

Hemmung der Eisrekristallisation in wässrigen Lösungen durch Antigefrierglykopeptide

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Carsten Budke

Bielefeld 2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Koop
2. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier °° ISO 9706

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Teilprojekts A8 des SFB 613 an der Universität Bielefeld in der Arbeitsgruppe für Atmosphärische und Physikalische Chemie. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Koop, dem Leiter dieser Arbeitsgruppe, und den beiden anderen Teilprojektleitern Prof. Dr. Norbert Sewald und Dr. Sören Doose möchte ich danken, für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema arbeiten zu können. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Koop für die gute Betreuung und seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Zudem danke ich Prof. Sewald für die Übernahme der Zweitbegutachtung.

Besonders danken möchte ich weiterhin Carolin Plattner, Anna S. Norgren und Marco Wißbrock, die einen Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen synthetisiert haben, und außerdem Lilly Nagel und Stefan Bollmann. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projekts. Carolin und Lilly gilt mein Dank zusätzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Prof. Dr. Peter Kusalik und Payman Pirzadeh von der University of Calgary danke ich für einige Vorschläge zu untersuchender Verbindungen und insbesondere Payman für einige hilfreiche Diskussionen.

Des Weiteren danke ich allen, deren Bachelorarbeiten, Block- oder Forschungspraktika ich in den letzten Jahren mitbetreuen durfte für die gute Zusammenarbeit und die Bereicherung meiner Arbeit: Natalie Pries, Marius Koch, Kerstin Hartkamp, Raimund Noske, Nadine Weinert und Ferdinand Zink.

Der gesamten Arbeitsgruppe PC 2 danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Aktivitäten auch außerhalb des Labors. Markus Böttcher möchte ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und ihre Geduld.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Heggemann, C., Budke, C., Schomburg, B., Majer, Z., Wißbrock, M., Koop, T. und Sewald, N.: Antifreeze Glycopeptide Analogues: Microwave-Enhanced Synthesis and Functional Studies, *Amino Acids*, 38, 213–222, doi:10.1007/s00726-008-0229-0, 2010.

Budke, C., Heggemann, C., Koch, M., Sewald, N. und Koop, T.: Ice Recrystallization Kinetics in the Presence of Synthetic Antifreeze Glycoprotein Analogues Using the Framework of LSW Theory, *J. Phys. Chem. B*, 113, 2865–2873, doi:10.1024/jp805726e, 2009.

Norgren, A. S., Budke, C., Majer, Z., Heggemann, C., Koop, T. und Sewald, N.: On-Resin Click-Glycoconjugation of Peptoids, *Synthesis*, S. 488–494, doi:10.1055/s-0028-1083302, 2009.

Zusammenfassung

Antigefrierproteine (AFP) hemmen das Wachstum von Eiskristallen und spielen daher eine wichtige Rolle beim Überleben vieler Organismen bei Temperaturen unterhalb des Gefrierpunkts. Insbesondere bei Antigefrierglykoproteinen und -glykopeptiden (AFGP), die in einigen Fischen der Polarmeere vorkommen, sind viele Aspekte zum Wirkmechanismus nach wie vor unverstanden. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Reihe von Substanzen untersucht, die wie AFP und AFGP das Eiswachstum inhibieren. Dabei wurde die Effizienz dieser Wachstumshemmung mit Hilfe einer speziellen Form der Ostwaldreifung bestimmt, nämlich der Eisrekristallisation von polykristallinem Eis in wässrigen Lösungen.

Es wurden Experimente zur Kinetik der Eisrekristallisation durchgeführt, um neben der hemmenden Wirkung der Substanzen auch den Einfluss weiterer Faktoren wie der Temperatur und des Eisanteils zu bestimmen. Hierzu wurden wässrige Natriumbromid- und Saccharoselösungen bei Rekristallisationstemperaturen von -25 bis -5°C untersucht. Um die Kinetik der Eisrekristallisation und den Einfluss der verschiedenen Faktoren zu quantifizieren, wurde eine erweiterte Form der LSW-Theorie (Lifshitz-Slyozov-Wagner) entwickelt und verwendet. Damit war es möglich, die Effizienz zu bestimmen, mit der AFGP und einige synthetische Analoga die Rekristallisation hemmen. In den Untersuchungen wurden Auswirkungen bereits kleiner struktureller Veränderungen sichtbar, wodurch Struktur-Wirkungs-Beziehungen quantitativ und nicht wie zuvor nur qualitativ abgeleitet werden konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit effektivste Verbindung zeigte bereits bei einer Konzentration von $0.23\ \mu\text{g mL}^{-1}$ eine Antigefrieraktivität. Damit ist die hier vorgestellte Methode der Effizienzbestimmung zudem um ein Vielfaches empfindlicher als andere gängige Verfahren, wodurch es möglich wurde, bei bisher als inaktiv eingestuften Verbindungen eine Aktivität nachzuweisen.

Des Weiteren wird eine neue experimentelle Methode vorgestellt, bei der die optische Anisotropie von Eis dazu genutzt wurde, um mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie Aufschluss über diejenigen Eisfacetten zu erhalten, deren Wachstum durch die spezifische Adsorption der Glykopeptide gehemmt ist.

Unter Verwendung aller erhaltenen Daten ergibt sich, dass der Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus bei Antigefrierglykopeptiden auf einer reversiblen Adsorption an prismatischen Eisflächen basiert. Zudem legen die aufgestellten Struktur-Wirkungs-Beziehungen den Schluss nahe, dass die Adsorption an Eis auf den Hydroxygruppen der Kohlenhydrate an den Positionen C4 oder C6 beruht. Allerdings wird auch deutlich, dass die Hydroxygruppen selbst oder Motive wie die Disaccharidgruppe der natürlichen AFGP nicht essentiell sind, aber die Effektivität sehr stark erhöhen.

Abstract

Antifreeze proteins (AFP) inhibit the growth of ice crystals and, thus, play an important role in the survival of many organisms at temperatures below the freezing point. But many aspects of the mechanism of action are still not understood, especially for antifreeze glycoproteins and glycopeptides (AFGP), which are present in some fish of the polar oceans. Therefore, within the present work several substances were investigated that inhibit the ice growth similar to AFP and AFGP. The efficiency of this growth inhibition was determined using a special form of Ostwald ripening, namely, the ice recrystallization of polycrystalline ice in aqueous solutions.

Experiments on the kinetics of ice recrystallization were conducted for determining the influence of factors such as temperature and ice volume fraction in addition to the inhibitory effect of the substances. Hence, aqueous sodium bromide and sucrose solutions were investigated at recrystallization temperatures of -25 to -5°C . An extended form of LSW theory (Lifshitz-Slyozov-Wagner) was developed and employed for quantifying the kinetics of the ice recrystallization process and the influence of the different factors. This analysis allows for the determination of the efficiency of AFGP and some synthetic analogues in inhibiting recrystallization. The effects of very small structural changes became evident, allowing for the establishment of quantitative structure-activity relationships, in contrast to previous qualitative studies. The most efficient compound investigated in this work showed antifreeze activity already at a concentration of $0.23\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Hence, the method presented here is much more sensitive than other common procedures, which made it possible to detect activity for compounds previously classified as inactive.

Furthermore, a new experimental method is presented, which uses the optical anisotropy of ice to provide information on those ice facets, whose growth is inhibited by the specific adsorption of the glycopeptides.

The combined data strongly suggests that the adsorption-inhibition mechanism of antifreeze glycopeptides is based on a reversible adsorption to prism ice faces. In addition, the observed structure-activity relationships lead to the conclusion that the hydroxy groups of the carbohydrates at positions C4 or C6 are responsible for the adsorption. It is also clear, however, that the hydroxy groups, or motifs like the disaccharide groups of natural AFGP are not essential for activity, but they greatly increase their efficiency.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Antigefrierproteine	3
2.1	Leben mit Eis	3
2.2	Wirkungsweise	6
2.3	Antigefrierglykoproteine	10
2.4	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	14
2.5	Antigefrierpolymere	20
3	Eisrekristallisation	25
3.1	LSW-Theorie	25
3.2	Experimenteller Teil	28
3.3	Auswertung	32
3.4	Wässrige Lösungen	37
3.4.1	Parametrisierungen	37
3.4.2	Berechnung der LSW-Ratenkonstante	41
3.4.3	Natriumbromid- und Saccharoselösungen	43
3.4.4	Weitere wässrige Lösungen	50
3.5	Temperatur	53
3.5.1	Konstante Temperatur	53
3.5.2	Stufenweise Temperaturvariation	55
3.5.3	Zyklische Temperaturvariation	58
3.5.4	Zusammenfassung	61
3.6	Additive	63
3.6.1	Kinetische Beschreibung	63
3.6.2	AFP-Effektivität unter verschiedenen Bedingungen	68
3.6.3	Struktur-Wirkungs-Untersuchungen	74
3.6.4	Einfluss von niedermolekularen Verbindungen	100
4	Polarisationsmikroskopie	103
4.1	Optische Anisotropie	103
4.2	Experimenteller Teil	105
4.3	Antigefrierglykopeptide	106
4.4	Polyvinylalkohol	109
4.5	Zusammenfassung	111

5	Schlussfolgerungen und Ausblick	113
6	Anhang	117
6.1	Anpassungen	117
6.1.1	Wässrige Lösungen	117
6.1.2	Additive	118
6.2	ImageTool-Skript	120
6.3	Igor-Skript	125
7	Literaturverzeichnis	135

Abbildungsverzeichnis

2.1	Thermische Hysterese und Kelvin-Effekt.	6
2.2	Modell der Adsorption von AFP Typ I.	7
2.3	Synthese von AFGP nach Tsuda und Nishimura (1996).	12
2.4	Synthese des T-Antigen-Threonin-Bausteins nach Plattner (2009).	13
2.5	Synthese von AFGP nach Plattner (2009).	14
2.6	Chemische Modifikationen der Disaccharidgruppe bei natürlichen AFGP.	15
2.7	Essentielle AFGP-Motive nach Tachibana et al. (2004a).	17
2.8	C-verknüpfte AFGP-Analoga (Ben et al., 1999).	18
2.9	Vergleich zwischen Peptiden und Peptoiden.	20
2.10	Modell für die Eisadsorption von PVA nach Budke und Koop (2006).	22
2.11	Inhibierung der Rekristallisation durch Polymere nach Gibson et al. (2009).	24
3.1	Experimenteller Aufbau.	29
3.2	Optische Beobachtung der Eisrekristallisation.	30
3.3	Bildanalyse mittels Bilderkennungssoftware.	31
3.4	Bestimmung der Rekristallisationsratenkonstante.	33
3.5	Berechnung des Eisanteils anhand des Phasendiagramms.	34
3.6	Bestimmung des Eisanteils und zeitliche Änderung der Eisoberfläche.	36
3.7	Schmelzpunkt- und Dichte-Kurven von wässrigen Lösungen.	37
3.8	Diffusionskoeffizienten von Wasser in Natriumbromidlösungen.	40
3.9	Abhängigkeit der diffusionskontrollierten Rekristallisation vom Eisanteil.	44
3.10	Abweichung zwischen Einwaage- und Ausgangsmassenanteil.	46
3.11	Abhängigkeit der Rekristallisation vom Massenanteil des Gelösten.	47
3.12	Zusammenhang zwischen der Kristallanzahl und dem Eisanteil.	49
3.13	Zusammenhang zwischen der Eis/Lösung-Grenzfläche und dem Eisanteil.	50
3.14	Rekristallisation bei konstanter Temperatur.	54
3.15	Stufenweise Erniedrigung der Rekristallisationstemperatur.	55
3.16	Stufenweise Erhöhung der Rekristallisationstemperatur.	57
3.17	Sprungweise zyklische Variation der Temperatur.	59
3.18	Sprungweise und graduelle zyklische Variation der Temperatur.	60
3.19	Optische Betrachtung der AFP-kontrollierten Rekristallisation.	64
3.20	Bestimmung der AFP-kontrollierten Rekristallisationsgeschwindigkeit.	66
3.21	Skalierung der limitierenden Rekristallisationsratenkonstante.	67
3.22	Beeinflussung der Effektivität von AFGP 39a durch den Eisanteil.	69
3.23	Beeinflussung der Effektivität von AFGP 39a durch die Temperatur.	70
3.24	Beeinflussung der Effektivität von PVA6 (29a) durch den Eisanteil.	71

3.25	Beeinflussung der Effektivität von PVA6 (29a) durch die Temperatur. . . .	71
3.26	Beeinflussung der Effektivität von PVA27 (29b) durch die Temperatur. . .	72
3.27	Zusammenfassung der Effektivitäten bei unterschiedlichen Bedingungen. .	73
3.28	Molmassenabhängigkeit der Inhibierung bei PVA.	75
3.29	Rekristallisation in PEG-Lösungen.	76
3.30	Rekristallisation in Lösungen, die Polyasparaginsäurenatriumsalz enthalten.	77
3.31	Rekristallisation in Lösungen, die Klick-Chemie-Produkte enthalten. . . .	79
3.32	Molmassenabhängigkeit der Inhibierung bei Disaccharid-AFGP.	82
3.33	Molmassenabhängigkeit der Inhibierung bei Monosaccharid-AFGP.	82
3.34	Einfluss des Kohlenhydrats bei AFGP mit 3 Wiederholeinheiten.	83
3.35	Einfluss des Kohlenhydrats bei AFGP mit 4 Wiederholeinheiten.	83
3.36	Acetylierung der Kohlenhydrat-Hydroxygruppen.	85
3.37	<i>N</i> -Terminal acetylierte AFGP.	86
3.38	Einfluss von Sequenzvariationen bei AFGP mit 3 Wiederholeinheiten. . . .	87
3.39	Peptide mit (Pro-Ala-Thr)-Wiederholeinheit.	89
3.40	Zusammenfassung der Effektivitäten der untersuchten Verbindungen. . . .	91
3.41	Streuung der Ratenkonstanten bei den untersuchten Verbindungen.	94
3.42	Diskussion des Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus.	96
3.43	Effektivitätsvergleich der untersuchten Glykopeptide.	98
4.1	Doppelbrechende Kristalle zwischen gekreuzten Polarisatoren.	104
4.2	Eiskristallhabitus in Gegenwart von Monosaccharid-AFGP (38b).	107
4.3	Eiskristallhabitus in Gegenwart von PVA (29b).	110

Tabellenverzeichnis

2.1	Klassifizierung und Eigenschaften von Fisch-Antigefrierproteinen.	4
2.2	Natürlich vorkommende Varianten von Antigefrierglykopeptiden.	11
3.1	Kinetische Parameter nach Ardell (1997).	27
3.2	Grenzwerte für AFP-kontrollierte Rekristallisation.	32
3.3	Grenzwerte für die Güte der Ratenkonstanten.	33
3.4	Parametrisierung von Schmelzpunkt und Dichte wässriger Lösungen.	38
3.5	Parametrisierung der Wasser-Diffusionskoeffizienten in NaBr-Lösungen.	39
3.6	Größen zur Berechnung der LSW-Ratenkonstante.	42
3.7	Parametrisierung der Eisanteilabhängigkeit der Ratenkonstante.	45
3.8	Rekristallisation in verschiedenen wässrigen Lösungen.	51
3.9	Einfach aufgebaute Polymere.	74
3.10	Mit Klick-Chemie synthetisierte Verbindungen nach Norgren et al. (2009).	78
3.11	Antigefrier(glyko)peptide mit (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheit.	81
3.12	Prolinhaltige Antigefrierglykopeptide.	87
3.13	Beeinflussung durch niedermolekulare Verbindungen.	101
6.1	Parameter der Anpassungen in Abbildung 3.9.	117
6.2	Parameter der Anpassungen in Abbildung 3.12 und 3.13.	117
6.3	Parameter der Anpassungen in Unterabschnitt 3.6.2.	118
6.4	Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Polymere).	118
6.5	Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Polymere).	118
6.6	Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Glykopeptide).	119
6.7	Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Glykopeptide).	119

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

A ^b	<i>C</i> -[1-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glukopyranosyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl]-L-alanin
Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid
AcOH	Essigsäure
AcSH	Thioessigsäure
AFGP	Antigefrierglykoprotein oder -peptid (engl.: antifreeze glycoprotein/peptide)
AFP	Antigefrierprotein oder -peptid (engl.: antifreeze protein/peptide)
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
CD	Zirkulardichroismus (engl.: circular dichroism)
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DPPA	Diphenylphosphorylazid
DSC	dynamische Wärmestromkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry)
EtOH	Ethanol
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
G ^{α}	<i>N</i> -[1-(α -D-Galaktopyranosyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ylmethyl]glycin
G ^{β}	<i>N</i> -[1-(β -D-Galaktopyranosyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ylmethyl]glycin
G ^b	<i>N</i> -[1-(2-Acetamido-2-desoxy- β -D-glukopyranosyl)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-ylmethyl]glycin
GalNAc	D- <i>N</i> -Acetylgalaktosamin
Gal	D-Galaktose
GPMDES	3-Glycidoxypropylmethyldiethoxysilan
GPTES	3-Glycidoxypropyltriethoxysilan

HATU	<i>O</i> -(7-Azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HOAt	1-Hydroxy-7-aza-1 <i>H</i> -benzotriazol
HOBt	1-Hydroxy-1 <i>H</i> -benzotriazol
INA	Eiskeim (engl.: ice nucleating agent)
IPO	Isopropylamin-Oktahydrat
LSW	Lifshitz-Slyozov-Wagner
MeOH	Methanol
MPTES	3-Methacryloxypropyltriethoxysilan
NaOAc	Natriumacetat
NaOMe	Natriummethanolat
NMR	magnetische Kernresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance)
PAEM	Poly-2-aminoethylmethacrylat
PAsSNa	Polyasparaginsäurenatriumsalz
PAS	Polyacrylsäure
PEG	Polyethylenglykol
PGalEMA	Poly(β -D-galaktosyloxy)ethylmethacrylat
PMAMGlc	Poly(1-methyl- α -D-glukosyl)methacrylat
PMAS	Polymethacrylsäure
PVA	Polyvinylalkohol
RTM	Rastertunnelmikroskopie
Sac	Saccharose
SPPS	Festphasenpeptidsynthese (engl.: solid phase peptide synthesis)
T ^a	<i>O</i> -(2-Acetamido-2,4,6-tri- <i>O</i> -acetyl-2-desoxy- α -D-galaktopyranosyl)-L-threonin
T ^d	<i>O</i> -[2-Acetamido-2-desoxy-3- <i>O</i> -(β -D-galaktopyranosyl)- α -D-galaktopyranosyl]-L-threonin
T ^m	<i>O</i> -(2-Acetamido-2-desoxy- α -D-galaktopyranosyl)-L-threonin
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBTU	<i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluorborat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TH	thermische Hysterese

TMSOTf	Trimethylsilyltrifluormethansulfonat
VFT	Vogel-Fulcher-Tammann
VG	Voorhees-Glicksman
VTES	Vinyltriethoxysilan
WLF	Williams-Landel-Ferry

Symbole

A	Erster Parameter der Ardell-Gleichung (3.9)
A_{ges}	Probenfläche
A_i	Fläche eines Kristalls
A	Erster Parameter der Jones-Dole-Gleichung (3.16)
α	Molekularfeldpotential
A	mittlere Kristallfläche
B	Zweiter Parameter der Ardell-Gleichung (3.9)
β	Übergangs-Faktor zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation
B	Zweiter Parameter der Jones-Dole-Gleichung (3.16)
B	VFT-Konstante
$c_{eq,w}$	Gleichgewichtskonzentration von Wasser in der Lösung im Gleichgewicht mit Eis
c_∞	Konzentration an Gelöstem im Gleichgewicht mit einem Kristall des Radius $r_i \rightarrow \infty$
c_i	Inhibierungskonzentration des Übergangs zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation
c_l	Konzentration an Gelöstem in der Lösung
c_r	Konzentration an Gelöstem im Gleichgewicht mit einem Kristall des Radius r_i
C	Fragilitätsparameter
D_0	Diffusionskoeffizient von Wasser in reinem Wasser
Δw	Differenz zwischen w_E und w_Q
Δ	Übersättigung
ΔE	Aktivierungsenergie
D_∞	theoretischer Diffusionskoeffizient von Wasser in reinem Wasser für $T \rightarrow \infty$

D_i	durchschnittlicher Durchmesser eines Kristalls
\mathbb{D}	Dritter Parameter der Jones-Dole-Gleichung (3.16)
d	Dimensionalität der dispergierten Phase
D	Dimensionalität des Diffusionsfeldes
D_w	Diffusionskoeffizient von Wasser in der Lösung
D	Diffusionskoeffizient
f	Überlapp-Faktor
$\gamma_{i/l}$	Grenzflächenenergie zwischen Eis und Lösung
$\gamma_{v/l}$	Grenzflächenenergie zwischen Luft und Lösung
γ	Grenzflächenenergie
J	Fluss
K_{11}	Erster Freie-Volumen-Parameter des Lösemittels
K_{12}	Erster Freie-Volumen-Parameter des Gelösten
K_{21}	Zweiter Freie-Volumen-Parameter des Lösemittels
K_{22}	Zweiter Freie-Volumen-Parameter des Gelösten
k_{d0}	diffusionsbestimmte Ratenkonstante für $Q_v \rightarrow 0$
k_d	diffusionsbestimmte Ratenkonstante
k_i	AFP-bestimmte Ratenkonstante
k_{l0}	limitierende Ratenkonstante für $Q_v \rightarrow 0$
k_{lim}	Grenzwert von k zur Unterscheidung zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation
k_{LSW}	LSW-Rekristallisationsratenkonstante
k_l	limitierende Ratenkonstante
k	Rekristallisationsratenkonstante
m	Erster kinetischer Parameter der Ardell-Gleichung (3.9)
M_w	Gewichtsmittel der Molmasse
m	Masse
n	Kinetischer Parameter der Ardell-Gleichung (3.8)
N	Kristallanzahl
Ω_i	molares Volumen von Eis
Ω	molares Volumen
O_v	Grenzfläche zwischen Eis und Lösung pro Volumen
p	Zweiter kinetischer Parameter der Ardell-Gleichung (3.9)

p	Eisanteil-Parameter der modifizierten VG-Gleichung (3.10)
Q_a	Flächenanteil von Eis
Q_m	Massenanteil von Eis
Q_v	Volumenanteil von Eis
r_0	mittlerer Kristallradius zur Zeit $t = 0$
r_c	kritischer Radius eines Kristalls im Gleichgewicht mit der Lösung
r_{h0}	hypothetischer mittlerer Kristallradius zur Zeit $t = 0$
r_i	Radius eines Kristalls
ρ_i	Dichte von Eis
ρ_l	Dichte der Lösung
R_i	Rundheit eines Kristalls
ROI	betrachtete Bildfläche
R	Allgemeine Gaskonstante
σ	Standardabweichung
σ_{lim}	Grenzwert für die Standardabweichung der Ratenkonstante k zur Beurteilung ihrer Güte
T_0	Vogel-Temperatur
T_{g1}	Glaspunkt des Lösemittels
T_{g2}	Glaspunkt des Gelösten
t_s	Übergangszeitpunkt zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation
T	Temperatur
t	Zeit
U_i	Umfang eines Kristalls
\hat{V}_1^*	spezifisches kritisches Volumen des Lösemittels
\hat{V}_2^*	spezifisches kritisches Volumen des Gelösten
V_{ges}	Probenvolumen
V	mittleres Teilchenvolumen
w_1	Massenanteil des Lösemittels
w_2	Massenanteil des Gelösten
$w_{eq,s}$	Gleichgewichtsmassenanteil von Gelöstem in der Lösung im Gleichgewicht mit Eis
w_E	Einwaagemassenanteil des Gelösten

w_Q	Ausgangsmassenanteil des Gelösten (berechnet über den Eisanteil Q_v)
w_s	Massenanteil des Gelösten
ξ	Verhältnis der kritischen molaren Volumina der Sprungeinheiten des Lösemittels und des Gelösten
Z_a	Teilchendichte (pro Fläche)
Z_v	Teilchendichte (pro Volumen)

1 Einleitung

Die Natur hat eine Vielzahl von Strategien entwickelt, um Leben unter extremen Bedingungen zu ermöglichen. Beispielsweise nutzen einige Fische der Polarmeere so genannte Antigefrierproteine und -peptide (AFP; engl.: antifreeze protein/peptide), um der Gefahr intrazellulärer Eisbildung und den entsprechenden Auswirkungen zu begegnen (Venketesh und Dayananda, 2008). Diese Proteine hemmen das Eiswachstum und minimieren dadurch die Auswirkungen des Kontakts mit Eis, dem diese Fische aufgrund ihres Lebensraums ausgesetzt sind. Die Inhibierung des Eiswachstums basiert auf der Adsorption der Proteine an der Eisoberfläche. AFP sind also keine Gefrierschutzmittel im üblichen Sinn des Begriffs „antifreeze“, denn sie bewirken im Gegensatz zu Gefrierschutzmitteln keine starke Erniedrigung des Eisschmelzpunkts.

Zu den heute bekannten AFP gehört auch die Klasse der Antigefrierglykoproteine und -glykopeptide (AFGP; engl.: antifreeze glycoprotein/peptide). Obwohl diese Proteine bereits in den 1960er-Jahren von DeVries und Wohlschlag (1969) entdeckt wurden und damit die erste bekannte AFP-Art darstellen, ist auch heute noch wenig über ihren genauen Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus bekannt. Anhand von Struktur-Wirkungs-Untersuchungen sollen in dieser Arbeit Struktur motive aufgeklärt werden, die für die Adsorption dieser Proteine an Eis essentiell sind. Zudem soll die Frage beantwortet werden, ob die Wirksamkeit der AFGP auf einer irreversiblen oder reversiblen Adsorption beruht.

Zur Quantifizierung der Effektivität, mit der verschiedene AFGP das Eiswachstum hemmen, wird ihre Wirkung auf die Eisrekristallisation experimentell untersucht. Rekristallisation ist eine Form der Ostwaldreifung, bei der in einer polykristallinen Probe große Kristalle auf Kosten von kleineren wachsen. Diese Methode bietet gegenüber der häufig verwendeten Messung der Temperaturdifferenz zwischen dem Eisschmelzpunkt und der Temperatur, unterhalb derer Kristallwachstum zu beobachten ist, den Vorteil einer sehr viel höheren Empfindlichkeit (Inada und Lu, 2003, 2004). Um einen messbaren Effekt auf die Eisrekristallisation zu haben, genügen nämlich deutlich kleinere AFGP-Konzentrationen. Da Eisrekristallisation auch durch andere Faktoren wie Temperatur und Eisanteil beeinflusst wird (Jayanth und Nash, 1989), ist ein weiterer wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit die quantitative Beschreibung dieser Einflüsse. Erst damit kann die Wirkung der AFGP gesondert betrachtet werden. Zudem können die hier untersuchten Lösungen von z. B. Saccharose als Modellsysteme in der Lebensmittelindustrie dienen (Sutton et al., 1996; Regand und Goff, 2006).

Die Gewinnung von AFGP aus natürlichen Quellen ist heute noch relativ aufwendig und kostenintensiv. Daher ist ein langfristiges Ziel, mit Hilfe der hier gezeigten Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen Analoga zu entwickeln, die für Anwendungen inter-

essant sind. Mögliche Anwendungsgebiete reichen von der Lagerung von Lebensmitteln bei tiefen Temperaturen bis hin zur Kryokonservierung von Geweben oder Organen im medizinischen Bereich (Griffith und Ewart, 1995; Wang, 2000).

Im folgenden Kapitel wird es darum gehen, die verschiedenen in der Natur vorkommenden AFP und ihre Wirkungsweise vorzustellen. Besonders ausführlich werden an dieser Stelle AFGP behandelt und bisherige Struktur-Wirkungs-Untersuchungen zu diesen Proteinen zusammengefasst. Des Weiteren gehören zu diesem Kapitel Antigeferenzpolymere wie z. B. Polyvinylalkohol (PVA), die aufgrund ihrer besseren Verfügbarkeit für Anwendungen interessant sein könnten und daher auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Im Kapitel 3 folgt dann die Beschreibung der Eiskristallisation in wässrigen Lösungen sowohl theoretisch anhand der LSW-Theorie (Lifshitz-Slyozov-Wagner) als auch experimentell. Dabei werden erstens wässrige Natriumbromid- und Saccharoselösungen genauer untersucht und Einflüsse von Temperatur und Eisanteil auf die Rekrystallisationsgeschwindigkeit quantifiziert, zweitens werden Rekrystallisationsexperimente bei variierenden Temperaturen vorgestellt und drittens werden für eine Reihe von Additiven wie Polymeren, Peptiden und Peptiden anhand der Bestimmung der jeweiligen Inhibierungseffizienz Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt. Dabei werden die Beobachtungen in Hinblick auf ein besseres Verständnis der AFGP-Adsorption interpretiert. In Kapitel 4 wird schließlich eine neue Methode vorgestellt, die unter Ausnutzung der optischen Anisotropie von Eis mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie weiteren Aufschluss über den Adsorptionsprozess liefert.

2 Antigefrierproteine

2.1 Leben mit Eis

Um ein Überleben von Organismen wie beispielsweise in den Polarmeeren lebenden Fischen bei Temperaturen unterhalb von 0°C zu ermöglichen, hat die Natur im Wesentlichen zwei Strategien entwickelt (Margesin et al., 2007). Dies sind die Gefriervermeidung und die Gefriertoleranz. Bei gefriervermeidenden Organismen wird die Bildung von Eis verhindert. Dies kann durch Erhöhung der Konzentration an Polyalkoholen und Zuckern erreicht werden, wodurch der Eisschmelzpunkt erniedrigt wird. Häufig vorkommende Verbindungen sind Glycerol und Mannitol bzw. Trehalose und Glukose. Die Verschiebung des Eisschmelzpunkts, der die thermodynamische Grenze darstellt, unterhalb der Eis stabil ist, beruht auf einer kolligativen Eigenschaft der gelösten Substanzen. Dies bedeutet, die Änderung hängt in erster Linie von ihrer Konzentration, nicht aber von ihrer chemischen Struktur ab. Die in Organismen beobachtete Konzentrationserhöhung kann auf zweierlei Weise erreicht werden. Zum einen werden die entsprechenden Substanzen in größeren Mengen produziert, zum anderen wird Wasser aus den Zellen entfernt. Eine weitere Möglichkeit der Gefriervermeidung besteht in der kinetischen Hinderung der Eisbildung (Nukleation) selbst. Die intrazelluläre Flüssigkeit wird in einem unterkühlten, und damit metastabilen, Zustand gehalten. Hierzu werden Eiskeime, die die Eisbildung erleichtern würden, entfernt oder ihre Wirkung durch AFP aufgehoben (Zachariassen und Kristiansen, 2000). AFP, wie sie z. B. in Insekten vorkommen, verhindern zudem das Eindringen von extrazellulärem Eis durch die Membranen. Anstelle der Gefriervermeidung verfolgen einige Organismen die Strategie der Gefriertoleranz. Hierbei wird nicht die Eisbildung verhindert, sondern deren Auswirkung minimiert. Dazu tragen häufig ebenfalls AFP bei. Der hier nichtkolligative Mechanismus basiert auf der Adsorption der Proteine an bestimmte Eisflächen, wodurch deren Wachstum gestoppt wird.

Entdeckt wurden AFP von DeVries und Wohlschlag (1969) in antarktischen Fischen. Bereits in den 50er-Jahren des vergangenen Jahrhunderts beobachteten Scholander et al. (1957) bei arktischen Fischen, dass diese bei Wassertemperaturen von -1.8°C überleben können. Natriumchlorid, Harnstoff und freie Aminosäuren erklären jedoch nur eine Schmelzpunktniedrigung ihres Blutplasmas auf -1.0°C. DeVries und Wohlschlag konnten zeigen, dass für das Überleben der Fische ein Glykoprotein verantwortlich ist. Dieses ist aus (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten aufgebaut, wobei am Threonin jeweils ein Disaccharid gebunden ist. Je nach Anzahl der Wiederholeinheiten n gibt es dieses AFP mit Massen von 2.6 bis 33.0 kDa ($n = 4 - 50$). Heute sind neben den Glykoproteinen noch vier weitere AFP-Typen in Fischen bekannt (Tabelle 2.1).

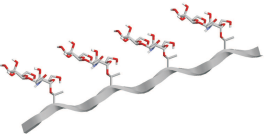




Typ	Klassifikation	Masse [kDa]	Eisbindung	Struktur	
AFGP	(Ala-Ala-Thr)- Einheiten, Disaccharide	2.6 - 33.0	{100}	Polyprolin II	
AFP I	alaninreich, α -Helix	3.3 - 4.5	{201}, {2 $\bar{1}$ 0}	α -Helix	
AFP II	cysteinreich, Disulfid- Bindungen	11.0 - 24.0	{111}	globulär, C-Typ-Lektin- Faltung	
AFP III	β -Sandwich	6.5 - 14.3	{100}, {201}	globulär mit einer flachen Seite	
AFP IV	glutaminreich, spiralförmiges Bündel	12.3	unbekannt	Helixbündel vermutet	

Tabelle 2.1: Klassifizierung und Eigenschaften von Fisch-Antigefrierproteinen. Die gezeigten Strukturen der AFP I - IV sind zu finden unter <http://www.rcsb.org>. AFP I. PDB-ID: 1wfa (Sicheri und Yang, 1995). AFP II. PDB-ID: 2zib (Nishimiya et al., 2008). AFP III. PDB-ID: 1hg7 (Antson et al., 2001). AFP IV. Die dargestellte Struktur gehört zur LDL-rezeptorbindenden Domäne des menschlichen Apolipoproteins E. PDB-ID: 1lpe (Wilson et al., 1991).

Im Folgenden sind beim jeweiligen AFP-Typ beispielhaft Fischarten aufgeführt, die die entsprechenden Proteine produzieren. Mittlerweile sind insgesamt über 50 solcher Fischarten bekannt (Burcham et al., 1986a; Davies und Hew, 1990; Wöhrmann, 1996; Barrett, 2001). Typ I AFP sind alaninreich und liegen als α -Helix vor. Varianten mit Massen zwischen 3.3 und 4.5 kDa kommen in einigen Schollen und Cottiden vor. Obwohl strukturell sehr ähnlich, werden unter den AFP des Typs I zum Teil große Unterschiede beobachtet. So adsorbieren die AFP aus der Winterflunder (*Pseudopleuronectes americanus*) spezifisch an die pyramidalen $\{201\}$ -Eisflächen, AFP aus dem Seeskorpion (*Myoxocephalus scorpius*) hingegen adsorbieren an sekundären prismatischen $\{2\bar{1}0\}$ -Eisflächen. Neben den mit etwa 4 kDa relativ kleinen Proteinen wurden von Marshall et al. (2004a) so genannte hyperaktive Typ I AFP mit einer Masse von 16.7 kDa in der Winterflunder (*P. americanus*) entdeckt. Diese liegen als Homodimere vor und besitzen mehrere eisbindende Flächen, wodurch sie schon bei deutlich kleineren Konzentrationen Antigeфриereigenschaften zeigen. AFP des Typs II sind cysteinreiche, globulär aufgebaute Proteine mit Massen von 11.0 bis 24.0 kDa. Eine zusätzliche Unterteilung erfolgt hier in calciumabhängige, wie sie im Hering (*Clupea harengus harengus*) und im Regenbogenstint (*Osmerus mordax mordax*) vorkommen, und calciumunabhängige Proteine im Seeraben (*Hemitrypterus americanus*). Sowohl aus der im Nordatlantik vorkommenden Aalmutter (*Zoarces americanus*) als auch aus der antarktischen Aalmutter (*Lycodichthys dearborni*) und dem Seewolf (*Anarhichas lupus*) können AFP vom Typ III ($m = 6.5 - 14.3$ kDa) gewonnen werden. Die Zusammensetzung dieser globulären Proteine wird nicht durch eine bestimmte Aminosäure dominiert. Experimente von Antson et al. (2001) deuten darauf hin, dass Typ III AFP an eine Reihe von Eisflächen adsorbieren können. Hierzu gehören die primären prismatischen $\{100\}$ - sowie die pyramidalen $\{201\}$ -Flächen. An welche Eisflächen AFP vom Typ IV, wie sie im Grauen Seeskorpion (*Myoxocephalus octodecimspinosus*) zu finden sind, adsorbieren, wurde noch nicht bestimmt. Auch konnte die Tertiärstruktur noch nicht aufgeklärt werden, allerdings wird aufgrund der Ähnlichkeit zu Apolipoproteinen ein Bündel von vier α -Helices vermutet (Deng et al., 1997; Deng und Laursen, 1998). Die Masse dieses an Glutamin und Glutaminsäure reichen Proteins beträgt 12.3 kDa.

Nicht nur in Fischen sondern auch in Pflanzen, Bakterien, Pilzen und wirbellosen Tieren wie Insekten und Spinnen kommen AFP vor (Venketesh und Dayananda, 2008). Diese Proteine unterscheiden sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihren Eigenschaften deutlich von Fisch-AFP. Insekten-AFP sind in der Regel deutlich effektiver als Fisch-AFP und diese sind wiederum effektiver als AFP, wie sie in Pflanzen, Bakterien und Pilzen vorkommen. Die meisten der etwa 50 bekannten Insekten- und 6 Spinnenarten, in denen AFP gefunden wurden, gehören zu der Gruppe der gefriervermeidenden Organismen (Duman et al., 2004). Einige sind allerdings auch gefriertolerant und überleben Temperaturen von -40 bis -70°C . Auch AFP-produzierende Pflanzen sind mit mehr als 70 verschiedenen Arten sehr verbreitet (Griffith und Ewart, 1995; Doucet et al., 2000; Raymond und Knight, 2003). Diese bilden AFP jedoch nur bei Akklimatisierung an niedrige Temperaturen. Zu diesen Pflanzen zählen einzellige Kieselalgen, aber auch Moose und einige höhere Pflanzen. Hierzulande vorkommende Arten sind Möhren, Roggen oder Kartoffeln.

In der Regel sind Pflanzen und auch die meisten Bakterien als gefriertolerant einzustufen. Viele der AFP in Bakterien und Pilzen (über 20 Arten) zeigen eine relativ geringe Effektivität (Duman und Olsen, 1993; Yamashita et al., 2002; Gilbert et al., 2004; Raymond und Janech, 2009). Eine Ausnahme bildet dabei ein von Gilbert et al. (2005) isoliertes und charakterisiertes antarktisches Bakterium. Das AFP dieses Bakteriums besitzt eine ähnliche Effektivität wie AFP in Insekten oder Fischen. Dies deutet darauf hin, dass es zu den gefriervermeidenden Spezies zu zählen ist.

2.2 Wirkungsweise

Trotz der großen Vielfalt basiert die Hemmung des Eiswachstums durch AFP immer auf dem gleichen Prinzip. Nach dem von Raymond und DeVries (1977) vorgestellten Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus wird durch die Adsorption der AFP an der Eisoberfläche das Kristallwachstum gehemmt oder sogar komplett gestoppt. Die Bedeckung der Eisoberfläche mit einer AFP-Monolage ist hierbei nicht nötig. Das Eis zwischen den adsorbierten Molekülen wächst nur bis zu einer bestimmten Krümmung der Oberfläche (Abbildung 2.1). Dies beruht auf dem Kelvin-Effekt, wonach eine konvex gekrümmte Oberfläche einen geringeren Schmelzpunkt als eine ebene Oberfläche aufweist. Das Eis zwischen den AFP wächst bei Temperaturabsenkung immer nur so weit, bis der Schmelzpunkt der nun gekrümmten Oberfläche gerade der aktuellen Temperatur entspricht. Makroskopisches Eiswachstum kann so erst ab dem Hysteresegefrierpunkt beobachtet werden, der auch als Nichtgleichgewichtsgefrierpunkt bezeichnet wird. Ab diesem Punkt ist der Abstand zwischen den AFP zu groß, um das Eiswachstum zu verhindern. Der Unterschied zwischen Schmelzpunkt und Hysteresegefrierpunkt wird als thermische Hysterese (TH) bezeichnet.

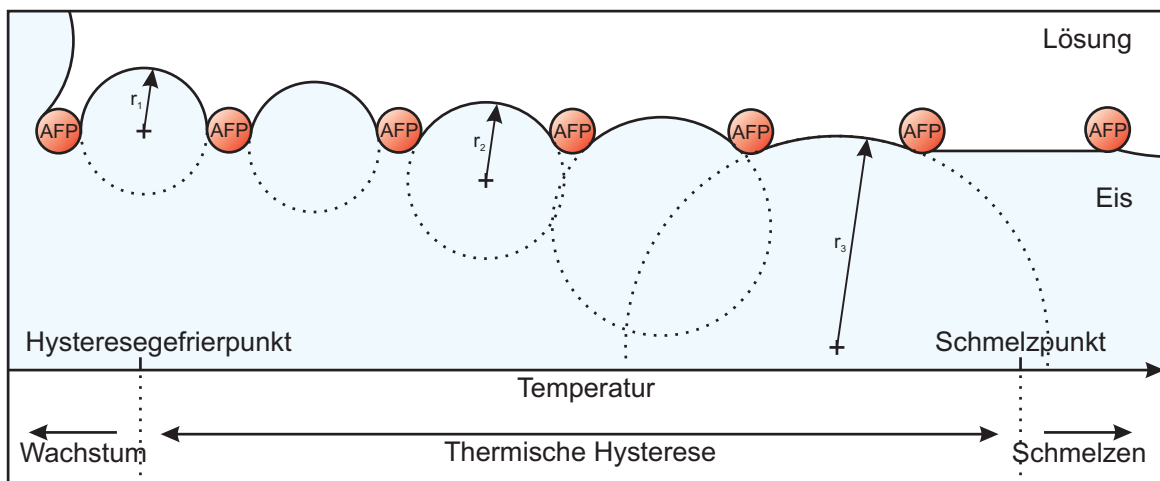


Abbildung 2.1: Thermische Hysterese und Kelvin-Effekt. An die Eisoberfläche adsorbierte AFP hemmen das Eiswachstum aufgrund der Ausbildung von gekrümmten Oberflächen.

bezeichnet. Das Ausmaß der Hysterese hängt neben weiteren Faktoren hauptsächlich von der Art und Konzentration des Proteins ab (Takamichi et al., 2007).

Die Adsorption der AFP geschieht an Eisflächen, die für das jeweilige Protein spezifisch sind. Im Falle des AFP Typ I aus der Winterflunder sind dies die $\{201\}$ -Flächen. Wen und Laursen (1992, 1993a,b) führten eine Reihe von Mutationsstudien an diesem Protein durch. Sie stellten unter anderem fest, dass die Threonin-, Asparagin- und Asparatgruppen nicht nur vorhanden sein, sondern auch einen bestimmten Abstand zueinander aufweisen müssen. Von besonderer Bedeutung ist die Regelmäßigkeit der Oberflächenstruktur sowohl des Proteins als auch derjenigen von Eis. Im Eis finden sich Abstände von 16.7 \AA zwischen Sauerstoffatomen auf der (201) -Fläche (Abbildung 2.2a). Die gleichen

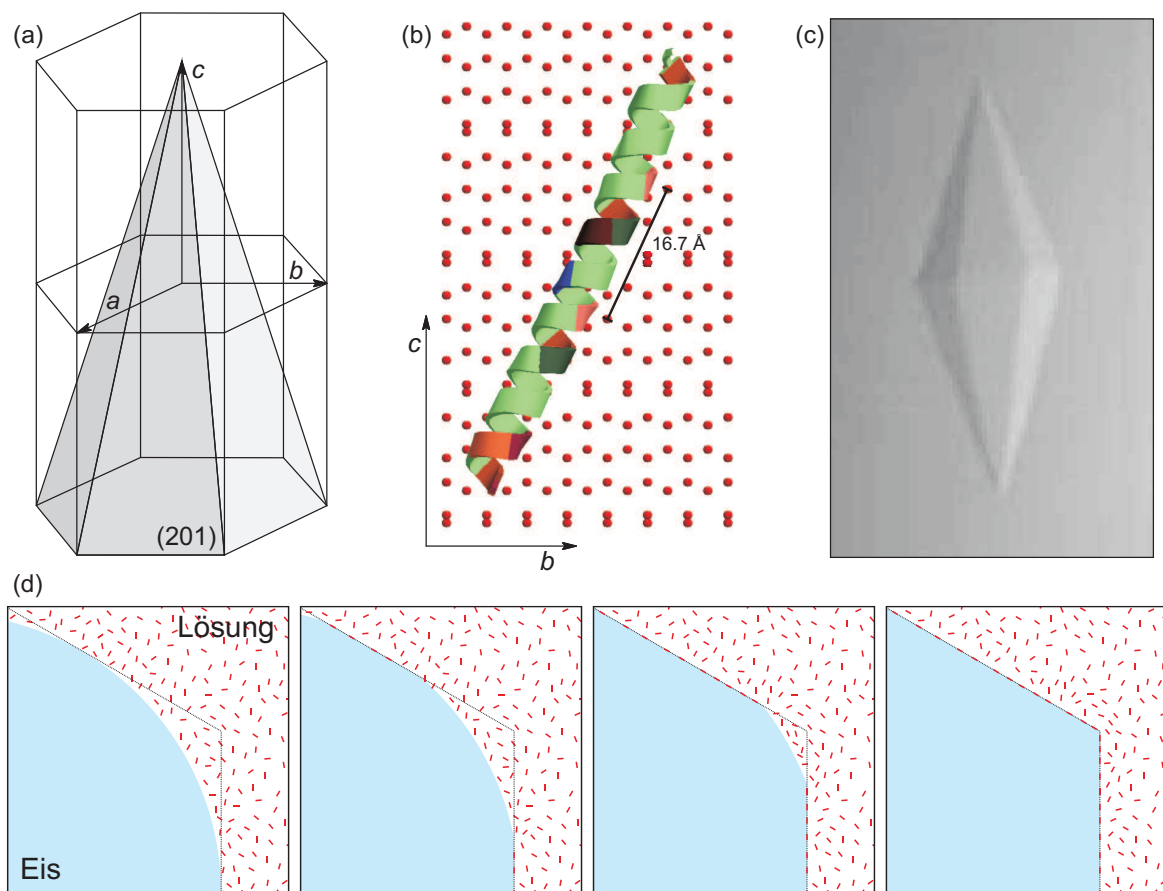


Abbildung 2.2: Modell der Adsorption von AFP Typ I. (a) Sekundäre pyramidale $\{201\}$ -Eisflächen. (b) Strukturvergleich zwischen AFP Typ I aus der Winterflunder mit der (201) -Fläche von Eis. (c) Ausbildung eines spezifischen Kristallhabitus aufgrund der Adsorption von AFP Typ I (Davies et al., 2002). Verwendet mit freundlicher Genehmigung der Royal Society. (d) Eisstrukturierung durch Antigefrierproteine. Sobald die wachsende Eisfront die zum AFP (rote Balken) passende Fläche ausbildet, wird das Wachstum durch adsorbierende AFP gestoppt.

Abstände liegen zwischen den Threonin- und den Asparagingruppen im AFP Typ I vor (Abbildung 2.2b). Aufgrund dieser Übereinstimmung kommt es insbesondere innerhalb des Hysteresebereichs zur Ausbildung einer besonderen Eiskristallform (Abbildung 2.2c). Da die Adsorption an den $\{201\}$ -Flächen erfolgt, wird nur das Wachstum dieser Flächen gehemmt bzw. gänzlich gestoppt, während alle anderen Flächen weiter wachsen können. Die Folge ist so genannte Eisstrukturierung (Abbildung 2.2d). Ohne Zusatz von AFP sind aus einer Lösung gewachsene Eiskristalle stets rund, da diese Form wegen der kleineren Oberfläche energetisch am günstigsten ist. Wie in Abbildung 2.2d zu sehen ist, wird das Kristallwachstum aufgrund der spezifischen Adsorption nicht sofort gestoppt. Erst nachdem sich die Flächen herausgebildet haben, an die AFP adsorbieren, wird dies erreicht. Die einzigartige Form des nun vorliegenden Kristalls kann entsprechend Aufschluss darüber geben, an welche Flächen AFP adsorbiert sind (Abbildung 2.2a-c).

Dass die Antigefrieraktivität des AFP Typ I aus der Winterflunder gerade auf den Threonin-, Asparagin- und Asparaginsäuregruppen basiert, wurde bereits vor den Arbeiten von Wen und Laursen (1992, 1993a,b) postuliert. Nach der Vorstellung von DeVries (1984) sind die Hydroxygruppen dieser Aminosäuren und damit Wasserstoffbrückenbindungen für die Bindung an Eis verantwortlich. Untersuchungen, bei denen Threonin gegen Valin oder Serin ausgetauscht wurde, deuten jedoch darauf hin, dass neben Wasserstoffbrücken auch van der Waals-Wechselwirkungen von großer Bedeutung sind (Chao et al., 1997; Haymet et al., 1998; Zhang und Laursen, 1998). Es wurde gezeigt, dass der Austausch gegen Valin die Effektivität nur geringfügig herabsetzt, wohingegen nach einem Austausch gegen Serin die Antigefrieraktivität vollständig aufgehoben ist. Es erscheint plausibel, dass die eisbindende Fläche des Proteins als Ganzes bestimmte Voraussetzungen erfüllen muss. Erst dann kommt es zu einer molekularen Erkennung zwischen Protein und Eis und einer Bindung im Sinne eines Wirt-Gast-Komplexes.

Obwohl das Adsorptions-Inhibierungs-Modell von Raymond und DeVries (1977) im Prinzip allgemein akzeptiert ist, gibt es dennoch eine Reihe von offenen Fragen und immer wieder modifizierte oder auch neue Erklärungsansätze (Kristiansen und Zachariassen, 2005). Dass tatsächlich eine Adsorption stattfindet ist jedoch unstrittig. Dies konnte von Brown et al. (1985) spektroskopisch gezeigt werden. Ein weiterer wichtiger Hinweis ist der Einbau der AFP beim Eiswachstum, wie ihn bereits Raymond und DeVries (1977) und auch andere Gruppen beobachtet haben (Knight et al., 1991, 1993; Marshall et al., 2004b). Zudem konnte mittels Rastertunnelmikroskopie (RTM) gezeigt werden, dass sich gekrümmte Flächen ausbilden, wenn AFP an Eis adsorbiert sind (Grandum et al., 1999; Inada et al., 2000). Die Größe der beobachteten Vertiefungen entspricht dabei der Größe der adsorbierten Moleküle.

Umstritten ist jedoch, ob die Adsorption irreversibel oder reversibel ist. Der ursprüngliche Mechanismus basiert auf einer irreversiblen Adsorption. Hiermit lässt sich allerdings nicht erklären, dass unterschiedliche AFP bei gleicher Konzentration unterschiedliche Effektivitäten zeigen. Alternative Modelle (Burcham et al., 1986b; Li und Luo, 2000), die einen dynamischen Austausch der Proteine zwischen Lösung und Eisoberfläche innerhalb des Hysteresebereichs vorschlagen, versagen allerdings beim Versuch, die vollständige Inhibierung des Eiswachstums zu erklären. Kristiansen und Zachariassen (2005) postulieren

daher einen Zwei-Stufen-Prozess. Am Schmelzpunkt stellt sich nach ihrem Modell ein Gleichgewicht zwischen adsorbierten AFP und AFP in Lösung ein. Dass eine permanente Adsorption hier unwahrscheinlich ist, ist unter dem Gesichtspunkt leicht vorstellbar, dass die Eisoberfläche einen quasi-flüssigen Zustand besitzt und nicht als fest angesehen werden kann. Wird die Probe jedoch abgekühlt und die Eisfront wächst, so wird dadurch die Adsorption verstärkt. Zum einen wird das Eis unterhalb der AFP dabei verfestigt, zum anderen werden die adsorbierten AFP vom Eis umschlossen und damit die Desorption erschwert. Untersuchungen von Zepeda et al. (2008) legen nahe, dass zumindest für AFGP ein reversibler Mechanismus in Betracht gezogen werden muss. Pertaya et al. (2007) hingegen beobachteten bei einem Typ III AFP eine irreversible Adsorption. Vermutlich sind diese unterschiedlichen Ergebnisse auf die verschiedenen AFP zurückzuführen. Die Beobachtung, dass sich die Wirksamkeit mehrerer AFP unterscheidet, ist mit unterschiedlichen Adsorptions-Gleichgewichten zu erklären.

Neben der thermischen Hysterese und der Eisstrukturierung zeichnen sich AFP auch durch die Hemmung der Eiskristallisation aus. Rekristallisation ist eine Form von Ostwald-Reifung eines polykristallinen Materials, bei der große Kristalle wachsen, während sich kleinere Kristalle auflösen. Dieser Prozess beruht auf der Minimierung der Grenzflächenenergie. Insgesamt nimmt im Verlauf der Rekristallisation die Anzahl an Kristallen ab. Der mittlere Kristallradius hingegen nimmt entsprechend zu, da bei konstanter Temperatur die Gesamtemenge konstant bleibt. Die Beobachtung, dass größere Kristalle auf Kosten der kleineren wachsen, hängt mit dem Kelvin-Effekt zusammen. Die kleineren Kristalle besitzen eine stärker gekrümmte Oberfläche und damit einen etwas geringeren Schmelzpunkt als die größeren. Dieser Schmelzpunktunterschied führt zu einem Fluss von Wassermolekülen von den kleinen zu den großen Kristallen. Im Fall der diffusionskontrollierten Rekristallisation bestimmt dieser Fluss, über die Diffusion des Wassers innerhalb der Lösung und damit auch die Viskosität der Lösung, die Geschwindigkeit der Rekristallisation. Bei der Zugabe von AFP jedoch führt die Adsorption und die damit verbundene Hemmung des Kristallwachstums dazu, dass hier nicht mehr die Diffusion in der Lösung zwischen den Eiskristallen sondern der Einbau von Wassermolekülen in die Eiskristalle geschwindigkeitsbestimmend ist.

Neben den zuvor beschriebenen Phänomenen, die auf der Adsorption von AFP an Eis beruhen, sind AFP auch in der Lage, die heterogene Eiskristallisation zu beeinflussen. Hierbei verhindern sie die Bildung von Eis vermutlich durch Adsorption an einen Eiskeim (INA; engl.: ice nucleating agent). Das Kristallisieren von Wasser setzt wie bei sehr vielen Flüssigkeiten einen Nukleationsprozess voraus. Dies bedeutet, dass reines Wasser auf etwa -40°C abgekühlt werden kann, ohne dass es gefriert. Im Bereich zwischen dem Schmelzpunkt und der Nukleationstemperatur liegt die Flüssigkeit in einem metastabilen, unterkühlten Zustand vor. Wird die Nukleation in solchen Flüssigkeiten durch die spontane Bildung eines so genannten Eisembryos kritischer Größe ausgelöst, wird von homogener Nukleation gesprochen. Bei der heterogenen Nukleation erfolgt die Bildung des Eisembryos an der Oberfläche eines INA. Je nach dessen Wirksamkeit wird dabei die Nukleationstemperatur im Vergleich zum homogenen Fall unterschiedlich stark erhöht. AFP wirken gegensätzlich und erniedrigen diese Temperatur wieder, indem sie an den

INA adsorbieren und dessen Effekt dadurch wieder aufheben oder zumindest reduzieren. Die Grundlage für die Wirksamkeit der INA ist wie bei den AFP die Übereinstimmung von Bausteinen ihrer Struktur mit der Kristallstruktur von Eis. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Bestandteile von Eiskeimen auch Antigeftriereigenschaften besitzen können (Kobashigawa et al., 2005).

Eisbildung ist nicht das einzige Problem von Organismen bei tiefen Temperaturen. Schon oberhalb des Gefrierpunkts kann es zu einem Phasenübergang der Membranen von einer flüssigkristallinen Phase zu einer Gel-Phase kommen (Drobnis et al., 1993). Hierdurch wird ihre Durchlässigkeit erhöht, das heißt, die intrazellulären Bestandteile können unkontrolliert austreten. Rubinsky et al. (1990) konnten erstmals zeigen, dass AFP neben ihrer Wirksamkeit in Gegenwart von Eis auch zur Membranstabilisierung beitragen. Hays et al. (1996) bewiesen, dass AFP dabei direkt mit der Membran interagieren und nicht Ionenkanäle blockieren, wie es ursprünglich von Negulescu et al. (1992) angenommen wurde.

2.3 Antigeftrierglykoproteine

Die ersten AFGP wurden von DeVries und Wohlschlag (1969) identifiziert und waren damit auch die ersten bekannten Antigeftrierproteine überhaupt. Sie wurden aus verschiedenen Antarktisdorschen isoliert, die zum Teil ständig in der Nähe des Schelfeises leben. In den darauf folgenden Untersuchungen wurde ihre Primärstruktur aufgeklärt (DeVries et al., 1970; Komatsu et al., 1970; DeVries et al., 1971). Die meisten AFGP sind aus (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten aufgebaut, wobei am Threonin ein Disaccharid aus Galaktose und *N*-Galaktosamin (β -D-Galaktosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-*N*-acetylgalaktosamin) *O*-glykosidisch gebunden ist. Diese Struktureinheit (β -Gal-(1 \rightarrow 3)- α -GalNAc-*O*-Thr) gehört auch zur Gruppe der tumorassoziierten Kohlenhydrat-Antigene und wird als T-Antigen bezeichnet. AFGP werden entsprechend der Anzahl an Wiederholeinheiten von $n = 4$ bis 50 und damit ihrer Masse von $m = 2.6$ bis 33.0 kDa in 8 Klassen unterteilt, wobei AFGP 1 dem längsten Protein entspricht. Als AFGP 8 wird das kleinste Peptid mit 4 Wiederholeinheiten und einer Masse von 2.6 kDa bezeichnet. Neben den typischen (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten wurden bei den AFGP mit kleineren Molmassen (AFGP 6-8) Varianten gefunden, bei denen Alanin teilweise durch Prolin ersetzt ist und solche, bei denen *C*-terminal ein Arginin-Alanin-Dipeptid angefügt ist (Burcham et al., 1986a). Die zugehörigen Sequenzen sind in Tabelle 2.2 aufgeführt. Weitere AFGP, die aus einer größeren Anzahl unterschiedlicher Aminosäuren bestehen, wurden von Wöhrmann (1996) entdeckt. Das von ihm gefundene AFGP im antarktischen Silberfisch (*Pleuragramma antarcticum*) besteht aus Glycin, Alanin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und geringen Anteilen von Valin, Leucin, Arginin und Threonin. Bei diesem mit einer Masse von 150 kDa relativ großen AFGP findet sich zudem nicht das übliche Disaccharid. Die Analyse der Zuckerszusammensetzung deutet auf *N*-Acetylglukosamin hin. Des Weiteren beobachtete er beim AFGP des Aaldorsches (*Muraenolepis marmoratus*) Anteile von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Serin, Arginin und Prolin zusätzlich zu Threonin und Alanin.

Aminosäuresequenz																		
H-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH																		
H-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-OH																		
H-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Arg-Ala-OH																		
H-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH																		
H-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH																		
H-Ala-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Arg-Ala-OH																		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

Tabelle 2.2: Natürlich vorkommende Varianten von Antigefrierglykopeptiden.

Nahezu identische AFGP kommen in einer Reihe von Fischen sowohl des nördlichen wie des südlichen Polarmeeres vor, obwohl diese Fischarten nicht direkt miteinander verwandt sind und zu verschiedenen Ordnungen gehören. Die AFGP dieser Fische der beiden Hemisphären unterscheiden sich allein im gelegentlichen Vorkommen von Arginin an Stelle von Threonin bei Dorschen des Nordpolarmeeres. Chen et al. (1997a) konnten am Riesen-Antarktisdorsch (*Dissostichus mawsoni*) zeigen, dass das Antigefrier-Gen der antarktischen Fische sich aus einem Trypsinogen-Gen entwickelt hat. Das Antigefrier-Gen des arktischen Polardorsches (*Boreogadus saida*) hingegen zeigt keine solchen Übereinstimmungen zu Trypsinogen-Genen (Chen et al., 1997b). Die Entwicklung beider Fischarten hat also sehr verschiedene Verläufe genommen und stellt damit eines der wenigen Beispiele für konvergente Evolution dar.

Zur Aufklärung der AFGP-Sekundärstruktur wurden mehrere Methoden angewandt. Dazu gehören magnetische Kernresonanz (NMR; engl.: nuclear magnetic resonance), Zirkulardichroismus (CD; engl.: circular dichroism), Lichtstreuung sowie Raman- und IR-Spektroskopie. DeVries et al. (1970) untersuchten AFGP 8 und ein Gemisch aus AFGP 3 und 4 mittels CD-Spektroskopie. Die Spektren weisen nur kleine Unterschiede auf. Beide besitzen ein ausgeprägtes Minimum bei etwa 195 nm und ein schwaches Maximum bei etwa 220 nm. Dies wurde zunächst als Fehlen einer definierten Sekundärstruktur interpretiert. Möglich ist aber auch, dass eine gestreckte, linksgängige Polyprolin II Helix vorliegt, was durch umfangreiche CD- und NMR-Daten von Bush et al. (1981, 1984) und Bush und Feeney (1986) gestützt wird. Aus diesen geht hervor, dass AFGP 8 bei tiefen Temperaturen in einer gestreckten, stäbchenartigen Konformation vorliegt. Durch Erhöhung der Temperatur nimmt die Flexibilität zu, so dass schließlich ein flexibles Knäuel gebildet wird. Die größeren AFGP 1-4 lassen sich ebenfalls am besten als flexible Stäbchen beschreiben, wobei die hohe Segment-Mobilität eine Fernordnung verhindert. Die hohe Flexibilität wurde ebenfalls von Ahmed et al. (1975) mittels quasielastischer Lichtstreu-

ung nachgewiesen. Aber auch hier wird eine gewisse Abweichung von einer rein zufälligen Anordnung beobachtet. Am besten werden AFGP vermutlich durch eine Polyprolin II Helix beschrieben. Die Struktur ist jedoch sehr flexibel und ist daher als eine Art Mittelwert zu verstehen. Temperaturabhängige CD-Spektroskopie und Titrations-CD-Experimente sowie NMR-Daten von Plattner (2009) unterstützen diese Einschätzung.

Um Aussagen über den Wirkmechanismus von AFGP machen zu können, ist nicht nur die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur wichtig, sondern insbesondere auch die Möglichkeit, gezielt Modifikationen durchführen zu können. Die Gewinnung von AFGP-Mutanten aus natürlichen Quellen ist relativ aufwendig und liefert nur geringe Mengen. Zudem ist die Anzahl an Modifikationen begrenzt. Bei einer entsprechenden Synthesestrategie ist mit einer synthetischen Darstellung hingegen eine Vielzahl von Derivaten zugänglich. Die ersten naturidentischen AFGP wurden von Tsuda und Nishimura (1996) synthetisiert (Abbildung 2.3). Sie stellten dazu zunächst den Glykosyldonor **1** her und kuppelten diesen an das Tripeptid **2**. Umwandlung der Azidogruppe zur Acetamidgruppe und anschließende Entfernung der Schutzgruppen liefert die AFGP-Tripeptideinheit **5**. Als letzter Schritt erfolgt eine Polymerisation mittels Diphenylphosphorylazid (DPPA) zum AFGP (**6**). Sie erhielten auf diese Weise ein Gemisch aus Peptiden mit Massen von 6.0 bis 7.3 kDa ($n = 10 - 12$). In den darauf folgenden Jahren wurde diese Synthesestrategie weiter verfeinert und auch dazu benutzt, Analoga zu synthetisieren (Tachibana et al., 2002, 2004b).

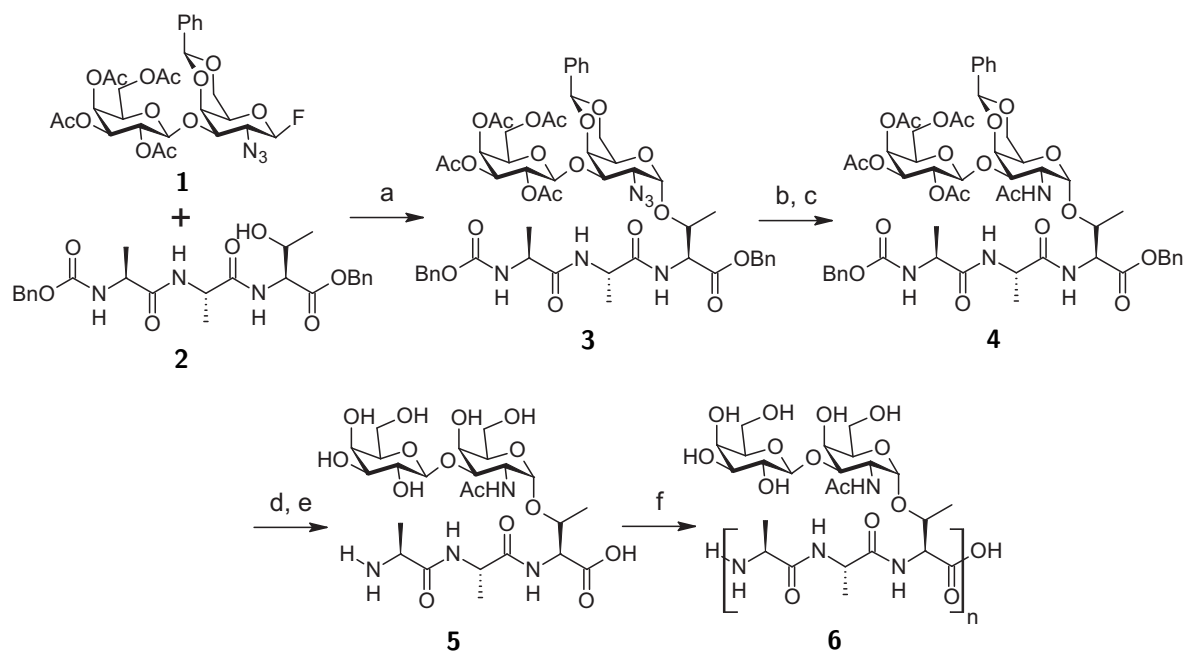


Abbildung 2.3: Synthese von AFGP nach Tsuda und Nishimura (1996). (a) $(C_5H_5)_2ZrCl_2$, $AgClO_4$, CH_2Cl_2 , Molekularsieb 4 Å. (b) $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, $B(OH)_3$, $NaBH_4$, EtOH. (c) Ac_2O , MeOH. (d) NaOMe, THF/MeOH. (e) H_2 , Pd/C, MeOH. (f) $Ph_2P(O)N_3$, Et_3N , Me_2SO .

Da durch Polymerisation immer Gemische verschieden langer Polymere erhalten werden und einzelne Aminosäuren des Rückgrats nicht ausgetauscht werden können, ist die vorgestellte Syntheseroute nicht optimal. Die Festphasenpeptidsynthese (SPPS; engl.: solid phase peptide synthesis) ist besser geeignet, um gezielt Peptide einer bestimmten Länge und Zusammensetzung zu synthetisieren (Plattner, 2009; Heggemann et al., 2010). Durch die Synthese nicht nur natürlicher AFGP, sondern auch einer großen Anzahl von Analoga zeigt die Arbeit von Plattner (2009) die Vielseitigkeit der SPPS. Bei der Synthese der natürlichen AFGP wird zunächst das Disaccharid hergestellt und dann mit Threonin verknüpft (Abbildung 2.4). Der Ausgangspunkt für die Bildung des Disaccharids ist die Reaktion des Trichloracetimidats **7** und des Galaktals **8**, welches in vier Schritten aus β -D-Galaktose erzeugt wird, in Gegenwart geringer Mengen von Trimethylsilyltrifluormethansulfonat (TMSOTf) zu einem Disaccharid-Glykal. Entfernung der Silylgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) und anschließende Acetylierung liefert das vollständig acetylierte Glykal **9**. Einer der größten Vorteile der vorgestellten Synthese liegt im nächsten Schritt, bei dem gleichzeitig ein Azid in der C2-Position des Saccharids und ein Chlorid in der anomeren Position eingeführt wird (Abbildung 2.4d). Diese Methode kann auf Mono- und Disaccharid-Glykale angewandt werden. Sie liefert durch Zugabe von Eisen(III)chlorid, Natriumazid und Wasserstoffperoxid zu einer Lösung des Glykals **9** in Acetonitril selektiv das α -Anomer **10** in guten Ausbeuten. Nach Verknüpfung mit Threonin, Einführung der Acetamidgruppe und Entfernung der *tert*-Butyl-Schutzgruppe wird der T-Antigen-Threonin-Baustein **12** erhalten.

Der Aufbau der Peptidkette erfolgt halbautomatisch in einem Mikrowellen-Peptid-Synthesizer (Abbildung 2.5), was zu einer stark verkürzten Reaktionszeit im Vergleich zur manuellen Kupplung führt. Bei der vorwiegend automatisierten Mikrowellen-Synthese werden Kupplung, Capping und Entschützung durch Mikrowellen-Strahlung begleitet. Lediglich

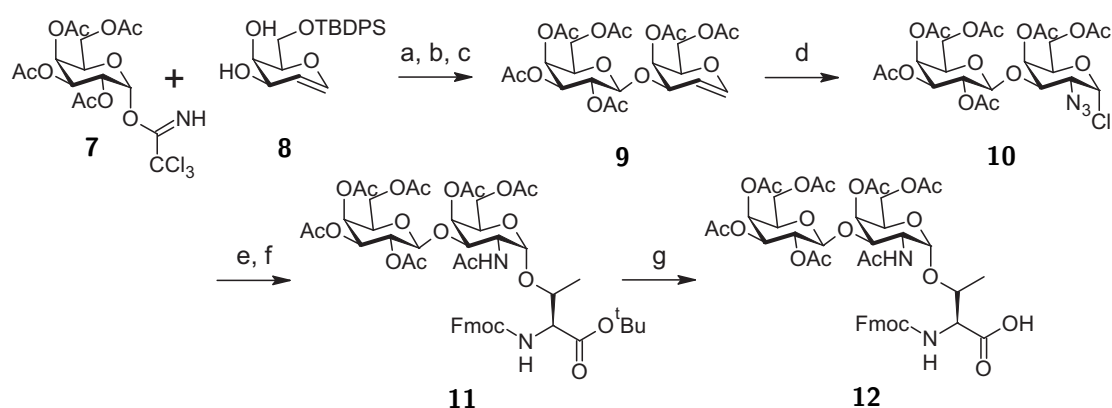


Abbildung 2.4: Synthese des T-Antigen-Threonin-Bausteins nach Plattner (2009). (a) TMSOTf, CH_2Cl_2 . (b) TBAF, AcOH, THF. (c) Ac_2O , Pyridin. (d) FeCl_3 , NaN_3 , H_2O_2 , CH_3CN . (e) Fmoc-Thr-O^tBu, AgClO_4 , Ag_2CO_3 , CH_2Cl_2 , Toluol. (f) AcSH, Pyridin. (g) 95 % TFA.

