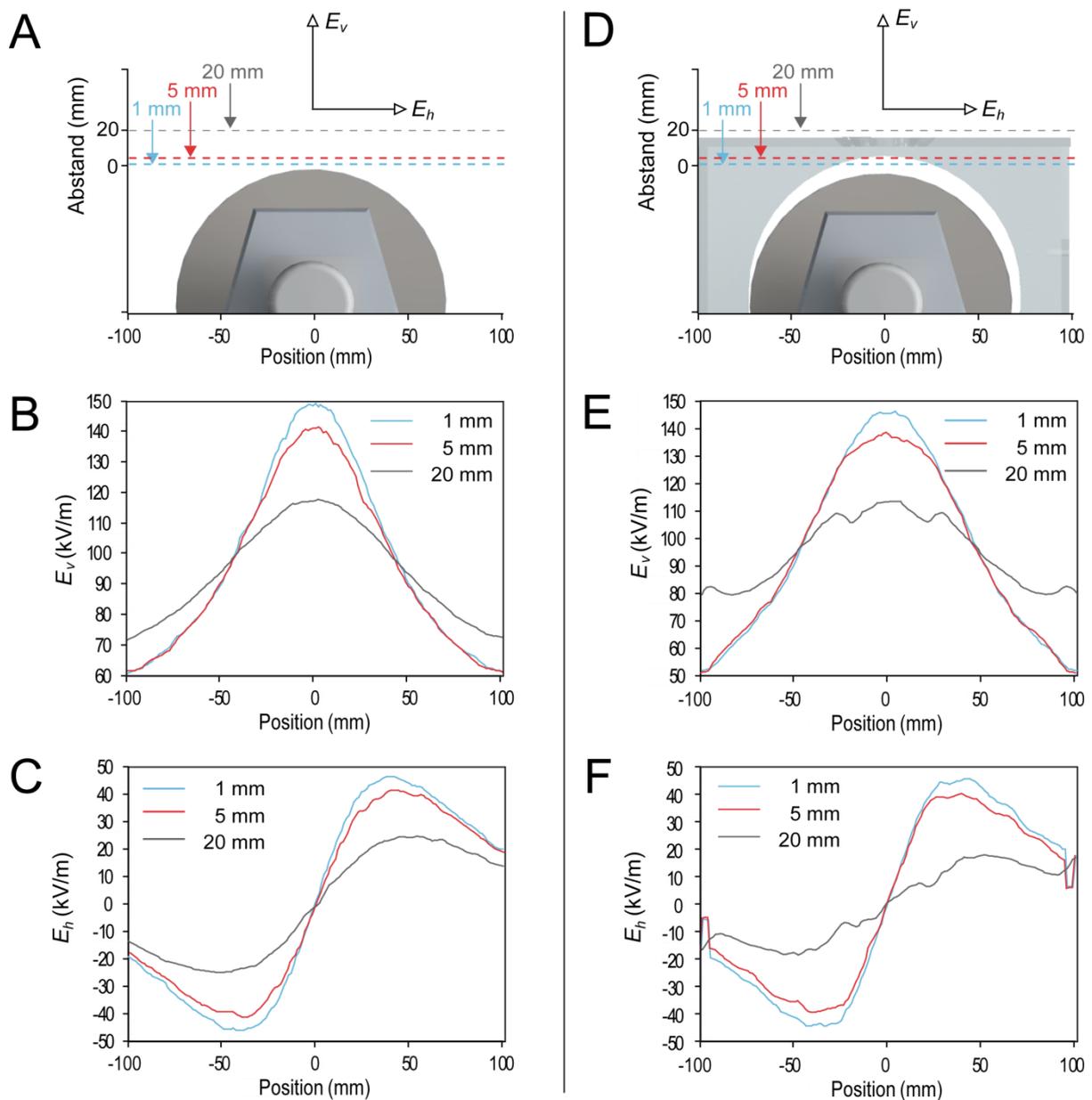


Abbildung 27: Unterteilung der Feldvektoren in vertikale und horizontale Komponenten  $E_v$  und  $E_h$  in unterschiedlichen Abständen des Kollektors (1 mm, 5 mm, 20 mm). Schematische Darstellung des Kollektors ohne Verschalung mit den für die Simulation verwendeten Profillinien (A) und den daraus resultierenden Diagrammen für die vertikal (B) und die horizontal (C) gerichteten Feldstärkenprofile. Zum Vergleich: Aufbau mit Verschalung des Kollektors (D) sowie die zugehörigen Diagramme der vertikalen (E) und horizontalen Feldkomponenten (F).

Aus den Kurven lässt sich schließen, dass die Verschalung des Kollektors weder in vertikaler (vergleiche Abbildung 27, B und E), noch in horizontaler Richtung (vergleiche Abbildung 27, C und F) einen maßgeblichen Einfluss auf Richtung oder Stärke des elektrischen Feldes hatte. Wie aus den praktischen Versuchen hervorging, spielte vor allem die Ringelektrode am Spinnkopf eine entscheidende Rolle bei der Fokussierung der Faserflugbahn. Diese Beobachtung konnte anhand der Simulation erklärt werden. Analog zu Abbildung 27 wurden auch hier die Feldstärkenprofile nahe der Kanülenöffnung, sowohl für den Aufbau ohne (Abbildung 28, A-C) als auch mit Ringelektrode (Abbildung 28, D-F), betrachtet.

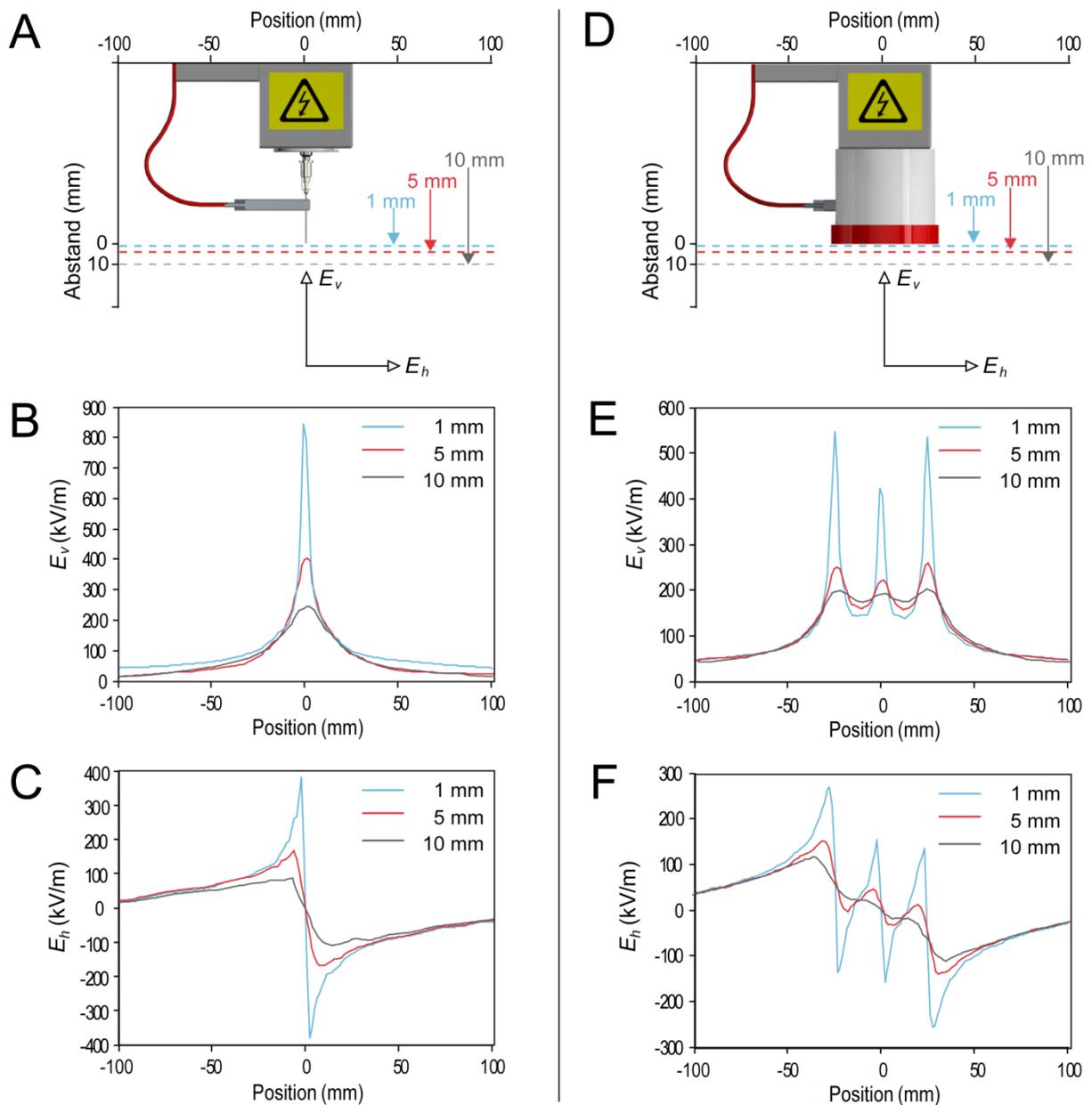


Abbildung 28: Unterteilung der Feldvektoren in vertikale und horizontale Komponenten  $E_v$  und  $E_h$  in unterschiedlichen Abständen der Kanülenöffnung (1 mm, 5 mm, 10 mm). Schematische Darstellung des Spinnkopfes ohne Abschirmung mit den für die Simulation verwendeten Profillinien (A) und den daraus resultierenden Diagrammen für die vertikal (B) und die horizontal (C) gerichteten Feldstärkenprofile. Zum Vergleich: Aufbau mit Ringelektrode (D) sowie die zugehörigen Diagramme der vertikalen (E) und horizontalen Feldkomponenten (F).

In den Diagrammen der vertikalen Feldstärkenkomponente resultieren aus dem Einfluss der Ringelektrode zwei zusätzliche Maxima, links und rechts des Peaks der Kanüle, welcher im Vergleich zum Aufbau ohne Abschirmung um ca. 51 % (Distanz: 1 mm) an Intensität verliert (vergleiche Abbildung 28, B und E). Entscheidend für die Flugbahn der Fasern ist jedoch primär die horizontal gerichtete Komponente des elektrischen Feldes, die durch die Ringelektrode an der Kanüle um ca. 63 % (Distanz: 1 mm) reduziert wird. Zudem kommt es im Abstand von ca. 1,5 cm links und rechts der Kanüle zu einem Richtungswechsel der Feldstärke hin zur Kanüle. Dies bedeutet, dass die Faser bei Erreichen dieses Radius eine Kraft nach innen erfährt, wodurch die Flugbahn der Faser nach außen begrenzt wird.

### 3.1.3 Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit der Kollektorrolle

Der Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit der Kollektorrolle auf die Faserorientierung wurde untersucht, indem Fasermatten aus eADF4(C16) (10 % w/v in HFIP) unter Vorgabe unterschiedlicher Drehzahlen (0, 1000, 2000, 4000, 4500 rpm) hergestellt und rasterelektronenmikroskopisch analysiert wurden. Dabei wurden dieselben Prozessparameter wie in 3.1.2 verwendet. Der Grad der Faserausrichtung wurde anhand der REM-Aufnahmen bestimmt (Abbildung 29, A-C), wobei die Winkelausrichtung von jeweils 200 Fasern mittels einer Bildverarbeitungssoftware (ImageJ 1.43u) gemessen und in 10°-Intervalle eingeteilt wurde. Die daraus resultierende Häufigkeitsverteilung stand in guter Korrelation mit einer Gauß-Verteilung (Abbildung 29, D).

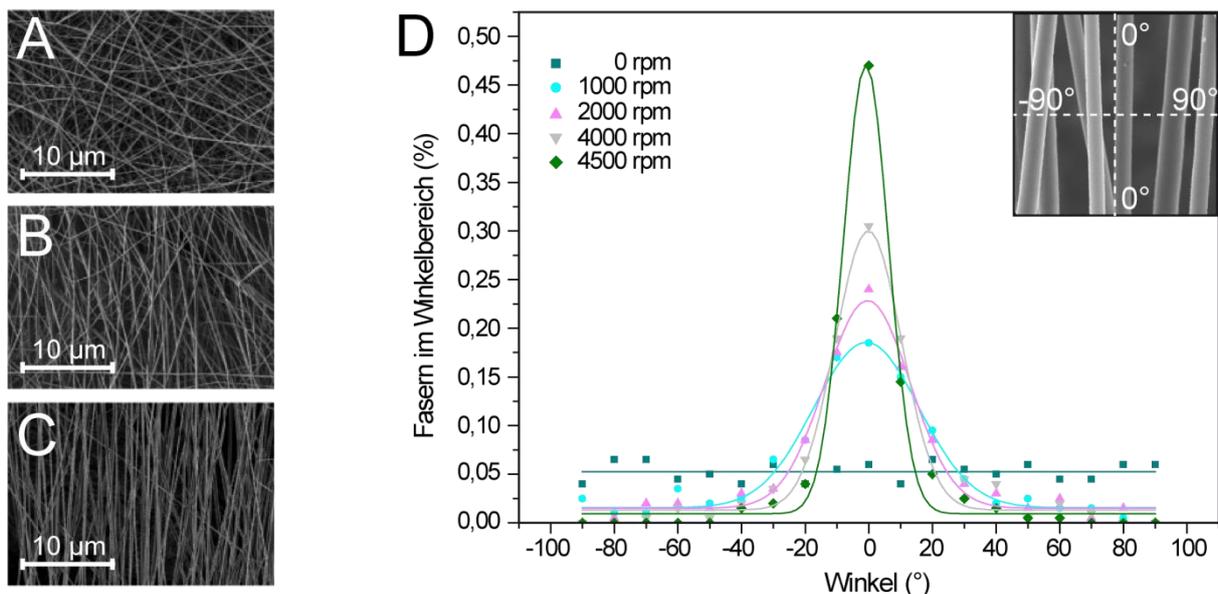


Abbildung 29: Exemplarische REM-Aufnahmen von eADF4(C16) Fasermatten, die bei unterschiedlichen Drehzahlen (Oberflächengeschwindigkeiten) gesponnen wurden: 0 rpm (0 m/s) (A), 1000 rpm (7.3 m/s) (B) und 4500 rpm (33.0 m/s) (C). Häufigkeitsverteilung der Faserausrichtung von eADF4(C16)-Fasern bei unterschiedlicher Drehzahl des Zylinders (D).

Aus den Versuchen ging hervor, dass die maximale Drehzahl von 4500 rpm mit einer Oberflächengeschwindigkeit von 33 m/s am Zylinder erforderlich ist, um die mit diesem Aufbau bestmögliche Faserausrichtung zu erhalten. Geschwindigkeiten, bei denen die Fasern etwa zu schnell abgezogen und eventuell zum Reißen gebracht wurden, konnten aufgrund der limitierten Drehzahl nicht erreicht werden. Aus der Oberflächengeschwindigkeit von 33 m/s lässt sich qualitativ aufgrund des hohen Grades an Faserausrichtung abschätzen, dass die Fluggeschwindigkeit der Faser ebenfalls in dieser Größenordnung liegen muss.

## 3.2 Herstellung elektrostatisch gesponnener Fasern

### 3.2.1 Einfluss der Spinnlösung auf die Fasermorphologie

Um den Einfluss der Spinnlösung auf die Faserbeschaffenheit zu untersuchen wurden jeweils zwei unterschiedliche Proteine (eADF4(C16) und eADF4(C32NR4)), sowie zwei synthetische Polymere (PCL und PA6) unter Variation der Konzentration (6, 8, 10, 12 % w/v) in HFIP gelöst (Tabelle 5). Anschließend wurden die Lösungen rheologisch charakterisiert und elektrostatisch versponnen. Die daraus resultierenden Fasern wurden morphologisch untersucht und der Zusammenhang zwischen Viskosität und Faserdurchmesser betrachtet.

**Tabelle 5: Eigenschaften der versponnenen eADF4-Proteine und Polymere**

	Molare Masse (g/mol)	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )	Nettoladung bei pH 7
<b>eADF4(C16)</b>	48.000 <sup>[221]</sup>	1,3 <sup>[34,222]*</sup>	-16
<b>eADF4(C32NR4)</b>	104.000	1,3 <sup>[34,222]*</sup>	-32
<b>PCL (Capa 6506)</b>	50.000 <sup>[223,224]</sup>	1,1 <sup>[224]</sup>	---
<b>PA6</b>	10.000 <sup>[225,226]</sup>	1,14 <sup>[227]</sup>	---

\* Für die Dichte wurde eine für Proteine allgemein charakteristische Dichte angenommen

#### 3.2.1.1 Rheologische Charakterisierung von Spinnlösungen

Die dynamische Scherviskosität  $\eta$  der Lösungen wurde in Abhängigkeit der Scherrate  $\dot{\gamma}$  durch einen Rotationsversuch (Kegel gegen Platte) gemessen. Der verwendete Kegel hatte einen Durchmesser von 40 mm und einen Winkel von 0,5°. Die Spaltbreite betrug 11  $\mu\text{m}$  und es wurde bei einer Temperatur von 20 °C gemessen. Die Scherrate wurde während der Messungen schrittweise

logarithmisch von  $2,864 \text{ s}^{-1}$  auf  $286,4 \text{ s}^{-1}$  erhöht, wobei die Messdauer der einzelnen Punkte jeweils 60 s betrug. Es wurden jeweils vier Messungen pro Probe durchgeführt (Abbildung 30).

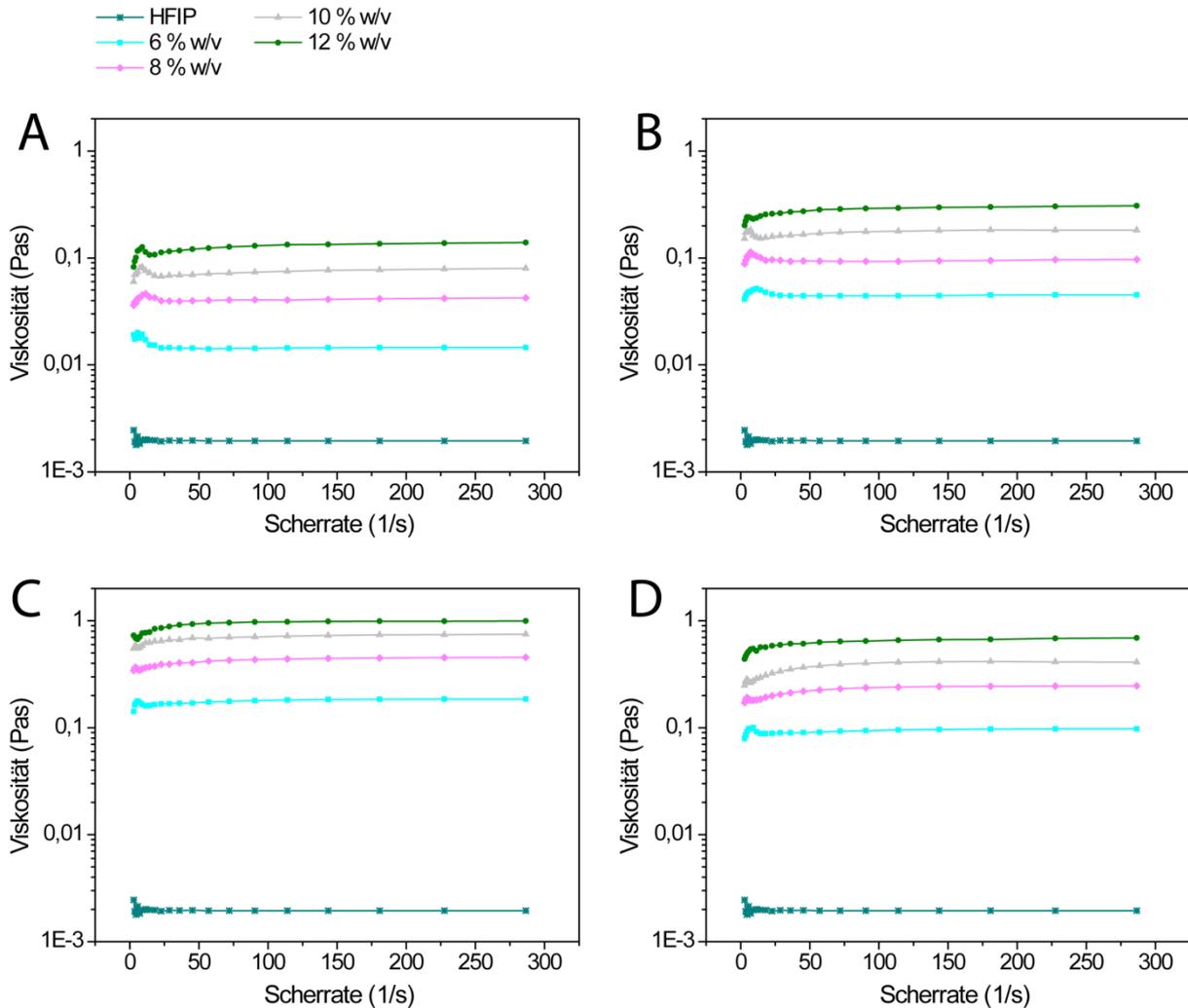
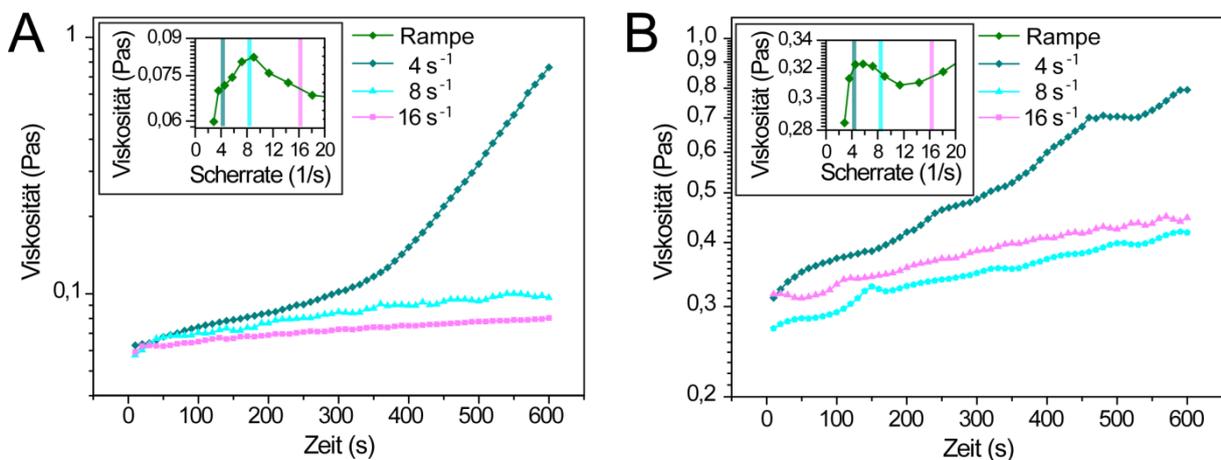


Abbildung 30: Fließkurven von eADF4(C16) (A), eADF4(C32NR4) (B), PCL (C) und PA6 (D) bei unterschiedlichen Konzentrationen in HFIP.

Sowohl bei Seidenproteinlösungen als auch bei synthetischen Polymerlösungen konnte ein starker Einfluss der Konzentration auf die Viskosität gemessen werden. Mit steigender Konzentration kam es bei allen Lösungen zu einem Anstieg der Viskosität. Beim Vergleich der Fließkurven von Proteinlösungen und Polymerlösungen wird deutlich, dass die Proteinlösungen bei gleicher Konzentration insgesamt deutlich geringere Viskositäten aufweisen. Im niedrigen Scherratenbereich von ca.  $3-8 \text{ s}^{-1}$  wurde bei allen Fließkurven ein Anstieg der Viskosität gemessen, der mit zunehmender Scherrate wieder abfiel. Dieser Effekt ist bei Proteinlösungen anteilmäßig ausgeprägter als bei Polymerlösungen. Um zu überprüfen, ob das Verhalten beispielsweise auf eine

molekulare Ausrichtung in der Lösung zurückzuführen ist, wurden exemplarisch für 10 %ige Lösungen (w/v) aus eADF4(C16) und PA6 Rotationsversuche bei konstanten Scherraten von  $4 \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \text{ s}^{-1}$  und  $16 \text{ s}^{-1}$  über eine Dauer von 10 min durchgeführt. Dabei wurde für jede Messung eine neue, nicht vorbelastete Probe verwendet. Die Messungen von eADF4(C16) in HFIP zeigten, dass es im niedrigen Scherratenbereich ( $4 \text{ s}^{-1}$ ) zu einem starken Anstieg der gemessenen Viskosität mit der Zeit kam, während die Viskosität bei höheren Scherraten ( $8 \text{ s}^{-1}$ ,  $16 \text{ s}^{-1}$ ) zeitlich nur geringfügig zunahm (Abbildung 31, A). Ein ähnliches Verhalten ist aus den Messkurvenverläufen von PA6-Lösungen ersichtlich (Abbildung 31, B).



**Abbildung 31:** Ergebnisse der Rotationsversuche bei konstanten Scherraten von  $4 \text{ s}^{-1}$ ,  $8 \text{ s}^{-1}$  und  $16 \text{ s}^{-1}$  für 10 % w/v eADF4(C16) (A) und 10 % w/v PA6 (B). Um die konstanten Scherraten der ursprünglich gemessenen Scherratenrampe anschaulich zuordnen zu können sind die Ausschnitte der Fließkurven im niedrigen Scherbereich in den Diagrammen oben links abgebildet. Die farbigen Balken markieren die Scherraten, bei denen die neuen Messungen durchgeführt wurden.

Daraus wurde gefolgert, dass das lokale Viskositätsmaximum im Bereich niedriger Scherraten nicht etwa auf strukturelle Effekte zurückzuführen, sondern ein zeitabhängiges Phänomen ist. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es an der Phasengrenze Lösung/Luft zum Austrocknen der Lösung kommt und sich mit der Zeit ein dünner Protein/Polymer-Film zwischen Kegel und Platte bildet. Bei niedrigen Scherraten kann der Film eine Verbindung zwischen Kegel und Platte bilden und verursacht somit einen mechanischen Widerstand, der als scheinbare Zunahme der Viskosität registriert wird. Bei höheren Scherraten kommt es zum dauerhaften Abriss der getrockneten Schicht und der mechanische Einfluss des Films ist für die Messung nicht mehr signifikant. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass die scheinbare Viskositätszunahme (also die Differenz aus dem lokalen Maximum und dem darauffolgenden Minimum) sowohl bei eADF4(C16) als auch PA6 in derselben Größenordnung liegt ( $\Delta\eta_{C16} = 0,015 \text{ Pas}$ ,  $\Delta\eta_{Nylon 6} = 0,014 \text{ Pas}$ ), obwohl die absolute

Viskosität von 10 % w/v PA6 um ca. Faktor fünf größer ist als die von 10 % w/v eADF4(C16). Dass der Effekt bei der eADF4(C16)-Lösung über einen breiteren Scherratenbereich auftritt könnte eine Indikation dafür sein, dass die Proteinlösungen schneller austrocknen als die Polymerlösungen.

Unabhängig von den Beobachtungen bei niedrigen Scherraten wurde jedoch bei allen Messkurven mit zunehmender Scherrate ein leichter Anstieg der Viskosität gemessen. Um dieses scheinbar strukturviskose Fließverhalten zu quantifizieren, wurden die Kurven nach dem Potenzgesetz von Ostwald und de Waele gefittet und so die Konsistenz- ( $k$ ) und Fließindizes ( $m$ ) ermittelt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Konsistenzindizes  $k$  und Fließindizes  $m$  für Protein- (eADF4(C16), eADF4(C32NR4)) und Polymerlösungen (PCL, PA6) mit unterschiedlichen Konzentrationen (w/v).

		6 %	8 %	10 %	12 %
eADF4(C16)	$k$ (Pas)	0,013 ± 0,004	0,035 ± 0,001	0,057 ± 0,005	0,090 ± 0,005
	$m$ ( )	1,000 ± 0,006	1,033 ± 0,009	1,061 ± 0,005	1,075 ± 0,008
eADF4(C32NR4)	$k$ (Pas)	0,061 ± 0,016	0,089 ± 0,005	0,152 ± 0,004	0,249 ± 0,046
	$m$ ( )	0,979 ± 0,028	1,009 ± 0,017	1,044 ± 0,016	1,061 ± 0,004
PCL	$k$ (Pas)	0,155 ± 0,008	0,328 ± 0,015	0,513 ± 0,048	0,712 ± 0,052
	$m$ ( )	1,036 ± 0,003	1,051 ± 0,003	1,040 ± 0,012	1,047 ± 0,010
PA6	$k$ (Pas)	0,085 ± 0,003	0,177 ± 0,007	0,290 ± 0,032	0,527 ± 0,031
	$m$ ( )	1,033 ± 0,001	1,063 ± 0,010	1,069 ± 0,021	1,064 ± 0,006

Die Konsistenzindizes aller Lösungen nehmen mit steigender Konzentration zu und auch die Fließindizes steigen tendenziell an. Lösungen von 6 % w/v eADF4(C16) und eADF4(C32NR4) haben Fließindizes nahe 1,0 und können unter Berücksichtigung der Standardabweichung als newtonsche Fluide betrachtet werden. Bei höheren Konzentrationen weisen alle Lösungen ein schwach strukturviskoses Fließverhalten nahe dem newtonschen Verhalten auf. Für die weitere Auswertung wurden die Asymptoten der Fließkurven bei hohen Scherraten als Kennwerte für die Viskosität verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: Asymptotische Werte der Viskosität  $\eta$  von Protein- (eADF4(C16), eADF4(C32NR4)) und Polymerlösungen (PCL, PA6) mit unterschiedlichen Konzentrationen (w/v).

		6 %	8 %	10 %	12 %
eADF4(C16)	$\eta$ (Pas)	0,014 ± 0,004	0,042 ± 0,003	0,079 ± 0,005	0,133 ± 0,003
eADF4(C32NR4)	$\eta$ (Pas)	0,054 ± 0,008	0,100 ± 0,013	0,183 ± 0,004	0,303 ± 0,009
PCL	$\eta$ (Pas)	0,188 ± 0,008	0,431 ± 0,016	0,635 ± 0,095	0,914 ± 0,041
PA6	$\eta$ (Pas)	0,101 ± 0,004	0,247 ± 0,004	0,417 ± 0,038	0,738 ± 0,024

### 3.2.1.2 Einfluss der Konzentration auf die Faserdurchmesser

Die Konzentration der Lösung stellt beim elektrostatischen Spinnen die beste Möglichkeit zur gezielten Einstellung der resultierenden Faserdurchmesser dar. Um den Einfluss der Konzentration bei der Faserherstellung zu untersuchen, wurden Vliese aus künstlichen Seidenproteinen (eADF4(C16), eADF4(C32NR4)) sowie aus synthetischen Polymeren (PCL, PA6) versponnen und mittels REM analysiert (Abbildung 32; Abbildung 33).

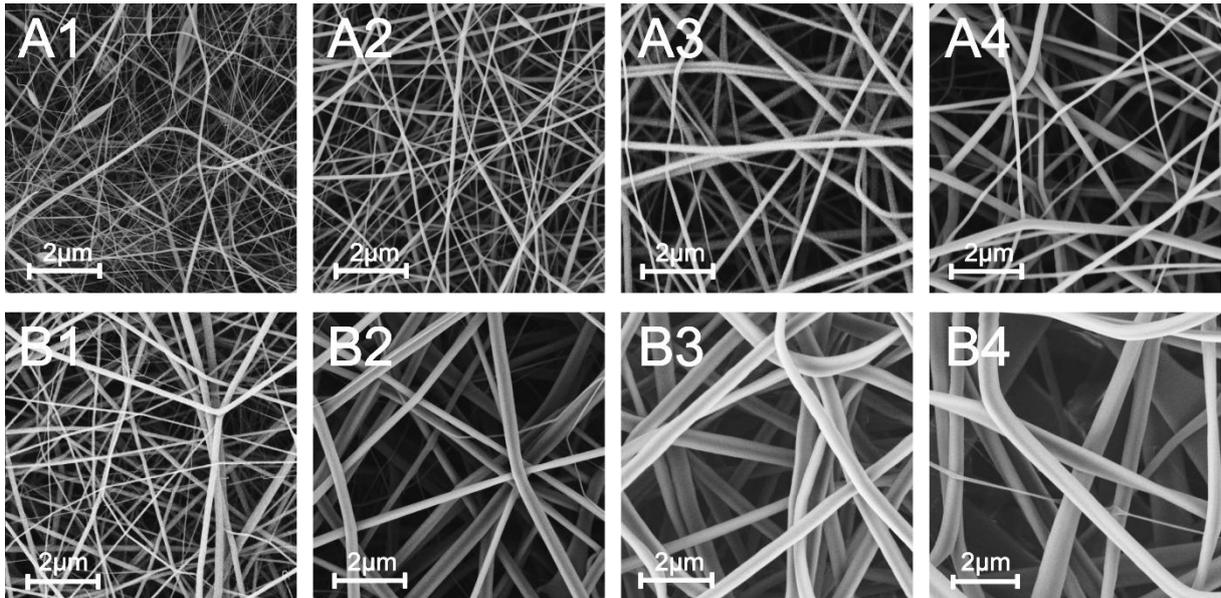


Abbildung 32: REM-Untersuchung elektrostatisch gesponnener Fasern aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen: Versponnen wurden eADF4(C16) (A) und eADF4(C32NR4) (B) zu jeweils 6 % w/v (1), 8 % w/v (2), 10 % w/v (3) und 12 % w/v (4).

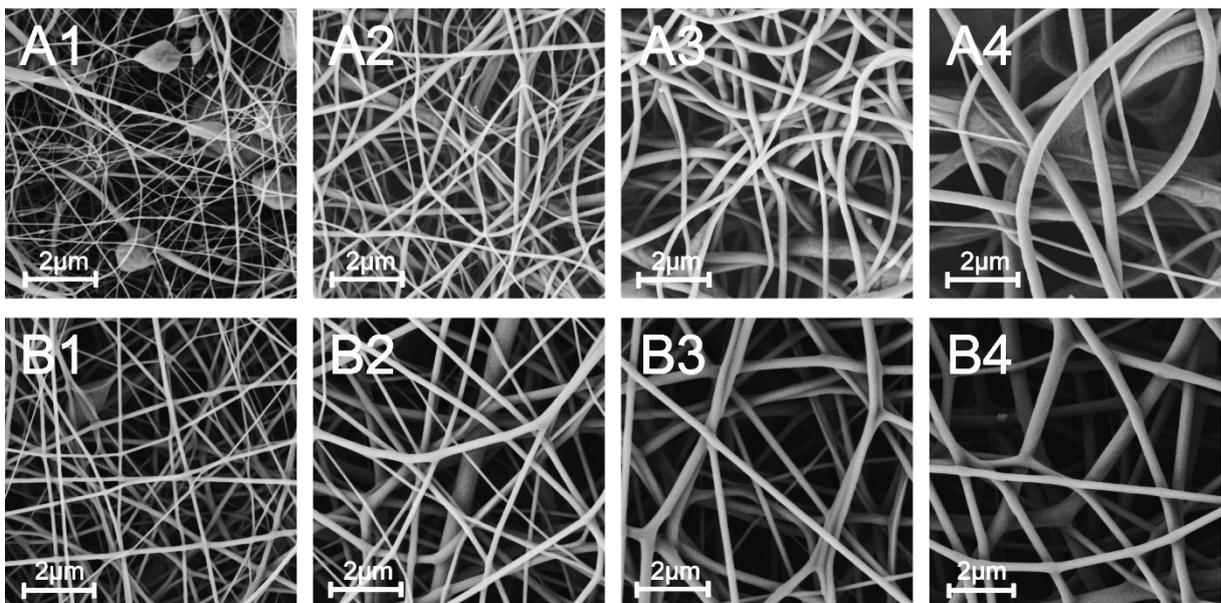


Abbildung 33: REM-Untersuchung elektrostatisch gesponnener Fasern aus unterschiedlich konzentrierten Lösungen: Versponnen wurden PCL (A) und PA6 (B) zu jeweils 6 % w/v (1), 8 % w/v (2), 10 % w/v (3) und 12 % w/v (4).

Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass bei allen versponnenen Materialien im gewählten Konzentrationsbereich (6-12 % w/v) glatte Fasern mit runden Durchmessern hergestellt wurden, welche mit steigender Konzentration zunahmen. Dennoch wurden deutliche Unterschiede zwischen den Materialien beobachtet. Beim Verspinnen von 6 % w/v eADF4(C16) und 6 % w/v PCL wurden sehr dünne Fasern mit sphärischen Ausprägungen generiert, die auf Strömungsinstabilitäten am Taylor-Konus zurückzuführen sind (Abbildung 32, A1 und Abbildung 33, A1). Aufgrund dieser Beobachtung ist davon auszugehen, dass es hier bei weiterer Reduzierung der Konzentration zum elektrostatischen Versprühen der Lösung kommt und keine Fasern mehr hergestellt werden können.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Faserdurchmesser ist bei den verschiedenen Materialien unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Größenverteilung der Durchmesser wurde anhand der REM-Aufnahmen ausgewertet, indem mit einer Bildverarbeitungssoftware (ImageJ 1.43u) jeweils 300 Durchmesser pro Vlies vermessen und in Histogrammen in 20 nm Intervallen abgebildet wurden (Abbildung 34; Abbildung 35).

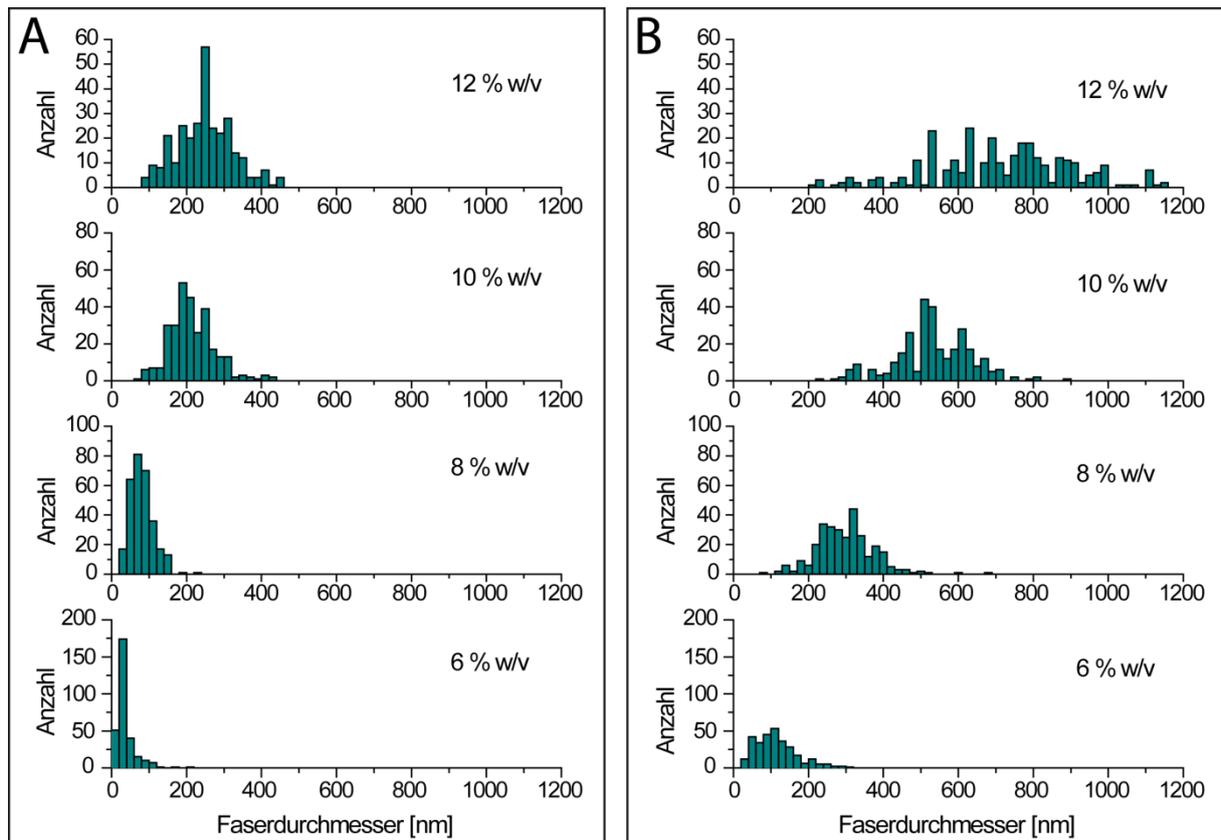
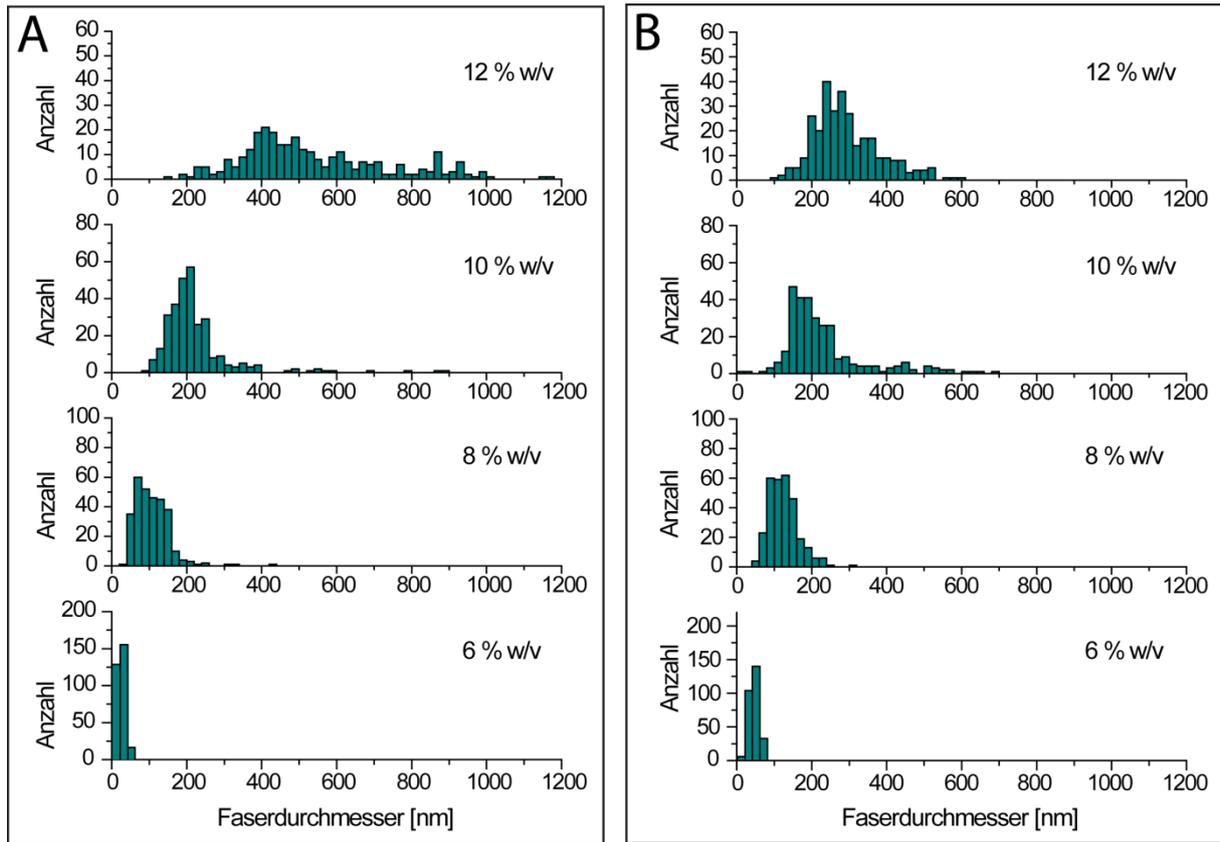


Abbildung 34: Histogramme der Durchmesserverteilung elektrostatisk gesponnener Fasern aus unterschiedlichen Konzentrationen. Versponnen wurden eADF4(C16) (A) und eADF4(C32NR4) (B) zu jeweils 6 - 12 % w/v.



**Abbildung 35: Histogramme der Durchmesserverteilung elektrospinnener Fasern aus unterschiedlichen Konzentrationen. Verspinnen wurden PCL (A) und PA6 (B) zu jeweils 6 - 12 % w/v.**

Die Größenverteilung wurde mit zunehmender Konzentration breiter, das heißt die Vliese wurden inhomogener, wobei die Verteilung insbesondere bei Faserdurchmessern, die größer als 400 nm waren (10 % w/v, 12 % w/v eADF4(C32NR4) und 12 % w/v PCL), deutlich zunahm (Abbildung 34, B; Abbildung 35, A). Lösungen, bei denen die konzentrationsbedingte Durchmesserzunahme geringer war (eADF4(C16) und PA6) führten zu homogeneren Vliese (Abbildung 34, A; Abbildung 35, B).

Auf Grundlage der konzentrationsabhängigen Durchmessercharakterisierung konnte gezeigt werden, dass sich die Lösungen, unabhängig der Materialklasse (Protein/synthetisches Polymer), beim Verspinnen sehr unterschiedlich verhalten. Im Vergleich zu eADF4(C16) und PA6 konnte mit eADF4(C32NR4) und PCL ein erheblich größerer Bereich an Faserdurchmessern eingestellt werden (Tabelle 8). Durch Verspinnen niedriger Konzentrationen (6 % w/v) wurden mit allen Materialien, ausgenommen eADF4(C32NR4), Fasern mit Durchmessern im Nanometer-Bereich hergestellt. Die REM-Bilder von eADF4(C32NR4)-Fasern (6 % w/v) (Abbildung 32, B1) weisen keine sphärischen Ausprägungen auf. Es ist also davon auszugehen, dass eine weitere Reduzierung der Konzentration und somit das Verspinnen von Nanofasern auch hier möglich ist.

**Tabelle 8: Mittlere Faserdurchmesser  $d$  bei unterschiedlicher Spinnkonzentration.**

		6 % (w/v)	8 % (w/v)	10 % (w/v)	12 % (w/v)
<b>eADF4(C16)</b>	<b><math>d</math> (nm)</b>	36 ± 24	81 ± 31	214 ± 61	250 ± 74
<b>eADF4(C32NR4)</b>	<b><math>d</math> (nm)</b>	113 ± 55	298 ± 76	532 ± 101	723 ± 209
<b>PCL</b>	<b><math>d</math> (nm)</b>	24 ± 9	108 ± 46	223 ± 102	547 ± 213
<b>PA6</b>	<b><math>d</math> (nm)</b>	57 ± 32	125 ± 39	230 ± 108	293 ± 90

Um für die mechanischen Messungen möglichst ähnliche morphologische Voraussetzungen zu schaffen und so die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden im weiteren Verlauf ausschließlich Fasern aus 10 % w/v eADF4(C16), PCL und PA6 gesponnen, da diese dieselbe Größenordnung aufweisen. Für eADF4(C32NR4) wurde eine Konzentration von 7 % w/v verwendet, die beim Verspinnen zu Fasern mit einem mittleren Durchmesser von 193 nm ± 37 nm führt und somit im selben Bereich liegt.

### 3.2.1.3 Zusammenhang zwischen Viskosität und Faserdurchmesser

Aus den bekannten molaren Massen, den rheologischen Messungen und der Charakterisierung der Faserdurchmesser (Abbildung 36 A, B) konnten folgende Thesen aufgestellt werden:

- Unabhängig der molaren Masse weisen die Lösungen der synthetischen Polymere ein höheres Viskositätsniveau auf (Abbildung 36, A):

$$\eta_{C16}, \eta_{C32NR4} < \eta_{PCL}, \eta_{PA6}$$

- Innerhalb der Materialklassen führen Lösungen aus Proteinen/Polymeren mit größerem Molekulargewicht zu einer höheren Viskosität (Abbildung 36, A):

$$\eta_{C16} < \eta_{C32NR4}, \eta_{PA6} < \eta_{PCL}$$

- Trotz signifikant geringerer Viskosität lassen sich aus Proteinlösungen bei gleicher Konzentration ähnliche oder größere Faserdurchmesser herstellen als aus den hier verarbeiteten Polymerlösungen (Abbildung 36, B):

$$d_{C16} \sim d_{PA6} < d_{PCL} < d_{C32NR4}$$

- Innerhalb der Materialklassen führen Lösungen mit höherer Viskosität (also höherem Molekulargewicht) zu größeren Faserdurchmessern (Abbildung 36, B):

$$d_{C16} < d_{C32NR4}, d_{PA6} < d_{PCL}$$

Um die Zusammenhänge zu visualisieren wurden in Abbildung 36, C die erzielten Faserdurchmesser gegen die korrespondierende Viskosität aufgetragen.

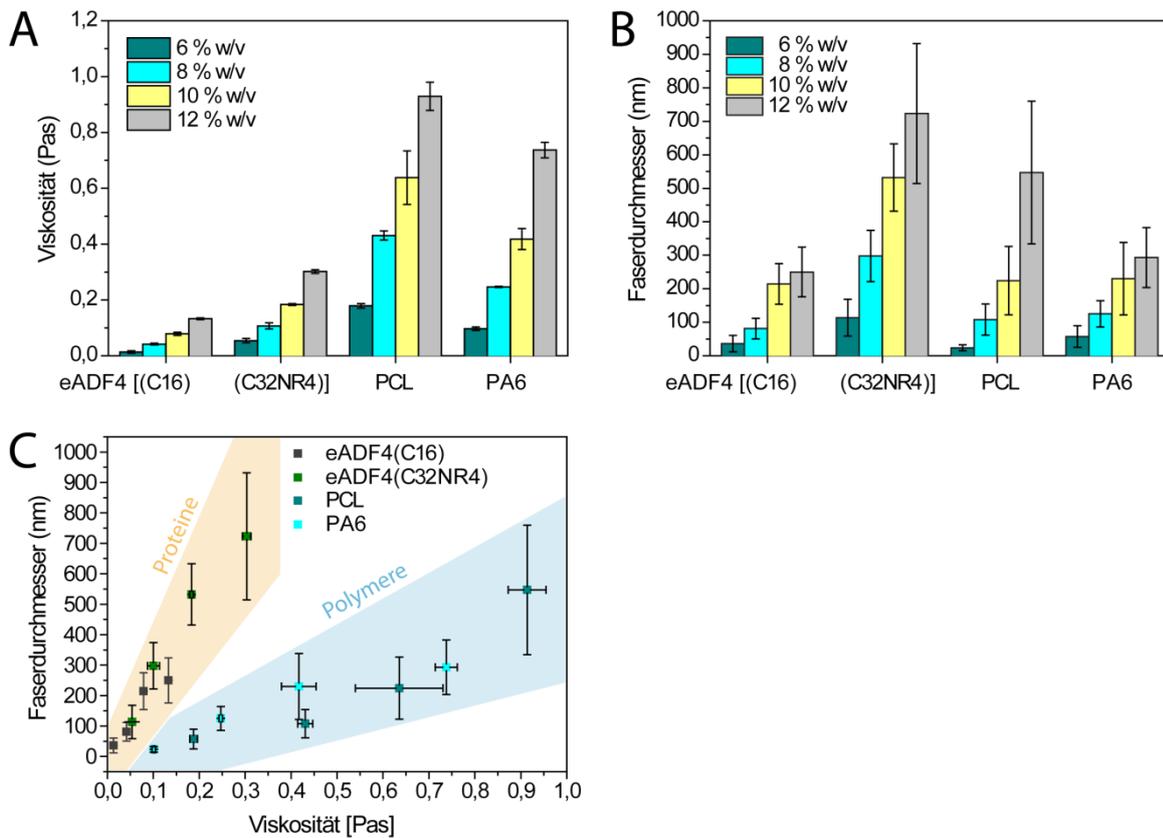


Abbildung 36: Zusammenfassung der Ergebnisse beim Verspinnen unterschiedlicher Protein- und Polymerlösungen: konzentrationsabhängiger Faserdurchmesser (A), Viskosität (B), Faserdurchmesser in Abhängigkeit der Viskosität (C).

Im Diagramm lassen sich die Datenpunkte in zwei Bereiche einteilen – der steile Bereich, indem die Protein-Punkte liegen, und der flacher verlaufende Bereich der synthetischen Polymere. Aus der Systematik lässt sich folgern, dass bei der Proteinverarbeitung eine stärkere Abhängigkeit der Fasermorphologie von der Viskosität der Lösung besteht als bei den synthetischen Polymeren. Dabei muss beachtet werden, dass bei Proteinlösungen zur Änderung der Viskosität wesentlich größere Konzentrationsänderungen erforderlich sind als bei den Polymeren. Dieser Sachverhalt wird in der Diskussion näher erörtert.

