

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft



# **Immobilisierung der Penicillin G Acylase an funktionalisierte Trägerpartikel für biotechnologische Anwendungen**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt an der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg

von Herrn Dipl.-Chem. Bertolt Kranz  
aus Regensburg, 2007

Die Dissertation wurde unter der Betreuung von

Prof. Dr. Rainer Köster  
Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik  
Naturwissenschaftliche Fakultät IV - Chemie und Pharmazie  
Universität Regensburg

vom 15.03.2004 bis 14.03.2007 im Institut ITC–WGT des Forschungszentrums Karlsruhe angefertigt.

## Conclusion

Immobilisation of the model enzyme penicillin G acylase (EC 3.5.1.11) from *E. coli* was investigated. Both loading and specific activity of the enzyme were improved by optimisation. The secondary structure of the immobilised enzyme was determined by circular dichroism measurements.

### Synthesis of the polymer particle

Two types of magnetic polymer particles, consisting of polymethylacrylate and polyvinylacetate and suitable for industrial pharmacy, were synthesised at low costs.

Compared to the state of the art, the overall yield could be increased from 7 to 40% by improving the synthesis of the magnetic fluid and the polymer reaction. Moreover, several variants of the reaction were tested to allow for a later automation of the experiments.

As a result, non-porous polymer particles were obtained, which had a high mechanical stability and were stable in organic solvents and water-based media at a pH of 3.5 to 12. The particles could be stored in water-based media for two years. They had a high magnetic saturation which allowed for magnetic separation and provided 500  $\mu\text{mol/g}$  of functional groups for further modifications with a spacer. The average particle diameter was below 5  $\mu\text{m}$  and the specific surface was in the range of 2 to 5  $\text{m}^2/\text{g}$ . The polymethylacrylate particle had a zeta potential of -28 mV, whereas that of the polyvinylacetate particle amounted to +3.4 mV.

The particles obtained were found to be very useful for enzyme immobilisation, because they are cheap (< 10 €/g), easy to separate and stable, and allow for high loading. Due to the small particle size, no strong diffusion limitation will occur.

Particles of about the same price level (for example Eupergit<sup>®</sup>-C) have a much larger particle size, particles of the same quality (for example Micromer<sup>®</sup>-M) are much more expensive (by a factor of 70).

Comparison with polymer nanoparticles revealed that the latter were no useful enzyme carriers because of their high tendency to agglomerate. Additionally, they could not be magnetically separated, although they possessed magnetic properties. This was attributed to the fact that magnetic saturation per single particle was too small.

## Modification with a spacer

The polymer particles were activated with hexamethylenediamine and further modified with two different spacers. The first spacer (hexamethylenediamine-glutaraldehyde spacer, HG spacer) consisted of a continuous sequence of hexamethylenediamine and glutaraldehyde; the second spacer (amino acid spacer, AS spacer) contained amino acids. The spacer length (related to the ideal stretched spacer molecules) of the HG spacer was varied over a wide range (14.6 nm). Use of a spacer with variable amino acids represented a new approach which ensured a high variability of the structure because of the high amount of different structured amino acids.

In both cases, glutaraldehyde was used to activate the spacer for enzyme immobilisation, because this method was superior to activation with epichlorohydrine or carbonyldiimidazole. The glutaraldehyde method allowed for work in water-based media (no solvent exchange is necessary), reached the highest yield, and costs were low. This method was further improved by varying the reaction parameters.

The HG spacer was modified in its length from 1.62 to 16.2 nm and the enzyme penicillin G acylase (EC 3.5.1.11, from *E. coli*) was immobilised. A maximum specific activity of 42.2 U/mg (unit = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , free enzyme 42 U/mg, same activity test) was achieved for 24.0 mg/g active enzyme on the particles. In this case, spacer length was longest with 16.2 nm. The spacer length was not increased beyond this value, as enzyme loading started to decrease from about 11 nm. Still, intrinsic properties (such as specific activity) of the enzyme were improved clearly with increasing spacer length. Storage stability and the stability of the enzyme against high temperatures, ionic strength, and extreme pH values were improved as well.

The AS spacer was modified in length from 2.9 to 9.1 nm and in structure through the use of different amino acids ( $\alpha$ -aminobutylic acid, asparaginic acid, glycine, lysine, phenylalanine, and proline). Agglomeration of the AS spacer increased strongly with increasing spacer length. Hence, it was impossible to produce any spacer with a length of  $> 9$  nm.  $\alpha$ -aminobutylic acid and glycine were used to produce a spacer similar to the HG spacer. Through the amino acids of asparaginic acid and lysine and through phenylalanine, dissociation groups and an aromatic rest, respectively, were incorporated in the spacer. Proline produced a somewhat "more rigid" spacer. Maximum enzyme loading was achieved with

the pure lysine spacer (60.5 mg/g at 5.3 nm). The maximum amount of active enzyme was reached by the phenylalanine spacer with 19.1 U/mg at 2.9 nm.

The polymer nanoparticles showed an enzyme loading of 120 mg/g, an amount of active enzyme of 108 mg/g, and a specific activity of 37.9 U/mg. These are excellent values which would recommend these particles for enzyme immobilisation. However, agglomeration increased drastically with the loading of the particles. Consequently, only one spacer unit (1.62 nm) could be synthesised, the expenditure being rather high.

### **Determination of the secondary structure**

For the first time, covalent immobilised enzyme (penicillin G acylase, EC 3.5.1.11, from *E. coli*) on a solid surface (silica nanoparticles, Ludox<sup>®</sup>-HS40 from Grace Davison) was investigated with circular dichroism.

First, the enzyme was separated and purified by one-dimensional gel electrophoresis, reduced to peptide fragments with trypsin, and characterised with mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS). The protein database entry is 1h2g; the molar mass is 86192 g/mol. After that, the particles were modified with glutardialdehyde and the enzyme was covalently immobilised onto the particles. Saturation was reached at 55.8 mg/g, but the yield dropped to 14% only.

Covalent immobilisation of the enzyme onto the silica nanoparticles (12 nm diameter, monodisperse) changed the enzyme structure only slightly: The amount of  $\alpha$ -helix determined by circular dichroism increased by 0.5%, the amount of  $\beta$ -sheets by 2.2%, while the amount of  $\beta$ -turns decreased by 1.6% and the amount of random coils by 1.1%. Specific activity decreased strongly with increasing enzyme loading, from 22.1 to 9.17 U/mg. Taking into consideration the slight change of the enzyme structure only, the drastic reduction of the specific activity is supposed to be caused by diffusion limitation (of the substrate to the enzyme) in catalysis or by steric hindrance.

### **Screening method for immobilisation**

Comparative measurements of the kinetics of enzyme immobilisation on surfaces and the maximum enzyme loading achievable were made for the first time on the  $\mu$ l scale by means of the quartz crystal micro balance (QCM) technique. This method was compared to the standard synthesis and biochemical characterisation techniques (hydrolyses of a

substrate) and found to be an ideal screening method because of the small amounts needed.

The enzyme was immobilised onto a QCM chip and the binding behaviour was investigated. Moreover, activity of the immobilised enzyme on the chip was determined. Enzyme loadings were found to be comparable.

From an immobilised enzyme, a carrier and a spacer were synthesised. This immobilised system was investigated and optimised with respect to the amount of active enzyme on the carrier. The properties of the system were found to be good as regards both the particle and the enzyme. Use of spacers clearly improved the intrinsic properties of the enzyme.

## **Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11) von *E.coli* untersucht. Sowohl die Beladung als auch die spezifische Aktivität des Enzyms wurde durch Optimierungen verbessert. Durch Circular dichroismus-Messungen wurde die Sekundärstruktur des immobilisierten Enzyms bestimmt.

### **Synthese der Polymerpartikel**

Es wurden preisgünstige und für die industrielle Pharmazie verwendbare magnetische Polymerpartikel aus Polymethylacrylat sowie Polyvinylacetat synthetisiert.

Durch die Verbesserung der Magnetitgelsynthese und der Suspensionspolymerisation zur Darstellung der Partikel konnte die Gesamtausbeute gegenüber dem bisherigen Stand der Technik von 7 auf ~ 40% gesteigert werden. Zudem wurden auch einige Synthesevarianten durchgeführt, um eine spätere Automatisierung des Prozesses zu ermöglichen.

Dadurch wurden nicht-poröse Polymerpartikel erhalten, die über eine hohe mechanische Stabilität verfügen und in organischen Lösungsmitteln, sowie wässrigen Systemen von pH 3.5 bis 12 stabil sind. Diese können in wässrigen Medien zwei Jahre lang gelagert werden. Sie weisen eine hohe magnetische Sättigung auf, die eine magnetische Separierung ermöglicht und stellen 500  $\mu\text{mol/g}$  Oberflächengruppen für die Funktionalisierung durch Spacer zur Verfügung. Der mittlere Teilchendurchmesser lag unter 5  $\mu\text{m}$  und die spezifi-

sche Oberfläche im Bereich von  $\sim 2$  bis  $\sim 5 \text{ m}^2/\text{g}$ . Die Polymethylacrylat-Partikel verfügten über ein Zetapotential bei pH 7.5 von  $-28 \text{ mV}$  und die Polyvinylacetat-Partikel von  $+3.4 \text{ mV}$ .

Daraus ergeben sich Träger, die hervorragend für die Immobilisierung geeignet sind, da sie preisgünstig ( $< 10 \text{ €/g}$ ), leicht separierbar und stabil sind, sowie eine hohe Beladung ermöglichen. Auf Grund der geringen Größe der Partikel entstehen keine hohen Diffusionslimitierungen.

Partikel in derselben Preisklasse (zum Beispiel Eupergit<sup>®</sup>-C) besitzen einen deutlich größeren mittleren Teilchendurchmesser, Partikel mit vergleichbaren Eigenschaften (zum Beispiel Micromer<sup>®</sup>-M) sind deutlich teurer ( $\sim 70$  fach).

Vergleiche mit Polymer-Nanopartikel ergaben, dass diese nicht als Träger geeignet sind, da sie sehr stark agglomerierten und trotz magnetischer Partikeleigenschaften nicht magnetisch separiert werden konnten. Dies lag daran, dass die magnetische Sättigung pro Polymer-Nanopartikel zu gering war.

### **Funktionalisierung mit Spacern**

Die Polymerpartikel wurden mit Hexamethyldiamin aktiviert und mit zwei verschiedenen Spacern funktionalisiert. Der erste Spacer (Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer, HG-Spacer) besteht aus einer Abfolge von Hexamethyldiamin und Glutardialdehyd, der zweite Spacer (Aminosäurespacer, AS-Spacer) besteht aus Aminosäuren. Die Längenvariation (bezogen auf ideal linearisierte Spacermoleküle) des HG-Spacers umfasste einen weiten Bereich ( $14.6 \text{ nm}$ ). Die Verwendung von Spacern mit variablen Aminosäuren stellt einen neuartigen Ansatz dar, der auf Grund der Vielzahl von Aminosäuren mit unterschiedlicher Seitenkette eine hohe Variabilität der Struktur ermöglicht.

In beiden Fällen wurde Glutardialdehyd zur Aktivierung der Partikel für die Enzymimmobilisierung verwendet, da diese Methode der Aktivierung mittels Epichlorhydrin oder 1, 1'-Carbonyldiimidazol überlegen war. Die Glutardialdehyd-Methode erlaubt Arbeiten in wässrigen Medien (kein Lösungsmittelaustausch), besaß die höchste Ausbeute und ist preiswert. Diese Methode wurde zudem durch Variation der Reaktionsparameter weiter verbessert.

Der HG-Spacer wurde in seiner Länge von  $1.62$  bis  $16.2 \text{ nm}$  variiert und das Enzym Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11 von *E.coli*) immobilisiert. Dabei ergab sich, dass eine maxi-

male spezifische Aktivität von 42.2 U/mg (U = Unit [ $\mu\text{mol}/\text{min}$ ], freies Enzym: 42.0 mg/g bei gleichem Aktivitätstest) bei einer Menge von 24.0 mg/g aktivem Enzym auf den Partikeln erreicht wurde. Dies war der Fall bei der maximalen Spacerlänge, die 16.2 nm betrug. Eine weitere Verlängerung des Spacers wurde wegen der ab  $\sim 11$  nm wieder sinkende Beladung nicht durchgeführt. Es ergab sich aber eindeutig eine Verbesserung der intrinsischen Eigenschaften (wie der spezifischen Aktivität) des Enzyms mit zunehmender Spacerlänge. Auch die Lagerstabilität und die Stabilität gegenüber hohen Temperaturen, Ionenstärken und extremen pH-Werten wurden verbessert.

Der AS-Spacer wurde in seiner Länge von 2.9 bis 9.1 nm und durch die Verwendung von verschiedenen Aminosäuren ( $\alpha$ -Aminobutylsäure, Asparaginsäure, Glycin, Lysin, Phenylalanin und Prolin) modifiziert. Die Agglomeration der mit AS-Spacern funktionalisierten Partikel nahm mit steigender Spacerlänge weiter zu. Daher konnten keine Spacer  $> 9$  nm verwendet werden.  $\alpha$ -Aminobutylsäure und Glycin wurden verwendet, um einen mit dem HG-Spacer vergleichbaren AS-Spacer darzustellen. Durch die Aminosäuren Asparaginsäure und Lysin wurden dissoziierbare Gruppen, durch Phenylalanin ein aromatischer Rest in den Spacer eingebracht und Prolin sorgte für einen etwas „starrerem“ Spacer. Die maximale Beladung wurde mittels des reinen Lysinspacers mit 60.5 mg/g erreicht (5.3 nm), während die maximale Menge an aktivem Enzym beim Phenylalaninspacer mit 19.1 U/mg bei 2.9 nm erreicht wurde.

Die Polymer-Nanopartikel wiesen eine Beladung von 120 mg/g, 108 mg/g aktives Enzym auf den Partikeln und eine spezifische Aktivität von 37.9 U/mg auf. Dies sind hervorragende Werte, die eine Verwendung dieser Partikel empfehlen würden. Allerdings steigerte sich das Problem der Agglomeration mit beladenen Partikeln deutlich, so dass nur eine Spacerlänge des HG-Spacers (1.62 nm) synthetisiert werden konnte und dies bereits mit erheblichem Aufwand verbunden war.

### **Aufklärung der Sekundärstruktur**

Zum ersten Mal konnte kovalent immobilisiertes Enzym (Penicillin G Acylase, EC 3.5.1.11, von *E.coli*) an einer festen Phase (Silica-Nanopartikel, Ludox<sup>®</sup>-HS40 von Grace Davison) mittels Circular dichroismus analysiert werden.

Dazu wurde zuerst das Enzym durch eine 1D-Gelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt, durch Trypsin in Peptidfragmente abgebaut und mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS/MS) charakterisiert (Proteindatenbank-Eintrag 1h2g, molare Masse 86192

g/mol). Anschließend wurden die Partikel mit Glutardialdehyd funktionalisiert und das Enzym kovalent daran gebunden. Dabei wurde die Beladung bis zur Sättigung (55.8 mg/g) erhöht, die Ausbeute sank dabei aber auf 14%.

Die kovalente Immobilisierung des Enzyms auf diesen Silica-Nanopartikeln (12 nm Durchmesser, monodispers) änderte die Struktur des Enzyms nur sehr gering: Der mit Circular-dichroismus-Messungen bestimmte Anteil an  $\alpha$ -Helices stieg um 0.5%, der Anteil der  $\beta$ -Faltblätter um 2.2%, dafür sank der Anteil der  $\beta$ -Schleifen um 1.6% und der des ungeordnete Strukturanteils um 1.1%. Die spezifische Aktivität sank allerdings mit zunehmender Beladung rapide: Von 22.1 bis 9.17 U/mg. In Betracht der geringen Strukturänderung liegt der Schluss nahe, dass die deutliche Verminderung der spezifischen Aktivität durch die Diffusionslimitierung (des Substrattransportes zum Enzym) bei der Katalyse oder durch sterische Effekte gegeben ist.

### **Screening-Methode für Immobilisierungen**

Es wurden vergleichende Messungen im  $\mu$ l-Maßstab zur Kinetik von Enzymimmobilisierungen an Oberflächen und erzielbare maximale Beladung erstmalig mit der Quarzkristallmikrowaagen-Technik durchgeführt. Die Methode stellt wegen der geringen benötigten Mengen eine ideale Screening-Methode im Vergleich zu klassischen Synthesemethoden und biochemischen Charakterisierungsverfahren (wie Hydrolyse eines Substrates) dar.

Das Enzym wurde auf einem Chip der Quarzkristallmikrowaage immobilisiert und der Verlauf der Bindung an den Chip untersucht. Zudem wurde die Aktivität des auf dem Chip immobilisierten Enzyms gemessen. Dabei ergaben sich vergleichbare Beladungsmengen.

Es wurde ein Immobilisat erstellt, von dem Träger und Spacer selbstständig synthetisiert wurden. Dieses Immobilisat ist untersucht und betreffs der aktiven Menge Enzym auf dem Träger optimiert worden. Dabei zeigt sich, dass das Immobilisat über sehr gute Eigenschaften, sowohl im Bezug auf den Träger, als auch auf das Enzym verfügt. Die Verwendung von Spacern verbesserte die intrinsischen Eigenschaften des Enzyms deutlich.

## **Danksagung**

Herr Prof. Dr. Rainer Köster war mir eine unschätzbare Hilfe, vor allem durch zahlreiche Ratschläge, lehrreiche Diskussionen und seine große Geduld. Er ermöglichte mir, ein sehr interessantes Themengebiet zu erarbeiten, dabei eigene Ideen einzubringen und stellte eine hervorragende Ausstattung zur Verfügung. Seine Organisationsfähigkeit und konstruktive Kritik erleichterten mir die Arbeit erheblich. Dafür möchte ich mich bei ihm herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias Franzreb, der mir oft mit Rat und Tat zur Seite stand und mich sehr freundlich in seine Arbeitsgruppe integriert hat. Vor allem möchte ich mich für die Einblicke in die Ingenieurwissenschaften und Biotechnologie bedanken, die er mir ermöglicht hat. Die hervorragende Zusammenarbeit war eine sehr große Unterstützung.

Meinem Freund Herrn Dipl.-Chem. Jens Christian Bolle möchte ich herzlich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die zahllosen Diskussionen über unsere Arbeit danken, die mir ein steter Quell für neue Ideen waren.

Ebenfalls für die gute Zusammenarbeit möchte ich Herrn Andreas Meichelböck danken.

Mein Dank gilt Frau Dr. Sonja Berensmeier für ihre Hilfe in biotechnologischen Fragen und die gute Arbeitsatmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen und Freunden Herrn Dipl.-Chem. Harald Trösse, Herrn Dipl.-Chem. Sebastian Seibold und Herrn Dipl.-Ing. Günther Butschek. Sie trugen zu einem sehr angenehmen Arbeitsklima bei und unterstützten die Arbeit durch interessante Diskussionen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. R. Köster und Herrn PD Dr. Matthias Franzreb, besonders Herrn Dipl.-Ing. Martin Silvestre. Die sehr gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfestellungen erlaubten einen reibungslosen Ablauf.

## Danksagung

Ich möchte mich in besonderer Weise bei Herrn Dr. Jochen Bürck (Institut für biologische Grenzflächen) für die äußerst freundliche und sehr interessante Zusammenarbeit bedanken, bei der ich sehr viel gelernt habe.

Darüber hinaus bedanke ich mich beim Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Rolf Nüesch und allen anderen Mitarbeitern des Institutes „Institut für Technische Chemie-Wasser- und Geotechnologie“ des Forschungszentrums Karlsruhe, vor allem bei den „guten Geistern“ Frau Astrid Biedermann, Herrn Christian Biedermann und Frau Sibylle Heidt für das überaus gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt Frau Dr. Dorothee Szabo und ihrer Arbeitsgruppe (Institut für Materialforschung) für die Bereitstellung der Polymer-Nanopartikel und die gute Zusammenarbeit. Ebenso möchte ich Herrn Dr. Alexander Welle für die Zusammenarbeit bei den Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage danken.

Ebenso danke ich der Firma Grace Davison für die Bereitstellung der Silica-Nanopartikel Ludox<sup>®</sup>-HS40 und den freundlichen Umgang miteinander.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meinem Vater Irnfried, meine Mutter Ellen und meinen Geschwistern Gunhild, Wolfram und Otfried, die es mir erst ermöglichten, meine Ziele zu erreichen und die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Vor allem aber bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Verlobten Katharina Fund, die mir mit ihrer Engelsgeduld und großen Hilfsbereitschaft vieles sehr erleichterte.

## **Inhaltsangabe:**

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>Magnetische Polymerträgersysteme für die Enzymimmobilisierung</b>	<b>19</b>
2.1.	Stand des Wissens	19
2.1.1.	Freie Enzyme	19
2.1.2.	Immobilisierte Enzyme	20
2.2	Übersicht	27
2.3.	Material und Methoden	28
2.3.1.	Verwendete Geräte und Chemikalien	28
2.3.2.	Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des magnetischen Fluids	30
2.3.3.	Optimierung und resultierende Synthesevorschrift der Polymerpartikel-Synthese	32
2.3.4.	Versuche zur Stabilität der Polymerpartikel in verschiedenen Lösungsmitteln	34
2.3.5.	Einengung der Partikelgrößenverteilung	35
2.4	Analytische Methoden	35
2.4.1.	Dichtebestimmung mittels eines Pygnometers	36
2.4.2.	Gravimetrische Bestimmung der Partikelkonzentration	36
2.4.3.	Messung der magnetischen Suszeptibilität	36
2.4.4.	Messung der Partikelgröße, Größenverteilung und Bestimmung der Morphologie	36
2.4.5.	Messung der Spezifischen Oberfläche durch Absorptionsmessungen (BET-Isotherme)	37
2.4.6.	Messung des Zetapotentials	37
2.4.7.	Überprüfung des reinheitsgrades des Überstandes durch UV-Messungen	39
2.5.	Ergebnisse und Diskussion	39
2.5.1.	Optimierung des magnetischen Fluids	39
2.5.2.	Optimierung der Polymerpartikel-Synthese	40
2.5.3.	Versuche zur Stabilität der Polymerpartikel in verschiedenen Lösungsmitteln	43
2.5.4.	Einengung der Partikelgrößenverteilung	45
2.5.5.	Analytische Messungen	46
2.6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	56

<b>3. Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacern und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase</b>	<b>62</b>
3.1. Stand des Wissens	62
3.1.1. Das Modellenzym Penicillin G Acylase	62
3.1.2. Immobilisierte Enzyme	65
3.1.3. Verwendung von Spacern	66
3.2. Übersicht	69
3.3. Material und Methoden	69
3.3.1. Verwendete Geräte und Methoden	69
3.3.2. Übersicht über die Spacersynthesen	72
3.3.3. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacers	73
3.3.4. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des Aminosäurespacers	76
3.3.5. Variation der Spacer	79
3.3.6. Synthese eines Auftragsspacers	80
3.3.7. Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase	82
3.4. Analytische Methoden	84
3.4.1. Bestimmung der Epoxygruppen mittels Titration	84
3.4.2. Messung der Aminogruppe mit 2, 4, 6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)	85
3.4.3. Messung der Enzymaktivität freier und immobilisierter Penicillin G Acylase	86
3.4.4. Active Site Titration der Penicillin G Acylase	87
3.4.5. Messung der Gesamtproteinmenge von Penicillin G Acylase	88
3.5. Ergebnisse und Diskussion	88
3.5.1. Optimierung des Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacers	88
3.5.2. Optimierung des Aminosäurespacers	90
3.5.3. Variation der Spacer	91
3.5.4. Synthese eines Auftragsspacers	95
3.5.5. Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase	96
3.5.6. Analytische Messungen	97
3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	115

<b>4.</b>	<b>Physikalisch-chemische Untersuchung der Penicillin G Acylase</b>	<b>119</b>
4.1.	Stand des Wissens	119
4.1.1.	Chiroptische Methode (Circulardichroismus)	120
4.1.2.	Massenspektrometrie	122
4.1.3.	Quarzkristallmikrowaagen-Untersuchung	123
4.2	Übersicht	123
4.3.	Material und Methoden	125
4.3.1.	Verwendete Geräte und Chemikalien	125
4.3.2.	Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel	127
4.3.3.	Immobilisierung der Penicillin G Acylase	128
4.4.	Analytische Methoden	128
4.4.1.	Messung des IR-Spektrums der Silica-Nanopartikel	129
4.4.2.	Gelelektrophorese und Massenspektrometrie-Messungen	129
4.4.3.	Messung der Enzymaktivität freier und immobilisierter Penicillin G Acylase	129
4.4.4.	Active Site Titration der Penicillin G Acylase	131
4.4.5.	UV-Messungen	131
4.4.6.	Circulardichroismus-Messungen	132
4.4.7.	Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage	133
4.5.	Ergebnisse und Diskussion	133
4.5.1.	Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel	133
4.5.2.	Immobilisierung der Penicillin G Acylase	135
4.5.3.	Analytische Messungen	135
4.6.	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	152
<b>5.</b>	<b>Ausblick</b>	<b>155</b>
<b>6.</b>	<b>Fehlerbetrachtung</b>	<b>156</b>
6.1.	Experimentelle Randbedingungen und verfahrensbedingte Fehler	156
6.2.	Fehlerabschätzungen	156
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen und Definitionen</b>	<b>158</b>

<b>8.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>160</b>
8.1.	Literaturangaben zu Kapitel 1	160
8.2.	Literaturangaben zu Kapitel 2	160
8.3.	Literaturangaben zu Kapitel 3	166
8.4.	Literaturangaben zu Kapitel 4	173
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	<b>179</b>
9.1.	Abbildungsverzeichnis	179
9.2.	Tabellenverzeichnis	182
9.3.	Datenanhang	183

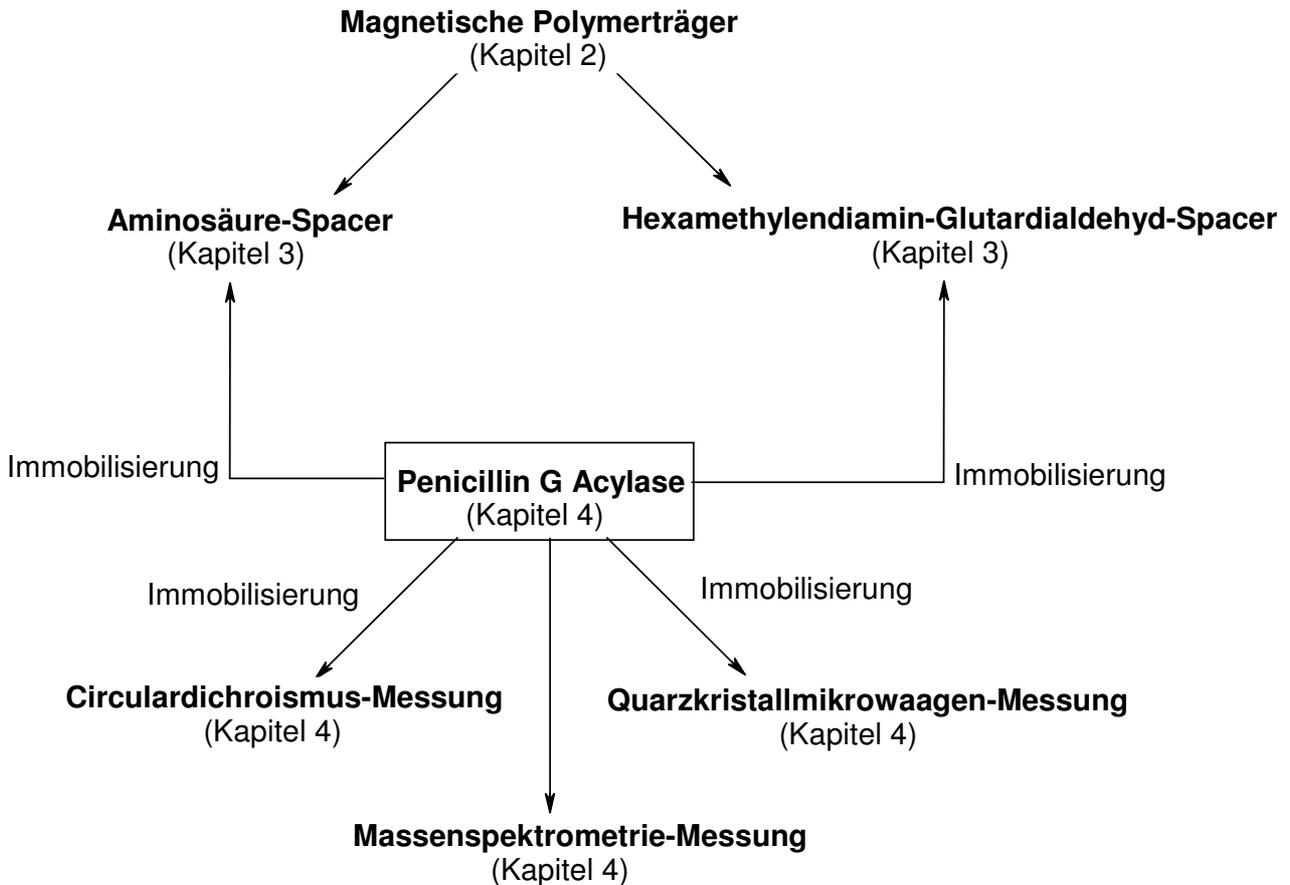
# 1. Einleitung und Zielsetzung

Die Biotechnologie („Die technische Nutzung des Potentials von Mikroorganismen, pflanzlichen und tierischen Zellen, sowie von Teilen dieser zum Zwecke der Produktsynthese oder Stoffumwandlung“, European Federation of Biotechnology, 1980) ist eine sehr alte Tradition, die zum Beispiel durch die Gärung schon sehr früh, wenn auch ohne tiefere Kenntnisse, angewendet wurde. Erst im 19. Jahrhundert wurde die Biotechnologie bewusst zur Produktgewinnung (Ethanol, Aceton, Butanol, Glycerol, Citronensäure, Bäcker- und Futterhefen) genutzt. Antibiotika und Impfstoffe wurden in den fünfziger Jahren durch die Biotechnologie produziert, als diese wissenschaftlich erschlossen wurde. Diese vertiefte sich immer weiter und kombinierte Erkenntnisse aus verschiedenen Wissenschaften und der Technik miteinander. Ab den achtziger Jahren kamen dann noch große Fortschritte in der Gentechnik, Biochemie, Mikrobiologie und Computer-gesteuerten Prozessen hinzu (Leuchtenberger, 1998).

Die Immobilisierung von Enzymen, die in größerem Maßstab in den sechziger Jahren entstand, ist heute ein bedeutendes Gebiet der Wissenschaft. Es gibt viele Möglichkeiten ein Enzym zu immobilisieren, von der reinen Adsorption, über Einschlussverfahren, Quervernetzung bis hin zur kovalenten Bindung. Dabei ist die Immobilisierung ein zweischneidiges Schwert, da sie in der Regel die Stabilität des Enzyms gegenüber äußeren Einflüssen wie zum Beispiel das Reaktionsmedium erhöht, dafür aber oft die intrinsischen Eigenschaften (wie die molekulare Aktivität) des Enzyms verschlechtert werden (Kallenberg et al, 2005).

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase von *E.coli* (EC 3.5.1.11). Dieses Enzym ist bedeutend für die industrielle Herstellung von Antibiotika. Seit den sechziger Jahren erweitert die enzymatische Darstellung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Amoxicillin, Ampicillin, Cefadroxil, Cefamandol, Cefazolin, Cephalexin, Cephaloglycin und Cephalothin) durch Penicillin G Acylase die traditionelle chemische Synthese. Dabei werden penicillin-basierende Antibiotika (semisynthetische Penicilline [SSP], zum Beispiel Amoxicillin, Ampicillin) und cephalosporin-basierende Antibiotika (semisynthetische Cephalosporine [SSC], zum Beispiel Cefadroxil, Cephalexin) unterschieden.

Eine Übersicht über die in dieser Arbeit behandelten Themen bietet Abb.1.



**Abb.1:** Schematische Darstellung der Arbeitsbereiche.

Das Enzym wurde an magnetische Polymerträger immobilisiert, die durch Spacer funktionalisiert wurden. Für die Immobilisierung des Enzyms wurde die kovalente Bindung an einen magnetischen Polymerträger gewählt, da diese das Enzym dauerhaft an den Träger bindet. Es wurden dafür Polymerträger, die selbstständig synthetisiert wurden, verwendet, da diese chemisch und mechanisch sehr stabil und zudem preisgünstig (im Bezug auf eine Nutzung in der pharmazeutischen Industrie) sind. Die magnetischen Eigenschaften erlauben eine schnelle und einfache Separierung und die Verwendung von Partikeln mit einem mittleren Teilchendurchmesser von unter 5  $\mu\text{m}$ , die über eine geringere Diffusionslimitierung des Stofftransportes des Substrats zum Enzym als größere Partikel verfügen. Daher wurden auch nicht-poröse Partikel synthetisiert, obwohl diese eine geringere Beladung als poröse Partikel aufweisen.

Um die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger zu vermindern ohne den Träger zu verändern, wurde ein Spacer (engl. Abstandshalter) verwendet. Dieser wurde in seiner Länge variiert, um die optimale Länge für die kovalente Bindung des Modellenzym Penicillin G Acylase zu finden.

Der Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer ist ein in der Biotechnologie weit verbreiteter Spacer, durch die Modifizierungen des Spacers war es möglich, sowohl die Enzymbeladung, als auch die spezifische Aktivität des Enzyms zu erhöhen.

Die Überlegung, ebenfalls die Struktur der Spacer zu verändern, führte zu dem Ansatz mit Hilfe der Merrifield Festphasensynthese einen Spacer aus Aminosäuren zu verwenden. Der Aminosäurespacer ist eine neuartige Anwendung der Peptidsynthese in der Enzymimmobilisierung. Diese können sowohl in der Länge, als auch im Bezug auf die chemische Struktur verändert werden. Gerade letztere lässt sich auf Grund der hohen Anzahl von verschiedenen Aminosäuren sehr stark modifizieren. Eine hohe Anzahl von funktionellen Gruppen ermöglicht eine mehrfache Bindung des Enzyms, wodurch die Struktur des Enzyms stärker fixiert wird. Somit ist die Enzymstruktur stabiler und nicht so anfällig gegenüber Einflüssen (wie zum Beispiel hohe Temperaturen), die die Struktur des Enzyms verändern.

Die große Flexibilität bei der Verwendung von Spacern zur Immobilisierung von Proteinen wurde durch die Synthese eines definierten Spacers für ein Protein erwiesen.

Die Sekundärstruktur des auf Silica-Nanopartikel immobilisierten Enzyms wurde mittels Circular dichroismus-Messungen analysiert. Es wurde die molare Masse und die Aminosäuresequenz der Penicillin G Acylase durch Massenspektrometrie-Messungen und eines Datenbankabgleichs ermittelt. Da die Einbußen der intrinsischen Eigenschaften (wie die spezifische Aktivität oder molekulare Aktivität) sowohl durch Änderungen der Sekundärstruktur des immobilisierten Enzyms, als auch durch Wechselwirkungen oder sterische Hinderung mit dem Träger bewirkt werden können, wurde ein Vergleich der Sekundärstruktur des freien und des immobilisierten Enzyms durchgeführt. Dabei war das Ziel, diese Analyse an auf festen Phasen kovalent immobilisierten Enzymen durchzuführen, ein Untersuchungsobjekt, das bisher noch nicht erfolgreich betrachtet wurde.

Der Verlauf der kovalenten Immobilisierung wurde mittels der Quarzkristallmikrowaagen-Technik verfolgt. Diese ermöglicht es, die Massenzunahme auf einem Chip über eine Frequenzänderung zu bestimmen.

Durch die Kombination obiger Ziele soll ein wissenschaftlich analysiertes und getestetes Immobilisat entwickelt werden, das nach der Maßstabsvergrößerung für die industrielle Produktionen von pharmazeutisch relevanten Chemikalien verwendet werden kann.

## **2. Magnetische Polymerträgersysteme für die Enzymimmobilisierung**

Ziel der Synthese war es, geeignete Partikel für die kovalente Immobilisierung des Modell-enzym Penicillin G Acylase zu synthetisieren, die preiswert genug sind, um in der industriellen Pharmazie Anwendung zu finden. Als geeignet sind Partikel anzusehen, die schnell und vollständig separiert werden können, genügend funktionelle Gruppen für die Spacer-synthese zur Verfügung stellen und deren Oberfläche eine ausreichende Enzymbeladung ermöglicht.

### **2.1. Stand des Wissens**

Bei der Verwendung von Enzymen als Biokatalysatoren in der Industrie stellt sich die Frage, ob diese in freier Form oder als Immobilisat eingesetzt werden sollen. Beide Anwendungsmöglichkeiten bieten einige Vorteile und Nachteile, so dass diese Entscheidung je nach Problemstellung unterschiedlich ausfallen kann. Während Biokatalysatoren in der Wissenschaft in kleinen Mengen eingesetzt werden, entwickelt sich dies für die Industrie oft auf Grund der größeren verwendeten Mengen zu einem deutlichen Kostenfaktor, den es zu optimieren gilt.

#### **2.1.1 Freie Enzyme**

Freie Enzyme unterliegen keinerlei Einschränkungen ihrer biochemischen und kinetischen Eigenschaften, wie sie durch die Immobilisierung entstehen können. Somit katalysieren sie die entsprechenden Reaktionen mit maximaler Substratspezifität, Stereoselektivität und Enantioselektivität, ersteres lässt je nach Enzym nur eine beschränkte Auswahl an Substraten zu. Dadurch ist die Substratpalette deutlich eingeschränkt und zudem sind die meisten Enzyme nur in rein wässrigen Lösungen aktiv. Aus den beiden obigen Bedingungen ergibt sich, dass diese Enzyme, wenn sie in Wasser schwerlösliche Substrate katalytisch umsetzen, nur bei geringen Konzentrationen arbeiten. Dies senkt die Produktivität oft deutlich unter die von der Industrie benötigten Werte. Das Temperaturmaximum für mesophile Enzyme liegt bei 37°C, allerdings denaturiert das Enzym bei dieser Temperatur. Ebenso stellen extreme pH-Werte und hohe Ionenstärken meist ein nicht zu überwindendes Problem dar. Bei der Produktaufreinigung gehen die Enzyme in der Regel verloren, so dass sie nur einmal verwendet werden können (Buchholz und Kasche, 1997).

### 2.1.2. Verwendung von Trägern zur Immobilisierung

Die Entwicklung geeigneter Immobilisierungsmethoden ist ein komplexes Arbeitsfeld, das sich zu einem bedeutenden Bereich der Forschung in der industriellen Biokatalyse entwickelt hat. Enzyme können mittels schwacher oder starker Wechselwirkungen (Van der Waals oder ionische Wechselwirkungen) immobilisiert werden. Diese sind im Allgemeinen zu schwach, um das Enzym während der Reaktion oder Aufbereitung am Träger zu halten, zudem können hohe Edukt- oder Produktkonzentrationen, pH-Werte oder Ionenstärken die Wechselwirkung zusätzlich schwächen. Eine kovalente Bindung hingegen ist unter den Bedingungen, bei denen das Immobilisat verwendet wird, ausreichend stabil. Grundsätzlich werden drei Methoden der Immobilisierung verwendet: Die trägerfreie Bindung, das Einschlussverfahren und die Trägerbasierende Bindung.

#### Trägerfreie Immobilisate

Der Vorteil von trägerfreien Immobilisaten liegt darin, dass die Aktivität der Enzyme bezogen auf die Gesamtmasse der Immobilisate besonders hoch ist. Zudem existieren keine Wechselwirkungen zwischen dem Träger und dem Enzym (Kallenberg, 2005) und es fallen keine Kosten für die Träger an, welche unter Umständen höher als jene für die verwendeten Enzyme sein können.

Zu den trägerfreien Enzymsystemen gehören unter anderem direkt vernetzte Enzyme, bei denen mehrere Enzymmoleküle durch ein Spacermolekül, z. B. Glutardialdehyd, miteinander verbunden sind. Dabei werden zwei Methoden unterschieden: Quervernetzte Enzymaggregate (CLEA – cross linked enzyme aggregates) und quervernetzte Enzymkristalle (CLEC – cross linked enzyme crystals).

CLEAs werden durch Fällung des Enzyms gebildet, ohne dass dessen Struktur gestört wird und anschließend mit einem geeigneten Reagenz quervernetzt. Das Enzym wird, sollte es noch nicht in reiner Form vorliegen, bei geeigneter Wahl der Chemikalien (Ammoniumsalze, Polyethylenglycol, enzymspezifische organische Lösungsmittel) gereinigt. Hierbei sind die Enzymmoleküle ohne jede Ausrichtung aneinander gebunden und das verbrückende Molekül muss einen ausreichenden Abstand gewährleisten, damit das Substrat das aktive Zentrum des Enzyms erreichen kann (Schoevaart et al, 2004, Mateo et al, 2004, Cao et al 2001 und 2000).

Im Gegensatz dazu wird bei CLECs vor der Quervernetzung eine Kristallisation durchgeführt. Dies beinhaltet für Enzyme, die nicht leicht zu kristallisieren sind, einen zusätzlichen, zeitaufwendigen Schritt. Dafür sind CLECs in der Regel chemisch und mechanisch sehr

stabil und die Kristallisation kann zur Aufreinigung benutzt werden. Wenn die CLECs klein genug ( $< 20 \mu\text{m}$ ) und die Abstände zwischen den Kristalliten ausreichend groß sind, um die Diffusion des Substrates zu ermöglichen, dann stellt diese Immobilisierungsmethode ein sehr aktives Immobilisat dar. Die Enzymmoleküle sind dabei im Kristall geordnet und können somit orientiert gebunden werden (Håring und Schreier, 1999).

Sowohl die CLECs, als auch die CLEAs können durch Filtration separiert werden. Im industriellen Maßstab ist dies allerdings auf Grund ihrer geringen Größe nicht einfach nur mit Druckgradienten möglich. Die Erhöhung der Stabilität, wie auch die Verminderung der Enzymeigenschaften ist oft geringer als bei trägergebundenen Enzymen. Allerdings sind auch direkt vernetzte Enzyme von der Diffusionslimitierung betroffen. Diese ist bei gleicher Größe nicht geringer als bei an Trägern gebundenen Enzymen (Cao et al, 2003).

### **Einschlussverfahren**

Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung von Enzyme ist das Einschließen dieser in eine Matrix, wie zum Beispiel Gelatine oder Alginat (Busto, 1998). Meist sind die dafür verwendeten Verfahren ohne hohen apparativen Aufwand: Das Enzym oder die ganze Zelle wird in einer wässrigen Lösung, bestehend aus einer permanenten und einer temporären Matrix, suspendiert und dann in eine Vernetzlerlösung getropft, um feste Partikel, meist im Millimeterbereich, zu bilden. Der letzte Schritt besteht darin, die temporäre Matrix wieder heraus zu lösen, um Poren in den Partikeln zu erzeugen, damit das Substrat zum Enzym gelangen und katalysiert werden kann. Eine Vernetzung mit bifunktionellen Molekülen stabilisiert die Partikel und bindet das Enzym oder die Zelle kovalent an die Partikel (Norouzian et al, 2002, Reetz, 1997). Diese Methode hat im Vergleich mit den Methoden der trägerfreien oder trägergebundenen Immobilisierung den Nachteil, dass sie einer hohen Diffusionslimitierung unterliegt. Diese ist zum einen von der Partikelgröße abhängig und zum anderen von der Größe der Poren. Durch diese Immobilisierungsmethode sind kleinere Partikel (unterlagen einer geringeren so genannten externen Diffusion) nur mit deutlich erhöhtem Aufwand herstellbar. Außerdem kann das Substrat das Enzym oder die Zelle nur über Poren erreichen (so genannte interne Diffusion). Daher ist diese Einschränkung nur schwer zu reduzieren. Aus diesem Grund werden Träger mit großen Poren verwendet. Beide „Diffusionslimitierungsarten“ beziehen sich auf die Diffusionslimitierung des Substrates in der enzymatisch katalysierten Reaktion. Diese entsteht durch einen Konzentrationsgradienten, der durch die verminderte Konvektion in der Umgebung der Partikel

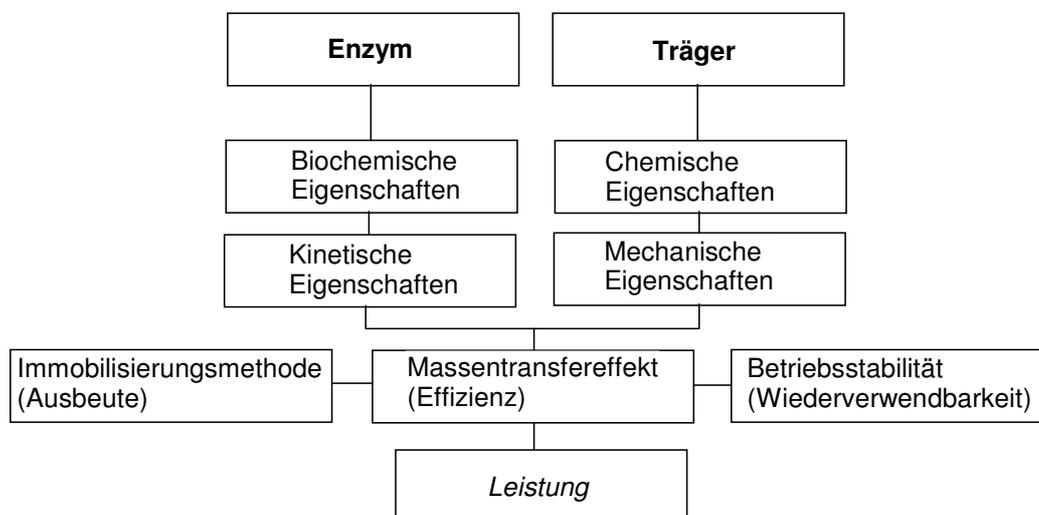
entsteht. Ist das Enzym in einer Pore immobilisiert, so spricht man von interner, ansonsten von externer Diffusionslimitierung.

Es wurden Silica-Nanopartikel mit verschiedenen spezifischen Porenvolumen (0.802 bis 1.20 cm<sup>3</sup>/g, daraus ergab sich eine spezifische Oberfläche von 466 bis 854 m<sup>2</sup>/g) zur Immobilisierung von Penicillin G Acylase verwendet und miteinander verglichen und dabei zeigte sich, dass diese eine Beladung von 89 bis 94% der eingesetzten Enzymmenge erzielten, dabei 28.1 bis 76.8% der Aktivität verloren ging (Chong und Zhao, 2004). Diese Ergebnisse wurden auch durch die Verwendung von ITQ-6 (Antikörper) bestätigt, die ein spezifisches Porenvolumen von 0.75 cm<sup>3</sup>/g (600 m<sup>2</sup>/g) besitzen und hohe Aktivitäten zeigten (Corma et al, 2002 und 2001).

Auch die Verwendung anorganischer Materialien wie zum Beispiel layered double hydroxides (LDHs) zum Einschluss von Enzymen oder Zellen stellt eine weitere Option dar. Diese besitzen den Vorteil, dass sie durch die geeignete Reaktion mit organischen Disäuren (zum Beispiel Glutaminsäure) geweitet werden können und somit die interne Diffusionslimitierung gesenkt werden kann. Allerdings ist die Bindung an das Trägermaterial ionischer Natur und daher sehr anfällig gegenüber pH-Änderungen oder hohen Konzentrationen anderer Ionen.

### Trägergebundene Enzyme

Die Eigenschaften der Immobilisate bestehen sowohl aus jenen des Trägers (chemische und mechanische Eigenschaften), als auch denen des Enzyms (biochemische und kinetische Eigenschaften). (Tischer und Kasche, 1999, vgl. Abb.2):



**Abb.2:** Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften eines Immobilisats, die sich aus der Kombination von Enzym und Träger ergeben (Tischer und Kasche, 1999).

Zu den biochemischen Eigenschaften des Enzyms gehören:

Molekulare Masse, prosthetische Gruppe, funktionelle Gruppen an der Enzymoberfläche, Reinheit

Zu den kinetischen Parametern des Enzyms gehören:

Spezifische Aktivität, kinetische Parameter, Einfluss von pH, Temperatur und Lösungsmitteln auf die Enzymkinetik

Zu den chemischen Eigenschaften des Trägers gehören:

Zusammensetzung, funktionelle Gruppen, Porengröße, chemische Stabilität, mögliches Schwellverhalten

Zu den mechanischen Eigenschaften des Trägers gehören:

Partikelgröße, Stabilität gegenüber hohen Drücken, Fließverhalten, Sedimentationsverhalten, Abriebfestigkeit

Bei einem Immobilisat ergeben sich durch die Kombination von Träger und Enzym folgende weitere Parameter:

Immobilisierungsmethode:

Beladung, Ausbeute, Veränderung der intrinsischen Eigenschaften (wie spezifische Aktivität)

Massentransfer Effekte:

Konzentrationseffekte innerhalb der Partikel (z.B. pH-Gradienten), externe und interne (in den Poren) Diffusion, Effizienz (molekulare Aktivität des immobilisierten Enzyms im Vergleich zum freien Enzym)

Stabilität:

Betriebsstabilität, Lagerstabilität

Leistung:

Produktivität (Masse Produkt pro eingesetzte Enzymmenge), Enzymverbrauch (Verlust an Enzymmenge pro Masse Produkt)

Generell liegt der Vorteil von immobilisierten Enzymen in ihrer erhöhten Stabilität (Cao et al, 1999) und der Wiederverwendbarkeit, die eine deutliche Kostenreduktion ermöglicht, wenn die Herstellung der Immobilisate nicht zu teuer ist und das Enzym oft genug wieder verwendet werden kann. Ebenso ist die Handhabung der Immobilisate gegenüber den Enzymen erleichtert, da diese einfacher separiert werden können (Kallenberg et al, 2005, Tischer und Kasche, 1999).

Am besten lassen sich trägergebundenen Enzymsysteme anhand der Eigenschaften des Trägers in verschiedene Klassen einteilen. Als geeignete Größen dienen hier vor allem die mittlere Teilchengröße, die Porosität und die Materialeigenschaften, besonders magnetische oder biologisch abbaubare Materialien. Gerade für katalytische Reaktionen mittels der Penicillin G Acylase ist es wichtig, das Reaktionsgleichgewicht so zu verschieben, dass die Synthese gegenüber der Hydrolyse begünstigt ist. Ein Weg dies zu erreichen ist, die Wasseraktivität zu kontrollieren. Dabei wird dem Enzym genug Wasser zur Verfügung gestellt, dass die Struktur erhalten bleibt, aber nicht genug, dass die Hydrolyse gegenüber der Synthese begünstigt wird. Dies funktioniert sehr gut mit Silicapartikeln (Basso et al, 2000a und 2000b, De Martin et al, 1999). Eine weitere Möglichkeit ist das Arbeiten in wasserfreien, organischen Lösungsmitteln.

Unzählige Arbeitsgruppen haben zahlreiche Träger zur Immobilisierung verwendet und untersucht. Viele Enzyme, vor allem Penicillin G Acylase wurden unter anderem auf Chitosan (Adriano et al, 2005a und 2005b), Nylon (Eldin et al, 2000), Polymerträger (Liu et al, 2005b, Ma et al, 2005, Yanga et al, 2005, Basso et al, 2003a, Akgöl et al, 2001, Guan et al, 2001; Wu et al, 1998, Müller-Schulte und Brunner, 1995, Bryjak und Noworyta, 1993, Bryjak et al, 1989), Silicapartikel (Dumitriu et al, 2003, Basso et al, 2000a, Esquena et al, 1996), Micellen (Celej et al, 2004), Aerogele (Basso et al, 200b) und organisch modifizierte Xerogele (Basso et al, 2003b) immobilisiert. Auch sehr ungewöhnliche Träger, wie zum Beispiel Lipidfilme (Phadtare et al, 2002), LDHs (Layered Double Hydroxides) oder intelligente Polymere (Sharma et al, 2003), die je nach pH-Wert flüssig oder fest sind, werden verwendet.

Auch biologisch abbaubare Materialien wie Agarose, oft bereits als Aldehyd-Agarose funktionalisiert, werden als Träger für die Immobilisierung eingesetzt. Enzyme werden an diese über ihre Aminogruppen gebunden (Guisan, 1988). Vor allem eine bedeutende Stabilitätssteigerung gegenüber hohen Temperaturen durch die Mehrfachbindung bei der Immobilisierung zeichnet diesen Träger aus (Fernández-Lafuente et al, 1992).

Die Literaturrecherche ergab, dass zwar viele verschiedene Träger verwendet werden, aber Polymerträger einen sehr großen Anteil daran haben. Daher werden immer wieder Verfahren entwickelt, um möglichst preiswert Polymerträger herzustellen (Tanyolac und Ozdural, 2000).

Eupergit<sup>®</sup>-C ist ein weit verbreiteter Träger und somit eignet sich dieser sehr gut, um als Vergleich für die hier verwendeten Polymerträger zu dienen (Katchalski-Katzir und Kraemer, 2000), da dieser Träger preiswert ist (6 €/g) und zur Immobilisierung von Enzymen,

auch Penicillin G Acylase, verwendet wird. Eupergit<sup>®</sup>-C besitzt eine mittlere Teilchengröße von ~170 µm und ist mit Poren von ~25 nm von poröser Beschaffenheit. Es ist ein Copolymerträger, bestehend aus Methacrylamid, Glycidylmethacrylat und Allylglycidylether, vernetzt mit N, N'-Methylen-bis(methacrylamid), hergestellt von Röhm (Darmstadt, Deutschland) (Röhm, 1995). Dabei ist Eupergit<sup>®</sup>-C sehr hygroskopisch und adsorbiert ungefähr die dreifache Menge seines Eigengewichtes an Wasser. Nach der Wasseraufnahme ist es allerdings mechanisch und chemisch sehr stabil (pH-Bereich von 0 bis 14) und verändert sich auch bei starken Änderungen des pH-Werts nicht (Janssen et al, 2002). Das Enzym wird über dessen Aminogruppen an die Epoxygruppen des Trägers gebunden, wobei diese Bindung im pH-Bereich von 1 bis 12 stabil ist (Mateo et al, 2000). Auf Grund der hohen Anzahl von funktionellen Gruppen auf dem Träger wird das Enzym mehrfach an den Träger gebunden, dies bewirkt eine höhere Betriebsstabilität des Enzyms. Die nicht reagierten funktionellen Gruppen können mittels diverser Reagenzien, wie Mercaptoethanol, Ethanolamin, oder Glycin geblockt werden (Kallenberg et al, 2005).

Vergleichbare Eigenschaften und Bedingungen haben auch andere verwendete Polymerträger, wie zum Beispiel Sepabeads fP-EP (Resindion, Mailand, Italien), ebenfalls ein Copolymer auf der Basis von Polymethylacrylat. Diese sind auch mit Epoxidgruppen funktionalisiert und binden in ähnlicher Weise wie Eupergit<sup>®</sup>-C (Mateo et al, 2002). Ebenso wird Amberlite XAD-7, ein poröser Polymerträger (~9 nm Porengröße) für die stationäre Phase in der Chromatographie entwickelt, zur Immobilisierung von Enzymen verwendet. Dabei werden die Oberflächengruppen mit Diaminoethan aktiviert und mit Glutardialdehyd für die Bindung an Aminogruppen des Enzyms weiter funktionalisiert (Kallenberg et al, 2005). Die Beladung mit Enzym und die Ausbeute der Immobilisierung sind allerdings sehr niedrig (Bianchi et al, 1996).

## **Magnetische Polymerträger**

Die in der Industrie angewendete Trennmethode der Filtration setzt Partikel von mindestens 100 µm voraus, damit diese schnell und effizient abgetrennt werden können. Reaktionen, die von Enzymen, die auf Partikel dieser Größenordnung gebunden sind, katalysiert werden, unterliegen starken Diffusionslimitierungen. Daher sind magnetische Polymermikroträger, die ohne Beschränkung der Größe leicht und effizient magnetisch separiert werden können, eine sehr gute Alternative (Kallenberg et al, 2005) und auch kommerziell erhältlich (eine Übersicht bietet unter anderem: [www.magneticmicrosphere.com](http://www.magneticmicrosphere.com)). Vor allem Mikroträger mit einem mittleren Durchmesser kleiner als 5 µm unterliegen kaum einer Dif-

fusionslimitierung des Substrates bei der katalysierten Reaktion (Janssen et al, 2002). Die Diffusionslimitierung kann zum Beispiel durch alternierende Magnetfelder weiter vermindert werden (Reichert et al, 2004, Safarik und Safarikova, 2004).

Die mittlere Partikelgröße und Größenverteilung sind wichtige Parameter, da bei polydispersen Partikeln mit einer sehr breiten Größenverteilung deutliche Unterschiede in der spezifischen Aktivität auftreten können. Assemblase<sup>®</sup>, industriell gefertigte immobilisierte Penicillin G Acylase, bestehend aus Chitosan und Gelatine, wies eine fünffach höhere spezifische Beladung (bezogen auf die Fläche) bei der Partikelfraktion mit dem kleinsten Durchmesser (< 200 µm) im Vergleich mit der Fraktion mit dem größten Durchmesser (> 600 µm) auf (Van Roon et al, 2003). Auch war die Enzymverteilung auf den Partikeln unterschiedlicher Chargen von Assemblase<sup>®</sup> sehr unterschiedlich, da das Chitosan-Gelatine-Verhältnis nicht immer gleich war (Van Roon et al, 2005a und 2005b).

Es werden fast ausschließlich Magnetitkerne verwendet, um die magnetischen Eigenschaften des Trägers zu erhalten. Diese werden meist als Magnetitgel (Chatterjee et al, 2003, Shen et al, 1999) verwendet und mittels Suspensions- oder Emulsionspolymerisationen in die Polymermatrix eingeschlossen (Sajjadi und Jahanzad, 2006, Georgiadou und Brooks, 2006 und 2005, Liu et al, 2005a, Xue und Sun, 2002, Gomez-Lopera et al, 2001, Arias et al, 2001). Selten werden reine Metallpartikel (Gupta et al, 2005, Shinkai, 2002, Carpenter, 2001) verwendet. Die Suspensionspolymerisation erzeugt Polymerpartikel mit einer mittleren Teilchengröße von 1 bis 1000 µm und breiter Größenverteilung. Die Emulsionspolymerisation dagegen erlaubt die Synthese von Partikeln zwischen 10 nm und 10 µm mit einer engen Größenverteilung (Arshady, 1992).

