

## **IV. Phasenverhalten und Kristallinität von Bienenwachsen**

### **IV.1. Einleitung**

Die physikalischen Eigenschaften der Bienenwachse sind für die Honigbienen von erheblicher Bedeutung bei der Stabilität ihres Nestmaterials und in der Kommunikation über Vibrationen (Kapitel I.2. und I.5.).

Honigbienen kommen in den unterschiedlichsten Klimazonen vor. Dabei sind die Wachse auch ganz unterschiedlichen Umgebungstemperaturen ausgesetzt. Bei dem Versetzen eines Bienenstockes aus Deutschland nach Sizilien schmolz das von den Bienen gebaute Wabenwachs in kurzer Zeit (Tautz, persönliche Mitteilung). In Indien (Bangalore) wurden schon Wachstumtemperaturen von 60 °C an den Nestern von *Apis florea* gemessen (Tautz, persönliche Mitteilung). Somit sollten die Bienen eine Möglichkeit besitzen, den Schmelzpunkt der Wachse zu beeinflussen, um eine Instabilität oder gar ein Zerstören ihres Stockes durch zu hohe Temperaturen zu vermeiden.

Die Weiterleitung von Vibrationen durch eine Wabe sollte sehr stark von den physikalischen Eigenschaften des Wachses abhängen, mit dem diese Wabe gebaut wurde. Die physikalischen Eigenschaften von Wachsen sind temperaturabhängig aufgrund von Änderungen im Phasenverhalten der Wachse mit steigender oder abnehmender Temperatur (Lourens und Reynhardt 1979, Basson und Reynhardt 1988). Die Annahme, daß die Weiterleitung von Vibrationen in den Waben von der Temperatur der Wachse und damit vom Phasenverhalten abhängt, wird durch folgende Befunde unterstützt: Es gibt nur einen kleinen Temperaturbereich (30-33 °C) für die optimale Weiterleitung der Vibrationen durch Waben bei *Apis mellifera carnica* (Tautz et al. 1996). Die Kraft, die benötigt wird, um einen Rand einer Wabenzelle parallel zur Wabenoberfläche zu verschieben ist genauso temperaturabhängig und in einem Bereich von 30-33 °C minimal (Rohrseitz 1998).

Aber nicht nur die Temperatur, sondern auch die Art und der Zustand des Wachses (z.B. Wabenalter) spielen bei den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Wachse eine Rolle. Während der Verarbeitung und Nutzung der Wachse treten signifikante Änderungen in den chemischen und physikalischen Eigenschaften auf (Kapitel I.2., Hepburn 1986, Kurstjens et al. 1985, eigene Daten in Kapitel II.3.1.).

Es gibt zahlreiche ältere Studien über das Phasenverhalten und die Kristallinität von Bienenwachs, wobei bis jetzt nur Wabenwachse untersucht wurden. Röntgenbeugungsexperimente mit Wabenwachs ergaben, daß die Ketten des Wachses die Tendenz haben, sich parallel zueinander anzuordnen und dann in einem zweidimensionalen

Wabenwachs keine Textur aufweist und auch nicht laminiert vorliegt (Kurstjens et al. 1985). Nach neueren Untersuchungen besitzt das Bienenwachs eine ähnliche Struktur wie die technischen Fischer-Tropsch-Wachse mit kristallinen und amorphen Zonen (Basson und Reynhardt 1988). Dieses Modell wurde auch schon für Pflanzenkutikulawachse angenommen (Reynhardt und Riederer 1994).

Mit Hilfe der Fourier-transformierten Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) sollten die unterschiedlich alten Wabenwachse und die Kutikulawachse verschiedener Kasten und Geschlechter der Honigbiene *Apis mellifera carnica* auf ihr temperaturabhängiges Phasenverhalten hin untersucht werden. Zudem sollte geprüft werden, ob die physikalischen Eigenschaften von den chemischen Eigenschaften der Wachse abhängen, denn dann wäre es denkbar, daß die Bienen über die Wachssynthese die physikalischen Eigenschaften der Wachse verändern können.

## IV.2. Material und Methoden

*IV.2.1. Waben- und Kutikulawachse.* Für die Analyse der Schmelzdaten wurden dieselben Wachse wie in der chemischen Analyse (Kapitel II.2.1. und II.2.3.) verwendet. Die Kutikulawachse wurden von ca. 10 Individuen gepoolt, um genügend Material für die Messungen zu bekommen. Die Wachse wurden in einer Konzentration von 2 mg/ml in Chloroform gelöst.

*IV.2.2. Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie).* Die Infrarotspektren wurden mit einem Bio-Rad FTS 164 FT-IR Spektrometer (Bio-Rad, Krefeld) aufgenommen. Es wurde ein speziell angefertigter thermostatisierter Probenhalter für den Modus der horizontalen abgeschwächten Totalreflektion (h-ATR) benutzt. Die Temperatur des Probenhalters wurde mit Bohrungen in den zugehörigen Metallteilen eingestellt, die mit dem Wasserkreislauf eines Thermostaten (Haake, Karlsruhe, F3-C Thermostat) verbunden waren. Die Steuerung des Spektrometers und des Thermostaten erfolgte über Computer mit der Software des FTIR-Gerätes. Mittels Temperaturfühlern wurde die Temperatur des Probenhalters direkt gemessen.

Die Probenkammer des Spektrometers wurde ständig mit trockener Luft gespült (Whatman purge gas generator Typ 75-45, Balston, Haverhill, Mass. U.S.A.). Als Probenhalter wurde ein ZnSe-Kristall (Bio-Rad) benutzt. Die Infrarotspektren wurden in einem Wellenzahlbereich von 4000 bis 670  $\text{cm}^{-1}$  bei einer Temperatur von 3 bis 95 °C in einem Intervall von 2 °K aufgenommen. Die Auflösung betrug 2  $\text{cm}^{-1}$  und für jede Temperatur wurden 20 Messungen gemittelt. Weitere technische Daten und Informationen zur Zuverlässigkeit der Methode sind der Veröffentlichung von Merk et al. (1998) zu entnehmen.