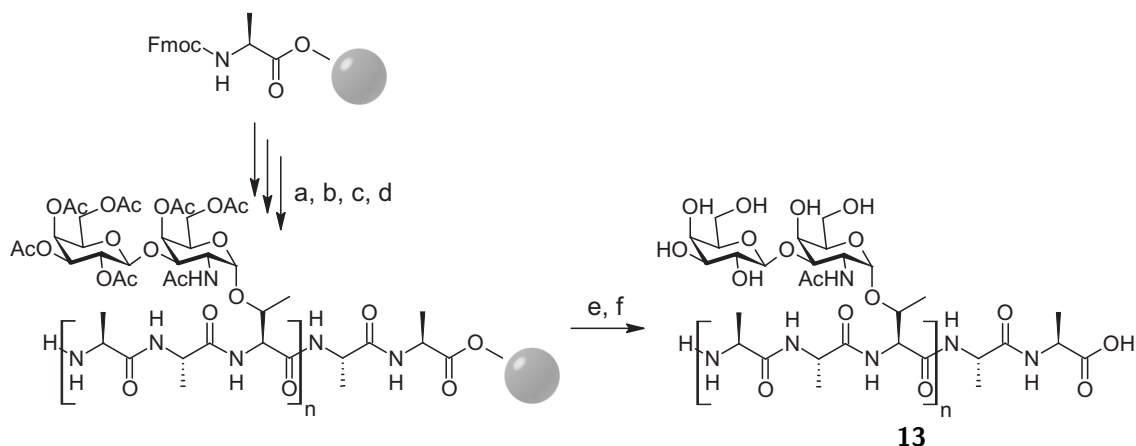


Abbildung 2.5: Synthese von AFGP nach Plattner (2009). (a) 20% Piperidin, DMF. (b) Fmoc-Ala-OH, TBTU, DIPEA, DMF. (c) Fmoc-Thr(R')-OH, HATU, HOAt, DIPEA. (d) Ac₂O, HOBt, DIPEA. (e) H₂NNH₂, DMF. (f) TFA, DCM/DMF.

der Baustein **12** wird jeweils manuell zugegeben, um Verluste gering zu halten. Auf diese Weise wurden gezielt AFGP mit 3, 4 und 5 Wiederholeinheiten synthetisiert.

2.4 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Die Aufklärung der essentiellen Motive für die Antifriereigenschaften der AFGP begann direkt nach ihrer Entdeckung mit chemischen Modifikationen an den natürlichen Proteinen. Eine Auswahl der synthetisierten Derivate und die Ergebnisse der Effektivitätsstudien sind in Abbildung 2.6 zusammengefasst. Bereits bei den ersten Experimenten von Komatsu et al. (1970) und Ahmed et al. (1973) stellte sich die Wichtigkeit der Disaccharidgruppe heraus. In diesen Arbeiten wurde die Effektivität der Verbindungen mit einem Osmometer ermittelt. Dabei wird die nicht-kolligative Gefrierpunktniedrigung, also die thermische Hysterese, bestimmt. Oxidation der Galaktosylgruppe mit Natriumperodat (Abbildung 2.6a) und Acetylierung durch Essigsäureanhydrid in Pyridin (Abbildung 2.6b) führen beide zu einem Verlust der Antifrieraktivität. Kompletter Verlust tritt nach Komatsu et al. (1970) bereits bei Acetylierung von 35% der Hydroxygruppen ein. Deacetylierung mit Hydroxylamin führt aber auch zur Wiederherstellung der Aktivität. Ahmed et al. (1973) beobachteten eine Reduktion auf 18% in Bezug auf die thermische Hysterese bei einer 32%igen Acetylierung. β -Eliminierung mit Natriumhydroxidlösung führt zur Abspaltung des Kohlenhydrats und zum Abbau des Threonins. Die Proteine verlieren vollständig ihre Fähigkeit, das Eiswachstum zu stoppen. Ahmed et al. (1973) geben bei einem 80%igen Modifikationsgrad, das heißt 80% des Threonins sind umgewandelt worden, eine TH von 9% an.

Zudem wurden in den Untersuchungen von Vandenheede et al. (1972) und Ahmed et al. (1973) die Hydroxygruppen enzymatisch mit D-Galaktose-Oxidase gezielt in C6-Position

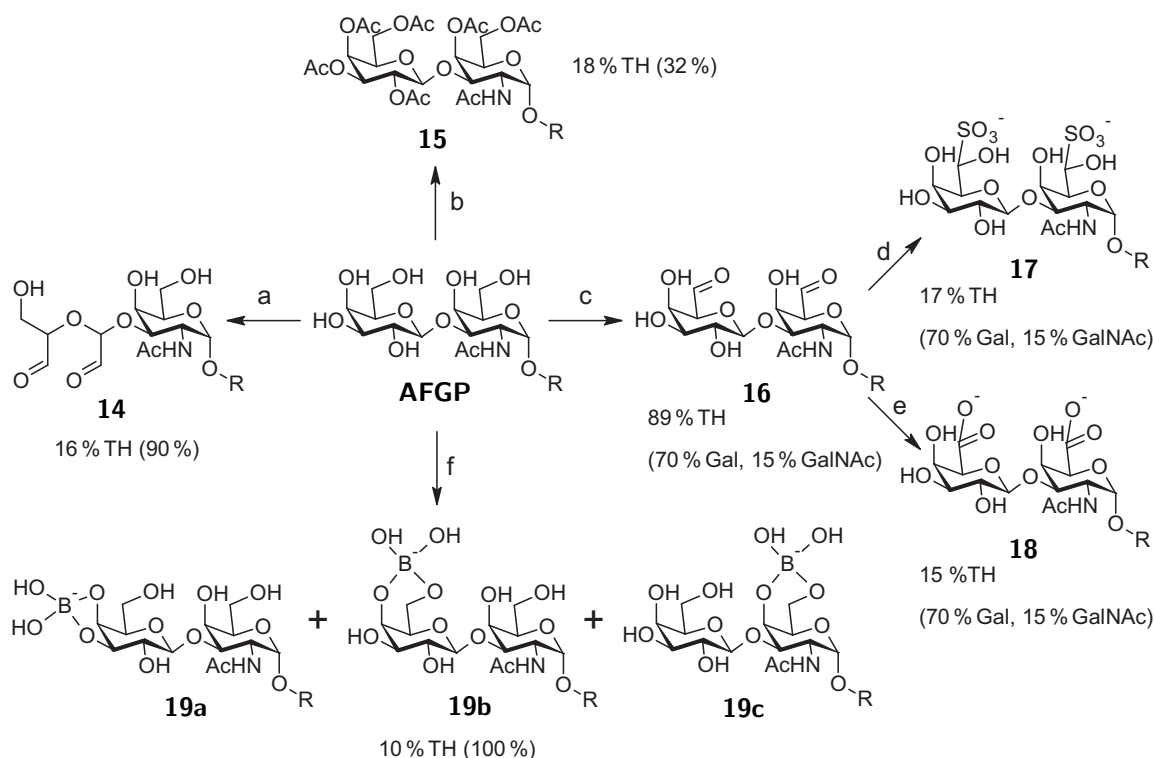


Abbildung 2.6: Chemische Modifikationen der Disaccharidgruppe bei natürlichen AFGP. (a) NaIO₄, NaOAc, Wasser. (b) Ac₂O, Pyridin. (c) D-Galaktose-Oxidase, Peroxidase, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, Wasser. (d) NaHSO₃, Wasser. (e) Iod, Na₂CO₃, Wasser. (f) Na₂B₄O₇, Wasser. Unter jeder Verbindung ist jeweils der Wert der thermischen Hysterese relativ zum natürlichen AFGP angegeben, und in Klammern der Grad der chemischen Modifikation.

oxidiert (Abbildung 2.6c). Dies führte zu einer nur leichten Erniedrigung der Effektivität. Die darauf folgende Umsetzung mit Natriumhydrogensulfit (Abbildung 2.6d) oder Iod (Abbildung 2.6e) verringert die Effektivität jedoch stark. Dabei ist anzumerken, dass nach Vandenheede et al. (1972) auch natürliches AFGP bei Zugabe von Natriumhydrogensulfit an Effektivität verliert. Bei einer Konzentration von 15 mmol L⁻¹ wird die TH beim nativen AFGP auf 73% erniedrigt. Bei dem zuvor mit Galaktose-Oxidase behandelten AFGP ist der Wert von 28% relativ zur oxidierten Form zu sehen. Für diese Erniedrigung machen die Autoren die negative Ladung verantwortlich.

Osuga et al. (1989) führten nach der Oxidation mit D-Galaktose-Oxidase eine Reihe von Aminosäuren und Peptiden an der C6-Position mittels reduktiver Aminierung in Gegenwart von Cyanoborhydrid ein. Dadurch wurde die Effektivität im Vergleich zur oxidierten Form immer erniedrigt, jedoch nicht vollständig aufgehoben. Interessanterweise ist das (Gly)-Analogon weniger effektiv als die Analoga mit (Gly)₂, (Gly)₃ und (Gly)₄. Am wenigsten effektiv ist das (Gly-Glu)-Analogon. Die Komplexierung des Kohlenhydrats mit Boraten (Abbildung 2.6f) führt ebenfalls zu einer Reduktion der Antigefriereffektivität

(DeVries, 1971; Ahmed et al., 1973). Es zeigt sich, dass dies reversibel und vom pH-Wert abhängig ist (Ahmed et al., 1976). Bei einem pH-Wert von 7 besitzt das AFGP nahezu die volle Effektivität, welche sich leicht bis zu einem pH-Wert von 8.4 erniedrigt. Dann folgt ein rapider Abfall bis ab 8.8 praktisch keine Aktivität mehr beobachtet werden kann. Dieser Trend geht einher mit der Anzahl von gebundenem Borat. Bei pH 8.0 kommen etwa 0.5 mol Borat auf ein mol Disaccharid. Bei pH 9.0 allerdings sind es fast 2.0 mol pro mol Disaccharid. Dies bedeutet, dass sowohl die Galaktosyl- als auch die *N*-Acetylgalaktosamingruppe komplexiert vorliegen.

Des Weiteren wurde einhergehend mit der Sequenzanalyse schon früh der Einfluss der Kettenlänge auf die Antigefriereigenschaften untersucht. Komatsu et al. (1970) zeigten, dass die Teilung der Proteinkette mit Subtilisin oder Protease (gewonnen aus *Streptomyces griseus*) zur Desaktivierung von AFGP führt. Nach Feeney und Yeh (1978) wurde damals eine minimale Länge von 10 bis 11 Wiederholeinheiten bzw. 30 bis 33 Aminosäuren angenommen. Hierzu muss jedoch angemerkt werden, dass die natürlichen AFGP mit Molmassen kleiner als 10 kDa (AFGP 6-8) als inaktiv oder geringfügig effektiv eingestuft werden (DeVries et al., 1970; Feeney, 1974). Dies bedeutet allerdings nicht, dass sie keine thermische Hysterese verursachen. Sie sind nur deutlich weniger effektiv als längere AFGP. Neuere Untersuchungen von Wu et al. (2001) zeigen, dass bei einer Konzentration von 20 mg mL⁻¹ eine thermische Hysterese von 0.2°C bei den AFGP 6-8 auftritt, wohingegen die AFGP 3-5 eine thermische Hysterese bei dieser Konzentration von bis zu 0.8°C aufweisen. Die Unterschiede innerhalb einer dieser beiden Klassen sind nicht signifikant. Geoghegan et al. (1980) untersuchten die Größenabhängigkeit der Antigefriereffektivität, indem sie natürliches AFGP 8 mittels Edman-Abbau sukzessive um je eine Aminosäure verkürzten. Es zeigte sich, dass die Effektivität stark von den Untersuchungsbedingungen abhängt. Wird die thermische Hysterese des verkürzten AFGP allein untersucht, so sind die Peptide bereits nach Entfernung der ersten Tripeptid-Einheit absolut inaktiv. In einem weiteren Test allerdings, bei dem eine Mischung aus effektiven Proteinen und den verkürzten AFGP untersucht wurde, zeigte sich eine Verstärkung der Effektivität auch nach 4 Edman-Zyklen. Diese Erhöhung der thermischen Hysterese bei Gemischen von kleinen und großen AFGP ist ein Phänomen, dass zuvor von Osuga et al. (1978) beobachtet wurde. In ihren Experimenten kam es je nach den verwendeten Konzentrationen zu einer 2- bis 8fachen Verstärkung bei Mischung von größeren AFGP (AFGP 1-5) mit AFGP 8.

Nach den ersten Modifikationen an natürlichen AFGP in den 1970er-Jahren wurde wenig auf diesem Gebiet gearbeitet. Erst als AFGP synthetisch zugänglich wurden und damit auch eine Vielzahl von Analoga, trat die Untersuchung wieder in das Blickfeld verschiedener Gruppen. Einen der wichtigsten Beiträge leisteten die Arbeiten von Tachibana et al. (2002, 2004a,b). Zur Synthese der Peptide wurde eine leicht modifizierte Variante der von Tsuda und Nishimura (1996) vorgestellten Route verwendet. Diese beruht auf der Polymerisation von Tripeptideinheiten und anschließender Trennung der Polymere mittels wiederholter präparativer Größenausschlusschromatographie. Auf diese Weise wurden Peptide mit bis zu 7 Wiederholeinheiten synthetisiert. Neben dem Einfluss der Kettenlänge wurde auch die Wirkung einer großen Zahl von Modifikationen am Disaccharid sowie der

Austausch von Threonin gegen Serin untersucht. Eine Einteilung der untersuchten Verbindungen nach ihrer Effektivität ist in Abbildung 2.7 dargestellt. Tachibana et al. (2004a) identifizierten 3 essentielle Motive für die AFGP-Antigefrieraktivität. Diese sind die Acetamidgruppe in der C2-Position, die α -Konfiguration der *O*-glykosidischen Bindung zwischen dem Kohlenhydrat und der Peptidkette und die γ -Methylgruppe des Threonins. Nach dem Austausch von Threonin gegen Serin wird keine thermische Hysterese mehr beobachtet. Die Galaktosylgruppe scheint nur geringen Einfluss auf die Effektivität zu haben. Entfernung oder Änderung der Bindung zwischen den Kohlenhydraten wirkt sich nur in kleinem Maße aus. Vollständige Entfernung des Zuckers jedoch bewirkt den Verlust von thermischer Hysterese sowie von Eisstrukturierung. Beim Vergleich der AFGP mit 1 bis 7 Wiederholeinheiten stellt sich heraus, dass zur Beobachtung von thermischer Hysterese eine minimale Kettenlänge von 2 Wiederholeinheiten nötig ist. Auch beim Monomer zeigen sich allerdings bei einer Konzentration von 40 mg mL^{-1} hexagonale Eiskristalle. Für thermische Hysterese reicht die Effektivität aber nicht. Bereits ab dem Dimer bilden sich bipyramidale Kristalle aus. Ab dem Trimer genügen dafür auch schon 10 mg mL^{-1} . Das Dimer verursacht eine thermische Hysterese von 0.20°C bei einer Konzentration von

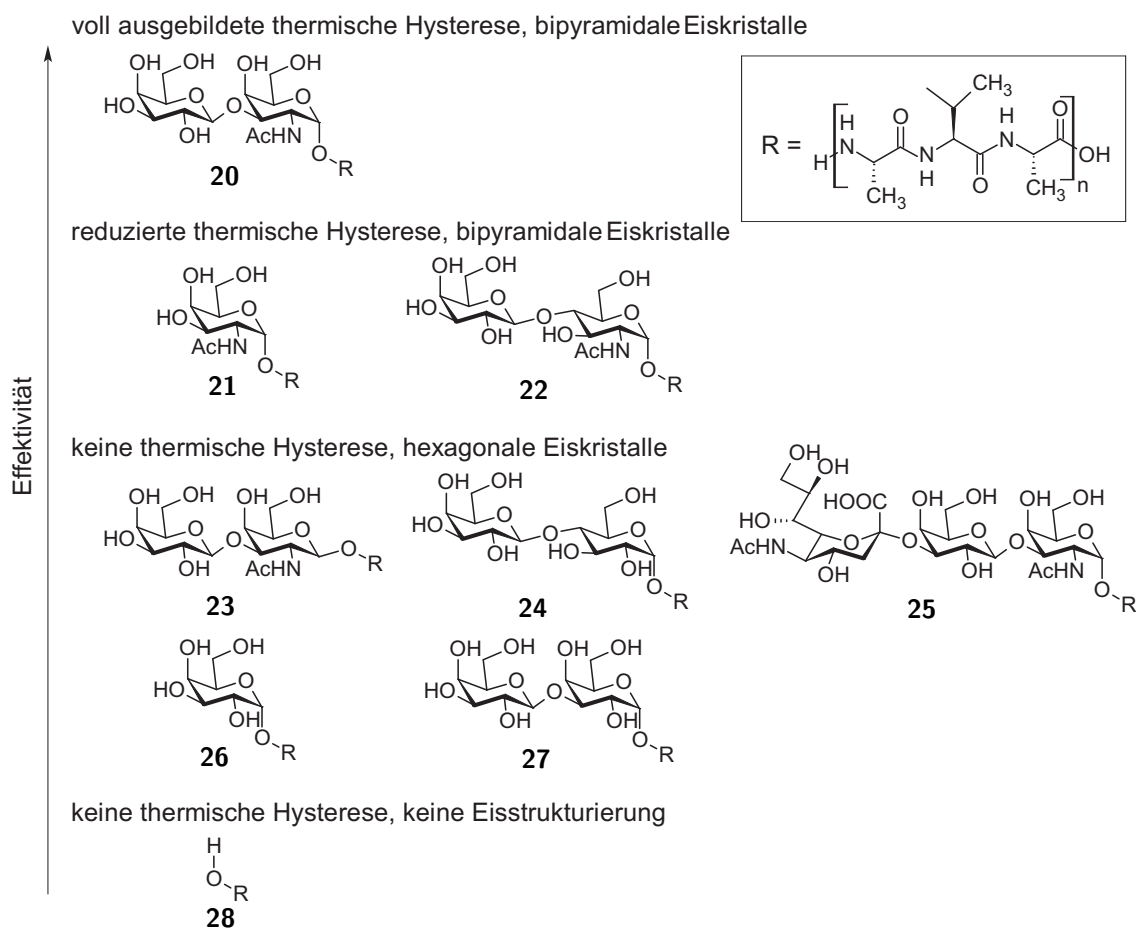


Abbildung 2.7: Essentielle AFGP-Motive nach Tachibana et al. (2004a).

40 mg mL⁻¹. Bei gleicher Konzentration steigert sich die thermische Hysterese bis zum Pentamer. Hier wird ein Wert von 0.43°C erreicht. Verlängerung der Kette bringt ab jetzt keine weitere Erhöhung der Effektivität. Die Peptide mit 6 und 7 Wiederholeinheiten zeigen den gleichen Verlauf in der Abhängigkeit der thermischen Hysterese von der Konzentration wie das Pentamer.

Um die Stabilität von AFGP zu erhöhen, wurde in der Gruppe von Robert N. Ben die Strategie verfolgt, das Kohlenhydrat über Kohlenstoffverknüpfung mit dem Peptidrückgrat zu verbinden (Abbildung 2.8). Diese C-verknüpften Glykokonjugate können im Gegensatz zu natürlichen, O-verknüpften nicht durch säure/basen- oder enzymkatalysierte Hydrolyse gespalten werden. Die Peptide der ersten Generation (Abbildung 2.8a) sind aus (Lys-Gly-Gly)-Wiederholeinheiten aufgebaut (Ben et al., 1999). Die Verknüpfung bei diesen Peptiden basiert daher nicht rein auf Kohlenstoff, sondern beinhaltet ein Stickstoffatom in der Peptidbindung zwischen Aminosäureseitenkette und Zuckerrest. Zunächst wird bei der Synthese dieser C-verknüpften Analoga der Tripeptid-Baustein synthetisiert. Die Kupplung des geschützten Saccharids erfolgt dann am ϵ -Amino-Terminus des Lysins. Der Aufbau des Polymers wird durch SPPS mittels O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorphosphat (HATU) als Kupplungsreagenz durchgeführt. Nach Entfernung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) und der Acetyl-Schutzgruppen am Saccharid wurde so ein Peptid mit 3 Wiederholeinheiten hergestellt. Da das Harz zu Beginn der SPPS mit Fmoc-Glycin beladen wird, ist das Peptid dann entsprechend aus 10 Aminosäuren aufgebaut. Eniade et al. (2003) untersuchten auf diesem Wege synthetisierte Peptide mit 3, 6 und 9 Wiederholeinheiten. Zur Bestimmung der jeweiligen Antigefriereffektivität betrachteten sie den Einfluss der Peptide auf Eiskristallisation, thermische Hysterese und Eisstrukturierung. Eine signifikante Reduktion der Rekristallisationsgeschwindigkeit wurde in diesen Untersuchungen nur beim Hexamer und Nonamer beobachtet, wobei das Nonamer etwas effektiver als das Hexamer war. Aufgrund der großen strukturellen Veränderung relativ zum natürlichen AFGP ist die Tatsache verwunderlich, dass überhaupt Antigefrieraktivität beobachtet wurde. In der Tat ist die thermische Hysterese so klein ($< 0.1^\circ\text{C}$), dass sie nicht genau bestimmt werden konnte. Unabhängig davon belegt die Bildung hexagonaler Kristalle je-

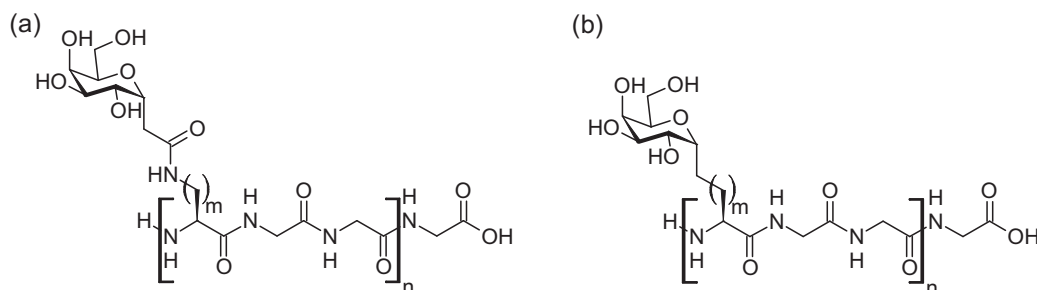


Abbildung 2.8: C-verknüpfte AFGP-Analoga. (a) Peptide der ersten Generation mit $n = 3 - 9$ und $m = 1 - 4$ (Ben et al., 1999; Tam et al., 2009). (b) Peptide der zweiten Generation mit $n = 4$ und $m = 1 - 3$ (Liu und Ben, 2005).

doch die Wirksamkeit der Analoga. Tam et al. (2009) synthetisierten Analoga der ersten Generation mit unterschiedlichen Abständen zwischen Kohlenhydrat und Rückgrat. Es zeigte sich, dass allein das Ornithin-Analogon ($m = 3$) Antigefriereigenschaften besitzt: Weder das Lysin-Analogon ($m = 4$) noch die Analoga mit $m < 3$ hemmen die Eisrekristallisation oder führen zu Eisstrukturierung. Aufgrund von CD- und NMR-Untersuchungen sowie molekulardynamischen Simulationen kommen die Autoren zu dem Schluss, dass dies mit einer Faltung der Seitenkette zum Rückgrat erklärt werden kann. Hierbei bildet sich für $m = 3$ zwischen Kohlenhydrat und Rückgrat eine hydrophobe Tasche. Bei den übrigen Analoga nimmt die Seitenkette immer eine gestreckte Form an und richtet das Kohlenhydrat zur Lösung hin aus.

Den Einfluss der Konfiguration verschiedener Zucker auf die Inhibierung der Eisrekristallisation bei einem Analogon bestehend aus 4 (Orn-Gly-Gly)-Wiederholeinheiten untersuchten Czechura et al. (2008). Die verglichenen Kohlenhydrate waren D-Galaktose, D-Glukose, D-Mannose und D-Talose. Keines der Peptide bewirkte eine thermische Hysterese und nur das Galaktose-Analogon zeigte Eisstrukturierung und hemmte die Rekristallisation in ähnlichem Maße wie AFGP 8. Ein eindeutiger Trend ist bei den weiteren Analoga nicht zu beobachten. Zwar ist die Effektivität im Falle von Glukose höher als bei Mannose und Talose, allerdings ist sie bei geringen Konzentrationen sogar höher als bei natürlichen AFGP. Eine deutliche Zunahme der Wirkung mit steigender Konzentration ist bei keinem der drei Peptide zu beobachten. Die Autoren versuchen Kompressibilitätsdaten der Kohlenhydrate und die Inhibierung der Rekristallisation in Verbindung zu setzen. Sie postulieren für eine hohe Wirksamkeit, dass die Hydratation der Kohlenhydrate zu einer Wasserstruktur führen sollte, die möglichst wenig Ähnlichkeit mit der Struktur von Bulk-Wasser hat.

Liu und Ben (2005) synthetisierten die Peptide der zweiten Generation (Abbildung 2.8b) ebenfalls durch Fmoc-basierte SPPS. Die hier verwendeten Bausteine wurden mittels Olefin-Kreuzmetathese oder katalytischer, asymmetrischer Hydrogenierung dargestellt. Auf diese Weise wurden Analoga mit unterschiedlichen Abständen zwischen Saccharid und Peptidrückgrat erhalten, die dort kein Heteroatom mehr besitzen. Untersuchungen der Rekristallisationsinhibierung zeigen, dass das Serin-Analogon ($m = 1$) mit Abstand am effektivsten ist. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass die Anzahl von Atomen zwischen dem Kohlenhydrat und dem Peptid hier gleich der entsprechenden Zahl beim natürlichen AFGP ist. Nach einer Verlängerung des Abstands um ein oder zwei Kohlenstoffatome zeigen die Analoga nahezu keine Aktivität mehr.

Vielversprechend in Bezug auf ihre Stabilität sind auch *N*-substituierte Glycine, die auch als Peptoide bezeichnet werden (Abbildung 2.9). Bei diesen Oligomeren ist die sonst am α -Kohlenstoff angefügte Seitenkette im Vergleich zu normalen Peptiden zum Stickstoff hin verschoben. Entsprechende AFGP-Analoga wurden von Norgren et al. (2009) synthetisiert. Die Verknüpfung zwischen Saccharid und Peptoid erfolgte mittels einer [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin (Klick-Reaktion). Diese Arte der Verknüpfung wurde ebenfalls von Miller et al. (2009) verwendet, um AFGP-Analoga zu synthetisieren. Dort allerdings wurde auf diese Weise das Saccharid mit einem Peptidrückgrat verbunden. Das Fehlen von Aktivitätsstudien zu diesen Analoga verhindert leider eine



Abbildung 2.9: Vergleich zwischen Peptiden und Peptoiden. Bei Peptoiden ist die Seitenkette vom α -Kohlenstoff- zum Stickstoffatom hin verschoben.

Beurteilung des Effekts, den diese neue Verknüpfungsart hat. Bei den von Norgren et al. dargestellten Peptoiden ist dies zwar anders, aber das Fehlen einer Inhibierung der Eiskristallisation muss hier nicht zwangsläufig bedeuten, dass dies mit dem Rückgrat oder der Verknüpfung zwischen Kohlenhydrat und Rückgrat zusammenhängt. Hierauf wird im Unterabschnitt 3.6.3 unter dem Punkt Klick-Chemie näher eingegangen.

Eine weitere Klasse von AFGP-Analoga sind zyklische AFGP-Analoga. Diese wurden von Hachisu et al. (2009) in einer Eintopfsynthese dargestellt. Die hierzu benötigten linearen AFGP wurden durch Polymerisation mittels DPPA in Dimethylformamid (DMF) analog zur Methode von Tsuda und Nishimura (1996) synthetisiert. Das dabei erhaltene Gemisch beinhaltete hauptsächlich Polymere mit 2, 3 und 4 Wiederholeinheiten. Das Reaktionsgemisch wurde mit DMF stark verdünnt und dann ohne Reinigungsschritt wieder mit DPPA umgesetzt. Nach dem Ausfällen der zyklischen Peptide durch Zugabe von Diethylether wurden diese in einer Ionenaustauschssäule getrennt. Die Hauptprodukte der Zyklisierung bestehen entsprechend der eingesetzten linearen Peptide aus 2, 3 und 4 Wiederholeinheiten. Alle zyklischen AFGP zeigen bei einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} die Ausbildung von bipyramidalen Eiskristallen. Um die Antigefriereeaktivität vergleichen zu können, wurde die thermische Hysterese bestimmt. Sie liegt für die zyklischen Peptide im Bereich zwischen dem linearen Dimer und dem Trimer. Das lineare Tetramer ist mit einer thermischen Hysterese von fast 0.3°C bei einer Konzentration von 10 mg mL^{-1} das effektivste Peptid. Bemerkenswert ist, dass der üblicherweise beobachtete Trend einer steigenden Effektivität mit steigender Molmasse bei den zyklischen AFGP nicht auftritt. Im Gegensatz dazu nimmt hier die thermische Hysterese ab.

2.5 Antigefrierpolymere

Obwohl natürliche AFGP mittlerweile auch synthetisch zugänglich sind, ist ihre Produktion in großem Maßstab noch zu aufwendig und damit auch zu kostspielig für industrielle Anwendungen. Ein Ziel wäre daher, einfacher aufzubauende Mimetika zu entwickeln, die in großen Mengen durch Polymerisation gewonnen werden können. Tatsächlich gibt es Polymere, die Antigefriereeigenschaften besitzen. Knight et al. (1995) identifizierten Polyvinylalkohol (PVA) als effektiven Rekristallisationsinhibitor. PVA wird durch Polymerisation von Vinylacetat mit anschließender Hydrolyse hergestellt. Es bewirkt eine sehr kleine thermische Hysterese, so dass diese zunächst nicht angegeben werden konnte. Inada und Lu (2004) bestimmten einen Wert von 0.04°C bei einer Konzentration von 50 mg mL^{-1} ($M_w = 13\,000 - 23\,000 \text{ g mol}^{-1}$). Bei AFP Typ I ($m = 3\,300 \text{ Da}$) genügen

schon 2 mg mL^{-1} für eine thermische Hysterese von 0.32°C . Dies macht deutlich, wie gering die Wirksamkeit von PVA in Bezug auf thermische Hysterese ist. Auch bei Betrachtung der Eisrekristallisation ist PVA weniger wirksam als AFP Typ I. Inada und Lu (2003) verfolgten die inhibierende Wirkung von PVA konzentrationsabhängig und untersuchten dabei den Einfluss der molaren Masse und des Hydrolysegrades. Aufgetragen wird jeweils eine repräsentative Kristalllänge nach 5 h Rekristallisation bei -2°C gegen die Konzentration in mol L^{-1} . Die Wirksamkeit nimmt mit steigender Konzentration, steigender Molmasse und steigendem Hydrolysegrad zu. Der gleiche Verlauf wie beim AFP Typ I ($m = 3\,300 \text{ Da}$) wurde von Inada und Lu bei vollständig hydrolysiertem PVA mit einer Molmasse von $89\,000 - 98\,000 \text{ g mol}^{-1}$ beobachtet. Neben PVA und AFP Typ I wurden auch mehrere Polysorbat-Emulgatoren (Tween 80, 81 und 85), Vinyltriethoxysilan (VTES), Polyacrylsäure (PAS) und Polyethylenglykol (PEG) getestet. Abgesehen von Tween 85 hemmte keines dieser Polymere die Eisrekristallisation. Bei einer Konzentration von 5 mg mL^{-1} zeigte Tween 85 eine reduzierte repräsentative Kristalllänge im Vergleich zur Kontrolllösung. Die Effektivität von PVA wurde allerdings nicht erreicht.

Knight et al. (1995) untersuchten neben PVA auch PAS, Polyvinylpyrrolidon und die Polyaminosäuren der Asparaginsäure, von Asparagin, Histidin und Hydroxyprolin. Keine dieser Verbindungen wurde als Antigefriersubstanz eingestuft in dem Sinne, dass es an Eis adsorbiert. Diese Einstufung beruht auf der in allen Fällen fehlenden Eisstrukturierung. Dennoch zeigen Poly-L-histidin-HBr und Poly-L-hydroxyprolin eine Hemmung der Eisrekristallisation. Dies hängt möglicherweise mit dem hohen Eisanteil zusammen, der bei den Untersuchungen vorlag. Die Autoren stellten fest, dass Polymere eine ähnliche Effektivität wie Antigefrierpeptide aufweisen, wenn die polykristallinen Proben keine oder nur wenig Lösung beinhalten. Daher setzten sie den Lösungen zusätzlich Natriumchlorid zu. Um die Aufhebung der Wirkung bei Poly-L-histidin-HBr und Poly-L-hydroxyprolin zu beobachten, genügte die verwendete Natriumchloridkonzentration ($c \lesssim 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$) vermutlich nicht aus. Dieselbe Erklärung könnte für die Aktivität von Tween 85 zutreffen. Obwohl allen Lösungen Calciumchlorid hinzugefügt wurde ($c = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$), wurde auch bei den Versuchen von Inada und Lu (2003) die Rekristallisation bei vergleichsweise hohem Eisanteil beobachtet.

Die Vorstellung, wonach die Wirksamkeit von PVA so wie die von AFP auf der Adsorption an der Eisoberfläche beruht und dass hierdurch eine Krümmung der Eisoberfläche bewirkt wird, wird durch RTM-Untersuchungen von Lu et al. (2002) gestützt. Die Länge der dabei beobachteten Vertiefungen in der Eisoberfläche ist mit 500 nm nur geringfügig kürzer, als bei einer vollständig gestreckten Konformation der PVA-Moleküle zu erwarten wäre. Ihre Länge sollte dann 510 bis 560 nm betragen ($M_w = 89\,000 - 98\,000 \text{ g mol}^{-1}$).

Aus einer Lösung gewachsene Eiskristalle sind bei Normaldruck stets rund, wenn nicht das Wachstum von bestimmten Eisfacetten gehemmt wird (Abbildung 2.10a). Wie in Abbildung 2.10b zu beobachten ist, bilden sich beim Wachstum in Gegenwart von PVA hingegen hexagonale Kristalle aus (Budke und Koop, 2006). Das Wachstum der prismatischen Eisflächen wird also gehemmt (Abbildung 2.10c). Der in Abbildung 2.10d gezeigte Vergleich der Eisstruktur mit der Kristallstruktur von PVA legt eine Adsorption parallel zur c -Achse an den primären und sekundären prismatischen Flächen nahe. Der Abstand

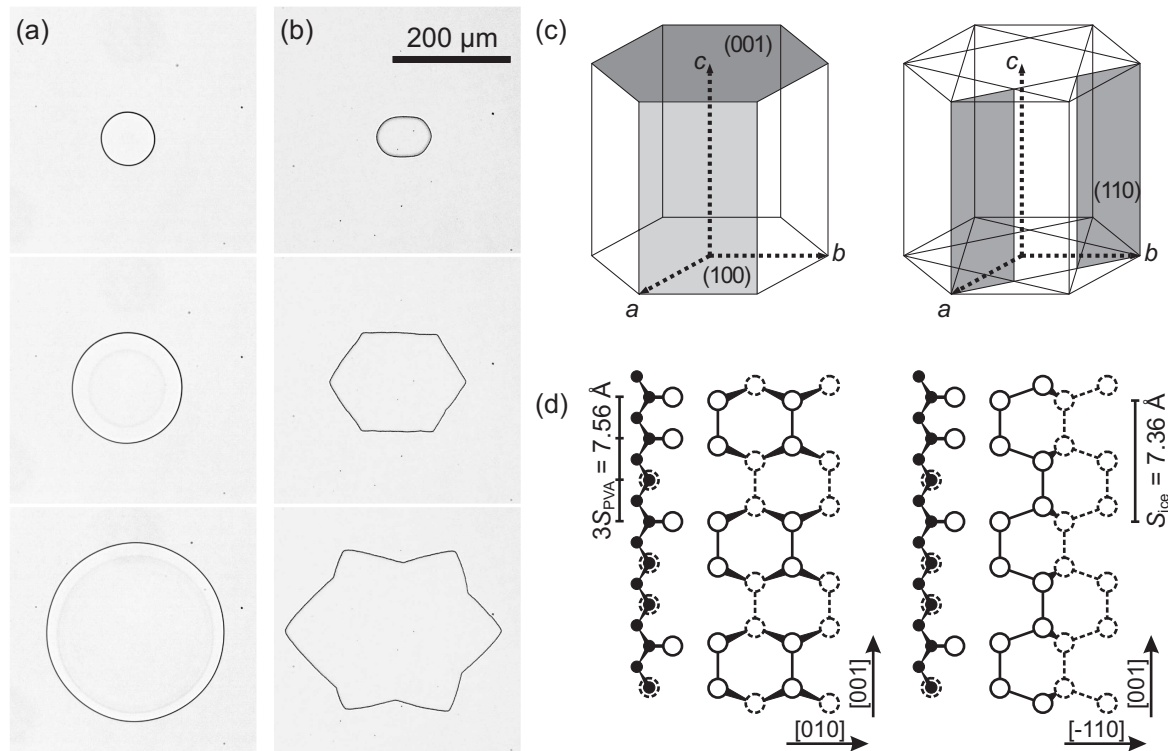


Abbildung 2.10: Modell für die Eisadsorption von PVA nach Budke und Koop (2006). Wachstum bei ca. -0.3°C von runden Eiskristallen in reinem Wasser (a) und Ausbildung von hexagonalen Strukturen in Gegenwart von PVA (b). (c) Kristallstruktur von hexagonalem Eis. Hervorgehoben sind die basale (001)-Fläche, die primäre prismatische (100)- und die sekundäre prismatische (110)-Fläche. (d) Adsorption von PVA parallel zur c -Achse an den prismatischen Eisflächen.

zwischen den Hydroxygruppen im kristallinen PVA beträgt 2.52 \AA . Der Abstand der Sauerstoffatome entlang der c -Achse im Eis ist mit 7.36 \AA etwa dreimal so lang. Im Gegensatz zu diesem Modell steht die Hypothese von Inada und Lu (2004). Anhand der Beobachtung des Wachstum von Eiskristallen bei der Bestimmung der thermischen Hysterese vermuten sie, dass PVA an pyramidalen $\{10x\}$ -Flächen adsorbiert, die in ihren Experimenten nicht genauer bestimmt werden konnten.

Eine weitere Gruppe von Verbindungen mit Antifriereigenschaften könnten Silane sein. Inada et al. (2000) untersuchten den Einfluss von AFP und mehrerer Silane auf das Eiswachstum mittels optischer Mikroskopie und RTM. Die Silane liegen dabei im Wasser als Silanole vor. In Gegenwart von Vinyltriethoxysilan (VTES), 3-Glycidoxypropyltriethoxysilan (GPTES) und 3-Methacryloxypropyltriethoxysilan (MPTES) bilden sich nadelförmige Kristalle aus. Bei 3-Glycidoxypropylmethyldiethoxysilan (GPMDDES) und 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) hingegen ist das Wachstum dendritisch. Aufgrund dieser

Beobachtungen werden von Inada et al. die ersten drei Silane als Rekristallisationsinhibitoren eingestuft.

In einem Rekristallisationsexperiment und durch Betrachtung des Wachstums von einzelnen Kristallen konnten Mastai et al. (2002) zeigen, dass Blockcopolymere aus Polyethylenoxid und Poly[2-(2-hydroxyethyl)ethylen] eine eishemmende Wirkung aufweisen. Weitere Kandidaten dafür sind Polyweinsäureamide (Yagci et al., 2006). Aus reinem Wasser und aus polymerhaltigen Lösungen gebildetes polykristallines Eis bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ zeigt deutliche Unterschiede in der Form der Kristalle. Das Fehlen von Messungen der thermischen Hysterese oder Untersuchungen der Rekristallisation verhindert leider eine vergleichende Aussage über die Antiegefriereigenschaften dieser Polymere. Das Gleiche gilt für die Experimente von Baruch und Mastai (2007). Blockcopolymere aus Polyethylenoxid und Polyethylenimin, modifiziert mit Hydroxygruppen, führen zu einer deutlichen Änderung der Eiskristallmorphologie. Ein genauer Vergleich mit AFP ist mit dieser Art von Experimenten aber nicht möglich.

Funakoshi et al. (2008) bestimmten die thermische Hysterese von Ammoniumpolyacrylat. Diese liegt bei einer Konzentration von 25 mmol L^{-1} bei $0.03\text{ }^{\circ}\text{C}$. Es ist damit zwar sehr viel weniger effektiv als AFP oder auch PVA, dennoch ist die nachgewiesene thermische Hysterese ein wichtiger Hinweis in Bezug auf essentielle Struktur motive für Antiegefriereigenschaften. Polyacrylsäure zeigt gar keine thermische Hysterese. Zudem führt die Mischung von Ammoniumpolyacrylat mit AFP vom Typ I zu einer Verstärkung der thermischen Hysterese, wie es beim Mischen verschiedener AFGP von Osuga et al. (1978) beobachtet wurde. Daher könnte es trotz seiner geringen Effektivität durchaus für Anwendungen interessant sein.

Eine Reihe von verschiedenen Polymeren wurde von Gibson et al. (2009) ebenfalls auf Rekristallisationsinhibierung hin untersucht (Abbildung 2.11). Dazu gehören PVA (**29**), PEG (**30**), PAS (**31**) und Derivate der Polymethacrylsäure (**32-34**) sowie die Polyaminosäuren Poly-L-hydroxyprolin (**35**), Poly-L-lysin-HBr (**36**) und Natriumpoly-L-glutamat (**37**). Die stärkste Inhibierung bewirkt PVA mit einer Molmasse von $115\,500\text{ g mol}^{-1}$. Mit abnehmender Molmasse zeigt sich auch hier eine Reduktion der Wirksamkeit. PVA mit einer Molmasse von $9\,000\text{ g mol}^{-1}$ ist noch sehr effektiv, aber bereits bei einer Molmasse von $3\,500\text{ g mol}^{-1}$ ist sie stark herabgesetzt. Der gleiche Trend wird bei Poly(1-methyl- α -D-glukosyl)methacrylat (PMAMGlc, **32**) beobachtet. Es ist jedoch deutlich weniger effektiv als PVA in Relation zur Molmasse. In molaren Konzentrationen betrachtet sind PVA9 ($M_w = 9\,000\text{ g mol}^{-1}$) und PMAMGlc130 ($M_w = 130\,000\text{ g mol}^{-1}$) ähnlich wirksam. Das Gleiche gilt für PVA4 ($M_w = 3\,500\text{ g mol}^{-1}$) und PMAMGlc20 ($M_w = 20\,200\text{ g mol}^{-1}$). Das zweite untersuchte Glykopolymer in dieser Studie Poly(β -D-galaktosyloxy)ethylmethacrylat (PGalEMA, **33**) bewirkt bei einer Molmasse von $16\,500\text{ g mol}^{-1}$ ebenfalls eine geringfügige Reduktion der Rekristallisationsgeschwindigkeit. Es passt damit in den Trend, der bei PMAMGlc beobachtet wird. PAS (**31**) ist in Bezug auf Rekristallisation ebenso inaktiv wie bei thermischer Hysterese. Poly-2-aminoethylmethacrylat (PAEM, **34**) und PEG (**30**) inhibieren die Eisrekristallisation ebenfalls nicht. Das Gleiche gilt für Poly-L-lysin-HBr (**36**) und Natriumpoly-L-glutamat (**37**). Die Autoren führen dies auf die geladenen Seitengruppen zurück, was jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen von

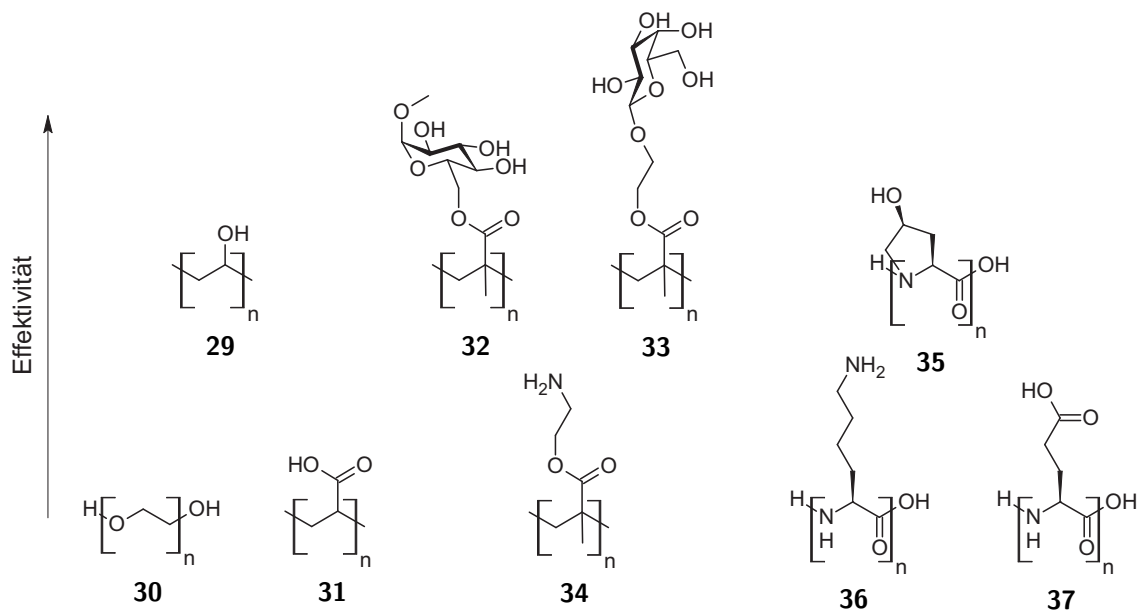


Abbildung 2.11: Inhibierung der Rekristallisation durch Polymere nach Gibson et al. (2009).

Funakoshi et al. (2008) steht. Dort führte gerade die Einführung von geladenen Seitengruppen bei PAS zu einer Hemmung des Eiswachstums. Das Ammoniumsalz der PAS zeigt eine thermische Hysterese von 0.03°C bei einer Konzentration von 300 mg mL^{-1} (25 mmol L^{-1}). Auch ohne geladene Seitengruppen hemmt Poly-L-hydroxyprolin (**35**) in geringem Maße die Rekristallisation. Um einen signifikanten Effekt zu beobachten, ist wie bei den Glykopolymeren eine Konzentration von mindestens 40 mg mL^{-1} erforderlich. PVA4 erreicht eine vergleichbare Effektivität bereits bei 5 mg mL^{-1} . Die Wirksamkeit von Poly-L-hydroxyprolin ist möglicherweise mit seiner Sekundärstruktur zu erklären. Es ist zu erwarten, dass es eine polyprolinartige Struktur ausbildet, wie es auch bei AFP angenommen wird. Aufgrund des hohen Eisanteils bei den Experimenten von Gibson et al. kann jedoch der Grund für die Wirksamkeit nicht einwandfrei geklärt werden.

Die Untersuchung der AFP-Effektivität mittels Eisrekristallisation hat in den vergangenen Jahren im Gegensatz zur thermischen Hysterese an Bedeutung gewonnen. Der Hauptgrund hierfür ist die deutlich höhere Empfindlichkeit der Methode. Werden für eine thermische Hysterese von 0.04°C noch 50 mg mL^{-1} PVA mit einer Molmasse von $13\,000 - 23\,000\text{ g mol}^{-1}$ benötigt, so reichen für eine maximale Hemmung der Rekristallisation schon $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ des selben Polymers aus (Inada und Lu, 2004, 2003). Knight et al. (1995) konnten zeigen, dass Polymere auch fälschlich als aktiv eingestuft werden können, wenn der Eisanteil bei der Rekristallisation besonders hoch ist. Zudem beeinflusst der Eisanteil selbst die Geschwindigkeit der Rekristallisation und hohe Konzentrationen an gelösten Substanzen beeinflussen wiederum den Eisanteil. Daher wird im nachfolgenden Kapitel die Bedeutung solcher Einflüsse quantitativ beschrieben, bevor die AFP-Effektivität einer Reihe von Verbindungen mittels Eisrekristallisation bestimmt wird.

3 Eisrekristallisation

3.1 LSW-Theorie

Rekristallisation findet grundsätzlich statt, wenn eine Anzahl von Partikeln in ihrer eigenen gesättigten oder übersättigten Lösung vorliegen. Solche Dispersionen sind energetisch nicht stabil. Aufgrund der erhöhten Grenzfläche vieler kleiner im Vergleich zu einem einzelnen Partikel kommt es zu einem Reifungsprozess, der im Allgemeinen als Ostwaldreifung bezeichnet wird. Er tritt in einer Vielzahl von unterschiedlichen Systemen wie Emulsionen, Niederschlägen und Legierungen auf, bei denen neben dem Oberbegriff Ostwaldreifung auch weitere Begriffe geläufig sind. So wird in der Metallurgie häufig auch von Alterung oder in polykristallinen Festkörpern von Kornvergrößerung gesprochen. Die Alterung von Niederschlägen durch Umlösen, wobei feste Partikel in einer Lösung vorliegen, wird auch als Rekristallisation bezeichnet. In der Chemie steht Rekristallisation zudem als Synonym für Umkristallisation, dem Auflösen und wieder Auskristallisieren von Substanzen zur Trennung oder Reinigung. Weder dies noch die Umwandlung zwischen unterschiedlichen kristallinen Formen ist aber in der vorliegenden Arbeit gemeint.

Bei der Rekristallisation wird beobachtet, dass sich kleine Partikel auflösen, während größere wachsen. Dies hängt mit der höheren Löslichkeit von kleineren Partikeln aufgrund der stärker gekrümmten Oberfläche zusammen. Es kommt zu einem Materietransport von den kleinen zu den großen Partikeln, der in der Regel den geschwindigkeitsbestimmenden Prozess darstellt. Neben der Diffusion in der Lösung sind ebenfalls die Aggregation der Partikel, also die Verschmelzung benachbarter Kristalle, aber auch das Wachsen und Auflösen der Kristalle wichtige Prozesse. Die theoretische Beschreibung der diffusionskontrollierten Reifung wurde maßgeblich von Lifshitz und Slyozov (1961) sowie unabhängig davon von Wagner (1961) entwickelt. Die LSW-Theorie (Lifshitz-Slyozov-Wagner) baut im Wesentlichen auf zwei Gleichungen auf: zum einen auf der Kelvin-Gleichung (3.1), die auch als Gibbs-Thomson-Gleichung bezeichnet wird, und zum anderen auf dem ersten Fickschen Gesetz (3.2). In der hier verwendeten Form gibt die Kelvin-Gleichung die Konzentration c_r an Gelöstem im Gleichgewicht mit einem Kristall des Radius r_i relativ zur Konzentration c_∞ für den Fall einer ebenen Grenzfläche, also $r_i \rightarrow \infty$, an.

$$c_r = c_\infty \exp\left(\frac{2\gamma\Omega}{r_i RT}\right) \quad (3.1)$$

Dabei ist γ die Grenzflächenenergie zwischen Kristall und Lösung, Ω das molare Volumen der festen Phase, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Nach Gleichung 3.2 ist der Fluss J von Gelöstem durch die Grenzfläche proportional zum stationären Wert

des Konzentrationsgradienten an der Grenzfläche. Die Proportionalitätskonstante ist der Diffusionskoeffizient D .

$$J = -D \left(\frac{\delta c}{\delta x} \right)_{x=r_i} \quad (3.2)$$

Für die Änderung des Kristallradius mit der Zeit ergibt sich Gleichung 3.3. Zur Vereinfachung wird dabei $2\gamma\Omega c_\infty/RT$ durch \mathbf{a} ersetzt. Bei der Herleitung von Gleichung 3.3 wird vorausgesetzt, dass der Abstand zwischen den Partikeln groß im Vergleich zu ihren Radien, also der Volumenanteil der dispergierten Partikel an der Dispersion Q_v nahe Null ist, und dass die Übersättigung $\Delta = c_l - c_\infty$ klein ist. c_l ist die Konzentration an Gelöstem in der Lösung.

$$\frac{dr_i}{dt} = \frac{D}{r_i} \left(\Delta - \frac{\mathbf{a}}{r_i} \right) \quad (3.3)$$

Nach Gleichung 3.3 steht ein Kristall mit dem kritischen Radius $r_c = \mathbf{a}/\Delta$ im Gleichgewicht mit der Lösung. Größere Kristalle wachsen und kleinere lösen sich auf. Im diffusionskontrollierten Fall kann der kritische Radius durch den experimentell leichter zugänglichen mittleren Kristallradius r ersetzt werden, da dann beide Werte identisch sind. Infolge der Zeitabhängigkeit wird zur Beschreibung der Geschwindigkeit der Rekristallisation nach der LSW-Theorie die Ratengleichung 3.4 erhalten.

$$r(t) = \left(r_0^3 + k_{LSW} \cdot t \right)^{1/3} \quad (3.4a)$$

$$r^3(t) = r_0^3 + k_{LSW} \cdot t \quad (3.4b)$$

Hiernach besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem kubischen mittleren Radius r^3 und der Zeit t . r_0 ist der mittlere Radius zur Zeit $t = 0$. Die Rekristallisationsratenkonstante k_{LSW} kann geschrieben werden als

$$k_{LSW} = \frac{8\gamma\Omega^2 c_\infty D}{9RT}. \quad (3.5)$$

Bei der Rekristallisation sinkt die Teilchenanzahl N , während der mittlere Radius ansteigt. Dies hängt mit der konstanten Temperatur zusammen. Bei konstanter Temperatur ist auch der Anteil der dispergierten Partikel an der Dispersion konstant. Wie groß dieser Wert ist, hängt vom jeweiligen Phasendiagramm ab. Hiernach wird die Konzentration der Lösung durch die Temperatur bestimmt. Ist die Gesamtkonzentration an Gelöstem höher als die Gleichgewichtskonzentration, bildet der überschüssige Teil die dispergierte Phase. Der Volumenanteil der dispergierten Phase Q_v lässt sich berechnen aus dem Produkt der Teilchendichte Z_v und dem mittleren Teilchenvolumen V . Die Teilchendichte Z_v entspricht dabei dem Quotienten aus Teilchenanzahl N und dem Probenvolumen V_{ges} . Für sphärische Partikel in einem dreidimensionalen System ergibt sich:

$$Q_v = Z_v \cdot V = \frac{N}{V_{ges}} \cdot V = \frac{N}{V_{ges}} \cdot \frac{4}{3}\pi r^3. \quad (3.6)$$

Bei der Betrachtung von zweidimensionaler Rekristallisation wird der Flächenanteil Q_a , analog zum Volumenanteil, aus dem Produkt von Teilchendichte Z_a und mittlerer Teilchenfläche A berechnet. Die Teilchendichte Z_a ist hier das Verhältnis zwischen Teilchenanzahl N und der Probenfläche A_{ges} .

$$Q_a = Z_a \cdot A = \frac{N}{A_{ges}} \cdot A = \frac{N}{A_{ges}} \cdot \pi r^2 \quad (3.7)$$

Dies hat Konsequenzen für die Geschwindigkeit, mit der die Teilchenanzahl abnimmt. In der Arbeit von Ardell (1997) wird theoretisch abgeleitet, wie die Dimensionalität der dispergierten Phase (d) und des Diffusionsfeldes (D) die Kinetik beeinflussen. Hierzu werden die allgemeinen Gleichungen 3.8 und 3.9 aufgestellt.

$$r^n(t) = r_0^n + k_{LSW} \cdot t \quad (3.8)$$

$$N(t) = \mathcal{A} \cdot t^{-m} + \mathcal{B} \cdot t^{-p} \quad (3.9)$$

Die Parameter \mathcal{A} und \mathcal{B} sind systemspezifische Konstanten. Die Exponenten n , m und p werden durch die jeweilige Dimensionalität bestimmt (Tabelle 3.1). Gleichung 3.9 gilt auch, wenn der Anteil der dispergierten Phase an der Gesamtdispersion innerhalb der Rekristallisationszeit keinen konstanten Wert annimmt.

d	D	n	m	p
3	3	3	1	4/3
3	2	4	3/4	1
3	1	5	3/5	4/5
2	2	3	2/3	1
2	1	4	1/2	3/4

Tabelle 3.1: Kinetische Parameter n , m und p nach Ardell (1997) für unterschiedliche Dimensionen der dispergierten Phase (d) und des Diffusionsfeldes (D).

In der LSW-Theorie wird ein konstanter Volumenanteil angenommen, daher entfällt der zweite Term von Gleichung 3.9. Zudem gilt dort $d=D=3$. Es ergibt sich eine Zeitabhängigkeit der Teilchenanzahl $N \propto t^{-1}$. Für den zweidimensionalen Fall erhält man $N \propto t^{-2/3}$. Die Ratengleichung 3.4 ist aber in beiden Fällen identisch. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sie in einer Vielzahl von Systemen sinnvoll angewendet werden kann (Tsao et al., 2004; Sung et al., 2007; Sutton et al., 1996). Es ist zudem üblich auch bei zweidimensionalen Systemen vom Volumenanteil zu sprechen. Volumenanteil und Flächenanteil sind dann identisch, wenn die Partikelränder dieselbe Höhe wie die Lösung besitzen. Das System ist dann nicht mehr zweidimensional, es kann aber als solches behandelt werden. Im folgenden Text wird daher immer der Begriff Volumenanteil verwendet.

Obwohl die Ratengleichung 3.4 prinzipiell zur Bestimmung der Ratenkonstante in realen Systemen verwendbar ist, trifft dies nicht auf die Ratenkonstante k_{LSW} zu. Eine Reihe von zum Teil sehr wichtigen Faktoren werden in der LSW-Theorie vernachlässigt (Jayanth und Nash, 1989). Der wichtigste davon ist der deutlich von Null verschiedene Anteil der dispersierten Phase an der Dispersion in realen Systemen. Die Tatsache von Volumenanteilen größer Null führt zu einer Überlappung der Diffusionsfelder, die die Partikel umgeben. Mit zunehmender Nähe der Partikel zueinander wird dieser Punkt immer wichtiger. Des Weiteren werden bei hohen Volumenanteilen auftretende Prozesse wie die Aggregation nicht berücksichtigt. Daher wurden mehrere Theorien entwickelt, die diese Faktoren miteinbeziehen (Jayanth und Nash, 1989; Baldan, 2002; Stevens und Davies, 2002). Es fällt jedoch schwer zu entscheiden, welche dieser Theorien für eine bestimmte Anwendung am besten geeignet ist. Für diese Arbeit kann Aggregation als Faktor ausgeschlossen werden, wie später gezeigt wird. Daher genügt an dieser Stelle ein eher grundsätzlicher nichtlinearer Molekularfeldansatz von Voorhees und Glicksman (1984), bei dem die Partikelumgebung durch das Molekularfeldpotential $\alpha = r/r_c$ beschrieben wird. Diese Theorie sagt im Vergleich zu anderen einen weder besonders starken noch besonders schwachen Einfluss des Volumenanteils auf die diffusionsbestimmte Ratenkonstante k_d in realen Systemen voraus. Gleichung 3.10 stellt eine leicht modifizierte Version der Originalgleichung dar.

$$k_d(Q_v) = k_{d0} \cdot \frac{\alpha^3}{1 - p \cdot Q_v^{1/3}} \quad (3.10)$$

Der Unterschied liegt im Parameter p , der bereits im Artikel von Budke et al. (2009) eingeführt wurde, um die experimentellen Daten sinnvoll beschreiben zu können. Theoretisch sollte dieser Wert gleich Eins sein. Da er aber größer als Eins ist, steigt k_d schneller mit zunehmendem Volumenanteil Q_v . Für sehr kleine Volumenanteile strebt k_d allerdings in beiden Fällen gegen k_{d0} , die diffusionsbestimmte Ratenkonstante für $Q_v \rightarrow 0$. Die Ratenkonstante k_{LSW} gilt für diffusionskontrollierte Rekristallisation bei einem Volumenanteil nahe Null. Damit sollten k_{d0} und k_{LSW} identisch sein, was zutrifft, denn α ist an diesem Punkt gleich Eins, mittlerer Kristallradius und kritischer Radius sind gleich. Erst mit steigendem Eisanteil wird α kleiner Eins. Der Vergleich mehrerer Theorien deutet darauf hin, dass für $Q_v \lesssim 0.40$ die Eisanteilabhängigkeit durch einen linearen Zusammenhang $\alpha = 1 - 0.15 \cdot Q_v$ beschrieben werden kann (Voorhees und Glicksman, 1984; Brailsford und Wynblatt, 1979; Stevens und Davies, 2002).

3.2 Experimenteller Teil

Teil dieser Arbeit ist die Bestimmung der Rekristallisationsgeschwindigkeitskonstante k von polykristallinem Eis in unterschiedlichen Lösungen. Dazu wird der in Abbildung 3.1 schematisch dargestellte Aufbau verwendet. Die Art der Probenvorbereitung sowie die experimentelle Prozedur sind an das von Smallwood et al. (1999) entwickelte Sucrose-Sandwich-Splat-Assay angelehnt. In der vorliegenden Arbeit wurde nach dem folgenden

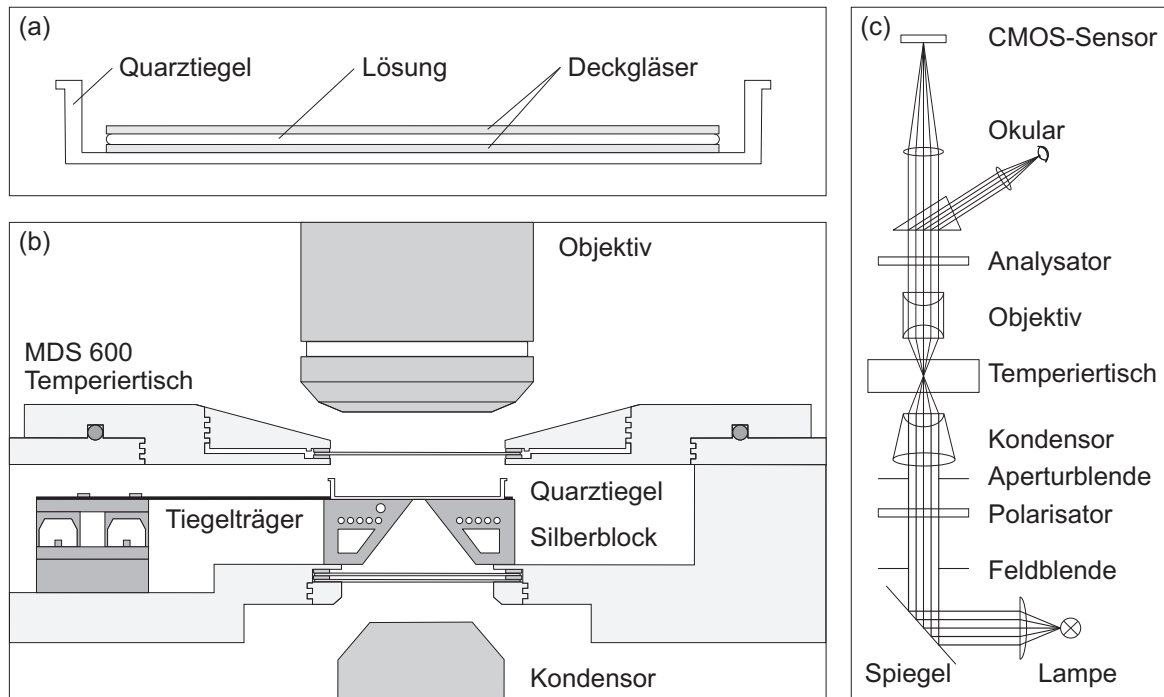


Abbildung 3.1: Experimenteller Aufbau. (a) Sucrose-Sandwich-Splat-Assay. (b) Temperiertisch Linkam MDS 600. (c) Mikroskop Olympus BX51.

Prinzip vorgegangen: Zunächst werden etwa $10\ \mu\text{m}$ dünne Filme erzeugt, indem $2\ \mu\text{L}$ der jeweiligen Lösung zwischen zwei runden Deckgläsern (Durchmesser = $14\ \text{mm}$) leicht zusammengedrückt werden, wobei überschüssige Lösung entfernt wird. Das Sandwich wird dann mit dem Kühlsystem MDBCS196 (Linkam) untersucht. Dieses System besteht aus einem Temperiertisch (Linkam MDS 600), einem Stickstoffvorratsgefäß (Taylor-Wharton Classic-25 oder D2L), der Stickstoffpumpe LNP94/2, der Temperatursteuerung TMS94 sowie einer Motorsteuerung (MDS) zur Positionierung der Probe. Das Sandwich wird auf einem Quarztiegel (Abbildung 3.1a) in den Temperiertisch verbracht und ein im Folgenden genauer beschriebenes Temperaturprofil absolviert. Der Temperiertisch ist dabei in ein optisches Mikroskop (Olympus BX51) eingebaut, das im Durchlicht-Hellfeld-Modus betrieben wird (Abbildung 3.1b,c). Das Innere des Temperiertisches sowie das obere Fenster werden mit trockenem, gasförmigen Stickstoff gespült, um Kondensation von Wasser zu vermeiden. Während der Rekristallisation wird jede Minute ein Bild mit einer Digitalkamera (PixelINK PL-A662) aufgenommen. Die Bilder haben eine Auflösung von 1280×1024 Pixel. Bei der hier verwendeten 20fachen Vergrößerung hat der Bildausschnitt eine Größe von $383 \times 307\ \mu\text{m}$.

Ein typisches Rekristallisationsexperiment ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Das polykristalline Eis wurde hierbei durch Abkühlen der Probe mit $20\ ^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$ bis auf $-50\ ^\circ\text{C}$ erzeugt. Anschließend wurde mit einer Rate von $10\ ^\circ\text{C}\ \text{min}^{-1}$ bis auf $-8\ ^\circ\text{C}$ aufgewärmt und bei dieser Temperatur die Rekristallisation verfolgt. Der Einwaagemassenanteil an Saccharose beträgt 45 Gew.-%. Gut zu erkennen ist, wie die mittlere Kristallgröße zunimmt, wäh-

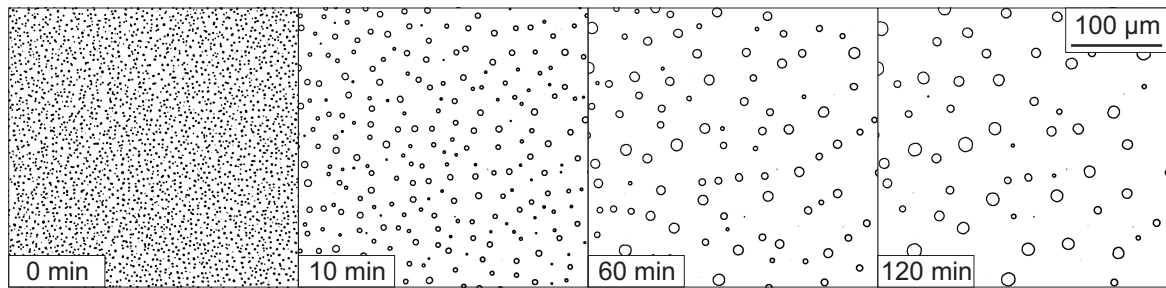


Abbildung 3.2: Während der Rekristallisation bei -8°C aufgenommene Bilder von Eiskristallen, gebildet aus einer wässrigen Saccharoselösung (45 Gew.-%). Der Kontrast aller Bilder wurde zugunsten einer besseren Darstellung verändert.

rend die Kristallanzahl sinkt. Der mittlere Radius zu Beginn beträgt etwa $0.5\ \mu\text{m}$. Nach 120 Minuten ist er auf $5\ \mu\text{m}$ angestiegen. Im gleichen Zeitraum reduziert sich die Eiskristallanzahl von ungefähr 1000 auf etwa 50. Bei einer Dauer von 120 Minuten und einer Bildaufnahmerate von einem Bild pro Minute ergibt sich dadurch eine Gesamtanzahl von rund 15 000 Objekten, die bei jedem Experiment vermessen werden. Aufgrund der Verwendung einer Bilderkennungssoftware und Entwicklung einer Analyseroutine dauert dies auf einem Standard-PC lediglich 4 Minuten. Wird ein Experiment ausgewertet, bei dem Antigefrierproteine zugegeben wurden, so verlängert sich die Zeit auf etwa 10 Minuten, da die Kristallanzahl weniger schnell abnimmt und dadurch mehr Objekte vermessen werden müssen. Die vollständige Analyseroutine ist im Anhang (Abschnitt 6.2) aufgeführt.

Die während der Rekristallisationsexperimente aufgenommenen Bilder werden mit der Bilderkennungssoftware UTHSCSA Image Tool Version 3.0 analysiert. Dieses am University of Texas Health Science Center in San Antonio, Texas, entwickelte Programm kann unter <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html> frei heruntergeladen werden. Zunächst wird bei der Bildanalyse das Originalbild in ein Grauskalenbild umgewandelt, wobei Schwarz ein Wert von 0 und Weiß der Wert 255 zugeordnet ist. Wie in Abbildung 3.3 gezeigt, werden mit Hilfe der Funktion „find objects“ alle Pixel mit einer Graustufe unterhalb eines bestimmten Grenzwertes in rote Pixel konvertiert. Ein typischer Wert ist 210. Der genaue verwendete Grenzwert hängt vom Kontrast des Originalbildes ab. Alle benachbarten roten Pixel werden einem Objekt zugeordnet, das durch die schwarze Umrandung begrenzt wird. Die Fläche des Objekts berechnet sich nach der Anzahl an Pixeln innerhalb der Umrandung. Es werden also sowohl die roten als auch die grauen Pixel gezählt. Alle Pixel mit Graustufen oberhalb des Grenzwertes sind in Abbildung 3.3 blau dargestellt. Es werden hier wie zuvor alle benachbarten Pixel zu einem Objekt zusammengefasst und entsprechend seiner Umrandung dessen Fläche bestimmt. Auf diese Weise werden für jeden Kristall eine äußere und eine innere Fläche erhalten. Aus der Länge der Umrandung ergibt sich jeweils der Umfang des Objekts. Diese Größen werden für alle Kristalle eines jeden Bildes bestimmt. Davon ausgenommen sind Objekte, die den Bildrand berühren, da

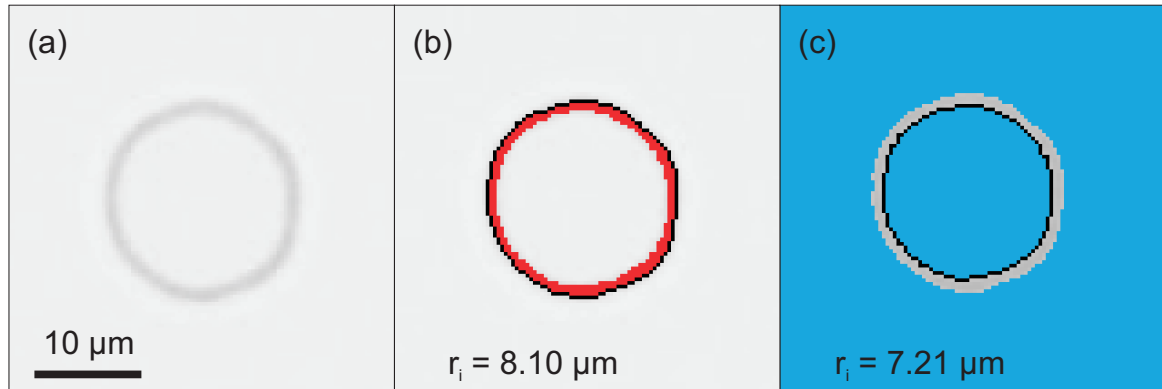


Abbildung 3.3: Bildanalyse mit der Software UTHSCSA ImageTool. (a) Grauskalenbild eines Eiskristalls. (b) Bestimmung der äußeren Begrenzung. (c) Bestimmung der inneren Begrenzung. Die angegebenen durchschnittlichen Kristallradien ergeben sich bei Verwendung der entsprechenden Umrandungen aus den darin eingeschlossenen Flächen.

deren Größe und damit auch ihr Radius unterschätzt würde. Entsprechend werden solche Kristalle auch bei der Bestimmung der Kristallanzahl nicht mitgezählt.