### 3.2.2 Nachbehandlung der Proteinfasern

Aufgrund ihrer Sekundärstruktur, die nach dem elektrostatischen Spinnen aus HFIP primär aus  $\alpha$ -Helices, *Random Coils* und  $\beta$ -Schleifen besteht, sind die rekombinanten Spinnenseidenfasern zunächst wasserlöslich.<sup>[52]</sup> Um die Fasern für Anwendungen wasserunlöslich zu machen, müssen durch Nachbehandlung kristalline Strukturen, bestehend aus  $\beta$ -Faltblättern, induziert werden. Als Nachbehandlungsmittel wurden 2-Propanol, Ethanol und Methanol getestet (Tabelle 9).

Tabelle 9: Theoretische Eigenschaften der verwendeten Alkohole (Werte wurden mit SF Dampfdruck 3.0 ermittelt).

	Molmasse (g/mol)	Siedepunkt (°C)	Dampfdruck bei 60 °C (bar)
<b>Methanol</b>	32,04	64,4	0,85
<b>Ethanol</b>	46,07	78,3	0,47
<b>2-Propanol</b>	60,10	82,2	0,39

#### 3.2.2.1 Experimenteller Aufbau zur Ermittlung geeigneter Nachbehandlungsparameter

Das Eintauchen der eADF4-Vliese in die ausgewählten einwertigen Alkohole eignete sich nicht als Nachbehandlungsmethode, da sich dabei Kugeln formten und somit die Faserstruktur teilweise oder gänzlich verloren ging (Abbildung 37).

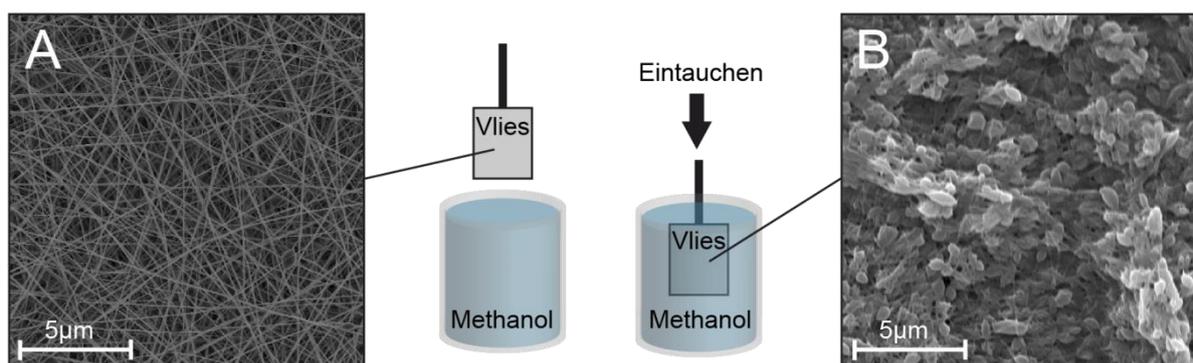


Abbildung 37: eADF4(C16)-Vlies im unbehandelten Zustand (A) und nach dem Eintauchen in Methanol (B).

Eine wesentlich mildere Methode bietet das Bedampfen.<sup>[67,228]</sup> Um zu evaluieren, welche einwertigen Alkohole sich am besten für die Nachbehandlung von künstlichen Seidenproteinfasern

eignen, wurde anhand von eADF4(C16)-Fasern eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der Sekundärstrukturänderungen in Abhängigkeit der Bedampfungszeiten mittels FTIR untersucht wurden. Um dies unter kontrollierten Bedingungen durchführen zu können, wurden drei gleiche Glasbehälter mit Halterungen und Druckauslässen versehen und mit jeweils 40 ml Flüssigkeit (2-Propanol, Ethanol, Methanol) befüllt. Anschließend wurden darin alignierte Fasermatten (Faserdurchmesser: ca. 200 nm) in Rahmen angebracht (Abbildung 38) und die Gefäße in einen vorgeheizten Ofen (60 °C) gestellt, so dass sich eine gesättigte Dampf Atmosphäre einstellen konnte. Die Proben wurden dann nach definierten Bedampfungszeiten entnommen und an jeweils sechs Stellen mittels FT-IR gemessen. Um den reinen Temperatureinfluss zu untersuchen, wurde als Referenz eine weitere Fasermatte analysiert, die ohne Bedampfung bei 60 °C im Ofen verweilte.

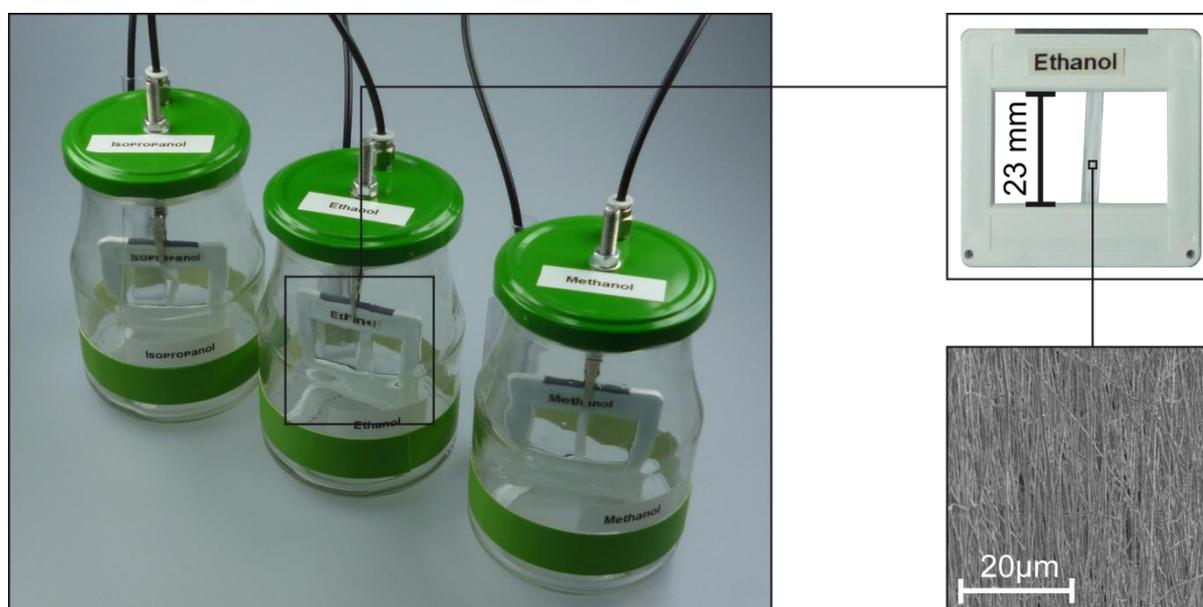


Abbildung 38: Experimenteller Aufbau zur Ermittlung geeigneter Nachbehandlungsbedingungen: Drei Parallelansätze (2-Propanol, Ethanol, Methanol) in Nachbehandlungsbehältern (links) mit eingespannten alignierten eADF4(C16)-Fasermatten.

### 3.2.2.2 Einfluss einwertiger Alkohole auf die Proteinsekundärstruktur

Die Proteinsekundärstrukturanteile wurden ermittelt, indem die Proben nach definierten Verweilzeiten in entsprechendem Dampf entnommen und FT-IR-Spektren aufgezeichnet wurden. Die Messungen erfolgten kontaktfrei, wobei die Transmission der Strahlung im Wellenzahlenbereich von  $800\text{ cm}^{-1}$  -  $4000\text{ cm}^{-1}$  gemessen wurde. Für jedes Spektrum wurden 60 Einzelmessungen vorgenommen und gemittelt. Aufgrund der definierten Primärstruktur der Seidenproteine sind die

möglichen anzuregenden chemischen Bindungen und deren Absorptionswellenzahlen bekannt. Unter Vorgabe der absorbierenden Wellenzahlen wurde im Amid I-Bereich ( $1600\text{ cm}^{-1} - 1700\text{ cm}^{-1}$ ) eine Fourier-Selbstentwicklung (*Fourier-self-deconvolution: FSD*) durchgeführt bei der die, dem resultierenden Spektrum zugrundeliegenden, Absorptionsbanden iterativ berechnet wurden. Die Kurven wurden integriert und deren prozentualer Flächenanteil am Gesamtspektrum bestimmt. Durch Zuordnung zu den entsprechenden Sekundärstrukturen und Summierung dieser Anteile wurden schließlich die Sekundärstrukturanteile bestimmt. Anhand der FSD-Auswertung konnte eine deutliche Veränderung der Amid I-Bande aufgrund der Nachbehandlung registriert werden (Abbildung 39, A und B).

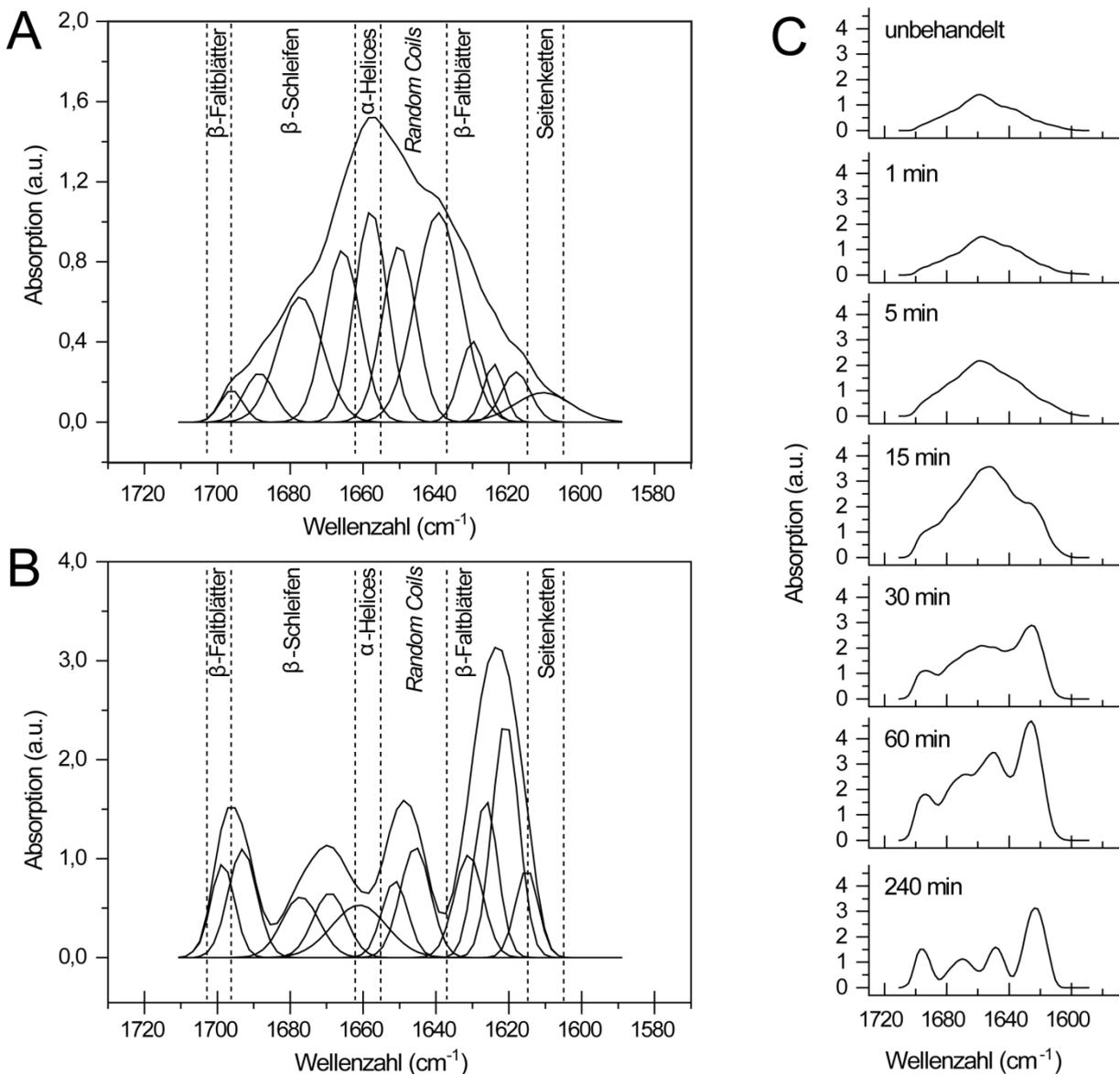


Abbildung 39: FT-IR-Spektren der Amid I-Bande von eADF4(C16)-Fasermatten bei Nachbehandlung mit Ethanol: FSD einer unbehandelten (A) und behandelten (B) Probe (nach 240 min). Zeitliche Veränderung der Amid I-Bande bei Ethanol-Bedampfung (C).

Im Vergleich zum Spektrum der unbehandelten Probe (Abbildung 39, A), bei dem vor allem die Banden der  $\alpha$ -helikalen Regionen, der  $\beta$ -Schleifen und der *Random Coils* dominieren, ist im beispielhaften Spektrum der Ethanol-behandelten Probe (240 min, 60 °C) eine ausgeprägte Zunahme an kristallinen  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu sehen, welche mit einer Abnahme der anderen Strukturanteile einhergeht. Die Veränderung der Amid I-Bande mit der Behandlungsdauer in Ethanol ist in Abbildung 39, C exemplarisch dargestellt.

Anhand der Auswertung konnte ein direkter Vergleich zwischen den eingesetzten Alkoholen erstellt werden (Abbildung 40). Daraus geht hervor, dass bei allen drei Nachbehandlungsmethoden nach ca. 240 min eine Zunahme des  $\beta$ -Faltblattanteils von ursprünglich 11 % auf ca. 36 % induziert wurde. Bei der Kontrolle, die nur eine Temperaturänderung ohne Alkohol umfasste, kam es zu keinen signifikanten Änderungen der Sekundärstruktur.

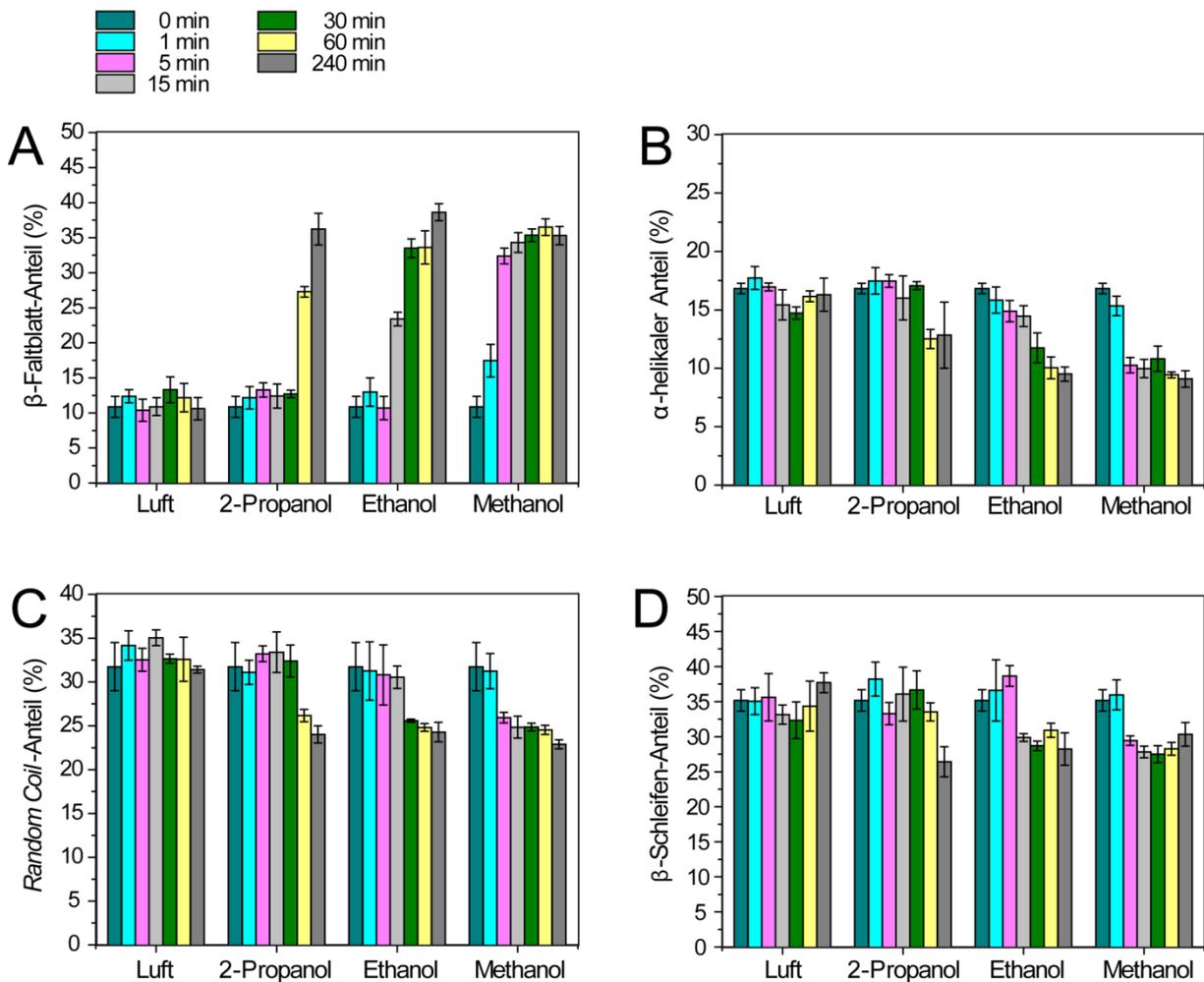


Abbildung 40: Zeitabhängige Proteinsekundärstrukturanalyse von eADF4(C16) nach Bedampfen mit Alkoholen (2-Propanol, Ethanol und Methanol) bei 60 °C. Als Kontrolle wurde eine Messreihe bei 60 °C an Luft durchgeführt. Die Sekundärstrukturanteile wurden mittels FSD berechnet und in  $\beta$ -Faltblätter (A),  $\alpha$ -Helices (B), *Random Coils* (C) und  $\beta$ -Schleifen (D) unterteilt.

Die Kristallisation setzte bei den dampfbehandelten eADF4(C16)-Fasermatten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Behandlung ein (Abbildung 40, A). Beim Bedampfen mit 2-Propanol kam es nach ca. 60 min zur Zunahme kristalliner Regionen, während bei der Ethanol-Behandlung bereits nach 15 min eine signifikante Änderung der Sekundärstruktur gemessen wurde. Bei Proben, die Methanoldampf ausgesetzt waren, wurde bereits unmittelbar nach Beginn der Behandlung (ca. 1 min) eine deutliche Umstrukturierung registriert. Analog zum Anstieg der  $\beta$ -Faltblattanteile nahmen die anderen Strukturanteile ab ( $\alpha$ -Helices:  $-6,3 \pm 2,1 \%$ , *Random Coils*:  $-8,0 \pm 0,7 \%$ ,  $\beta$ -Schleifen:  $-6,8 \pm 1,9 \%$ ) (Abbildung 40, B, C, D).

### 3.2.2.3 Morphologische Stabilität nachbehandelter Fasern in Wasser

Zur Überprüfung, ob die veränderte Sekundärstruktur die wasserlöslichen Fasern wasserunlöslich macht, wurden behandelte Proben befeuchtet und sowohl makroskopisch (Abbildung 41) als auch rasterelektronenmikroskopisch (Abbildung 42) betrachtet.

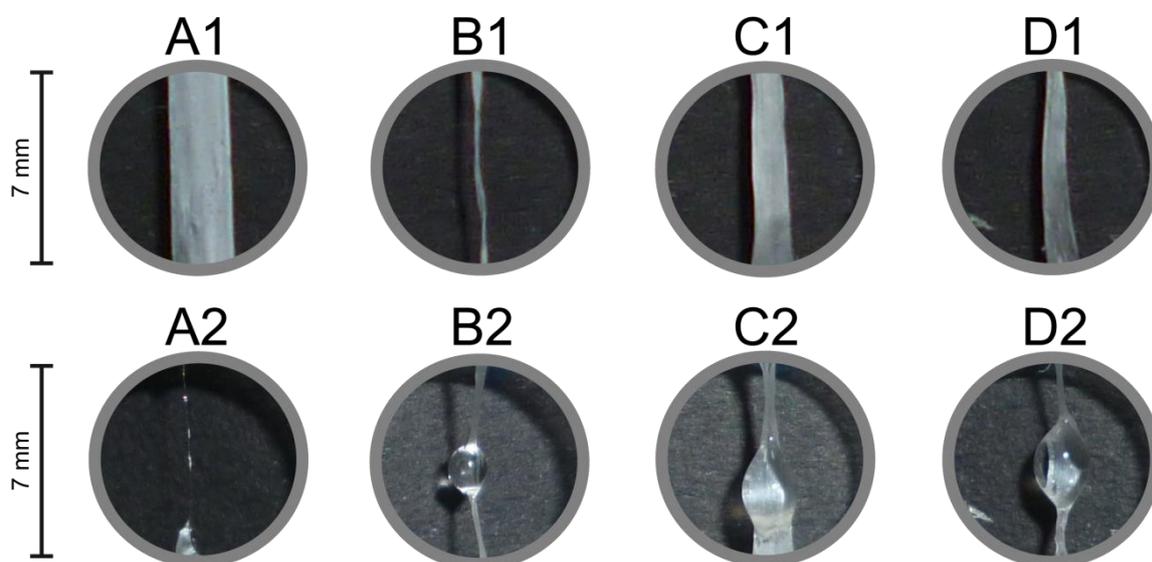


Abbildung 41: Fotos elektrostatisk gesponnenen Fasermatten aus eADF4(C16). Die Fasern wurden jeweils für 240 min bei 60 °C in Luft (A), 2-Propanoldampf (B), Ethanoldampf (C) oder Methanoldampf (D) gelagert. Um die Löslichkeit der Fasern zu testen wurden die trockenen Fasern (1) anschließend mit 10  $\mu$ l Wasser befeuchtet (2).

Aufnahmen, die nach der Behandlung gemacht wurden zeigen, dass sich die Fasermatten je nach Behandlungsmittel unterschiedlich stark zusammenziehen (Abbildung 41). Besonders stark trat dies bei der Behandlung mit 2-Propanol auf (Abbildung 41, B1), wohingegen die Ethanol- und Methanol-



- Bei der Behandlung mit Ethanol und Methanol kam es ebenfalls zu leichten Vermelzungen an den Kontaktpunkten der Fasern, die Fasermorphologie konnte jedoch erhalten werden (Abbildung 42, C1, D1)
- Durch Lagerung der Proben für ca. 18 h in Wasser kam es zu keinen erkennbaren morphologischen Veränderungen (Abbildung 42, B2, C2, D2).

Die Nachbehandlung mit einwertigen Alkoholen führte also in allen Fällen zur Wasserunlöslichkeit der Vliese, wobei jedoch unterschiedliche morphologische Veränderungen auftraten. Das Bedampfen mit 2-Propanol führte zum Verschmelzen der Fasern, während bei der Behandlung mit Ethanol und Methanol vergleichbar positive Resultate erzielt wurden. Da das Verdampfen von Methanol bei der Nachbehandlung ein gesundheitliches Risiko darstellt, mussten sämtliche Arbeitsschritte unter einem Laborabzug durchgeführt werden. Die Verwendung von Methanol ist also insbesondere in Hinsicht auf eine industrielle Umsetzung kritisch zu hinterfragen. Da gezeigt wurde, dass sich Ethanol in gleicher Weise eignet und wesentlich unproblematischer ist, wurde in allen weiteren Versuchen ausschließlich mit Ethanol nachbehandelt.

### **3.2.2.4 Optimiertes Nachbehandlungsverfahren**

Aufbauend auf den Ergebnissen der Vorversuche (3.2.2.1) wurde die Nachbehandlungsmethode des Bedampfens auf einen größeren Behälter übertragen und experimentell optimiert. Der Behälter ist mit drei Zu-/Abläufen ausgestattet. Durch zwei davon laufen Silikonschläuche, welche es ermöglichen mittels zweier 60 ml-Spritzen Flüssigkeiten in den Behälter zu injizieren und auch wieder abzusaugen. Der dritte Ablauf wird über einen Schlauch in ein Wasserbad geführt und dient dem Druckausgleich sowie der Kontrolle über die Dampfentwicklung im Behälter (sichtbar durch aufsteigende Blasen im Wasserbad). Die Nachbehandlung der Proben erfolgt in mehreren Schritten: Zunächst wird die Probe mittig im Gefäß angebracht und dieses luftdicht verschlossen. Die beiden Spritzen werden mit Wasser und Ethanol befüllt und an die Schläuche angeschlossen. Anschließend wird das Gefäß in einem Ofen platziert und für ca. 20 min auf 60 °C temperiert (Abbildung 43, A). Dieser Schritt ist bei der Nachbehandlung entscheidend, da die Probe vortemperiert sein soll, um die morphologieschädigende Kondensation des Dampfes an der Probenoberfläche so weit wie möglich zu reduzieren. Nun kann Ethanol aus der Spritze in das Nachbehandlungsgefäß überführt werden (Bedampfungsdauer: 60 min) (Abbildung 43, B). Da Ethanol beim Bedampfen den natürlichen

Weichmacher Wasser aus der Seidenstruktur verdrängt, wird der Probe im letzten Schritt wieder Wasser zugeführt. Zu diesem Zweck wird Ethanol aus dem Gefäß gesaugt und stattdessen Wasser eingefüllt (Abbildung 43, C). Nach weiteren 60 min Bedampfungsdauer (Dampfdruck von Wasser bei 60 °C: 0,2 bar) kann das Wasser abgesaugt und der Behälter geöffnet werden. Um die Probe für die weitere Handhabung weich zu machen kann sie nun zusätzlich mit Wasser besprüht werden.

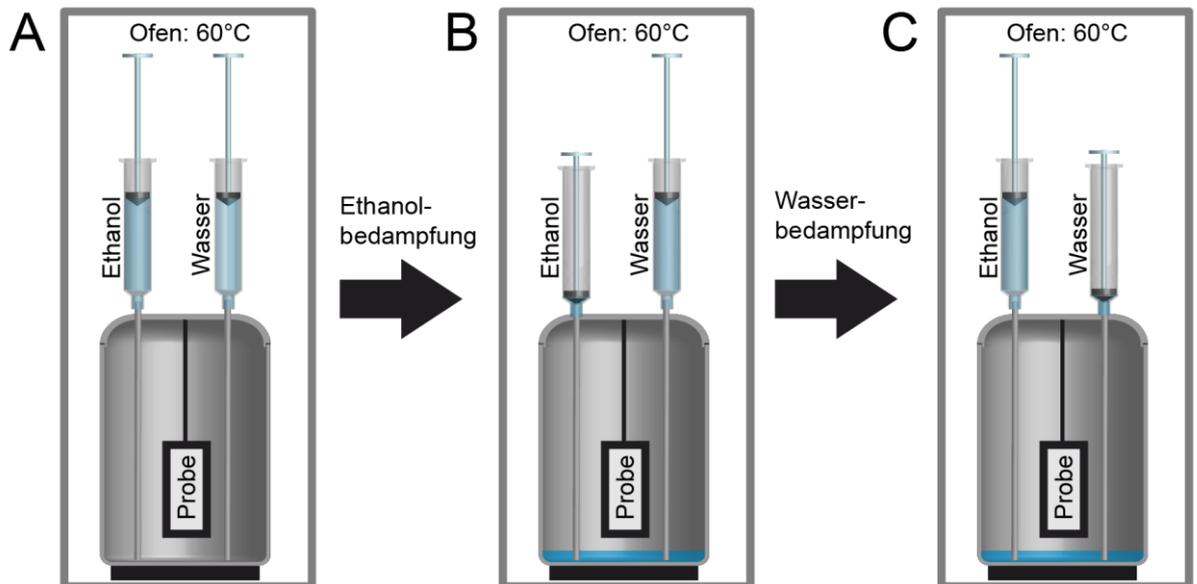


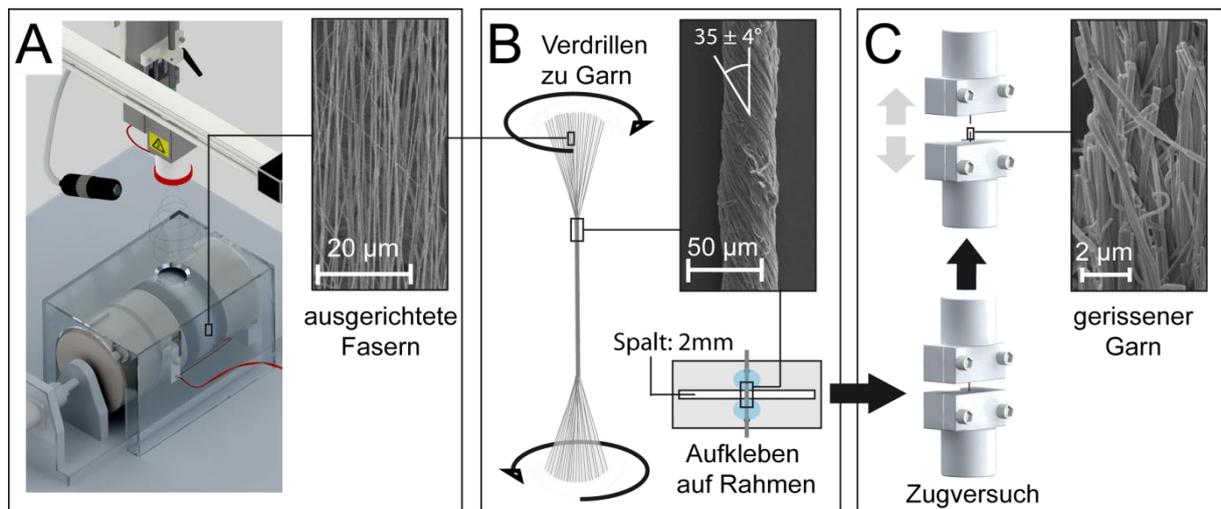
Abbildung 43: Schematische Darstellung der Nachbehandlung: Nach dem Vortemperieren wird Ethanol zugegeben um die Faltung der Proteine in ihre stabile  $\beta$ -Faltblatt-reiche Form zu induzieren. Anschließend wird Ethanol entfernt und Wasser zugeführt um die Probe für die weitere Handhabung weicher und somit unempfindlicher zu machen.

### 3.3 Mechanische Untersuchung von Protein-/Polymer-Garnen, natürlicher *Dragline* und nassgesponnenen Fasern

#### 3.3.1 Vorgehensweise bei der Präparation und Charakterisierung von Garnen

Um die Eignung elektrostatisch gesponnener Fasern für potentielle Anwendungen zu beurteilen, wurden mechanische Messungen durchgeführt. Der Fokus lag dabei auf dem Effekt der Nachbehandlung sowie dem Einfluss der Luftfeuchtigkeit. Für die Zugversuche wurden ausgerichtete Fasermatten aus eADF4(C16) (10% w/v) und eADF4(C32NR4) (7 % w/v) aus HFIP gesponnen (Abbildung 44, A) und sowohl unbehandelt als auch nach der Ethanolbehandlung gemessen. Als Vergleichssysteme wurden synthetische Polymere (PCL und PA6, 10% w/v aus HFIP) gesponnen und das natürliche Vorbild, die *Dragline*-Seide von *A. diadematus* (aus adulter Spinne mit 3 cm/s

gezogen), analog untersucht. Um sie in eine stabile kompakte Form zu bringen, wurden die Fasermatten aus eADF4(C16), eADF4(C32NR4), PCL und PA6 händisch zu Garnen verdrillt, teilweise nachbehandelt, und anschließend für die Zugversuche auf lasergeschnittene Plastikrahmen geklebt (Abbildung 44, B). Der Grad des Verdrillens wurde bestimmt, indem die verschiedenen Garne rasterelektronenmikroskopisch untersucht und deren Windungswinkel mit der Software ImageJ gemessen wurden. Die Winkel lagen alle im selben Bereich und betrug ca.  $35 \pm 4^\circ$ .



**Abbildung 44: Vorgehensweise bei der Durchführung mechanischer Messungen:** Zunächst wurden ausgerichtete Fasern gesponnen und die Fasermatten vom Substrat (schwarze Pappe) abgezogen (A). Anschließend wurden die Fasern händisch zu Garnen verdrillt (ca. 30 cm lang), die dann in kurze Stücke (ca. 1,5 cm) geschnitten und für den Zugversuch auf Rahmen (Spaltbreite: 2 mm) geklebt wurden (B). Die Rahmen mit den Fasern wurden in der Zugmaschine fixiert, die Stege der Rahmen getrennt und die Garne bis zum Reißen gedehnt (C).

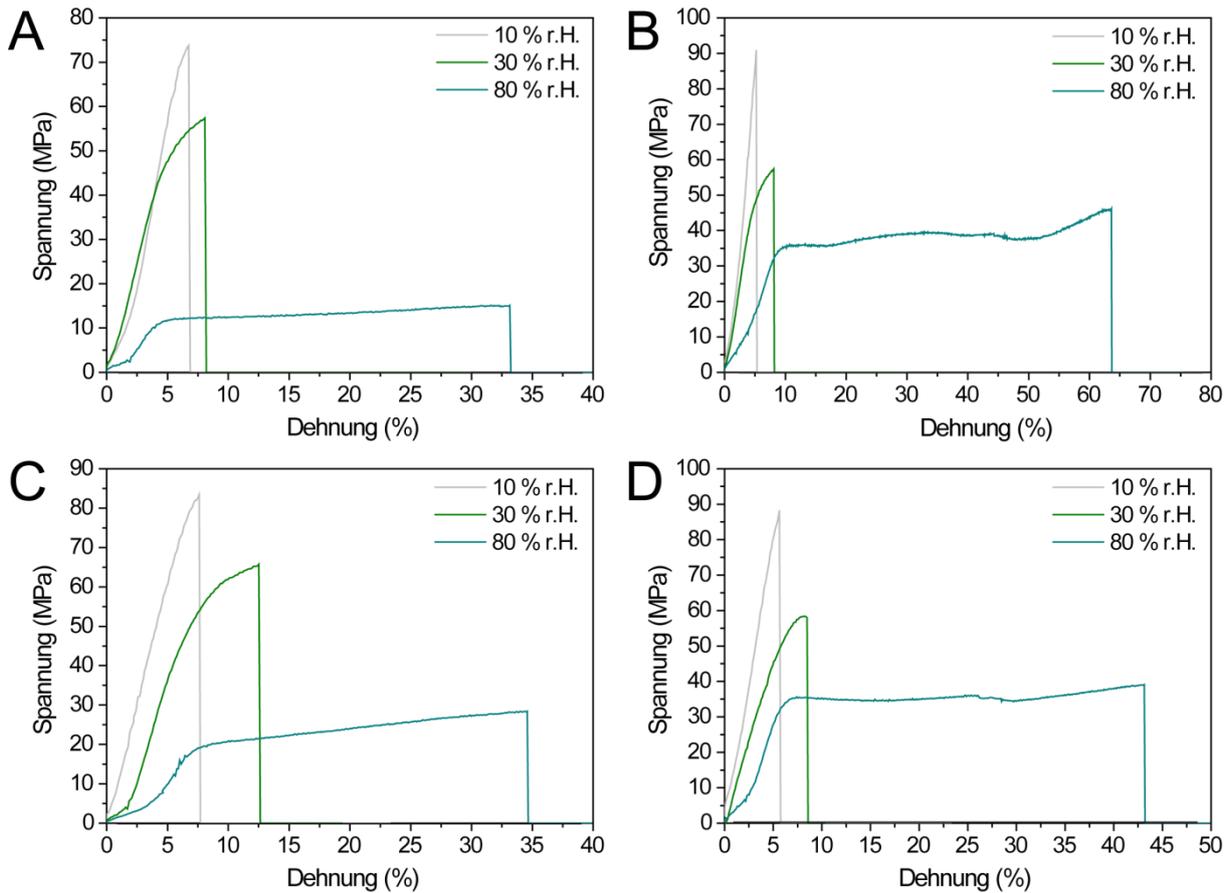
Für die Auswertung wurden die Fasern, zur Umrechnung der gemessenen Kräfte in Spannungen, gewogen und anhand der bekannten Materialdichte mit dem theoretischen Durchmesser einer gleichschweren Einzelfaser gerechnet. Bei der Interpretation der aufgeführten Ergebnisse muss beachtet werden, dass die ermittelten mechanischen Daten nicht die Materialeigenschaften an sich repräsentieren, sondern ausschließlich als Kennwerte der Materialien in ihrer spezifischen morphologischen Form zu verstehen sind.

In der ersten Messreihe wurden die Garne bis zum Materialversagen gedehnt (Abbildung 44, C). In weiteren Versuchen wurden ergänzend dynamische Belastungstests durchgeführt und das Superkontraktionsverhalten bei statischer Deformation und variierender Luftfeuchtigkeit untersucht.

### 3.3.2 Zugversuche von Protein-/Polymer-Garnen und natürlicher Spinnenseide

Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit und Nachbehandlung auf die Mechanik der Seidenproteingarne wurde anhand von quasistatischen Zugversuchen getestet (Deformationsrate: 0,005 mm/s, bzw. Dehnungsrate: 0,25 %/s) und mit den Eigenschaften von PCL- und PA6-Garnen verglichen. Zudem sollte anhand der, aus der Literatur bekannten, physikalische Eigenschaften dieser Polymere ein Vergleich aufgestellt werden, der Aufschluss über den Effekt der Fasermorphologie auf die gemessenen mechanischen Eigenschaften und somit Rückschlüsse auf das Proteinsystem zulässt. Ergänzend wurde die natürliche *Dragline-Seide* von *A. diadematus* getestet, um insbesondere die Feuchtigkeitssensitivität der rekombinanten Seide mit ihrer natürlichen Vorlage vergleichen zu können. Die *Dragline* Fäden wurde mit einem rotierenden Zylinder aus einer adulten Spinne mit einer Geschwindigkeit von 3 cm/s gezogen.

Die Zugkurven (Auswertung erfolgte nach wahrer Spannung und Dehnung, siehe Kapitel 2.2.6) von behandelten und unbehandelten eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garnen zeigen ein sehr ähnliches Muster (Abbildung 45, A-D). Charakteristisch war bei allen Messungen der deutliche Einfluss der Luftfeuchtigkeit sowohl auf die Zugfestigkeit als auch auf die Dehnbarkeit. Bei einer niedrigen Luftfeuchtigkeit von 10 % r.H. waren die Proteingarne relativ spröde, wohingegen sie mit steigender Luftfeuchtigkeit weicher und um ein Vielfaches dehnbarer wurden. Auffällig war hier vor allem die Veränderung des Zugkurvenprofils. Im Gegensatz zu den Messungen bei niedriger Luftfeuchtigkeit (10 % r.H., 30 % r.H.) können für die Zugkurven bei 80 % r.H. zwei Phasen definiert werden. In der ersten, kürzeren Phase kommt es zur Spannungsaufnahme, woraufhin in der zweiten Phase ein langer Dehnungsbereich auftritt, indem die Fasern der Deformation nur noch wenig zusätzliche Spannung entgegensetzen, bevor sie schließlich reißen. Bei nachbehandelten Fasern kam es häufig nochmals zu einem Spannungsanstieg, bevor das Material versagte (Abbildung 45, B). Die Ethanolbehandlung hatte zudem für beide Proteine bei hoher Luftfeuchtigkeit eine positive Auswirkung auf die Zugfestigkeit, während der Unterschied bei geringer Luftfeuchtigkeit nicht signifikant war (Abbildung 45, C, D). Die Dehnbarkeit nahm im niedrigen Feuchtigkeitsbereich (10% r.H., 30 % r.H.) durch die Behandlung tendenziell ab, wohingegen sie bei hoher Luftfeuchtigkeit (80 % r.H.) deutlich zunahm.



**Abbildung 45:** Repräsentative Zugkurven (wahre Spannung und Dehnung) von Garnen aus eADF4(C16) (unbehandelt: A, behandelt: B), eADF4(C32NR4) (unbehandelt: C, behandelt: D) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit (10, 30, 80 % r.H.).

Die Zugkurven der Polymergarne zeigten ein deutlich anderes Verhalten. Bei PCL bewirkte die Steigerung der Luftfeuchtigkeit lediglich einen geringen Abfall der Zugfestigkeit bei tendenziell sinkender Bruchdehnung (Abbildung 46, A). PA6 hingegen wurde mit zunehmender Luftfeuchtigkeit deutlich weicher, jedoch nicht in dem Umfang wie eADF4-Proteine (Abbildung 46, B). Ähnlich wie bei eADF4(C16) verhielt es sich bei den Messungen der natürlichen *Dragline*. Bei geringer Abnahme der Zugfestigkeit wurden die Fäden mit zunehmender Luftfeuchtigkeit deutlich dehnbarer. Im Vergleich zu den Garnen war der Spannungsbereich der natürlichen Seide etwa 10fach erhöht (Abbildung 46, C). Bei der Betrachtung dieser Messungen ist zu beachten, dass es sich bei den *Dragline*-Proben um Doppelfilamente handelte, was in den Zugkurven zum Teil anhand eines zweistufigen Bruches zu sehen ist. Dies wurde berücksichtigt, indem beide Filamentdurchmesser mikroskopisch vermessen und ihre Querschnittsflächen für die Spannungsberechnung addiert wurden.

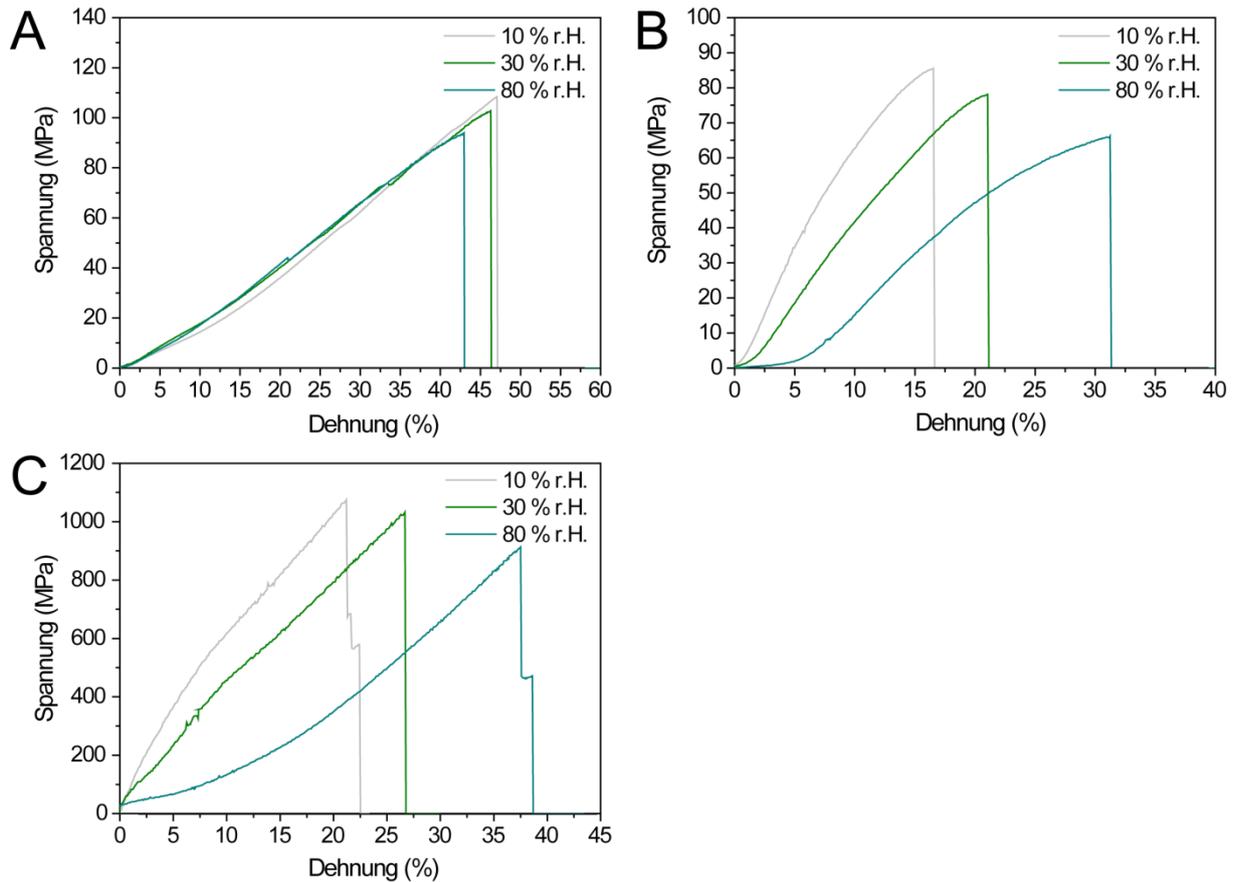


Abbildung 46: Repräsentative Zugkurven (wahre Spannung und Dehnung) von Garnen aus PCL (A) und PA6 (B), sowie eines Doppelfilaments der *A. diadematus Dragline* Seide (C) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit (10, 30, 80 % r.H.).

Um eine quantitative Aussage über das mechanische Verhalten der betrachteten Proben treffen zu können wurde eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der jeweils mindestens 20 Fasern gemessen wurden. Messungen, bei denen sich die Fasern aus dem Kleber lösten oder kein eindeutiger Bruch auftrat, wurden verworfen. Zudem wurde darauf geachtet, dass die Schwankung der Luftfeuchtigkeit unter 2 % lag. Da die Garne nicht immer absolut gerade, sondern zum Teil leicht gebogen vorlagen, wurde bei der Bestimmung des effektiven Elastizitätsmoduls der Bereich verwendet, indem die Spannungszunahme erstmalig sichtbar linear verlief. Somit konnte gewährleistet werden, dass nicht etwa die Federhärte einer gebogenen Faser als Elastizitätsmodul missinterpretiert wurde. Es wird an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen, dass es sich bei den hier aufgeführten Daten nicht um die physikalischen Eigenschaften der Materialien an sich handelt, sondern um die mechanischen Eigenschaften, die aus den Materialeigenschaften und ihrer morphologischen Beschaffenheit resultieren. Anhand der Ergebnisse kann sowohl der Einfluss der Luftfeuchtigkeit als auch der Nachbehandlung nachvollzogen werden.

Unter Abnahme der Zugfestigkeit sinkt sowohl bei den behandelten als auch den unbehandelten eADF4(C16)-Proben der Elastizitätsmodul, wobei sich die Nachbehandlung vor allem bei einer niedrigen Luftfeuchtigkeit von 10 % r.H. bemerkbar macht, da die behandelten Fasern unter diesen Bedingungen deutlich steifer sind (vergleiche Abbildung 47, A und B). Bei hoher Luftfeuchtigkeit werden die Garne in beiden Fällen erheblich dehnbarer, was zu einer erhöhten Zähigkeit führt. Durch den gesteigerten Anteil kristalliner Regionen ist die Zähigkeitszunahme bei behandelten Garnen aufgrund der Kombination aus erhöhter Zugfestigkeit und Dehnbarkeit größer als bei unbehandelten Garnen.

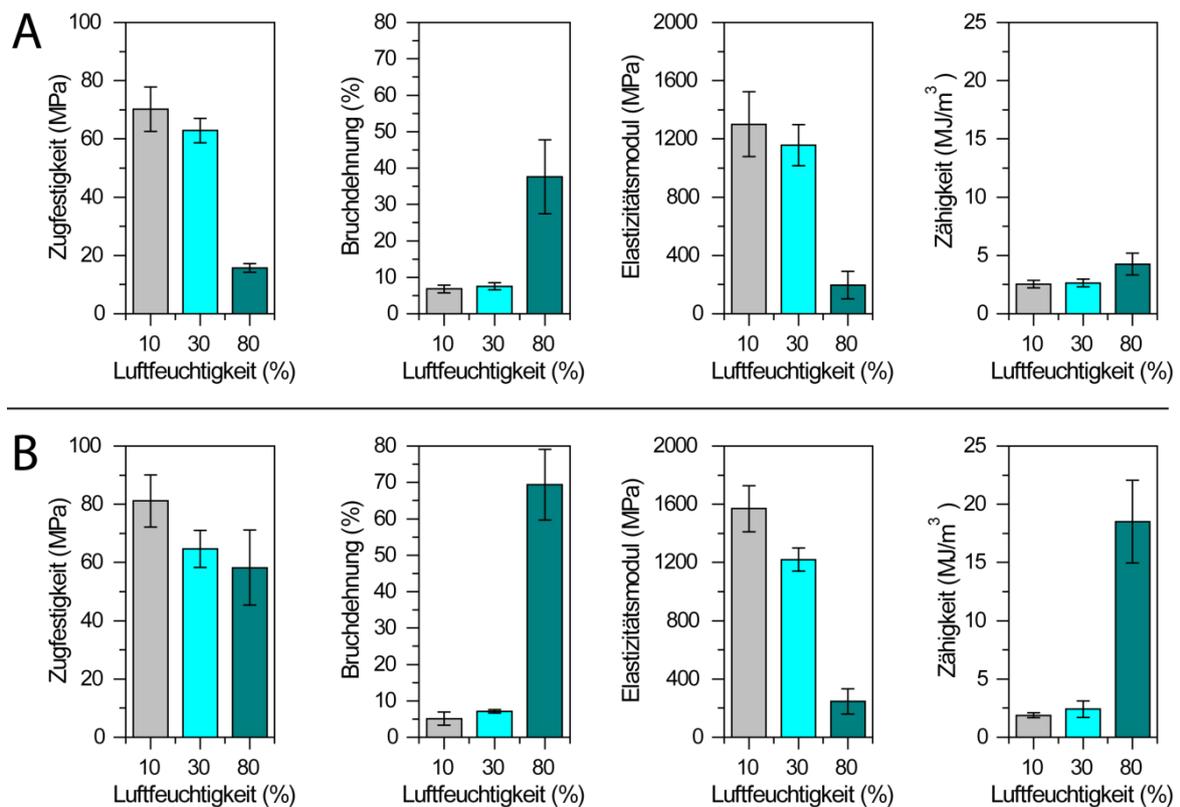
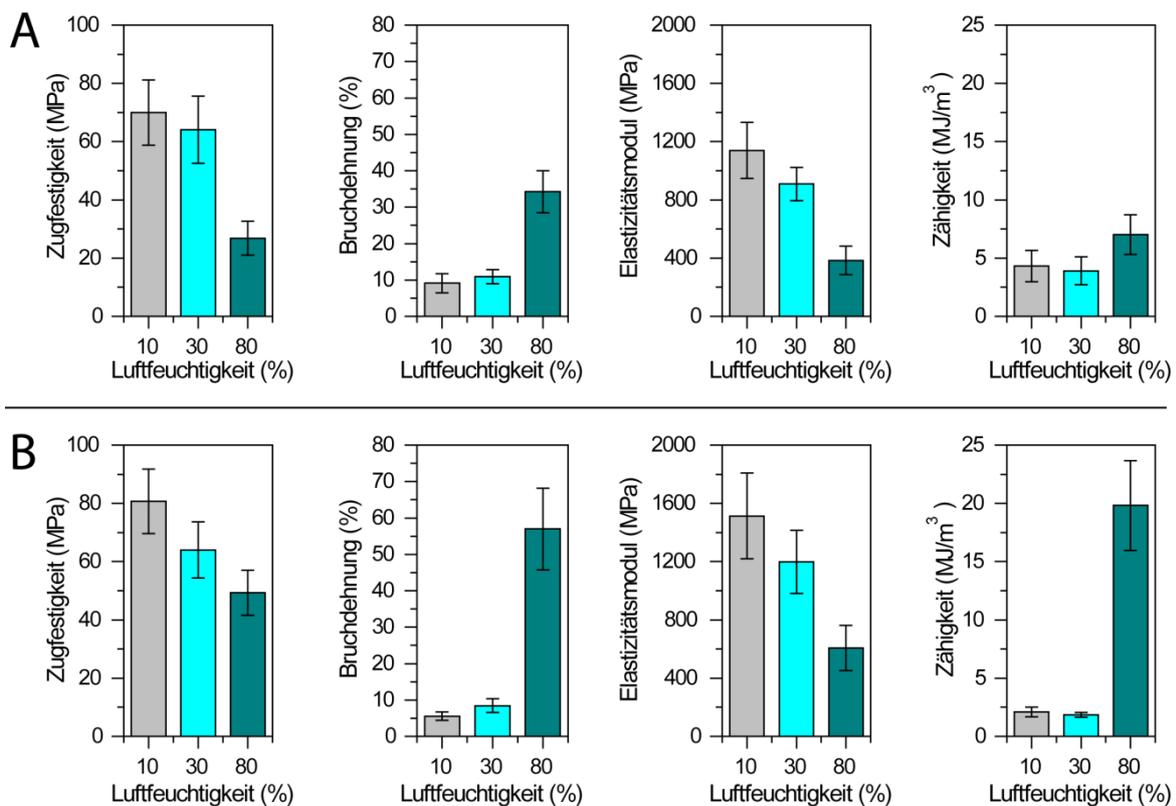


Abbildung 47: Mechanische Eigenschaften von unbehandelten (A) und ethanolbehandelten (B) eADF4(C16)-Garnen (Auswertung nach wahrer Spannung und Dehnung).