Zur Herstellung magnetischer Polymerträger wird oft Magnetit verwendet, dies ist ein inverser Spinel, der auch Magneteisenstein genannt wird und eine schwarze Farbe besitzt ( $\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{Fe}^{\text{II}}\text{O} \cdot \text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_3$ , kubisch dichteste Kugelpackung:  $\text{O}^{2-}$ , 1/8 Tetraederlücken:  $\text{Fe}^{3+}$ , 1/4 Oktaederlücken: Je  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ). Magnetit kristallisiert in kubischer Struktur (Schwertmann und Cornell, 2000). Magnetit ist ferrimagnetisch für  $T < T_C$  (Curie – Temperatur) und paramagnetisch für  $T > T_C$  ( $T_C$  beträgt 850 K). Die magnetische Sättigung  $M_S$  beträgt für Magnetitkristalle 92 bis 100  $\text{Am}^2/\text{kg}$ . Für  $T < T_C$  liegt folgende Spinausrichtung vor:  $[\text{Fe}^{3+}\downarrow]_{\text{TL}}[\text{Fe}^{3+}\uparrow\text{Fe}^{2+}\uparrow]_{\text{OL}}\text{O}_4$ . Kleine Partikel ( $\sim 10$  nm) sind für  $T < T_C$  superparamagnetisch (Cornell und Schwertmann, 1996). Er ist thermodynamisch instabil an der Luft und gerade kleinere Partikel (< 100 nm) oxidieren durch Luftsauerstoff bereits bei der Synthese oder der späteren Lagerung. Bei diesem Prozess entsteht dabei überwiegend Maghemit.

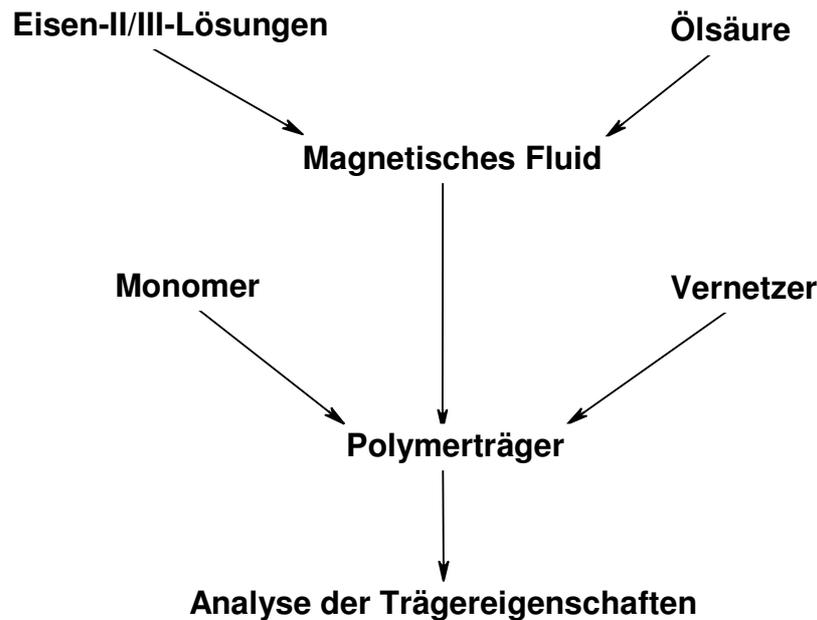
Maghemit ( $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3 = \text{Fe}^{\text{III}}_{2.66}\square_{0.33}\text{O}^{-\text{II}}_4$ ), der rein eine hellbraune-rötliche Färbung aufweist, wird oft als vollständig oxidiertes Magnetit bezeichnet, da die  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Fe}^{3+}$ -Ionen oxidiert werden. Dabei wird 11% des Eisengehaltes aus der Struktur durch Lücken ersetzt und somit die kubische Struktur erhalten. Die Umwandlung von Magnetit ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$ ) zu Maghemit ( $\text{Fe}^{\text{III}}_{2.66}\square_{0.33}\text{O}^{-\text{II}}_4$ ) erfolgt schleichend, das heißt ohne Übergangstemperatur durch Oxidation bei Raumtemperatur bereits durch Luftsauerstoff (Schwertmann und Cornell, 2000). Maghemit ist ferrimagnetisch für  $T < T_C$  und paramagnetisch für  $T > T_C$  ( $T_C$  beträgt 820 bis 986 K, ist jedoch nicht eindeutig zu bestimmen, da Maghemit ab 713 K zu Hämatit ( $\alpha - \text{Fe}_2\text{O}_3$ , rotbraun, antiferromagnetisch) reagiert). Die magnetische Sättigung  $M_S$  beträgt für Maghemitkristalle unter 20 nm 60 bis 80  $\text{Am}^2/\text{kg}$ . Kleine Partikel ( $\sim 10$  nm) sind für  $T < T_C$  superparamagnetisch (Cornell und Schwertmann, 1996).

Die Verwendung von magnetischen Polymerpartikeln mit kleinen Magnetit- oder Maghemitkernen ( $< 10$  nm) erzeugt superparamagnetische Träger. Diese sind nur magnetisch, wenn ein externes Feld anliegt (Cornell und Schwertmann, 1996). Dies erleichtert die spätere Resuspendierung. Unterschreitet die Partikelgröße den Mikrometerbereich, so ist eine magnetische Separierung nicht mehr möglich. Obwohl diese Grenze im Nanometerbereich liegt, werden diese dennoch gerne als Träger verwendet (Peng et al, 2005, Arias et al, 2001), da diese eine sehr große spezifische Oberfläche besitzen, obwohl die nutzbare Oberfläche deutlich geringer ist, als die Berechnung unter Annahme idealer Kugelgeometrie erwarten lässt (Franzreb et al, 2006).

Dabei werden nicht nur die Synthesemethoden für die Träger, sondern auch die Reaktoren modifiziert, um bessere Träger zu erhalten (De Lathouder et al, 2004). Die Reaktoren werden oft sowohl im Bezug auf die Eigenschaften der Träger, als auch im Bezug auf die Reaktionsbedingungen der Immobilisierung modifiziert (Balcao et al, 1996). Auch Elektromembranreaktoren, die die Katalyse bei verschiedenen Stromstärken beeinflussen, werden verwendet und erhöhen die Umsetzungsrate des Substrates zum Produkt, katalysiert durch ein Enzym, deutlich (Pribyl et al, 2003, Zadrazil et al, 2003).

## 2.2. Übersicht

Für die Immobilisierung des Enzyms wurden magnetische Polymerpartikel synthetisiert, deren mittlere Partikelgröße im Bereich weniger Mikrometer liegt. Dazu war die Synthese eines magnetischen Fluids für die anschließende Polymersynthese notwendig (vgl. Abb.3).



**Abb.3:** Übersicht zu Kapitel 2.

Die Eigenschaften der Polymerpartikel wurden analysiert, um ihre Eignung als Träger für immobilisierte Enzyme zu bestimmen.

## 2.3. Material und Methoden

Der erste Schritt zur Darstellung von magnetischen Partikeln ist die Synthese eines magnetischen Fluids, das über superparamagnetische Eigenschaften verfügt. Dies ermöglicht eine Resuspendierung, da die Träger nur so lange magnetisch sind, wie ein externes Magnetfeld anliegt. Das magnetische Fluid wird mittels einer Suspensionspolymerisation umschlossen und es ergeben sich auf Grund der Reaktionsbedingungen sphärische Partikel im Mikrometerbereich. Diese besitzen eine ausreichende Abriebfestigkeit und magnetische Sättigung, die für die mehrmalige Verwendung in der Magnetseparation nötig ist. Die Analyse der Trägereigenschaften umfasste die Bestimmung der Dichte, der magnetische Sättigung, des mittlerer Teilchendurchmesser, der Morphologie, der spezifische Oberfläche und des Zetapotentials.

### 2.3.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

Folgende Geräte und Chemikalien wurden für die Synthese des magnetischen Fluids, die Synthese der Polymerpartikel und die Analytik eingesetzt:

## Verwendete Geräte

- Adsorptionsmessung:  
Autosorb – 1 (Quantachrome GmbH, Odelzhausen, Deutschland)
- Dichtebestimmung:  
Glaspygrometer aus Borosilikatglas, 50 ml Volumen (Blaubrand von Brand, Wertheim, Deutschland)
- ESEM-Bilderzeugung:  
ESEM XL 30 FEG-Environmental Scanning Electron Microscope (Philips, Niederlande)
- Filtermedium zur Wägung:  
Cellulose Nitrat Filter, 0,45 µm (Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Deutschland)
- Filtermedium zur Wägung:  
Polyethersulfone Filter, 0.45 µm (PAL Gelman Lab, PAL Corporation, USA)
- Gefriertrocknung:  
Gefriertrocknungsanlage BETA 1-8 K (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)
- Magnetische Sättigungs-Messungen:  
AGM Type Micromag 2900 Fa-Magnetometer (Princeton Industrial Corporation, USA)
- Magnetseparation:  
Permanentmagnet (Nd-Fe-B), 48 mm \* 28 mm \* 15 mm, 850 mT (Steinert Elektromagnetbau GmbH, Deutschland)
- Partikelgrößenbestimmung:  
Particle Sizer Cis 100-Größenmeßgerät / Laserlichtabschattung (Galai, USA)
- Reaktionsführung, Schüttler:  
Kompaktschüttler KS 15A (Edmund Büchler GmbH, Deutschland)
- Reaktionsführung, Schüttler und Heizer:  
Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Deutschland)
- Reinstwassererzeugung:  
Milli-Q Plus Ultra Pure-Reinstwasseranlage (Millipore Corporation, USA)
- Ultraschallbehandlung:  
Ultraschall-Reinigungsgerät RK100H-beheizbares Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland)
- UV-Messungen:  
Shimadzu UV 1202-Spektrometer (Shimadzu, Japan)

- UV-Messung, Küvette:  
Quarzpräzisionsküvette Suprasil, 2.00 mm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, Deutschland)
- Wägung:  
Adventurer Balance (Ohaus Corporation, USA)
- Zentrifugation:  
5415 D-Eppendorf Zentrifuge (Eppendorf AG, Deutschland)
- Zetapotentialbestimmung:  
ZetaSizer 5000-Zetapotentialmeßgerät (Malvern Instruments Ltd., Britannien)  
Automatic titration stand Mettler DL 21: Titrator (Mettler Toledo, Schweiz)

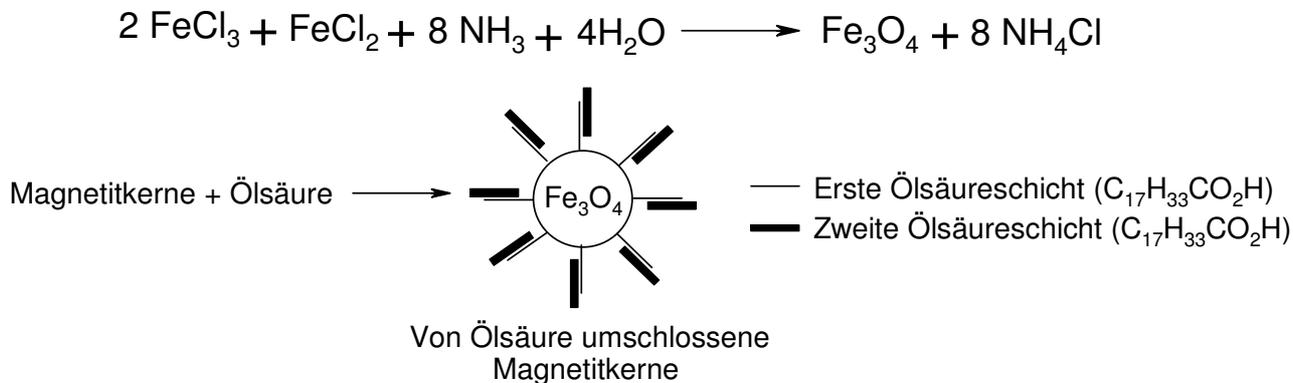
### Verwendete Chemikalien

- Acros Organics, Fischer Scientific GmbH, Deutschland:  
Poly(vinylalkohol) (MW 22000 g/mol, Hydrolysegrad der Acetatgruppen: 88)
  - Iris Biotech GmbH (95615 Marktredwitz, Deutschland)  
Diisopropylcarbodiimid (reinst), 1-Hydroxybenzotriazol (reinst), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0.]undec-7en (reinst)
  - Merck, Deutschland:  
Aceton (reinst), Ammoniaklösung (25%, reinst), Benzoylperoxid (zur Synthese), Dimethylformamid (zur Analyse, wasserfrei), Divinylbenzen (55% technische Isomerenmischung), Eisen(II)-chlorid Tetrahydrat (reinst), Eisen(III)-chlorid wasserfrei (zur Synthese), Ethanol (absolut, zur Analyse), n-Hexan (reinst), Kaliumcyanid (zur Analyse), Methylacrylat, Natriumazid (zur Synthese), Natriumchlorid (reinst), Ninhydrin (zur Analyse), Ölsäure (extra rein), Piperidin (zur Analyse), Phenol (zur Synthese), Pyridin (zur Analyse), Stickstoff (5.0)
  - Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:  
Methylenblau (0.05% w/v), Vinylacetat (99%, GC)
- Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Qualität, es wurde stets Reinstwasser verwendet

### 2.3.2. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des magnetischen Fluids

Das Magnetitgel besteht aus Magnetitkernen, sowie einem Ölsäurecoating, das dem Magnetitgel hydrophoben Charakter verleiht. Damit das Magnetitgel in der Polymerisation

verwendet werden kann, muss sowohl die Reaktion der Eisensalze zu Magnetit gelingen, als auch die Bindung der Ölsäure ausreichend stabil sein (vgl. Abb.4). Das magnetische Fluid sorgt für die magnetischen Eigenschaften der synthetisierten Partikel.



**Abb.4:** Bruttoreaktionsgleichung zur Synthese von Magnetitkernen (oben). Coating der Magnetitkerne mit Ölsäure (unten).

Die von Ölsäure umschlossenen Magnetitkerne sind idealisiert dargestellt. Bisher ist weder der Protonierungsgrad, noch die Anzahl der Ölsäureschichten ausreichend untersucht worden, obwohl man von mehrschichtigen Ölsäureanlagerungen ausgeht.

Es wurden die Reaktionsparameter optimiert:

- Reaktorgefäß: Dreihalskolben (Fassungsvolumen: 2 Liter), Reaktionszylinder mit Strombrechern (drei Zentimeter über dem Gefäßboden, Fassungsvolumen: 2 Liter)
- Rührgeschwindigkeit: 400 bis 1000 U/min
- Temperatur: 80 bis 100 °C
- Reaktionsdauer: 1 bis 1.5 Stunden
- Eisen(II)-chlorid und Eisen(III)-chlorid: Verhältnis 1 : 2, 6.64 bis 20.0 g<sub>Eisen(II)-chlorid</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub> und 18.1 bis 54.6 g<sub>Eisen(III)-chlorid</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Ammoniak-Lösung (25v% in Wasser): 14.6 bis 65.4 ml<sub>Ammoniak</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Ölsäure: Zugabemenge von 11.5 bis 43.1 ml<sub>Ölsäure</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>, Tropfgeschwindigkeit von 0.5 bis 1.7 ml/min.

Zur besseren Untersuchung des Einflusses der Reaktionsparameter auf die Reaktion wurden die Parameter systematisch verändert.

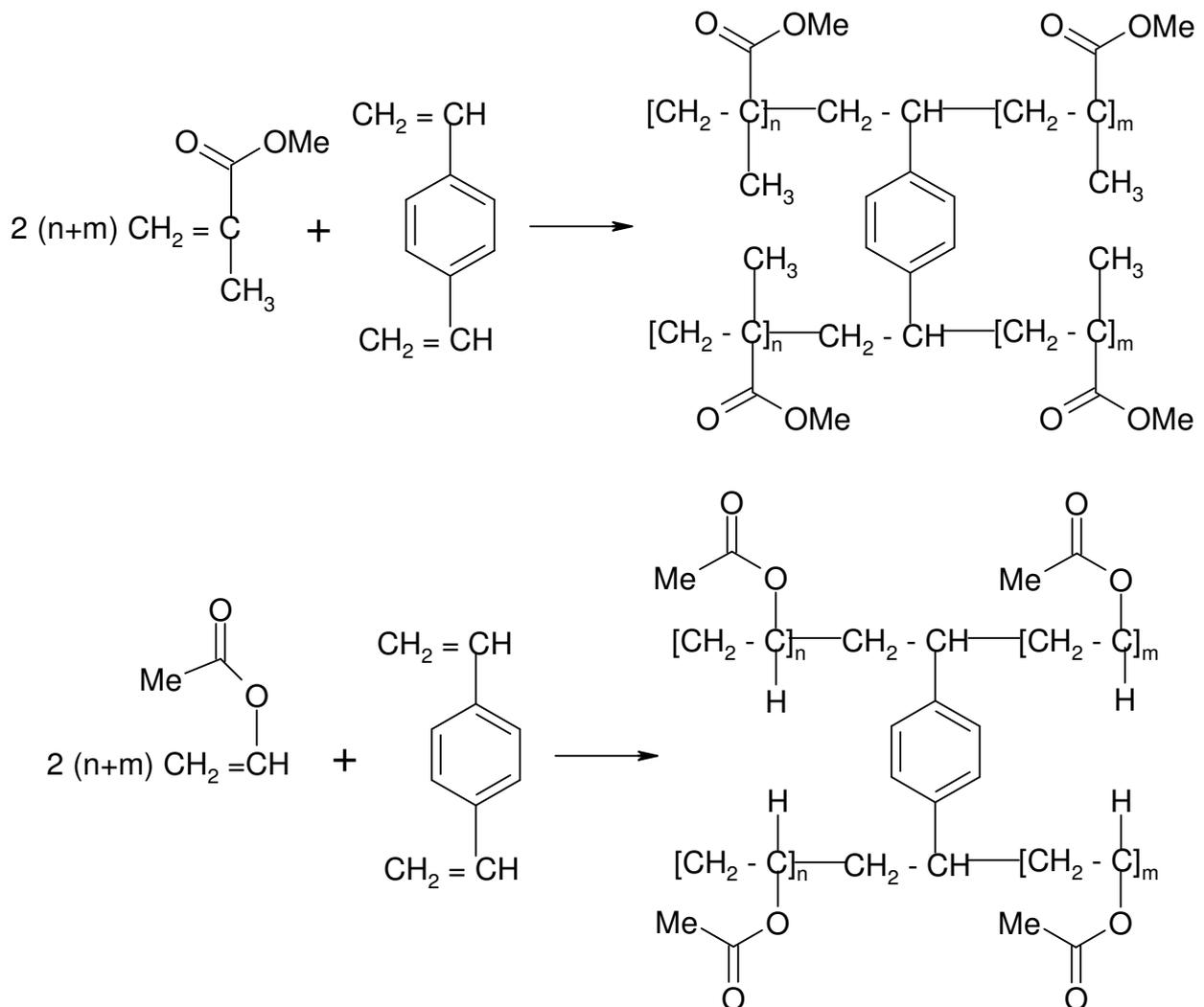
### Reaktionsvorschrift

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden in einem Vierhalsreaktor bei 700 U/min 17.2 g Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat und 28.2 g Eisen(III)-chlorid in 1200 ml Wasser gelöst, filtriert und auf 85 °C erhitzt. Anschließend erfolgte die schnelle Zugabe von 56.0 ml Ammoniak-

Lösung (25% in H<sub>2</sub>O). Danach sind tropfenweise (0.8 ml/min) 30.0 ml Ölsäure als Coating zugegeben worden. Die gesamte Reaktion dauert eine Stunde. Gründliches Waschen der abgekühlten Suspension ermöglichte die Lagerung des magnetischen Fluids ohne Beeinträchtigungen. Dieses sollte eine „schmierige schwarze, metallisch glänzende Masse“ sein.

### 2.3.3. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift Polymerpartikel-Synthese

Durch die Polymerisation wurde das magnetische Fluid mit einem vernetzten Polymer umhüllt, wodurch runde Polymer-Mikropartikel entstanden. Diese sind im Gegensatz zum magnetischen Fluid chemisch stabil und stellen zugleich funktionelle Gruppen zur weiteren chemischen Modifizierung zur Verfügung. Es wurden sowohl Polymethylacrylat-Partikel (PmaP), als auch Polyvinylacetat-Partikel (PvacP) synthetisiert (vgl. Abb.5).



**Abb.5:** Copolymerisation des Monomers Methylacrylat zu Polymethylacrylat (oben) und Vinylacetat zu Polyvinylacetat (unten), jeweils mit Divinylbenzen vernetzt.

Dabei wurde jeweils Divinylbenzen (DVB) als Vernetzer, Polyvinylalkohol (PVA) als Tensid und Dibenzoylperoxid (BPO) als Initiator verwendet. Um die Polymerisation in der wässrigen Phase zu verhindern wurde Methylenblau als Inhibitor verwendet und Natriumchlorid verringerte die Löslichkeit des Monomers in der wässrigen Phase. Da das Magnetitgel in keinem der beiden Monomere löslich war, wurde Hexan als Hilfslösungsmittel verwendet. Da die Polymerisation bei 80 °C gestartet wurde und Hexan einen Siedepunkt von 69 °C besitzt, wurde die Polymerisation dadurch nicht beeinflusst. Durch die Suspensionspolymerisation werden sphärische Partikel von 1 bis 1000 µm erzeugt (Arshady, 1992).

Damit das Magnetitgel während der Polymerisation umschlossen werden kann, muss es in stabiler Suspension vorliegen, dazu waren einige Vorversuche notwendig:

- Magnetitgel in Monomer (Methylacrylat / Vinylacetat, 0.11 bis 0.27 g<sub>Magnetitgel</sub>/ml<sub>Monomer</sub>)
- Lösungsversuche mit Hexan (0.35 bis 0.54 g<sub>Magnetitgel</sub>/ml<sub>Hexan</sub>) – auch in unterschiedlicher Reihenfolge von Magnetitgel, Monomer und Hexan als Hilfslösungsmittel

Zusätzlich wurde untersucht, ob eine stabile Suspension von Magnetit in Hexan gebildet werden kann. Dafür wurden 10 g Magnetitgel in 50 mL Hexan suspendiert und ohne Rühren wurden in definierten Zeitabständen (0 s, 30 s, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min, 360 min) Proben entnommen, deren Magnetitgehalt überprüft wurde.

Es wurde auch die Löslichkeit von 1 g Dibenzoylperoxid in je 10 ml verschiedener Lösungsmittel (Dichlormethan, Vinylacetat, Wasser, Aceton, Hexan, <sup>t</sup>Butylmethylether, Tetrachlorkohlenstoff, Butanol, Dichlormethan) untersucht.

Zusätzlich wurden die Reaktionsparameter verändert, damit mechanisch stabile Partikel mit möglichst kleinem Durchmesser entstehen:

- Reaktionsgefäß: Reaktionszylinder mit Strombrechern (Fassungsvolumen: 2 Liter)
- Rührgeschwindigkeit: 500 bis 800 U/min
- Temperatur: 80 bis 100 °C
- Reaktionsdauer: 4 bis 5 Stunden
- Polyvinylalkohol: Unverändert 20.8 g<sub>PVA</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Natriumchlorid: 30.8 bis 39.2 g<sub>NaCl</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Magnetitgel: 7.69 bis 13.1 g<sub>Magnetitgel</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>, in 30.0 bis 100 ml<sub>Hexan</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub> Hexan gelöst
- Methylenblau: 0.77 bis 2.31 ml<sub>Methylenblau</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Monomerkonzentration: 53.8 bis 85.4 ml<sub>Monomer</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>

- Divinylbenzen: 1.23 bis 8.46 ml<sub>Divinylbenzen</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>
- Dibenzoylperoxid: 1.15 bis 3.92 g<sub>Dibenzoylperoxid</sub>/l<sub>Reaktionsvolumen</sub>

Um die Auswirkungen auf die Synthese zu untersuchen wurden mehrere Reaktionsparameter modifiziert.

### Reaktionsvorschrift

Unter einer Stickstoffschutzgasatmosphäre wurde in einem Vierhalsreaktor bei 800 U/min 25 g gelöstes Natriumchlorid und 25 g gelöster Polyvinylalkohol in 1000 ml Wasser vorgelegt und auf 60 °C erhitzt, wonach 1 ml Methylenblau hinzugegeben wurde. 2 g Benzoylperoxid sind zu 20 g magnetischen Fluid in 80 ml n-Hexan, gelöst und dem Reaktionsmedium zugeführt worden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml Divinylbenzen und 95 ml Methylacrylat/Vinylacetat. Die Polymerisation wurde über 4 h bei 85 °C durchgeführt. Die Partikel sind gründlich mit Wasser gewaschen und separiert worden: Die Partikel sedimentierten im Reaktionsgefäß 5 min, bevor sie vorsichtig dekantiert wurden. Diese Prozedur wurde so lange wiederholt, bis keine Partikel mehr überführt werden konnten. Auf diese Weise blieben die größeren Agglomerate im Reaktionsgefäß zurück und wurden verworfen.

Die Lagerung der Partikel erfolgte in Wasser mit Natriumazid (0.1 g<sub>Natriumazid</sub>/l<sub>Gesamtvolumen</sub>), um mikrobiellen Befall zu vermindern.

#### 2.3.4. Versuche zur Stabilität der Polymerpartikel in verschiedenen Lösungsmitteln

Damit die Partikel in der organischen Synthese verwendet werden können, vor allem im Bezug auf die folgenden Spacerversuche, wurde die Stabilität in einigen organischen Lösungsmitteln und Reagenzien untersucht:

Ethanol-Wasser-Mischung (70v% Ethanol), Ethanol, Tetrahydrofuran, Toluol, Aceton, Dimethylformamid, Piperidin, Pyridin, Diisopropylcarbodiimid, 1-Hydroxybenzotriazol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, Phenol, Diisopropylcarbodiimid und Dimethylformamid (1 : 1 – Volumenverhältnis), Ninhydrin in Ethanol (50 g<sub>Ninhydrin-5%-w/v/l</sub>), Phenol in Ethanol (800 g<sub>Phenol-80%-w/v/l</sub>), Kaliumcyanid in Pyridin (2 ml KCN<sub>0.001M</sub> (wässrig) in 98 ml Pyridin), Piperidin in Dimethylformamid (20v%), 5v% Trifluoressigsäure in Wasser und Dimethylformamid.

Zusätzlich wurde das Agglomerationsverhalten der Partikel unter verschiedenen Lagerbedingungen, die für Polymerpartikel üblich sind, untersucht. Dafür wurden je 3 g Partikel in je 100 ml unter verschiedenen Bedingungen suspendiert:

- Wasser, Ethanol (70v% in Wasser), Aceton – jeweils bei Raumtemperatur
- Verschiedene Puffer: Acetatpuffer (0.1 M, pH 5.00), Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5), Bicarbonatpuffer (0.2 M, pH 10.0)
- Bei 4°C in Wasser
- Bei Raumtemperatur unter stetigem Schütteln (1 Hz)

Dabei wurden alle zwei Wochen Proben entnommen und der mittlere Partikeldurchmesser bestimmt. Nach vier Monaten wurden die Proben zusätzlich mit Ultraschall behandelt und erneut gemessen.

### **2.3.5. Einengung der Partikelgrößenverteilung**

Partikel mit einem mittleren Teilchendurchmesser  $< 5 \mu\text{m}$  verursachen einen geringeren Einfluss auf die Aktivität des immobilisierten Enzyms (Kallenberg et al, 2005). Daher wurde die Partikelgrößenverteilung von Partikelsuspensionen, deren mittlerer Teilchendurchmesser  $> 5 \mu\text{m}$  war, eingengt. Dazu wurde ein spezieller Reaktionszylinder mit vier Hähnen verwendet, um eine genaue Separierung der Partikel zu ermöglichen.

## **2.4. Analytische Methoden**

Die Eigenschaften der Polymerpartikel sind sehr wichtig für die Immobilisierung des Enzyms, da diese sowohl auf die Ausbeute der Immobilisierung, als auch auf die spätere Katalyse von Substraten Einfluss nehmen. Die Trocknung der Partikel erfolgte durch Gefriertrocknung:

### **Gefriertrocknung**

Das Trockengut wurde im Gefrierschrank gefroren und dann in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausgesetzt. Dadurch wird die Probe je nach Menge an Wasser innerhalb von wenigen Stunden, bei größeren Proben über Nacht, getrocknet.

Die Gefriertrocknung eignet sich besonders gut zum Trocknen von leicht zersetzlichen Stoffen, da es sich dabei um eine sehr schonende Methode handelt, die ohne hohe Temperaturen, die die Stoffe zersetzen können, auskommt (Jakubke und Karcher 1999). Das Trockengut wird dabei gefroren in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausgesetzt. Durch das dabei auftretende Dampfdruckgefälle zwischen dem gefrorenen Material und dem Kondensator setzt eine Sublimation des Eises ein.

#### **2.4.1. Dichtebestimmung mittels eines Pygnometers**

Hierfür wurde ein Glaspygnometer verwendet, in das die Partikel als konzentrierte Suspension eingeführt und durch Auffüllen des Pyknometers bis zur Volumenmarkierung verdünnt wurden.

#### **2.4.2. Gravimetrische Bestimmung der Partikelkonzentration**

Auf drei vorher gewogene Filter (Polyethersulfone Filter, 0.45 µm) wurden eine definierte Menge der Partikel in Wasser aufgetragen, filtriert und mit Wasser gewaschen. Dem folgte die Gefriertrocknung und Lagerung über Nacht im Exsikkator. Durch die Differenzwägung am nächsten Tag wurde die Partikelkonzentration (mg/ml) der Suspension bestimmt.

#### **2.4.3. Messung der magnetische Suszeptibilität**

Um die Eigenschaften der Partikel nicht zu verändern wurden diese gefriergetrocknet und mittels eines Magnetometers die magnetische Suszeptibilität bestimmt.

Bei dem alternierenden Gradient Magnetometer (kurz AGM) wird die Probe in einem statischen Magnetfeld magnetisiert und gleichzeitig von einem alternierenden Magnetfeld überlagert. Der dadurch entstehende Feldgradient erzeugt eine wechselnde Kraft auf die Probe, wobei die Größe des Feldgradienten proportional zum magnetischen Moment der Probe ist. Die dadurch entstehende Auslenkung der Probe, wird über den Probenhalter auf ein piezoelektrisches Element übertragen. Das piezoelektrische Element erzeugt eine Spannung, die proportional zu der auf die Probe wirkende Kraft ist. Synchron zur erzeugten Amplitude wird am Ausgang des piezoelektrischen Elements die Frequenz des Feldgradienten aufgenommen und über die Kurve gelegt. Die daraus entstehende Spannungsamplitude ist proportional zum magnetischen Moment der Probe. Die Kalibrierung des Magnetometers erfolgt durch einen Nickelstandard.

Die Proben wurden gewogen und die magnetische Sättigung  $M_s$  ( $[M_s] = \text{Am}^2/\text{kg}$ ) mittels eines Magnetometers bestimmt. Von den Proben sind jeweils drei Messungen durchgeführt worden.

#### **2.4.4. Messung der Partikelgröße, Größenverteilung und Bestimmung der Morphologie**

Für die Bestimmung der Größenverteilung wurden die Proben mit dem Größenmeßgerät Partikel Sizer CIS 100 durch Laserlichtabschattung vermessen. Die Größe der einzelnen

Partikel, sowie deren Oberflächenbeschaffung wurde visuell aus den Bildern des Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM) ermittelt. Hierfür wurde die Partikelsuspension auf einen Filter aufgetragen, getrocknet und anschließend mit dem ESEM untersucht.

#### 2.4.5. Messung der Spezifische Oberfläche durch Adsorptionsmessung (BET – Isotherme)

Die BET-Isotherme stellt die am weitesten verbreitete Darstellung für die Mehrschichtadsorption dar. Sie steigt mit zunehmendem Druck immer weiter an, da es keine Begrenzung für die Menge an adsorbierbarem Material gibt.

Für unreaktive Gase ( $N_2$ ) auf polaren Oberflächen gilt die vereinfachte Gleichung (vgl. Abb.6).

$$\frac{V}{V_{Mono}} = \frac{1}{1 - z}, z = \frac{p}{p^*}$$

**Abb.6:** Gleichung für die Mehrschichtadsorption unreaktiver Gase an polaren Oberflächen.  $p$ : Druck,  $p^*$ : Dampfdruck,  $V_{Mono}$ : Adsorbiertes Gasvolumen der Monolage.

Die BET-Isotherme stimmt nur bei Drücken im mittlerem Druckbereich ( $\sim 0.1$  bis  $\sim 30$  kPa) mit den experimentellen Daten überein. Bei kleineren Drücken liegt die Adsorption über dem berechneten Wert, bei größeren Drücken hingegen liegt die Adsorption unter dem berechneten Wert (Atkins 1996). In dieser Arbeit wurde die spezifische Oberfläche durch sieben Adsorptionsmesspunkte nach der BET – Methode bestimmt.

Die Adsorptionsdaten (unter Verwendung von Stickstoffgas) wurden mit dem Autosorb – 1 gemessen. Die Partikel wurden durch Gefriertrocknung getrocknet und die spezifische Oberfläche gemessen, nachdem die Proben durch Erhitzen auf  $60^\circ C$  im Vakuum für 12 h entgast worden waren.

#### 2.4.6. Messung des Zetapotentials

Das Zetapotential wird auch elektrokinetisches Potential genannt, es ist das Potential, dass beim Anlegen eines elektrischen Feldes an ein Zweiphasensystem (fest / flüssig) an der Scherebene zwischen beweglicher und unbeweglicher Phase auftritt. Das Zetapotential von Kolloiden kann durch mikroskopische Beobachtung der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld gemessen werden. Es ist kleiner als das Oberflächenpotential und gleich oder kleiner als das Sternpotential. Das Zetapotential ist ein Maß für die Stabilität von elektrostatisch stabilisierten kolloiden Dispersionen (Jakubke und Karcher, 1999). Direkt an der Oberfläche des Teilchens liegt eine praktisch unbewegliche Schicht von lo-

nen (elektrische Ladungen einzelner Teilchen an der Oberfläche), der Radius dieser festen Schicht wird als Scherradius bezeichnet und er ist entscheidend für die Beweglichkeit der Teilchen. Das elektrische Potential an der Oberfläche dieser Kugel relativ zum Potential im Inneren des Lösungsmittels bezeichnet man als Zetapotential  $\xi$  ( $[\xi] = \text{mV}$ ). Um diese erste Ladungsschicht lagert sich eine bewegliche, diffusere Atmosphäre von Gegenionen aus dem Lösungsmittel an. Dies ist eine der wesentlichen Ursachen der kinetischen Stabilisierung von Kolloiden. Die innere und äußere Schicht von Ladungsträgern werden zusammen als elektrische Doppelschicht bezeichnet (Atkins, 1996).

Die elektrische Ladung auf einer Oberfläche kann im Prinzip durch isomorphe Substitution im Kristallgitter oder durch eine chemische Reaktion an der Oberfläche verursacht werden. Im zweiten Fall ist die Ladung von der Zusammensetzung der Lösung und den an der Oberfläche ablaufenden Reaktionen abhängig. In der Nähe elektrisch geladener Oberflächen wird eine Gegenladung in der Lösung aufgebaut; Wassermoleküle orientieren sich entsprechend der Dipolladung. Verschiedene Modelle beschreiben diese elektrische Doppelschicht in Bezug auf ihre Struktur und auf den Zusammenhang zwischen Ladung und Potential. Ein einfaches Modell geht von der konstanten Kapazität aus. Es wird angenommen, dass sich die Ionen mit einer der Oberflächenladung entgegengesetzter Ladung in einer starren Schicht in einem bestimmten Abstand von der Oberfläche befinden. Das Gouy-Chapman-Modell berücksichtigt die elektrischen Kräfte und die thermische Bewegung, um die Verteilung der Gegenionen in der Nähe der Oberfläche zu beschreiben. Es resultiert eine diffuse Verteilung der Gegenionen in der Doppelschicht (Sigg und Stumm, 1994).

Das Zetapotential der synthetisierten Teilchen (Größe im Bereich von wenigen Mikrometern) wurden mit einem Zetasizer (5 mW He-Ne-Laser, Messung bei 633 nm, ZET 5104 Kapillarzelle, PD Mikroelektroden, Betriebstemperatur  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) gemessen. Die Abhängigkeit des Zetapotentials vom pH-Wert wurde mit einem automatischen Titrator bestimmt, der durch eine Pumpe mit der Kapillarzelle des Zetasizers verbunden ist. Die Dispersion wurde mit 0.05 M NaOH oder 0.05 M HNO<sub>3</sub> eingestellt und dann in den sauren beziehungsweise alkalischen Bereich titriert. Zumeist wurde die Analyse auf Grund der Empfindlichkeit der Polymerpartikel bei  $\text{pH} \geq 3.5$  von hohen pH-Werten zu niedrigen pH-Werten durchgeführt.

### 2.4.7. Überprüfung des Reinheitsgrades des Überstandes durch UV-Messungen

Die Polymerpartikel wurden in einer rein wässrigen Suspension gelagert. Um zu Bestimmen, ob die Waschüberstände noch Reste an Monomer oder kurzkettige Polymere enthalten, wurden diese mit einer UV-VIS-Messung überprüft. Erst nachdem das UV-VIS-Spektrum keinerlei Monomer mehr anzeigte, wurde die Waschung eingestellt.

Die Messung wurde in einer Quarzküvette gegen Wasser als Referenz durchgeführt.

## 2.5. Ergebnisse und Diskussion

Die Verbesserung der Eigenschaften der Polymerpartikel wurde auf zwei Wege erzielt: Zum einen wurden die Synthesevorschriften optimiert und zum anderen wurde die Partikelsuspension nachträglich verändert.

### 2.5.1. Optimierung des magnetischen Fluids

Ein geeignetes Magnetitgel ist unerlässlich für die Herstellung von magnetischen Polymerpartikeln, da sonst die Umhüllung während der Polymerisation nicht oder nur teilweise stattfindet. Dazu muss das Magnetitgel vollständig in eine stabile Suspension überführt werden (vgl. 2.5.2.).

Ebenfalls wurde die Reaktionstemperatur modifiziert, um die Reaktionsdauer der Reaktion zu verkürzen und die Partikeleigenschaften zu verbessern. Zudem zeigte sich, dass die Beschaffenheit des Magnetitgels von der Reaktionstemperatur abhängt. Eine hohe Rührgeschwindigkeit sorgt für eine bessere Durchmischung, die für die schnelle Verteilung der zugegebenen Ammoniaklösung und Ölsäure bedeutend ist. Die Menge an Ammoniaklösung beeinflusst den Protonierungsgrad der Ölsäure und verändert damit die Hydrophobie des Magnetitgels. Sowohl die Menge an zugegebener Ölsäure, wie auch deren Zutropfgeschwindigkeit hatten erheblichen Einfluss auf die Eigenschaften des Magnetitgels (vgl. Tab.1).

Modifizierter Parameter	Variation	Bemerkung
Rührgeschwindigkeit	400 bis 1000 U/min	> 950 U/min löst sich die Ölsäure ab
Temperatur	80 bis 100 °C	> 90 °C löst sich die Ölsäure ab
Ammoniakkonzentration	21.5 bis 46.2 ml/l	> 44.6 ml/l reduziert die Ausbeute
Ölsäurekonzentration	13.8 bis 29.9 ml/l	< 20.0 ml/l misslingt die Partikelgröße > 25.4 ml/l verbleibt Ölsäure im Reaktionsmedium
Dosiergeschwindigkeit (Ölsäure)	0.6 bis 30 ml/min	Keine Veränderung
Rührgeschwindigkeit	400 U/min	Stark verminderte Ausbeute: 62% Die Ammoniakkonzentration und die Ölsäurekonzentration sind zu niedrig. Das Magnetitgel ließ sich ohne Verluste der Öl-
Temperatur	85 °C	
Ammoniakkonzentration	21.5 ml/l	
Ölsäurekonzentration	13.8 ml/l	

Ölsäure-Dosiergeschwindigkeit	0.8 ml/min	säure waschen.
Rührgeschwindigkeit Temperatur Ammoniakkonzentration Ölsäurekonzentration Ölsäure-Dosiergeschwindigkeit	650 U/min 85 °C 32.3 ml/l 17.7 ml/l 0.9 ml/min	Etwas verbesserte Ausbeute: 66% Die Erhöhung der Ammoniak – und Ölsäurekonzentration, sowie der Rührgeschwindigkeit verbesserte das Magnetitgel, dieses musste vorsichtig gewaschen werden, da die Ölsäure sich leichter als normal löste.
Rührgeschwindigkeit Temperatur Ammoniakkonzentration Ölsäurekonzentration Ölsäure-Dosiergeschwindigkeit	650 U/min 85 °C 43.1 ml/l 23.1 ml/l 0.8 ml/min	Leicht verminderte Ausbeute: 85% Das Magnetitgel ist optimal einsetzbar, weder löst sich Ölsäure beim Waschen, noch ist die Suspendierbarkeit in Hexan war vermindert.
Rührgeschwindigkeit Temperatur Ammoniakkonzentration Ölsäurekonzentration Ölsäure-Dosiergeschwindigkeit	700 U/min 85 °C 43.1 ml/l 23.1 ml/l 0.8 ml/min	Ausbeute: 90% Höhere Ausbeute durch Erhöhung der Rührgeschwindigkeit. Optimale Parameter, das Magnetitgel war stabil (keine Loslösung der Ölsäure) und ließ sich in Hexan sehr gut suspendieren.

**Tab.1:** Auflistung ausgewählter Versuche zur Modifizierung der Magnetitgelsynthese.

Durch die in Tab.1 beschriebene optimale Synthese entsteht eine „schmierige schwarze, metallisch glänzende Masse“, die sich hervorragend in Hexan lösen lässt. Es zeigte sich, dass Veränderungen der Ölsäure-Dosiergeschwindigkeit nur in Kombination mit anderen Parametern eine Wirkung zeigte, wobei die anderen Parameter (vgl. Tab.1) auch einzeln variiert das Ergebnis beeinflussten. Die Ausbeute bezieht sich auf die maximal mögliche Ausbeute von 70 g, die höchste Ausbeute, die in dieser Arbeit erzielt wurde betrug 63.2 g (90%).

Diese Synthesevorschrift ermöglicht es, Magnetitgel der gleichen Beschaffenheit reproduzierbar in hoher Ausbeute darzustellen. Alle anderen Magnetitgelsorten, mit der Beschaffenheit von großen, harten und nicht schmierigen Kugeln bis hin zu einer teerartigen Masse lassen sich nur schlecht oder gar nicht in Hexan lösen und sind somit für die Polymerisation nicht geeignet.

### 2.5.2. Optimierung der Polymerpartikel-Synthese

Die Suspensionspolymerisation ist eine Bezeichnung für ein Verfahren zur Polymerisation von überwiegend wasserunlöslichen Monomeren, die als diskontinuierliche Phase in Form feiner Tröpfchen in einer kontinuierlichen Wasser-Phase unter Rühren verteilt werden. Die Polymerisation wird gestartet durch öl-lösliche, das heißt in den Monomeren gelöste Initiatoren. Die Tröpfchengröße (0,01 bis 0,5 mm) wird über das Verhältnis von kontinuierlicher zu diskontinuierlicher Phase (ca. 2:1 bis 10:1) und die Rührgeschwindigkeit eingestellt. Eine Koagulation der Tröpfchen wird durch zugesetzte Schutzkolloide (Dispergatoren, unter anderem Polyvinylalkohol, Methylcellulose, Gelatine, Tricalciumphosphat) verhindert.

In den einzelnen Monomer-Tröpfchen verläuft die Polymerisation, sie kann als Substanzpolymerisation bei Temperatur von ca. 40 bis 100°C, bei Überdruck auch bei höheren Temperaturen, durchgeführt werden. Vorteile der Suspensionspolymerisation sind niedrige Viskositäten der Reaktionsgemische auch bei hohem Monomer-Umsatz, leichte Abführung der Polymerisationswärme und in der Regel gute Abtrennbarkeit der resultierenden Polymeren (zum Beispiel durch Filtrieren oder Zentrifugieren). Diese fallen in Form feiner Perlen an; daher wird die Suspensionspolymerisation auch als Perlpolymerisation bezeichnet. Nachteilig bei der Suspensionspolymerisation ist, dass erforderliche Hilfsmittel meist nur schwierig abgetrennt werden können. Die Suspensionspolymerisation, die auch als Substanzpolymerisation in kleinen Teilchen betrachtet werden kann, wird technisch in großem Umfang durchgeführt, unter anderem zur Herstellung von S-PVC (Suspensions-PVC) oder Polytetrafluorethylen (Römp-CD-Chemie Lexikon).

Nachdem in den Versuchen verschiedene Konzentrationen (0.2 bis 0.3 g/ml) von Magnetitgel im entsprechenden Monomer suspendiert wurden, zeigte sich, dass dies keine stabile Suspension ergab. Selbst das Filtrat war nur schwach vom Magnetitgel schwarz gefärbt. Daher wurde Hexan als Hilfslösungsmittel verwendet. Dieses Lösungsmittel hat den Vorteil, dass der Siedepunkt 69°C beträgt und somit verdampft, bevor die Polymerisation beginnt.

Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- Magnetitgel in Hexan (0.3 g/ml) ließ sich sehr gut suspendieren → Zugabe von  $9.5 \frac{\text{ml}_{\text{Monomer}}}{\text{g}_{\text{Magnetitgel}}}$  führte zum Ausfallen des Magnetitgels.
- Danach wurde verschieden aussehendes Magnetitgel (von „großen, harten Brocken“ bis hin zur „schmierig schwarzer, metallisch glänzender Masse“) unter denselben Bedingungen suspendiert. Dabei zeigte sich, dass die „schmierig schwarze, metallisch glänzende Masse“ am besten suspendiert werden kann, auch wenn die Suspendierung nicht vollständig war.
- Es zeigte sich auch, dass das Magnetitgel mit Monomer versetzt nicht mehr mit Hexan suspendierbar war. Daraus folgte, dass das Magnetitgel, suspendiert in Hexan, unabhängig vom Monomer zugegeben werden musste.
- Zur Stabilitätsuntersuchung der Suspension wurden anschließend 10 g Magnetitgel in 100 ml Hexan gelöst, in zehn Schritten von 0 bis 360 min je eine Probe entnommen und davon die Masse bestimmt. Die entnommene Masse war über den ganzen Zeitraum hinweg konstant, so dass von einer stabilen Suspension ausgegangen werden kann.

Für diese Versuche war nicht nur die Konzentration an Magnetitgel in Hexan, sondern auch die Gesamtmenge an Hexan von Bedeutung, da dieses bei 69°C verdampft und sich damit Schaum bildet, der durch die Stickstoffbegasung ein Überschäumen der Reaktion und damit ein Scheitern der Polymerisation verursachen kann. Somit wurde darauf geachtet, die Hexanmenge so gering wie möglich zu halten.

Um eine spätere Automatisierung des Prozesses zu erleichtern, wurde der Initiator Dibenzoylperoxid in verschiedenen Lösungsmitteln gelöst und es ergab sich:

- Keine Löslichkeit in Wasser, Aceton, Hexan, Tetrachlorkohlenstoff und Butanol
- Eine geringe Löslichkeit in Vinylacetat, dies führte bei Raumtemperatur und Lichteinfluss zur Polymerisation
- Eine gute Löslichkeit in tert-Butylmethylether und Dichlormethan

Es wird Dichlormethan empfohlen, da es im Gegensatz zu tert-Butylmethylether nicht leicht entzündlich ist. Beide Siedepunkte sind sehr niedrig (40°C für Dichlormethan und 55°C für tert-Butylmethylether), so dass das jeweilige Lösungsmittel vor der eigentlichen Polymerisation verdampft.

Auch die Dibenzoylperoxid-Lösungen in t-Butylmethylether und Dichlormethan sind nicht über einen längeren Zeitraum (länger als zwei Tage) stabil, so dass sie stets frisch angesetzt werden sollten.

### Optimierung der Synthese

Ebenso wurden die Reaktionsparameter der Polymerisation optimiert, um möglichst kleine Partikel mit hoher magnetischer Sättigung bei großer Ausbeute zu erhalten. Wichtig war dabei die Kosten für dieses Verfahren möglichst gering zu halten (vgl. Tab.2).

Modifizierter Parameter	Variation	Bemerkung
Temperatur	80 bis 100°C	> 90°C: Größere Partikel, geringere Ausbeute
Dibenzoylperoxidkonzentration	1.15 und 3.92 g/l	> 1.67 g/l: Größere Partikel, geringere Ausbeute
Magnetitgelkonzentration	8.33 bis 25.0 g/l	> 16.7 g/l: Größere Partikel
Hexanmenge (Magnetitgel-Lösung)	30.0 bis 100 ml	Zunehmende Schaumbildung
Rührgeschwindigkeit Reaktionszeit / Temperatur	600 U/min 3 h / 65°C 20 min / 80°C	Sehr geringe Ausbeute (7%). Die verwendeten Parameter erwiesen sich als nicht praktikabel. Weder die Reagenzien, noch die Reaktionsparameter gaben einen Hinweis auf die optimalen Bedingungen, so dass eine Optimierung dringend erforderlich war.
Dibenzoylperoxidkonzentration Magnetitgel-Hexan-Konzentration Natriumchloridkonzentration Monomerkonzentration Divinylbenzenkonzentration	2.50 g/l 8.3 g/l (35 ml) 41.7 g/l 55.0 ml/l 1.25 ml/l	
Rührgeschwindigkeit Reaktionszeit / Temperatur	700 U/min 1h / 60°C 3 h / 70°C	Bereits gesteigerte Ausbeute (23%). Insbesondere die Steigerung der Rührgeschwindigkeit und der Temperatur erzielten

Dibenzoylperoxidkonzentration Magnetitgelkonzentration (in Hexan) Natriumchloridkonzentration Monomerkonzentration Divinylbenzenkonzentration	1 h / 80 °C 2.50 g/l 9.17 g/l (36 ml) 41.7 g/l 54.2 ml/l 1.25 ml/l	eine höhere Ausbeute. Zudem war die Partikelbeschaffenheit verbessert und die Richtung der Optimierung aufgezeigt.
Rührgeschwindigkeit Reaktionszeit / Temperatur  Dibenzoylperoxidkonzentration Magnetitgelkonzentration (in Hexan) Natriumchloridkonzentration Monomerkonzentration Divinylbenzenkonzentration	700 U/min 1h / 60 °C 3 h / 70 °C 20 min / 85 °C 1.67 g/l 13.3 g/l (30 ml) 20.8 g/l 79.2 ml/l 8.3 ml/l	Verbesserte Ausbeute (28%). Diese wurde durch eine Verminderung der Dibenzoylperoxid- und der Natriumchloridkonzentration, sowie der Erhöhung der Monomer- und Divinylbenzenkonzentration ermöglicht. Eine Verbesserung der magnetischen Sättigung konnte durch eine Erhöhung der Magnetitgelkonzentration erzielt werden.
Rührgeschwindigkeit Temperatur Reaktionszeit Dibenzoylperoxidkonzentration Magnetitgelkonzentration (in Hexan) Natriumchloridkonzentration Monomerkonzentration Divinylbenzenkonzentration	800 U/min 85 °C 4 h 1.67 g/l 16.7 g/l (80 ml) 20.8 g/l 79.2 ml/l 8.3 ml/l	Optimale Reaktion, 41% Ausbeute. Die Ausbeute konnte durch eine Erhöhung der Rührgeschwindigkeit und der Temperatur erreicht werden. Auch eine verbesserte magnetische Sättigung wurde durch eine stabilere Suspension des Magnetitgels in Hexan und durch eine größere Magnetitgelmenge erreicht.

**Tab.2:** Auflistung ausgewählter Versuche zur Modifizierung der Polymerpartikel-Synthese.

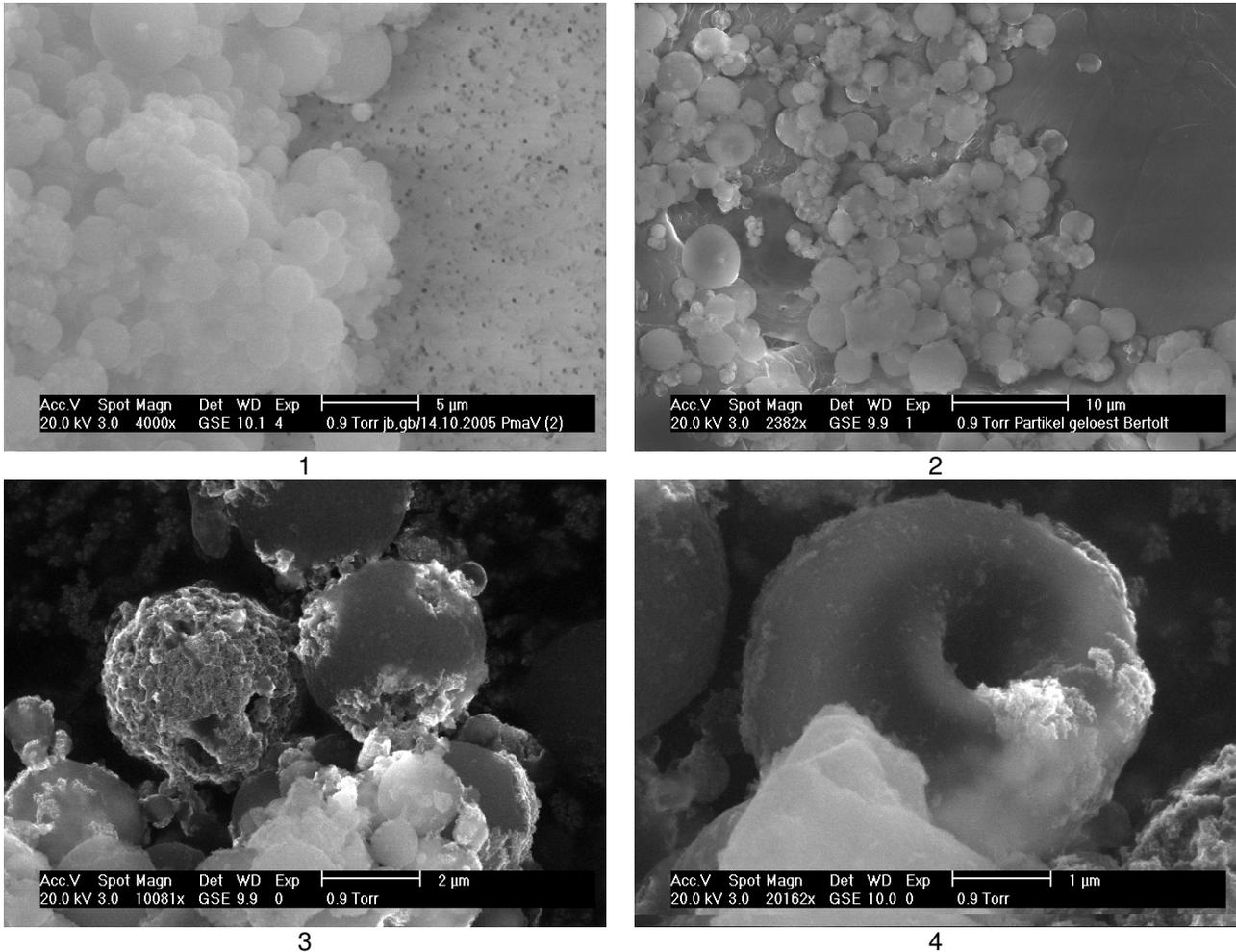
Die optimalen Reaktionsbedingungen erlauben eine reproduzierbare Darstellung von Polymerpartikeln mit ähnlicher Größenverteilung. Auch ist der sich bildende Schaum so gering, dass die Reaktion dadurch nicht gestört wird. Die Ausbeute bezieht sich auf die maximal mögliche Ausbeute von 119 g. Die höchste in dieser Arbeit erzielte Ausbeute betrug 108 g (90%), diese wurde durch die Abtrennung der Polymerpartikel-Aggregate auf 49.0 g reduziert (41%).

### 2.5.3. Versuche zur Stabilität der Polymerpartikel in verschiedenen Lösungsmitteln

Je 1 g Polymerpartikel wurde in verschiedenen Lösungsmitteln suspendiert:

- Die Partikel konnten mit folgenden Reagenzien gewaschen und über Stunden gelagert oder verwendet werden:  
Dimethylformamid, Piperidin, Pyridin, Diisopropylcarbodiimid, 1-Hydroxybenzotriazol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, Phenol, Ethanol und Dimethylformamid (1 : 1 – Volumenverhältnis), Ninhydrin in Ethanol (50 g<sub>Ninhydrin-5%-w/v/l</sub>), Phenol in Ethanol (800 g<sub>Phenol-80%-w/v/l</sub>), Kaliumcyanid in Ethanol (2 ml KCN<sub>0.001M</sub> in 98 ml Pyridin), Piperidin in Dimethylformamid (20v%), Aceton
- In folgenden Lösungsmitteln war eine Lagerung nicht möglich (vgl. Abb.7):
  - Die Ethanol-Wasser-Mischung (70v% Ethanol) führt zu gesteigerter Agglomeration
  - Tetrahydrofuran löst die Polymerhülle teilweise auf und löst Magnetitgel aus den Partikeln, wodurch sich die Partikel verformen

- 5v% Trifluoressigsäure in Wasser oder Dimethylformamid beschädigen die Partikel schwer
- Toluol löst die Polymerhülle der PmaP fast vollständig auf, die PvacP werden durch Toluol nur geringfügig beschädigt



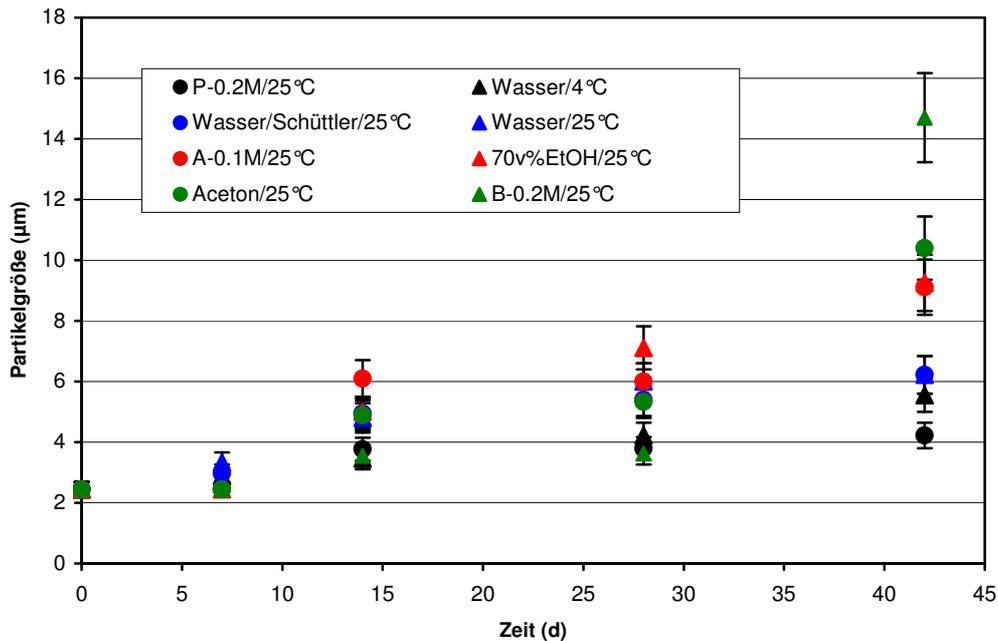
**Abb.7:** Ausgewählte ESEM-Bilder obiger Stabilitätsversuche in diversen Lösungsmitteln: 1) PmaP über 24 h in einer Ethanol-Wasser-Mischung (30v% Ethanol). 2) PmaP über 24 h in Tetrahydrofuran. 3) PmaP über 20 min in einer 5 v% Trifluoressigsäurelösung in Wasser / 4) 5v% Trifluoressigsäure in Dimethylformamid.