Eine weitere berechnete Größe ist die Rundheit eines Kristalls R_i . Mit $R_i = 4 \pi A_i U_i^{-2}$ ergeben sich hierfür theoretisch Werte von 0 bis 1, wobei 1 einem perfekten Kreis entspricht. A_i und U_i sind Fläche und Umfang eines Kristalls. Der Kristallradius r_i ergibt sich als Hälfte des durchschnittlichen Durchmessers D_i . Dieser wiederum ist der Durchmesser eines perfekten Kreises, der dieselbe Fläche wie das betrachtete Objekt besitzt ($D_i = (4 \cdot A_i \cdot \pi^{-1})^{1/2}$). Insgesamt werden aus den so bestimmten Größen für jedes Bild entsprechend der Betrachtung der äußeren bzw. der inneren Umrandung jeweils zwei Mittelwerte gebildet. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die im Weiteren verwendeten Werte immer auf den Mittelwert aus beiden Größen.

Die Ausgabe der ImageTool-Analyse beinhaltet aufgrund der Betrachtung der äußeren und inneren Fläche für jede Minute zwei Textdateien, die für jedes Objekt die zuvor beschriebenen Größen beinhalten. Zudem wird eine Datei erzeugt, in der die Mittelwerte als Funktion der Zeit und experimentelle Daten wie Konzentration und Temperatur aufgeführt sind. Alle diese Daten werden in das Datenanalyse- und Darstellungs-Programm Igor Pro Version 5.0.5.0 eingelesen. Dies geschieht mit Hilfe einer Auswertungsroutine automatisch nach Angabe des Pfades innerhalb weniger Sekunden. Innerhalb dieser Zeit werden direkt weitere wichtige Größen berechnet, Anpassungen an die Daten vorgenommen und die Ergebnisse in Form von Tabellen und Graphen ausgegeben. Ausgewählte Bestandteile der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Auswertungsroutine sind im Anhang (Abschnitt 6.3) angegeben.

3.3 Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wird das Ziel verfolgt die diffusionskontrollierte und die AFP-gehemmte Rekristallisation zu beobachten und zu beschreiben. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Temperatur und der Eisanteil diese Typen von Rekristallisation beeinflussen können. Um jedoch weitere, störende Faktoren wie beispielsweise Aggregation vernachlässigen zu können, beinhaltet die Auswertung der Daten Kriterien, die zum Ausschluss einiger Experimente führen.

Wenn Aggregation der dominierende Prozess ist, so führt dies zu einer Veränderung in der Rundheit der Objekte. Ein typischer runder Kristall besitzt eine Rundheit von etwa 0.9, wohingegen die Aggregation zweier Kristalle zu einem Objekt mit einer Rundheit von unter 0.6 führt. Da dies zu Beginn der Experimente häufig auftritt, wird der Zeitraum, auf den sich die weiteren Analysen beziehen, eingeschränkt. Es werden nur Daten verwendet, bei denen mindestens 90 % der Kristalle eine Rundheit von über 0.7 zeigen. Wenn dies nur für einen Beobachtungszeitraum von unter 20 Minuten gilt, wird das ganze Experiment verworfen. Bei Lösungen, die AFP enthalten, wird dieses Kriterium nicht angewandt, wenn die vorliegende Rekristallisationsgeschwindigkeit deutlich unterhalb der diffusionskontrollierten liegt. In diesem Fall könnte die Veränderung in der Rundheit, die auf Eisstrukturierung zurückzuführen ist, fälschlicherweise als Aggregation gedeutet werden. Zudem führt die Zugabe von genügend AFP dazu, dass Aggregation die Rekristallisation nicht mehr signifikant beeinflusst. Der limitierende Prozess ist dann das Wachstum der Kristalle. Die Grenzwerte k_{lim} für die Unterscheidung zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Sie sind gerade halb so groß wie die entsprechenden diffusionskontrollierten Geschwindigkeitskonstanten. Ist die Rekristallisation aufgrund der Hemmung durch AFP langsamer, wird der Beobachtungszeitraum manuell festgelegt.

Lösung	Saccharose	Saccharose	Saccharose	Natriumbromid
T [°C]	-6	-8	-10	-25
k_{lim} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	2.0	0.7	0.4	3.6

Tabelle 3.2: Grenzwerte der Geschwindigkeitskonstanten k für die Unterscheidung zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation.

Ein weiteres Kriterium für die Güte eines Experiments gibt die Bestimmung der allgemeinen Rekristallisationsratenkonstante k selbst. Diese könnte aus der Abnahme der Kristallanzahl N abgeleitet werden. Die Anpassung nach Gleichung 3.9 liefert allerdings zwei Parameter, die zur Beschreibung der Rekristallisationsgeschwindigkeit benötigt werden. Wenn der Eisanteil konstant ist, sollte der zweite Term im späteren Teil des Prozesses vernachlässigbar werden, aber es zeigt sich, dass eine Anpassung dann nicht zufriedenstellend gelingt. Dies hängt zum Teil damit zusammen, dass innerhalb der ersten Minuten verhältnismäßig viele sehr kleine Kristalle vorliegen. Bei sehr kleinen Kristallen kann zwar der Außenradius bestimmt werden, oft jedoch nicht der Innenradius. Solche Kristalle tauchen daher auch bei der Kristallanzahl nicht auf und vermindern damit die mittlere Kristallan-

zahl. Der Einfluss auf den mittleren Radius ist hingegen nur gering, da die Werte hier insgesamt sehr klein sind. Aus diesem Grund wird k nach Gleichung 3.4 aus der linearen Abhängigkeit $r^3(t)$ bestimmt (Abbildung 3.4b). Kommt es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einer graduellen Änderung von Aggregations- zu Diffusionskontrolle, so bedeutet dies eine Verlangsamung der Rekristallisation. Obwohl beide Prozesse einzeln der gleichen Kinetik folgen, wird dann die Abhängigkeit $r^3(t)$ aufgrund der verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten nichtlinear. Als Kriterium für die Linearität wird die Standardabweichung der Ratenkonstanten herangezogen. Die in Tabelle 3.3 aufgeführten Grenzwerte σ_{lim} sind empirisch bestimmt worden und beruhen auf der Betrachtung einer Reihe von Einzelexperimenten.

Lösung	Sac	Sac	Sac	Sac	NaBr
T [°C]	-5	-6	-8	-10	-25
σ_{lim} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	0.40	0.15	0.035	0.035	0.17

Tabelle 3.3: Grenzwerte in der Standardabweichung der Ratenkonstanten k zur Beschreibung ihrer Güte.

Zu Beginn der Experimente, und in einigen Fällen auch über einen größeren Zeitraum, wird beobachtet, dass einige Kristalle im optischen Blickfeld wandern. Dies tritt vor allem bei größeren Abständen zwischen den Deckgläsern auf. Diese Bewegungen einiger Kristalle führen in vielen Fällen zu Stößen und damit zu Aggregation. Experimente, bei denen dies vermehrt auftritt, werden durch obige Kriterien also ausgeschlossen. Dieses Phänomen

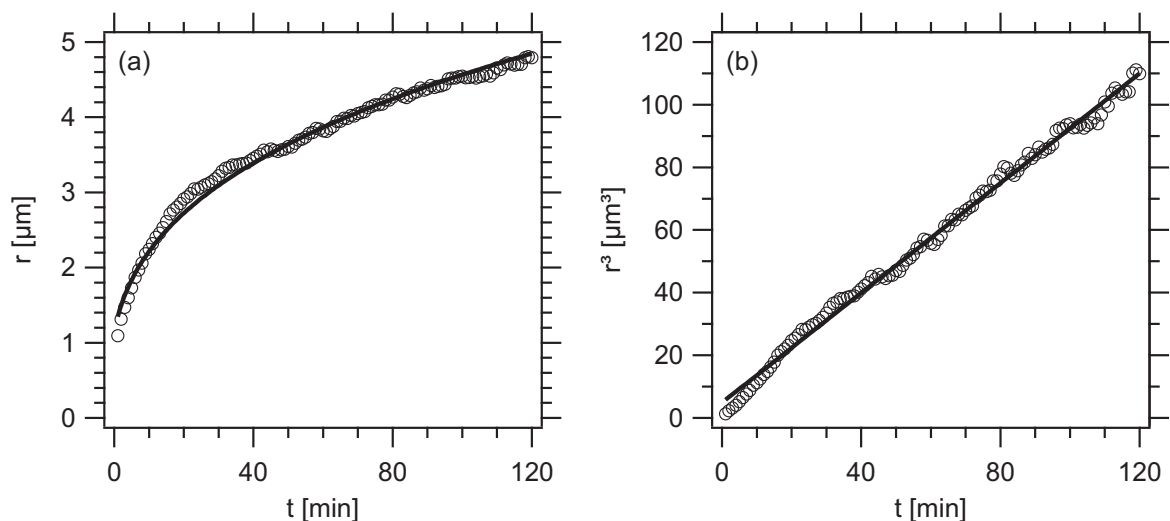


Abbildung 3.4: Bestimmung der Rekristallisationsratenkonstante. Es wird die Rekristallisation bei -8°C einer 45 Gew.-% Saccharoselösung verfolgt. (a) Änderung des mittleren Kristallradius r mit der Zeit t . Die Linie stellt die Anpassung nach Gleichung 3.4a dar. (b) Änderung des kubischen mittleren Radius r^3 mit der Zeit t . Die Linie basiert auf der Anpassung nach Gleichung 3.4b.

deutet allerdings auf ein weiteres Problem hin. Gründe für die Bewegungen können ein Temperaturgradient innerhalb der Probe oder ein Konzentrationsgradient sein. Betrifft dies in großem Maße den betrachteten Bildausschnitt, so sollte das am Eisanteil erkennbar sein, da dieser eine temperatur- und konzentrationsabhängige Größe ist.

Der Eisanteil wird durch das Phasendiagramm bestimmt. Er hängt vom eingesetzten Gesamtmassenanteil an Saccharose w_E und der Temperatur T ab. Sind beide Größen konstant, sollte sich ein konstanter Eisanteil ergeben. In Abbildung 3.5a ist beispielhaft das Saccharose/Wasser-Phasendiagramm gezeigt. Aufgrund der Auftragung des Eisschmelzpunkts als Funktion des Massenanteils an Saccharose ergibt sich der Eisanteil als Massenbruch nach dem Hebelgesetz.

Bestimmt wird der Eisanteil Q_m durch den Gleichgewichtsmassenanteil $w_{eq,s}$ an Saccharose bei einer bestimmten Temperatur und durch den Massenanteil der eingesetzten Lösung w_E .

$$Q_m = \frac{m_{Eis}}{m_{Eis} + m_{Lösung}} = \frac{w_{eq,s} - w_E}{w_{eq,s}} = 1 - \frac{w_E}{w_{eq,s}} \quad (3.11)$$

Für einen Ausgangsmassenanteil von 40 Gew.-% wird ein Eisanteil Q_m von 0.29 bei -10°C erhalten. Experimentell wird der Volumen-Eisanteil Q_v bestimmt. Der Zusammenhang zwischen Q_m und Q_v ist gegeben durch Gleichung 3.12.

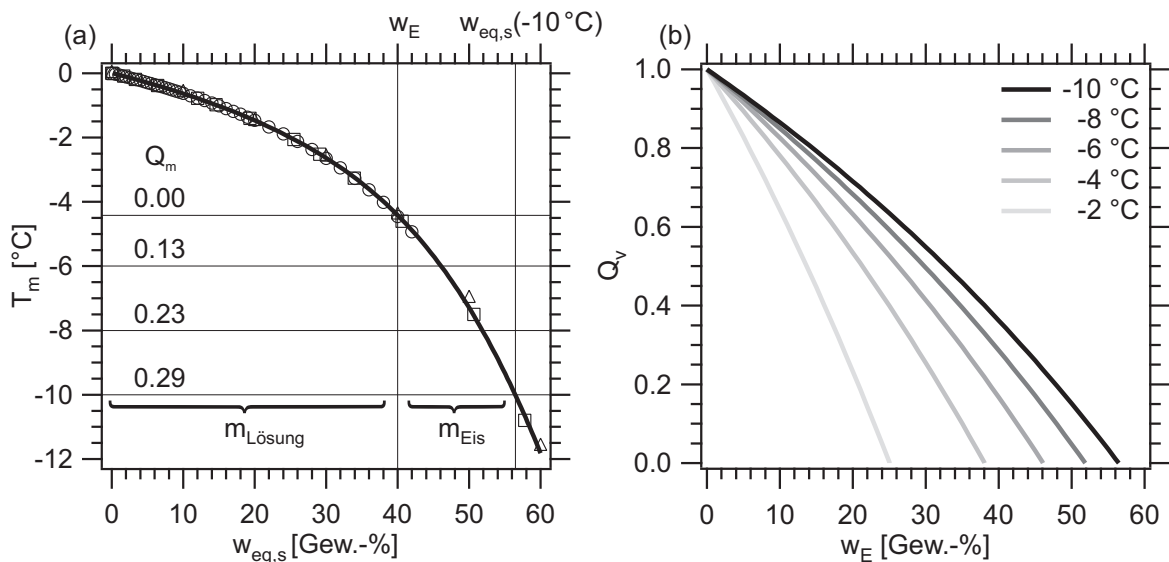


Abbildung 3.5: Berechnung des Eisanteils anhand des Phasendiagramms am Beispiel von Saccharose. Die Datenpunkte sind der Literatur entnommen (Young und Jones, 1949; Washburn, 1928; Weast, 1979). (a) Berechnung des Massenanteils Q_m bei konstantem Massenanteil w_E . (b) Abhängigkeit des Volumen-Eisanteils Q_v bei konstanter Temperatur vom Massenanteil w_E .

$$Q_m = \frac{Q_v \cdot \rho_i}{Q_v \cdot \rho_i + (1 - Q_v) \cdot \rho_l}. \quad (3.12)$$

Für die Umrechnung wird angenommen, die Dichten von Eis ρ_i und den verschiedenen konzentrierten Lösungen ρ_l seien temperaturunabhängig. Für die Abhängigkeit des Volumen-Eisanteils Q_v bei konstanter Temperatur vom Gesamtmassenanteil w_E gilt dann:

$$Q_v = \left(1 + \frac{\rho_i}{\rho_l} \left(\frac{w_{eq,s}}{w_{eq,s} - w_E} - 1 \right) \right)^{-1}. \quad (3.13)$$

Um die während der Rekristallisation tatsächlich vorliegende Konzentration zu überprüfen, wird bei jedem Experiment der Volumen-Eisanteil Q_v bestimmt. Mit Gleichung 3.14 wird daraus dann der Massenanteil w_Q berechnet, der theoretisch dem Gesamtmassenanteil w_E entsprechen sollte.

$$w_Q = \left(1 - \frac{Q_v \cdot \rho_i}{Q_v \cdot \rho_i + (1 - Q_v) \cdot \rho_l} \right) \cdot w_{eq,s} \quad (3.14)$$

Da bei der Auswertung Kristalle am Rand nicht gezählt werden, wird der Eisanteil um etwa 5% unterschätzt. Dies führt dazu, dass der Massenanteil w_Q um ca. 1% überschätzt wird.

Zeigt sich bei der Bestimmung des Eisanteils eine starke Änderung mit der Zeit, so bedeutet dies auch eine Änderung der Gesamtkonzentration der Lösung. Um entsprechende Experimente auszuschließen, wird die Standardabweichung des Eisanteils Q_v herangezogen. Experimente, bei denen dieser Wert größer als 0.01 ist, wurden verworfen.

Der Eisanteil wird für jedes Bild als Produkt aus mittlerer Kristallfläche A und Kristallanzahl N geteilt durch die betrachtete Bildfläche ROI berechnet. Bei dieser zweidimensionalen Betrachtung wird angenommen, dass die Kristalle eine zylindrische Form besitzen und vom unteren bis zum oberen Deckglas reichen. Die zeitlichen Änderungen von A , U und N sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Des Weiteren sind hier der Eisanteil Q_v und die Grenzfläche zwischen Eis und Lösung O_v abgebildet. Diese Größen werden anhand von A bzw. U und N berechnet. Für den Eisanteil eines Experiments wird der Mittelwert über den Beobachtungszeitraum genommen (horizontale Linie in Abbildung 3.6c). Die Verwendung der Summe aller Kristallflächen anstelle des Produkts aus mittlerer Fläche und Kristallanzahl führt zu keiner signifikanten Änderung des Eisanteils. Der Anstieg des Eisanteils zu Beginn der Rekristallisation hat zum größten Teil experimentelle Gründe. Bei sehr kleinen Kristallen lässt sich kein Innendurchmesser bestimmen. Dadurch wird die Kristallanzahl unterschätzt und es ergibt sich ein zu kleiner Eisanteil.

Nach dem Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus ist für die thermische Hysterese die Konzentration der AFP auf der Eisoberfläche der wichtigste Faktor. Daher wird auch die Gesamtgrenzfläche zwischen Eis und Lösung pro Gesamtvolumen O_v bestimmt. Wie in Abbildung 3.6d zu sehen ist, wird sie während der Rekristallisation kleiner, was letztlich die Triebkraft des Ostwaldreifungsprozesses darstellt: Die Grenzflächenenergie wird minimiert. O_v wird analog zum Eisanteil berechnet als Produkt von mittlerem Umfang U und

Kristallanzahl N geteilt durch die betrachtete Bildfläche ROI . Es wird hier wieder angenommen, die Kristalle seien zylinderförmig und die Kristallunterseite sowie die Oberseite stünden nicht in Kontakt mit der Lösung sondern nur mit den Deckgläsern.

Zur Berechnung von w_Q aus dem Eisanteil Q_v sind für diese Arbeit Kenntnisse über die Dichten und Gleichgewichtsmassenanteile in Natriumbromid- und Saccharoselösungen wichtig. Die relevanten Parametrisierungen werden im folgenden Kapitel erläutert.

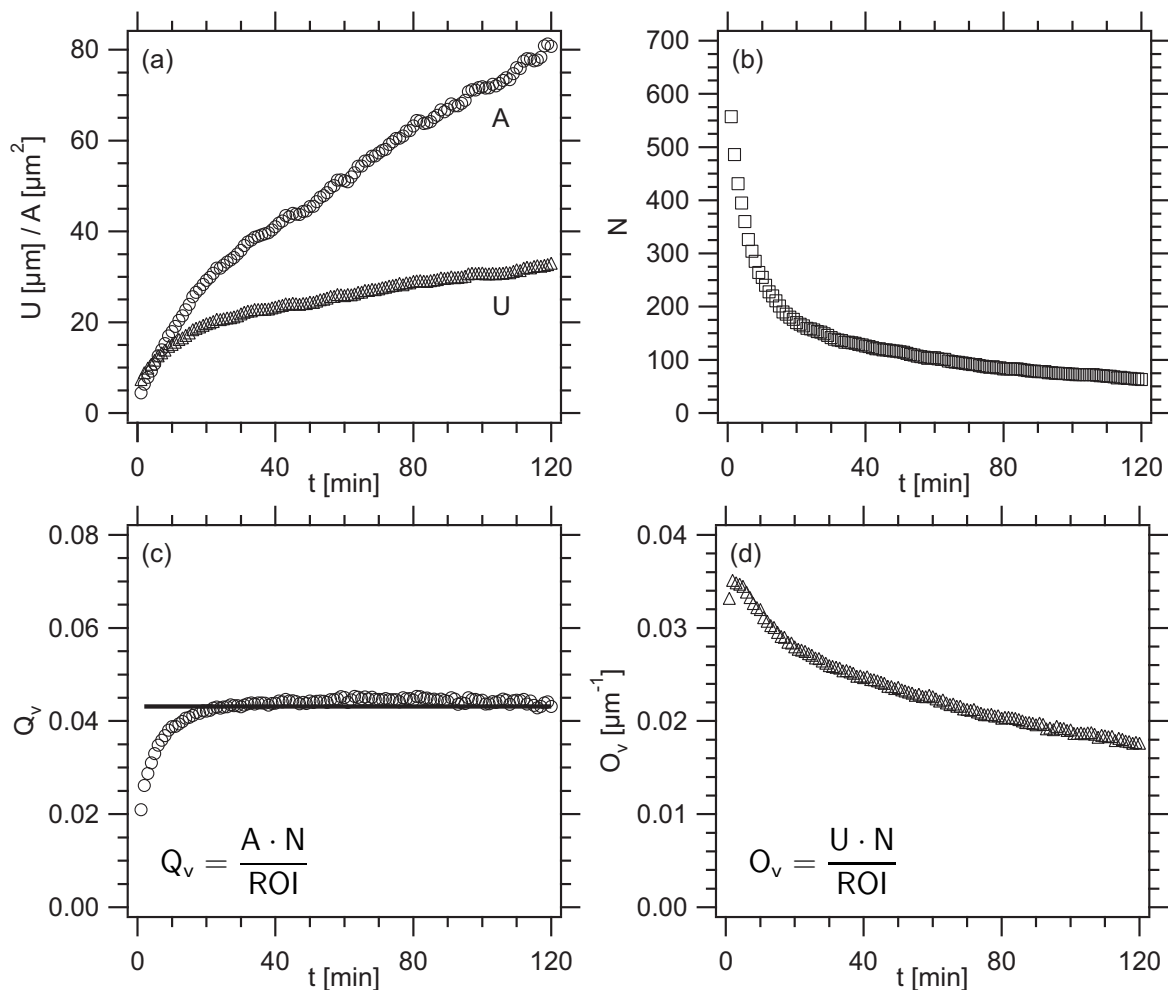


Abbildung 3.6: Bestimmung des Eisanteils und zeitliche Änderung der Eisoberfläche. Es wird die Rekristallisation bei -8°C einer 45 Gew.-% Saccharoselösung verfolgt (siehe auch Abbildung 3.4). (a) Änderung der mittleren Kristallfläche A bzw. des mittleren Umfangs U . (b) Änderung der Kristallanzahl N . (c) Änderung des Eisanteils Q_v . Die horizontale Linie entspricht dem mittleren Eisanteil des Experiments. (d) Zeitliche Änderung der Eisoberfläche O_v .

3.4 Wässrige Lösungen

3.4.1 Parametrisierungen

In der vorliegenden Arbeit wird die Eiskristallisation hauptsächlich in Natriumbromid- und Saccharoselösungen betrachtet. Die Einwaagemassenanteile an Natriumbromid liegen im Bereich von 24 bis 33 Gew.-%. Die Saccharosemassenanteile reichen von 25 bis 54 Gew.-%. Die Rekristallisationstemperaturen erstrecken sich hier von -10 bis -5 °C. Die Experimente mit Natriumbromidlösungen wurden immer bei -25 °C durchgeführt. Zur Beschreibung dieser Konzentrations- und Temperaturbereiche werden die folgenden Parametrisierungen aufgestellt.

Zunächst ist der Massenanteil an Gelöstem bei der jeweiligen Rekristallisationstemperatur zu bestimmen. Der Gleichgewichtsmassenanteil $w_{eq,s}$ in Gew.-% von Natriumbromid bzw. Saccharose wird nach der allgemeinen doppeltextentiellen Gleichung 3.15 erhalten. Der Schmelzpunkt T_m bei dieser Konzentration ist bei der Berechnung in °C anzugeben. Die Anpassung an die Daten ist in Abbildung 3.7a dargestellt (Roth und Scheel, 1923; Washburn, 1928; Tang et al., 2003; Young und Jones, 1949; Weast, 1979). Die Parametrisierung gilt im Bereich von -28 bis 0 °C für Natriumbromid und -30 bis 0 °C für Saccharose.

$$y(x) = y_0 + A_1 \exp(\tau_1 \cdot x) + A_2 \exp(\tau_2 \cdot x) \quad (3.15)$$

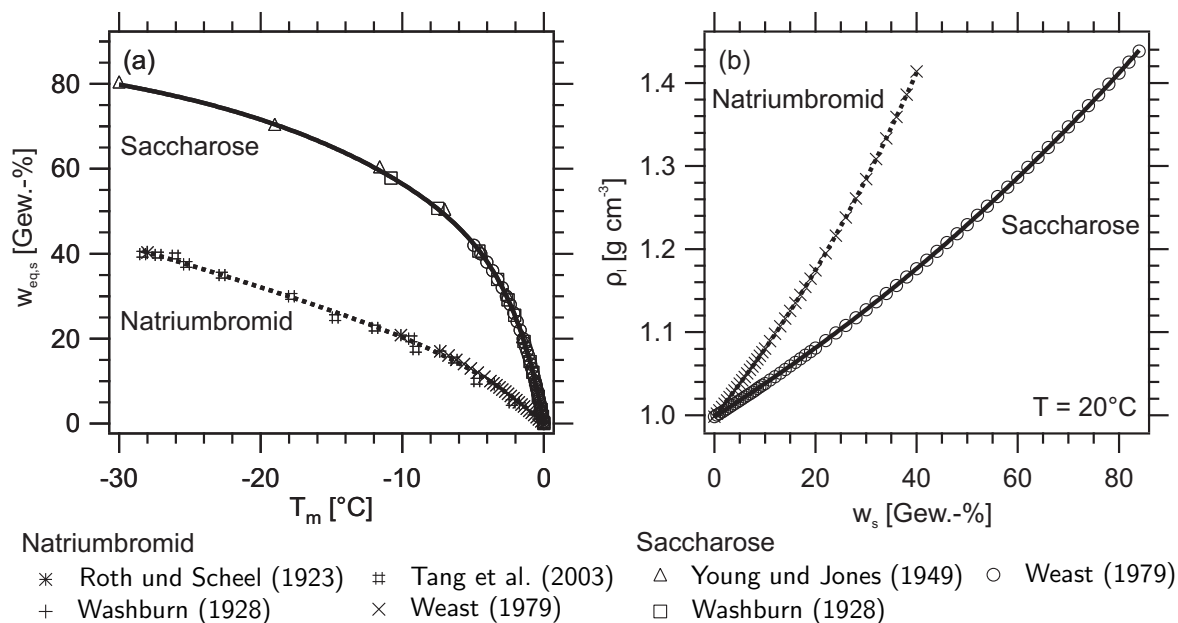


Abbildung 3.7: Schmelzpunkt- (a) und Dichte-Kurven (b) von wässrigen Natriumbromid- und Saccharoselösungen. Die Linien entsprechen den Anpassungen nach Gleichung 3.15.

Die Dichten ρ_l in g cm^{-3} von wässrigen Natriumbromid- und Saccharoselösungen bei 20°C werden ebenfalls anhand der Gleichung 3.15, aber in der monoexponentiellen Form, berechnet. Der Massenanteil w_s wird dabei in Gew.-% angegeben. Die in Abbildung 3.7b dargestellten Anpassungen umfassen Daten mit Massenanteilen w_s von 0 bis 40 Gew.-% Natriumbromid und 0 bis 84 Gew.-% Saccharose. Da keine temperaturabhängigen Daten vorliegen, wird für die weiteren Berechnungen angenommen, die Dichten seien temperaturunabhängig. Dies ist eine sehr gute Annahme, denn beispielsweise der Unterschied zwischen den Dichten von reinem Wasser bei -30 und $+20^\circ\text{C}$ beträgt nur etwa 1 % (Lide, 2001).

$y(x)$	x	Lösung	y_0	A_1	τ_1	A_2	τ_2
$w_{eq,s}$ [Gew.-%]	T_m [$^\circ\text{C}$]	NaBr	97.794	-7.8195	0.24495	-90.136	0.016008
$w_{eq,s}$ [Gew.-%]	T_m [$^\circ\text{C}$]	Sac	90.009	-29.674	0.47463	-60.215	0.059252
ρ_l [g cm^{-3}]	w_s [Gew.-%]	NaBr	0.50406	0.49474	0.015203	-	-
ρ_l [g cm^{-3}]	w_s [Gew.-%]	Sac	0.43651	0.56152	0.0069027	-	-

Tabelle 3.4: Parameter nach Gleichung 3.15 zur Beschreibung des Gleichgewichtsmassenanteils und der Dichte von Natriumbromid- und Saccharoselösungen.

Für die Berechnung der LSW-Ratenkonstante wird zudem der Diffusionskoeffizient von Wasser D_w unter den jeweiligen Bedingungen benötigt. Er ist sowohl temperatur- als auch konzentrationsabhängig. Zur Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeit wird die erweiterte Jones-Dole-Gleichung (3.16) verwendet (Kaminsky, 1957). Bei der erweiterten Form wird ein quadratischer Term an die ursprüngliche Gleichung von Jones und Dole (1929) angefügt, um Konzentrationen größer 0.1 mol L^{-1} besser zu beschreiben.

$$D_w(w_s) = D_0 \left(1 + \mathbb{A} \cdot w_s^{1/2} + \mathbb{B} \cdot w_s + \mathbb{D} \cdot w_s^2 \right) \quad (3.16)$$

D_0 ist der Diffusionskoeffizient von reinem Wasser. Die Jones-Dole-Parameter \mathbb{A} , \mathbb{B} und \mathbb{D} sind substanz- und temperaturspezifische Konstanten. Für die weitere Betrachtung wird angenommen, die Temperaturabhängigkeit dieser Koeffizienten sei im Bereich von -25 bis $+25^\circ\text{C}$ vernachlässigbar (siehe unten).

Mit der empirisch gefundenen VFT-Gleichung (Vogel-Fulcher-Tammann) lässt sich die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten im unterkühlten Temperaturbereich gut beschreiben (Vogel, 1921; Fulcher, 1925; Tammann und Hesse, 1926). In der ursprünglichen Form gibt sie die Temperaturabhängigkeit der Viskosität wieder. Zur Unterscheidung zwischen fragilen Flüssigkeiten, bei denen sich die Viskosität nahe des Glaspunkts stark ändert, und starken Flüssigkeiten, die nur geringe Änderungen zeigen, wird in der Originalgleichung der Koeffizient B gegen $C \cdot T_0$ ersetzt (Angell, 1988, 1995). Der Fragilitätsparameter C liegt für die meisten Substanzen im Bereich von ungefähr 5 bis 100. Kleine Werte sind fragilen und große sind starken Flüssigkeiten zuzuordnen. Damit ergibt sich für die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten:

$$D_w(T) = D_\infty \exp \left(\frac{-C \cdot T_0}{T - T_0} \right). \quad (3.17)$$

D_∞ ist der theoretische Diffusionskoeffizient für $T \rightarrow \infty$. T_0 ist die so genannte Vogel-Temperatur.

Beschreibt die VFT-Gleichung die Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten in reinem Wasser, so entspricht sie D_0 in der Jones-Dole-Gleichung. Es wird so Gleichung 3.18 erhalten.

$$D_w(T, w_s) = D_\infty \exp\left(\frac{-C \cdot T_0}{T - T_0}\right) \left(1 + \mathbb{A} \cdot w_s^{1/2} + \mathbb{B} \cdot w_s + \mathbb{D} \cdot w_s^2\right). \quad (3.18)$$

Die Anpassung dieser Gleichung an die Viskositätsdaten von Abdulagatov und Azizov (2006) gelingt zufriedenstellend, obwohl über große Temperaturbereiche die Parameter \mathbb{A} und insbesondere \mathbb{B} typischerweise als temperaturabhängig angesehen werden. Die Daten von Abdulagatov und Azizov (2006) umfassen Natriumbromidlösungen mit Massenanteilen von 0 bis 23 Gew.-% und Temperaturen von 16 bis 95 °C. Die Abweichung zwischen der Anpassung nach Gleichung 3.18 und den experimentellen Daten beträgt maximal 4 %. Daher wird die Annahme einer Temperaturunabhängigkeit der Jones-Dole-Parameter als vertretbar angesehen.

Für Natriumbromidlösungen sind Wasser-Diffusionskoeffizienten bei 25 °C von 0 bis 52 Gew.-% (Müller und Hertz, 1996; Easteal und Woolf, 1986) sowie bei 23 °C von 0 bis 46 Gew.-% vorhanden (McCall und Douglass, 1965). Zudem gibt es Daten für eine 18-prozentige Lösung bei Temperaturen von 5 bis 45 °C (Easteal und Woolf, 1986). Des Weiteren werden zur Bestimmung der Parameter von Gleichung 3.18 Messungen von Gillen et al. (1972) und Price et al. (1999) zu Diffusionskoeffizienten von reinem Wasser im Temperaturbereich von -35 bis +25 °C verwendet. Durch die in Abbildung 3.8 dargestellte Anpassung von Gleichung 3.18 an alle gerade erwähnten Daten werden die in Tabelle 3.5 aufgeführten Parameter erhalten. Zur Bestimmung der Wasser-Diffusionskoeffizienten in Natriumbromidlösungen im Temperaturbereich von -35 bis +45 °C und gleichzeitig im Konzentrationsbereich von 0 bis 52 Gew.-% kann diese Parametrisierung entsprechend in guter Näherung verwendet werden.

D_∞ [m ² s ⁻¹]	C	T_0 [K]	\mathbb{A} [Gew.-% ^{-1/2}]	\mathbb{B} [Gew.-% ⁻¹]	\mathbb{D} [Gew.-% ⁻²]
$4.7984 \cdot 10^{-8}$	2.3376	168.8	0.02291	-0.0070992	-0.00012752

Tabelle 3.5: Parameter nach Gleichung 3.18 zur Beschreibung der Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Wasser D_w in Natriumbromidlösungen.

Bei der Anpassung wird für den Fragilitätsparameter C ein Wert von etwa 2 erhalten. Dies stimmt mit der Einstufung von Wasser als sehr fragile Flüssigkeit oberhalb von etwa -45 °C überein (Ito et al., 1999; Angell, 2002). Bei dieser Temperatur scheint Wasser einen Wechsel von extrem fragiler zu sehr starker Flüssigkeit zu vollziehen. T_0 wird hier mit 169 K bestimmt, was auf einen Glaspunkt oberhalb dieser Temperatur hindeutet. Im Gegensatz dazu ist der überwiegend akzeptierte Glaspunkt von Wasser aber 136 K, also niedriger als T_0 . Wie in dem Übersichtsartikel von Angell (2002) diskutiert, ist die

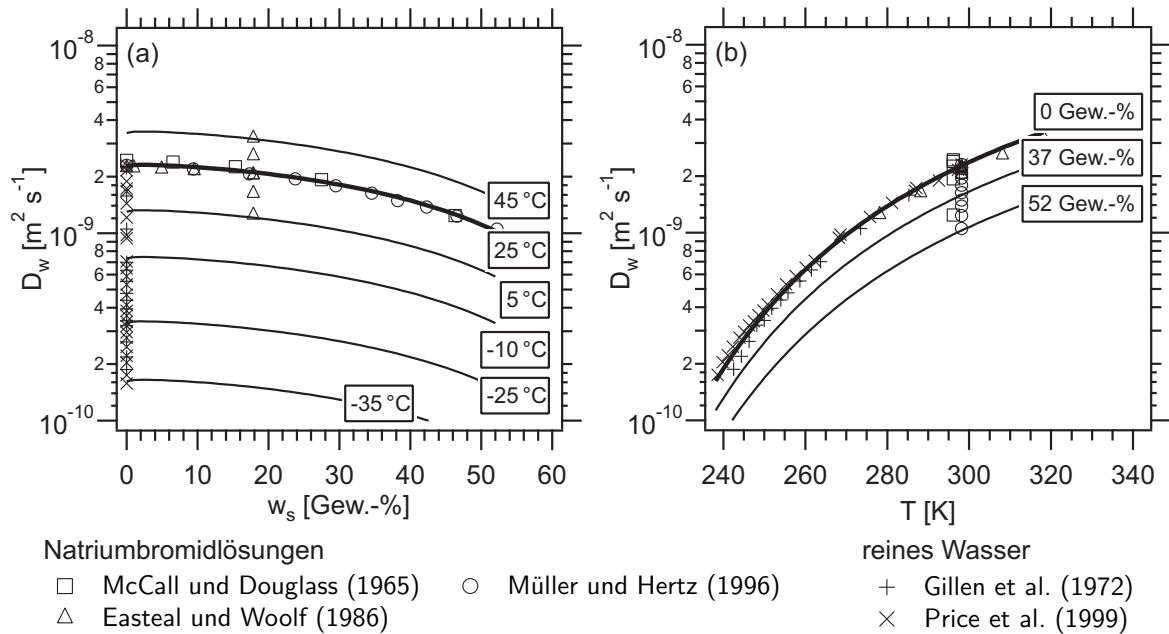


Abbildung 3.8: Bestimmung der Konzentrations- (a) und Temperaturabhängigkeit (b) des Diffusionskoeffizienten von Wasser D_w in Natriumbromidlösungen. Die breiten Linien entsprechen den Anpassungen an die Daten. Die dünneren Linien stellen die Extrapolationen anhand von Gleichung 3.18 dar.

se Festlegung jedoch problematisch. Einiges deutet auf einen Glaspunkt von 165 K hin (Velikov et al., 2001; Cervený et al., 2004; Yue und Angell, 2004).

Zur Bestimmung der Wasser-Diffusionskoeffizienten in Saccharoselösungen stehen mehr experimentelle Daten zur Verfügung. Die Daten von Rampp et al. (2000), Girlich et al. (1994) und Ekdawi-Sever et al. (2003) umfassen zusammen Massenanteile von 0 bis 74 Gew.-% und Temperaturen von -7 bis +85°C. Insbesondere für die Temperaturabhängigkeit der Jones-Dole-Koeffizienten genügen aber auch sie nicht. Zudem müssen wie beim Natriumbromid die für diese Arbeit relevanten Werte extrapoliert werden. Aufgrund dieser Unzulänglichkeiten wird hier eine von He et al. (2006) vorgestellte Parametrisierung verwendet, die auf der Freie-Volumen-Theorie von Vrentas und Duda (1977a,b) basiert. Für Natriumbromidlösungen liegt keine entsprechende Parametrisierung vor. Daher wird dort die bereits beschriebene Gleichung 3.18 verwendet.

$$D_w(T, w_1) = D_\infty \exp \left(\frac{-\Delta E}{RT} + \frac{-(w_1 \hat{V}_1^* + \xi w_2 \hat{V}_2^*)}{w_1 \left(\frac{K_{11}}{f} \right) (K_{21} - T_{g1} + T) + w_2 \left(\frac{K_{12}}{f} \right) (K_{22} - T_{g2} + T)} \right) \quad (3.19)$$

Gleichung 3.19 gibt die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von Wasser D_w von der Temperatur T und vom Massenanteil von Wasser w_1 an. w_2 ist der Massenanteil der gelösten Substanz ($w_2 = 1 - w_1$). He et al. bestimmten die im folgenden aufgeführten Parameter für Glycerin, Fruktose, Saccharose und Trehalose. Da in der vorliegenden Arbeit

nur die Werte für Saccharose relevant sind, sind diese im Folgenden jeweils angegeben. D_∞ wird hier als präexponentieller Faktor bezeichnet. Er entspricht wie zuvor dem Diffusionskoeffizienten für $T \rightarrow \infty$. Es ist allerdings anzumerken, dass D_∞ in der Herleitung von He et al. (2006) mit $1.39 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ leicht von dem zuvor verwendeten Wert abweicht. ΔE ist die Aktivierungsenergie, die ein Wassermolekül zur Überwindung der attraktiven Wechselwirkungen mit seinen Nachbarn aufbringen muss ($\Delta E = 1.98 \cdot 10^3 \text{ J mol}^{-1}$). Beide Parameter wurden von He et al. durch die Anpassung an Diffusionsdaten von reinem Wasser erhalten. Es wird angenommen, sie seien nicht konzentrationsabhängig. Die Datenquellen zu dieser Anpassung sowie zu denen der folgenden Parameter sind dem Artikel von He et al. (2006) zu entnehmen. ξ ist das Verhältnis der kritischen molaren Volumina der Sprungeinheiten des Lösemittels und des Gelösten ($\xi = 0.79$). Der Begriff Sprungeinheit meint den Teil eines Moleküls, der sich bei der Diffusion bewegt. Diese Unterscheidung ist besonders wichtig bei Polymeren. Die kritischen Volumina sind die Räume, die frei sein müssen, damit ein Molekül bzw. die Sprungeinheit bei der Diffusion hineinspringen kann. ξ wird als letzter Parameter durch Anpassung von Gleichung 3.19 an Diffusionsdaten der Lösungen bestimmt. Die spezifischen kritischen Volumina \hat{V}_1^* und \hat{V}_2^* werden mit der Gruppenbeitragsmethode abgeschätzt ($\hat{V}_1^* = 0.91 \text{ mL g}^{-1}$, $\hat{V}_2^* = 0.59 \text{ mL g}^{-1}$). Die Freie-Volumen-Parameter von reinem Wasser K_{21} und K_{11}/f werden durch Anpassung an Viskositätsdaten bei verschiedenen Temperaturen erhalten ($K_{21} = -19.73 \text{ K}$, $K_{11}/f = 1.945 \cdot 10^{-3} \text{ mL g}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Der Überlapp-Faktor f wird eingeführt um zu berücksichtigen, dass das freie Volumen für mehr als ein Molekül zugänglich ist. Die Freie-Volumen-Parameter des Gelösten K_{22} und K_{12}/f werden durch Anpassung der WLF-Gleichung (Williams-Landel-Ferry) an Viskositätsdaten der jeweiligen Lösungen bei unterschiedlichen Konzentrationen und Temperaturen bestimmt ($K_{22} = 69.21 \text{ K}$, $K_{12}/f = 3.36 \cdot 10^{-4} \text{ mL g}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Die Glaspunkte T_{g1} und T_{g2} sind mit 136 K für Wasser und 347.15 K für Saccharose angegeben.

3.4.2 Berechnung der LSW-Ratenkonstante

In dieser Arbeit wird die Rekristallisation von polykristallinem Eis in wässrigen Natriumbromid- und Saccharoselösungen betrachtet. Daher kann für einen Eisanteil Q_v nahe Null nach der LSW-Theorie geschrieben werden:

$$\lim_{Q_v \rightarrow 0} (k_d) \equiv k_{LSW} = \frac{8\gamma_{i/l}\Omega_i^2 c_{eq,w} D_w}{9RT}. \quad (3.20)$$

Die diffusionsbestimmte Geschwindigkeitskonstante k_d entspricht dann der LSW-Ratenkonstanten k_{LSW} , wobei $\gamma_{i/l}$ für die Grenzflächenenergie zwischen Eis und Lösung steht. Ω_i ist das molare Volumen von Eis. $c_{eq,w}$ und D_w entsprechen der Gleichgewichtskonzentration bzw. dem Diffusionskoeffizienten von Wasser in der Lösung. Mit den obigen Parametrisierungen und den im Folgenden angegebenen Werten kann nun die LSW-Ratenkonstante berechnet werden.

Da keine Daten für $\gamma_{i/l}$ in wässrigen Natriumbromid- oder Saccharoselösungen vorliegen, wird ein Wert von 0.033 J m^{-2} verwendet. Dies ist die Grenzflächenenergie zwischen Eis

und reinem Wasser bei 0°C (Ketcham und Hobbs, 1969). Untersuchungen der Eisnukleation und Parametrisierungen von Zobrist et al. (2007) deuten darauf hin, dass $\gamma_{i/l}$ im Bereich von 0 bis -10°C um weniger als 4% abnimmt. Bei -25°C sind es mit $\gamma_{i/l} = 0.028 \text{ J m}^{-2}$ allerdings schon 15%. Durch die Zugabe von Natriumbromid oder Saccharose tritt eine Erhöhung der Oberflächenspannung $\gamma_{v/l}$ zwischen Luft und Lösungen im Vergleich zu reinem Wasser auf. Bei einer 23-prozentigen Natriumbromidlösung erhöht sich $\gamma_{v/l}$ bei 20°C um etwa 5% (Weast, 1979). Die gleiche Erhöhung ist bei einer 55-prozentigen Saccharoselösung zu beobachten. Möglicherweise wird durch Zugabe von Natriumbromid oder Saccharose der Temperatureffekt aufgehoben, vielleicht wird er aber auch verstärkt.

Mit 0.9167 g cm^{-3} für die Dichte von Eis ergibt sich für das molare Volumen Ω_i ein Wert von $1.9652 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3 \text{ mol}^{-1}$ bei 0°C (Lide, 2001). Die Temperaturabhängigkeit der Dichte ist bis zu sehr tiefen Temperaturen vernachlässigbar ($\rho_i(-30^\circ\text{C}) = 0.9216 \text{ g cm}^{-3}$). Die Abweichung beträgt bei -30°C nur 0.5%.

Die Gleichgewichtskonzentration von Wasser in der Lösung $c_{eq,w}$ wird durch das Phasendiagramm bestimmt. Bei vorgegebener Rekristallisationstemperatur erfolgt die Berechnung von $c_{eq,w}$ nach Gleichung 3.21.

$$c_{eq,w} = \frac{\rho_l}{M_w} \left(1 - \frac{w_{eq,s}}{100} \right) \quad (3.21)$$

Die Dichte der jeweiligen Lösung ρ_l und der Gleichgewichtsmassenanteil von Gelöstem in der Lösung $w_{eq,s}$ in Gew.-% werden anhand der Parametrisierungen in Unterabschnitt 3.4.1 erhalten. Das Gleiche gilt für den Diffusionskoeffizienten D_w unter den jeweiligen Bedingungen. Damit können alle zur Berechnung von k_{LSW} erforderlichen Größen beschrieben werden. Für die hier relevanten Bedingungen werden die in Tabelle 3.6 aufgeführten Werte erhalten.

Lösung	T [°C]	T [K]	$w_{eq,s}$ [Gew.-%]	ρ_l [kg m ⁻³]	$c_{eq,w}$ [mol m ⁻³]	D_w [m ² s ⁻¹]	k_{LSW} [µm ³ min ⁻¹]
NaBr	-25	248.15	37.369	1377.2	47881	$2.3165 \cdot 10^{-10}$	3.65
Sac	-6	267.15	46.089	1208.4	36160	$1.2463 \cdot 10^{-10}$	1.38
Sac	-8	265.15	51.860	1239.7	33128	$6.4160 \cdot 10^{-11}$	0.66
Sac	-10	263.15	56.457	1265.6	30590	$3.1776 \cdot 10^{-11}$	0.30

Tabelle 3.6: Größen zur Berechnung der LSW-Ratenkonstante k_{LSW} nach Gleichung 3.20.

Es zeigt sich, dass k_{LSW} bei gleicher Lösung mit steigender Temperatur zunimmt, obwohl die Temperatur T in Gleichung 3.20 im Nenner steht. Dies beruht auf der Temperaturabhängigkeit von $c_{eq,w}$ und D_w . Beide Größen werden mit steigender Temperatur größer. Die Rechnungen liefern einen oberen Grenzwert bei 0°C von $k_{LSW} \approx 18 \text{ µm}^3 \text{ min}^{-1}$. Bei dieser Temperatur steht Eis im Gleichgewicht mit reinem Wasser. Der Grenzwert ergibt sich somit durch den Wasser-Diffusionskoeffizienten in reinem Wasser bei 0°C.

Für Saccharoselösungen wird bei Temperaturen unterhalb von -17°C eine Ratenkonstante von $k_{LSW} < 0.01 \text{ µm}^3 \text{ min}^{-1}$ erhalten. Bei Natriumbromidlösungen liegt der entsprechende

Wert theoretisch bei $-63\text{ }^\circ\text{C}$. Die Rekristallisation in Natriumbromidlösungen ist also deutlich schneller als in Saccharoselösungen. Dies hängt maßgeblich mit dem Phasendiagramm zusammen. Aufgrund der Dissoziation von Natriumbromid und der Differenz zwischen den Molmassen von Natriumbromid und Saccharose muss ein größerer Massenanteil an Saccharose vorliegen, um die gleiche Schmelzpunktniedrigung wie in Natriumbromidlösungen zu erreichen. Der Wasseranteil wird entsprechend reduziert. Die Dichten zweier Lösungen mit selbem Schmelzpunkt sind jedoch nahezu identisch. Dies bedeutet bei gleichem Schmelzpunkt beinhaltet die Natriumbromidlösung mehr Wasser pro Lösungsvolumen. $c_{eq,w}$ ist also größer.

D_w ist in Natriumbromidlösungen bei gleicher Temperatur ebenfalls größer. Dies ist auch auf die höhere Wasserkonzentration $c_{eq,w}$ zurückzuführen. Aber auch bei gleichem $c_{eq,w}$ ist der Diffusionskoeffizient von Wasser in Natriumbromidlösungen größer. Dies hängt mit der höheren Viskosität von Saccharoselösungen zusammen.

Für die in Tabelle 3.6 aufgeführten Bedingungen ergibt sich dadurch die deutlich höchste LSW-Ratenkonstante in Natriumbromidlösungen bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$, obwohl diese die mit Abstand niedrigste betrachtete Rekristallisationstemperatur darstellt. Die gleiche Ratenkonstante wird in Saccharoselösungen erst bei $-3.4\text{ }^\circ\text{C}$ erreicht. In Saccharoselösungen beträgt k_{LSW} bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ nur $0.25\text{ }\mu\text{m}^3$ pro Woche. Die Rekristallisation ist also praktisch gestoppt.

3.4.3 Natriumbromid- und Saccharoselösungen

Zum Vergleich mit den theoretischen Rechnungen und zur Beschreibung der Eisanteilabhängigkeit der Rekristallisationsratenkonstante wurden die im folgenden Teil beschriebenen Experimente durchgeführt. Ein Teil dieser Untersuchungen ist in der Arbeit von Koch (2007) bereits beschrieben. Die Daten wurden allerdings im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit optimierten Auswahlkriterien neu ausgewertet und durch weitere Experimente ergänzt. Zudem werden sie im folgenden Teil unter anderen Gesichtspunkten beurteilt.

In den Experimenten wurde das folgende Temperaturprofil verwendet. Jede Probe wurde mit einer Rate von $20\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ bis auf $-50\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt, um polykristallines Eis zu erhalten. Anschließend wurde mit $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ bis auf die Rekristallisationstemperatur aufgewärmt, die dann für 2 Stunden konstant gehalten wurde. Im Fall der Saccharoselösungen mit Einwaagemassenanteilen von 25 bis 54 Gew.-% lag diese Temperatur im Bereich von -10 bis $-5\text{ }^\circ\text{C}$. Bei konstanter Temperatur wurde jede Minute ein Bild aufgenommen. Eine ähnliche Prozedur wurde bei Natriumbromidlösungen angewandt. Die Massenanteile liegen hier im Bereich von 24 bis 33 Gew.-%. Aufgrund der deutlich tieferen Schmelzpunkte im Vergleich zu Saccharoselösungen wurde hier die Rekristallisation bei $-25\text{ }^\circ\text{C}$ verfolgt. Damit ergeben sich Experimente mit Eisanteilen Q_v von 0.01 bis 0.30. Alle diese Experimente erfüllen dabei die in Abschnitt 3.3 aufgeführten Auswahlkriterien. Limitierender Faktor für die Rekristallisationsgeschwindigkeit ist entsprechend immer die Diffusion der Wassermoleküle in der Lösung. Die diffusionsbestimmten Rekristallisationsratenkonstanten (k_d) all dieser Experimente wurden auf die in Abschnitt 3.3 beschriebene Weise bestimmt. Analog zur Abbildung 3.4 ergeben sich dabei die Werte für k_d aus der Auftragung des kubischen mittleren Radius r^3 gegen die Zeit t . Die erhaltenen Werte für k_d

sind in Abbildung 3.9 in Abhängigkeit vom Eisanteil (Q_v) aufgetragen. Die Bestimmung des jeweils zeitlich gemittelten Wertes für Q_v erfolgte analog zur Abbildung 3.6. Die hier aufgeführten Daten von Saccharoselösungen wurden bereits im Artikel von Budke et al. (2009) zur Beschreibung der Abhängigkeit $k_d(Q_v)$ verwendet. In der vorliegenden Arbeit werden zudem Daten und Anpassungen zu Natriumbromidlösungen vorgestellt.

Die kleinste Ratenkonstante wird mit einem Werte von $0.26 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei einem Eisanteil von 0.02 und einer Temperatur von -10°C erhalten (Saccharoselösung). Bei Untersuchung einer Natriumbromidlösung mit einem Eisanteil $Q_v = 0.25$ bei -25°C wird die höchste Ratenkonstante bestimmt ($k_d = 13.32 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$). Es zeigt sich, wie bei den Berechnungen von k_{LSW} , dass k_d für die Saccharoselösungen auch bei Eisanteilen größer Null mit steigender Temperatur zunimmt. Die höchsten Werte werden, wie bei den Berechnungen, für Natriumbromidlösungen bei -25°C erhalten.

Die Abhängigkeit vom Eisanteil kann prinzipiell mit der im Abschnitt 3.1 erläuterten VG-Gleichung (3.10) beschrieben werden. Wie erwähnt, muss im Gegensatz zur Originalgleichung von Voorhees und Glicksman (1984) der Parameter p eingeführt werden. Zudem hat sich gezeigt, dass das Molekularfeldpotential α im hier betrachteten Bereich

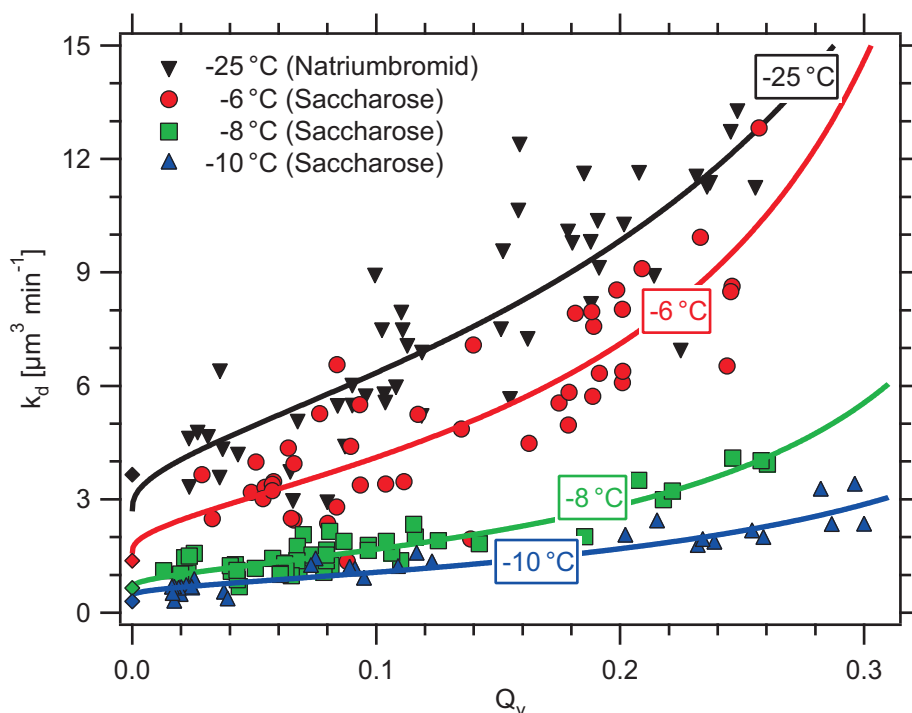


Abbildung 3.9: Abhängigkeit der diffusionsbestimmten Geschwindigkeitskonstante k_d vom Eisanteil Q_v in Natriumbromid- und Saccharoselösungen bei verschiedenen Temperaturen. Experimentelle Daten werden durch Symbole dargestellt. Die Linien beschreiben die Anpassungen an die Daten mittels Gleichung 3.22. Die Rauten bei $Q_v = 0$ stellen die in Tabelle 3.6 aufgeführten berechneten Werte für k_{LSW} dar.

($Q_v \lesssim 0.30$) nur geringfügig von 1 abweicht. Bei $Q_v = 0.30$ ergibt sich für α ein Wert von 0.96. Es zeigt sich, dass dadurch nur schwach die übrigen Parameter k_{d0} und p beeinflusst werden. Wird bei der Anpassung an die Daten für α die Gleichung $\alpha = 1 - 0.15 \cdot Q_v$ anstelle von $\alpha = 1$ verwendet, so ergeben sich für k_{d0} um etwa 1 % höhere Werte. p wird um 2 % erhöht. Aufgrund dieser geringen Abweichungen wird zur Vereinfachung α gleich Eins gesetzt.

$$k_d(Q_v) = k_{d0} \cdot \frac{1}{1 - p \cdot Q_v^{1/3}} \quad (3.22)$$

Die Anpassung von Gleichung 3.22 an die experimentell bestimmten Daten liefert die in Tabelle 3.7 angegebenen Werte. Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den berechneten Werten für k_{LSW} und den experimentell erhaltenen Werten k_{d0} für die Extrapolation von k_d für $Q_v \rightarrow 0$.

Lösung	T [°C]	k_{LSW} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	k_{d0} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	p
Natriumbromid	-25	3.76 ± 0.75	2.68 ± 0.65	1.24 ± 0.12
Saccharose	-6	1.38 ± 0.28	1.57 ± 0.46	1.33 ± 0.11
Saccharose	-8	0.66 ± 0.13	0.65 ± 0.09	1.32 ± 0.06
Saccharose	-10	0.30 ± 0.06	0.44 ± 0.13	1.26 ± 0.09

Tabelle 3.7: Parameter nach Gleichung 3.22 für die Anpassungen der in Abbildung 3.9 gezeigten Daten zur Abhängigkeit der diffusionsbestimmten Ratenkonstante vom Eisanteil. Ebenfalls aufgeführt sind die dazugehörigen Werte für k_{LSW} berechnet nach Gleichung 3.20. Die Fehler für k_{d0} entsprechen $\pm 3\sigma$ und die für k_{LSW} geben eine Unsicherheit von 20 % wieder.

Für den Faktor p werden bei allen untersuchten Messreihen Werte von etwa 1.3 erhalten. Diese Abweichung von 1 führt dazu, dass k_d schon bei Eisanteilen von 0.5 gegen unendlich geht. Nach der Originalgleichung sollte dies erst nahe 1 passieren. Ein erster oberflächlicher Vergleich des hier beobachteten Verhaltens mit weiteren Theorien zeigt kaum zufriedenstellende Übereinstimmungen (Jayanth und Nash, 1989). Die Zunahme von k_d mit Q_v wird in fast allen Fällen unterschätzt. Die beste Übereinstimmung findet sich mit dem Modell von Asimow (1963). Diese Theorie basiert allerdings auf unrealistischen Lösungen für das Diffusionsfeld (Baldan, 2002). Da die theoretische Modellierung der Ostwaldreifung für die Zielsetzung dieser Arbeit nicht essentiell ist, wird darauf verzichtet, die verschiedenen Modelle detailliert zu vergleichen. Allein zur quantitativen Beschreibung der Abhängigkeit $k_d(Q_v)$ im Bereich $Q_v \lesssim 0.30$ genügt Gleichung 3.22.

Im Abschnitt 3.3 wurde der Zusammenhang zwischen dem Eisanteil und dem Phasendiagramm erläutert. Bei gegebener Temperatur wird damit eine theoretische Abhängigkeit des Eisanteils Q_v vom Einwaagemassenanteil w_E erhalten. In Abbildung 3.10a ist diese Abhängigkeit graphisch dargestellt. Die Linien entsprechen dabei den theoretisch zu erwartenden Verläufen für die verschiedenen untersuchten Lösungen und Temperaturen. Die Punkte stellen die experimentell erhaltenen Werte dar. Bei hohem Einwaagemassenanteil

nahe dem Gleichgewichtsmassenanteil, also Eisanteilen nahe Null, stimmen Experiment und Theorie gut überein. Die Abweichungen sind bei niedrigeren Konzentrationen insbesondere im Fall der Saccharoselösungen bei -6 und -8 °C hingegen relativ groß.

Wird aus den gemessenen Eisanteilen auf den Ausgangsmassenanteil w_Q zurückgeschlossen, wird Abbildung 3.10b erhalten. Hier wird deutlich, was die Abweichung zwischen Theorie und Experiment in Bezug auf die Konzentrationen bedeutet. Bei jedem Experiment, unabhängig von Lösung oder Temperatur, ist der Ausgangsmassenanteil, der sich aus dem Eisanteil berechnet, größer als der Einwaagemassenanteil. Die Größe der Differenz $\Delta w = w_Q - w_E$ unterscheidet sich jedoch stark zwischen den Natriumbromid- und den Saccharoselösungen. Bei den Natriumbromidlösungen liegt sie im Bereich von 1.8 bis 7.6 Gew.-% mit größeren Abweichungen bei kleineren Konzentrationen. Im gleichen Konzentrationsbereich (25 - 35 Gew.-%) betragen die Abweichungen bei den Saccharoselösungen zwischen 4.1 Gew.-% bei -6 °C und 22.6 Gew.-% bei -10 °C. Innerhalb der Saccharoselösungen zeigen sich tendenziell größere Abweichungen bei niedrigeren Temperaturen. Mit zunehmender Konzentration wird auch hier Δw kleiner.

Ein geringer Teil der Abweichungen kommt wahrscheinlich durch die Herstellung der dünnen Lösungsfilme zustande. Nach Platzierung der 2 μL Lösung auf dem ersten Deckglas vergehen einige Sekunden bis das zweite Deckglas darüber gelegt wird. In dieser Zeit verdunstet ein Teil des Wassers. Verfolgung des Gewichtsverlustes mit einer Mikrowaage (Sartorius CP2P) belegt eine Gewichtsabnahme von etwa $2 \mu\text{g s}^{-1}$. Die Konzentrationserhöhung liegt zu diesem Zeitpunkt bei ca. 0.2 %. Ein weiterer Gewichtsverlust tritt danach

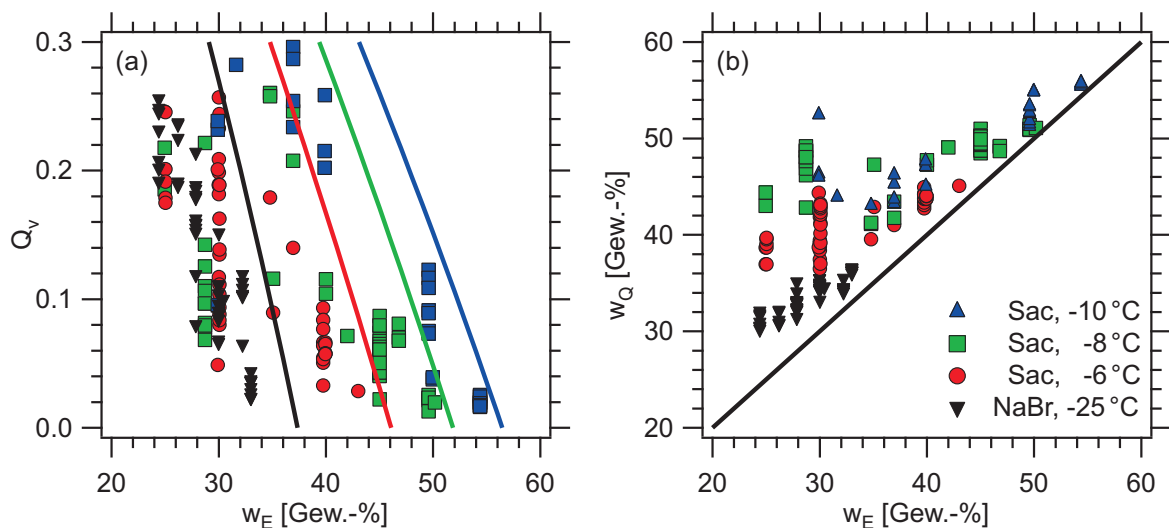


Abbildung 3.10: Abweichung zwischen Einwaage- und Ausgangsmassenanteil. (a) Abhängigkeit des Eisanteils Q_v vom Einwaagemassenanteil w_E . Die Linien entsprechen der theoretischen Abhängigkeit nach Gleichung 3.13. (b) Abweichung des Ausgangsmassenanteils w_Q , der über den Eisanteil berechnet wird, von dem Einwaagemassenanteil an Natriumbromid bzw. Saccharose.

auf. An den Rändern des Sandwich kann weiterhin Wasser verdampfen. Die Messung der Probenmasse nach der Rekristallisation deutet auf eine Konzentrationserhöhung von ungefähr 2% innerhalb der Rekristallisationszeit von 2 Stunden. Der Bereich, der während der Rekristallisation beobachtet wird, ist davon aber praktisch nicht betroffen, was sich in den zeitlich konstanten Eisanteilen darstellt. Vermutlich tritt der größte Teil des Wasserverlustes ohnehin vor und nach der Rekristallisation auf, da der Dampfdruck temperaturabhängig ist. Er sinkt mit tieferer Temperatur (Lide, 2001). Der beobachtete Trend einer größeren Abweichung zwischen w_Q und w_E bei niedrigeren Temperaturen steht zu dieser Überlegung im Gegensatz. Die kleinere Abweichung bei größeren Konzentrationen sowie der Unterschied zwischen Natriumbromid- und Saccharoselösungen passt hingegen sehr gut. Mit zunehmender Konzentration und beim Wechsel von Saccharose zu Natriumbromid sinkt der Dampfdruck entsprechender Lösungen (Pearce et al., 1928; Cooke et al., 2002).

Die Rekristallisationsratenkonstante k_d hängt, wie in Abbildung 3.9 gezeigt, vom Eisanteil und von der Temperatur ab. Eisanteil und Temperatur wiederum stehen in Beziehung zum Einwaage- bzw. Ausgangsmassenanteil. In Abbildung 3.11 sind die Auftragungen von k_d gegen diese Konzentrationen dargestellt.

Bei der Auftragung von k_d gegen den Einwaagemassenanteil w_E wird eine breite Streuung der Ratenkonstanten beobachtet. Sowohl eine Temperaturabhängigkeit als auch ein Unterschied zwischen Natriumbromid- und Saccharoselösungen ist nicht zu erkennen. Die Streuung und die mittlere Ratenkonstante nehmen jedoch mit höherer Konzentration ab. Bei 30 Gew.-% treten Werte im Bereich von 1 bis 13 $\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ auf. Bei 50 Gew.-% hingegen liegen die Werte zwischen 0 und 2 $\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Wird gegen den Ausgangsmas-

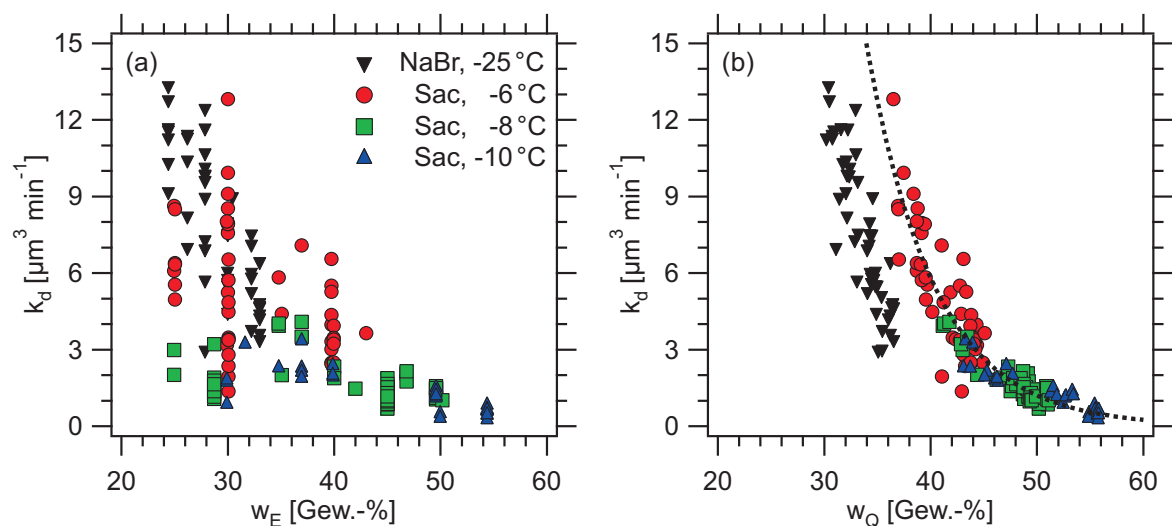


Abbildung 3.11: Abhängigkeit der diffusionsbestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_d vom Einwaagemassenanteil w_E (a) und dem Ausgangsmassenanteil w_Q (b), der über den Eisanteil berechnet wird. Die gepunktete Linie stellt eine exponentielle Anpassung an die Saccharosedaten dar.

senanteil w_Q aufgetragen, ergibt sich ein völlig anderes Bild. Zum einen lassen sich jetzt Natriumbromid- und Saccharoselösungen wieder eindeutig unterscheiden, zum anderen fallen die Saccharosedenaten zusammen und ergeben eine gemeinsame Kurve, an die sich eine monoexponentielle Funktion anpassen lässt (Gleichung 3.23). Hierbei ergibt sich $k_d(Q_v)$ in $\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei Verwendung von w_Q in Gew.-%.

$$k_d(w_Q) = 3109.7 \cdot \exp(-0.15704 \cdot w_Q) \quad (3.23)$$

Temperaturunterschiede sind hier nicht mehr zu beobachten. k_d hängt allein vom Ausgangsmassenanteil ab. Diese Beobachtung beruht darauf, dass bei einem konstanten Einwaage- bzw. Ausgangsmassenanteil eine Temperaturabsenkung zu einer Erhöhung des Eisanteils führt. Durch die Temperaturerniedrigung wird k_d kleiner, gleichzeitig führt der Anstieg des Eisanteils aber zu einer Rekristallisationsbeschleunigung. Der prinzipiell gleiche Kurvenverlauf ist bei Natriumbromidlösungen zu erahnen. Für eine eindeutige Klärung müssten jedoch weitere Daten bei höheren Konzentrationen bzw. niedrigeren Temperaturen vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich nur sagen, dass die Natriumbromidlösungen im Vergleich zu Saccharose die gleichen Ratenkonstanten bei kleineren Massenanteilen aufweisen.