Die quantitative Auswertung unbehandelter und ethanolbehandelter eADF4(C32NR4)-Garne ergab eine Analogie zu den Ergebnissen, die mit eADF4(C16) generiert wurden (Abbildung 48). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung lagen die Werte der Zugfestigkeit und Bruchdehnung sowohl für behandelte und unbehandelte eADF4(C32NR4)-Garne, als auch in Anbetracht ihrer Luftfeuchtigkeitssensitivität in derselben Größenordnung wie bei eADF4(C16)-Garnen. Geringe Unterschiede konnten beim gemessenen Elastizitätsmodul registriert werden, da eADF4(C16) bei

niedriger Luftfeuchtigkeit (10% r.H. und 30 % r.H.) unabhängig von der Nachbehandlung einen höheren Elastizitätsmodul hatte als eADF4(C32NR4), während bei 80 % r.H. eADF4(C32NR4) steifer war als eADF4(C16). In Hinsicht auf die Zähigkeit wurde gezeigt, dass eADF4(C32NR4)-Garne im unbehandelten Zustand eine tendenziell höhere Zähigkeit aufweisen als unbehandelte eADF4(C16)-Garne, jedoch nach der Ethanolbehandlung ein sehr ähnliches Verhalten zeigen. Sowohl bei eADF4(C16) als auch bei eADF4(C32NR4) wurde die mit Abstand höchste Energieaufnahme bei nachbehandelten Proben in hoher Luftfeuchtigkeit gemessen.



**Abbildung 48: Mechanische Eigenschaften von unbehandelten (A) und ethanolbehandelten (B) eADF4(C23NR4)-Garnen (Auswertung nach wahrer Spannung und Dehnung).**

Um die mechanischen Daten der Seidenproteingarne zuverlässig interpretieren zu können und Rückschlüsse auf den Einfluss der Morphologie zu ziehen, wurden Vergleichsmessungen mit den beiden synthetischen Polymeren PCL und PA6 durchgeführt (Abbildung 49).

Bei PCL-Garnen ist ein geringfügiger Luftfeuchtigkeitseinfluss zu sehen. Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen kann hier jedoch lediglich von einer Tendenz gesprochen werden, die sich aufgrund der Kombination aus geringen feuchtigkeitsabhängigen Änderungen der Zugfestigkeit und Bruchdehnung vor allem in der Zähigkeit bemerkbar macht. Es ist anzumerken, dass sich die

Abnahme der Zähigkeit mit der Luftfeuchtigkeit gegenteilig zum mechanischen Verhalten der Seidenproteingarne verhält. Der Elastizitätsmodul bleibt dabei konstant (Abbildung 49, A).

PA6-Garne hingegen weisen, wenn auch in geringerem Maße, ein feuchtigkeitsabhängiges Verhalten auf, das in Analogie zu den eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garnen steht. Während die Zugfestigkeit geringfügig abnimmt kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Bruchdehnung bei gleichzeitiger Abnahme des Elastizitätsmoduls. Die erhöhte Bruchdehnung spiegelt sich in der feuchtigkeitsabhängigen Zunahme der Zähigkeit wieder (Abbildung 49, B).

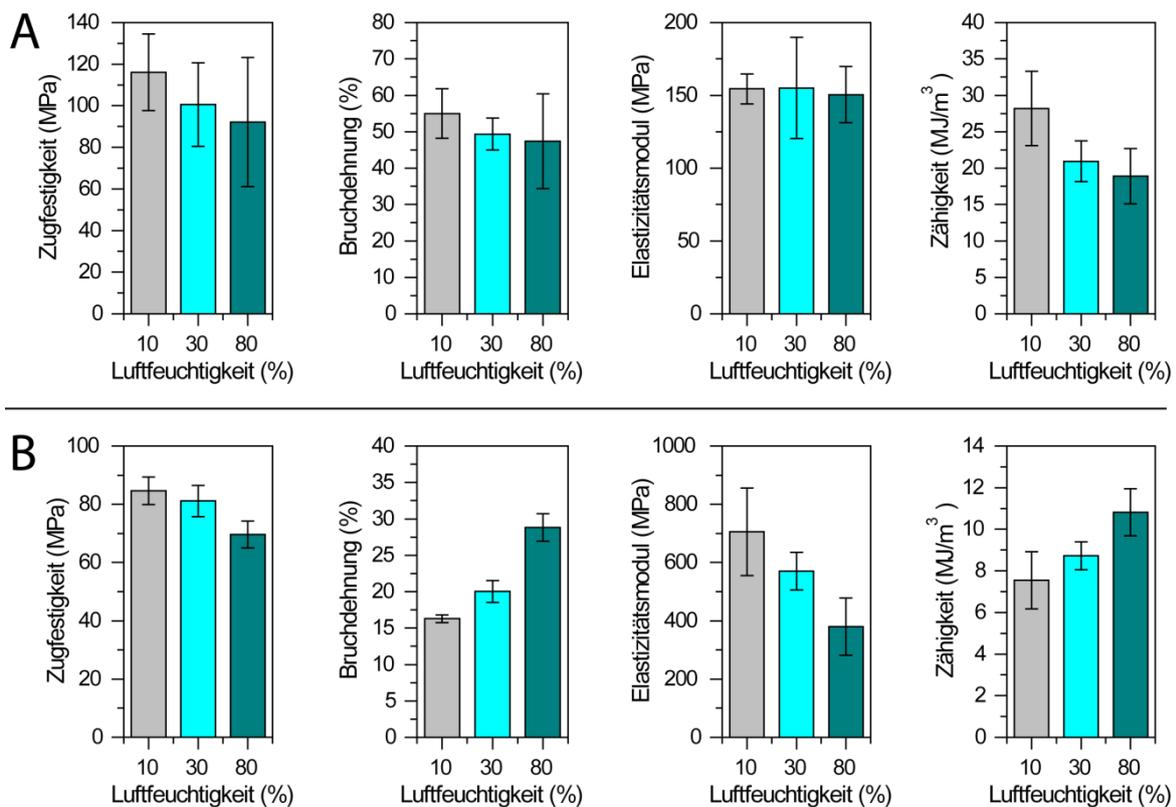


Abbildung 49: Mechanische Eigenschaften von PCL- (A) und PA6-Garnen (B) (Auswertung nach wahrer Spannung und Dehnung).

Aus den ermittelten Daten ist ersichtlich, dass eADF4(C16), eADF4(C32NR4) und PA6 bei Variation der Luftfeuchtigkeit ähnliche charakteristische Verhaltensmuster aufweisen. Die Messungen von PCL hingegen ergaben ein davon abweichendes Muster, obwohl alle Proben morphologisch vergleichbar waren. Daraus lässt sich schließen, dass die feuchtigkeitsbedingte Variation der ermittelten Daten primär auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Materialien zurückzuführen ist und weniger ein morphologiespezifisches Verhalten darstellt.

Im Vergleich zu eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garnen liegen die Zugfestigkeit und der Elastizitätsmodul des natürlichen Spinnenseidenfadens um ein Vielfaches höher (Abbildung 50). Dies spiegelt sich auch in der resultierenden Zähigkeit wieder. Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit hingegen weist klare Parallelen zu den Ergebnissen von eADF4-Proteinen auf. Mit zunehmender Feuchtigkeit sinkt die Zugfestigkeit in vergleichbarer Relation wie bei behandelten Proteingarnen und auch die Abnahme des Elastizitätsmoduls findet in derselben Größenordnung statt. Der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Bruchdehnung ist tendenziell gleich, wobei der natürliche Seidenfaden bei niedriger Luftfeuchtigkeit (10 % r.H., 30 % r.H.) erheblich dehnbarer ist als eADF4(C16)- oder eADF4(C32NR4)-Garne. Grundlegend abweichend hingegen ist, dass die Zähigkeit des natürlichen Systems feuchtigkeitsunabhängig konstant bleibt, während bei den künstlichen Proteinen eine signifikante Zunahme der Zähigkeit durch die erhöhte Luftfeuchtigkeit registriert wurde.

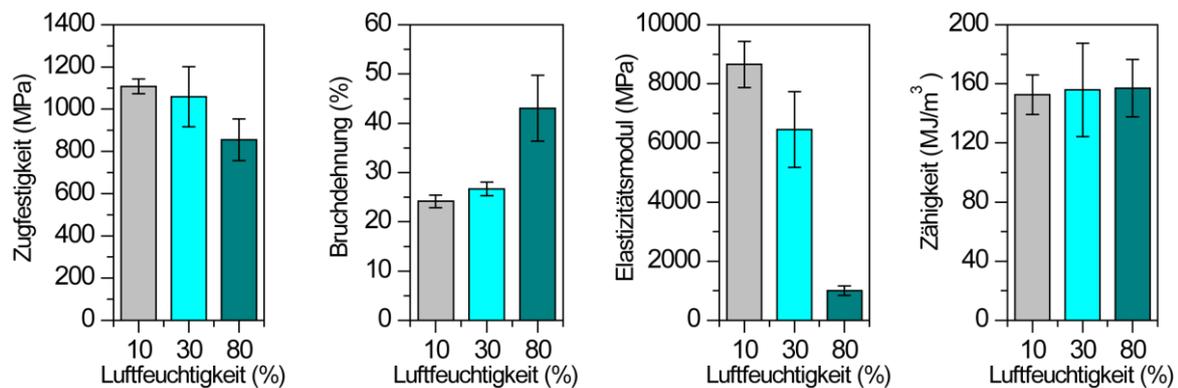


Abbildung 50: Mechanische Eigenschaften der natürlichen *Dragline*-Seide von *A. diadematus* (Auswertung nach wahrer Spannung und Dehnung).

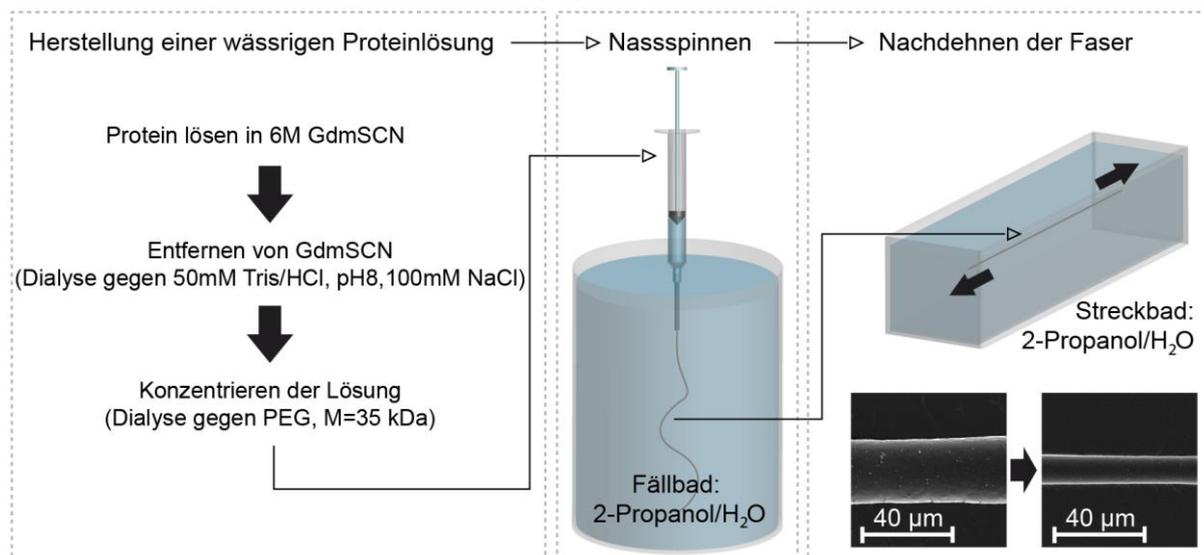
Resümierend lassen sich aus den aufgeführten Beobachtungen folgende Thesen aufstellen:

- Das Proteinmolekulargewicht sowie die carboxyterminale Domäne NR4 haben keinen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der eADF4-Garne.
- Die Ethanolbehandlung der Proteingarne führt bei niedriger Luftfeuchtigkeit (10 % r.H.) zu einer Zunahme des effektiven Elastizitätsmoduls sowie einer Abnahme der Bruchdehnung und resultiert bei hoher Luftfeuchtigkeit durch gleichzeitige Zunahme der Zugfestigkeit und der Bruchdehnung in einer wesentlich höheren Zähigkeit.
- Da das Verhaltensmuster von PCL trotz gleicher Morphologie maßgeblich von dem von eADF4-Proteinen abweicht, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte aufgrund der materialspezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften auftreten.

- Das Verhaltensmuster von eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garnen steht weitestgehend in Analogie zu dem des natürlichen Seidenfadens, welcher jedoch wesentlich stabiler ist und eine feuchtigkeitsunabhängige konstante Zähigkeit aufweist.

### 3.3.3 Herstellung und mechanische Charakterisierung nassgesponnener Proteinfasern

Das Nassspinnverfahren eignet sich zur Herstellung von Fasern mit Durchmessern im Mikrometerbereich und öffnet somit ein zweites Feld potentieller Applikationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig ein Verfahren entwickelt, welches eine Konzentrierung wässriger Lösungen mittels Polyethylenglycol-Dialyse (PEG-Dialyse, siehe Kapitel 2.2.2.2), sowie das Verspinnen in ein alkoholhaltiges Fällbad und das Nachstrecken als Mittel zur mechanischen Stabilisierung umfasst (Abbildung 51). Die Methode wurde in Zusammenarbeit mit Martha Geffers im Rahmen einer Diplomarbeit vertieft und schließlich von Aniela Heidebrecht (Lehrstuhl Biomaterialien, Universität Bayreuth) auf ein breites Spektrum verschiedener Proteine übertragen und weiterführend optimiert. Die Ergebnisse wurden im Journal *Advanced Materials* veröffentlicht.<sup>[229]</sup>



**Abbildung 51: Vorgehensweise beim Nassspinnen: Herstellung einer konzentrierten Lösung mittels PEG-Dialyse, Nassspinnen in wässrig verdünntes 2-Propanol und Nachdehnen im Streckbad. Rechts unten ist anhand von REM-Aufnahmen der Einfluss des Nachstreckens auf die Fasermorphologie zu sehen: Die Fasern wurden dünner und glatter.**

Bei den Versuchen mit verschiedenen rekombinanten Seidentypen stellte sich heraus, dass sich insbesondere eADF3-Proteine zum Nassspinnen eignen, da sie ein besseres Lösungsverhalten in wässrigen Systemen aufwiesen und sich reproduzierbar nachstrecken ließen. Der Schritt des

Nachstreckens wurde in Analogie zum biologischen System entwickelt, da der Seidenfaden beim natürlichen Spinnprozess durch Abseilen oder Herausziehen von der Spinne ebenfalls nachgestreckt wird. Dadurch kommt es zum einen zur Ausrichtung der kristallinen Bereiche und zum anderen wird die Struktur verdichtet, was insgesamt zu einem höheren Grad an Kristallisation führt. In Tabelle 10 sind die mechanischen Werte von elektrostatisch gesponnenen eADF4-Garnen im Vergleich zu den nassgesponnenen und um 600 % nachgestreckten eADF3-Fasern (bei eADF3(AQ12): 400 %) sowie natürlicher Spinnenseide, angegeben. Im Gegensatz zu den eADF4-Garnen, bei denen weder das Molekulargewicht noch die carboxyterminale Domäne einen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften hatten, ist bei nassgesponnenen eADF3-Fasern ein deutlicher Effekt zu sehen. Durch Verdopplung des Molekulargewichts von eADF3(AQ12) auf eADF3(AQ24) kam es zu einer Erhöhung der Zugfestigkeit um ca. Faktor 4, was mit einer signifikanten Zunahme der Dehnbarkeit und einer Verdopplung des Elastizitätsmoduls einherging. Durch Verdopplung des Molekulargewichts konnte die Zähigkeit somit um ca. Faktor 5 verbessert werden. Vergleichbar verhielt sich der Einfluss der carboxyterminalen Domäne bei eADF3(AQ12)NR3. Auch hier kam es zu einer signifikanten Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, die unter Berücksichtigung der Standardabweichung im Bereich der Fasermechanik von eADF3(AQ24) liegen.

**Tabelle 10: Übersicht über mechanische Eigenschaften (bei 30 % r.H.) von elektrostatisch gesponnenen eADF4-Garnen, natürlicher *A. diadematus Dragline (DL)*, sowie nassgesponnenen eADF3-Fasern (U: ungestreckt, G: nachgestreckt). (Zugfestigkeit  $\sigma$ , Bruchdehnung  $\epsilon$ , Elastizitätsmodul  $E$ , Zähigkeit  $U_T$ , ausgewertet nach wahrer Spannung und Dehnung).**

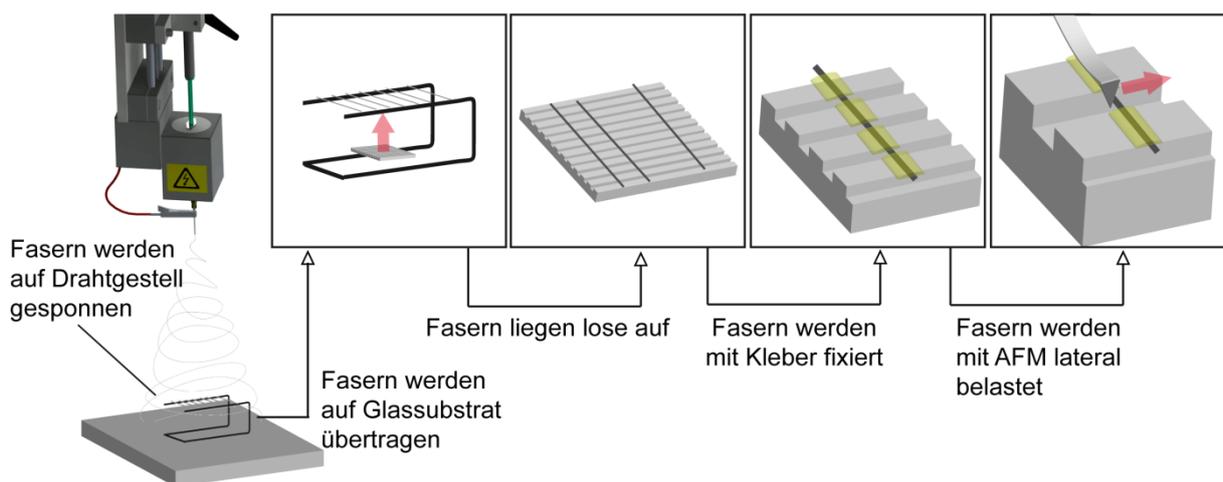
	$\sigma$ (MPa)		$\epsilon$ (%)		$E$ (GPa)		$U_T$ (MJ/m <sup>3</sup> )	
<b>eADF4(C16)</b>	62,9 ± 4,3		7,5 ± 1,0		1,16 ± 0,14		2,6 ± 0,3	
<b>eADF4(C16) beh.</b>	64,7 ± 6,4		7,1 ± 0,5		1,22 ± 0,08		2,4 ± 0,7	
<b>eADF4(C32NR4)</b>	64,1 ± 11,6		11,0 ± 1,9		0,91 ± 0,11		3,9 ± 1,2	
<b>eADF4(C32NR4) beh.</b>	64,0 ± 9,7		8,5 ± 1,9		1,20 ± 0,22		1,9 ± 0,2	
<b><i>A. diadematus DL</i></b>	1058,7 ± 142,3		26,7 ± 1,4		6,46 ± 1,28		155,9 ± 31,6	
	<b>U</b>	<b>N</b>	<b>U</b>	<b>N</b>	<b>U</b>	<b>N</b>	<b>U</b>	<b>N</b>
<b>eADF3((AQ)12)</b>	10 ± 2	66 ± 22	17 ± 9	38 ± 16	0,9 ± 4	2 ± 0,9	0,9 ± 0,4	20 ± 12
<b>eADF3((AQ)24)</b>	22 ± 0,4	280 ± 48	22 ± 3	65 ± 6	0,4 ± 1	4 ± 0,6	4 ± 1	110 ± 24
<b>eADF3((AQ)12NR3)</b>	32 ± 12	244 ± 23	10 ± 3	64 ± 11	2 ± 0,5	4 ± 0,4	2 ± 1,5	83 ± 10

Aus den Ergebnissen wurde ersichtlich, dass das Molekulargewicht und die carboxyterminale Domäne essentiell zur mechanischen Stabilität nassgesponnener Fasern beitragen, da längere Proteinketten stärkere intermolekulare Wechselwirkungen ausbilden und die carboxyterminale

Domäne einen positiven Einfluss auf die Vorassemblierung während des Spinnens hat. Diese Effekte wurden bei den Garnen nicht registriert, was vermutlich auf das starke Lösungsmittel HFIP zurückzuführen ist, welches die Vorassemblierung inhibiert.

### 3.3.4 Mechanische Messungen elektrostatisch gesponnener Einzelfasern mittels AFM

Es wurde gezeigt, dass sowohl die Nachbehandlung, als auch die Luftfeuchtigkeit einen Einfluss auf das mechanische Verhalten der rekombinanten Seidenproteine haben. Um dieses Verhalten an Einzelfasern zu verifizieren, wurden in Zusammenarbeit mit Benedikt Neugirg (Physikalische Chemie II, Universität Bayreuth) mittels AFM mechanische Belastungstests an elektrostatisch gesponnenen Einzelfasern (unbehandelt/behandelt) aus eADF4(C16) durchgeführt. Dazu wurde ein Drahtgestell als Gegenelektrode verwendet, auf dem sich die Fasern freihängend ablagerten. In diesem Zustand wurden die Fasern zum Teil nach der in Kapitel 3.2.2.4 beschriebenen Methode behandelt. Die ausgerichteten Fasern wurden mit einem strukturierten Glassubstrat abgenommen. Anschließend wurden mit einem Mikromanipulator Klebertropfen auf die Kontaktstellen der Fasern mit den Stegen des Substrats platziert, um die sie zu immobilisieren. Schließlich wurden die fixierten Fasern unter definierter Luftfeuchtigkeit lateral belastet (Abbildung 52).



**Abbildung 52:** Präparationsmethode für AFM-Messungen an Einzelfasern: Fasern werden direkt auf zwei parallele Drähte (Abstand 1 cm) gesponnen (und teilweise nachbehandelt) und anschließend auf ein strukturiertes Glassubstrat übertragen. Mit einem Mikromanipulator werden die lose aufliegenden Fasern für die lateralen Belastungsexperimente mit Kleber fixiert und anschließend belastet.

Es wird darauf hingewiesen, dass es sich hierbei nicht um einen klassischen Zugversuch handelte, sondern um ein laterales Biegeexperiment (Kapitel 2.2.5.2), welches einen anderen Belastungsfall darstellt. Die ermittelten Daten sind also nicht als Kennwerte des Materials zu betrachten, sondern sollen durch internen Vergleich Aufschluss über die untersuchten Einflüsse geben.

Wie bei den mechanischen Messungen der Garne war auch bei den eADF4-Einzelfasermessungen deutlich der Einfluss der Luftfeuchtigkeit zu sehen (Abbildung 53). Sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Fasern nahm mit steigender Luftfeuchtigkeit die Zugfestigkeit ab, während die Bruchdehnung insbesondere bei 80 % r.H. stark anstieg und der Elastizitätsmodul kleiner wurde. Analog zu den Beobachtungen bei den Zugmessungen an eADF4-Garnen (Abbildung 47), hatte die Zunahme der Luftfeuchtigkeit vor allem bei behandelten Proben einen stark positiven Effekt auf die Zähigkeit. Im Gegensatz zu den Ergebnissen die mit eADF4-Garnen generiert wurden, bewirkte die Nachbehandlung bei diesen Messungen jedoch keinen signifikanten Anstieg des Elastizitätsmoduls. Obgleich die hier ermittelten Werte zahlenmäßig wesentlich höher sind, wurden auch in diesem Versuch überwiegend dieselben Tendenzen beobachtet wie bei den Garnen.

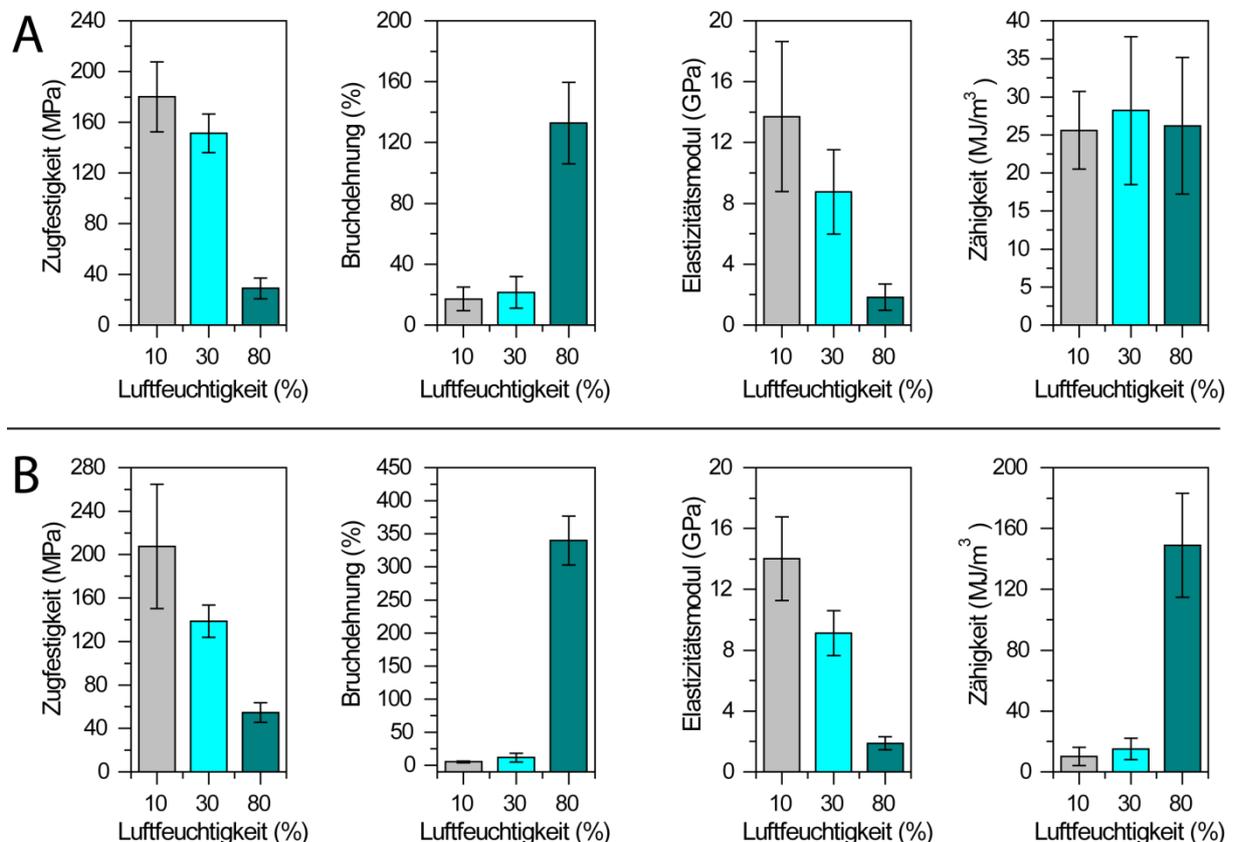


Abbildung 53: Ergebnisse aus lateralen Biegeexperimenten mittels AFM: Messungen an unbehandelten (A) und Ethanol-behandelten (B) eADF4(C16)-Einzelfasern.

### 3.3.5 Dynamische Belastungstest von Protein-/Polymer-Garnen

In der Mehrzahl potentieller Anwendungen ist davon auszugehen, dass das Material einer dynamischen Belastung ausgesetzt ist. Um einen Eindruck über das materialabhängige Ermüdungsverhalten der Garne zu gewinnen, wurden dynamische Zugversuche mit eADF4(C16)-, sowie PCL- und PA6-Garnen zum Vergleich durchgeführt. Dabei wurden zwei Fälle simuliert (Abbildung 54, B):

- Kontinuierlich lineare Be- und Entlastung (max. Dehnung: 5 %, Frequenz: 0,05 Hz, Zyklen: 11)
- Sprunghafte Be- und Entlastung (max. Dehnung: 4 %, Frequenz: 0,01 Hz, Zyklen: 4)

Aufgrund der bekannten Luftfeuchtigkeitssensitivität der Seidenproteingarne wurden sämtliche Messungen bei jeweils drei Luftfeuchtigkeiten durchgeführt (30, 60, 80 % r.H.). Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.3.2 und 3.3.4 aufgeführten Experimenten wurde hier nicht bei 10 % r.H. gemessen, da eine Dehnung von 5 % bei Garnen aus rekombinanten Seidenproteinen unter diesen Bedingungen bereits in der Größenordnung der Bruchdehnung liegt. Stattdessen wurde eine zusätzliche Luftfeuchtigkeit von 60 % r.H. eingeführt. Für jede Messung wurden neue und somit unbelastete Proben verwendet.

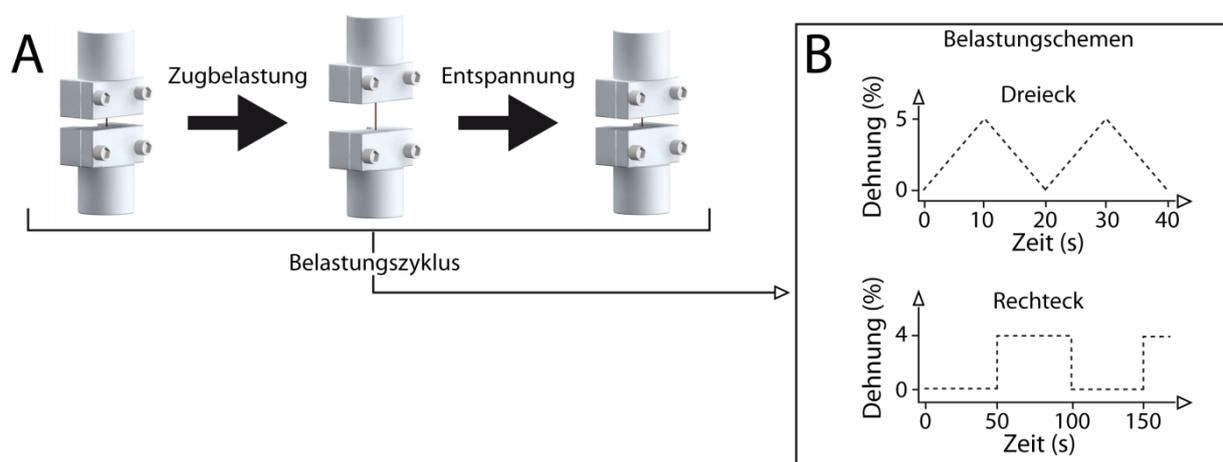


Abbildung 54: Schematische Darstellung dynamischer Zugversuche (A) sowie Belastungsschemen für dreieckige und rechteckige Deformationsprofile unter Angabe der Messparameter (B) (ausgewertet nach wahrer Spannung und Dehnung).

Bei den linearen Belastungszyklen von eADF4(C16)-Garnen konnte abermals der starke Einfluss der Luftfeuchtigkeit beobachtet werden. Aufgrund der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Reduzierung des Elastizitätsmoduls sank mit zunehmender Luftfeuchtigkeit bei unbehandelten (Abbildung 55, A) und behandelten eADF4(C16)-Garnen (Abbildung 55, B) die maximal bei 5 % Dehnung auftretende Spannung. Aus den Messungen geht hervor, dass der ermüdungsbedingte Spannungsabfall im Verlauf von 11 Zyklen bei 30 % r.H. im Falle von behandelten eADF4(C16)-Garnen (Abfall um ca. 34 %) stärker war, als bei unbehandelten (Abfall um ca. 19 %). Bei hoher Luftfeuchtigkeit hingegen war der Spannungsabfall von unbehandelten Proben höher (Abfall bei 60 % r.H.: 38 %, 80 % r.H.: 31 %) als von behandelten Proben (Abfall bei 60 % r.H.: 14 %, 80 % r.H.: 0 %). Bei PCL (Abbildung 55, C) und PA6 (Abbildung 55, D) wurden hingegen nur geringe Spannungsverluste (< 5 %) im Verlauf der 11 Zyklen registriert. Auch hier spiegelten sich die Ergebnisse aus Kapitel 3.3.2 wieder. So hatte die Luftfeuchtigkeit bei PCL-Garnen nur einen sehr geringen Einfluss auf das mechanische Verhalten. PA6 hingegen wurde durch Feuchtigkeit zuzufuhr weicher, wobei zwischen dem Verhalten bei 60 % r.H. und 80 % r.H. kein Unterschied mehr ersichtlich war.

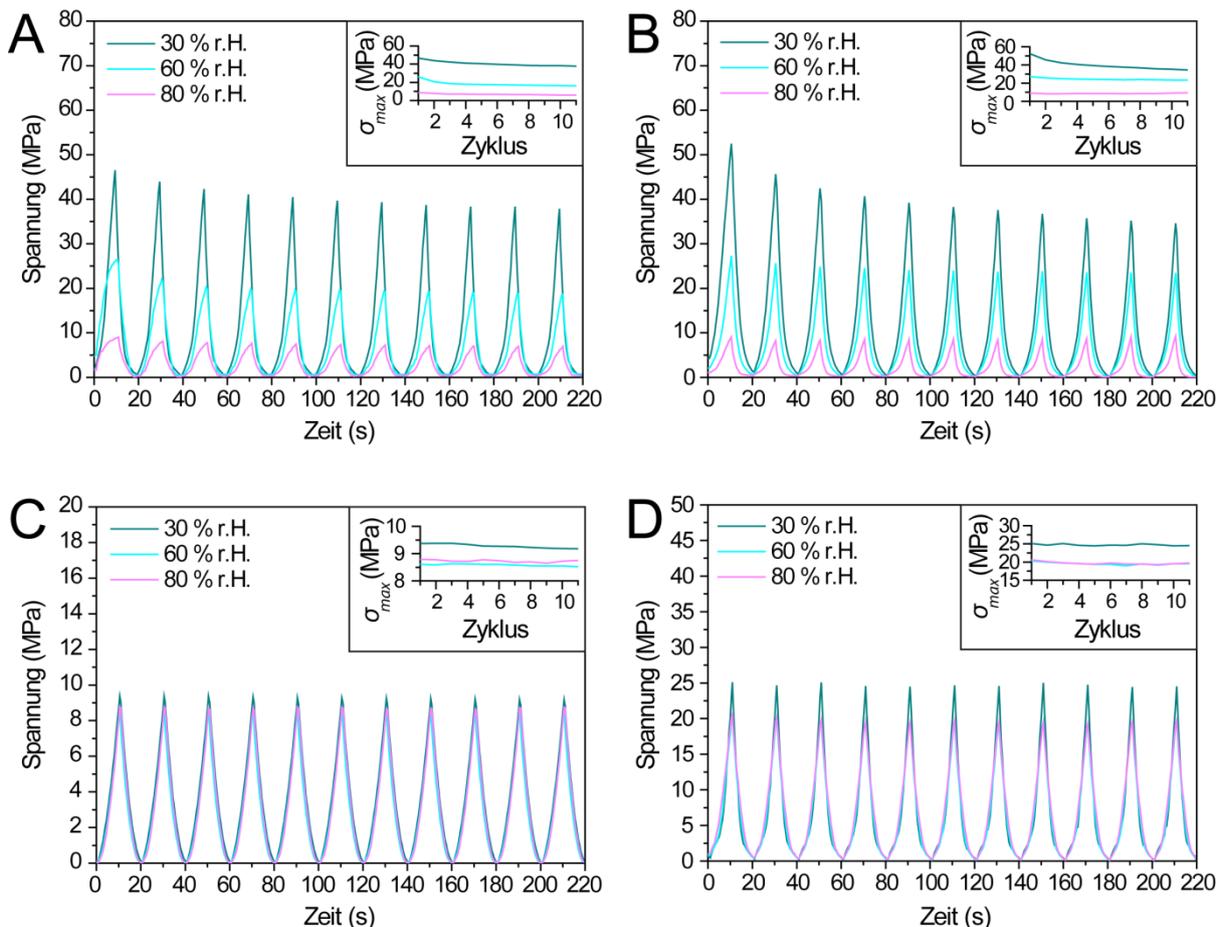
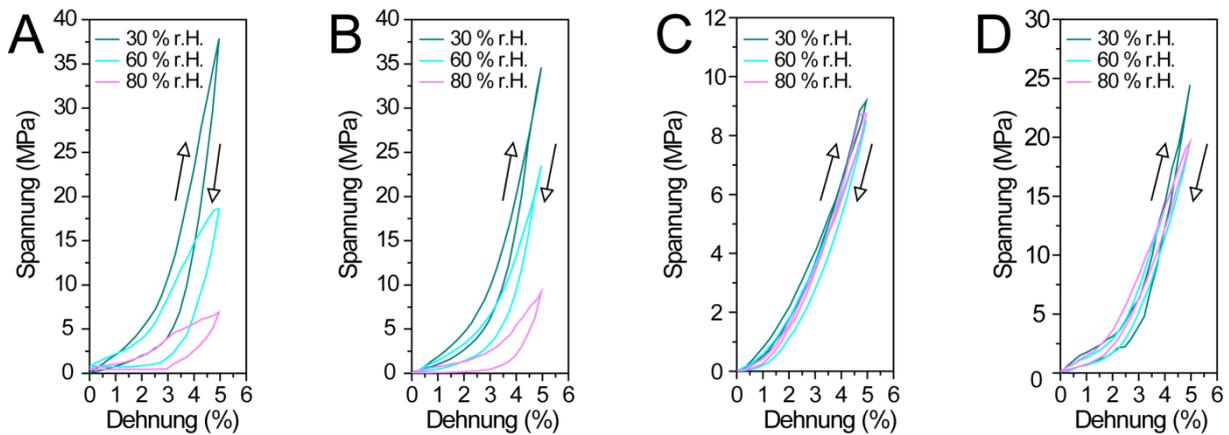


Abbildung 55: Zugkurven bei kontinuierlicher linearer Be- und Entlastung (11 Zyklen) und unter Variation der Luftfeuchtigkeit: unbehauelter (A) und behauelter eADF4(C16)-Garn (B), PCL-Garn (C), PA6-Garn (D). Oben rechts ist jeweils der Verlauf der bei 5 % Dehnung gemessenen maximalen wahren Spannung  $\sigma_{max}$  aufgetragen.

Neben dem Ermüdungsverhalten der Garne kann aus den Belastungszyklen die elastische Hysterese abgeleitet werden (Abbildung 56). Für die Auftragung wurde der jeweils 11. Zyklus verwendet, da die Garne hier bereits auf die Belastung konditioniert waren und die Änderung der Spannung bei 5 % Deformation nur noch gering war. Beim unbehandelten eADF4(C16)-Garn (Abbildung 56, A) ist die Diskrepanz zwischen Be- und Entlastungsphase deutlich größer als beim behandeltem eADF4(C16)-Garn (Abbildung 56, B). Die Polymere hingegen weisen insgesamt engere Hystereseschleifen auf als die Proteingarne (Abbildung 56, C, D).



**Abbildung 56: Mechanische Hysterese (Zyklus 11) von Garnen aus eADF4(C16) (A), behandeltem eADF4(C16) (B), PCL (C) und PA6 (D). Die Pfeile markieren die Richtung der Spannungs-Dehnungs-Kurven.**

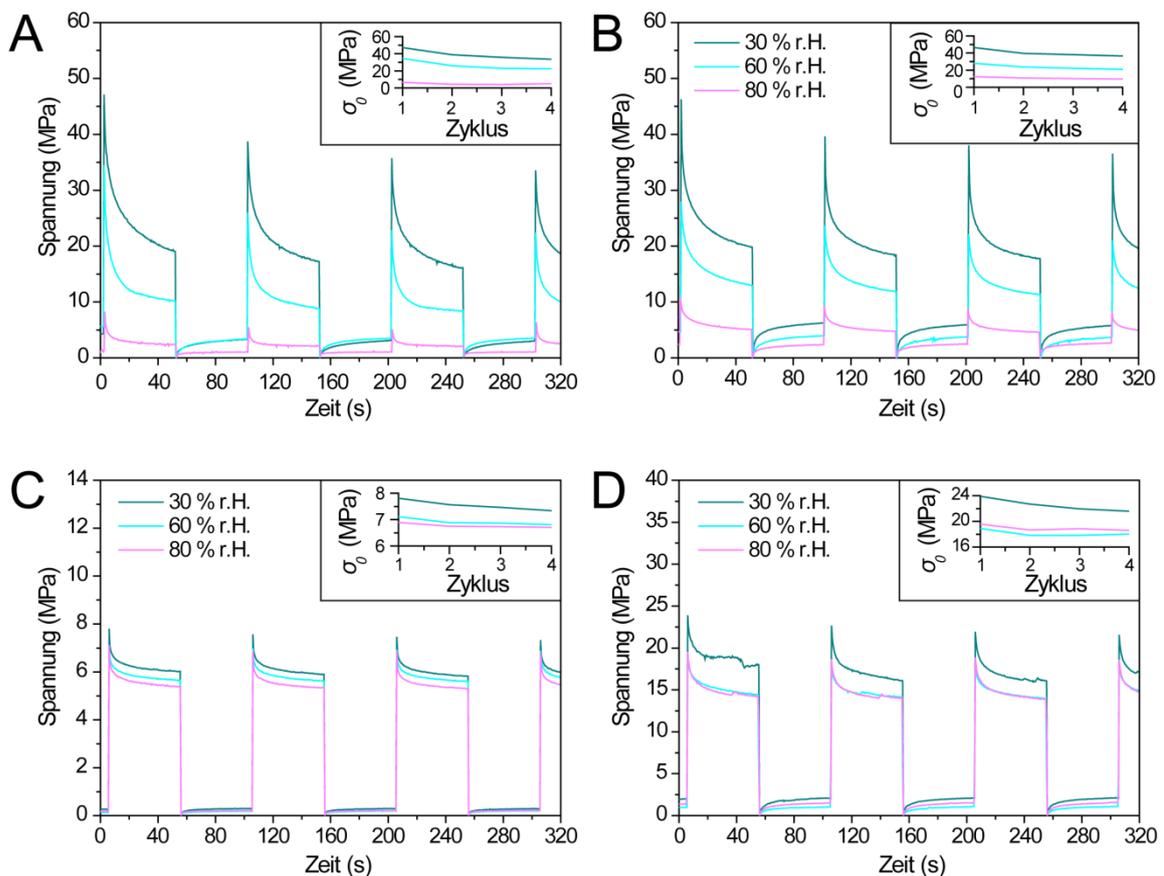
Der Flächeninhalt der Hysterese ist ein Maß für die Differenz der Energieaufnahme der Garne aufgrund der Deformation und der Energieabgabe während der Entspannung und wird als dissipierte Energie bezeichnet. Die dissipierte Energie geht während des Belastungszyklus irreversibel verloren, obgleich die Probe ihren ursprünglichen Zustand einnimmt. Diese Materialeigenschaft wird als pseudoelastisches Verhalten bezeichnet. Die dissipierte Energie wurde für die Zyklen 8 - 11 berechnet und deren prozentualer Anteil an der maximal aufgenommenen Energie der Garne bestimmt (Tabelle 11). Insbesondere bei eADF4(C16)-Garnen war ein stark pseudoelastisches Verhalten zu beobachten, das sich mit zunehmender Luftfeuchtigkeit ausprägte. Durch die Ethanolbehandlung der eADF4(C16)-Garne wurde der Energieverlust in der Hystereseschleife reduziert. Bei PCL konnte ebenfalls eine Zunahme der Dissipation mit Steigerung der Luftfeuchtigkeit registriert werden, während der Energieverlust bei PA6 relativ konstant blieb.

## Ergebnisse

**Tabelle 11: Mittlere relative dissipierte Energie von Garnen aus eADF4(C16), behandeltem eADF4(C16), PCL und PA6 bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit (gemittelte Werte der Lastzyklen 8-11).**

	$\Delta E_{C16} (\%)$	$\Delta E_{C16, beh.} (\%)$	$\Delta E_{PCL} (\%)$	$\Delta E_{PA6} (\%)$
<b>30 % r.H.</b>	$37,16 \pm 0,08$	$18,18 \pm 0,45$	$5,14 \pm 0,08$	$19,91 \pm 0,69$
<b>60 % r.H.</b>	$54,67 \pm 0,50$	$28,77 \pm 0,20$	$17,19 \pm 0,15$	$20,56 \pm 0,30$
<b>80 % r.H.</b>	$58,39 \pm 1,54$	$51,15 \pm 1,40$	$23,63 \pm 0,04$	$18,11 \pm 0,22$

Durch den Zugversuch mit sprunghafter Be- und Entlastung wurde das Relaxationsverhalten der Garne untersucht (Abbildung 57). Die Dehnung betrug dabei 4 % und die Haltezeit 50 s. Aus den Messungen wird ersichtlich, dass bei unbehandelten und behandelten eADF4(C16)-Garnen (Abbildung 57, A, B) eine stärkere Relaxation auftrat als bei den Polymeren (Abbildung 57, C, D).



**Abbildung 57: Sprunghafte Be- und Entlastung von Garnen aus eADF4(C16) (A), behandeltem eADF4(C16) (B), PCL (C) und PA6 (D) bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. Oben rechts ist jeweils der Verlauf der bei 4 % gemessenen initialen Spannung  $\sigma_0$  aufgetragen.**

Als Maß für das Relaxationsverhalten wurde der relative Spannungsabfall bei statischer Dehnung von 4 % über den Zeitraum von 50 s berechnet (Tabelle 12). Während unbehandelte eADF4(C16)-Garne bei höherer Luftfeuchtigkeit eine tendenziell stärkere Relaxation zeigten, konnte bei behandelten eADF4(C16)-, sowie PCL und PA6-Garnen kein eindeutiger Effekt beobachtet werden. Allgemein lässt sich sagen, dass die eADF4(C16)-Proben eine mehr als doppelt so ausgeprägte relative Relaxation aufweisen als die Polymerproben.

**Tabelle 12: Mittlerer relativer Spannungsabfall von Garnen aus unbehandeltem und behandeltem eADF4(C16), PCL und PA6 bei unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit und Relaxation über 50 s (gemittelte Werte der Lastzyklen 1-3).**

	$\Delta\sigma_{C16}(\%)$	$\Delta\sigma_{C16, beh.}(\%)$	$\Delta\sigma_{PCL}(\%)$	$\Delta\sigma_{PA6}(\%)$
<b>30 % r.H.</b>	56,7 ± 2,6	54,7 ± 2,2	22,2 ± 0,5	26,9 ± 2,2
<b>60 % r.H.</b>	66,4 ± 3,7	50,8 ± 2,2	19,6 ± 0,5	21,9 ± 1,5
<b>80 % r.H.</b>	64,2 ± 6,8	50,3 ± 2,7	23,1 ± 1,1	26,1 ± 1,4

### 3.3.6 Superkontraktionsverhalten von Protein-/Polymer-Garnen und natürlicher Seide

Von Spinnenseide ist bekannt, dass sie unter bestimmten Bedingungen durch Feuchtigkeitsaufnahme superkontrahieren kann.<sup>[230-232]</sup> In den folgenden Versuchen wurde zunächst das Superkontraktionsverhalten der *Dragline*-Seide von *A. diadematus* experimentell nachgewiesen und anschließend unter denselben Bedingungen eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garne im unbehandelten und behandelten Zustand gemessen. Für den Versuch wurden ausschließlich Proben verwendet, die nach ihrer Herstellung bei einer Luftfeuchtigkeit von 30 % r.H. gelagert wurden. Die Proben wurden in der Zugmaschine fixiert und bis zum ersten messbaren Spannungsanstieg deformiert. Dieser Zustand wurde gehalten und die Luftfeuchtigkeit wurde zyklisch erhöht und wieder reduziert, wobei die Spannungsreaktion der Proben gemessen wurde. Die maximalen Befeuchtungs- und Trocknungsraten lagen im Bereich von ca. 1,6 % r.H./s. Dabei war insbesondere die initiale Erhöhung der Luftfeuchtigkeit von Interesse, da in dieser Phase die Superkontraktion zu erwarten war.

Beim natürlichen Seidenfaden wurde eine starke mechanische Reaktion des Materials auf die Luftfeuchtigkeitsänderungen registriert (Abbildung 58, A). Wie bei den Zugmessungen in Kapitel 3.3.2 wurde auch hier das Doppelfilament der *Dragline* gemessen. Gemäß der Erwartung fand bei der ersten Feuchtigkeitszufuhr ab ca. 60 % r.H. ein Spannungsanstieg statt, der auf die mechanisch

inhibierte Superkontraktion der Faser zurückzuführen war (Abbildung 58, B). Im darauffolgenden Verlauf der Messungen kam es durch Senkung der Luftfeuchtigkeit zur Kontraktion, während sich der Faden durch Feuchtigkeitzufuhr entspannte. Insgesamt sank das Spannungsniveau im Laufe der Be- und Entfeuchtungszyklen.

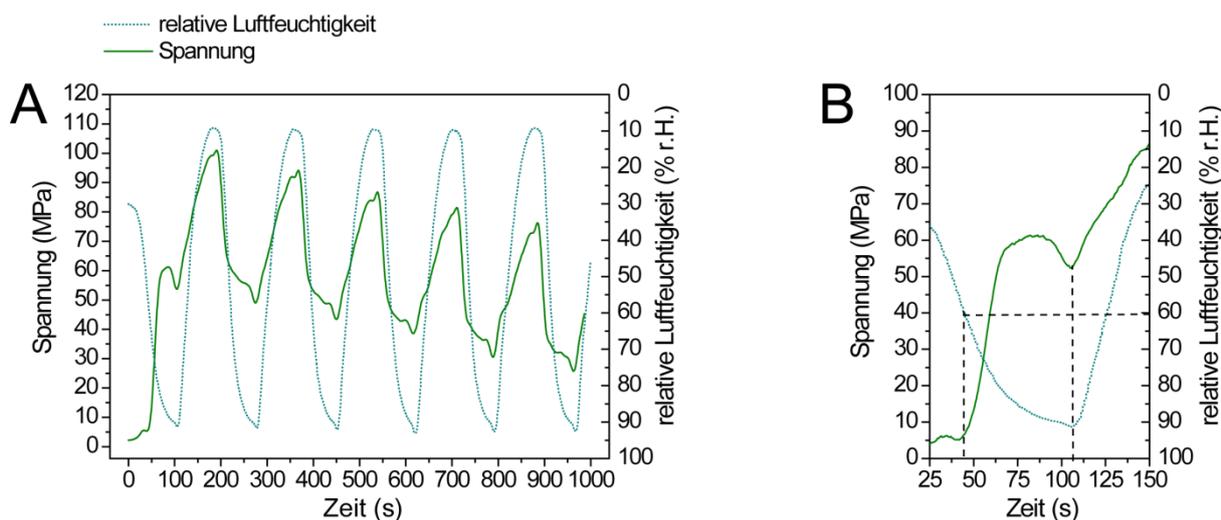
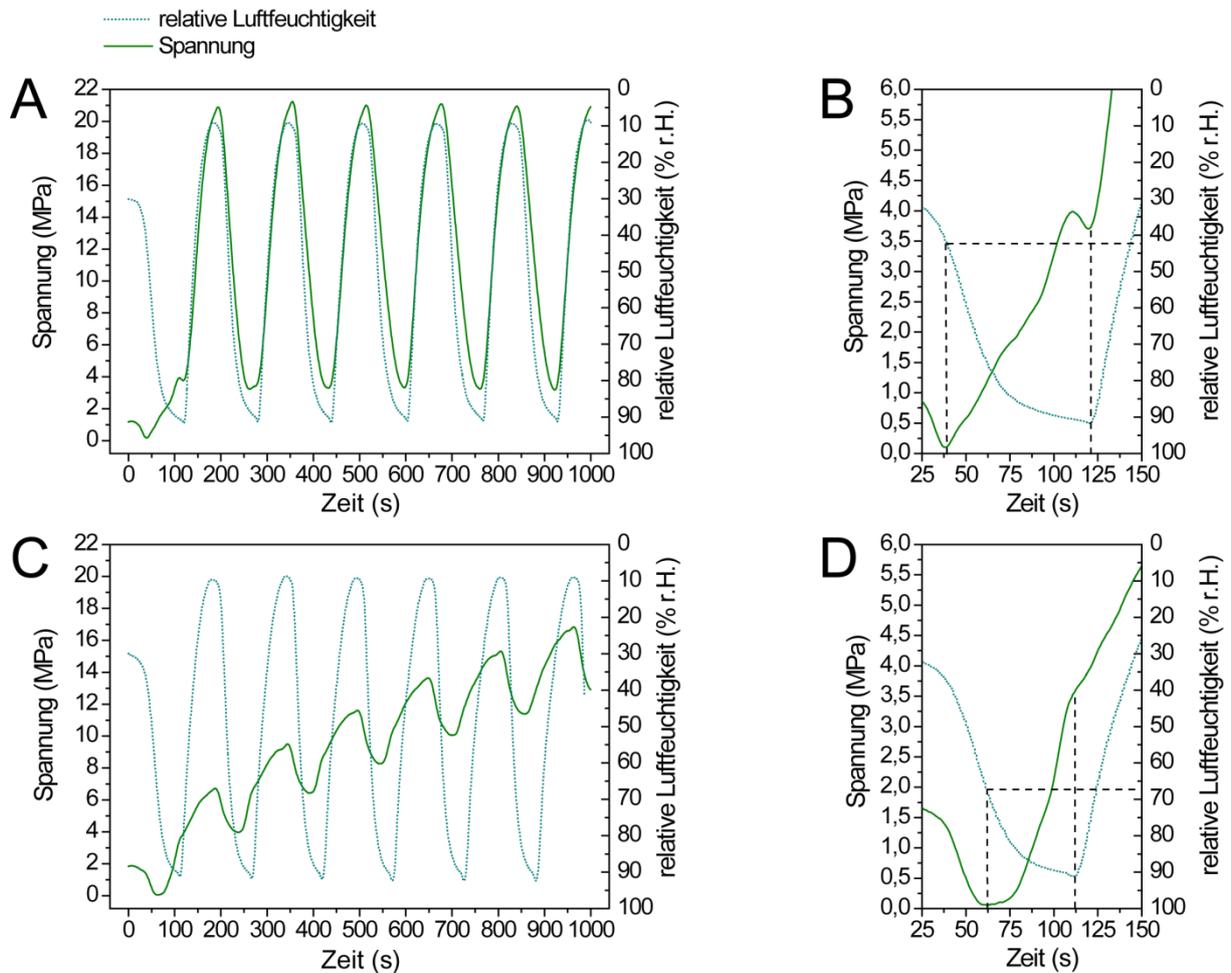


Abbildung 58: Spannungsverlauf der *Dragline*-Seide von *A. diadematus* bei statischer Dehnung und zyklischer Variation der relativen Luftfeuchtigkeit (A), sowie Detailansicht des Spannungsverlaufs bei erstmaliger Feuchtigkeitzufuhr (B).