Damit zeigt sich, dass die Polymerpartikel zwar sehr stabil sind, dennoch nicht jeden pH-Wert unbeschadet überstehen. Gerade niedrige pH-Werte ( $\text{pH} < 3.5$ ) und gewisse organische Lösungsmittel zersetzen die Partikelhülle. Auch sind oft Kombinationen von organischen Substanzen problematisch, obwohl die einzelnen organischen Reagenzien keinerlei Schaden verursachen. Somit sollte vor jedem Versuch mit Mischungen von organischen Lösungsmitteln die Verträglichkeit kontrolliert werden.

## Agglomeration durch Lagerung

Ein weiteres Problem stellt die Agglomeration der Partikeln dar, die selbst bei geeigneter Lagerung nicht vermieden, sondern nur reduziert werden kann.

Die Agglomeration wurde bei verschiedenen Lagerungsbedingungen untersucht (vgl. Abb.8):



**Abb.8:** Veränderung der Partikelgröße durch Agglomeration während der Lagerung. A bedeutet Acetatpuffer (pH 5), B bedeutet Bicarbonatpuffer (pH 10), P bedeutet Phosphatpuffer (pH 7.5).

Die Lagerung der Partikel in einem Phosphatpuffer (pH 7.5, 0.2 M) verursachte die geringste Agglomeration der Partikel, die Lagerung in Wasser erwies sich als ebenfalls geeignet.

### 2.5.4. Einengung der Partikelgrößenverteilung

Da die Polymerisation im Bezug auf die Polyvinylacetat-Partikel sehr große Partikel mit einer durchschnittlichen Größe von 6 µm lieferte, wurden diese nochmals durch gezielte Separierung so behandelt, dass alle Partikel über 10 µm abgetrennt wurden. Hierfür wurde ein Zylinder mit vier Hälsen verwendet, aus denen nach einer gewissen Sedimentationszeit die Partikel auf unterschiedlicher Höhe des Gefäßes wieder abgelassen werden konnten (vgl. Abb.9).



**Abb.9:** „Vierhalsseparationszylinder“ zur nachträglichen Optimierung der Partikelgrößenverteilung. Da Partikel verschiedener Größe unterschiedlich schnell separieren, konnten mit diesem Hilfsmittel die größeren Partikel abgetrennt werden. Dadurch war es möglich, die mittlere Partikelgröße auf  $3.2 \mu\text{m}$  zu senken (vgl. Größenverteilung der Partikel, Kapitel 2.5.5.), auch wenn dabei 20% der Masse verworfen werden musste.

### 2.5.5. Analytische Messungen

Für die Verwendung der Polymerträger sind folgende Eigenschaften der Partikel von entscheidender Bedeutung: Die Dichte, magnetische Sättigung, Größenverteilung, Morphologie, spezifische Partikeloberfläche und das Zetapotential.

#### Dichtebestimmung mittels eines Pycnometers

Mit Hilfe eines Glaspycnometers wurde eine Dichte von  $1.21 \text{ g/cm}^3$  für die Polymethylacrylat-Partikel und  $1.32 \text{ g/cm}^3$  für die Polyvinylacetat-Partikel gemessen. Beide Werte sind größer als die Dichte von Wasser, dies ist für die Separierung sehr wichtig, auch aus dem Grund, dass auf dem Wasser schwimmende Partikel der Oberflächenspannung des Wasser zur Luft unterliegen und dadurch deutlich schwieriger zu separieren wären. Dennoch lassen sich die Partikel ohne größeren Aufwand in wässrigen Medien resuspendieren.

#### Messung der Magnetischen Sättigung

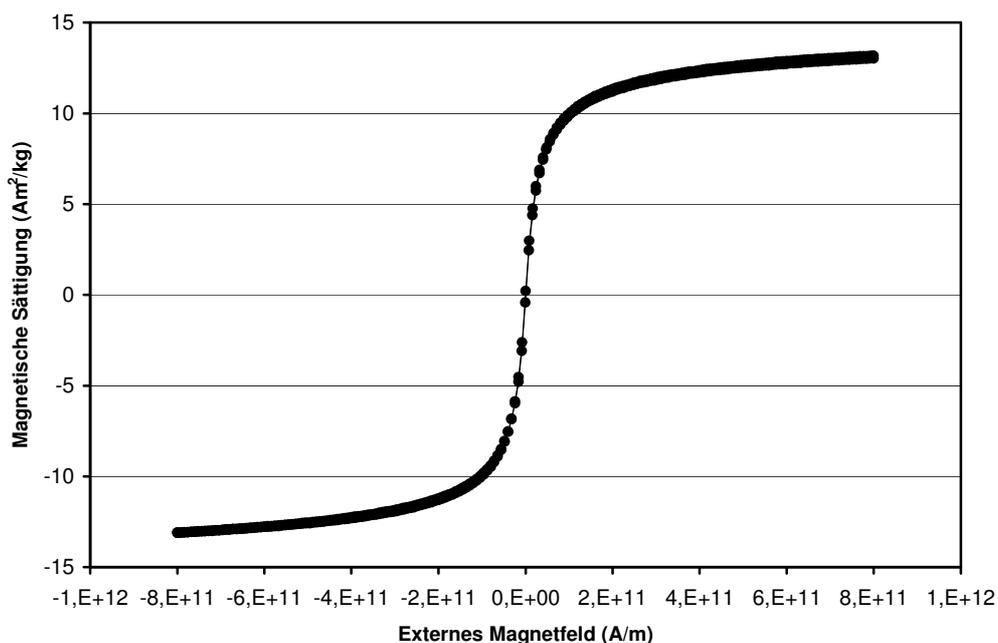
Die magnetische Sättigung  $M_s$  ist von entscheidender Bedeutung für die Handhabung der Partikel, der Automatisierung von Reaktionen in denen diese verwendet werden und der Wiederverwendbarkeit des Enzyms. Sie muss hoch genug sein, um eine vollständige Separierung innerhalb kürzester Zeit (unter einer Minute) zu erlauben. Die magnetische Sättigung ist abhängig von der Größe der Partikel, dem Anteil an magnetischer Substanz in den Partikeln und der Art des magnetischen Materials.

Die magnetische Flussdichte jedes Materials ändert sich, sobald dieses in den Wirkungsbereich eines Magnetfeldes eintritt, da die Elektronen dabei mit dem Magnetfeld in Wechselwirkung treten. Die Änderung der magnetischen Flussdichte ist spezifisch für die jeweilige Substanz. Folgende unterschiedliche Arten des Magnetismus werden unterschieden (Stöcker 1998):

- **Diamagnetismus:**  
Dies ist eine Eigenschaft aller Stoffe und kann, da sie im Vergleich zu den anderen Arten des Magnetismus sehr schwach ist, nur beobachtet werden, wenn sie alleine auftritt. Eine diamagnetische Substanz wird in Bereiche geringer magnetischer Feldstärke abgedrängt.
- **Paramagnetismus:**  
Paramagnetismus liegt vor, wenn unkompenzierte magnetische Momente bei Elektronen auftreten. Dies ist der Fall, wenn die Elektronenschalen der Atome nicht vollständig aufgefüllt sind. Im Magnetfeld werden die ursprünglich willkürlich orientierten magnetischen Momente ausgerichtet. Eine paramagnetische Substanz wird von den Bereichen höchster magnetischer Feldstärke angezogen.
- **Ferromagnetismus:**  
Dieser wird durch die Ausrichtung der Magnetisierungsrichtungen der Weisschen Bezirke (Kristallbereiche gleicher Magnetisierung, im unmagnetisierten Zustand statistisch verteilt,  $\sim 10 \mu\text{m}$  bis  $1 \text{mm}$ ) in Feldrichtung hervorgerufen. Die Hysterese ist eine ferromagnetische Eigenschaft.
- **Antiferromagnetismus:**  
In diesem Fall liegen im Kristall zwei Teilgitter mit entgegengesetzter Magnetisierung (antiparalleler magnetischer Momente) vor. Da die magnetischen Momente gleich groß sind, kompensieren sich die Teilgitter und es treten keine Domänen auf. Daher verhält sich die Substanz diamagnetisch.
- **Ferrimagnetismus:**  
Dieser liegt vor, wenn in einem Kristall zwei Untergitter vorhanden sind, deren unterschiedlich große magnetische Momente zu einem resultierenden magnetischen Moment führen. Daraus ergeben sich ferromagnetische (Hysterese), sowie antiferromagnetische (Diamagnetismus) Eigenschaften.
- **Superparamagnetismus:**

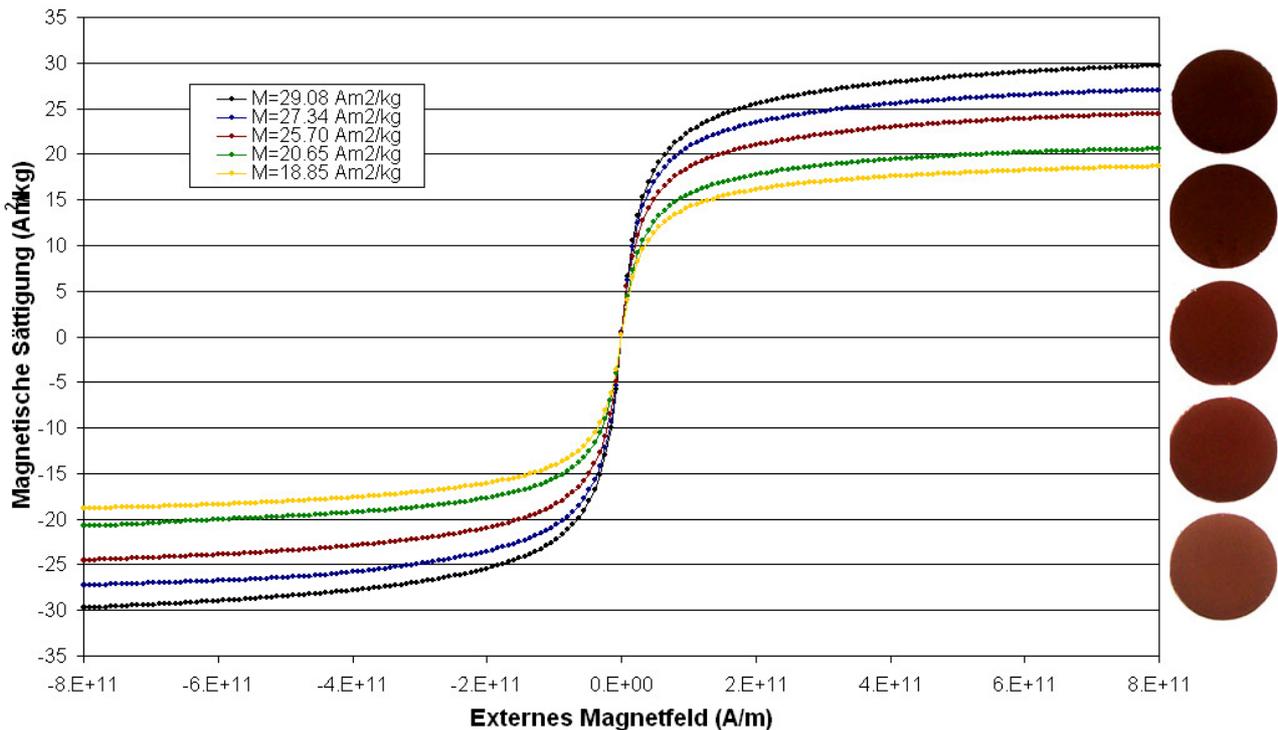
Dieser tritt nur bei ferromagnetischen oder ferrimagnetischen Substanzen auf, die folgende Bedingung erfüllen: Damit die Magnetisierung nach Abschalten des äußeren Magnetfeldes wieder auf Null fällt, muss die thermische Energie ausreichend sein, um die Spinnomente spontan und schnell zwischen ihren beiden Zuständen wechseln zu lassen und somit statistisch zu verteilen. Dafür ist es erforderlich, dass die Partikel kleiner sind als ein Weisscher Bereich. Der Weissche Bereich liegt für Eisen bei  $\sim 20$  nm. Für Eisenoxide gilt, dass nur Partikel kleiner 10 nm bei Raumtemperatur superparamagnetisch sind. Superparamagnetische Partikel zeigen keine Remanenzmagnetisierung, so dass sie ihren Magnetismus sofort nach Abschalten eines externen Magnetfeldes verlieren (Cornell und Schwertmann, 1996).

Um die Eigenschaften des magnetischen Materials zu bestimmen wird eine Magnetisierungskurve aufgenommen, dabei wird die magnetische Sättigung  $M_S$  ( $\text{Am}^2/\text{kg}$ ) in Abhängigkeit vom externen Magnetfeld  $H$  ( $\text{A/m}$ ) gemessen (vgl. Abb.10).



**Abb.10:** Magnetischen Sättigung der Polymethylacrylat-Partikel.

Experimentelle Untersuchungen haben ergeben, dass eine magnetische Sättigung von  $10.0 \text{ Am}^2/\text{kg}$  notwendig ist, um obige Bedingungen zu erfüllen. Dennoch ist eine höhere magnetische Sättigung wünschenswert, da diese die Separierung weiter beschleunigt. Die magnetische Sättigung der PmaP betrug  $13.2 \text{ Am}^2/\text{kg}$ . Diese hat zudem einen Einfluss auf das Aussehen der Partikel (vgl. Abb.11).



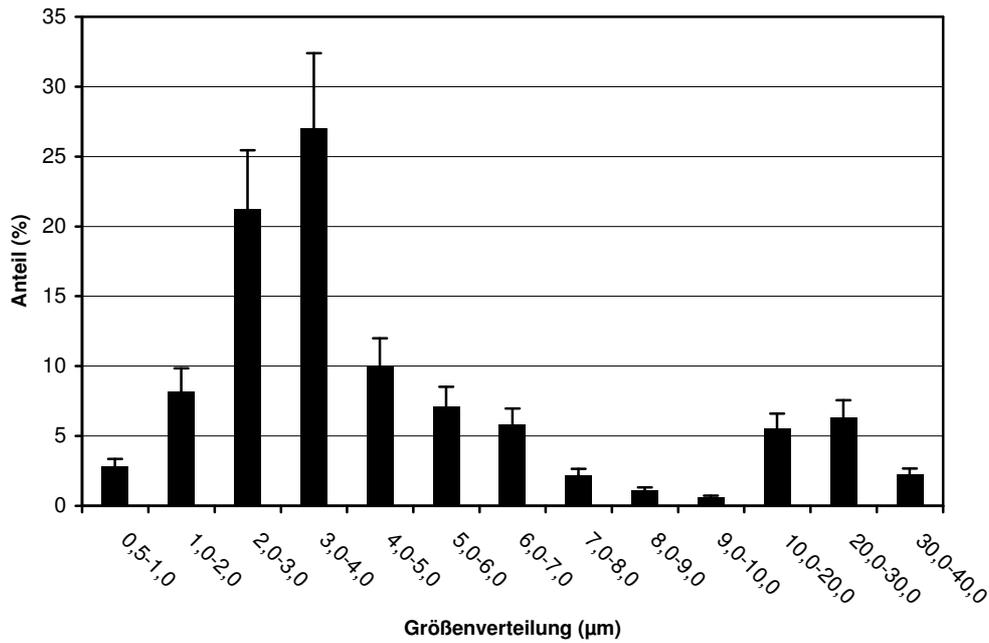
**Abb.11:** Magnetische Sättigungen verschiedener Magnetit-Polyvinylacetat-Partikel Proben und die daraus resultierende Farbe (in Reihenfolge der dargestellten magnetischen Sättigungen) der Polymerpartikel.

Wie in Abb.11 zu sehen, führt eine höhere magnetische Sättigung zu einer Farbvertiefung von hellbraun bis hin zu sehr dunklem braun der Partikel. Diese Farbvertiefung wird allerdings nach kurzer Zeit der Lagerung in wässrigen Medien wieder aufgehoben, da dass Magnetit (schwarz gefärbt) zu Maghemit (braun gefärbt) oxidiert wird und dabei bis zu 20% der magnetischen Sättigung verloren geht. Dieses ist dann allerdings stabil, eine Oxidation zu Hämatit findet unter diesen Bedingungen nicht statt.

### Messung der Partikelgröße, Größenverteilung und Bestimmung der Morphologie

Da eine preiswerte Synthese der Partikel angestrebt wurde, ist die Polymerisation nicht darauf ausgelegt, monodisperse Partikel zu erzeugen, deren Herstellung höheren synthetischen Aufwand benötigt. Dennoch sollte der Anteil an größeren Partikeln (> 10 µm) gering, die durchschnittliche Teilchengröße unter 5 µm und die Partikelgrößenverteilung möglichst eng sein, um die Diffusionslimitierung gering zu halten (Kallenberg 2005). Die Größenverteilung wurde als „area distribution“ ermittelt.

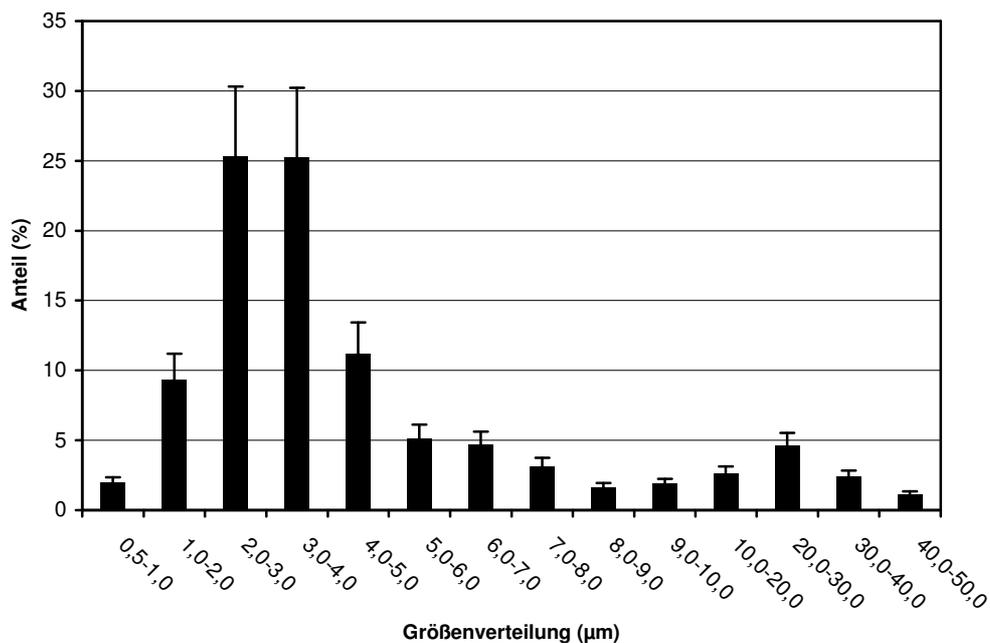
Die PmaP wiesen eine Größenverteilung und einen mittleren Teilchendurchmesser auf, der die obige Bedingung erfüllt (vgl. Abb.12).



**Abb.12:** Größenverteilung der PmaP.

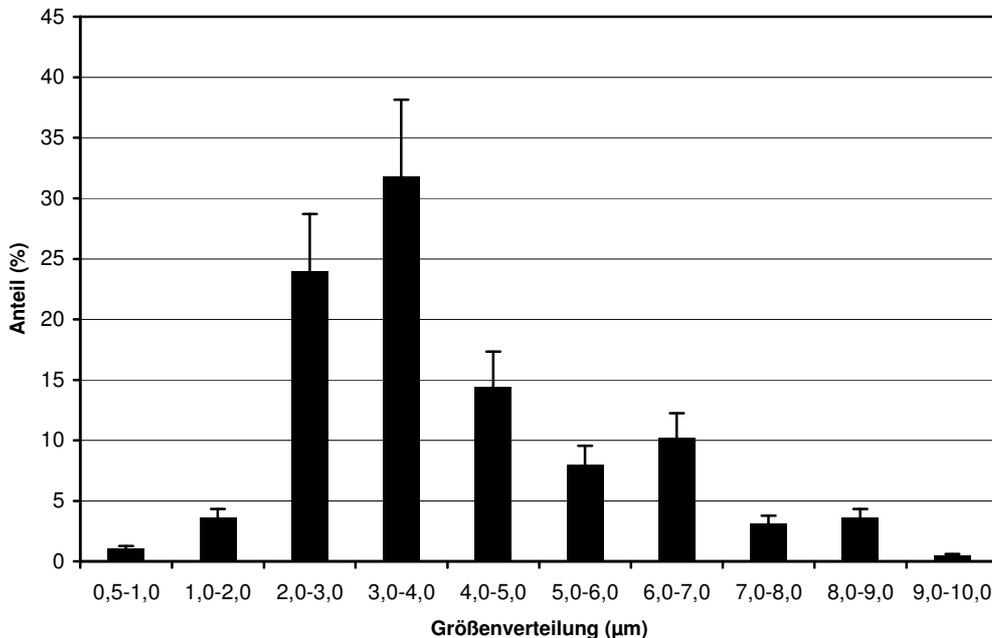
Obwohl 14% der Polymethylacrylat-Partikel einen Durchmesser über 10 µm besitzen (vgl. Abb.13), beträgt der mittlere Teilchendurchmesser 4 µm. Daher war eine weitere Aufreinigung nicht nötig.

Im Gegensatz dazu weisen die Polyvinylacetat-Partikel einen mittleren Teilchendurchmesser von 6 µm (vgl. Abb.13) auf und erfüllen damit obige Bedingung nicht mehr.



**Abb.13:** Größenverteilung der PvacP vor der Aufarbeitung.

Da diese Partikelsuspension über Partikelfractionen mit sehr großem mittleren Teilchendurchmesser verfügen, wurden die Partikel nachträglich weiter separiert (vgl. Kapitel 2.5.4.), um sowohl den mittleren Teilchendurchmesser zu reduzieren, als auch die größeren Fractionen abzutrennen (vgl. Abb.14).

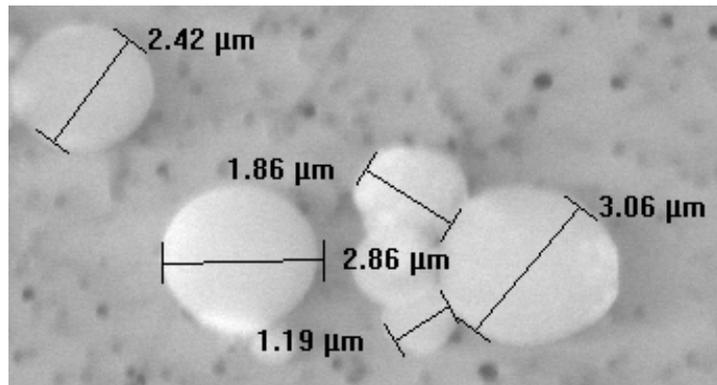


**Abb.14:** Größenverteilung der PvacP nach der Aufarbeitung.

Nach der Aufarbeitung betrug der mittlere Teilchendurchmesser der Partikelsuspension 3 µm. Damit erfüllte die Partikelsuspension die Bedingung, einen maximalen mittleren Teilchendurchmesser von 5 µm aufzuweisen und nur einen möglichst geringen Anteil an Partikelfractionen mit einer Größe von mehr als 10 µm zu beinhalten.

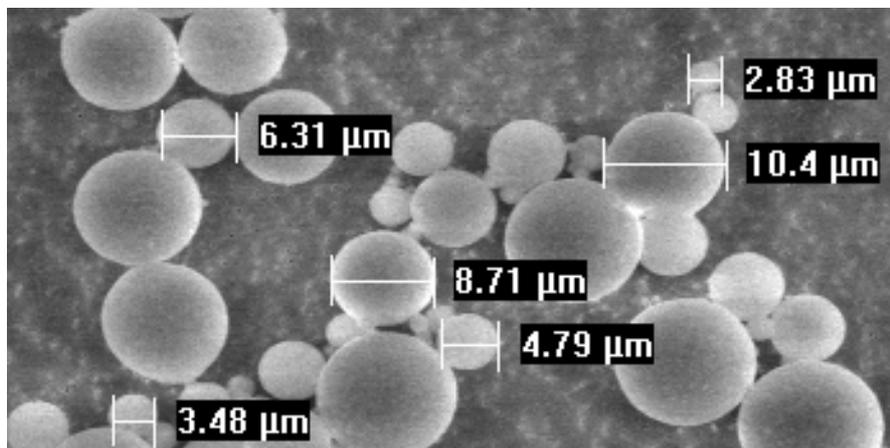
Die Morphologie der Partikel ist von großer Bedeutung, da sie Aussagen über die Porosität von Partikeln erlaubt. Eine hohe Porosität erhöht zwar die Enzymbeladung, vermindert aber in der Regel die spezifische Aktivität der Enzyme, da diese in Poren immobilisiert werden.

Wie in Abb.15 zu sehen, sind die Polymethylacrylat-Partikel (PmaP) sphärisch und weisen keine Poren auf, in denen Enzyme immobilisiert werden könnten. Außerdem zeigt diese Aufnahme gut die Größenverteilung der Partikelsuspension.



**Abb.15:** ESEM-Bild der PmaP nach der Separierung.

Wie in Abb.16 zu erkennen, ist auch die Porosität der ebenfalls sphärischen Polyvinylacetat-Partikel (PvacP) so klein, dass keinerlei Enzymmoleküle darin immobilisiert werden können.

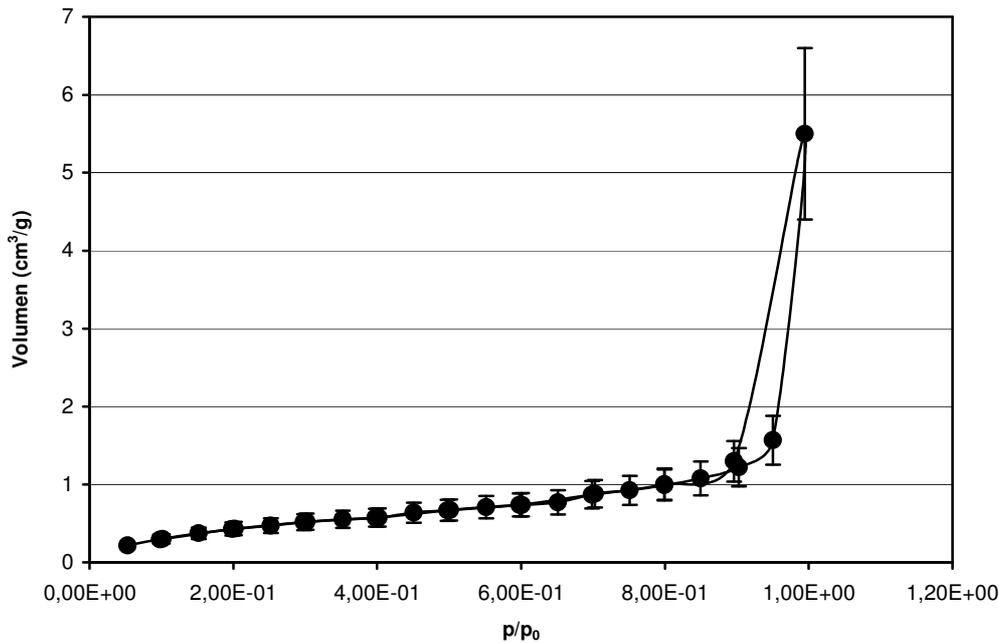


**Abb.16:** ESEM-Bild der PvacP nach der Separierung.

Die PvacP weisen, wie oben gut zu erkennen, eine breite Größenverteilung auf.

### **Messung der spezifischen Oberfläche durch Adsorptionsmessung (BET-Isotherme)**

Die spezifische Oberfläche der PmaP wurde mittels einer BET-Isotherme gemessen (vgl. Abb.17).



**Abb.17:** BET-Isotherme der PmaP.

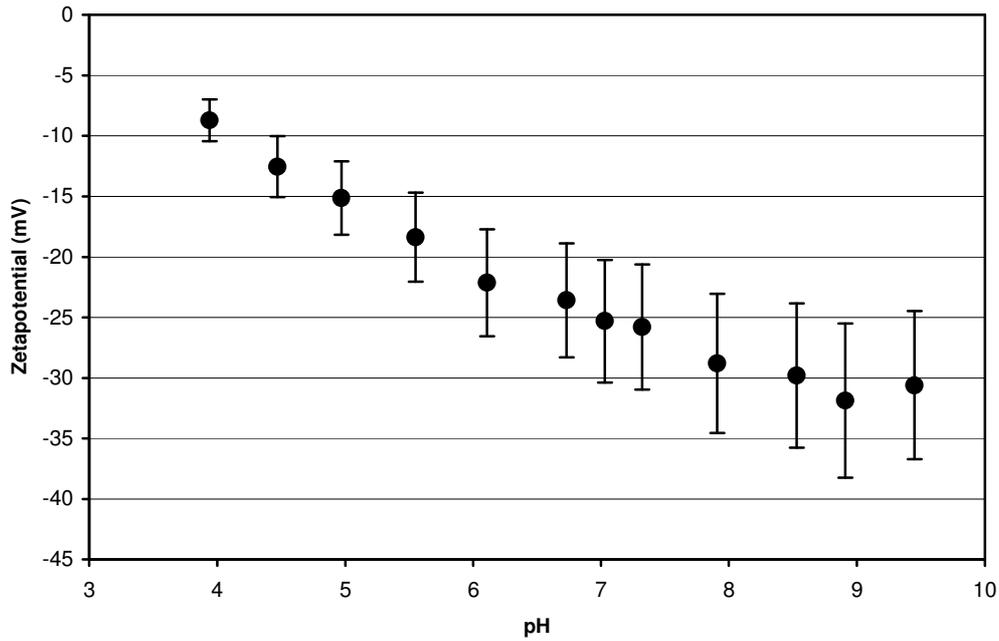
Die PmaP besitzen eine spezifische Oberfläche von  $2.20 \text{ m}^2/\text{g}$ , dieser liegt in der für Mikropartikeln üblichen Größenordnung und ist ausreichend, um eine industriell nutzbare Beladung mit Enzym zu erhalten. Die spezifische Oberfläche, ebenfalls mit einer BET-Isotherme bestimmt, beträgt  $4.90 \text{ m}^2/\text{g}$ .

### Messung des Zetapotentials

Das Zetapotential der Partikel bei pH 7.5 ist zum einen für die Beladung mit dem Enzym und zum anderen für die Bildung einer stabilen Suspension von Bedeutung.

Die DLVO-Theorie (DLVO: Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeck) erklärt die Stabilität von lyophoben Dispersionen. Darin wird davon ausgegangen, dass sich die abstoßenden Kräfte zwischen den Ladungen der elektrischen Doppelschichten benachbarter Teilchen und die anziehenden Kräfte auf Grund der van-der-Waals-Wechselwirkungen der Moleküle in den Teilchen gerade ausgleichen (Atkins, 1996).

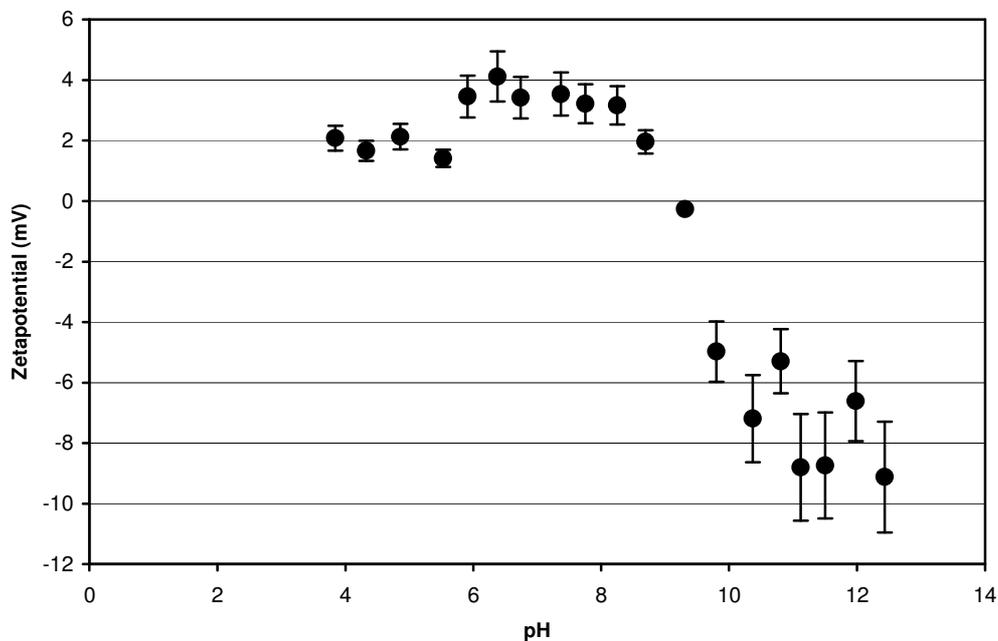
Die Bildung einer stabilen Partikelsuspension musste vermieden werden, da sonst eine Separierung deutlich erschwert worden wäre. Sowohl für die Immobilisierung, als auch für die Lagerung der Immobilisate wird ein Phosphatpuffer mit pH 7.5 verwendet. Mit  $-28 \text{ mV}$  bei pH 7.5 (vgl. Abb.18) zeigen die Polymethylacrylat-Partikel ein hohes negatives Zetapotential.



**Abb.18:** Zetapotentialkurve der PmaP in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Trotz des hohen negativen Zetapotentials bildeten die PmaP keine stabile Partikelsuspension in Wasser.

Für die Polyvinylacetat-Partikel ergibt sich bei pH 7.5 ein positives Zetapotential von 3.4 mV (vgl. Abb.19).

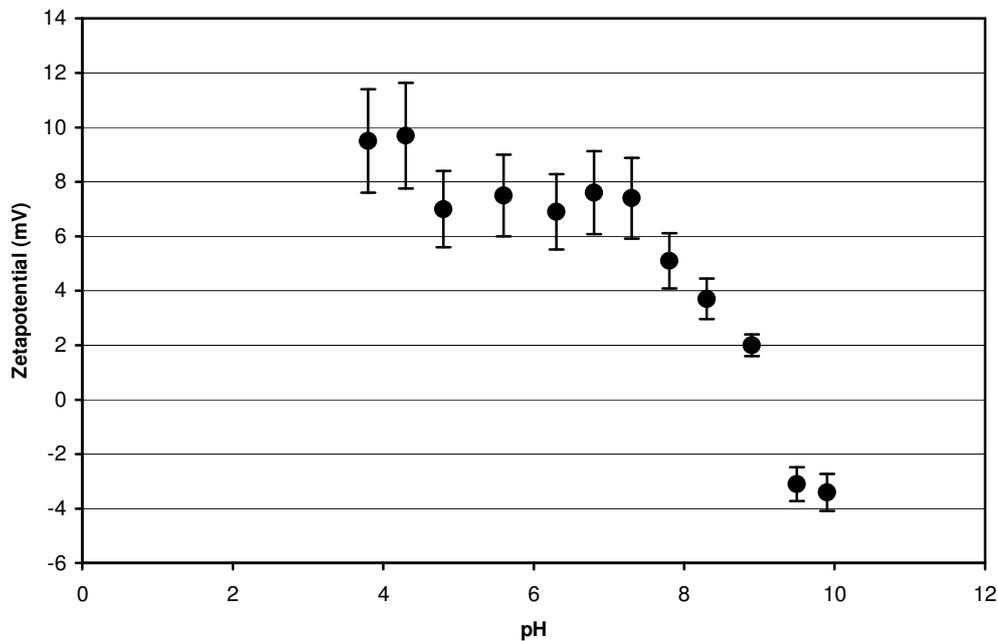


**Abb.19:** Zetapotentialkurve der PvacP in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Auch die PvacP bildeten keine stabile Partikelsuspension in Wasser.

Die Verwendung beider Partikelarten ermöglichte es, die Auswirkungen von anziehenden und abstoßenden Wechselwirkungen von Träger und Enzym zu untersuchen.

Ebenfalls von Interesse ist das Zetapotential der reinen Magnetitkerne mit einem mittleren Teilchendurchmesser von weniger als 10 nm (Abb.20).

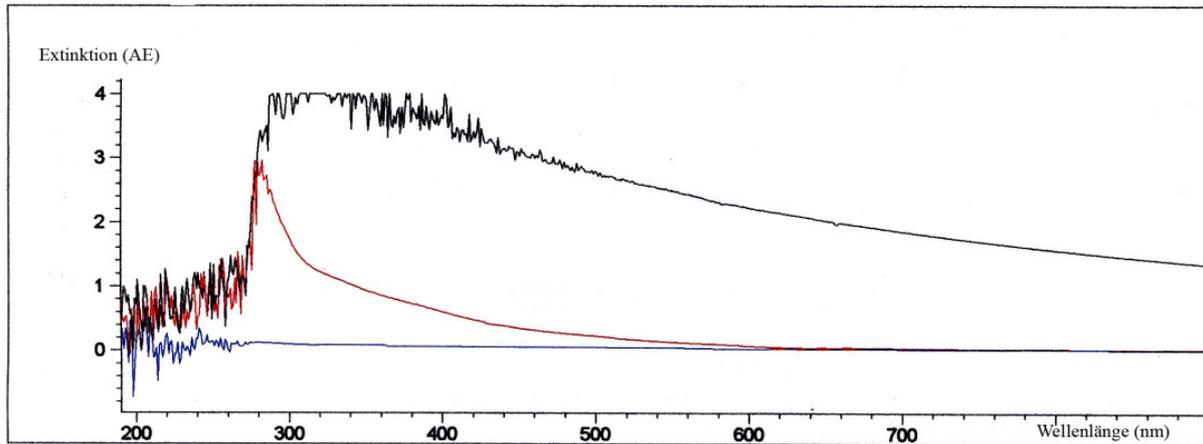


**Abb.20:** Zetapotentialkurve der Magnetitkerne in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Die reinen Magnetitkerne besitzen bei pH 7.5 ein Zetapotential von +6.0 mV und zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die Zetapotentialkurve der Polyvinylacetat-Partikel. Da beide Polymerarten Magnetitkerne besitzen, der Kurvenverlauf der Polymethylacrylat-Partikel allerdings unterschiedlich ist, besitzen die Magnetitkerne nur einen geringen Einfluss auf das Zetapotential der Polymerpartikel.

### **Überprüfung des Reinheitsgrades des Überstandes durch UV-Messungen**

Die Polymerisation erforderte eine Separierung der Partikel vom Reaktionsmedium. Da kurzkettige Polymere, die nicht kovalenter Bestandteil der Träger sind, durch schwache Wechselwirkungen als Verunreinigungen an den Partikeln haften können, war eine gründliche Waschung erforderlich. Mittels UV-Messungen wurde die Reinheit des Überstandes der Waschungen der Partikelsuspension im Bezug auf die kurzkettigen Polymere untersucht (vgl. Abb.21).



**Abb.21:** UV-Spektren der verschiedenen Waschungen der Partikelsuspension nach der Polymerisation. AE bedeutet Absorptionseinheiten.

Das UV-Spektrum zeigt bei der ersten Waschung nach der Separierung eine starke Absorption über den Bereich von 300 nm bis 900 nm (schwarze Linie), nach der Filtrierung zeigt sich die Bande des Monomers bei 294 nm (rote Linie) und nach viermaligem Waschen mit Wasser ist keine Absorption des Monomers im Überstand mehr zu sehen (blaue Linie).

## 2.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Ziel der Synthese von Polymerpartikeln im Mikrometermaßstab war es, preisgünstige und für die Industrie verwendbare Partikel herzustellen, die zudem für die Beladung mit einem Modellenzym (Penicillin G Acylase) geeignet sind und die intrinsischen Parameter des Enzyms möglichst wenig beeinflussen.

### Optimierung des magnetischen Fluids

Die Magnetitkerne ermöglichten magnetische Eigenschaften der Partikel, das Coating der Magnetitkerne mit Ölsäure verhinderte, dass das Magnetitgel aus der Polymermatrix der Partikel ausgewaschen wurde. Die Synthese des magnetischen Fluids musste weiter optimiert werden, um reproduzierbar für die Polymerisation geeignetes Magnetitgel in hoher Ausbeute herzustellen. Zu diesem Zweck wurden viele Parameter (Rührgeschwindigkeit, Temperatur, Ammoniakkonzentration, Ölsäurekonzentration, Ölsäuredosiergeschwindigkeit) einzeln oder in Kombination mit anderen Parametern geändert. Es wurden 43.1 ml/l wässrige Ammoniaklösung benötigt, um ein magnetisches Fluid zu erhalten, dass auch in organischen Lösungsmitteln nicht aus der Polymermatrix ausgewaschen wird.

Die Löslichkeit des Magnetitgels in wässrigen Lösungen kann gesteigert werden, wenn die Ammoniakkonzentration in der Synthese erhöht wird. Eine Erhöhung der Menge um 50% zeigt eine Sättigung im Lösungsverhalten in Wasser.

Durch die Optimierungen der Reaktionsparameter konnte die Reaktionsausbeute reproduzierbar auf 90% (62.3 g) der maximal erzielbaren Ausbeute von 70 g gesteigert werden (bezogen auf die stöchiometrisch maximal mögliche Ausbeute).

### **Optimierung der Polymersynthese**

Es wurde die Polymerisation optimiert, um möglichst kleine Partikel mit hoher magnetischer Sättigung zu erhalten. Dafür wurden verschiedene Parameter (Rührgeschwindigkeit, Temperatur, Reaktionsdauer, Initiatorkonzentration, Magnetitgelkonzentration und Hexankonzentration, Natriumchloridkonzentration, Monomerkonzentration und Vernetzerkonzentration) einzeln oder in Kombination mit miteinander verändert. Dies ermöglichte eine Ausbeute von bis zu 90% (108 g, bezogen auf die stöchiometrisch maximal mögliche Ausbeute), die allerdings durch die Separierung der Partikel auf 41% (49.0 g) verringert wurde. Dies war unumgänglich, da sich Partikelagglomerate bildeten und das Magnetitgel nicht vollständig vom Polymer umschlossen wurde.

Für eine spätere Automatisierung wurde der Initiator Dibenzoylperoxid in eine kurzfristig stabile (zwei Tage) Lösung in Dichlormethan überführt, um die Dosierung zu vereinfachen. Dichlormethan besitzt ebenfalls einen geringen Siedepunkt (40°C), so dass es wie das Hexan vor der Polymerisation verdampfen wird.

Wichtig dafür war eine stabile Suspension des Magnetitgels im Monomer. Da das Magnetitgel im Monomer keine stabile Suspension bildete, wurde Hexan als Lösungsmittel verwendet. Dieses besitzt einen Siedepunkt von 69°C, so dass es verdampft, bevor die Polymerisation bei 80°C beginnt. Das Magnetitgel wurde als Suspension in Hexan unabhängig vom Monomer zugegeben, da das Magnetitgel bei Zugabe von Monomer zur Hexansuspension ausfällt. Die Stabilität der Suspension wurde durch Sedimentationsversuche überprüft, die zu keiner Sedimentation innerhalb von 3 h führten. Außerdem wurde untersucht, ob ein stabiles magnetisches Fluid vorliegt, bei dem das Magnetitgel durch einen Magneten nicht vom Lösungsmittel getrennt werden kann. Auch dies war im oben beschriebenen Fall gegeben.

## Stabilitätsversuche

Außerdem wurde die Stabilität der Partikel in verschiedenen organischen Reagenzien untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Partikel sehr stabil sind, die Polymerhülle in Toluol allerdings aufgelöst wird. Da die Partikel nur bei einem pH größer 3.5 stabil sind, ist die Verwendung starker Säuren nicht möglich. Schon 5v% Trifluoressigsäure beschädigen die Partikel schwer. Außerdem besitzen die Partikel eine hohe mechanische Stabilität, die sich darin äußert, dass keinerlei Abrieb durch die wiederholte Separierung, aber auch nicht durch Zentrifugation, stattfindet. Dies konnte durch ESEM-Bilder gezeigt (vgl. Kapitel 2.5.5.) werden.

Auch die Lagerung unter verschiedenen Bedingungen wurde untersucht, vor allem um eine Agglomeration der Partikel zu verhindern. Dabei ergab sich, dass die beste Lagerung über längere Zeit im Phosphatpuffer (0.2 M) bei pH 7.5 gewährleistet ist. Dies ist sehr günstig, da das Modellenzym Penicillin G Acylase ebenfalls unter diesen Bedingungen gelagert wird.

## Eigenschaften der Polymerpartikel

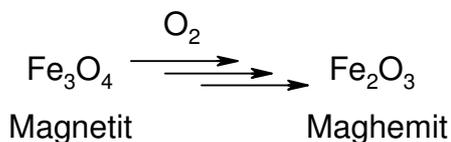
In Tab.3 sind die Eigenschaften der beiden Polymerpartikelarten aufgeführt. Die spezifische Oberfläche liegt im zu erwarteten Bereich für nicht-poröse Mikropartikel und bietet ausreichende Oberflächen, um eine hohe Beladung mit Enzym zu ermöglichen.

Partikeleigenschaft	PmaP	PvacP
Spezifische Oberfläche	2.20 m <sup>2</sup> /g	4.90 m <sup>2</sup> /g
Magnetische Sättigung	13.2 Am <sup>2</sup> /kg	20.0 Am <sup>2</sup> /kg
Mittlerer Teilchendurchmesser (Größenverteilung)	4.0 µm (0.5 µm – 40 µm)	6.0µm (0.5 µm – 50 µm)
nach Separierung	--	3.3 µm (0.5 µm – 10 µm)
Morphologie	Sphärisch, nicht porös	Sphärisch, nicht porös
Zetapotential bei pH 7.5	-28 mV	+3.4 mV
Dichte	1.21 g/cm <sup>3</sup>	1.32 g/cm <sup>3</sup>
Funktionelle Aminogruppen	500 µmol/g	410 µmol/g

**Tab.3:** Auflistung der Eigenschaften der Polymethylacrylat-Partikel (PmaP) und der Polyvinylacetat-Partikel (PvacP).

Die magnetische Sättigung liegt für beide Partikel über dem Grenzwert von 10 µm, so dass eine problemlose Handhabung und schnelle Separierung (unter einer Minute) im Labormaßstab gegeben ist. Damit sind eine wiederholte Verwendung und eine Automatisierung der Prozesse möglich. Die magnetische Sättigung von Magnetit liegt bei 92 bis 100 Am<sup>2</sup>/kg, also deutlich über dem Wert der Polymerpartikel. Dies hat verschiedene Gründe: Zum einem sind maximal 60% der Polymermasse Magnetitkerne, zum anderen sind diese

auch nicht ideal kristallin, so dass eine Verminderung der magnetischen Sättigung eintritt. Auch oxidiert der Magnetit zu Maghemit, das eine kleinere magnetische Sättigung von 60 bis 80 Am<sup>2</sup>/kg aufweist:



Daher hellen sich die Partikel farblich auf und weisen eine niedrigere magnetische Sättigung auf. Die Werte in Tab.3 beziehen sich auf Proben, die bereits nach einiger Lagerzeit gemessen wurden, um den Wert zu erhalten, der für die Handhabung relevant ist. Das heißt, die Oxidation war bei Raumtemperatur bereits schleichend mit Luftsauerstoff erfolgt. Diese ist, wie vorherige Arbeiten mittels Mößbauerspektroskopie belegten, bereits nach wenigen Tagen abgeschlossen. Daher haben selbst frisch hergestellte Partikel einen Anteil an Maghemitkernen.

Die selektierten Chargen der beiden Polymerpartikelarten besitzen einen geeigneten mittleren Teilchendurchmesser und eine geeignete Größenverteilung, so dass keine größeren Einbußen der spezifischen Aktivität bei der Enzymbeladung zu erwarten sind. Dafür muss der mittlere Teilchendurchmesser kleiner als 5 µm (Janssen et al, 2002) sein. Ein weiterer Parameter der die spezifische Aktivität beeinflusst, ist die Morphologie der Partikel. Da diese aber keine Porosität aufweisen, die groß genug wären, um Enzym darin zu binden, wird diese Bedingung erfüllt. Dies wurde auch durch die durchgeführten Immobilisierungsversuche bestätigt (vgl. Kapitel 3.5.6.).

Da die Partikelgröße ein kritischer Parameter ist, wurden zum Vergleich Versuche mit Polymer-Nanopartikeln (aus Polymethylmethacrylat mit Maghemitkern) durchgeführt. Diese wurden vom Institut für Materialforschung (IMF) des Forschungszentrums Karlsruhe zur Verfügung gestellt, hatten einen Durchmesser von 4 nm und waren nicht porös. Sie konnten aber nur in kleinem Maßstab mit erheblichem Aufwand hergestellt werden, weswegen sie auf Grund der Kosten für die industrielle Nutzung bisher nicht geeignet sind. Außerdem lassen sie sich auf Grund der geringen Dichte nur schwer in Wasser suspendieren und wurden deshalb in Ethylenglycol oder trocken geliefert. Obwohl sie magnetisch sind, war es nicht möglich, die Polymer-Nanopartikel magnetisch zu separieren. Dies lag daran, dass bei Partikeln im Nanometerbereich die magnetische Sättigung pro Partikel sehr gering ist. Dazu kam, dass die Partikel nach jeder Zentrifugation so stark agglomerierten,

dass nach wenigen Zentrifugationen diese Agglomerate nicht mehr resuspendierbar waren.

Die Polymethylacrylat-Partikel besitzen bei pH 7.5, bei dem die Immobilisierung vorgenommen wird, ein Zetapotential von -28 mV und sind somit, wie das Enzym, negativ geladen. Die Wechselwirkung von gleich geladenen Partikeln und Enzymen verursachte eine niedrigere Beladung mit Enzym im Vergleich zu den Polyvinylacetat-Partikeln, die bei pH 7.5 über ein Zetapotential von +3.4 mV verfügen. Dadurch wurde die Bindung des Enzyms an die Träger erschwert, allerdings konnte dies durch eine Erhöhung der Ionenstärke vermindert werden.

Dieser Effekt ist als kinetischer Salzeffekt bekannt: Der Salzeffekt beschreibt den Einfluss von Fremdsalzen auf thermodynamische und kinetische Gesetzmäßigkeiten in Lösungen. Durch den Salzzusatz werden die Ionenstärken und damit die Aktivitätskoeffizienten aller in der Lösung vorhandenen Komponenten verändert (Jakubke und Karcher, 1999). Dieser wird quantitativ mit der Brönstedt-Bjerrum-Gleichung beschrieben, die die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante  $k$  von der Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Ionen, sowie der Konzentration der Ionen in Lösung, der Ladungszahl der Ionen und der Ionenstärke beschreibt (vgl. Abb.22).

$$\ln k = \ln k_0 + 1.02 * z_A * z_B \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}}, I = 0.5 * \sum_i c_i * z_i^2$$

**Abb.22:** Brönstedt-Bjerrum-Gleichung.

In Abb.22 bedeutet  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion in Anwesenheit von Ionen der Ionenstärke  $I$ ,  $k_0$  die Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit von Ionen (unendliche Verdünnung).  $c_i$  ist die Konzentration in mol/l und  $z_i$  die Ladungszahl der  $i$ -ten Ionensorte in der Lösung.

Der kinetische Salzeffekt ist bei der Reaktion geladener kurzlebiger Zwischenprodukte ebenso zu beobachten, wie bei konventionellen Ionenreaktionen. Die Wolke aus Ionen entgegengesetzt geladenen Vorzeichens, mit der sich ein Ion in Lösung umgibt, schirmt die Ladung des Ions zu einem gewissen Teil nach außen ab. Dieser Effekt bewirkt, dass das abstoßende Potential zwischen zwei gleichnamig geladenen Ionen weniger stark ist als bei Abwesenheit der Ionenatmosphäre und entsprechend wird das Anziehungspotential zwischen zwei ungleichnamig geladenen Ionen kleiner. Infolgedessen wird die Geschwindigkeit einer Ionenreaktion durch die Anwesenheit „inert“ Salze, die an der Reaktion selbst gar nicht teilnehmen, beeinflusst (Henglein et al, 1969).

Da aber die spezifische Aktivität (vgl. Kapitel 3) des Enzyms, immobilisiert auf den Polymethylacrylat-Partikeln größer ist, als auf den Polyvinylacetat-Partikeln, wurden die Polymethylacrylat-Partikel für die weiteren Versuche verwendet.

Die Polymerpartikel weisen 410  $\mu\text{mol/g}$  (PvacP) beziehungsweise 500  $\mu\text{mol/g}$  (PmaP) an funktionellen Gruppen (Aminogruppen) auf. Diverse Immobilisierungsversuche haben gezeigt, dass die Trägerpartikel mindestens 300  $\mu\text{mol/g}$  verfügbare funktionelle Gruppen aufweisen sollten. Die Obergrenze ist stark von der Art und Größe des Enzyms abhängig.

### **Betrachtungen zur Immobilisierung**

Aus obigen Betrachtungen ergibt sich, dass beide Partikelarten hervorragend für die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase geeignet sind. Sowohl im Bezug auf die Handhabung während der Experimente, als auch im Bezug auf den Einfluss des Trägers auf das Enzym sind die Partikel im Vergleich zu kommerziell erhältlichen Trägern sehr gut.

Die kommerziell am meisten verwendeten Partikel (Eupergit<sup>®</sup>-C) kosten 6 €/g (Stand März 2007), besitzen jedoch einen mittleren Teilchendurchmesser von 170  $\mu\text{m}$  und sind damit nicht nur deutlich größer als die hier verwendeten Polymer-Mikropartikel, sondern zudem noch porös (Porengröße um 25 nm) (Röhm GmbH, 1995). Daher ist die Beladung zwar sehr groß, die Effizienz des Enzyms jedoch auf Grund der sehr niedrigen molekularen Aktivität (Umsatzrate pro Enzymmolekül und Sekunde) deutlich reduziert (Kallenberg et al, 2005). Dieser Polymerträger ist in der Regel durch Epoxygruppen funktionalisiert.

Die Kosten für die selbst hergestellten Partikel liegen in der Größenordnung von unter 10 € (bezogen auf vergleichbare Partikel und industrielle Fertigung) und sind damit viel preisgünstiger als andere Polymer-Mikropartikel mit analogen Eigenschaften (zum Beispiel: Micromer<sup>®</sup>-M, Polymer-Mikropartikel von Micromod ([www.micromod.de](http://www.micromod.de)), 4  $\mu\text{m}$  Durchmesser, 500  $\mu\text{mol/g}$  Aminogruppen für die Funktionalisierung, Dichte von 1.1  $\text{g/cm}^3$ , aber nur 3.6  $\text{Am}^2/\text{kg}$  magnetische Sättigung  $\rightarrow$  440 €/g).

Eine weitere Verbesserung des Trägersystems, vor allem in Bezug auf die Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger), konnte durch die Verwendung von Spacern (vgl. Kapitel 3) erzielt werden.

### **3. Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase**

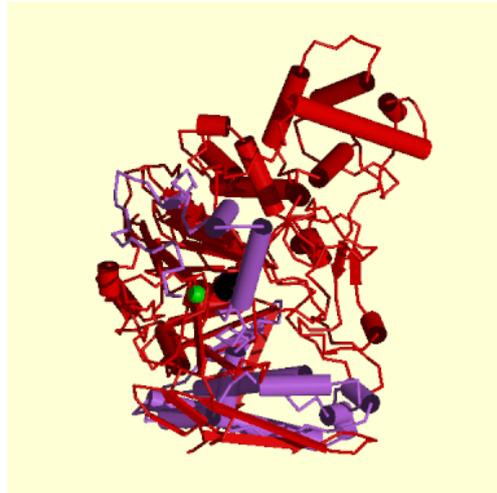
Ziel der Synthese von Spacern zur Funktionalisierung von Trägern, die zur Immobilisierung von Enzymen verwendet werden, ist es, die Einflüsse des Trägers auf das Enzym zu vermindern. Dies wird dadurch erreicht, dass die Distanz zwischen beiden vergrößert wird und Spacer Verwendung finden, die strukturell an die Erfordernisse angepasst werden können.

#### **3.1. Stand des Wissens**

Die Penicillin G Acylase ist ein gründlich charakterisiertes Enzym und verfügt über eine große industrielle Bedeutung, daher wurde sie als Modellenzym für diese Arbeit verwendet.

##### **3.1.1. Das Modellsystem Penicillin G Acylase**

Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11, 86192 g/mol, 766 Aminosäuren) von *E.coli* ist ein seit langem bekanntes Enzym (Kasche et al, 1987), es ist eine Hydrolase, die alle C-N-Bindungen von linearen Amiden spaltet. Es gehört der Ntn-Familie (N terminal nucleophile-Familie) an und weist somit einige Eigenschaften auf, die allen Enzymen dieser Familie zu Eigen sind. Zum einen besteht das katalytische Zentrum immer aus einer der folgenden, am N-Terminus sitzenden Aminosäure: Serin, Threonin oder Cystein. Dabei wirkt die  $\alpha$ -Aminogruppe stets als Base um die Katalyse zu unterstützen. Außerdem ist das katalytische Zentrum in ein  $\beta$ -Faltblatt eingebunden, dem sich ein anderes  $\beta$ -Faltblatt anschließt. Über beiden Enden der Faltblattkombination befinden sich je zwei Paare von  $\alpha$ -Helicis (vgl. Abb.23).