Von den Wachslösungen wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  (entspricht 200  $\mu\text{g}$  Wachs) auf die Oberfläche des ZnSe-Kristalls aufgetragen. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels bei Raumtemperatur wurde die Probe für 3 min bei 95 °C erhitzt, um das Lösungsmittel vollständig zu entfernen und eine homogene Wachsschicht auf dem Kristall zu bekommen. Die vollständige Evaporation des Lösungsmittels wurde spektroskopisch nachgewiesen. Vorangegangene Untersuchungen von Merk (1998) konnten nachweisen, daß in einem Bereich von 150 bis 600  $\mu\text{g}$  der Probe die Ergebnisse der Messungen unabhängig von der Menge des aufgetragenen Wachses waren. Für jede Wachsort wurden die Messungen vier mal wiederholt.

IV.2.3. *Auswertung der Daten.* Die Schmelzkurven der langkettigen aliphatischen Bestandteile der Waben- und Kutikulawachse wurden aus der temperaturabhängigen Verschiebung der asymmetrischen ( $\nu_{as}$ ) und symmetrischen ( $\nu_s$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsbanden ermittelt. Dafür wurden die Peakmaxima der Banden bei 2927-2916 und 2856-2848  $\text{cm}^{-1}$  hergenommen.

Die Kristallinität der Wachse bei 25 °C wurde nach einer Methode von Zerbi et al. (1989) bestimmt. Dabei wurden die Höhenverhältnisse der beiden Peaks bei  $\sim 730$  and  $\sim 720$   $\text{cm}^{-1}$  (a und b), verursacht durch die  $\text{CH}_2$ -Pendelschwingungen ( $\delta_{rock}$ ) herangezogen (Abb. IV.1, inlay). Es wurden folgende Formeln angewandt:

$$A = \frac{b-(a/IF)}{(a+b)} * 100, C = 100 - A$$

mit A: amorpher Anteil [%], C: kristalliner Anteil[%], a: Peakhöhe der Bande bei 730  $\text{cm}^{-1}$ , b: Peakhöhe der Bande bei 720  $\text{cm}^{-1}$ , IF: Instrumentenfaktor = 0,84374 (experimentell bestimmt für das hier benutzte Spektrometer).

Der Begriff kristallin darf bei IR-spektroskopischen Untersuchungen nicht im kristallographischen Sinne verstanden werden. Bei IR-Messungen ist unter kristallin ein molekularer Ordnungszustand zu verstehen, der sich in der Aufspaltung der Banden bei 730  $\text{cm}^{-1}$  und 720  $\text{cm}^{-1}$  zeigt (Marsen 1962). Der hier verwendete Kristallinitätsgrad beschreibt lediglich das Verhältnis von kristallinen zu amorphen Bestandteilen der Wachse.

### IV.3. Ergebnisse

Die Infrarotspektren der Wachse wiesen im Bereich von 4000 bis 670  $\text{cm}^{-1}$  vier Gruppen charakteristischer Absorptionsbanden auf (Abb. IV.1). Diese Banden wurden von den  $\text{CH}_2$ -, den C=O- und C=C-Schwingungen verursacht. Die Banden bei 2916-2927 und 2848-2856  $\text{cm}^{-1}$  waren durch die asymmetrischen ( $\nu_{\text{as}}$ ) und symmetrischen ( $\nu_{\text{s}}$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen bedingt. Die Banden bei 1471-1473 und 720-730  $\text{cm}^{-1}$  konnten den  $\text{CH}_2$ -Scher- ( $\delta_{\text{sciss}}$ ) und Pendelschwingungen ( $\delta_{\text{rock}}$ ) zugeordnet werden.

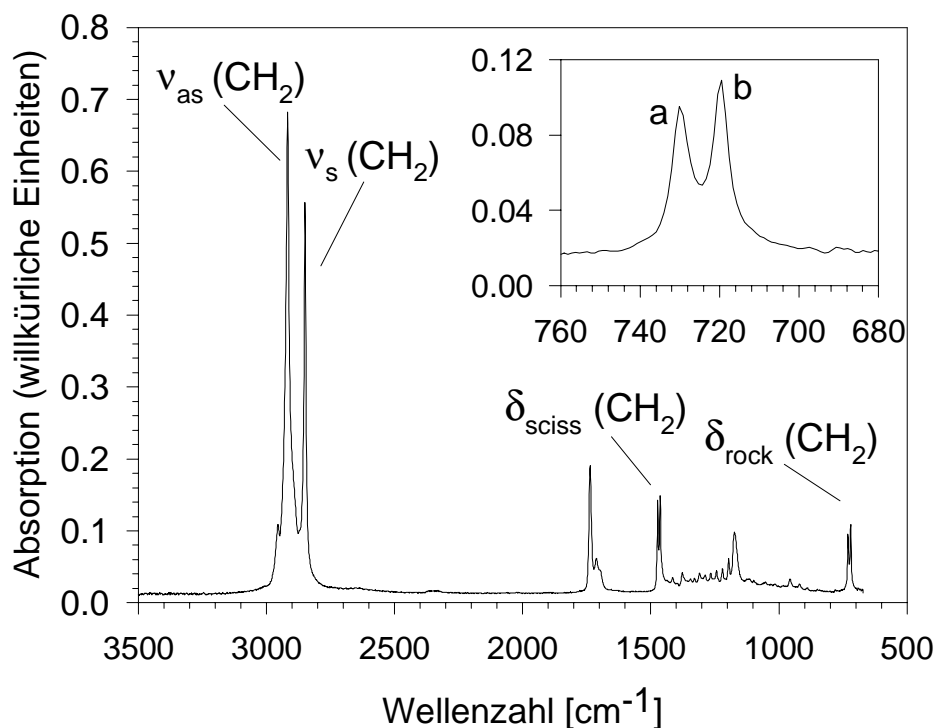


Abbildung IV.1: Einzelnes FTIR-Spektrum von einem mittelalten Wabenwachs bei 25 °C in horizontaler abgeschwächter Totalreflektion (h-ATR) gemessen. Es sind die symmetrischen ( $\nu_{\text{s}}$ ) und asymmetrischen ( $\nu_{\text{as}}$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsbanden und die  $\text{CH}_2$ -Scher- ( $\delta_{\text{sciss}}$ ) und Pendelschwingungsbanden ( $\delta_{\text{rock}}$ ) angegeben. Inlay:  $\text{CH}_2$ -Pendelschwingungsbanden ( $\delta_{\text{rock}}$ ): Peakmaxima bei 730  $\text{cm}^{-1}$  (a) und 720  $\text{cm}^{-1}$  (b).