Die diffusionskontrollierte Rekristallisation in reinen Natriumbromid- bzw. Saccharoselösungen wird maßgeblich durch die Temperatur und den Eisanteil bestimmt. Hauptziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von AFP zu quantifizieren. Nach dem Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus ist bei der AFP-kontrollierten Rekristallisation die Konzentration von AFP auf der Eisoberfläche maßgebend. In diesem Fall ist dann nicht mehr die Diffusion durch die Lösung, sondern der Einbau von Wassermolekülen in den Eiskristall geschwindigkeitsbestimmend. Daher ist neben dem Eisanteil Q_v auch die Eisoberfläche O_v zu beachten. Sie berechnet sich analog zum Eisanteil aus dem Produkt von mittlerem Kristallumfang U und Kristallanzahl N geteilt durch die betrachtete Bildfläche ROI . In Abbildung 3.12 sind A und N zu verschiedenen Rekristallisationszeiten (nach 5, 10 und 120 Minuten) als Funktion des mittleren Eisanteils aufgetragen. Q_v reicht bei den hier betrachteten Experimenten von 0.01 bis 0.26. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur Experimente mit Saccharoselösungen bei -8°C dargestellt.

Der zeitliche Verlauf aller hier betrachteten Größen wurde bereits in Abbildung 3.6 für eine Saccharoselösung (45 Gew.-%) bei -8°C dargestellt. Die gleichen Trends sind natürlich auch hier wieder zu finden. A und U steigen mit der Zeit, wobei A schneller ansteigt als U . Dagegen nimmt N mit der Zeit ab, was dazu führt, dass Q_v praktisch konstant bleibt während O_v auch abnimmt. Die Verkleinerung der Grenzfläche zwischen Eis und Lösung stellt die Triebkraft der Ostwaldreifung dar.

Die Veränderung von A und U mit dem Eisanteil zu verschiedenen Zeiten lässt sich gut linear beschreiben. Die Anpassungs-Parameter sind in Tabelle 6.2 im Anhang aufgeführt. In Abbildung 3.12a ist $A(Q_v)$ aufgetragen. Die Abhängigkeit $U(Q_v)$ zeigt einen ähnlichen Verlauf. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede werden im Folgenden kurz erläutert. Die Extrapolation von A oder U für $Q_v \rightarrow 0$ führt nicht zu unendlich kleinen Kristallen, denn auch bei sehr kleinen Eisanteilen wächst die mittlere Kristallgröße während der Rekristallisation an. Nach 5 Minuten liegt A im Bereich von 10 bis $33 \mu\text{m}^2$. Für $Q_v \rightarrow 0$

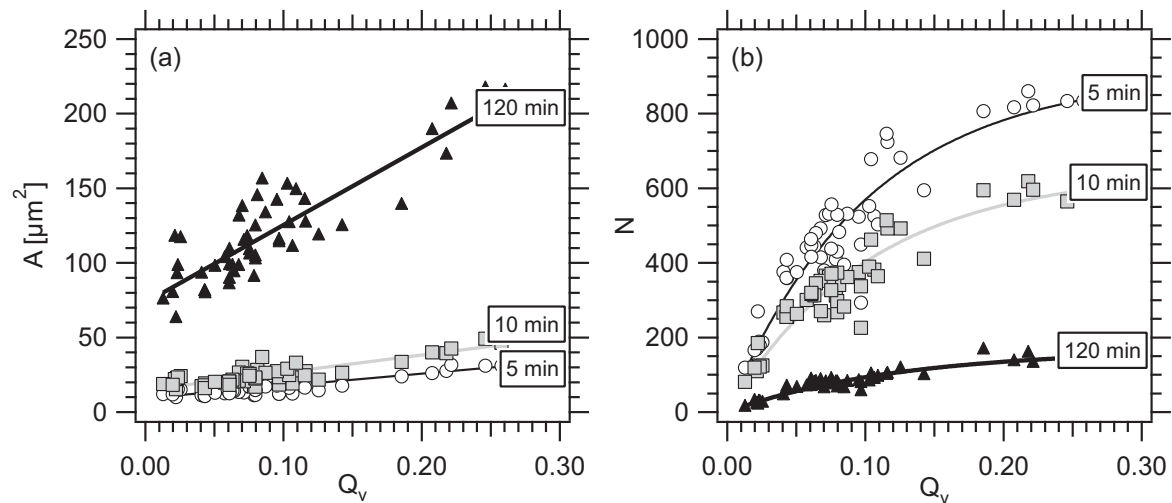


Abbildung 3.12: Zusammenhang zwischen der mittleren Kristallfläche A (a) bzw. der Kristallanzahl N (b) zu verschiedenen Rekristallisationszeiten (nach 5, 10 und 120 Minuten) und dem Eisanteil Q_v . Die Linien dienen der besseren Veranschaulichung.

ergibt sich $A(0) = 9.4 \mu\text{m}^2$. Bei einer Rekristallisationszeit von 120 Minuten liegen die Werte zwischen 63 und $217 \mu\text{m}^2$. $A(0)$ beträgt dann $73 \mu\text{m}^2$.

Die Aufweitung der mittleren Kristallflächen mit der Zeit beruht auf den unterschiedlichen Rekristallisationsgeschwindigkeiten bei den jeweiligen Eisanteilen. Mit steigendem Q_v nimmt k_d zu, also wächst A bei größeren Eisanteilen schneller. Entsprechendes ist bei Betrachtung des mittleren Umfangs U zu beobachten. Die Veränderung von $U(0)$ fällt hier allerdings geringer aus, da der mittlere Umfang sich langsamer mit der Zeit ändert. Dies ist auch in den Steigungen der Anpassungsgeraden zu sehen. Die Steigung wächst von $35 \mu\text{m}$ bei 5 Minuten auf $81 \mu\text{m}$ bei 120 Minuten. Bei der mittleren Kristallfläche sind die Werte $82 \mu\text{m}^2$ und $520 \mu\text{m}^2$.

Wie in Abbildung 3.12b zu sehen ist, zeigt die Kristallanzahl N eine völlig andere Abhängigkeit vom Eisanteil. An die Daten lässt sich besser eine monoexponentielle als eine lineare Funktion anpassen. Wird der Parameter für $Q_v = 0$ variabel gelassen, werden hierfür Werte nahe Null erhalten. Dies gilt auch für die unterschiedlichen Zeiten. Daher wird zur Anpassung eine Funktion verwendet, die durch den Ursprung geht. Die Kristallanzahl nimmt mit der Zeit ab. Die Änderung der Kristallanzahl mit dem Eisanteil ist bei 5 Minuten Rekristallisationszeit am größten. Sie wächst bis $Q_v = 0.1$ von Null auf etwa 600 an. Danach nimmt die Steigung ab und bei einem Eisanteil von 0.25 sind es nach 5 Minuten ca. 800 Kristalle. Wie in Abbildung 3.6 bereits zu sehen war, verläuft auch die zeitliche Änderung bei der Kristallanzahl anders als bei mittlerer Fläche oder Umfang. Dies führt hier zu einer größeren Differenz zwischen 5 und 10 Minuten.

In Abbildung 3.13a ist der Eisanteil zu den unterschiedlichen Rekristallisationszeiten $Q_v(t)$ als Funktion des mittleren Eisanteils aufgetragen. Würde sich der Eisanteil gar nicht zeitlich ändern, ergäbe sich die gepunktete Linie: Beide Eisanteile wären gleich. In

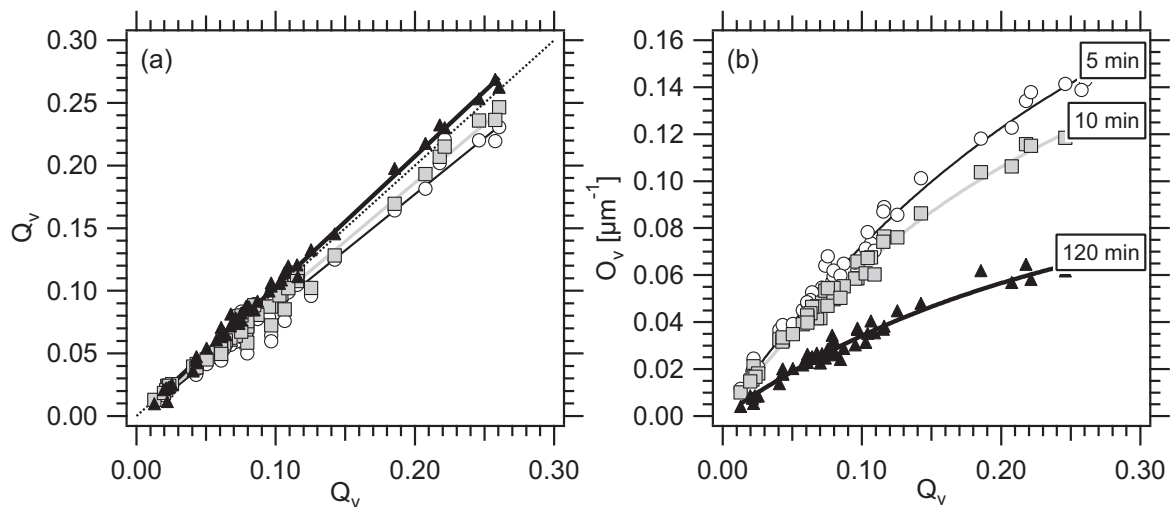


Abbildung 3.13: Zusammenhang zwischen dem Eisanteil $Q_v(t)$ (a) zu verschiedenen Rekristallisationszeiten (nach 5, 10 und 120 Minuten) bzw. der Grenzfläche zwischen Eis und Lösung O_v (b) und dem zeitlich gemittelten Eisanteil \bar{Q}_v . Die Linien dienen der besseren Veranschaulichung.

der Tat ist die zeitliche Änderung gering. Der leichte Anstieg innerhalb der ersten Minuten ist auf sehr kleine Kristalle zurückzuführen. Dieser Punkt wurde bereits in Abschnitt 3.3 erläutert.

Anders verhält es sich mit der Grenzfläche zwischen Eis und Lösung. In Abbildung 3.13b zeigt sich deren zeitliche Änderung. Bei sehr kleinen Eisanteilen ($Q_v \approx 0.01$) sinkt O_v von $0.012 \mu\text{m}^{-1}$ nach 5 Minuten auf $0.003 \mu\text{m}^{-1}$ nach 120 Minuten. Bei großen Eisanteilen ($Q_v \approx 0.25$) sind die entsprechenden Werte 0.14 und $0.066 \mu\text{m}^{-1}$. Der Bereich, in dem sich die Grenzfläche ändert, variiert also stark mit dem Eisanteil. Er wird mit zunehmendem Eisanteil größer. Das Gleiche gilt für den zeitlichen Mittelwert von O_v . Er wird ebenfalls mit zunehmendem Eisanteil größer. Die erhaltenen Parameter der Anpassungen in Abbildung 3.13 sind in Tabelle 6.2 im Anhang aufgeführt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zunahme des Eisanteils in erster Linie durch einen Anstieg der Kristallanzahl erfolgt. Bei größerem Q_v liegen mehr Kristalle vor, während ihre Größe nahezu unverändert bleibt. Dies hat zur Folge, dass die Grenzfläche zwischen Eis und Lösung mit steigendem Eisanteil stark zunimmt.

3.4.4 Weitere wässrige Lösungen

In der vorliegenden Arbeit werden neben wässrigen Lösungen von Natriumbromid und Saccharose auch Lösungen weiterer, verhältnismäßig einfacher Verbindungen untersucht. Interessant ist hierbei die Fragestellung, ob vielleicht auch relativ einfach gebaute Moleküle Antifriereigenschaften besitzen können.

Lösungen der in Tabelle 3.8 aufgeführten Verbindungen wurden analog zu den Natriumbromid- und Saccharoselösungen bei unterschiedlichen Konzentrationen und Tempe-

raturen untersucht. Der Umfang dieser Untersuchungen ist jedoch deutlich kleiner. In Tabelle 3.8 sind einige dieser Experimente exemplarisch aufgeführt. Zum Vergleich ist zunächst ein Experiment bei -6°C einer Saccharoselösung dargestellt ($w_E = 25$ Gew.-%). Unter diesen Bedingungen wird ein Eisanteil von 0.19 erhalten. Die Ratenkonstante k_d beträgt $6.34 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Aus dem nach 120 Minuten aufgenommenen Foto ist zu entnehmen, dass die Eiskristalle alle rund sind. Eckige Kristalle wären ein Zeichen für Antifriefeigenschaften.

Ähnliche Bilder werden für 2,5-Hexandiol, Dipropylenglykol und Isopropylalkohol erhalten. Aufgrund der unterschiedlichen Phasendiagramme sind die bestimmten Ratenkonstanten aber nur schwer direkt miteinander zu vergleichen. Bei den Experimenten mit 2,5-Hexandiol- und Dipropylenglykollösungen wurde die Rekristallisation in beiden Fällen bei -9°C und mit Massenanteilen von 20 Gew.-% durchgeführt. Daraus ergeben sich leicht unterschiedliche Eisanteile und auch unterschiedliche Ratenkonstanten. Die Werte liegen allerdings mit 6.97 und $6.26 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ im gleichen Bereich wie bei der Saccharoselösung. Die Isopropylalkohollösung wurde bei -18°C und 30 Gew.-% untersucht. Daraus ergibt sich hier ein Eisanteil von 0.12 und eine Ratenkonstante von $2.26 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Die Rekristallisation verläuft hier also deutlich langsamer als bei den vorangegangenen Experimenten, jedoch sind Temperatur und Eisanteil auch niedriger. Der geringere Wert ist vermutlich darauf zurückzuführen. Zudem können die Wasser-Diffusionskonstanten innerhalb der verschiedenen Lösungen unterschiedlich sein. Anhand der Bilder sind keine gravierenden Unterschiede festzustellen, alle Kristalle sind rund. Weder 2,5-Hexandiol noch Dipropylenglykol oder Isopropylalkohol besitzen Antifriefeigenschaften.

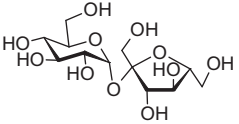
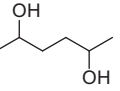
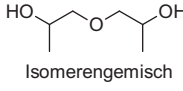


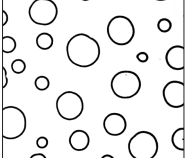
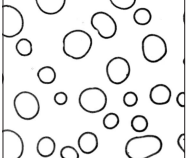
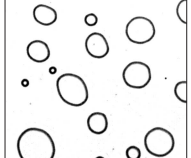


	Saccharose	2,5-Hexandiol	Dipropylenglykol	Isopropylalkohol	Isopropylamin
Struktur			 Isomerengemisch		
M_w [g mol ⁻¹]	342.30	118.17	134.17	60.10	59.11
$t = 120$ min					
T [°C]	-6.0	-9.0	-9.0	-18.0	-6.0
w_E [Gew.-%]	25.0	20.0	20.0	30.0	30.0
Q_v	0.19	0.20	0.14	0.12	0.06
k_d [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	6.34	6.97	6.26	2.26	(0.13)

Tabelle 3.8: Rekristallisation in verschiedenen wässrigen Lösungen. Der Kontrast aller Bilder wurde zugunsten einer besseren Darstellung verändert.

Ein vielleicht auf den ersten Blick unerwartetes Ergebnis wird bei der Untersuchung von Isopropylaminlösungen beobachtet. Hier ist ein Versuch mit einer 30-prozentigen Lösung bei -6°C aufgeführt. Dies führt zu einem Anteil der Kristalle von 0.06. Die Ratenkonstante liegt bei $0.13 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$, die Rekristallisation verläuft also extrem langsam. Die bedeutendere Beobachtung ist aber das Auftreten von länglichen, zum Teil eindeutig hexagonalen Kristallen. Hemmt ein vergleichsweise kleines und einfach aufgebautes Molekül wie Isopropylamin also die Eiskrekristallisation? Nein, denn die beobachteten Kristalle bestehen nicht aus Eis. Ein Blick in das Phasendiagramm offenbart, dass es sich hier um Isopropylamin-Oktahydrat (IPO) handelt, das wie Eis auch eine hexagonale Kristallstruktur besitzt (Pickering, 1893). Das Eis-Isopropylamin-Oktahydrat-Eutektikum liegt bei 18 Gew.-% und -8°C . Bei kleineren Konzentrationen, bei denen wieder Eiskristalle vorliegen, sind tatsächlich die Kristalle wieder rund und die Rekristallisation verläuft deutlich schneller. Sie läuft dann auch wieder diffusionskontrolliert ab. Unter den obigen Bedingungen wachsen also IPO-Kristalle und deren Kristallwachstum, also der Flüssig-Fest-Übergang, bestimmt die Rekristallisationsgeschwindigkeit.

Die eckige Kristallform beruht auf Unterschieden in den Grenzflächenenergien. Verschiedene Kristallflächen besitzen auch unterschiedliche Energien. Am günstigsten sind dabei die primären Flächen, diese werden daher zuerst ausgebildet. Die Minimierung der Kristall-Flüssigkeit-Grenzfläche spielt aber auch immer eine Rolle. So ist es bei Eis in Lösung in der Regel günstiger einen runden Kristall zu bilden, also auch das Wachstum von sekundären Flächen zuzulassen. Beim IPO ist es hingegen günstiger, die vergrößerte Oberfläche einer eckigen Kristallform in Kauf zu nehmen.

3.5 Temperatur

3.5.1 Konstante Temperatur

Die diffusionskontrollierte Rekristallisation hängt in erster Linie vom Eisanteil und von der Temperatur ab. Es wurde gezeigt, wie aus beiden Größen auf den Ausgangsmassenanteil w_Q , den Gesamtanteil des Gelösten, zurückgeschlossen werden kann. Und es wurde beobachtet, dass w_Q eine Größe ist, aus der die Ratenkonstante k_d direkt bestimmt werden kann. Damit ist w_Q ein nützliches Werkzeug beim Vergleich verschiedener Experimente. Im vorangegangenen Kapitel wurde zudem deutlich, dass es eine Differenz zwischen dem Einwaagemassenanteil w_E und w_Q gibt, obwohl beide Größen eigentlich identisch sein sollten. Zum Teil lässt sich diese Abweichung durch Verdampfen von Wasser erklären. Aber insbesondere die Temperaturabhängigkeit der Abweichung bedarf noch einer genaueren Betrachtung, denn mit steigender Temperatur wird die Abweichung kleiner.

Zum Verständnis dieser Beobachtung wird zunächst noch einmal ein genauerer Blick auf einige Experimente mit Saccharoselösungen ($w_E = 30$ Gew.-%) bei -5 und -8°C geworfen (Abbildung 3.14). Die Rekristallisation bei -5°C (schwarze Linien) verläuft schneller als bei -8°C (graue Linien): Der mittlere Radius wächst schneller an und die Kristallanzahl sinkt schneller ab. Der kubische mittlere Radius nach 120 Minuten $r^3(120)$ liegt bei -5°C zwischen 400 und $1200 \mu\text{m}^3$. Bei -8°C reichen die Werte von 100 bis $500 \mu\text{m}^3$. Die Kristallanzahl nach 120 Minuten $N(120)$ variiert bei -5°C zwischen 30 und 60 . Bei -8°C liegen die Zahlen im Bereich von 50 bis 160 . Dabei gehört ein hoher mittlerer Radius immer zu einer hohen Kristallanzahl und umgekehrt. Eigentlich ist zu erwarten, dass ein hoher Wert für $r^3(120)$ zu einem niedrigen Wert für $N(120)$ passt. Verläuft die Rekristallisation in Bezug auf den Radius schneller, so sollte dies auch in Bezug auf die Kristallanzahl zutreffen. Tatsächlich ist auch nicht die Abnahme der Kristallanzahl langsamer, sondern der Eisanteil ist insgesamt bei größerem k_d höher und damit auch die Kristallanzahl zu Beginn. Es ist zu erwarten, dass sich bei längeren Beobachtungszeiten die Reihenfolge von N umkehrt.

Die Beobachtung einer langsameren Rekristallisation bei niedrigerer Temperatur lässt sich auch allein aus der LSW-Ratenkonstanten ableiten, allerdings muss bei realen Experimenten der Eisanteil Q_v berücksichtigt werden. Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass Q_v mit kleinerer Temperatur zunimmt und dies dazu führt, dass sich die Ratenkonstante bei konstantem Ausgangsmassenanteil w_Q nicht ändert (Abbildung 3.11b). Wie hier nochmal zu sehen ist, gilt dies nicht für den Einwaagemassenanteil w_E , der bei den Experimenten in Abbildung 3.14, wie auch bei allen übrigen in diesem Kapitel, bei jeweils 30 Gew.-% liegt. k_d nimmt ebenso wie in Abbildung 3.11b mit steigendem w_Q exponentiell ab: k_d ist größer bei kleinerem w_Q . Bei -5°C liegt w_Q im Bereich von 35 bis 41 Gew.-%. Bei -8°C hingegen reichen die Werte von 40 bis 49 Gew.-%. An dieser Stelle sei nochmal darauf hingewiesen, dass Eisanteil und damit auch w_Q im Verlauf der Rekristallisation jeweils praktisch konstant bleiben. Die Konzentration an Saccharose ändert sich während der Rekristallisation also nicht.

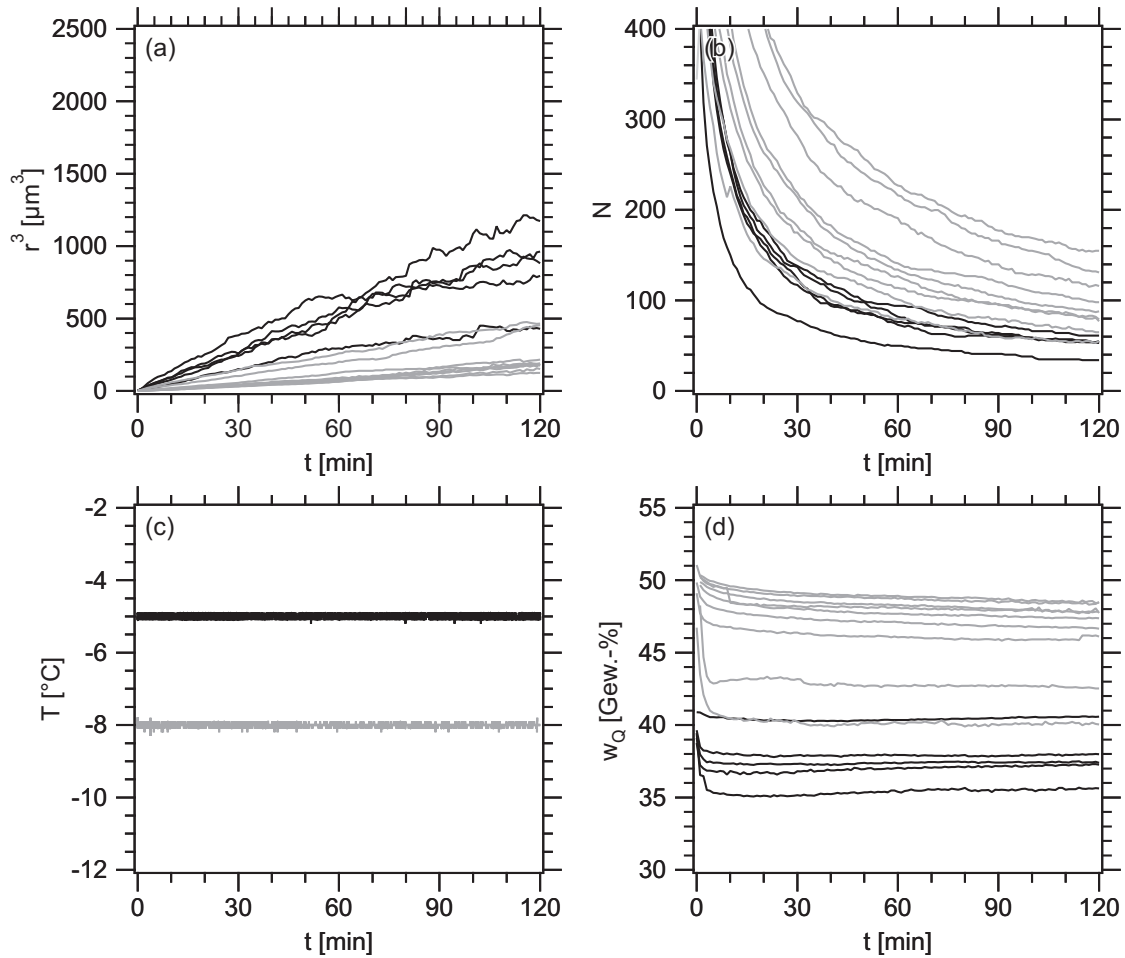


Abbildung 3.14: Rekristallisation bei -5°C (schwarze Linien) und -8°C (graue Linien). Der Saccharosemassenanteil beträgt 30 Gew.-%. Zeitlicher Verlauf des kubischen mittleren Radius (a), der Kristallanzahl (b), der Temperatur (c) und des Ausgangsmassenanteils (d).

Zu den hier besprochenen Experimenten gehören zwei bei $w_Q \approx 40$ Gew.-%. Die Ratenkonstanten stimmen mit $3.70 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei -5°C und $3.86 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei -8°C auch sehr gut überein, wie es aufgrund der Abhängigkeit $k_d(Q_v)$ zu erwarten war. Für den Verlauf $N(t)$ gilt dies aber nicht. Im Gegenteil, die beiden Kurven liegen maximal voneinander entfernt. Gleicher Ausgangsmassenanteil w_Q bei verschiedenen Temperaturen bedeutet unterschiedliche Eisanteile. Q_v beträgt 0.06 beim Experiment mit einer Rekristallisationstemperatur von -5°C . Dies ist der niedrigste Wert unter den Experimenten bei dieser Temperatur. Mit 0.28 ist entsprechend der Eisanteil, der zu $k_d = 3.86 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ gehört, bei -8°C der höchste.

3.5.2 Stufenweise Temperaturvariation

Wenn der Eisanteil Q_v , und damit auch der Ausgangsmassenanteil w_Q , bei konstanter Temperatur unverändert bleibt, so sollte w_Q auch bei Temperaturänderungen konstant bleiben. Die Gesamtkonzentration sollte sich nicht mit der Temperatur ändern, sondern der Eisanteil sollte entsprechend zu- bzw. abnehmen. In Abbildung 3.15 sind Experimente gezeigt, bei denen die Rekristallisationstemperatur von -5°C (schwarze Linien) bzw. von -7°C (graue Linien) alle 30 Minuten jeweils um 1°C abgesenkt wurde. Die Kühlrate betrug immer 1°C min^{-1} .

r^3 sowie N sind nach 120 Minuten bei stufenweiser Temperaturerniedrigung in etwa so groß, als wäre die Temperatur während der gesamten Zeit konstant bei -5 bzw. -7°C

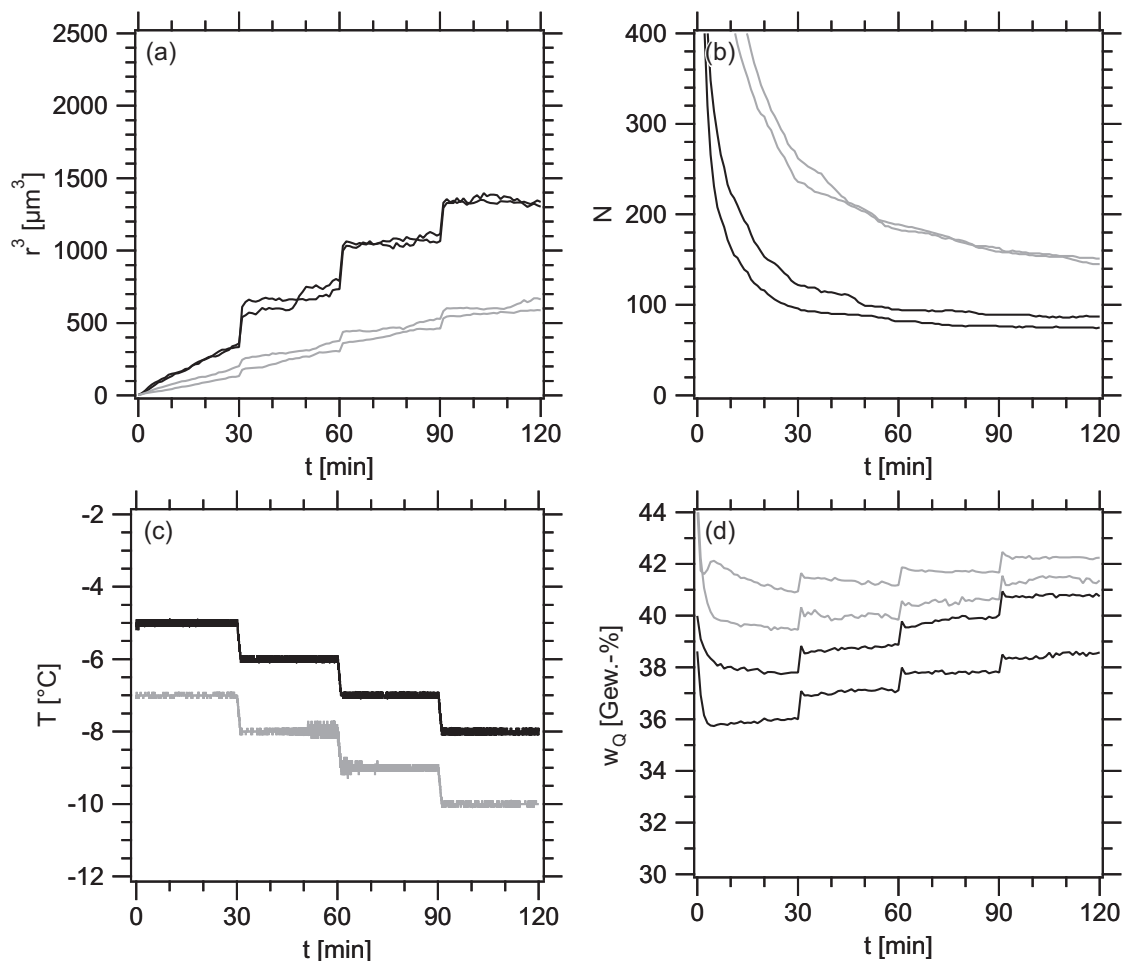


Abbildung 3.15: Ausgehend von -5°C (schwarze Linien) bzw. -7°C (graue Linien) wird die Rekristallisationstemperatur um je 1°C in einer Minute alle 30 Minuten abgesenkt. Der Saccharosemassenanteil beträgt 30 Gew.-%. Zeitlicher Verlauf des kubischen mittleren Radius (a), der Kristallanzahl (b), der Temperatur (c) und des Ausgangsmassenanteils (d).

gehalten worden. Besonders auffällig ist hier, dass bei niedrigerer Temperatur der Anstieg im Radius beim Temperatursprung kleiner ausfällt als bei höherer Temperatur. Dies passt zur kleineren Änderung des Eisanteils bei tiefen Temperaturen. Aus dem Phasendiagramm ist ersichtlich, dass die Schmelzpunktkurve zunächst nur langsam absinkt und ab ca. 30 Gew.-% immer steiler wird (Abbildung 3.5). Je steiler die Kurve ist, desto geringer ist auch die Änderung im Eisanteil. Dies findet sich auch bei der stufenweisen Temperaturerniedrigung wieder. Die Zunahme des Eisanteils wird kleiner bei tieferen Temperaturen. Da gleichzeitig die Kristallanzahl abnimmt, bleibt der Sprung in den mittleren Radien innerhalb eines Experiments nahezu konstant.

Wie bei konstanter Temperatur verläuft auch hier die Rekristallisation schneller, die bei der höheren Temperatur startet. Dies gilt in Bezug auf r^3 wie auf N . Ebenso wird hier beobachtet, dass bei höherem Ausgangsmassenanteil w_Q die Reifung langsamer ist. Zudem wird in Abbildung 3.15d deutlich, dass durch die Erhöhung des Eisanteils bei Temperaturerniedrigung auch w_Q größer wird. Bei einer Gesamttemperaturerniedrigung über die Dauer der Experimente (120 Minuten) von -5 auf -8°C nimmt w_Q um 2.7 Gew.-% zu. Bei der Temperaturerniedrigung von -7 auf -10°C ist die Zunahme von w_Q mit 1.5 Gew.-% etwa halb so groß. Eigentlich sollte w_Q innerhalb eines Experiments konstant bleiben. Was könnte der Grund hierfür sein? (1) Der Eisanteil wird nicht genau genug bestimmt. Aufgrund der Art der Bild-Auswertung wird der Eisanteil um etwa 5 % unterschätzt. Dies führt zu einer Überschätzung von w_Q um 1 %. Da dies aber natürlich für die Eisanteile bei allen Temperaturen gilt, kann es nicht der Grund für die Abweichung sein. (2) Bei der Temperaturerniedrigung erhöht sich der Eisanteil. Da Eis eine geringere Dichte als die Lösung hat, wird etwas von der Lösung am Rand der Deckgläser heraus gedrückt. An dieser Stelle verdampft das Wasser schneller aufgrund der größeren Luft-Lösung-Grenzfläche und die Konzentration an Saccharose erhöht sich. Bei konstanter Temperatur ändert sich w_Q allerdings nicht. Dies würde also heißen, hier verdampft praktisch kein Wasser oder die Konzentration an Saccharose erhöht sich nur am Rand. Die Konzentration innerhalb der ganzen Probe wieder auszugleichen, dauerte in dem Fall länger als der Beobachtungszeitraum. Dies müsste aber auch im Fall der Temperaturerniedrigung gelten, weshalb diese Möglichkeit also auch unwahrscheinlich ist. (3) Bei kleinem Eisanteil, also bei höheren Temperaturen oder höheren Einwaagemassenanteilen, ist der Unterschied zwischen w_E und w_Q geringer. Dies könnte bedeuten, dass die Kurve, die in dieser Arbeit zur Beschreibung des Phasendiagramms benutzt wird, bei größerer Entfernung von w_E bzw. T_m immer schlechter wird. Die Daten im Bereich höherer Konzentrationen bzw. tieferer Schmelzpunkte könnten unzureichend sein, um das System zu beschreiben. Möglicherweise ist aber auch die Verwendung des Bulk-Phasendiagramms generell nicht richtig. Die Erweiterungen der LSW-Theorie basieren darauf, dass sich die Diffusionsfelder der einzelnen Kristalle überlappen. Das heißt, die Konzentration in der Umgebung der Kristalle erreicht niemals die Gleichgewichtskonzentration eines einzelnen Bulk-Kristalls. Ob die beobachtete Änderung von w_Q bei Temperaturerniedrigung innerhalb eines Experiments auf das in dieser Arbeit verwendete Bulk-Phasendiagramm zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht abschließend geklärt werden. Allerdings erscheint dies zu diesem Zeitpunkt als die plausibelste Erklärung.

In Abbildung 3.16 sind Experimente gezeigt, bei denen die Rekristallisationstemperatur stufenweise alle 30 Minuten um 1°C erhöht wird. Die Ausgangstemperaturen sind hier -7°C (schwarze Linien) und -9°C (graue Linien). Die Aufwärmrate beträgt 1°C min^{-1} . Unter diesen Bedingungen steigt der kubische mittlere Kristallradius jeweils auf Werte um $800 \mu\text{m}^3$. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen mit Temperaturniedrigung zeigt sich hier eine Zunahme in der Änderung des mittleren Radius beim Temperatursprung mit steigender Temperatur. Dies hängt mit der Abnahme in der Kristallanzahl zusammen. Bei den vorangegangenen Experimenten blieb die Kristallanzahl nach den ersten 30 bis 60 Minuten noch nahezu konstant, da die Rekristallisation verlangsamt wurde. Außerdem sind beim Temperatursprung dort alle Kristalle größer geworden, danach musste erst eine Zeit lang Reifung

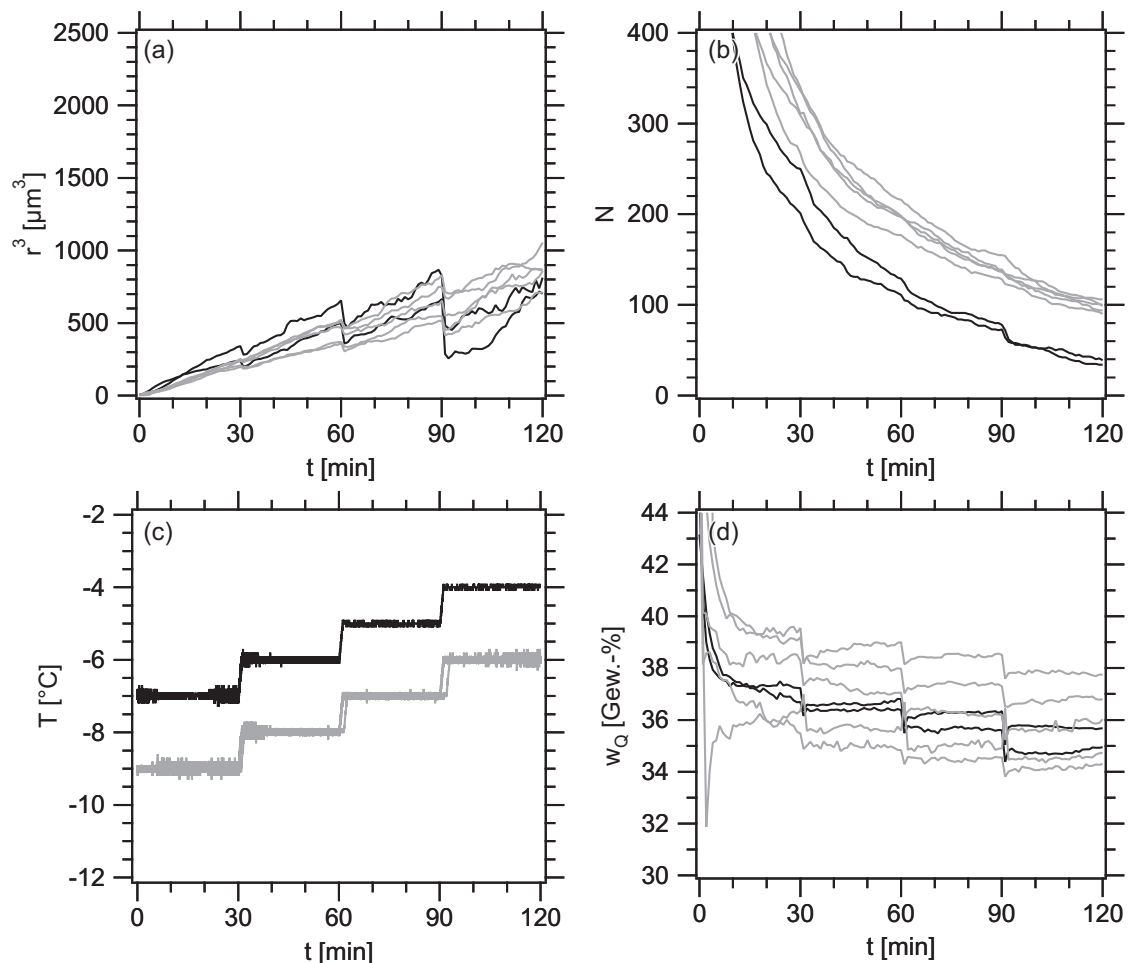


Abbildung 3.16: Ausgehend von -7°C (schwarze Linien) bzw. -9°C (graue Linien) wird die Rekristallisationstemperatur um je 1°C in einer Minute alle 30 Minuten erhöht. Der Saccharosemassenanteil beträgt 30 Gew.-%. Zeitlicher Verlauf des kubischen mittleren Radius (a), der Kristallanzahl (b), der Temperatur (c) und des Ausgangsmassenanteils (d).

stattfinden, bis einige Kristalle klein genug wurden, um sich schließlich aufzulösen. Bei der Temperaturerhöhung führt aber jeder Temperatursprung zum Schmelzen einiger Kristalle, auch wenn diese zuvor relativ groß gewesen waren, und die danach höhere Temperatur bewirkt zudem eine schnellere Rekristallisation.

Im Gegensatz zur Temperaturerniedrigung findet sich bei der Temperaturerhöhung eine Abnahme des Ausgangsmassenanteils w_Q . Wieder ist zu beobachten, dass mit steigender Temperatur w_Q abnimmt, also die Differenz zwischen w_E und w_Q kleiner wird. Die Abnahme von w_Q beträgt bei der Temperaturerhöhung 1.9 Gew.-% beim Übergang von -7 auf -4°C und 2.1 Gew.-%, wenn die Starttemperatur -9°C ist. Die Unterschiede sind also kleiner als bei der Temperaturerniedrigung. Insgesamt liegt die Zu- bzw. Abnahme von w_Q bei einer Temperaturänderung um 3°C etwa bei 2 Gew.-%. Bei den Versuchen mit konstanter Rekristallisationstemperatur hingegen unterscheiden sich die durchschnittlichen Werte für w_Q bei -5 und -8°C um fast 9 Gew.-%. w_Q reicht dort von 35 Gew.-% bei -5°C bis zu 49 Gew.-% bei -8°C . Dies muss bedeuten, dass dort der Temperaturunterschied nicht allein für die Änderung von w_Q verantwortlich ist. Die Vermutung liegt nahe, dass die Saccharosemassenanteile im jeweiligen Beobachtungsfeld tatsächlich von w_E verschieden sind. Der Unterschied zwischen w_E und w_Q beruht also nicht allein auf der ungenauen Berechnung von w_Q mit Hilfe des Bulk-Phasendiagramms.

3.5.3 Zyklische Temperaturvariation

Bei der stufenweisen Temperaturänderung wurde gezeigt, dass sich der Ausgangsmassenanteil w_Q mit jedem Temperatursprung ändert. Eine Temperaturerniedrigung führt zu einer Steigerung von w_Q und eine Temperaturerhöhung zur Absenkung. Im Folgenden soll durch zyklische Temperaturvariation, also abwechselndes Abkühlen und Aufwärmen, getestet werden, ob die Änderungen in w_Q gleich groß sind. Dies würde bedeuten, die Konzentration an Saccharose ändert sich nicht. In Abbildung 3.17 sind Versuche dargestellt, bei denen die Temperatur zwischen -5 und -8°C sprunghaft mit 3°C min^{-1} alle 10 Minuten geändert wurde. Bei $t = 0$ min wurde jeweils mit -5°C begonnen. Der Unterschied zwischen den beiden dargestellten Versuchsreihen liegt hier in den davor herrschenden Bedingungen. Im ersten Fall (schwarze Linien) wurde direkt von -50°C auf -5°C aufgewärmt. Dies ist die Standardvorgehensweise. Bei der zweiten Versuchsreihe ist eine 10-minütige Rekristallisation bei -10°C vorgeschaltet.

Die vorangehende Rekristallisation führt bei $t = 0$ min zu leicht größeren mittleren Kristallradien und zu kleineren Kristallanzahlen. Die Folge ist während der gesamten restlichen Versuchsdauer ein höherer mittlerer Radius und eine geringere Kristallanzahl. Es ist also enorm wichtig auf die Startbedingungen zu achten, wenn verschiedene Messreihen miteinander verglichen werden.

Trotz der unterschiedlichen Startbedingungen besitzen die beiden Versuchsreihen aber aufgrund des ansonsten gleichen Temperaturprofils große Gemeinsamkeiten. In beiden Fällen ist zu beobachten, dass die Änderung des mittleren Radius während der Temperatursprünge mit der Zeit größer wird. Dies ist in der Abnahme der Kristallanzahl begründet. Der Eisanteil ist bei -5°C immer gleich groß und damit auch w_Q . Das Glei-

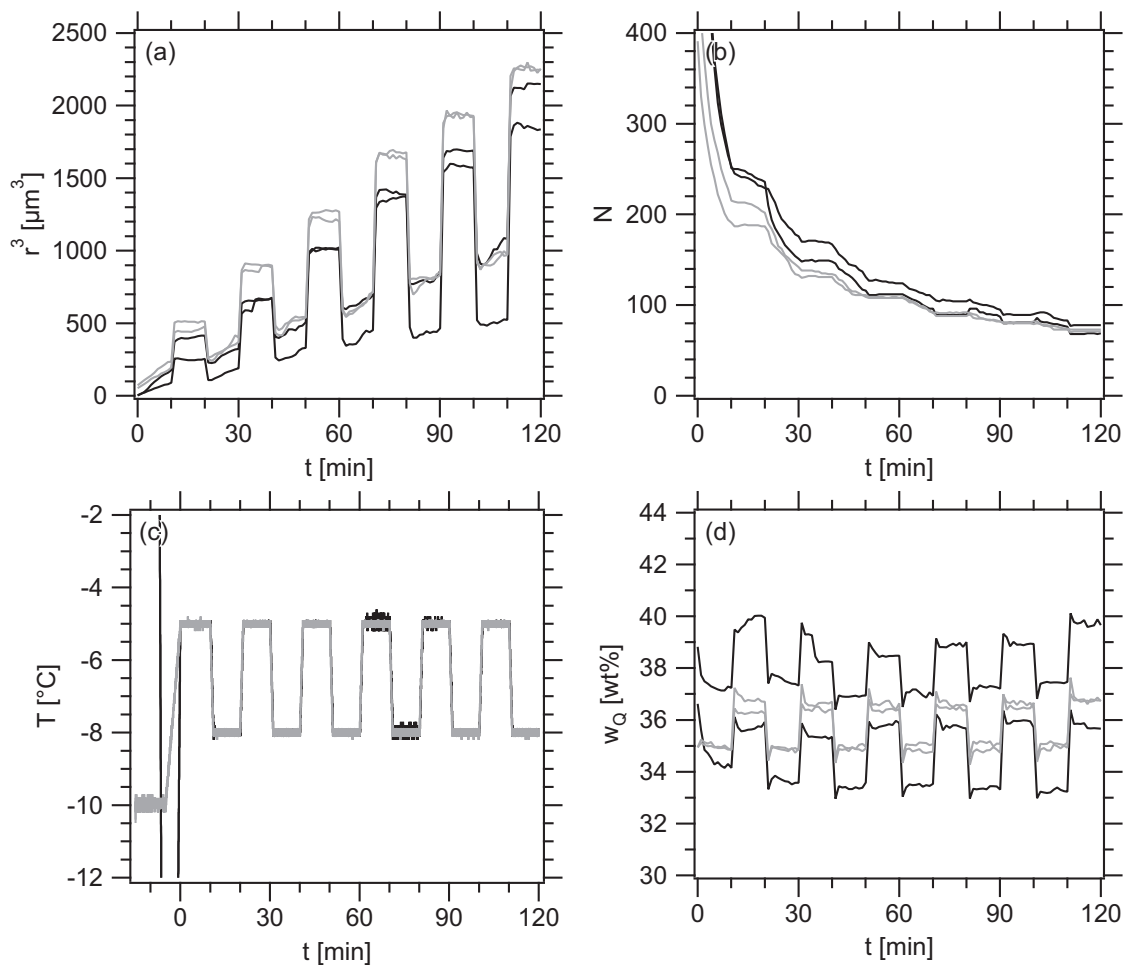


Abbildung 3.17: Sprungweise zyklische Variation der Rekristallisationstemperatur zwischen -5 und -8°C ohne (schwarze Linien) und mit vorangestellter Reifung bei -10°C (graue Linien). Der Saccharosemassenanteil beträgt 30 Gew.-%. Zeitlicher Verlauf des kubischen mittleren Radius (a), der Kristallanzahl (b), der Temperatur (c) und des Ausgangsmassenanteils (d).

che gilt für -8°C . Um bei kleinerer Kristallanzahl auf denselben Eisanteil zu kommen, muss der mittlere Radius größer werden, was so auch beobachtet wird. Dass Q_v und w_Q nach jedem Temperaturzyklus wieder auf den vorangegangenen Wert zurückkommen, belegt erneut, dass sich die Konzentration an Saccharose während des Beobachtungszeitraums nicht ändert, genauso wie es für die Rekristallisation bei konstanter Temperatur zu beobachten ist. Allerdings ändert sich w_Q auch hier bei jedem Temperatursprung ebenso wie bei der stufenweisen Temperaturvariation. Die Änderung in w_Q beträgt wiederum etwa 2 Gew.-%.

In Abbildung 3.18 ist gezeigt, wie sich eine graduelle Temperaturänderung im Vergleich zu einer sprunghaften auswirkt. Bei beiden Versuchsreihen wird die Temperatur zwischen -5 und -8°C verändert, wobei die Starttemperatur wieder -5°C ist. Bei der ersten Versuchs-

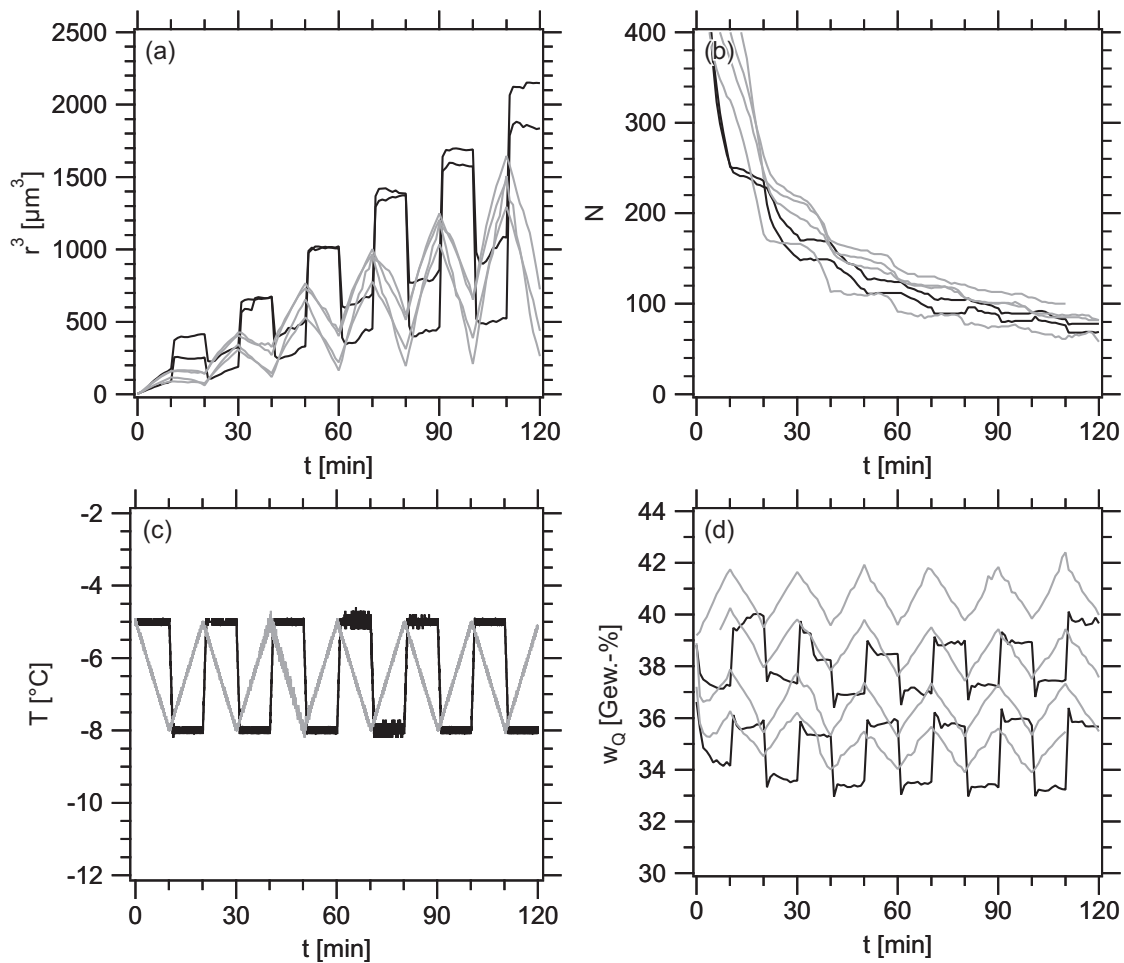


Abbildung 3.18: Sprungweise und graduelle zyklische Variation der Rekrystallisationstemperatur zwischen -5 und -8°C mit 3 (schwarze Linien) und $0.3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (graue Linien). Der Saccharosemassenanteil beträgt 30 Gew.-%. Zeitlicher Verlauf des kubischen mittleren Radius (a), der Kristallanzahl (b), der Temperatur (c) und des Ausgangsmassenanteils (d).

reihe (schwarze Linien) wurde die Temperatur sprunghaft alle 10 Minuten verändert und dann wieder konstant gehalten. Bei der zweiten Versuchsreihe (graue Linien) hingegen wurde innerhalb der 10 Minuten die Temperatur mit $0.3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ abgesenkt bzw. erhöht, so dass diese nie konstant blieb.

Das Resultat der graduellen Temperaturvariation ist eine im Mittel geringfügig langsamere Rekrystallisation. Die maximalen Kristallradien zum Ende der Temperaturerhöhung liegen im Fall der graduellen Temperaturvariation immer niedriger. Dies trifft jedoch nicht auf die minimalen Radien bei der Temperaturerniedrigung zu. Hier passen die Radien zu den Ausgangsmassenanteilen. Wieder ist die Rekrystallisation bei niedrigerem w_Q schneller. Im Vergleich mit den Experimenten in Abbildung 3.14 zeigt sich bei -5°C auch keine gravierende Veränderung im mittleren Radius. Die kubischen mittleren Radien liegen

bei beiden Arten der Temperaturvariation im Bereich zwischen 300 und 1200 μm^3 . Dies ist derselbe Bereich, wie er für konstante -5°C gefunden wird. Die Rekristallisation bei -8°C verläuft langsamer. Entscheidend für die Geschwindigkeit scheint damit die höchste Temperatur während der Rekristallisation zu sein. Die Temperaturerniedrigung führt zwar zu einer Erhöhung des mittleren Radius, nach jedem Zyklus werden aber wieder Werte erreicht, die denen ohne Temperaturänderung entsprechen.

Sowohl bei der sprungweisen Temperaturvariation mit 3°C min^{-1} als auch bei der langsamen Temperaturänderung mit $0.3^\circ\text{C min}^{-1}$ ändert sich w_Q um ca. 2 Gew.-% beim Temperaturwechsel von 3°C . Wieder zeigt sich keine Änderung von w_Q bei gleicher Temperatur. Die Konzentration der Lösung ändert sich nicht mit der Zeit.

3.5.4 Zusammenfassung

Wie es bereits im vorangegangenen Unterabschnitt 3.4.3 beobachtet wurde, zeigte sich auch hier in allen Experimenten eine Differenz Δw zwischen dem Ausgangsmassenanteil w_Q , der über den jeweils bestimmten Eisanteil berechnet wurde, und dem Einwaagemassenanteil w_E . Hierbei ist w_Q immer größer als w_E . Die Temperaturabhängigkeit des Unterschieds zwischen beiden Größen deutete sich bereits in Abbildung 3.10 an, wurde an dieser Stelle aber eindeutig belegt. Mit abnehmender Temperatur vergrößert sich Δw . Dies wird sowohl beim Vergleich mehrerer Einzelexperimente bei verschiedenen Temperaturen als auch bei der Temperaturänderung innerhalb eines Experiments deutlich. Im vorangegangenen Kapitel wurde bereits ersichtlich, dass Δw mit zunehmendem w_E kleiner wird. Zusammen mit der Temperaturabhängigkeit lässt sich sagen, dass Δw mit kleiner werdendem Eisanteil abnimmt. Je größer der im Phasendiagramm zu betrachtende Teil ist, der zur Berechnung von w_Q benötigt wird, desto schlechter passen w_E und w_Q zusammen. Dies lässt vermuten, dass die Abweichung auf das hier verwendete Bulk-Phasendiagramm zurückzuführen ist. Denn dabei wird vernachlässigt, dass bei Eisanteilen größer Null durch die Überlappung der Diffusionsfelder der einzelnen Kristalle in der Lösung nicht mehr die Gleichgewichtskonzentration eines Bulk-Kristalls erreicht wird.

Allerdings lässt sich die Differenz zwischen w_E und w_Q nicht allein mit der Verwendung des Bulk-Phasendiagramms erklären. Beim Vergleich mehrerer Einzelexperimente wird eine deutlich größere Abweichung beobachtet als bei der Temperaturänderung innerhalb eines Experiments. Während eines Experiments bewirkt die Einstellung einer bestimmten Temperatur einen festen Wert für w_Q . Dies gilt natürlich, wenn die Temperatur während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant gehalten wird, aber auch im Fall von zyklischen Temperaturänderungen. Die tatsächlich vorliegende Konzentration im Bereich des Beobachtungsfeldes ändert sich also nicht. Die Änderung von w_Q mit der Temperatur innerhalb eines Experiments ist vermutlich noch durch dessen Berechnung mittels des Bulk-Phasendiagramms zu erklären. Werden mehrere Experimente miteinander verglichen, kommt jedoch ein weiterer Faktor hinzu. Nun kommt zum Tragen, dass möglicherweise der tatsächlich vorliegende Gesamtmassenanteil vom Einwaagemassenanteil abweicht. Dies könnte mit Inhomogenitäten innerhalb der verwendeten Lösungen zusammenhängen, dann müssten jedoch auch Experimente zu beobachten sein, bei denen w_Q

geringer als w_E ist. Dies ist nicht der Fall. Das Verdampfen von Wasser während der Probenvorbereitung und im Zeitraum bis zum Erreichen der Rekristallisationstemperatur ist daher eine plausible Ursache für die zum Teil große Differenz zwischen w_E und w_Q .

3.6 Additive

3.6.1 Kinetische Beschreibung

In den vorangegangenen Kapiteln 3.4 und 3.5 wurde die diffusionskontrollierte Eisrekristallisation in wässrigen Lösungen und der Einfluss des Eisanteils und der Temperatur quantitativ bestimmt. Weitere Faktoren wie Aggregation müssen in der vorliegenden Arbeit aufgrund der experimentellen Bedingungen ($Q_v \lesssim 0.3$) und aufgrund der vorgestellten Auswahlkriterien nicht berücksichtigt werden. Die Auswahlkriterien sind in Abschnitt 3.3 genauer beschrieben.

Hauptziel dieser Arbeit ist die Aufklärung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen einer Reihe von Verbindungen in Bezug auf Antigefriereigenschaften. Dazu soll für diese Additive die Effektivität bestimmt werden, mit der sie die Eisrekristallisation hemmen. Da die Geschwindigkeit der allein diffusionskontrollierten Eisrekristallisation bereits von mehreren Faktoren (Art der Lösung, Eisanteil, Temperatur) abhängt, wurden diese Faktoren im bisherigen Teil der Arbeit ausführlich untersucht. Nun können die Rahmenbedingungen ausgewählt werden, bei denen die Rekrystallisationsinhibierung durch die nachfolgend beschriebenen Additive optimal beobachtet werden kann.

Die beiden am umfangreichsten untersuchten Lösungen dieser Arbeit sind Natriumbromid- und Saccharoselösungen. Bei den Natriumbromidlösungen betrug die Rekrystallisationstemperatur -25°C . Bei den Saccharoselösungen liegen die meisten Daten bei -6 , -8 und -10°C vor. Sowohl bei den Natriumbromidlösungen wie auch bei den Saccharoselösungen bei -6°C liegen die Ratenkonstanten k_d relativ hoch und zeigen eine starke Abhängigkeit vom Eisanteil ($1.36 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1} \lesssim k_d \lesssim 13.32 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$, $0.02 \lesssim Q_v \lesssim 0.26$). Vorteilhaft bei beiden Versuchsreihen ist die verhältnismäßig geringe Abweichung zwischen dem Einwaagemassenanteil w_E und dem Ausgangsmassenanteil w_Q . Dies gilt insbesondere für die Natriumbromidlösungen. Allerdings ist die Streuung von k_d unter beiden Bedingungen mit bis zu $5 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei gleichem Q_v sehr groß. Bei -8 und -10°C (Saccharoselösungen) streuen die Werte um maximal $1 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Zudem ist die Abhängigkeit von Q_v deutlich geringer. Bei -8°C liegt k_d im Bereich von 0.69 bis $4.09 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei Eisanteilen von 0.01 bis 0.26 . Bei -10°C sind die minimalen und maximalen Werte für k_d 0.26 und $3.35 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ ($0.02 \lesssim Q_v \lesssim 0.30$). Mit niedrigeren Temperaturen wird jedoch der Unterschied zwischen w_E und w_Q größer. Nachteilig sind auch die sehr kleinen Werte für k_d bei tieferen Temperaturen. Wenn zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekrystallisation unterschieden werden soll, sind größere Differenzen in den zugehörigen Ratenkonstanten vorteilhaft. Aus diesen Überlegungen heraus wurden für die Bestimmung der AFP-Effektivität Saccharoselösungen bei -8°C verwendet. Der Saccharosemassenanteil wurde mit $45 \text{ Gew.}\%$ so gewählt, dass Q_v zwischen 0.02 und 0.09 lag. Damit ist der Eisanteil so klein, dass Aggregation praktisch keine Rolle spielt und doch so groß, dass die Kristallanzahl für eine sinnvolle statistische Auswertung genügt. Gleichzeitig ist die Differenz zwischen w_E und w_Q mit $4.6 \text{ Gew.}\%$ im Mittel vergleichsweise gering. Die Ratenkonstanten sind mit Werten von 0.69 bis $1.88 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ ausreichend groß, um eine deutliche Unterscheidung zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekrystallisation zu

ermöglichen. Die Festlegung auf einen Massenanteil von 45 Gew.-% Saccharose und eine Temperatur von -8°C gilt, sofern nicht anders angegeben, für alle Untersuchungen von Polymeren, Peptoiden und Peptiden, die im Folgenden beschrieben werden.

In Abbildung 3.19a sind Bilder von Eiskristallen während der Rekristallisation gezeigt, bei der von einer 45 Gew.-%-Saccharoselösung ausgegangen wurde. Die Rekristallisationstemperatur beträgt -8°C . Die mittlere Kristallanzahl reduziert sich bei diesem Experiment von rund 800 zu Beginn auf 255 nach 10 Minuten und schließlich auf 63 nach 120 Minuten. Die Bilder stellen Ausschnitte der tatsächlich aufgenommenen Fotos dar. Der mittlere Radius wächst von 0.60 auf $4.79\ \mu\text{m}$. Diese zeitlichen Veränderungen sind qualitativ auch anhand der Bilder nachzuvollziehen. Eine weitere wichtige Beobachtung ist die Form der Kristalle. Mit einer mittleren Rundheit von 0.90 und auch augenscheinlich sind die Kristalle alle rund.

Wenn zu der Lösung AFP gegeben werden, wird die Rekristallisation gehemmt. In dem in Abbildung 3.19 gezeigten Beispiel ist es ein Glykopeptid mit 4 Wiederholeinheiten und einem Monosaccharid (GalNAc) am Threonin (AFGP **38b**). Bei einer Konzentration von $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$ zeigt sich nach 60 Minuten deutlich die Ausbildung von hexagonalen

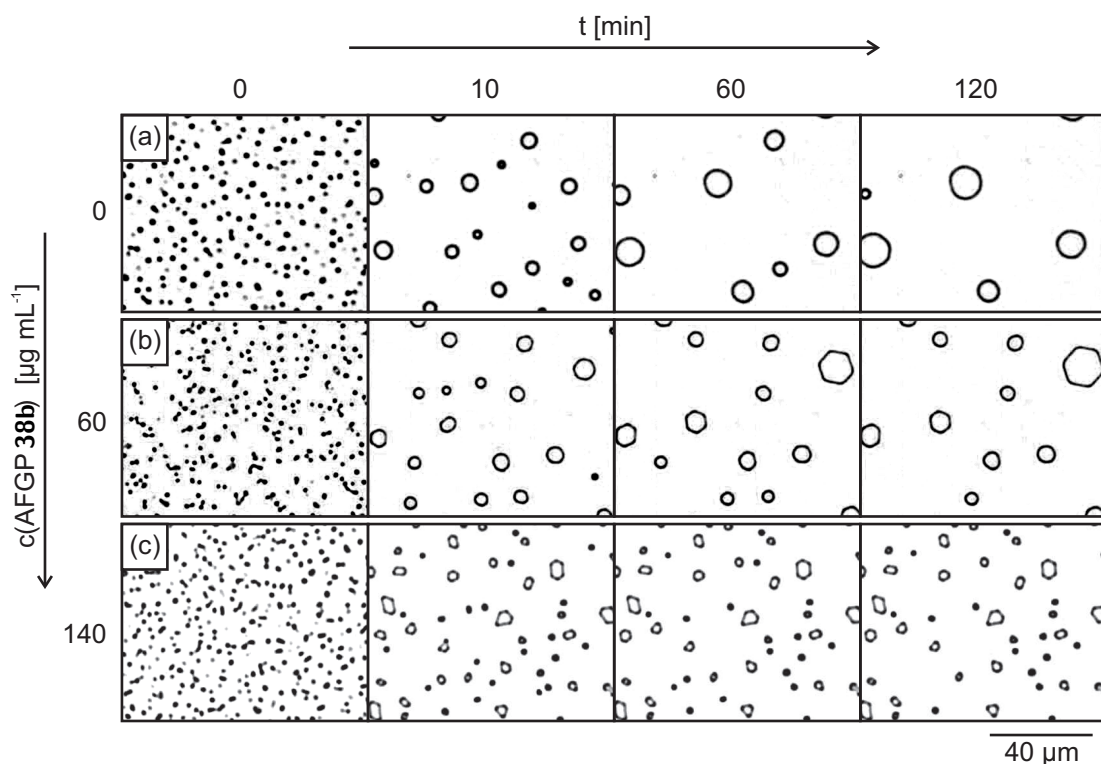


Abbildung 3.19: Repräsentative Bilder von Eiskristallen im Verlauf der Rekristallisation bei -8°C , gebildet in wässrigen Saccharoselösungen (45 Gew.-%). (a) Reine Saccharoselösung ohne AFP. (b) Lösung mit $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$ AFGP **38b** ($[\text{AAT}^{\text{m}}]_4\text{AA}$). (c) Lösung mit $140\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Der Kontrast aller Bilder wurde zugunsten einer besseren Darstellung verändert.

Kristallen (Abbildung 3.19b). Allerdings führt die optisch eindeutige Änderung der Kristallform nicht zu einer signifikanten Änderung der mittleren Rundheit. Diese ist daher kein sinnvolles Maß für die Effektivität von AFP. Die spezifische Adsorption des AFGP bewirkt jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Experimenten in Bezug auf Kristallanzahl und Kristallgröße. Nach 10 Minuten ist dieser bei einer Konzentration von $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ noch nicht zu erkennen, aber nach 60 Minuten und noch deutlicher nach 120 Minuten werden die Unterschiede klar. Durch die Adsorption werden die Abnahme von N und die Zunahme von r verlangsamt. Die Kristallanzahl sinkt lediglich bis auf 120 und der mittlere Radius wächst nur bis auf $3.39 \mu\text{m}$ an. Wird die Konzentration weiter auf $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhöht (Abbildung 3.19c), so verstärkt sich dieser Trend. Die Kristallanzahl sinkt noch langsamer und besitzt nach 120 Minuten noch einen Wert von 592. Der mittlere Radius r wird während der gesamten Rekristallisation nicht größer als $1.55 \mu\text{m}$. Rekristallisation ist hier nur innerhalb der ersten 10 Minuten zu beobachten. Danach verändern sich Kristallanzahl und mittlerer Radius praktisch nicht mehr, die Eisrekristallisation ist vollständig gestoppt.

Die gleiche Beobachtung ergibt sich bei Betrachtung der zeitlichen Änderung des kubischen mittleren Radius (Abbildung 3.20). In der reinen Saccharoselösung wird eine Ratenkonstante von $0.88 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bestimmt. Zur Anpassung wird dabei die in Abschnitt 3.1 vorgestellte LSW-Ratengleichung 3.4b verwendet. In dem Experiment mit $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ des Glykopeptids kann diese Gleichung jedoch nicht mehr verwendet werden. Hier tritt nach 30 Minuten ein Wechsel zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle ein. Wird die Ratenkonstante k_d bis zu diesem Zeitpunkt bestimmt, so ergibt sich ein Wert von $0.75 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Die Rekristallisation verläuft somit diffusionskontrolliert. Im Bereich von 30 bis 120 Minuten wird die Rekristallisation durch das AFGP inhibiert und die Ratenkonstante k_i beträgt $0.14 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Der Flüssig-Fest-Übergang bestimmt nun die Rekristallisationsgeschwindigkeit. Bei einer Konzentration von $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ gilt dies für fast die gesamte Beobachtungszeit, lediglich innerhalb der ersten Minuten wächst der mittlere Radius an, danach ist das Eiswachstum gestoppt ($k_i < 0.01 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$).

Die Ratenkonstanten k_d und k_i lassen sich gut durch Anpassung der LSW-Ratengleichung an die Daten bestimmen. Da teilweise innerhalb eines Experiments und in einem bestimmten Konzentrationsbereich ein Wechsel zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle auftritt, wird in dieser Arbeit Gleichung 3.24 verwendet (Budke et al., 2009). In dieser Gleichung werden beide Prozesse berücksichtigt.

$$r^3(t) = (1 - \beta(t)) \cdot [r_0^3 + k_d(Q_v) \cdot t] + \beta(t) \cdot [r_{h0}^3 + k_i(Q_v, c) \cdot t] \quad (3.24)$$

$$\text{mit} \quad \beta(t) = (1 + \exp(t_s - t))^{-1} \quad (3.25)$$

Hierbei ist r_0 der mittlere Kristallradius zum Zeitpunkt $t = 0$. $k_d(Q_v)$ ist die diffusionsbestimmte, eisanteilabhängige Ratenkonstante, die mit Gleichung 3.22 wiedergegeben werden kann (siehe Unterabschnitt 3.4.3). Die AFP-kontrollierte Rekristallisation wird durch den zweiten Teil von Gleichung 3.24 beschrieben. r_{h0} ist der hypothetische mittlere Radius zu Beginn der Rekristallisation, wenn nur der zweite Prozess ablaufen würde. k_i

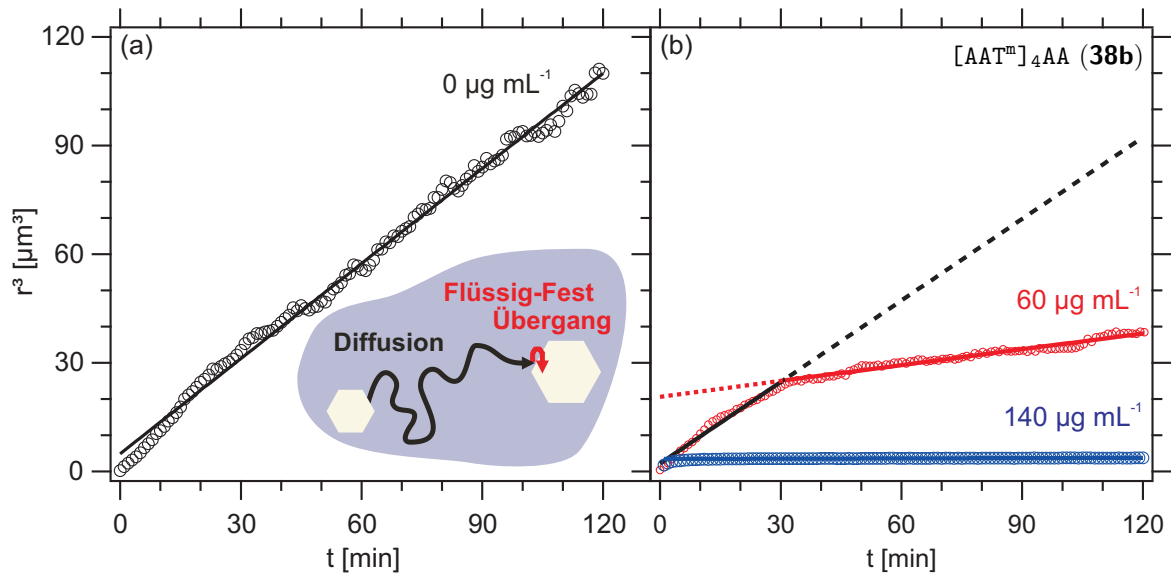


Abbildung 3.20: Bestimmung der Rekristallisationsgeschwindigkeit in 45 Gew.-%-Saccharoselösungen bei -8°C . (a) Reine Lösung ohne AFGP. (b) Lösungen mit $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $140 \mu\text{g mL}^{-1}$ AFGP **38b**. Die durchgezogenen Linien resultieren aus den Anpassungen nach Gleichung 3.24. Gestrichelte Linien stellen die Extrapolationen zu späteren bzw. früheren Zeiten dar. Die Zeichnung illustriert die je nach AFGP-Konzentration limitierenden Prozesse der Diffusions- und AFP-Kontrolle.

ist die Ratenkonstante der durch AFP inhibierten Eisrekristallisation. Sie hängt von der AFP-Konzentration c und zum Teil vom Eisanteil Q_v ab. Der zeitabhängige Faktor β gibt an, zu welcher Zeit t die Diffusion bzw. der Flüssig-Fest-Übergang die Rekristallisationsgeschwindigkeit bestimmt. Zum Zeitpunkt t_s ist $\beta(t) = 0.5$. Beide Prozesse tragen in gleichem Maße zur Gesamtgeschwindigkeit der Rekristallisation bei. Für $\beta < 0.5$ dominiert die Diffusionskontrolle, für $\beta > 0.5$ bestimmt die Adsorption der AFP die Rekristallisationsgeschwindigkeit. Im obigen Beispiel einer AFP-Konzentration von $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ liegt t_s bei ungefähr 30 Minuten. Bei der reinen Saccharoselösung ist t_s größer 120 Minuten und β damit während der gesamten Beobachtungszeit gleich Null. Bei größeren AFP-Konzentrationen ist t_s sehr klein und für β ergibt sich damit ein Wert von Eins.