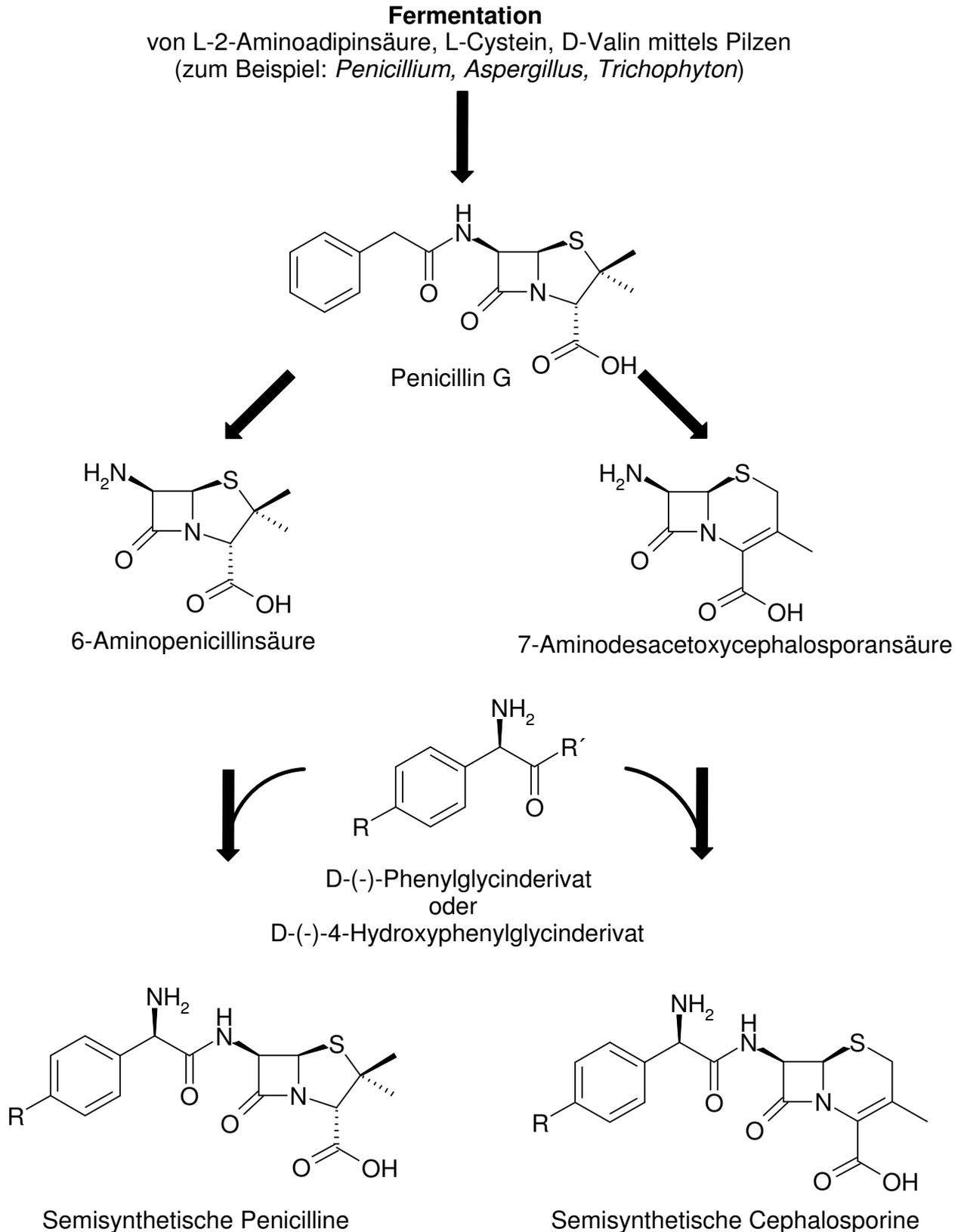


**Abb.23:** Schematische Darstellung der Penicillin G Acylase von *E.coli*.

Das Enzym wird als Precursor in der Zelle dargestellt und ist in dieser Form nicht katalytisch aktiv. Es reift selbstständig durch Autoproteolyse, dabei werden ein Signalpeptid (am Anfang des Enzyms) und ein Spacerpeptid (innerhalb des Enzyms) abgespalten und die gereifte Penicillin G Acylase besitzt nun zwei Ketten (Dodson, 2000, Hewitt et al, 2000, Kasche et al, 1999). Diese Ketten werden als A-Kette mit den Aminosäuren A1 bis A209 und B-Kette mit den Aminosäuren B1 bis B557 bezeichnet. Die gereifte Form der Penicillin G Acylase ist katalytisch aktiv. Dieser Mechanismus ist in der Zelle für die Funktionsweise des Enzyms von entscheidender Bedeutung (Ignatova et al, 2002, 2000a und 2000b).

Dieses Enzym ist in der Industrie von entscheidender Bedeutung für die Synthese von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Bruggink et al, 1998, Valle et al, 1991).

Seit den sechziger Jahren erweitert die enzymatische Darstellung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Amoxicillin, Ampicillin, Cefadroxil, Cefamandol, Cefazolin, Cephalexin, Cephaloglycin und Cephalothin) durch Penicillin Amidase aus *E. coli* die traditionelle chemische Synthese. Dabei werden penicillin-basierende Antibiotika (semisynthetische Penicilline [SSP], zum Beispiel Amoxicillin, Ampicillin) und cephalosporin-basierende Antibiotika (semisynthetische Cephalosporine [SSC], zum Beispiel Cefadroxil, Cephalexin) unterschieden. Erstere werden aus 6-Aminopenicillinsäure und letztere aus 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure hergestellt (vgl. Abb.24).



**Abb.24:** Übersicht über die Herstellung semisynthetischer Antibiotika (Bruggink et al, 1998).

Der Vorteil der semisynthetischen Darstellung von Antibiotika liegt in der Verwendung von wässrigen Medien, Vermeidung gefährlicher Substanzen und Verringerung der benötigten Syntheseschritte. Erst 1990 begann die Umstellung der Produktion von  $\beta$ -Lactam-

Antibiotika durch enzymatische Katalyse in der Industrie. Seit dieser Zeit nimmt ihre Bedeutung stetig zu (Bruggink et al, 1998).

Um für die jeweilige Aufgabe ein passendes Enzym zu finden, werden auch Penicillin G Acylasen von anderen Mikroorganismen (zum Beispiel *A. faecalis*) verwendet oder das Enzym genetisch modifiziert (Gabor et al, 2005 und 2004, Morillas et al, 2003, Gemeiner, 1982). Durch genetische Modifikationen wurde eine gezielte Steigerung der Aktivität (Shio und Quax, 2004) erreicht. Schon 1983 wurden detaillierte Überlegungen zur Produktion von Antibiotika durch immobilisierte Enzyme angestellt (Vandamme, 1983), die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika sind hierbei ein wichtiger Zweig (Wegnam et al, 2001, Shevale et al, 1997). Dabei wurden auf verschiedenste Weise die Bedingungen für die Katalyse angepasst. Die meisten Synthesen finden in wässrige Medien (Schroen et al, 1999. Mincheva et al, 1996, Ebert et al, 1996) statt. Auch die Verwendung besonderer Reaktoren (Webb et al, 1996) und organische Lösungsmittel, um den Anteil der Hydrolyse an der Katalyse zu vermindern (Van Langen et al, 2003) wurden untersucht. Gerade letzteres ist sehr wichtig, da in organischen Medien überwiegend die Synthesefähigkeit und nicht die Hydrolyseeigenschaften des Enzyms genutzt werden können (Ebert et al, 1998).

### 3.1.2. Immobilisierte Enzyme

Die meisten Enzyme, so auch Penicillin G Acylase, sind in organischen Lösungsmitteln nicht stabil. Ein Verfahren um die Stabilität in organischen Lösungsmitteln zu erhöhen ist die Immobilisierung von Enzymen, die ebenfalls andere Eigenschaften (Stabilität gegenüber hohen Temperaturen, Ionenstärken und extremen pH-Werten) verbessert, aber die intrinsischen Eigenschaften des Enzyms beeinträchtigt (Kallenberg et al, 2005).

Außerdem ergibt sich durch die Wahl des Trägers oder dessen Modifizierung die Möglichkeit, in wässrigen Systemen zu arbeiten und organische Bedingungen zu simulieren. Gerade für Lipasen, die zu Aktivierung eine Öl/Wasser-Grenzschicht benötigen, wird dies verwendet. Ein Beispiel dafür ist Octylagarose, das eine hydrophobe Oberfläche besitzt, so dass daran immobilisierte Lipasen in rein wässrigen Medien Katalysen durchführen können (Fernandez-Lafuente, 1998).

In der Regel werden aber Polymerträger als hydrophobe Träger verwendet um verschiedenste Enzyme zu binden. Dies kann auch direkt an der Oberfläche unter Verwendung eines Nullspacers wie zum Beispiel 1, 1'-Carbonyldiimidazol stattfinden (Akgöl et al, 2001), in der Regel werden meist längere Spacer verwendet. Penicillin G Acylase wurde mittels Glutardialdehyd auf Polymerträgern immobilisiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Aus-

beute der Immobilisierung 72% betrug und die Lagerstabilität deutlich erhöht war (Bryjak et al, 1989).

Weitere Experimente derselben Arbeitsgruppe ergaben, dass die Partikelgröße dabei eine wichtige Rolle spielt (Bryjak und Noworyta, 1993). Zwar erhöhte eine Immobilisierung der Penicillin G Acylase mittels einer reduzierenden Aminierung durch Natriumcyanoborhydrid die Lagerstabilität ebenfalls deutlich, führte aber zum Verlust von 75% der Aktivität (Burtreau et al, 1989). Eine gute Lösung bot sich hier für  $\alpha$ -Chymotrypsinogen an, dass erst nach der Immobilisierung zu  $\alpha$ -Chymotrypsin aktiviert wurde und somit hohe Stabilitäten und eine hohe Aktivität ermöglichte (Fadnavie et al, 2003). Die Optimierung der Immobilisierung bietet ein weites Feld an Möglichkeiten (Ragnitz et al, 2001).

Der pH-Wert ist für viele Reaktionen, zum Beispiel für die Synthese von Ampicillin (Ospina et al, 1996) sehr entscheidend, daher sollte dieser konstant gehalten werden. Eine Untersuchung des pH-Wertes innerhalb von Polymerpartikeln mit Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) zeigte einen deutlichen pH-Gradienten (Spiess und Kasche, 2001), dieser beeinflusste auch die Katalyse des Substrates. Der pH-Gradient ergibt sich dadurch, dass die Partikel mit immobilisiertem Enzym in einem Medium gelagert wurden, das einen anderen pH-Wert aufweist, als das Medium, das für die Katalyse verwendet wird. Somit diffundieren je nach dem ob der pH-Wert des Mediums für die Katalyse höher oder geringer ist, Protonen aus dem Partikel in die Lösung oder von der Lösung in die Partikel. Dies erzeugt im Partikel und in dessen Nähe einen pH-Gradienten.

Die Penicillin G Acylase ist auch bei niedrigen pH-Werten über einen gewissen Zeitraum stabil (Ferreira et al, 2004), so dass auch dieser für die Industrie interessante Bereich bis pH 3 genutzt werden kann.

### **3.1.3. Verwendung von Spacern**

Als Spacer (engl. Abstandhalter) wird bei der Immobilisierung von Enzymen ein Molekül genannt, das das Enzym mit dem Träger kovalent oder nicht-kovalent verbindet. Neben der Bindung wird ein Spacer auch oft dazu verwendet, einen gewissen Abstand zwischen Enzym und Träger zu ermöglichen. Dies vermindert die Wechselwirkungen des Trägers mit dem Enzym.

Als Spacer werden oft Amine, zum Beispiel Hexamethyldiamin verwendet. Diese können durch 1, 1'-Carbonyldiimidazol mit dem Enzym gekuppelt werden (Arica et al, 2000 und 1999), aber die Ausbeuten sind meist gering. Eine Kettenverlängerung von Hexamethyldiamin mit Glutardialdehyd erwies sich als die bessere Alternative (Arica et al,

2004). Glutardialdehyd wird oft zur Aktivierung der Partikel benutzt, um dann eine kovalente Bindung mit dem Enzym zu knüpfen (Onyezili, 1986), allerdings muss man auf Grund der hohen Reaktivität von Glutardialdehyd dessen Verhalten in wässrigen Lösungen, vor allem die Polymerisation von Glutardialdehyd, bedenken (Migneault et al, 2004). Eine nachträgliche Reduzierung des durch die Amin- und die Aldehydgruppe formierten Imins zum Amin mit Natriumborhydrid führt zu einer weiteren Steigerung der Stabilität, allerdings auf Kosten der spezifischen Aktivität (Bianchi et al, 1996).

Die Spacerlänge hat einen gewichtigen Einfluss auf die spezifische Aktivität des Enzyms. Schon in den neunziger Jahren wurden ein Zusammenhang zwischen der Beladung und der Spacerlänge festgestellt, wobei diese für kleinere Enzyme (Ribonuclease, 13.7 kmol/g, Trypsin, 23,6 kmol/g,  $\alpha$ -Chymotrypsin, 25.0 kmol/g) ein Maximum bei drei Oxyethyleneinheiten (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-) ergab und nur die deutlich größere Urease (483 kmol/g) einen linearen Anstieg der Beladung mit der Spacerlänge ergab (Manecke und Polakowski, 1981). Ebenso ergaben verschiedene Spacermoleküle unterschiedlicher Länge (von einer direkten Immobilisierung, also ohne Spacer bis hin zu Bovine Serum Albumin mit einer Länge von 9 nm als Spacer) eine deutliche Zunahme der Beladung und Aktivität (Nouaimi et al, 2001). Dhal und Babu (1985) beluden Polymerträger einmal direkt mit Enzym, einmal über Hexamethyldiamin und einmal mit Lysin, jeweils mit Glutardialdehyd aktiviert. Es zeigte sich, dass ein mit einem endlos langen Spacer immobilisiertes Enzym sich dem freien Enzym anpassen würde, da mit längerem Spacer sowohl die Aktivität stieg, als auch das pH-Optimum und die Temperaturstabilität sich dem des freien Enzyms anpassten. Eine Möglichkeit die Eigenschaften kurzer Spacer (meist hohe Stabilität) mit langen Spacern (höhere spezifische Aktivität) zu kombinieren ist die Verwendung von intelligenten Polymeren, die ihre Länge mit der Temperatur verändern (Ivanov et al, 2003, Yasui et al, 1997). Das Problem der Diffusionslimitierung konnte damit deutlich reduziert werden. Eine weitere Methode zur Reduzierung der Diffusionslimitierung sind nicht-isothermische Bedingungen (Schroen et al, 2001), diese Arbeitsgruppe hat auch den Einfluss der Diffusionslimitierung des Substrates genauer untersucht (Schroen et al, 2002).

$\beta$ -Galactosidase wurde ebenfalls mit Spacern verschiedener Länge immobilisiert und dabei umfangreich (unter isothermischen und nicht-isothermischen Bedingungen) untersucht. Die Autoren (De Maio et al, 2003a und 2003b) zeigten wie auch Dhal und Babu auf, dass sich die Eigenschaften eines immobilisierten Enzyms mit zunehmender Spacerlänge der des freien Enzyms annähert.

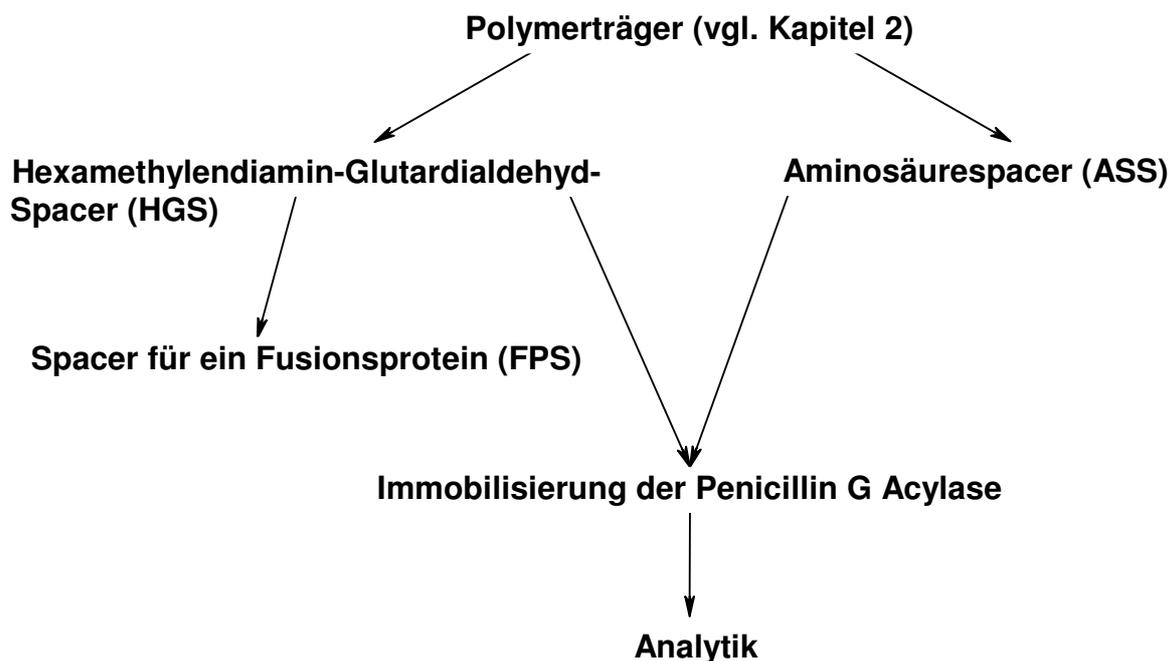
Da der Spacer gezielt modifiziert werden kann, ist es möglich, die Beladung durch Modifizierung der funktionellen Gruppen zu erhöhen. Dabei wurden 10 bis 20% der Epoxygruppen in ionische Gruppen oder Metallchelate umgewandelt. Durch die anziehenden Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen des Spacers mit dem Enzym wurde eine höhere Beladung erzielt und das Enzym nicht-kovalent gebunden. Danach fand eine kovalente Immobilisierung über die verbleibenden Epoxygruppen statt (Mateo et al, 2000). Je nach Anzahl der funktionellen Gruppen, die für die Immobilisierung zu Verfügung stehen und bei geeigneter Reaktionsführung kann ein Enzym einfach oder mehrfach gebunden werden (Mateo et al, 2001). Letzteres ermöglicht höhere Stabilitäten des Enzyms. Penicillin G Acylase, immobilisiert mittels Glutardialdehyd, war durch die Mehrfachbindung im Vergleich zur Einfachbindung deutlich stabiler im Bezug auf pH und Temperatur (Adriano et al, 2005a und 2005b). Auch andere Gruppen verwendeten Mehrfachbindungen um die Stabilität von immobilisierten Enzymen zu erhöhen (Eldin et al, 2000, Fernandez-Lafuente et al, 1999 und 1992, Guisan, 1988). Eine Arbeitsgruppe immobilisierte das Enzym erst unter milden Bedingungen nicht-kovalent, fixierte das Enzym dann durch höhere pH-Werte und längere Reaktionsdauer kovalent an den Träger und blockierte schließlich die übrig gebliebenen Gruppen mit Mercaptoethanol, um eine Weiterreaktion mit dem Enzym zu verhindern (Mateo et al, 2002)

Durch die große Strukturvielfalt sind Aminosäuren als Spacermoleküle sehr geeignet, da sie sowohl für hydrophobe, als auch hydrophile Spacer, geladen oder ungeladen, verwendet werden könnten. Zudem ist die Synthese an festen Phasen bereits fest etabliert (Merrifield, 1963). Die heute verwendeten Syntheserouten verwenden speziell dafür optimierte Schutzgruppen, Kupplungsreagenzien und Reaktionsbedingungen. Dadurch werden Ausbeuten nahe 100% und kurze Reaktionszeiten ermöglicht (Chan und White, 2003). Im Gegensatz zur ursprünglichen Merrifield Festphasensynthese sind diese Syntheserouten auf die Fmoc-Schutzgruppe (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) für die  $\alpha$ -Aminogruppe ausgelegt, so dass hohe pH-Werte vermeiden werden, da diese Schutzgruppe basisch abgespalten wird (Chan und White, 2003). Auch die meisten käuflichen Aminosäuren sind in dieser Weise geschützt. Diese Syntheseroute wird Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis (FSPPS) genannt.

Magnetische Träger werden ebenfalls für FSPPS-Route verwendet (Szymonilka und Chapman, 1995), so dass auch kleinere Träger in der automatisierten Synthese verwendet werden können. Dabei können auch Dendrimere erzeugt werden, so dass eine hohe Anzahl von funktionellen Gruppen gewährleistet werden kann (Sadler und Tam, 2002).

### 3.2. Übersicht

Die in Kapitel 2 synthetisierten Polymerträger (Polymethylacrylat, Polyvinylacetat) wurden durch Spacer weiter funktionalisiert. Dabei wurde der Spacer (engl. Abstandshalter) dazu verwendet, das Enzym kovalent zu binden und durch die Variation der Spacerlänge den Abstand zwischen Enzym und Träger zu verändern. Dazu wurden der Hexamethylendiamin-Glutardialdehyd-Spacer (HGS, HG-Spacer) und der Aminosäurespacer (ASS, AS-Spacer) (vgl. Abb.25) verwendet.



**Abb.25:** Übersicht zum Kapitel 3.

Sowohl der HG-Spacer, als auch der AS-Spacer wurden im Bezug auf die Spacerlänge variiert. Durch die Verwendung unterschiedlicher Aminosäuren wurde der AS-Spacer auch strukturell modifiziert. Beide Spacer wurden verwendet, um das Modellenzym Penicillin G Acylase von *E. coli* kovalent zu immobilisieren.

Auf Basis des HG-Spacers wurde auch für eine spezielle Anwendung ein Spacer konstruiert. Dieser Auftragsspacer (ATS, AT-Spacer) wurde so konstruiert, dass ein Protein durch eine irreversible Inhibition mittels des Spacers immobilisiert wurde.

### 3.3. Material und Methoden

Die Parameter der Synthesen des HG-Spacers und AS-Spacers wurden optimiert, um die Modifizierungen der Spacer durchzuführen. Nachdem diese Methoden etabliert waren,

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

wurden die Spacer mit Glutardialdehyd, Epichlorhydrin oder Carbonyldiimidazol aktiviert, um das Modellenzym Penicillin G Acylase zu binden.

### 3.3.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

Folgende Geräte und Chemikalien wurden für die Spacersynthesen, Immobilisierungen und Analyse eingesetzt:

#### Verwendete Geräte

- Filtermedium zur Wägung:  
Cellulose Nitrat Filter, 0,45 µm (Sartorius, Sartorius AG Göttingen, Deutschland)
- Filtermedium zur Wägung:  
Polyethersulfone Filter, 0,45 µm (PAL Gelman Lab, PAL Corporation, USA)
- Gefriertrocknung:  
Gefriertrocknungsanlage BETA 1-8 K (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)
- Magnetseparation:  
Permanentmagnet (Nd-Fe-B), 48 mm \* 28 mm \* 15 mm, 850 mT (Steinert Elektromagnetbau GmbH, Deutschland)
- Proteingehaltsbestimmung:  
Cobas Mira Plus Spectrophotometric Roboter (Roche, Basel, Schweiz)
- Reaktionsführung, Schüttler:  
Kompaktschüttler KS 15A (Edmund Büchler GmbH, Deutschland)
- Reaktionsführung: Schüttler:  
Vortex Genie 2T (VWR International AG, Bruchsal, Deutschland)
- Reaktionsführung, Schüttler und Heizer:  
Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Deutschland)
- Reinstwassererzeugung:  
Milli-Q Plus Ultra Pure-Reinstwasseranlage (Millipore Corporation, USA)
- Ultraschallbehandlung:  
Ultraschall-Reinigungsgerät RK100H-beheizbares Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland)
- UV-Messungen:  
Shimadzu UV 1202-Spektrometer (Shimadzu, Japan)
- UV-Messung, Küvette:

Quarzpräzisionsküvette Suprasil, 2.00 mm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, Deutschland)

- Wägung:  
Adventurer Balance (Ohaus Corporation, USA)
- Zentrifugation:  
5415 D-Eppendorf Zentrifuge (Eppendorf AG, Deutschland)
- Zetapotentialbestimmung:  
ZetaSizer 5000-Zetapotentialmeßgerät (Malvern Instruments Ltd., Britannien)  
Automatic titration stand Mettler DL 21: Titrator (Mettler Toledo, Schweiz)

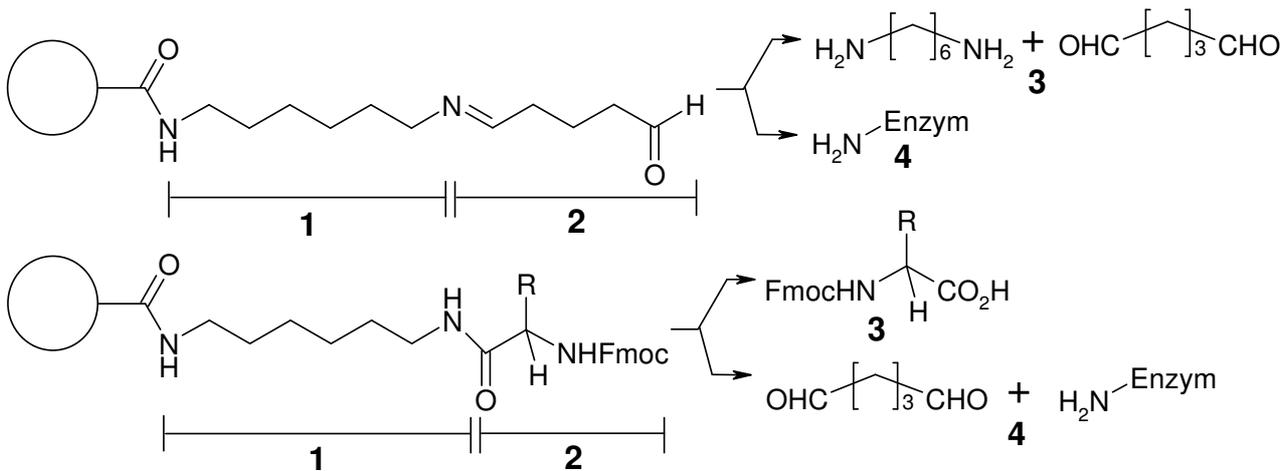
### Verwendete Chemikalien

- AcrosOrganics (Geel, Belgien)  
2-Chlorethanol (reinst)
- Iris Biotech GmbH (95615 Marktredwitz, Deutschland)  
Diisopropylcarbodiimid (reinst), Fmoc-Aminoisobutylsäure (reinst), Fmoc-Glycin (reinst), Fmoc-L-Asparaginsäure(tBu) (reinst), Fmoc-L-Lysin(Boc) (reinst), Fmoc-L-Phenylalanin (reinst), Fmoc-L-Prolin (reinst), 1-Hydroxybenzotriazol (reinst),
- Merck, Deutschland:  
Aceton (reinst), 6-Aminohexansäure (zur Synthese), 1, 1'-Carbonyldiimidazol (zur Synthese), 1, 6-Diaminohexan (zur Synthese), 1, 6-Dichlorhexan (zur Synthese), Dimethylformamid (zur Analyse, wasserfrei), Epichlorhydrin (zur Synthese), Ethanol (absolut, zur Analyse), Ethanolamin (reinst), Glutardialdehyd (zur Synthese), Kaliumcyanid (zur Analyse), Natriumazid (zur Synthese), Natriumborhydrid (zur Synthese), Natriumhydroxid (reinst), Ninhydrin (zur Analyse), Phenol (zur Synthese), Piperidin (zur Analyse), <sup>1</sup>Propanol (reinst), Pyridin (zur Analyse), Salzsäure (reinst), Tetrahydrofuran (reinst), Triethylamin (reinst), Trimethylsilaniodid (zur Synthese)
- Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:  
Bicinchoninsäure (reinst), Bovine Serum Albumin (1 mg/ ml aktives Protein, reinst) Lösung, 1, 1'-Carbonyldiimidazol (reinst), Kupfer(II)sulfat pentahydrat (4% w/v, reinst), Natriumtetraborat (reinst), 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB, reinst), Penicillin G Acylase (*E.coli*, 3.5.1.11, reinst), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, > 99%, GC), 2, 4, 6-Trinitrobenzonsulfonsäure (5% w/v, TNBS, reinst)

→ Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Qualität, es wurde stets Reinstwasser verwendet

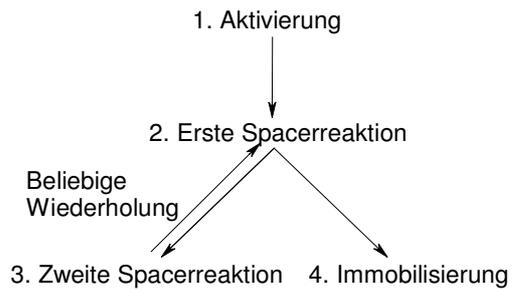
### 3.3.2. Übersicht über die Spacersynthesen

Der Spacer dient sowohl dazu, die funktionellen Gruppen des Partikels zu modifizieren, als auch das Enzym zu binden. Zusätzlich kann durch die Variation der Spacerlänge der Abstand des Enzyms zum Träger verändert werden (vgl. Abb.26).



**Abb.26:** Übersicht über die Spacerreaktionen: 1) Aktivierung, 2) Erste Spacerreaktion, 3) 2. Spacerreaktion, 4) Immobilisierung. Oben: Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer, unten: Aminosäurespacer.

Durch die Aktivierung (1) werden die Estergruppen des Polymers durch Aminogruppen ersetzt, diese befinden sich gleichzeitig etwas von der Partikeloberfläche entfernt und sind somit sterisch weniger gehemmt. Die Spacerreaktionen (2, 3) dienen dazu, die Länge des Spacers zu vergrößern um danach die Immobilisierung (4) zu begünstigen. Dadurch entsteht im Falle des Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacers (HGS, HG-Spacer) ein linearer Kohlenwasserstoffspacer, der alle zwölf Atome ein Heteroatom (Stickstoff) besitzt und somit ein hydrophober Spacer ist, der die Immobilisierung durch hydrophobe Wechselwirkungen begünstigt. Im Falle des Aminosäurespacers (ASS, AS-Spacer) entsteht ein in der Hydrophilie variabler Spacer, bei dem im Schnitt jedes dritte Atom ein Heteroatom ist. Dabei ist der HG-Spacer ein Spacer, der in der Biotechnologie zur Immobilisierung weit verbreitet ist, wobei der AS-Spacer eine neuartige Anwendung von Aminosäuren als Spacer für Enzymimmobilisierungen darstellt. Da die allgemein verwendeten proteinogenen Aminosäuren eine große Strukturvielfalt bereitstellen, ist die Struktur des AS-Spacers ebenso wie dessen Länge stark modifizierbar.



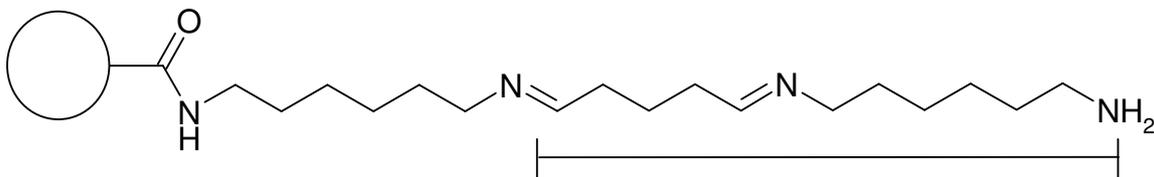
Sowohl dissoziierbare Gruppen, als auch aromatische Systeme können als Seitengruppen verwendet werden. Es können sowohl lineare, als auch verzweigte Spacer mit fast beliebigen Seitengruppen synthetisiert werden, zudem ist die dafür verwendete Festphasensynthese bereits fest etabliert.

Die Länge der Spacer wurde geometrisch mit den entsprechenden Bindungswinkeln und Bindungslängen (Smith und March, 2001) unter Annahme idealer Linearität berechnet (vgl. Abb.27).

### 3.3.3. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des Hexamethyldiamin-Glutarialdehyd-Spacers

Um eine gleiche Ausgangsbasis zu schaffen, wurde die Aktivierung der Polymerpartikel für den 10 g Maßstab optimiert. Da jeweils Proben von 50 mg für die Immobilisierung verwendet wurden, konnten so mehrere Versuchsreihen mit Partikeln derselben Aktivierungsreaktion durchgeführt werden. Die weiteren Spacerreaktionen wurden auf einen Maßstab von 50 bis 250 mg ausgelegt, da diese in 2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt wurden, um mehrere Reaktionen parallel in einem Thermomixer durchführen zu können.

Die Synthese des HG-Spacers (vgl. Abb.27) wurde durch Optimierung einiger Syntheseparameter verbessert und den Erfordernissen angepasst.



**Abb.27:** Aktivierte Polymerpartikel mit einer Spacereinheit des HG-Spacers (Markierung).

Für die Optimierung wurden folgende Größen in der Aktivierungsreaktion mit Hexamethyldiamin verändert:

- Reaktorgefäß: 250 ml Erlenmeyerkolben
- Rührgeschwindigkeit: 400 bis 900 U/min
- Temperatur: 25 bis 80 °C
- Reaktionsdauer: 1 bis 72 h
- Hexamethyldiamin-Konzentration: 0.4 bis 5.0 mol/l
- 100 bis 200 Moläquivalente Hexamethyldiamin wurden im Bezug zur Stoffmenge an funktionellen Gruppen auf dem Träger zugegeben.

In der ersten Funktionalisierungsreaktion mit Glutardialdehyd wurden folgende Parameter verändert:

- Reaktorgefäß: 2 ml Reaktionsgefäße
- Rührgeschwindigkeit: 400 bis 1400 U/min
- Temperatur: 25 bis 60 °C
- Reaktionsdauer: 1 und 72 h
- Glutardialdehyd-Konzentration: 0.4 bis 5.0 mol/l
- 100 bis 200 Moläquivalente Glutardialdehyd wurden im Bezug zur Stoffmenge an funktionellen Gruppen auf dem Träger zugegeben.

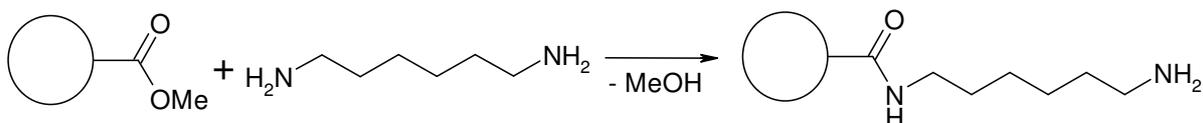
Anschließend wurde die Aktivierungsreaktion mit Hexamethyldiamin den weiteren Erfordernissen angepasst und zur zweiten Funktionalisierungsreaktion umgewandelt, dabei wurden folgende Parameter verändert:

- Reaktorgefäß: 2 ml Reaktionsgefäße
- Rührgeschwindigkeit: 400 bis 1400 U/min
- Temperatur: 25 bis 60 °C
- Reaktionsdauer: 1 bis 24 h
- Hexamethyldiamin-Konzentration: Unverändert 3.9 M
- 100 bis 130 Moläquivalente Hexamethyldiamin wurden im Bezug zur Stoffmenge an funktionellen Gruppen auf dem Träger zugegeben.

Bis auf die Aktivierungsreaktion, die auch im größeren Maßstab dargestellt wurde, um aktivierte Partikel als Vorrat zu haben, wurden bei beiden Funktionalisierungsreaktionen Imine gebildet. Daher wurden beide Reaktionen ähnlich optimiert.

### Reaktionsvorschrift der Aktivierung

Durch die Optimierung der Synthese war es möglich, die Anforderungen an die Aktivierung, eine hohe Anzahl an funktionellen Gruppen und einen Ansatz im Grammbereich zu erfüllen.



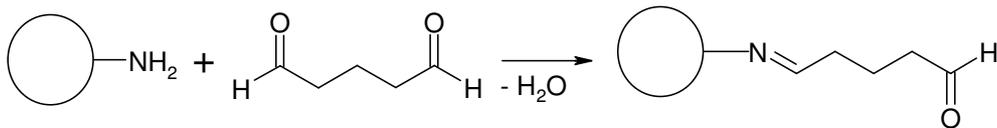
**Abb.28:** Aktivierung der Polymethylacrylat-Partikel durch Hexamethyldiamin.

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 180 ml Hexamethyldiamin-Lösung (50w% in Wasser, 3.9 M, 130 Moläquivalente) pro g Partikel 24 h lang bei 60°C und 700 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden anschließend gründlich mit Wasser gewaschen und bei 4°C in Wasser gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation.

Die in den Reaktionen verwendete Partikelmenge lag zwischen 10 und 20 g.

### Reaktionsvorschrift der ersten Funktionalisierung

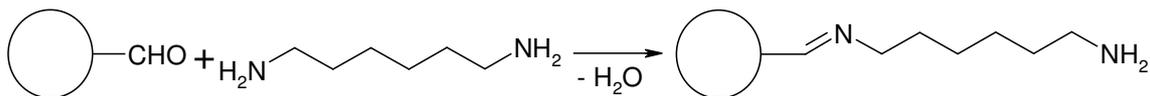


**Abb.29:** Erste Funktionalisierungsreaktion des HG-Spacers.

Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 25 ml Glutardialdehydlösung (42w% in Wasser, 3.9 M, 130 Moläquivalente) pro g Partikel 1 h lang bei 40°C und 1400 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden gründlich mit Wasser gewaschen und bei 4°C in Wasser gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikel lag zwischen 50 und 250 mg.

### Reaktionsvorschrift der zweiten Funktionalisierung



**Abb.30:** Zweite Funktionalisierungsreaktion des HG-Spacers.

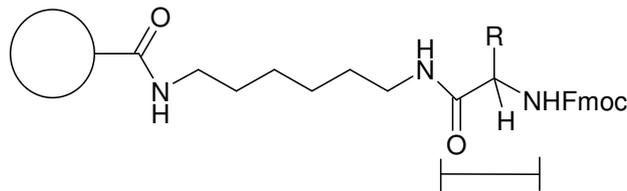
Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 18 ml Hexamethyldiamin-Lösung (50w% in Wasser, 3.9 M, 130 Moläquivalente) pro g Partikel 1 h lang bei 40°C und 1400 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden gründlich mit Wasser gewaschen und bei 4°C in Wasser gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikel lag zwischen 50 und 250 mg.

Die Vorreaktion für die Immobilisierung wurde ebenfalls mit Glutardialdehyd (vgl. erste Funktionalisierungsreaktion) durchgeführt.

### 3.3.4. Optimierung und resultierende Synthesevorschrift des Aminosäurespacers

Die Partikel wurden mit derselben Reaktionsvorschrift wie für den HG-Spacer aktiviert (vgl. Kapitel 3.3.3). Da die weiteren Spacerreaktionen im Gegensatz zum HG-Spacer allerdings in organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden, unterschied sich die weitere Vorgehensweise deutlich.



**Abb.31:** Aktivierte Polymerpartikel mit einer Spacereinheit des AS-Spacers (Markierung).

Da die Reaktionen, basierend auf der Merrifield-Technik, bereits hervorragend optimiert sind, wurden diese nur noch an die vorliegenden Erfordernisse angepasst. Dazu wurden folgende Parameter der Funktionalisierung (Kupplung) verändert:

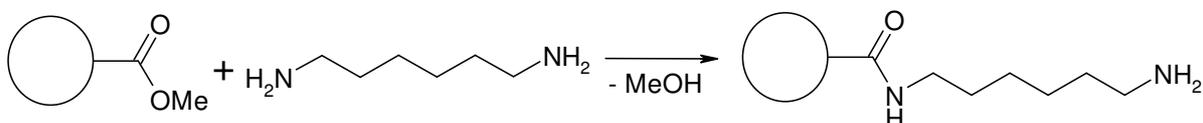
- Reaktorgefäß: 2 ml Reaktionsgefäße
- Rührgeschwindigkeit: 400 bis 1400 U/min
- Temperatur: 25 bis 40 °C
- Reaktionsdauer: 20 min bis 24 h
- Die Menge an Dimethylformamid als Lösungsmittel ist von 2.0 bis 6.0 ml/g<sub>HOBt+Fmoc-AS</sub> variiert worden.

Die Aktivierungsreaktionen, die zur Immobilisierung des Enzyms notwendig sind, wurden ebenfalls den Anforderungen angepasst:

- Glutardialdehydaktivierung: Analog der ersten Funktionalisierung des HG-Spacers
- Epichlorhydrinaktivierung: Diese Reaktion fand erst nach der Optimierung der anderen Reaktionen Verwendung, deshalb wurden deren Parameter übernommen und nur die Temperatur im Bereich von 25 bis 60 °C variiert.

Alle anderen Parameter konnten aus der Literatur (Chan und White, 2003) übernommen werden.

#### Reaktionsvorschrift der Aktivierung

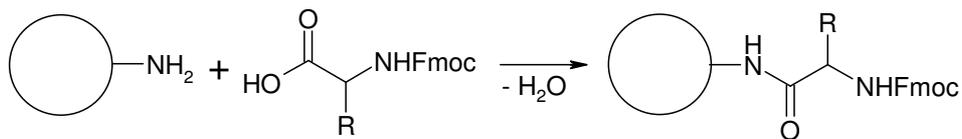


**Abb.32:** Aktivierung der Polymethylacrylat-Partikel durch Hexamethyldiamin.

Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 180 ml Hexamethyldiamin-Lösung (50w% in Wasser, 3.9 M) pro 10 g Partikel 24 h lang bei 60°C und 700 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden gründlich mit Wasser gewaschen und bei 4°C in Wasser gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation, der Überschuss an Reagenz im Bezug auf die Partikel betrug 130 zu 1.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikeln lag zwischen 10 und 20 mg.

### Reaktionsvorschrift der Funktionalisierung (Kupplung)



**Abb.33:** Kupplungsreaktion einer Aminosäure an eine Aminogruppe.

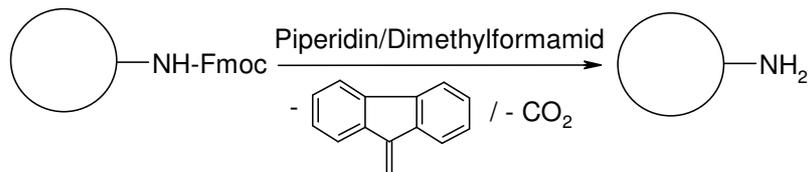
In einem 2 ml Reaktionsgefäß wurden je 5 Moläquivalente 1-Hydroxybenzotriazol (0.20 g/g<sub>Partikel</sub>) und 5 Moläquivalente Fmoc-Aminosäure (0.45 g/g<sub>Partikel</sub>) in berechneter Menge an Dimethylformamid (4.6 ml/g<sub>HOBT+Fmoc-AS</sub>) gelöst, dann erfolgte die langsame Zugabe von 5 Moläquivalente Diisocarbonyldiimidazol (0.23 ml/g<sub>Partikel</sub>). Anschließend wurde 20 min bei 25°C mit 400 U/min geschüttelt. Diese Lösung wurde zu einem Moläquivalente Partikel (in einem weiteren 2 ml Reaktionsgefäß, die Partikel müssen vorher mit Dimethylformamid gewaschen worden sein) gegeben und anschließend 3 h bei 40°C bei 1400 U/min geschüttelt. Danach wurden die Partikel fünfmal mit Dimethylformamid (100 $\mu\text{l}$  – 1200 $\mu\text{l}$ ) gewaschen und 5 mg für den Kaisertest (zur Bestimmung freier Aminogruppen) entnommen. Sollte der Test positiv ausfallen, war eine erneute Kupplung nötig.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikeln lag zwischen 50 und 250 mg.

### Reaktionsvorschrift des Kaisertests

Nach fünfmaligem Waschen der Partikel (5 mg) mit Ethanol (100 $\mu\text{l}$ ), wurde zu den Partikeln jeweils zwei Tropfen von den drei Reaktionslösungen (50 g/l Ninhydrin (5%-w/v) in Ethanol, 800 g/l Phenol (80%-w/v) in Ethanol, 2 ml Kaliumcyanid<sub>0.001M</sub> in 98 ml Pyridin)) zugeben, diese und eine Blindprobe wurden dann bei 95°C 10 min lang bei 1400 U/min geschüttelt. Eine blaue Färbung zeigte einen positiven Test und damit freie Aminogruppen an (Kaiser et al, 1970).

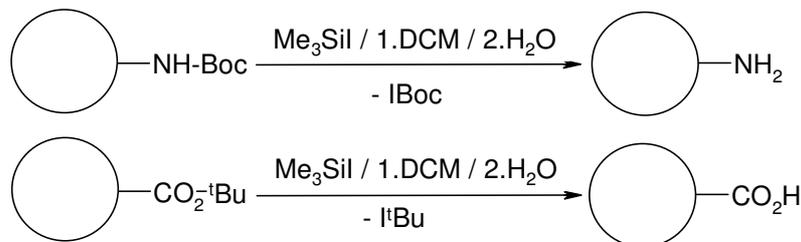
### Reaktionsvorschrift der Fmoc-Entschützung



**Abb.34:** Fmoc-Entschützung der Aminogruppe.

Zu den Partikeln (DMF-feucht) wurde 20v% Piperidin in Dimethylformamid hinzugegeben (100  $\mu\text{l}$  – 1200  $\mu\text{l}$ ), diese für 2 min bei 25 °C und 1400 U/min geschüttelt danach wurde das Lösungsmittel entfernt und dieser Schritt zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Dimethylformamid (100  $\mu\text{l}$  – 1200  $\mu\text{l}$ ) gewaschen.

### Reaktionsvorschrift der Boc/<sup>t</sup>Bu-Entschützung

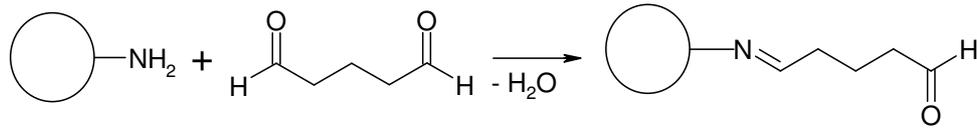


**Abb.35:** Alternative Entschützungsmethode für Boc und <sup>t</sup>Bu –Schutzgruppen (Adams et al, 2002, Olah und Narang, 1982).

Da beide Schutzgruppen sauer abgespalten werden müssen, wurde eine alternative Entschützungsmethode verwendet (Adams et al, 2002, Olah und Narang, 1982).

50 mg Partikel wurden fünfmal mit Acetonitril und anschließend fünfmal mit Dichlormethan gewaschen. Die auf 0 °C gekühlten Partikel wurden mit einer ebenfalls bei 0 °C aufbewahrten Reaktionslösung (125  $\mu\text{l}$  Trimethylsilaniodid in 4875  $\mu\text{l}$  Dichlormethan) versetzt (1.2 Moläquivalente) und 5 min bei 0 °C und 1400 U/min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde der Überstand durch 5 ml Wasser ersetzt und der Ansatz 5 min bei 25 °C und 1400 U/min geschüttelt. Das Wasser wurde dann entfernt und die Partikel je fünfmal mit Acetonitril und Dimethylformamid gewaschen. Direkt nach der Reaktion auftretende Agglomerationen wurden dadurch wieder aufgelöst.

### Reaktionsvorschrift der Glutardialdehyd- Aktivierung

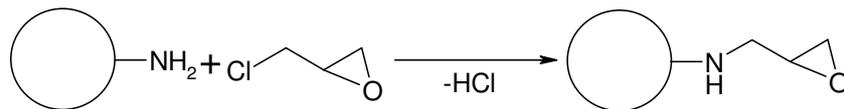


**Abb.36:** Aktivierung der Partikel mit Glutardialdehyd.

Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 25 ml Glutardialdehydlösung (42w% in Wasser, 3.9 M, 130 Moläquivalente) pro g Partikel 1 h lang bei 40°C und 1400 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden gründlich mit Wasser gewaschen und bei 4°C in Wasser gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikel lag zwischen 50 und 250 mg.

### Reaktionsvorschrift der Epichlorhydrin-Aktivierung



**Abb.37:** Aktivierung der Partikel mit Epichlorhydrin.

Die Partikel (500  $\mu\text{mol}$  funktionelle Gruppen) wurden mit 12 ml Epichlorhydrinlösung (3.9 M, 130 Moläquivalente) pro g Partikel 1 h lang bei 40°C und 1400 U/min zur Reaktion gebracht. Die funktionalisierten Partikel wurden gründlich mit Aceton gewaschen und bei 4°C in Aceton gelagert. Die Trennung erfolgte mittels Magnetseparation.

Die in den Reaktionen verwendete Menge an Partikeln lag zwischen 50 und 250 mg.

### 3.3.5. Variationen der Spacer

Der Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer (HG-Spacer) ist ein einfacher Spacer, dessen Verwendung in der Immobilisierung von Enzymen weit verbreitet ist. Dieser wurde nur in seiner Länge von 1.62 bis 16.2 nm variiert, dies entspricht, da eine Spacereinheit aus je einem Molekül Hexamethyldiamin und Glutardialdehyd besteht, zehn Spacereinheiten. Nach jeder Spacereinheit (1.62 nm) fand eine Immobilisierung statt.

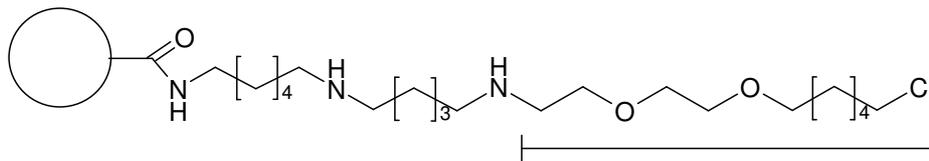
Der Aminosäurespacer hingegen ist ein sehr flexibel veränderbarer Spacer, der in seiner Länge (2.9 bis 9.1 nm) und Struktur (Verwendung der Aminosäuren  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure, L-Asparaginsäure, Glycin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Prolin) verändert wurde. Da jede Aminosäure einer Spacereinheit entspricht, beinhaltet dies, zusätzlich zur Aktivierung der

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

Partikel durch Hexamethyldiamin, die Synthese von 24 Spacereinheiten. Alle vier Spacereinheiten (alle 1.2 nm) fand eine Immobilisierung statt.

### 3.3.6. Synthese eines Auftragsspacers

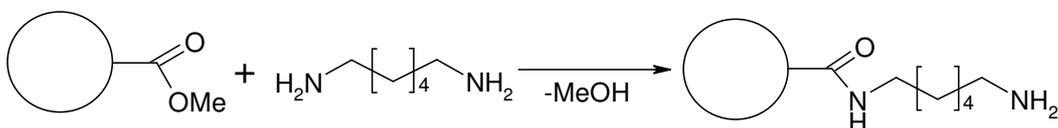
Um die Flexibilität der Spacerfunktionalisierung an Trägersystemen zu belegen, wurde die kovalente Immobilisierung eines Proteins durch eine irreversible Inhibierung durchzuführen. Dazu wurde folgender Spacer (genannt Auftragsspacer, ATS, AT-Spacer) in einer sechs Stufen Synthese dargestellt (vgl. Abb.38).



**Abb.38:** Am Partikel gebundener Auftragsspacer.

Der markierte Teil des Auftragsspacers (vgl. Abb.38) ist für die irreversible Inhibierung und damit kovalente Bindung der Dehalogenase ausgelegt. Für die Synthese diese Spacers waren folgende Schritte notwendig:

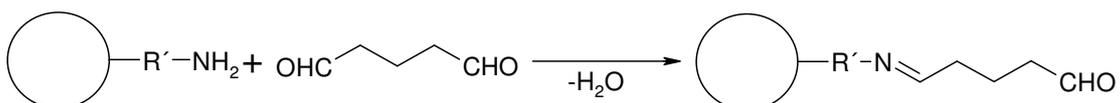
#### Reaktionsvorschrift der Aktivierung



**Abb.39:** Aktivierung der Partikel mit Hexamethyldiamin.

Die Partikel wurden mit 17 ml Hexamethyldiamin (50w%, 3.9 M) pro g Partikel 24 h bei 60°C und 500 U/min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Wasser gewaschen.

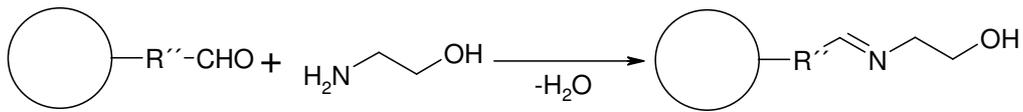
#### Reaktionsvorschrift der ersten Funktionalisierung



**Abb.40:** Erste Funktionalisierung des Auftragsspacers.

Die Partikel wurden mit 11 ml Glutardialdehyd (42w%, 3.9 M) pro g Partikel 24 h bei 25°C und 500 U/min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Wasser gewaschen.

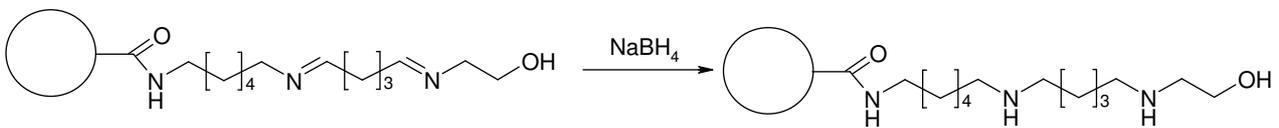
### Reaktionsvorschrift der zweiten Funktionalisierung



**Abb.41:** Zweite Funktionalisierung des Auftragsspacers.

Die Partikel wurden mit 3.5 ml Ethanolamin (3.9 M) pro g Partikel 24 h bei 25°C und 800 U/min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Wasser gewaschen.

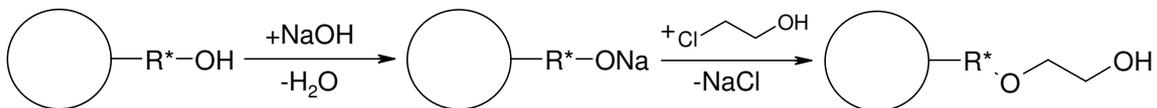
### Reaktionsvorschrift der Reduktion der Amidbindungen



**Abb.42:** Reduktion der Aminogruppen des Auftragsspacers.

Die Partikel wurden in 70 ml Wasser mit 40 mg Natriumborhydrid pro g Partikel 45 min bei 25°C und 800 U/min zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Wasser gewaschen.

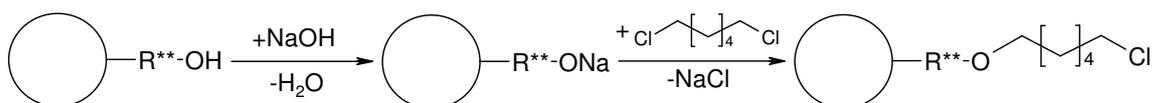
### Reaktionsvorschrift der dritten Funktionalisierung



**Abb.43:** Dritte Funktionalisierung des Auftragsspacers.

Die Partikel wurden mit 15 ml Natronlauge (10w%, 2.8 M) pro g Partikel 5 h bei 25°C und 800 U/min zur Reaktion gebracht. Danach wurde die Natronlauge vorsichtig abgegossen. Die Partikel reagierten mit 4 ml 2-Chlorethanol (5 M) pro g Partikel 24 h bei Raumtemperatur und 500 U/min. Anschließend wurden die Partikel fünfmal mit Wasser gewaschen.

### Reaktionsvorschrift der vierten Funktionalisierung



**Abb.44:** Vierte Funktionalisierung des Auftragsspacers.

Die Partikel wurden mit 15 ml Natronlauge (10w%, 2.8 M) pro g Partikel 5 h bei 25°C und 800 U/min zur Reaktion gebracht. Danach wurde die Natronlauge vorsichtig abgegossen und die Partikel dreimal mit Tetrahydrofuran gewaschen. Die Partikel reagierten mit 8 ml

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

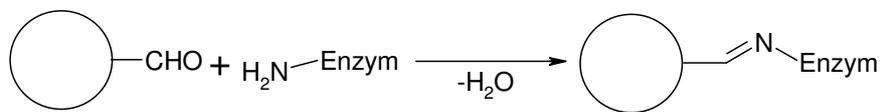
Dichlormethan (2 M) pro g Partikel in 700 ml Tetrahydrofuran und 3.5 ml Triethylamin 24 h bei 60 °C und 500 U/min. Anschließend wurden die Partikel je fünfmal mit Tetrahydrofuran und Wasser gewaschen.

Die Partikel wurden in Wasser bei 4 °C gelagert.

### 3.3.7. Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

Im abschließenden synthetischen Schritt wurde das Enzym immobilisiert, dabei wurden verschiedene Techniken verwendet:

#### Reaktionsvorschrift der Immobilisierung mittels Glutardialdehyd



**Abb.45:** Immobilisierung des Enzyms mittels Glutardialdehyd.

50 mg Träger wurden mit einer entsprechenden Menge Penicillin G Acylase-Lösung immobilisiert, so dass die Konzentration  $100 \text{ mg}_{\text{PA}} - \text{Aktivität}/\text{g}_{\text{Träger}}$  (Penicillin Amidase in 4 ml bis 5 ml Phosphatpuffer (I = 1.0 M, pH = 7.5)) entsprach. Danach erfolgte die Reaktion über 40 h bei 40 °C, die Waschung erfolgte durch verschiedene Puffer. Es wurde jeweils einmal mit Phosphatpuffer (I = 1 M, pH = 7.5), Natriumacetatpuffer (I = 0.1 M, pH = 3.75). Bicarbonatpuffer (I = 0.2 M, pH = 9.0) und anschließend solange mit Phosphatpuffer (I = 0.2 M, pH = 7.5) gewaschen, bis keine Aktivität des Enzyms mehr messbar war. Die Trennung erfolgte stets durch Magnetseparation mit einem Permanentmagneten. Die Waschung mit Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung, Ionenstärke und pH dient dem Zweck, alle nicht kovalenten Bindungen zu lösen und so jegliches Enzym bis auf das kovalent gebundene Enzym vom Träger zu waschen. Die immobilisierte Penicillin Amidase wurde in Phosphatpuffer (I = 0.2 M, pH = 7.5) bei 4 °C gelagert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Umsetzung von NIPAB gemessen (vgl. Kapitel 3.4.).