Im Bereich von  $1755\text{-}1675\text{ cm}^{-1}$  lagen die Banden der C=O- und C=C-Valenzschwingungen. Die verschiedenen kleinen Banden im Bereich von  $1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  werden als Fingerprint des Spektrums bezeichnet (Schwedt 1996). Sie sind auf Gerüstschwingungen der gesamten Moleküle zurückzuführen, d.h. durch die Wechselwirkungen aller Atome eines Moleküls bestimmt.

Die Peakmaxima der Absorptionsbanden der asymmetrischen ( $\nu_{as}$ ) und symmetrischen ( $\nu_s$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungen ( $2916\text{-}2927$  und  $2848\text{-}2856\text{ cm}^{-1}$ ) verschoben sich im Laufe des Temperaturanstiegs zu größeren Wellenzahlen. Diese Verschiebungen entstehen durch das vermehrte Auftreten von gauche-Konformeren und damit durch eine Zunahme der Unordnung in den Alkylketten mit der Temperatur (Cameron et al. 1980, Mantsch und McElhaney 1991, Blume 1996).

Aus der Auftragung dieser Peakmaximaverschiebung mit der Temperatur wurden die Schmelzkurven der Wachse erhalten (Abb. IV.2). Diese Methode zur Erkennung von Phasenübergängen wurde auch schon in der Polymerforschung angewandt (Campoy 1996). In allen Wachsen konnten drei Phasenübergänge detektiert werden: zwei fest-fest-Übergänge (1. und 2. Phasenübergang, 1 und 2 in Abb. IV.2) und ein fest-flüssig-Übergang (kristalliner Endpunkt, 3 in Abb. IV.2). Beim ersten Phasenübergang beginnen die Kettenenden zu schwingen und mit steigender Temperatur nimmt der Anteil der orthorhombischen Kristallinität ab. Beim 2. Phasenübergang sind die orthorhombischen Kristallstrukturen der Wachse komplett in die hexagonalen Strukturen überführt. Dies wird als orthorhombischer Endpunkt bezeichnet. Der 3. Phasenübergang, der kristalline Endpunkt, zeigt den Übergang von der kristallinen in die amorphe Phase an. Bei dieser Temperatur sind die Wachse zu 100 % amorph. Zwischen dem 2. Phasenübergang und dem kristallinen Endpunkt liegen die Kristalle in der hexagonalen Anordnung vor, d.h. die Ketten liegen alltrans vor und können um ihre Längsachse rotieren (Rotatorphase) (Marsen 1961, Larrson 1986).

Der 1. Phasenübergang trat bei einer Temperatur von  $41\text{ °C}$  für Königinnen-Kutikulawachs (QU) bis  $59.9\text{ °C}$  für die Wachsschuppen auf. Der 2. Phasenübergang fand zwischen  $52.5$  (QU) und  $77.5\text{ °C}$  (WS) statt. Die kristallinen Endpunkte schwankten zwischen  $70\text{ °C}$  (QU) und  $88\text{ °C}$  (WS). Die Kristallinitäten der Wachse bei  $25\text{ °C}$  reichten von  $89.8$  bis  $102\%$  (Tab. IV.1). Die Kristallinitätswerte über  $100\%$  sind mit  $100\%$  gleichzusetzen. Sie resultieren aus der rein rechnerischen Auswertung nach Zerbi et al. (1989).

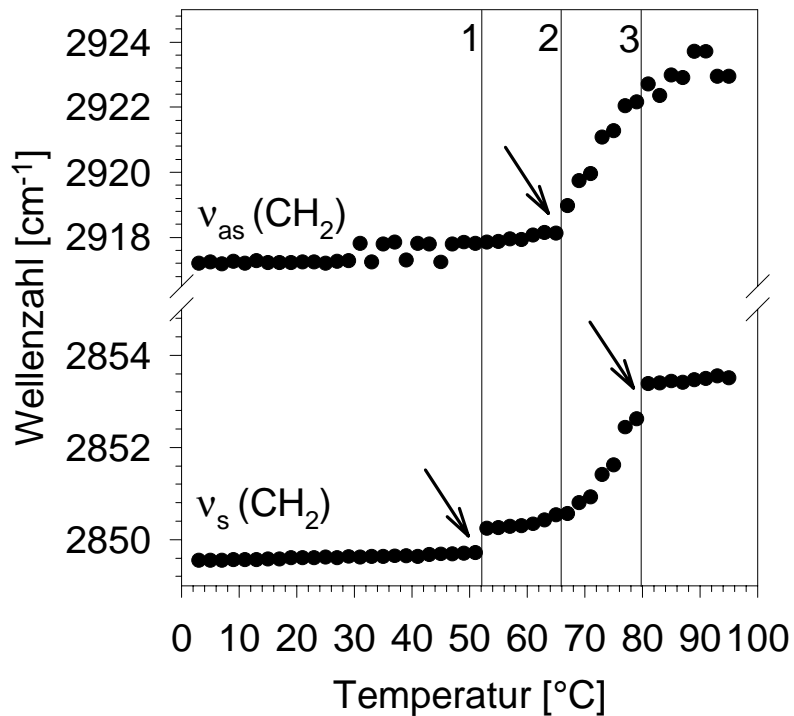


Abbildung IV.2: Schmelzkurven eines mittelalten Wabenwachses aus der Auftragung der Verschiebung der Peakmaxima der asymmetrischen ( $v_{as}$ ) und symmetrischen ( $v_s$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsbanden ( $2916\text{-}2927$  und  $2848\text{-}2856\text{ cm}^{-1}$ ). Die Pfeile geben die drei Phasenübergänge (1 bis 3) an.