Nachdem gezeigt wurde, dass sich der experimentelle Aufbau zum Nachweis der charakteristischen Superkontraktion eignet, wurden analog Experimente mit eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Garnen durchgeführt. Die mechanische Reaktion unbehandelter eADF4(C16)-Garne stand makroskopisch betrachtet in sehr guter umgekehrter Korrelation zur Änderung der relativen Luftfeuchtigkeit (Abbildung 59, A), wobei die Zu- und Abnahme der Spannung im zyklischen Verlauf konstant blieb. Die Ausnahme bildete der initiale Zyklus, bei dem es unter Feuchtigkeitzufuhr ab ca. 42 % r.H. zu einer Spannungszunahme kam, die in Analogie zur gemessenen Superkontraktion der natürlichen Seide steht (Abbildung 59, B). Nachbehandelte eADF4(C16)-Garne hingegen zeigten ein davon deutlich abweichendes Verhalten (Abbildung 59, C). Zwar kam es auch hier generell beim Trocknen zur Kontraktion und beim Befeuchten zur Entspannung, jedoch war die Spannungszunahme nicht vollständig reversibel, so dass es zu einem Ansteigen des Spannungsniveaus im Laufe der Messungen kam. In Hinsicht auf die Superkontraktion fand zwar auch hier zu Beginn eine Spannungszunahme mit zunehmender Luftfeuchtigkeit statt, wobei jedoch im Gegensatz zu unbehandelten eADF4-Garnen, beim Erreichen der maximalen Luftfeuchtigkeit keine Relaxationsphase auftrat.



**Abbildung 59: Spannungsverlauf von unbehandeltem (A) und behandeltem (C) eADF4(C16)-Garn bei statischer Dehnung und zyklischer Variation der relativen Luftfeuchtigkeit, sowie Detailsicht des Spannungsverlaufs von unbehandeltem (B) und behandeltem (D) eADF4(C16)-Garn bei erstmaliger Feuchtigkeitszufuhr.**

Um einen eventuellen Einfluss der carboxyterminalen Domäne auf das Superkontraktionsverhalten zu untersuchen, wurden ebenfalls Experimente mit eADF4(C32NR4) durchgeführt (Abbildung 60). Die Spannungsprofile dieser Messungen weisen ein hohes Maß an Übereinstimmung mit den Kurven von eADF4(C16)-Garnen auf. In unbehandeltem Zustand verhielt sich der Spannungsverlauf nahezu invers proportional zur Luftfeuchtigkeitsänderung (Abbildung 60, A) und das charakteristische lokale Spannungsmaximum der Superkontraktion (ab ca. 55 % r.H.) trat hier ebenfalls bei erstmaliger Befeuchtung auf (Abbildung 60, B). Auch bei eADF4(C32NR4)-Garnen hatte die Nachbehandlung mit Ethanol den Effekt der Spannungszunahme während des Messverlaufs (Abbildung 60, C). Bei initialer Befeuchtung kam es zu einem Spannungsanstieg (ab ca. 65 % r.H.), der jedoch wie bei eADF4(C16) nahezu übergangslos in die trocknungsbedingte Spannungszunahme übergang (Abbildung 60, D).

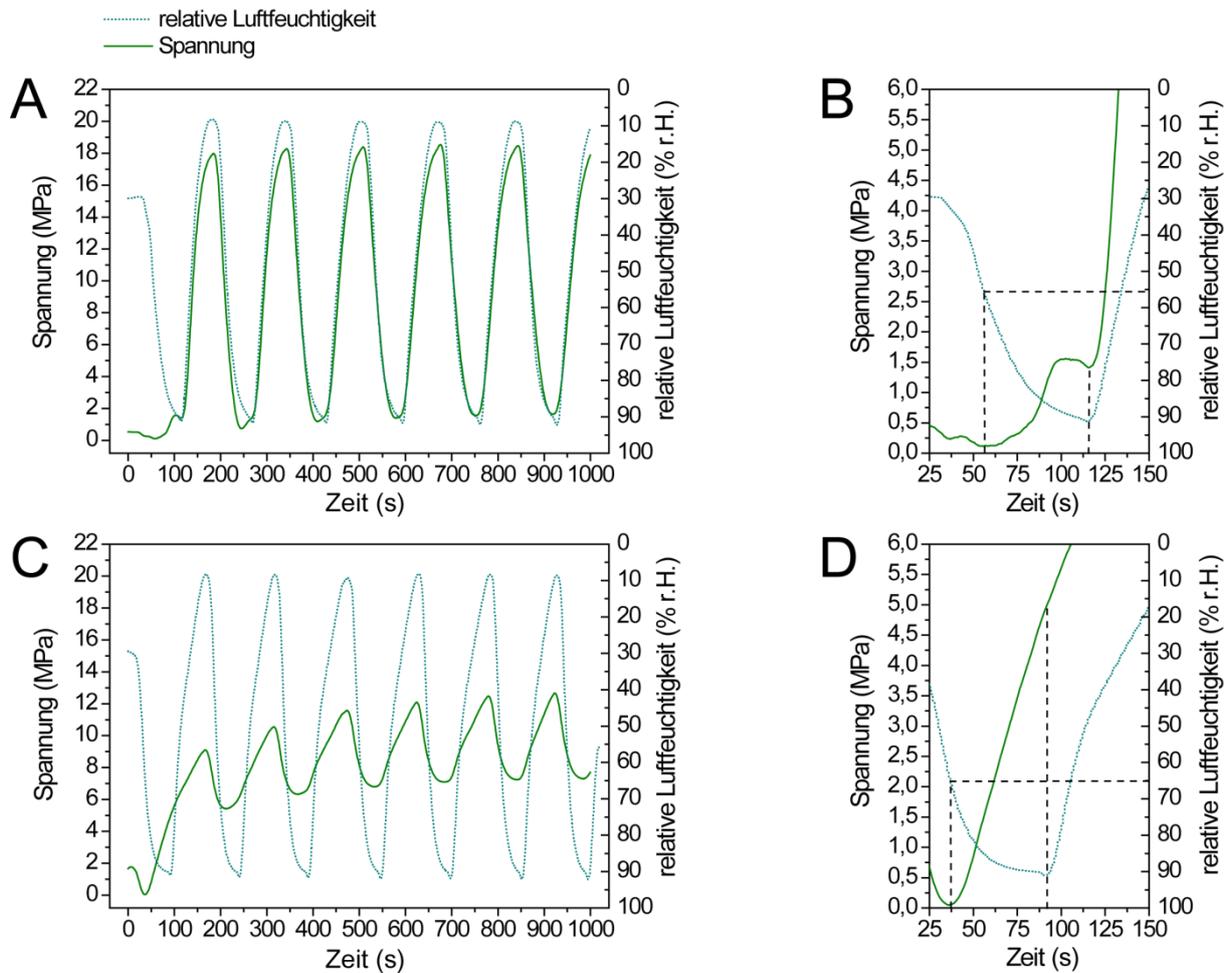


Abbildung 60: Spannungsverlauf von unbehandeltem (A) und behandeltem (C) eADF4(C32NR4)-Garn bei statischer Dehnung und zyklischer Variation der relativen Luftfeuchtigkeit, sowie Detailansicht des Spannungsverlaufs von unbehandeltem (B) und behandeltem (D) eADF4(C32NR4)-Garn bei erstmaliger Feuchtigkeitszufuhr.

Um Rückschlüsse auf eventuelle hygroscopische Effekte der spezifischen morphologischen Beschaffenheit der Garne ziehen zu können, wurden ergänzend Messungen mit PCL- und PA6-Garnen durchgeführt (Abbildung 61). Bei Betrachtung der Spannungsprofile von PCL bestätigte sich das Ergebnis vorhergegangener mechanischer Prüfverfahren, da auch hier nur ein geringer Einfluss der Luftfeuchtigkeit registriert werden konnte. Zwar kam es ebenfalls zu einer inversen Spannungsreaktion auf Luftfeuchtigkeitsänderungen und einer irreversiblen Zunahme des Spannungsniveaus, diese fiel jedoch vergleichsweise gering aus (Abbildung 61, A). Die initiale Feuchtigkeitszufuhr führte nur zu einer Spannungszunahme im unteren messbaren Bereich (Abbildung 61, B). Bei PA6 konnte wiederum eine deutliche mechanische Reaktion auf die Variation der relativen Luftfeuchtigkeit gemessen werden (Abbildung 61, C). Dabei kam es bei erstmaliger Feuchtigkeitszufuhr zu einer irreversiblen Spannungszunahme (Abbildung 61, D). Auffällig war hierbei, dass die Probe bei Überschreiten einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 - 60 % r.H. nur noch

unwesentlich relaxierte, was mit den experimentellen Beobachtungen der dynamischen Zugversuche aus Kapitel 3.3.5 in Übereinstimmung steht.

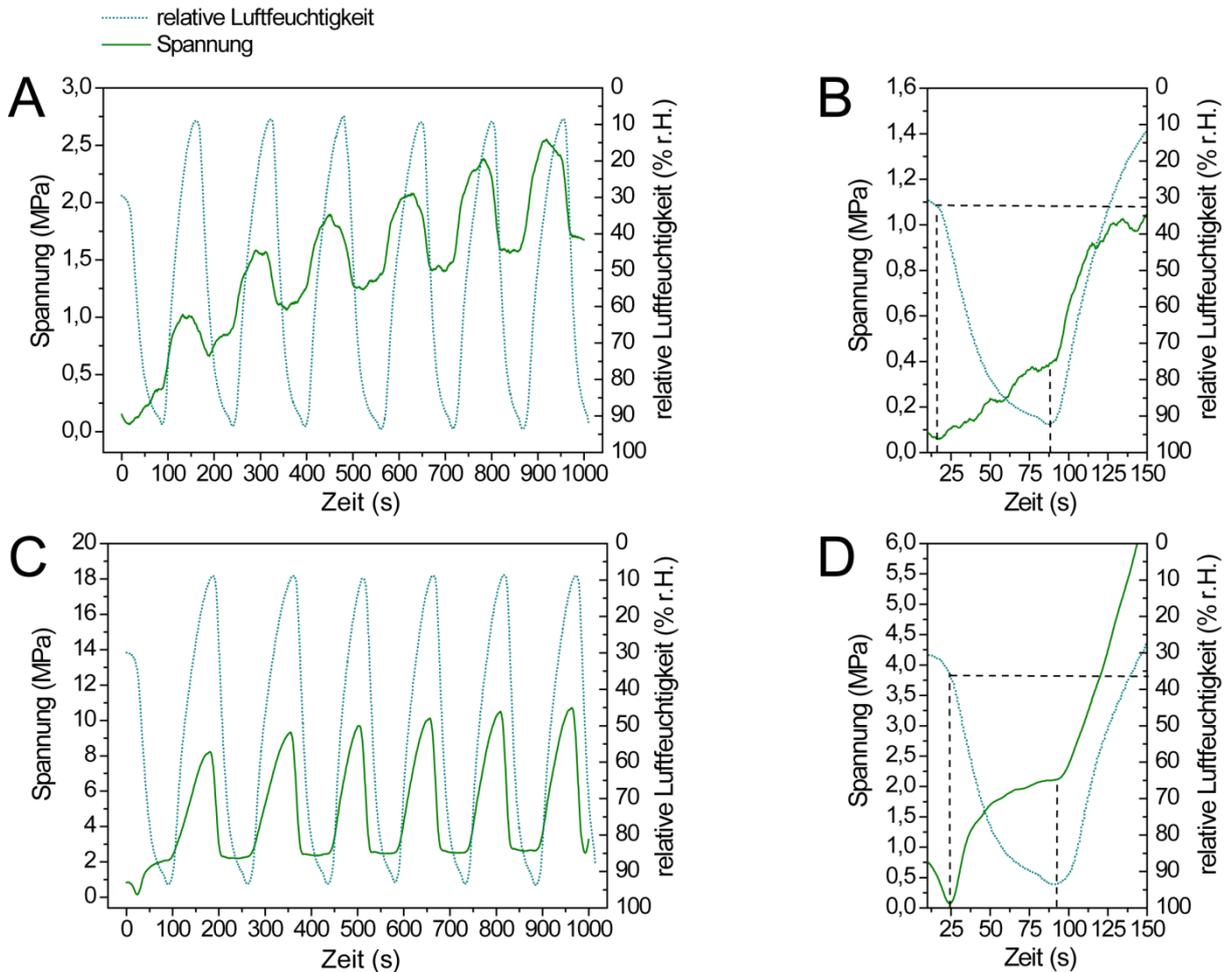


Abbildung 61: Spannungsverlauf von PCL- (A) und PA6-Garn (C) bei statischer Dehnung und zyklischer Variation der relativen Luftfeuchtigkeit, sowie Detailansicht des Spannungsverlaufs von PCL- (B) und PA6-Garn (D) bei erstmaliger Feuchtigkeitszufuhr.

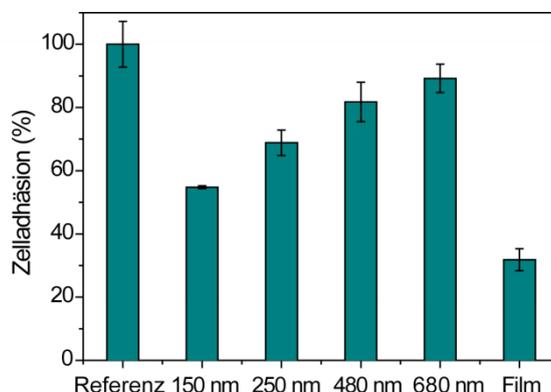
### 3.4 Anwendungen elektrostatisch gesponnener Spinnenseidenvliese

Im bisherigen Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt primär auf der Prozessetablierung und der Charakterisierung der resultierenden Fasern. Es konnte gezeigt werden, dass sich die rekombinanten Seidenproteine eADF4(C16) und eADF4(C32NR4) in vergleichbarer Weise wie die Beispielpolymere PCL und PA6 zu Fasern mit Durchmessern im Submikro- bis Nanometerbereich verspinnen lassen. Was die Proteine für Anwendungen attraktiv macht ist vor allem ihre Biokompatibilität. Im Folgenden wurde die Eignung von eADF4(C16)-Vliesen im Bereich der Medizintechnik (z.B. für die Geweberekonstruktion) sowie für technischen Anwendungen im Bereich der Filtration untersucht.

### 3.4.1 Medizintechnische Anwendung von Spinnseidenproteinvliesen

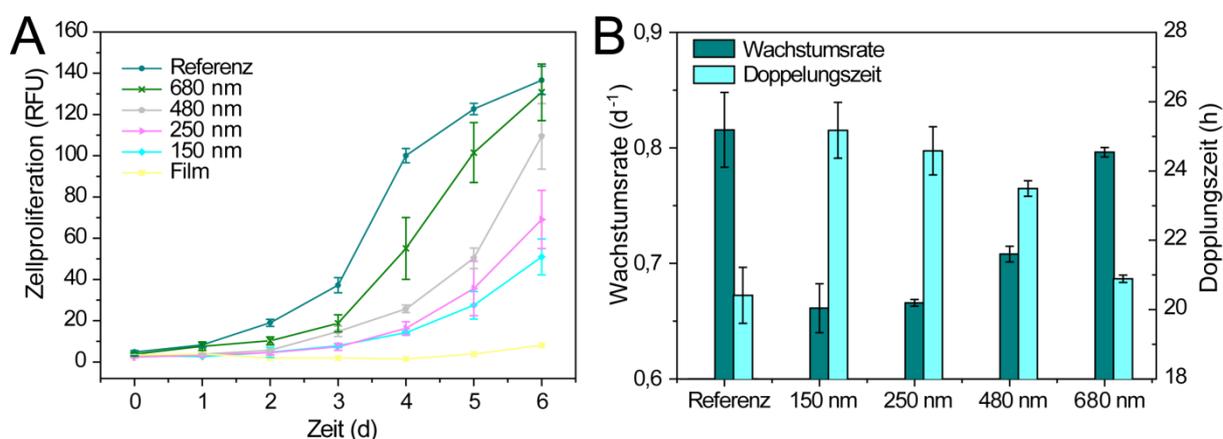
Das Wachstumsverhalten von Fibroblasten (BALB/3T3 Mausfibroblasten) wurde auf elektrostatisch gesponnenen eADF4(C16)-Vliesen bei Variation der Faserdurchmesser untersucht (Nachbehandlung erfolgte wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben) und die Ergebnisse wurden in *Advanced Biomaterials* veröffentlicht.<sup>[228]</sup> Als Referenz wurden Fibroblasten auf behandelten Zellkulturplatten angezogen, die eine sehr gute Adhäsionsgrundlage bieten. Um den morphologischen Einfluss von eADF4(C16)-Oberflächen auf die Zelladhäsion beurteilen zu können, wurden zudem Parallelansätze mit glatten Filmen durchgeführt, die aus 3 % w/v eADF4(C16) in HFIP gegossen wurden. Die Zelladhäsion- und Proliferation wurde durch Zugabe von 10 % v/v CellTiter-Blue ins Nährmedium quantitativ bestimmt. CellTiter-Blue enthält Resazurin, welches nicht fluoresziert und von vitalen Fibroblasten zu fluoreszierendem Resorufin metabolisiert wird. Anhand der Fluoreszenzintensität kann die Anzahl lebender Fibroblasten relativ zu einer Referenz (hier: behandelte Zellkulturplatten) quantifiziert werden.

Beim Adhäsionsversuch wurde die Kultur zunächst für 4 Stunden angezogen und dann, nach Zugabe von CellTiter-Blue, weitere 2,5 Stunden inkubiert. Da Zellen die nicht adhären innerhalb weniger Stunden sterben, wurde angenommen, dass bei den anschließenden Fluoreszenzmessungen nur Resorufin gemessen wurden, welches auf den Stoffwechsel adhärenter Fibroblasten zurückzuführen war. Somit konnte das Adhäsionsverhalten untersucht werden, wobei ein signifikanter Einfluss der Vliesmorphologie auf die Zelladhäsion registriert wurde (Abbildung 62). Dickere Fasern erwiesen sich im Vergleich zu dünneren als bessere Adhäsionsgrundlage, während die Fibroblasten am schlechtesten auf glatten Filmen adhärten.



**Abbildung 62:** Zelladhäsion von Fibroblasten auf eADF4(C16)-Vliesen mit unterschiedlichen Faserdurchmessern (wie angezeigt), sowie zum Vergleich auf eADF4(C16)-Filmen. Als Referenz wurde eine behandelte Zellkulturplatte verwendet und die Adhäsion darauf als 100 % definiert. Alle Werte wurden aus jeweils 4 Ansätzen gemittelt.

Der Proliferationsversuch erfolgte analog zum Adhäsionsversuch unter Verwendung von CellTiter-Blue zur Quantifizierung vitaler Fibroblasten. Dabei wurden über einen Inkubationszeitraum von 6 Tagen einmal täglich Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Bei Betrachtung der Wachstumskurven (Abbildung 63, A) ist ein deutlicher Einfluss der Faserdurchmesser auf das Proliferationsverhalten erkennbar. Die Fibroblasten vermehrten sich auf Vliesen mit dünneren Fasern langsamer als auf Vliesen mit dicken Fasern, wohingegen die Zellproliferation auf Filmen deutlich schlechter war. Die beste Wachstumsgrundlage boten die behandelten Zellkulturplatten (als Referenz gekennzeichnet). Aus dem exponentiellen Bereich der Proliferationskurven wurden nach dem kinetischen Modell von Monod (Kapitel 2.2.7.3) die Wachstumsraten und Doppelungszeiten berechnet (Abbildung 63, B).<sup>[228]</sup>

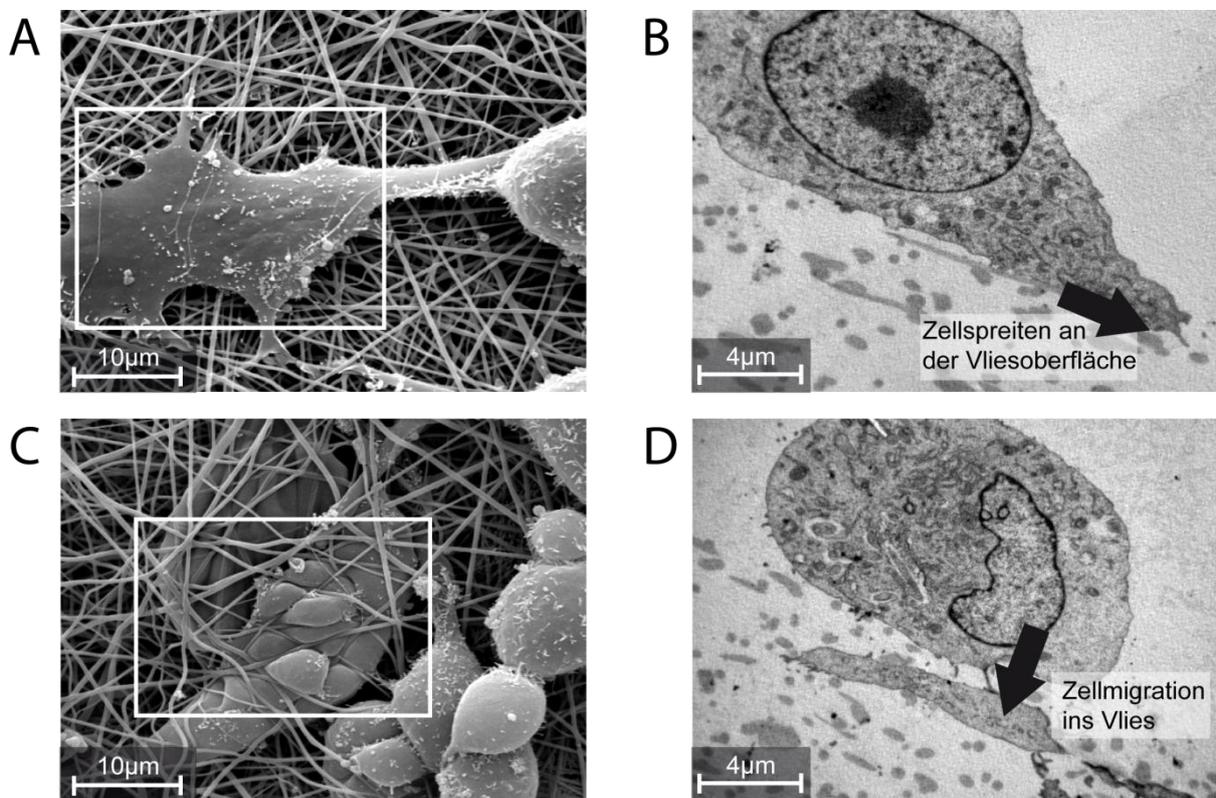


**Abbildung 63:** Wachstumskurven von Fibroblasten auf eADF4(C16)-Vliesen mit unterschiedlichen Faserdurchmessern (wie angezeigt), sowie zum Vergleich auf eADF4(C16)-Filmen (A) (die Werte wurden aus jeweils 4 Ansätzen gemittelt). Aus dem exponentiellen Bereich der Wachstumskurven wurde jeweils die Wachstumsrate und Doppelungszeit errechnet (B). Aufgrund des geringen Wachstums auf Filmen konnte hier keine Wachstumsrate/Doppelungszeit ermittelt werden.

Das exponentielle Wachstum fand bei der Referenz zwischen Tag 1 und Tag 4 statt, wohingegen bei Vliesen das Wachstum zwischen Tag 2 und Tag 5 als exponentieller Bereich herangezogen wurde. Unter Berücksichtigung der zeitlichen Verzögerung, die für eine längere Adaptionsphase der Zellen steht, konnte gezeigt werden, dass durch Einsatz von Vliesen mit Faserdurchmessern um 680 nm ähnlich gute Proliferationsbedingungen geschaffen wurden, wie bei der Positivkontrolle (Referenz). Vliese mit dünnen Fasern (150 nm, 250 nm) wiesen hingegen deutlich niedrigere Wachstumsraten auf. Die Doppelungszeit wurde aus den Wachstumsraten berechnet und verhält sich reziprok proportional.

Da Zelladhäsion die Voraussetzung für die Proliferation der Fibroblasten darstellt, war davon auszugehen, dass die Ursache des durchmesserabhängigen Wachstumsverhaltens in den Adhäsionsmechanismen der Zellen lag. Anhand von REM- und TEM-Aufnahmen adhärenter

Fibroblasten wurden zwei Adhäsionsstrategien beobachtet (Abbildung 64). Zum einen war zu sehen, dass Zellen unter Einsatz von Filopodien und Lamellipodien an den Vliesoberflächen adhärten und spreiteten (Abbildung 64, A, B). Dieses Verhalten wurde auch auf der glatten Oberfläche der behandelten Zellkulturplatten gesehen. Zum anderen kam es zur Zellmigration in die Vliese. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zeigt Zellen, die unter Fasern liegen und somit physikalisch verankert sind (Abbildung 64, C). Die Beobachtung konnte im Querschnitt der TEM-Untersuchungen bestätigt werden. Hierbei war deutlich zu sehen, dass Teile der Zellen unter den oberen Faserschichten lagen (Abbildung 64, D). Da die Faserzwischenräume bei Vliesen mit dickeren Fasern größer waren, wurde die Zellmigration hier begünstigt.



**Abbildung 64:** Adhäsionsmechanismen von Fibroblasten auf eADF4(C16)-Vliesen (Faserdurchmesser ca. 480 nm): Zellspreiten durch Oberflächenadhäsion von Filopodien/Lamellipodien (REM: A, TEM: B), Physikalische Verankerung durch Migration ins Vlies (REM: C, TEM: D).

Es konnte also gezeigt werden, dass sich die Morphologie bei der Kultivierung von Fibroblasten auf eADF4(C16)-Oberflächen als gutes Mittel zur Kontrolle über die Wachstumsrate eignet. Obgleich eADF4(C16)-Filme eine schlechte Adhäsions- und Proliferationsgrundlage bieten, so können dennoch elektrostatisch gesponnene eADF4-Fasern eingesetzt werden, um bessere Wachstumsgrundlagen bereitzustellen.

### 3.4.2 Technische Anwendung von Spinnseidenproteinvliesen in der Filtration

Da beim elektrostatischen Spinnen im Vergleich zu anderen Spinnverfahren sehr dünne Fasern generiert werden können, ist es eine potentielle Methode zu Herstellung von beispielsweise Feinstaubfiltern (Partikelgröße: 300 nm - 10  $\mu\text{m}$ ). Um die Eignung von eADF4(C16)-Vliesen für solche Anwendungen zu untersuchen, wurden in Kooperation mit BSH (Bosch und Siemens Hausgeräte GmbH) kommerziell erhältliche Polyamidgewebe (PA-Gewebe) als mechanisch stabiles Grundgerüst direkt mit eADF4(C16)-Fasern (Durchmesser: ca. 120 nm) besponnen (Abbildung 65, A). Um große homogene Flächen zu spinnen wurde der X-Y-Plotter der Anlage verwendet, wobei der Spinnkopf mit einer definierten Fahrgeschwindigkeit über ein vorprogrammiertes Raster bewegt wurde. Die Vliese wurden anschließend, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, nachbehandelt. Die Vliesbelegung wurde über die Fahrgeschwindigkeit des Spinnkopfes eingestellt, wobei anhand der Flussrate und der gesamten besponnenen Fläche eine mittlere eADF4(C16)-Belegung von 43  $\text{mg}/\text{m}^2$  bei einer Fahrgeschwindigkeit 1,3 mm/s und 130  $\text{mg}/\text{m}^2$  bei 4 mm/s berechnet wurde. Die Zunahme der Vliesdicke mit der errechneten Belegung ist beim Vergleich der REM-Aufnahmen von PA-Geweben, die mit 43  $\text{mg}/\text{m}^2$  (Abbildung 65, B) und 130  $\text{mg}/\text{m}^2$  (Abbildung 65, C) besponnen wurden, deutlich zu erkennen. Außerdem ist zu sehen, dass die Fasern nicht einfach auf dem PA-Gitter aufliegen, sondern vermutlich aufgrund der Nachbehandlung an den Erhöhungen der Maschen mit dem Gewebe verschmolzen sind.

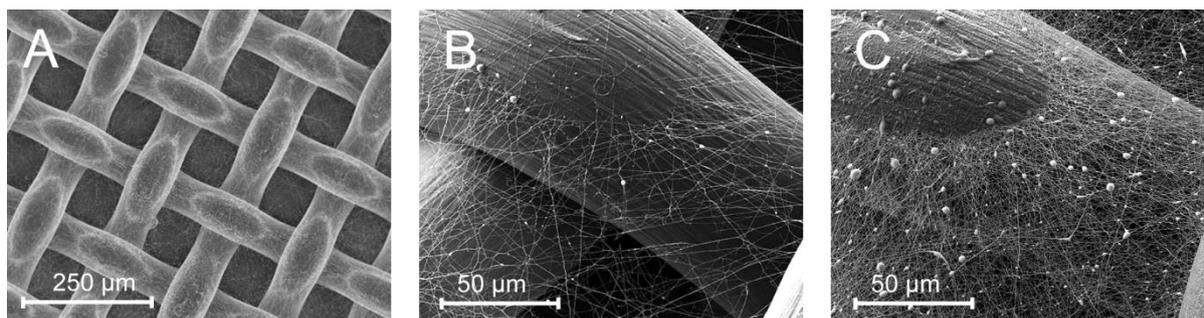
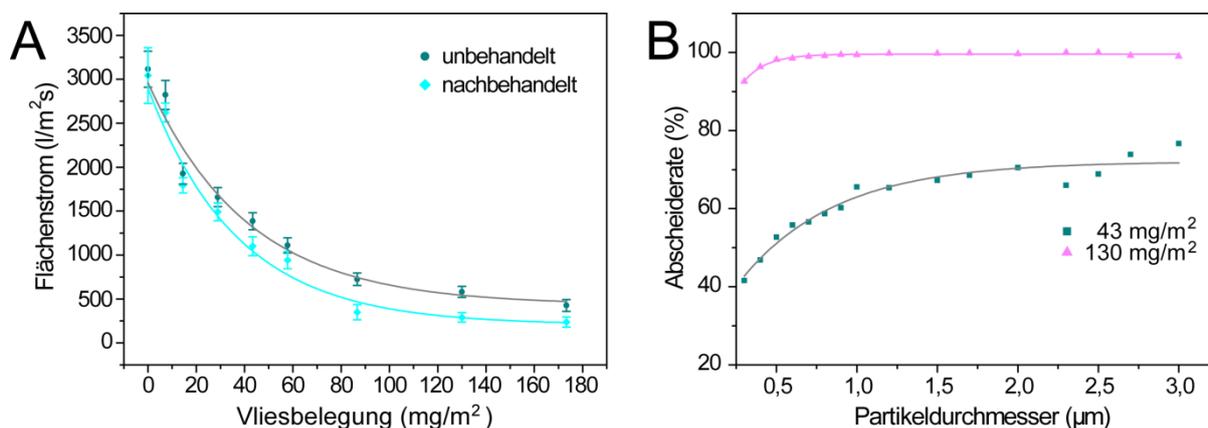


Abbildung 65: Besponnenes PA-Gewebe (A), Detailansicht von Polyamidgewebe bei einer eADF4(C16)-Vliesbelegung von 43  $\text{mg}/\text{m}^2$  (B) und 130  $\text{mg}/\text{m}^2$  (C) (in beiden Fällen nach der Ethanolbehandlung).

Der Einfluss der Vliesbelegung auf die Luftdurchlässigkeit der Filter wurde nach ISO 9237 Standard untersucht. Dabei wurde der Flächenstrom bei einem Differenzdruck von 200 Pa in Abhängigkeit der eADF4-Vliesbelegung gemessen (Abbildung 66, A). Es wurden sowohl unbehandelte als auch Ethanol-behandelte Vliese analysiert. Aus den Graphen geht hervor, dass der Flächenstrom mit

zunehmender Belegung exponentiell abnimmt, wobei die Nachbehandlung die Luftdurchlässigkeit nur geringfügig senkt. In einem weiteren Prüfverfahren, das vom Projektpartner Mann & Hummel durchgeführt wurde, konnte die Abscheiderate von Di-Ethyl-Hexyl-Sebacat Aerosol-Partikeln (0,3 – 3  $\mu\text{m}$ ) gemessen werden (Abbildung 66, B). Die Maschenweite des PA-Gewebes beträgt ca. 90  $\mu\text{m}$  und ist somit ungeeignet für die Filtration der feinen Partikel. Durch Belegung des Gewebes mit 43  $\text{mg}/\text{m}^2$  eADF4(C16)-Fasern wurden Abscheideraten von ca. 40 % für Partikel der Größe 0,3  $\mu\text{m}$  und ca. 70 % für Partikel der Größe 3  $\mu\text{m}$  erreicht. Vliese, die ca. dreimal so stark mit eADF4-Fasern belegt waren (130  $\text{mg}/\text{m}^2$ ), hatten Abscheideraten von ca. 90 % für Partikel der Größe 0,3  $\mu\text{m}$  und ca. 99 % für Partikel der Größe 3  $\mu\text{m}$ . Die Enddruckdifferenz  $\Delta P$  betrug bei geringer Vliesbelegung (43  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) vor der Filtration 67 Pa und nach der Filtration 74 Pa sowie bei relativ dichter Belegung (130  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) vor der Filtration 264 Pa und nach der Filtration 281 Pa.

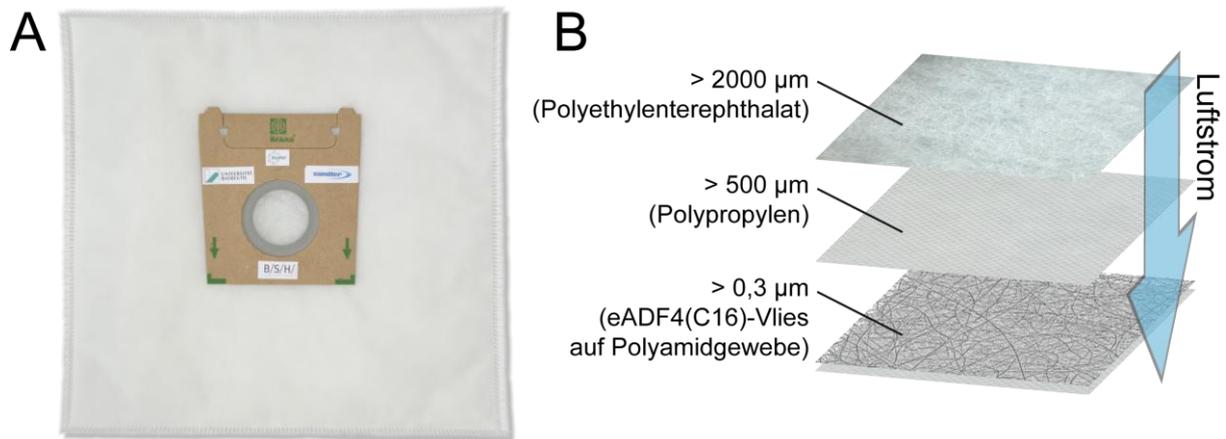


**Abbildung 66:** Ergebnisse der Filteranalytik von elektrostatisch gesponnenen eADF4(C16)-Vliesen (Faserdurchmesser ca. 120 nm) auf Polyamidgewebe: Luftdurchlässigkeit (Flächenstrom) in Abhängigkeit der Vliesbelegung (A). Abscheiderate von Di-Ethyl-Hexyl-Sebacat Aerosol-Partikeln (0,3  $\mu\text{m}$  – 3  $\mu\text{m}$ ) bei einer Vliesbelegung von 43  $\text{mg}/\text{m}^2$  und 130  $\text{mg}/\text{m}^2$  (B).

Anhand der Messungen konnte aufgeführt werden, dass durch geringen Materialaufwand von eADF4(C16) (130  $\text{mg}/\text{m}^2$ ) bereits Vliese mit hohen Abscheideraten hergestellt wurden, wobei das PA-Gewebe primär als mechanisch stabiles Substrat fungierte. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in *JoVE (Journal of Visual Experiments)* publiziert<sup>[67]</sup> und darauf aufbauend in Zusammenarbeit mit BSH und der Firma Sandler AG der Prototyp eines Staubsaugerbeutels hergestellt (Abbildung 67).

Der Staubsaugerbeutel ist so aufgebaut, dass zunächst große Partikel (> 2000  $\mu\text{m}$ ) in einem Stapelvlies aus schmelzgeblasenem Polyethylenterephthalat (PET) abgeschieden werden. Es folgt ein schmelzgeblasenes PP-Spinnvlies, welches Partikel herausfiltert, die größer sind als 500  $\mu\text{m}$ . Die

beiden PP-Vliese wurden von der Sandler AG zur Verfügung gestellt. Auf der letzten Schicht werden Feinpartikel ( $> 0,3 \mu\text{m}$ ) abgeschieden. Für diese Schicht wurden die, im Rahmen der Arbeit entwickelten, eADF4(C16)-Vliese auf PA-Gewebe eingesetzt. Die verschiedenen Schichten wurden vom Kooperationspartner BSH nach den gängigen Standards konfektioniert und durch Ultraschallschweißen zu einem Beutel verbunden. Somit konnte erstmalig unter Verwendung von eADF4(C16) ein marktfertiges Filterprodukt hergestellt werden.



**Abbildung 67: Prototyp eines Staubsaugerbeutels (A): Der Beutel ist aus mehreren Schichten mit unterschiedlichen Abscheideraten aufgebaut (B).**

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines Prozesses zum elektrostatischen Spinnen

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Konstruktion wurde eine Anlage zum Verspinnen rekombinanter Spinnenseidenproteinlösungen gebaut. Die Grundlage bei der Erstellung des Anforderungsprofils bildeten Erfahrungen, die beim Betrieb einer vereinfachten Vorgängeranlage gesammelt wurden, sowie themenverwandte Veröffentlichungen anderer Gruppen.

#### 4.1.1 Umgebungsbedingungen beim elektrostatischen Spinnen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die rekombinanten Spinnenseidenproteine eADF4(C16) und eADF4(C32NR4) versponnen, die aus derselben repetitiven Aminosäuresequenz aufgebaut sind und sich lediglich durch ihr Molekulargewicht und die Anwesenheit einer carboxyterminalen Domäne unterscheiden. Im Zuge experimenteller Vorversuche zu dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die Faserdurchmesser trotz gleicher Spinnlösung und identischen Spinnparametern von Experiment zu Experiment variierten. Als mögliche Ursache wurden Veränderungen der relativen Luftfeuchtigkeit in Betracht gezogen. Nezarati et al.<sup>[233]</sup> untersuchten anhand von Polyethylenglycol (PEG), Polycaprolacton (PCL) und Polycarbonateurethan (PCU) den Einfluss der relativen Luftfeuchtigkeit auf die Fasermorphologie beim elektrostatischen Spinnen. Es wurde gezeigt, dass es bei niedriger Luftfeuchtigkeit (< 50 % r.H.) aufgrund verringerter elektrostatischer Entladung zum Faserbruch kommen kann, wohingegen bei hoher Luftfeuchtigkeit (> 50 % r.H.) materialspezifische Effekte auftraten. Beim hydrophilen PEG kam es durch Wasseraufnahme zum Faserbruch und Verlust der Fasermorphologie. PCL hingegen wies nach dem Verspinnen Poren auf, die auf eine dampfinduzierte Phasenseparation zurückzuführen sind. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch beim elektrostatischen Verspinnen von Polystyrol (PS) gemacht.<sup>[234]</sup> In anderen Publikationen wurde hingegen eine Abnahme der Faserdurchmesser bei steigender Luftfeuchtigkeit beschrieben.<sup>[182,235]</sup> Nezarati et al.<sup>[233]</sup> folgerten, dass der Einfluss der Luftfeuchtigkeit sowohl auf die Hydrophobizität der Polymere, als auch auf die Mischbarkeit des Lösungsmittels mit Wasser, sowie dessen Flüchtigkeit zurückzuführen ist. Die Mischbarkeit mit Wasser wurde als Indikation für die Wasseraffinität des Lösungsmittels bei hoher Luftfeuchtigkeit betrachtet. In dieser Arbeit wurde HFIP als Lösungsmittel verwendet, welches aufgrund seiner polaren Eigenschaften ein hohes Maß an Löslichkeit in Wasser aufweist, da seine hydrophilen Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken mit den umgebenden Wassermolekülen ausbilden.<sup>[236]</sup> Daraus lässt sich schließen, dass HFIP bei hoher Luftfeuchtigkeit

schnell Wasser absorbiert, was wiederum die Flüchtigkeit reduziert und somit den Spinnprozess beeinträchtigt, zumal der Trocknungsvorgang verlangsamt wird. Folglich wird der Lösungsstrahl länger im elektrischen Feld gedehnt und die Faser wird dünner. Mit dem Verdampfen des Lösungsmittels nimmt im weiteren Verlauf der Faserbildung der Einfluss der Polymer-, bzw. Proteineigenschaften zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eADF4(C16) versponnen, für das bereits gezeigt wurde, dass es nach der Verarbeitung aus HFIP hydrophile Eigenschaften aufweist.<sup>[52]</sup> Aufgrund ihrer hydrophilen Peptidbindungen, haben eADF4-Proteine eine starke Affinität zur Luftfeuchtheitsaufnahme, was beim elektrostatischen Spinnen insbesondere aufgrund des großen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses der Fasern relevant ist. Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde geschlussfolgert, dass sich das hier verwendete Protein/Lösungsmittelsystem in hohem Maße feuchtigkeitssensitiv verhält. Bestätigt wird diese Annahme unter Einbezug von Beobachtungen, die beim elektrostatischen Spinnen anderer Seidenproteine gemacht wurden. Beim Verspinnen wässriger Lösungen aus *B. mori* Fibroin wurde beispielweise gezeigt, dass bei 60 % r.H. inhomogene Fasern mit sphärischen Ausprägungen hergestellt wurden, wohingegen eine Luftfeuchtigkeit von < 30% zu homogenen Fasern führte, da hierbei der Trocknungsvorgang beschleunigt wurde.<sup>[237]</sup> Mit dem Einbau einer Luftfeuchtigkeitsregelung wurde folglich eine Grundvoraussetzung für die Reproduzierbarkeit des Prozesses erfüllt. Im Gegensatz zu den wässrigen *B. mori* Fibroin Lösungen musste die Verdampfungsgeschwindigkeit beim Verspinnen von eADF4-Proteinen aus HFIP nicht beschleunigt, sondern verlangsamt werden, um zu schnelles Austrocknen an der Kanülenöffnung zu verhindern. Es wurde daher im Folgenden bei einer Luftfeuchtigkeit von  $50 \pm 5$  % r.H. gesponnen, da unter diesen Bedingungen in Hinsicht auf die Homogenität der Fasern gut reproduzierbare Ergebnisse generiert werden konnten. Aufgrund der Klimatisierung des Labors auf 25 °C konnten Temperatureinflüsse vernachlässigt werden.

### 4.1.2 Einstellung des elektrischen Feldes beim elektrostatischen Spinnen

In Voraussicht auf potentielle Anwendungen sollten mit der Anlage zwei mögliche Spinnmodi realisiert werden - das Verspinnen von Vliesen sowie von ausgerichteten Fasern. Vliese konnten auf einfachem Weg durch Verwendung einer kontaktierten Metallplatte als Kollektor hergestellt werden, wohingegen für ausgerichtete Fasern ein rotierender Zylinder eingesetzt wurde. Die ersten Versuche wurden diesbezüglich mit einem einfachen Aufbau ohne Abschirmungen durchgeführt, wie er auch häufig in der Literatur beschrieben ist.<sup>[238-241]</sup> Trotz des schmalen Kontaktstreifens auf dem Zylinder legten sich die Fasern hierbei über die volle Breite des Zylinders ab, was in Hinsicht auf die beabsichtigte Bündelung der Fasern unerwünscht war. Zudem wurde ein Materialverlust von

über 20 % verzeichnet. Obgleich sich viele Publikationen mit der Parametrisierung des elektrostatischen Spinnprozesses beschäftigen, so bleibt die Problematik des prozessbedingten Materialverlusts meist unbehandelt. Theron et al.<sup>[242]</sup> verwendeten eine senkrecht zur Spinnrichtung rotierende Scheibe die, analog zum hier verwendeten Zylinder, als Kollektor für ausgerichtete Fasern eingesetzt wurde. Der Aufbau wurde von Weldon et al.<sup>[243]</sup> für die Herstellung von medizinischem Nahtmaterial übernommen, wobei bei hohen Drehzahlen der rotierenden Scheibe (Durchmesser: 28 cm, Drehzahl: 1200 rpm) ein signifikanter Materialverlust während des Spinnens verzeichnet, jedoch nicht quantifiziert wurde. Kim et al.<sup>[244]</sup> beobachteten dasselbe Problem und führten es auf Luftverwirbelungen zurück, die bei hoher Drehzahl auftreten und die dünnen Fasern von ihrer Flugbahn abbringen. Um das Problem zu beheben wurde in dieser Arbeit eine Verschalung über dem Zylinder angebracht, die aufgrund ihrer dielektrischen Eigenschaften die Faserdeposition auf einen kleineren Bereich reduzieren sollte. Dasselbe Prinzip wurde von Garrigues et al.<sup>[245]</sup> angewandt, um eine definierte Faserablagerung zu erzielen, jedoch wurden auch dort nicht die Materialverluste ermittelt. Durch Verschalung des Zylinders wurde das Problem der Luftverwirbelungen behoben und darüber hinaus noch ein positiver Effekt geschaffen, da an der Öffnung ein Luftsoog entstand, der die Faserablagerung auf dem Zylinder begünstigte. Dabei konnte zwar gezeigt werden, dass sich die Ablagefläche der Fasern auf einen engeren Bereich konzentrierte, jedoch wurde ein hoher Materialverlust von fast 90 % verzeichnet. Um die theoretischen Hintergründe der Faserablagerung besser zu verstehen wurden elektrostatische Feldsimulationen durchgeführt. Obgleich in der Literatur eine Simulation beschrieben ist, die neben dem elektrischen Feld auch die Vorgänge in der Faser selbst untersucht,<sup>[246]</sup> lag der Fokus bei den hier durchgeführten Simulationen rein auf der Modifikation des elektrostatischen Feldes, zumal dieses der beeinflussbare Parameter war. Anhand der Feldsimulationen wurde gezeigt, dass die Verschalung das elektrische Feld nur geringfügig beeinflusst und somit kaum zur gezielten Ablagerung auf dem Kollektorstreifen beiträgt. Eine Möglichkeit, um den Prozess effizienter zu gestalten lag in der Fokussierung des elektrischen Feldes an der Kanüle, um die Faserdeposition auf den Bereich des Kollektorstreifens zu konzentrieren. Arras et al.<sup>[247]</sup> zeigten, dass sich die Ablagefläche von elektrostatisch gesponnenen Fasern unter Verwendung von plattenförmigen Sekundärelektroden reduzieren ließ. Die Elektroden wurden parallel zur Kanüle angebracht und, wie auch die Kanüle, negativ geladen. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die Biegeinstabilitäten der Fasern in horizontaler Richtung reduziert wurden, was zu einer engeren Flugbahn führte. Dasselbe Prinzip wurde in dieser Arbeit erfolgreich angewandt und ebenfalls mittels elektrostatischer Feldsimulationen untersucht. Durch Einsatz einer Ringelektrode an der Kanüle wurde die Faserdeposition auf die Öffnung der Zylinderschalung fokussiert, was den Materialverlust auf ca. 12 % senkte. Anhand der Simulation konnte der positive

Effekt durch Vergleich der Verläufe der horizontalen und vertikalen Feldstärkenkomponenten ohne und mit Ringelektrode erklärt werden. Die Ringelektrode führte nicht nur zur Fokussierung des Feldes in horizontale Richtung, sondern bewirkte im Abstand von ca. 1,5 cm zur Kanülenachse einen vektoriellen Richtungswechsel der Feldstärke nach innen hin. Somit wurde für die herabfliegende Faser eine Barriere nach außen geschaffen, die den Flugradius einschränkte und zu einer kleineren Ablagefläche führte. Eine ähnliche Vorgehensweise wurde von Yang et al.<sup>[248]</sup> veröffentlicht, die eine Ringelektrode zur Feldausrichtung beim elektrostatischen Spinnen mit mehreren Kanülen verwendeten und das System ebenfalls anhand von Feldsimulationen beschrieben. Zwar sind die berechneten Feldstärken in guter Korrelation mit den hier aufgeführten Ergebnissen, jedoch wurden in der Publikation keine Feldstärkenprofile gezeigt, welche in dieser Arbeit die Erklärungsgrundlage für die in der Praxis beobachtete Fokussierung bilden.

#### 4.1.3 Elektrostatisches Spinnen ausgerichteter Fasern

Im letzten Schritt der Parametrisierung des elektrostatischen Spinnprozesses wurde der Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit des Zylinders auf den Ausrichtungsgrad der Fasermatten untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass beim Verspinnen einer 10 %igen eADF4(C16)-Lösung aus HFIP eine Oberflächengeschwindigkeit von 33 m/s erforderlich war, um einen hohen Grad an Ausrichtung zu erzielen. Bisher publizierte Wickelgeschwindigkeiten zum elektrostatischen Spinnen ausgerichteter Fasermatten lagen meist im Bereich von 2 m/s – 30 m/s, woraus sich schließen lässt, dass die Spinnengeschwindigkeit stark vom System abhängt.<sup>[142,249-253]</sup> Die hier verwendete Geschwindigkeit von 33 m/s ist also im Vergleich relativ hoch. Anhand der REM-Aufnahmen wurden jedoch auch bei 33 m/s keine Faserdefekte (Verjüngung oder Bruch) beobachtet, wie sie beispielsweise von Zussman et al.<sup>[142]</sup> beim Verspinnen von wässrigen Polyethylenoxidlösungen nachgewiesen wurden. Diese und die Tatsache, dass die Fasern bei einer Wickelgeschwindigkeit von 29 m/s deutlich weniger ausgerichtet waren, lassen die Annahme zu, dass eine Annäherung der Oberflächengeschwindigkeit an die Endgeschwindigkeit der heranfliegenden Faser erreicht wurde. Reneker et al.<sup>[134]</sup> ermittelten beim elektrostatischen Verspinnen von Polyethylenoxid aus Wasser anhand von stereographischen Videoaufzeichnungen Strahlgeschwindigkeiten von 0.5-5 m/s. Da sich diese Werte jedoch ausschließlich auf den oberen Bereich des Strahls beziehen, wurde eine Abschätzung der Faserendgeschwindigkeit  $v$  nach folgender Formel als zuverlässigste Methode beschrieben.<sup>[79,102]</sup>

$$v = \frac{4}{\pi \cdot \rho \cdot d^2} \cdot c \cdot \dot{V} \quad \text{[Formel 22]}$$

Dabei gilt:  $\rho$  = Dichte,  $d$  = Faserdurchmesser,  $c$  = Konzentration der Lösung,  $\dot{V}$  = Volumenstrom.