Zur Beschreibung der AFP-Effektivität ist nur k_i relevant, da nur k_i von der AFP-Konzentration abhängt. Daher wird im Folgenden immer dann, wenn zwei Prozesse während der Rekristallisation auftreten, die kleinere Ratenkonstante k_i verwendet. Zur Vereinfachung wird zudem die Ratenkonstante k_l eingeführt. k_l ist die Ratenkonstante des limitierenden Prozesses. Bei kleinen AFP-Konzentrationen gilt $k_l = k_d$, bei großen Konzentrationen gilt $k_l = k_i$. Damit ist k_l eine Funktion des Eisanteils Q_v und der AFP-Konzentration c .

Auch bei konstantem Einwaagemassenanteil wird eine gewisse Variation in k_d beobachtet, die zum Teil durch leicht unterschiedliche Eisanteile erklärt werden kann. Zudem führt

die Zugabe von weiteren Additiven zu den Saccharoselösungen zu einer Veränderung des Schmelzpunkts und damit auch des Eisanteils. Um allein den Effekt der Additive auf die Rekristallisationsratenkonstante betrachten zu können, wird k_l in Gleichung 3.26 anhand der Anpassungen in Unterabschnitt 3.4.3 mit dem Eisanteil skaliert (Budke et al., 2009).

$$k_{l0}(c) = \frac{k_{d0} \cdot k_l(Q_v, c)}{k_d(Q_v)} \quad (3.26)$$

Die neue Ratenkonstante k_{l0} für $Q_v \rightarrow 0$ ist nun allein von der AFP-Konzentration abhängig. Für sehr kleine Konzentrationen geht k_{l0} gegen k_{d0} , die diffusionsbestimmte Ratenkonstante in diesem Fall. Das Ergebnis dieser Skalierung ist in Abbildung 3.21a am Beispiel des AFGP **38a** dargestellt. Dieses Glykopeptid besteht aus 3 Wiederholeinheiten. Am Threonin ist ein Monosaccharid (GalNAc) gebunden. Mehrere Experimente bei gleicher AFP-Konzentration sind aus Gründen der Übersichtlichkeit in einem mittleren Wert für k_l bzw. k_{l0} zusammengefasst, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Dies gilt für alle nachfolgenden Auftragungen dieser Art.

Die in Abbildung 3.21 dargestellten Kurven basieren auf der Anpassung der Hill-Gleichung 3.27 an die Mittelwerte.

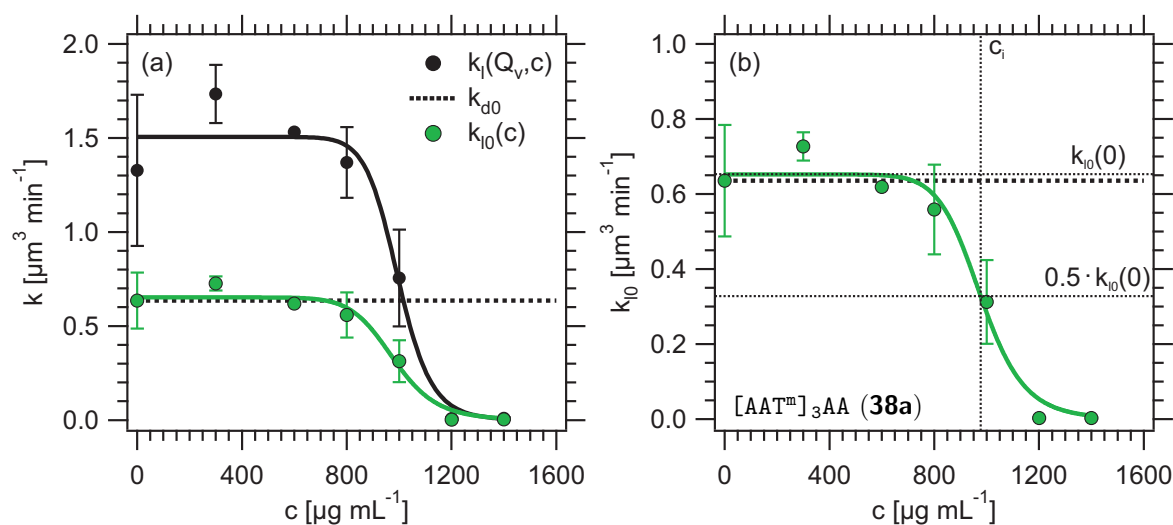


Abbildung 3.21: Skalierung der limitierenden Rekristallisationsratenkonstante $k_l(Q_v, c)$ zur Bestimmung der eisanteil-unabhängigen Ratenkonstante k_{l0} . (a) Vergleich zwischen den Originaldaten (schwarze Punkte) und den skalierten Werten (grüne Punkte). (b) Anpassung der Hill-Funktion an die skalierten Datenpunkte. Die Punkte stehen jeweils für den Mittelwert mehrerer Experimente bei gleicher AFP-Konzentration. Es sind Daten vom AFGP **38a** gezeigt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Linien basieren auf den Anpassungen von Gleichung 3.27 an die Daten.

$$k_{l0}(c) = k_{l0}(0) - \frac{k_{l0}(0)}{1 + \left(\frac{c_i}{c}\right)^s} \quad (3.27)$$

Der Grenzwert $k_{l0}(0)$ entspricht dabei der limitierenden Ratenkonstante skaliert für Q_v gegen Null bei der Konzentration $c = 0$. Somit sollte er k_{d0} entsprechen. Bei dem hier gezeigten Beispiel stimmen beide Werte perfekt überein ($k_{l0}(0) = k_{d0} = 0.65 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$). Die Inhibierungskonzentration c_i gibt den Punkt des Wechsels zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle an. Sie stellt damit eine sinnvolle Größe zur Beschreibung der Antigefrier-effektivität dar. Es gilt $k_{l0}(c_i) = 0.5 \cdot k_{l0}(0)$. Im Fall des hier gezeigten Peptids liegt c_i bei Betrachtung von $k_{l0}(c)$ bei $978 \mu\text{g mL}^{-1}$. Bei Anpassung von Gleichung 3.27 an die Originaldaten ohne Skalierung wird ein Wert von $996 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhalten. c_i wird also im hier betrachteten Beispiel durch die Skalierung kaum beeinflusst. Der Exponent s in Gleichung 3.27 ist ein Maß für die relative Breite des Übergangs. Mit einem Wert von 11.8 ist dieser hier vergleichsweise schmal. Je kleiner s , desto breiter ist der Übergang. Die absolute Breite des Übergangs hängt allerdings mit der Lage von c_i zusammen. Für c_i z. B. $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $s = 10$ liegt der Übergang von der diffusionskontrollierten Rekristallisation ($k_{l0} \approx k_{d0}$) hin zur maximalen Rekristallisationsinhibierung ($k_{l0} \approx 0$) zwischen etwa 50 und $150 \mu\text{g mL}^{-1}$. Bleibt s bei 10, so werden für $c_i = 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ die Grenzwerte 500 und $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ erhalten. Absolut wird der Übergang also breiter, relativ gesehen bleibt er konstant.

3.6.2 AFP-Effektivität unter verschiedenen Bedingungen

Glykopeptide

Mit k_{l0} wird die Ratenkonstante des limitierenden Prozesses angegeben für einen theoretischen Eisanteil Q_v gleich Null. Im Fall der diffusionskontrollierten Rekristallisation entspricht sie k_{d0} bzw. k_{LSW} . Dies trifft im Bereich kleiner AFP-Konzentrationen zu. In Unterabschnitt 3.4.2 wurde gezeigt, wie k_{LSW} berechnet werden kann. Seine Größe wird lediglich durch zwei Faktoren bestimmt: die Art der Lösung (Natriumbromid oder Saccharose) und die Temperatur. In Abbildung 3.22a ist die Konzentrationsabhängigkeit von k_{l0} für ein AFGP mit 3 Wiederholeinheiten und einem Disaccharid (Gal-GalNAc) am Threonin dargestellt (AFGP **39a**). Hierbei wurden jeweils Saccharoselösungen bei -8°C untersucht. Die drei Messreihen unterscheiden sich lediglich in den Saccharosemassenanteilen und folglich im Eisanteil. Damit sollten die Werte für $k_{l0}(0)$ bei allen drei Messreihen gleich k_{d0} bei -8°C sein. Die Mittelwerte liegen im Bereich von 0.62 bis $0.73 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ und stimmen damit innerhalb der Schwankung auch gut überein. k_{d0} beträgt $0.65 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei -8°C .

In Abbildung 3.22b sind die Eisanteile der unterschiedlichen Messreihen dargestellt. Q_v steigt mit abnehmendem Saccharosemassenanteil. Die Mittelwerte von Q_v über den untersuchten Konzentrationsbereich des Peptids betragen 0.08 bei 45 Gew.-%, 0.09 bei 40 Gew.-% und 0.19 bei 30 Gew.-%. Wie in Abbildung 3.22a zu sehen ist, ergibt sich daraus keine Änderung im Verlauf von $k_{l0}(c)$. Dies hängt mit zwei gegenläufigen Trends

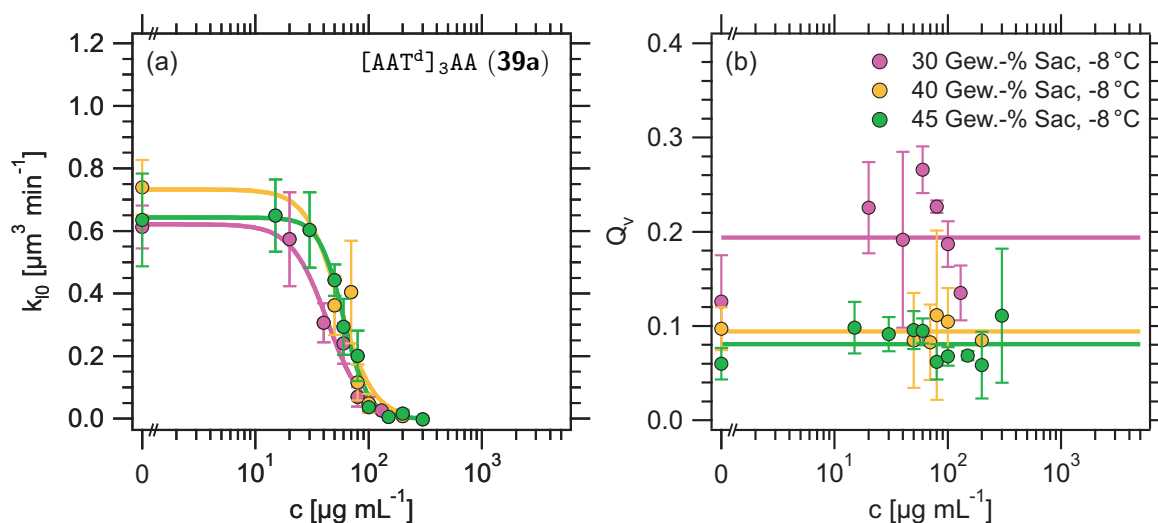


Abbildung 3.22: Beeinflussung der Effektivität von $[AAT^d]_3AA$ (**39a**) durch den Eisanteil (a) bei gleicher Temperatur. (b) Erniedrigung des Eisanteils mit steigendem Saccharosemassenanteil.

zusammen. Wenn die Peptide nicht oder nur zu geringen Teilen ins Eis eingebaut werden, steigt die AFP-Konzentration in der Lösung mit der Erhöhung des Eisanteils an. Daraus ergibt sich eine erhöhte Effektivität und c_i sollte zu kleineren Konzentrationen verschoben sein. Mit der Zunahme des Eisanteils nimmt jedoch auch die Grenzfläche zwischen Eis und Lösung zu (siehe Unterabschnitt 3.4.3). Die Konzentration von AFP auf der Eisoberfläche bestimmt die Effektivität. Da Konzentration und Eisoberfläche in gleichem Maße größer werden, ändert sich die Effektivität mit steigendem Eisanteil nicht. c_i nimmt nur geringfügig mit steigendem Q_v ab. Bei 45 Gew.-% ($Q_v = 0.08$) beträgt c_i $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$). Der Wert sinkt auf $55 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($28 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei 40 Gew.-% ($Q_v = 0.09$) und auf $43 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($22 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei 30 Gew.-% ($Q_v = 0.19$).

Deutlich verändert sich $k_{10}(c)$ allerdings mit der Temperatur, wie in Abbildung 3.23a zu sehen ist. Zum einen verändert sich k_{d0} , die diffusionsbestimmte Ratenkonstante für $Q_v \rightarrow 0$. Bei -25°C und Natriumbromidlösungen liegt k_{d0} bei $2.68 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Der Wert sinkt auf $1.56 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei -6°C und Saccharoselösungen. Die kleinste Ratenkonstante beträgt hier $0.65 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei -8°C . Die Eisanteile sind mit 0.12, 0.06 und 0.08 bei den unterschiedlichen Bedingungen ähnlich den vorangegangenen (Abbildung 3.23b). Neben k_{d0} ändert sich auch c_i . Der Übergang zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle verschiebt sich von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -25°C (30 Gew.-% Natriumbromid) über $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -8°C (45 Gew.-% Saccharose) auf $156 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($78 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -6°C (40 Gew.-% Saccharose). Mit steigender Temperatur nimmt c_i zu, die Effektivität nimmt also ab.

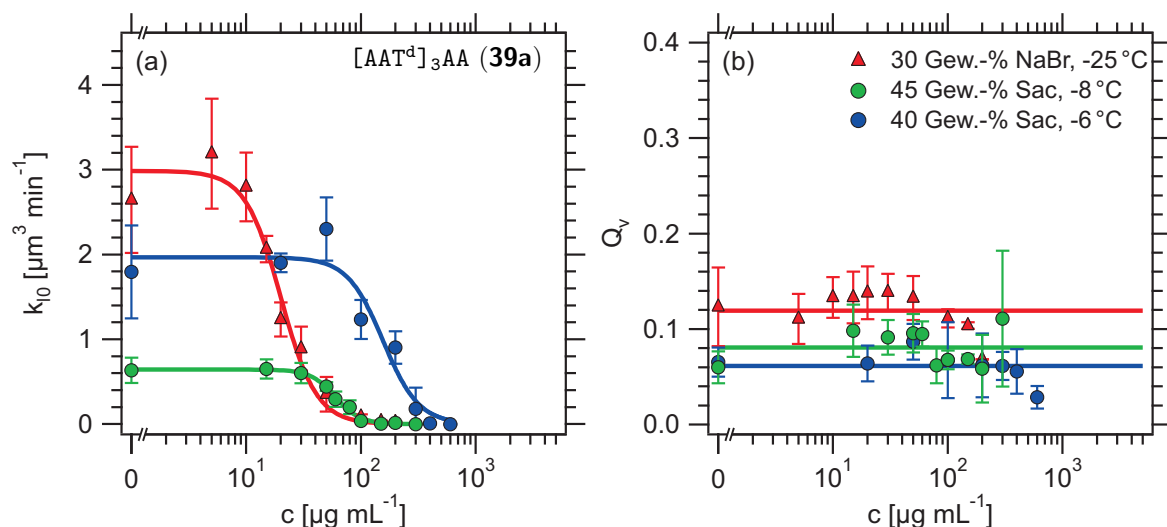


Abbildung 3.23: Beeinflussung der Effektivität von [AAT^d]₃AA (**39a**). (a) Einfluss der Temperatur auf die Rekristallisationsgeschwindigkeit. (b) Eisanteile bei den jeweiligen Bedingungen.

Polymere

Ein ähnliches Bild wie beim AFGP **39a** ergibt sich in Abbildung 3.24, in der die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Lösungen von PVA dargestellt sind. An dieser Stelle wird PVA6 (**29a**) mit einer Molmasse von $5\,800 \text{ g mol}^{-1}$ betrachtet. Bei konstanter Temperatur (-8°C) zeigt sich eine Änderung in der Effektivität mit dem Eisanteil. Da die Werte für k_{l0} aber auch bei gleicher PVA-Konzentration stark variieren, ist die Differenz in c_i von $359 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($62 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei 40 Gew.-% Saccharose zu $590 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($102 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei 45 Gew.-% nicht als sehr ausgeprägt einzustufen.

Mit $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.6 \mu\text{mol L}^{-1}$) liegt c_i bei -25°C (30 Gew.-% Natriumbromid) hingegen deutlich tiefer als bei -8°C (Abbildung 3.25): Die Effektivität von PVA6 ist stark erhöht. Bei -6°C fällt die zu erwartende Steigerung von c_i mit einem Wert von $628 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($108 \mu\text{mol L}^{-1}$) allerdings sehr gering aus. Trotzdem ist eine Verschiebung der Kurve $k_{l0}(c)$ ersichtlich. Die Konzentration maximaler Effektivität bei $k_{l0} \approx 0$ steigt von $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4.3 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -25°C über etwa $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($140 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -8°C auf rund $2\,500 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($430 \mu\text{mol L}^{-1}$) bei -6°C . Allerdings verändert sich bei PVA6 auch die Breite der Kurven. s sinkt von 9.03 bei -25°C über 4.79 bei -8°C auf 1.68 bei -6°C . Der Übergang zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle wird breiter.

Beim zuvor betrachteten AFGP (**39a**) ist eine große Änderung von s nicht zu beobachten. Vier der fünf Kurven (Abbildung 3.22a und Abbildung 3.23a) besitzen Werte für s zwischen 2.72 und 2.92. Lediglich die Messreihe bei -8°C und einem Saccharosemassenanteil von 45 Gew.-% ist mit $s = 3.99$ etwas schmaler als die anderen. Neben der Breite der Übergänge fällt die Variation der Ratenkonstanten beim PVA6 größer aus als beim AFGP. Damit ist die Lage von c_i weniger genau bestimmt und präzise Aussagen über den Einfluss von Eisanteil und Temperatur sind schwieriger.

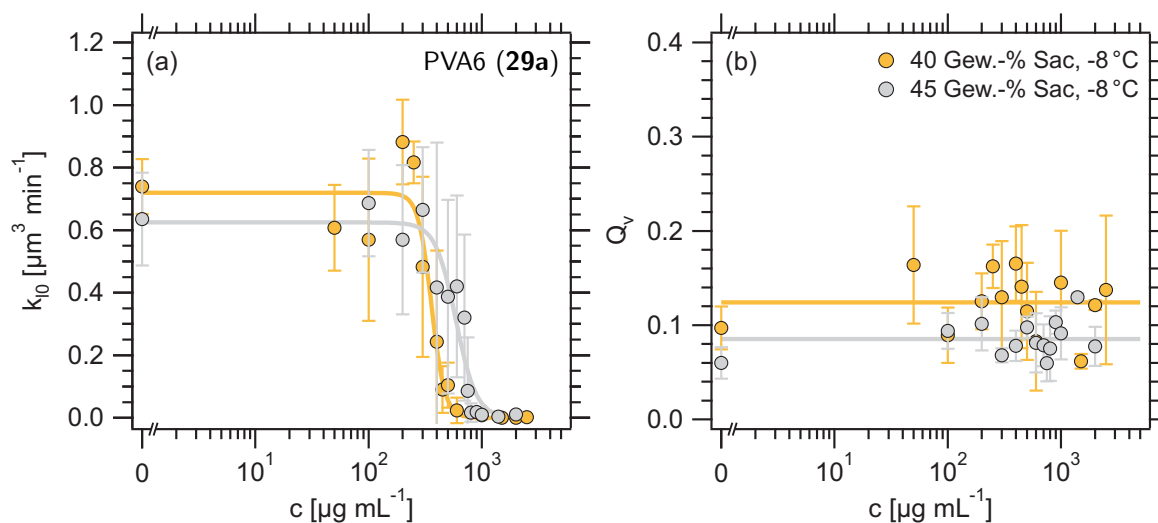


Abbildung 3.24: Beeinflussung der Effektivität von PVA6 (**29a**). (a) Einfluss des Eisanteils auf die Rekristallisationsgeschwindigkeit bei gleicher Temperatur. (b) Erniedrigung des Eisanteils mit steigendem Saccharosemassenanteil.

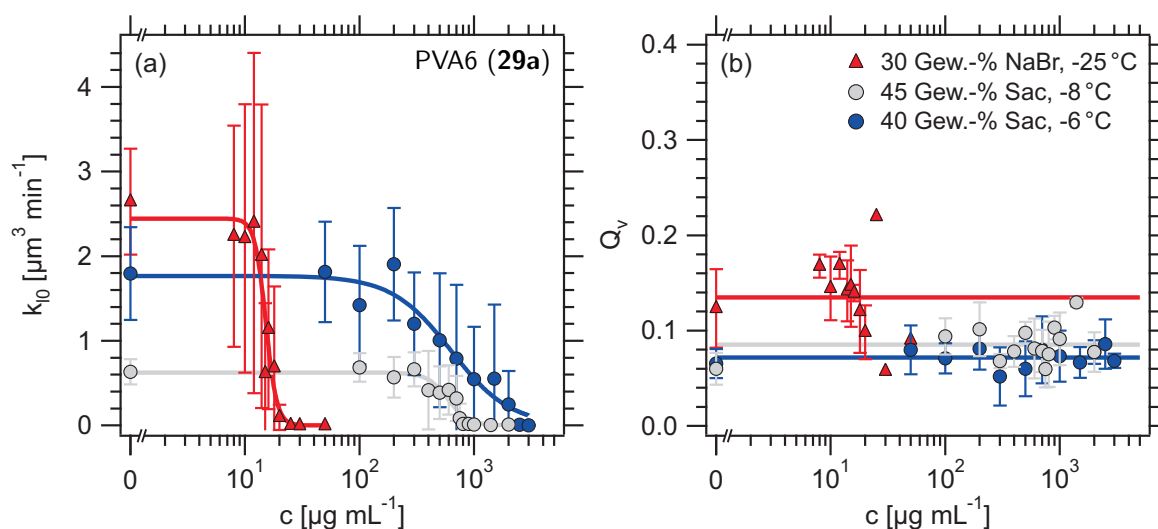


Abbildung 3.25: Beeinflussung der Effektivität von PVA6 (**29a**). (a) Einfluss der Temperatur auf die Rekristallisationsgeschwindigkeit. (b) Eisanteile bei den jeweiligen Bedingungen.

Eindeutig zeigt sich jedoch der Unterschied zwischen den Natriumbromidlösungen (30 Gew.-%) bei -25 °C und den Saccharoselösungen (45 Gew.-%) bei -8 °C in Abbildung 3.26a bei Betrachtung von PVA27 (**29b**) mit einer Molmasse von 27000 g mol^{-1} . c_i steigt von $5.8\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.21\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) bei -25 °C auf $32\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$) bei -8 °C an. Q_v beträgt 0.11 bzw. 0.08 (Abbildung 3.26b). s ändert sich hier mit steigender Temperatur praktisch nicht, der Wert steigt von 3.54 auf 3.72.

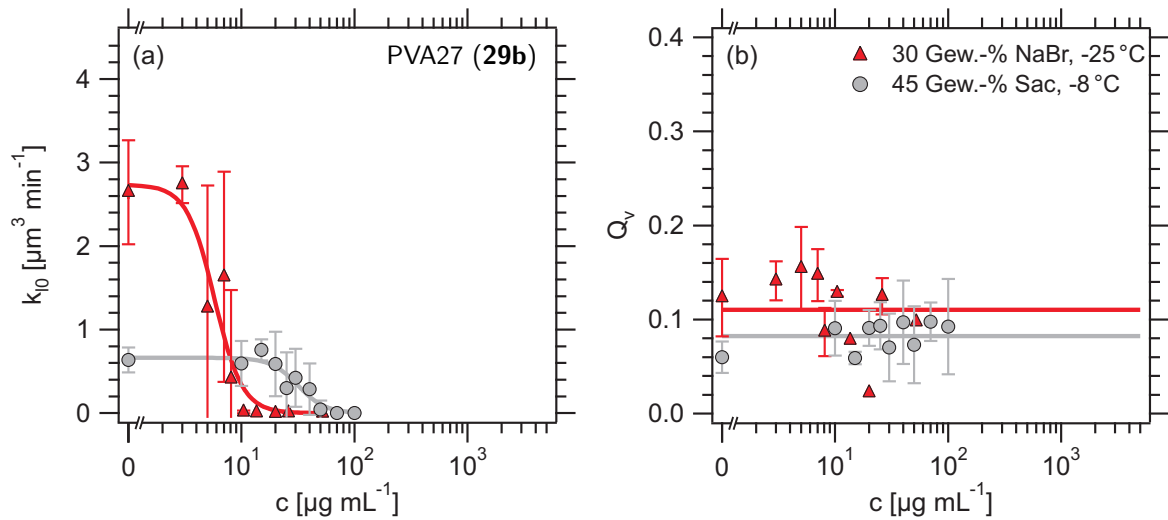


Abbildung 3.26: Beeinflussung der Effektivität von PVA27 (**29b**). (a) Einfluss der Temperatur auf die Rekristallisationsgeschwindigkeit. (b) Eisanteil bei den jeweiligen Bedingungen.

Zusammenfassung

In diesem Abschnitt wurde die Wirkung unterschiedlicher Versuchsbedingungen auf die Effektivität eines Glykopeptids und zweier PVA-Varianten mit verschiedenen Kettenlängen beschrieben. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.27 zusammengefasst. Die Effektivität unter den jeweiligen Bedingungen wird dabei durch die Inhibierungskonzentration c_i in $\mu\text{mol L}^{-1}$ dargestellt.

Beim AFGP **39a** wird die höchste Effektivität bei -25°C in Natriumbromidlösungen erreicht. c_i beträgt hier nur $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Leicht herabgesetzt ist die Effektivität bei -8°C , wobei die Variation des Saccharosemassenanteils bei dieser Temperatur zu keiner signifikanten Änderung von c_i führt: Im Mittel liegt der Wert bei $27 \mu\text{mol L}^{-1}$. Erhöhung der Temperatur auf -6°C führt zu einer weiteren Abnahme der Effektivität ($c_i = 78 \mu\text{mol L}^{-1}$). Ein ähnliches Ergebnis wird für PVA6 (**29a**) erhalten. Hier fällt der Unterschied zwischen den Natriumbromidlösungen bei -25°C und den Saccharoselösungen bei -8°C allerdings sehr viel größer aus. c_i steigt von $2.6 \mu\text{mol L}^{-1}$ bei 30 Gew.-%-Natriumbromidlösungen (-25°C) auf $62 \mu\text{mol L}^{-1}$ bei den 40 Gew.-%-Saccharoselösungen (-8°C). Erhöhung des Saccharosemassenanteils auf 45 Gew.-% führt zu einem leichten Anstieg von c_i auf $102 \mu\text{mol L}^{-1}$. Die Temperaturerhöhung auf -6°C bewirkt im Fall von PVA6 im Gegensatz zum AFGP keine weitere deutliche Effektivitätsabnahme, c_i beträgt bei -6°C $108 \mu\text{mol L}^{-1}$. Durch diese Veränderungen im Vergleich zum AFGP **39a** ist eine Umkehrung der Effektivitäten zu beobachten. Bei -25°C ist das Polymer effektiver, bei -8 und -6°C hingegen das Glykopeptid.

PVA27 (**29b**) ist sowohl bei -25°C als auch bei -8°C effektiver als PVA6 oder AFGP **39a**. c_i wächst beim PVA27 von $0.21 \mu\text{mol L}^{-1}$ bei -25°C in Natriumbromidlösungen (30 Gew.-%) auf $1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ bei -8°C in Saccharoselösungen (45 Gew.-%) an.

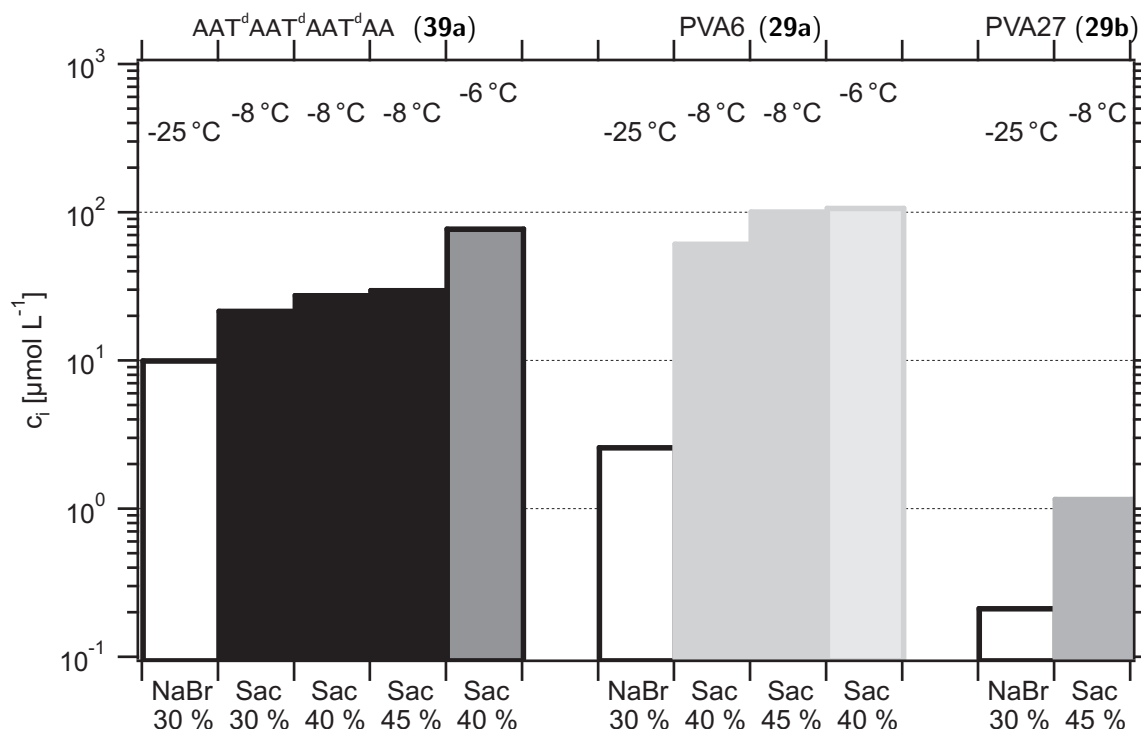


Abbildung 3.27: Zusammenfassung der Effektivitäten in unterschiedlichen Lösungen und bei verschiedenen Temperaturen, dargestellt durch die Inhibierungskonzentration c_i . Die Konzentrationen an Natriumbromid bzw. Saccharose sind in Gew.-% angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Saccharoselösungen je nach inhibierender Substanz Eisanteil bzw. Saccharosemassenanteil und Temperatur unterschiedlich stark die Effektivität beeinflussen. Beim AFGP wird die Effektivität eindeutig in erster Linie durch die Temperatur beeinflusst. Beim PVA hingegen scheint der Eisanteil ein wichtiger Faktor zu sein. Beim PVA ist allerdings zu beachten, dass die Ratenkonstanten stark variieren und dadurch der exakte Wert von c_i nicht so genau wie beim AFGP **39a** bestimmt werden kann. Die Konzentration maximaler Inhibierung ($k_{10} \approx 0$) deutet ebenfalls auf einen dominanten Temperatureffekt hin. Mit Erniedrigung der Temperatur wird diese Konzentration zu kleineren Werten verschoben. Vollständige Inhibierung der Rekristallisation tritt mit niedrigeren Temperaturen bereits bei kleineren Konzentrationen auf.

In jedem Fall ist die Effektivität bei -25 °C in Natriumbromidlösungen deutlich größer als bei -8 oder -6 °C in Saccharoselösungen. Dieser Unterschied ist wiederum bei den verschiedenen Substanzen unterschiedlich stark ausgeprägt. Am kleinsten fällt er beim AFGP aus. Hier wird c_i beim Wechsel von -25 °C auf -8 °C um den Faktor 3 erhöht. Mit einem Faktor von 5 liegt die Effektivitätsänderung beim PVA27 im selben Bereich. PVA6 hingegen weist einen Faktor von etwa 30 auf. Die Effektivität wird stark durch die sehr unterschiedlichen Versuchsbedingungen beeinflusst. Ob der Unterschied zwischen den Natriumbromid- und den Saccharoselösungen allein auf die veränderte Temperatur zurückzuführen ist, muss

noch abschließend geklärt werden. Ob die enorme Effektivitätserhöhung beim Schritt zu $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 Gew.-% Natriumbromid) zum Teil am Natriumbromid liegt, müssen weitere Untersuchungen von anderen Lösungen klären. Der direkte Vergleich verschiedener Lösungen bei derselben Temperatur ist hierzu nötig, lag aber nicht im Fokus der Aufgabenstellung dieser Arbeit.

3.6.3 Struktur-Wirkungs-Untersuchungen

Polymere

Zu den hier getesteten Polymeren gehören PVA, PEG und das Natriumsalz der Polyasparaginsäure (PAsSNa) (Tabelle 3.9). Aus der Literatur ist bekannt, dass PVA die Eisrekristallisation inhibiert (Knight et al., 1995; Budke und Koop, 2006; Gibson et al., 2009). Es kann daher als Referenzsubstanz für Antifrieraktivität stehen. PEG hingegen zeigt keine Antifriereigenschaften (Inada und Lu, 2003; Budke und Koop, 2006; Gibson et al., 2009). Es sollte daher die Rekristallisation nur wenig beeinflussen.

In Abbildung 3.28 sind die Kurvenverläufe $k_{l0}(c)$ der drei untersuchten PVA-Varianten dargestellt. Der Hydrolysegrad dieser Polymere unterscheidet sich nicht, alle sind mit Werten größer 95 % praktisch vollständig hydrolysiert. Die drei Polymere unterscheiden sich hingegen in ihren Molmassen. Das kleinste besteht mit einer Molmasse von $5\,800\text{ g mol}^{-1}$ aus etwa 80 Wiederholeinheiten (PVA6, **29a**). PVA27 (**29b**) ist mit $M_w = 27\,000\text{ g mol}^{-1}$ und $n = 600$ die mittlere Variante. Die größte PVA-Variante ist aus rund 3 300 Wiederholeinheiten aufgebaut und besitzt eine Molmasse von $145\,000\text{ g mol}^{-1}$ (PVA145, **29c**). Im linken Teil von Abbildung 3.28 ist k_{l0} als Funktion der PVA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$

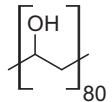
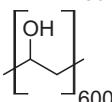
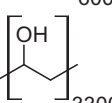
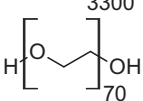
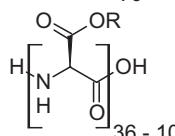
Name	Kürzel	Struktur	Nr.	Molmasse [g mol^{-1}]
Polyvinylalkohol	PVA6		29a	5 800
Polyvinylalkohol	PVA27		29b	27 000
Polyvinylalkohol	PVA145		29c	145 000
Polyethylenglycol	PEG3		30	3 000
Poly-L-asparaginsäure-natriumsalz	PAsSNa	 R = H oder Na	40	5 000 - 15 000

Tabelle 3.9: Einfach aufgebaute Polymere.

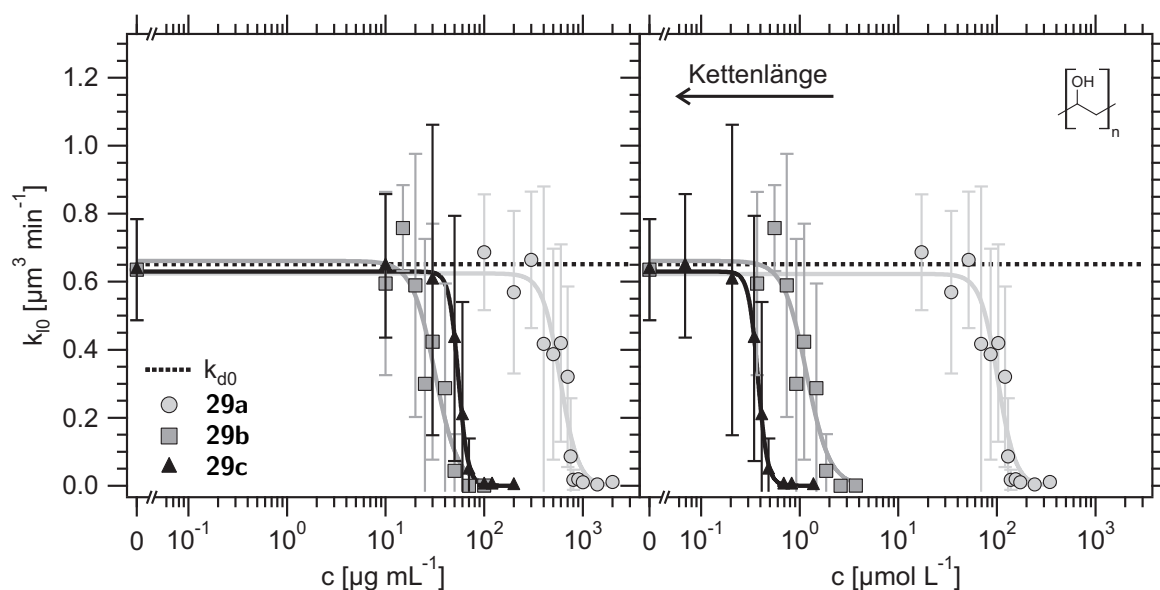


Abbildung 3.28: Molmassenabhängigkeit der Rekristallisationsinhibierung bei Polyvinylalkohol.

aufgetragen. Dabei ergibt sich die folgende Reihenfolge der Effektivität. Am wenigsten effektiv ist PVA6 ($c_i = 590 \mu\text{g mL}^{-1}$), danach kommt PVA145 ($c_i = 55 \mu\text{g mL}^{-1}$) und am effektivsten ist PVA27 ($c_i = 32 \mu\text{g mL}^{-1}$). Dieser Trend verändert sich bei Betrachtung der Konzentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$. Die Position von PVA6 bleibt mit $c_i = 102 \mu\text{mol L}^{-1}$ bestehen, aber die Reihenfolge von PVA27 und PVA145 kehrt sich um. Mit $c_i = 0,38 \mu\text{mol L}^{-1}$ ist PVA145 nun am effektivsten. Danach folgt PVA27 mit $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Beim PVA bestätigt sich damit der Trend höherer Antieffektivität mit zunehmender Kettenlänge (Inada und Lu, 2003). Besonders drastisch fällt dies beim Übergang von PVA6 zu PVA27 auf. Während die Kettenlänge um den Faktor 8 verlängert wird, verschiebt sich c_i ungefähr um den Faktor 80. PVA145 ist etwa 5 mal so lang wie PVA27, c_i erhöht sich im Vergleich nur um das Dreifache. Die Umkehrung der Reihenfolge dieser beiden PVA-Varianten beim Wechsel zwischen Massen- und Anzahl-Konzentration erklärt sich durch die großen Unterschiede in den Molmassen. Für die Hemmung der Eisrekristallisation ist die Polymer-Teilchenanzahl auf der Eisoberfläche und offensichtlich auch die Art des Teilchens entscheidend. Gleiche Massen-Konzentration bei unterschiedlichen Molmassen bedeutet eine größere Teilchenanzahl des PVA mit der kleineren Molmasse. Obwohl das 5 mal größere PVA145 pro Molekül betrachtet effektiver ist, ist es nicht 5 mal effektiver als PVA27.

Wie aus den Untersuchungen von Inada und Lu (2003), Budke und Koop (2006) und Gibson et al. (2009) ersichtlich, hemmt PEG die Eisrekristallisation nicht. Dieser Befund wird auch in dieser Arbeit erhalten. In Abbildung 3.29 ist gezeigt, dass selbst bei Konzentrationen von $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $2700 \mu\text{mol L}^{-1}$ die Rekristallisation durch PEG nicht gehemmt wird. Das hier untersuchte PEG3 besitzt eine Molmasse von 3000g mol^{-1} . Auffällig ist beim PEG zudem die breite Schwankung der Ratenkonstanten: Es werden

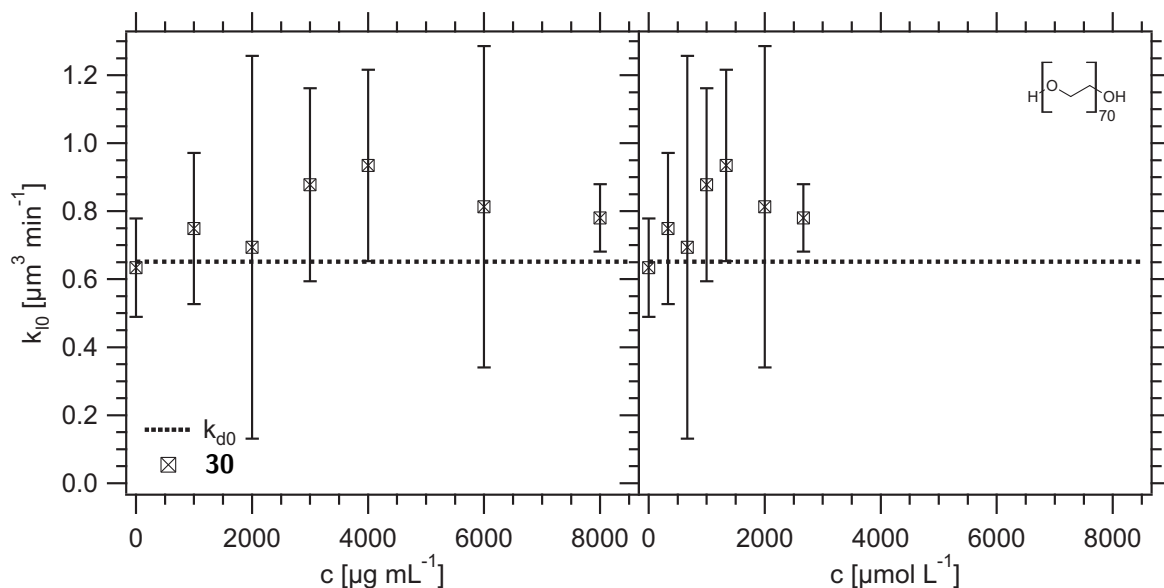


Abbildung 3.29: Rekrystallisation in wässrigen PEG-Lösungen.

absolute Ratenkonstanten k im Bereich von 0.42 bis $3.78 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ gefunden. Innerhalb reiner Saccharoselösungen (45 Gew.-%) schwanken die Werte hingegen nur zwischen 0.69 und $2.16 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Besonderes Augenmerk gilt den sehr kleinen Ratenkonstanten, da sie auf Antifriereigenschaften hindeuten könnten. Diese kleinen Werte gehen allerdings immer mit sehr kleinen Eisanteilen einher. Sie sind daher nicht auf eine Eisadsorption zurückzuführen.

Das Fehlen von Rekrystallisationsinhibierung beim PEG entspricht den bisherigen Beobachtungen, die in der Literatur beschrieben sind (Inada und Lu, 2003; Budke und Koop, 2006; Gibson et al., 2009). Worauf dies zurückzuführen ist, wird allerdings nicht diskutiert. Das Modell von Budke und Koop (2006) für die Eisadsorption von PVA basiert auf passenden Abständen zwischen den Hydroxygruppen entlang der Polymerkette. Diese Hydroxygruppen fehlen beim PEG, was vermutlich die Ursache der nicht beobachteten Inhibierung ist.

Beim Natriumsalz der Polyasparaginsäure (**40**, $M_w = 5\,000 - 15\,000 \text{ g mol}^{-1}$) wurden im Vergleich zum PEG sogar noch höhere Massen-Konzentrationen verwendet. Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, kann aber selbst bei $15\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $1\,500 \mu\text{mol L}^{-1}$ auch hier keine Inhibierung beobachtet werden.

Funakoshi et al. (2008) untersuchten die Wirkung des Ammoniumsalzes von Polyacrylsäure ($M_w \approx 12\,000 \text{ g mol}^{-1}$) auf die thermische Hysterese. Dabei bestimmten sie einen Wert von 0.03°C bei einer Konzentration von 300 mg mL^{-1} (25 mmol L^{-1}). Die gleiche TH wurde von Inada und Lu (2004) bei einer PVA-Konzentration von etwa 44 mg mL^{-1} (2.4 mmol L^{-1}) beobachtet ($M_w = 13\,000 - 23\,000 \text{ g mol}^{-1}$). Die Effektivität des Salzes der PAS ist also nur sehr gering. Dessen polyionischer Charakter ist vermutlich hierfür die Ursache und könnte daher auch der Grund für das Fehlen von Antifriereigenschaften beim in dieser Arbeit untersuchten PASNa sein. Die hier verwendete Untersuchung der Eisre-

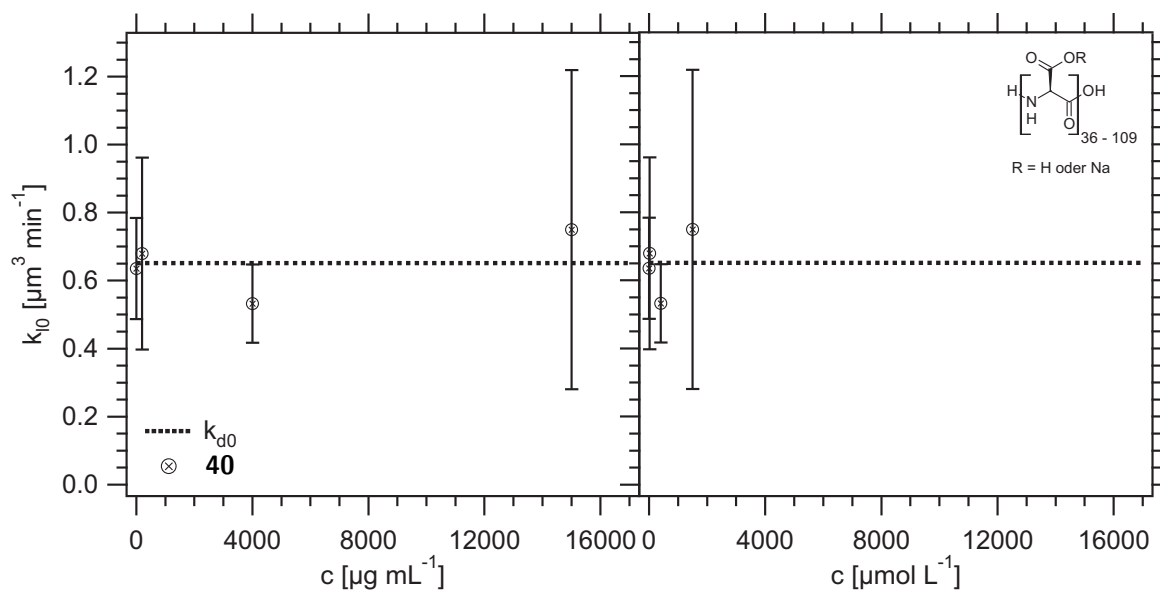


Abbildung 3.30: Rekristallisation in wässrigen Lösungen, die das Natriumsalz der Polyasparaginsäure enthalten.

kristallisation ist jedoch um ein Vielfaches sensitiver als die Untersuchung der thermischen Hysterese. PVA6 hemmt die Rekristallisation schon bei $590 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($102 \mu\text{mol L}^{-1}$). Diese molare Konzentration ist etwa 20-mal kleiner als beim TH-Experiment von Inada und Lu (2004), in dem bei 50 mg mL^{-1} (2.8 mmol L^{-1}) eine Hysterese von maximal 0.04°C beobachtet wurde. Angenommen PASNa und das Ammoniumsalz der PAS würden eine ähnliche Effektivität aufweisen, bedeutete es eine Konzentration von $c_i \gtrsim 10 \text{ mg mL}^{-1}$ (1.0 mmol L^{-1}) für die Rekristallisationsexperimente. Es wurde hier allerdings sogar eine größere Konzentration verwendet und dennoch keine Inhibierung festgestellt. Die gleiche Beobachtung machten Gibson et al. (2009) bei der Untersuchung mehrerer Polymere, darunter auch verschiedene Polyaminosäuren. Weder Polylysin·HBr noch Natriumpolyglutamat zeigten einen Effekt auf die Eisrekristallisation. Polyhydroxyprolin hemmte die Rekristallisation bei einer Konzentration von 40 mg mL^{-1} in geringem Maße, seine Effektivität ist damit ebenfalls nur sehr gering.

Klick-Chemie

In der vorliegenden Arbeit sind mehrere Peptoide und auch Peptide untersucht worden, bei denen die Verknüpfung zwischen Rückgrat und Kohlenhydrat mittels Klick-Chemie erzeugt wurde (Tabelle 3.10). Wie in Abschnitt 2.4 bereits erläutert wurde, handelt es sich bei der Klick-Reaktion um eine [3+2]-Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin. Der Aufbau der Kette erfolgte bei allen hier untersuchten Klick-Chemie-Verbindungen mittels Fmoc-Festphasenpeptidsynthese (Fmoc-SPPS). Aufgrund der Syntheseroute kann aber variiert werden, wann Rückgrat und Kohlenhydrat verknüpft werden. Bei der Route A wird die Verknüpfung zuerst durchgeführt und dann die Kette mit den glykosylier-

ten Bausteinen aufgebaut. Bei der Route B wird zunächst die Peptoidkette an der festen Phase aufgebaut und anschließend die Klick-Reaktion mit dem noch am Harz befindlichen Polymer durchgeführt. Eine ausführliche Beschreibung der Syntheseroute ist der Arbeit von Norgren et al. (2009) zu entnehmen.

Das Vorbild der in dieser Arbeit untersuchten Klick-Chemie-Verbindungen (Tabelle 3.10) sind die natürlichen AFGP. Dennoch unterscheiden sie sich in mehreren Punkten. Aufgrund der Klick-Chemie sind bei allen aufgeführten Verbindungen Rückgrat und Kohlenhydrat über ein Triazol verknüpft. Des Weiteren besitzen die Verbindungen keinen typischen *C*-Terminus (Carboxyl) sondern stattdessen ein Amid. Die Verbindungen **41**, **42** und **43** sind reine Peptoide. Das Rückgrat besteht bei allen drei Verbindungen aus 4 Wiederholungen von 3 *N*-Methylglycin-Einheiten, wobei am ersten jeweils das Kohlenhydrat gebunden ist. Die Kohlenhydrate sind β -Galaktose (**41**), α -Galaktose (**42**) und β -*N*-Acetylglukosamin (**43**). Bei den Verbindungen **44** und **45** ist das Kohlenhy-

Struktur	Sequenz	Nr.	Masse [Da]
	$[G^{\beta}GG]_4$	41	1 786.72
	$[G^{\alpha}GG]_4$	42	1 786.72
	$[G^bGG]_4$	43	1 950.93
	$[G^bAA]_4$	44	1 950.93
	$[A^bAA]_4$	45	1 950.93

Tabelle 3.10: Mit Klick-Chemie synthetisierte Verbindungen nach Norgren et al. (2009).
G: *N*-Methylglycin. A: Alanin.

drat ebenfalls β -*N*-Acetylglukosamin. Das Rückgrat beider Verbindungen besteht wieder aus 4 Wiederholungen von drei Untereinheiten. Diese sind bei Verbindung **44** allerdings aus *N*-Methylglycin, an dem wieder das Kohlenhydrat gebunden ist, und zweimal Alanin aufgebaut. Bei Verbindung **45** besteht das Rückgrat aus Alanin-Tripeptideinheiten. Das Kohlenhydrat ist hier am β -Kohlenstoff des jeweils ersten Alanins gebunden.

In Abbildung 3.31 sind die Ergebnisse der Rekrystallisationsuntersuchungen der Klick-Chemie-Verbindungen dargestellt. Keine inhibiert signifikant die Eisrekrystallisation. Die maximale untersuchte Konzentration beträgt $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\approx 1000 \mu\text{mol L}^{-1}$). Ausgenommen davon ist Verbindung **45**, bei der die maximale Konzentration $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2050 \mu\text{mol L}^{-1}$) beträgt. Bei dieser Konzentration ist hier eine leichte Erniedrigung von k_{10} zu beobachten. Der Mittelwert liegt mit $0.46 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ allerdings nicht signifikant tiefer als k_{d0} ($0.65 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$). Vollständiges Aufhalten der Rekrystallisation konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Aufgrund der Vielzahl von strukturellen Veränderungen der Klick-Chemie-Produkte im Vergleich zum natürlichen AFGP ist eine Zuordnung der Effektivitätsänderung zu bestimmten Strukturelementen schwierig. In den Arbeiten von Tachibana et al. (2004a) wurden 3 essentielle Motive für die Aktivität von AFGP identifiziert. Dazu gehört die Acetamidgruppe in der C2-Position, die auch bei den Klick-Chemie-Verbindungen **44** und **45** vorliegt. Dazu zählen weiterhin die α -Konfiguration der *O*-glykosidischen Bindung zwischen dem Kohlenhydrat und der Peptidkette und die γ -Methylgruppe des Threonins. Da das Kohlenhydrat bei den Verbindungen **44** und **45** weder in der α -Konfiguration gebunden ist noch an einem Threonin, könnte das Fehlen beider oder einer dieser Struktur motive hier entscheidend sein. Czechura et al. (2008) konnten anhand einiger synthetischer Analoga zeigen, dass weder das Entfernen der Acetamidgruppe noch ein Spacer zwischen

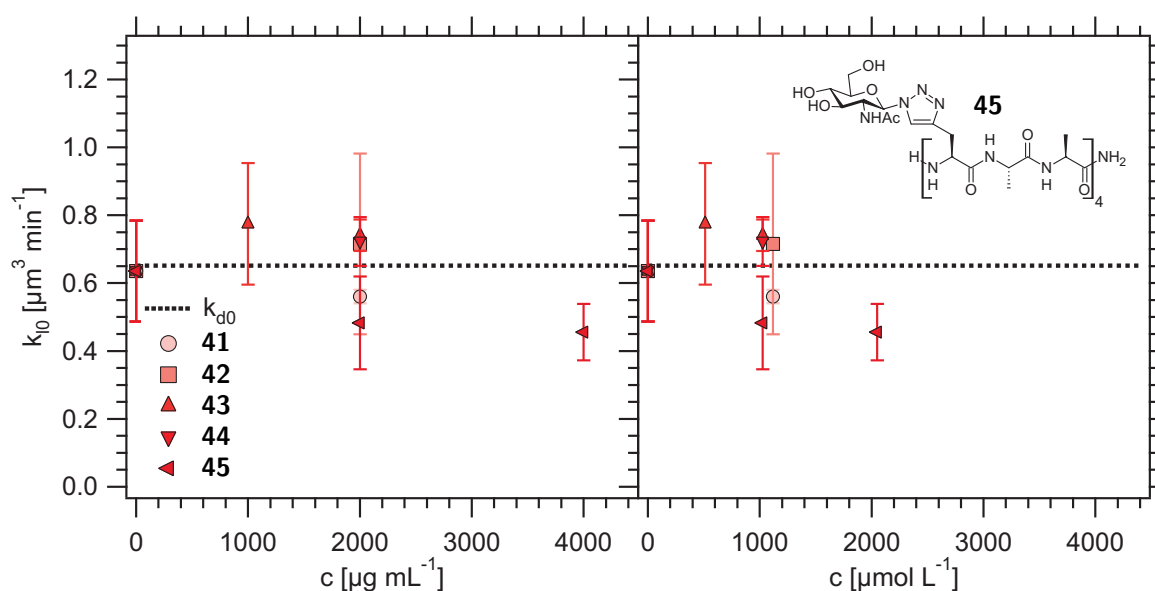


Abbildung 3.31: Rekrystallisation in wässrigen Lösungen, die Klick-Chemie-Produkte enthalten.

Rückgrat und Kohlenhydrat zum vollständigen Verlust der Antigefriereigenschaften führen muss. Des Weiteren ist auch der Austausch von Alanin gegen Glycin im Rückgrat nicht zwingend mit einem Verlust der Antigefrieraktivität verbunden. Allerdings zeigen Analoga, bei denen Glukose, Mannose oder Talose an die Stelle von Galaktose treten, keinerlei inhibierende Wirkung mehr. Die Untersuchung weiterer Analoga, bei denen weniger umfassende Veränderungen zum natürlichen AFGP vorliegen, sollte mehr Klarheit bringen. Die bisherigen Beobachtungen zeigen, dass die hier untersuchten Klick-Chemie-Verbindungen nicht inhibierend wirken. Welches Strukturmotiv in welchem Maße dafür verantwortlich ist, kann jedoch nicht aufgeklärt werden.

Glykopeptide

Der wichtigste Schritt in der Syntheseroute der in Tabelle 3.11 aufgeführten Peptide ist wie bei den Klick-Chemie-Verbindungen die SPPS. Bei der Darstellung der AFGP **39a** und **39b**, die ein Disaccharid-Kohlenhydrat (Gal-GalNAc) besitzen, wird zunächst ein Threonin-Baustein mit *O*-glykosidisch gebundener Disaccharidgruppe erzeugt und dieser dann in der anschließenden Fmoc-SPPS in einem Mikrowellen-Peptid-Synthesizer eingesetzt. Die übrigen Verbindungen werden in ähnlicher Weise synthetisiert. Details können den Arbeiten von Plattner (2009) und Heggemann et al. (2010) entnommen werden.

Zur Beurteilung der Rekristallisationsexperimente werden von Plattner (2009) aufgenommene CD-Spektren herangezogen. Dabei wurden Lösungen der Peptide in reinem Wasser verwendet. Die dort aufgeführte Analyse der Spektren umfasst mehrere Programme und Basissätze. Dies führt zu Unterschieden in den gefundenen Anteilen von bestimmten Sekundärstrukturen. Im Folgenden sind jeweils durchschnittliche Werte angegeben. Des Weiteren ist anzumerken, dass die Analyse der Spektren auf Basissätzen von Proteinen basiert. Da aber Peptide untersucht wurden, sind die Ergebnisse lediglich als Hinweise zu verstehen, präzise Aussagen sind nicht möglich.

Die meisten der natürlichen AFGP bestehen aus (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten, wobei am Threonin ein Disaccharid aus Galaktose und *N*-Galaktosamin *O*-glykosidisch gebunden ist. Diese AFGP kommen mit Wiederholeinheiten von $n = 4$ bis 50 und damit Massen von $m = 2.6$ bis 33.0 kDa vor. Das kleinste dieser Proteine mit 4 Wiederholeinheiten und einer Masse von 2.6 kDa wird als AFGP 8 bezeichnet. Dieses Peptid (**39b**) wurde von Plattner (2009) synthetisiert und im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die hierbei beobachtete Veränderung von k_{10} mit der AFP-Konzentration ist in Abbildung 3.32 dargestellt (rote Symbole). Mit einem Übergang zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation bei $0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$) ist es die effektivste, im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Verbindung.

Zu einer dramatischen Reduktion der Effektivität führt die Verkürzung von AFGP 8 (**39b**) um eine Wiederholeinheit. AFGP **39a** (grüne Symbole) mit 3 Tripeptideinheiten weist einen Wert für c_i von $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) auf. Um die gleiche Antigefriereeaktivität wie ein Molekül AFGP **39b** zu erreichen, sind also etwa 340 Moleküle des kleineren AFGP **39a** nötig. Die Masse wird dabei lediglich um den Faktor 1.3 von 2 594 zu 1 986 Da reduziert.

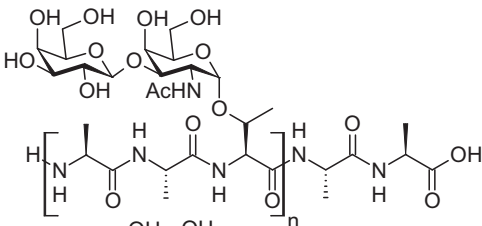
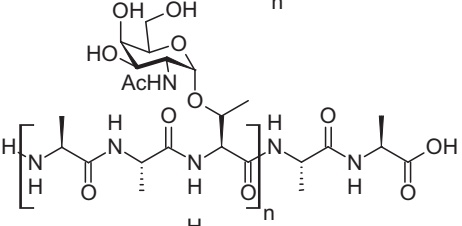
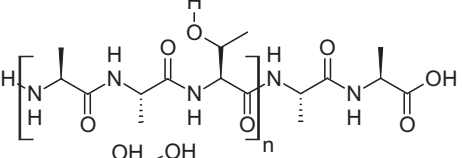
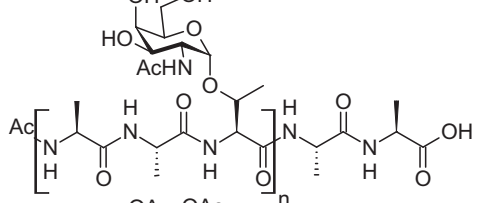
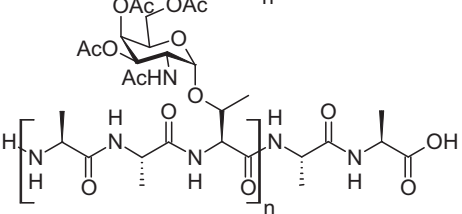
Struktur	Sequenz	n	Nr.	Masse [Da]
	[AAT ^d] _n AA	3	39a	1 985.95
		4	39b	2 594.54
	[AAT ^m] _n AA	3	38a	1 499.53
		4	38b	1 945.98
		5	38c	2 392.43
	[AAT] _n AA	4	46	1 133.21
	Ac-[AAT ^m] _n AA	2	47a	1 095.11
		3	47b	1 541.56
	[AAT ^a] _n AA	5	48	3 022.98

Tabelle 3.11: Antifrier(glyko)peptide mit (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheit. A: Alanin. T: Threonin.

Deutlich weniger drastisch fällt die Abnahme der Antifriereffektivität bei AFGP mit Monosaccharid-Kohlenhydraten (GalNAc) aus (Abbildung 3.33). Untersucht wurden Peptide mit 3, 4 und 5 Wiederholeinheiten (**38a,b,c**). Mit $c_i = 978 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($652 \mu\text{mol L}^{-1}$) ist AFGP **38a** am wenigsten effektiv. Danach folgen AFGP **38b** mit $41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($21 \mu\text{mol L}^{-1}$) und AFGP **38c** mit $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$). Um das effektivste Peptid **38c** zu ersetzen, wird demnach die 17fache molare Konzentration an AFGP **38b** bzw. das 520fache an AFGP **38a** benötigt.

Bemerkenswert ist neben der Effektivitätsänderung die Veränderung der Kurvenform beim Vergleich der drei Peptide **38a**, **38b** und **38c**. Mit $s = 12$ ist der Übergang zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle beim AFGP **38a** deutlich schmäler als bei den beiden anderen Peptiden. Hier liegen die Werte bei 3.0 (**38b**) und 3.8 (**38c**).

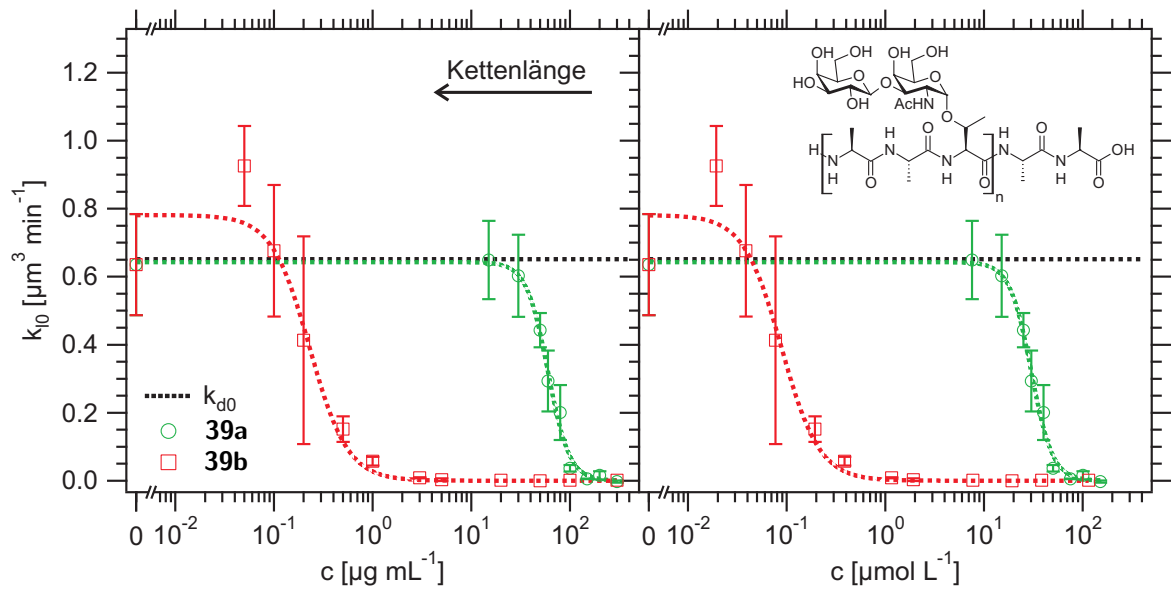


Abbildung 3.32: Molmassenabhängigkeit der Rekristallisationsinhibierung bei AFGP mit Disaccharid-Kohlenhydrat.

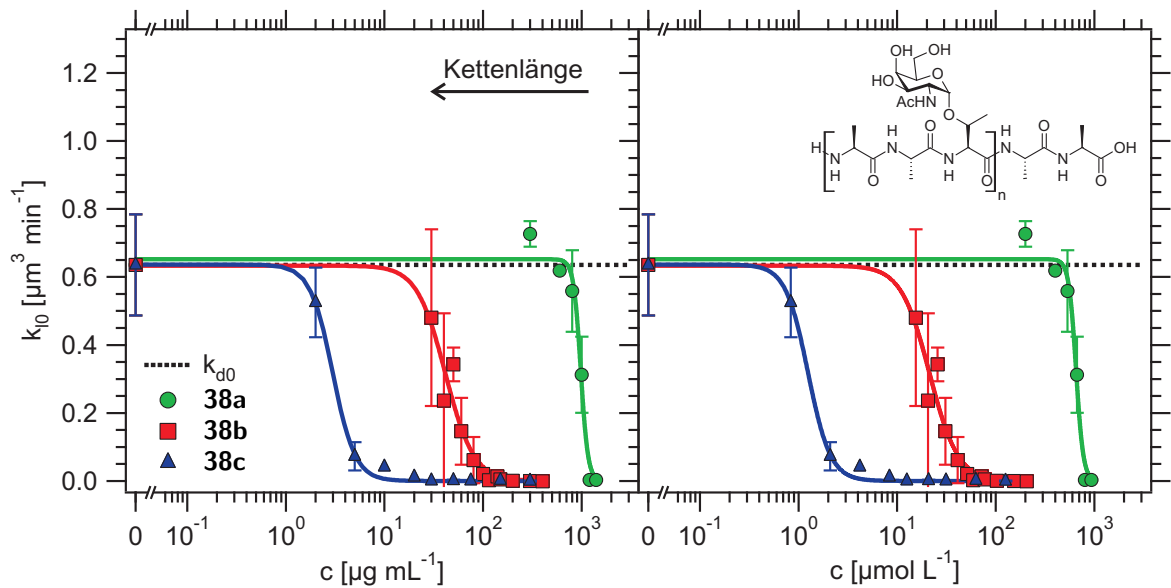


Abbildung 3.33: Molmassenabhängigkeit der Rekristallisationsinhibierung bei AFGP mit Monosaccharid-Kohlenhydrat.

In Abbildung 3.34 ist der Einfluss des Kohlenhydrats auf die Antigefriereffektivität gezeigt. Verglichen werden hier die Peptide **38a** und **39a**. Beide Peptide bestehen aus 11 Aminosäuren ($n = 3$). Beim AFGP **38a** ist am Threonin jedoch ein Monosaccharid (GalNAc) anstelle des Disaccharids (Gal-GalNAc) beim AFGP **39a** gebunden. Die Verkürzung des Kohlenhydrats führt zu einer ähnlichen Effektivitätsreduktion wie die Ent-

fernung einer Wiederholeinheit. c_i steigt von $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($30 \mu\text{mol L}^{-1}$) auf $978 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($652 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Der Unterschied zwischen Monosaccharid und Disaccharid fällt bei den Peptiden mit $n = 4$ noch größer aus (Abbildung 3.35). Hier erhöht sich c_i von $0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$) beim AFGP **39b** auf $41 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($21 \mu\text{mol L}^{-1}$) beim Peptid **38b**. Damit wird hier die Effektivität rund um das 200fache reduziert, also deutlich stärker als bei den Peptiden mit 3 Wiederholeinheiten (20fache Reduktion).