Tabelle IV.1: Phasenverhalten von verschiedenen alten Wabenwachsen und Kutikulawachsen verschiedener Kasten und Geschlechter aus den FTIR-spektrometrischen Analysen (Mittelwerte  $\pm$  95% Vertrauensbereich).

Proben (n=4)	1. Phasen- übergang [°C]	2. Phasen- übergang [°C]	kristalliner Endpunkt [°C]	Kristallinität bei 25°C [%]
Wachsschuppen	$59.5 \pm 1.59$	$77.5 \pm 3.05$	$88 \pm 4.11$	$101.5 \pm 1.99$
Junges Wachs	$54 \pm 1.59$	$71.5 \pm 1.59$	$80 \pm 1.84$	$102.0 \pm 1.35$
Mittelaltes Wachs	$53.5 \pm 3.05$	$69.5 \pm 1.59$	$82 \pm 4.11$	$100.4 \pm 1.67$
Altes Wachs	$51 \pm 2.60$	$68.5 \pm 3.05$	$80.5 \pm 1.59$	$99.7 \pm 0.91$
Arbeiterinnen	$48 \pm 4.11$	$63.5 \pm 3.05$	$81 \pm 2.60$	$96.4 \pm 1.71$
Drohnen	$38 \pm 1.84$	$56.5 \pm 1.59$	$79 \pm 2.60$	$90.3 \pm 0.71$
	+	+	+	+

Die qualitativen chemischen Zusammensetzungen der betrachteten Wachse stimmten recht gut überein (Kapitel II.3.1. und II.3.3.). Somit ist es unwahrscheinlich, daß die Unterschiede im Phasenverhalten der Wachse auf Unterschiede in den Substanzklassen zurückzuführen sind. Aber es könnten Unterschiede in den Kettenlängenverteilungen der Wachse (Kapitel II.3.1. und II.3.3., Abb. II.5 und II.7) für die Unterschiede im Phasenverhalten verantwortlich sein. Der Median über das gesamte Spektrum der Ketten betrug bei den Wachsschuppen 44 C-Atome und verringerte sich bis zum Königinnen-Kutikulawachs um 14 C-Atome auf eine Kettenlänge von C<sub>30</sub>. Der absolute Anteil langer Ketten am Wachs lag zwischen 17.5 % und 70.4 % und der absolute Anteil kurzer Ketten zwischen 16.0 % und 67.7 % bezogen auf die Fraktionen 1 bis 3 der Festphasenextraktionen (Kapitel II.2.5., Tab. IV.2).

Tabelle IV.2: Chemische Eigenschaften von verschiedenen alten Wabenwachsen und Kutikulawachsen verschiedener Kasten und Geschlechter aus den GC-FID- und GC-MS-Analysen (Fraktionen 1 bis 3, Kapitel II.3.1. und II.3.3.).

Probe	Median der Kettenlängen [Anzahl der C-Atome]			Absoluter Anteil [%]* von	
	C <sub>19</sub> -C <sub>54</sub>	C <sub>19</sub> -C <sub>36</sub>	C <sub>37</sub> -C <sub>54</sub>	langen Ketten C <sub>37</sub> to C <sub>54</sub>	kurzen Ketten C <sub>19</sub> -C <sub>36</sub>
Wachsschuppen	44	29	46	70,4	16,0
Junges Wachs	43	29	46	67,6	20,4
Mittelaltes Wachs	42	29,5	46	59,2	26,6
Altes Wachs	42	31	46	56,7	29,6
Arbeiterinnen	34	31	46	43,2	52,1
Drohnen	33	30	46	36,3	57,1
Königinnen	30	28	42,5	17,5	67,7

\*Differenz zu 100 %: Komponenten mit unidentifizierter Kettenlänge

Es ergab sich eine gute Korrelation zwischen der Temperatur des 2. Phasenübergangs und dem absoluten Anteil langer Ketten (C<sub>37</sub> bis C<sub>54</sub>) der verschiedenen Wachse mit  $r^2 = 0,9228$  (Abb. IV.3). Die Temperaturen des 1. Phasenübergangs und des kristallinen Endpunktes korrelierten mit dem absoluten Anteil langer Ketten mit  $r^2 = 0,7879$  und  $r^2 = 0,6391$ . Der Median der Kettenlängen der verschiedenen Wachse (C<sub>19</sub> bis C<sub>54</sub>) korrelierte ebenfalls gut mit dem 2. Phasenübergang mit  $r^2 = 0,9074$ .



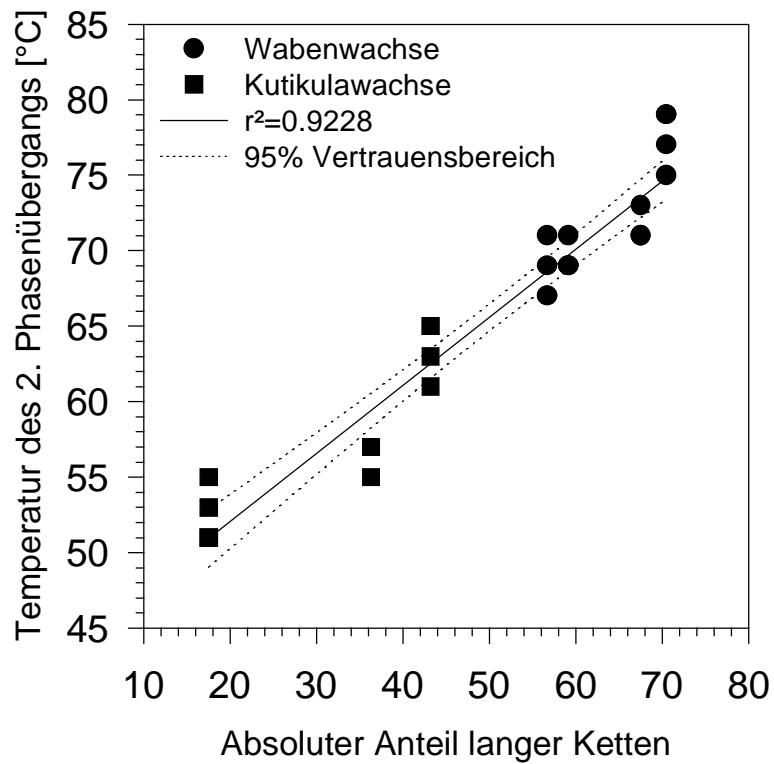


Abb. IV.3: Korrelation zwischen dem absoluten Anteil langer Ketten ( $C_{37}$  bis  $C_{54}$ ) der Waben- und Kutikulawachse und der Temperatur des 2. Phasenübergangs.