#### Reaktionsvorschrift der Immobilisierung mittels Epichlorhydrin

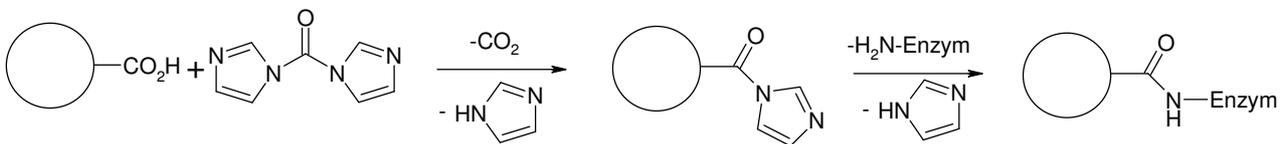


**Abb.46:** Immobilisierung des Enzyms mittels Epichlorhydrin.

50 mg Träger wurden erst mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 70:30, dann mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 30:70 und schlussendlich dreimal mit reinem Wasser gewaschen.

Diese Partikel wurden mit einer entsprechenden Menge Penicillin G Acylase-Lösung immobilisiert, so dass die Konzentration  $100 \text{ mg}_{\text{PA}} - \text{Aktivität}/\text{g}_{\text{Träger}}$  (Penicillin Amidase in 4 ml bis 5 ml Phosphatpuffer ( $I = 1.0 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ )) entsprach. Danach erfolgte die Reaktion über 40 h bei  $40^\circ\text{C}$ , die Waschung erfolgte durch verschiedene Puffer. Es wurde jeweils einmal mit Phosphatpuffer ( $I = 1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ), Natriumacetatpuffer ( $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 3.75$ ), Bicarbonatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 9.0$ ) und anschließend solange mit Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) gewaschen, bis keine Aktivität des Enzyms mehr messbar war. Die Trennung erfolgte stets durch Magnetseparation mit einem Permanentmagneten. Die Waschung mit Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung, Ionenstärke und pH dient dem Zweck, alle nicht kovalenten Bindungen zu lösen und so jegliches Enzym bis auf das kovalent gebundene Enzym vom Träger zu waschen. Die immobilisierte Penicillin Amidase wurde in Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Umsetzung von NIPAB gemessen (vgl. Kapitel 3.4.).

### Reaktionsvorschrift der Immobilisierung mittels Carbonyldiimidazol



**Abb.47:** Immobilisierung des Enzyms mittels 1, 1'-Carbonyldiimidazol.

50 mg Träger wurden erst mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 30:70, dann mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 70:30 und schlussendlich dreimal mit reinem Aceton gewaschen. Anschließend wurde 0.10 g Carbonyldiimidazol (in 5 mL Aceton gelöst) hinzugegeben und 6 h lang bei  $25^\circ\text{C}$  funktionalisiert. Die Partikel wurden erst mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 70:30, dann mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis von 30:70 und schlussendlich dreimal mit reinem Wasser gewaschen.

Diese Partikel wurden mit einer entsprechenden Menge Penicillin G Acylase-Lösung immobilisiert, so dass die Konzentration  $100 \text{ mg}_{\text{PA}} - \text{Aktivität}/\text{g}_{\text{Träger}}$  (Penicillin Amidase in 4 ml bis 5 ml Phosphatpuffer ( $I = 1.0 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ )) entsprach. Danach erfolgte die Reaktion über 40 h bei  $40^\circ\text{C}$ , die Waschung erfolgte durch verschiedene Puffer. Es wurde jeweils einmal mit Phosphatpuffer ( $I = 1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ), Natriumacetatpuffer ( $I = 0.1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 3.75$ ).

Bicarbonatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 9.0$ ) und anschließend solange mit Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) gewaschen, bis keine Aktivität des Enzyms mehr messbar war. Die Trennung erfolgte stets durch Magnetseparation mit einem Permanentmagneten. Die Waschung mit Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung, Ionenstärke und pH dient dem Zweck, alle nicht kovalenten Bindungen zu lösen und so jegliches Enzym bis auf das kovalent gebundene Enzym vom Träger zu waschen. Die immobilisierte Penicillin Amidase wurde in Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch die Messung des Chromophors 5-Amino-2-nitrobenzoesäure nach der Hydrolyse von NIPAB (vgl. Kapitel 3.4.) gemessen.

### **3.4. Analytische Methoden**

Die Messung der primären Aminogruppen, wie auch die Aktivitätsmessungen erfolgten spektroskopisch. Die Epoxygruppen der funktionalisierten Partikel wurden durch Titration bestimmt. Die Trocknung der Partikel erfolgte durch Gefriertrocknung:

#### **Gefriertrocknung**

Das Trockengut wurde im Gefrierschrank gefroren und dann in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausgesetzt. Dadurch wird die Probe je nach Menge an Wasser innerhalb von wenigen Stunden, bei größeren Proben über Nacht, getrocknet.

Die Gefriertrocknung eignet sich besonders gut zum Trocknen von leicht zersetzlichen Stoffen, da es sich dabei um eine sehr schonende Methode handelt, die ohne hohe Temperaturen, die die Stoffe zersetzen können, auskommt (Jakubke und Karcher 1999). Das Trockengut wird dabei gefroren in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausgesetzt. Durch das dabei auftretende Dampfdruckgefälle zwischen dem gefrorenen Material und dem Kondensator setzt eine Sublimation des Eises ein.

#### **3.4.1. Bestimmung der Epoxygruppen mittels Titration**

Basis für die Bestimmung der Epoxygruppen ist die quantitative Umsetzung aller Epoxygruppen mit einem Überschuss an 6 – Aminohexansäure. Zu diesen vorbereiteten Partikeln wird eine definierte Menge Natronlauge zugegeben und die Partikel abgetrennt. Die restliche Natronlauge wird mit Salzsäure rücktitriert und so die Konzentration an Epoxygruppen bestimmt.

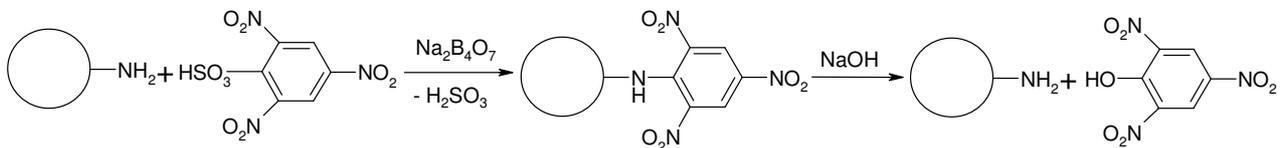


**Abb.48:** Reaktion der Epoxygruppen mit 6 – Aminohexansäure.

Die vorliegende Konzentration an Epoxygruppen wurde durch eine praxisorientierte Methode der Firma chemagen Biopolymer Technologie AG (Baesweiler, Deutschland) bestimmt:

25 mg Partikel (500  $\mu\text{mol}$ ) wurden mit einem Überschuss (60-fach, 17 ml) an 6-Aminohexansäure 24 h lang bei 50°C und pH 12 (mit Natronlauge<sub>1M</sub> eingestellt) unter intensiven Rühren inkubiert. Nach der Reaktion wurden die Partikel gründlich mit Wasser / Salzsäure / Wasser gewaschen. Die gewaschenen Partikel inkubierten in einem Überschuss an Natronlauge<sub>0,01M</sub> 3 h lang bei RT. Danach wurden die Partikel magnetisch separiert, der Überstand (der den Überschuss an Natronlauge enthält) wurde mit Salzsäure<sub>0,05M</sub> rücktitriert, um die Menge an nicht reagierter Natronlauge zu bestimmen. Daraus wurde die Menge an Epoxygruppen pro Gramm trockenem Träger durch die Massenbilanz bestimmt.

### 3.4.2. Messung der Aminogruppen mit 2, 4, 6-Trinitrobenzensäure (TNBS)



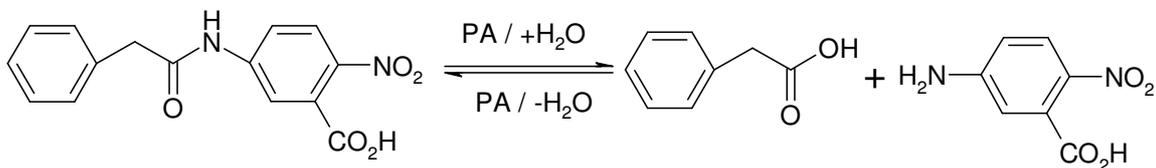
**Abb.49:** Reaktion der Aminogruppen mit 2, 4, 6-Trinitrobenzensäure (TNBS).

Die Konzentration der Aminogruppen auf den aktivierten, magnetischen Trägern wurde durch die von Bubnis und Ofner (1992) beschriebene Methode mit 2, 4, 6 – Trinitrobenzensäure (TNBS), modifiziert wie nachfolgend beschrieben, bestimmt. Eine bestimmte Menge Magnetitpartikel wurden mit 1 ml 0.1% w/v wässriger TNBS-Lösung (enthält 3% w/v Natriumtetraborat) 5 min lang bei 70°C unter intensiven Schütteln inkubiert. Danach wurden die Magnetitpartikel gründlich mit Wasser gewaschen und für 10 min mit 1.5 ml Natronlauge<sub>1M</sub> bei 70°C, ebenfalls unter intensivem schütteln, zur Reaktion gebracht. Danach wurden die Magnetitpartikel abgetrennt und entstandene Menge an 2, 4, 6-Trinitrophenol bei 410 nm mit reiner Natronlauge<sub>1M</sub> als Vergleich gemessen. Die Eichkurve von 2, 4, 6-Trinitrophenol wurde dadurch bestimmt, dass verschiedene TNBS-Konzentrationen (0 nmol bis 500 nm) mit 1.5 ml Natronlauge<sub>1M</sub> bei 70°C für 10 min inkubierten (intensives Schütteln) und die Konzentration von 2, 4, 6-Trinitrophenol bei 410 nm

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase spektroskopisch gemessen. Die Konzentration der Aminogruppen wurde in  $\mu\text{m}$  Aminogruppen pro g trockenem Träger bestimmt.

### 3.4.3. Messung der Enzymaktivität freier und immobilisierter Penicillin G Acylase

Die Aktivität der freien Penicillin G Acylase (PGA) wurde durch einen spektroskopischen Test mit Hilfe eines Chromophors, entstanden durch die Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoesäure (NIPAB) bestimmt (Kasche 1987). Dabei katalysiert das Enzym Penicillin G Acylase die Hydrolyse von NIPAB zu Phenylelessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure. Die entstandene Konzentration von letzterem wurde bei 380 nm gemessen (vgl. Abb.50).



**Abb.50:** Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoesäure (NIPAB) durch Penicillin G Acylase zu Phenylelessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure.

Dabei wurde folgende Formel zur Bestimmung der am Träger immobilisierten Enzymmenge verwendet:

$$m_{IE} = \frac{c_a * V_a - (c_e * V_e + \sum_{i=1}^n c_{wi} * V_{wi})}{m_p}$$

**Abb.51:** Menge an immobilisiertem Enzym.  $m_{IE}$ : Menge an immobilisierter Penicillin G Acylase auf trockenem Träger ([mg/g]),  $c_a$  ( $c_e$ ): Anfangskonzentration (Endkonzentration) der Penicillin G Acylase im Überstand ([mg/ml]),  $V_a$  ( $V_e$ ): Anfangsvolumen (Endvolumen) der Enzymlösung ([ml]),  $c_{wi}$ : Konzentration der Penicillin G Acylase in den Waschungen ([mg/ml]),  $V_{wi}$ : Volumen der Waschungen ([ml]),  $i$ : Anzahl der Waschungen ( $i = 1-n$ ) [-],  $m_p$ : Trockengewicht der Träger [g].

Das Spektrometer wurde mit 25  $\mu\text{l}$  NIPAB (5 mM) in 950  $\mu\text{l}$  Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) abgeglichen und die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von PGA (25  $\mu\text{l}$ ) bei 25 °C gestartet. Die durch die Katalyse mittels PGA entstandene Menge des Chromophors wurde spektroskopisch nach einer Minute gemessen. Die Menge an PGA wurde auf das Volumen der Ausgangslösung bezogen. Bei diesen Bedingungen verursacht die Ausgangslösung von 1  $\text{mg}_{\text{PGA}}/\text{ml}$  eine Änderung der Absorption von 3.0 Absorptionseinheiten pro Minute, dies entspricht 42 Units pro ml (Kasche 1987).

Die Aktivitätsmessung der immobilisierten PGA wurde wie von Galunsky (1994) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden folgende Änderungen gegenüber der ursprünglichen Vorschrift vorgenommen: Das Spektrometer wurde mit 25  $\mu\text{l}$  NIPAB (5 mM) Lösung in 950  $\mu\text{l}$

Phosphatpuffer ( $I = 0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7.5$ ) abgeglichen. Die Hydrolyse begann nach der Zugabe von immobilisierter PGA ( $25 \mu\text{l}$ ) und anschließender intensiven Durchmischung (Vortex Genie 2T) der Probe. Nach Reagieren bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  und Zentrifugieren wurde die immobilisierte PGA mittels Zentrifugieren abgetrennt und die Absorption des Überstandes bei  $380 \text{ nm}$  gemessen (der gesamte Vorgang dauerte  $1 \text{ min}$ ).

Der Aktivitätstest wurde auch dafür verwendet, um festzustellen ob nach der Waschung eines Immobilisates noch Aktivität im Überstand vorhanden war. Es wurde so lange gewaschen, bis der Test negativ ausfiel, dies bedeutet, dass das Immobilisat ausreichend gewaschen und keine Enzymmoleküle mehr an den Träger adsorbiert waren.

#### **3.4.4. Active Site Titration der Penicillin G Acylase**

Die Active Site Titration ist eine allgemein verwendete Methode für die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration von Penicillin G Acylase. Dabei wird das aktive Zentrum der Penicillin G Acylase (PGA) mit dem Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) irreversibel inhibiert (Svedas, 1977). Die verwendete Konzentration des Inhibitors PMSF beträgt zwischen  $0$  und  $60\%$  der eingesetzten Enzymkonzentration. Diese liegt im Bereich von  $10$  bis  $20 \mu\text{mol/l}$ . Dafür wird die PMSF-Lösung ( $20 \text{ mmol/l}$  in  $i$ Propanol) mit Phosphatpuffer ( $0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} 7.5$ ) verdünnt, die Verunreinigung mit  $i$ Propanol stört die Messung nicht (Van Langen et al, 2002, Janssen et al, 2002). Jedes Molekül PMSF acyliert selektiv das aktive Zentrum der PGA ( $\text{Serin}_{B1}$ ) und deaktiviert dadurch dieses PGA-Molekül irreversibel, so dass keine weiteren Substrate hydrolysiert werden können. Nachdem das freie Enzym oder die Träger mit immobilisiertem PGA inkubierten ( $20 \text{ min}$  für das freie und  $2 \text{ h}$  für das immobilisierte Enzym), wurde die verbliebene Aktivität wie oben beschrieben durch NIPAB gemessen. Die Probe ohne Inhibitor besitzt eine  $100\%$  Aktivität, die anderen Proben entsprechend der unterschiedlichen Zugabe an PMSF eine umso geringere Aktivität, je höher die Konzentration an PMSF war.

Dabei wird eine Enzymkonzentration von  $1 \text{ mg/ml}$  verwendet, das Gesamtvolumen beträgt  $1 \text{ ml}$ . Die sieben Proben bestehen stets aus  $25 \mu\text{l}$  Partikelsuspension,  $25 \mu\text{l}$  NIPAB ( $5 \text{ mM}$ ), Phosphatpuffer ( $0.2 \text{ M}$ ,  $\text{pH} 7.5$ ) mit je  $950, 940, 930, 910, 890, 870$  und  $850 \mu\text{l}$ , sowie PMSF ( $5 \mu\text{M}$ ) mit jeweils  $0, 10, 20, 40, 60, 80$  und  $100 \mu\text{l}$ . Dies entspricht der verbleibenden Aktivität der Enzymmoleküle von  $100, 94, 88, 76, 64, 52$ , und  $40\%$ . Diese verbleibende Aktivität in Prozent wird gegen die Konzentration des Inhibitors PMSF aufgetragen. Da eine Enzymaktivität von  $0$  eine Inhibierung von  $100\%$  bedeutet (jedes Enzymmolekül ist durch ein PMSF-Molekül inhibiert) wird durch die Extrapolation des Graphen auf die En-

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

zymaktivität von 0 die Konzentration der aktiven Zentren der Penicillin G Acylase in der Probe berechnet.

### 3.4.5. Messung der Gesamtproteinmenge von Penicillin G Acylase

Die gesamte Menge an immobilisierter PA wurde durch die Bicinchonin Säure Analyse (engl. Bicinchoninic acid, BCA) bestimmt. Dabei werden  $\text{Cu}^{2+}$  - Proteinkomplexe in alkalischem Milieu gebildet und anschließend das  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert. Die reduzierte Menge an Kupferionen ist proportional zur Menge an Protein (Cystein, Cystin, Tryptophan, Tyrosin und die Peptidbindung sind in der Lage  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  zu reduzieren). BCA bildet unter alkalischen Bedingungen einen blauen Komplex mit  $\text{Cu}^{1+}$ -Ionen. Dadurch ist die Reduktion der  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen durch Proteine im alkalischen Milieu spektroskopisch messbar. Als Standard wurde das Protein Bovine Serum Albumin verwendet. Diese Bestimmung wurde mit dem Cobas Mira Plus-Proteinmessroboter durchgeführt.

## 3.5. Ergebnisse und Diskussion

Die Optimierungen der Spacer wurden durch die Zunahme der funktionellen Gruppen, als auch durch die Effizienz bei der Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase bewertet.

### 3.5.1. Optimierung des Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacers

Die Optimierung des HG-Spacers war nötig, um die Ausbeute der einzelnen Spacerreaktionen zu verbessern. Da ein HG-Spacer aus bis zu zwanzig Teilreaktionen bestand, war die Gesamtausbeute deutlich von der Ausbeute der Teilreaktionen abhängig.

#### Aktivierung der Partikel

Tab.4 listet ausgewählte Optimierungsreaktionen auf.

Modifizierter Parameter	Variation	Bemerkung
Rührgeschwindigkeit	400 bis 900 U/min	> 600 U/min: Partikel haften nicht am Rührfisch, > 700 U/min: Rührfisch springt
Temperatur	25 bis 80 °C	> 60 °C: Gute Reaktionsausbeute, aber bei höheren Temperaturen Probleme mit den Partikeln
Reaktionsdauer	1 bis 72 h	24 h optimal (Ausbeute gegen Zeitaufwand)
Konzentration der Reagenz	0.4 bis 5.0 mol/l	3.9 M optimale Ausbeute
Moläquivalente	100 bis 200 eq.	130 eq. beste Ausbeute
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	63 $\mu\text{mol}$ Aminogruppen pro g Partikel. Keine guten Reaktionsbedingungen.
Temperatur	25 °C	
Reaktionsdauer	24 h	
Konzentration der Reagenz	0.4 mol/l	

Moläquivalente	100 eq	
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	108 µmol Aminogruppen pro g Partikel. Nur eine leichte Verbesserung, aber teilweise Agglomeration der Partikel nach der Reaktion.
Temperatur	25°C	
Reaktionsdauer	24 h	
Konzentration der Reagenz	3.9 mol/l	
Moläquivalente	100 eq	
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	158 µmol Aminogruppen pro g Partikel. Höhere Reaktionsdauer führt nur zur geringen Verbesserung.
Temperatur	25°C	
Reaktionsdauer	72 h	
Konzentration der Reagenz	0.4 mol/l	
Moläquivalente	100 eq	
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	353 µmol Aminogruppen pro g Partikel. Deutlich bessere Reaktionsausbeute, die Temperatur ist optimal.
Temperatur	60°C	
Reaktionsdauer	24 h	
Konzentration der Reagenz	0.4 mol/l	
Moläquivalente	100 eq	
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	333 µmol Aminogruppen pro g Partikel. Länger als 24 h erniedrigt die Reaktionsausbeute (dieser Versuch wurde nach dem Versuch mit den optimalen Parametern durchgeführt).
Temperatur	60°C	
Reaktionsdauer	28.5 h	
Konzentration der Reagenz	3.9 mol/l	
Moläquivalente	130 eq	
Rührgeschwindigkeit	700 U/min	500 µmol Aminogruppen pro g Partikel. Optimale Reaktionsbedingungen für die Aktivierung größerer Partikelmengen (> 5 g) im Erlenmeyerkolben.
Temperatur	60°C	
Reaktionsdauer	24 h	
Konzentration der Reagenz	3.9 mol/l	
Moläquivalente	130 eq	

**Tab.4:** Auflistung ausgewählter Reaktionen zur Optimierung der Hexamethyldiamin-Aktivierung.

Durch die Optimierung der einzelnen Parameter war eine Steigerung der Anzahl an funktionellen Gruppen um das Achtfache möglich.

Die Glutardialdehyd-Funktionalisierung wurde, da sie ebenfalls eine Iminbindung knüpft, in ähnlicher Weise optimiert, so dass nur kleinere Änderungen notwendig waren:

- Die Rührgeschwindigkeit wurde dem Thermomixer angepasst, dieser schüttelte mit 1400 U/min.
- Die optimale Reaktionstemperatur im 2ml-Reaktionsgefäß lag bei 40°C
- Die optimale Reaktionsdauer im 2ml-Reaktionsgefäß lag bei 1 h.

Die Aktivierungsreaktion für die Immobilisierung mittels Glutardialdehyd unterliegt denselben Reaktionsparametern.

Die Hexamethyldiamin-Funktionalisierung wurde ebenfalls auf der Basis der oben aufgeführten Reaktionen optimiert und entspricht der Glutardialdehyd-Funktionalisierung.

Wie in Tab.4 und obiger Beschreibung aufgeführt, sind die optimalen Reaktionsbedingungen bei erhöhter Temperatur (60°C und 40°C) und hoher Konzentration (3.9 M) gegeben. Die Gesamtausbeute der Funktionalisierungsreaktionen des HG-Spacers lag bei 90%. Dies beinhaltet auch das Verhalten der Partikel und wurde so verbessert, dass keine Ag-

glomeration der Partikel erfolgt und die Viskosität der Reaktionslösungen die Reaktion nicht beeinträchtigt. Die Partikelagglomeration stellte ein großes Problem dar, da die Partikel oft separiert werden müssen und somit auch kleinste Mengen von Agglomeraten dadurch zu erheblichen Verlusten führten.

Auch wurden Reaktionen mit Ethylendiamin durchgeführt, da diese aber eine sehr geringe Ausbeute (nicht mehr als 273  $\mu\text{mol/g}$ , entspricht 55%) zeigen, wurde auf die Verwendung dieser Reagenz verzichtet. Dies ist in der kürzeren Kohlenwasserstoffkette vom Ethylendiamin zum Hexamethyldiamin begründet, so dass die beiden primären Aminogruppen des Ethylendiamin-Moleküls einen negativen induktiven Effekt auf die jeweils andere Gruppe verursachen. Dadurch wird die Reaktivität der primären Amine gesenkt, da durch den induktiven Effekt der jeweils anderen Aminogruppe die Elektronegativität der Aminogruppen gesenkt wird. Der mesomere Effekt der Aminogruppen kommt nicht zum Tragen, da weder in Ethylendiamin, noch in Hexamethyldiamin Doppelbindungen zur Verfügung stehen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass der induktive Effekt von „elektronenziehenden“ Gruppen (Elementen) eine Reichweite von drei Methylengruppen besitzt (Smith und March, 2001).

### 3.5.2. Optimierung des Aminosäurespacers

Da die Festphasen-Peptidsynthese bereits etabliert ist, mussten nur einige Parameter den Bedingungen angepasst werden (vgl. Tab.5).

Modifizierter Parameter	Variation	Bemerkung
Rührgeschwindigkeit	400 bis 1400 U/min	> 400 U/min führen bei der Reaktion mit Diisopropylcarbodiimid zu Verklumpungen, bei den restlichen Reaktionen ist die Maximalgeschwindigkeit (1400 U/min) optimal.
Temperatur	25 bis 40°C	> 25°C ist für die DIC-Reaktion ungeeignet. 40°C waren, wie auch in den anderen Funktionalisierungsreaktionen, am besten.
Reaktionsdauer	20 min bis 24 h	3 h Reaktionsdauer war ausreichend.
Dimethylformamid-Verhältnis	2.0 bis 6.0 ml/g <sub>HOBT+Fmoc-AS</sub>	Weniger DMF als 4.6 ml/g <sub>HOBT+Fmoc-AS</sub> führen zur Verklumpung, mehr ist nicht nötig.
Rührgeschwindigkeit Temperatur Reaktionsdauer Dimethylformamid-Verhältnis	1400 U/min 40°C 3 h 4.6 ml/g <sub>HOBT+Fmoc-AS</sub>	Optimale Reaktionsparameter für die Kupplungsreaktion.

**Tab.5:** Auflistung ausgewählter Reaktionen zur Optimierung der ASS-Synthese.

Die Kupplungsreaktion musste weiter verbessert werden, da die in der Literatur (Chan und White, 2003) angegebenen Parameter bei den Polymerpartikeln nicht zum Erfolg führten. Da aber einige Parameter übernommen werden konnten, war die Optimierung der Reakti-

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

on durch wenige Änderungen (vgl. Tab.5) möglich. Die Ausbeute der Teilreaktionen der Funktionalisierungsreaktionen des AS-Spacers lag bei fast 100%, die Gesamtausbeute bei ~ 98%. Die Anzahl der Aminogruppen konnte mittels des TNBS-Tests (vgl. Kapitel 3.4.) nicht bestimmt werden. Daher wurden die Reaktionen, wie in der Literatur beschrieben, durch den Kaisertest auf ihre Vollständigkeit überprüft.

Es wurden auch der Vortex Genie 2T verwendet, aber obwohl bei gleicher Reaktionstemperatur eine höhere Ausbeute erzielt wurde, wurde auf diese Methode nicht weiter verwendet. Dies lag zum einen daran, dass dieser Schüttler nicht temperiert werden kann und zum anderen, dass die Ausbeuten sehr großen Schwankungen unterworfen waren.

Die Glutardialdehyd-Aktivierungsreaktion für die Immobilisierung wurde wie die entsprechende Funktionalisierungsreaktion durchgeführt und für die Epichlorhydrinreaktion wurden diese Bedingungen übernommen. Allerdings zeigte sich, dass bei der letzteren genannten Reaktion die Ausbeute sehr schlecht war, so dass diese Reaktion nicht weiter verwendet wurde. Unter diesen Bedingungen ist sie der Glutardialdehyd-Aktivierungsreaktion deutlich unterlegen.

### **3.5.3. Variationen der Spacer**

Der HG-Spacer wurde nur in der Länge (von 1.62 bis 16.2 nm) verändert. Die Längenberechnung ergibt sich aus der geometrische Berechnung des Moleküls anhand der Bindungswinkel und Bindungslängen unter Annahme idealer Linearität des Spacers. Die Gesamtausbeute der Reaktionen des Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacers (HG-Spacer) lag bei 90%. Durch die große Anzahl an funktionellen Gruppen (500  $\mu\text{mol/g}$ ) und die beliebige Variation der Spacerlänge ist dieser, auch wegen der einfachen Synthese, bestens für die Bestimmung des Effekts der Spacerlänge auf die Enzymaktivität geeignet. Eine Spacereinheit dieses Spacers (je ein Molekül Hexamethyldiamin und Glutardialdehyd) beträgt 1.62 nm, es wurden zehn Spacereinheiten synthetisiert. Zudem werden von vielen Arbeitsgruppen Spacer mit überwiegender Kohlenwasserstoffstruktur verwendet, so dass sich dieser Spacer bestens zum Vergleich eignet. Die 500  $\mu\text{mol/g}$  an funktionellen Gruppen sind ausreichend, um eine konkurrenzfähige Beladung des Enzyms auf den Träger zu gewährleisten. Auch konnte eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Spacerlänge festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.5.6.).

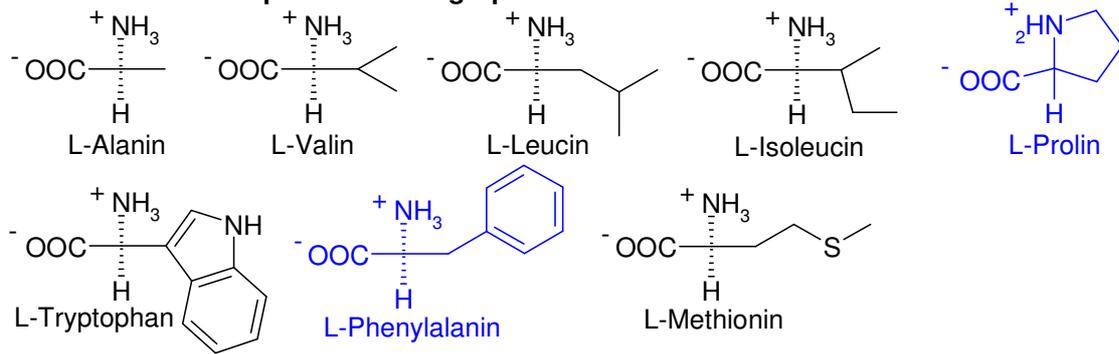
Durch die Begrenzung auf die Variation der Spacerlänge kann dieser Effekt isoliert betrachtet werden. Die benötigte Spacerstruktur wird dann durch den Aminosäurespacer be-

stimmt. Auch der AS-Spacer ist mit bis zu 24 Spacereinheiten (eine Aminosäure entspricht einer Spacereinheit) und daher in einer Länge von 2.9 bis 9.1 nm synthetisiert worden. Durch die gezielte Verwendung unterschiedlicher Aminosäuren wurde dieser Spacer den gestellten Anforderungen in höherem Maße gerecht.

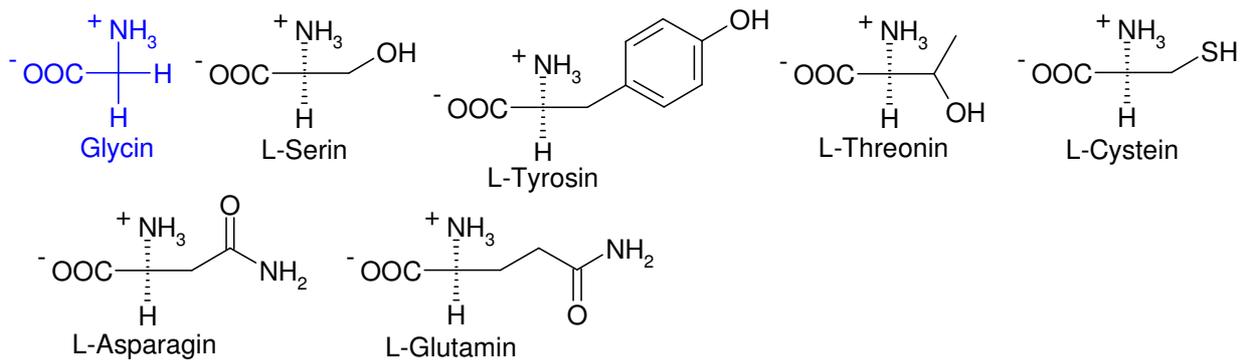
Der Aminosäurespacer erlaubte es, neben der Länge ebenfalls die Struktur zu verändern. Dazu wurde erst einmal, wie beim HG-Spacer, der Effekt der Länge auf die Beladung mit Enzym getestet, zu diesem Zweck wurde Glycin verwendet. Danach wurde die Struktur modifiziert, indem weitere Aminosäuren ( $\alpha$ -Aminoisobutylsäure, L-Asparaginsäure, L-Lysin, L-Prolin, L-Phenylalanin, vgl. Abb.52 und Tab.6) eingebaut wurden. L-Asparaginsäure und L-Lysin brachten dissoziierbare Gruppen und L-Phenylalanin einen aromatischen Rest in den Spacer ein, während L-Prolin als eine cyclische Aminosäure einen etwas starreren Spacer ermöglichte.  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure ist keine proteinogene Aminosäure, sondern ist vergleichbar mit Alanin (Methylgruppe als Rest). Allerdings ist das  $\alpha$ -Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe ersetzt. Damit ist ein Spacer mit dieser Aminosäure dem HG-Spacer sehr ähnlich, da die Anzahl, wenn auch nicht die Anordnung der C-H<sub>x</sub>-Gruppen im Bezug zu den Heteroatomen vergleichbar ist.  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure ist keine chirale Aminosäure.

In Abb.52 sind die am meisten verwendeten, weil proteinbildende Aminosäuren, dargestellt. Diese sind in vier Gruppen (unpolar, polar ungeladen, positiv und negativ geladen) eingeteilt, die Aminosäuren innerhalb einer Gruppe zeigen damit auch ähnliches Verhalten.

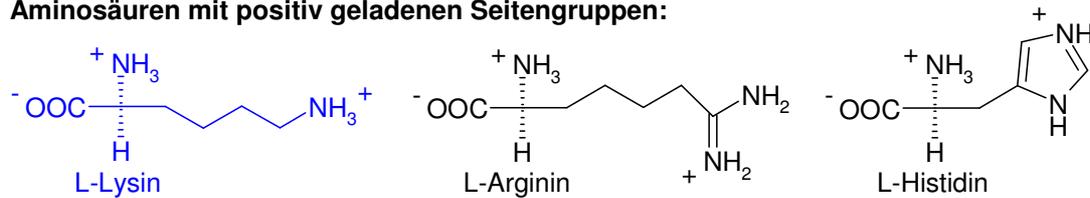
**Aminosäuren mit unpolaren Seitengruppen:**



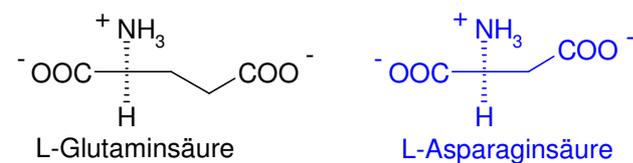
**Aminosäuren mit polar ungeladenen Seitengruppen:**



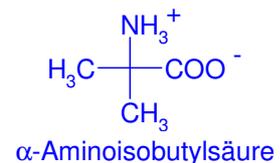
**Aminosäuren mit positiv geladenen Seitengruppen:**



**Aminosäuren mit negativ geladenen Seitengruppen:**



**Künstliche Aminosäure:**



**Abb.52:** Strukturformeln der 20 proteinogenen Aminosäuren und  $\alpha$ -Aminoisobutylic acid (Quelle Römpp-CD-Chemie-Lexikon, 1995). Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren sind blau gekennzeichnet.

Die aufgeführte künstliche Aminosäure ( $\alpha$ -Aminoisobutylic acid, Aib) gehört in die Gruppe der unpolaren Aminosäuren, genauer gesagt ist sie die unpolarste aller Aminosäuren, da das sonst immer vorhandene Wasserstoffatom durch eine Methylgruppe ersetzt wurde. Die Bewertung der Gruppen bezieht sich immer auf das zentrale C-Atom ( $\alpha$ -C-Atom), das die  $\alpha$ -Aminogruppe und  $\alpha$ -Säuregruppe miteinander verknüpft.

In Tab.6 sind die wichtigsten Eigenschaften der am meisten verwendeten Aminosäuren aufgeführt.

Bezeichnung	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode	Summenformel	M (g/mol)	Löslichkeit (g/l <sub>H2O</sub> ) bei 25°C	pI	pK <sub>1</sub>	pK <sub>2</sub>
L-Alanin	Ala	A	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	89.09	160	6.01	2.34	9.69
L-Arginin	Arg	R	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	174.20	149	10.76	2.17	9.04
L-Asparagin	Asn	N	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	132.12	20	5.41	2.02	8.00
L-Asparaginsäure	Asp	D	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	133.10	4.3	2.77	1.88	9.60
L-Cystein	Cys	C	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S	121.15	160	5.10	1.86	8.35
L-Glutamin	Gln	Q	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	146.15	34.9	5.65	2.17	9.13
L-Glutaminsäure	Glu	E	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147.13	7.5	3.22	2.19	9.67
Glycin	Gly	G	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75.07	225	5.97	2.34	9.60
L-Histidin	His	H	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	155.16	38.2	7.59	1.82	9.17
L-Isoleucin	Ile	I	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.17	32.1	6.02	2.36	9.68
L-Leucin	Leu	L	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	131.17	22.4	5.98	2.36	9.60
L-Lysin	Lys	K	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146.19	2000	9.74	2.18	8.95
L-Methionin	Met	M	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub> S	149.21	53.7	5.74	2.28	9.21
L-Phenylalanin	Phe	F	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	165.19	25.1	5.48	1.83	9.13
L-Prolin	Pro	P	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	115.13	1550	6.30	1.99	10.60
L-Serin	Ser	S	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	105.09	360	5.68	2.21	9.15
L-Threonin	Thr	T	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	119.12	90.3	5.87	2.11	9.02
L-Tryptophan	Trp	W	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	204.22	10.6	5.89	2.38	9.39
L-Tyrosin	Tyr	Y	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	181.19	0.40	5.66	2.20	9.11
L-Valin	Val	V	C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	117.15	56.1	5.97	2.32	9.62

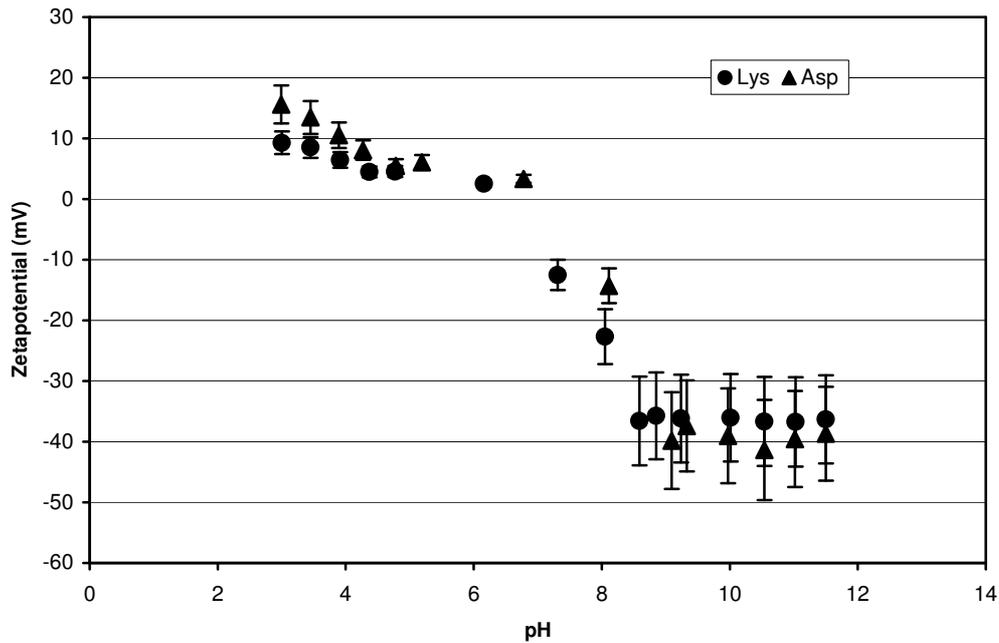
**Tab.6:** Auflistung der wichtigsten Eigenschaften der am häufigsten verwendeten Aminosäuren (Jakubke und Karcher, 1998).

Die in der Abbildung und Tabelle (siehe oben) aufgeführten Strukturen und Eigenschaften der proteinogenen Aminosäuren zeigen die Vielfalt, die durch die Verwendung verschiedener Aminosäuren möglich ist. Daher bieten sich diese für einen Spacer mit variabler Struktur sehr gut an.

Es wurden Spacer mit folgenden Strukturvariationen synthetisiert:

- Reine Spacer von  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure, L-Asparaginsäure, Glycin, L-Lysin, L-Phenylalanin und L-Prolin
- Gemischte Spacer (verschiedene Aminosäuren) und vernetzte Spacer (Hauptkettengruppe und Nebengruppe gekuppelt)

Ein Effekt war, dass sich das Zetapotential der synthetisierten Polymerpartikel durch die verschiedenen Aminosäuren vor allem durch Asparaginsäure und Lysin veränderte wurde (vgl. Abb.53).



**Abb.53:** Zetapotential der PmaP in Abhängigkeit des pH-Wertes mit 2.9 nm AS-Spacer: a) entschütztes Lysin, b) entschützte Asparaginsäure.

Im Vergleich zu den Partikeln, bei denen das Zetapotential bei pH 7.5 (dem pH-Wert der Immobilisierung) bei -28 mV lag, betrug das Zetapotential bei pH 7.5 für den Asparaginsäure-Spacer -5.5 mV und für den Lysin-Spacer -12.5 mV. Dies liegt daran, dass sowohl Asparaginsäure, als auch Lysin dissoziierbare Gruppen in den Spacer einbringen. Die anderen AS-Spacer, basierend auf den Aminosäuren  $\alpha$ -Aminobutylsäure, L-Prolin, L-Phenylalanin und Glycin veränderten das Zetapotential der Polymerpartikel nicht.

### 3.5.4. Synthese eines Auftragsspacers

Der Grund für den Auftrag zur Synthese dieses Spacers ist ein gentechnisch hergestelltes Fusionsprotein, das durch die Fusion eines Dehalogenasegens mit einem Amylosucrasegen zu einem Gen entstanden ist. Das entsprechende Protein hat zwei Domänen, eine Domäne der Dehalogenase und eine Domäne der Amylosucrase. Ersteres ist für die Bindung zuständig und bindet über das aktive Zentrum der Dehalogenase irreversibel an ein definiertes Substrat, dass in den Spacer eingebaut (vgl. Abb.31, Markierung) wurde. Die Dehalogenase ist so mutiert, das es das halogenierte Substrat noch erkennt und das Chlor abspaltet, aber dabei kovalent am dehalogenierten Substrat hängen bleibt. Normalerweise greift das Enzym nucleophil am Substrat (vermutlich mit einem Serin) an, spaltet dabei das Chlor ab und wird dabei vorübergehend kovalent gebunden und kann sich dann über ein Wassermolekül selbst wieder abspalten. Der Auftragsspacer (ATS, AT-Spacer) verknüpft das Protein mit den Polymer-Mikropartikeln und ermöglicht damit eine einfachere Handha-

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase  
bung. Die Amylosucrase hingegen ist ein Enzym, mit dem über die Enzymaktivität die an die Partikel gebundene Enzymmenge feststellbar ist.

### 3.5.5. Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

Das Enzym Penicillin G Acylase wurde über die Aminogruppen des Enzyms (Lysin, relatives Proteinvorkommen 7.1% oder Arginin (relative Proteinhäufigkeit 4.4%) mittels Glutaraldehyd, Epichlorhydrin oder Carbonyldiimidazol gebunden. Dabei ist die Glutaraldehyd-Methode die effizienteste Methode, denn sie besitzt gegenüber den anderen Methoden einige Vorteile:

- Stetiges Arbeiten in wässrigen Medien, ein Lösungsmittelwechsel ist nicht notwendig, dies vereinfacht die Handhabung und verkürzt die Synthesedauer deutlich
- Einfachere Reaktionsbedingungen als mit 1, 1'-Carbonyldiimidazol und dabei nicht so problematisch wie Epichlorhydrin.
- Deutlich höhere Beladung (Faktor 33) als bei den beiden Alternativen.

Nachdem diese Unterschiede erwiesen waren, wurde ausschließlich der Glutaraldehyd verwendet und dabei auch in seiner Wirkungsweise verbessert. Dafür wurde die Reaktionszeit auf von 8 bis zu 96 h und die Temperatur bis 60 °C variiert.

Die Erhöhung der Temperatur bei der Immobilisierung des Enzyms mittels Aldehydgruppen (Glutaraldehyd-Methode) von 25 auf 40 °C erbrachte eine Steigerung der Ausbeute auf das Doppelte, während höhere Temperaturen (bis 60 °C untersucht) das Enzym denaturierten. Dies ist nicht nur durch eine Verminderung der Aktivität auf 0.0 mg/g, sondern auch durch eine Trübung der Lösung durch Schlierenbildung des nun denaturierten Enzyms ersichtlich gewesen. Eine weitere Erhöhung der Ausbeute um das Doppelte erbrachte die Erhöhung der Reaktionsdauer von 1h auf 40h.

Nur die Carbonyldiimidazol-Methode hat die Eigenschaft, dass es als Nullspacer die Kettenlänge nicht erhöht (vgl. Abb.47). In dieser Arbeit war das Ziel aller Spacersynthesen eine Verlängerung der Spacerkette. Daher wurde diese Methode nur verwendet, um einen Vergleich der Immobilisierung des Enzyms zu erzielen. Da sich dabei keinerlei Verbesserungen zeigten, wurde diese Methode nicht weiter verfolgt.

Ein Nullspacer ist notwendig, wenn ein Spacer mit definierter Struktur erstellt werden soll und somit eine Immobilisierung mit den gängigen Methoden nicht praktikabel ist, da diese durch die Aktivierung zur Immobilisierung die Struktur verändern würde.

## **Optimierungsversuche**

Es wurden mehrere Versuche zur Optimierung der Immobilisierungsbedingungen durchgeführt. Dazu wurde zum einem die eingesetzte Menge an Enzym für die Immobilisierung von 50 mg/g bis 200 mg/g variiert. Dabei zeigte sich, dass 100 mg/g ein sehr guter Wert ist, eine Erhöhung der Enzymmenge auf 200 mg/g führte zu einer Verminderung der Ausbeute um 40%. Ebenso wurde die Ionenstärke von 0.2 bis 1.0 M überprüft und es konnte die Ausbeute um den Faktor zwei für die Ionenstärke 1.0 M gesteigert werden. Zu beachten ist, dass eine weitere Erhöhung der Ionenstärke nicht empfehlenswert ist, da dies das Enzym beeinträchtigen würde (Buchholz und Kasche, 1997). Die maximal erzielte Ausbeute bei der Immobilisierung betrug 99%.

Zudem wurden auch Versuche durchgeführt, in der der jeweilige Spacer (HG-Spacer und AS-Spacer) ohne Glutardialdehyd-Aktivierung zur Immobilisierung verwendet wurde. In beiden Fällen konnte kein Enzym auf den Trägern nachgewiesen werden, so dass hiermit belegt ist, dass keine adsorbierten Enzymmoleküle nach den Waschungen auf dem Partikeln verbleiben, also die Aldehydgruppe zur kovalenten Bindung notwendig ist.

### **3.5.6. Analytische Messungen**

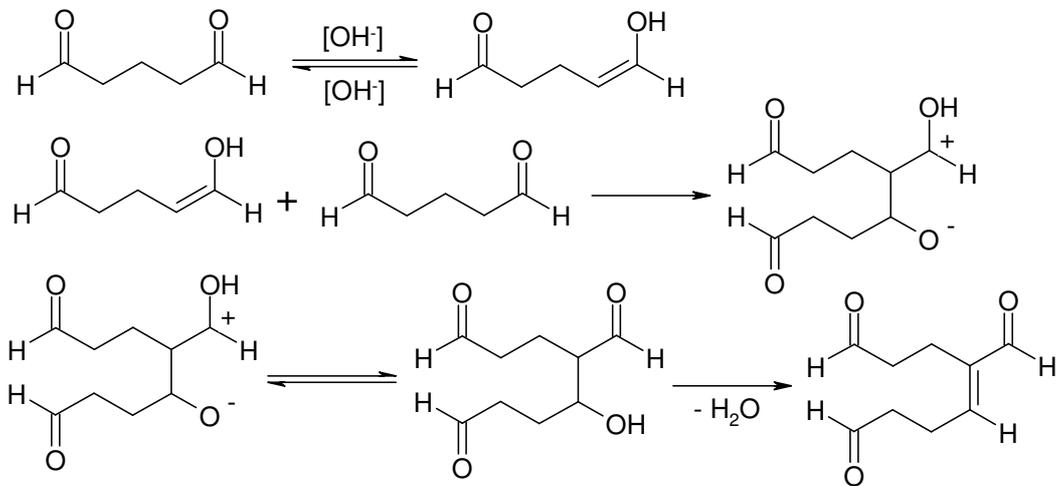
Die Bewertung der Spacer erfolgte über einen Vergleich der Beladung mit Enzym und der Menge an aktivem Enzym auf dem Träger.

#### **Messung der Aminogruppen mit 2, 4, 6-Trinitrobenzensäure**

Die Aktivierung der funktionellen Gruppen der jeweiligen Polymerpartikel (Polymethylacrylat-Partikel, Polyvinylacetat-Partikel) stellte 500  $\mu\text{mol/g}$  an Aminogruppen zur Verfügung. Diese konnten auch während einer längeren Synthese mittels der optimierten Reaktionsvorschrift so gehalten werden, dass eine Verminderung der Gesamtausbeute von maximal 10% gewährleistet werden konnte. Da sowohl Hexamethyldiamin, als auch Glutardialdehyd bifunktionelle Moleküle mit jeweils zwei identischen Gruppen darstellten, ist eine intramolekulare Reaktion, die zum Verlust von zwei funktionellen Gruppen pro Molekül des Reaktanden führt, möglich. Dies wurde durch die Verwendung eines 130-fachen Überschusses, der intermolekulare Reaktionen begünstigt, vermieden.

Ein Problem stellte die Polymerisation von Glutardialdehyd dar (vgl. Abb.54). Dies führt dazu, dass nach der Reaktion eines dimerisierten Moleküls (drei Aldehydgruppen) mit einer Aminogruppe (noch zwei Aldehydgruppen übrig) mehr Aldehydgruppen zur Verfügung

stehen, als wenn Glutardialdehyd (zwei Aldehydgruppen) mit einer Aminogruppe (noch eine Aldehydgruppe übrig) reagiert (Migneault et al, 2004).



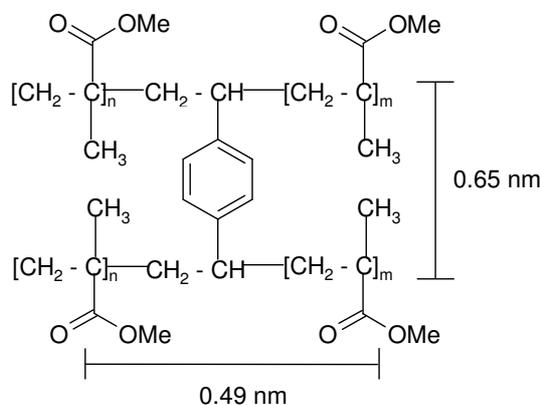
**Abb.54:** Polykondensation von zwei Glutardialdehydmolekülen.

Wenn ein Dimer aus zwei Glutardialdehydmolekülen reagiert, so werden nun für eine Aminogruppe zwei Aldehydgruppen zur Verfügung gestellt. Die Polykondensation wurde aber durch sorgfältige Lagerung der Glutardialdehydlösung (50w% in Wasser), bei 4 °C im Dunkeln, auf ein Minimum reduziert.

### Generelle Betrachtungen des Spacers

Um die Effekte der Spacerlänge beurteilen zu können, müssen einige Auswirkungen der Funktionalisierung der Partikel mit Spacern aufgezeigt werden:

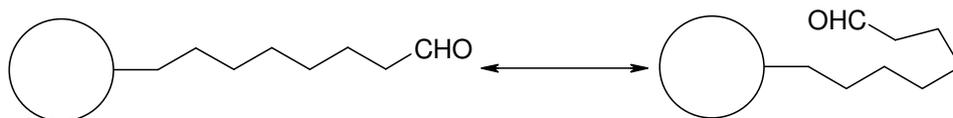
Zum einen ist das ganze Polymerpartikel mit Spacern funktionalisiert. Unter Vernachlässigung der Partikelkrümmung sind auf einer Fläche von  $3.19 \cdot 10^{-19} \text{ m}^2$  vier funktionelle Gruppen vorhanden (vgl. Abb.55).



**Abb.55:** Berechnung der funktionellen Gruppen auf einem Polymethylacrylat-Partikel.

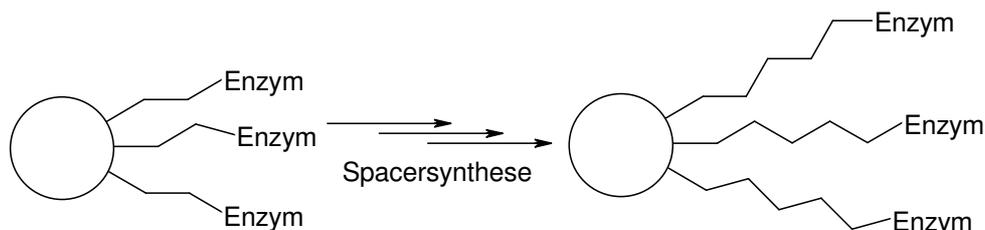
Bei einer spezifischen Oberfläche der PmaP von  $2.20 \text{ m}^2/\text{g}$  ergibt sich damit eine maximale Anzahl von funktionellen Gruppen auf den PmaP von  $46 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}$  ( $102 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}$  für die PvacP). Dies ist eine sehr grobe Abschätzung, die die Oberflächenbeschaffenheit nicht berücksichtigt. Aber da die Partikel eine Konzentration von  $500 \text{ } \mu\text{mol}/\text{g}$  Aminogruppen durch den Spacer aufweisen, hat jede funktionelle Gruppe des Partikels mit dem Spacer reagiert. Daraus folgt eine sehr hohe „Spacerbeladungsdichte“. Aus obiger Betrachtung ergibt sich auch, dass auf dem Partikel zwischen jeder funktionellen Gruppe durchschnittlich ein Abstand von  $0.65 \text{ nm}$  liegt. Dies entspricht ungefähr vier Kohlenstoff-Kohlenstoff-Einfachbindungen.

Zum anderen ist es gerade bei längeren Spacern möglich, dass durch eine Drehung um eine C-C-Einfachbindung die effektive Spacerlänge verkürzt wird (vgl. Abb.56). Das Molekül stellt nicht mehr seine maximale Länge für den Abstand des Enzyms zum Partikel zur Verfügung, es ist „verstrickt“.



**Abb.56:** Schematisches Beispiel einer Verstrickung des Spacers.

Allerdings sorgt ein längerer Spacer, wenn er ideal linear gestreckt ist, für ein „erhöhtes Raumvolumen“, das dem Enzym zur Verfügung steht (vgl. Abb.57).



**Abb.57:** Schematisches Beispiel des erhöhten Raumvolumens der Enzymmoleküle durch längere Spacer.

Dadurch sinkt die Wahrscheinlichkeit sterischer Hinderung des Enzyms sowohl durch die Träger (wenn keine Verstrickung stattfindet), vor allem aber durch andere Enzymmoleküle. Außerdem sind die Enzyme im Mittel weiter von dem Träger entfernt und unterliegen somit während der Katalyse einer geringeren Wechselwirkung durch den Träger. Da die sterische Hinderung zwischen dicht gepackten Enzymmolekülen größer ist, als zwischen Enzymmolekülen mit größerem Abstand zueinander, unterliegt das Substrat bei längeren Spacern einer geringeren Diffusionslimitierung.

## Messung der Aktivität freier und immobilisierte Penicillin G Acylase

Die reine Stammlösung der Penicillin G Acylase (E.coli, 3.5.1.11.) von Sigma-Aldrich hat eine Aktivität von 16.13 mg/ml und das Enzym eine spezifische Aktivität von 42 U/mg. Dies bezieht sich auf den NIPAB-Aktivitätstest (vgl. Kapitel 3.4.): 42 U/ml bei 1 mg/ml entspricht 42 U/mg (Kasche, 1987). Diese Lösung wurde zur Immobilisierung der Penicillin G Acylase auf den Polymerpartikeln verwendet. Die Ausbeute der Immobilisierung lag zwischen 20 und 99%, es wurden stets 100 mg Enzym pro g Träger für die Immobilisierung eingesetzt.

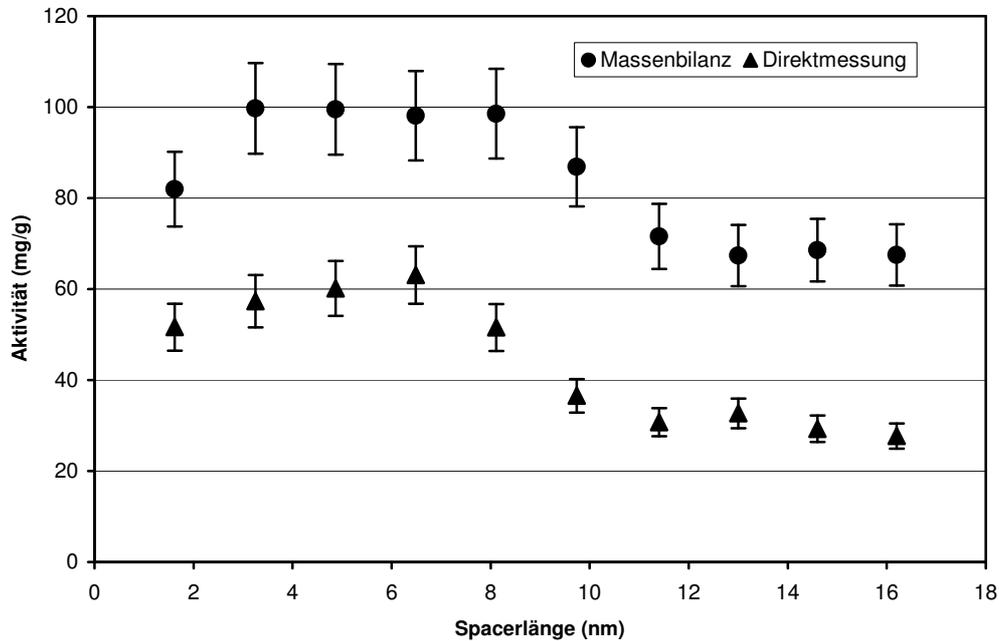
Es wurden dabei drei wichtigen Parametern untersucht:

- **Massenbilanz:**  
Diese ergibt sich aus der Differenz der für die Immobilisierung eingesetzten Enzymmenge (gemessen als Aktivität in  $\text{mg}_{\text{aktives Enzym}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ ) abzüglich der Enzymmengen des Überstandes und der Waschungen. Die Massenbilanz ergibt somit die Gesamtbeladung des Trägers mit Enzym.
- **Direktmessung:**  
Dies ist eine direkte Bestimmung der Aktivität (in  $\text{mg}_{\text{aktives Enzym}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ ) des auf den Trägern immobilisierten Enzyms. Diese ist meist, auf Grund von Änderungen der Aktivität des Enzyms auf den Trägern durch die Immobilisierung, unterschiedlich zur Massenbilanz. Dabei kann nicht unterschieden werden, ob ein Teil der Enzymmoleküle vollständig aktiv ist und der Rest inaktiviert, ob alle Enzymmoleküle nur teilweise aktiv sind oder ob es eine Kombination aus beidem ist.
- **Spezifische Aktivität:**  
Diese berechnet sich aus der Aktivität der Direktmessung geteilt durch die Aktivität der Massenbilanz multipliziert mit der spezifischen Aktivität ( $\text{U}/\text{mg}_{\text{aktives Enzym}}$ , 1 U entspricht 1  $\mu\text{mol}$  Substratumsatz pro Minute bei 25 °C) des Enzyms unter den Bedingungen des Aktivitätstests. Die spezifische Aktivität ergibt die Aktivität des immobilisierten Enzyms im Vergleich zum freien Enzym (42 U/mg).

## Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer

Sowohl die Polyvinylacetat-Partikel, als auch die Polymethylacrylat-Partikel wurden mit dem HG-Spacer funktionalisiert. Anschließend wurde das Modellenzym Penicillin G Acylase mittels der Glutardialdehyd-Methode immobilisiert.

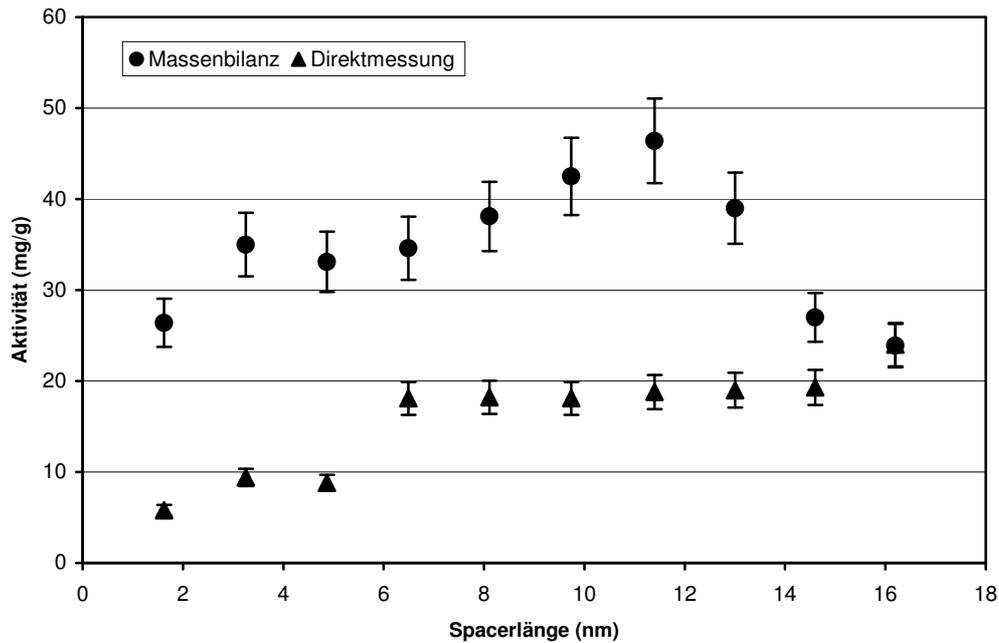
Bei der Immobilisierung auf PvacP zeigt die Aktivität der Massenbilanz, als auch der Direktmessung mit zunehmender Spacerlänge ein annähernd konstantes Verhalten. Ab der Länge von 8 nm trat eine Verminderung der Aktivität ein (vgl. Abb.58).



**Abb.58:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PvacP immobilisiert.

Die maximale Beladung der PvacP mit Enzym betrug 99.7%. Diese Immobilisate bestanden aus positiv geladenen Polyvinylacetat-Partikeln und dem negativ geladenem Enzym.

Der Verlauf der Aktivität der Penicillin G Acylase, mittels HG-Spacer auf Polymethylacrylat-Partikeln immobilisiert zeigt ein anderes Verhalten (vgl. Abb.59). Die Aktivität (Massenbilanz) zeigt einen leichten Anstieg bis zu einem Maximum von 46.4 mg/g bei einer Länge von 11.4 nm. Danach sinkt die Aktivität mit zunehmender Spacerlänge, so dass bei einer Länge von 16.2 nm wieder der Wert der kürzesten Spacerlänge (1.62 nm) von ~ 25 mg/g erreicht wird.

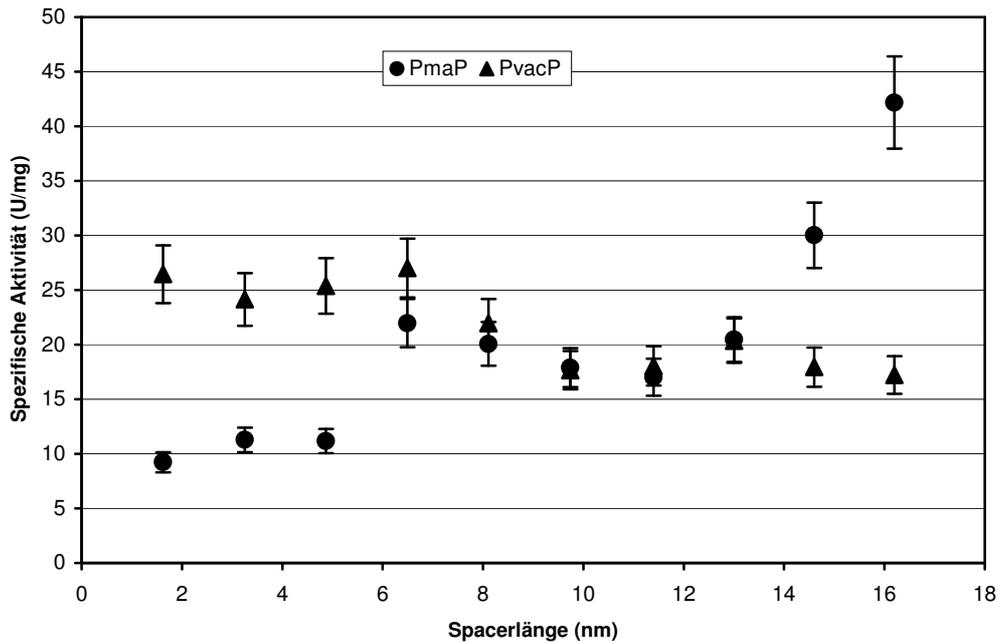


**Abb.59:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PmaP immobilisiert.

Die Aktivität bestimmt durch die Direktmessung hingegen steigt mit zunehmender Spacerlänge von 5.8 mg/g auf 24.0 mg/g. Bei dieser Versuchsreihe wurde das negativ geladene Enzym an die negativ geladenen Polymethylacrylat-Partikel gebunden.

Für die Polyvinylacetat-Partikel (vgl. Abb.58) ergeben sich dabei höhere Beladungen als für die Polymethylacrylat-Partikel (vgl. Abb.59). Ein Unterschied der beiden Partikel liegt darin, dass erstere Partikel positiv und letztere negativ geladen sind und das Enzym ebenfalls negativ geladen ist. Somit unterliegen die Polyvinylacetat-Partikel einer anziehenden und die Polymethylacrylat-Partikel einer abstoßenden Wechselwirkung mit dem Enzym.

Ebenso ist der Verlauf der spezifischen Aktivität (vgl. Abb.60) des auf den beiden Polymerträgern immobilisierten Enzyms unterschiedlich.



**Abb.60:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PmaP und auf PvacP immobilisiert.

Die spezifische Aktivität des auf den PmaP immobilisierten Enzyms stieg mit zunehmender Spacerlänge von 9.2 auf 42.2 U/mg. Damit ist die spezifische Aktivität des Enzyms, immobilisiert mittels des Spacer mit einer Länge von 16.2 nm, so hoch wie die des freien Enzyms (42.0 U/mg).

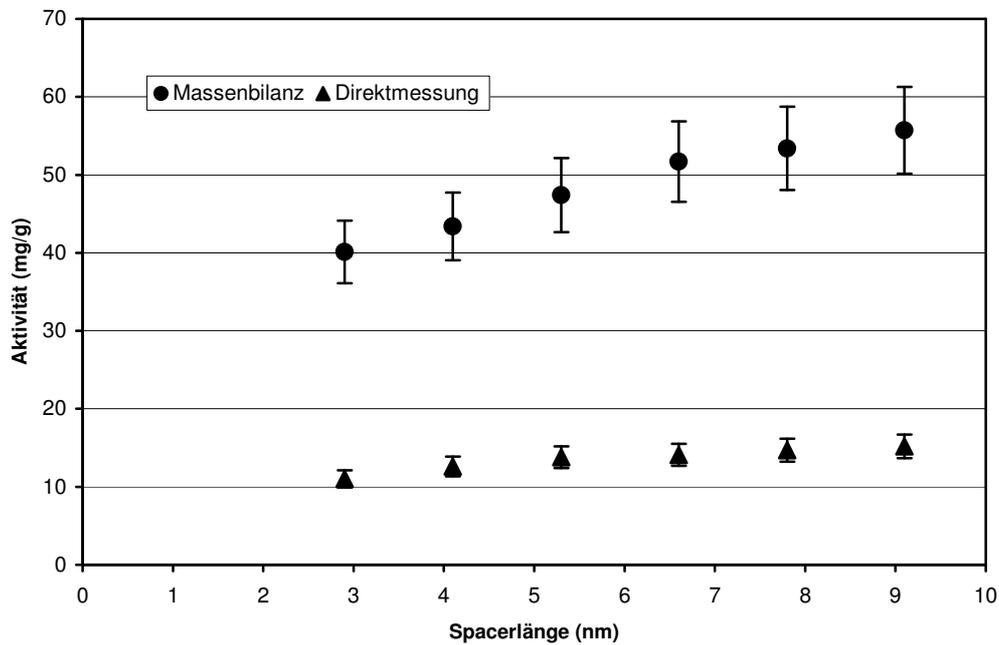
Im Falle der PvacP sankt die spezifische Aktivität des Enzyms mit zunehmender Spacerlänge von 26.5 auf 17.2.

Ab einer Länge von ~ 10 nm agglomerierten die Polymerpartikel mit HG-Spacer, so dass die Resuspendierung aufwendiger wurde. Ab einer Länge von ~ 16 nm wurde die Agglomeration so stark, dass die Handhabung der Partikel deutlich erschwert wurde und längere Spacerketten nicht mehr möglich waren.

### Aminosäurespacer

Polymethylacrylat-Partikel wurden mit dem Aminosäurespacer funktionalisiert und durch Glutardialdehyd aktiviert. Daran wurde Penicillin G Acylase kovalent an die Träger gebunden. Die Auswirkungen auf die Aktivität des immobilisierten Enzyms mit zunehmender Spacerlänge wurde durch die Synthese von 24 Spacereinheiten Glycin (bis zu einer Gesamtlänge von 9.1 nm) untersucht. Auf diese Weise kann der Längeneffekt unabhängig von Strukturvariationen (da Glycin nur ein Wasserstoffatom als Rest besitzt) betrachtet

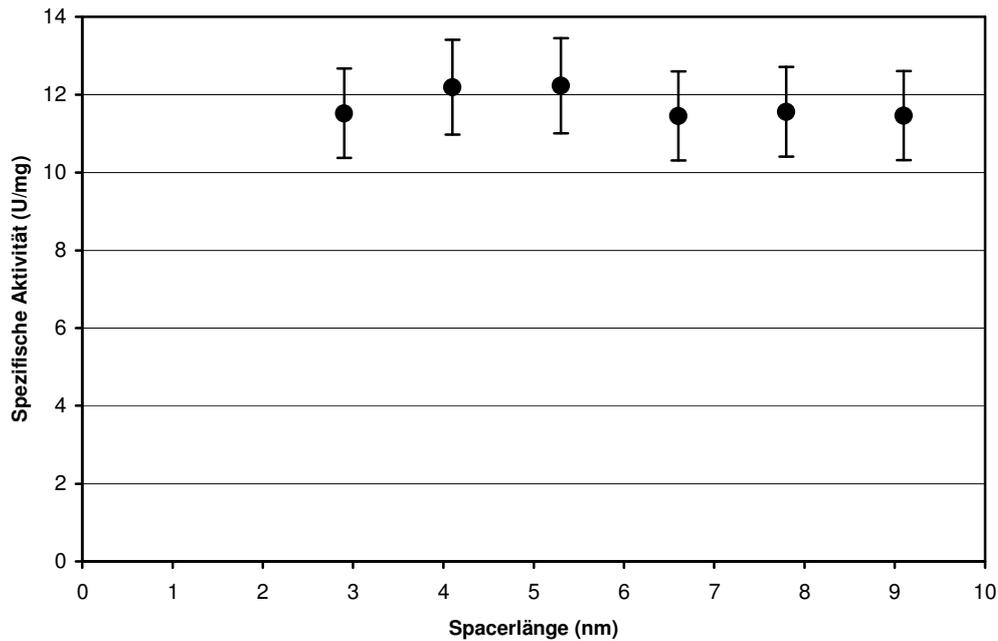
werden. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung (Massenbilanz und Direktmessung) sind in Abb.61 aufgeführt.



**Abb.61:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Glycin-Einheiten) auf PmaP immobilisiert.

Die Aktivität (Massenbilanz) der immobilisierten Penicillin G Acylase nahm mit steigender Spacerlänge von 40.1 bis 55.7 mg/g zu. Die durch Direktmessung bestimmte Aktivität blieb mit zunehmender Spacerlänge im Rahmen des mittleren Fehlers konstant bei ~ 13 mg/g.

Die spezifische Aktivität blieb mit steigender Spacerlänge konstant auf ~ 12 U/g (vgl. Abb.62).



**Abb.62:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Glycin-Einheiten) auf PmaP immobilisiert.

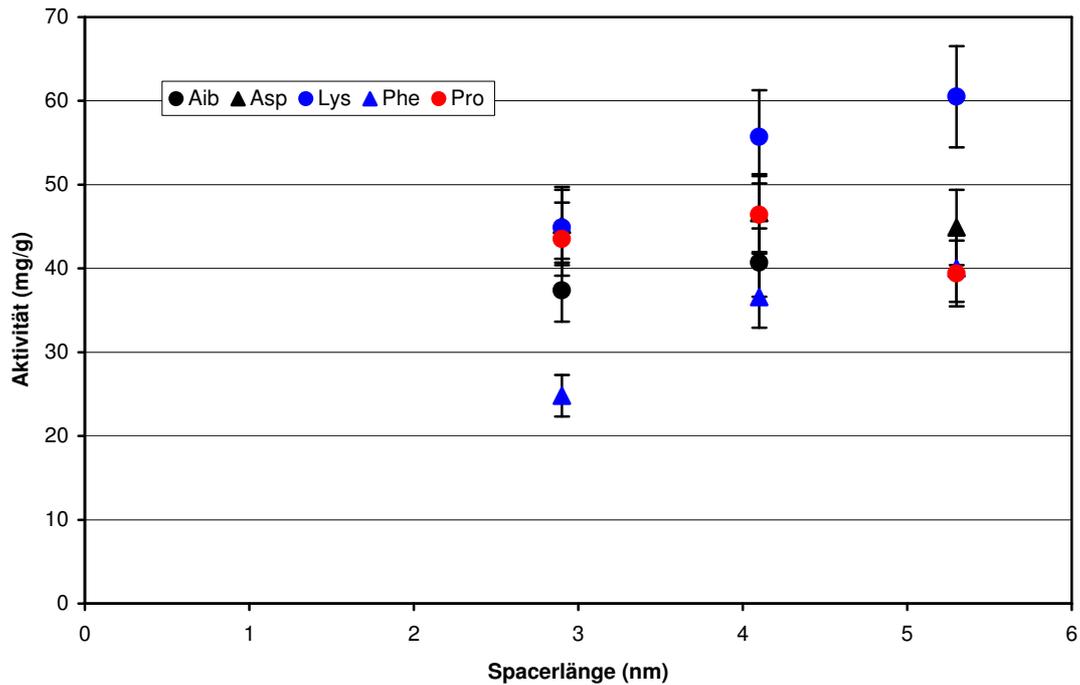
Dies zeigt, dass der Glycin-Spacer im Gegensatz zum HG-Spacer, dem Enzym durch die zunehmende Länge keine besseren Bedingungen für die Katalyse ermöglicht.

Das Problem der Agglomeration trat bei den mit AS-Spacern funktionalisierten PmaP schon bei kürzeren Spacerlängen auf und war bei ~ 10 nm so intensiv, dass keine längeren Spacer möglich waren. Dies entspricht aber bereits 24 Synthesen, wobei beim HG-Spacer eine Spacerlänge von ~ 16 nm 20 Syntheseschritten entspricht.

Um die Struktur des AS-Spacers zu verändern wurden verschiedene weitere Aminosäuren eingesetzt:  $\alpha$ -Aminobutylsäure, L-Asparaginsäure, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Prolin. In der ersten Versuchsreihe wurden diese als reine Spacer verwendet, das heißt, der gesamte Spacer besteht aus denselben Aminosäuren.

Bei den Synthesen des AS-Spacers mit anderen Aminosäuren war die Agglomeration stärker als bei dem reinen Glycin-Spacer. Daher sind von allen Spacern nur zwölf Spaceereinheiten synthetisiert worden. Eine Ausnahme stellt  $\alpha$ -Aminobutylsäure dar, von der nur acht Spaceereinheiten als Spacer untersucht werden konnten, da dieser noch stärker agglomerierte.

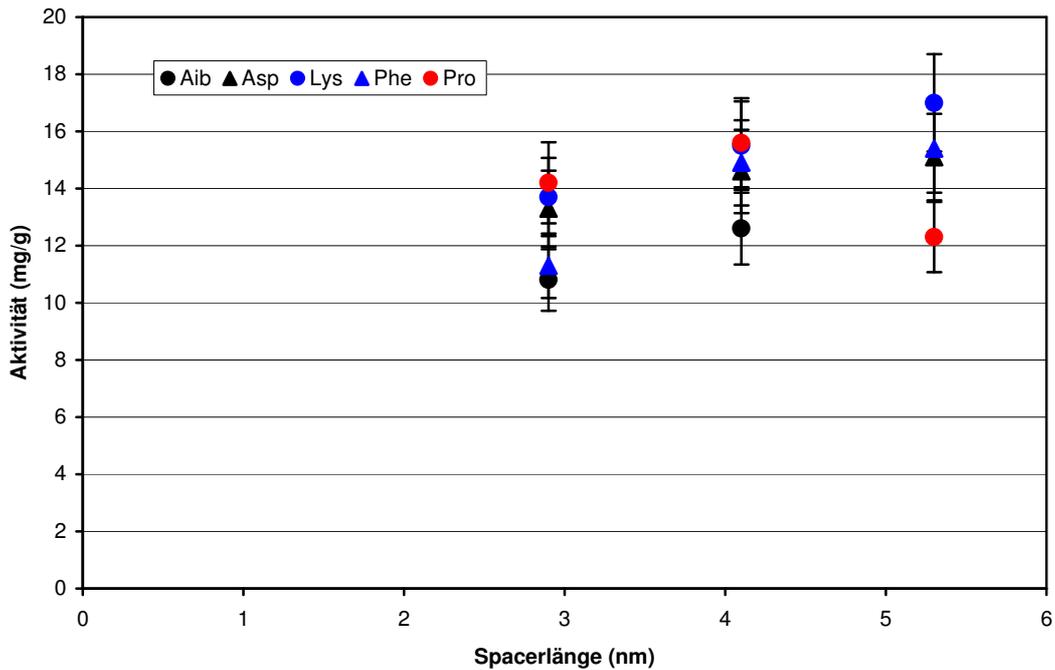
In Abb.63 ist die Aktivität (Massenbilanz) der Penicillin G Acylase, kovalent durch reine Aminosäurespacer immobilisiert, aufgeführt.



**Abb.63:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Spacer aus jeweils denselben Aminosäurebausteinen) auf PmaP immobilisiert.

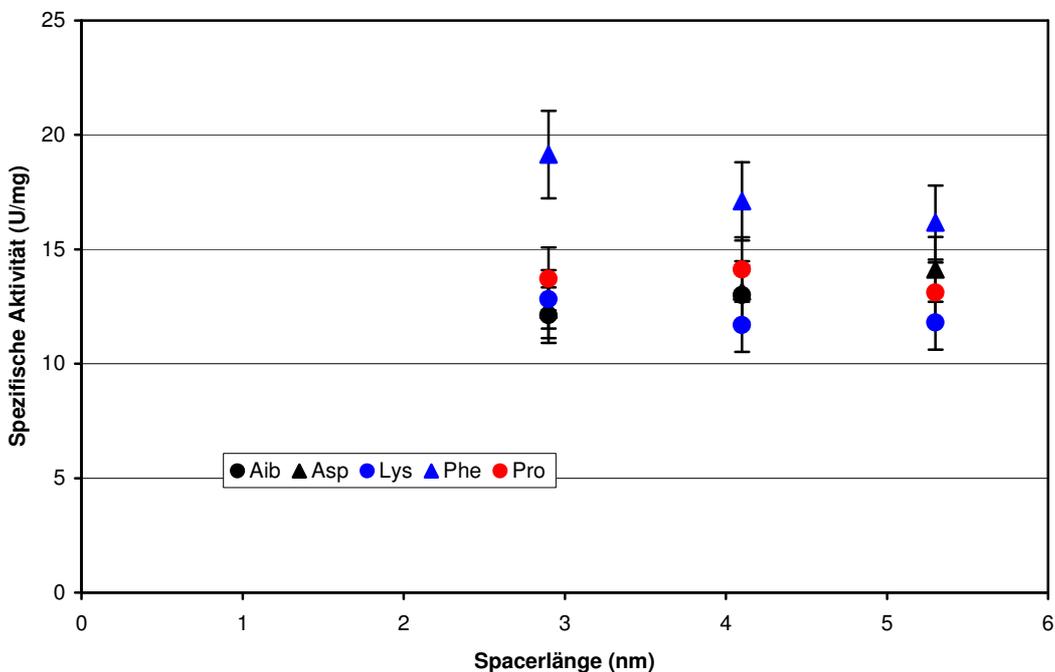
Auch bei den Spacern mit anderen Aminosäuren als Glycin zeigt sich im Bezug auf die Beladung, dass diese, mit Ausnahme des Lysin-Spacers und Phenylalanin-Spacers, mit steigender Länge des Spacers konstant bleibt. Die Beladung mit Enzym ist bei Verwendung des Lysin-Spacers deutlich höher als bei den andern Spacern.

Die Aktivität (Direktmessung) der AS-Spacer blieb für alle verwendeten Aminosäuren mit zunehmender Spacerlänge konstant bei ~14 mg/g (vgl. Abb.64).



**Abb.64:** Aktivität (Direktmessung) der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers auf PmaP immobilisiert.

Die spezifische Aktivität des Enzyms unter Verwendung der oben beschriebenen AS-Spacern blieb mit zunehmender Spacerlänge konstant (vgl. Abb.65).



**Abb.65:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers auf PmaP immobilisiert.

Dies zeigt deutlich, dass die Auswirkungen der Spacer auf das Enzym nicht so stark von der Länge des Spacers abhängig sind. Der Phenylalanin-Spacer wies für die Länge von

2.9 nm die höchste spezifische Aktivität von allen Spacern (HG-Spacer wie auch AS-Spacern) auf. Diese sinkt dann allerdings sehr stark mit zunehmender Spacerlänge.

Bezogen auf die Massenbilanz und die Direktmessung erzielte der Lysin-Spacer den größten positiven Effekt auf die Eigenschaften des Enzyms nach der Immobilisierung. Sowohl die Beladung, als auch die Menge an aktivem Enzym auf dem Träger waren sehr hoch. Aber auch hier war die Agglomeration bei Spacerlängen von mehr als 3 nm sehr stark. Daher wurden bei den anschließenden Versuchen, die Mischungen und Verzweigungen darstellen, nur vier Spacereinheiten synthetisiert (vgl. Tab.7).

Beschreibung (2.9 nm)	MB (mg/g)	DM (mg/g)	sA (U/mg)
1) Gly-Lys-Asp-Gly	58.6	15.5	11.1
2) Gly-Gly-(Lys:Asp=3:1)-Gly	43.5	14.8	14.3
3) Lys-Lys (verzweigt)	28.8	9.33	13.6
4) Lys (entschützt)	38.1	11.7	12.9
5) Asparaginsäure (entschützt)	20.6	5.11	10.4

**Tab.7:** Massenbilanz (MB), Direktmessung (DM) und spezifische Aktivität (sA) von vier Spacerversuchen (mit einer Länge von je 2.9 nm) als Variation des Lysin-Spacers.

Durch die Kombination von Lysin und Asparaginsäure neben Glycin als Abstandhalter in einem Spacer (Spacer Nr.1) sollte es ermöglicht werden, dass die Spacerstränge sich gegenseitig anziehen. Damit wurde eine mehrfache Bindung des Enzyms und somit eine höhere Beladung und Stabilität erzielt (Fernández-Lafuente et al, 1992).

Dieser Effekt wurde in einem zweiten Versuch weiter untersucht (Spacer Nr. 2), indem die Aminosäuren Lysin und Asparaginsäure in einer Synthese gleichzeitig im Verhältnis 3:1 zugegeben wurden. Für beide Spacer (Nr. 1+2) war geplant, dass die dissoziierbaren Gruppen, die positive Ladungen bilden (Lysin) mit jenen, die negative Ladungen bilden (Asparaginsäure) Bündel aus Spacersträngen bilden.

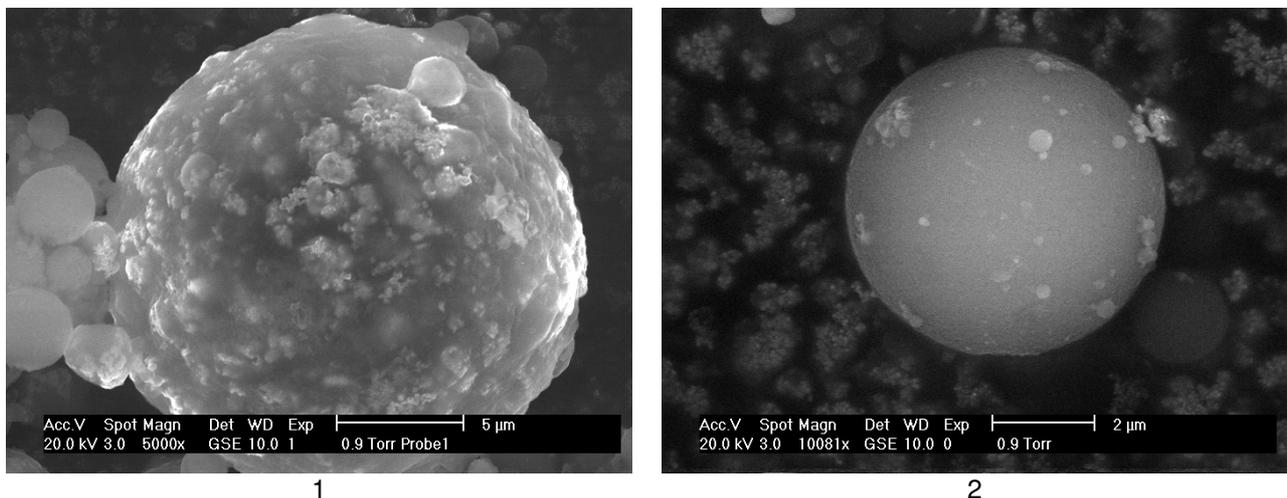
Die Verzweigung des Lysin-spacers (Spacer Nr. 3), in dem beide Seitengruppen verwendet wurden, diente dem Zweck, eine erneute Kupplung mit Lysin durchzuführen. Damit ist es möglich, die Anzahl der funktionellen Gruppen pro Kupplungsschritt zu verdoppeln (wie bei Dendrimeren).

Um zu überprüfen ob positive Ladungen der Lysin-Seitenketten die Beladung erhöhen würden, wurde ein normaler Lysin-Spacer synthetisiert und anschließend alle Seitenketten entschützt (Spacer Nr. 4). Zum Vergleich wurde dies ebenfalls mit einem Asparaginsäure-Spacer (Spacer Nr. 5) durchgeführt.

Die Aktivität der Penicillin G Acylase, immobilisiert durch die oben beschriebenen AS-Spacer variierte nur wenig. Die durch die Massenbilanz bestimmte Aktivität des Gly-Lys-

Asp-Gly-Spacers (Nr. 1) war die höchste aller AS-Spacer bei dieser Spacerlänge (~ 60 mg/g), wobei die des entschützten Asparaginsäure-Spacers (Nr. 5) den niedrigsten Wert aller AS-Spacer darstellte (~ 20 mg/g). Die übrigen Spacer (Nr. 2, 3, 4) lagen alle um 30 bis 40 mg/g. Auch bei der Aktivität (Direktmessung) lag der Asparaginsäure-Spacer (Nr. 5) bei einem niedrigem Wert (~ 5 mg/g) als alle anderen Spacer (Nr. 1-4: Um 12 mg/g). Die spezifische Aktivität lag für alle fünf untersuchten Spacern um 12 U/mg und somit im selben Größenbereich wie die anderen AS-Spacer vergleichbarer Länge (2.9 nm).

Die Spacer, die mit entschützter Seitengruppe (Lysin und Asparaginsäure, Spacer Nr. 3-5) verwendet wurden, zeigten in Untersuchungen mit dem ESEM, dass die Behandlung der Partikel mit Trimethylsilaniodid (TMSI, zum Entschützen) diese verändert hatte (vgl. Abb.66).



**Abb.66:** ESEM-Bild der PmaP nach Entschützen der Lysin-Seitenkette mittels TMSI (1) im Vergleich zu mit Wasser gewaschenem PmaP (2).

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen ist, war die äußere Hülle des Partikels nach dem Kontakt mit Trimethylsilaniodid (TMSI) beschädigt und verformt. Daher sind die Ergebnisse der Spacer Nr. 3-5 nicht zu verwenden, da diese Veränderung der Partikeloberfläche die Anzahl der funktionalen Gruppen reduzierte. Erst an diesem Punkt zeigte sich, dass die Behandlung mit TMSI die Partikel veränderte.

### **Bewertung der Spacerversuche**

Aus den Ergebnissen der Aktivitätsmessung und den generellen Betrachtungen des Spacers (hohe „Spacerbeladungsdichte“, „Verstrickung“, „erhöhtes Raumvolumen“) folgt:

- Bei der Immobilisierung des Enzyms auf den PvacP ergab sich eine höhere Beladung durch die anziehenden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger

- Bei der Immobilisierung des Enzyms auf den PmaP ist die Beladung auf Grund der abstoßenden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger geringer
- Beide Immobilisate unterliegen den Effekten des „erhöhten Raumvolumens“, der erhöhten Wahrscheinlichkeit der „Verstrickung“ und verfügen auf Grund der hohen Anzahl an Aminogruppen über eine hohe „Spacerbeladungsdichte

Daraus ergibt sich:

Da sich Enzym und Träger bei der Immobilisierung auf PvacP anziehen, ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass es hierbei zur „Verstrickung“ kommt. Somit sind die Enzyme im Mittel näher am Träger als es bei den immobilisierten Enzymen auf den PmaP der Fall ist. Da die Diffusion in der Nähe der Träger geringer ist, ist die Diffusionslimitierung des Substrates in der Katalyse höher und die Aktivität somit geringer. Dies erklärt, warum bei den PvacP-Immobilisaten im Gegensatz zu den PmaP-Immobilisaten die spezifische Aktivität mit zunehmender Spacerlänge abnimmt.

Daraus ergibt sich, dass ein längerer Spacer nur bei abstoßenden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Träger einen positiven Effekt erzielt. Daher wurden die Versuche mit dem AS-Spacer ausschließlich mit den PmaP vorgenommen.

### **Vergleich mit den Nanopolymer-Partikeln**

Um einen Vergleich mit Nanopartikeln zu erhalten, wurden Polymethylmetacrylat-Nanopartikel (4 nm mittlere Partikelgröße) mit einer Spacereinheit des HG-Spacers funktionalisiert und mit Enzym mittels der Glutardialdehyd-Methode beladen:

- 120 mg/g Beladung (Massenbilanz)
- 108 mg/g aktives Enzym (Direktmessung)
- 37.8 U/mg spezifische Aktivität

Diese Werte sind, im Vergleich mit den Mikropartikeln, gerade bei einem so kurzen Spacer, hervorragend. Die Beladung ist deutlich höher, wenn auch nicht so hoch wie unter Zugrundelegung der spezifischen Oberfläche berechnet wurde. Da die Nanopartikel eine hundertfach größere spezifische Oberfläche besitzen als die Mikropartikel sollten sie deutlich mehr Enzym binden. Aber es zeigte sich in diversen Versuchen (Franzreb et al, 2006), dass oft nur ein Hundertstel der erwarteten Beladung auf Nanopartikeln erfolgt. Daher ist die Beladung, die etwa dem Doppelten des Maximalwertes der Mikropartikel entspricht, im Rahmen des erwarteten Bereichs. Der Anteil an aktivem Enzym, wie auch die spezifische Aktivität sind, gerade für solch einen kurzen Spacer, sehr hoch. Dies ist auf ein günstige-

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

res Größenverhältnis von Träger und Enzym und die daraus resultierende geringere sterische Hinderung zurück zu führen.

Allerdings ist die Handhabung der Nanopartikel äußerst problematisch. Obwohl magnetisch, konnten diese in wässrigen Medien nicht magnetisch separiert werden, so dass sie zentrifugiert werden mussten. Dies liegt daran, dass diese Nanopartikel aus einem einzigen Maghemitkristall ( $< 4$  nm) bestehen, der mit einem Polymethylmethacrylat-Coating versehen ist. Daher ist die magnetische Sättigung pro Nanopartikel zu gering, um eine magnetische Separation anzuwenden. Zudem agglomerierten die Partikel aber bei jeder Separation stärker als zuvor, so dass sie bei Versuchen mit längeren Spacern nicht mehr resuspendiert werden konnten. Somit konnten keine Versuche mit längeren Spacern durchgeführt werden.

### **Active Site Titration der Penicillin G Acylase**

Die Active Site Titration (AST) ist eine sehr genaue Methode, um die aktive Penicillin G Acylase in freier oder immobilisierter Form zu bestimmen. Daher wurde diese Methode verwendet, um die Direktmessung bei entweder zweifelhaften Ergebnissen oder stichprobenartig zu überprüfen. Dabei stellte sich heraus, dass die Ergebnisse eine Abweichung von bis zu  $\pm 4\%$  aufwiesen.

### **Messung der Gesamtproteinmenge von Penicillin G Acylase**

Diese Methode wurde verwendet, um die Massenbilanz zu überprüfen und ist nur auf nicht immobilisiertes Enzym anzuwenden. Da dabei eine Referenz mit Bovine Serum Albumin (BSA) verwendet wurde, ist der Fehler sehr hoch:  $\sim \pm 20\%$ . Daher wurde diese Methode nur zur zusätzlichen Überprüfung von Ergebnissen verwendet.

### **Versuche zur Lagerstabilität**

Die Lagerstabilität bezeichnet die Veränderung der Aktivität des Enzyms durch die Lagerung in einem Zeitraum von wenigen Tagen bis einigen Wochen.

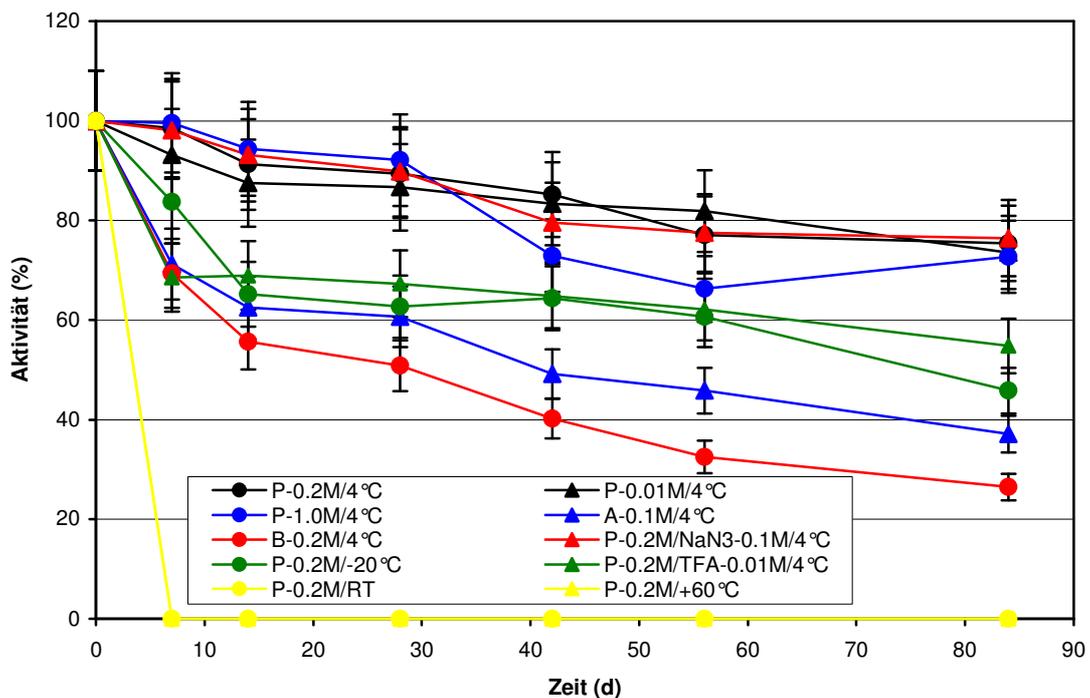
Es wurde die Lagerstabilität der Penicillin G Acylase in freier (vgl. Abb.67) und immobilisierter (vgl. Abb.68) Form unter zehn verschiedenen Bedingungen der Lagerung untersucht:

- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / 4°C
- Phosphatpuffer (0.01 M, pH 7.5) / 4°C

- Phosphatpuffer (1.0 M, pH 7.5) / 4 °C
- Acetatpuffer (0.1 M, pH 3.75) / 4 °C
- Bicarbonatpuffer (0.2 M, pH 9.0) / 4 °C
- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / Natriumazid (0.1 M) / 4 °C
- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / Raumtemperatur
- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / -20 °C
- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / +60 °C
- Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) / Trifluoressigsäure (0.01 M) / 4 °C

Natriumazid wird verwendet, um Mikroorganismen in der Probe abzutöten und somit Kontaminationen zu vermeiden.

Es zeigte sich, dass die Penicillin G Acylase bei 60 °C (P-0.2 M / +60 °C) sofort deaktiviert wurde, so dass keine Lagerstabilität messbar war (vgl. Abb.67).



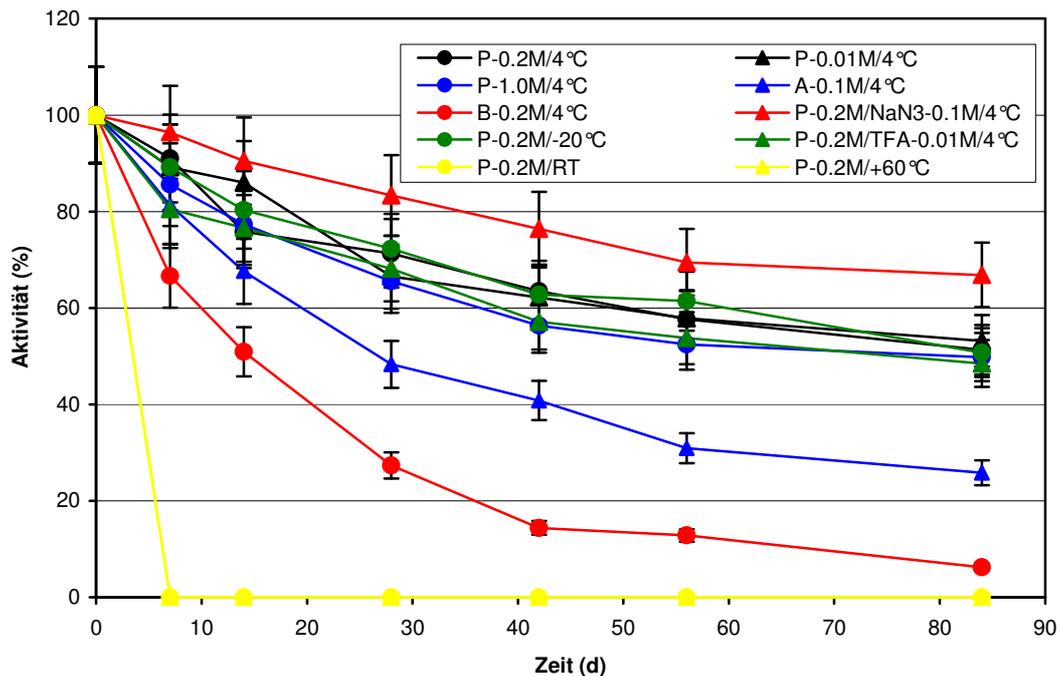
**Abb.67:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Lagerstabilität). Die Punkte sind zur besseren Übersicht durch Linien verbunden.

Eine Lagerung bei Raumtemperatur (P-0.2 M / RT) führte zu einer Vermehrung von Mikroorganismen, so dass die Probe nach kurzer Zeit stark kontaminiert war. Mikroorganismen sind in jeder Probe vorhanden, da nicht steril gearbeitet wurde. Diese vermehren sich aber bei 4 °C nicht wesentlich, so dass sie kein Problem darstellen.

Dabei stellte sich heraus, dass vier Aufbewahrungsarten, jene in reinen Phosphatpuffern bei unterschiedlicher Ionenstärke (P-0.2 M / 4 °C, P-0.01 M / 4 °C, P-1.0 M / 4 °C) und jene

mit Natriumazid (P-0.2 M /  $\text{NaN}_3$ -0.1 M / 4°C) nach 84 Tagen immer noch eine Aktivität von über 70% aufwiesen. Alle anderen Aufbewahrungsarten waren merklich ungünstiger. Bei der endgültigen Lagerung wurde Natriumazid zugegeben, um deren Vermehrung zu unterbinden.

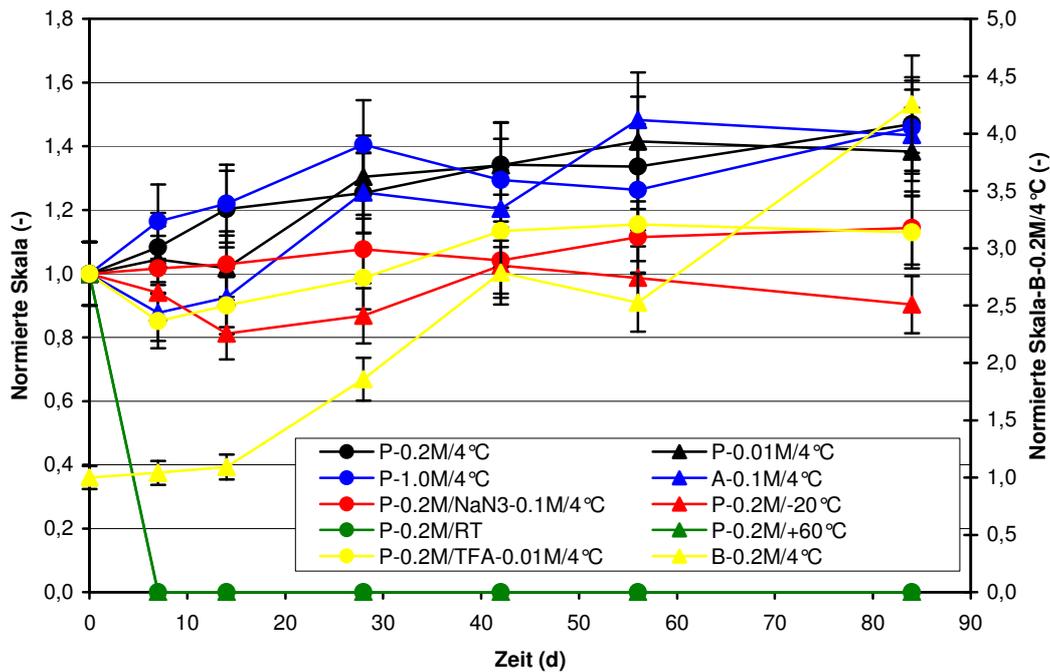
Auch beim freien Enzym erwies sich der Phosphatpuffer mit Natriumazid (P-0.2 M /  $\text{NaN}_3$ -0.1 M / 4°C) als das beste Medium zur Lagerung des Enzyms (vgl. Abb.68).



**Abb.68:** Aktivität der freien Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Lagerstabilität).

Die Lagerung des freien Enzyms in Lösung bei -20°C und mit Trifluoressigsäure als Zusatz (P-0.2 M / -20°C, P-0.2M / TFA-0.01 M / 4°C) verursachte nur einen geringen Verlust an Aktivität. Es zeigte sich eine Aktivität von 50% nach 84 Tagen.

Die Ergebnisse der Lagerungsarten der freien und immobilisierten Penicillin G Acylase wurden zueinander in Beziehung gebracht. Dabei wurde die Lagerstabilität des immobilisierten Enzyms mit der Lagerstabilität des freien Enzyms normiert. Daraus ergibt sich, dass ein Wert größer eins eine höhere Lagerstabilität des immobilisierten Enzyms im Vergleich zum freien Enzym aufweist (vgl. Abb.69).



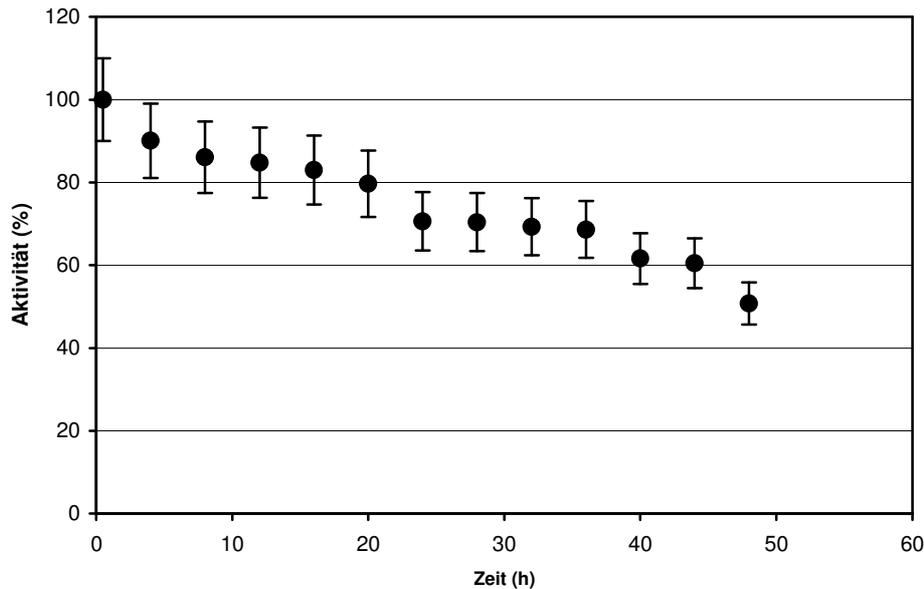
**Abb.69:** Vergleich der Lagerstabilitäten der immobilisierten und freien Penicillin G Acylase. Diese ist auf 1.0 bei gleicher Stabilität normiert. Der Graph für die Aufbewahrung in Bicarbonatpuffer (B-0.2M) ist als einziger der rechten y-Achse zugeordnet.

Mit Ausnahme der Lagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  ist bei allen Proben das immobilisierte Enzym stabiler als das freie Enzym, ganz deutlich ist es bei der Lagerung in Bicarbonatpuffer (B-0.2 M /  $4^{\circ}\text{C}$ ) zu sehen, das als einzige Probe auf der linken Normierungsskala angezeigt wird. Dabei ist das immobilisierte Enzym um den Faktor vier stabiler als das freie Enzym. Der stabilisierende Effekt der Immobilisierung ist im alkalischen Bereich besonders ausgeprägt.

### Versuche zur Betriebsstabilität

Die Betriebsstabilität bezeichnet die Veränderung der Aktivität des Enzyms nach mehreren Katalyse- und Aufreinigungszyklen in einem Zeitraum von einigen Stunden.

Die Betriebsstabilität der Penicillin G Acylase, immobilisiert auf Polymethylacrylat-Partikeln (PmaP) wurde durch 13 Zyklen (alle 4 h eine Messung, sowie eine Messung nach 0.5 h) gemessen (vgl. Abb.70).



**Abb.70:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Betriebsstabilität).

Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität nach 20 h (6 Zyklen) bei 80% liegt. Diese sinkt auf 52% nach 48 h (13 Zyklen).

### 3.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Funktionalisierung der Polymerpartikel (vgl. Kapitel 2) mit dem Hexamethylendiamin-Glutardialdehyd-Spacer (HG-Spacer) und mit dem Aminosäurespacer (AS-Spacer). Das Modellenzym Penicillin G Acylase wurde mittels Glutardialdehyd kovalent immobilisiert und die Aktivität bestimmt. Dabei wurden die Beladung und die Menge an aktivem Enzym auf dem Träger gemessen. Es wurden auch die Lagerstabilität und Betriebsstabilität untersucht.

#### Optimierung der Spacersynthese

Durch die Optimierung der Parameter der Aktivierungsreaktion der Partikel mit Hexamethylendiamin konnte die Anzahl an Aminogruppen auf 500  $\mu\text{mol/g}$  gesteigert werden. Die Gesamtausbeute des HG-Spacers betrug mindestens 90%. Dies wurde durch die hohe Ausbeute der Teilreaktionen erreicht. Die Bedingungen für die Synthese des AS-Spacers sind ebenfalls verbessert worden und erlaubten somit deutlich erhöhte Beladungen. Da bei dieser, auf der Merrifield-Technik basierenden Methode, die Ausbeuten bei fast 100% liegen, lag die Gesamtausbeute bei > 98%.

Nachdem die Reaktionsvorschriften verbessert worden waren, wurden die Parameter für die Spacersynthese festgelegt. Dabei wurden der HG-Spacer in seiner Länge (1.62 bis

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

16.2 nm) und der AS-Spacer in seiner Länge (2.9 bis 9.1 nm) und Struktur ( $\alpha$ -Aminobutylsäure, Asparaginsäure, Glycin, Lysin, Phenylalanin und Prolin) variiert, um günstige Bedingungen für die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase und der durch dieses Enzym durchgeführten Katalyse zu gewährleisten.

Dabei wurde Glycin verwendet, um den HG-Spacer mit dem AS-Spacer vergleichen zu können, während durch die  $\alpha$ -Aminobutylsäure der AS-Spacer weitere Methylgruppen erhielt und somit dem HG-Spacer weiter angenähert wurde, da das Verhältnis von Heteroatomen zu Kohlenstoffatomen dem HG-Spacer weiter angepasst wurde.

Die Asparaginsäure und Lysin –Aminosäuren stellen dissoziierbare Gruppen, Phenylalanin einen aromatischen Rest im Spacer zur Verfügung, während Prolin einen etwas starreren Spacer bewirkte.

Ebenso wurde die Flexibilität der Spacer durch die Synthese eines speziellen Spacers für die Inhibierung eines Proteins mit einem Teil des Spacers als Substrat unter Beweis gestellt. Somit ist es möglich, durch die Verwendung einer Vielzahl von chemischen Reaktionen und Substanzen, den Spacer dem aktuellen Problem anzupassen.

### **Immobilisierung der Penicillin G Acylase mittels Spacern**

Von den untersuchten Immobilisierungstechniken ist die Bindung mittels Glutardialdehyd mit Abstand am günstigsten, da die Ausbeute deutlich höher ist, es ein stetiges Arbeiten in wässrigen Medien erlaubt und eine unproblematische Handhabung ermöglicht. Auch zeigte sich, dass eine Reaktionsdauer von 40 h und eine Reaktionstemperatur von 40°C die höchste Ausbeute erbringt. Ebenso erwiesen sich eine Ionenstärke von 1.0 M und eine eingesetzte Enzymmenge von 100 mg/g allen anderen Varianten überlegen. Die maximale Ausbeute betrug 99%.

Die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase erbrachte auf den Polymermikroträgern eine Beladung (Massenbilanz) von 23.9 bis 99.7 mg/g, 5.8 bis 64.3 mg/g aktives Enzym und eine spezifische Aktivität von 9.2 bis 42.2 U/mg durch den HG-Spacer. Dies belegt eindeutig eine Verbesserung der Beladung, aktiven Enzymmenge und der spezifischen Aktivität durch die Verwendung von Spacern. Auch konnte bei den letzten beiden Parametern eine deutliche Steigerung mit zunehmender Spacerlänge festgestellt werden.

Beim AS-Spacer (Glycin) hingegen variierte die Beladung (Massenbilanz) von 40.1 bis 55.7 mg/g, die Menge an aktivem Enzym (Direktmessung) von 11.0 bis 15.2 mg/g und die

Modifizierung der Trägersysteme mittels Spacer und Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase

spezifische Aktivität von 11.5 bis 12.2 U/mg. Obwohl die Massenbilanz so hoch war, waren der Anteil an aktivem Enzym und damit die spezifische Aktivität deutlich geringer. Gerade letztere wirft die Frage auf, warum in diesem Falle ein längerer Spacer nicht zu der bei HG-Spacer festgestellten Zunahme der spezifischen Aktivität führte.

Das Maximum der Beladung erzielte der HG-Spacer auf den Polyvinylacetat-Partikeln (99.7 mg/g, 3.25 nm) und bei dem AS-Spacer der Lysin-Spacer mit 60.5 mg/g (bei 5.3 nm Spacerlänge), das Maximum der Menge an aktivem Enzym auf dem Träger der HG-Spacer mit 64.3 mg/g (bei 6.49 nm Spacerlänge), bei dem auch das Maximum der spezifischen Aktivität mit 42.2 U/mg lag. Die maximale spezifische Aktivität beim AS-Spacer erzielte der Phenylalanin-Spacer mit 19.1 U/mg (bei einer Länge von 2.9 nm). Von den weiteren Versuchen ist der Gly-Lys-Asp-Gly-Spacer hervorzuheben. Dieser wies mit 58.6 mg/g eine hohe Beladung (Massenbilanz) und mit 15.5 mg/g zudem eine hohe Menge an aktivem Enzym (Direktmessung) auf. Leider war die spezifische Aktivität mit 11.1 U/mg sehr gering. Dennoch ist dies ein viel versprechendes Ergebnis, dass die Vorteile für die Spacersynthese durch die Flexibilität der Aminosäuren belegt.

Nicht immer ist eine Erhöhung der Beladung mit einer Steigerung der aktiven Enzymmenge gekoppelt. Denn dabei spielen zwei gegenläufige Effekte eine Rolle: Die „Verstrickung“ des Spacers, deren Wahrscheinlichkeit mit zunehmender Spacerlänge steigt und das ebenfalls mit zunehmender Spacerlänge zur Verfügung stehende „erhöhte Raumvolumen“ für das Enzym.

### **Vergleich mit Polymer-Nanopartikeln**

Ein Vergleich mit den Polymethylmethacrylat-Nanopartikeln (Institut für Materialforschung, Forschungszentrum Karlsruhe) erbrachte die für Nanopartikel im erwarteten Bereich liegende Beladung (Massenbilanz) von 120 mg/g, 108 mg/g Menge an aktivem Enzym und die hohe spezifische Aktivität von 37.8 U/mg. Allerdings war die Agglomeration der Nanopartikel so stark, dass keine detaillierten Versuche möglich waren.

### **Problem der Agglomeration**

Auch bei den Mikropartikeln ergab sich ein großes Problem durch die Agglomeration, vor allem bei dem AS-Spacer. Hierbei agglomerierten die Partikel so stark, dass einige längere Versuchsfolgen nur mit hohem Aufwand im Bezug auf die Separierung und Resuspension möglich waren, wohingegen andere nicht über eine gewisse Länge hinaus synthetisiert werden konnten.

Da die Nanopartikel deutlich stärker als die Mikropartikel agglomerierten und, obwohl magnetische Partikel, nicht magnetisch separiert werden konnten, sind diese für einen Einsatz als Träger weniger geeignet.

### **Betrachtung der Lager- und Betriebsstabilität**

Die beste Lagerungsbedingung für immobilisierte Penicillin G Acylase stellt die Aufbewahrung in Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) mit 0.1 M Natriumazid bei 4°C dar. Natriumazid wird auf Grund der antibakteriellen Wirkung als Zusatz verwendet. Diese Lagerungsart erhielt nach 28 Tagen noch 89.8% und nach 84 Tagen noch 76.5% der Aktivität.

Die immobilisierte Penicillin G Acylase besitzt nach 6 Zyklen (20 h) immer noch eine Aktivität von 80%. Damit ist diese Immobilisierungsmethode im Bezug auf die Betriebsstabilität noch verbesserungswürdig, da bei anderen Immobilisaten bis zu 300 Zyklen möglich waren.

### **Vergleich der Ergebnisse**

Der in der Industrie oft verwendete Träger Eupergit<sup>®</sup>-C liegt mit 6 €/g in der Preisklasse der in dieser Arbeit verwendeten Polymerträgern. Eupergit<sup>®</sup>-C besitzt eine maximale Beladung mit Penicillin G Acylase von 0.36 µmol/g, mit 0.30 µmol/g aktives Enzym. Auf Grund der sehr geringen molekularen Aktivität (Substratumsatz pro Enzymmolekül und Sekunde) ist die Aktivität deutlich reduziert (Kallenbert et al, 2005). Die in dieser Arbeit verwendeten Polymerträgern wiesen eine Beladung von 0.70 µmol/g an Enzym, eine maximalen Menge an aktivem Enzym von 0.28 µmol/g und eine spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms von 42.2 U/mg auf.