Auf Grundlage dieser Formel ergibt sich für das Verspinnen von 10 % w/v eADF4(C16) mit 14 µl/min bei einem resultierenden Faserdurchmesser von 214 nm eine Faserherstellungsrate von ca. 500 m/s. Tomaszewski et al. errechneten beim Verspinnen von Polyvinylalkol Fasergeschwindigkeiten von über 200 m/s.<sup>[102]</sup> Der Rückschluss auf die Geschwindigkeit der Faser ist jedoch nur dann berechtigt, wenn die Bedingung erfüllt ist, dass ausschließlich ein Taylorkonus auftritt und somit eine Einzelfaser versponnen wird. Unabhängig davon lässt die Berechnung jedoch eine Aussage über die versponnene Faserlänge pro Zeit zu. In dieser Arbeit wurde mit einem relativ hohen Volumenstrom gearbeitet, wobei immer mehrere Taylor-Konen gleichzeitig auftraten. Unter der Annahme, dass die Wickelgeschwindigkeit von 33 m/s im Bereich der effektiven Fasergeschwindigkeit liegt und unter Einbeziehung der errechneten Faserherstellungsrate von ca. 500 m/s, kann geschlossen werden, dass im Mittel etwa 15 Fasern gleichzeitig versponnen wurden. Anhand der Beobachtungen, die bei der Mehrfachstrahlbildung an der Kanüle gemacht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass dies in einer realistischen Größenordnung liegt.

Auch wenn in diesem Prozess unter geringem Materialeinsatz große Mengen an Fasern hergestellt werden können, so muss bei einer Hochskalierung des Verfahrens bedacht werden, dass es sich bisher um einen diskontinuierlichen Prozess handelt. Es wäre zwar möglich, den Radius des Zylinders zu vergrößern und dadurch längere Fasermatten herzustellen, jedoch müsste der Rotor zur Fasermattenentnahme stets angehalten und wieder neu angefahren werden. Es wurden jedoch bereits verschiedene Konzepte zur kontinuierlichen Herstellung ausgerichteter Faserbündel veröffentlicht. Pan et al.<sup>[254]</sup> versponnen beispielsweise Fasern aus zwei gegensätzlich geladenen und gegenüber platzierten Kanülen (entsprechend dem Schema aus Abbildung 68, A). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Ladung ziehen sich die Fasern an und orientieren sich zu einem ausgerichteten Bündel, das im Anschluss von einer Rolle abgezogen wird. So konnten maximal 14,9 m/s Garn hergestellt werden. Da dieser Prozess später auch für verschiedene andere Polymer/Lösungsmittel-Systeme eingesetzt wurde, ist davon auszugehen, dass sich auf diese Weise auch rekombinante Spinnenseidenproteine verarbeiten lassen.<sup>[255,256]</sup> Ein anderer kontinuierlicher Ansatz beschreibt das elektrostatische Spinnen in ein Bad, indem die Fasern zunächst unausgerichtet schwimmen und sich beim Herausziehen zu einem ausgerichteten Bündel formieren (entsprechend dem Schema aus Abbildung 68, B).<sup>[257-259]</sup> Diese Vorgehensweise wäre insofern interessant, als dass die rekombinanten Seidenfasern durch Verwendung eines Alkohol-Bads in einem Schritt versponnen und nachbehandelt werden könnten. Es wurde zwar gezeigt, dass das Eintauchen der Fasern in ein Nachbehandlungsbad zum Morphologieverlust der Fasern führt, jedoch wäre es denkbar, das Bad so zu beheizen, dass die Fasern bereits vor dem direkten Kontakt mit der Flüssigkeit aufgrund der Dampfatosphäre stabilisiert werden.

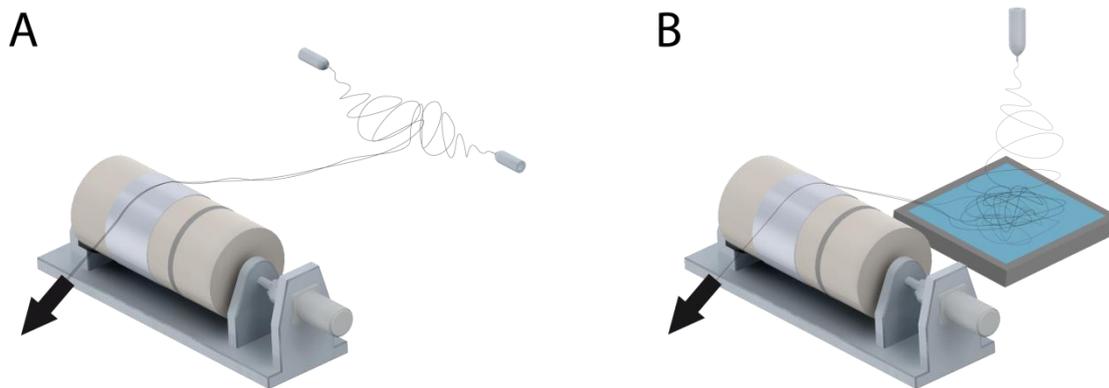


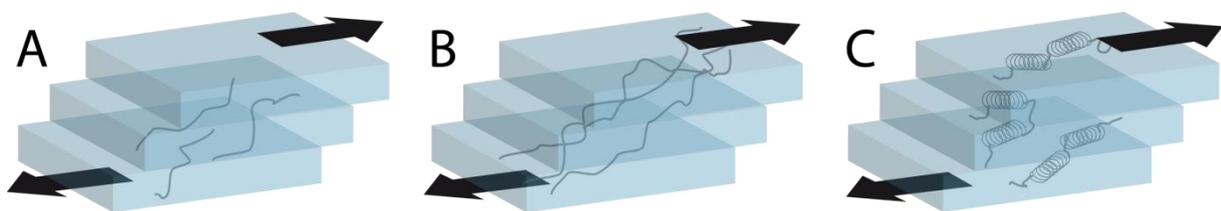
Abbildung 68: Kontinuierliche Verfahren zur Herstellung von Faserbündeln: Gegenspinnen zweier unterschiedlich geladener Fasern (A) oder Verwendung eines Bads, aus dem die Fasern als Bündel abgezogen werden (B).

## 4.2 Einfluss der Spinnlösung und der Nachbehandlung auf morphologische und strukturelle Eigenschaften elektrostatisch gesponnener eADF4-Fasern.

### 4.2.1 Rheologische Charakterisierung der Spinnlösungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Spinnlösungen zunächst rheologisch charakterisiert, wobei die Viskosität bei allen Lösungen mit zunehmender Konzentration erwartungsgemäß stieg. Das Fitten der Kurven nach dem Potenzgesetz von Ostwald und de Waele zeigte, dass sich die Lösungen lediglich leicht scherverdickend verhalten, was jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf ein strukturviskoses Verhalten, sondern auf das Ausdampfen des leicht flüchtigen HFIPs zurückzuführen ist. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Lösungen um annähernd newtonsche Flüssigkeiten handelt. Wässrige Seidenlösungen, die von der Spinne im natürlichen System verwendet werden, verhalten sich hingegen über einen großen Konzentrationsbereich, ähnlich wie eine Polymerschmelze, scherverdünnend.<sup>[260]</sup> Vergleichbare Beobachtungen wurden von Keerl und Scheibel bei der rheologischen Charakterisierung wässriger Lösungen des rekombinanten Spinnenseidenproteins eADF3(AQ24NR3) gemacht, wobei anhand eines Strukturmodells gezeigt wurde, dass das charakteristische scherverdünnende Verhalten erst mittels Induktion kristalliner  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch Zugabe von Phosphat erreicht werden konnte.<sup>[261]</sup> Anhand von CD-Messungen an selbstassemblierenden  $\beta$ -Faltblatt-ausbildenden Peptiden wurde nachgewiesen, dass  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen mit zunehmend konzentriertem HFIP bis zu 100% (bei reinem HFIP) verloren

gehen, wobei  $\alpha$ -helikale Strukturen stabilisiert werden.<sup>[262,263]</sup> HFIP bildet dabei aufgrund seiner starken Interaktion mit den Peptidbindungen der Proteine eine stabile Solvathülle aus, die eine Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern und somit eine scherinduzierte Aggregation verhindert.<sup>[264]</sup> Somit kann das newtonsche Verhalten und die Stabilität der Proteinlösungen in HFIP erklärt werden. Ferner wurde anhand eines in HFIP gelösten rekombinant hergestellten Seidenpeptids, welches auf der Aminosäuresequenz von *N. clavipes* basiert, gezeigt, dass unter Zugabe von Wasser die  $\alpha$ -helikale Struktur konserviert blieb, da die Struktur motive in HFIP hochgradig abgeschirmt sind.<sup>[265]</sup> Der zugrundeliegende Mechanismus wurde zwar noch nicht vollständig erklärt, basiert jedoch auf der Stabilisierung von Wasserstoffbrücken der  $\alpha$ -helikalen Bereiche, der Anordnung mizellenartiger Strukturen um hydrophobe Oberflächen, sowie thermodynamischen und hydrophoben Effekten.<sup>[265-267]</sup> Die aufgeführten Ergebnisse können auch zur Erklärung des, im Vergleich zu PCL- und PA6-Lösungen, niedrigen Viskositätsniveaus von eADF4-Proteinen in HFIP herangezogen werden. Von Polymeren ist bekannt, dass bereits geringe Mengen in Lösung zu einer starken Zunahme der Viskosität führen können, da sie eine Brücke zwischen mehreren Fließebenen bilden und dadurch einen mechanischen Widerstand darstellen.<sup>[268]</sup> Je länger die Polymerketten also sind, desto größer wird der Fließwiderstand.<sup>[269-271]</sup> Anhand dieses Modells kann erklärt werden, warum sowohl bei den eADF4-Proteinen, als auch bei den Polymeren PCL und PA6 jeweils das größere Molekulargewicht zur höheren Viskosität führte (Abbildung 69, A, B). Aufgrund der zuvor beschriebenen  $\alpha$ -helikalen Sekundärstruktur liegen die Proteine jedoch nicht als voll entfaltete Ketten in HFIP vor, sondern sind kompakter als ein entfaltetes Polymer mit identischem Molekulargewicht in Lösung (Abbildung 69, C). Infolgedessen ist die Beeinträchtigung der Fließebenen also geringer, was die geringeren Viskositätsniveaus bei eADF4-Proteinen erklärt.



**Abbildung 69:** Schematische Darstellung gescherter Fließebenen von Polymerlösungen: Moleküle mit geringem Molekulargewicht (A) durchkreuzen weniger Fließebenen als längere Molekülketten (B) und bilden somit einen geringeren Fließwiderstand (Viskosität). Die eADF4-Proteine (C) hingegen haben zwar ein großes Molekulargewicht, sind jedoch aufgrund ihrer Sekundärstruktur kompakter und kreuzen daher weniger Fließebenen.

#### 4.2.2 Einfluss der Eigenschaften der Spinnlösung auf die Fasermorphologie

Die Viskosität gilt beim elektrostatischen Spinnen als am besten geeignetes Mittel, um die resultierende Fasermorphologie zu kontrollieren.<sup>[272]</sup> In der Vergangenheit wurden verschiedene Ansätze zur Aufstellung systematischer Zusammenhänge zwischen Verspinnbarkeit und der dazu mindestens erforderlichen Konzentration/Viskosität verfolgt, deren Gültigkeit sich jedoch meist auf ein spezifisches Polymer/Lösungsmittel-System beschränkte.<sup>[273,274]</sup> Gupta et al.<sup>[156]</sup> versponnen elektrostatisch Polymethylmethacrylat (PMMA) aus N, N-Dimethylformamid (DMF) unter Variation des PMMA-Molekulargewichts und zeigten eine lineare Korrelation zwischen der Nullscherviskosität und dem Faserdurchmesser. Aus den Daten geht hervor, dass der Anstieg der Faserdurchmesser mit der Viskosität unabhängig vom Molekulargewicht (im Bereich von 12 - 100 kDa) im selben Maße auftrat. Die Empfindlichkeit  $\frac{\Delta d}{\Delta \eta}$  der Faserdurchmesser  $d$  gegen Veränderungen der dynamischen Viskosität  $\eta$  betrug dabei 0,72  $\mu\text{m}/\text{Pas}$ . Um einen Vergleich anstellen zu können wurden im Rahmen dieser Arbeit die Viskositäten aller Lösungen bei niedriger Scherrate ( $2,864 \text{ s}^{-1}$ ) gegen die resultierenden Faserdurchmesser aufgetragen und jeweils die Steigung einer linearen Trendlinie ermittelt (Tabelle 13). Interessant ist hierbei vor allem der Vergleich der Ergebnisse von eADF4(C16)- mit eADF4(C32NR4)-Lösungen, da die beiden Proteine aus der identischen Aminosäuresequenz aufgebaut sind und somit der Einfluss des Molekulargewichts direkt nachvollzogen werden kann.

**Tabelle 13: Empfindlichkeit der Faserdurchmesser  $d$  gegen Änderungen der Viskosität  $\eta$  der versponnenen Lösung unter Angabe des Bestimmtheitsmaßes der gefitteten Trendlinie.**

	$\frac{\Delta d}{\Delta \eta}$ ( $\mu\text{m}/\text{Pas}$ )	Bestimmtheitsmaß $R^2$
<b>eADF4(C16)</b>	3,62	0,9532
<b>eADF4(C32NR4)</b>	3,78	0,9998
<b>PCL</b>	0,80	0,8453
<b>PA6</b>	0,67	0,8753

Die Empfindlichkeiten  $\frac{\Delta d}{\Delta \eta}$  von eADF4(C16)- und eADF4(C32NR4)-Lösungen korrelieren sehr gut und bestätigen somit das Ergebnis von Gupta et al. insofern, als dass das Molekulargewicht keinen signifikanten Einfluss auf die Viskositäts-Faserdurchmesser-Abhängigkeit hat. Dennoch ist es ein entscheidender Parameter beim elektrostatischen Spinnen, da mit größeren Molekülen ein wesentlich breiteres Durchmesserspektrum hergestellt werden kann als mit kleineren Molekülen im

selben Konzentrationsintervall. Bei PCL- und PA6-Lösungen liegt die viskositätsabhängige Zunahme der Faserdurchmesser in der Größenordnung derer von PMMA in DMF. Da beim elektrostatischen Spinnen neben der Viskosität/Konzentration jedoch auch andere Eigenschaften der Lösung wie Leitfähigkeit, Ladungsdichte, Oberflächenspannung sowie Dipolmoment und dielektrische Konstante eine entscheidende Rolle spielen,<sup>[86]</sup> kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, inwiefern die Größenordnungen als charakteristisch für Proteine oder Polymere angesehen werden können. Es wurde jedoch eine Systematik aufgezeigt, die, basierend auf rheologischen Untersuchungen, zumindest innerhalb eines Lösungsmittelsystems eine Prognose für die resultierenden Faserdurchmesser zulässt.

Ein weiteres Phänomen, das beobachtet wurde, ist das Auftreten von sphärischen Ausprägungen beim Verspinnen von 6 % w/v eADF4(C16) und PCL. Die Ursache dafür liegt in einer Kontraktion des Lösungsstrahls, die aufgrund der Kapillarkraft der Oberflächenspannung auftritt.<sup>[141]</sup> Dementgegen wirken Verstrickungen der gelösten Polymerketten, welche den Strahl während des Austrocknens stabilisieren. Diese physikalischen Wechselwirkungen der Moleküle nehmen mit zunehmender Moleküllänge zu, was dazu führt, dass die Instabilität des Strahls mit steigendem Molekulargewicht innerhalb einer Polymerklasse abnimmt.<sup>[275,276]</sup> Demzufolge kann erklärt werden, warum es beim elektrostatischen Verspinnen von 6 %igen eADF4(C16)-Lösungen zu sphärischen Ausprägungen kommt, wohingegen eADF4(C32NR4) bei gleicher Konzentration homogene Faserdurchmesser aufweist. Um den unerwünschten Effekt zu vermeiden eignet sich die Stabilisierung der Fließbedingungen durch Erhöhung der Konzentration, da hierbei zum einen eine höhere Polymerdichte und somit Wechselwirkung erzeugt wird, und zum anderen das Austrocknen des Strahls beschleunigt wird.<sup>[277]</sup> Durch Erhöhen der Konzentration auf 8 % w/v konnte aufgrund der stabilisierten Fließbedingungen auch bei eADF4(C16) und PCL die Bildung von sphärischen Ausprägungen verhindert werden, wobei die mittleren Faserdurchmesser zunahm. Generell erwies sich der Vergleich der erzielten Durchmesser mit Werten aus der Literatur als schwierig, zumal nur wenige Quellen zur Verfügung standen und meist keine präzisen Angaben zu den Spinnparametern gemacht wurden. So konnte beispielsweise aus den REM-Untersuchungen einer Veröffentlichung von Polini et al.<sup>[278]</sup> entnommen werden, dass beim Verspinnen von PCL aus HFIP bei 40 % r.H. Faserdurchmesser von ca. 290 nm (3 % w/v), 320 nm (6 % w/v) und ca. 2 µm (12% w/v) generiert wurden, was sich nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt und aufgrund der geringen Durchmesserzunahme bei Verdopplung der Konzentration von 3 % w/v auf 6 % w/v für den Prozess untypisch ist. Kim et al.<sup>[279]</sup> stellten (ohne Angabe der Luftfeuchtigkeit) Fasern mit Durchmessern von 200 nm aus 10 % w/v PCL in HFIP her, was wiederum in relativ guter Korrelation mit den Werten dieser Arbeit steht (223 ± 102 nm). Beim Vergleich der Durchmesser elektrostatisch gesponnener

Fasern aus PA6 mit einer Arbeit von Manis et al.<sup>[280]</sup>, bei der verschiedene Konzentrationen PA6 (ohne Angabe der Luftfeuchtigkeit) aus HFIP versponnen wurden, traten signifikante Unterschiede auf. Ähnlich unstimmtig verhält es sich bei Veröffentlichungen, die sich mit dem elektrostatischen Verspinnen von Seidenproteinen aus organischen Lösungsmitteln befassen (Tabelle 14). Die starke Variation der Ergebnisse bei Verwendung derselben Polymer/Lösungsmittelsysteme zeigt die große Notwendigkeit einer detaillierten parametrischen Charakterisierung des elektrostatischen Spinnprozesses.

**Tabelle 14: Übersicht über elektrostatisch versponnene Seiden aus organischen Lösungsmitteln unter Angabe der Konzentration *c* und der Faserdurchmesser *d*.**

	Seide	Lösungsmittel	<i>c</i>	<i>d</i> (nm)
Ayutsede et al. <sup>[281]</sup>	<i>B. mori</i> Kokonseide	FA	9 % w/w	55 ± 29
			12 % w/w	63 ± 33
			15 % w/w	99 ± 58
Sukigara et al. <sup>[159]</sup>	<i>B. mori</i> Kokonseide	FA	10 % w/w	57 ± 23
			12 % w/w	56 ± 21
			15 % w/w	65 ± 27
			19,5 % w/w	368 ± 179
Lee et al. <sup>[282]</sup>	<i>B. mori</i> Kokonseide	FA	8 % *	205 ± 30
			9 % *	235 ± 10
			10 % *	305 ± 90
			11 % *	320 ± 110
Wei et al. <sup>[283]</sup>	<i>B. mori</i> Kokonseide	HFIP	8 % w/w	1290 ± 370
Zarkoob et al. <sup>[284]</sup>	<i>B. mori</i> Kokonseide	HFIP	1,2 % w/v	25
	nat. <i>N. clavipes</i> Dragline	HFIP	2 % w/v	100
Stephens et al. <sup>[285]</sup>	rek. <i>N. clavipes</i> Spidroin 1	HFIP	28 % w/v	300

\* keine Angabe über w/v oder w/w

## 4.2.3 Sekundärstrukturanalyse elektrostatisch gesponnener eADF4-Fasern

### 4.2.3.1 Einfluss der Verarbeitung auf die Proteinsekundärstruktur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Nachbehandlungsmethode für rekombinante Seidenfasern entwickelt, bei der die einwertigen Alkohole Methanol, Ethanol und 2-Propanol zur Induktion kristalliner Strukturen eingesetzt wurden. Hümmerich et al.<sup>[286]</sup> zeigten bereits, dass eADF4(C16)-Filme, die aus HFIP gegossen wurden, durch Eintauchen in Methanol wasserunlöslich wurden. Auf

diesem Ergebnis aufbauend untersuchten Spieß et al.<sup>[53]</sup> mittels FT-IR die Sekundärstrukturanteile von eADF4(C16)-Filmen aus HFIP vor und nach der Behandlung mit Methanol. Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit den Daten der elektrostatisch gesponnenen Fasern ist zu sehen, dass der  $\beta$ -Faltblatt-Anteil unbehandelter Filme ca. doppelt so hoch ist, wie der von unbehandelten elektrostatisch gesponnenen Fasern (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Gegenüberstellung der Sekundärstrukturanteile unbehandelter und methanolbehandelter Filme (getaucht) und unbehandelter und methanolbehandelter elektrostatisch gesponnener Fasern (bedampft). Der Fehler beträgt bei den Messwerten der Filme  $\pm 2$  % (die Seitenketten tragen zur Amid I Bande bei, stellen aber keine Sekundärstruktur dar).**

	Filme <sup>[53]</sup>		Fasern	
	unbehandelt	behandelt	unbehandelt	behandelt
<b><math>\beta</math>-Faltblatt-Anteil (%)</b>	21,1	42,3	10,9 $\pm$ 1,5	35,3 $\pm$ 1,3
<b><math>\alpha</math>-helikaler Anteil (%)</b>	18,7	7,7	16,8 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,7
<b>Random Coil-Anteil (%)</b>	27,7	21,7	31,7 $\pm$ 2,8	22,9 $\pm$ 0,5
<b><math>\beta</math>-Schleifen-Anteil (%)</b>	27,8	21,9	35,2 $\pm$ 1,5	30,3 $\pm$ 1,7
<b>Seitenketten (%)</b>	4,2	4,7	5,4 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,3

Im Gegensatz zu den Filmen, die über Nacht bei 30 % r.H. getrocknet wurden, fand der Trocknungsvorgang der Fasern während des elektrostatischen Spinnens bei 50 % r.H. statt. Obwohl für eADF4-Filme gezeigt wurde, dass eine höhere Luftfeuchtigkeit beim Austrocknen tendenziell zu einer Zunahme an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen führt,<sup>[287]</sup> wiesen die eADF4-Vliese jedoch trotz höherer Luftfeuchtigkeit einen niedrigeren Anteil kristalliner Strukturen auf. Ein weiterer Unterschied war der Einfluss des elektrischen Feldes. Beim elektrostatischen Spinnen von *A. pernyi* Fibroin aus HFIP wurde ein positiver Einfluss des elektrischen Feldes auf die Kristallinität der Proteine ermittelt. So wurde durch Steigerung der Spannung eine Zunahme des  $\beta$ -Faltblatt-Anteils verzeichnet, der auf eine verstärkte molekulare Ausrichtung zurückgeführt wurde.<sup>[288]</sup> Da jedoch in dieser Arbeit elektrostatisch gesponnene Fasern einen geringeren kristallinen Anteil als Filme auswiesen muss dafür ein anderer Grund in Betracht gezogen werden. Im Gegensatz zu den Filmen, die über Nacht getrocknet wurden fand das Verdampfen des Lösungsmittels beim elektrostatischen Spinnen wesentlich schneller statt. Auf Basis der Oberflächengeschwindigkeit des Zylinders (33 m/s) und des Elektrodenabstands (20 cm), sowie der Beobachtung, dass keine Verschmelzungen der Fasern zu sehen waren, lässt sich eine Trockengeschwindigkeit von ca. 6 ms abschätzen, was die Annahme legitimiert, dass hier die Ursache für die abweichenden Ergebnisse liegt. Es wird vermutet, dass das langsame Austrocknen des Films die Faltung kristalliner Bereiche bei der Proteinassemblierung begünstigt, da die mobile Phase, in der eine Faltung der Moleküle stattfinden kann, länger ist. Beim

elektrostatischen Spinnen hingegen ist die Übergangsphase von Lösung zu Festkörper und somit die Phase der Vorstrukturierung sehr kurz, was die Transformation der Proteinstruktur erschwert. Diese Theorie erklärt auch, warum bei höherer Luftfeuchtigkeit nach Vertrocknen der Filme ein erhöhter kristalliner Anteil registriert wurde. Hu et al.<sup>[289,290]</sup> zeigten, dass die Wasseraufnahme von Seide ihre Glasübergangstemperatur herabsetzt, was zu einer Reduzierung der, für molekulare Bewegungen erforderlichen, Energie führt und eine Vorstrukturierung der Seidenproteine begünstigt. Durch Dehydration der Struktur kann schließlich die Ausbildung kristalliner Bereiche induziert werden. Gestützt wird diese Theorie durch Beobachtungen, die bei der Verarbeitung von *B. mori* Fibroin aus HFIP gemacht wurden. Während bei Filmen ein Strukturanteil von 24,1 %  $\beta$ -Faltblätter auftrat,<sup>[291]</sup> wurde bei elektrostatisch gesponnenen Fasern nur ein kristalliner Anteil von 16,9 % registriert.<sup>[292]</sup> Auch Min et al.<sup>[293]</sup> zeigten, dass der kristalline Anteil bei elektrogewebenen Fasern erheblich geringer war als bei Filmen desselben Materials. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit der strukturellen Auswertung, die für eADF4(C16) durchgeführt wurde.

#### 4.2.3.2 Einfluss der Nachbehandlung auf die Proteinsekundärstruktur

Die Nachbehandlung von Seidenproteinen unter Verwendung von einwertigen Alkoholen ist in der Literatur vielfach beschrieben.<sup>[59,294-299]</sup> In dieser Arbeit wurde die Nachbehandlung der Proteine durch Bedampfen mit Methanol, Ethanol und 2-Propanol durchgeführt. Die Sekundärstrukturanalyse von eADF4(C16) ergab eine zeitliche Abhängigkeit der Umstrukturierung, die vom jeweiligen verwendeten Alkohol abhing. Unter Einwirkung von Methanol kam es bereits innerhalb der ersten Minuten zur Strukturänderung von amorphen Bereichen in  $\beta$ -Faltblätter, die bei Ethanol nach ca. 15 min und bei 2-Propanol nach ca. 60 min einsetzte. Diese Zeitabhängigkeit wurde auch von anderen Gruppen bei der Nachbehandlung von *B. mori* Fibroin dokumentiert. Yan et al.<sup>[300]</sup> stellten Filme aus *B. mori* Fibroin-Lösungen her, die anschließend in 60 % Methanol getaucht wurden. Es wurde gezeigt, dass innerhalb der ersten zwei Minuten eine Zunahme von  $\beta$ -Faltblättern um 33 % der Gesamtstruktur auftrat, was auf die stark dehydrierende Wirkung von Methanol zurückzuführen ist und die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Nuanchai et al.<sup>[301]</sup> gossen Filme aus regeneriertem *B. mori* Fibroin in wässriger Lösung und behandelten diese durch Tauchen in Ethanol und Methanol (je 80 %) für 30, 60 und 90 min, wobei die Nachbehandlung nach ca. 30 min weitgehend erfolgt war. Jeong et al.<sup>[302]</sup> bedampften aus HFIP elektrostatisch gesponnene *B. mori* Fibroin-Fasern mit Wasser, Methanol, Ethanol und 1-Propanol (bei 35 °C), wobei die Sekundärstrukturänderung bei allen Behandlungsagenzien nach ca. 30 min abgeschlossen war. Auch hier kam es in Gegenwart von Methanol zu einem höheren Grad an Kristallisation als in Gegenwart von Ethanol. An anderer Stelle

wurde der Grad der Nachbehandlung von *B. mori* Fibroin mit Ethanol und Methanol wiederum als vergleichbar beschrieben.<sup>[54,303]</sup>

Bei der Nachbehandlung wird den Proteinen Wasser entzogen, welches durch Wasserstoffbrücken in der Struktur gebunden ist und die Faltung in eine thermodynamisch stabilere  $\beta$ -Faltblatt-reiche Form verhindert. Sowohl Methanol als auch Ethanol verfügen über eine hydrophile Hydroxylgruppe, die durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken Wasser binden kann. Diese Eigenschaft ist bei der Nachbehandlung entscheidend, da hierbei durch Dehydration hydrophobe Bedingungen geschaffen werden, die dazu führen, dass hydrophobe Seitenketten der Proteine wechselwirken und somit  $\beta$ -Faltblätter ausgebildet werden.<sup>[304]</sup> Der Unterschied der verwendeten Alkohole liegt lediglich in der Länge der hydrophoben Kohlenwasserstoffkette, die jedoch die Molekülgröße ausmacht und somit den Diffusionskoeffizienten  $D$  bestimmt, wie aus der Stokes-Einstein-Formel ersichtlich ist:<sup>[305]</sup>

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6\pi\eta R_0} \quad \text{[Formel 23]}$$

Dabei gilt:  $k_B$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  = Temperatur,  $\eta$  = Viskosität des Mediums,  $R_0$  = Molekularradius. Diese Formel wurde für die Diffusion in Flüssigkeiten aufgestellt und wird hier zur Veranschaulichung gezeigt, da zu erwarten ist, dass der Alkohol primär durch die wasserangereicherte amorphe Proteinphase diffundiert. Da für die Nachbehandlung eine Diffusion des Alkohols in die Proteinstruktur erforderlich ist, wird vermutet, dass die längere erforderliche Behandlungsdauer mit Ethanol und 2-Propanol auf deren kleinere Diffusionskoeffizienten zurückzuführen ist. Ferner muss beachtet werden, dass die Nachbehandlungsmittel durch Verdampfen bei konstanter Temperatur zugeführt wurden, wobei sich der Dampfdruck der Alkohole unterscheidet. Bei 60 °C entwickelt Methanol einen Dampfdruck von 0,85 bar, Ethanol von 0,47 bar und 2-Propanol von 0,39 bar (berechnet mit Software: SF Dampfdruck 3.0). Aus der theoretischen Betrachtung und den Ergebnissen der Experimente lässt sich schließen, dass mit Methanol aufgrund des höheren Dampfdrucks und Diffusionskoeffizienten schneller hydrophobe Bedingungen in der Proteinstruktur geschaffen werden. Folglich dauert es bei Ethanol und 2-Propanol länger bis eine für die Kristallisation ausreichende Alkoholkonzentration in den Fasern erreicht wird. Chen et al.<sup>[306]</sup> zeigten, dass die Verdünnung von Ethanol (40 %, 45 %) mit Wasser bei der Behandlung von *B. mori* Fibroin Filmen zu einer Verzögerung der Kristallisation führte. Die Autoren unterteilten die Nachbehandlung in drei Phasen:

1. Lag-Phase: Ausbildung zunächst abgeschirmter intramolekularer  $\beta$ -Faltblätter zwischen antiparallelen Proteinsträngen, die als Nukleus für die weitere Kristallisation fungieren.

2. Exponentielle Phase: Schnelle Ausbreitung der kristallinen Struktur zwischen und entlang der Moleküle. In dieser Phase wird aufgrund kinetischer Vorgänge der Großteil der  $\beta$ -Faltblatt-reichen Strukturen ausgebildet.
3. Letzte Phase: Nur noch langsame Zunahme des Kristallisationsgrads durch Ausrichtung von Proteinketten zur Bildung energetisch stabilerer  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen und Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichts.

Dieses Modell kann zur Erklärung der zeitlichen Verzögerung (Phase 1.) herangezogen werden, in der bei Ethanol und 2-Propanol keine signifikante Zunahme an  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen zu sehen war, und erklärt auch die darauf folgende schnelle Kristallisation (Phase 2.). Die zugrundeliegende Kinetik der Ausbildung von  $\beta$ -Faltblättern wurde von Hu et al.<sup>[307]</sup> anhand der thermisch induzierten Kristallisation von *B. mori* Fibroin untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die  $\beta$ -Faltblattformation anhand des kinetischen Modells vom Avrami et al.<sup>[308]</sup>, welches für die isotherme Kristallisation von Polymeren entwickelt wurde, beschrieben werden kann:

$$X_c^{rel}(t) = 1 - e^{(-Kt^n)} \quad \text{[Formel 24]}$$

Es gilt:  $X_c^{rel}(t)$  = zeitabh. relativer Kristallisationsgrad,  $K$  = Kristallisationsrate,  $n$  = Avrami-Exponent.

Die Kristallisationsrate wird von der Temperatur und von Diffusionsvorgängen sowie der Nukleationsrate bestimmt, wohingegen der Avrami-Exponent vom Nukleationsmechanismus und geometrischen Kristallwachstum abhängt.<sup>[309]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gemessene relative Zunahme kristalliner Strukturen bei der Nachbehandlung von eADF4(C16) mit verschiedenen Alkoholen nach der Avrami-Gleichung gefittet (Abbildung 70). Für den Fit wurde der initiale  $\beta$ -Faltblattanteil (10,9 %) Null gesetzt und der Endwert nach 240 min als 100 % definiert.

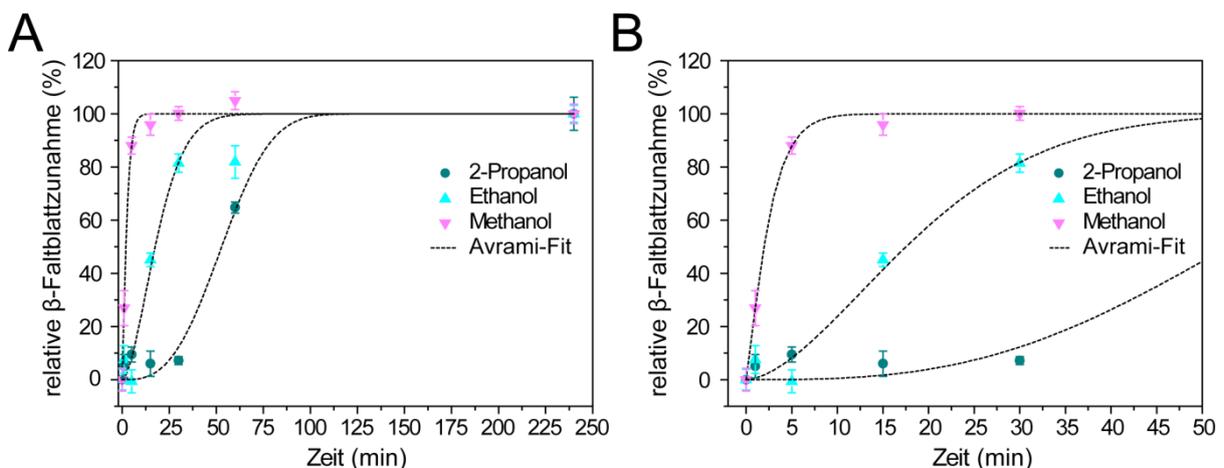


Abbildung 70: Avrami-Fit der, durch FT-IR gemessenen, relativen Zunahme kristalliner  $\beta$ -Faltblätter: Übersicht über die gesamte Behandlungsdauer (A) und Detailansicht der Anfangsphase (B). Die Werte wurden jeweils aus 9 Datenpunkten gemittelt und die Standardabweichung als Fehlerbalken angegeben.

Durch Verwendung der Avrami-Gleichung konnten die Kristallisationsraten und Avrami-Exponenten für die unterschiedlichen Nachbehandlungssysteme ermittelt werden. Aus diesen Kennwerten lässt sich die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der Kristallisation wie folgt berechnen (Tabelle 16):

$$t_{1/2} = \left(\frac{\ln 2}{K}\right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{[Formel 25]}$$

**Tabelle 16: Auf Basis der Avrami-Gleichung berechnete Parameter für die Kristallisationskinetik bei der Nachbehandlung von eADF4(C16) durch Bedampfen mit verschiedenen Alkoholen bei 60 °C.**

	K	Log <sub>10</sub> K	n	t <sub>1/2</sub> (min)	t <sub>98%</sub> (min)
<b>2-Propanol</b>	0,000006	-5,2	2,935773	53	94
<b>Ethanol</b>	0,005790	-2,2	1,670835	18	48
<b>Methanol</b>	0,314307	-0,5	1,185268	2	8

Hu et al.<sup>[307]</sup> ermittelten bei der thermisch induzierten Kristallisation von *B. mori* Fibroin anhand von FT-IR-Messungen Avrami-Koeffizienten von 1,57 (215 °C), 1,68 (210 °C) und 1,81 (205 °C). Es zeigte sich jedoch, dass allein auf Basis dieser Werte keine eindeutigen Rückschlüsse auf das geometrische Wachstum kristalliner Regionen in der Struktur gezogen werden konnten. In Bezug auf die Kristallisationsrate ist in Tabelle 16 ist eine signifikante Zunahme der Werte bei Abnahme des Molekulargewichts des jeweiligen verwendeten Alkohols zu sehen. Üblicherweise bezieht sich der Diffusionseinfluss der Kristallisationsrate auf die Diffusion von Molekülen, die aktiv an der Kristallisation teilnehmen. Bei der Nachbehandlung von eADF4(C16) ist jedoch die Diffusion der Alkohole der limitierende Faktor der Kristallisationsrate. Dies spiegelt sich ebenfalls in der starken Abnahme der Halbwertszeiten der Kristallisation bei sinkendem Molekulargewicht der Alkohole wieder. Auf Basis der gefitteten Kurven wurde ermittelt, dass die Nachbehandlungsdauer zum Erreichen von 98 % der Sekundärstrukturtransformation bei 2-Propanol 94 min, bei Ethanol 48 min und bei Methanol 8 min beträgt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Ethanol für 60 min bedampft, was angesichts der theoretischen Behandlungsdauer von etwa 48 min in einem sinnvollen Zeitbereich liegt. Die Auswertung gibt eine Indikation dafür, dass sich das kinetische Verhalten der  $\beta$ -Faltblatt-Formation durch das für Polymere aufgestellte isotherme Modell nach Avrami beschreiben lässt, wobei die Wahl des Nachbehandlungsmittels einen signifikanten Einfluss auf die Kinetik der Kristallisation hat.

### 4.3 Mechanische Eigenschaften von Garnen aus elektrostatisch gesponnenen Fasern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde, basierend auf dem uniaxialen Zugversuch, ein Verfahren zur Ermittlung und Beurteilung mechanischer Eigenschaften von Garnen aus elektrostatisch gesponnenen Fasern eingesetzt. Dabei ist jedoch zu beachten, dass die eingeführte Methode in einigen relevanten Punkten vom etablierten Standard für Faserzugversuche abweicht:

- Es wurden verdrehte Faserbündel (Garne) gemessen, was bedeutet, dass einerseits die Kraftaufnahme der Fasern nicht parallel zur Zugrichtung ist und andererseits die Deformation des Garns nicht gleich der Dehnung der Einzelfasern entspricht.
- Zur Ermittlung der Spannung aus der Kraftkurve wurde auf Grundlage der Masse und Dichte der Materialien ein theoretischer Querschnitt berechnet, der dem einer soliden Einzelfaser mit idealer Dichte (also ohne Lösungsmittelreste und Poren) entspricht.
- Da bei den Zugmessungen zum Teil große Deformationen auftraten wurde für die Auswertung die wahre Spannung und wahre Dehnung berechnet.

Diese Spezifikationen müssen vor allem beim Vergleich der angeführten Ergebnisse mit externen Quellen berücksichtigt werden.

#### 4.3.1 Beurteilung der mechanischen Messmethode anhand von Polymergarnen

Zhou et al.<sup>[310]</sup> stellten, in vergleichbarer Weise wie hier beschrieben, elektrostatisch gesponnene Matten aus ausgerichteten N,N-Dimethylformamidfasern (DMF) her und untersuchten den Einfluss des Verdrillens auf die mechanischen Eigenschaften der resultierenden Garne. Die Zugfestigkeit sowie der Elastizitätsmodul stiegen mit dem Grad des Verdrillens um ein 4-5-faches. Der Effekt wird damit begründet, dass bei auftretender Deformation ein erhöhter transversaler Druck im Garn entsteht, der zu Reibung zwischen den Einzelfasern führt und das Gleiten der Fasern reduziert. Das führt zu einer verbesserten Kraftübertragung zwischen den Fasern, was die Widerstandsfähigkeit des Garns gegen die mechanische Belastung verbessert. Ab einem gewissen Grad der Verdrillung ist jedoch der Windungswinkel der Einzelfasern mit der Achse der Zugrichtung so groß, dass die longitudinale Kraftaufnahme der Einzelfasern zu gering ist und die Widerstandsfähigkeit des Garns

abfällt. Dieses Verhalten wurde von Hearle<sup>[311,312]</sup> beschrieben und mathematisch modelliert. Yan et al.<sup>[313]</sup> fanden bei Garnen aus elektrostatisch gesponnenem Polyacrylnitril (PAN) den, in Hinsicht auf Zugfestigkeit und Elastizitätsmodul, idealen Windungswinkel bei ca. 35°. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Garne mit Windungswinkeln von  $35 \pm 4^\circ$  eine mechanisch günstige Morphologie aufweisen.

Zunächst wurden Garne aus den semikristallinen Polymeren PCL und PA6 hergestellt und mechanisch untersucht. Da in dieser Arbeit unter anderem die Feuchtigkeitssensitivität der künstlichen Spinnenseidenfasern untersucht wurde, sollte anhand von PCL, welches nur geringfügig Wasser absorbiert,<sup>[314]</sup> verifiziert werden, ob mechanische Effekte auf die hygroskopischen Eigenschaften der Proteine, oder etwa auf die Garmorphologie zurückzuführen sind. Von PCL ist bekannt, dass es aufgrund seiner Hydrophobizität und somit geringen Wasseraufnahmefähigkeit keine signifikante mechanische Beeinträchtigung durch Feuchtigkeitsänderung erfährt.<sup>[315,316]</sup> Bei PA6 kommt es hingegen aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Wasser und den Amid-Gruppen zur Erhöhung der Mobilität der Molekülketten. Dies führt zu einer Abnahme des Elastizitätsmoduls und der Zugfestigkeit.<sup>[317]</sup> Folglich kann die Wasserabsorption dieser Materialien (Tabelle 17) als Indikation für ihre mechanische Unbeständigkeit unter Feuchtigkeitseinfluss betrachtet werden.

**Tabelle 17: Wasseraufnahmefähigkeit von Filmen und Vliesen aus PCL und PA6**

	Morphologie	Medium	Wasseraufnahme (%)
<b>PCL</b>	Film (Querschnitt: 2 x 4 mm <sup>2</sup> )	NaCl 0,154 M, pH 7,4	< 0,5 <sup>[315]</sup>
<b>PCL</b>	Vlies ( $\varnothing_{\text{Faser}} 432 \pm 123$ nm)	Wasser	2,6 <sup>[318]</sup>
<b>PA6</b>	Film (8 $\mu$ m dick)	92 % r.H.	8,8 <sup>[319]</sup>
<b>PA6</b>	Vlies ( $\varnothing_{\text{Faser}}$ ca. 400 nm)	Wasser	7,4 <sup>[320]</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass anhand des hier vorgestellten mechanischen Messverfahrens die Feuchtigkeitssensibilität der Materialien gemessen werden kann. Sowohl aus den statischen als auch aus den dynamischen Zugkurven wurde ersichtlich, dass die Variation der Luftfeuchtigkeit erwartungsgemäß nur einen geringfügigen Einfluss auf das mechanische Verhalten von PCL hatte. In Tabelle 18 sind zur Übersicht mechanische Daten aus der Literatur angegeben, die an elektrostatisch gesponnenen PCL-Fasern gemessen wurden. Tan et al.<sup>[321]</sup> führten beispielweise Zugmessungen an PCL-Einzelfasern ( $\varnothing 1,4 \pm 0,3$   $\mu$ m) durch (Tabelle 18). Die Zugfestigkeit scheint zunächst erheblich niedriger als die der hier ermittelte Wert, was sich jedoch nach Umrechnung in die wahre Spannung relativiert, da sich aufgrund der hohen Dehnung ein Wert von ca. 120 MPa ergibt. Die wahre Bruchdehnung beträgt ca. 110 % und ist somit ca. doppelt so groß wie die der Garne. Da der

Elastizitätsmodul in der Regel im niedrigen Deformationsbereich gemessen wird, kann davon ausgegangen werden, dass sich der Wert mit der wahren Spannung/Dehnung als Berechnungsgrundlage nicht signifikant ändert. Er steht somit in guter Korrelation mit den Daten der Garne. Jahani et al.<sup>[322]</sup> ermittelten eine Zugfestigkeit von ausgerichteten PCL-Fasermatten, die nach Umrechnung in die wahre Spannung bei ca. 36 MPa liegt. Die wahre Bruchdehnung beträgt ca. 41 %. Unter Einbezug der Beobachtungen von Zhou et al.<sup>[310]</sup> kann die erhöhte Zugfestigkeit der Garne auf den bereits beschriebenen Effekt des Verdrillens zurückgeführt werden, zumal der berechnete Faktor (ca. 3) in der von Zhou et al. beschriebenen Größenordnung liegt (ca. Faktor 4). Dies trifft auch auf die Steigerung der Bruchdehnung zu. Beim direkten Vergleich der Daten muss zudem berücksichtigt werden, dass bei der Verarbeitung unterschiedliche Lösungsmittel eingesetzt wurden, was einen Einfluss auf die Kristallinität des Polymers hat. HFIP führt beispielsweise aufgrund seiner höheren Permittivität zu einem stärkeren Kristallisationsgrad als Chloroform, was sich wiederum in den mechanischen Eigenschaften bemerkbar macht.<sup>[323]</sup>

**Tabelle 18: Vergleich der ermittelten wahren Zugfestigkeit  $\sigma_{max}$ , Bruchdehnung  $\epsilon_{max}$  und des Elastizitätsmoduls  $E$  von PCL bei 30 % r.H. (diese Arbeit) mit Literaturwerten (*engineered*) von elektrostatisch gesponnenen PCL-Fasern (ohne Angabe der Luftfeuchtigkeit).**

	Lösungsmittel	Fasern	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (MPa)
<b>diese Arbeit</b>	HFIP	Garn	101 ± 20	49,3 ± 4,4	150 ± 30
<b>Tan et al.</b> <sup>[321]</sup>	Chloroform/Methanol (3:1 w/w)	einzel*	40 ± 10	200 ± 100	120 ± 30
<b>Jahani et al.</b> <sup>[322]</sup>	Chloroform/DMF (9:1)	Matte**	24,11	51,37	---

\* Einzelfasern; \*\* Matten aus ausgerichteten Fasern

Beim elektrostatischen Spinnen von PA6 aus HFIP kommt es, ähnlich wie beim Schmelzspinnen<sup>[324]</sup>, zur Ausbildung metastabiler  $\gamma$ -Kristalle (pseudo-hexagonal mit Wasserstoffbrücken zwischen parallelen verdrehten Ketten), welche durch nachträgliche Temperaturbehandlung (150 °C) in stabilere  $\alpha$ -Kristalle (monozyklisch mit Wasserstoffbrücken zwischen antiparallelen planaren Ketten) überführt werden können.<sup>[325]</sup> Es wurde gezeigt, dass diese Umstrukturierung einen signifikanten Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften hat.<sup>[226]</sup> Die kristallinen Eigenschaften müssen folglich auch bei der Betrachtung der mechanischen Eigenschaften von PA6-Garnen berücksichtigt werden. Volpato et al.<sup>[326]</sup> versponnen ebenfalls PA6 aus HFIP und ermittelten unter Verwendung des Nennquerschnitts die mechanischen Eigenschaften ihrer ausgerichteten Fasermatten (Tabelle 19). Berücksichtigt man die hohe Dehnung durch Umrechnung in die wahre Spannung/Dehnung, so ergibt sich für die Zugfestigkeit ein Wert von ca. 22 MPa, welcher, ähnlich wie bei PCL, um ca. Faktor 4 kleiner ist als die Zugfestigkeit der PA6-Garne. Analog verhält es sich beim Elastizitätsmodul. Somit

trifft auch hier die Systematik der mechanischen Stabilisierung aufgrund des Verdrillens der Fasermatten zu.

**Tabelle 19: Vergleich der ermittelten wahren Zugfestigkeit  $\sigma_{max}$ , Bruchdehnung  $\epsilon_{max}$  und des Elastizitätsmoduls  $E$  von PA6 bei 30 % r.H. (diese Arbeit) mit Literaturwerten (*engineered*) elektrostatisch gesponnener PA6-Fasern (ohne Angabe der Luftfeuchtigkeit).**

	Lösungsmittel	Fasern	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (MPa)
<b>diese Arbeit</b>	HFIP	Garn	81,1 ± 5,4	20,0 ± 1,5	570 ± 70
<b>Volpato et al.</b> <sup>[326]</sup>	HFIP	Matte*	13,3 ± 1,7	67 ± 5	89,2 ± 19,2

\* Matten aus ausgerichteten Fasern

Anhand der mechanischen Messungen konnte der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf das Materialverhalten von PA6-Fasern nachvollzogen werden (Tabelle 20). Jia et al. <sup>[327]</sup> untersuchten das mechanische Verhalten von PA6-Zugstäben (ISO-3167) und zeigten bei einer Feuchtigkeitsaufnahme von ca. 1,2 % w/w (23 °C, 50 % r.H.) eine Abnahme des Elastizitätsmoduls um ca. 20 %. In einer anderen Publikation derselben Gruppe wird angegeben, dass PA6 bei 30 % r.H (23 °C) ca. 1,1 % w/w Wasser absorbiert, was in einem ähnlichen Bereich liegt wie die zuvor genannten 1,2 % w/w (bei 23 °C, 50 % r.H.). Es kann also angenommen werden, dass auch die im Rahmen dieser Arbeit getesteten PA6-Garne bei 30 % r.H. (25 °C) ca. 1,1 % w/w Wasser aufnehmen, was zu einer Abnahme des Elastizitätsmoduls von ebenfalls 20 % führt. Analoge Ergebnisse wurden auch von Cossard et al. <sup>[328]</sup> veröffentlicht. Obgleich der Feuchtigkeitsgehalt der Garne nicht bestimmt und daher anhand der Literaturdaten abgeschätzt wurde, liegt der Feuchtigkeitseinfluss auf den Elastizitätsmodul in allen Fällen in derselben Größenordnung, was die Plausibilität der Daten belegt.

**Tabelle 20: Wahre Zugfestigkeit  $\sigma_{max}$ , Bruchdehnung  $\epsilon_{max}$ , Elastizitätsmodul  $E$  und Zähigkeit  $U_T$  elektrostatisch gesponnener PA6-Garne bei Variation der Luftfeuchtigkeit.**

Luftfeuchtigkeit	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (MPa)	$U_T$ (MJ/m <sup>3</sup> )
<b>10 % r.H.</b>	84,6 ± 4,7	16,3 ± 0,5	0,71 ± 0,15	7,5 ± 1,4
<b>30 % r.H.</b>	81,1 ± 5,4	20,0 ± 1,5	0,57 ± 0,07	8,7 ± 0,7
<b>80 % r.H.</b>	69,6 ± 4,6	28,8 ± 1,9	0,38 ± 0,10	10,8 ± 1,1

Carrascal et al. <sup>[329]</sup> zeigten anhand von PA6/Glasfaser-Kompositen, dass der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Mechanik bei Übersteigen eines Feuchtigkeitsgehalts von ca. 3 % w/w nur noch gering ist. Es wird vermutet, dass die Molekülketten aufgrund der Wasseraufnahme und der damit verbundenen Lösung der intermolekularen Wasserstoffbrücken ab einem gewissen Grad der

Hydratation nur noch eine Annäherung an ihre maximale Mobilität erfahren. Ein Zeiteffekt der Wasserabsorption wie er für PA6-Zugstäbe (4 mm dick) dokumentiert wurde<sup>[327]</sup> kann bei den Garnen ausgeschlossen werden, da für PA6-Fasern ( $\varnothing$  ca. 4  $\mu\text{m}$ ) eine Equilibrierungszeit (95 % des Maximalwertes) von nur 12 s gemessen wurde.<sup>[330]</sup> Die hier verwendeten Fasern waren zudem wesentlich dünner und wurden für 2 min equilibriert, bevor sie gemessen wurden. Somit kann erklärt werden, warum bei den dynamischen Zugversuchen von PA6-Garnen zwar ein deutlicher Unterschied zwischen  $\sigma_{max}$  (30 % r.H.) und  $\sigma_{max}$  (60 % r.H.) besteht, eine weitere Feuchtigkeitzufuhr auf 80 % r.H. jedoch keine signifikante Änderung bewirkt.