#### **IV.4. Diskussion**

*IV.4.1. Methodik.* Die FTIR-Spektroskopie, die auf den Wechselwirkungen von IR-Strahlung mit den CH<sub>2</sub>-Gruppen aliphatischer Verbindungen beruht, wurde in der Vergangenheit bereits in vielen verschiedenen Bereichen angewandt, unter anderem bei technischen Wachsen (LeRoux 1969, LeRoux 1970), zur Untersuchung von Insektenkutikula und deren Kohlenwasserstoffen (Gibbs und Crowe 1991, Gibbs et al. 1991, Gibbs et al. 1995, Gibbs 1995, Gibbs und Pomonis 1995) und zur Untersuchung von Pflanzen-Kutikulawachsen (Merk et al. 1998).

Die Waben- und Kutikulawachse der Bienen werden von aliphatischen Verbindungen dominiert (ca. 70 %) (Hepburn 1986, Fröhlich et al. 2000a, Kapitel II.3.1. und II.3.3.). Somit kann davon ausgegangen werden, daß für annähernd 70 % des untersuchten Wachses die aus den Messungen mit der FTIR-Spektroskopie gewonnenen physikalischen Informationen zutreffen.

Die hier verwendete Auftragung der Wachse auf den ZnSe-Kristall aus der Lösung (Rekonstitution) brachte den Vorteil mit sich, daß die wachsbefüllte Fläche in den Messungen konstant gehalten werden konnte und somit eine Variabilität der Ergebnisse vermieden werden konnte. Das Verfahren der Rekonstitution von Wachsen wurde von Schreiber und Schönherr (1993) etabliert.

Mit nativem Wachs auf dem ZnSe-Kristall erhöhte sich die Variabilität zwischen den Messungen stark durch eine Veränderung der wachsbefüllten Fläche. Dies ist auf das Schmelzen und Pressen des Wachses während des Temperaturanstiegs zurückzuführen. Allerdings mußte sichergestellt werden, daß sich die Wachse durch das Lösen und Rekristallisieren nicht verändern. Das Phasenverhalten rekonstituierter Wachse wurde mit dem der nativen Wachse verglichen. In den Temperaturen des 1. und 2. Phasenübergangs und des kristallinen Endpunktes gab es keine Unterschiede. Dies wurde auch schon bei einem Vergleich von rekonstituierten und nativen Kutikulawachsen bei Pflanzen mit derselben Methodik nachgewiesen (Merk 1998). Allerdings ergab sich im Verlauf der Schmelzkurven des nativen Wachses eine Verschiebung der temperaturabhängigen Änderung der Peakmaxima (2916-2927 und 2848-2856 cm<sup>-1</sup>) ab dem 1. Phasenübergang zu höheren Wellenzahlen im Vergleich zu den rekonstituierten Wachsen (Abb. IV.4).

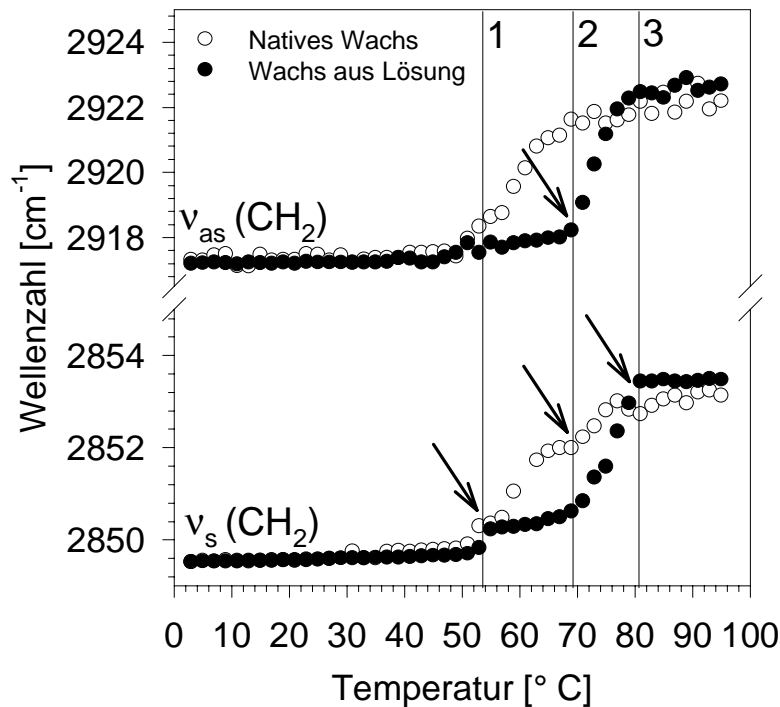


Abbildung IV.4: Schmelzkurven von jungem Wabenwachs (Mittelwerte aus je 4 Proben) aus der Auftragung der Verschiebung der Peakmaxima der asymmetrischen ( $v_{as}$ ) und symmetrischen ( $v_s$ )  $\text{CH}_2$ -Streckschwingungsbanden ( $2916\text{-}2927$  und  $2848\text{-}2856\text{ cm}^{-1}$ ). Die Pfeile geben die drei Phasenübergänge (1 bis 3) an. Die Wachse wurden mit zwei verschiedenen Auftragungsmethoden gemessen: Auftragung auf den ZnSe-Kristall 1. als natives Wachs und 2. als rekonstituiertes Wachs.