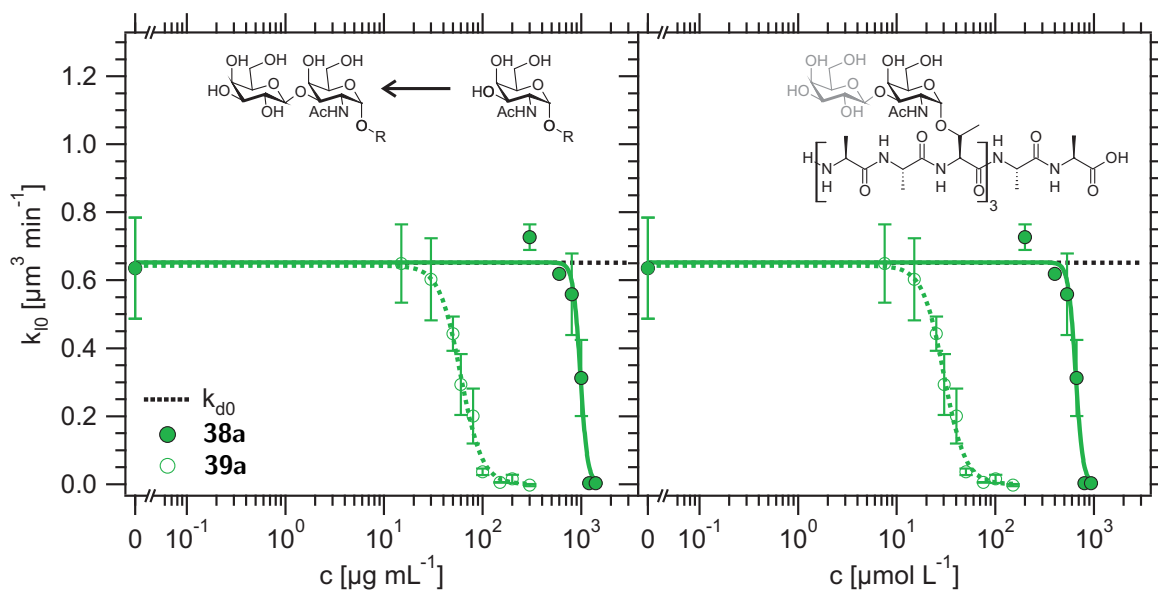


Abbildung 3.34: Einfluss des Kohlenhydrats bei AFGP mit 3 Wiederholeinheiten.

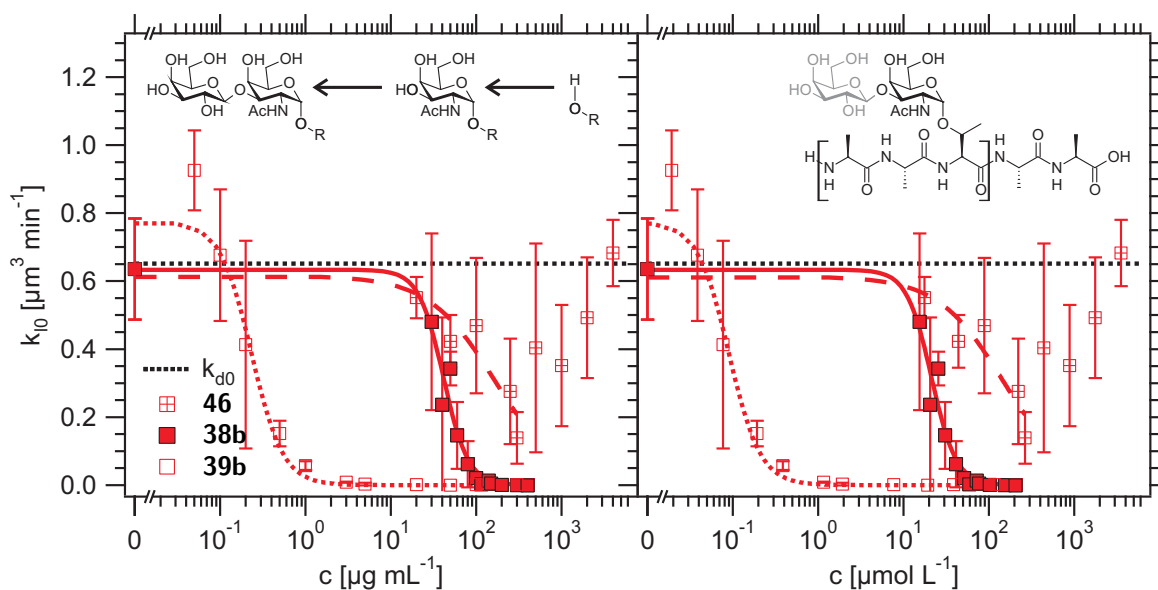


Abbildung 3.35: Einfluss des Kohlenhydrats bei AFGP mit 4 Wiederholeinheiten.

Komplette Entfernung des Kohlenhydrats reduziert die Antiegefriereffektivität weiter. Beim AFP **46** lässt sich c_i jedoch nicht genau bestimmen, da es einen völlig anderen Kurvenverlauf zeigt als die Glykopeptide. Ab ca. $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ist auch hier eine Erniedrigung von k_{l0} zu beobachten. k_{l0} sinkt aber nur bis auf etwa $0.14 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ bei $300 \mu\text{g mL}^{-1}$. Danach steigt die Ratenkonstante erneut an und bei $4\,000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ist k_{d0} wieder erreicht.

Bei Anpassung der Hill-Gleichung (3.27) an die Daten bis einschließlich $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ wird ein Wert für c_i von $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ bzw. $147 \mu\text{mol L}^{-1}$ erhalten. Der nachfolgende Anstieg von k_{l0} deutet allerdings darauf hin, dass auch schon im Bereich bis $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ nicht allein die Inhibierung durch AFP **46** die Ratenkonstanten bestimmt. Daher ist c_i als tatsächlich etwas kleiner als $165 \mu\text{g mL}^{-1}$ einzuschätzen.

AFP **46** besteht allein aus (Ala-Ala-Thr-)-Wiederholeinheiten. Da es dadurch aus vorwiegend unpolaren (Alanin) und nur wenigen polaren Aminosäuren (Threonin) besteht, ist eine geringe Löslichkeit in Wasser zu erwarten. Dies ist vermutlich die Ursache für den Anstieg von k_{l0} : Die Moleküle aggregieren oder fallen aus und stehen damit für eine Eisinhibierung nicht mehr zur Verfügung. Dies ist vermutlich auch der Grund, warum das unglykosilierte Rückgrat von Tachibana et al. (2004a) als vollständig inaktiv eingestuft wird. Anhand der neuen Daten wird nun klar, dass es durchaus Antiegefriereigenschaften besitzt. Es ist allerdings nur in einem kleinen Konzentrationsbereich aktiv.

Prinzipiell ist unabhängig vom genauen Wert für c_i zu sagen, dass der Unterschied vom reinen Rückgrat ($c_i = 165 \mu\text{g mL}^{-1}$) zum Monosaccharid ($c_i = 41 \mu\text{g mL}^{-1}$) um ein Vielfaches kleiner ist als der Unterschied zwischen Mono- und Disaccharid ($c_i = 0.23 \mu\text{g mL}^{-1}$). Die CD-Spektren von AFP **46** und den glykosilierten Peptiden **39b** und **38b** unterscheiden sich stark. Dies ist ein weiterer Grund, warum die hier beobachtete Aktivität von AFP **46** relativ überraschend ist. **39b** und **38b** zeigen für AFGP typische CD-Spektren mit Maxima bei etwa 215 nm und Minima bei rund 195 nm. Beim AFP **46** ($c = 353 \mu\text{mol L}^{-1}$) liegt das Maximum bei 198 nm und das Minimum bei 218 nm. Dies deutet auf einen hohen β -Strang-Anteil hin ($\approx 40\%$). Der Random-Coil-Anteil ist hier mit ca. 35% verglichen mit den glykosilierten Peptiden ($\approx 48\%$) kleiner.

Acetylierung

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss des Kohlenhydrats zu untersuchen, ist die Acetylierung der Hydroxygruppen. In Abbildung 3.36 ist der Vergleich zwischen AFGP **38c** und AFGP **48** dargestellt. Beide Peptide sind aus 5 Wiederholeinheiten aufgebaut. Am Threonin ist *N*-Acetylgalaktosamin *O*-glykosidisch gebunden. Beim AFGP **48** sind im Unterschied zum AFGP **38c** alle Hydroxygruppen des Kohlenhydrats acetyliert. Diese Acetylierung bewirkt eine Erhöhung in c_i von $3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$) auf $220 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($73 \mu\text{mol L}^{-1}$). Wieder wird die Effektivität stark herabgesetzt, aber nicht vollständig aufgehoben. Dies steht im Gegensatz zu den frühen Untersuchungen von Komatsu et al. (1970), bei denen schon eine 35-%ige Acetylierung zum vollständigen Verlust der Antiegefrieraktivität führt. Ahmed et al. (1973) geben an, dass bei einer 32-%igen Acetylierung die thermische Hysterese auf 18% im Vergleich zum natürlichen AFGP erniedrigt wird. Dies macht deutlich, wie viel sensitiver die in dieser Arbeit verwendete Methode der ki-

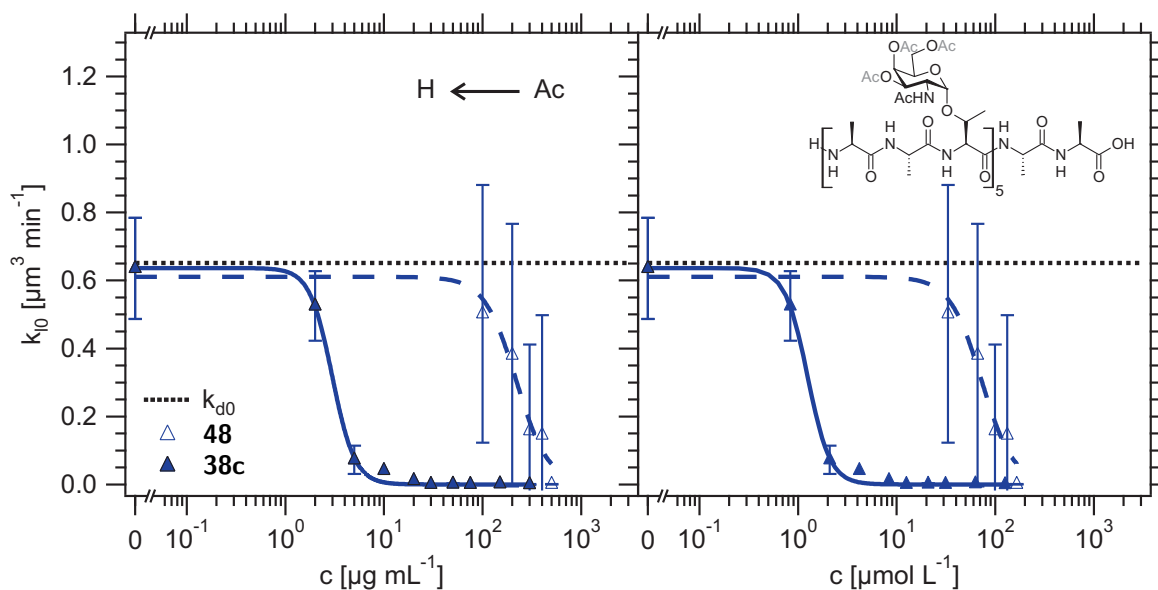


Abbildung 3.36: Acetylierung der Kohlenhydrat-Hydroxygruppen.

netischen Rekristallisationsanalyse ist. Die TH-Experimente lassen vermuten, dass bei Acetylierung aller Kohlenhydrat-Hydroxygruppen die Antigefriereigenschaften vollständig verloren gehen. Dies wird allerdings in den hier gezeigten Rekristallisationsexperimenten nicht beobachtet. Mit $c_i = 73 \mu\text{mol L}^{-1}$ wird sogar ein Wert erhalten, der im Vergleich zu den anderen untersuchten Verbindungen als durchschnittlich einzustufen ist. Die am wenigsten effektiven Verbindungen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind Derivate der Monosaccharid-AFGP mit $n = 3$. Dort liegen die c_i -Werte bei etwa $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. Es können mit der hier verwendeten Methode also c_i -Werte bestimmt werden, die mindestens eine Größenordnung größer sind als beim acetylierten AFGP **48** beobachtet.

Das CD-Spektrum der acetylierten Verbindung **48** deutet nicht auf eine starke strukturelle Veränderung hin. Es ist daher zu vermuten, dass die Bindung an die Eisoberfläche beeinflusst wird. Beim Vergleich der glykosilierten mit unglykosilierten AFGP wurde deutlich, dass das Kohlenhydrat zur Erhöhung der Löslichkeit beiträgt. Es wird vermutet, dass das Kohlenhydrat aber auch über die Hydroxygruppen für die Eisbindung verantwortlich ist. Die Effektivität des unglykosilierten Peptids (**46**) könnte auf die Hydroxygruppe des Threonins zurückzuführen sein. Die Eisbindung über das Kohlenhydrat wird dadurch nicht ausgeschlossen. Dies gilt ebenfalls für die Acetylierung des Kohlenhydrats. Dieser kann weiterhin als Protonen-Akzeptor in Wasserstoffbrücken dienen. Die reduzierte Effektivität könnte bedeuten, dass die Protonen-Donor-Eigenschaft wichtig ist, aber auch, dass die Acetylgruppen sterisch die Anbindung an Eis erschweren.

Die Acetylierung am *N*-Terminus führt nicht zu einer so deutlichen Erniedrigung der Effektivität wie die Acetylierung des Kohlenhydrats (Abbildung 3.37). Auch hier ist nach den CD-Spektren keine starke strukturelle Veränderung zu erwarten. Zur Erklärung der vergleichsweise geringen Reduzierung der Effektivität genügt sie aber vielleicht aus. Der

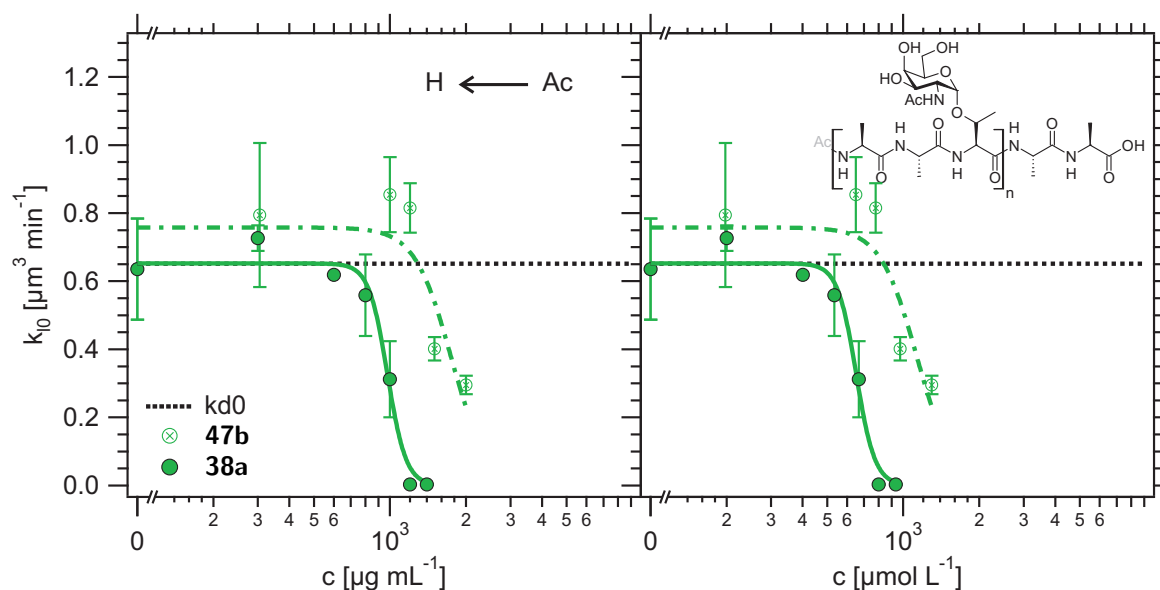


Abbildung 3.37: *N*-Terminal acetylierte AFGP. Am Threonin ist jeweils GalNAc *O*-glykosidisch gebunden.

Einfluss der Acetylierung am *N*-Terminus auf die Eiskristallisation ist in Abbildung 3.37 an Peptiden mit 3 Wiederholeinheiten gezeigt. Am Threonin ist jeweils wieder GalNAc gebunden. c_i steigt bei dieser Acetylierung von $978 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($652 \mu\text{mol L}^{-1}$) beim AFGP **38a** auf $1743 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1132 \mu\text{mol L}^{-1}$) beim AFGP **47b**. Dieser Wert für c_i ist zunächst nur als vorläufig anzusehen, da nur Konzentrationen bis $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($1297 \mu\text{mol L}^{-1}$) untersucht wurden. Es ist zwar bereits eine Erniedrigung von k_{10} ersichtlich, allerdings ist die vollständige Inhibierung noch nicht erreicht. Weitere Experimente bei höheren Konzentrationen müssen noch durchgeführt werden. Neben AFGP **47b** wurde ein weiteres auf diese Weise acetyliertes Peptid mit $n = 2$ untersucht (**47a**). Bis zu einer Konzentration von $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($7305 \mu\text{mol L}^{-1}$) zeigt es keine Inhibierung der Rekristallisation.

Prolinhaltige AFGP

In der Natur kommen neben den AFGP mit (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten auch Varianten vor, bei denen teilweise Alanin durch Prolin ausgetauscht ist (Burcham et al., 1986a). Dies führt in Bezug auf die thermische Hysterese jedoch nicht zu einer signifikanten Effektivitätsänderung (Schrag et al., 1982). Die Synthese der in dieser Arbeit untersuchten Prolin-Analoga (Tabelle 3.12) basiert wie die Synthese der übrigen hier untersuchten Peptide und Peptoide auf SPPS. Hier kommt die große Stärke der SPPS zum Tragen, da auf diese Weise gezielt Sequenzvariationen möglich sind. Details der Synthese sind der Arbeit von Plattner (2009) zu entnehmen.

Der Einfluss der in Tabelle 3.12 aufgeführten Sequenzvariationen ist in Abbildung 3.38 gezeigt. Hier werden Monosaccharid-Peptide mit $n = 3$ verglichen. Als Referenz ist zudem das unsubstituierte Peptid **38a** gezeigt. Bei den prolinhaltigen Peptiden **49**, **50** und

Aminosäuresequenz														Nr.	Masse [Da]
H-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH														49	1 551.60
H-Ala-Ala-Thr-Gly-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH														50	1 511.54
H-Ala-Ala-Thr-Ser-Ala-Thr-Ala-Ala-Thr-Pro-Ala-OH														51	1 541.56
H-Pro-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Pro-Ala-Thr-Pro-Ala-OH														52	2 076.17
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		

Tabelle 3.12: Prolinhaltige Antifrierglykopeptide. Am Threonin ist jeweils GalNAc *O*-glykosidisch gebunden.

51 wurde Alanin an Position 10 gegen Prolin ausgetauscht. Weitere Sequenzvariationen wurden bei diesen Peptiden an Position 4 durchgeführt.

Bei Peptid **49** führt der Austausch gegen ein weiteres Prolin an Position 4 zum völligen Verlust der Aktivität im Konzentrationsbereich bis $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2578 \mu\text{mol L}^{-1}$). Dies ist überraschend, da die CD-Spektren von Plattner (2009) nur auf eine geringe strukturelle Veränderung hindeuten. Es werden durch das relativ starre Prolin vermutlich Strukturmo-tive wie Schleifen auf Kosten von helikalen Strukturen stabilisiert und die möglicherweise wichtige Polyprolin II Helix wird weniger leicht ausgebildet. An dieser Stelle ist anzumerken, dass es keine stark dominierende Sekundärstruktur gibt (40-55 % Random-Coil).

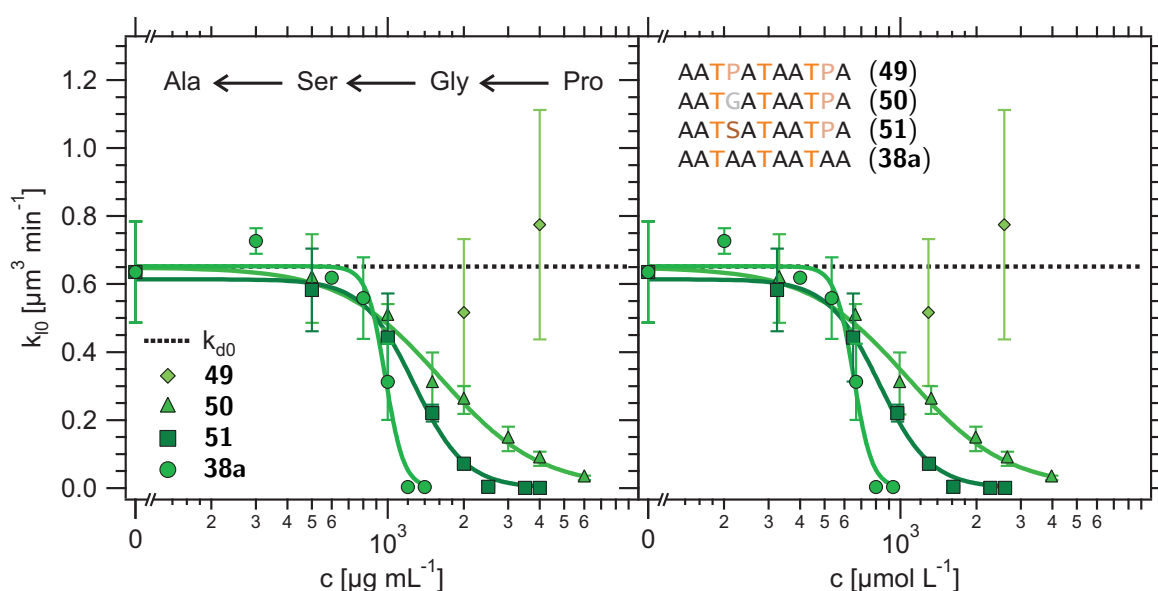


Abbildung 3.38: Einfluss von Sequenzvariationen bei AFGP mit 3 Wiederholeinheiten. Am Threonin ist jeweils GalNAc *O*-glykosidisch gebunden.

Beim Gly⁴-Pro¹⁰-Derivat **50** ist die Effektivität im Vergleich zum AFGP **38a** ebenfalls herabgesetzt. Es kommt aber nicht zu einem völligen Verlust der Antigefriereigenschaften. Selbst bei einer Konzentration von 6 000 µg mL⁻¹ (3 969 µmol L⁻¹) wird die Rekristallisation allerdings auch nicht vollständig gestoppt. k_{l0} erreicht hier den Wert 0.03 µm³ min⁻¹, c_i beträgt 1 614 µg mL⁻¹ (1 067 µmol L⁻¹). Der Wert für das unsubstituierte AFGP **38a** liegt bei $c_i = 978$ µg mL⁻¹ (652 µmol L⁻¹). Eindeutig wird c_i durch die Einführung von Glycin und Prolin an den Positionen 4 und 10 zu höheren Konzentrationen verschoben. Gleichzeitig wird die Kurve jedoch auch breiter. s ändert sich von 12 auf 2.2. Dabei ändert sich der Punkt, ab dem k_{l0} absinkt, praktisch nicht sondern k_{l0} sinkt mit höheren Konzentrationen weniger drastisch.

Der Austausch von Alanin durch Serin im Ser⁴-Pro¹⁰-Derivat **51** führt zu einem ähnlichen Kurvenverlauf $k_{l0}(c)$ wie er für das Gly⁴-Pro¹⁰-Derivat **50** beobachtet wird. Im Vergleich dazu wird die Effektivität allerdings erhöht. Mit $c_i = 1 270$ µg mL⁻¹ (824 µmol L⁻¹) liegt es zwischen dem Gly⁴-Pro¹⁰-Derivat **50** und dem unsubstituierten AFGP **38a**. Die Breite des Übergangs nimmt mit $s = 4.3$ ebenfalls ausgehend vom Derivat **50** ($s = 2.2$) ab und nähert sich **38a** ($s = 12$) an.

Natürliche AFGP bestehen aus mindestens 4 Wiederholeinheiten. Bei den natürlichen Prolin-Varianten dieser Größe sitzt das Prolin typischerweise an den Positionen 4 und 10 oder 7 und 13 (Tabelle 2.2). Bei den Peptiden mit nur 3 Wiederholeinheiten wurde beobachtet, dass der Austausch an den Positionen 4 und 10 dort zu einer extremen Erniedrigung der Effektivität, vielleicht sogar zu einer völligen Desaktivierung, führt. In Abbildung 3.39 ist $k_{l0}(c)$ im Fall eines Peptids mit 4 (Pro-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten gezeigt. Beim Peptid **52** ist Alanin an den Positionen 1, 4, 7, 10 und 13 gegen Prolin ausgetauscht worden. Dies führt zwar zu einer Effektivitätserniedrigung im Vergleich zum unsubstituierten AFGP **38b** aber nicht zu einer völligen Aufhebung der inhibierenden Wirkung. c_i erhöht sich von 41 µg mL⁻¹ (21 µmol L⁻¹) beim AFGP **38b** auf 178 µg mL⁻¹ (86 µmol L⁻¹). Um ein Molekül der unsubstituierten Variante **38b** zu ersetzen, werden demnach 4 Moleküle des Prolin-Analogons **52** benötigt.

Liegt die Erniedrigung der Effektivität des Pro⁴-Pro¹⁰-Derivat **49** mit $n = 3$ im ähnlichen Bereich wie beim Prolin-Analogon **52** mit $n = 4$, würde dies ein c_i von etwa 4 200 µg mL⁻¹ (2 600 µmol L⁻¹) bedeuten. Die dort maximale untersuchte Konzentration beträgt 4 000 µg mL⁻¹ (2 578 µmol L⁻¹). **49** könnte also doch wirksam sein. Weitere Untersuchungen bei höheren Konzentrationen werden dies zeigen. Es wird jedoch im Gegensatz zu den TH-Experimenten von Schrag et al. (1982) in den vorliegenden Rekristallisationsuntersuchungen deutlich, dass durch die Einführung von Prolin sehr wohl Effektivitätsänderungen hervorgerufen werden.

Auffällig ist beim Vergleich zwischen [PAT^m]₄PA (**52**) und [AAT^m]₄AA (**38b**) neben der Verschiebung von c_i die Veränderung der Kurvenform. Der Übergang zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle ist mit $s = 16$ beim Prolin-Analogon sehr viel schärfer als beim unsubstituierten Peptid ($s = 3.0$). Dies hängt möglicherweise mit einer geringeren Flexibilität des Prolin-Analogons zusammen. Dies würde zu den Beobachtungen beim Gly⁴-Pro¹⁰-Derivat **50** passen, bei dem das sterisch weniger anspruchsvolle Glycin an die Stelle von Alanin tritt. Der Vergleich in Abbildung 3.38 zeigt, dass der Übergang beim Glycin-

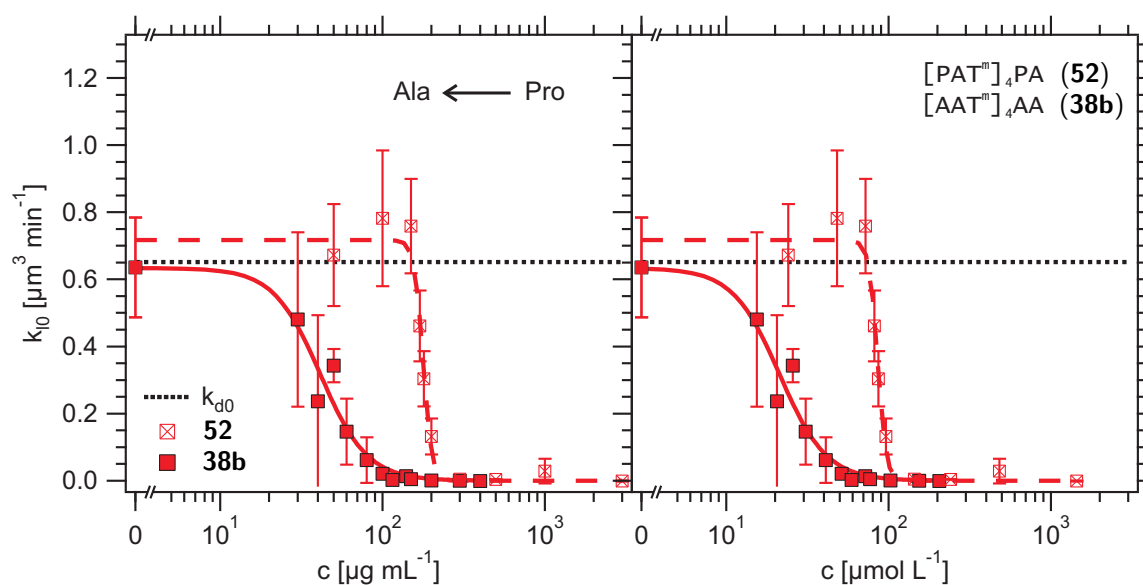


Abbildung 3.39: Proteine mit (Pro-Ala-Thr)-Wiederholeinheit. Vergleich zwischen $[\text{AAT}^m]_4\text{AA}$ (**38b**) und $[\text{PAT}^m]_4\text{PA}$ (**52**). Am Threonin ist jeweils GalNAc *O*-glykosidisch gebunden.

Derivat breiter ist als beim Serin-Derivat. Zur besseren Beantwortung der Fragestellung, wo genau Alanin im Vergleich zu Glycin und Serin steht, ist die Untersuchung eines Derivats mit Prolin allein an Position 10 notwendig.

Die CD-Spektren der Peptide **52** und **38b** unterstützen die Flexibilitätshypothese jedoch nicht. Der Random-Coil-Anteil unterscheidet sich bei beiden Peptiden praktisch nicht. Hingegen ist beim Prolin-Analogon der Polyprolin II-Anteil mit etwa 11 % geringer als beim Peptid **38b** (14 %). Dafür sind α - und 3_{10} -Helix-Anteil höher. Sowohl beim α -Helix-Anteil wie auch beim 3_{10} -Helix-Anteil ist das Verhältnis jeweils 6 % zu 3 %. Insgesamt dominieren nach der Random-Coil weiterhin β -Strang (18 %) und β -Schleife (16 %). Beim unsubstituierten Peptid sind die entsprechenden Anteile 21 % und 13 %. Da bei Verwendung unterschiedlicher Programme oder Basissätze bereits Veränderungen der jeweils bestimmten Anteile um mehrere Prozent beobachtet werden, kann nicht von einer deutlichen Strukturänderung durch Einführung des Prolins gesprochen werden.

Vergleich aller untersuchten Additive

Wie im vorangegangenen Abschnitt zu sehen war, unterscheiden sich die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen in der Effizienz, mit der sie die Eisrekrystallisation hemmen. In Abbildung 3.40 sind die Ergebnisse all dieser Effektivitätsuntersuchungen in Saccharoselösungen (45 Gew.-%) bei -8°C zusammengefasst. Die Effektivität wird dabei durch die Inhibierungskonzentration c_i in $\mu\text{mol L}^{-1}$ angegeben. Diese Größe spiegelt gut die Wirksamkeit einer Substanz wieder, da es die Konzentration angibt, bei der ein Wechsel zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle eintritt. Bei kleineren Konzentrationen bestimmt

die Diffusion der Wassermoleküle in der Lösung zwischen den Eiskristallen die Geschwindigkeit der Eiskristallisation. Bei Konzentrationen größer c_i bestimmt der Flüssig-Fest-Übergang beim Kristallwachstum den Reifungsprozess.

Es wurden 3 PVA-Varianten mit unterschiedlichen Kettenlängen untersucht. Die kleinste Variante (PVA6) besitzt eine Molmasse von $5\,800\text{ g mol}^{-1}$. Die Polymerkette besteht damit aus ca. 80 Wiederholeinheiten. Die Molmasse der mittleren Variante PVA27 beträgt $27\,000\text{ g mol}^{-1}$ ($n \approx 600$). PVA145 ist mit einer Kettenlänge $n \approx 3\,300$ die mit Abstand längste in dieser Arbeit untersuchte Verbindung. Seine Molmasse beträgt $145\,000\text{ g mol}^{-1}$. Beim Vergleich dieser 3 Polymere hat sich gezeigt, dass sich die relative Effektivität ändern kann, wenn zwischen Massen- und Anzahl-Konzentrationen unterschieden wird. Bei einer Auftragung in $\mu\text{mol L}^{-1}$ zeigt sich klar die Zunahme der Effektivität mit größerer Kettenlänge.

Obwohl alle 3 PVA-Varianten im Vergleich zu den Peptiden deutlich größer sind, liegt ihre Effektivität in einem ähnlichen Bereich. Die hier untersuchten aktiven Peptide besitzen Massen von 1.1 bis 3.0 kDa. Die in dieser Arbeit effektivste Verbindung ist AFGP **39b** mit $c_i = 0.09\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ und einer Masse von 2.6 kDa. Es stellt das synthetische Ebenbild des kleinsten natürlichen AFGP dar. Es ist aus 14 Aminosäuren aufgebaut ($n = 4$) und trägt am Threonin ein Disaccharid (Gal-GalNAc). PVA145 erreicht im Verhältnis zu seiner Molmasse mit $c_i = 0.38\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ eine eher geringe Effektivität. Dennoch ist dies der zweitkleinste Wert aller untersuchten Substanzen. Danach kommen PVA27 und AFGP **38c**. Beide Verbindungen sind mit Werten für c_i von $1.2\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ gleich effektiv. Pro Molekülmasse ist allerdings AFGP **38c** mit einer Masse von 2.3 kDa um ein Vielfaches effektiver als PVA27. AFGP **38c** besitzt eine Länge von 17 Aminosäuren ($n = 5$) und am Threonin ist hier ein Monosaccharid (GalNAc) gebunden.

Neben den 3 PVA-Varianten wurden zwei weitere einfache Polymere untersucht. PEG3 und Polyasparaginsäurenatriumsalz (PAsSNa) sind im betrachteten Konzentrationsbereich allerdings inaktiv. Nach dem Modell von Budke und Koop (2006) adsorbiert PVA über Hydroxygruppen, deren Abstände zu Sauerstoff-Abständen im Eis passen. Das Fehlen solcher struktureller Übereinstimmungen bzw. das Fehlen von Hydroxygruppen ist vermutlich die Erklärung für die Beobachtungen beim PEG und beim PAsSNa.

Bei allen hier untersuchten Verbindungen, die einen Triazol-Linker als Strukturelement beinhalten (Klick-Chemie-Verbindungen), wurde keine inhibierende Wirkung festgestellt. Dies muss aber nicht zwangsläufig mit dem Linker zusammenhängen. Aufgrund weiterer Veränderungen im Vergleich zu den natürlichen AFGP ist eine Zuordnung des Effektivitätsverlusts zu bestimmten Strukturelementen nicht möglich.

Die natürlichen AFGP sind aus (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten aufgebaut. Am Threonin ist dabei jeweils ein Disaccharid aus Galaktose und *N*-Galaktosamin (β -D-Galaktosyl-(1 \rightarrow 3)- α -D-*N*-acetylgalaktosamin) *O*-glykosidisch gebunden. Peptide dieses Typs mit 3 und 4 Wiederholeinheiten wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. AFGP **39a** mit $n = 3$ erreicht eine mittlere Effektivität im Vergleich zu den übrigen getesteten Verbindungen. c_i beträgt hier $30\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$. Damit ist es allerdings das effektivste Peptid mit 3 Wiederholeinheiten. Alle Modifikationen führen zu einer Effektivitätsreduktion. Das entsprechende Monosaccharid-Analogon (**38a**) weist einen Wert für c_i von $652\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$

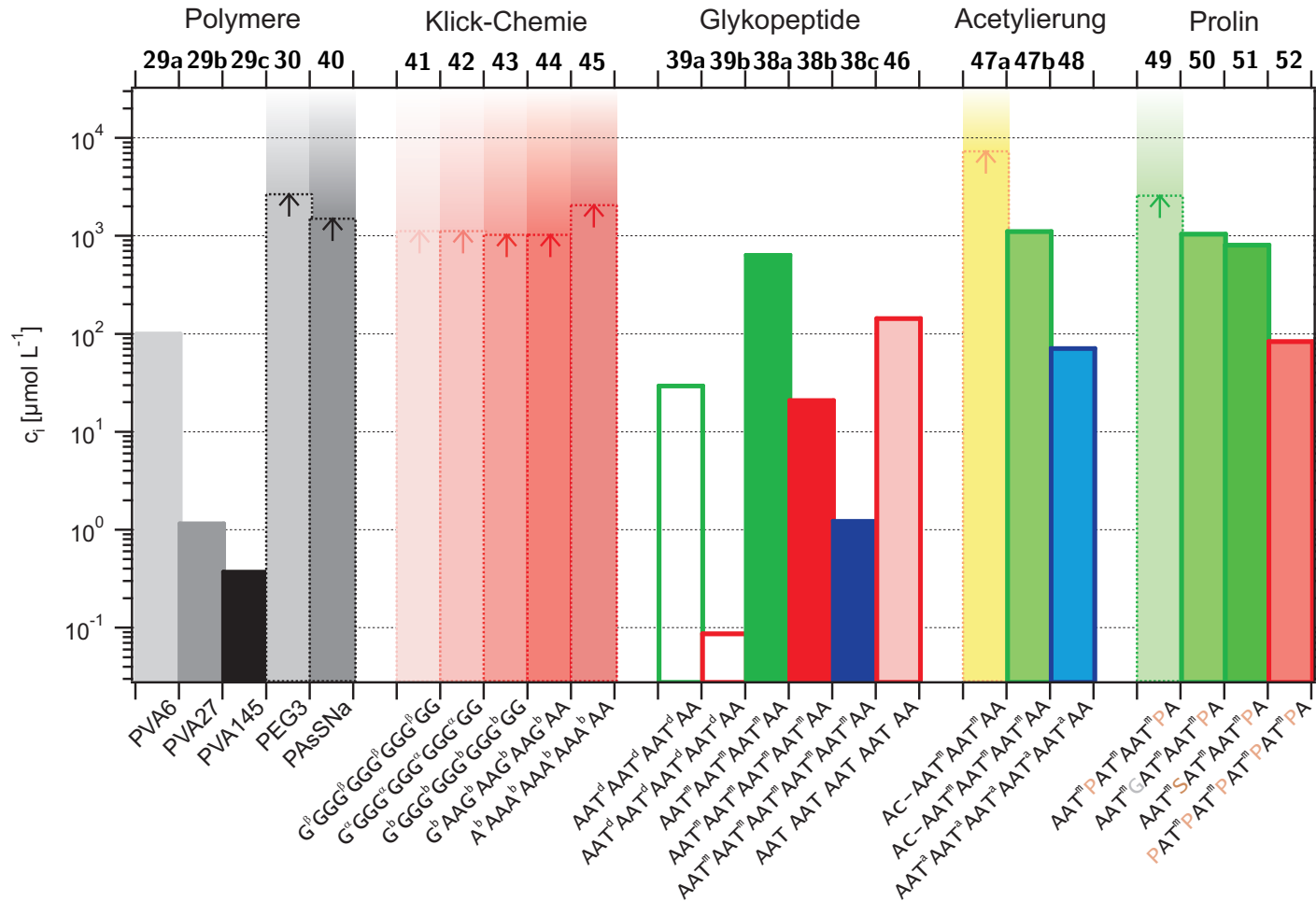


Abbildung 3.40: Zusammenfassung der Effektivitäten der untersuchten Verbindungen, dargestellt durch die Inhibierkonzentration c_i . Bei inaktiven Verbindungen gibt der Pfeil die maximale untersuchte Konzentration an.

auf. Diese Veränderung beeinflusst die Effektivität also sehr stark. Ebenfalls einen sehr starken Einfluss hat die Kettenlänge. Die Verlängerung um eine Wiederholeinheit bewirkt eine enorme Effektivitätssteigerung, denn c_i beträgt beim AFGP **39b** nur noch $0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$. Um die gleiche Wirksamkeit zu erreichen, sind etwa 340 mal so viele Moleküle des kürzeren AFGP **39a** nötig. Die Verlängerung des Rückgrats bewirkt bei den Monosaccharid-Peptiden (**38**) keine so große Effektivitätssteigerung wie bei den Peptiden mit Disaccharid-Kohlenhydrat (**39**). c_i sinkt mit steigender Kettenlänge von $652 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 3$) über $21 \mu\text{mol L}^{-1}$ bis auf $1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n = 5$).

Bei den Peptiden **39b**, **38b** und **46** mit jeweils 4 Wiederholeinheiten ist wie bei den Peptiden **39a** und **38a** mit 3 Wiederholeinheiten der Einfluss des Kohlenhydrats zu erkennen. Sehr groß fällt hier die Effektivitätserniedrigung beim Übergang von Gal-GalNAc zu GalNAc aus. c_i steigt von $0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**39b**) auf $21 \mu\text{mol L}^{-1}$ (**38b**). Interessanterweise führt die komplette Entfernung des Kohlenhydrats nicht zum vollständigen Verlust der Antifrieraktivität. Für AFP **46** lässt sich ein c_i von $147 \mu\text{mol L}^{-1}$ bestimmen. Diese Beobachtung überrascht, da die Experimente von Tachibana et al. (2004a) ein anderes Bild lieferten. Nach ihnen ist das Peptidrückgrat allein inaktiv. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass AFP **46** auch in der vorliegenden Arbeit kein typisches Verhalten zeigt. Beim AFP **46** wird ein lokales Minimum in Bezug auf die Rekristallisationsgeschwindigkeit beobachtet. Mit weiter zunehmender Konzentration steigt k_{l0} wieder an und die Diffusionsgrenze wird schließlich erneut erreicht. Dieses ungewöhnliche Verhalten des Rückgrats ist vermutlich auf dessen geringere Löslichkeit zurückzuführen. Mit zunehmender Konzentration tritt vermehrt Aggregation auf, die Moleküle binden aneinander und nicht mehr an das Eis.

Acetylierung der Glykopeptide sowohl am *N*-Terminus wie auch am Kohlenhydrat führt zu einer Reduktion der Effektivität. Beim AFGP **47a** mit nur 2 Wiederholeinheiten und Acetylierung am *N*-Terminus ist der Effekt der Acetylierung jedoch nicht zu bestimmen, da zum Vergleich kein entsprechendes nicht-acetyliertes Peptid vorliegt und keine Inhibierung der Rekristallisation im untersuchten Konzentrationsbereich zu beobachten ist. Anders sieht es aus beim AFGP **47b** mit $n = 3$. Hier steigt c_i mit der *N*-terminalen Acetylierung von $652 \mu\text{mol L}^{-1}$ auf $1132 \mu\text{mol L}^{-1}$ an. Ein dramatischerer Effekt wird durch die Acetylierung des Kohlenhydrats hervorgerufen. Beim nicht-acetylierten AFGP **38c** liegt c_i bei $1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Der Wert für das entsprechende acetylierte AFGP **48** beträgt $73 \mu\text{mol L}^{-1}$.

In der Natur kommen auch prolinhaltige AFGP vor. In TH-Messungen zeigten sich allerdings keine signifikanten Effektivitätsunterschiede zwischen den verschiedenen AFGP-Arten (Schrag et al., 1982). Der Austausch von Alanin gegen Prolin zeigte in der vorliegenden Arbeit hingegen immer eine deutliche Abnahme der Effektivität. Beim Prolin-Analogen **49** ($n = 3$) führt der Austausch an den Positionen 4 und 10 zum völligen Verlust der inhibierenden Wirkung. Weniger dramatisch fällt der Effekt aus, wenn lediglich an Position 10 Alanin gegen Prolin ausgetauscht wird. Bei den Peptiden **50** und **51** wurde an Position 4 Alanin gegen Glycin bzw. Serin ausgetauscht. Es zeigt sich, dass das Ser⁴-Pro¹⁰-Derivat das effektivere dieser beiden ist. Mit c_i -Werten von $1067 \mu\text{mol L}^{-1}$ und $824 \mu\text{mol L}^{-1}$ erreichen beide aber nicht die Effektivität des unsubstituierten AFGP **38a**

($c_i = 652 \mu\text{mol L}^{-1}$). Eine wichtige Beobachtung in dieser Reihe ist, dass sich die Kurvenverläufe $k_{l0}(c)$ nicht einfach verschieben sondern sich die Kurvenform verändert. Das Einbrechen der Ratenkonstante mit zunehmender Konzentration tritt etwa bei dem selben Punkt ein. Bei den weniger effektiven Peptiden werden die Kurven aber breiter, so dass c_i und die Konzentration, bei der vollständige Inhibierung ($k_{l0} \approx 0$) eintritt, zu höheren Werten verschoben werden.

Im Gegensatz zum Pro⁴-Pro¹⁰-Derivat (**49**), das im betrachteten Konzentrationsbereich inaktiv ist, hemmt AFGP **52** sehr wohl die Eisrekristallisation. Dieses Peptid ist aus (Pro-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten aufgebaut. Mit einem c_i von $86 \mu\text{mol L}^{-1}$ ist es aber ebenfalls deutlich weniger effektiv als das entsprechende AFGP **38b** mit (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheiten ($c_i = 21 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Variabilität der Ratenkonstanten

Abgesehen von den verschiedenen Effektivitäten in der Inhibierung der Eisrekristallisation unterscheiden sich die hier untersuchten Polymere, Peptoide und Peptide auch in der beobachteten Reproduzierbarkeit der Ratenkonstanten. Bei den vorangegangenen Auftragungen von $k_{l0}(c)$ wurde bei einer Konzentration jeweils der Mittelwert mehrerer Experimente in k_{l0} angegeben. Die Standardabweichung zu diesem Mittelwert wurde jeweils in Form von Fehlerbalken dargestellt. In Abbildung 3.41 ist der Mittelwert dieser Standardabweichungen für Werte von $k_{l0} > 0.05$ für die verschiedenen untersuchten Verbindungen aufgetragen. Werte von $k_{l0} \leq 0.05$ werden nicht verwendet, da dort aufgrund der ohnehin kleinen Werte auch nur kleine Schwankungen auftreten.

Es zeigt sich, dass insbesondere bei den Polymeren die Werte für k_{l0} stark variieren. $\sigma(k_{l0})$ liegt hier zwischen 0.25 und $0.30 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Dies führt dazu, dass c_i bei diesen Verbindungen weniger genau bestimmt werden kann. Die Streuung ist unabhängig von Art oder Länge der Polymere. Die Unterschiede in den Standardabweichungen zwischen den verschiedenen PVA-Varianten und die Unterschiede zwischen den aktiven und den inaktiven Polymeren sind nicht signifikant.

Überwiegend kleinere $\sigma(k_{l0})$ -Werte als bei den Polymeren finden sich bei den Peptoiden und Peptiden. Die meisten Werte liegen hier zwischen 0.07 und $0.15 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$. Auch hier ist kein eindeutiger Zusammenhang zur Effektivität oder zur Kettenlänge ersichtlich. Obwohl keines der Klick-Chemie-Verbindungen die Rekristallisation inhibiert, weist nur eines einen erhöhten Wert für $\sigma(k_{l0})$ auf. Mit $\sigma(k_{l0}) = 0.21 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ ragt das Peptoid **42** heraus. Der Unterschied zwischen diesem Peptoid und den übrigen Klick-Chemie-Verbindungen liegt in der α -Konfiguration des Kohlenhydrats. Abgesehen davon ist es sogar identisch zum Peptoid **41**. Einen ebenfalls hohen Wert für $\sigma(k_{l0})$ besitzt das am Kohlenhydrat acetylierte Peptid **48**. Mit $0.30 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ liegt der Wert ebenso hoch wie bei den Polymeren. Die Acetylierung am N-Terminus führt hingegen zu keiner Veränderung in $\sigma(k_{l0})$ im Vergleich zu den nicht-acetylierten AFGP. Bei den prolinhaltigen Peptiden fällt nur das inaktive Pro⁴-Pro¹⁰-Peptid (**49**) durch einen vergleichsweise hohen $\sigma(k_{l0})$ -Wert auf. Mit $0.23 \mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$ ist dieser deutlich größer als bei den übrigen prolinhaltigen Peptiden.

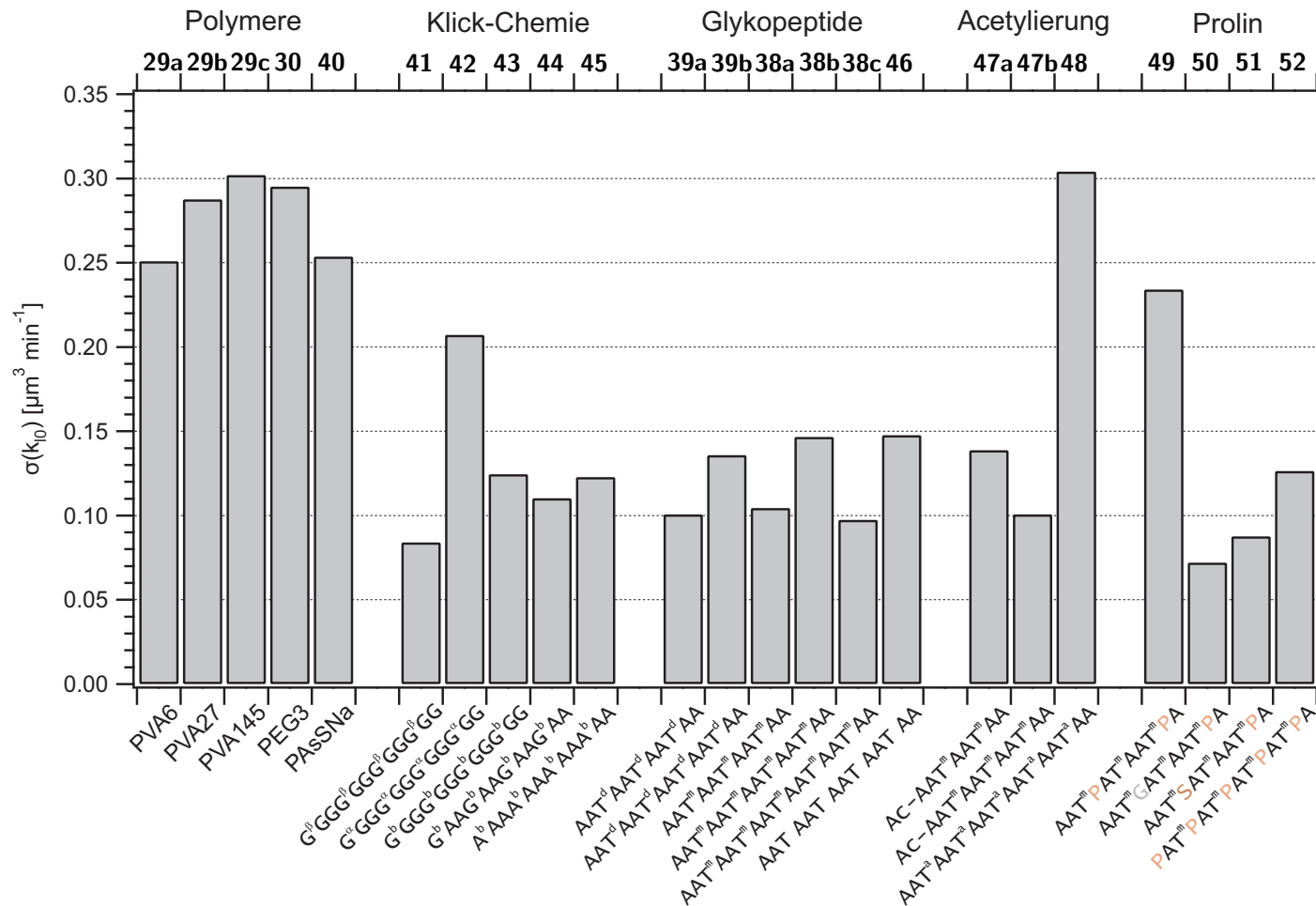


Abbildung 3.41: Streuung der Geschwindigkeitskonstanten bei den untersuchten Verbindungen. Mittlere Standardabweichung σ der Rekristallisationsgeschwindigkeitskonstanten k_{10} gemittelt über Werte mit $k_{10} > 0.05$.

Eine mögliche Erklärung für die generelle Streuung der Ratenkonstanten und für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Verbindungen im Speziellen könnten Löslichkeitsunterschiede sein. Vor Beginn der Rekristallisation werden die Proben auf -50°C abgekühlt, um die Eisnukleation auszulösen. Bei dieser Temperatur liegt ein Großteil des Wassers in Form von Eis vor. Zwischen den Eiskristallen befindet sich dann eine hochkonzentrierte Lösung von Saccharose und des jeweiligen Additivs. Während der Temperaturerhöhung bis zur Rekristallisationstemperatur löst sich ein Teil des Eises auf und die Konzentration der Lösung wird verringert. Ist die Diffusion der Saccharose und des Additivs schnell genug, kommt es in dieser Zeit oder spätestens in den ersten Minuten der Rekristallisation zu einer Gleichverteilung innerhalb der Lösung. Für die sehr gut wasserlösliche Saccharose sollte dies auf jeden Fall zutreffen. Bei den relativ großen und teilweise ohnehin schlecht wasserlöslichen Polymeren (PVA) könnte die Gleichverteilung innerhalb der Lösung einige Zeit benötigen. Die Folge wäre eine schnellere Wasserdiffusion in Bereichen kleinerer Additivkonzentration und umgekehrt. So könnten Unterschiede innerhalb eines Beobachtungsbereichs und zu umgebenden Bereichen auftreten. Verschiedene Experimente führten dann zu unterschiedlichen Ratenkonstanten. Diese Vorstellung würde zu den Beobachtungen beim acetylierten Peptid **48** passen. Dieses Peptid ist verhältnismäßig groß und aufgrund des acetylierten Kohlenhydrats auch weniger gut wasserlöslich. Bei dem Peptoid **42** und dem prolinhaltigen Peptid **49** trifft dies aber nicht zu. Hier scheinen strukturelle Ursachen vorzuliegen. Möglicherweise beeinflussen diese die Löslichkeit der Verbindungen, indem die Orientierung der hydrophoben und hydrophilen Gruppen eingeschränkt wird.

Physikalische Deutung der beobachteten Effektivitätsunterschiede

Wenn es um die Wirkungsweise der Antifrierproteine geht, ist eine der grundlegenden Fragen, wie die unterschiedlichen Effektivitäten der verschiedenen Verbindungen zustande kommen. Das Adsorptions-Inhibierungs-Modell ist allgemein akzeptiert, es kann bei Annahme einer irreversiblen Adsorption die beobachteten unterschiedlichen Effektivitäten aber nicht erklären. Die Hemmung des Kristallwachstums beruht auf dem Kelvin-Effekt. Die Kristallflächen zwischen den adsorbierten AFP bilden konvexe Wölbungen aus. Dies führt zu einer Erniedrigung des lokalen Schmelzpunkts und stoppt das Kristallwachstum. Bei welcher Temperatur dies geschieht, hängt prinzipiell nur vom Abstand der AFP zueinander auf der Oberfläche ab. Mit kleinerem Abstand sinkt der Hysteresegefrierpunkt. Wäre aber allein der Abstand ausschlaggebend, so müssten verschiedene AFP bei gleicher Konzentration die gleiche thermische Hysterese zeigen. Dies ist aber nicht der Fall, was sich in der vorliegenden Arbeit in der Verschiebung der Inhibierungskonzentration c_i widerspiegelt. Wie können die unterschiedlichen Effektivitäten dann erklärt werden? Eine Möglichkeit ist die Beeinflussung des flüssigen Wassers in der Umgebung der adsorbierten AFP. Dadurch wird die Kristallisation neuen Wassers auf der Eisoberfläche behindert. Molekulardynamik-Simulationen von Smolin und Daggett (2008) und Nutt und Smith (2008) stützen diese Hypothese. Hiernach bildet sich eine eisähnliche, geordnete Struktur des flüssigen Wassers in der Umgebung der eisbindenden Proteinflä-

che aus. In der Nähe der übrigen Flächen hingegen ist die Wasserstruktur weniger geordnet, was das Einschließen des Proteins durch Eis erschwert. Die betrachteten Proteine waren in der Arbeit von Smolin und Daggett (2008) ein AFP vom Typ III und bei den Simulationen von Nutt und Smith (2008) ein Insekten-AFP (*Choristoneura fumiferana*). Zwei weitere Erklärungsansätze sind in Abbildung 3.42 dargestellt. Ob ein adsorbiertes Protein vom Eis eingeschlossen werden kann, wird neben der Proteinoberfläche auch durch die bedeckte Eisfläche bestimmt (Li et al., 2006). Dies wird in Abbildung 3.42a verdeutlicht. Bei sehr kleinen AFP (rot), die nur eine kleine Eisoberfläche bedecken, genügt beim Hysteresegefrierpunkt die Umorientierung weniger Wassermoleküle, um die Lücke zu schließen und weiteres Eiswachstum zu ermöglichen, was bei den größeren AFP (blau) nicht so leicht geschehen kann.

In Abbildung 3.42b ist ein Gleichgewicht zwischen adsorbierten AFP und AFP in Lösung dargestellt. Wenn die Proteine nicht irreversibel an die Eisoberfläche gebunden sind, sondern sich ein reversibles Gleichgewicht einstellt, könnte dies dazu führen, dass relativ ähnlich aufgebaute Proteine gleicher Größe das Eiswachstum in unterschiedlichem Maße hemmen. Je mehr das Gleichgewicht auf der Seite der Adsorbierten liegt, desto größer ist die Effektivität des Proteins. Es genügt dann eine kleinere Gesamtkonzentration. Obgleich manche Experimente auf eine irreversible Adsorption hindeuten (Pertaya et al., 2007), muss dadurch aber nicht das Modell als solches in Frage gestellt sein. Die Beobachtung einer irreversiblen Adsorption beim AFP Typ III bedeutet nur, dass das Gleichgewicht sehr weit auf der Seite der adsorbierten Moleküle liegt. Die Untersuchungen von AFGP durch Zepeda et al. (2008) deuten an, dass hier eine schwächere Wechselwirkung zwischen Eis und Protein vorliegt und die Adsorption als reversibel betrachtet werden kann.

Eine reversible Adsorption würde ebenfalls die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen erklären. Dies gilt insbesondere für die Temperaturabhängigkeit des c_i -Wertes beim AFGP **39a**. In Unterabschnitt 3.6.2 wurde gezeigt, wie sich c_i unter ansonsten glei-

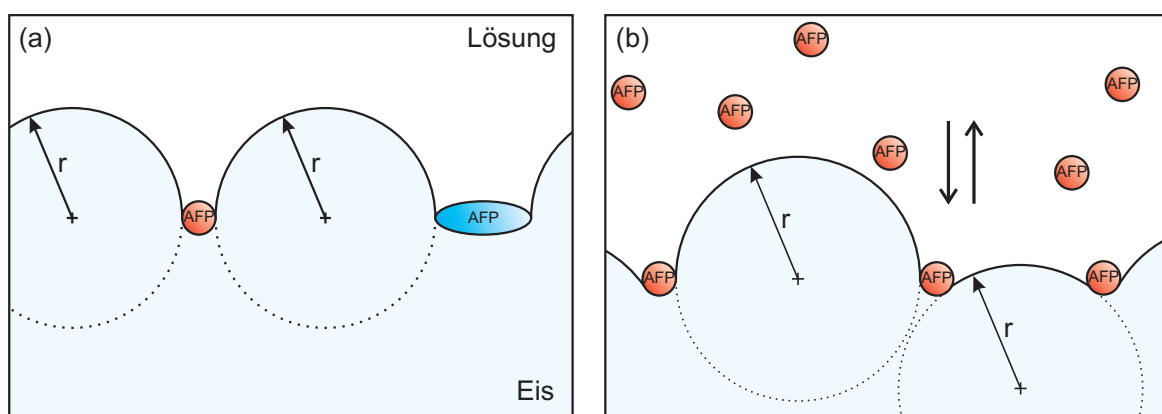


Abbildung 3.42: Diskussion des Adsorptions-Inhibierungs-Mechanismus. Einfluss der AFP-Größe (a) und der Bindungsstärke (b) beim Hysteresegefrierpunkt. Die Eisflächen zwischen den adsorbierten AFP weisen maximale Krümmung auf.

chen Bedingungen mit zunehmender Temperatur erhöht. Die Untersuchungen bei -6 und -8°C beziehen sich alle auf Saccharoselösungen und Eisanteile um 0.07 . Wäre die Adsorption irreversibel, so müsste allein die Konzentration der AFP auf der Eisoberfläche bestimmend sein. Die Grenzfläche zwischen Eis und Lösung nimmt bei -6°C aufgrund der schnelleren Rekristallisation schneller ab. Es sollte dann also eine kleinere Konzentration ausreichen, um die Eisoberfläche in gleichem Maße zu bedecken wie bei -8°C . Gleichzeitig gilt, dass bei der höheren Temperatur ein größerer Abstand, also eine kleinere Konzentration, ausreicht, um das Eiswachstum zu stoppen. Die thermische Hysterese ist kleiner (höhere Temperatur) bei größerem Abstand (kleinere Konzentration). c_i sollte mit steigender Temperatur also kleiner werden, der umgekehrte Trend wird aber beobachtet. Dies kann nur bedeuten, dass das Gleichgewicht mit zunehmender Temperatur mehr zur Seite der Lösung verschoben wird, was physikalisch plausibel ist.

Gegen eine reine Größenabhängigkeit spricht außerdem die Effektivitätsabnahme bei Acetylierung. Dadurch wird das Peptid größer, es sollte also effektiver sein. Auch wird die Bindung nicht komplett verhindert, denn die acetylierten Peptide binden weiterhin an Eis, nur eben schwächer, was den Größeneffekt überkompensiert. Insgesamt nimmt die Effektivität durch Acetylierung ab.

Für die AFP-Adsorption an Eis sind übereinstimmende Abstände zwischen Hydroxygruppen im Protein und Sauerstoffatomen im Eis entscheidend. Aufgrund dieser Übereinstimmung kommt es dann während der Adsorption zu Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Protein und Eis. Es wird vermutet, dass bei Antifrieglykopeptiden, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, für die Eisbindung das Kohlenhydrat essentiell ist (Komatsu et al., 1970; Ahmed et al., 1973; Tachibana et al., 2004a). Welche Hydroxygruppen des Kohlenhydrats jedoch genau in welchem Maße an der Bindung beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Die in dieser Arbeit beobachtete Rekristallisationsinhibierung auch bei vollständiger Acetylierung der Kohlenhydrat-Hydroxygruppen lässt vermuten, diese wären gar nicht an der Bindung beteiligt. Zudem zeigt auch das unsubstituierte Rückgrat allein Antifrieeigenschaften. Beide Beobachtungen lassen sich allerdings leicht erklären. Nach der Acetylierung stehen die Sauerstoffatome immer noch als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren zur Verfügung und beim Rückgrat kann die Hydroxygruppe des Threonins die Funktion des Kohlenhydrats teilweise übernehmen. Zudem könnte die strukturelle Übereinstimmung zwischen Eis und Peptid bestehen bleiben. Schwächere van der Waals-Wechselwirkungen sorgen dann möglicherweise allein für die Eisbindung. Auf die Wichtigkeit von van der Waals-Wechselwirkungen weisen die Arbeiten von Chao et al. (1997), Haymet et al. (1998) und Zhang und Laursen (1998) hin.

Nach dem Modell von Knight et al. (1993) erfolgt die Eisbindung der AFGP über die Hydroxygruppen in C6-Position. Eine Bindung über mehr als zwei Hydroxygruppen pro Disaccharid sind nach ihren Überlegungen nicht möglich. Um dennoch eine ausreichend starke Bindung zwischen Eis und Protein zu erhalten, wird ein Einbau der Hydroxygruppen ins Eis postuliert. Damit bindet jede Hydroxygruppe nicht nur über eine Wasserstoffbrücke sondern über 3. Wenn die C6-Position die entscheidende ist, sollten Modifikationen an dieser Stelle zu einem Aktivitätsverlust führen. Im Abschnitt 2.4 wurden Experimente vorgestellt, wonach die Oxidation zum Aldehyd eine nur leichte Effektivitätsreduktion

bewirkt. Wieder könnte dies bedeuten, dass die Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Funktion noch besteht. Weitere Umsetzungen mit Natriumhydrogensulfit oder Iod führen zu dramatischen Erniedrigungen der thermischen Hysterese. Dies muss auf die Einführung von negativen Ladungen zurückzuführen sein. Allein die Vergrößerung der Gruppe kann es nicht sein, da die Anbindung weiterer Aminosäuren an der C6-Position durch Osuga et al. (1989) die Effektivität nicht in allen Fällen stark erniedrigt.

Czechura et al. (2008) untersuchten bei C-verknüpften Glykokonjugaten den Einfluss der Konfiguration des Kohlenhydrats. Dabei wurde beobachtet, dass nur das Galaktose-Analogon eine ähnliche Hemmung der Rekristallisation zeigt wie natürliches AFGP. Änderungen an den Positionen C2 (Talose) und C4 (Glukose) bewirken einen praktisch vollständigen Aktivitätsverlust. Ob entsprechende Modifikationen auch bei den natürlichen Proteinen zu einem so starken Effekt führen, ist allerdings noch fraglich. Zudem lässt die verwendete Methode nicht den Schluss zu, ob die Wirksamkeit nur herabgesetzt oder wirklich vollständig aufgehoben wurde.

Leider können auch die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen keinen eindeutigen Beweis für die Adsorption über bestimmte Hydroxygruppen liefern. Es können aber einige Hinweise abgeleitet werden. Die nachfolgenden Überlegungen sind in Abbildung 3.43 zusammengefasst.

Bei den Monosaccharid-Analoga (**38**) führt die Kettenverlängerung zu einer Erniedrigung von c_i im Bereich einer Größenordnung. Bei den Disaccharid-Analoga (**39**) hingegen wird c_i um zwei Größenordnungen verringert. Es liegt der Schluss nahe, dass die Zunahme von

Nr.	m [Da]	n	OH/OH	OH+OH	OH+OH	c_i [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
38a	1500	3	3	6	6	652
46	1133	4	4	4	4	147
39a	1986	3	6	12	9	30
38b	1946	4	4	8	8	21
38c	2392	5	5	10	10	1.2
39b	2594	4	8	16	12	0.09

Abbildung 3.43: Effektivitätsvergleich der untersuchten Glykopeptide zur Identifizierung der essentiellen Hydroxygruppen.

Wasserstoffbrückenbindungen bei Verlängerung der Kette bei den Disaccharid-AFGP doppelt so groß wie bei den Monosaccharid-AFGP ist. Sowohl die GalNAc- als auch die Gal-Gruppe sind beim Disaccharid an der Bindung beteiligt. Wäre allein die Größenänderung entscheidend, so müsste der Schritt vom Monosaccharid-Trimer (**38a**) zum Disaccharid-Trimer (**39a**) zum gleichen Ergebnis führen wie bei den Tetrameren (**38b** und **39b**). In beiden Fällen wird die Masse und damit auch ungefähr die Größe um den Faktor 1.3 erhöht. Bei den Peptiden mit 4 Wiederholeinheiten wird c_i aber um zwei Größenordnungen erniedrigt. Bei den Trimeren wird c_i nur um eine Größenordnung abgesenkt.

Nahezu gleiche Massen besitzen das Monosaccharid-Tetramer ($m(\mathbf{38b}) = 1946$ Da) und das Disaccharid-Trimer ($m(\mathbf{39a}) = 1986$ Da). Tatsächlich sind hier die Effektivitäten mit $c_i = 21 \mu\text{mol L}^{-1}$ und $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ auch sehr ähnlich. Ebenfalls gut ist die Übereinstimmung in den Massen zwischen dem Monosaccharid-Pentamer (**38c**) mit 2392 Da und dem Disaccharid-Tetramer (**39b**) mit 2594 Da. Allerdings unterscheiden sich hier die Effektivitäten deutlich. Beim Monosaccharid-Pentamer beträgt c_i $1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Der Wert für das Disaccharid-Tetramer liegt hingegen mit $0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$ um ein Vielfaches tiefer. Die Schlussfolgerung ist, dass bei den kleineren Peptiden sowohl Größe als auch Bindungsstärke nahezu übereinstimmen. Hier ist die Anzahl der an der Bindung beteiligten Hydroxygruppen ähnlich. Bei den größeren Peptiden hingegen unterscheidet sich diese Anzahl stärker.

In der Reihe der Tetramere vom Rückgrat **46** über das Monosaccharid-Analogon **38b** bis zum Disaccharid-Analogon **39b** sinkt c_i zunächst verhältnismäßig leicht von $147 \mu\text{mol L}^{-1}$ auf $21 \mu\text{mol L}^{-1}$. Der Übergang vom Mono- zum Disaccharid ($c_i = 0.09 \mu\text{mol L}^{-1}$) bewirkt eine sehr viel größere Effektivitätssteigerung. Die Molmassen der Peptide steigen hingegen bei diesem Übergang schwächer an. Das heißt, hier nimmt die Bindungsstärke in größerem Maße zu. Wenn die Hydroxygruppe, wie Knight et al. (1993) es vorschlägt, tatsächlich ins Eis eingebaut wird, könnte die Methylgruppe des Threonins stören. Die Bindung dadurch schwächer werden. Die Untersuchung eines (Ala-Ala-Ser)-Peptids ohne Kohlenhydrat könnte diese Frage beantworten. Zu diesem Zeitpunkt ist zu vermuten, dass die Anzahl von essentiellen Hydroxygruppen vom Rückgrat zum Monosaccharid wenig oder gar nicht ansteigt. Dies ist nur möglich, wenn in beiden Fällen die Bindung zum Eis nur über eine Hydroxygruppe pro Wiederholeinheit erfolgt. Dafür spricht auch die höhere Effektivität des Rückgrats **46** im Vergleich zum Monosaccharid-Trimer **38a**. Würden mehrere Kohlenhydrat-Hydroxygruppen an das Eis binden, so besäße AFGP **38a** nicht nur die größere Molmasse, sondern auch die deutlich größere Bindungsstärke. Da das Rückgrat allerdings effektiver ist, muss dieses stärker binden. Der analoge Vergleich zwischen den Peptiden **39a** und **38b** wiederum zeigt, dass nun das Disaccharid-Trimer **39a** über mehr Hydroxygruppen an das Eis binden muss, da hier dessen Effektivität trotz des geringeren Anstiegs der Molmasse verhältnismäßig stark ansteigt. Dies muss zusammen mit den übrigen Kriterien bedeuten, dass die Bindung beim Disaccharid auf zwei Hydroxygruppen pro Wiederholeinheit beruht. Diese Schlussfolgerungen würden zu dem Modell von Knight et al. (1993) passen. Es gibt nur eine essentielle Hydroxygruppe pro Ring und diese sitzt an Position C4 oder C6.