## 4. Physikalisch-chemische Untersuchung der Penicillin G Acylase

Eine etablierte Methode zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen stellt die Circular dichroismus-Messung dar. Dabei wird die Sekundärstruktur von Proteinen durch die unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives Medium (chirale Moleküle) bestimmt. Damit bietet sich diese Methode an, um die Strukturänderungen von Enzymen infolge der Immobilisierung zu untersuchen. Bisher war es aber nicht möglich, kovalent immobilisiertes Enzym mittels Circular dichroismus zu untersuchen. Dies wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung spezieller Träger und besonderer Handhabung der Träger erreicht.

Eine Voraussetzung für die Auswertung von CD-Spektren ist die Kenntnis der exakten molaren Masse und der Aminosäuresequenz des untersuchten Proteins. Diese Parameter wurden durch Massenspektrometrie bestimmt.

Mittels der Quarzkristallmikrowaagentchnik wurde die Kinetik der Immobilisierung gemessen, indem die Frequenzänderung auf Grund der Massenzunahme durch die Immobilisierung ausgewertet wurde.

### 4.1. Stand des Wissens

Immobilisierung führt sowohl zu einer erhöhten Betriebsstabilität und Lagerstabilität, als auch zu einer erhöhten Enzymstabilität gegenüber extremen pH-Werten, höheren Temperaturen und Ionenstärken. Man fand eine höhere thermische Stabilität von immobilisierter  $\beta$ -Glucosidase gegenüber dem freien Enzym (Busto 1998). Während sich die pH-Stabilität nicht änderte, verminderten sich die kinetischen Eigenschaften des immobilisierten Enzyms. Für Lipase (*Candida Antarctica*) wurden (Cao et al, 1999) einige Träger (Celite, HyfloSupergel, Amberlite XAD-7, Polypropylen, Polypropylen mit magnetischen Eigenschaften, Silicagel) für die Immobilisierung untersucht, um den besten zu bestimmen. Es ergab sich bei der Katalyse durch auf Polypropylenträger immobilisiertem Enzym eine Verminderung der Aktivität von 25% nach sechs Zyklen und eine Verminderung der Aktivität um 30% bei einer Temperaturerhöhung von 30°C auf 70°C als bestes Ergebnis. Die Immobilisierung von Penicillin G Acylase auf Acrylträgern bestätigte, dass die Lagerstabilität, die Stabilität gegenüber niedrigeren pH-Werten und die thermische Stabilität erhöht waren (vgl. Kapitel 2).

#### 4.1.1. Chiroptische Methode (Circulardichroismus)

Die Circulardichroismus-Messung (CD-Messung) ist eine gut etablierte spektroskopische Technik um strukturelle Eigenschaften von Proteinen zu untersuchen. Als CD wird das Phänomen bezeichnet, dass der molare Extinktionskoeffizient für links- und rechts-zikular polarisiertes Licht nach dem Durchgang durch ein optisch aktives Medium unterschiedliche Intensität aufweist. Dies ergibt ein elliptisch polarisiertes Licht, dass mit einem Dichrometer gemessen wird. Die Dimension des CD ist die molare Elliptizität (MRE, engl. mean residue ellipticity,  $[MRE] = \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$ ):

$$\text{molare Elliptizität} = 3300 \cdot \Delta\varepsilon \quad \text{mit} \quad \Delta\varepsilon = \varepsilon_{\text{links}} - \varepsilon_{\text{rechts}} / \varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient}$$

CD wird innerhalb von Absorptionsbanden beobachtet, die von Elektronenübergängen herrühren (Jakubke und Karcher, 1998). Es wurden zahllose Publikationen über die Sekundärstruktur, die tertiäre Struktur-Fingerprints von Proteinen, die Protein-Liganden-Wechselwirkungen, Thermodynamik der Proteinfaltung, Konformationsübergänge, Proteinaggregation und die Kinetik der Proteinfaltung verfasst. Die Grundlagen über CD und Beispiele ihrer Anwendungen wurden in einigen Review-Artikeln zusammengefasst (Kelly et al, 2005, Heitz und Van Mau, 2002, Berova et al 2000, Van Mierlo und Steensma, 2000, Greenfield, 1999, Woody, 1995).

CD wird in der Regel dazu genutzt, um Proteine in Lösung zu untersuchen, hierzu sind sehr gut ausgearbeitete Algorithmen verfügbar, die die Berechnung der Sekundärstrukturanteile aus gemessenen Spektren von strukturell unbekanntem Proteinen ermöglichen (Oberg et al, 2004, Sreerama und Woody, 2004 a und 2004b, Wallace et al, 2003). Dies basiert auf den charakteristischen CD-Spektren im UV-Bereich der unterschiedlichen Anteile der Sekundärstruktur. Diese Techniken benötigen einen Basissatz von CD-Spektren von Proteinen, die unterschiedliche Faltungen vertreten, deren Strukturen durch X-ray Kristallographie bekannt sind. Wenn allerdings strukturelle Änderungen von an festen Phasen immobilisierten Enzymen gemessen werden sollen, dann entstehen durch Streueffekte im UV-Bereich und eine im Bezug auf die Messung zu schnelle Sedimentation Artefakte im CD-Spektrum. Durch eine inhomogene Verteilung der Chromophore in der Lösung entstehen weitere Artefakte. Diese Artefakte werden absorption flattening (Absorptionsglättung) genannt, da sie die Konturen des Spektrums verwischen (Bustamente und Maestre, 1988). Dieser Effekt wurde erstmals von Duysens 1956 entdeckt. Das Problem der inhomogenen Verteilung der Chromophore in der Lösung während der Messung wurde schon

früh erkannt (Wallace und Mao, 1984) und eingehend untersucht (Glaeser und Jap, 1985, Wallace und Teeters, 1987).

Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, haben einige Arbeitsgruppen CD-Spektren von verschiedenen Enzymen aufgenommen, die nicht-kovalent auf Nanopartikeln immobilisiert waren, so dass keine schnelle Sedimentation entsteht und somit die Streueffekte minimal sind (Maste et al, 1997, Caessens et al, 1999, Giacomelli und Norde, 2001, Peng et al, 2004). Ebenso wurde das Problem dadurch umgangen, dass das CD-Spektrum von zum Beispiel Bovine Serum Albumin in Lösung gemessen wurde und zwar bevor und nachdem es an einer festen Oberfläche (Silica-Nanoträger und Polystyrol-Nanoträger) adsorbiert war (Norde und Giacomelli, 2000). Dieser Versuch zeigte, dass ein schneller Austausch zwischen der adsorbierten und gelösten Form des Enzyms stattfand. Das CD-Spektrum zeigt eine deutliche Konformationsänderung nach dem Adsorptions- und Desorptionsprozess bei den Polystyrol-Nanopartikeln, nicht aber bei den Silica-Nanopartikeln. Dies liegt daran, dass Enzyme durch hydrophobe Wechselwirkungen adsorbiert und dabei oft in ihrer Sekundärstruktur verändert werden. Dieser Effekt ist bei den hydrophilen Silica-Nanopartikeln deutlich geringer. Silicapartikel wurden schon dazu verwendet, um die Sekundärstruktur von Enzyme nach der Adsorption an Trägern in freier Form zu bestimmen (Norde und Zoungrana, 1998). In diesem Fall wurde das freie Enzym in Gegenwart der Partikel untersucht. Eine weitere Arbeitsgruppe (Vermeer und Norde, 2000) verwendeten dünne mit Teflon umhüllte Quarzplatten mit adsorbiertem Protein auf der Teflonschicht, welche in einer Quarzzelle mit Puffer eingesetzt wurden, um brauchbare CD-Spektren zu erhalten. Allerdings sind die Spektren des auf Teflon adsorbierten Proteins IgG, die in dieser Publikation gezeigt werden, unterhalb 205 nm unbrauchbar.

Ganesan et al (2006) stellten eine neu entwickelte rotierende Zellhalterung vor, die in ein CD-Spektropolarimeter eingesetzt wurde und dazu genutzt werden konnte, die Sedimentation von Mikropartikeln zu verhindern. Das Protein Subtilisin Carlsberg wurde auf der Oberfläche von 35 bis 60  $\mu\text{m}$  großen Silicapartikeln adsorbiert und die rotierende Zellhalterung wurde direkt am Detektor positioniert. Dadurch konnte ein CD-Spektrum mit nur minimalen Streueffekten und Verzerrungen gemessen werden, obwohl auch hier Adsorptionsglättung auftrat. Die Adsorptionsglättung wurde durch einen empirischen Ansatz ausgeglichen.

Bisher wurde noch kein kovalent an einer festen Phase gebundenes Enzyme mit Circular-dichroismus gemessen. Sharma et al (2003) banden  $\alpha$ -Chymotrypsin durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) kovalent an einen besonderen Polymethyl-

methacrylat-Träger, der je nach pH-Wert fest oder flüssig ist: Das Enzym wurde an den Träger im festen Zustand bei pH 4.5 immobilisiert und separiert. Die CD-Messung fand bei einem pH von 7.6 statt, bei dem der Träger flüssig ist. Somit wurde das Spektrum nicht von einem an einer festen Oberfläche immobilisiertem Enzym gemessen. Allerdings sind die CD-Spektren der freien und immobilisierten  $\alpha$ -Chymotrypsin auf Wellenlängen  $> 200$  nm limitiert und das Spektrum des freien Enzyms zeigt starke Abweichungen mit Literaturdaten (zum Beispiel Celej et al, 2004).

Für die meisten Immobilisierungen wurden Silicapartikel verwendet, da diese in der Regel lichtdurchlässig sind. Immobilisierung von Penicillin G Acylase sowohl auf Silica-Nanopartikeln (Chong et al, 2004, He et al, 2000), als auch auf Silica-Mikropartikeln (Cal-lerie et al, 2004) sind gängige Verfahren. Die Streuung von Partikeln in Lösung ist abhängig von der Wellenlänge des verwendeten Lichts, der Größe der Partikel und deren Größenverteilung. Je geringer die zur Analyse verwendete Wellenlänge ist, desto stärker ist der Streueffekt. Kleinere Partikel und Partikel mit schmaler Größenverteilung streuen weniger als größere Partikel oder solche mit breiter Größenverteilung. Silica-Mikropartikel können in fast beliebigen Größen erzeugt werden (Esquena et al, 1996).

#### **4.1.2. Massenspektrometrie**

Für die Bestimmung der Sekundärstruktur mittels Circular dichroismus-Messungen sind die molare Masse und die Aminosäuresequenz von entscheidender Bedeutung. Erstere lässt sich direkt durch Massenspektrometrie (MS) bestimmen, diese benötigt dafür nur geringe Mengen an Protein. Für die Bestimmung der Aminosäuresequenz ist eine vollständige Sequenzierung nötig und kann mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Da aber in den meisten Fällen bekannte Enzyme verwendet werden, können diese über enzymatischen Abbau („Verdau“) in definierte Fragmente zerlegt (Shevchenko et al, 1996) und durch Massenspektrometrieanalyse unter Verwendung verschiedener Datenbanken (zum Beispiel NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) identifiziert werden. Diese Daten umfassen alle relevanten Eigenschaften des Enzyms, auch die molare Masse und die Aminosäuresequenz. Das Protein wird mittels Gelelektrophorese gereinigt und wenn es aus mehreren Untereinheiten besteht, auch in diese aufgetrennt.

Dieses Verfahren ist etabliert (Lahm und Langen, 2000). Für die Massenspektrometrie-Messungen werden oft MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry, Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierungs-Flugzeitmassenspektrometrie) (Markus et al, 2000) oder MALDI-TOF MS/MS (Tandem-

MS, Bienvenult et al, 2002) verwendet, die über eine bessere Auftrennung der Fragmente verfügen.

### 4.1.3. Quarzkristallmikrowaagen-Untersuchung

Die QCM-Technik wurde vor ungefähr 25 Jahren entwickelt und wird verwendet, um Oberflächenprozesse an der Grenzfläche fest-flüssig (meist Wasser) zu untersuchen. Die Grundlage der Quarzkristallmikrowaagentechnik bildet ein dünner Quarzkristall, dessen Oberfläche mit einer Elektrode bedampft ist. Es wird eine Wechselspannung angelegt, die den Quarzkristall, der als Sensor fungiert, zu einer resonanten Oszillation anregt. Diese fällt exponentiell ab, wenn die Wechselspannung unterbrochen wird. Die Quarzkristallmikrowaagentechnik mit Dissipation Monitoring (QCM-D) misst diesen Abfall und bestimmt daraus die Resonanzfrequenz des Kristalls  $f$  und die Dämpfung  $D$ . Erstere ist von der gesamten oszillierenden Masse  $m$  abhängig. Für dünne, starre Filme gilt die Sauerbrey-Gleichung ( $\Delta m = -k \cdot \Delta f$ ,  $k$ : Konstante), eine sehr einfache Gleichung zur Bestimmung der Masse des adsorbierten Materials in Form eines Films (Welle, 2004). Ein Film besteht zum Beispiel aus immobilisiertem Enzym und Wasser, das auf dem QCM-Chip aufgebracht wurde.

Bei weichen und viskosen Filmen allerdings dissipiert die Energie und die Oszillation wird gedämpft. Diese Dämpfung enthält Informationen über die Struktur des Films. Je höher der Wassergehalt, desto höher ist die Dämpfung. Durch Messung von Frequenz und Dämpfung bei Grund- und Obertönen können Masse, Dicke, dynamische Viskosität und Elastizität des gebundenen Films exakt bestimmt werden (Welle, 2004).

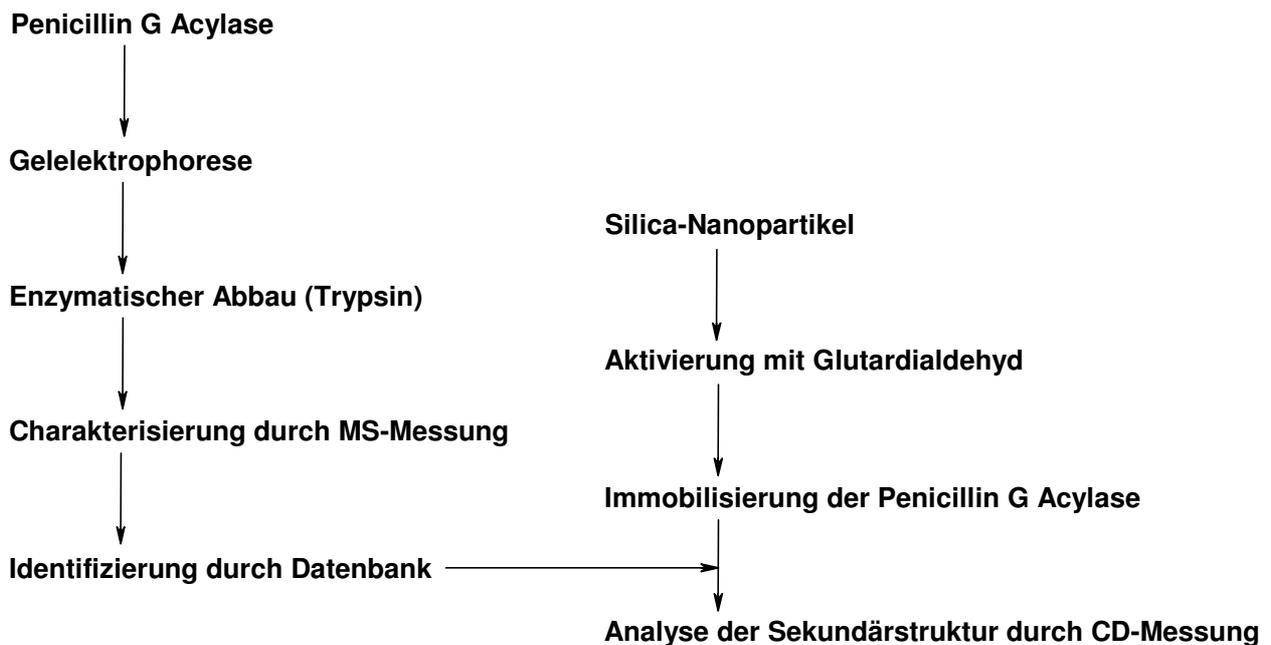
Die QCM-D-Technik erlaubt zeitaufgelöste, die Beschaffenheit der Probe nicht beeinträchtigende Studien von Oberflächenphänomenen zur Bestimmung der Viskoelastizität und der Masse (Welle, 2004).

Diese Methode ist ein etabliertes Verfahren, dass zur Bestimmung von komplexen biologischen Systemen verwendet wird (Marx, 2003). Auch absorbierte und kovalent immobilisierte Proteinen wurden untersucht (Höök et al, 2001, Liu und Wang, 2001).

## 4.2. Übersicht

Die Aufklärung der Sekundärstruktur des immobilisierten Modellenzym Penicillin G Acylase von *E. coli* mittels Circular dichroismus-Messungen erforderte zwei parallel durchgeführte Versuchsreihen. Die Penicillin G Acylase wurde mittels Gelelektrophorese (eindimensional) aufgereinigt und in ihre beiden Untereinheiten aufgetrennt. Diese wurden

durch das Enzym Trypsin abgebaut und durch Massenspektrometrie (MS) charakterisiert. Dafür wurde ein MALDI-TOF MS/MS (Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeit-Tandem-Massenspektrometrie) - System verwendet. Das charakteristische MS-Spektrum wurde mittels der NCBI-Datenbank abgeglichen und das Enzym identifiziert. Damit stand auch die exakte molare Masse und Aminosäuresequenz zur Verfügung (vgl. Abb.71).

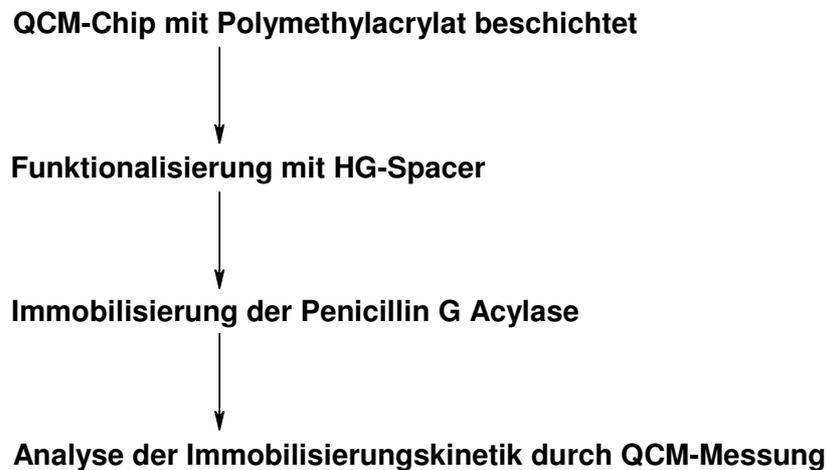


**Abb.71:** Übersicht zum Kapitel 4: Circular dichroismus.

Parallel dazu wurden geeignete Träger gesucht, die eine Circular dichroismus (CD)-Messung nicht durch Streuung oder Sedimentation beeinflussen. Silica-Nanopartikel von Grace Davison (Ludox<sup>®</sup>-HS 40) erfüllten diese Anforderungen, nachdem einige Vorversuche die Bedingungen der Handhabung dieser Nanopartikel aufzeigten, die eine Agglomeration der Träger verhinderten. Die Silica-Nanopartikel wurden mit Glutardialdehyd aktiviert und die Penicillin G Acylase kovalent immobilisiert. Dieses Immobilisat konnte mittels CD-Messungen untersucht werden und mit Hilfe der Ergebnisse der NCBI-Datenbanksuche ausgewertet werden. Dabei ergaben sich geringe Strukturänderungen des Enzyms durch die kovalente Immobilisierung auf Silica-Nanopartikeln. Zum ersten Mal wurde von einem Enzym, dass kovalent an eine feste Oberfläche gebunden wurde, mittels CD-Messungen die Sekundärstruktur bestimmt.

Die Kinetik der Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase von *E. coli* wurde mittels der Quarzmikrowaagentchnik untersucht.

Dafür wurden Quarzmikrowaagen (QCM)-Chips mit Polymethylacrylat beschichtet und mit dem Hexamethyldiamin-Glutaraldehyd-Spacer (HG-Spacer, vgl. Kapitel 3) funktionalisiert (vgl. Abb.72).



**Abb.72:** Übersicht zum Kapitel 4: Quarzkristallmikrowaagen-Technik.

Das Enzym wurde kovalent an den QCM-Chip gebunden und die Kinetik der Immobilisierung mittels QCM-Messungen untersucht. Die berechneten Beladungen aus mehreren unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden erlauben einen Vergleich der Methoden untereinander und ermöglichen so ein schnelles Screening von Immobilisierungstechniken.

### 4.3. Material und Methoden

Die Verwendung von Silica-Nanopartikeln erforderten einige Vorversuche, um Agglomerationen durch Funktionalisierungsreaktionen oder Separierungen zu vermeiden. Dies war ein kritischer Parameter, da agglomerierte Silica-Nanopartikel keine stabilen Suspensionen bildeten und somit nicht in CD-Messungen verwendet werden konnten.

#### 4.3.1. Verwendete Geräte und Chemikalien

Folgende Geräte und Chemikalien wurden für die Identifizierung der Penicillin G Acylase durch MS-Messungen, Immobilisierung auf Silica-Nanopartikel und CD-Messungen und die Untersuchung der Immobilisierungskinetik mittels QCM-Messungen eingesetzt:

#### Verwendete Geräte

- Circular dichroismus-Messung:  
J-810 Spektropolarimeter (JASCO Co., Tokio, Japan)
- Filtermedium zur Wägung:

Polyethersulfone Filter, 0.45 µm (PAL Gelman Lab, PAL Corporation, USA)

- Gefriertrocknung:  
Gefriertrocknungsanlage BETA 1-8 K (Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland)
- Gelelektrophorese:  
Gelelektrophorese-Einheit Mini-PROTEAN 3 Cell (BioRAD Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- IR-Messungen:  
Bruker IFS-66-Infrarotspektrometer (Bruker GmbH, Ettlingen, Deutschland)
- Massenspektrometrie:  
MALDI-TOF MS/MS Unit ABI 4700 (Applied Biosystems, Foster City, USA)
- Proteingesamtbestimmung:  
Cobas Mira Plus Spectrophotometric Roboter (Roche, Basel, Schweiz)
- Quarzkristallmikrowaagen-Messung:  
Q-Sense D300 (Q-Sense, Göteborg, Schweden)
- Reaktionsführung: Schüttler:  
Vortex Genie 2T (VWR International AG, Bruchsal, Deutschland)
- Reaktionsführung, Schüttler und Heizer:  
Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Deutschland)
- Reinstwassererzeugung:  
Milli-Q Plus Ultra Pure-Reinstwasseranlage (Millipore Corporation, USA)
- Ultraschallbehandlung:  
Ultraschall-Reinigungsgerät RK100H-beheizbares Ultraschallbad (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland)
- UV-Messungen:  
Shimadzu UV 1202-Spektrometer (Shimadzu, Japan)
- UV-Messung, Küvette:  
Quarzpräzisionsküvette Suprasil, 2.00 mm Schichtdicke (Hellma, Mühlheim, Deutschland)
- Wägung:  
Adventurer Balance (Ohaus Corporation, USA)
- Zentrifugation:  
5415 D-Eppendorf Zentrifuge (Eppendorf AG, Deutschland)
- Zentrifugation:

Ultra Pro 80 (Kendro Laboratory Products, Berlin, Deutschland)

- Zetapotentialbestimmung:  
ZetaSizer 5000-Zetapotentialmeßgerät (Malvern Instruments Ltd., Britannien)  
Automatic titration stand Mettler DL 21: Titrator (Mettler Toledo, Schweiz)

### Verwendete Chemikalien

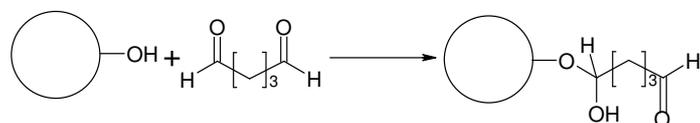
- Merck, Deutschland:  
Glutardialdehyd (zur Synthese)
  - Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland:  
6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB, reinst), Penicillin G Acylase (*E.coli*, 3.5.1.11, reinst), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, > 99%, GC)
  - Grace Davison, Columbia, USA:  
Silica-Nanopartikel ( $\text{SiO}_2$ , Ludox<sup>®</sup>-HS 40) wurden von Grace Davison zur Verfügung gestellt.
  - Promega, Mannheim, Deutschland:  
Sequencing-Grade-Modified-Trypsin (reinst.)
  - GE Healthcare, München, Deutschland:  
LMW-SDS Marker Kit (reinst.)
- Alle anderen Chemikalien waren von analytischer Qualität, es wurde stets Reinstwasser verwendet

### 4.3.2. Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel

Die Silica-Nanopartikel sind monodispers, besitzen eine Teilchengröße von 12 bis 14 nm und bestehen aus Siliziumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ). An der Oberfläche befinden sich OH-Gruppen, die für die Funktionalisierung mit Glutardialdehyd verwendet wurden.

Um die Agglomeration der Silica-Nanopartikel zu verhindern, durfte die Partikelkonzentration der reinen Silica-Nanopartikeln 100 mg/ml nicht überschritten werden. Auch mussten alle Reaktionen mit 1400 U/min durchgeführt werden.

### Reaktionsvorschrift



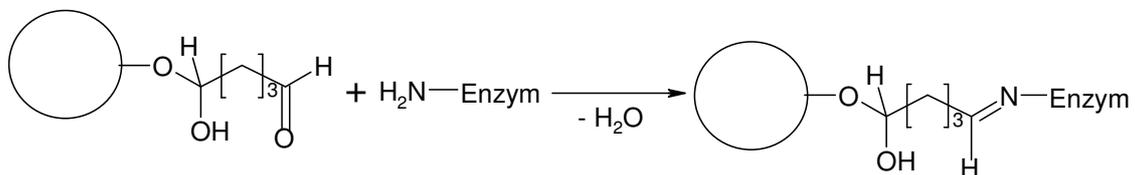
**Abb.73:** Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel mit Glutardialdehyd.

Die Silica-Nanopartikel wurden 1 h bei 25 °C und 1400 U/min mit Glutardialdehyd (1 M) im Thermomixer funktionalisiert und anschließend fünfmal mit Wasser gewaschen. Die Partikel wurden jeweils mit einer Ultrazentrifuge 90 min bei 25 °C und 30 kU/min separiert.

### 4.3.3. Immobilisierung der Penicillin G Acylase

Um eine Agglomeration der Partikel zu verhindern, durfte die Konzentration der mit Enzym beladenen Silica-Nanopartikel 10 mg/ml nicht überschreiten und es musste stets mit 1400 U/min gerührt werden.

#### Reaktionsvorschrift



**Abb.74:** Immobilisierung der Penicillin G Acylase mittels Glutardialdehyd an Silica-Nanopartikel.

40 bis 400 mg Penicillin G Acylase pro g Silica-Nanopartikel, gelöst in 0.2 M Phosphatpuffer (pH 7.5), wurde 1 h bei 25 °C und 1400 U/min im Thermomixer zur Reaktion gebracht. Danach wurden das Immobilisat fünfmal mit 0.01 M Phosphatpuffer (pH 7.5) gewaschen und jeweils mit einer Ultrazentrifuge 90 min bei 25 °C und 30 kU/min separiert.

## 4.4. Analytische Methoden

Die Analytik wurde überwiegend apparativ durchgeführt: Es wurden IR-, MS-, UV-, CD- und QCM-Messungen verwendet. Die Trocknung der Partikel erfolgte durch Gefriertrocknung:

### Gefriertrocknung

Das Trockengut wurde im Gefrierschrank gefroren und dann in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausgesetzt. Dadurch wird die Probe je nach Menge an Wasser innerhalb von wenigen Stunden, bei größeren Proben über Nacht, getrocknet.

Die Gefriertrocknung eignet sich besonders gut zum Trocknen von leicht zersetzlichen Stoffen, da es sich dabei um eine sehr schonende Methode handelt, die ohne hohe Temperaturen, die die Stoffe zersetzen können, auskommt (Jakubke und Karcher 1999). Das Trockengut wird dabei gefroren in der Gefriertrocknungsanlage dem Hochvakuum ausge-

setzt. Durch das dabei auftretende Dampfdruckgefälle zwischen dem gefrorenen Material und dem Kondensator setzt eine Sublimation des Eises ein.

#### **4.4.1. Messung des IR-Spektrums der Silica-Nanopartikel**

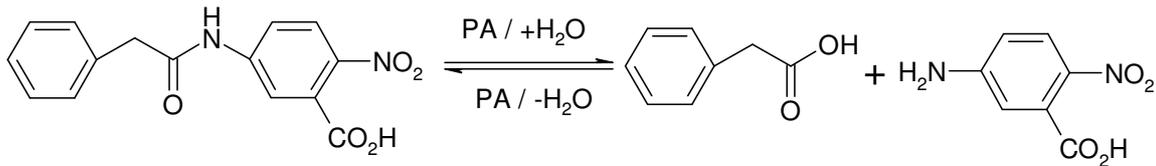
Die Aufnahme der IR – Spektren erfolgte mittels DRIFTS (Diffusion Reflectance Infrared Fourier Transformed Spectroscopy), dabei wird die Probe trocken mit Kaliumbromid verrieben und in einen zylinderförmigen Halter eingebracht. Das IR-Spektrum wird von dem Pulver in Reflexion aufgenommen und ausgewertet.

#### **4.4.2. Gelelektrophorese und Massenspektrometrie**

Die Penicillin G Acylase wurde durch eine eindimensionale Gelelektrophorese mit einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel (1D-SDS-PAGE) gereinigt und in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Die Enzymlösung wurde zweimal mit Puffer, bestehend aus 150 mM Tris (Tri(hydroxymethyl)methylamin, pH 6.8), 120 g/l Natriumdodecylsulfat (SDS), 30v% Glycerol, 15v%  $\beta$ -Mercaptoethanol und 120 mg/l Coomassie Brilliant Blue R-250 als Markierungsreagenz für die Laufmittelfront verdünnt. Die Konzentration des Enzyms betrug nach der Verdünnung 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , die Lösung wurde für 5 min auf 99°C erhitzt. Die Proben wurden dann in die Gelelektrophoresekammer eingebracht und mit Puffer (145 g/l Glycin, 29 g/l Tris, 10 g/l SDS) aufgefüllt. Die Elektrophorese dauerte eine Stunde bei 170 V und 400 mA. Das Gel wurde mit 200 g/l Trichloressigsäure fixiert und die Banden mit 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R-250 markiert. Die Massen wurden durch den Proteinmarker LMW-SDS-Marker Kit angezeigt. Die charakteristischen Enzymbanden wurden aus dem Gel ausgestochen und mittels Trypsin (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) enzymatisch abgebaut. Die Peptidlösung wurde 1:1 mit einer gesättigten Lösung  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure in einem Gemisch aus 0.1v% Trifluoressigsäure und Acetonitril im Verhältnis von 70:30 gemischt und luftgetrocknet ins MALDI-MS eingeführt.

#### **4.4.3. Messung der Enzymaktivität freier und immobilisierter Penicillin G Acylase**

Die Aktivität der freien Penicillin G Acylase (PGA) wurde durch einen spektroskopischen Test mit Hilfe eines Chromophors, entstanden durch die Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzensäure (NIPAB) bestimmt (Kasche 1987). Dabei katalysiert das Enzym Penicillin G Acylase die Hydrolyse von NIPAB zu Phenylelessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoesäure. Die entstandene Konzentration von letzterem wurde bei 380 nm gemessen (vgl. Abb.50).



**Abb.75:** Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB) durch Penicillin G Acylase zu Phenyllessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoessäure.

Dabei wurde folgende Formel zur Bestimmung der am Träger immobilisierten Enzymmenge verwendet:

$$m_{IE} = \frac{c_a * V_a - (c_e * V_e + \sum_{i=1}^n c_{Wi} * V_{Wi})}{m_P}$$

**Abb.76:** Menge an immobilisiertem Enzym.  $m_{IE}$ : Menge an immobilisierter Penicillin G Acylase auf trockenem Träger ([mg/g]),  $c_a$  ( $c_e$ ): Anfangskonzentration (Endkonzentration) der Penicillin G Acylase im Überstand ([mg/ml]),  $V_a$  ( $V_s$ ): Anfangsvolumen (Endvolumen) der Enzymlösung ([ml]),  $c_{Wi}$ : Konzentration der Penicillin G Acylase in den Waschungen ([mg/ml]),  $V_{Wi}$ : Volumen der Waschungen ([ml]),  $i$ : Anzahl der Waschungen ( $i = 1-n$ ) [-],  $m_P$ : Trockengewicht der Träger [g].

Das Spektrometer wurde mit 25  $\mu$ l NIPAB (5 mM) in 950  $\mu$ l Phosphatpuffer ( $I = 0.2$  M, pH = 7.5) abgeglichen und die Hydrolyse wurde durch die Zugabe von PGA (25  $\mu$ l) bei 25°C gestartet. Die durch die Katalyse mittels PGA entstandene Menge des Chromophors wurde spektroskopisch nach einer Minute gemessen. Die Menge an PGA wurde auf das Volumen der Ausgangslösung bezogen. Bei diesen Bedingungen verursacht die Ausgangslösung von 1 mg<sub>PGA</sub>/ml eine Änderung der Absorption von 3.0 Absorptionseinheiten pro Minute, dies entspricht 42 Units pro ml (Kasche 1987).

Die Aktivitätsmessung der immobilisierten PGA wurde wie von Galunsky (1994) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden folgende Änderungen gegenüber der ursprünglichen Vorschrift vorgenommen: Das Spektrometer wurde mit 25  $\mu$ l NIPAB (5 mM) Lösung in 950  $\mu$ l Phosphatpuffer ( $I = 0.2$  M, pH = 7.5) abgeglichen. Die Hydrolyse begann nach der Zugabe von immobilisierter PGA (25  $\mu$ l) und anschließender intensiven Durchmischung (Vortex Genie 2T) der Probe. Nach Reagieren bei 25°C und Zentrifugieren wurde die immobilisierte PGA mittels Zentrifugieren abgetrennt und die Absorption des Überstandes bei 380 nm gemessen (der gesamte Vorgang dauerte 1 min).

Der Aktivitätstest wurde auch dafür verwendet, um festzustellen ob nach der Waschung eines Immobilisates noch Aktivität im Überstand vorhanden war. Es wurde so lange gewaschen, bis der Test negativ ausfiel, dies bedeutet, dass das Immobilisat ausreichend gewaschen und keine Enzymmoleküle mehr an den Träger adsorbiert waren.

#### 4.4.4. Active Site Titration der Penicillin G Acylase

Die Active Site Titration ist eine allgemein verwendete Methode für die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration von Penicillin G Acylase. Dabei wird das aktive Zentrum der Penicillin G Acylase (PGA) mit dem Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) irreversibel inhibiert (Svedas, 1977). Die verwendete Konzentration des Inhibitors PMSF beträgt zwischen 0 und 60% der eingesetzten Enzymkonzentration. Diese liegt im Bereich von 10 bis 20  $\mu\text{mol/l}$ . Dafür wird die PMSF-Lösung (20  $\text{mmol/l}$  in <sup>1</sup>Propanol) mit Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) verdünnt, die Verunreinigung mit <sup>1</sup>Propanol stört die Messung nicht (Van Langen et al, 2002, Janssen et al, 2002). Jedes Molekül PMSF acyliert selektiv das aktive Zentrum der PGA (Serin<sub>B1</sub>) und deaktiviert dadurch dieses PGA-Molekül irreversibel, so dass keine weiteren Substrate hydrolysiert werden können. Nachdem das freie Enzym oder die Träger mit immobilisiertem PGA inkubierten (20 min für das freie und 2h für das immobilisierte Enzym), wurde die verbliebene Aktivität wie oben beschrieben durch NIPAB gemessen. Die Probe ohne Inhibitor besitzt eine 100% Aktivität, die anderen Proben entsprechend der unterschiedlichen Zugabe an PMSF eine umso geringere Aktivität, je höher die Konzentration an PMSF war.

Dabei wird eine Enzymkonzentration von 1 mg/ml verwendet, das Gesamtvolumen beträgt 1 ml. Die sieben Proben bestehen stets aus 25  $\mu\text{l}$  Partikelsuspension, 25  $\mu\text{l}$  NIPAB (5 mM), Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5) mit je 950, 940, 930, 910, 890, 870 und 850  $\mu\text{l}$ , sowie PMSF (5  $\mu\text{M}$ ) mit jeweils 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100  $\mu\text{l}$ . Dies entspricht der verbleibenden Aktivität der Enzymmoleküle von 100, 94, 88, 76, 64, 52, und 40%. Diese verbleibende Aktivität in Prozent wird gegen die Konzentration des Inhibitors PMSF aufgetragen. Da eine Enzymaktivität von 0 eine Inhibierung von 100% bedeutet (jedes Enzymmolekül ist durch ein PMSF-Molekül inhibiert) wird durch die Extrapolation des Graphen auf die Enzymaktivität von 0 die Konzentration der aktiven Zentren der Penicillin G Acylase in der Probe berechnet.

#### 4.4.5. UV-Messungen

Die Konzentration der Penicillin G Acylase, sowohl in gelöster Form, als auch auf Silica-Nanopartikel kovalent immobilisiert, wurde durch den Extinktionskoeffizienten des Proteins bei 280 nm unter denaturierenden Bedingungen nach einer Standardmethode (Edelhoch, 1967) bestimmt. Für diese Messung wurde die Proteinlösung (Proteinsuspension) in 6 M Guanidinhydrochlorid in 0.02 M Phosphatpuffer bei pH 6.5 verdünnt. Das Absorptionsspektrum im Bereich der aromatischen Absorption der Tryptophan und Tyrosin Aminosäu-

ren (280 nm) wurde von 240 bis 400 nm in einer Quarzmikroküvette (1.0 cm Schichtdicke) gemessen. Die Vergleichsprobe war für das freie Enzym die reine Lösung (6 M Guanidiniumhydrochlorid in 0.02 M Phosphatpuffer bei pH 6.5) und für das immobilisierte Enzym obige Lösung mit Silica-Nanopartikel identischer Konzentration wie in der Probe.

Aus der flachen Basislinie des UV-Spektrums des Proteins bei 310 nm war deutlich ersichtlich, dass die Streueffekte durch die Silica-Nanopartikel vernachlässigbar sind und daher keine Korrektur notwendig ist. Die Konzentration des Enzyms in Lösung oder immobilisiert wurde durch die Absorption bei 280 nm unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten bestimmt. Dieser berechnet sich aus der Anzahl der Tryptophane, Tyrosine und Cysteine (Gill und Hippel, 1989). Er beträgt für die Penicillin G Acylase  $199000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , da die Penicillin G Acylase 28 Tryptophane und 31 Tyrosine und kein Cystein besitzt. Aus der molaren Masse der Penicillin G Acylase und der Masse der Silica-Nanopartikel konnte die Beladung ermittelt werden.

#### **4.4.6. Circular dichroismus-Messungen**

Das CD-Gerät wurde regelmäßig mit 0.06% (w/v) wässrigem Ammonium-D-10-(+)-Camphersulfonat (ACS) bei 290.5 nm kalibriert, um der Verschiebung des Spektrums durch die Veränderung der Spiegel durch die Messungen entgegenzuwirken. Die Spektren wurden von 180 bis 260 nm mit einer Schrittweite von 0.1 nm gemessen. Drei wiederholte Messungen mit einer Messgeschwindigkeit von 10 nm/min, 4 s Responszeit und 1 nm Bandbreite wurden für jede Probe und jede Referenz gemittelt. Die Proben wurden in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7.5) in einer Quarzmikroküvette (0.1 cm optische Schichtdicke) gemessen. Die Vergleichsprobe war für das freie Enzym die reine Lösung (6 M Guanidiniumhydrochlorid in 0.02 M Phosphatpuffer bei pH 6.5) und für das immobilisierte Enzym obige Lösung mit Silica-Nanopartikel identischer Konzentration wie in der Probe. Die gemittelten Vergleichsspektren wurden vom gemittelten Probenspektrum abgezogen, um einwandfreie CD-Spektren zu erhalten. Alle Spektren wurden bei 20 °C gemessen.

Die CD-Spektren wurden durch eine adaptive Glättungsmethode zur Rauschunterdrückung (Teil der JASCO Spektrumanalyse Software) optimiert. Die Sekundärstruktur wurde durch die Algorithmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3 von DICHROWEB (Whitmore und Wallace, 2004, Lobley et al, 2002) ermittelt. Es wurden drei Algorithmen verwendet, um die Auswertungen der Algorithmen untereinander vergleichen zu können.

#### 4.4.7. Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage

Der QCM-Chip wurde mit in Toluol gelöstem Polymethylacrylat beschichtet (Dicke: 265 nm) und mit Hexamethyldiamin und Glutardialdehyd in der Quarzmikrowaage funktionalisiert (analog der Reaktionsvorschrift, vgl. Kapitel 3.3.3.). Danach wurde das Enzym nach folgendem Ablauf immobilisiert:

- 0 bis 12 min: Äquilibration mit Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5)
- 12 bis 116 min: Immobilisierung des Enzyms (2.9 mg/ml)
- 116 bis 210 min: Waschung (Bicarbonatpuffer [0.2 M, pH 9.2], Phosphatpuffer [1.0 M, pH 7.5], Acetatpuffer [0.1 M, pH 3.75], Phosphatpuffer [0.2 M, pH 7.5])
- 210 bis 250 min: Äquilibration mit Phosphatpuffer (0.2 M, pH 7.5)

und mittels eines QCM-D (Quarz Crystal Mikrobalance with Dissipation Monitoring) analysiert. Die Messungen wurden bei 25 °C aufgenommen, alle verwendeten Lösungen waren temperiert. Der Schermodulus  $G$  der Beschichtung betrug 120 kPa, die dynamische Viskosität  $\eta$  betrug 0.0015 Ns/m<sup>2</sup> und wurden während der Messung als konstant angenommen (Welle, 2004). Die Auswertung wurde mittels der Software QTools 1.2.0.33. (vom Hersteller Q-Sense) vorgenommen. Diese wertet die Frequenzänderung und Dämpfung der Schwingung des QCM-Chips aus, die durch die Massenzunahme durch die Immobilisierung des Enzyms entsteht. Je niedriger die Beladungsdichte mit Enzym auf dem QCM-Chip ist, also je höher der Wasseranteil auf dem QCM-Chip ist, desto höher ist die Dämpfung.

### 4.5. Ergebnisse und Diskussion

Die folgenden Ergebnisse beinhalten die Auswertung der Identifizierung des Modellenzyms mittels Massenspektrometrie-Messungen, der Sekundärstrukturanalyse mittels Circular dichroismus-Messungen und der Untersuchung der Immobilisierungskinetik durch Quarzkristallmikrowaagen-Messungen.

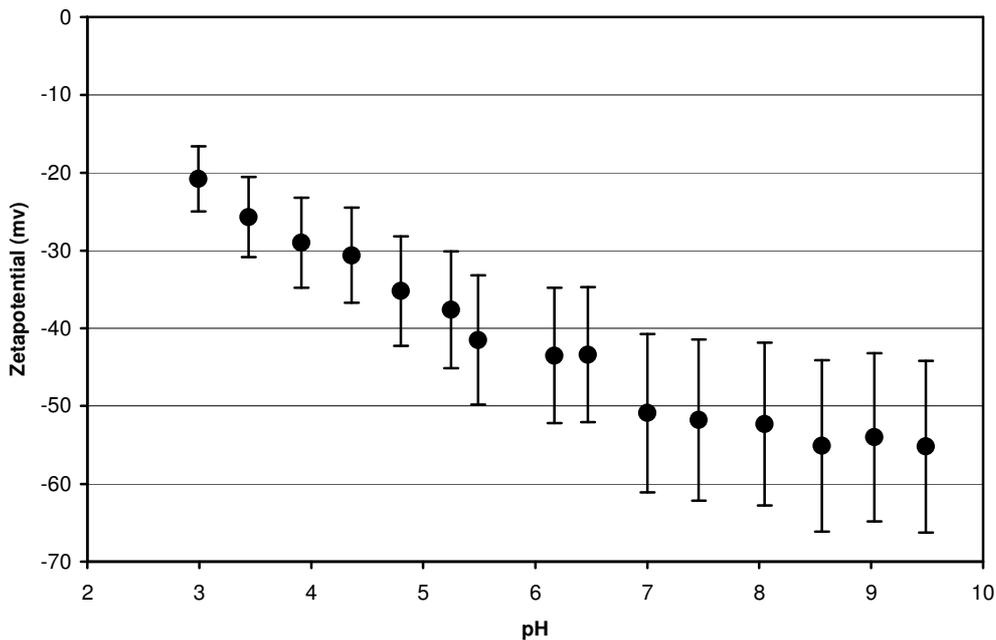
#### 4.5.1. Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel

Als Basis für alle Versuche zur Bestimmung der Sekundärstruktur wurden Silica-Nanopartikel von Grace Davison (Ludox<sup>®</sup>-HS40) verwendet. Diese verfügen über folgende Eigenschaften:

- Monodispers, 12 nm Durchmesser

- Spezifische Oberfläche 198 bis 258 m<sup>2</sup>/g
- Dichte 1.292 bis 1.312 g/cm<sup>3</sup>
- Transparent, bilden eine stabile kolloidale Suspension (400 mg Partikel / ml Suspension) in Wasser (vgl. Abb.77)
- Zetapotential -52 mV bei pH 7.5 (vgl. Abb.78)

Das Zetapotential der Silica-Nanopartikel ist in Abb.77 dargestellt. Diese weisen ein Zetapotential von -51.8 mV bei pH 7.5 auf.



**Abb.77:** Zetapotential der Silica-Nanopartikel Ludox®-HS40 in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Auf Grund der geringen Teilchengröße (12 nm) und des hohen Zetapotentials bilden diese Partikel in wässrigen Medien eine über lange Zeit stabile Suspension. Eine Agglomeration tritt nur bei unsachgemäßer Separierung und verstärkt nach der Beladung mit Enzym auf. Dies wurde durch die besondere Behandlung verhindert:

- Die Partikel wurden nur mit der Ultrazentrifuge (90 min, 30 kU/min, 25 °C) separiert.
- Jede Reaktion wurde mit 1400 U/min ausgeführt.
- Die Konzentration an Silica-Nanopartikel im Medium betrug nie mehr als 100 mg/ml ohne Enzym und nie mehr als 10 mg/ml mit kovalent immobilisiertem Enzym.

Die Aktivierung der Silica-Nanopartikel mit Glutardialdehyd erfolgte im 20 ml Maßstab und stellte so 2 g aktivierte Partikel zur Verfügung, die für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche verwendet wurden. Nach jeder Reaktion wurden die Partikel getrocknet und die Konzentration mittels Wägung bestimmt.

#### 4.5.2. Immobilisierung der Penicillin G Acylase

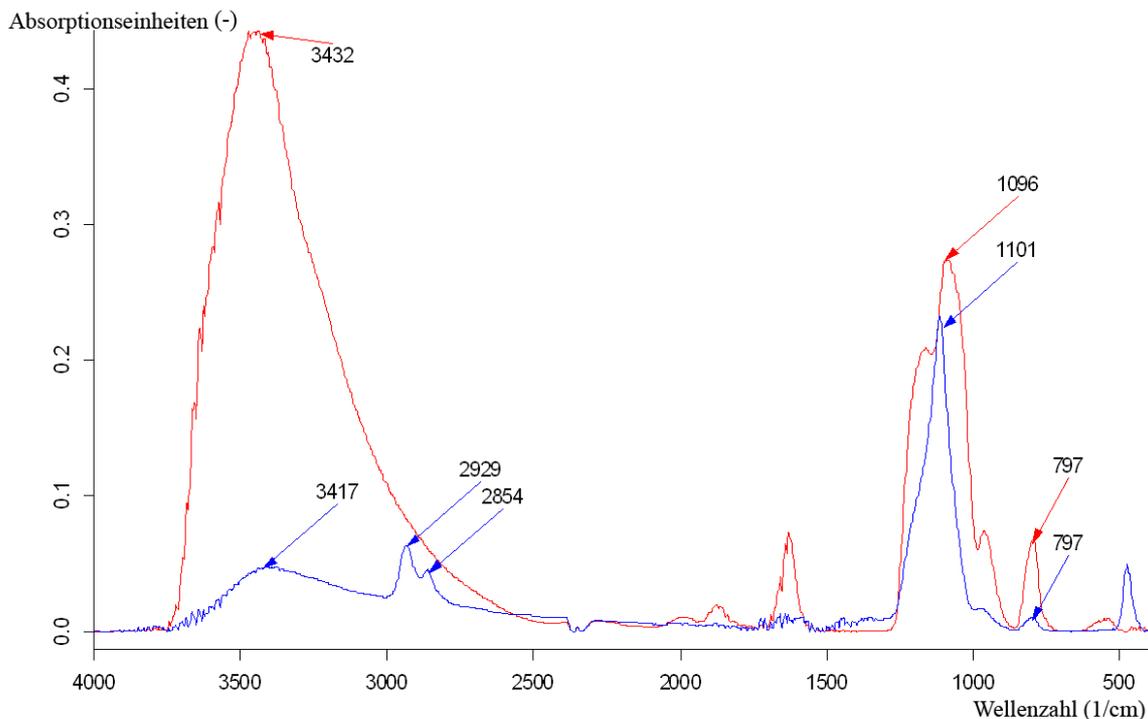
Die aktivierten Silica-Nanopartikel wurden mit Penicillin G Acylase beladen, dabei wurden stets 20 mg/ml Silica-Nanopartikel verwendet und mit 40 bis 400 mg Enzym pro g Partikel reagiert. Für die CD-Messungen wurden die gewaschenen Proben auf eine Konzentration von 0.03 mg Silica-Nanopartikel pro ml eingestellt. Das Enzym wurde über seine Aminogruppen (Lysin, relative Proteinhäufigkeit 7.1% oder Arginin, relative Proteinhäufigkeit 4.4%) gebunden.

#### 4.5.3. Analytische Messungen

Die Immobilisate aus Enzym und Silica-Nanopartikel sind mittels IR- und CD-Messungen untersucht worden. Für die QCM-Messungen wurde auf QCM-Chips immobilisiertes Enzym verwendet.

#### Messung des IR-Spektrums der Silica-Nanopartikel

Um die Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel mit Glutardialdehyd zu überprüfen, wurden die reinen Silica-Nanopartikel und die aktivierten Silica-Nanopartikel mittels IR untersucht (vgl. Abb.78).



**Abb.78:** IR-Spektren von reinen Silica-Nanopartikeln (rot) und mit Glutardialdehyd funktionalisierten Silica-Nanopartikeln (blau).

Das IR-Spektrum (vgl. Abb.78) zeigt neben den Banden der Silica-Nanopartikel ( $3432\text{ cm}^{-1}$  Si-OH,  $1096\text{ cm}^{-1}$  Si-OH,  $797\text{ cm}^{-1}$  Si-OH, vgl. IR-Vergleichsspektrum im Anhang) die nur im Spektrum der Silica-Nanopartikel mit Glutardialdehyd-Funktionalisierung auftretenden Banden der Funktionalisierung ( $2929\text{ cm}^{-1}$  CH<sub>2</sub> und  $2854\text{ cm}^{-1}$  CHO).

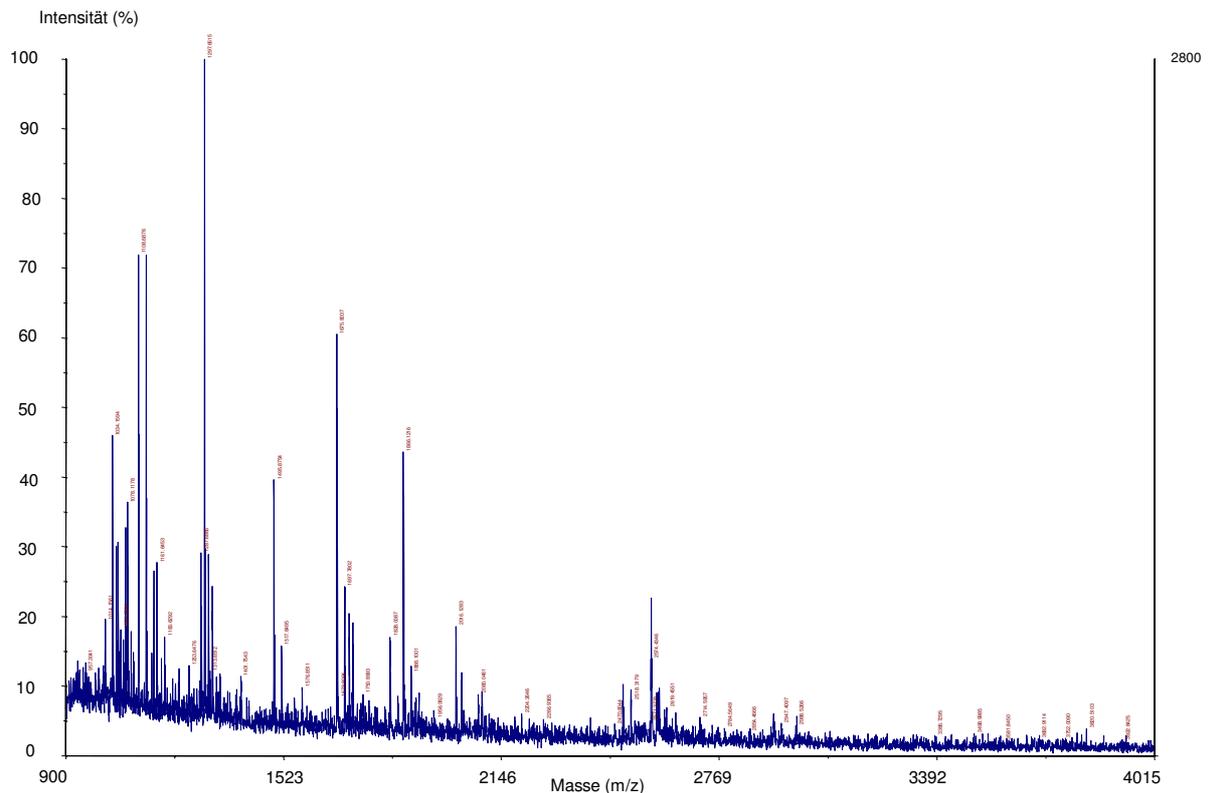
### **Gelelektrophorese und Massenspektrometrie**

Für die Untersuchung der Sekundärstruktur der immobilisierten Penicillin G Acylase von *E. coli* musste die molare Masse und die Aminosäuresequenz bestimmt werden. Dazu waren eine 1D-Gelelektrophorese und ein enzymatischer Abbau mittels Trypsin notwendig, da der Detektor des Massenspektrometers nur Peptidfragmente von 2 bis 25 kDa erkennt. Um die Penicillin G Acylase zu charakterisieren, wurde die MALDI-TOF MS/MS Massenspektrometrie verwendet. Die Banden des Massenspektrums konnten eindeutig dem Enzym Penicillin G Acylase mittels der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zugeordnet werden. Diese Datenbank ist für die Identifizierung enzymatisch in definierte Fragmente abgebaute Proteine ausgelegt. In dieser Datenbank gilt eine Auswertung mit einem Wert  $> 57$  als signifikant, der Wert der Auswertung obiger Messung betrug 127 und ist damit eindeutig signifikant. Mit den Arbeitsschritten Aufreinigung, enzymatischer Abbau zu Peptidfragmenten, Massenspektrometrie verbundener Datenbankabgleich ergab:

- Penicillin G Acylase, gereifte Form, von *E. coli*, EC 3.5.1.11.
- 86192 g/mol, 766 Aminosäuren.
- Das Enzym hat eine A-Kette (Aminosäuren A1 bis A209) und eine B-Kette (Aminosäuren B1 bis B557).

Nur die gereifte Form der Penicillin G Acylase ist katalytisch aktiv (vgl. Kapitel 3.1.1.).

Abb.79 zeigt das MS-Spektrum der Fragmente von Penicillin G Acylase nach der Aufreinigung mittels einer 1D-Gelelektrophorese und einem tryptischen Abbau.



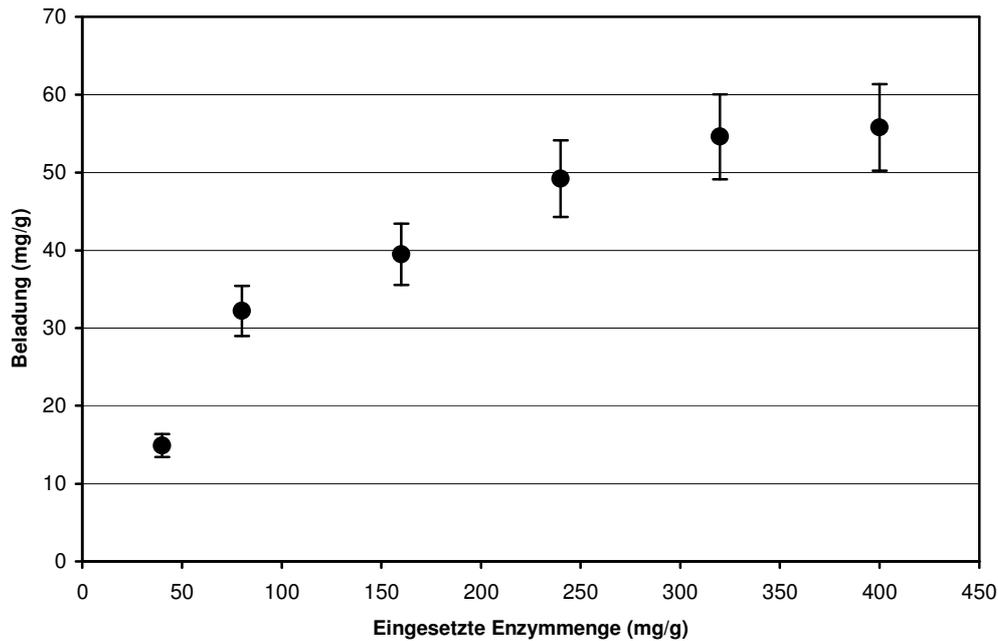
**Abb.79:** MS-Spektrum der durch enzymatischen Abbau gebildeten Peptidfragmente der Penicillin G Acylase.

Dieses Spektrum wurde genutzt, um mittels eines Datenbankabgleichs die molare Masse und die Aminosäuresequenz des Enzyms zu bestimmen.