Wahrscheinlich ist die Flächenänderung der Wachsfläche auf dem ZnSe-Kristall während des Schmelzens der nativen Wachse für diesen Effekt verantwortlich. Oder es herrschen im nativen Wachs andere Ordnungszustände, die mit der Bearbeitung des Wachses durch die Bienen einhergehen. Allerdings müßten sich dann auch Unterschiede in den Temperaturen der Phasenübergänge in Vergleich zum rekonstituierten Wachs ergeben. Die Art der Wachsauftragung auf den ZnSe-Kristall spielt bei den hier diskutierten Phasenübergängen jedoch keine Rolle.

*IV.4.2. Phasenverhalten der Wachse.* Der Übergang von der orthorhombischen in die hexagonale Anordnung der Kristalle der Wachse befand sich zwischen  $68,5$  und  $77,5\text{ °C}$  bei den Wabenwachsen und zwischen  $52,5$  und  $63,5\text{ °C}$  bei den Kutikulawachsen (Tab. IV.1). Es

Laut Literatur schmilzt das Wabenwachs von *Apis mellifera* bei 62-65 °C (Jordan et al. 1940, Ullmann 1988). Der Schmelzpunkt von *Apis dorsata*-Wabenwachs liegt zwischen 64 und 65,5 °C (Jyothia und Reddy 1993). Bei einem Vergleich mit den hier gezeigten Daten für Wabenwachse (außer Wachsschuppen) stimmen die Ergebnisse ganz gut mit den Literaturdaten überein, denn mit einem Beginn des Schmelzens bei 51 bis 54 °C und einem kristallinen Endpunkt von 80 bis 80,5 °C liegt die Mitte des Schmelzintervalls hier bei ca. 66 bis 67 °C.

Messungen mit der Differenz-Scanning-Kalorimetrie (DSK) zeigten einen breiten Schmelzverlauf von Wabenwachs der Art *Apis mellifera adansonii* (Basson und Reynhardt 1988). Der Beginn des Schmelzens lag bei 27 °C (1. Phasenübergang), zwei weitere Übergänge erhielt man bei 56 °C (2. Phasenübergang) und bei 67 °C (kristalliner Endpunkt). Mit Hilfe der Röntgenbeugung konnten Basson und Reynhardt (1988) die Temperaturabhängigkeit der Dimensionen  $\alpha$  und  $\beta$  der Elementarzelle des Bienenwachses messen. Zwischen 27 und 67 °C kam es zu einer Verlängerung der  $\alpha$ -Achse. Dies entsprach dem Schmelzbereich des Wachses, der mit der DSK gemessen wurde. Nach diesen Messungen treten Änderungen innerhalb des Temperaturbereichs (27 bis 67 °C) auf, welche die mechanischen Eigenschaften des Wachses beeinflussen könnten. Dieser Temperaturbereich ist von biologischer Relevanz. Es gibt nur einen sehr kleinen Bereich von 30-33 °C, in dem die Weiterleitung von Vibrationen durch das Wachs optimal ist und in dem die Kraft, einen Zellrand parallel zur Wabenoberfläche zu verschieben, minimal wird (Tautz et al. 1996, Rohrseitz 1998). Diese Weiterleitung von Vibrationen und Kraft zur Verschiebung eines Zellrands ist für die Bienen jedoch von erheblicher Bedeutung in Bezug auf ihre Kommunikation im Bienenstock (Kapitel I.5.). Mit den hier durchgeführten FTIR-Messungen konnten in diesem biologisch relevanten Temperaturbereich jedoch keine Änderungen in den Wachsen festgestellt werden. Somit scheint die DSK aufgrund ihrer besseren Auflösung als direktere Meßmethode geeigneter zu sein, temperaturabhängige Veränderungen in Wachsen zu detektieren.

*IV.4.3. Zusammenhang zwischen chemischen Eigenschaften und Schmelzverhalten der Wachse.* Die Schmelztemperatur von Lipiden (Einzelsubstanzen) steigt mit zunehmender Kettenlänge an, ein Kohlenstoffatom mehr im Kohlenstoffgerüst von n-Alkanen erhöht die Schmelztemperatur um 1-3 °C (Gibbs und Pomonis 1995). Bei reinen Paraffinwachsen (techn. Fischer-Tropsch-Wachsen) mit unterschiedlichen gewichteten mittleren Kettenlängen konnte mittels NMR nachgewiesen werden, daß ein Zusammenhang zwischen den

besteht. (Lourens und Reynhardt 1979). Für sehr heterogene Wachse mit vielen unterschiedlichen Substanzklassen konnte ein solcher Zusammenhang bisher nicht nachgewiesen werden. Bei den hier durchgeführten Messungen ergab sich eine gute Korrelation zwischen dem Median der Kettenlängen über das gesamte Kettenlängenspektrum der Bienenwachse und dem ersten bzw. zweiten Phasenübergang (1.:  $r^2 = 0,8023$ , 2.:  $r^2 = 0,9074$ ). Dies bestätigt die Ergebnisse von Lourens und Reynhardt (1979) und Gibbs und Pomonis (1995). Ein theoretischer Anstieg des Medians um 2 C-Atome führt zu einer Erhöhung des 2. Phasenübergangs um 3 °C im Bienenwachs. Zum ersten Mal konnte für ein komplexes Substanzgemisch wie den Bienenwachsen eine lineare Abhängigkeit zwischen der mittleren gewichteten Kettenlänge und dem Schmelzverhalten der Wachse nachgewiesen werden.