Anhand des Literaturabgleichs der verwendeten Polymere wurde somit der Einfluss der hier verwendeten Morphologie gezeigt (Erhöhung der Stabilität durch Verdrillen der Fasern), sowie methodenübergreifend das feuchtigkeitssensitive Verhalten der exemplarisch untersuchten Polymere nachgewiesen. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse werden im Folgenden die mechanischen Daten der eADF4-Fasergarne diskutiert.

### 4.3.2 Mechanische Eigenschaften von eADF4(C16)-Garnen

#### 4.3.2.1 Einfluss der Verarbeitungsmethode

Die mechanischen Eigenschaften von eADF4(C16)-Filmen wurden bereits von Spieß et al.<sup>[53]</sup> untersucht. Die Messungen wurden bei einer Luftfeuchtigkeit von 41 % r.H. durchgeführt. Unter Verweis auf die Abweichung der Umgebungsbedingungen werden die Daten mit den mechanischen Eigenschaften der eADF4(C16)-Garne bei 30 % r.H. verglichen (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** Zugfestigkeit  $\sigma_{max}$ , Bruchdehnung  $\epsilon_{max}$ , Elastizitätsmodul  $E$  und Zähigkeit  $U_T$  von Filmen und Garnen aus eADF4(C16) vor/nach Behandlung (die Filme wurden in Methanol getaucht und die Garne mit Ethanol bedampft).

	% r.H.	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (GPa)	$U_T$ (MJ/m <sup>3</sup> )
<b>eADF4(C16)-Film, unbehandelt</b>	41	42 ± 4	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,3	0,77 ± 0,13
<b>eADF4(C16)-Film, behandelt</b>	41	52 ± 3	1,8 ± 0,3	3,3 ± 0,5	0,30 ± 0,15
<b>eADF4(C16)-Garn, unbehandelt</b>	10	70,2 ± 7,6	6,8 ± 1,1	1,30 ± 0,22	2,5 ± 0,3
	30	62,9 ± 4,3	7,5 ± 1,0	1,16 ± 0,14	2,6 ± 0,3
	80	15,7 ± 1,5	37,6 ± 10,1	0,20 ± 0,09	4,2 ± 0,9
<b>eADF4(C16)-Garn, behandelt</b>	10	81,1 ± 8,9	5,1 ± 1,8	1,57 ± 0,16	1,9 ± 0,2
	30	64,7 ± 6,4	7,1 ± 0,5	1,21 ± 0,08	2,4 ± 0,7
	80	58,2 ± 12,9	69,3 ± 9,7	0,25 ± 0,09	18,5 ± 3,5

Im Vergleich zu den eADF4(C16)-Garnen war die Zugfestigkeit der Filme um 33 % (unbehandelt) und 20 % (behandelt) niedriger, die Dehnbarkeit 61 % (unbehandelt) und 75 % (behandelt) geringer, der Elastizitätsmodul 106 % (unbehandelt) und 172 % (behandelt) höher, sowie die resultierende Zähigkeit 70 % (unbehandelt) und 88 % (behandelt) niedriger.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die Ursache hierfür in der Verarbeitung und der resultierenden morphologischen Form liegt. Von Polymerkompositen mit kristallinen Komponenten ist bekannt, dass beim Faserspinnen gegenüber dem Foliengießen wesentlich höhere Dehnraten erreicht werden, was aufgrund der verbesserten Ausrichtung der Moleküle in den Fasern zur höheren Zugfestigkeit führt.<sup>[331]</sup> Auch die Seidenproteine sind aus kristallinen Bereichen aufgebaut, die sich innerhalb einer amorphen Matrix ausrichten können.<sup>[29]</sup> Da beim elektrostatischen Spinnen zunächst große Scherkräfte im Taylorkonus auftreten und die Faser anschließend im elektrischen Feld gedehnt wird, ist zu erwarten, dass dies die molekulare Ausrichtung der Proteine begünstigt. Somit lässt sich die höhere Zugfestigkeit, sowie Dehnbarkeit und Zähigkeit erklären. Gleichzeitig ist das molekulare Gefüge im Film aufgrund des höheren Kristallisationsgrades (siehe Kapitel 4.2.3.1) und seiner Unordnung steifer als die weniger kristalline, jedoch ausgerichtete Struktur in den Fasern. Aus den Zugkurven der eADF4-Garne (Kapitel 4.3.2.3) ist ersichtlich, dass sowohl bei unbehandelten, als auch bei nachbehandelten Garnen die Bruchdehnung bei niedriger Luftfeuchtigkeit zwischen 10 % r.H. und 30 % r.H. nur geringfügig zunimmt (Tabelle 21), was darauf schließen lässt, dass die Wasserabsorption zu gering ist, um die Wasserstoffbrücken der Struktur ausreichend zu lösen und die nötige Mobilität der Molekülketten zu bewirken. Es wird folglich vermutet, dass die Deformation bei niedriger Luftfeuchtigkeit primär durch Dehnung ungeordneter *Random Coil*-Strukturen auftritt. Auf Basis dieser Annahme lässt sich der höhere Elastizitätsmodul der Filme erklären, bei denen die Ketten ungeordnet vorliegen und bereits geringe Deformationen zum Bruch von Wasserstoffbrücken führen. Bei Fasern mit tendenziell ausgerichteten Strukturen tritt hingegen im niedrigen Deformationsbereich zunächst eine gleichgerichtete Entzerrung der amorphen Regionen auf, bevor es zum Bruch der Wasserstoffbrücken kommt. Dadurch treten im kleinen Deformationsbereich bei Fasern geringere Kräfte auf als bei Filmen, was sich im niedrigeren Elastizitätsmodul widerspiegelt (Abbildung 71). Zudem ist die Morphologie der Garne insofern mechanisch günstig, als dass sich Risse nur innerhalb einer einzelnen Faser ausbreiten können und nicht wie beim Film die gesamte Struktur betroffen ist. Anhand dieses Modells können die mechanischen Unterschiede von Filmen und elektrostatisch gesponnenen Fasern erklärt werden. Um diese Hypothese experimentell bestätigen zu können müssen zukünftig weitere Versuchsreihen durchgeführt werden, bei denen sowohl das mechanische Verhalten der Filme unter Variation der Luftfeuchtigkeit als auch die kristalline Ausrichtung in Filmen und Fasern vor- und nach der Belastung untersucht werden.

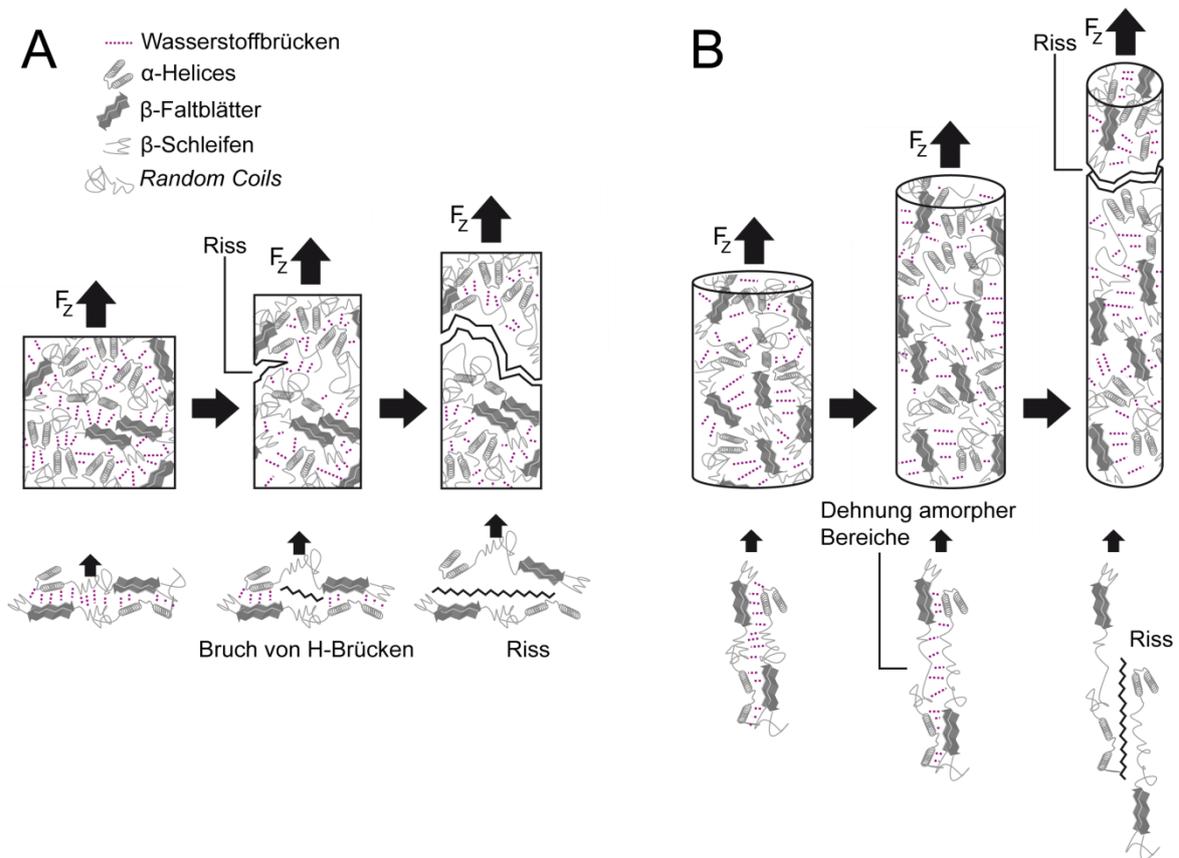


Abbildung 71: Strukturverhalten bei Deformation von Filmen (A) und Fasern (B): Bei Filmen kommt es bereits im niedrigen Deformationsbereich zu hohem mechanischen Widerstand durch Brechen von Wasserstoffbrücken, wohingegen die molekular ausgerichtete Struktur von Fasern eine Elongation der amorphen Bereiche ermöglicht.

#### 4.3.2.2 Einfluss der Nachbehandlung und Luftfeuchtigkeit

Anhand der Zugkurven konnte der Einfluss der Nachbehandlung sowie der Luftfeuchtigkeit auf die Mechanik von eADF4-Garnen nachvollzogen werden (Kapitel 3.3.2). Durch die Nachbehandlung kam es bei eADF4-Garnen erwartungsgemäß zu einer Zunahme des Elastizitätsmoduls aufgrund der erhöhten  $\beta$ -Faltblatt-Anteile. Als besonders interessant erwiesen sich jedoch vor allem die gemessenen Bruchdehnungen. Hier zeigte sich, dass zwischen Messungen bei 10 % r.H. und 30 % r.H. sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten eADF4-Garnen nur eine geringe Zunahme der Dehnbarkeit auftrat, wohingegen die Bruchdehnung bei 80 % r.H. um ein Vielfaches zunahm (Tabelle 21). Der signifikante Unterschied legitimiert eine strukturelle Fallunterscheidung des trockenen (10 % r.H. und 30 % r.H.) und feuchten (80 % r.H.) Zustandes. Plaza et al.<sup>[330]</sup> untersuchten den temperatur- und luftfeuchtigkeitsabhängigen Glasübergang von *A. trifasciata Dragline* anhand von mechanischen Messungen. Sie zeigten, dass sich die mechanischen Eigenschaften bei konstanter Temperatur und zunehmender Luftfeuchtigkeit zunächst nur schwach änderten, und erst ab einer

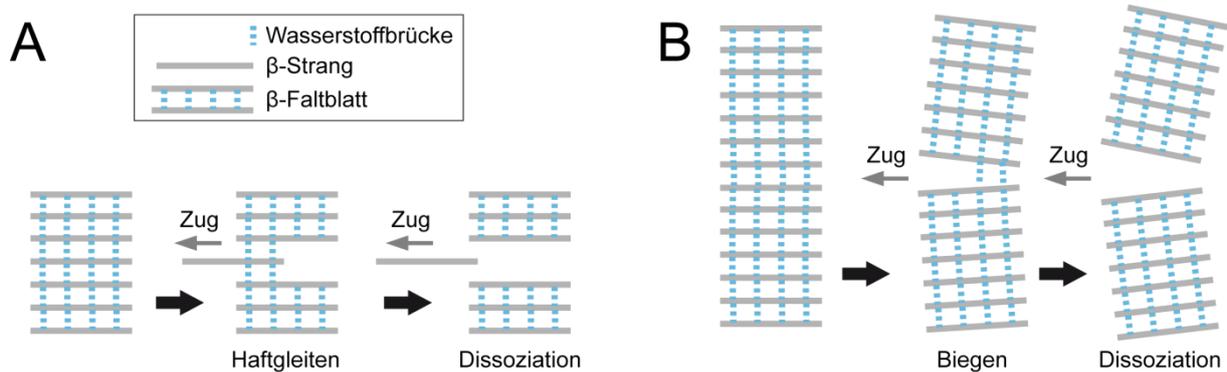
kritischen Luftfeuchtigkeit ein signifikanter Abfall des Elastizitätsmoduls auftrat, der auf die Störung der Wasserstoffbrücken zwischen den Molekülketten zurückgeführt wurde. Bei einer konstanten Temperatur von 20 °C fand dieser Übergang zwischen 70 % r.H. und 80 % r.H. statt. Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch die Analyse von *A. pernyi* Seiden, was den Rückschluss zulässt, dass es sich hierbei um ein für Seidenproteine charakteristisches Phänomen handelt.<sup>[332]</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten mechanischen Daten deuten darauf hin, dass bei eADF4-Fasern ein vergleichbarer Glasübergang stattfindet, der zur starken Abnahme des Elastizitätsmoduls und Zunahme der Bruchdehnung führt. Plaza et al.<sup>[330]</sup> stellten fest, dass die kritische Luftfeuchtigkeit in dem Bereich liegt, indem es zur für Spinnenseide charakteristischen Superkontraktion kommt. Auf diesen Punkt wird im nachfolgenden Kapitel 4.3.2.3 näher eingegangen. In Hinsicht auf die Nachbehandlung sind primär die folgenden beiden Beobachtungen von Interesse:

- Im feuchten Zustand kommt es bei unbehandelten Proben zu einem wesentlich stärkeren Abfall der Zugfestigkeit als bei behandelten Proben.
- Die Zunahme der Bruchdehnung im feuchten Zustand ist bei behandelten Garnen signifikant größer als bei unbehandelten Garnen.

Dieses unterschiedliche Materialverhalten führte dazu, dass die Zähigkeit der nachbehandelten eADF4-Garne um ein Vielfaches höher war, als die der unbehandelten Proben. Die Beobachtungen wurden anhand von AFM-Messungen an eADF4(C16)-Einzelfasern (Kapitel 3.3.4) bestätigt, obgleich beachtet werden muss, dass die absoluten mechanischen Daten in ihrer Größenordnung zum Teil signifikant von denen der Zugmessungen an Garnen abwichen. Es wird darauf hingewiesen, dass die Methode noch nicht vollständig etabliert ist und im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich als zusätzliches Verfahren angewandt wurde, um eventuelle Effekte der Garn-Morphologie beurteilen zu können. Ein methodeninterner Vergleich unbehandelter und behandelter Fasern zeigt jedoch eine hochgradige Analogie zu den Zugmessungen an eADF4-Garnen, was abermals bestätigt, dass die beobachteten Effekte maßgeblich auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine zurückzuführen sind.

Um das Phänomen der erhöhten Zugfestigkeit nach der Behandlung und bei 80 % r.H. zu erklären, wurde das Strukturmodell von Abbildung 71, B (Kapitel 4.3.2.1) für den feuchten Zustand erweitert und eine Fallunterscheidung für die Belastung unbehandelter und behandelter Fasern aufgestellt (Abbildung 73). Das Modell baut auf die vielfach beschriebene Beobachtung auf, dass Proteine bei einem hohen Kristallisationsgrad intermolekulare  $\beta$ -Faltblätter ausbilden und somit eine gegen Wasser stabile physikalische Vernetzung stattfindet.<sup>[307,333-336]</sup> Keten et al.<sup>[337]</sup> untersuchten die

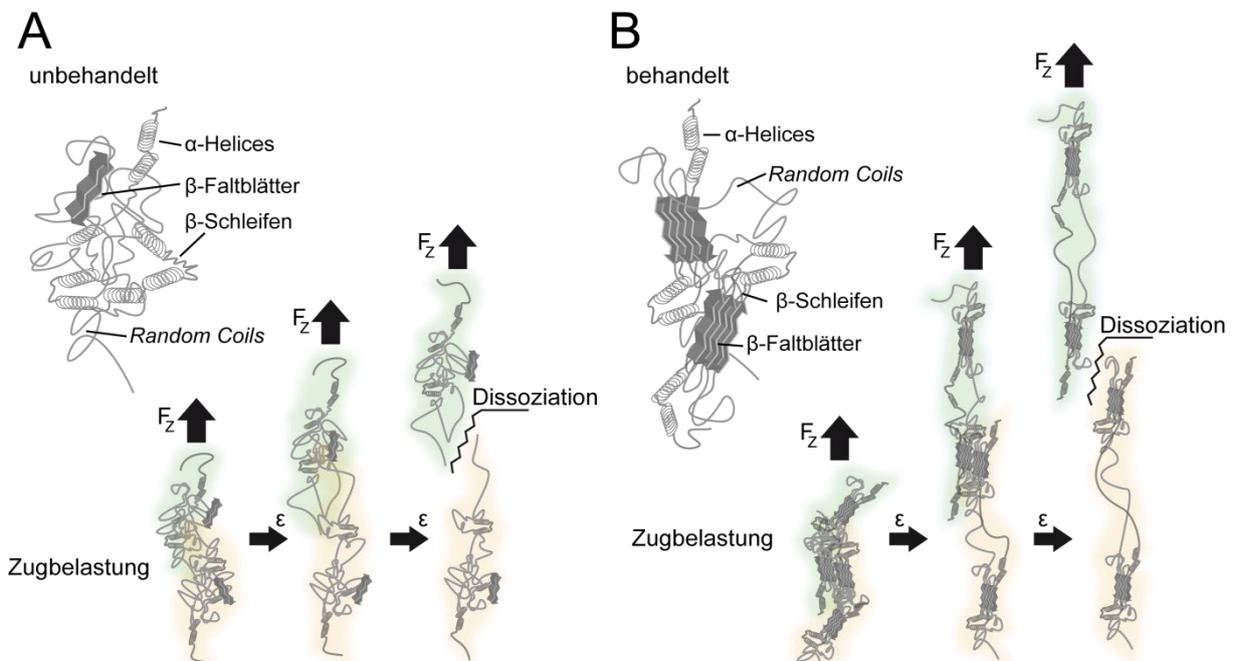
molekularen Vorgänge bei mechanischer Belastung von  $\beta$ -Faltblättern anhand von dynamischen Simulationen. Das Ziel der Untersuchungen lag darin, zu erklären, warum Spinnenseide eine hohe Zähigkeit aufweist, obwohl sie nur durch relativ schwache Wasserstoffbrücken vernetzt ist. Sie führten die hohe Energiedissipation auf einen Haftgleiteffekt innerhalb der  $\beta$ -Faltblätter zurück. Bei ausreichend großer Zugbelastung ausgerichteter  $\beta$ -Faltblätter kommt es zum Bruch von Wasserstoffbrücken und die Ketten gleiten zunächst aneinander vorbei, bis sich versetzt neue Wasserstoffbrücken ausbilden. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis die Ketten komplett dissoziiert sind, wodurch in Summe wesentlich mehr Wasserstoffbrücken gelöst werden müssen, als ursprünglich an der Struktur beteiligt waren (Abbildung 72, A). Ferner zeigten sie, dass der Effekt durch die Höhe und Länge der  $\beta$ -Faltblätter limitiert ist. Durch Stapelung vieler  $\beta$ -Faltblätter in die Höhe tritt bei Belastung eine signifikante Beugung der Struktur auf, wodurch die Wasserstoffbrücken reißverschlussartig nacheinander brechen (Abbildung 72, B).



**Abbildung 72:** Verhalten bei Zugbelastung von  $\beta$ -Faltblättern mit geringer Höhe (A) im Vergleich zu hoch gestapelten  $\beta$ -Faltblättern (B). (Abbildung vereinfacht nach Simulationsmodell von Keten et al.<sup>[337]</sup>)

In Bezug auf die Länge der  $\beta$ -Faltblätter wurde gezeigt, dass die kooperative Kraftaufnahme von Wasserstoffbrücken in Reihe nur über eine kritische Länge von ca. 4 Brücken funktioniert, da bei längeren  $\beta$ -Faltblättern aufgrund der molekularen entropischen Elastizität der Ketten lokale Defekte auftreten.<sup>[338]</sup> Auf Basis von AFM-Messungen an einer Proteindomäne mit zwei verschiedenen großen Clustern aus Wasserstoffbrücken (2 und 6 Wasserstoffbrücken), wurde das Modell experimentell bestätigt, da die Dissoziationsenergie bei 6 Wasserstoffbrücken nur ca. 1,5 mal so groß war wie bei 2 Wasserstoffbrücken.<sup>[339]</sup> Unter der Annahme, dass Wasserstoffbrücken in  $\beta$ -Faltblättern in Clustern von 3-4 Brücken brechen, wurde eine Energiebarriere zum Ziehen eines  $\beta$ -Strangs aus dem Faltblatt von 9,64 kcal/Mol berechnet.<sup>[338]</sup> Diese Energie liegt weit unter der Energie, die erforderlich wäre um kovalente Bindungen (50-110 kcal/Mol)<sup>[340]</sup> der Proteinketten zu lösen, was darauf schließen lässt, dass das Materialversagen allein auf die Dissoziation von Wasserstoffbrücken zurückgeführt werden

kann, wobei sich zunächst die Bereiche der  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Schleifen entfalten, bevor es schließlich zur Zerstörung kristalliner Strukturen kommt.<sup>[341,342]</sup> Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich das Strukturmodell für den Belastungsfall an unbehandelten sowie nachbehandelten eADF4-Fasern folgendermaßen aufstellen. Bei unbehandelten Proben findet aufgrund des geringen  $\beta$ -Faltblatt-Anteils ( $10,9 \pm 1,5 \%$ ) keine oder kaum eine intermolekulare Vernetzung kristalliner Strukturen statt. Im Belastungsfall können sich die amorphen Bereiche daher nur so weit entzerren, bis die physikalischen Wechselwirkungen zwischen den Proteinketten der Belastung nachgeben und die Moleküle dissoziieren. Diese Strukturdefekte breiten sich makroskopisch aus bis es zum Reißen der Faser kommt. Erst durch die Nachbehandlung wird eine stabile intermolekulare physikalische Vernetzung durch den hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern ( $35,3 \pm 1,3$ ) induziert. Im Gegensatz zu den Wasserstoffbrücken, die sich in den amorphen Bereichen ausbilden, sind die dichteren kristallinen Strukturen gegen Wasser stabil und bleiben somit auch bei hoher Luftfeuchtigkeit erhalten. Durch das stabile Netzwerk kommt es bei Zugbelastung zu einer größeren Kraftaufnahme, die wiederum dazu führt, dass sich amorphe Bereiche (*Random Coils*,  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Schleifen) weiter entzerren können (Abbildung 73). Dieses Phänomen führt makroskopisch zu einer größeren Bruchdehnung und höheren Zugfestigkeit nachbehandelter Proben, was anhand der Zugmessungen nachbehandelter eADF4-Garne experimentell bestätigt wurde.



**Abbildung 73:** Strukturmodell für den Belastungsfall unbehandelter (A) und nachbehandelter (B) eADF4-Fasern. Bei unbehandelten Fasern besteht kaum/keine intermolekulare Vernetzung durch  $\beta$ -Faltblätter, während es bei nachbehandelten Proben zur kristallinen Vernetzung und somit Stabilisierung der Gesamtstruktur kommt.

Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Ethanolbehandlung elektrostatisch gesponnener *B. mori* Fibroin-Fasern veröffentlicht, wobei ebenfalls eine Zunahme der Bruchdehnung und Zugfestigkeit verzeichnet wurde, jedoch ohne Angabe der Luftfeuchtigkeit. Bei Messungen unter Wasser kam es im Vergleich zu trocken gemessenen Fasern analog zu den hier vorgestellten Ergebnissen zu einer signifikanten Zunahme der Bruchdehnung unter Abnahme der Zugfestigkeit.<sup>[343]</sup> Zugmessungen, die bei 50 % r.H. mit elektrostatisch gesponnenen *B. mori* Fibroinfasern durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls eine Zunahme der Zähigkeit und Zugfestigkeit mit dem Grad der Kristallinität.<sup>[62]</sup> Die publizierten Daten erlauben die Annahme, dass die Mechanismen des vorgestellten Strukturmodells auch für andere Seidenproteine gültig sind.

#### 4.3.2.3 Vergleich von eADF4-Fasern mit natürlicher *Dragline*-Seide

Bei natürlicher *Dragline*-Seide wurden unter Einfluss von Feuchtigkeit zwei charakteristische Phänomene beschrieben – Erweichung des Materials sowie Superkontraktion. Wie bereits erörtert (Kapitel 4.3.2.2) werden durch Absorption von Wasser die intermolekularen Wasserstoffbrücken der amorphen Bereiche in Seidenproteinen gelöst und die Molekülketten werden mobiler.<sup>[344]</sup> Wasser wirkt somit als natürlicher Weichmacher, was sich in den mechanischen Eigenschaften der Seide widerspiegelt.<sup>[345,346]</sup> Natürliche *Dragline* Seide ist in der Lage Wasser stark zu binden, was anhand von *Nephila Dragline* demonstriert wurde, die nach dem Trocknen im Exsikkator noch einen Wassergehalt von 6 - 7 % w/w aufwies.<sup>[347]</sup> Ferner wurde gezeigt, dass der Wassergehalt der *Dragline* von *Nephila senegalensis* bei 80 % r.H. auf ca. 66 % w/w ansteigt, was die mechanischen Eigenschaften der Fasern deutlich beeinflusst.<sup>[348]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Feuchtigkeitssensitivität von eADF4-Garnen mit der des natürlichen Vorbilds, der *Dragline* von *A. diadematus*, verglichen. Die mechanischen Eigenschaften, die hier für *A. diadematus Dragline* gemessen wurden (bei 30 % r.H.) stehen insbesondere in Hinsicht auf ihre Zähigkeit in guter Korrelation zu den Werten, die von Gosline et. al.<sup>[349]</sup> beschrieben wurden (Tabelle 22). Keerl und Scheibel<sup>[350]</sup> zeigten, dass die mechanischen Eigenschaften von *A. diadematus Dragline* stark von der Abziehgeschwindigkeit der Seide aus der Spinndrüse abhängen, und führten dieses Verhalten auf die verbesserte molekulare Ausrichtung aufgrund erhöhter Scherkräfte und des Nachdehnens zurück. Da die mechanischen Eigenschaften jedoch auch von Alter und Haltungsbedingungen (Ernährung, Umgebungsbedingungen etc.) der Spinnen abhängen, können Einflüsse wie Abziehgeschwindigkeit und Luftfeuchtigkeit nur auf Basis von Messungen an einzelnen Tieren intern ermittelt werden. Versuchsreihenübergreifend können jedoch Tendenzen verglichen werden, wobei Keerl und

Scheibel<sup>[350]</sup> ebenfalls das Materialerweichen mit zunehmender Luftfeuchtigkeit beobachteten (Tabelle 22). Madsen et al.<sup>[351]</sup> verwendeten bei der Gewinnung natürlicher *A. diadematus Dragline*, wie auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, eine Abziehggeschwindigkeit von 3 cm/s und führten Zugmessungen bei 50 % r.H. durch. Die mechanischen Daten stehen in sehr guter Korrelation zu den hier ermittelten Werten. Vehoff et al.<sup>[348]</sup> machten vergleichbare luftfeuchtigkeitsabhängige Zugmessungen mit *N. senegalensis Dragline* und dokumentierten dasselbe Verhalten wie es hier für *A. diadematus Dragline* aufgeführt wurde (Tabelle 22). Dabei stimmen sowohl der Trend als auch die Größenordnung der mechanischen Veränderungen speziesübergreifend überein, was eine deutliche Indikation dafür ist, dass es sich bei der Feuchtigkeitssensitivität um ein charakteristisches Merkmal von *Dragline* Seidenproteinen handelt.

**Tabelle 22: Vergleich der hier ermittelten mechanischen Eigenschaften von *A. diadematus Dragline* mit Werten aus der Literatur. Die jeweiligen Abziehggeschwindigkeiten bei der Fadengewinnung sind, sofern bekannt, in der ersten Spalte in Klammern angegeben. (mechanische Parameter: Zugfestigkeit  $\sigma_{max}$ , Bruchdehnung  $\epsilon_{max}$ , Elastizitätsmodul  $E$ , Zähigkeit  $U_T$ , Bruchkraft  $F_B$ , Brucharbeit  $W_B$ )**

	r.H. (%)	$\sigma_{max}$ (MPa)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (GPa)	$U_T$ (MJ/m <sup>3</sup> )
<b><i>A. diadematus</i> (3 cm/s)</b> <b>(diese Arbeit)</b>	10	1108,1 ± 35,1	24,2 ± 1,3	8,65 ± 0,78	152,6 ± 13,4
	30	1058,7 ± 142,3	26,7 ± 1,4	6,46 ± 1,28	155,9 ± 31,6
	80	855,3 ± 98,1	43,1 ± 6,7	1,00 ± 0,17	157,0 ± 19,4
<b><i>A. diadematus</i></b> <b>(Gosline et al.)<sup>[349]</sup></b>	---*	1100	27	10	160
<b><i>A. diadematus</i> (20 cm/s)</b> <b>(Keerl und Scheibel)<sup>[350]</sup></b>	30	1255,8 ± 317,2	26,7 ± 3,9	---*	---*
	70	1147,7 ± 186	30,8 ± 3,8	---*	---*
<b><i>A. diadematus</i> (3 cm/s)</b> <b>(Madsen et al.)<sup>[351]</sup></b>	50	1080 ± 160	28 ± 4	6,9 ± 1,22	---*
	r.H. (%)	$F_B$ (mN)	$\epsilon_{max}$ (%)	$E$ (GPa)	$W_B$ (μJ)
<b><i>N. senegalensis</i></b> <b>(Vehoff et al.)<sup>[348]</sup></b>	25	44,4 ± 2,7	18,9 ± 2,0	10,5 ± 0,6	40,6 ± 5,7
	44	40,3 ± 3,6	24,2 ± 2,8	7,8 ± 0,4	46,0 ± 8,9
	80	33,0 ± 3,1	34,6 ± 2,5	1,4 ± 0,5	39,3 ± 6,4

\* nicht angegeben

Bei den eADF4-Garnen waren dieselben Trends zu sehen wie beim natürlichen Seidenfaden von *A. diadematus*. Um den Umfang der mechanischen Reaktion der Proben zu veranschaulichen, sind in Tabelle 23 die prozentualen Veränderungen, die durch die Luftfeuchtigkeitssteigerung von 10 % r.H. auf 80 % r.H. auftraten, dargestellt.

**Tabelle 23:** Prozentuale Zu- (+), bzw. Abnahme (-) mechanischer Werte bei Steigerung der Luftfeuchtigkeit von 10 % r.H. auf 80 % r.H. (Änderung der Zugfestigkeit  $\Delta\sigma_{10-80}$ , Bruchdehnung  $\Delta\varepsilon_{10-80}$ , des Elastizitätsmoduls  $\Delta E_{10-80}$ , der Zähigkeit  $\Delta U_{T,10-80}$ ).

	$\Delta\sigma_{10-80}$ (%)	$\Delta\varepsilon_{10-80}$ (%)	$\Delta E_{10-80}$ (%)	$\Delta U_{T,10-80}$ (%)
<i>A. diadematus, Dragline</i>	-23	+44	-88	+3
eADF4(C16), unbehandelt	-78	+82	-85	+40
eADF4(C16),behandelt	-28	+93	-86	+90
eADF4(C32NR4),unbehandelt	-62	+73	-67	+28
eADF4(C32NR4), behandelt	-39	+90	-60	+89

Wenn auch die Tendenzen bei allen Proben erwartungsgemäß gleich waren, so geht aus dem Vergleich deutlich hervor, dass elektrostatisch gesponnene Garne wesentlich feuchtigkeitssensitiver reagierten als die natürliche Seide. Die Ursache dafür liegt vermutlich primär an der Zugänglichkeit der Sekundärstrukturelemente für Wasser. Außerdem ist im Gegensatz zu den eADF4-Garnen, die jeweils ausschließlich aus einem Protein bestehen, die natürliche *Dragline*-Seide aus mindestens zwei Proteintypen (MaSP1 und MaSP2) aufgebaut, welche einen Kern bilden, der von einer Schicht aus Lipiden, Glykoproteinen oder anderen Seidenproteinen ummantelt ist.<sup>[41]</sup> Es wird vermutet, dass die unpolare Lipide die Feuchtigkeitszu- und abfuhr aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften beeinträchtigen. Bei eADF4-Garnen hingegen wird die Feuchtigkeitsaufnahme zusätzlich durch das große Oberflächen-Volumenverhältnis der Submikrofasern beschleunigt.

Das Superkontraktionsverhalten der *A. diadematus Dragline* sowie der eADF4-Garne wurde durch kontinuierliches Bedampfen und Entfeuchten der Messkammer untersucht. Die Fasern wurden dazu im entspannten Zustand fixiert und die Spannungsaufnahme aufgrund der Kontraktion gemessen. Pérez-Rigueiro et al.<sup>[352]</sup> untersuchten das Superkontraktionsverhalten, indem sie *Dragline*-Fäden bekannter Länge in einer Zugmaschine so fixierten, dass die Fäden zunächst lose durchgingen. Durch Eintauchen in Wasser kam es zur kontrollierten Superkontraktion, das heißt die Fäden zogen sich zunächst zusammen bis sie die, aufgrund der Fixierung vorgegebene, Länge erreichten und brachten im weiteren Verlauf durch die inhibierte Kontraktion eine messbare Kraft an der Zugmaschine auf. In diesem Zustand wurden sie getrocknet und anschließend der Abstand in der Zugmaschine soweit verringert bis keine Kraft mehr anlag. Der Vorteil dieser Methode gegenüber dem einfachen Messen der Längenänderung beim Eintauchen,<sup>[353]</sup> liegt darin, dass der Grad der Superkontraktion eingestellt werden kann, da die Fasern aufgrund der einstellbaren Fixierungsabstände in ihrer Längenänderung limitiert werden. Durch Zugmessungen, welche an unterschiedlich stark kontrahierten Fasern durchgeführt wurden, konnte somit der zunehmende Einfluss der Superkontraktion (Abnahme der Steifigkeit) auf die mechanischen Fasereigenschaften gemessen werden. Um jedoch genauere

Informationen über den Übergang vom Ausgangszustand zum kontrahierten Zustand, sowie die Feuchtigkeitssensibilität nach der Superkontraktion zu erhalten, wird häufig die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode der dynamischen Luftfeuchtigkeitsänderung bei statischer Deformation und gleichzeitiger Kraftmessung angewandt. Blackledge et al.<sup>[231]</sup> führten derartige Versuche mit *N. clavipes Dragline* durch. Dabei kam es analog zu den hier vorgestellten Messverläufen von *A. diadematus Dragline* bei initialer Befeuchtung zu einer Spannungsaufnahme der Fasern aufgrund von Superkontraktion, auf die eine zyklische Spannungszu- und abnahme mit sinkender und steigender Luftfeuchtigkeit folgte. Die gemessene Kontraktionsspannung bei *N. clavipes*-Seide betrug ca. 100 MPa, während bei *A. diadematus*-Seide etwa 60 MPa gemessen wurden. Die Werte repräsentieren in gutem Maß den dokumentierten mechanischen Unterschied der beiden Seidentypen von ca. Faktor 1,5, wodurch die Plausibilität der Messergebnisse bestätigt wird.<sup>[354]</sup> Interessant war bei den Messungen an eADF4-Garnen vor allem der Einfluss der Nachbehandlung. Bei unbehandelten Fasern setzte die Superkontraktion bei einer niedrigeren Luftfeuchtigkeit ein als bei behandelten Fasern, was eine Indikation dafür ist, dass durch den höheren kristallinen Anteil die Glasübergangstemperatur stieg. Diese Annahme wird durch Literaturangaben gestützt, in denen vergleichbare Ergebnisse bei der Nachbehandlung von *B. mori* Fibroin erzielt wurden.<sup>[355]</sup> Die zweite Beobachtung ist, dass es bei behandelten Proben zu einer irreversiblen Spannungszunahme im Laufe der Be- und Entfeuchtungszyklen kommt. Das Phänomen kann unter Einbezug der aufgeführten Literaturangaben durch eine Erweiterung des aufgestellten Strukturmodells für unbehandelte und behandelte eADF4-Garne (Abbildung 73) folgendermaßen beschrieben werden. Aufgrund der Zugmessungen wurde geschlossen, dass die Nachbehandlung zu einer intermolekularen physikalischen Vernetzung führt, die stabil gegen Feuchtigkeitseinflüsse ist. Nach dem Strukturmodell von Blackledge et al.<sup>[231]</sup> kommt es durch Wasserzufuhr zur Mobilisierung der Proteinketten. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass dadurch die Ausbildung, bzw. Assemblierung von  $\beta$ -Faltblättern induziert wird.<sup>[62,356]</sup> Somit kann gefolgert werden, dass es beim Be- und Entfeuchten nachbehandelter eADF4-Garne zu einer Zunahme der intermolekularen physikalischen Quervernetzung kommt. Durch Feuchtigkeitzufuhr erreichen die Moleküle die nötige Mobilität, um sich auszurichten und durch Dehydration wird das Material so verdichtet, dass die Assemblierung zu intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern stattfinden kann. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus bei eADF4(C16) aufgrund der kürzeren und daher beweglicheren Ketten begünstigt wird, weshalb der Effekt hier besonders ausgeprägt war, wohingegen eADF4(C32NR4) aufgrund seines Molekulargewichts und der kovalenten Bindung, vermittelt durch die carboxyterminale Domäne, wesentlich unflexibler ist. Gestützt wird diese Theorie zusätzlich durch die Ergebnisse, die aufgrund des Nachdehnens beim Nassspinnen erzielt wurden. Um die Fasern mechanisch zu

stabilisieren mussten sie im feuchten Milieu nachgestreckt und beim Trocknen im gestreckten Zustand gehalten werden. Es wird vermutet, dass in diesem Schritt, analog zum hier vorgestellten Modell, eine Zunahme dicht gepackter intermolekularer kristalliner Strukturen induziert wird, wie sie auch von An et al. beim Nachdehnen ihrer rekombinanten Spinnenseidenproteine verzeichnet wurden.<sup>[58]</sup> Dabei spielt das Lösungsmittel eine essentielle Rolle. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die mechanisch stabilsten Fasern beim Nassspinnen wässriger Proteinlösungen erzielt werden. Beim natürlichen Faserspinnprozess der Spinne wird ebenfalls eine wässrige Lösung versponnen, wobei es bereits im Spinnkanal zu einer scherinduzierten Vorassemblierung der Proteinketten kommt.<sup>[29,357]</sup> Du et al.<sup>[358]</sup> zeigten, dass eine Erhöhung der Abzugsgeschwindigkeit beim Ziehen eines *Dragline* Fadens aus der Spinne die Ausrichtung und Größe kristalliner Bereiche im Proteinnetzwerk und somit die mechanischen Eigenschaften verbessern kann. Aufgrund der in Kapitel 4.1.3 erörterten Eigenschaften des beim elektrostatischen Spinnen verwendeten Protein/Lösungsmittelsystems kann geschlossen werden, dass es zwar zu einer molekularen Ausrichtung, jedoch nicht zu einer mit dem natürlichen System vergleichbaren Vorassemblierung kommen kann, da diese aufgrund des Lösungsmittels HFIP inhibiert wird. Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Nassspinnverfahren führte zu wesentlich besseren Resultaten, da hier aufgrund des wässrigen Systems eine Vorassemblierung der Proteinketten möglich war, wobei das Nachstrecken, wie bei der Spinne, einen entscheidenden Beitrag zur mechanischen Stabilisierung der Fasern leistete. Aufbauend auf diesen Versuchen wurde von Aniela Heidebrecht der Einfluss der nichtrepetitiven Domänen auf die Vorassemblierung untersucht und es konnten erstmalig Fasern hergestellt werden, die eine vergleichbare Zähigkeit wie die der natürlichen *Dragline* Seide von *A. diadematus* aufwiesen.<sup>[229]</sup>

Wenn auch die elektrostatisch gesponnenen Fasern aus HFIP den nassgesponnenen Fasern aus wässrigen Lösungen in ihren mechanischen Eigenschaften unterlegen sind, so öffnen sie dennoch aufgrund ihrer submikro-/nanoskopischen Morphologie ein neues Anwendungsfeld für rekombinante Spinnenseidenproteine (Kapitel 4.4).

## **4.4 Potentielle Anwendungen elektrostatisch gesponnener Seidenproteinfasern**

### **4.4.1 Medizinische Anwendungen**

Von natürlicher Spinnenseide ist seit langem bekannt, dass sie biokompatibel ist und im Körper abgebaut werden kann.<sup>[31,32]</sup> In Kombination mit ihren exzellenten mechanischen Eigenschaften gilt sie als ein ideales Material für den Einsatz im medizinischen Bereich. Sie bietet eine attraktive

Alternative zu synthetischen Polymeren, von denen bekannt ist, dass häufig nach Implantation unerwünschte Nebenreaktionen auftreten können. Vielseitig eingesetzt werden beispielsweise Polyglykolsäure (PGA) und Polymilchsäure (PLA), wobei gesehen wurde, dass bei der Verwendung dieser Materialien für die Geweberekonstruktion eine Dedifferenzierung von körpereigenen Zellen auftreten kann. Dies hat zur Folge, dass der Wiederaufbau der extrazellulären Matrix durch die Zellen nicht im gewünschten Umfang stattfindet.<sup>[359]</sup> Zudem kommt es häufig zum Verlust der mechanischen Eigenschaften, und es können aufgrund der Degradation (z.B. bei PLA) saure Abbauprodukte entstehen.<sup>[360]</sup> Ferner werden bioabbaubare Polymere im Körper oft zu schnell degradiert (1-2 Monate), um den Zellen lange genug als Stützgewebe zur Herstellung einer körpereigenen extrazellulären Matrix zu dienen.<sup>[361]</sup> Schäfer-Nolte et. al.<sup>[362]</sup> stellten in vivo (Ratte, prävertebrale Faszie) einen direkten Vergleich zwischen kommerziell erhältlichen Geweben zur Stabilisierung von Leistenbrüchen und Geweben aus natürlicher *Dragline* Seide her. Sie verzeichneten eine bessere Zellmigration bei Verwendung der Spinnenseidengewebe und zeigten, dass der Abbau des Seidengewebes erst nach 4 Wochen einsetzte. Nach 4 Monaten war die Spinnenseide komplett durch körpereigenes Gewebe ersetzt worden. Beim Einsatz von gereinigtem *B. mori* Fibroin hingegen wurden in der Literatur zum Teil negative Ergebnisse bezüglich der Biokompatibilität beschrieben, was auf Rückstände des Klebproteins Sericin zurückgeführt wurde.<sup>[32,363]</sup> Für eine medizinische Studie wurde Serum von neun Personen, die allergisch auf *B. mori* Seide reagierten, entnommen und die Bindungsaktivität der Antikörper (IgE und IgG) auf verschiedene Polypeptide (Molekulargewicht: 14 - 70 kDa), die aus nativer *B. mori* Seide extrahiert wurden, untersucht. Durch einen Westernblot wurde gezeigt, dass die allergenen Polypeptide primär der Sericin-Fraktion zugeordnet werden können.<sup>[364]</sup> Ferner wurde in vitro nachgewiesen, dass die Aktivität von Makrophagen, die zuvor mit bakteriellen Lipopolysacchariden stimuliert wurden, in Anwesenheit von Sericin stark zunahm, was ebenfalls als Indikation für die Immunantwort im Organismus angesehen wird.<sup>[365]</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der morphologischen Beschaffenheit von eADF4(C16)-Vliesen auf das Wachstumsverhalten von Fibroblasten untersucht. Dabei wurde sowohl bei den Adhäsions- als auch bei den Proliferationsversuchen ein signifikanter Einfluss der Faserdurchmesser auf das Zellwachstum verzeichnet.<sup>[228]</sup> Vergleichbare Ergebnisse wurden von Kumbar et al.<sup>[366]</sup> anhand von elektrostatisch gesponnenem Polylactid-co-Glycolid (PLGA) veröffentlicht. Sie ermittelten die idealen Wachstumsbedingungen für Zellen auf Fasern mit Durchmessern im Bereich von 350-1100 nm, was in sehr guter Korrelation zu den hier vorgestellten Ergebnissen steht. Anhand der REM- und TEM-Untersuchungen wurde aufgeführt, dass Fibroblasten auf eADF4(C16)-Vliesen mit Faserdurchmessern von 480-680 nm durch Adhäsion an Fasern spreizen. Es konnte zudem eine

Zellmigration in Vliese mit großen Faserdurchmessern beobachtet werden, wobei sich Zellen durch Filopodien physikalisch im Vlies verankerten und in die Vlieszwischenräume wanderten. Dieses Adhäsionsverhalten wurde ebenfalls auf Vliesen aus *B. mori* Fibroin dokumentiert.<sup>[367]</sup> Die schlechte Zelladhäsion auf glatten eADF4(C16)-Oberflächen wurde von Hardy et al.<sup>[368]</sup> auf die negative Proteinladung zurückgeführt, die die Anlagerung von Proteinen der extrazellulären Matrix inhibiert.

Aufgrund der hier gezeigten kontrollierbaren Zelladhäsion wären beispielsweise Wundauflagen aus dünnen Fasern (150 nm) denkbar, die während der Heilung nicht ins Gewebe integriert werden, also wieder abgezogen werden können, und aufgrund ihrer feinporigen Struktur eine gute Keimbarriere darstellen.<sup>[369]</sup> Die Fähigkeit der Proteine, schnell Feuchtigkeit aufzunehmen, und bei Änderung der Umgebungsbedingungen wieder abzugeben (Kapitel 4.3.2.3), könnte bei Wundauflagen zur Aufnahme von Wundexsudat auf der Unterseite und Abdampfen der Feuchtigkeit auf der Oberseite genutzt werden. Ferner könnten dickere Proteinfasern (680 nm) für die Geweberekonstruktion eingesetzt werden, da sie den Zellen eine gute Wachstumsgrundlage bieten. Aufgrund der mechanischen Untersuchungen an Garnen wird vermutet, dass die schichtweise orthogonale Auftragung alignierter Fasern zu ausreichend stabilen Geweben für den Hautersatz führen kann.

### 4.4.2 Technische Anwendung in der Filtration

In dieser Arbeit wurden im Rahmen eines anwendungsorientierten Industrieprojekts eADF4(C16)-Vliese auf ihre Eignung als Filtermedien geprüft. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass elektrostatisch gesponnene Polymerfasern vielfältig für Filtrationsanwendungen eingesetzt werden können.<sup>[370]</sup> Kritisch wird hingegen betrachtet, dass derartige Fasern, wenn sie zu kurzen Fragmenten brechen, lungengängig und im schlimmsten Falle biopersistent sein könnten.<sup>[371]</sup> Andererseits wurden bereits Ansätze verfolgt, um elektrostatisch gesponnene Faserfragmente aus biokompatiblen Polymeren gezielt für Inhalationstherapien einzusetzen.<sup>[372]</sup> Da eADF4-Proteine aus Aminosäuren aufgebaut sind und somit vom Körper abgebaut werden können, darf davon ausgegangen werden, dass die Verwendung elektrostatisch gesponnener eADF4-Vliese im Vergleich zu Vliesen aus synthetischen Polymeren gesundheitlich unbedenklich ist.

Auf Grundlage etablierter Verfahren zur Filteranalytik konnte gezeigt werden, dass bereits unter geringem Materialaufwand von eADF4(C16) sehr gute Abscheideraten im Feinpartikelbereich bei anwendungsgerechter Luftdurchlässigkeit erreicht wurden. Die Ergebnisse, welche in dieser Arbeit mit elektrostatisch gesponnenen eADF4(C16)-Vliesen erzielt wurden, wiesen im Vergleich zu

Polymervliesen mit ähnlicher Morphologie und Belegung insbesondere für kleine Partikel ( $\varnothing$  0,3  $\mu\text{m}$ ) erheblich bessere Abscheideraten auf (Tabelle 24).

**Tabelle 24: Vergleich der hier ermittelten Abscheideraten von eADF4(C16)-Vliesen mit Ergebnissen, die anhand von vergleichbaren Vliesen und Messparametern generiert wurden.**

	Material	Faserdurchmesser (nm)	Belegung (g/m <sup>2</sup> )	Partikeldurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	Abscheiderate (%)
<b>diese Arbeit</b>	eADF4(C16)	120	0,13	0,3	92,6 %
				1	99,4%
<b>Heikkila et al.</b> <sup>[373]</sup>	PA66	120	0,1	0,3	74
				1	>90
<b>Li &amp; Frey</b> <sup>[374]</sup>	PA6	120	0,1	0,3	ca. 60
				1	ca. 88

Im Folgenden sollen nun die zugrundeliegende Vorgänge bei der hier angewandten Luftfiltration zunächst theoretisch erörtert und anschließend in den praktischen Zusammenhang mit den dokumentierten Beobachtungen gebracht werden. Im Allgemeinen wurden für die Luftfiltration neben dem einfachen Größenausschluss folgende Abscheidemechanismen in der Literatur beschrieben (Abbildung 74):<sup>[375]</sup>

- Diffusion: Kleine Partikel (< 100 nm) kollidieren aufgrund ihrer brownischen Bewegung mit Fasern und scheiden sich ab. Die Abscheiderate hängt bei diesem Mechanismus stark von der Anströmgeschwindigkeit ab.
- *Interception*: Partikel die sich einer Faser im Luftstrom in der Größenordnung oder kleiner ihres Radius nähern, neigen zur Adhäsion an der Oberfläche. Der Effekt wird vor allem bei Partikeln > 100 nm relevant und hängt stark vom Faserdurchmesser ab.
- *Impaction*: An der Krümmung der Stromlinien in der Nähe einer Faser verlässt ein Partikel aufgrund seiner Trägheit die Strömung und kollidiert mit der Faser, wo er haften bleibt. Dieser Effekt ist für Partikel in der Größenordnung mehrerer hundert Nanometer relevant.
- Elektrostatische Anziehung: Durch Ladungen von Partikeln und/oder Fasern kann es aufgrund von elektrostatischer Anziehung zur Partikelabscheidung kommen.

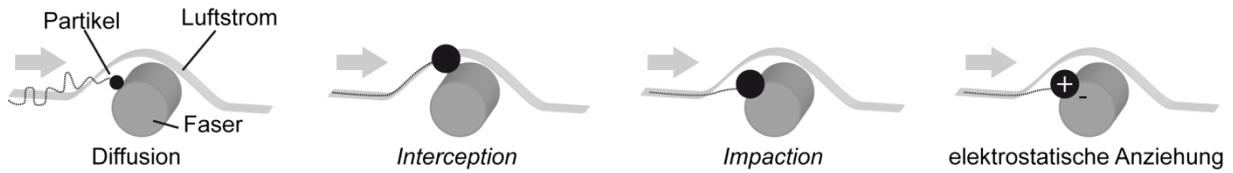


Abbildung 74: Mögliche Abscheidemechanismen bei der Luftfiltration: Diffusion, *Interception*, *Impaction* und elektrostatische Anziehung. (Abbildung wurde in Anlehnung an Quelle<sup>[376]</sup> angefertigt)

Auf Basis der physikalischen Gesetzmäßigkeiten dieser Mechanismen konnte ein mathematisches Modell erstellt werden, das die Abhängigkeit der Abscheiderate von der Partikelgröße beschreibt (Abbildung 75, A).<sup>[375]</sup> Aus der Auftragung wird deutlich ersichtlich, welche Abscheidemechanismen in welchem Partikelgrößenbereich dominieren. Ferner wurde der Einfluss der Faserdurchmesser des Filters auf den Kurvenverlauf aufgeführt (Abbildung 75, B).<sup>[377]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden Partikel im Größenbereich von 0,3 - 3  $\mu\text{m}$  auf eADF4-Vliesen mit Faserdurchmessern von ca. 120 nm abgeschieden. Der Messbereich der Partikeldurchmesser wurde in Abbildung 75, B gelb markiert. Betrachtet man die Kurve, die für Faserdurchmesser von 500 nm ermittelt wurde, so wird deutlich, dass die Abscheiderate im Messbereich von  $> 0,3 \mu\text{m}$  bereits sehr hoch und bei Partikeln  $> 0,6 \mu\text{m}$  bereits maximal ist. Dieses Verhalten beschreibt in sehr guter Weise die Kurven, die für Spinnenseidenvliese bei einer Belegung von  $130 \text{ mg/m}^2$  gemessen wurden (Abbildung 66, B).