3.6.4 Einfluss von niedermolekularen Verbindungen

Li et al. (1998) konnten eine kooperative Wirkung in Bezug auf thermische Hysterese zwischen einem AFP und einer Reihe von Salzen, Aminosäuren und Kohlenhydraten nachweisen. Das dort verstärkte AFP stammt von der überwinternden Larve eines Feuerkäfers (*Dendroides canadensis*). Die größte Verstärkung wurde dabei durch die Zugabe von Natriumcitrat hervorgerufen. Es erhöht die TH von 1.3°C auf 6.8°C bei einer Citratkonzentration von 1 mol L⁻¹. Die AFP-Konzentration beträgt jeweils 10 mg mL⁻¹ (1.4 mmol L⁻¹).

In der vorliegenden Arbeit wurde Natriumcitratdihydrat verwendet, um seinen Einfluss auf die Rekristallisationsinhibierung eines Glykopeptids (**39a**) zu testen. AFGP **39a** ist aus 3 Wiederholeinheiten aufgebaut und trägt ein Disaccharid (Gal-GalNAc) am Threonin. In Tabelle 3.13 sind einige exemplarische Versuche dargestellt, die die Wirkung von Natriumcitrat verdeutlichen sollen. Alle Experimente wurden bei -8°C durchgeführt. Als erstes ist ein Experiment mit reiner Saccharoselösung (45 Gew.-%) aufgeführt. Bei einem Eisanteil von 0.06 wird dabei eine diffusionsbestimmte Ratenkonstante von 1.32 µm³ min⁻¹ erhalten. Beim zweiten Experiment beinhaltet die Lösung neben Saccharose (35 Gew.-%) noch AFGP **39a** (0.01 mg mL⁻¹ bzw. 0.005 mmol L⁻¹) und Natriumcitratdihydrat (39 mg mL⁻¹ bzw. 130 mmol L⁻¹). Da die Zugabe von Natriumcitrat in diesen Mengen einen großen Einfluss auf den Schmelzpunkt der Lösung hat, wurde der Saccharosemassenanteil reduziert, um den Eisanteil konstant zu halten ($Q_v = 0.08$). Die AFGP-Konzentration liegt mit 0.01 mg mL⁻¹ in einem Bereich, wo die Rekristallisation noch vollständig diffusionskontrolliert abläuft ($c_i = 0.06$ mg mL⁻¹). Wenn das Natriumcitrat die Effektivität des Peptids erhöht, dann sollte der Effekt hier deutlich werden. Wie in Tabelle 3.13 jedoch ersichtlich ist, wird die Effektivität von AFGP **39a** bei einer Natriumcitratdihydratkonzentration von 39 mg mL⁻¹ nicht verstärkt. k_d beträgt 1.38 µm³ min⁻¹. Auch die Kristallform ändert sich nicht deutlich. Die Natriumcitratkonzentration ist im Vergleich zu den Versuchen von Li et al. (1998) aber auch gering. Zukünftige Experimente mit reinen Natriumcitratlösungen bei -8°C werden hoffentlich zweifelsfrei klären, ob Natriumcitrat die Effektivität von AFGP **39a** beeinflusst. Der Vergleich zwischen Natriumbromid- und Saccharoselösungen im Unterabschnitt 3.6.2 hatte gezeigt, dass die Temperatur nicht verändert werden darf, wenn die Effektivitäten verglichen werden sollen. Obgleich Natriumcitrat die Effektivität von AFGP **39a** unter den bisherigen Bedingungen nicht beeinflusst, gilt dies nicht generell für niedermolekulare Verbindungen. In Tabelle 3.13 ist in der letzten Spalte ein Experiment mit AFGP **39a** in einer Saccharoselösung (45 Gew.-%) bei -8°C gezeigt. Die AFGP-Konzentration liegt mit 0.10 mg mL⁻¹ (0.05 mmol L⁻¹) im Bereich der AFP-Kontrolle. Hier wird eine Ratenkonstante von 0.11 µm³ min⁻¹ erhalten. Beinhaltet die Lösung zusätzlich 1,3-Cyclohexandiol (2.4 mg mL⁻¹ bzw. 21 mmol L⁻¹) führt dies zu einer Aufhebung der Wirksamkeit des Peptids (dritte Spalte in Tabelle 3.13). Unter den ansonsten gleichen Bedingungen beträgt die Ratenkonstante nun 1.25 µm³ min⁻¹. Es handelt sich wieder um diffusionskontrollierte Rekristallisation. Um zu verstehen, wie das Glykopeptid durch das Diol beeinflusst wird, sind weitere Experimente geplant. Der erste Schritt wird die Bestimmung des optimalen Verhältnis-

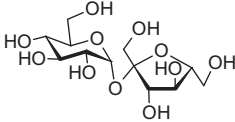
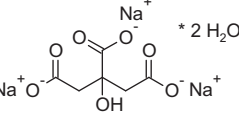
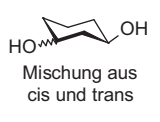
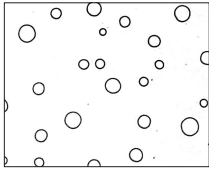
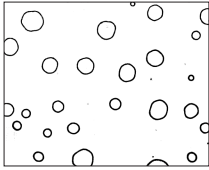
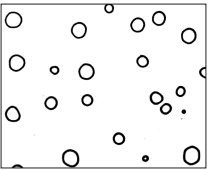
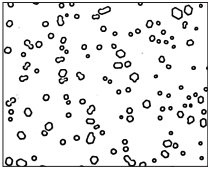
	Saccharose	Natrium-citratdihydrat	1,3-Cyclohexandiol	AFGP 39a
	45 Gew.-%	39 mg mL ⁻¹	2.4 mg mL ⁻¹	0.10 mg mL ⁻¹
Struktur				[AAT ^d] ₃ AA
M_w [g mol ⁻¹]	342.30	294.10	116.16	1 985.95
$100 \mu\text{m}$ $t = 120 \text{ min}$				
T [°C]	-8.0	-8.0	-8.0	-8.0
w_{Sac} [Gew.-%]	45.0	35.0	45.0	45.0
Q_v	0.06	0.08	0.05	0.08
$c(\mathbf{39a})$ [mg mL ⁻¹]	0.00	0.01	0.10	0.10
k [$\mu\text{m}^3 \text{ min}^{-1}$]	1.32	1.38	1.25	0.11

Tabelle 3.13: Beeinflussung der Wirksamkeit von AFGP **39a** durch Zugabe niedermolekularer Verbindungen.

ses zwischen Peptid und Diol sein. Dazu muss zunächst das bisher verwendete Gemisch aus *cis*- und *trans*-Diol getrennt werden. Wenn Diol und Peptid direkt miteinander interagieren, könnte dies mit der Orientierung von Hydroxygruppen zusammenhängen. Dies könnte zu einer Komplexbildung führen, die das Anbinden an das Eis verhindert. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, könnten auch andere zyklische Polyole und verschiedene Peptide verwendet werden.

Li et al. (1998) beobachteten in ihren Versuchen mit dem Insekten-AFP zwar in fast allen Fällen eine Verstärkung der Hysterese, aber auch dort trifft dies nicht auf alle zugegebenen Substanzen zu. Die Untersuchungen umfassen Salze verschiedener organischer Säuren, mehrere Polyole, Aminosäuren, Amine und anorganische Salze, insgesamt 21 Substanzen. Nur eine von ihnen verstärkt das AFP nicht. Natriumsulfat hebt im Gegenteil die thermische Hysterese komplett auf. Die kleinste getestete Konzentration von 0.5 mol L⁻¹ bewirkt bereits diesen Effekt.

Weitere Untersuchungen von Kristiansen et al. (2008) und Wang et al. (2009) zur AFP-Verstärkung durch Salze deuten darauf hin, dass der Mechanismus auf dem Hofmeister-Effekt basiert (Lewith, 1888; Hofmeister, 1888). Danach beeinflussen Salze die Wasserstruktur und verstärken oder vermindern dadurch hydrophobe Wechselwirkungen von Proteinen, was zur Verringerung (Aussalzen) oder zur Erhöhung der Löslichkeit (Einsalzen) führt. Anhand ihrer unterschiedlichen Beeinflussung des Wassers lassen sich Kationen und Anionen in so genannte Hofmeister-Reihen einteilen (Collins und Washabaugh, 1985; Cacace et al., 1997). Am Anfang einer solchen Reihe stehen dabei polare kosmo-

trophe Salze (z. B. Ammoniumsulfat). Diese Salze bestehen aus schwach hydratisierten Kationen und stark hydratisierten Anionen. Sie begünstigen die Ausbildung von Wasserstrukturen, verstärken dadurch hydrophobe Wechselwirkungen und stabilisieren Proteine. Am Ende stehen chaotrophe Salze (z. B. Calciumthiocyanat), die den umgekehrten Effekt haben. Sie brechen Wasserstrukturen auf und destabilisieren Proteine. Salze wie Natriumchlorid stehen in der Mitte der Hofmeister-Reihe und beeinflussen die Proteinstabilität wenig. Die Hofmeister-Reihe wird typischerweise für Ionen angegeben, wobei Anionen einen in der Regel größeren Effekt haben als Kationen. Aber auch ungeladene organische Verbindungen beeinflussen die Proteinstabilität (Collins und Washabaugh, 1985; Cacace et al., 1997). Sie müssen daher ebenfalls berücksichtigt werden, was die Beobachtungen von Li et al. (1998) und Amornwittawat et al. (2008, 2009) erklären könnte. Amornwittawat et al. (2008, 2009) beobachteten eine AFP-Verstärkung durch Polycarbonsäuren, Polyole und Kohlenhydrate. Die Vergrößerung der thermischen Hysterese bestimmten sie dabei mittels dynamischer Wärmestromkalorimetrie (DSC; engl.: differential scanning calorimetry). Das verwendete AFP entstammt wie bei Li et al. (1998) dem Feuertäfer *Dendroides canadensis*.

Nach dem von Kristiansen et al. (2008) vorgeschlagenen Mechanismus wird durch die Zugabe von Salzen das Gleichgewicht zwischen AFP in der Lösung und im Bereich der Eis/Lösung-Grenzfläche verändert. Das Aussalzen führt zu einer erhöhten AFP-Konzentration an der Grenzfläche und damit zu einer Verstärkung der thermischen Hysterese. Problematisch ist allerdings die Aufhebung der thermischen Hysterese durch Natriumsulfat. Li et al. (1998) fanden besonders große TH-Verstärkung bei kosmotropen Salzen wie Natriumcitrat und Ammoniumsulfat. Auch Natriumsulfat sollte aber zu dieser Gruppe gehören. Zudem wurde bei keiner weiteren Verbindung eine Verminderung der Hysterese beobachtet. Die Verwendung von chaotropen Salzen wie Natriumiodid oder Natriumperchlorat in der Arbeit von Wang et al. (2009) führte lediglich zu einer geringeren Verstärkung. Die Anwendbarkeit der Hofmeister-Reihe auf die Verstärkung von AFP ist also fraglich.

4 Polarisationsmikroskopie

4.1 Optische Anisotropie

Kristallines Wasser, also Eis, kommt abhängig von Druck und Temperatur in 15 Modifikationen vor (Malenkov, 2009). Bei den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit (Normaldruck, $T \geq -25^\circ\text{C}$) ist allerdings nur die hexagonale Form I_h von Bedeutung. Bei Normaldruck kommt ebenfalls kubisches Eis (I_c) vor, diese Eisform wandelt sich allerdings bei Temperaturen über -33°C schnell in die hexagonale Form um (Murray und Bertram, 2006). Hexagonales Eis ist die typischerweise in der Natur vorkommende Eisform, wie sie auch in Schneeflocken zu erkennen ist. Die Kristallstruktur von Eis I_h gehört zur Raumgruppe $P6_3/mmc$ und die Gitterkonstanten sind bei -8°C $a = b = 4.52 \text{ \AA}$, $c = 7.36 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma = 120^\circ$ (Röttger et al., 1994). Da Eis I_h eine nichtkubische Kristallstruktur besitzt, ist es doppelbrechend. Dies bedeutet, dass ein Lichtstrahl beim Durchgang durch einen Eiskristall in einen ordentlichen und einen außerordentlichen Strahl geteilt wird. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit des ordentlichen Strahls ist nicht richtungsabhängig und der Strahl folgt dem snelliusschen Brechungsgesetz. Dies gilt aber nicht für den außerordentlichen Strahl, der nicht dem snelliusschen Brechungsgesetz folgt und dessen Ausbreitungsgeschwindigkeit richtungsabhängig ist. Aufgrund dieser Richtungsabhängigkeit werden doppelbrechende Kristalle auch als optisch anisotrop bezeichnet. Der ordentliche Strahl verhält sich dabei wie bei einem optisch isotropen Kristall. Das Verhalten des außerordentlichen Strahls hingegen hängt von der Orientierung des einfallenden Lichtstrahls zur optischen Achse (c -Achse) des Kristalls ab. Sind beide parallel zueinander ausgerichtet, so fallen ordentlicher und außerordentlicher Strahl zusammen und der Kristall erscheint optisch isotrop. Sind einfallendes Licht und optische Achse nicht parallel zueinander orientiert, so wird der außerordentliche Strahl in einem anderen Winkel gebrochen und besitzt eine andere Ausbreitungsgeschwindigkeit als der ordentliche Strahl. Der Kristall besitzt in unterschiedlichen Raumrichtungen auch verschiedene Brechungsindizes. Für einfallendes Licht parallel zur optischen Achse und Licht senkrecht zur optischen Achse werden zwei Hauptbrechungsindizes definiert.

Beim Einstrahlen von unpolarisiertem Licht in einen doppelbrechenden Kristall wird dieses linear polarisiert. Daher können doppelbrechende Kristalle zur Erzeugung von linear polarisiertem Licht eingesetzt werden. Die Polarisierungsebenen der beiden resultierenden Teilstrahlen stehen senkrecht zueinander und parallel bzw. senkrecht zur optischen Achse. Wird bereits linear polarisiertes Licht eingestrahlt, kann dadurch die Ausrichtung der optischen Achse bestimmt werden, wie im Folgenden erläutert wird. Der Zusammenhang zwischen Orientierung der optischen Achse (o) und der Polarisierungsebene des polarisierten Lichts ist in Abbildung 4.1 dargestellt. In einem Polarisationsmikroskop wird zunächst

unpolarisiertes Licht durch einen Polarisationsfilter (Polarisator, P) linear polarisiert. Dieses Licht und seine Polarisationsrichtung wird durch den Vektor \vec{p} symbolisiert. Dann tritt dieses durch den zu untersuchenden Kristall, wobei der Lichtstrahl in den ordentlichen (\vec{o}) und den außerordentlichen Strahl (\vec{a}_o) geteilt wird. Sind Polarisator und optische Achse parallel zueinander ausgerichtet, so besitzt das austretende Licht entsprechend nur eine Komponente. Das austretende Licht schwingt dann nur parallel zum Polarisator bzw. zur optischen Achse. Trifft dieses Licht dann auf einen zweiten Polarisationsfilter, den Analysator (A), der senkrecht zum Polarisator ausgerichtet ist, tritt kein Licht hindurch. Das resultierende Bild ist vollkommen schwarz. In Abbildung 4.1a ist eine kleine Abweichung zwischen Polarisator und optischer Achse gezeigt. Die Folge ist, dass die Vektoren \vec{o} und \vec{a}_o geringe Anteile in Richtung des Analysators besitzen. Dies wird durch die Vektoren \vec{a}_{ao} und \vec{a}_{ao} dargestellt. Ein Teil des eingestrahlichten Lichts tritt aus und der Kristall erscheint etwas heller als der schwarze Hintergrund.

Die maximale Helligkeit wird erreicht, sobald Polarisator und optische Achse in einem 45° -Winkel zueinander stehen (Abbildung 4.1b). Hier erreichen die Vektoren \vec{a}_o und \vec{a}_{ao} ihre maximale Länge. Bei größerem Winkel nimmt die Helligkeit erneut ab (Abbildung 4.1c),

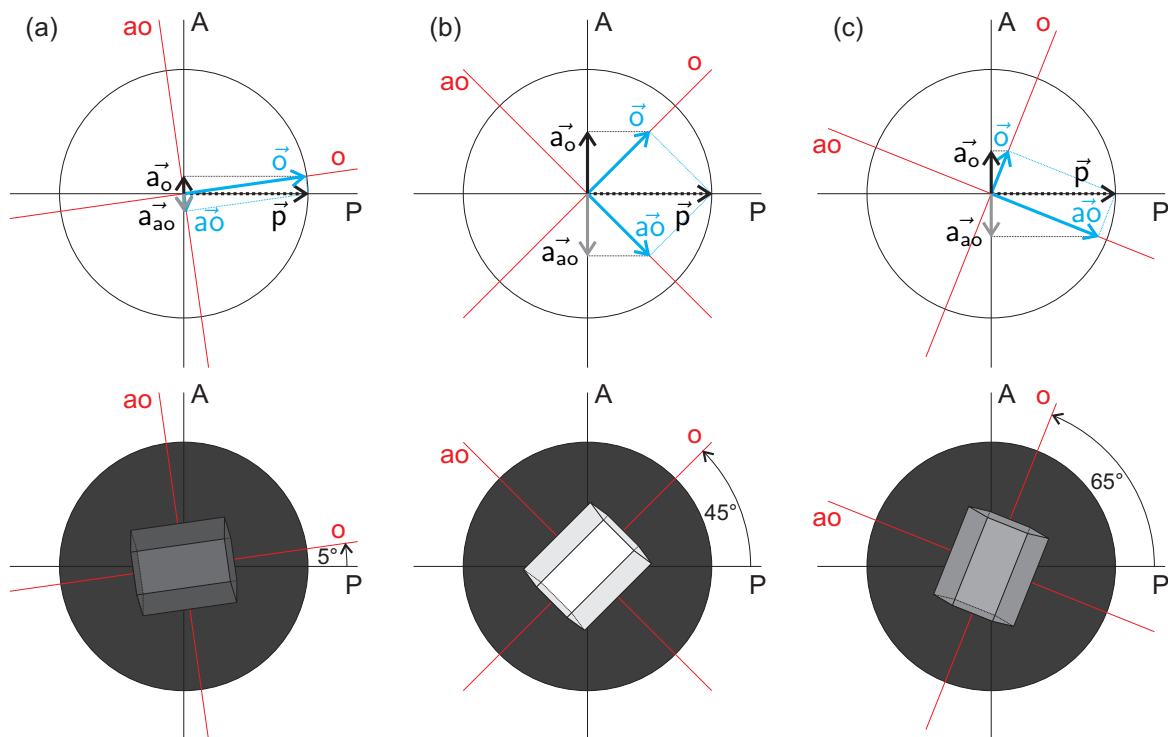


Abbildung 4.1: Abhängigkeit der Helligkeit von der Orientierung der optischen Achse (o) doppelbrechender Kristalle zwischen gekreuzten Polarisatoren. (a) Polarisator (P) und optische Achse sind nahezu parallel zueinander angeordnet. (b) Maximale Helligkeit bei 45° -Stellung. (c) Abnahme der Helligkeit bei Annäherung von Analysator (A) und optischer Achse.

bis bei paralleler Ausrichtung von Analysator und optischer Achse wieder ein völlig schwarzes Bild erhalten wird.

Stehen der Polarisator und die optische Achse eines Kristalls in einem 45° -Winkel zu einander, so besitzt dieser seine maximale Helligkeit. Unterschiedliche Kristalle können bei gleicher Orientierung und bei gleicher eingestrahelter Lichtintensität dennoch unterschiedlich hell sein. Dies hängt damit zusammen, dass aus dem einfallenden Lichtstrahl zwei Teilstrahlen erzeugt werden, die sich mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch den Kristall bewegen. In Abhängigkeit der resultierenden Phasendifferenz, die wiederum von der Dicke des Kristalls abhängt, kommt es beim Wiederaustritt des Lichts aus dem Kristall zu destruktiver oder konstruktiver Interferenz.

Im Folgenden wird die Polarisationsmikroskopie dazu eingesetzt, die Lage der optischen Achse und damit die absolute Ausrichtung kleiner Eiskristalle zu bestimmen. Ziel dieser Experimente war die Ermittlung der jeweiligen Eisfacetten, an denen AFGP oder PVA adsorbieren.

4.2 Experimenteller Teil

Die verwendete Apparatur besteht aus einem optischen Mikroskop (Olympus BX51) mit dem Kondensor/Polarisator U-POC-2 und dem Analysator U-AN360P sowie einem Temperiertisch (siehe auch Abbildung 3.1). Das Mikroskop wurde in den hier erläuterten Experimenten im Durchlicht-Hellfeld-Modus betrieben. Von den untersuchenden Saccharoselösungen (30 Gew.-%) wurden je $5 \mu\text{L}$ zwischen zwei am Rand mit Silikonfett verschlossenen Gläsern verbracht. Dieses Sandwich wurde in den Temperiertisch überführt und ein im Folgenden näher beschriebenes Temperaturprofil durchlaufen. Währenddessen wurde das Innere der Kammer und das obere Fenster mit trockenem, gasförmigem Stickstoff gespült, um Kondensation von Wasser aus der Luft zu verhindern. Nach dem Einstellen einer konstanten Temperatur wurden die zurückbleibenden Eiskristalle unter rechtwinklig zueinander angeordneten, linearen Polarisatoren beobachtet. Zur Bestimmung der Lage der optischen Achse wurden Polarisator und Analysator in 10° -Schritten insgesamt um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht.

Beim AFGP **38b** wurde das mit flüssigem Stickstoff gekühlte System MDBC196 (Linkam) verwendet. Bilder wurden hier mit der Digitalkamera PixeLINK PL-A662 aufgenommen. Die AFGP-Konzentration lag bei 1 mg mL^{-1} . Die Probe wurde von Raumtemperatur mit einer Rate von $20^\circ\text{C min}^{-1}$ auf -40°C abgekühlt. Nach dem Einfrieren wurde mit $10^\circ\text{C min}^{-1}$ auf -5°C aufgewärmt. Anschließend wurde die Temperatur mit 1 bis $0.01^\circ\text{C min}^{-1}$ so eingestellt, dass nur noch wenige Kristalle zurückblieben. Während der folgenden Aufnahme von Bildern wurde die Temperatur konstant gehalten.

Bei der Untersuchung von PVA27 (**29b**) kam als Temperiertisch das Peltier-Kühlsystem LTS120 (Linkam) zum Einsatz. Zur Aufnahme von Bildern wurde die Digitalkamera Olympus DT5 benutzt. Die PVA-Konzentration betrug 5 mg mL^{-1} . Das Temperaturprofil war bei diesem Versuch ähnlich dem zuvor beschriebenen mit dem Unterschied, dass zunächst mit einer Rate von $10^\circ\text{C min}^{-1}$ auf -25°C abgekühlt wurde.

4.3 Antigefrierglykopeptide

Die kleinen natürlichen AFGP adsorbieren an den primären prismatischen $\{100\}$ -Eisflächen. Dies wurde für AFGP 7 und 8 mittels Gefrierätzens bestimmt (Knight et al., 1993; Knight und DeVries, 1994). Bei dieser Methode wird zunächst ein Einkristall am Ende eines Kühlfingers angefroren, dessen Temperatur bei -6°C gehalten wird. Dann wird der Kristall in eine AFGP-Lösung (100 mL, $+15^\circ\text{C}$) eingetaucht. Dies führt dazu, dass der Kristall bis auf eine Dicke von etwa 0.5 cm um den Kühlfinger antaut, bevor er wieder langsam zu wachsen beginnt. Nach 6 Stunden hat der Kristall eine Halbkugelform mit einem Durchmesser von 6 cm angenommen. Nachdem die oberste Eisschicht abgekratzt wurde, wird bei -15 bis -20°C das restliche Eis langsam verdampft. An Stellen, an die keine AFGP adsorbiert sind, bleibt eine vollkommen glatte Oberfläche zurück. Dort allerdings, wo AFGP adsorbiert und ins Eis eingebaut wurden, entsteht eine raue, milchige Oberfläche.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Eis-Einkristalle ebenfalls in AFGP-Lösungen (AFGP **38b**) gezüchtet. In Abbildung 4.2 sind Kristalle gezeigt, die in einem dieser Experimente erhalten wurden. In der obersten Reihe (ohne gekreuzte Polarisatoren) wird bereits deutlich, wie klar sich die hexagonale Eisstruktur beim Eiswachstum ausgeprägt hat. In Abbildung 4.2a ist die Gesamtheit aller in diesem Experiment betrachteten Kristalle gezeigt. In Abbildung 4.2b-f ist jeweils ein Kristall vergrößert dargestellt. In Abbildung 4.2b ist die c-Achse des betrachteten Kristalls senkrecht zur Bildfläche orientiert. Die prismatischen Flächen sind perfekt ausgebildet. Zwischen gekreuzten Polarisatoren ist dieser Kristall nicht zu erkennen, da das Licht beim Durchgang durch den Kristall bei dieser Orientierung nicht in einen ordentlichen und einen außerordentlichen Strahl geteilt wird. Dies gilt unabhängig von der Stellung des Kristalls zum Polarisator. Gleichzeitige Drehung von Polarisator und Analysator führt zu keiner Aufhellung. Die geringfügige Aufhellung der jeweiligen Bilder im Bereich von 30 bis 60° beruht auf der nicht perfekten 90° -Stellung zwischen Polarisator und Analysator.

Bei den drei nächsten Eiskristallen (Abbildung 4.2c-e) liegt die c-Achse in der Bildebene. Drehung von Polarisator und Analysator führt hier zu einer Aufhellung der Kristalle je nach Orientierung im Vergleich zum Polarisator bzw. Analysator. Die optimale Orientierung der optischen Achse wird bei diesen Kristallen bei ca. 60 , 30 und 20° erreicht, da dort die Kristalle am hellsten sind.

Beim Kristall in Abbildung 4.2c sind auch die basalen und prismatischen Flächen ($1\bar{1}0$) und (010) gut zu erkennen. Dieser Kristall besitzt zwei deutlich unterschiedliche Arten von Kristallrändern. Sowohl der obere als auch der untere Rand sind relativ schmal und sehr dunkel. Das Licht wird an diesen Flächen gebrochen und stark abgelenkt. Sie stehen demnach senkrecht zur Bildebene, wodurch sie dunkler erscheinen. Dies sind die basalen $\{001\}$ -Kristallflächen. Zwischen gekreuzten Polarisatoren zeigt sich bei den beiden anderen Rändern eine Helligkeitsänderung aufgrund einer variierenden Kristalldicke. Diese Ränder sind daher den abgeschrägten prismatischen Flächen ($1\bar{1}0$) und (010) zuzuordnen. Direkt an der Grenze zur (100) -Fläche ist die Helligkeit wie die Kristalldicke am

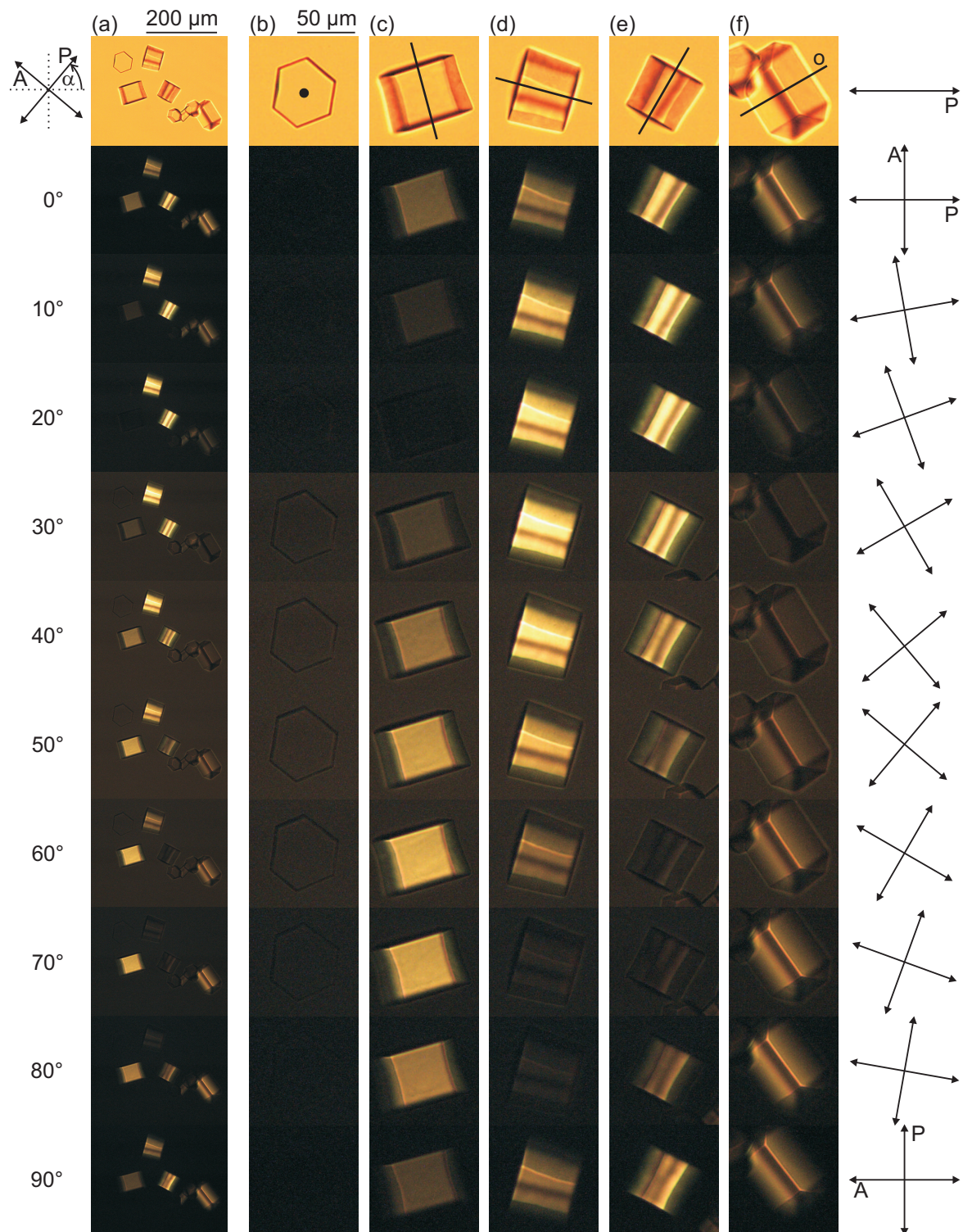


Abbildung 4.2: Form und Orientierung von Eiskristallen, gebildet aus einer Saccharose-Lösung (30 Gew.-%) mit 1 mg mL^{-1} Monosaccharid-AFGP **38b**. Die Linien in der oberen Reihe geben die Orientierung der optischen Achse (o) an. Die Pfeile geben die Stellung von Polarisator (P) und Analysator (A) an.

größten. Zum Rand hin, nimmt die Dicke und damit auch die Helligkeit ab, bis schließlich nicht mehr zwischen Kristall und Umgebung unterschieden werden kann.

In Abbildung 4.2c fallen mehrere der 6 Kanten des hexagonalen Prismas parallel zur *c*-Achse übereinander und sind daher nicht zu unterscheiden. Beim dem Kristall, der in Abbildung 4.2d gezeigt ist, sind vom unteren Bildrand ausgehend aber alle 6 Kanten erkennbar. Dadurch ergeben sich bei diesem Kristall 5 Bereiche mit Helligkeitsunterschieden zwischen gekreuzten Polarisatoren. Vom unteren Rand (erste Kante) beginnend nimmt die Helligkeit mit der Kristalldicke zu, bis die zweite Kante erreicht wird. Von nun an wird weniger Licht gestreut, da zumindest eine der Kristallflächen senkrecht zum einfallenden Licht steht. Maximale Helligkeit wird zwischen der dritten und vierten Kante erhalten. Hier sind die obere und die untere Kristallfläche senkrecht zum einfallenden Licht orientiert. Weiter nach oben nimmt die Helligkeit erneut ab, bis am oberen Rand (sechste Kante) der Kristall wieder mit der Umgebung verschmilzt. Ein ähnliches Bild wird beim Kristall in Abbildung 4.2e beobachtet. Allerdings fallen auch hier zwei Kanten übereinander. Es ergeben sich 4 Bereiche.

In Abbildung 4.2f ist ein Kristall gezeigt, der aufgrund der Verschmelzung mit einem weiteren weder auf einer basalen noch auf einer prismatischen Fläche ruht. Die *c*-Achse dieses Kristalls ragt aus der Bildebene heraus, ist aber nicht senkrecht zu ihr ausgerichtet. Dies hat zur Folge, dass zwischen gekreuzten Polarisatoren hier noch deutlicher der Zusammenhang zwischen Helligkeit und Kristalldicke zu erkennen ist. Die größte Helligkeit wird bei diesem Kristall bei 80° erreicht. An der vermeintlich dicksten Stelle ist eine dunkle Kante des Kristalls, so dass hier der Kristall nicht hell sondern im Gegenteil schwarz ist. In der Umgebung dieser Kante allerdings ist die Helligkeit tatsächlich am höchsten. Zum Rand hin wird die Helligkeit dann mit abnehmender Kristalldicke geringer.

Bei den in AFGP-Lösung gewachsenen Kristallen sind sowohl die primären prismatischen als auch die basalen Flächen ausgeprägt. Um entscheiden zu können, an welche Flächen die Peptide genau adsorbieren oder ob sie vielleicht sogar an beide adsorbieren, muss die Oberflächenbeschaffenheit betrachtet werden. Am besten werden die Unterschiede beim Vergleich der Kristalle in der oberen Reihe (ohne gekreuzte Polarisatoren) ersichtlich. Beim Kristall, dessen basale Fläche in der Bildebene liegt (Abbildung 4.2b), ist die Oberfläche vollkommen glatt. Dies deutet wie beim Gefrierätzen auf das Fehlen von adsorbierten Molekülen hin. Das Wachstum erfolgt schichtweise, wobei jede Schicht vollständig geschlossen wird, ohne dass adsorbierte AFGP dies behindern. Dies ist anders bei den prismatischen Flächen (Abbildung 4.2c-e). Hier ist die Rauigkeit der prismatischen Kristallflächen gut zu erkennen. Die Oberfläche weist hellere und dunklere Flecken auf. Aufgrund von Vertiefungen dort, wo Peptide adsorbiert sind, kommt es zu einer Ablenkung des Lichts. AFGP **38b** adsorbiert also wie natürliches AFGP 8 an die prismatischen $\{100\}$ -Eisflächen.

4.4 Polyvinylalkohol

Für PVA wird von Inada und Lu (2004) eine Adsorption an pyramidalen $\{10x\}$ -Flächen vorgeschlagen, wobei sie das x anhand ihrer Experimente nicht genauer bestimmen konnten. Die Beobachtungen von Budke und Koop (2006) bei der Betrachtung des Kristallwachstums von Eis in PVA-Lösungen hingegen deuten auf eine andere Adsorption parallel zur c -Achse an primären und sekundären prismatischen Eisflächen hin. Dieses Modell wird gestützt durch den Vergleich der Strukturen von Eis und PVA.

Analog zu den zuvor beschriebenen Experimenten mit AFGP **38b** wurden Versuche mit PVA27 (**29b**) durchgeführt. In Abbildung 4.3a ist das Gesamtbild eines dieser Experimente aufgeführt. In Abbildung 4.3b-f sind ausgewählte Kristalle gezeigt. Prinzipiell wird ein ähnliches Bild wie beim AFGP erhalten. In Abbildung 4.3b,c ist jeweils ein Kristall gezeigt, dessen c -Achse senkrecht zur Bildfläche ausgerichtet ist. Zwischen gekreuzten Polarisatoren sind diese Kristalle unsichtbar. Anders sieht es in Abbildung 4.3d-f aus. Die c -Achsen der hier gezeigten Kristalle befinden sich in der Bildebene. Die Kristalle ändern ihre Helligkeit bei Drehung von Polarisator und Analysator. Es werden nur die prismatischen Flächen beobachtet, die Ausbildung von pyramidalen Flächen ist nicht zu erkennen. Zum einen zeigen die Kristalle keine charakteristische Bipyramide, zum anderen nimmt die Helligkeit nicht kontinuierlich ab, sondern bleibt innerhalb der (100) -Fläche konstant. Beim Kristall in Abbildung 4.3d sind die basalen Flächen nach oben bzw. unten hin ausgerichtet. Die Flächen $(1\bar{1}0)$ und (010) befinden sich links und rechts. Daher ist dieser Kristall bei einer Drehung von etwa 45° am hellsten. Der Kristall in Abbildung 4.3e ist hierzu um 45° gegen den Uhrzeigersinn verdreht. Entsprechend ist er bei 0 bzw. 90° am hellsten, also genau dann, wenn der vorherige Kristall (Abbildung 4.3d) am dunkelsten ist und umgekehrt. Der in Abbildung 4.3f gezeigte Kristall ist bei 60° am hellsten und damit dann optimal zum Polarisator ausgerichtet.

Wie beim AFGP erschließt sich die Adsorption bei Betrachtung der Oberflächenbeschaffenheit. Beim PVA27 ist die Rauigkeit jedoch sehr viel stärker ausgeprägt. Klar ist die basale Fläche (Abbildung 4.3b,c) sehr viel glatter als die prismatischen Flächen. Wie in Abbildung 4.3d-f zu sehen ist, sind die Oberflächen der prismatischen $\{100\}$ -Flächen durch große Vertiefungen gekennzeichnet. PVA adsorbiert demnach ebenso wie AFGP an die prismatischen Eisflächen. Diese Beobachtung untermauert das Modell von Budke und Koop (2006), wonach PVA an diese Flächen adsorbiert.

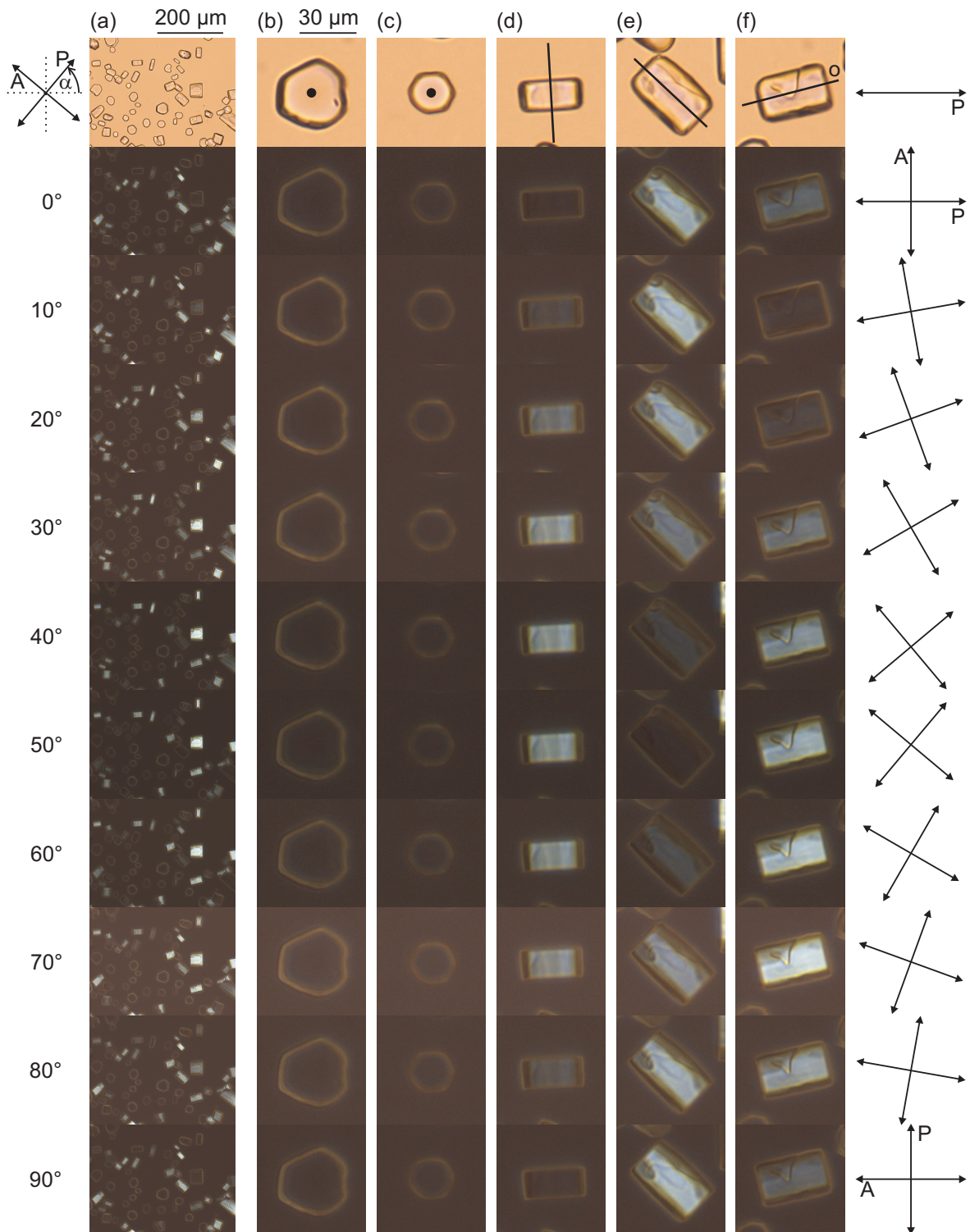


Abbildung 4.3: Form und Orientierung von Eiskristallen, gebildet aus einer Saccharose-Lösung (30 Gew.-%) mit 5 mg mL^{-1} PVA27 (**29b**). Die Linien in der oberen Reihe geben die Orientierung der optischen Achse (o) an. Die Pfeile geben die Stellung von Polarisator (P) und Analysator (A) an.

4.5 Zusammenfassung

Mit der in diesem Kapitel vorgestellten Technik der Polarisationsmikroskopie ist es erstmals gelungen, die absolute Orientierung von Eiskristallen mit Durchmessern von 20 bis 50 μm in Gegenwart von gefrierhemmenden Substanzen zu bestimmen und daraus auf die Eisfacetten zu schließen, an die AFGP oder PVA adsorbieren. Diese Technik ist ein vergleichsweise einfaches und schnelles Werkzeug für solche Studien und kann daher zukünftig ohne großen Aufwand oder Probenvorbereitung vermehrt genutzt werden. Neben der einfacheren Versuchsdurchführung im Vergleich zum Gefrierätzen bietet die neue Methode zudem den großen Vorteil, dass sehr viel geringe Mengen benötigt werden. Im Gegensatz zu mehreren Millilitern der zu untersuchenden Lösung genügen hier wenige Mikroliter.

5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kinetik der Eisrekristallisation in verschiedenen wässrigen Lösungen in Anwesenheit von verschiedenen Additiven wie AFGP untersucht. Zudem wurde zur Beschreibung dieser Kinetik eine neue Methode entwickelt und angewandt, die auf der LSW-Theorie basiert. Ein Schwerpunkt lag dabei auf Natriumbromid- und Saccharoselösungen. Bei der Bestimmung der Ratenkonstanten für die diffusionskontrollierte Rekristallisation in Abhängigkeit des Eisanteils Q_v zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den nach der LSW-Theorie berechneten und den anhand der experimentellen Daten extrapolierten Werten für Q_v gegen Null. Zudem ergaben sich bei gleichem Eisanteil bei den Saccharoselösungen immer kleinere Rekristallisationsratenkonstanten als bei den Natriumbromidlösungen, obwohl die Rekristallisationstemperatur dort sehr viel niedriger war. Die experimentelle Betrachtung der Temperaturabhängigkeit zeigte bei den Saccharoselösungen eine Abnahme der Rekristallisationsgeschwindigkeit mit sinkender Temperatur. Dennoch sind die Ratenkonstanten der Natriumbromidlösungen die höchsten, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden. Aus den Berechnungen wird ersichtlich, dass dies maßgeblich mit den höheren Diffusionskoeffizienten von Wasser in den entsprechenden Lösungen zusammenhängt. Zur Beschreibung des Einflusses des Eisanteils wurde in dieser Arbeit eine modifizierte Form der VG-Gleichung vorgestellt (Voorhees und Glicksman, 1984). Bei der Anpassung dieser Gleichung an die experimentellen Daten zeigte sich, dass der Kurvenverlauf für $Q_v \lesssim 0.30$ praktisch unabhängig von der Art der Lösung und auch ebenso unabhängig von der Rekristallisationstemperatur ist. Ob dies auch für weitere Lösungen und in einem größeren Temperatur- und Eisanteilsbereich gilt, müssen allerdings noch weitere Experimente zeigen.

Bei der Berechnung des Gesamtmassenanteils des Gelösten aus dem Eisanteil ergab sich bei allen durchgeführten Experimenten eine Abweichung von dem Einwaagemassenanteil. Umfangreiche Untersuchungen bei konstanten und variierenden Temperaturen während der Rekristallisation legen den Schluss nahe, dass dies zum Teil mit der Verwendung des Bulk-Phasendiagramms zusammenhängt, denn aufgrund der überlappenden Diffusionsfelder der Kristalle bei Eisanteilen größer Null darf dann nicht mehr die Gleichgewichtskonzentration eines Bulk-Kristalls verwendet werden. Allerdings ist bei diesem Punkt anzumerken, dass kein besseres Phasendiagramm zur Verfügung steht. Eine weitere Ursache ist vermutlich auch das Verdampfen von Wasser während der Probenvorbereitung und in dem Zeitraum bis zum Beginn der Rekristallisation. Die durchgeführten Experimente belegen aber eindeutig, dass sich der Gesamtmassenanteil während der Rekristallisation im Beobachtungsbereich nicht ändert. Dennoch wird ein Ziel weiterer Versuche die Minimierung dieses Artefakts sein müssen, beispielsweise durch das Verschließen der Ränder der Deckgläser mit Fetten oder Polymerfilmen.

Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Bestimmung der Effektivität, mit der verschiedene Substanzen die Eisrekristallisation hemmen. Zur Quantifizierung dieser Effektivität wurde die Inhibierungskonzentration c_i eingeführt, bei der ein Wechsel zwischen diffusions- und AFP-kontrollierter Rekristallisation eintritt. Es stellte sich heraus, dass die so bestimmte Effektivität zum Teil stark von der Rekristallisationstemperatur abhängt. Mit sinkender Temperatur wird die gleiche Wirkung schon bei kleineren Konzentrationen erreicht, das heißt die Effektivität nimmt zu. Dies deutet auf ein reversibles Gleichgewicht zwischen an Eis adsorbierten und desorbierten Molekülen hin, da ein Adsorptionsgleichgewicht bei tieferen Temperaturen zur Seite der adsorbierten AFP verschoben werden sollte. Ein solcher Effekt ist bei irreversibler Adsorption nicht zu erwarten. Die Erhöhung des Eisanteils und damit die Erhöhung der AFP-Konzentration hat hingegen praktisch keine Erhöhung der Effektivität zur Folge. Es wurde gezeigt, dass dies auf der größer werdenden Eisoberfläche bei steigendem Eisanteil beruht, wodurch die Konzentration auf der Eisoberfläche nahezu unverändert bleibt. Es muss an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen werden, dass die Effektivitätssteigerung bei abnehmender Temperatur möglicherweise nicht allein auf die veränderte Temperatur zurückzuführen ist. Einen weiteren Einfluss könnte die Art der Lösung haben. Gegenstand weiterer Untersuchungen zur Klärung dieser Frage werden daher verschiedene Lösungen bei gleichbleibender Rekristallisationstemperatur sein.

Neben der Temperaturabhängigkeit von c_i legen auch die Vergleiche unterschiedlicher Polymere und AFGP einen reversiblen Adsorptions-Mechanismus nahe. So bewirkt die Verlängerung der Kette bei PVA ebenso wie bei AFGP eine Erhöhung der Effektivität. Diese könnte allein betrachtet auch auf die Veränderung in der Molekülgröße zurückzuführen sein. Chemische Veränderungen der AFGP-Molekülbausteine wie etwa Modifikationen des Kohlenhydrats, Acetylierung und Sequenzvariationen deuten jedoch darauf hin, dass die Effektivität nicht allein größenabhängig ist. Vielmehr wird die Stärke der Bindung an das Eis beeinflusst. Die beobachtete Veränderung in der Bindungsstärke bei AFGP mit Mono- und Disaccharid-Kohlenhydraten lässt zudem den Schluss zu, dass an der Bindung in erster Linie die Hydroxygruppen der Kohlenhydrate an den C4- oder C6-Positionen beteiligt sind. Zu diesem Ergebnis trägt bei, dass auch das reine Peptidrückgrat, also ohne Kohlenhydrat, Antifriereigenschaften besitzt. Dies konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden. Tachibana et al. (2004a) waren aufgrund des Fehlens von thermischer Hysterese und Eisstrukturierung bei ihren Experimenten zu dem Schluss gekommen, dass das Peptidrückgrat allein inaktiv sei. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings belegt, dass dem nicht so ist. Vermutlich genügt die Hydroxygruppe des Threonins für eine Bindung an Eis aus. Jedoch ist die Hemmung der Rekristallisation auf einen relativ kleinen Konzentrationsbereich beschränkt. Hierfür könnte die durch die Entfernung des Kohlenhydrats verringerte Löslichkeit dieses Peptids verantwortlich sein. Bei zu hohen Konzentrationen kommt es wahrscheinlich zu einer Aggregation bzw. zum Ausfallen der Peptide, die dadurch nicht mehr an Eis binden können.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass es beim Austausch von Alanin gegen Prolin bei AFGP zu einer starken Erniedrigung der Effektivität in Bezug auf die Hemmung der Eisrekristallisation kommt. Wie stark die Effektivität allerdings

bei den natürlichen, prolinhaltigen AFGP herabgesetzt ist, wurde bisher nicht geklärt und wird Teil zukünftiger Experimente sein. In Bezug auf thermische Hysterese hatten Schrag et al. (1982) keinen signifikanten Effekt durch den Austausch von Alanin gegen Prolin beobachtet. Bereits in der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass bei Peptiden, bei denen Alanin gegen Glycin oder Serin ausgetauscht wurde, neben einer veränderten Effektivität zudem eine Änderung in der Breite des Übergangs zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle zu beobachten ist. Dies könnte mit einer veränderten Flexibilität der Peptide zu erklären sein. Beweise für diese These gibt es bisher nicht, diese Vermutung wird jedoch durch die Kurvenform bei einem Prolin-Analagon mit (Pro-Ala-Thr)-Wiederholeinheit gestützt. Bei diesem Analogon kommt es zu einem deutlich schärferen Übergang zwischen Diffusions- und AFP-Kontrolle im Vergleich zum Peptid mit (Ala-Ala-Thr)-Wiederholeinheit. Weitere Sequenzvariationen und Rechnungen zur Struktur der entsprechenden Verbindungen könnten zukünftig zur Erklärung der Beobachtungen beitragen.

In dieser Arbeit wurde außerdem eine neue Methode vorgestellt, um die spezifische Adsorption von Antieisfrierstoffen zu untersuchen. Grundlage der neuen Technik ist die Ausnutzung der optischen Anisotropie von Eis. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie kann dabei die Orientierung von Eiskristallen in einer AFP-Lösung in-situ bestimmt werden, was zur Bestimmung der Eisfacetten beiträgt, deren Wachstum durch die Adsorption von AFGP gehemmt ist. Damit konnte hier die Adsorption von Monosaccharid-AFGP an prismatischen Eisflächen eindeutig nachgewiesen werden. Sie adsorbieren also an dieselben Flächen wie die natürlichen AFGP gleicher Größe (Knight et al., 1993; Knight und DeVries, 1994).

Analoge Untersuchungen mit PVA zeigten, dass auch dieses Gefrierschutzpolymer an prismatischen Flächen adsorbiert. Damit konnte das zuvor von Budke und Koop (2006) vorgestellte Adsorptionsmodell einer Adsorption parallel zur c-Achse weiter bekräftigt werden. Zur Erweiterung des Anwendungsbereichs dieser Technik soll in zukünftigen Experimenten versucht werden, auch die Adsorption an pyramidalen Eisflächen durch beispielsweise AFP vom Typ I mit der hier verwendeten Methode nachzuweisen.

6 Anhang

6.1 Anpassungen

6.1.1 Wässrige Lösungen

Lösung	T [°C]	k_{d0} [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	p
Natriumbromid	-25	2.6801 ± 0.206	1.2443 ± 0.0374
Saccharose	-6	1.5657 ± 0.144	1.3335 ± 0.0334
Saccharose	-8	0.6519 ± 0.0295	1.3183 ± 0.0179
Saccharose	-10	0.44205 ± 0.0398	1.2634 ± 0.0282

Tabelle 6.1: Parameter der Anpassungen in Abbildung 3.9. Die Fehler für k_{d0} und p entsprechen $\pm \sigma$.

Abb.	Funktion	t [min]	a	Einheit	b	Einheit
3.12a	$y = a + b \cdot x$	5	9.4437	μm^2	81.793	μm^2
3.12a	$y = a + b \cdot x$	10	14.726	μm^2	117.64	μm^2
3.12a	$y = a + b \cdot x$	120	73.402	μm^2	520.04	μm^2
3.12b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	5	909.16	-	-9.8559	-
3.12b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	10	647.42	-	-9.735	-
3.12b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	120	167.68	-	-8.157	-
3.13a	$y = a + b \cdot x$	5	-0.002216	-	0.89698	-
3.13a	$y = a + b \cdot x$	10	-0.0011032	-	0.93728	-
3.13a	$y = a + b \cdot x$	120	-0.00089798	-	1.0409	-
3.13b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	5	0.23689	μm^{-1}	-3.6455	-
3.13b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	10	0.19011	μm^{-1}	-4.0749	-
3.13b	$y = a - a \cdot \exp(b \cdot x)$	120	0.0992	μm^{-1}	-4.2242	-

Tabelle 6.2: Parameter der Anpassungen in Abbildung 3.12 und 3.13.

6.1.2 Additive

AFP	Nr.	Lösung	w_E [Gew.-%]	T [°C]	Q_v	$k_{l0}(0)$ [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	c_i [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	s
[AAT ^d] ₃ AA	39a	NaBr	30	-25	0.11922	2.9857	20.045	2.799
[AAT ^d] ₃ AA	39a	Sac	30	-8	0.19388	0.62121	43.308	2.7259
[AAT ^d] ₃ AA	39a	Sac	40	-8	0.094214	0.73235	55.301	2.9287
[AAT ^d] ₃ AA	39a	Sac	45	-8	0.080674	0.64272	59.911	3.9946
[AAT ^d] ₃ AA	39a	Sac	40	-6	0.061391	1.9669	155.8	2.7904
PVA6	29a	NaBr	30	-25	0.13474	2.4451	15.186	9.0282
PVA6	29a	Sac	40	-8	0.12399	0.71904	359.08	7.3566
PVA6	29a	Sac	45	-8	0.085341	0.62459	589.8	4.7903
PVA6	29a	Sac	40	-6	0.071663	1.7702	628.01	1.6807
PVA27	29b	NaBr	30	-25	0.11023	2.7347	5.783	3.5449
PVA27	29b	Sac	45	-8	0.082449	0.66062	31.716	3.7213

Tabelle 6.3: Parameter der Anpassungen in Unterabschnitt 3.6.2 für Konzentrationen in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Kürzel	Nr.	$k_{l0}(0)$ [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	c_i [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	s	c_{max} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
PVA6	29a	0.62433	590.20	4.802	2000.00
PVA27	29b	0.66100	31.69	3.712	100.00
PVA145	29c	0.62974	54.83	8.956	200.00
PEG3	30	-	-	-	8000.00
PAsSNa	40	-	-	-	15000.00

Tabelle 6.4: Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Polymere) für Konzentrationen in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Kürzel	Nr.	$k_{l0}(0)$ [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	c_i [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	s	c_{max} [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
PVA6	29a	0.62283	102.14	4.869	344.83
PVA27	29b	0.66107	1.17	3.710	3.70
PVA145	29c	0.62974	0.3781	8.9559	1.38
PEG3	30	-	-	-	2666.67
PAsSNa	40	-	-	-	1500.00

Tabelle 6.5: Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Polymere) für Konzentrationen in $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Sequenz	Nr.	$k_{l0}(0)$ [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	c_i [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	s	C_{max} [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
AAT ^d AAT ^d AAT ^d AA	39a	0.64274	59.91	3.9932	300.00
AAT ^d AAT ^d AAT ^d AAT ^d AA	39b	0.78116	0.23026	2.2561	300.00
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38a	0.65213	978.21	11.813	1400.00
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38b	0.63344	41.436	3.0062	400.00
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38c	0.63652	2.9903	3.8102	300.00
AAT AAT AAT AAT AA	46	0.61548	164.74	1.1175	4000.00
Ac-AAT ^m AAT ^m AA	47a	-	-	-	8000.00
Ac-AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	47b	0.75781	1743.3	6.0243	2000.00
AAT ^a AAT ^a AAT ^a AAT ^a AAT ^a AA	48	0.61077	219.68	2.6876	500.00
AAT ^m PAT ^m AAT ^m PA	49	-	-	-	4000.00
AAT ^m GAT ^m AAT ^m PA	50	0.64905	1613.6	2.2033	6000.00
AAT ^m SAT ^m AAT ^m PA	51	0.61402	1269.5	4.2643	4000.00
PAT ^m PAT ^m PAT ^m PAT ^m PA	52	0.71679	177.68	16.571	3000.00

Tabelle 6.6: Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Glykopeptide) für Konzentrationen in $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Sequenz	Nr.	$k_{l0}(0)$ [$\mu\text{m}^3 \text{min}^{-1}$]	c_i [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	s	C_{max} [$\mu\text{mol L}^{-1}$]
AAT ^d AAT ^d AAT ^d AA	39a	0.64273	30.167	3.9941	151.06
AAT ^d AAT ^d AAT ^d AAT ^d AA	39b	0.78125	0.08873	2.2538	115.63
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38a	0.65232	652.1	11.783	933.63
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38b	0.63344	21.293	3.0058	205.55
AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	38c	0.63653	1.2499	3.8099	125.40
AAT AAT AAT AAT AA	46	0.61352	146.65	1.1339	3529.80
Ac-AAT ^m AAT ^m AA	47a	-	-	-	7305.20
Ac-AAT ^m AAT ^m AAT ^m AA	47b	0.75784	1131.8	5.9941	1297.39
AAT ^a AAT ^a AAT ^a AAT ^a AAT ^a AA	48	0.61077	72.669	2.6876	165.40
AAT ^m PAT ^m AAT ^m PA	49	-	-	-	2577.98
AAT ^m GAT ^m AAT ^m PA	50	0.64916	1067.2	2.2018	3969.47
AAT ^m SAT ^m AAT ^m PA	51	0.61401	823.5	4.2641	2594.77
PAT ^m PAT ^m PAT ^m PAT ^m PA	52	0.71681	85.579	16.564	1444.97

Tabelle 6.7: Parameter der Anpassungen in Abschnitt 3.6 (Glykopeptide) für Konzentrationen in $\mu\text{mol L}^{-1}$.

6.2 ImageTool-Skript

```
macro 'Rekristallisation';

var
  j,n,num,num1,count,start,ende,time,tstart,tende : integer;
  min,max,minInnen,maxInnen,minAussen,maxAussen : integer;
  nObj,nObjInnen,nObjAussen : integer;
  timeint : integer;
  timeunit,tab : string;
  tick1,tick2,ticktime,ticktime2,T : real;
  Bild1,index,Gray,Gray1 : integer;
  Abfrage: boolean;
  left,top,width,height : integer;
  poly,vergr : string;
  Exports,ExportsInnen,ExportsAussen : string;
  Dateiname,Dateiname_neu,Dateiordner,Durchmesser : string;
  Obj,ObjInnen,ObjAussen,Results,Diameter : integer;
  Radius,Area,Perimeter,Roundness,FeretDiameter,nObjDiff,RadiusDiff : real;
  RadiusInnen,AreaInnen,PerimeterInnen,RoundnessInnen,FeretDiameterInnen : real;
  RadiusAussen,AreaAussen,PerimeterAussen,RoundnessAussen,FeretDiameterAussen : real;
  concSac,concAdd,Tm,Tcon : real;
  Additiv,Tm_str,Tcon_str,concSac_str : string;
  ROI : real;
  ctrlROI : integer;

begin

{Einstellungen}
  Set('Image', 'scale factor := -4');
  Set('Find Objects', 'selection := auto');
  Set('Find Objects', 'search entire image := true');
  Set('Find Objects', 'show numbers := true');
  Set('Find Objects', 'show outlines := true');
  Set('Find Objects', 'number color := 0 0 0');
  Set('Find Objects', 'outline color := 0 0 0');
  Set('Find Objects', 'show number of objects := false');
  Set('Find Objects', 'send to results := false');
  Set('Find Objects', 'include edge objects := false');
  Set('Find Objects', 'exclude background := false');

  timeunit:='min'; tab := chr(9); Bild1 := 0;CloseAll; ShowResults(1); DiscardResults;

{ROI und Thresholds bestimmen}
  DateiOrdner := GetOpenFileName('Bild auswählen','jpg'); Open(DateiOrdner); Bild1 := PidNumber;
  if Bild1=0 then begin
    Exit;
  end; MoveWindow(5,640);

  Set('Image', 'scale factor := -2'); PlugIn('makegray.dll'); Gray := PidNumber; MoveWindow(0,80);
  minInnen := 210; maxInnen := 255; minAussen := 0; maxAussen := minInnen;
  Set('Find Objects', 'min size := 5'); SetDensitySlice(minInnen,maxInnen); FindObjects; nObj := nObjects;
  ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray1:=PidNumber; MoveWindow(645,80);
  SetDensitySlice(minInnen,maxInnen); FindObjects; Zoom(1);

  ctrlROI := 0;
  repeat
    Abfrage := ShowMessageCancel('Messung des Innendurchmessers: Anzahl Objekte: ',nObj, ' '; Grenzwerte: ',minInnen, ' - ',maxInnen,','; Grenzwerte beibehalten?');
    SelectPic(Gray); Close; SelectPic(Gray1); Close;

  if Abfrage = true then begin
    ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray:=PidNumber; MoveWindow(0,80);
    Abfrage := ShowMessageCancel('Soll ein Bereich ausgewählt werden?');
    if Abfrage=false then begin
```

```

Set('Find Objects', 'search entire image := false'); poly := 'false';
GetUserRoi('ROI angeben',poly); GetRoi(left,top,width,height);
ROI := width*height*117964.8/(1280*1024); ctrlROI := 1;
end else begin
Set('Find Objects', 'search entire image := true');
GetPicSize(width,height); ROI := width*height*117964.8/(1280*1024); ctrlROI := 0;
end; Abfrage := true;

GetUserThresholds(",minInnen,maxInnen); GetThresholds(minInnen,maxInnen); FindObjects; nObj := nObjects;
ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray1:=PidNumber; MoveWindow(645,80);
if ctrlROI=1 then begin
MakeRoi(left,top,width,height);
end;
SetDensitySlice(minInnen,maxInnen); FindObjects; Zoom(1);
end else begin
if ctrlROI<>1 then begin
Set('Find Objects', 'search entire image := true');
GetPicSize(width,height); ROI := width*height*117964.8/(1280*1024);
end;
end;
until Abfrage=false;

maxAussen := minInnen;
if (maxAussen>217) and (maxAussen<226) then begin
Set('Find Objects', 'min size := 50');
end else if (maxAussen>195) and (maxAussen<218) then begin
Set('Find Objects', 'min size := 40');
end else if maxAussen<196 then begin
Set('Find Objects', 'min size := 35');
end else begin
Set('Find Objects', 'min size := 60');
end;

ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray:=PidNumber; MoveWindow(0,80);
if ctrlROI=1 then begin
MakeRoi(left,top,width,height);
end;
SetDensitySlice(minAussen,maxAussen); FindObjects; nObj := nObjects;
ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray1:=PidNumber; MoveWindow(645,80);
if ctrlROI=1 then begin
MakeRoi(left,top,width,height);
end;
SetDensitySlice(minAussen,maxAussen); FindObjects; Zoom(1);

repeat
Abfrage := ShowMessageCancel('Messung des Außendurchmessers: Anzahl Objekte: ',nObj,
'; Grenzwerte: ',minAussen,'-',maxAussen,'; Grenzwerte beibehalten?');
SelectPic(Gray); Close; SelectPic(Gray1); Close;
if Abfrage=true then begin
ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray:=PidNumber; MoveWindow(0,80);
if ROI<117964.8 then begin
MakeRoi(left,top,width,height);
end;
GetUserThresholds(",minAussen,maxAussen); GetThresholds(minAussen,maxAussen);

if (maxAussen>217) and (maxAussen<226) then begin
Set('Find Objects', 'min size := 50');
end else if (maxAussen>195) and (maxAussen<218) then begin
Set('Find Objects', 'min size := 40');
end else if maxAussen<196 then begin
Set('Find Objects', 'min size := 35');
end else begin
Set('Find Objects', 'min size := 60');
end;
end;

```

```

FindObjects; nObj := nObjects;
ChoosePic(Bild1); PlugIn('makegray.dll'); Gray1:=PidNumber; MoveWindow(645,80);
if ctrlROI=1 then begin
  MakeRoi(left,top,width,height);
end;
SetDensitySlice(minAussen,maxAussen); FindObjects; Zoom(1);
end ;
until Abfrage=false;

{Experimentelle Daten eingeben}
SelectPic(Bild1); Abfrage := true; Dateiname := DateiOrdner;
Tm_str := '-5'; Tcon_str := '-8'; concSac_str := '45'; concAdd := 0;
tende := 120; timeint := 1; start := 88; tstart := 0;

repeat
if Abfrage=true then begin
  Dateiname := GetString('Dateinamen eingeben',Dateiname);
  if (length(Dateiname)>30) then begin
    repeat
      Dateiname:= GetString('Der Dateiname ist zu lang!',Dateiname);
      until (length(Dateiname)<31);
    end;
  end;

  DateiOrdner:=GetString('Outputordner angeben',DateiOrdner); Dateiname_neu:=concat(DateiOrdner,'Results_',Dateiname,'.txt');
  ExportsInnen:=concat(DateiOrdner,'Innen/'); ExportsAussen:=concat(DateiOrdner,'Aussen/');

  Tm_str := GetString('Schmelzpunkt in °C eingeben',Tm_str); Tm := StringToNum(Tm_str);
  Tcon_str := GetString('Messtemperatur in °C eingeben',Tcon_str); Tcon := StringToNum(Tcon_str);
  concSac_str := GetString('Saccharosekonz. in wt% eingeben',concSac_str); concSac := StringToNum(concSac_str);
  Additiv := GetString('Additiv eingeben',Additiv); concAdd := GetNumber('Additiv-konz. in µg/ml eingeben',concAdd,2);
  tende := GetNumber('Messdauer eingeben in Minuten',tende,0);
  timeint := GetNumber('Zeit zwischen den Bildern in Minuten eingeben',timeint,2);
  start := GetNumber('Nummer des Startbilds eingeben',start,0);
  tstart := GetNumber('Zeit des Startbilds eingeben in Minuten',tstart,0);
  ende := (tende/timeint) + start - (tstart/timeint);

  MakeNewTextWindow; Results := PidNumber; MoveWindow(660,80);
  WriteLn('Rekristallisation',tab,'Mittelwerte');
  WriteLn('Probe',tab,Dateiname);
  WriteLn('Thresholds',tab,minInnen,'-',maxInnen,', ',minAussen,'-',maxAussen);
  WriteLn('ROI [µm²]',tab,ROI);
  WriteLn('Schmelzpunkt [°C]',tab,Tm);
  WriteLn('Messtemperatur [°C]',tab,Tcon);
  WriteLn('Saccharosekonz. [wt%]',tab,concSac);
  WriteLn('Additivkonz. [µg/ml]',tab,concAdd,tab,('(',Additiv,')'));
  WriteLn('Bild',tab,'Zeit',tab,'Objekte',tab,'Radius',tab,'Flaeche',tab,'Umfang',tab,'Rundheit',tab,'Durchmesser',tab,
    'ObjDiff=Innen-Aussen',tab,'RadiusDiff=Aussen-Innen');

  Abfrage := ShowMessageCancel('Eingaben beibehalten?');
  if Abfrage=true then begin
    SelectPic(Results); Close;
  end;
end;
until Abfrage=false; SelectPic(Bild1); Close;

MakeNewTextWindow; ObjInnen := PidNumber; MoveWindow(850,680);
min := minInnen; max := maxInnen; Durchmesser:= 'Innen';
WriteLn('Thresholds:',tab,min,'-',max,tab,Durchmesser,tab,Dateiname);
WriteLn('Bild',tab,'t/',timeunit,tab,'Objects',tab,'Radius',tab,'Area',tab,'Perimeter',tab,'Roundness',tab,'Feret Diameter');

MakeNewTextWindow; ObjAussen := PidNumber; MoveWindow(850,680);
min := minAussen; max := maxAussen; Durchmesser := 'Aussen';
WriteLn('Thresholds:',tab,min,'-',max,tab,Durchmesser,tab,Dateiname);
WriteLn('Bild',tab,'t/',timeunit,tab,'Objects',tab,'Radius',tab,'Area',tab,'Perimeter',tab,'Roundness',tab,'Feret Diameter');

```



```

{Bildanalyse}
tick1 := TickCount; time := tstart;
for count := start to ende do begin

    Set('Image', 'scale factor := -4'); Open('Bild',count,'.jpg'); MoveWindow(5,640); num := PidNumber; SelectPic(num);
    Set('Image', 'scale factor := -2'); PlugIn('makegray.dll'); num1 := PidNumber; MoveWindow(5,80);

    for Diameter := 1 to 2 do begin
        if Diameter=1 then begin
            min := minInnen; max := maxInnen; Durchmesser:= 'Innen';
            Exports := ExportsInnen; Obj := ObjInnen; Set('Find Objects', 'min size := 5');
        end else begin
            min := minAussen; max := maxAussen; Durchmesser := 'Aussen';
            Exports := ExportsAussen; Obj := ObjAussen; nObj := nObjAussen; Radius := RadiusAussen;
            Area := AreaAussen; Roundness := RoundnessAussen; FeretDiameter := FeretDiameterAussen;

            if (maxAussen>217) and (maxAussen<226) then begin
                Set('Find Objects', 'min size := 50');
            end else if (maxAussen>195) and (maxAussen<218) then begin
                Set('Find Objects', 'min size := 40');
            end else if maxAussen<196 then begin
                Set('Find Objects', 'min size := 45');
            end else begin
                Set('Find Objects', 'min size := 60');
            end;
        end;

        SelectPic(num1);
        if ctrlROI=1 then begin
            MakeRoi(left,top,width,height);
        end;
        SetDensitySlice(min,max); FindObjects; nObj:=nObjects;

        if nObj>0 then begin
            SelectPic(num); PlugIn('objanal.dll'); Wait(0.1);
            Radius := (StringToNum(GetResults('Feret Diameter',-2)))/2;
            Area := StringToNum(GetResults('Area',-2));
            Perimeter := StringToNum(GetResults('Perimeter',-2));
            Roundness := StringToNum(GetResults('Roundness',-2));
            FeretDiameter := StringToNum(GetResults('Feret Diameter',-2));
            SelectPic(Obj);
            WriteLn(count,tab,time,tab,nObj,tab,Radius,tab,Area,tab,Perimeter,tab,Roundness,tab,FeretDiameter);
            MakeNewTextWindow; CopyRows(1,nObj); Paste; SaveAs(Exports,time,timeunit,'.txt'); Close;
        end else begin
            SelectPic(Obj);
            WriteLn(count,tab,time,tab,0);
            MakeNewTextWindow;
            WriteLn(tab,'Object',tab,'Area',tab,'Perimeter',tab,'Roundness',tab,'Feret Diameter');
            SaveAs(Exports,time,timeunit,'.txt'); Close;
        end;

        if Diameter=1 then begin
            if nObj>0 then begin
                ObjInnen := Obj; nObjInnen := nObj; RadiusInnen := Radius; AreaInnen := Area;
                PerimeterInnen := Perimeter; RoundnessInnen := Roundness; FeretDiameterInnen := FeretDiameter;
            end else begin
                ObjInnen := Obj; nObjInnen := 0; RadiusInnen := 0; AreaInnen := 0;
                PerimeterInnen := 0; RoundnessInnen := 0; FeretDiameterInnen := 0;
            end;
        end else begin
            if nObj>0 then begin
                ObjAussen := Obj; nObjAussen := nObj; RadiusAussen := Radius; AreaAussen := Area;
                PerimeterAussen := Perimeter; RoundnessAussen := Roundness; FeretDiameterAussen := FeretDiameter;
            end else begin
                ObjAussen := Obj; nObjAussen := 0; RadiusAussen := 0; AreaAussen := 0;
            end;
        end;
    end;
end;