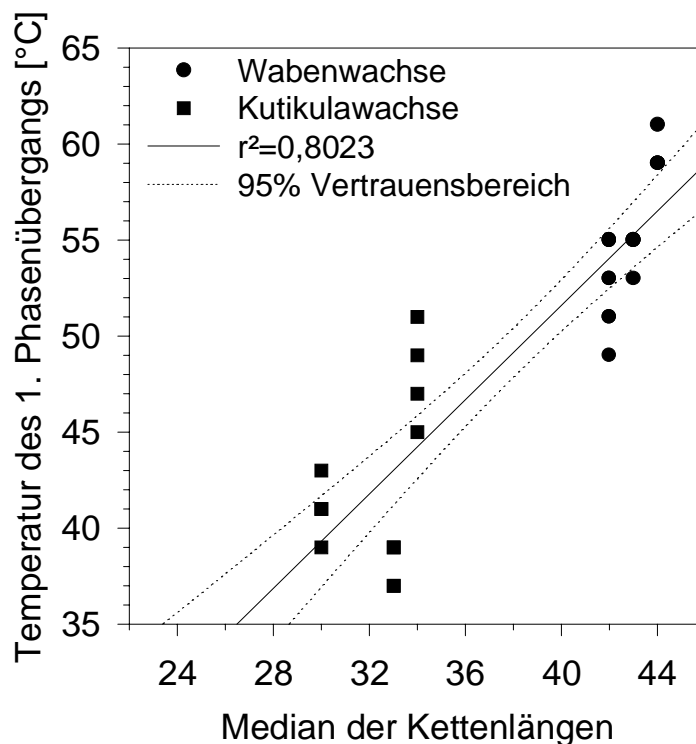


Abb. IV.5: Korrelation zwischen dem Median der Kettenlängen über das gesamte Spektrum ( $\text{Median}_{\text{ges}}$ ) und dem 1. Phasenübergang von Bienenwachsen mit  $r^2 = 0,8023$  und Extrapolation der Korrelationsgeraden zu 35 °C.

Schon der Beginn von Schwingungen der Kettenenden der Wachsbestandteile (1. Phasenübergang) könnte die Übertragungseigenschaften der Wachse für Vibrationen beeinflussen. Es ist möglich, die Korrelationsgeraden des Medians der Kettenlängenverteilung mit dem 1. Phasenübergang zur optimalen Stocktemperatur von 35 °C (Moritz und Southwick 1992) zu extrapolieren (Abb. IV.5). Aufgrund dieser Extrapolation mit den hier gemessenen Werten sollte das Bienenwachs mindestens eine mittlere Kettenlänge von 27 C-Atomen aufweisen, um den 1. Phasenübergang bei einer Stocktemperatur von 35 °C zu vermeiden. Aufgrund der DSK-Daten von Basson und Reynhardt (1988) mit einem 1. Phasenübergang bei geringerer Temperatur sollte sich diese postulierte mittlere Kettenlänge der Wachse zu noch längeren Ketten verschieben. Es ist denkbar, daß Bienen die Wachszusammensetzung und damit die Kettenlängen über Enzyme der Wachssynthese beeinflussen können. Somit hätten die Bienen direkten Einfluß auf die physikalischen Eigenschaften des Wachses bei verschiedenen Stocktemperaturen. Allerdings könnten auch andere Beimischungen zu den Wachsen, wie zum Beispiel Pflanzenharze (Propolis) zu einer Änderung der physikalischen Eigenschaften führen (Hepburn und Kurstjens 1984, Hepburn und Kurstjens 1988).

*IV.4.4. Struktur der Wachse.* Es wird angenommen, daß Wabenwachs von Honigbienen eine ähnliche Struktur wie die technischen Fischer-Tropsch-Wachse besitzen (Basson und Reynhardt 1988). Diese Annahme wird durch Röntgenbeugungsdiagramme gestützt, die für Bienenwachs und Fischer-Tropsch-Wachs identisch sind. Danach würde das Bienenwachs aus amorphen Zonen und kristallinen Zonen bestehen, in denen die orthorhombischen Kristalle in unterschiedlichen kristallinen Flocken vorliegen (Abb. IV.6). Diese Flocken könnten durch die Tendenz verursacht sein, daß Substanzen gleicher Kettenlänge bevorzugt nebeneinander zu liegen kommen (Small 1986). Die amorphen Zonen enthalten die freien Kettenenden (B), Defekte, die durch verzweigte Ketten verursacht werden (C) und kurze Bestandteile des Wachses (D) (Abb. IV.6).

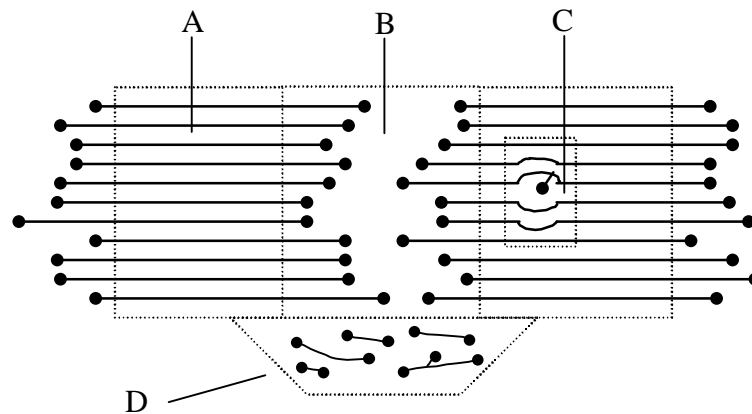


Abbildung IV.6: Strukturmodell eines Wachses mit A: kristalliner Zone im orthorhombischen Zustand, B: amorpher Zone mit Kettenenden, C: starrer amorpher Zone verursacht durch Verzweigungen, D: mobiler amorpher Zone aus den kürzesten Bestandteilen des Wachses (nach Basson und Reynhardt 1992).