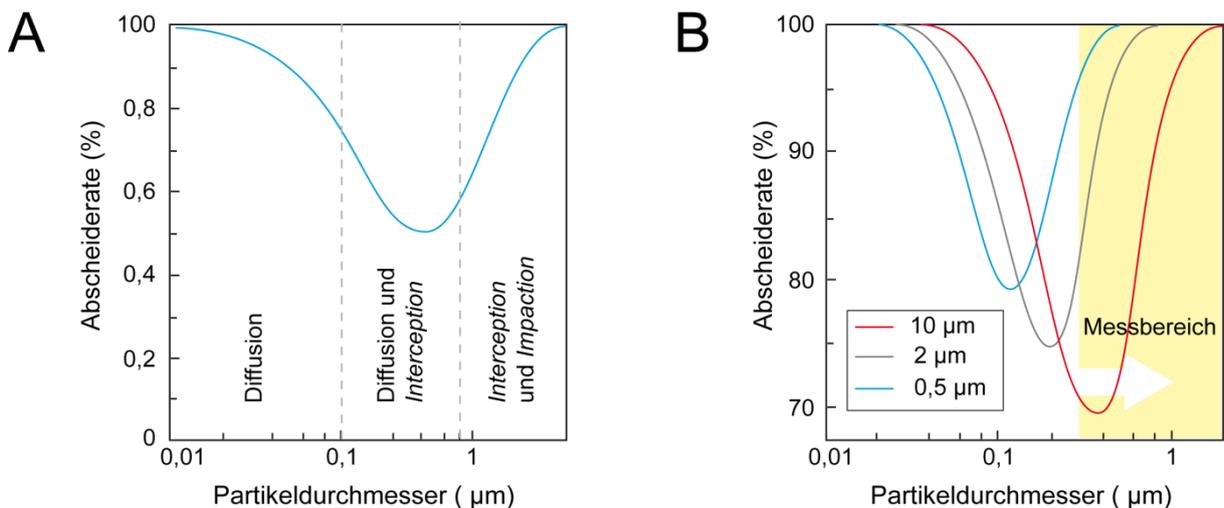


Abbildung 75: Einteilung des Verlaufs der Abscheiderate in die, bei unterschiedlichen Partikelgrößen auftretenden, Abscheidemechanismen (A) (Abbildung in Anlehnung an Quelle<sup>[376]</sup> angefertigt). Simulation der Abscheiderate bei unterschiedlichen Faserdurchmessern (B) (Abbildung in Anlehnung an Quelle<sup>[377]</sup> angefertigt).

Daraus lässt sich schließen, dass die dominierenden Abscheidemechanismen der hier verwendeten eADF4-Vliese primär *Interception* und *Impaction* waren. Ferner wurde aufgezeigt, dass eine Vliesbelegung von 130 mg/m<sup>2</sup> erforderlich ist, um diese typischen Filtereigenschaften zu generieren. Das Ergebnis ist insofern interessant, als dass durch die dokumentierte Einstellbarkeit der Faserdurchmesser nun unterschiedliche Abscheidemechanismen genutzt, und Filter gezielt auf spezifische Partikelgrößen konditioniert werden können. Da eADF4(C16) negativ geladen ist, treten bei der Filtration elektrostatische Kräfte auf, die ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Abscheideraten haben können. Zudem ist es möglich, rekombinante Spinnenseidenproteine zu modifizieren, um erwünschte Eigenschaften zu generieren. So wurde beispielweise mit eADF4(κ16) ein positiv geladenes Äquivalent zu eADF4(C16) geschaffen, welches sich zur Abscheidung negativ geladener Teilchen eignen würde.<sup>[378]</sup>

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass rekombinante Spinnenseide aufgrund ihrer im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Eigenschaften ein vielversprechendes Material für eine Vielzahl potentieller technischer Filter-Anwendungen darstellt.

### 5 Zusammenfassung

Im Laufe ihrer 400 Millionen Jahre langen Evolution haben Spinnen die Fähigkeit entwickelt, Seidenfäden herzustellen, die aufgrund einer einzigartigen Kombination aus Dehnbarkeit und Festigkeit in der Lage sind, hohen mechanischen Belastungen Stand zu halten. Schon vor vielen Hundert Jahren erkannten die Menschen, dass Spinnenseide nicht nur stabil, sondern auch biokompatibel ist und verwendeten Spinnennetze beispielsweise als Wundabdeckungen. Mit der Entwicklung moderner biotechnologischer Methoden wurde schließlich in den letzten Jahrzehnten die Voraussetzung zur intensiven Erforschung der zugrundeliegenden Proteinstrukturen geschaffen, und es gelang Spinnenseidenproteine des Abseilfadens (*Dragline*) von *Araneus diadematus* (*A. diadematus*) rekombinant in *Escherichia coli* Bakterien herzustellen. Die Proteine können aus verschiedenen Lösungsmitteln wie wässrigen Salzlösungen, Hexafluor-2-Propanol oder Ameisensäure verarbeitet werden. Das Lösungsmittel hat dabei einen großen Einfluss auf die Sekundärstruktur der Proteine nach der Prozessierung, wobei für die Stabilität der Struktur in Wasser insbesondere der Anteil kristalliner  $\beta$ -Faltblätter an der Gesamtstruktur entscheidend ist. Um kristalline Strukturen zu induzieren, können die hergestellten Formkörper nachträglich mit einwertigen Alkoholen nachbehandelt werden.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Umsetzung eines Verfahrens zum elektrostatischen Spinnen von Submikrofasern aus eADF4-Proteinen (*engineered A. diadematus fibroin 4*), wobei in einem Parallelansatz zum Vergleich ein Nassspinnverfahren zur Herstellung von Mikrofasern aus wässrigen eADF3-Lösungen (*engineered A. diadematus fibroin 3*) angewendet wurde. Im Rahmen der Arbeit wurde eine Elektrosinnanlage konstruiert und gebaut, die es einerseits ermöglicht großflächig homogen verteilte Vliese herzustellen, und die andererseits für das Spinnen ausgerichteter Fasermatten geeignet ist. Die entscheidenden Parameter zur Kontrolle des Prozesses lagen dabei in der gezielten Orientierung des beim Verspinnen angelegten elektrischen Feldes, sowie in den Eigenschaften der verarbeiteten Spinnlösungen. Durch den Einsatz einer Sekundärelektrode am Spinnkopf sowie einer Verschalung am Kollektor gelang es, die Ablagefläche der Fasern und damit den Materialverlust beim Spinnen ausgerichteter Fasern signifikant zu reduzieren, was anhand elektrostatischer Feldsimulationen theoretisch erklärt werden konnte. Um einen möglichen Einfluss des Molekulargewichts der rekombinanten Seide beim elektrostatischen Spinnen zu klären, wurden die Seidenproteine eADF4(C16) (Monomer: 48 kDa) und eADF4(C32NR4) (Dimer: 208 kDa) verarbeitet. Zur Einstellung der morphologischen Vliesbeschaffenheit wurden unterschiedlich konzentrierte Proteinlösungen aus Hexafluor-2-Propanol versponnen und die resultierenden Faserdurchmesser mikroskopisch untersucht. Auf Basis rheologischer Untersuchungen konnte der

systematische Einfluss des Proteinmolekulargewichts und der Konzentration auf die Viskosität der Spinnlösungen und die resultierenden Faserdurchmesser nachvollzogen werden.

Um die eADF4-Fasern wasserunlöslich zu machen, wurde im nächsten Schritt ein Nachbehandlungsverfahren entwickelt, bei dem die empfindliche Morphologie der Vliese konserviert wurde. Zu diesem Zweck wurden eADF4-Vliese mit Methanol, Ethanol und 2-Propanol bedampft, wobei ein signifikanter Einfluss des Alkohols auf die erforderliche Behandlungsdauer festgestellt wurde. Die zeitliche Zunahme von  $\beta$ -Faltblättern wurde mittels FT-IR gemessen und konnte anhand eines mathematischen Modells für isotherme Kristallisation beschrieben werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Faltungskinetik bei der Nachbehandlung mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Diffusion der Alkohole in die Struktur limitiert wird, weshalb niedermolekulare Alkohole aufgrund ihrer geringeren molekularen Größe zur schnelleren Kristallisation führten.

Im Folgenden wurden ausgerichtete elektrostatisch gesponnene eADF4-Fasermatten zu Garnen verdrillt und im unbehandelten sowie behandelten Zustand durch quasistatische und dynamische Zugversuche mechanisch untersucht. Der Fokus lag dabei auf dem Einfluss der Nachbehandlung, sowie der Luftfeuchtigkeit, wobei zum Vergleich natürliche *Dragline* und nassgesponnene Fäden aus eADF3(AQ12), eADF3(AQ12NR3) und eADF3(AQ24) einbezogen wurden. Ferner wurden, um den Einfluss der Garnmorphologie auf die hygroskopischen Eigenschaften evaluieren zu können, die Polymere Polycaprolacton und Polyamid 6 identisch zu eADF4-Proteinen verarbeitet und mechanisch gemessen. Durch Vergleich des luftfeuchtigkeitsabhängigen Verhaltens unbehandelter und nachbehandelter eADF4-Garne mit der Mechanik natürlicher *Dragline* und nassgesponnener eADF3-Fasern konnte auf Basis von gängigen Strukturmodellen natürlicher Seidenproteine der Einfluss der Nachbehandlung und der Luftfeuchtigkeit auf das mechanische Verhalten der eADF4-Garne auf molekularer Ebene beschrieben werden. Ferner wurde anhand von nassgesponnenen eADF3-Proteinen die Bedeutung des wässrigen Lösungsmittels und der scherinduzierten Molekülausrichtung auf die Assemblierung mechanisch stabiler Fasern aufgeführt (veröffentlicht in *Advanced Materials*, 2015)<sup>[229]</sup>.

Obgleich elektrostatisch versponnene eADF4-Fasern den nassgesponnenen eADF3-Fasern mechanisch unterlegen sind, konnte ihre Eignung für potentielle medizin- und filtertechnische Applikationen experimentell nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen von Zellkulturexperimenten das Adhäsions- und Proliferationsverhalten von Fibroblasten auf eADF4-Vliesen mit unterschiedlichen Faserdurchmessern untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass sich das Zellwachstum durch gezielte Einstellung der Faserdurchmesser signifikant beeinflussen lässt (veröffentlicht in *Advanced Engineering Materials*, 2012)<sup>[228]</sup>. In Hinsicht auf Filteranwendungen

wurden kommerziell erhältliche Polyamidgewebe elektrostatisch mit eADF4-Vliesen besponnen und die resultierende Luftdurchlässigkeit und Abscheiderate analysiert. Es wurde gezeigt, dass unter geringem Materialeinsatz bereits sehr gute Abscheideraten mit anwendungsgerechter Luftdurchlässigkeit erzielt werden konnten (veröffentlicht in *Journal of Visualized Experiments*, 2013)<sup>[67]</sup>. Anhand eines aus der Literatur bekannten Modells konnten die theoretisch zugrundeliegenden Abscheidemechanismen identifiziert und somit die Grundlage für eine gezielte anwendungsadaptierte Filtergestaltung geschaffen werden.

## 6 Summary

During 400 million years of evolution, spiders have developed the ability to produce silk threads, which are able to withstand high mechanical forces due to a unique combination of strength and ductility. Many hundreds of years ago, humans used orb webs for wound dressing, realizing that spider silk is not only extraordinarily tough, but also biocompatible. With the development of modern biotechnological methods in recent decades, the prerequisite for intensive investigations of the underlying protein structures were created, and enabled the recombinant production of *Araneus diadematus* (*A. diadematus*) dragline silk proteins in *Escherichia coli* bacteria. These proteins can be dissolved in various solvents such as aqueous salt solutions, hexafluoroisopropanol or formic acid. The solvent has a great influence on the secondary structure of the proteins after processing. In particular, the proportion of crystalline  $\beta$ -sheets to the overall secondary structure is crucial for the stability of the proteins in water. In order to induce crystalline structures, the processed proteins can subsequently be treated with monohydric alcohols.

The main focus of this work was on developing an electrostatic spinning method to produce eADF4-submicron fibers (engineered *A. diadematus fibroin 4*) from hexafluoroisopropanol, whereas in parallel an approach of wet-spinning eADF3-microfibers (engineered *A. diadematus fibroin 3*) from aqueous solutions was applied in comparison. In the first step, an electrospinning system was designed and constructed allowing the production of large areas of homogeneously distributed nonwoven mats as well as aligned fibers. The key parameter for optimization and control of the process was a targeted orientation of the electrostatic field on one hand, and a variation of the spinning dope properties on the other hand. By applying a secondary electrode at the spinning head and shielding of the collector, the deposition area of the fibers and thus the loss of material during aligned fiber spinning was significantly reduced, which was additionally explained by electrostatic field simulations. In order to determine the influence of protein molecular weight on the resulting fiber properties, spinning experiments were performed with eADF4(C16) (monomeric: 48 kDa) and eADF4(C32NR4) (dimeric: 208 kDa). The morphological characteristics of electrospun nonwovens were influenced by varying the spinning dope concentration, and the resulting fiber diameters were examined microscopically. Based on rheological studies of the spinning solutions, the systematic effect of molecular weight on the viscosity and the resulting fiber diameters could be determined.

To render eADF4 fibers insoluble in water, the next step was the development of a post-treatment procedure, in which the sensitive fiber morphology was preserved. For this purpose eADF4-nonwoven mats were vaporized with methanol, ethanol and 2-propanol, whereby a significant

influence of the type of alcohol on the required treatment duration was observed. The temporal increase in  $\beta$ -sheets was measured by FT-IR and could be described using a mathematical model for isothermal crystallization. The results indicated that the folding kinetics of eADF4(C16) during vapor treatment are limited by the diffusion of the alcohols into the protein structure, which explains why low molecular weight alcohols lead to a faster crystallization.

For performance of quasi-static and dynamic tensile tests, aligned electrospun eADF4-fiber mats were twisted into yarns and measured with or without previous treatment. Here, the main focus was set on the influence of post-treatment and the surrounding humidity. In addition, natural dragline and wet spun fibers of eADF3(AQ12), eADF3(AQ12NR3) and eADF3(AQ24) were included for comparison. Furthermore, the synthetic polymers polycaprolactone and polyamide 6 were processed and mechanically measured in the same manner as eADF4 to evaluate the influence of the yarn morphology on the hygroscopic properties. By comparing the humidity-dependent behavior of untreated and treated eADF4 yarns with the mechanical properties of natural dragline and wet-spun eADF3-fibers it was possible to describe, on the basis of common structural models of natural silk proteins, the influence of the treatment and humidity on the mechanical behavior of the eADF4 yarns on a molecular level. Moreover, the importance of the aqueous solvent and the shear-induced molecular alignment on the assembly properties of mechanically stable fibers was shown, based on wet-spun eADF3 proteins (published in *Advanced Materials*, 2015)<sup>[229]</sup>.

Although electrostatically spun eADF4 fibers are mechanically inferior to the wet-spun eADF3 fibers, their potential suitability for medical and filter technological applications has been experimentally demonstrated. Therefore, the adhesion and proliferation behavior of fibroblasts on eADF4 nonwoven mats with different fiber diameters was examined. It was shown that cell growth can be significantly influenced by adjusting the fiber diameters (published in *Advanced Engineering Materials*, 2012)<sup>[228]</sup>. In terms of filter applications, eADF4 nonwovens were directly spun onto commercially available polyamide fabrics and the resulting air permeability and retention rate were analyzed. It was shown that already small amounts of spider silk nonwoven mats achieved very good retention rates with application-appropriate air permeability (published in *Journal of Visualized Experiments*, 2013)<sup>[67]</sup>. Based on a theoretical model, the underlying deposition mechanisms could be identified, allowing targeted application-adapted filter development.

---

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 **McDonough, W., Braungart, M., Anastas, P. T. & Zimmerman, J. B.:** Applying the principles of green engineering to cradle-to-cradle design. *Environmental Science & Technology* 37(23), 434a-441a, (2003).
- 2 **Rossi, M. S. & Blake, A.:** The Plastics Scorecard - Evaluating the Chemical Footprint of Plastics. Report No. 1, 12-13, Clean Production Action, Somerville, (2014).
- 3 **Aeschelmann, F. et al.:** Bio-based Building Blocks and Polymers in the World – Capacities, Production and Applications: Status Quo and Trends Towards 2020. Report No. 2015-04, 3-4, nova-Institut, Huerth, (2015).
- 4 **Andreas Detzel, B. K., Cassandra Derreza-Greeven:** Untersuchung der Umweltwirkungen von Verpackungen aus biologisch abbaubaren Kunststoffen. *Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit* 52(Forschungskennzahl 37195314), 5-8, (2012).
- 5 **SenGupta, S. & Scheibel, T.:** Folding, Self-Assembly and Conformational Switches of Proteins. In: *Protein folding - misfolding: some current concepts of protein chemistry*, (eds J. Zbilut & T. Scheibel), 1-33, (2007).
- 6 **Shoulders, M. D. & Raines, R. T.:** Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry* 78, 929-958, (2009).
- 7 **Tarakanova, A. & Buehler, M. J.:** Molecular modeling of protein materials: case study of elastin. *Modelling and Simulation in Materials Science and Engineering* 21(6), (2013).
- 8 **Chou, C. C. & Buehler, M. J.:** Structure and mechanical properties of human trichocyte keratin intermediate filament protein. *Biomacromolecules* 13(11), 3522-3532, (2012).
- 9 **Wrzesniewska-Tosik, K. & Adamiec, J.:** Biocomposites with a content of keratin from chicken feathers. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 15(1), 106-112, (2007).
- 10 **Voigt, W. H.:** Zur Funktionellen Morphologie der Fibroin- und Sericin-Sekretion der Seidendruese von Bombyx Mori I. *Zeitschrift fuer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 66(4), 548-570, (1965).
- 11 **Stewart, R. J. & Wang, C. S.:** Adaptation of Caddisfly Larval Silks to Aquatic Habitats by Phosphorylation of H-Fibroin Serines. *Biomacromolecules* 11(4), 969-974, (2010).
- 12 **Wang, Y., Wang, H., Zhao, T. & Nakagaki, M.:** Characterization of a cysteine-rich protein specifically expressed in the silk gland of caddisfly *Stenopsyche marmorata* (Trichoptera; Stenopsychidae). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74(1), 108-112, (2010).
- 13 **Weisman, S. et al.:** Fifty years later: the sequence, structure and function of lacewing cross-beta silk. *Journal of Structural Biology* 168(3), 467-475, (2009).
- 14 **Weisman, S. et al.:** An unlikely silk: the composite material of green lacewing cocoons. *Biomacromolecules* 9(11), 3065-3069, (2008).
- 15 **Herberstein, M. E., Craig, C. L., Coddington, J. A. & Elgar, M. A.:** The functional significance of silk decorations of orb-web spiders: a critical review of the empirical evidence. *Biological Reviews* 75(4), 649-669, (2000).
- 16 **Getty, R. M. & Coyle, F. A.:** Observations on prey capture and anti-predator behaviors of ogre-faced spiders (Deinopis) in southern Costa Rica (Araneae, Deinopidae). *Journal of Arachnology* 24(2), 93-100, (1996).
- 17 **Yeargan, K. V.:** Ecology of a Bolas Spider, *Mastophora-Hutchinsoni* - Phenology, Hunting Tactics, and Evidence for Aggressive Chemical Mimicry. *Oecologia* 74(4), 524-530, (1988).
- 18 **Osaki, S.:** Spider silk as mechanical lifeline. *Nature* 384(6608), 419-419, (1996).
- 19 **Vasanthavada, K. et al.:** Spider glue proteins have distinct architectures compared with traditional spidroin family members. *The Journal of Biological Chemistry* 287(43), 35986-35999, (2012).

- 20 **Choresh, O., Bayarmagnai, B. & Lewis, R. V.:** Spider web glue: two proteins expressed from opposite strands of the same DNA sequence. *Biomacromolecules* 10(10), 2852-2856, (2009).
- 21 **Hakimi, O., Knight, D. P., Knight, M. M., Grahn, M. F. & Vadgama, P.:** Ultrastructure of insect and spider cocoon silks. *Biomacromolecules* 7(10), 2901-2908, (2006).
- 22 **Van Nimmen, E., Gellynck, K., Van Langenhove, L. & Mertens, J.:** The tensile properties of cocoon silk of the spider *Araneus diadematus*. *Textile Research Journal* 76(8), 619-628, (2006).
- 23 **Vincent, L. S.:** The Natural-History of the California Turret Spider *Atypoides-Riversi* (Araneae, Antrodiaetidae) - Demographics, Growth-Rates, Survivorship, and Longevity. *Journal of Arachnology* 21(1), 29-39, (1993).
- 24 **Seymour, R. S. & Hetz, S. K.:** The diving bell and the spider: the physical gill of *Argyroneta aquatica*. *Journal of Experimental Biology* 214(13), 2175-2181, (2011).
- 25 **Bonte, D. & Lens, L.:** Heritability of spider ballooning motivation under different wind velocities. *Evolutionary Ecology Research* 9(5), 817-827, (2007).
- 26 **Shear, W. A., Palmer, J. M., Coddington, J. A. & Bonamo, P. M.:** A Devonian Spinneret - Early Evidence of Spiders and Silk Use. *Science* 246(4929), 479-481, (1989).
- 27 **Craig, C. L.:** The Ecological and Evolutionary Interdependence between Web Architecture and Web Silk Spun by Orb Web Weaving Spiders. *Biological Journal of the Linnean Society* 30(2), 135-162, (1987).
- 28 **Heim, M., Roemer, L. & Scheibel, T.:** Hierarchical structures made of proteins. The complex architecture of spider webs and their constituent silk proteins. *Chemical Society Reviews* 39(1), 156-164, (2010).
- 29 **Römer, L. & Scheibel, T.:** The elaborate structure of spider silk: structure and function of a natural high performance fiber. *Prion* 2(4), 154-161, (2008).
- 30 **Lang, G. & Scheibel, T.:** Multifunktionale Spinnenseide - ein vielversprechender Werkstoff. *MM MaschinenMarkt* 26, 36-39, (2014).
- 31 **MacIntosh, A. C., Kearns, V. R., Crawford, A. & Hatton, P. V.:** Skeletal tissue engineering using silk biomaterials. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 2(2-3), 71-80, (2008).
- 32 **Wendt, H. et al.:** Artificial Skin - Culturing of Different Skin Cell Lines for Generating an Artificial Skin Substitute on Cross-Weaved Spider Silk Fibres. *PLoS One* 6(7), (2011).
- 33 **Wright, S. & Goodacre, S. L.:** Evidence for antimicrobial activity associated with common house spider silk. *BMC Research Notes* 5(326), (2012).
- 34 **Omenetto, F. G. & Kaplan, D. L.:** New Opportunities for an Ancient Material. *Science* 329(5991), 528-531, (2010).
- 35 **Ayoub, N. A., Garb, J. E., Tinghitella, R. M., Collin, M. A. & Hayashi, C. Y.:** Blueprint for a High-Performance Biomaterial: Full-Length Spider Dragline Silk Genes. *PLoS One* 2(6), (2007).
- 36 **Candelas, G. C. & Cintron, J.:** A Spider Fibroin and Its Synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 216(1), 1-6, (1981).
- 37 **Jackson, C. & O'Brien, J. P.:** Molecular-Weight Distribution of *Nephila-Clavipes* Dragline Silk. *Macromolecules* 28(17), 5975-5977, (1995).
- 38 **Hijirida, D. H. et al.:** C-13 NMR of *Nephila clavipes* major ampullate silk gland. *Biophysical Journal* 71(6), 3442-3447, (1996).
- 39 **Askarieh, G. et al.:** Self-assembly of spider silk proteins is controlled by a pH-sensitive relay. *Nature* 465(7295), 236-238, (2010).
- 40 **Hagn, F. et al.:** A conserved spider silk domain acts as a molecular switch that controls fibre assembly. *Nature* 465(7295), 239-242, (2010).
- 41 **Eisoldt, L., Smith, A. & Scheibel, T.:** Decoding the secrets of spider silk. *Materials Today* 14(3), 80-86, (2011).
- 42 **Knight, D. P. & Vollrath, F.:** Liquid crystals and flow elongation in a spider's silk production line. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 266(1418), 519-523, (1999).

- 43 **Vollrath, F. & Knight, D. P.:** Liquid crystalline spinning of spider silk. *Nature* 410(6828), 541-548, (2001).
- 44 **Vollrath, F., Holtet, T., Thogersen, H. C. & Frische, S.:** Structural organization of spider silk. *Proceedings of the Royal Society B - Biological Sciences* 263(1367), 147-151, (1996).
- 45 **Augsten, K., Muhlig, P. & Herrmann, C.:** Glycoproteins and skin-core structure in *Nephila clavipes* spider silk observed by light and electron microscopy. *Scanning* 22(1), 12-15, (2000).
- 46 **Giesa, T., Arslan, M., Pugno, N. M. & Buehler, M. J.:** Nanoconfinement of Spider Silk Fibrils Begets Superior Strength, Extensibility, and Toughness. *Nano Letters* 11(11), 5038-5046, (2011).
- 47 **van Beek, J. D., Hess, S., Vollrath, F. & Meier, B. H.:** The molecular structure of spider dragline silk: Folding and orientation of the protein backbone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(16), 10266-10271, (2002).
- 48 **Keten, S. & Buehler, M. J.:** Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies. *Journal of the Royal Society Interface* 7(53), 1709-1721, (2010).
- 49 **Slotta, U., Mougín, N., Römer, L. & Leimer, A. H.:** Synthetic Spider Silk Proteins and Threads. *Chemical Engineering Progress* 108(5), 43-49, (2012).
- 50 **Vendrely, C. & Scheibel, T.:** Biotechnological production of spider-silk proteins enables new applications. *Macromolecular Bioscience* 7(4), 401-409, (2007).
- 51 **Spieß, K., Wohlrab, S. & Scheibel, T.:** Structural characterization and functionalization of engineered spider silk films. *Soft Matter* 6(17), 4168-4174, (2010).
- 52 **Wohlrab, S., Spieß, K. & Scheibel, T.:** Varying surface hydrophobicities of coatings made of recombinant spider silk proteins. *Journal of Materials Chemistry* 22(41), 22050-22054, (2012).
- 53 **Spieß, K. et al.:** Impact of initial solvent on thermal stability and mechanical properties of recombinant spider silk films. *Journal of Materials Chemistry* 21(35), 13594-13604, (2011).
- 54 **Lammel, A. S., Hu, X., Park, S. H., Kaplan, D. L. & Scheibel, T. R.:** Controlling silk fibroin particle features for drug delivery. *Biomaterials* 31(16), 4583-4591, (2010).
- 55 **Addison, J. B. et al.:** Reversible Assembly of beta-Sheet Nanocrystals within Caddisfly Silk. *Biomacromolecules* 15(4), 1269-1275, (2014).
- 56 **Drummy, L. F., Phillips, D. M., Stone, M. O., Farmer, B. L. & Naik, R. R.:** Thermally induced alpha-helix to beta-sheet transition in regenerated silk fibers and films. *Biomacromolecules* 6(6), 3328-3333, (2005).
- 57 **Brenckle, M. A. et al.:** Protein-Protein Nanoimprinting of Silk Fibroin Films. *Advanced Materials* 25(17), 2409-2414, (2013).
- 58 **An, B., Hinman, M. B., Holland, G. P., Yarger, J. L. & Lewis, R. V.:** Inducing beta-Sheets Formation in Synthetic Spider Silk Fibers by Aqueous Post-Spin Stretching. *Biomacromolecules* 12(6), 2375-2381, (2011).
- 59 **Menezes, G. M., Teule, F., Lewis, R. V., Silva, L. P. & Rech, E. L.:** Nanoscale investigations of synthetic spider silk fibers modified by physical and chemical processes. *Polymer Journal* 45(9), 997-1006, (2013).
- 60 **Shao, Z. Z., Vollrath, F., Yang, Y. & Thogersen, H. C.:** Structure and behavior of regenerated spider silk. *Macromolecules* 36(4), 1157-1161, (2003).
- 61 **Hu, X. et al.:** Regulation of Silk Material Structure by Temperature-Controlled Water Vapor Annealing. *Biomacromolecules* 12(5), 1686-1696, (2011).
- 62 **Huang, X. Y. et al.:** Tunable Structures and Properties of Electrospun Regenerated Silk Fibroin Mats Annealed in Water Vapor at Different Times and Temperatures. *Journal of Nanomaterials* 2014, (2014).
- 63 **Tao, H. et al.:** Silk-based resorbable electronic devices for remotely controlled therapy and in vivo infection abatement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(49), 17385-17389, (2014).

- 64 **Metwalli, E. et al.:** Structural changes of thin films from recombinant spider silk proteins upon post-treatment. *Applied Physics A - Materials Science & Processing* 89(3), 655-661, (2007).
- 65 **Lu, Q. et al.:** Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomaterialia* 6(4), 1380-1387, (2010).
- 66 **Zhang, K. H., Fan, L. P., Yan, Z. Y., Yu, Q. Z. & Mo, X. M.:** Electrospun Biomimic Nanofibrous Scaffolds of Silk Fibroin/Hyaluronic Acid for Tissue Engineering. *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition* 23(9), 1185-1198, (2012).
- 67 **Lang, G., Jokisch, S. & Scheibel, T.:** Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins. *Journal of Visualized Experiments* 75(e50492), (2013).
- 68 **Liu, Z. et al.:** Preparation of Electrospun Silk Fibroin Nanofibers from Solutions Containing Native Silk Fibrils. *Journal of Applied Polymer Science* 132(1), (2015).
- 69 **Mhuka, V., Dube, S., Nindi, M. M. & Torto, N.:** Fabrication and structural characterization of electrospun nanofibres from *Gonometa Postica* and *Gonometa Rufobrunnae* regenerated silk fibroin. *Macromolecular Research* 21(9), 995-1003, (2013).
- 70 **Chen, D. R., Pui, D. Y. H. & Kaufman, S. L.:** Electro spraying of Conducting Liquids for Monodisperse Aerosol Generation in the 4 Nm to 1.8 Mu-M Diameter Range. *Journal of Aerosol Science* 26(6), 963-977, (1995).
- 71 **Cheng, S. C., Lin, Y. S., Huang, M. Z. & Shiea, J.:** Applications of electrospray laser desorption ionization mass spectrometry for document examination. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24(2), 203-208, (2010).
- 72 **Waits, C. M., Hanrahan, B. & Lee, I.:** Multiplexed electrospray scaling for liquid fuel injection. *Journal of Micromechanics and Microengineering* 20(10), (2010).
- 73 **Morton, W. J.:** Method of dispersing fluids. Patent: US705691 A, (1902).
- 74 **Formhals, A.:** Process and apparatus for preparing artificial threads. Patent: US1975504 A, (1934).
- 75 **Formhals, A.:** Artificial thread and method of producing same. Patent: US2187306 A, (1940).
- 76 **Formhals, A.:** Production of artificial fibers from fiber forming liquids. Patent: US2323025 A, (1943).
- 77 **Formhals, A.:** Method and apparatus for spinning. Patent: US2349950 A, (1944).
- 78 **Greiner, A. & Wendorff, J. H.:** Electrospinning: A fascinating method for the preparation of ultrathin fibres. *Angewandte Chemie - International Edition* 46(30), 5670-5703, (2007).
- 79 **Reneker, D. H. & Chun, I.:** Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 7(3), 216-223, (1996).
- 80 **Spruiell, J. E. & White, J. L.:** Structure Development During Polymer Processing: Studies of the Melt Spinning of Polyethylene and Polypropylene Fibers. *Polymer Engineering and Science* 15(9), 662-667, (1975).
- 81 **Swiatek, J., Jarzebowski, J. & Cichon, J.:** Investigation of Fibre Diameter Distribution in Non-Woven Textiles for Medical Applications in Melt-Blown Polyester Technology. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 16(3), 14-16, (2008).
- 82 **Raghavan, B., Soto, H. & Lozano, K.:** Fabrication of Melt Spun Polypropylene Nanofibers by Forcespinning. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 8(1), 52-60, (2013).
- 83 **Ogata, N., Shimada, N., Yamaguchi, S., Nakane, K. & Ogihara, T.:** Melt-electrospinning of poly(ethylene terephthalate) and polyalirate. *Journal of Applied Polymer Science* 105(3), 1127-1132, (2007).
- 84 **Kent, J. A.:** Kent and Riegel's Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology. Vol. 1, 505-506, (2010).
- 85 **Weitz, R. T., Harnau, L., Rauschenbach, S., Burghard, M. & Kern, K.:** Polymer nanofibers via nozzle-free centrifugal spinning. *Nano Letters* 8(4), 1187-1191, (2008).

- 86 **Pham, Q. P., Sharma, U. & Mikos, A. G.:** Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A review. *Tissue Engineering* 12(5), 1197-1211, (2006).
- 87 **Lord, P. R.:** Handbook of Yarn Production: Technology, Science and Economics. Vol. 28, 38-43, (2003).
- 88 **Zugenmaier, P.:** Crystalline Cellulose and Derivatives: Characterization and Structures. Vol. 1, 1-5, (2008).
- 89 **Shaikh, T., Chaudhari, S. & Varma, A.:** Viscose Rayon: A Legendary Development in the Manmade Textile. *International Journal of Engineering Research and Applications* 2(5), 675-680, (2012).
- 90 **Badrossamay, M. R., McIlwee, H. A., Goss, J. A. & Parker, K. K.:** Nanofiber Assembly by Rotary Jet-Spinning. *Nano Letters* 10(6), 2257-2261, (2010).
- 91 **Wehmann, M. & McCulloch, W. J. G.:** Melt blowing technology. In: *Polypropylene* Vol. 2, *Polymer Science and Technology Series*, (ed J. Karger-Kocsis), 415-420, (1999).
- 92 **Dersch, R., Greiner, A. & Wendorff, J. H.:** Polymer Nanofibers prepared by Electrospinning. In: *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* Vol. 4, (eds J. A. Schwarz, C. I. Contescu, & K. Putyera), 2931-2938, (2004).
- 93 **Song, L. et al.:** Sharp burnout failure observed in high current-carrying double-walled carbon nanotube fibers. *Nanotechnology* 23(1), (2012).
- 94 **Zhang, S., Shim, W. S. & Kim, J.:** Design of ultra-fine nonwovens via electrospinning of Nylon 6: Spinning parameters and filtration efficiency. *Materials & Design* 30(9), 3659-3666, (2009).
- 95 **Wang, C. H. et al.:** Electrospinning preparation, characterization and photocatalytic properties of Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanofibers. *Journal of Colloid and Interface Science* 333(1), 242-248, (2009).
- 96 **Zhang, Y., He, X. L., Li, J. P., Miao, Z. J. & Huang, F.:** Fabrication and ethanol-sensing properties of micro gas sensor based on electrospun SnO<sub>2</sub> nanofibers. *Sensors and Actuators B - Chemical* 132(1), 67-73, (2008).
- 97 **Agarwal, S., Wendorff, J. H. & Greiner, A.:** Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer* 49(26), 5603-5621, (2008).
- 98 **Sun, B., Duan, B. & Yuan, X. Y.:** Preparation of core/shell PVP/PLA ultrafine fibers by coaxial electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* 102(1), 39-45, (2006).
- 99 **McCann, J. T., Li, D. & Xia, Y. N.:** Electrospinning of nanofibers with core-sheath, hollow, or porous structures. *Journal of Materials Chemistry* 15(7), 735-738, (2005).
- 100 **Starr, J. D., Budi, M. A. K. & Andrew, J. S.:** Processing-Property Relationships in Electrospun Janus-Type Biphasic Ceramic Nanofibers. *Journal of the American Ceramic Society* 98(1), 12-19, (2015).
- 101 **Huang, Z. M., Zhang, Y. Z., Kotaki, M. & Ramakrishna, S.:** A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* 63(15), 2223-2253, (2003).
- 102 **Tomaszewski, W., Kudra, M., Ciechanska, D., Szadkowski, M. & Gutowska, A.:** Electrospinning of Aligned Fibrous Materials on an Inner Rapidly Rotating Cone Surface. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 20(6B), 44-51, (2012).
- 103 **Frenot, A. & Chronakis, I. S.:** Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8(1), 64-75, (2003).
- 104 **Chronakis, I. S.:** Novel nanocomposites and nanoceramics based on polymer nanofibers using electrospinning process - A review. *Journal of Materials Processing Technology* 167(2-3), 283-293, (2005).
- 105 **Hu, C. G. et al.:** Diameter-dependent voltammetric properties of carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters* 418(4-6), 524-529, (2006).
- 106 **Alberts, B. et al.:** Molecular Biology of the Cell. Vol. 5, 1185, (2007).

- 107 **Sundaray, B. et al.:** Electrospinning of continuous aligned polymer fibers. *Applied Physics Letters* 84(7), 1222-1224, (2004).
- 108 **McGrath, K. P. & Kaplan, D.:** Protein-Based Materials (Bioengineering of Materials). Vol. 1, 113, (1997).
- 109 **de Lacharriere, O. et al.:** Hair diameter diversity - A clinical sign reflecting the follicle miniaturization. *Archives of Dermatology* 137(5), 641-646, (2001).
- 110 **Sell, S. A., McClure, M. J., Garg, K., Wolfe, P. S. & Bowlin, G. L.:** Electrospinning of collagen/biopolymers for regenerative medicine and cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(12), 1007-1019, (2009).
- 111 **Wang, H. et al.:** Aggregation states of rhodamine 6G in electrospun nanofibrous films. *Journal of Colloid and Interface Science* 341(2), 224-231.
- 112 **Roben, C. et al.:** Immobilization of oligostyrene-prolinol conjugates into polystyrene via electrospinning and applications of these fibers in catalysis. *Synthesis-Stuttgart*(14), 2163-2168, (2008).
- 113 **Chen, M. et al.:** Electrospinning of calixarene-functionalized polyacrylonitrile nanofiber membranes and application as an adsorbent and catalyst support. *Langmuir* 29(38), 11858-11867, (2013).
- 114 **Kanzler, C. H. et al.:** Electrospun Metal Oxide Nanofibres for the Assessment of Catalyst Morphological Stability under Harsh Reaction Conditions. *Chemcatchem* 5(9), 2621-2626, (2013).
- 115 **Qin, X. H. & Wang, S. Y.:** Filtration properties of electrospinning nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 102(2), 1285-1290, (2006).
- 116 **Rajesh, K. P. & Natarajan, T. S.:** Electrospun polymer nanofibrous membrane for filtration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 9(9), 5402-5405, (2009).
- 117 **Luzio, A., Canesi, E. V., Bertarelli, C. & Caironi, M.:** Electrospun Polymer Fibers for Electronic Applications. *Materials* 7(2), 906-947, (2014).
- 118 **Nunes-Pereira, J., Sencadas, V., Correia, V., Rocha, J. G. & Lanceros-Mendez, S.:** Energy harvesting performance of piezoelectric electrospun polymer fibers and polymer/ceramic composites. *Sensors and Actuators A - Physical* 196, 55-62, (2013).
- 119 **Gouma, P., Kalyanasundaram, K. & Bishop, A.:** Electrospun single-crystal MoO<sub>3</sub> nanowires for biochemistry sensing probes. *Journal of Materials Research* 21(11), 2904-2910, (2006).
- 120 **Thorvaldsson, A., Stenhamre, H., Gatenholm, P. & Walkenstrom, P.:** Electrospinning of highly porous scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part A* 14(5), 845-846, (2008).
- 121 **Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D. & Farson, D. F.:** Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Materials Science & Engineering C - Biomimetic and Supramolecular Systems* 27(3), 504-509, (2007).
- 122 **Assmann, U. et al.:** Fiber scaffolds of polysialic acid via electrospinning for peripheral nerve regeneration. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 21(7), 2115-2124, (2010).
- 123 **Ramachandran, K. & Gouma, P. I.:** Electrospinning for Bone Tissue Engineering. *Recent Patents on Nanotechnology* 2(1), 1-7, (2008).
- 124 **Liu, N. H. et al.:** Electrospinning of poly (epsilon-caprolactone-co-lactide)/Pluronic blended scaffolds for skin tissue engineering. *Journal of Materials Science* 49(20), 7253-7262, (2014).
- 125 **Sun, X. M. et al.:** Use of ginsenoside Rg3-loaded electrospun PLGA fibrous membranes as wound cover induces healing and inhibits hypertrophic scar formation of the skin. *Colloids and Surfaces B - Biointerfaces* 115, 61-70, (2014).
- 126 **Garg, K. & Bowlin, G. L.:** Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* 5(1), (2011).
- 127 **Doshi, J. & Reneker, D. H.:** Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *Journal of Electrostatics* 35(2-3), 151-160, (1995).

- 128 **Demir, M. M., Yilgor, I., Yilgor, E. & Erman, B.:** Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* 43(11), 3303-3309, (2002).
- 129 **Rutledge, G. C. & Fridrikh, S. V.:** Formation of fibers by electrospinning. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(14), 1384-1391, (2007).
- 130 **Taylor, G.:** Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences* 280(1380), 383-397, (1964).
- 131 **Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P. & Rutledge, G. C.:** Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer* 42(25), 9955-9967, (2001).
- 132 **Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G. & Brenner, M. P.:** Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Physics of Fluids* 13(8), 2201-2220, (2001).
- 133 **Hohman, M. M., Shin, M., Rutledge, G. & Brenner, M. P.:** Electrospinning and electrically forced jets. II. Applications. *Physics of Fluids* 13(8), 2221-2236, (2001).
- 134 **Reneker, D. H. & Yarin, A. L.:** Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer* 49(10), 2387-2425, (2008).
- 135 **Shin, Y. M., Hohman, M. M., Brenner, M. P. & Rutledge, G. C.:** Electrospinning: A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Applied Physics Letters* 78(8), 1149-1151, (2001).
- 136 **Reneker, D. H., Yarin, A. L., Fong, H. & Koombhongse, S.:** Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of Applied Physics* 87(9), 4531-4547, (2000).
- 137 **Yarin, A. L., Koombhongse, S. & Reneker, D. H.:** Bending instability in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* 89(5), 3018-3026, (2001).
- 138 **He, J. H., Wan, Y. Q. & Yu, M. Y.:** Allometric scaling and instability in electrospinning. *International Journal of Nonlinear Sciences and Numerical Simulation* 5(3), 243-252, (2004).
- 139 **Theron, S. A., Yarin, A. L., Zussman, E. & Kroll, E.:** Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer* 46(9), 2889-2899, (2005).
- 140 **Yarin, A. L., Koombhongse, S. & Reneker, D. H.:** Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* 90(9), 4836-4846, (2001).
- 141 **Fong, H., Chun, I. & Reneker, D. H.:** Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 40(16), 4585-4592, (1999).
- 142 **Zussman, E., Rittel, D. & Yarin, A. L.:** Failure modes of electrospun nanofibers. *Applied Physics Letters* 82(22), 3958-3960, (2003).
- 143 **Yang, Q. B. et al.:** Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning. *Journal of Polymer Science Part B - Polymer Physics* 42(20), 3721-3726, (2004).
- 144 **Haghi, A. K. & Akbari, M.:** Trends in electrospinning of natural nanofibers. *Physica Status Solidi A - Applications and Materials Science* 204(6), 1830-1834, (2007).
- 145 **Geng, X., Kwon, O. H. & Jang, J.:** Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 26(27), 5427-5432, (2005).
- 146 **Stanger, J., Tucker, N., Kirwan, K. & Staiger, M. P.:** Effect of Charge Density on the Taylor Cone in Electrospinning. *International Journal of Modern Physics B* 23(6-7), 1956-1961, (2009).
- 147 **Qin, X. H., Yang, E. L., Li, N. & Wang, S. Y.:** Effect of different salts on electrospinning of polyacrylonitrile (PAN) polymer solution. *Journal of Applied Polymer Science* 103(6), 3865-3870, (2007).
- 148 **Heikkila, P. & Harlin, A.:** Electrospinning of polyacrylonitrile (PAN) solution: Effect of conductive additive and filler on the process. *Express Polymer Letters* 3(7), 437-445, (2009).
- 149 **Du, J. M., Shintay, S. & Zhang, X. W.:** Diameter control of electrospun polyacrylonitrile/iron acetylacetonate ultrafine nanofibers. *Journal of Polymer Science Part B - Polymer Physics* 46(15), 1611-1618, (2008).

- 150 **Angammana, C. J. & Jayaram, S. H.:** Analysis of the Effects of Solution Conductivity on Electrospinning Process and Fiber Morphology. *IEEE Transactions on Industry Applications* 47(3), 1109-1117, (2011).
- 151 **Fukushima, S., Karube, Y. & Kawakami, H.:** Preparation of ultrafine uniform electrospun polyimide nanofiber. *Polymer Journal* 42(6), 514-518, (2010).
- 152 **Nartetamrongsutt, K. & Chase, G. G.:** The influence of salt and solvent concentrations on electrospun polyvinylpyrrolidone fiber diameters and bead formation. *Polymer* 54(8), 2166-2173, (2013).
- 153 **Kim, S. J., Lee, C. K. & Kim, S. I.:** Effect of ionic salts on the processing of poly(2acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid) nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 96(4), 1388-1393, (2005).
- 154 **Bhardwaj, N. & Kundu, S. C.:** Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28(3), 325-347, (2010).
- 155 **Tiwari, S. K. & Venkatraman, S. S.:** Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers. *Materials Science & Engineering C - Materials for Biological Applications* 32(5), 1037-1042, (2012).
- 156 **Gupta, P., Elkins, C., Long, T. E. & Wilkes, G. L.:** Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer* 46(13), 4799-4810, (2005).
- 157 **Costa, L. M. M., Bretas, R. E. S. & Gregorio, R.:** Effect of Solution Concentration on the Electrospinning/Electrospray Transition and on the Crystalline Phase of PVDF. *Materials Sciences and Applications* 1, 247-252, (2010).
- 158 **Liu, Y., He, J. H., Yu, J. Y. & Zeng, H. M.:** Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers. *Polymer International* 57(4), 632-636, (2008).
- 159 **Sukigara, S., Gandhi, M., Ayutsede, J., Micklus, M. & Ko, F.:** Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning - part 1: processing parameters and geometric properties. *Polymer* 44(19), 5721-5727, (2003).
- 160 **Popat, K.:** Electrospun Nanofibers for Neuronal Applications. In: *Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (ed K. Popat), Ch. 4, 5-7, (2010).
- 161 **Sill, T. J. & von Recum, H. A.:** Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 29(13), 1989-2006, (2008).
- 162 **Hodzic, A. & Shanks, R.:** Electrospun cellulosic fibre-reinforced composite materials. In: *Natural Fibre Composites: Materials, Processes and Properties*, (eds A. Hodzic & R. Shanks), 126-129, (2014).
- 163 **Li, L., Jiang, Z., Li, M. M., Li, R. S. & Fang, T.:** Hierarchically structured PMMA fibers fabricated by electrospinning. *Rsc Advances* 4(95), 52973-52985, (2014).
- 164 **Adomaviciute, E. & Milasius, R.:** The influence of applied voltage on poly(vinyl alcohol) (PVA) nanofibre diameter. *Fibres & Textiles in Eastern Europe* 15(5-6), 69-72, (2007).
- 165 **Liu, W. & Adanur, S.:** Properties of Electrospun Polyacrylonitrile Membranes and Chemically-activated Carbon Nanofibers. *Textile Research Journal* 80(2), 124-134, (2010).
- 166 **Liu, Y., Dong, L. A., Fan, J., Wang, R. & Yu, J. Y.:** Effect of Applied Voltage on Diameter and Morphology of Ultrafine Fibers in Bubble Electrospinning. *Journal of Applied Polymer Science* 120(1), 592-598, (2011).
- 167 **Zhang, C. X., Yuan, X. Y., Wu, L. L., Han, Y. & Sheng, J.:** Study on morphology of electrospun poly(vinyl alcohol) mats. *European Polymer Journal* 41(3), 423-432, (2005).
- 168 **Beachley, V. & Wen, X. J.:** Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science & Engineering C - Biomimetic and Supramolecular Systems* 29(3), 663-668, (2009).
- 169 **Chowdhury, M. & Stylios, G. K.:** Analysis of the effect of experimental parameters on the morphology of electrospun polyethylene oxide nanofibers and on their thermal properties. *Journal of the Textile Institute* 103(2), 124-138, (2012).

- 170 **Rodoplu, D. & Mutlu, M.:** Effects of Electrospinning Setup and Process Parameters on Nanofiber Morphology Intended for the Modification of Quartz Crystal Microbalance Surfaces. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 7(2), 118-123, (2012).
- 171 **Tong, H. W. & Wang, M.:** Electrospinning of fibrous polymer scaffolds using positive voltage or negative voltage: a comparative study. *Biomedical Materials* 5(5), (2010).
- 172 **Deitzel, J. M., Kleinmeyer, J., Harris, D. & Tan, N. C. B.:** The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 42(1), 261-272, (2001).
- 173 **Wang, C., Hsu, C. H. & Lin, J. H.:** Scaling laws in electrospinning of polystyrene solutions. *Macromolecules* 39(22), 7662-7672, (2006).
- 174 **Milleret, V., Simona, B., Neuenschwander, P. & Hall, H.:** Tuning Electrospinning Parameters for Production of 3D-Fiber-Fleeces with Increased Porosity for Soft Tissue Engineering Applications. *European Cells & Materials* 21, 286-303, (2011).
- 175 **Wang, T. & Kumar, S.:** Electrospinning of polyacrylonitrile nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 102(2), 1023-1029, (2006).
- 176 **Zargham, S., Bazgir, S., Tavakoli, A., Rashidi, A. S. & Damerchely, R.:** The Effect of Flow Rate on Morphology and Deposition Area of Electrospun Nylon 6 Nanofiber. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 7(4), 42-49, (2012).
- 177 **Mazoochi, T., Hamadanian, M., Ahmad, M. & Jabbari, V.:** Investigation on the morphological characteristics of nanofibrous membrane as electrospun in the different processing parameters. *International Journal of Industrial Chemistry* 3(2), 2-9, (2012).
- 178 **Ki, C. S. et al.:** Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution. *Polymer* 46(14), 5094-5102, (2005).
- 179 **Biber, E., Gunduz, G., Mavis, B. & Colak, U.:** Effects of electrospinning process parameters on nanofibers obtained from Nylon 6 and poly (ethylene-n-butyl acrylate-maleic anhydride) elastomer blends using Johnson S-B statistical distribution function. *Applied Physics A - Materials Science & Processing* 99(2), 477-487, (2010).
- 180 **Coneski, P. N., Nash, J. A. & Schoenfisch, M. H.:** Nitric Oxide-Releasing Electrospun Polymer Microfibers. *Acs Applied Materials & Interfaces* 3(2), 426-432, (2011).
- 181 **Macossay, J., Marruffo, A., Rincon, R., Eubanks, T. & Kuang, A.:** Effect of needle diameter on nanofiber diameter and thermal properties of electrospun poly(methyl methacrylate). *Polymers for Advanced Technologies* 18(3), 180-183, (2007).
- 182 **De Vrieze, S. et al.:** The effect of temperature and humidity on electrospinning. *Journal of Materials Science* 44(5), 1357-1362, (2009).
- 183 **Qin, Q. F. et al.:** Effects of Polymerization and Spinning Conditions on Mechanical Properties of PAN Precursor Fibers. *Carbon Letters* 11(2), 176-183, (2010).
- 184 **Mimura, K., Kawachi, Y. & Kawai, A.:** Process for producing acrylic fiber. Patent: US4347203 A, (1980).
- 185 **Kuratani, K. & Fukushima, K.:** Process for high speed wet spinning of acrylonitrile fibers. Patent: US3701820 A, (1972).
- 186 **Tai, T., Rodini, D. J., Masson, J. C. & Leonard, R. L.:** Wet spinning process for aramid polymer containing salts. Patent: US5667743 A, (1997).
- 187 **Bair, T. I. & Gulrich, L. W.:** Wet spinning from sulfuric acid solution. Patent: US4466935 A, (1984).
- 188 **Li, X. J. et al.:** Cellulose Fibers from Cellulose/ 1-Ethyl-3-Methylimidazolium Acetate Solution by Wet Spinning with Increasing Spinning Speeds. *Journal of Applied Polymer Science* 131(9), (2014).
- 189 **Mao, Y., Zhang, L. N., Cai, J., Zhou, J. P. & Kondo, T.:** Effects of Coagulation Conditions on Properties of Multifilament Fibers Based on Dissolution of Cellulose in NaOH/Urea Aqueous Solution. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 47(22), 8676-8683, (2008).
- 190 **He, Y. Q. et al.:** Alginate/graphene oxide fibers with enhanced mechanical strength prepared by wet spinning. *Carbohydrate Polymers* 88(3), 1100-1108, (2012).