```

```
    PerimeterAussen := 0; RoundnessAussen := 0; FeretDiameterAussen := 0;
  end;
end; DiscardResults;
end;

nObj := round((nObjAussen + nObjInnen)/2);
Radius := (RadiusAussen + RadiusInnen)/2;
Area := (AreaAussen + AreaInnen)/2;
Perimeter := (PerimeterAussen + PerimeterInnen)/2;
Roundness := (RoundnessAussen + RoundnessInnen)/2;
FeretDiameter := (FeretDiameterAussen + FeretDiameterInnen)/2;
nObjDiff := nObjInnen - nObjAussen;
RadiusDiff := RadiusAussen - RadiusInnen;

SelectPic(Results);
if nObj>0 then begin
  WriteLn(count,tab,time,tab,nObj,tab,Radius,tab,Area,tab,Perimeter,tab,Roundness,tab,FeretDiameter,tab,nObjDiff,tab,
    RadiusDiff);
end else begin
  WriteLn(count,tab,time,tab,nObj);
end;
time := time + timeint; SelectPic(num); Close; SelectPic(num1); Close;
end;

{Speichern}
SelectPic(ObjInnen); Exports := ExportsInnen; SaveAs(Exports,'Objekte.txt'); Close;
SelectPic(ObjAussen); Exports := ExportsAussen; SaveAs(Exports,'Objekte.txt'); Close;
SelectPic(Results); SaveAs(Dateiname_neu); Close;

{Ende}
tick2 := TickCount; ticktime := trunc((tick2-tick1)/60000);
ticktime2 := round(((tick2-tick1)/60000-trunc((tick2-tick1)/60000))*60);
ShowMessage('Rechendauer: ',ticktime,' min',', ',ticktime2,' s');

end;
```

6.3 Igor-Skript

```

Menu "Macros"
  "Auswertung", Auswertung_Statistik()
End

////////////////////////////////////-Hauptprogramm-////////////////////////////////////

Function Auswertung_Statistik()
  String/G path,Dateiname,Ordner,Datum
  Variable/G ctrl,Prozess,run
  Variable timerStart,timerStop
  SVAR MovieName
  Variable i,refNum
  Variable/G V_FitOptions=4,V_FitMaxIters=100

  for (i=0;i<10;i+=1)
    timerStop=stopMSTimer(i)
  endfor
  timerStart=startMSTimer
  ctrl=1
  KillWaves/A/Z

  // Dateipfad festlegen
  NewPath/O/Z path, "C:Linkam:Linksys32:Exports:Carsten:"
  if (V_flag==0)
    Open/D/R/P=path refNum
  else
    Open/D/R refNum
  endif
  if (strlen(S_fileName)==0)
    return -1
  endif
  Dateiname=S_fileName
  Ordner=ParseFilePath(1, Dateiname, ":", 1, 0)
  Datum=ReplaceString("Results_",ParseFilePath(3,Dateiname,":",0,0),"")
  Datum="X"+Datum

  // Daten laden
  Results()
  // Auswertung_Quantile_Roundness
  Quantile_Roundness()
  // Auswertung_Ice_Volume_Fraction
  Ice_Volume_Fraction()

  Prozess=1
  Make/D/O/N=6 W_init,W_init1,W_init2
  W_init1=1,1,2,2,1e10,1
  W_init2=1,2,2,0.1,40,1
  W_init=W_init1
  run=0

  // Auswertung_Oberflaeche
  Oberflaeche()
  // Anpassung_Radius3
  fitting_Radius3()
  // Anpassung_Volume_Fraction
  fitting_VolumeFraction()
  // Graphen erstellen
  Graphen()
  // Panel erstellen
  Panel()
  DoWindow/F Panel_Anpassung

```

6 Anhang

```
timerStop=stopMSTimer(timerStart)
Print "Rechendauer: ",trunc(timerStop/6e7)," min ",round((timerStop/6e7-trunc(timerStop/6e7))*60)," s"
End

//////////-----Daten laden-----//////////

Function Results()
SVAR Dateiname
String/G Schmelz,Messtemp,Saccharosekonz,Additivkonz,Additiv,AOI
Variable/G Schmelzpunkt,Messtemperatur,Saccharosekonzentration,Additivkonzentration,ROI
Variable/G cSac_Smp,cLoes_Temp,dLoes_Temp
Variable/G ti,te,tintervall,xi,xe,maxRadius3,tstart,tende

Make/D/O Bild,Zeit,Objekte,Radius,Flaeche,Umfang,Rundheit,Durchmesser
Make/D/O ObjDiff_Innen_Aussen,RadiusDiff_Aussen_Innen
LoadWave/J/D/W/N/O/E=0/K=1/L=8,9,0,0,0 Dateiname //Daten laden

Make/T/O Probe0,Probe1,AdditivWave0
LoadWave/N=Probe/J/O/E=0/Q/K=2/L=0,0,8,0,2 Dateiname
AOI=Probe0[3]
Schmelz=Probe0[4]
Messtemp=Probe0[5]
Saccharosekonz=Probe0[6]
Additivkonz=Probe0[7]
ROI=str2num(Probe1[3])
Schmelzpunkt=str2num(Probe1[4])
Messtemperatur=str2num(Probe1[5])
Saccharosekonzentration=str2num(Probe1[6])
Additivkonzentration=str2num(Probe1[7])
LoadWave/N=AdditivWave/J/O/E=0/Q/K=2/L=0,7,1,2,1 Dateiname
Additiv=ReplaceString(" ",AdditivWave0[0],"")
Additiv=ReplaceString(")",Additiv,"")
If (strlen(Additiv)==0)
    Additiv=ParseFilePath(0,Dateiname,":",1,4)
    Additiv=ReplaceString(" Saccharose",Additiv,"")
endif

// Bestimmen des Saccharosemassenanteils und Dichte der Lösung
if (Messtemperatur>(-20))
    // Saccharose
    cSac_Smp = 90.009 + (-29.674)*exp(0.47463*Schmelzpunkt) + (-60.215)*exp(0.059252*Schmelzpunkt)
    cLoes_Temp = 90.009 + (-29.674)*exp(0.47463*Messtemperatur) + (-60.215)*exp(0.059252*Messtemperatur)
    dLoes_Temp = 0.43651 + 0.56152*exp(0.0069027*cLoes_Temp)
else
    // NaBr
    cSac_Smp = 97.794 + (-7.8195)*exp(0.24495*Schmelzpunkt) + (-90.136)*exp(0.016008*Schmelzpunkt)
    cLoes_Temp = 97.794 + (-7.8195)*exp(0.24495*Messtemperatur) + (-90.136)*exp(0.016008*Messtemperatur)
    dLoes_Temp = 0.50406 + 0.49474*exp(0.015203*cLoes_Temp)
endif

// Bestimmen der Messzeit
WaveStats/M=1/Q Radius
ti=Zeit[V_startRow]
te=Zeit[V_endRow]
tintervall=Zeit[V_startRow+1] - Zeit[V_startRow]

xi=V_startRow
xe=V_endRow
tstart=ti
tende=te

Make/D/O/N=(numpnts(Radius)) Radius3
Radius3=Radius^3
WaveStats/M=1/Q Radius3
maxRadius3=V_max*1.2
```

End

////////////////////-Quantile der Rundheit bestimmen-////////////////////

```

Function Quantile_Roundness()
  Variable t,q,i,avg_Aussen,max_Aussen,avg_Innen,max_Innen
  String Zeit_1,Ergebnis,RoundnessQuantilMatrixName,Datei
  NVAR ti,te,tintervall
  SVAR Ordner,Dateiname

  Make/D/O/N=((te-ti+1)/tintervall) Maximum,Quantil95,Quantil90,Quantil75,Median,Mittelwert
  Make/D/O/N=((te-ti+1)/tintervall) Quantil25,Quantil10,Quantil5,Minimum
  Make/D/O/N=((te-ti+1)/tintervall) sum_Area_Aussen,sum_Area_Innen
  Make/D/O/N=((te-ti+1)/tintervall) sum_Perimeter_Aussen,sum_Perimeter_Innen

  for (t=(ti);t<=(te);t+=(tintervall))
    Zeit_1=num2str(t)+"min.txt"
    Datei=Ordner+"Aussen:"+Zeit_1
    LoadWave/D/N/O/E=0/J/K=1/L=0,1,0,1,0/Q/W Datei
    Rename Roundness, Roundness_Aussen
    Rename AreaW, Area_Aussen
    Rename Perimeter, Perimeter_Aussen
    Datei=Ordner+"Innen:"+Zeit_1
    LoadWave/D/N/O/E=0/J/K=1/L=0,1,0,1,0/Q/W Datei
    Rename Roundness, Roundness_Innen
    Rename AreaW, Area_Innen
    Rename Perimeter, Perimeter_Innen

    WaveStats/M=1/Q Roundness_Aussen
    avg_Aussen=V_avg
    max_Aussen=V_max
    WaveStats/M=1/Q Roundness_Innen
    avg_Innen=V_avg
    max_Innen=V_max

    i=(t-ti)/(tintervall)

    WaveStats/M=1/Q Area_Aussen
    sum_Area_Aussen[i]=V_sum
    WaveStats/M=1/Q Area_Innen
    sum_Area_Innen[i]=V_sum

    WaveStats/M=1/Q Perimeter_Aussen
    sum_Perimeter_Aussen[i]=V_sum
    WaveStats/M=1/Q Perimeter_Innen
    sum_Perimeter_Innen[i]=V_sum

    Maximum[i]=(max_Aussen+max_Innen)/2
    Quantil95[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,95)+Quantil(Roundness_Innen,95))/2
    Quantil90[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,90)+Quantil(Roundness_Innen,90))/2
    Quantil75[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,75)+Quantil(Roundness_Innen,75))/2
    Median[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,50)+Quantil(Roundness_Innen,50))/2
    Mittelwert[i]=(avg_Aussen+avg_Innen)/2
    Quantil25[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,25)+Quantil(Roundness_Innen,25))/2
    Quantil10[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,10)+Quantil(Roundness_Innen,10))/2
    Quantil5[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,5)+Quantil(Roundness_Innen,5))/2
    Minimum[i]=(Quantil(Roundness_Aussen,0)+Quantil(Roundness_Innen,0))/2

    KillWaves Roundness_Aussen,Roundness_Innen,Area_Aussen,Area_Innen
    KillWaves Perimeter_Aussen,Perimeter_Innen
  endfor

  Rename Maximum,Roundness_Max
  Rename Quantil95,Roundness_Q95
  Rename Quantil75,Roundness_Q75

```

```

Rename Median,Roundness_Med
Rename Mittelwert,Roundness_Mit
Rename Quantil25,Roundness_Q25
Rename Quantil5,Roundness_Q5
Rename Minimum,Roundness_Min
Rename Quantil90,Roundness_Q90
Rename Quantil10,Roundness_Q10
End

////////////////////////////////-Eisanteil berechnen-////////////////////////////////

Function Ice_Volume_Fraction()
Wave Zeit,Objekte,Flaeche,sum_Area_Aussen,sum_Area_Innen
NVAR ROI

Make/D/O/N=(numpnts(Zeit)) VolumeFraction1,VolumeFraction2
VolumeFraction1=(Objekte*Flaeche)/ROI
VolumeFraction2=((sum_Area_Aussen+sum_Area_Innen)/2)/ROI
End
////////////////////////////////-Grenzfläche zwischen Eis und Lösung berechnen-////////////////////////////////

Function Oberflaeche()
Wave Zeit,Objekte,Umfang,sum_Perimeter_Aussen,sum_Perimeter_Innen
NVAR ROI,xi,xs
Variable/G U_ROI_i,U_ROI_e,U_ROI_120
Variable i

Make/D/O/N=(numpnts(Zeit)) Perimeter1,Perimeter2
Perimeter1=(Objekte*Umfang)/ROI
Perimeter2=((sum_Perimeter_Aussen+sum_Perimeter_Innen)/2)/ROI
U_ROI_i=Perimeter1[xi]
U_ROI_e=Perimeter1[xs]
for (i=0;i<=(numpnts(Zeit));i+=1)
  if (Zeit[i]==120)
    U_ROI_120=Perimeter1[i]
  endif
endifor
End

////////////////////////////////-Ratenkonstante bestimmen-////////////////////////////////

Function fitting_Radius3()
Wave Radius,Radius3,Zeit
NVAR xi,xs,ti,te,tintervall,tstart,tende
NVAR Messtemperatur
Variable n1,n2,ti_alt,te_alt,i,ii
Wave W_init,W_init1,W_init2
NVAR ctrl,Prozess,run
Variable/G tsw,xsw,sw,err1,err2,sdev_k1,sdev_k2
Variable f,n,err
NVAR k
Variable/G ctrl_error=1,ctrl_Zeit
SVAR Datum

if (Messtemperatur==5)
  err=0.40 elseif (Messtemperatur==6)
  err=0.15
elseif (Messtemperatur==7)
  err=0.10
elseif (Messtemperatur==8)
  err=0.035
elseif (Messtemperatur==10)
  err=0.035
elseif (Messtemperatur==25)
  err=0.17

```

```

endif
f=0

do
run=run+1

Print "_____ "
Print "Anpassung ",run
Print "_____ "

// Auswahlkriterien für ti und te
fit_Zeit()
ti_alt=ti
te_alt=te

KillWaves/Z Zeit_neu_R3
Make/D/O/N=(xe-xi+1) Zeit_neu_R3
ii=xi
for (i=0;i<=(numpnts(Zeit_neu_R3));i+=1)
  Zeit_neu_R3[i]=Zeit[ii]
  ii=ii+1
endfor

Make/T/O fit="r1","r2","k1","k2","tsw","sw"
Make/D/O/N=6 W_coef_R3,W_sigma_R3
W_coef_R3=W_init

if (Prozess==1)
  W_coef_R3[4]=W_init1[4]
  W_coef_R3[5]=W_init1[5]
  tsw=W_init1[4]
  sw=W_init1[5]
  Print "_____ Radius"3 - 1 Prozess _____"
  Make/O/T/N=1 T_Constraints
  T_Constraints[0] = "K1 > 0"
  Make/D/O/N=2 W_coef,W_sigma
  CurveFit line Radius3[xi,xe] /x=Zeit/D/C=T_Constraints
  if (W_coef[0]<0)
    W_coef_R3[0]=-(abs(W_coef[0]))^(1/3)
  else
    W_coef_R3[0]=(W_coef[0])^(1/3)
  endif
  W_coef_R3[1]=W_coef_R3[0]
  W_coef_R3[2]=W_coef[1]
  W_coef_R3[3]=W_coef[1]
  W_sigma_R3[0]=W_sigma[0]
  W_sigma_R3[1]=W_sigma[0]
  W_sigma_R3[2]=W_sigma[1]
  W_sigma_R3[3]=W_sigma[1]
  sdev_k1=W_sigma[1]
  sdev_k2=sdev_k1

  if ((W_sigma[1]) > err)
    ctrl=0
    ctrl_error=0
    Print "_____ "
    Print "Kriterien nicht erfüllt"
    Print "sdev_k1 = ",W_sigma[1]
    Print "_____ "
  else
    f=1
  endif
else
  Print "_____ Radius"3 - 2 Prozesse _____"
  Make/D/O/N=6 W_coef,W_sigma
  W_coef=W_init

```

```

W_sigma=0
Make/O/T/N=3 T_Constraints
T_Constraints[0] = "K2 > 0", "K3 > 0", "K4 > 0"
FuncFit/L=(xe-xi+1)/H="000001" Ostwaldreifung2Prozesse_r3,W_coef,Radius3[xi,xe] /x=Zeit/D/C=T_Constraints
W_coef_R3=W_coef
tsw=W_coef[4]
sw=W_coef[5]
sdev_k1=W_sigma[2]
sdev_k2=W_sigma[3]

te=floor(tsw)-sw*3
if ((tsw-ti)>=20)
  for (i=0;i<(numpnts(Zeit));i+=1)
    if (abs(Zeit[i]-ti)<=(0.5*tintervall))
      xi=i
    endif
    if (abs(Zeit[i]-te)<=(0.5*tintervall))
      xe=i
      break
    endif
  endfor
  Print "----- Radius"3 - 2 Prozess - k1 -----"
  Make/O/T/N=1 T_Constraints
  T_Constraints[0] = "K1 > 0"
  Make/D/O/N=2 W_coef,W_sigma
  CurveFit line Radius3[xi,xe] /x=Zeit/D/C=T_Constraints

  if ((W_sigma[1]) > err)
    f=0
    ctrl=0
    ctrl_error=0
    Print "-----"
    Print "Kriterien nicht erfüllt"
    Print "sdev_k1 = ",W_sigma[1]
    Print "-----"
  else
    f=1
  endif
else
  f=0
endif

ti=ceil(tsw)+sw*3
te=te_alt
if ((te-tsw)>=20)
  for (i=0;i<(numpnts(Zeit));i+=1)
    if (abs(Zeit[i]-ti)<=(0.5*tintervall))
      xi=i
    endif
    if (abs(Zeit[i]-te)<=(0.5*tintervall))
      xe=i
    endif
  endfor
  Print "----- Radius"3 - 2 Prozess - k2 -----"
  Make/O/T/N=1 T_Constraints
  T_Constraints[0] = "K1 > 0"
  Make/D/O/N=2 W_coef,W_sigma
  CurveFit line Radius3[xi,xe] /x=Zeit/D/C=T_Constraints

  if ((W_sigma[1]) > err)
    ctrl=0
    ctrl_error=0
    Print "-----"
    Print "Kriterien nicht erfüllt"
    Print "sdev_k2 = ",W_sigma[1]
  else
    f=1
  endif
endif

```



```

    Print "-----"
elseif (f==0)
    ctrl=1
    ctrl_error=1
    Prozess=1
endif
elseif (f==1)
    ctrl=1
    ctrl_error=1
    Prozess=1
    f=0
elseif (f==0)
    ctrl=0
    ctrl_Zeit=0
    Print "-----"
    Print "Kriterien nicht erfüllt"
    Print "tsw - ti = ",(ti_alt-tsw)," , te - tsw = ",(te_alt-tsw)
    Print "-----"
    f=1
endif
endif
while (f==0 && run<10)

Make/D/O/N=(numpnts(Zeit)) k1_line,k2_line,S_func_R3
k1_line=W_coef_R3[0]"3 + W_coef_R3[2] * Zeit
k2_line=W_coef_R3[1]"3 + W_coef_R3[3] * Zeit
S_func_R3=1/(1+exp((W_coef_R3[4]-Zeit)/W_coef_R3[5]))
Make/D/O/N=(numpnts(Zeit_neu_R3)) fit_Radius_3
fit_Radius_3=(1-(1/(1+exp((W_coef_R3[4]-Zeit_neu_R3)/W_coef_R3[5]))))
*(W_coef_R3[0]"3+W_coef_R3[2]*Zeit_neu_R3)
+(1/(1+exp((W_coef_R3[4]-Zeit_neu_R3)/W_coef_R3[5])))
*(W_coef_R3[1]"3+W_coef_R3[3]*Zeit_neu_R3)

ti=ti_alt
te=te_alt
for (i=0;i<(numpnts(Zeit));i+=1)
    if (abs(Zeit[i]-ti)<=(0.5*tintervall))
        xi=i
    endif
    if (abs(Zeit[i]-tsw)<=(0.5*tintervall))
        xsw=i
    endif
    if (abs(Zeit[i]-te)<=(0.5*tintervall))
        xe=i
    endif
endifor

KillWaves/Z W_coef,W_sigma,T_Constraints
End

//////////-----Beobachtungszeit festlegen-----//////////

Function fit_Zeit()
Wave Zeit,Roundness_Q10,Radius3,Objekte
NVAR ti,te,tintervall,xi,xe,tstart,tende
NVAR ctrl,Messtemperatur
Variable i,ti_alt,te_alt,xi_alt,xe_alt,k_test
Variable/G k
Variable/G ctrl_Zeit=1

ctrl=1
if (ti<tstart)
    ti=tstart
endif
if (te>tende)

```

```
te=tende
endif

for (i=0;i<(numpnts(Zeit));i+=1)
  if (abs(Zeit[i]-ti)<=(0.5*tintervall))
    xi=i
  endif
  if (abs(Zeit[i]-te)<=(0.5*tintervall))
    xe=i
    break
  endif
endif
endfor
ti_alt=ti
te_alt=te
xi_alt=xi
xe_alt=xe

Make/D/O/N=2 W_coef
CurveFit/Q line Radius3[xi,xe] /x=Zeit/D
k=W_coef[1]
if (Messtemperatur===-6)
  k_test=2.0
elseif (Messtemperatur===-8)
  k_test=0.7
elseif (Messtemperatur===-10)
  k_test=0.4
elseif (Messtemperatur===-25)
  k_test=3.6
endif
if (W_coef[1]>=k_test)
  for (i=xi;i<=xe;i+=1)
    if (((Roundness_Q10[i]+Roundness_Q10[i+1])/2)>0.75)
      ti=Zeit[i]
      xi=i
      break
    endif
    if (i==xe)
      ti=Zeit[i]
      xi=i
    endif
  endfor
  Print "ti = ",ti
  for (i=xi;i<=xe;i+=1)
    if (((Roundness_Q10[i]+Roundness_Q10[i+1])/2)<0.7)
      te=Zeit[i]
      xe=i
      break
    endif
    if (Objekte[i]<30)
      te=Zeit[i]
      xe=i
      break
    endif
    if (i==xe)
      te=Zeit[i]
      xe=i
    endif
  endfor
  Print "te = ",te
endif
KillWaves/Z W_coef

if ((te-ti)<20)
  ctrl=0
  ctrl_Zeit=0
```

```

Print "_____”
Print "Zeitintervall zu klein”
Print "ti = ",ti," , te = ",te," , te-ti = ",(te-ti)
Print "_____”
xi=xi_alt
xe=xe_alt
ti=ti_alt
te=te_alt
endif
End

////////////////////////////////-Neue Anpassungsfunktion-////////////////////////////////

Function Ostwaldreifung2Prozesse_r3(w,t) : FitFunc
Wave w
Variable t

//CurveFitDialog/ These comments were created by the Curve Fitting dialog. Altering them will
//CurveFitDialog/ make the function less convenient to work with in the Curve Fitting dialog.
//CurveFitDialog/ Equation:
//CurveFitDialog/ f(t) = ((1-(1/(1+exp((tsw-t)/sw))))*(r1^3+k1*t) + (1/(1+exp((tsw-t)/sw))))*(r2^3+k2*t))
//CurveFitDialog/ End of Equation
//CurveFitDialog/ Independent Variables 1
//CurveFitDialog/ t
//CurveFitDialog/ Coefficients 6
//CurveFitDialog/ w[0] = r1
//CurveFitDialog/ w[1] = r2
//CurveFitDialog/ w[2] = k1
//CurveFitDialog/ w[3] = k2
//CurveFitDialog/ w[4] = tsw
//CurveFitDialog/ w[5] = sw
return ((1-(1/(1+exp((w[4]-t)/w[5]))))*(w[0]^3+w[2]*t) + (1/(1+exp((w[4]-t)/w[5])))*(w[1]^3+w[3]*t))
End

////////////////////////////////-Mittleren Eisanteil bestimmen-////////////////////////////////

Function fitting_VolumeFraction()
Wave VolumeFraction1,Zeit
NVAR xi,xe,xsw,ctrl,Prozess
Variable/G MVF1,MVF2
Variable/G sdev_MVF1,sdev_MVF2
NVAR cLoes_Temp,dLoes_Temp
Variable/G cSac_MVF1,cSac_MVF2
Variable start,i,ii,sdev
Variable/G ctrl_MVF=1

sdev=0.01
if (xi==0)
start=1
else
start=xi
endif

Make/D/O/N=(xe-start+1) Zeit_neu_VF1,Zeit_neu_VF2
Make/D/O/N=(xe-start+1) MeanVolumeFractionGraph1,MeanVolumeFractionGraph2
if (Prozess==1)
Make/D/O/N=(xe-start+1) Zeit_neu_VF1,MeanVolumeFractionGraph1
WaveStats/M=2/Q/R=(start,xe) VolumeFraction1
MVF1=V_avg
MVF2=MVF1
sdev_MVF1=V_sdev
sdev_MVF2=sdev_MVF1
if (V_sdev>sdev)
ctrl=0
ctrl_MVF=0

```

```
Print "_____"  
Print "Kriterien nicht erfüllt"  
Print "Volume Fraction, MVF = ",MVF1,", V_sdev = ",V_sdev  
Print "_____"  
endif  
MeanVolumeFractionGraph1=MVF1  
cSac_MVF1 = cLoes_Temp * (1 - MVF1 * 0.917 / (MVF1 * 0.917 + (1-MVF1) * dLoes_Temp))  
cSac_MVF2 = cSac_MVF1  
i=start  
for (ii=0;ii<=(xe-start);ii+=1)  
  Zeit_neu_VF1[ii]=Zeit[i]  
  i=i+1  
endfor  
else  
Make/D/O/N=(xsw-start+1) Zeit_neu_VF1,MeanVolumeFractionGraph1  
Make/D/O/N=(xe-xsw+1) Zeit_neu_VF2,MeanVolumeFractionGraph2  
WaveStats/M=2/Q/R=(start,xsw) VolumeFraction1  
MVF1=V_avg  
sdev_MVF1=V_sdev  
if (V_sdev>sdev)  
  ctrl=0  
  ctrl_MVF=0  
  Print "_____"  
  Print "Kriterien nicht erfüllt"  
  Print "Volume Fraction, MVF1 = ",MVF1,", V_sdev = ",V_sdev  
  Print "_____"  
endif  
i=start  
for (ii=0;ii<=(xsw-start);ii+=1)  
  Zeit_neu_VF1[ii]=Zeit[i]  
  i=i+1  
endfor  
  
WaveStats/M=2/Q/R=(xsw,xe) VolumeFraction1  
MVF2=V_avg  
sdev_MVF2=V_sdev  
if (V_sdev>sdev)  
  ctrl=0  
  ctrl_MVF=0  
  Print "_____"  
  Print "Kriterien nicht erfüllt"  
  Print "Volume Fraction, MVF2 = ",MVF2,", V_sdev = ",V_sdev  
  Print "_____"  
endif  
  
MeanVolumeFractionGraph1=MVF1  
MeanVolumeFractionGraph2=MVF2  
cSac_MVF1 = cLoes_Temp * (1 - MVF1 * 0.917 / (MVF1 * 0.917 + (1-MVF1) * dLoes_Temp))  
cSac_MVF2 = cLoes_Temp * (1 - MVF2 * 0.917 / (MVF2 * 0.917 + (1-MVF2) * dLoes_Temp))  
i=xsw  
for (ii=0;ii<=(xe-xsw);ii+=1)  
  Zeit_neu_VF2[ii]=Zeit[i]  
  i=i+1  
endfor  
endif  
End
```

7 Literaturverzeichnis

- Abdulagatov, I. M. und Azizov, N. D.: Experimental Study of the Effect of Temperature, Pressure and Concentration on the Viscosity of Aqueous NaBr Solutions, *J. Solut. Chem.*, 35, 705–738, doi:10.1007/s10953-006-9020-6, 2006.
- Ahmed, A. I., Osuga, D. T. und Feeney, R. E.: Antifreeze Glycoprotein from an Antarctic Fish - Effects of Chemical Modifications of Carbohydrate Residues on Antifreeze and Antilectin Activities, *J. Biol. Chem.*, 248, 8524–8527, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/248/24/8524>, 1973.
- Ahmed, A. I., Feeney, R. E., Osuga, D. T. und Yeh, Y.: Antifreeze Glycoproteins from an Antarctic Fish - Quasi-Elastic Light-Scattering Studies of Hydrodynamic Conformations of Antifreeze Glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, 250, 3344–3347, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/250/9/3344>, 1975.
- Ahmed, A. I., Yeh, Y., Osuga, D. T. und Feeney, R. E.: Antifreeze Glycoproteins from Antarctic Fish - Inactivation by Borate, *J. Biol. Chem.*, 251, 3033–3036, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/251/10/3033>, 1976.
- Amornwittawat, N., Wang, S., Duman, J. G. und Wen, X.: Polycarboxylates Enhance Beetle Antifreeze Protein Activity, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1784, 1942–1948, doi:10.1016/j.bbapap.2008.06.003, 2008.
- Amornwittawat, N., Wang, S., Banatiao, J., Chung, M., Velasco, E., Duman, J. G. und Wen, X.: Effects of Polyhydroxy Compounds on Beetle Antifreeze Protein Activity, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, 1794, 341–346, doi:10.1016/j.bbapap.2008.10.011, 2009.
- Angell, C. A.: Perspective on the Glass Transition, *J. Phys. Chem. Solids*, 49, 863–871, doi:10.1016/0022-3697(88)90002-9, 1988.
- Angell, C. A.: Formation of Glasses from Liquids and Biopolymers, *Science*, 267, 1924–1935, doi:10.1126/science.267.5206.1924, 1995.
- Angell, C. A.: Liquid Fragility and the Glass Transition in Water and Aqueous Solutions, *Chem. Rev.*, 102, 2627–2649, doi:10.1021/cr000689q, 2002.
- Antson, A. A., Smith, D. J., Roper, D. I., Lewis, S., Caves, L. S. D., Verma, C. S., Buckley, S. L., Lillford, P. J. und Hubbard, R. E.: Understanding the Mechanism of Ice Binding by Type III Antifreeze Proteins, *J. Mol. Biol.*, 305, 875–889, doi:10.1006/jmbi.2000.4336, 2001.

- Ardell, A. J.: Temporal Behavior of the Number Density of Particles During Ostwald Ripening, *Mater. Sci. Eng. A*, 238, 108–120, doi:10.1016/S0921-5093(97)00436-X, 1997.
- Asimow, R.: Clustering Kinetics in Binary Alloys, *Acta Metall.*, 11, 72–73, doi:10.1016/0001-6160(63)90132-9, 1963.
- Baldan, A.: Review Progress in Ostwald Ripening Theories and Their Applications to Nickel-Base Superalloys - Part I: Ostwald Ripening Theories, *J. Mater. Sci.*, 37, 2171–2202, doi:10.1023/A:1015388912729, 2002.
- Barrett, J.: Thermal Hysteresis Proteins, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33, 105–117, doi:10.1016/S1357-2725(00)00083-2, 2001.
- Baruch, E. und Mastai, Y.: Antifreeze Properties of Polyglycidol Block Copolymers, *Macromol. Rapid Commun.*, 28, 2256–2261, doi:10.1002/marc.200700501, 2007.
- Ben, R. N., Eniade, A. A. und Hauer, L.: Synthesis of a C-Linked Antifreeze Glycoprotein (AFGP) Mimic: Probes for Investigating the Mechanism of Action, *Org. Lett.*, 1, 1759–1762, doi:10.1021/ol991025+, 1999.
- Brailsford, A. D. und Wynblatt, P.: Dependence of Ostwald Ripening Kinetics on Particle-Volume Fraction, *Acta Metall.*, 27, 489–497, doi:10.1016/0001-6160(79)90041-5, 1979.
- Brown, R. A., Yeh, Y., Burcham, T. S. und Feeney, R. E.: Direct Evidence for Antifreeze Glycoprotein Adsorption onto an Ice Surface, *Biopolymers*, 24, 1265–1270, doi:10.1002/bip.360240713, 1985.
- Budke, C. und Koop, T.: Ice Recrystallization Inhibition and Molecular Recognition of Ice Faces By Poly(vinyl alcohol), *ChemPhysChem*, 7, 2601–2606, doi:10.1002/cphc.200600533, 2006.
- Budke, C., Heggemann, C., Koch, M., Sewald, N. und Koop, T.: Ice Recrystallization Kinetics in the Presence of Synthetic Antifreeze Glycoprotein Analogues Using the Framework of LSW Theory, *J. Phys. Chem. B*, 113, 2865–2873, doi:10.1024/jp805726e, 2009.
- Burcham, T. S., Osuga, D. T., Rao, B. N. N., Bush, C. A. und Feeney, R. E.: Purification and Primary Sequences of the Major Arginine-Containing Antifreeze Glycopeptides from the Fish *Eleginus gracilis*, *J. Biol. Chem.*, 261, 6384–6389, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/261/14/6384>, 1986a.
- Burcham, T. S., Osuga, D. T., Yeh, Y. und Feeney, R. E.: A Kinetic Description of Antifreeze Glycoprotein Activity, *J. Biol. Chem.*, 261, 6390–6397, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/261/14/6390>, 1986b.

- Bush, C. A. und Feeney, R. E.: Conformation of the Glycotriptide Repeating Unit of Antifreeze Glycoprotein of Polar Fish as Determined from the Fully Assigned Proton NMR-Spectrum, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 28, 386–397, URL <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121485526/abstract>, 1986.
- Bush, C. A., Feeney, R. E., Osuga, D. T., Ralapati, S. und Yeh, Y.: Antifreeze Glycoprotein - Conformational Model Based on Vacuum Ultraviolet Circular-Dichroism Data, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 17, 125–129, URL <http://www3.interscience.wiley.com/journal/121592656/abstract>, 1981.
- Bush, C. A., Ralapati, S., Matson, G. M., Yamasaki, R. B., Osuga, D. T., Yeh, Y. und Feeney, R. E.: Conformation of the Antifreeze Glycoprotein of Polar Fish, *Arch. Biochem. Biophys.*, 232, 624–631, doi:10.1016/0003-9861(84)90582-4, 1984.
- Cacace, M. G., Landau, E. M. und Ramsden, J. J.: The Hofmeister Series: Salt and Solvent Effects on Interfacial Phenomena, *Q. Rev. Biophys.*, 30, 241–277, doi:10.1017/S0033583597003363, 1997.
- Cervený, S., Schwartz, G., Bergman, R. und Swenson, J.: Glass Transition and Relaxation Processes in Supercooled Water, *Phys. Rev. Lett.*, 93, 245702, doi:10.1103/PhysRevLett.93.245702, 2004.
- Chao, H. M., Houston, M. E., Hodges, R. S., Kay, C. M., Sykes, B. D., Loewen, M. C., Davies, P. L. und Sonnichsen, F. D.: A Diminished Role for Hydrogen Bonds in Antifreeze Protein Binding to Ice, *Biochemistry*, 36, 14652–14660, doi:10.1021/bi970817d, 1997.
- Chen, L., DeVries, A. L. und Cheng, C.-H. C.: Evolution of Antifreeze Glycoprotein Gene from a Trypsinogen Gene in Antarctic Notothenioid Fish, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 3811–3816, doi:10.1073/pnas.94.8.3811, 1997a.
- Chen, L., DeVries, A. L. und Cheng, C.-H. C.: Convergent Evolution of Antifreeze Glycoproteins in Antarctic Notothenioid Fish and Arctic Cod, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 3817–3822, doi:10.1073/pnas.94.8.3817, 1997b.
- Collins, K. D. und Washabaugh, M. W.: The Hofmeister Effect and the Behavior of Water at Interfaces, *Q. Rev. Biophys.*, 18, 323–422, doi:10.1017/S0033583500005369, 1985.
- Cooke, S. A., Jonsdottir, S. O. und Westh, P.: The vapour pressure of water as a function of solute concentration above aqueous solutions of fructose, sucrose, raffinose, erythritol, xylitol, and sorbitol, *J. Chem. Thermodyn.*, 34, 1545–1555, doi:10.1016/S0021-9614(02)00172-6, 2002.
- Czechura, P., Tam, R. Y., Dimitrijevic, E., Murphy, A. V. und Ben, R. N.: The Importance of Hydration for Inhibiting Ice Recrystallization with C-Linked Antifreeze Glycoproteins, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 2928–2929, doi:10.1021/ja7103262, 2008.

- Davies, P. L. und Hew, C. L.: Biochemistry of Fish Antifreeze Proteins, *FASEB J.*, 4, 2460–2468, URL <http://www.fasebj.org/cgi/content/abstract/4/8/2460>, 1990.
- Davies, P. L., Baardsnes, J., Kuiper, M. J. und Walker, V. K.: Structure and Function of Antifreeze Proteins, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 357, 927–933, doi:10.1098/rstb.2002.1081, 2002.
- Deng, G. und Laursen, R. A.: Isolation and Characterization of an Antifreeze Protein from the Longhorn Sculpin, *Myoxocephalus Octodecimspinosus*, *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Molec. Enzym.*, 1388, 305–314, doi:10.1016/S0167-4838(98)00180-0, 1998.
- Deng, G., Andrews, D. W. und Laursen, R. A.: Amino Acid Sequence of a New Type of Antifreeze Protein: From the Longhorn Sculpin *Myoxocephalus Octodecimspinosus*, *FEBS Lett.*, 402, 17–20, doi:10.1016/S0014-5793(96)01466-4, 1997.
- DeVries, A. L.: Glycoproteins as Biological Antifreeze Agents in Antarctic Fishes, *Science*, 172, 1152–1155, doi:10.1126/science.172.3988.1152, 1971.
- DeVries, A. L.: Role of Glycopeptides and Peptides in Inhibition of Crystallization of Water in Polar Fishes, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.*, 304, 575–588, doi:10.1098/rstb.1984.0048, 1984.
- DeVries, A. L. und Wohlschlag, D. E.: Freezing Resistance in Some Antarctic Fishes, *Science*, 163, 1073–1075, doi:10.1126/science.163.3871.1073, 1969.
- DeVries, A. L., Komatsu, S. K. und Feeney, R. E.: Chemical and Physical Properties of Freezing Point-Depressing Glycoproteins from Antarctic Fishes, *J. Biol. Chem.*, 245, 2901–2908, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/245/11/2901>, 1970.
- DeVries, A. L., J, V. und Feeney, R. E.: Primary Structure of Freezing Point-Depressing Glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, 246, 305–308, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/246/2/305>, 1971.
- Doucet, C. J., Byass, L., Elias, L., Worrall, D., Smallwood, M. und Bowles, D. J.: Distribution and Characterization of Recrystallization Inhibitor Activity in Plant and Lichen Species from the UK and Maritime Antarctic, *Cryobiology*, 40, 218–227, doi:10.1006/cryo.2000.2241, 2000.
- Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T. J., Overstreet, J. W. und Crowe, J. H.: Cold Shock Damage Is Due to Lipid Phase-Transitions in Cell-Membranes - A Demonstration Using Sperm as a Model, *J. Exp. Zool.*, 265, 432–437, doi:10.1002/jez.1402650413, 1993.
- Duman, J. G. und Olsen, T. M.: Thermal Hysteresis Protein Activity in Bacteria, Fungi, and Phylogenetically Diverse Plants, *Cryobiology*, 30, 322–328, doi:10.1006/cryo.1993.1031, 1993.

- Duman, J. G., Bennett, V., Sformo, T., Hochstrasser, R. und Barnes, B. M.: Antifreeze Proteins in Alaskan Insects and Spiders, *J. Insect Physiol.*, 50, 259–266, doi:10.1016/j.jinsphys.2003.12.003, 2004.
- Easteal, A. J. und Woolf, L. A.: Diffusion of Water in Solutions of Alkali-Metal Bromides, Tetraalkylammonium Bromides and Ammonium Bromide, *J. Solut. Chem.*, 15, 1003–1013, doi:10.1007/BF00645195, 1986.
- Ekdawi-Sever, N., de Pablo, J. J., Feick, E. und von Meerwall, E.: Diffusion of Sucrose and Alpha,Alpha-Trehalose in Aqueous Solutions, *J. Phys. Chem. A*, 107, 936–943, doi:10.1021/jp020187b, 2003.
- Eniade, A., Purushotham, M., Ben, R. N., Wang, J. B. und Horwath, K.: A Serendipitous Discovery of Antifreeze Protein-Specific Activity in C-Linked Antifreeze Glycoprotein Analogs, *Cell Biochem. Biophys.*, 38, 115–124, doi:10.1385/CBB:38:2:115, 2003.
- Feeney, R. E.: Biological Antifreeze, *Am. Scientist*, 62, 712–719, 1974.
- Feeney, R. E. und Yeh, Y.: Antifreeze Proteins from Fish Bloods, Bd. 32 von *Advances in Protein Chemistry*, S. 191 – 282, Academic Press, doi:10.1016/S0065-3233(08)60576-8, 1978.
- Fulcher, G. S.: Analysis of Recent Measurements of the Viscosity of Glasses, *J. Am. Ceram. Soc.*, 8, 339–355, doi:10.1111/j.1151-2916.1925.tb16731.x, 1925.
- Funakoshi, K., Inada, T., Tomita, T., Kawahara, H. und Miyata, T.: Thermal Hysteresis Induced by Ammonium Polyacrylate as Antifreeze Polymer, *J. Cryst. Growth*, 310, 3342–3347, doi:10.1016/j.jcrysgro.2008.04.011, 2008.
- Geoghegan, K. F., Osuga, D. T., Ahmed, A. I., Yeh, Y. und Feeney, R. E.: Antifreeze Glycoproteins from Polar Fish - Structural Requirements for Function of Glycopeptide-8, *J. Biol. Chem.*, 255, 663–667, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/255/2/663>, 1980.
- Gibson, M. I., Barker, C. A., Spain, S. G., Albertin, L. und Cameron, N. R.: Inhibition of Ice Crystal Growth by Synthetic Glycopolymers: Implications for the Rational Design of Antifreeze Glycoprotein Mimics, *Biomacromolecules*, 10, 328–333, doi:10.1021/bm801069x, 2009.
- Gilbert, J. A., Hill, P. J., Dodd, C. E. R. und Laybourn-Parry, J.: Demonstration of Antifreeze Protein Activity in Antarctic Lake Bacteria, *Microbiology-(UK)*, 150, 171–180, doi:10.1099/mic.0.26610-0, 2004.
- Gilbert, J. A., Davies, P. L. und Laybourn-Parry, J.: A Hyperactive, Ca²⁺-Dependent Antifreeze Protein in an Antarctic Bacterium, *FEMS Microbiol. Lett.*, 245, 67–72, doi:10.1016/j.femsle.2005.02.022, 2005.

- Gillen, K. T., Douglass, D. C. und Hoch, M. J. R.: Self-Diffusion in Liquid Water to -31°C , *J. Chem. Phys.*, 57, 5117–5119, doi:10.1063/1.1678198, 1972.
- Girlich, D., Lüdemann, H. D., Buttersack, C. und Buchholz, K.: C,T-Dependence of the Self-Diffusion in Concentrated Aqueous Sucrose Solutions, *Z. Naturforsch. C*, 49, 258–264, 1994.
- Grandum, S., Yabe, A., Nakagomi, K., Tanaka, M., Takemura, F., Kobayashi, Y. und Frivik, P.: Analysis of Ice Crystal Growth for a Crystal Surface Containing Adsorbed Antifreeze Proteins, *J. Cryst. Growth*, 205, 382–390, doi:10.1016/S0022-0248(99)00267-5, 1999.
- Griffith, M. und Ewart, K. V.: Antifreeze Proteins and Their Potential Use in Frozen Foods, *Biotechnol. Adv.*, 13, 375–402, doi:10.1016/0734-9750(95)02001-J, 1995.
- Hachisu, M., Hinou, H., Takamichi, M., Tsuda, S., Koshidaa, S. und Nishimura, S.-I.: One-Pot Synthesis of Cyclic Antifreeze Glycopeptides, *Chem. Commun.*, S. 1641–1643, doi:10.1039/b815917c, 2009.
- Haymet, A. D. J., Ward, L. G., Harding, M. M. und Knight, C. A.: Valine Substituted Winter Flounder 'Antifreeze': Preservation Of Ice Growth Hysteresis, *FEBS Lett.*, 430, 301–306, doi:10.1016/S0014-5793(98)00652-8, 1998.
- Hays, L. M., Feeney, R. E., Crowe, L. M., Crowe, J. H. und Oliver, A. E.: Antifreeze Glycoproteins Inhibit Leakage from Liposomes During Thermotropic Phase Transitions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 6835–6840, doi:10.1073/pnas.93.13.6835, 1996.
- He, X., Fowler, A. und Toner, M.: Water Activity and Mobility in Solutions of Glycerol and Small Molecular Weight Sugars: Implication for Cryo- and Lyopreservation, *J. Appl. Phys.*, 100, 074 702, doi:10.1063/1.2336304, 2006.
- Heggemann, C., Budke, C., Schomburg, B., Majer, Z., Wißbrock, M., Koop, T. und Sewald, N.: Antifreeze Glycopeptide Analogues: Microwave-Enhanced Synthesis and Functional Studies, *Amino Acids*, 38, 213–222, doi:10.1007/s00726-008-0229-0, 2010.
- Hofmeister, F.: Zur Lehre von der Wirkung der Salze II, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 24, 247–260, doi:10.1007/BF01918191, 1888.
- Inada, T. und Lu, S.-S.: Inhibition of Recrystallization of Ice Grains by Adsorption of Poly(vinyl alcohol) onto Ice Surfaces, *Cryst. Growth Des.*, 3, 747–752, doi:10.1021/cg0340300, 2003.
- Inada, T. und Lu, S.-S.: Thermal Hysteresis Caused by Non-Equilibrium Antifreeze Activity of Poly(vinyl alcohol), *Chem. Phys. Lett.*, 394, 361–365, doi:10.1016/j.cplett.2004.07.021, 2004.

- Inada, T., Yabe, A., Grandum, S. und Saito, T.: Control of Molecular-Level Ice Crystallization Using Antifreeze Protein and Silane Coupling Agent, *Mater. Sci. Eng. A*, 292, 149–154, doi:10.1016/S0921-5093(00)01011-X, 2000.
- Ito, K., Moynihan, C. T. und Angell, C. A.: Thermodynamic Determination of Fragility in Liquids and a Fragile-to-Strong Liquid Transition in Water, *Nature*, 398, 492–495, doi:10.1038/19042, 1999.
- Jayanth, C. S. und Nash, P.: Factors Affecting Particle-Coarsening Kinetics and Size Distribution, *J. Mater. Sci.*, 24, 3041–3052, doi:10.1007/BF01139016, 1989.
- Jones, G. und Dole, M.: The Viscosity of Aqueous Solutions of Strong Electrolytes with Special Reference to Barium Chloride, *J. Am. Chem. Soc.*, 51, 2950–2964, doi:10.1021/ja01385a012, 1929.
- Kaminsky, M.: Ion-Solvent Interaction and the Viscosity of Strong-Electrolyte Solutions, S. 171–179, doi:10.1039/DF9572400171, 1957.
- Ketcham, W. M. und Hobbs, P. V.: An Experimental Determination of the Surface Energies of Ice, *Philos. Mag.*, 19, 1161–1173, doi:10.1080/14786436908228641, 1969.
- Knight, C. A. und DeVries, A. L.: Effects of a Polymeric, Nonequilibrium Antifreeze upon Ice Growth from Water, *J. Cryst. Growth*, 143, 301–310, doi:10.1016/0022-0248(94)90071-X, 1994.
- Knight, C. A., Cheng, C. C. und DeVries, A. L.: Adsorption of Alpha-Helical Antifreeze Peptides on Specific Ice Crystal-Surface Planes, *Biophys. J.*, 59, 409–418, doi:10.1016/S0006-3495(91)82234-2, 1991.
- Knight, C. A., Driggers, E. und DeVries, A. L.: Adsorption to Ice of Fish Antifreeze Glycopeptide-7 and Glycopeptide-8, *Biophys. J.*, 64, 252–259, doi:10.1016/S0006-3495(93)81361-4, 1993.
- Knight, C. A., Wen, D. Y. und Laursen, R. A.: Nonequilibrium Antifreeze Peptides and the Recrystallization of Ice, *Cryobiology*, 32, 23–34, doi:10.1006/cryo.1995.1002, 1995.
- Kobashigawa, Y., Nishimiya, Y., Miura, K., Ohgiya, S., Miura, A. und Tsuda, S.: A Part of Ice Nucleation Protein Exhibits the Ice-Binding Ability, *FEBS Lett.*, 579, 1493–1497, doi:10.1016/j.febslet.2005.01.056, 2005.
- Koch, M.: Konzentrations- und temperaturabhängige Rekristallisation von Eis in Saccharoselösungen, Bachelorarbeit, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2007.
- Komatsu, S. K., DeVries, A. L. und Feeney, R. E.: Studies of Structure of Freezing Point-Depressing Glycoproteins from an Antarctic Fish, *J. Biol. Chem.*, 245, 2909–2913, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/245/11/2909>, 1970.

- Kristiansen, E. und Zachariassen, K.: The Mechanism by Which Fish Antifreeze Proteins Cause Thermal Hysteresis, *Cryobiology*, 51, 262–280, doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.007, 2005.
- Kristiansen, E., Pedersen, S. A. und Zachariassen, K. E.: Salt-Induced Enhancement of Antifreeze Protein Activity: A Salting-Out Effect, *Cryobiology*, 57, 122–129, doi:10.1016/j.cryobiol.2008.07.001, 2008.
- Lewith, S.: Zur Lehre von der Wirkung der Salze I, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 24, 1–16, doi:10.1007/BF01918180, 1888.
- Li, N., Andorfer, C. A. und Duman, J. G.: Enhancement of Insect Antifreeze Protein Activity by Solutes of Low Molecular Mass, *J. Exp. Biol.*, 201, 2243–2251, URL <http://jeb.biologists.org/cgi/content/abstract/201/15/2243>, 1998.
- Li, Q. und Luo, L.: Adsorption Kinetics in the Solution of a Thermal Hysteresis Protein, *Chem. Phys. Lett.*, 320, 335–338, doi:10.1016/S0009-2614(00)00214-1, 2000.
- Li, Q. Z., Yeh, Y., Liu, J. J., Feeney, R. E. und Krishnan, V. V.: A Two-Dimensional Adsorption Kinetic Model for Thermal Hysteresis Activity in Antifreeze Proteins, *J. Chem. Phys.*, 124, 204702, doi:10.1063/1.2186309, 2006.
- Lide, D. R., Hrsg.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 82. Aufl., 2001.
- Lifshitz, I. M. und Slyozov, V. V.: The Kinetics of Precipitation from Supersaturated Solid Solutions, *J. Phys. Chem. Solids*, 19, 35–50, doi:10.1016/0022-3697(61)90054-3, 1961.
- Liu, S. H. und Ben, R. N.: C-Linked Galactosyl Serine AFGP Analogues as Potent Recrystallization Inhibitors, *Org. Lett.*, 7, 2385–2388, doi:10.1021/ol050677x, 2005.
- Lu, S.-S., Inada, T., Yabe, A., Zhang, X. und Grandum, S.: Microscale Study of Poly(vinyl alcohol) as an Effective Additive for Inhibiting Recrystallization in Ice Slurries, *Int. J. Refrig.*, 25, 562–568, doi:10.1016/S0140-7007(01)00045-7, 2002.
- Malenkov, G.: Liquid Water and Ices: Understanding the Structure and Physical Properties, *J. Phys.-Condes. Matter*, 21, 283101, doi:10.1088/0953-8984/21/28/283101, 2009.
- Margesin, R., Neuner, G. und Storey, K. B.: Cold-Loving Microbes, Plants, and Animals-Fundamental and Applied Aspects, *Naturwissenschaften*, 94, 77–99, doi:10.1007/s00114-006-0162-6, 2007.
- Marshall, C. B., Fletcher, G. L. und Davies, P. L.: Hyperactive Antifreeze Protein in a Fish, *Nature*, 429, 153, doi:10.1038/429153a, 2004a.

- Marshall, C. B., Tomczak, M. M., Gauthier, S. Y., Kuiper, M. J., Lankin, C., Walker, V. K. und Davies, P. L.: Partitioning of Fish and Insect Antifreeze Proteins into Ice Suggests They Bind with Comparable Affinity, *Biochemistry*, 43, 148–154, doi:10.1021/bi035605x, 2004b.
- Mastai, Y., Rudloff, J., Colfen, H. und Antonietti, M.: Control over the Structure of Ice and Water by Block Copolymer Additives, *ChemPhysChem*, 3, 119–123, doi:10.1002/1439-7641(20020118)3:1<119::AID-CPHC119>3.0.CO;2-R, 2002.
- McCall, D. W. und Douglass, D. C.: Effect of Ions on Self-Diffusion of Water .I. Concentration Dependence, *J. Phys. Chem.*, 69, 2001–2011, doi:10.1021/j100890a034, 1965.
- Miller, N., Williams, G. M. und Brimble, M. A.: Synthesis of Fish Antifreeze Neoglycopeptides Using Microwave-Assisted "Click Chemistry", *Org. Lett.*, 11, 2409–2412, doi:10.1021/ol9005536, 2009.
- Müller, K. J. und Hertz, H. G.: A Parameter as an Indicator for Water-Water Association in Solutions of Strong Electrolytes, *J. Phys. Chem.*, 100, 1256–1265, doi:10.1021/jp951303w, 1996.
- Murray, B. J. und Bertram, A. K.: Formation and Stability of Cubic Ice in Water Droplets, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, 186–192, doi:10.1039/b513480c, 2006.
- Negulescu, P. A., Rubinsky, B., Fletcher, G. L. und Machen, T. E.: Fish Antifreeze Proteins Block Ca Entry into Rabbit Parietal-Cells, *Am. J. Physiol.*, 263, C1310–C1313, URL <http://ajpcell.physiology.org/cgi/content/abstract/263/6/C1310>, 1992.
- Nishimiya, Y., Kondo, H., Takamichi, M., Sugimoto, H., Suzuki, M., Miura, A. und Tsuda, S.: Crystal Structure and Mutational Analysis of Ca²⁺-Independent Type II Antifreeze Protein from Longsnout Poacher, *Brachyopsis Rostratus*, *J. Mol. Biol.*, 382, 734–746, doi:10.1016/j.jmb.2008.07.042, 2008.
- Norgren, A. S., Budke, C., Majer, Z., Heggemann, C., Koop, T. und Sewald, N.: On-Resin Click-Glycoconjugation of Peptoids, *Synthesis*, S. 488–494, doi:10.1055/s-0028-1083302, 2009.
- Nutt, D. R. und Smith, J. C.: Function of the Hydration Layer around an Antifreeze Protein Revealed by Atomistic Molecular Dynamics Simulations, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 13066–13073, doi:10.1021/ja8034027, 2008.
- Osuga, D. T., Ward, F. C., Yeh, Y. und Feeney, R. E.: Cooperative Functioning between Antifreeze Glycoproteins, *J. Biol. Chem.*, 253, 6669–6672, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/253/19/6669>, 1978.
- Osuga, D. T., Feather, M. S., Shah, M. J. und Feeney, R. E.: Modification of Galactose and *N*-Acetylgalactosamine Residues by Oxidation of C-6 Hydroxyls to the Aldehydes

- Followed by Reductive Amination - Model Systems and Antifreeze Glycoproteins, *J. Protein Chem.*, 8, 519–528, doi:10.1007/BF01026436, 1989.
- Pearce, J. N., Taylor, M. D. und Bartlett, R. M.: The Vapor Pressures of Aqueous Solutions of Potassium Iodide and Sodium Bromide at 25°C, *J. Am. Chem. Soc.*, 50, 2951–2958, doi:10.1021/ja01398a014, 1928.
- Pertaya, N., Marshall, C. B., DiPrinzio, C. L., Wilen, L., Thomson, E. S., Wettlaufer, J. S., Davies, P. L. und Braslavsky, I.: Fluorescence Microscopy Evidence for Quasi-Permanent Attachment of Antifreeze Proteins to Ice Surfaces, *Biophys. J.*, 92, 3663–3673, doi:10.1529/biophysj.106.096297, 2007.
- Pickering, S. U.: The Hydrate Theory of Solutions. Some Compounds of the Alkyl-Amines and Ammonia with Water, *J. Chem. Soc., Trans.*, 63, 141–195, doi:10.1039/CT8936300141, 1893.
- Plattner, C.: Synthesis, Conformational, and Functional Characterization of Antifreeze Glycopeptides, Dissertation, Universität Bielefeld, Bielefeld, 2009.
- Price, W. S., Ide, H. und Arata, Y.: Self-Diffusion of Supercooled Water to 238 K Using PGSE NMR Diffusion Measurements, *J. Phys. Chem. A*, 103, 448–450, doi:10.1021/jp9839044, 1999.
- Rampp, M., Buttersack, C. und Lüdemann, H. D.: C,T-Dependence of the Viscosity and the Self-Diffusion Coefficients in Some Aqueous Carbohydrate Solutions, *Carbohydr. Res.*, 328, 561–572, doi:10.1016/S0008-6215(00)00141-5, 2000.
- Raymond, J. A. und DeVries, A. L.: Adsorption Inhibition As A Mechanism Of Freezing Resistance In Polar Fishes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 74, 2589–2593, doi:10.1073/pnas.74.6.2589, 1977.
- Raymond, J. A. und Janech, M. G.: Ice-Binding Proteins from Enoki and Shiitake Mushrooms, *Cryobiology*, 58, 151–156, doi:10.1016/j.cryobiol.2008.11.009, 2009.
- Raymond, J. A. und Knight, C. A.: Ice Binding, Recrystallization Inhibition, And Cryoprotective Properties Of Ice-Active Substances Associated With Antarctic Sea Ice Diatoms, *Cryobiology*, 46, 174–181, doi:10.1016/S0011-2240(03)00023-3, 2003.
- Regand, A. und Goff, H. D.: Ice Recrystallization Inhibition in Ice Cream as Affected by Ice Structuring Proteins from Winter Wheat Grass, *J. Dairy Sci.*, 89, 49–57, URL <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/89/1/49>, 2006.
- Roth, W. A. und Scheel, K., Hrsg.: Landolt-Börnstein - Physikalisch-chemische Tabellen, Springer, Berlin, 5. Aufl., 1923.
- Röttger, K., Endriss, A., Ihringer, J., Doyle, S. und Kuhs, W. F.: Lattice-Constants and Thermal-Expansion of H₂O And D₂O Ice Ih Between 10 and 265 K, *Acta Crystallogr. Sect. B-Struct. Sc.*, 50, 644–648, doi:10.1107/S0108768194004933, 1994.

- Rubinsky, B., Arav, A., Mattioli, M. und DeVries, A. L.: The Effect of Antifreeze Glycopeptides on Membrane-Potential Changes at Hypothermic Temperatures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1369–1374, doi:10.1016/S0006-291X(05)80939-8, 1990.
- Scholander, P. F., Vandam, L., Kanwisher, J. W., Hammel, H. T. und Gordon, M. S.: Supercooling and Osmoregulation in Arctic Fish, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49, 5–24, doi:10.1002/jcp.1030490103, 1957.
- Schrag, J. D., Ogrady, S. M. und DeVries, A. L.: Relationship of Amino-Acid-Composition and Molecular-Weight of Antifreeze Glycopeptides to Non-Colligative Freezing-Point Depression, *Biochim. Biophys. Acta*, 717, 322–326, doi:10.1016/0304-4165(82)90186-6, 1982.
- Sicheri, F. und Yang, D. S. C.: Ice-Binding Structure and Mechanism of an Antifreeze Protein from Winter Flounder, *Nature*, 375, 427–431, doi:10.1038/375427a0, 1995.
- Smallwood, M., Worrall, D., Byass, L., Elias, L., Ashford, D., Doucet, C. J., Holt, C., Telford, J., Lillford, P. und Bowles, D. J.: Isolation and Characterization of a Novel Antifreeze Protein from Carrot (*Daucus carota*), *Biochem. J.*, 340, 385–391, doi:10.1042/0264-6021:3400385, 1999.
- Smolin, N. und Daggett, V.: Formation of Ice-like Water Structure on the Surface of an Antifreeze Protein, *J. Phys. Chem. B*, 112, 6193–6202, doi:10.1021/jp710546e, 2008.
- Stevens, R. N. und Davies, C. K. L.: Self-Consistent Forms of the Chemical Rate Theory of Ostwald Ripening, *J. Mater. Sci.*, 37, 765–779, doi:10.1023/A:1013891931423, 2002.
- Sung, Y.-M., Park, K.-S., Lee, Y.-J. und Kim, T.-G.: Ripening Kinetics of CdSe/ZnSe Core/Shell Nanocrystals, *J. Phys. Chem. C*, 111, 1239–1242, doi:10.1021/jp066203c, 2007.
- Sutton, R. L., Lips, A., Piccirillo, G. und Sztehlo, A.: Kinetics of Ice Recrystallization in Aqueous Fructose Solutions, *J. Food Sci.*, 61, 741–745, doi:10.1111/j.1365-2621.1996.tb12194.x, 1996.
- Tachibana, Y., Matsubara, N., Nakajima, F., Tsuda, T., Tsuda, S., Monde, K. und Nishimura, S.-I.: Efficient and Versatile Synthesis of Mucin-Like Glycoprotein Mimics, *Tetrahedron*, 58, 10 213–10 224, doi:10.1016/S0040-4020(02)01359-5, 2002.
- Tachibana, Y., Fletcher, G. L., Fujitani, N., Tsuda, S., Monde, K. und Nishimura, S.-I.: Antifreeze Glycoproteins: Elucidation of the Structural Motifs That Are Essential for Antifreeze Activity, *Angew. Chem.-Int. Edit.*, 43, 856–862, doi:10.1002/anie.200353110, 2004a.
- Tachibana, Y., Monde, K. und Nishimura, S.-I.: Sequential Glycoproteins: Practical Method for the Synthesis of Antifreeze Glycoprotein Models Containing Base Labile Groups, *Macromolecules*, 37, 6771–6779, doi:10.1021/ma049756z, 2004b.

- Takamichi, M., Nishimiya, Y., Miura, A. und Tsuda, S.: Effect of Annealing Time of an Ice Crystal on the Activity of Type III Antifreeze Protein, *FEBS J.*, 274, 6469–6476, doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06164.x, 2007.
- Tam, R. Y., Rowley, C. N., Petrov, I., Zhang, T., Afagh, N. A., Woo, T. K. und Ben, R. N.: Solution Conformation of C-Linked Antifreeze Glycoprotein Analogues and Modulation of Ice Recrystallization, *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 15 745–15 753, doi:10.1021/ja904169a, 2009.
- Tammann, G. und Hesse, W.: Die Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur bei unterkühlten Flüssigkeiten, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 156, 245–257, doi:10.1002/zaac.19261560121, 1926.
- Tang, M., Tao, W. H., Wu, C. C. und Chen, Y. P.: Solid-Liquid Equilibrium and Heat Capacity Measurements of Water + Sodium Bromide and Water + Sodium Carbonate Binary Mixtures, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, 34, 599–603, URL <http://nr.stpi.org.tw/ejournal/ChiChemEng/2003/EJ53-2003-599.pdf>, 2003.
- Tsao, C. S., Chen, C. Y. und Huang, J. Y.: Coarsening Kinetics, Thermodynamic Properties, and Interfacial Characteristics of δ' Precipitates in *Al - Li* Alloys Taking Into Account The Gibbs-Thomson Effect, *Phys. Rev. B*, 70, 174 104, doi:10.1103/PhysRevB.70.174104, 2004.
- Tsuda, T. und Nishimura, S.-I.: Synthesis of an Antifreeze Glycoprotein Analogue: Efficient Preparation of Sequential Glycopeptide Polymers, *Chem. Commun.*, S. 2779–2780, doi:10.1039/CC9960002779, 1996.
- Vandenheede, J. R., Ahmed, A. I. und Feeney, R. E.: Structure and Role of Carbohydrate in Freezing Point Depressing Glycoproteins from an Antarctic Fish, *J. Biol. Chem.*, 247, 7885–7889, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/247/24/7885>, 1972.
- Velikov, V., Borick, S. und Angell, C.: The Glass Transition of Water, Based on Hyperquenching Experiments, *Science*, 294, 2335–2338, doi:10.1126/science.1061757, 2001.
- Venketesh, S. und Dayananda, C.: Properties, Potentials, and Prospects of Antifreeze Proteins, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 28, 57–82, doi:10.1080/07388550801891152, 2008.
- Vogel, H.: Das Temperaturabhängigkeitsgesetz der Viskosität von Flüssigkeiten, *Phys. Z.*, 22, 645–646, 1921.
- Voorhees, P. W. und Glicksman, M. E.: Ostwald Ripening During Liquid-Phase Sintering - Effect of Volume Fraction on Coarsening Kinetics, *Metall. Transact. A*, 15, 1081–1088, doi:10.1007/BF02644701, 1984.
- Vrentas, J. S. und Duda, J. L.: Diffusion in Polymer - Solvent Systems .1. Re-Examination of Free-Volume Theory, *J. Polym. Sci. Pt. B - Polym. Phys.*, 15, 403–416, doi:10.1002/pol.1977.180150302, 1977a.

- Vrentas, J. S. und Duda, J. L.: Diffusion in Polymer-Solvent Systems .2. Predictive Theory for Dependence of Diffusion-Coefficients on Temperature, Concentration, and Molecular-Weight, *J. Polym. Sci. Pt. B - Polym. Phys.*, 15, 417–439, doi:10.1002/pol.1977.180150303, 1977b.
- Wagner, C.: Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen (Ostwald-Reifung), *Z. Elektrochem.*, 65, 581–591, 1961.
- Wang, J. H.: A Comprehensive Evaluation of the Effects and Mechanisms of Antifreeze Proteins during Low-Temperature Preservation, *Cryobiology*, 41, 1–9, doi:10.1006/cryo.2000.2265, 2000.
- Wang, S., Amornwittawat, N., Banatiao, J., Chung, M., Kao, Y. und Wen, X.: Hofmeister Effects of Common Monovalent Salts on the Beetle Antifreeze Protein Activity, *J. Phys. Chem. B*, 113, 13 891–13 894, doi:10.1021/jp907762u, 2009.
- Washburn, E. W., Hrsg.: *International Critical Tables*, Bd. IV, McGraw-Hill, New York, 1. Aufl., 1928.
- Weast, R. C., Hrsg.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 60. Aufl., 1979.
- Wen, D. Y. und Laursen, R. A.: Structure-Function-Relationships in an Antifreeze Polypeptide - The Role of Neutral, Polar Amino-Acids, *J. Biol. Chem.*, 267, 14 102–14 108, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/267/20/14102>, 1992.
- Wen, D. Y. und Laursen, R. A.: Structure-Function-Relationships in an Antifreeze Polypeptide - The Role of Charged Amino-Acids, *J. Biol. Chem.*, 268, 16 396–16 400, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/268/22/16396>, 1993a.
- Wen, D. Y. und Laursen, R. A.: Structure-Function-Relationships in an Antifreeze Polypeptide - The Effect of Added Bulky Groups on Activity, *J. Biol. Chem.*, 268, 16 401–16 405, URL <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/268/22/16401>, 1993b.
- Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H., Mahley, R. W. und Agard, D. A.: 3-Dimensional Structure of the LDL Receptor-Binding Domain of Human Apolipoprotein E, *Science*, 252, 1817–1822, doi:10.1126/science.2063194, 1991.
- Wöhrmann, A. P. A.: Antifreeze Glycopeptides and Peptides in Antarctic Fish Species from the Weddell Sea and the Lazarev Sea, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 130, 47–59, doi:10.3354/meps130047, 1996.
- Wu, Y., Banoub, J., Goddard, S. V., Kao, M. H. und Fletcher, G. L.: Antifreeze Glycoproteins: Relationship Between Molecular Weight, Thermal Hysteresis and the Inhibition of Leakage from Liposomes During Thermotropic Phase Transition, *Comp. Biochem. Physiol. B-Biochem. Mol. Biol.*, 128, 265–273, doi:10.1016/S1096-4959(00)00323-7, 2001.

- Yagci, Y. E., Antonietti, M. und Boerner, H. G.: Synthesis of Poly(tartar amides) as Bio-Inspired Antifreeze Additives, *Macromol. Rapid Commun.*, 27, 1660–1664, doi:10.1002/marc.200600451, 2006.
- Yamashita, Y., Nakamura, N., Omiya, K., Nishikawa, J., Kawahara, H. und Obata, H.: Identification of an Antifreeze Lipoprotein from *Moraxella* Sp of Antarctic Origin, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66, 239–247, doi:10.1271/bbb.66.239, 2002.
- Young, F. E. und Jones, F. T.: Sucrose Hydrates - The Sucrose-Water Phase Diagram, *J. Phys. Colloid Chem.*, 53, 1334–1350, doi:10.1021/j150474a004, 1949.
- Yue, Y. Z. und Angell, C. A.: Clarifying the Glass-Transition Behaviour of Water by Comparison with Hyperquenched Inorganic Glasses, *Nature*, 427, 717–720, doi:10.1038/nature02295, 2004.
- Zachariassen, K. E. und Kristiansen, E.: Ice Nucleation and Antinucleation in Nature, *Cryobiology*, 41, 257–279, doi:10.1006/cryo.2000.2289, 2000.
- Zepeda, S., Yokoyama, E., Uda, Y., Katagiri, C. und Furukawa, Y.: In Situ Observation of Antifreeze Glycoprotein Kinetics at the Ice Interface Reveals a Two-Step Reversible Adsorption Mechanism, *Cryst. Growth Des.*, 8, 3666–3672, doi:10.1021/cg800269w, 2008.
- Zhang, W. und Laursen, R. A.: Structure-Function Relationships in a Type I Antifreeze Polypeptide - The Role of Threonine Methyl and Hydroxyl Groups in Antifreeze Activity, *J. Biol. Chem.*, 273, 34 806–34 812, doi:10.1098/rstb.1984.0048, 1998.
- Zobrist, B., Koop, T., Luo, B. P., Marcolli, C. und Peter, T.: Heterogeneous Ice Nucleation Rate Coefficient of Water Droplets Coated by a Nonadecanol Monolayer, *J. Phys. Chem. C*, 111, 2149–2155, doi:10.1021/jp066080w, 2007.