Die Korrelation zwischen dem orthorhombischen Endpunkt (2. Phasenübergang) und dem absoluten Anteil langer Ketten der Wachse weist darauf hin, daß der Schmelzvorgang des Wachses vermutlich von den langkettigen Bestandteilen ( $C_{37}$  bis  $C_{54}$ ) des Bienenwachses dominiert ist (Abb. IV.3). Diese langen Bestandteile des Bienenwachses setzen sich aus den Estern, den ungesättigten Estern und den Hydroxyestern zusammen. Somit wäre das Schmelzen der Wachse esterdominiert. Mit einem Median der langkettigen Substanzen von 46 C-Atomen in den Wabenwachsen und von 46 und 42 C-Atomen in den Kutikulawachsen (Tab. IV.2) können die Schmelzpunkte der Wachse mit einem reinen  $C_{46}$ -Ester und  $C_{42}$ -Ester verglichen werden. Aus der Extrapolation von Schmelzpunkten kürzerkettiger synthetischer Ester ( $C_{24} - C_{40}$ , Iyengar und Schlenk 1968) konnten die Schmelzpunkte der langkettigen Ester geschätzt werden. Die extrapolierten Schmelzpunkte der reinen Ester ( $C_{42} \approx 75 \text{ °C}$  und  $C_{46} \approx 82 \text{ °C}$ ) stimmen recht gut mit dem Temperaturbereich der Schmelzpunkte der Wachse (Tab. IV.1:  $70 - 88 \text{ °C}$ ) überein. Dieses Dominieren des Schmelzens durch die langkettigen Substanzen bedeutet auch, daß die kurzen Ketten ( $C_{19}$  bis  $C_{36}$ ) nicht zu der orthorhombischen Kristallinität der Wachse beitragen. Nach dieser Theorie bestehen die amorphen Zonen der Wachse aus den kürzeren Bestandteilen ( $C_{19}$  bis  $C_{36}$ ) und sollten somit einen Anteil von 16-30 % bei den Wabenwachsen und 52-68 % bei den Kutikulawachsen gemäß den Anteilen kurzer Ketten in den Wachsen aufweisen (Tab. IV.2).

NMR-Messungen der Relaxationszeiten (schnelle und langsame Relaxation) erlaubten eine Bestimmung des Gehaltes an flüssigen Bestandteilen (schnelle Relaxationszeit) in

1. Phasenübergang, an dem die Kristalle noch vollständig im orthorhombischen Zustand vorliegen, wurde ein flüssiger Anteil des Wabenwachses von ca. 20 % bestimmt. Verglichen mit den hier gezeigten 16-30 % kurzen Ketten (entspricht der amorphen bzw. flüssigen Phase) im Wabenwachs unterstützen die NMR-Messungen von Basson und Reynhardt (1988) die Hypothese, daß nur die langkettigen Bestandteile des Wachses zur orthorhombischen Kristallinität beitragen.

*IV.4.5. Abschätzung der orthorhombischen Kristallinität.* Die orthorhombische Kristallinität bei 25 °C betrug ca. 100 % für Wabenwachse, für die Kutikulawachse lag sie zwischen 90 und 96 %. Frühere infrarot-spektroskopische Untersuchungen von Bienenwachs zeigten eine Kristallinität von 67 % (Marsen 1962). Bienen fügen bei der Verarbeitung von Wachsschuppen zu Wabenwachs Speichel zu, der das Wachs in einen amorphen Zustand überführt, bevor es verbaut wird. Die Kristallinität von jungem Wachs sollte kleiner sein als die von altem Wachs, da das Wachs nach der Verarbeitung im Laufe der Zeit durch die Wärme im Stock re-orientiert wird (Kratky 1937). Die Wachsschuppen selbst weisen eine erhöhte Kristallinität gegenüber dem Wabenwachs auf, da durch das Durchkauen der Wachse durch die Bienen die anisotropischen Schuppen zu isotropisches Wabenwachs überführt werden (Kurstjens et al. 1985). In den hier gezeigten Ergebnissen konnte keine Änderung der Kristallinität durch die Verarbeitung und Alterung des Wachses nachgewiesen werden.

Nach Merk (1998) betrug die Schichtdicke der rekonstituierten Wachse auf dem ZnSe-Kristall bei einer Probenmenge von 200 µg nur 0,3 µm und die Probe wurde komplett vom Meßstrahl durchdrungen. Eine zuverlässige Auswertung der orthorhombischen Kristallinität wird aber erst ab 5 µm Eindringtiefe des Meßstrahls erreicht, denn der Anteil der amorphen Phase steigt mit zunehmender Eindringtiefe (Zerbi et al. 1989). Nach Zerbi et al. (1989) war die äußerste Schicht eines Polyethylenfilms wesentlich kristalliner als das Innere des Films. Es könnte sein, daß bei der geringen Schichtdicke des Bienenwachses die amorphen Anteile und somit auch der Anteil der orthorhombischen Kristallinität des Wachses über die hier verwendete Auswertung nicht korrekt zu bestimmen sind. Dies würde die krassen Abweichungen der hier gezeigten Ergebnisse von den bisher veröffentlichten Daten erklären. Denn nach der oben aufgestellten Hypothese, daß die langen Ketten für die orthorhombische Kristallinität verantwortlich sind, müßten bei den Wabenwachsen bis zu 30 % und bei den Kutikulawachsen bis zu 68 % des Wachses amorph sein. Frühere infrarot-spektroskopische Untersuchungen (Marsen 1962) mit Schichtdicken von 50 µm, bei denen ebenfalls die CH<sub>2</sub>-Pendelschwingungsbanden (720 und 730 cm<sup>-1</sup>) zur Bestimmung der Kristallinität



amorphen Anteil von 33 %, was dem hier postulierten amorphen Anteil für Wabenwachs entspricht. Bei den Messungen mit nativem Wabenwachs waren die Kristallinitäten bei 25 °C um ca. 10 % geringer als beim rekonstituierten Wachs. Allerdings kann hier keine Aussage über die Dicke der vom Meßstrahl durchdrungenen Schicht gemacht werden. Bei Merk (1998) waren die Ergebnisse der Messungen in einem Bereich von 0,3 bis 0,9 µm Schichtdicke konstant. Aber diese Schichtdicke liegt weit außerhalb des von Zerbi et al. (1989) empfohlenen Bereichs von 5 µm. Bei größerer Schichtdicke ergeben sich breitere Absorptionsbanden, die schwer auszuwerten sind (Merk 1998). Wobei die hier verwendete Methode der Kristallinitätsbestimmung und der Schmelzkurvenauftragung immer von den Peakmaxima, also von der Intensität des Peaks ausging und nicht von den Flächen der Banden. Eine Bestimmung der Peakmaxima müßte auch bei breiteren Banden aufgrund größerer Schichtdicke möglich sein. Für die exakte Bestimmung der orthorhombischen Kristallinität der Bienenwachse mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie müßten weitere Messungen mit einer größeren Schichtdicke (ab 10 µm) durchgeführt werden.