- 191 **Li, L. et al.:** Preparation of high strength chitosan fibers by using ionic liquid as spinning solution. *Journal of Materials Chemistry* 22(17), 8585-8593, (2012).
- 192 **Toskas, G. et al.:** Pure Chitosan Microfibres for Biomedical Applications. *AUTEX Research Journal* 13(4), 134-140, (2013).
- 193 **Caves, J. M. et al.:** Fibrillogenesis in Continuously Spun Synthetic Collagen Fiber. *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials* 93B(1), 24-38, (2010).
- 194 **Hirano, S., Zhang, M., Nakagawa, M. & Miyata, T.:** Wet spun chitosan-collagen fibers, their chemical N-modifications, and blood compatibility. *Biomaterials* 21(10), 997-1003, (2000).
- 195 **Marsano, E. et al.:** Wet spinning of Bombyx mori silk fibroin dissolved in N-methyl morpholine N-oxide and properties of regenerated fibres. *International Journal of Biological Macromolecules* 37(4), 179-188, (2005).
- 196 **Zhu, Z. H., Ohgo, K. & Asakura, T.:** Preparation and characterization of regenerated Bombyx mori silk fibroin fiber with high strength. *Express Polymer Letters* 2(12), 885-889, (2008).
- 197 **Ha, S. W., Tonelli, A. E. & Hudson, S. M.:** Structural studies of Bombyx mori silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules* 6(3), 1722-1731, (2005).
- 198 **Albertson, A. E., Teule, F., Weber, W., Yarger, J. L. & Lewis, R. V.:** Effects of different post-spin stretching conditions on the mechanical properties of synthetic spider silk fibers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 29, 225-234, (2014).
- 199 **Geffers, M.:** Etablierung eines Verfahrens zur Herstellung von Spinnenseidenfasern. Diplomarbeit, Universität Bayreuth, Lehrstuhl Biomaterialien, (2012).
- 200 **Prentice, P.:** Rheology and Its Role in Plastics Processing. Vol. 7, 18-19, (1995).
- 201 **Walters, K.:** An Introduction to Rheology. Vol. 3, 29-32, (1989).
- 202 **Kraume, M.:** Transportvorgänge in der Verfahrenstechnik: Grundlagen und apparative Umsetzungen. Vol. 2, 38-44, (2012).
- 203 **Feßmann, J. & Orth, H.:** Angewandte Chemie und Umwelttechnik für Ingenieure: Handbuch für Studium und betriebliche Praxis. Vol. 2, 36-37, (2002).
- 204 **Smith, B. C.:** Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Second Edition. 2-5, (2011).
- 205 **Byler, D. M. & Susi, H.:** Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved Ftir Spectra. *Biopolymers* 25(3), 469-487, (1986).
- 206 **Hu, X., Kaplan, D. & Cebe, P.:** Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by thermal analysis and infrared spectroscopy. *Macromolecules* 39(18), 6161-6170, (2006).
- 207 **Munz, M.:** Force calibration in lateral force microscopy: a review of the experimental methods. *Journal of Physics D - Applied Physics* 43(6), (2010).
- 208 **Hutter, J. L. & Bechhoefer, J.:** Calibration of Atomic-Force Microscope Tips. *Review of Scientific Instruments* 64(7), 1868-1873, (1993).
- 209 **Sader, J. E., Chon, J. W. M. & Mulvaney, P.:** Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* 70(10), 3967-3969, (1999).
- 210 **Green, C. P. et al.:** Normal and torsional spring constants of atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* 75(6), 1988-1996, (2004).
- 211 **Heidelberg, A. et al.:** A generalized description of the elastic properties of nanowires. *Nano Letters* 6(6), 1101-1106, (2006).
- 212 **Sepeur, S.:** Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen. Vol. 1, 67, (2008).
- 213 **Thomas, J. & Gemming, T.:** Analytische Transmissionselektronenmikroskopie: Eine Einführung für den Praktiker. Vol. 1, 51-54, (2013).
- 214 **Fritz, H. & Schulze, G.:** Fertigungstechnik. Vol. 10, 412, (2012).
- 215 **Guinea, G. V., Perez-Rigueiro, J., Plaza, G. R. & Elices, M.:** Volume constancy during stretching of spider silk. *Biomacromolecules* 7(7), 2173-2177, (2006).
- 216 **Jiang, P. et al.:** Spider silk gut: Development and characterization of a novel strong spider silk fiber. *Scientific Reports* 4(7326), (2014).

- 217 **Perea, G. B. et al.:** The variability and interdependence of spider viscid line tensile properties. *Journal of Experimental Biology* 216(24), 4722-4728, (2013).
- 218 **Blackledge, T. A. & Hayashi, C. Y.:** Silken toolkits: biomechanics of silk fibers spun by the orb web spider *Argiope argentata* (Fabricius 1775). *Journal of Experimental Biology* 209(13), 2452-2461, (2006).
- 219 **Wong, J. Y., Leach, J. B. & Brown, X. Q.:** Balance of chemistry, topography, and mechanics at the cell-biomaterial interface: Issues and challenges for assessing the role of substrate mechanics on cell response. *Surface Science* 570(1-2), 119-133, (2004).
- 220 **Goncalves, R. et al.:** Kinetic analysis of the ex vivo expansion of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Biotechnology Letters* 28(5), 335-340, (2006).
- 221 **Huemmerich, D. et al.:** Primary structure elements of spider dragline silks and their contribution to protein solubility. *Biochemistry* 43(42), 13604-13612, (2004).
- 222 **Humenik, M., Smith, A. M. & Scheibel, T.:** Recombinant Spider Silks-Biopolymers with Potential for Future Applications. *Polymers* 3(1), 640-661, (2011).
- 223 **Chan, W. D., Goldberg, H. A., Hunter, G. K., Dixon, S. J. & Rizkalla, A. S.:** Modification of polymer networks with bone sialoprotein promotes cell attachment and spreading. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94A(3), 945-952, (2010).
- 224 **Riande, E., Diaz-Calleja, R., Prolongo, M., Masegosa, R. & Salom, C.:** Polymer Viscoelasticity: Stress and Strain in Practice Vol. 55, 79, (1999).
- 225 **Li, L., Bellan, L. M., Craighead, H. G. & Frey, M. W.:** Formation and properties of nylon-6 and nylon-6/montmorillonite composite nanofibers. *Polymer* 47(17), 6208-6217, (2006).
- 226 **Liu, Y. et al.:** Crystalline morphology and polymorphic phase transitions in electrospun nylon-6 nanofibers. *Macromolecules* 40(17), 6283-6290, (2007).
- 227 **Mahfuz, H. et al.:** Enhancement of strength and stiffness of Nylon 6 filaments through carbon nanotubes reinforcement. *Applied Physics Letters* 88(8), (2006).
- 228 **Leal-Egana, A. et al.:** Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein. *Advanced Engineering Materials* 14(3), B67-B75, (2012).
- 229 **Heidebrecht, A. et al.:** Biomimetic Fibers Made of Recombinant Spidroins with the Same Toughness as Natural Spider Silk. *Advanced Materials* 27(13), 2189-2194, (2015).
- 230 **Boutry, C. & Blackledge, T. A.:** Evolution of supercontraction in spider silk: structure-function relationship from tarantulas to orb-weavers. *Journal of Experimental Biology* 213(20), 3505-3514, (2010).
- 231 **Blackledge, T. A. et al.:** How super is supercontraction? Persistent versus cyclic responses to humidity in spider dragline silk. *Journal of Experimental Biology* 212(13), 1980-1988, (2009).
- 232 **Boutry, C. & Blackledge, T. A.:** Wet webs work better: humidity, supercontraction and the performance of spider orb webs. *Journal of Experimental Biology* 216(19), 3606-3610, (2013).
- 233 **Nezarati, R. M., Eifert, M. B. & Cosgriff-Hernandez, E.:** Effects of humidity and solution viscosity on electrospun fiber morphology. *Tissue Engineering Part C: Methods* 19(10), 810-819, (2013).
- 234 **Casper, C. L., Stephens, J. S., Tassi, N. G., Chase, D. B. & Rabolt, J. F.:** Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 37(2), 573-578, (2004).
- 235 **Cai, Y. S. & Gevelber, M.:** The effect of relative humidity and evaporation rate on electrospinning: fiber diameter and measurement for control implications. *Journal of Materials Science* 48(22), 7812-7826, (2013).
- 236 **Yoshida, K. et al.:** Structure and dynamics of hexafluoroisopropanol-water mixtures by x-ray diffraction, small-angle neutron scattering, NMR spectroscopy, and mass spectrometry. *Journal of Chemical Physics* 119(12), 6132-6142, (2003).
- 237 **Meinel, A. J. et al.:** Optimization strategies for electrospun silk fibroin tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 30(17), 3058-3067, (2009).

- 238 **Boland, E. D., Wnek, G. E., Simpson, D. G., Pawlowski, K. J. & Bowlin, G. L.:** Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: A study of poly(glycolic acid) electrospinning. *Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry* 38(12), 1231-1243, (2001).
- 239 **Matthews, J. A., Wnek, G. E., Simpson, D. G. & Bowlin, G. L.:** Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 3(2), 232-238, (2002).
- 240 **McClure, M. J., Sell, S. A., Ayres, C. E., Simpson, D. G. & Bowlin, G. L.:** Electrospinning-aligned and random polydioxanone-polycaprolactone-silk fibroin-blended scaffolds: geometry for a vascular matrix. *Biomedical Materials* 4(5), (2009).
- 241 **Aviss, K. J., Gough, J. E. & Downes, S.:** Aligned Electrospun Polymer Fibres for Skeletal Muscle Regeneration. *European Cells & Materials* 19, 193-204, (2010).
- 242 **Theron, A., Zussman, E. & Yarin, A. L.:** Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibres. *Nanotechnology* 12(3), 384-390, (2001).
- 243 **Weldon, C. B. et al.:** Electrospun drug-eluting sutures for local anesthesia. *Journal of Controlled Release* 161(3), 903-909, (2012).
- 244 **Kim, K. W., Lee, K. H., Khil, M. S., Ho, Y. S. & Kim, H. Y.:** The effect of molecular weight and the linear velocity of drum surface on the properties of electrospun poly(ethylene terephthalate) nonwovens. *Fibers and Polymers* 5(2), 122-127, (2004).
- 245 **Garrigues, N. W., Little, D., O'Connor, C. J. & Guilak, F.:** Use of an insulating mask for controlling anisotropy in multilayer electrospun scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry* 20(40), 8962-8968, (2010).
- 246 **Liu, L. H. & Dzenis, Y.:** Simulation of electrospun nanofibre deposition on stationary and moving substrates. *Micro & Nano Letters* 6(6), 408-411, (2011).
- 247 **Arras, M. M. L., Grasl, C., Bergmeister, H. & Schima, H.:** Electrospinning of aligned fibers with adjustable orientation using auxiliary electrodes. *Science and Technology of Advanced Materials* 13(3), (2012).
- 248 **Yang, Y. et al.:** A Shield Ring Enhanced Equilateral Hexagon Distributed Multi-needle Electrospinning Spinneret. *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation* 17(5), 1592-1601, (2010).
- 249 **Aviss, K. J., Gough, J. E. & Downes, S.:** Aligned electrospun polymer fibres for skeletal muscle regeneration. *European Cells and Materials* 19, 193-204, (2010).
- 250 **Kiselev, P. & Rosell-Llompart, J.:** Highly aligned electrospun nanofibers by elimination of the whipping motion. *Journal of Applied Polymer Science* 125(3), 2433-2441, (2012).
- 251 **Xu, C. Y., Inai, R., Kotaki, M. & Ramakrishna, S.:** Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 25(5), 877-886, (2004).
- 252 **Zussman, E., Burman, M., Yarin, A. L., Khalfin, R. & Cohen, Y.:** Tensile deformation of electrospun nylon-6,6 nanofibers. *Journal of Polymer Science Part B - Polymer Physics* 44(10), 1482-1489, (2006).
- 253 **Camposo, A. et al.:** Conformational Evolution of Elongated Polymer Solutions Tailors the Polarization of Light-Emission from Organic Nanofibers. *Macromolecules* 47(14), 4704-4710, (2014).
- 254 **Pan, H., Li, L. M., Hu, L. & Cui, X. J.:** Continuous aligned polymer fibers produced by a modified electrospinning method. *Polymer* 47(14), 4901-4904, (2006).
- 255 **Li, X. S. et al.:** Conjugate electrospinning of continuous nanofiber yarn of poly(L-lactide)/nanocalcium phosphate nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science* 107(6), 3756-3764, (2008).
- 256 **Yao, C., Li, X. S. & Song, T. Y.:** Preparation and Characterization of Zein and Zein/Poly-L-lactide Nanofiber Yarns. *Journal of Applied Polymer Science* 114(4), 2079-2086, (2009).

- 257 **Khil, M. S., Bhattarai, S. R., Kim, H. Y., Kim, S. Z. & Lee, K. H.:** Novel fabricated matrix via electrospinning for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B - Applied Biomaterials* 72B(1), 117-124, (2005).
- 258 **Smit, E., Buttner, U. & Sanderson, R. D.:** Continuous yarns from electrospun fibers. *Polymer* 46(8), 2419-2423, (2005).
- 259 **Bajaj, B., Yoon, S. J., Park, B. H. & Lee, J. R.:** Coiled Fibers of Poly (Amide-Co-Imide) PAI and Poly (Trimellitic Anhydride Chloride-Co-4, 4 '-Methylene Dianiline) (PTACM) by Using Mechano-Electrospinning. *Journal of Engineered Fibers and Fabrics* 7, 37-41, (2012).
- 260 **Holland, C., Terry, A. E., Porter, D. & Vollrath, F.:** Natural and unnatural silks. *Polymer* 48(12), 3388-3392, (2007).
- 261 **Keerl, D. & Scheibel, T.:** Rheological characterization of silk solutions. *Green Materials* 2(1), 11-23, (2013).
- 262 **Han, S. et al.:** Structural and Conformational Dynamics of Self-Assembling Bioactive beta-Sheet Peptide Nanostructures Decorated with Multivalent RNA-Binding Peptides. *Journal of the American Chemical Society* 134(38), 16047-16053, (2012).
- 263 **Stine, W. B., Dahlgren, K. N., Krafft, G. A. & LaDu, M. J.:** In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 278(13), 11612-11622, (2003).
- 264 **Takamuku, T. et al.:** Solvation of the Amphiphilic Diol Molecule in Aliphatic Alcohol-Water and Fluorinated Alcohol-Water Solutions. *Journal of Physical Chemistry B* 114(12), 4252-4260, (2010).
- 265 **McLachlan, G. D. et al.:** High-resolution NMR characterization of a spider-silk mimetic composed of 15 tandem repeats and a CRGD motif. *Protein Science* 18(1), 206-216, (2009).
- 266 **Walgers, R., Lee, T. C. & Cammers-Goodwin, A.:** An indirect chaotropic mechanism for the stabilization of helix conformation of peptides in aqueous trifluoroethanol and hexafluoro-2-propanol. *Journal of the American Chemical Society* 120(20), 5073-5079, (1998).
- 267 **Andersen, N. H. et al.:** Effect of hexafluoroisopropanol on the thermodynamics of peptide secondary structure formation. *Journal of the American Chemical Society* 121(42), 9879-9880, (1999).
- 268 **Carraher, C. E. J.:** Carraher's Polymer Chemistry, Ninth Edition. Vol. 9, 84-86, (2013).
- 269 **Dowling, A. H. & Fleming, G. J. P.:** The influence of poly(acrylic) acid number average molecular weight and concentration in solution on the compressive fracture strength and modulus of a glass-ionomer restorative. *Dental Materials* 27(6), 535-543, (2011).
- 270 **Ramos-Olmos, R., Rogel-Hernandez, E., Flores-Lopez, L. Z., Lin, S. W. & Espinoza-Gomez, H.:** Synthesis and Characterization of Asymmetric Ultrafiltration Membrane Made with Recycled Polystyrene Foam and Different Additives. *Journal of the Chilean Chemical Society* 53(4), 1705-1708, (2008).
- 271 **Kulicke, W. M. & Kniewske, R.:** The Shear Viscosity Dependence on Concentration, Molecular-Weight, and Shear Rate of Polystyrene Solutions. *Rheologica Acta* 23(1), 75-83, (1984).
- 272 **Pham, Q. P., Sharma, U. & Mikos, A. G.:** Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Engineering* 12(5), 1197-1211, (2006).
- 273 **Son, W. K., Youk, J. H., Lee, T. S. & Park, W. H.:** The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 45(9), 2959-2966, (2004).
- 274 **McKee, M. G., Wilkes, G. L., Colby, R. H. & Long, T. E.:** Correlations of solution rheology with electrospun fiber formation of linear and branched polyesters. *Macromolecules* 37(5), 1760-1767, (2004).
- 275 **Eda, G. & Shivkumar, S.:** Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene. *Journal of Applied Polymer Science* 106(1), 475-487, (2007).

- 276 **Thompson, C. J., Chase, G. G., Yarin, A. L. & Reneker, D. H.:** Effects of parameters on nanofiber diameter determined from electrospinning model. *Polymer* 48(23), 6913-6922, (2007).
- 277 **Lee, K. H., Kim, H. Y., Bang, H. J., Jung, Y. H. & Lee, S. G.:** The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers. *Polymer* 44(14), 4029-4034, (2003).
- 278 **Polini, A., Scaglione, S., Quarto, R. & Pisignano, D.:** Composite electrospun nanofibers for influencing stem cell fate. *Methods in Molecular Biology* 1058, 25-40, (2013).
- 279 **Kim, B. J. et al.:** Mussel-inspired adhesive protein-based electrospun nanofibers reinforced by Fe(III)-DOPA complexation. *Journal of Materials Chemistry B* 2015(3), 112-118, (2014).
- 280 **Manis, A. E., Bowman, J. R., Bowlin, G. L. & Simpson, D. G.:** Electrospun nitrocellulose and nylon: design and fabrication of novel high performance platforms for protein blotting applications. *Journal of Biological Engineering* 1(2), (2007).
- 281 **Ayutsede, J. et al.:** Regeneration of Bombyx mori silk by electrospinning. Part 3: characterization of electrospun nonwoven mat. *Polymer* 46(5), 1625-1634, (2005).
- 282 **Lee, K. H. et al.:** Application of electrospun silk fibroin nanofibers as an immobilization support of enzyme. *Fibers and Polymers* 6(3), 181-185, (2005).
- 283 **Wei, K., Kim, B. S. & Kim, I. S.:** Fabrication and biocompatibility of electrospun silk biocomposites. *Membranes (Basel)* 1(4), 275-298, (2011).
- 284 **Zarkoob, S. et al.:** Structure and morphology of electrospun silk nanofibers. *Polymer* 45(11), 3973-3977, (2004).
- 285 **Stephens, J. S. et al.:** Effects of electrospinning and solution casting protocols on the secondary structure of a genetically engineered dragline spider silk analogue investigated via fourier transform Raman spectroscopy. *Biomacromolecules* 6(3), 1405-1413, (2005).
- 286 **Huemmerich, D., Slotta, U. & Scheibel, T.:** Processing and modification of films made from recombinant spider silk proteins. *Applied Physics A - Materials Science & Processing* 82(2), 219-222, (2006).
- 287 **Spieß, K.:** Charakterisierung und Funktionalisierung von Filmen aus rekombinantem Spinneseidenprotein. Dissertation, Universität Bayreuth, Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften (2012).
- 288 **He, J. X., Guo, N. W. & Cui, S. Z.:** Structure and Mechanical Properties of Electrospun Tussah Silk Fibroin Nanofibres: Variations in Processing Parameters. *Iranian Polymer Journal* 20(9), 713-724, (2011).
- 289 **Hu, X., Kaplan, D. & Cebe, P.:** Dynamic protein-water relationships during beta-sheet formation. *Macromolecules* 41(11), 3939-3948, (2008).
- 290 **Hu, X., Kaplan, D. & Cebe, P.:** Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochimica Acta* 461(1-2), 137-144, (2007).
- 291 **Seib, F. P., Maitz, M. F., Hu, X. A., Werner, C. & Kaplan, D. L.:** Impact of processing parameters on the haemocompatibility of Bombyx mori silk films. *Biomaterials* 33(4), 1017-1023, (2012).
- 292 **Zhang, K. H., Mo, X. M., Huang, C., He, C. L. & Wang, H. S.:** Electrospun scaffolds from silk fibroin and their cellular compatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93A(3), 976-983, (2010).
- 293 **Min, B. M. et al.:** Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25(7-8), 1289-1297, (2004).
- 294 **Rockwood, D. N. et al.:** Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature Protocols* 6(10), 1612-1631, (2011).
- 295 **Dyakonov, T. et al.:** Design and characterization of a silk-fibroin-based drug delivery platform using naproxen as a model drug. *Journal of Drug Delivery* 2012, 490514, (2012).

- 296 **Min, B. M. et al.:** Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 25(7-8), 1289-1297, (2004).
- 297 **Nazarov, R., Jin, H. J. & Kaplan, D. L.:** Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *Biomacromolecules* 5(3), 718-726, (2004).
- 298 **An, B., Hinman, M. B., Holland, G. P., Yarger, J. L. & Lewis, R. V.:** Inducing beta-sheets formation in synthetic spider silk fibers by aqueous post-spin stretching. *Biomacromolecules* 12(6), 2375-2381, (2011).
- 299 **Kim, S. H., Nam, Y. S., Lee, T. S. & Park, W. H.:** Silk fibroin nanofiber. Electrospinning, properties, and structure. *Polymer Journal* 35(2), 185-190, (2003).
- 300 **Yan, C., Yang, B. & Yu, Z. C.:** Methanol-induced conformation transition of gland fibroin monitored by FTIR spectroscopy and terahertz spectroscopy. *Analyst* 139(8), 1967-1972, (2014).
- 301 **Nuanchai, N., Wilaiwan, S. & Prasong, S.:** Effect of different organic solvents and treatment times on secondary structure and thermal properties of silk fibroin films. *Current Research in Chemistry* 2(1), 1-9, (2010).
- 302 **Jeong, L., Lee, K. Y., Liu, J. W. & Park, W. H.:** Time-resolved structural investigation of regenerated silk fibroin nanofibers treated with solvent vapor. *International Journal of Biological Macromolecules* 38(2), 140-144, (2006).
- 303 **Prasong, S., Wilaiwan, S. & Nuanchai, N.:** Structure and Thermal Characteristics of Bombyx Mori Silk Fibroin: Effect of Different Organic Solvents. *International Journal of Chemical Technology* 2(1), 21-27, (2010).
- 304 **Hu, Y. P., Zhang, Q., You, R. C., Wang, L. S. & Li, M. Z.:** The Relationship between Secondary Structure and Biodegradation Behavior of Silk Fibroin Scaffolds. *Advances in Materials Science and Engineering* 2012, (2012).
- 305 **Ha, S. W., Park, Y. H. & Hudson, S. M.:** Dissolution of Bombyx mori silk fibroin in the calcium nitrate tetrahydrate-methanol system and aspects of wet spinning of fibroin solution. *Biomacromolecules* 4(3), 488-496, (2003).
- 306 **Chen, X., Shao, Z. Z., Knight, D. P. & Vollrath, F.:** Conformation transition kinetics of Bombyx mori silk protein. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* 68(1), 223-231, (2007).
- 307 **Hu, X., Lu, Q., Kaplan, D. L. & Cebe, P.:** Microphase Separation Controlled beta-Sheet Crystallization Kinetics in Fibrous Proteins. *Macromolecules* 42(6), 2079-2087, (2009).
- 308 **Avrami, M.:** Kinetics of Phase Change. II Transformation Time Relations for Random. *The Journal of Chemical Physics* 8(212), (1940).
- 309 **Talukdar, M. & Achary, P. G. R.:** Calorimetric Study on Kinetics of Mesophase Transition in Thermotropic Copolymers. *International Journal of Research & Reviews in Applied Sciences* 3(1), 92-99, (2010).
- 310 **Zhou, Y. Q., Fang, J., Wang, X. G. & Lin, T.:** Strip twisted electrospun nanofiber yarns: Structural effects on tensile properties. *Journal of Materials Research* 27(3), 537-544, (2012).
- 311 **Hearle, J. W. S.:** On Theory of Mechanics of Twisted Yarns. *Journal of the Textile Institute* 60(3), 95-101, (1969).
- 312 **Hearle, J. W. S.:** Theoretical Analysis of Mechanics of Twisted Staple Fiber Yarns. *Textile Research Journal* 35(12), 1060-1071, (1965).
- 313 **Yan, H., Liu, L. Q. & Zhang, Z.:** Continually fabricating staple yarns with aligned electrospun polyacrylonitrile nanofibers. *Materials Letters* 65(15-16), 2419-2421, (2011).
- 314 **Skarja, G. A. & Woodhouse, K. A.:** Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 9(3), 271-295, (1998).
- 315 **Correlo, V. M. et al.:** Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. *Macromolecular Bioscience* 7(3), 354-363, (2007).

- 316 **Sabo, R., Jin, L. W., Stark, N. & Ibach, R. E.:** Effect of Environmental Conditions on the Mechanical Properties and Fungal Degradation of Polycaprolactone/Microcrystalline Cellulose/Wood Flour Composites. *Bioresources* 8(3), 3322-3335, (2013).
- 317 **Abacha, N., Kubouchi, M. & Sakai, T.:** Diffusion behavior of water in polyamide 6 organoclay nanocomposites. *Express Polymer Letters* 3(4), 245-255, (2009).
- 318 **Chen, S. H., Chen, C. H., Shalumon, K. T. & Chen, J. P.:** Preparation and characterization of antiadhesion barrier film from hyaluronic acid-grafted electrospun poly(caprolactone) nanofibrous membranes for prevention of flexor tendon postoperative peritendinous adhesion. *International Journal of Nanomedicine* 9, 4079-4092, (2014).
- 319 **Miri, V., Persyn, O., Lefebvre, J. M. & Seguela, R.:** Effect of water absorption on the plastic deformation behavior of nylon 6. *European Polymer Journal* 45(3), 757-762, (2009).
- 320 **Li, Q., Wei, Q. F., Wu, N., Cai, Y. B. & Gao, W. D.:** Structural characterization and dynamic water adsorption of electrospun polyamide6/montmorillonite nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* 107(6), 3535-3540, (2008).
- 321 **Tan, E. P. S., Ng, S. Y. & Lim, C. T.:** Tensile testing of a single ultrafine polymeric fiber. *Biomaterials* 26(13), 1453-1456, (2005).
- 322 **Jahani, H. et al.:** The effect of aligned and random electrospun fibrous scaffolds on rat mesenchymal stem cell proliferation. *Cell Journal* 14(1), 31-38, (2012).
- 323 **Guarino, V., Cirillo, V., Taddei, P., Alvarez-Perez, M. A. & Ambrosio, L.:** Tuning Size Scale and Crystallinity of PCL Electrospun Fibres via Solvent Permittivity to Address hMSC Response. *Macromolecular Bioscience* 11(12), 1694-1705, (2011).
- 324 **Ibanes, C., de Boissieu, M., David, L. & Seguela, R.:** High temperature behaviour of the crystalline phases in unfilled and clay-filled nylon 6 fibers. *Polymer* 47(14), 5071-5079, (2006).
- 325 **Li, Y. Y. & Goddard, W. A.:** Nylon 6 crystal structures, folds, and lamellae from theory. *Macromolecules* 35(22), 8440-8455, (2002).
- 326 **Volpato, F. Z., Ramos, S. L. F., Motta, A. & Migliaresi, C.:** Physical and in vitro biological evaluation of a PA 6/MWCNT electrospun composite for biomedical applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 26(1), 35-47, (2011).
- 327 **Jia, N. Y., Fraenkel, H. A. & Kagan, V. A.:** Effects of moisture conditioning methods on mechanical properties of injection molded nylon 6. *Journal of Reinforced Plastics and Composites* 23(7), 729-737, (2004).
- 328 **Cossard, C., Kuciel, S., Mazurkiewicz, S. & Liber-Knec, A.:** Possibility of using polyamide 6 reinforced with glass fiber for Ilizarov rings. *Polimery* 53(4), 317-320, (2008).
- 329 **Carrascal, I., Casado, J. A., Polanco, J. A. & Gutierrez-Solana, F.:** Absorption and diffusion of humidity in fiberglass-reinforced polyamide. *Polymer Composites* 26(5), 580-586, (2005).
- 330 **Plaza, G. R., Guinea, G. V., Perez-Rigueiro, J. & Elices, M.:** Thermo-hygro-mechanical behavior of spider dragline silk: Glassy and rubbery states. *Journal of Polymer Science Part B - Polymer Physics* 44(6), 994-999, (2006).
- 331 **Gupta, R. K., Kennel, E. & Kim, K.:** Polymer Nanocomposites Handbook. Vol. 1, 272-276, (2009).
- 332 **Fu, C. J., Porter, D. & Shao, Z. Z.:** Moisture Effects on Antheraea pernyi Silk's Mechanical Property. *Macromolecules* 42(20), 7877-7880, (2009).
- 333 **Grip, S., Johansson, J. & Hedhammar, M.:** Engineered disulfides improve mechanical properties of recombinant spider silk. *Protein Science* 18(5), 1012-1022, (2009).
- 334 **Zheng, R., Zheng, X. J., Dong, J. & Carey, P. R.:** Proteins can convert to beta-sheet in single crystals. *Protein Science* 13(5), 1288-1294, (2004).
- 335 **Xiao, S. B., Xiao, S. J. & Grater, F.:** Dissecting the structural determinants for the difference in mechanical stability of silk and amyloid beta-sheet stacks. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15(22), 8765-8771, (2013).

- 336 **Semrigh, C. & Bausch, A. R.:** Protein crystals: How the weak become strong. *Nature Materials* 9(4), 293-295, (2010).
- 337 **Keten, S., Xu, Z. P., Ihle, B. & Buehler, M. J.:** Nanoconfinement controls stiffness, strength and mechanical toughness of beta-sheet crystals in silk. *Nature Materials* 9(4), 359-367, (2010).
- 338 **Keten, S. & Buehler, M. J.:** Geometric confinement governs the rupture strength of H-bond assemblies at a critical length scale. *Nano Letters* 8(2), 743-748, (2008).
- 339 **Keten, S. & Buehler, M. J.:** Strength limit of entropic elasticity in beta-sheet protein domains. *Physical Review E* 78(6), (2008).
- 340 **Segen, J. C.:** The Dictionary of Modern Medicine. Vol. 1, 70, (1992).
- 341 **Nguyen, A. T. et al.:** Crystal Networks in Silk Fibrous Materials: From Hierarchical Structure to Ultra Performance. *Small* 11(9-10), 1039-1054, (2014).
- 342 **Tarakanova, A. & Buehler, M. J.:** A Materiomics Approach to Spider Silk: Protein Molecules to Webs. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society* 64(2), 214-225, (2012).
- 343 **Zhang, K. H., Ye, Q. & Yan, Z. Y.:** Influence of Post-Treatment with 75% (v/v) Ethanol Vapor on the Properties of SF/P(LLA-CL) Nanofibrous Scaffolds. *International Journal of Molecular Sciences* 13(2), 2036-2047, (2012).
- 344 **Gosline, J. M., Denny, M. W. & Demont, M. E.:** Spider Silk as Rubber. *Nature* 309(5968), 551-552, (1984).
- 345 **Schafer, A., Vehoff, T., Glisovic, A. & Salditt, T.:** Spider silk softening by water uptake: an AFM study. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 37(2), 197-204, (2008).
- 346 **Brown, C. P. et al.:** The critical role of water in spider silk and its consequence for protein mechanics (vol 3, pg 3805, 2011). *Nanoscale* 3(12), 5186-5186, (2011).
- 347 **Rengasamy, R. S., Jassal, M. & Rameshkumar, C.:** Studies on Structure and Properties of Nephila-Spider Silk Dragline. *AUTEX Research Journal* 5(1), 30-39, (2005).
- 348 **Vehoff, T., Glisovic, A., Schollmeyer, H., Zippelius, A. & Salditt, T.:** Mechanical properties of spider dragline silk: Humidity, hysteresis, and relaxation. *Biophysical Journal* 93(12), 4425-4432, (2007).
- 349 **Gosline, J. M., Guerette, P. A., Ortlepp, C. S. & Savage, K. N.:** The mechanical design of spider silks: From fibroin sequence to mechanical function. *Journal of Experimental Biology* 202(23), 3295-3303, (1999).
- 350 **Keerl, D. & Scheibel, T.:** Characterization of natural and biomimetic spider silk fibers. *Bioinspired Biomimetic and Nanobiomaterials* 1(2), 83-93, (2012).
- 351 **Madsen, B., Shao, Z. Z. & Vollrath, F.:** Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *International Journal of Biological Macromolecules* 24(2-3), 301-306, (1999).
- 352 **Perez-Rigueiro, J., Elices, M. & Guinea, G. V.:** Controlled supercontraction tailors the tensile behaviour of spider silk. *Polymer* 44(13), 3733-3736, (2003).
- 353 **Shao, Z. Z. & Vollrath, F.:** The effect of solvents on the contraction and mechanical properties of spider silk. *Polymer* 40(7), 1799-1806, (1999).
- 354 **Bell, F. I., McEwen, I. J. & Viney, C.:** Fibre science - Supercontraction stress in wet spider dragline. *Nature* 416(6876), 37-37, (2002).
- 355 **Yuan, Q. Q., Yao, J. R., Huang, L., Chen, X. & Shao, Z. Z.:** Correlation between structural and dynamic mechanical transitions of regenerated silk fibroin. *Polymer* 51(26), 6278-6283, (2010).
- 356 **Zhang, X. H., Reagan, M. R. & Kaplan, D. L.:** Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61(12), 988-1006, (2009).
- 357 **Kojic, N., Bico, J., Clasen, C. & McKinley, G. H.:** Ex vivo rheology of spider silk. *Journal of Experimental Biology* 209(21), 4355-4362, (2006).
- 358 **Du, N. et al.:** Design of superior spider silk: From nanostructure to mechanical properties. *Biophysical Journal* 91(12), 4528-4535, (2006).

- 359 **Gellynck, K. et al.:** Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 19(11), 3399-3409, (2008).
- 360 **Kuhbier, J. W. et al.:** Interactions between Spider Silk and Cells - NIH/3T3 Fibroblasts Seeded on Miniature Weaving Frames. *PLoS One* 5(8), (2010).
- 361 **Moran, J. M., Pazzano, D. & Bonassar, L. J.:** Characterization of polylactic acid polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering* 9(1), 63-70, (2003).
- 362 **Schafer-Nolte, F. et al.:** Biomechanics and Biocompatibility of Woven Spider Silk Meshes During Remodeling in a Rodent Fascia Replacement Model. *Annals of Surgery* 259(4), 781-792, (2014).
- 363 **Altman, G. H. et al.:** Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24(3), 401-416, (2003).
- 364 **Dewair, M., Baur, X. & Ziegler, K.:** Use of Immunoblot Technique for Detection of Human Ige and Igg Antibodies to Individual Silk Proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 76(4), 537-542, (1985).
- 365 **Panilaitis, B. et al.:** Macrophage responses to silk. *Biomaterials* 24(18), 3079-3085, (2003).
- 366 **Kumbar, S. G., Nukavarapu, S. P., James, R., Nair, L. S. & Laurencin, C. T.:** Electrospun poly(lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds for skin tissue engineering. *Biomaterials* 29(30), 4100-4107, (2008).
- 367 **Hodgkinson, T., Yuan, X. F. & Bayat, A.:** Electrospun silk fibroin fiber diameter influences in vitro dermal fibroblast behavior and promotes healing of ex vivo wound models. *Journal of Tissue Engineering* 5, 1-13, (2014).
- 368 **Hardy, J. G., Leal-Egana, A. & Scheibel, T. R.:** Engineered Spider Silk Protein-Based Composites for Drug Delivery. *Macromolecular Bioscience* 13(10), 1431-1437, (2013).
- 369 **Kim, G. H. & Yoon, H.:** A direct electrospinning process by combined electric field and air-blowing system for nanofibrous wound-dressings. *Applied Physics A - Materials Science & Processing* 90(3), 389-394, (2008).
- 370 **Lackowski, M., Krupa, A. & Jaworek, A.:** Nonwoven filtration mat production by electrospinning method. *Journal of Physics: Conference Series* 301(1), (2011).
- 371 **Kane, A. B., Jean, D., Knuutila, S. & Jaurand, M.:** Malignant Mesothelioma: Mechanism of Carcinogenesis. In: *Occupational Cancers* Vol. 1, (eds S. Anttila & P. Boffetta), 299-319, (2014).
- 372 **Thieme, M., Agarwal, S., Wendorff, J. H. & Greiner, A.:** Electrospinning and cutting of ultrafine bioerodible poly(lactide-co-ethylene oxide) tri- and multiblock copolymer fibers for inhalation applications. *Polymers for Advanced Technologies* 22(9), 1335-1344, (2011).
- 373 **Heikkilä, P., Taipale, A., Lehtimäki, M. & Harlin, A.:** Electrospinning of polyamides with different chain compositions for filtration application. *Polymer Engineering and Science* 48(6), 1168-1176, (2008).
- 374 **Li, L. & Frey, M. W.:** Modification of air filter media with nylon-6 nanofibers. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* 231, (2006).
- 375 **Andrady, A. L.:** Science and Technology of Polymer Nanofibers. Vol. 1, 225-232, (2008).
- 376 **Wendorff, J. H., Agarwal, S. & Greiner, A.:** Electrospinning: Materials, Processing, and Applications. Vol. 1, 188-193, (2012).
- 377 **Graham, K. M. et al.:** Polymeric Nanofibers in Air Filtration Applications In: *Fifteen Annual Technical Conference & Expo of the American Filtration & Separation Society*, Galveston, Texas, Donaldson Co., (2002).
- 378 **Lammel, A. et al.:** Spider silk particles for controlled and sustained delivery of compounds. Patent: EP2506837 A2, (2012).

## 8 Publikationen

Heidebrecht, A., Eisoldt, L., Diehl, J., Schmidt, A., Geffers, M., Lang, G., Scheibel, T.:

Biomimetic Fibers Made of Recombinant Spidroins with the Same Toughness as Natural Spider Silk.

*Advanced Materials* 27(13), 2189-2194, (2015)

Lang, G. & Scheibel, T.:

Multifunktionale Spinnenseide - ein vielversprechender Werkstoff.

*MM MaschinenMarkt* 26, 36-39, (2014)

Lang, G., Jokisch, S. & Scheibel, T.:

Air filter devices including nonwoven meshes of electrospun recombinant spider silk proteins.

*Journal of Visualized Experiments* 75(e50492), (2013).

Leal-Egaña, L.\*, Lang, G.\*, Mauerer, C., Wickinghoff, J., Weber, M., Geimer S., Scheibel, T.:

Interactions of Fibroblasts with Different Morphologies Made of an Engineered Spider Silk Protein.

*Advanced Engineering Materials* 14(3), B67-B75, (2012)

\* Die Autoren trugen gleichermaßen zu dieser Arbeit bei.

9 Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser
$\mu$	Proliferationsrate ( $d^{-1}$ )
A	Querschnittsfläche ( $m^2$ )
$A(\lambda)$	Absorption (-)
<i>A. diadematus</i>	<i>Araneus diadematus</i>
<i>A. pernyi</i>	<i>Antheraea pernyi</i>
<i>A. trifasciata</i>	<i>Argiope trifasciata</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie ( <i>Atomic force microscopy</i> )
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
BSH	Bosch und Siemens Hausgeräte GmbH
c	Konzentration (-)
CA	Celluloseacetat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
d	Abstand/Durchmesser (m)
D	Diffusionskoeffizient ( $m^2s^{-1}$ )
Da	Dalton (g/mol)
$d_k$	Innendurchmesser der Kanüle (m)
DL	<i>Dragline</i>
DMC	Dichlormethan
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMF	Dimethylformamid
E	Elastizitätsmodul (Pa)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eADF3	<i>engineered A. diadematus Fibroin 3</i>
eADF4	<i>engineered A. diadematus Fibroin 4</i>
$E_h$	Horizontale Feldstärke (V/m)
$E_v$	vertikale Feldstärke (V/m)
ESEM	<i>Environmental scanning electron microscope</i>
F	Kraft (N)
FA	Ameisensäure ( <i>formic acid</i> )
$F_B$	Bruchkraft (N)
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FSD	Fourier-Selbstentfaltung ( <i>Fourier-self-deconvolution</i> )
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
h	Spalthöhe (m)
HCl	Salzsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
I	Flächenträgheitsmoment ( $m^4$ )
$I(t)$	Fluoreszenzintensität (RFU)
k	Konsistenzindex (-)
K	Kristallisationsrate (-)
$k_B$	Boltzmann-Konstante (J/K)
$K_d$	Sterberate (-)
L	Faserlänge (m)
$\Delta L$	Deformation (m)
M	Molar (mol/l)
m	Fließindex (-)
MaSp2	<i>Major Ampullate Spidroin 2</i>
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
n	Avrami-Exponent (-)
<i>N. clavipes</i>	<i>Nephila clavipes</i>
NaCl	Natriumchlorid
PA6	Polyamid 6

## Abkürzungsverzeichnis

---

PAN	Polyacrylnitril
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCL	Polycaprolacton
PCU	Polycarbonaturethan
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polymilchsäure
PLGA	Poly lactid-co-Glycolid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Polypropylen
PVP	Polyvinylpyrrolidon
$r$	Achsenabstand (m)
$R$	Kegelradius (m)
r.H.	Relative Luftfeuchtigkeit ( <i>relative humidity</i> )
$R_0$	Molekülradius (m)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFU	Relative Fluoreszenz ( <i>relative fluorescence units</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
$T$	Torsionsmoment (Nm)
$t_{1/2}$	Halbwertszeit (s)
$T_d$	Verdopplungszeit (s)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
$U$	Spannung (V)
$U_T$	Zähigkeit (MJ/m <sup>3</sup> )
UV	Ultra-Violett
$\dot{V}$	Flussrate (l/s)
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight per volume</i> )
w/w	Gewichtsprozent ( <i>weight per weight</i> )
$W_B$	Brucharbeit (J)
$X(t)$	Konzentration vitaler Zellen (-)
$X_C^{rel}(t)$	zeitabhängiger relativer Kristallisationsgrad (-)
$\Delta z_{Mitte}$	laterale Deformation (m)
$\alpha$	Kegelwinkel (rad)
$\epsilon(\lambda)$	Absorptionskoeffizient (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
$\epsilon_E$	Dehnung ( <i>engineered</i> ) (%)
$\epsilon_{max}$	Bruchdehnung (%)
$\epsilon_w$	wahre Dehnung (%)
$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge (m)
$\lambda_{ex}$	Extinktionswellenlänge (m)
$\sigma_E$	Spannung ( <i>engineered</i> ) (Pa)
$\sigma_{max}$	Zugfestigkeit (Pa)
$\sigma_w$	wahre Spannung (Pa)
$\eta$	dynamische Viskosität (Pas)
$\rho$	Dichte (g/cm <sup>3</sup> )
$\tau$	Schubspannung (Pa)
$\dot{\gamma}$	Scherrate (1/s)
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit (rad/s)

### 10 Danksagung

Die im Rahmen dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse sind das Resultat meiner wissenschaftlichen Tätigkeit am Lehrstuhl Biomaterialien vom Mai 2010 bis Dezember 2014 unter der Leitung meines Doktorvaters, Prof. Dr. Thomas Scheibel. Ihm möchte ich in höchstem Maße für das in mich gesetzte Vertrauen bei der Bereitstellung dieses fesselnden und in seiner Faszination unerschöpflichen Themas danken. Seine Bereitschaft mich in die Umsetzung verschiedenster Projekte einzubeziehen und die Offenheit zum Dialog gaben mir die Möglichkeit meinen wissenschaftlichen Horizont transdisziplinär zu erweitern. Ich danke ihm für das Wissen und Sachverständnis, das er mir im Rahmen fachlicher Diskussionen aber auch freundschaftlicher Gespräche vermitteln konnte, und für die finanzielle Unterstützung bei der Umsetzung dieser Erkenntnisse im Labor. Besonderer Dank gilt auch Dr. Martin Humenik für die hervorragende Beratung und den konstruktiven Dialog, der mir insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit außerordentlich hilfreich war. Ferner möchte ich mich bei meinen Kollegen, Dr. Michael Suhre, Dr. Lukas Eisoldt, Dr. Markus Heim, Dr. Stefanie Wohlrab und Aniela Heidebrecht für die immerwährende Bereitschaft bedanken, fundamentales biochemisches Halbwissen in solides Vollwissen umzuwandeln, und mir den Zugang zum Sprachgebrauch der Biochemie zu öffnen.

Ich danke dem Lehrstuhlinhaber der Physikalischen Chemie II, Prof. Dr. Andreas Fery, der mir auf Basis einer Kooperation die Möglichkeit gab, mit den beiden exzellenten Wissenschaftlern Dr. Daniel Kluge und Benedikt Neugirg zusammen zu arbeiten. Beide zeigten sich in höchstem Maß interessiert an der Thematik und bereicherten das gemeinsame Projekt nicht nur mit ihren Kompetenzen, sondern auch mit ihrer freundschaftlichen Art und unermüdlichen Begeisterungsfähigkeit.

Ich sehe es als großes Privileg an, auch rückblickend sagen zu können, dass mir an der Universität Bayreuth und im Rahmen meines Schaffens am Lehrstuhl Biomaterialien die optimalen Randbedingungen zur wissenschaftlichen Entfaltung geboten wurden. Neben der exzellenten und vor allem zugänglichen Infrastruktur und den synergetischen Effekten unkomplizierter, lehrstuhl- und fakultätsübergreifender Beziehungen, profitierte ich sehr von der positiven Arbeitsatmosphäre. In dieser Hinsicht danke ich allen meinen Kollegen, für das großartige Miteinander, welches sich im Rahmen gemeinsamer Ausflüge, Festlichkeiten und sogar auf sportlichem Weg beim Fußball immer wieder manifestierte.

Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle den Ureinwohnern der Ludwig-Thoma-Straße, Aniela Heidebrecht, Dr. Melanie Scheibel, Johannes Diehl, Andreas Schmidt, und Stephan Jokisch, die es auf ihre erfrischende Art vermochten, die Außenstelle zu einem Epizentrum guter Laune und frohen

Schaffens zu machen. Ich danke ganz besonders meinem guten Freund Johannes Diehl, der mich über die Jahre begleitete und mich dabei durch sein unbeschränktes Interesse an Politik, Naturwissenschaften, Ethik, Medien und Spinnenseide als zuverlässige Anlaufstelle für interessante Gespräche bereicherte. In seiner Aufgabe als REM-Beauftragter unterstützte er mich in stundenlangen Abendsitzungen bei der Untersuchung meiner Proben und legte dabei große Sorgfalt bei den Bildern und noch größere Geduld bei meinen Ansprüchen an den Tag. Ferner sorgten er und Andreas Schmidt in ihrer Tätigkeit als „beste technische Assistenten der Welt“ für eine reibungslose Laborarbeit, wobei sie ihrem Berufsstand alle Ehre machten. Ich danke außerdem Dr. Hendrik Bargel, der mich ebenfalls bei der Rasterelektronenmikroskopie unterstützte, Kristin Schacht für die Fixierung und transelektronenmikroskopische Untersuchung meiner Zellkulturproben und Stephan Jokisch für die gute Zusammenarbeit im Filterprojekt. Für organisatorische Hilfestellungen bei der Navigation durch verschiedenste Verwaltungsebenen danke ich den Sekretärinnen des Lehrstuhls, wobei sich vor allem Susanne Schramm beim Meistern vieler bürokratischer Herausforderungen hervortat und dabei stets mit positivem Pragmatismus erfrischte.

Mein größter Dank gebührt den Menschen meines familiären Umfelds, die mit ihrem beispiellosen Rückhalt einen essentiellen Beitrag zu meinem Schaffen leisteten. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Ich danke von ganzem Herzen meiner Partnerin Anja für die großartige Unterstützung und das Verständnis, das sie mir vor allem während der intensiven Zeit der Fertigstellung meiner Arbeit entgegenbrachte. Durch ihre Anteilnahme und die Fähigkeit mich auf humorvolle Art auch nach nächtlichen Stunden des Schreibens bei bester Laune zu halten, gab sie mir unendlich viel Kraft. Ich danke auch meiner Tochter, die sich während dieser Zeit als stetig wachsende Kugel im Bauch ihrer Mutter abzeichnete und mir durch gelegentliche Tritte zu verstehen gab, dass das Leben unaufhaltsam voran schreitet und die größte Herausforderung noch auf mich wartet. Die Vorfreude auf sie ließ nie einen Raum für Ermüdung sondern spendete viel Energie, auch im beruflichen Feld.

Eine sehr wichtige Rolle spielten vor allem meine Eltern Eva und Henner Lang, denen ich das Geschenk meines Ingenieursstudiums verdanke. Durch ihre bedingungslose Unterstützung und ihren steten Glauben an mich gaben sie mir die Möglichkeit zur freien beruflichen Entfaltung. Darüber hinaus zeigten sie ein unerschöpfliches Interesse an meiner Forschung und bekräftigten mich stets in meinem Handeln. Ich danke auch meiner Schwester Susanne und meinem Bruder Hannes dafür, dass sie während dieser Zeit immer ein offenes Ohr für mich hatten und mein Leben durch unseren starken Geschwisterbund bereichern.

### 11 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

---

Name: Gregor Lang  
Geburtsdatum- und Ort: 07.12.1983 in Singen, Baden Württemberg  
Familienstand: Ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutsch



#### Familie

---

Eltern: Dr. rer. pol. habil. Eva Lang, geb. Stehle,  
Professorin em. für Wirtschaftswissenschaften  
Dipl. Kfm. Henner Lang, Vorstand Wasserstiftung  
Geschwister: Susanne Lang und Hannes Lang, Ph.D.

#### Schulbildung

---

1990 – 1994 Grundschule Königsdorf, Bayern  
1994 – 2003 Gabriel von Seidl Gymnasium Bad Tölz, Bayern  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### Zivildienst

---

07/2003 – 04/2004 Zivildienst im Landratsamt Bad Tölz – Wolfratshausen  
Sachgebiet: Umweltschutz

#### Akademischer Werdegang

---

10/2004 – 07/2006 Grundstudium an der Universität Bayreuth  
Studiengang: Umwelt- und Bioingenieurwissenschaften  
10/2006 – 03/2010 Hauptstudium an der Universität Bayreuth  
Studienrichtung: Bioingenieurwissenschaften  
Studienschwerpunkt: Biokomponenten

- Studienarbeit: „*Entwicklung eines Laborbioreaktors zur Erforschung mikrobiologischer Vorgänge in Biogasanlagen*“  
Lehrstuhl für Bioprozesstechnik, 10/2007
- Teamprojektarbeit: „*Ionenselektive, CNT-funktionalisierte Nafion-Komposit-Membran zur Anwendung in mikrobiellen Brennstoffzellen*“  
Lehrstuhl für Werkstoffverarbeitung, 03/2008
- Diplomarbeit: „*Herstellung von Vliesstoffen aus Proteinen und Analyse ihrer Eignung als Scaffold für Zellkulturen*“  
Lehrstuhl Biomaterialien, 02/2010

Seit 05/2010

Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl Biomaterialien

03/2011

Zulassung zum Promotionsverfahren

03/2015

Erfolgreicher Abschluss des Promotionsverfahrens

- Dissertationsthema: „*Herstellung und Charakterisierung von Fasern aus rekombinanten Spinnenseidenproteinen und deren potentielle Applikationen*“

### Praktika / sonstige Tätigkeiten

---

04/2004 – 05/2004

Arbeitsverhältnis als Werkstudent bei Linde AG – Engineering,  
Pullach, Bayern

06/2004 – 07/2004

Industriepraktikum bei Otto Speck GmbH & Co. KG.,  
Geretsried, Bayern

12/2007 – 02/2008

Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für  
Funktionsmaterialien, Universität Bayreuth

01-03, 07-09/2008

Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Lehrstuhl Biomaterialien,  
Universität Bayreuth

10/2008 – 12/2008

Forschungspraktikum bei CSIRO, Materials Science and Engineering,  
Clayton South, VIC, Australien

04, 07-12/2009

Tätigkeit als studentische Hilfskraft am Lehrstuhl Biomaterialien,  
Universität Bayreuth

## 12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ferner erkläre ich, dass diese Dissertation nicht bereits an anderer Stelle eingereicht wurde oder von anderer Stelle endgültig abgelehnt wurde. Ich versichere, dass ich weder diese noch eine gleichartige Promotionsprüfung endgültig nicht bestanden habe. Zudem erkläre ich, dass ich weder in der Vergangenheit Hilfe von einem gewerblichen Promotionsberater- bzw. Vermittler in Anspruch genommen habe, noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Gregor Lang, Bayreuth, April 2015