### Messung der Aktivität freier und immobilisierter Penicillin G Acylase

Die reine Stammlösung der Penicillin G Acylase (E.coli, 3.5.1.11.) von Sigma-Aldrich hat eine Aktivität von 16.13 mg/ml und das Enzym eine spezifische Aktivität von 42 U/mg<sub>aktives Enzym</sub>. Dies bezieht sich auf den NIPAB-Aktivitätstest (vgl. Kapitel 4.4.): 42 U/ml bei 1 mg/ml entspricht 42 U/mg (Kasche, 1987).

Verschiedene Mengen an Enzym wurden auf derselben Partikelmenge kovalent immobilisiert und die Beladung wurde mittels UV-Messungen bestimmt. Abb.80 zeigt die Beladungen in Abhängigkeit der eingesetzten Enzymmenge pro g Silica-Nanopartikel.



**Abb.80:** Beladung der Silica-Nanopartikel als Funktion der eingesetzten Enzymmengen.

Es zeigt sich, dass für 40 bis 400 mg eingesetzte Enzymmenge pro g Silica-Nanopartikel die Beladung von 14.9 auf 55.8 mg/g (immobilisiertes Enzym pro g Silica-Nanopartikel) ansteigt. Für eine eingesetzte Enzymmenge von 320 und 400 mg/g zeigt sich eine nahezu konstante Beladung von 54.6 und 55.8 mg/g und somit eine Sättigung. Dabei sank die Ausbeute von 37% (bei 40 mg/g eingesetzter Enzymmenge) auf 14% (bei 400 mg/g).

Die spezifische Aktivität (Units an aktivem Enzym pro mg Enzymbeladung) sank von 22.1 U/mg (bei einer Beladung von 14.9 mg/g) über 12.2 U/mg (bei 39.5 mg/g) bis hin zu 9.17 U/mg (bei 55.8 mg/g).

Multipliziert man die Beladung (zum Beispiel 14.9 mg/g) eines Wertes mit der dazugehörigen spezifischen Aktivität (in diesem Fall 22.1 U/mg), so erhält man eine „spezifische Nanopartikel Aktivität“ von 330 U/g<sub>Partikel</sub>. Diese steigt mit zunehmender eingesetzter Enzymmenge auf 510 U/g<sub>Partikel</sub> (bei einer Beladung von 55.8 mg/g). Um diese Beladung zu erreichen, musste die eingesetzte Enzymmenge um das zehnfache erhöht werden. Dabei erhöhte sich die „spezifische Nanopartikel Aktivität“ allerdings nur um 50%.

### Active Site Titration der Penicillin G Acylase

Die Active Site Titration (AST) ist eine sehr genaue Methode, um die aktive Penicillin G Acylase in freier oder immobilisierter Form durch Inhibierung zu bestimmen. Daher wurde diese Methode verwendet, um die Direktmessung stichprobenartig oder bei zweifelhaften Ergebnissen zu überprüfen.

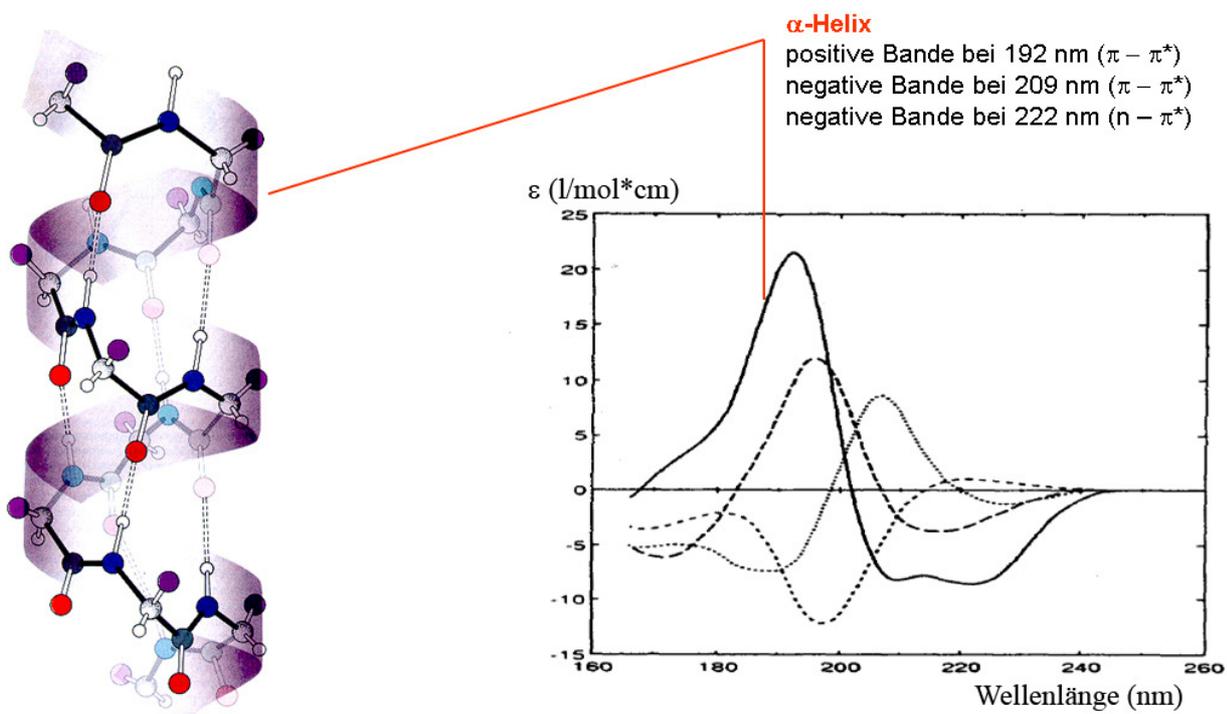
## UV-Messungen

Die Beladung der Partikel wurde mittels UV-Messungen bestimmt und durch Massenbilanz kontrolliert. Die Proben mussten temperiert und sorgfältig durchgeführt werden, da die Silica-Nanopartikel mit dem denaturierten Enzym zur Agglomeration (Schlierenbildung) neigten. Dabei stellten sich Abweichungen der UV-Messungen von den Aktivitätsmessungen mittels NIPAB von bis zu 4% heraus, es wurden die Werte der UV-Messung verwendet.

## Circulardichroismus-Messung

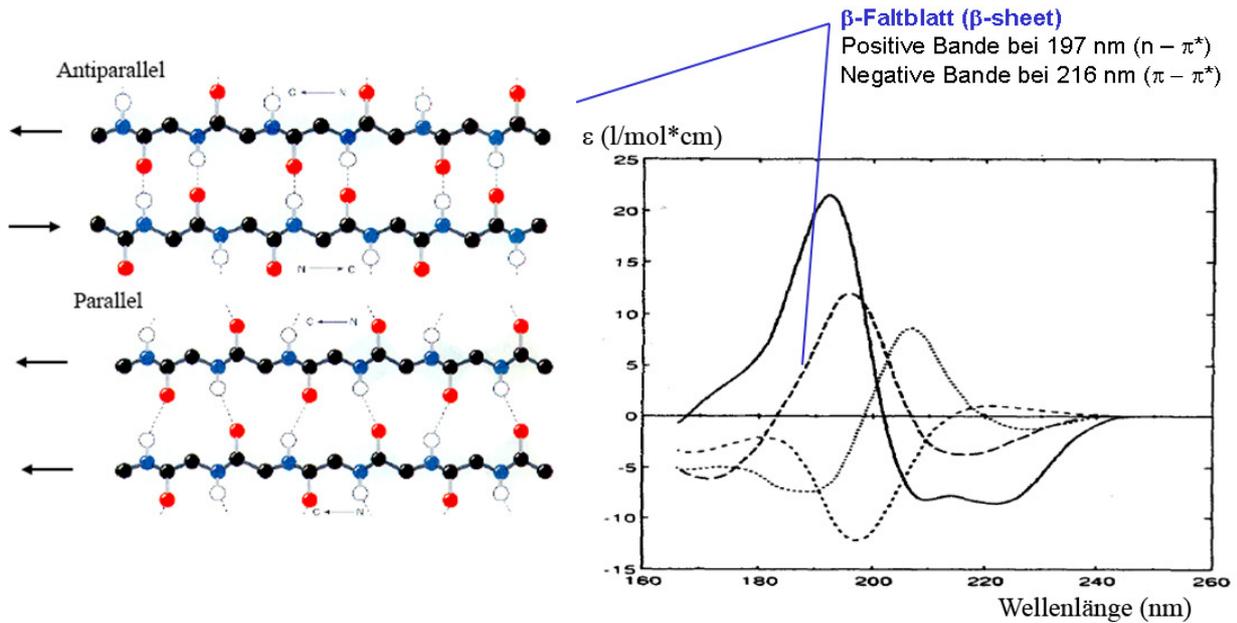
Zuerst wurden Circulardichroismus-Messungen (Bestimmung der Sekundärstruktur von Proteinen durch die unterschiedliche Absorption von rechts und links circular polarisiertem Licht beim Durchgang durch ein optisch aktives Medium [chirale Moleküle]) der freien Penicillin G Acylase durchgeführt, dabei stellte sich heraus, dass diese ohne Schwierigkeiten gemessen und damit die Sekundärstruktur bestimmt werden kann.

Die einzelnen Strukturelemente verursachen im CD-Spektrum Banden von definierter Gestalt bei bestimmten Wellenlängen (vgl. Abb.81-84). Die  $\alpha$ -Helix besitzt bei 192 nm eine positive, bei 209 nm und 222 nm eine negative Bande (vgl. Abb.81).



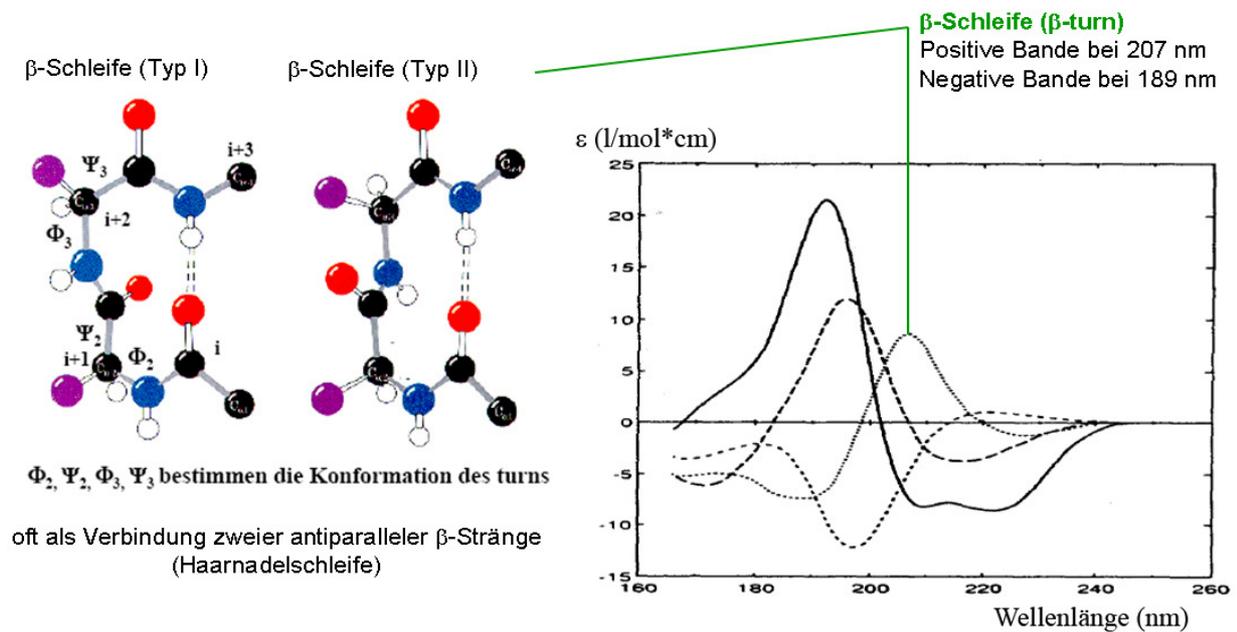
**Abb.81:**  $\alpha$ -Helix: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum.

Das  $\beta$ -Faltblatt besitzt eine positive Bande bei 197 nm und eine negative Bande bei 216 nm (vgl. Abb.82).



**Abb.82:**  $\beta$ -Faltblatt: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum.

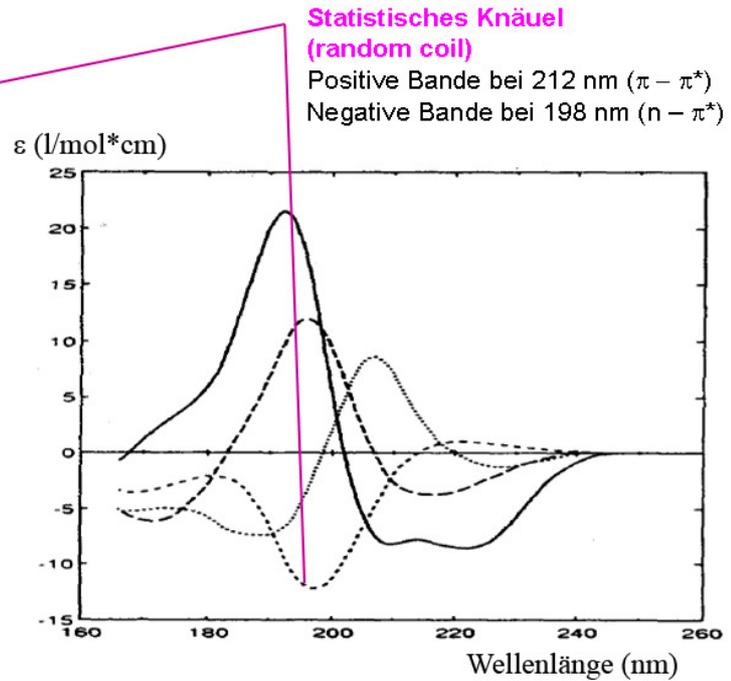
Die  $\beta$ -Schleife besitzt eine positive Bande bei 207 nm und eine negative Bande bei 189 nm (vgl. Abb.83).



**Abb.83:**  $\beta$ -Schleife: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum.

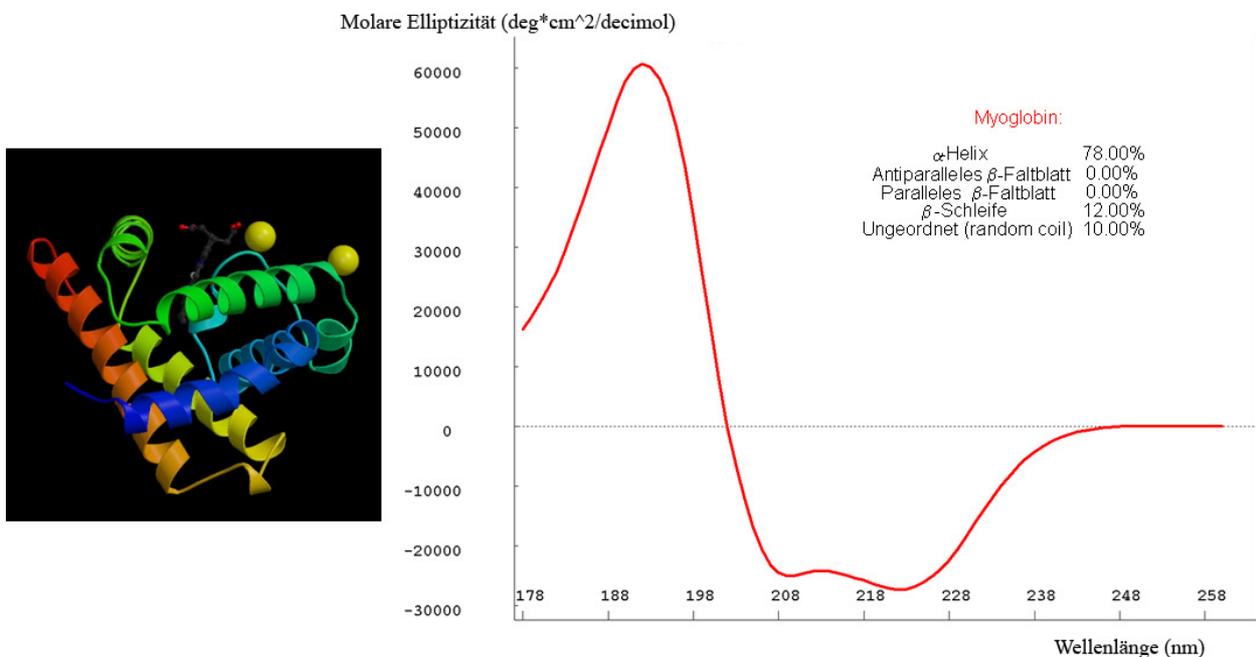
Das statistische Knäuel besitzt eine positive Bande bei 212 nm und eine negative Bande bei 198 nm (vgl. Abb.84).

Protein oder Teilstück eines Proteins  
ohne erkennbare Sekundärstruktur  
(irreguläre Struktur)



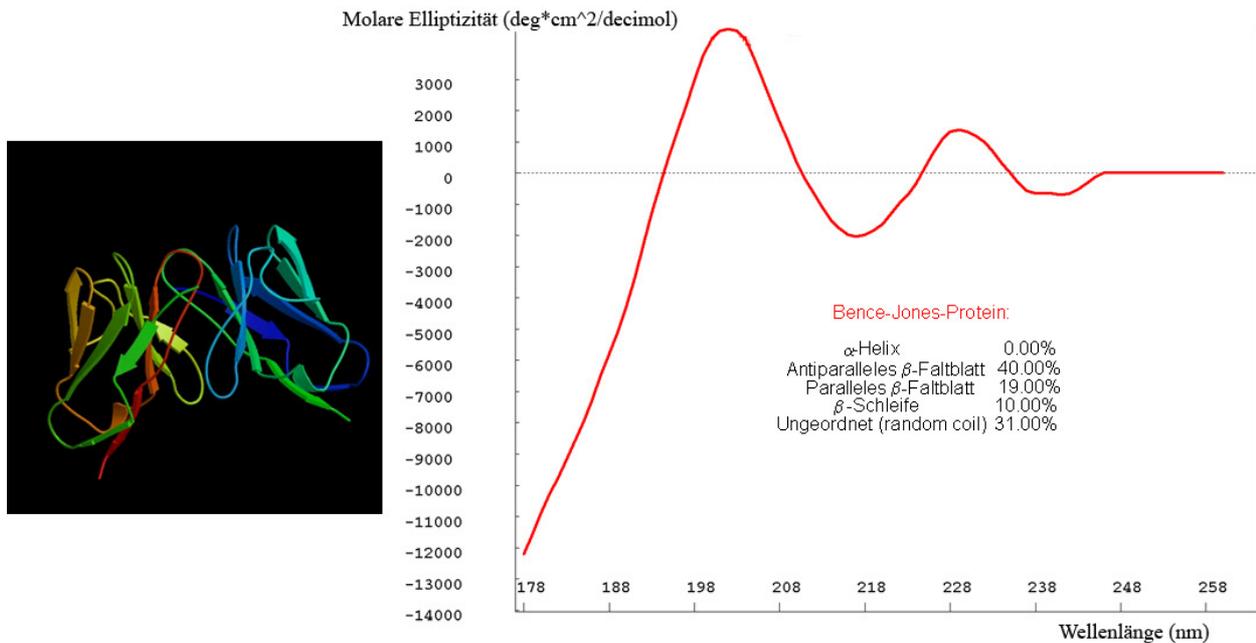
**Abb.84:** Statistisches Knäuel: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum.

Die Analyse der CD-Spektren erfolgt über Datenbanken, die über Referenzspektren eine Berechnung der Sekundärstruktur vornehmen. Zwei Beispiele für solche Spektren sind in Abb.85 und 86 gegeben.



**Abb.85:** Referenzspektrum für die CD-Analyse: Myoglobin.

In Abb.86 ist das CD-Spektrum von Myoglobin gegeben, dass auch als Referenzspektrum verwendet wird.



**Abb.86:** Referenzspektrum für die CD-Analyse: Bence-Jones-Protein.

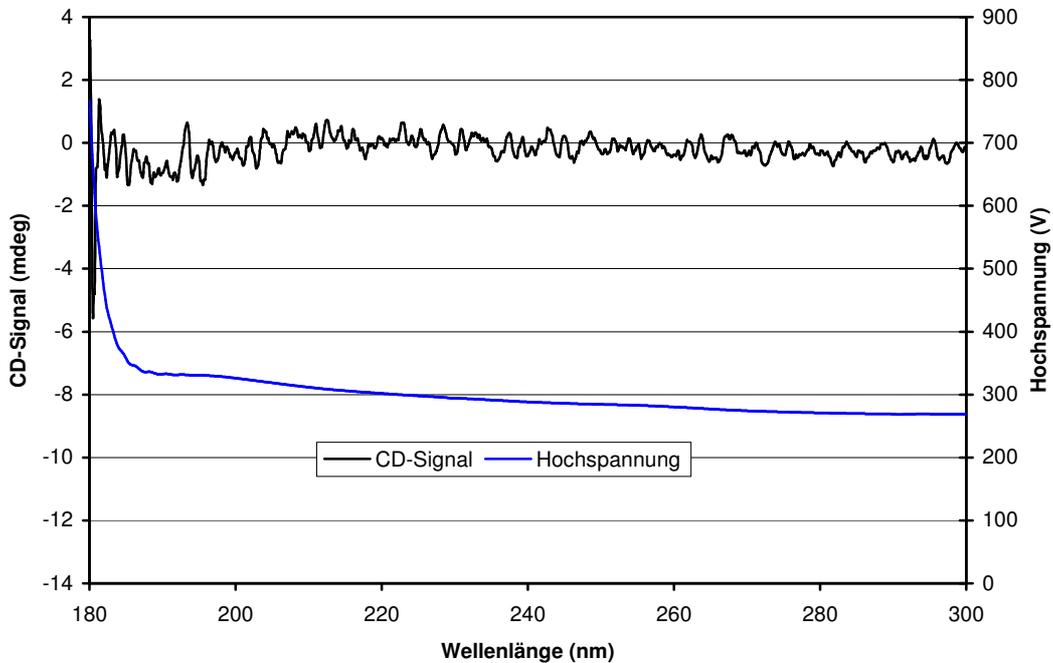
In Abb.86 ist das CD-Spektrum des Bence-Jones-Proteins gegeben, das auch als Referenzspektrum verwendet wird.

Durch die Verwendung von CD-Messungen konnten mögliche Strukturänderung der Penicillin Amidase verfolgt und somit festgestellt werden, ob dies der Grund für die verminderte Aktivität war.

Es wurde versucht, die Sekundärstruktur der Penicillin G Acylase (0.116 mg/ml), kovalent immobilisiert auf Polymerträgern (1 mg/ml), zu vermessen. Da dies einige Probleme aufwies (siehe unten), ergab sich letztendlich folgende Arbeitsreihenfolge der CD-Messungen:

- Messung der freien Penicillin G Acylase erfolgreich
- Messung des auf Polymerpartikel immobilisierten Enzyms erfolglos
- Messung der reinen Polymerpartikel geeignete Träger
- Messung einer Mischung von Polymerpartikeln und Enzym erfolgreich  
 → dennoch war eine Messung mit dem Immobilisat erfolglos
- Daher wurden Silica-Nanopartikel verwendet
  - mit adsorbiertem Enzym erfolgreich
  - mit kovalent gebundenem Enzym erfolgreich

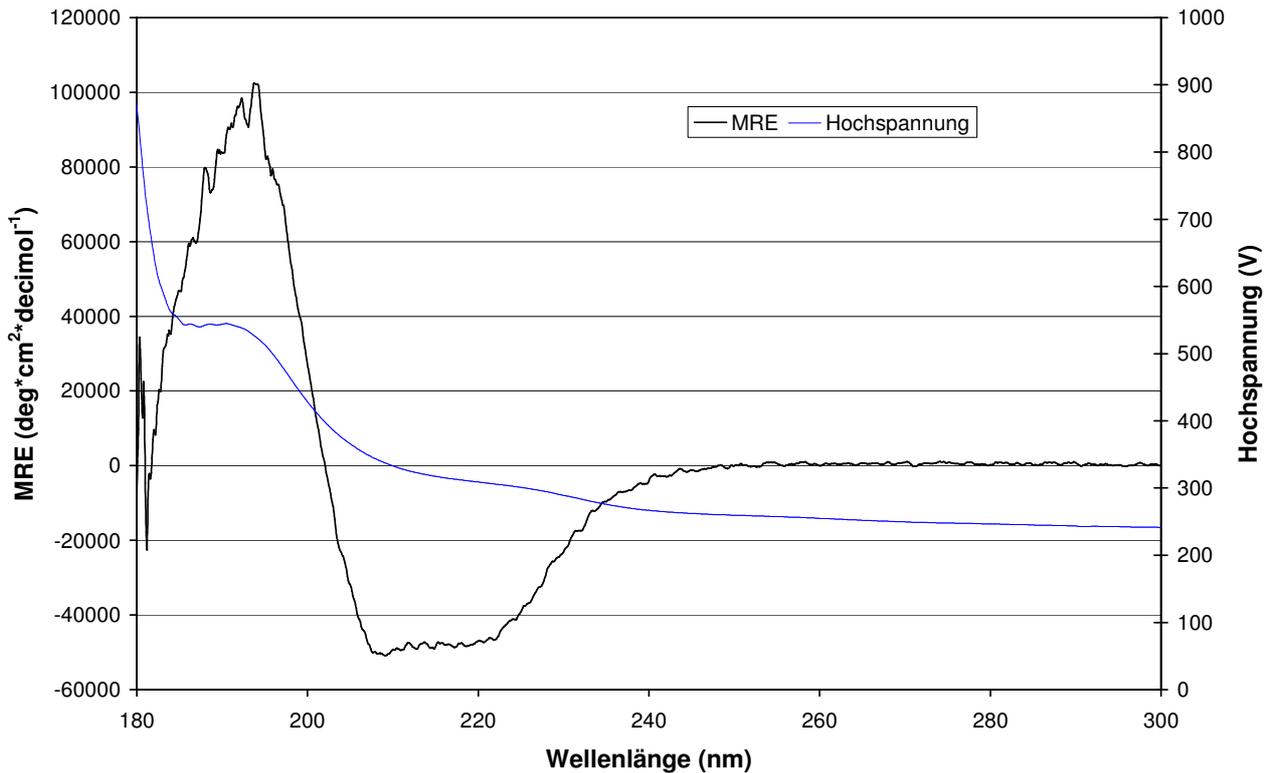
Es war nicht möglich, auf Polymerpartikeln immobilisiertes Enzym mittels CD zu vermessen, obwohl der Wert für die Hochspannung innerhalb des Toleranzbereiches ( $< 600$  V) lag (vgl. Abb.87). Dies bedeutet, dass die Partikel die Messung nicht durch Streuung stören.



**Abb.87:** CD-Spektrum der reinen Polymermikro-Partikel.

Im obigen CD-Spektrum ist nur das CD-Signal (Einheit mdeg, Millidegree) angegeben und es ist nur die Streuung der Partikel und die Hochspannung eingetragen.

Somit konnten die Partikel verwendet werden, da sie die Messung im benötigten Wellenlängenbereich nicht wesentlich beeinträchtigen. Eine Mischung dieser Partikel (1 mg/ml) mit dem Enzym (0.116 mg/ml) erbrachte ein verwertbares Spektrum (vgl. Abb. 88).



**Abb.88:** CD-Spektrum einer Mischung der reinen Polymermikro-Partikel und Penicillin G Acylase.

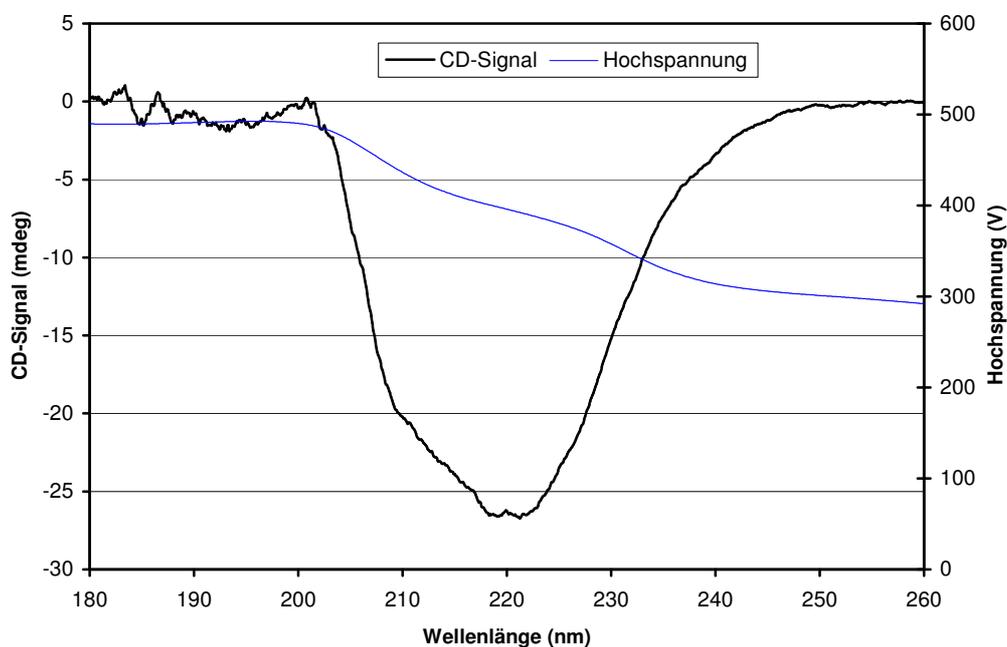
Obwohl das Spektrum im Bereich unter 200 nm verrauscht war, konnte die Sekundärstruktur des Enzyms in der Mischung bestimmt werden. Das CD-Signal des Enzyms wird als molare Elliptizität ( $[\text{molare Elliptizität}] = \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$ ) angegeben. Diese Angabe gibt das CD-Signal pro Mol Enzym wieder.

Allerdings war es dennoch nicht möglich, eine CD-Messung mit dem immobilisierten Enzym durchzuführen. Die kovalente Bindung des Enzyms und der damit verbundene, kurze mittlere Abstand des Enzyms zur Oberfläche verhinderten eine CD-Analyse des Enzyms. Durch die 1000-fach größeren Partikel wurde so viel Licht absorbiert, dass nicht genug Licht für eine Analyse der Messung den Detektor erreichte.

Alle weiteren Versuche, auf Polymer-Mikropartikel adsorbiertes oder kovalent immobilisiertes Enzym mittels CD zu vermessen, schlugen fehl. Die Verwendung der Polymer-Nanopartikel für die CD-Messung war auf Grund der starken Agglomeration (vgl. Kapitel 3.5.6.) und der damit verbundenen Streuung ebenfalls erfolglos. Daher wurden die Silica-Nanopartikel verwendet.

Ohne die Kenntnis der besonderen Handhabung für die Silica-Nanopartikel (vgl. Kapitel 4.3.2.) bildeten diese Agglomerate, die eine Vermessung bei niedriger Konzentration ( $< 0.03 \text{ mg Enzym pro ml}$ ) vereitelten.

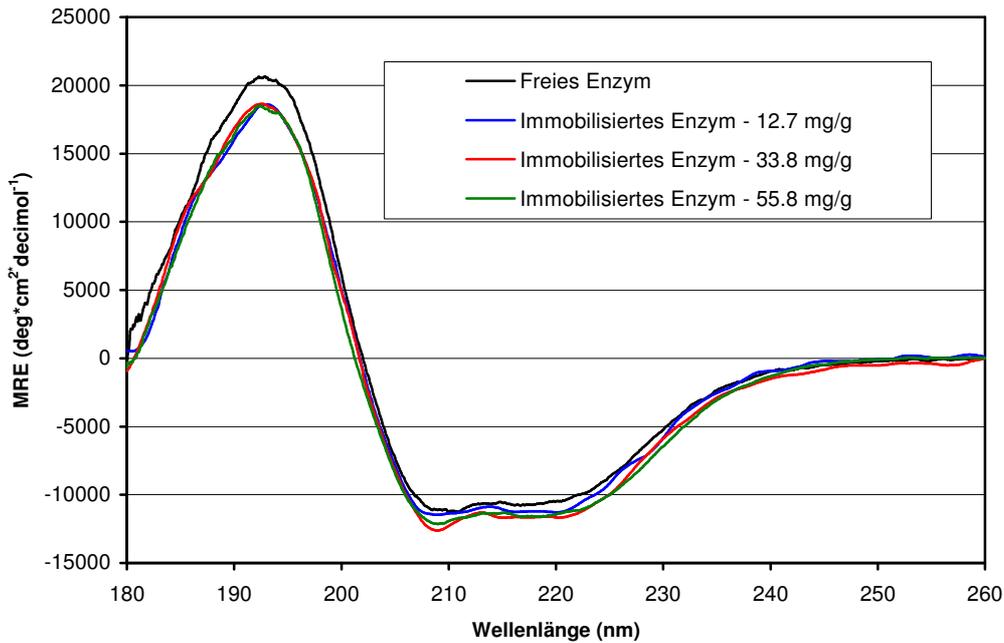
Durch Verwendung hoher Konzentrationen (0.5 mg Enzym pro ml) konnten CD-Messungen der Penicillin G Acylase durchgeführt werden, die mittels Adsorption auf Silica-Nanopartikeln immobilisiert war. Diese wiesen ebenfalls eine geringe Agglomeration auf, aber da die Silica-Nanopartikel viel kleiner als die Mikropartikel sind und somit eine höhere Beladung ermöglichten und weniger streuten, wurde die Messung nicht gestört. Zudem absorbieren diese Silicapartikel selbst kaum Strahlung im verwendeten Wellenlängenbereich. Dabei sind bereits Strukturänderungen zu erkennen, die auf diese, nicht-kovalente Immobilisierung zurückzuführen sind (vgl. Abb.89). Da aber eine hohe Konzentration verwendet werden musste, war die Messung unterhalb 200 nm möglich.



**Abb.89:** CD-Spektrum der Silica-Nanopartikel mit hoher Konzentration an Penicillin G Acylase.

Eine Auswertung dieses Spektrums war nicht möglich. Im obigen CD-Spektrum sind daher nur das CD-Signal (Einheit mdeg, Millidegree, Milligrad) und die Hochspannung angegeben.

Zwei große Probleme bei der Aufnahme von CD-Spektren von immobilisierten Enzymen, die Partikelsedimentation und die starke Lichtstreuung (Ganesan et al, 2006), wurden durch die Verwendung von Silica-Nanopartikeln und deren besondere Behandlung, die eine stabile Suspension in Wasser ermöglichten, vermieden. Durch diese Bedingungen (vgl. Kapitel 4.3.3.) konnten gute Spektren von kovalent immobilisierten Enzymen ohne Absorptionsglättung aufgenommen werden (vgl. Abb.90).



**Abb.90:** CD-Spektren der freien und auf Silica-Nanopartikeln kovalent immobilisierten Penicillin G Acylase im Vergleich.

In Abb.90 ist das CD-Spektrum der freien Penicillin G Acylase mit den CD-Spektren der Immobilisate (12.7, 33.8 und 55.8 mg/g) aufgeführt. Das Spektrum der freien Penicillin G Acylase stimmt mit dem in der Literatur (Lindsay et al, 1990) gut überein. Alle Spektren werden von Banden bei 192, 209 und 222 nm dominiert, die typisch für Proteine mit einem hohen  $\alpha$ -helicalen Anteil sind. Das CD-Spektrum der freien Penicillin G Acylase ist fast identisch mit den Spektren der kovalent immobilisierten Enzyme, unabhängig von der Beladung auf den Trägern. Das Spektrum des freien Enzyms zeigt eine MRE (mean residue ellipticity, molare Elliptizität, vgl. Kapitel 4.1.1.) von  $-10500 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{decimol}^{-1}$  bei 220 nm, während die immobilisierten Spektren untereinander sehr ähnlich sind und nur um 5% von dem Spektrum des freien Enzyms abweichen. Die Abweichung im Spektrum des freien Enzyms von den Spektren der immobilisierten Enzyme bei der positiven Bande bei 192 nm beträgt nur 10%.

### Auswertung der CD-Spektren mittels Algorithmen

Die Auswertung der CD-Spektren wurde mit den Sekundärstrukturbestimmungsalgorithmen CONTINLL (Van Stokkum et al, 1990), CDSSTR (Sreerama und Woody, 2000) und SELCON 3 (Sreerama und Woody, 1999) durchgeführt, die auf dem DICHROWEB-Server (Whitmore und Wallace, 2004) zur Verfügung stehen. Tab.8 zeigt die Sekundärstrukturelementanteile dieser Analysen für das freie Enzym Penicillin G Acylase zusammen mit

dessen Daten aus der Kristallstrukturaufklärung (Morillas et al, 2003, Proteindatenbank-Eintrag: 1h2g).

Methode	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet	NRMSD
CONTINLL	33.8	19.2	17.4	29.5	0.035
CDSSTR	35.0	23.0	19.0	23.0	0.009
SELCON 3	34.7	17.7	18.7	29.7	0.075
<b>X-ray (PDB)</b>	<b>34.9</b>	<b>20.0</b>	<b>18.1</b>	<b>27.0</b>	<b>--</b>

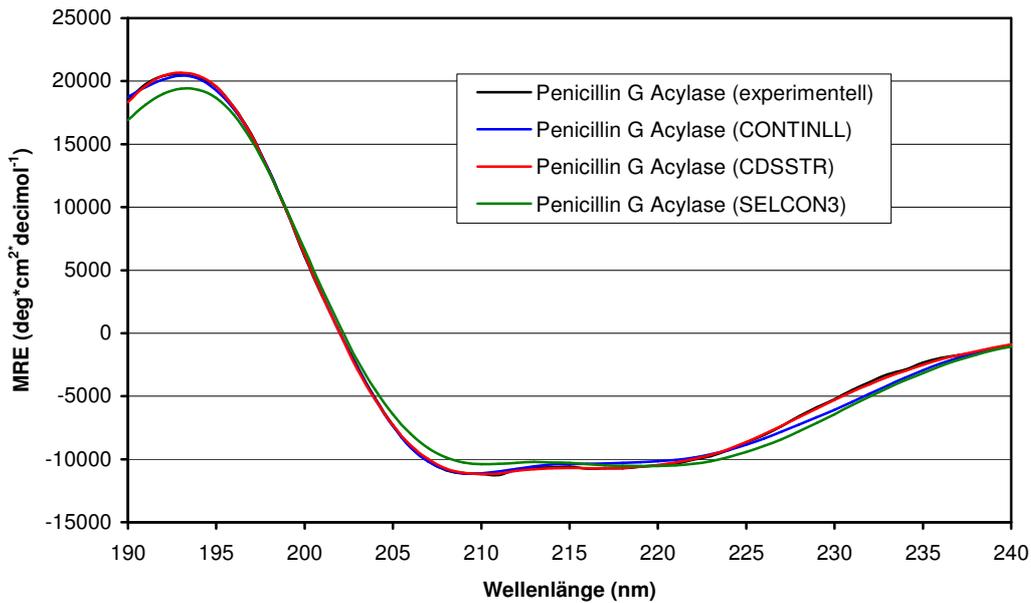
**Tab.8:** CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3 –Auswertung der CD-Spektren der freien Penicillin G Acylase zusammen mit den Röntgenstrukturdaten aus der Proteindatenbank (PDB).

Die Qualität der Anpassung der berechneten Spektren an die experimentellen Daten, aus denen die Sekundärstrukturelemente berechnet wurden, werden durch den NRMSD-Wert bestimmt, ein Wert < 0.1 bedeutet dabei eine gute Anpassung (Mao et al, 1982):

$$\text{NRMSD-Wert (normalized root mean square deviation): } NRMSD = \left[ \frac{\sum (\Theta_{\text{exp}} - \Theta_{\text{kal}})^2}{\sum (\Theta_{\text{exp}})^2} \right]^{1/2}$$

Der Strukturanalyse aus den CD-Spektren liegt die DSSP-Methode (Kabsch und Sander, 1983) zugrunde, die eine Relation der Proteinstruktur aus der Aminosäuresequenz durch definierte Strukturelemente ermöglicht. Die Einteilung der Gruppen der Sekundärstrukturelemente wurde wie allgemein üblich (Sreerama et al, 1999) vorgenommen:  $\alpha$ - und  $3_{10}$ -Helix wurden als  $\alpha$ -Helix, Faltblattstrukturen als  $\beta$ -Faltblatt, Schleifen und Krümmungen als  $\beta$ -Schleife eingeteilt, wobei minimal zwei benachbarte Aminosäuren für eine  $\beta$ -Schleife notwendig sind. Einzelne Aminosäuren (zum Beispiel zwischen zwei Strukturelementen) werden der Gruppe „Ungeordnet“ zugeteilt, die alle Aminosäuren umfasst, die keinem Strukturelement zugeordnet werden können. Die in der Tab.8 aufgeführten, durch verschiedene Algorithmen berechneten Strukturen stimmen sehr gut überein, die Abweichung zur Röntgenstrukturanalyse beträgt 3.1% für  $\alpha$ -Helix, 11.5% für  $\beta$ -Faltblatt, 5.0% für  $\beta$ -Schleife und 14.8% für den Bereich Ungeordnet. Da diese Daten an Enzymkristallen gemessen wurden und die freie Penicillin G Acylase in Lösung vermessen wurde, sind die Übereinstimmungen sehr gut.

Die Abb.91 zeigt die Übereinstimmung der experimentellen CD-Messung der freien Penicillin G Acylase mit den berechneten Daten aus den Algorithmen CONTINLL; CDSSTR und SELCON 3.



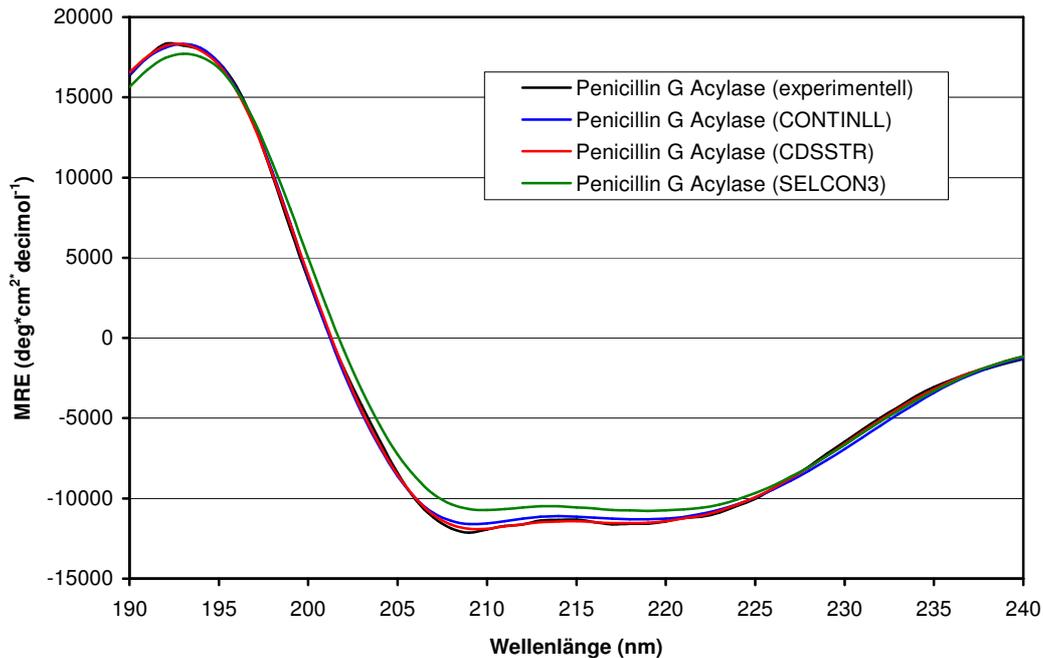
**Abb.91:** Vergleich der experimentellen CD-Messung der freien Penicillin G Acylase mit den berechneten Daten aus den Algorithmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3.

In Tab.9 ist exemplarisch die Auswertung der Strukturanalyse für die immobilisierte Penicillin G Acylase mit einer Beladung von 55.8 mg/g aufgeführt.

Method	$\alpha$ -Helix	$\beta$ -Faltblatt	$\beta$ -Schleife	Ungeordnet	NRMSD
CONTINLL	33.2	16.9	22.0	28.0	0.027
CDSSTR	35.0	19.0	18.0	28.0	0.013
SELCON 3	33.9	17.4	19.7	29.3	0.076

**Tab.9:** CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3 –Auswertung der CD-Spektren der immobilisierten Penicillin G Acylase.

Auch in diesem Fall ist der NRMSD-Wert deutlich unter 0.1 und zeigt somit die gute Anpassung der berechneten Daten mit den experimentellen Daten auf. Dies wird durch die CD-Spektren belegt (vgl. Abb.92).

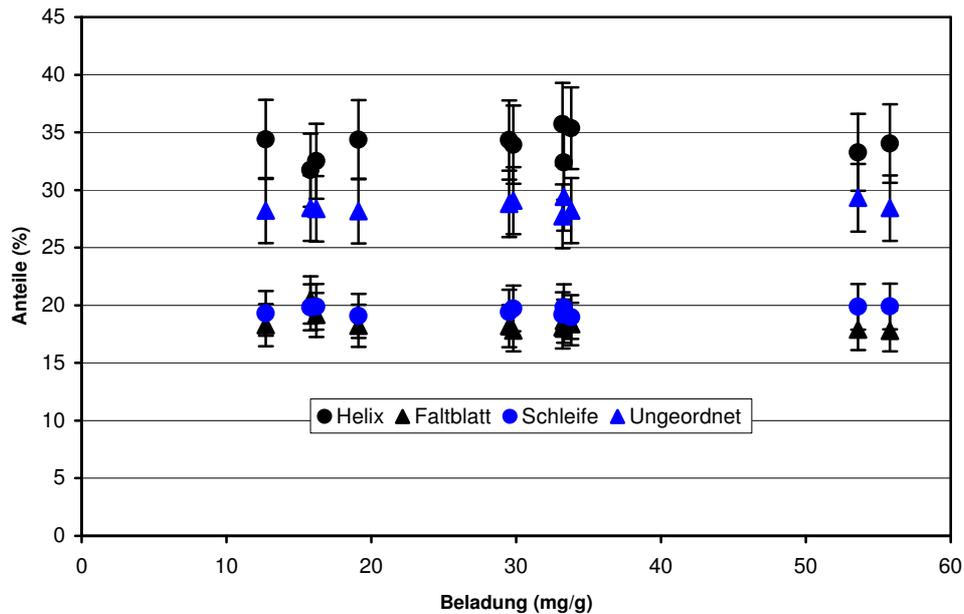


**Abb.92:** Vergleich der experimentellen CD-Messung der kovalent immobilisierten Penicillin G Acylase mit den berechneten Daten aus den Algorithmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3.

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass die Änderungen der Sekundärstrukturelemente, die durch die Immobilisierung von Penicillin G Acylase auf Silica-Nanopartikel, also der Vergleich des Struktur des freien Enzyms mit der des kovalent immobilisierten Enzyms, äußerst gering ist.

Die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase bewirkte im Vergleich zum freien Enzym eine Erhöhung des Anteils von 0.5% für die  $\alpha$ -Helix und 2.2% für das  $\beta$ -Faltblatt, sowie eine Verminderung der  $\beta$ -Schleife um 1.6% und des ungeordneten Anteils von 1.1%.

In Abb.93 sind die prozentualen Anteile der Sekundärstrukturelemente von elf kovalenten Immobilisierungen der Penicillin G Acylase auf die Silica-Nanopartikel mit unterschiedlicher Beladung (von 12.7 bis 55.8 mg/g) dargestellt ist.



**Abb.93:** Darstellung der prozentualen Sekundärstrukturanteile (CONTINLL) als Funktion der Beladung.

Dabei zeigt sich, dass keine über die Strukturänderung durch die Immobilisierung hinausgehende Strukturänderung mit steigender Beladung des Trägers mit Enzym auftritt.

In Abb.94 sind nur die CONTINLL-Berechnungen dargestellt, da die Berechnungen für CDSSTR und SELCON 3 vergleichbar sind. Diese sind als Funktion der Beladung aufgeführt und zeigen einen gleich bleibenden Anteil für alle Strukturelemente.

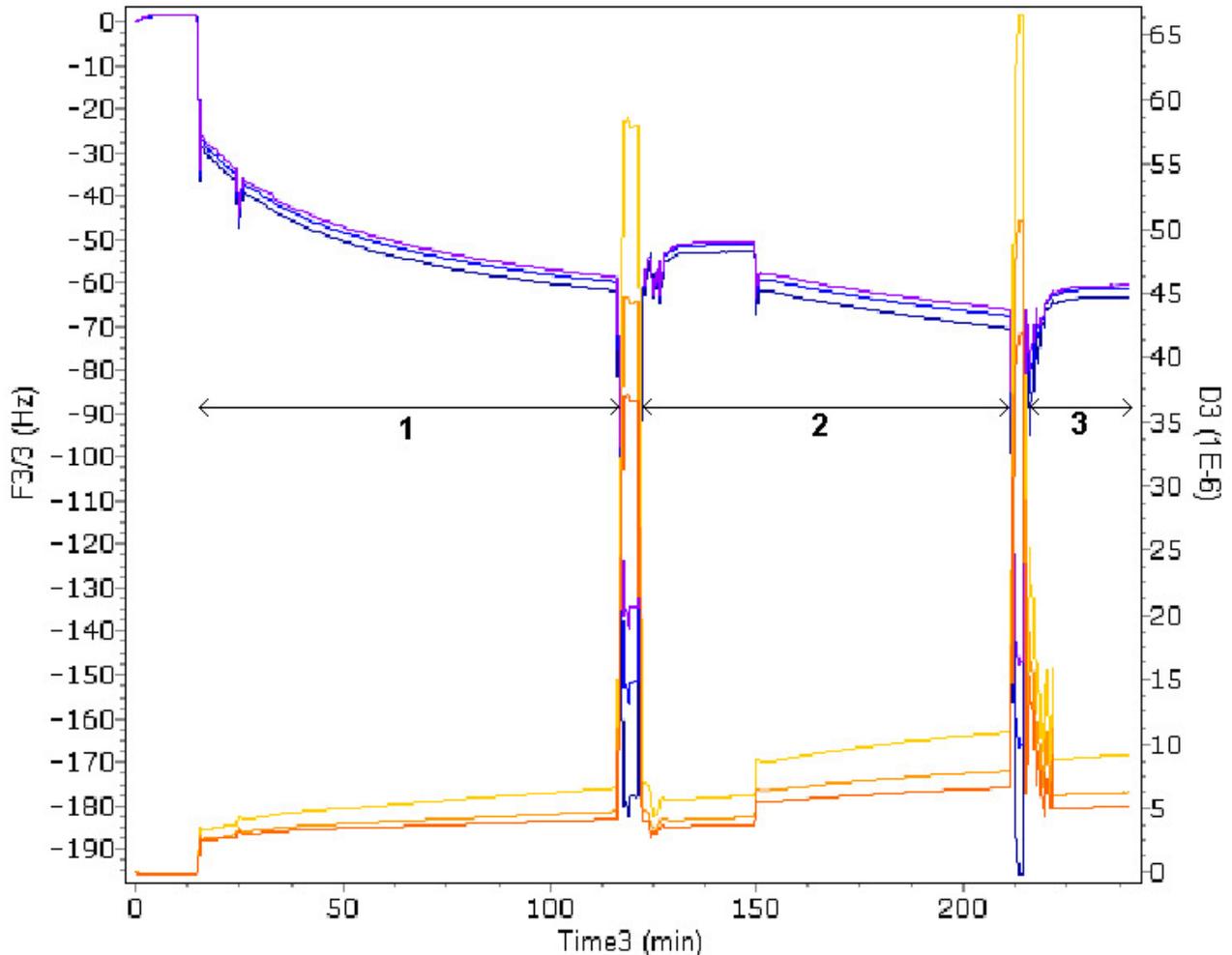
Da sich die Sekundärstruktur des Enzyms durch die Immobilisierung an Silica-Nanoträger nicht und unabhängig von der Höhe der Beladung ändert, können keine Strukturänderungen für die mit zunehmender Beladung steigende Verminderung der spezifischen Aktivität verantwortlich sein. Die spezifische Aktivität (Units an aktivem Enzym pro mg Enzymbeladung) sank von 22.1 U/mg (bei einer Beladung von 14.9 mg/g) über 12.2 U/mg (bei 39.5 mg/g) bis hin zu 9.17 U/mg (bei 55.8 mg/g)

Daher müssen andere Effekte, die die spezifische Aktivität vermindern, die Ursache für diese Ergebnisse sein. Da die spezifische Aktivität mit zunehmender Beladung sank, ist eine sterische Hinderung der Katalyse durch die dichtere Packung der Enzymmoleküle auf Grund der höheren Beladung wahrscheinlich. Durch die dichtere Packung der Enzymmoleküle ist auch die Diffusion in der Nähe der Enzymmoleküle geringer, dies führt zu einer Diffusionslimitierung des Substrates bei der Katalyse.

### Messungen mit der Quarzkristallmikrowaage:

Um die Kinetik der Immobilisierung mittels physikalisch-chemischer Methoden zu untersuchen und die immobilisierte Enzymmenge zu quantifizieren, verwendeten wir Quarzkris-

tallmikrowaagenmessungen (QCM-Messungen), die mittels einer Frequenzänderung die Massenzunahme auf dem QCM-Chip bestimmen können. Dies ist eine sehr genaue Methode, allerdings auch sehr empfindlich gegenüber den Reaktionsbedingungen. Die im Spektrum (Abb.94) zu sehenden Bereiche 1, 2 und 3 kennzeichnen die Immobilisierung, bei der auch die Frequenzminderung eintritt (entspricht einer Massenzunahme), das Waschen des Chips und die daran anschließende Äquilibration mit dem Puffer.



**Abb.94:** QCM-Messung von Penicillin Amidase auf einem QCM-Chip mit Polymethylacrylat-Beschichtung und einer HG-Spacereinheit. Die Frequenzerniedrigung (blaue Linien) ist auf Achse  $F3/3$  und die Dämpfung (orange Linien) ist auf Achse  $D3$  aufgeführt.

Die Frequenzerniedrigung gibt die Menge an immobilisiertem Enzym an, die Dämpfung erlaubt Aussagen über den Wassergehalt des Mediums in Kontakt mit dem QCM-Chip. Die Menge an immobilisiertem Enzym in Abb.94 betrug  $10.63 \text{ mg/m}^2$ .

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Immobilisierung war nach 104 min abgeschlossen.
- Die maximale Menge an kovalent immobilisiertem Penicillin G Acylase betrug  $18.69 \text{ mg/m}^2$ .

Daraus ergibt sich eine maximale Beladung für den Chip ( $A_{\text{Chip}} = 1.13 \text{ cm}^2$ ) von  $2.11 \mu\text{g}$ . Die Aktivität des auf dem Chip immobilisierten Enzyms wurde ebenfalls mittels einer Direktmessung vermessen, dabei ergab sich für den oben aufgeführten Chip eine Menge an aktivem Enzym von  $1.4 \mu\text{g}$ . Damit beträgt die spezifische Aktivität  $27.9 \text{ U/mg}$ . Das bedeutet, dass 66% der auf dem Chip immobilisierten Penicillin G Acylase katalytisch aktiv war. Eine Immobilisierung des Enzyms unter vergleichbaren Bedingungen (Polymethylacrylat-Partikel, eine HG-Spacereinheit) ergab:

- Optimale Immobilisierungsdauer betrug 40 h.
- Die maximal immobilisierte Enzymmenge betrug  $12.0 \text{ mg/m}^2$  ( $9.2 \text{ U/mg}$ ).

Dabei zeigt sich, dass sowohl die Beladung, als auch die spezifische Aktivität auf einem QCM-Chip höher ist, als auf den suspendierten Partikeln (nach Standardmethode, vgl. Kapitel 3.4.).

Durch die schnelle Durchführung der Quarzkristallmikrowaagen-Messungen lässt sich diese Methode sehr gut als schnelle Screening-Methode verwenden, um unterschiedliche Immobilisierungstechniken miteinander zu vergleichen.

#### **4.6. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Zur Identifizierung des verwendeten Enzyms wurde die Aufreinigung und Auftrennung des Enzyms mittels Gelelektrophorese mit der Massenspektrometrie kombiniert. Die Änderungen der Sekundärstruktur wurden mittels Circular dichroismus-Messungen analysiert und der Verlauf der Immobilisierung mittels Quarzkristallmikrowaagen-Messungen verfolgt.

##### **CD-Messungen**

Die vorgestellten CD-Messungen sind die ersten, die an einem kovalent an einer festen Phase – hier an Silica-Nanopartikeln ( $12 \text{ nm}$  groß) – immobilisierten Enzym vorgenommen wurden. Das Modellenzym Penicillin G Acylase ( $9 \text{ nm}$  groß) wurde kovalent auf Silica-Nanopartikel immobilisiert, um Lichtstreuung und Sedimentation, die zur Absorptionsglättung führen, zu reduzieren. Für die Charakterisierung des immobilisierten Enzyms sind die Beladung und die spezifische Aktivität wichtige Parameter. Daher wurde die Beladung auf den Trägern mit Hilfe von UV-Spektren über die Absorption der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin der Penicillin G Acylase bei  $280 \text{ nm}$  bestimmt (Gill et al, 1989). Die spezifische Aktivität des freien und immobilisierten Enzyms wurde durch die Methoden vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Kasche (Kasche et al, 1987, Galunsky et al, 1994) bestimmt. Diese bestimmen die Aktivität des Enzyms durch spektroskopische Messungen eines Chro-

mophors, dass durch die katalysierte Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB) erzeugt wird.

Um die Sekundärstrukturelemente durch CD-Spektroskopie zu bestimmen musste die exakte molare Masse und Konzentration des Proteins bekannt sein. Die verwendete Penicillin G Acylase wurde von Sigma-Aldrich gekauft, deren molare Masse war aber nicht klassifiziert. Daher wurde die molare Masse des Enzyms mittels Massenspektrometrie ermittelt, nachdem es durch Trypsin enzymatisch abgebaut und die Peptidfragmente durch 1D-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Damit wurde das Enzym eindeutig klassifiziert (Penicillin G Acylase von *E. coli*, gereifte Form, EC 3.5.1.11, 86192 g/mol). Als Vergleich für die CD-Messungen wurde das CD-Spektrum der freien Penicillin G Acylase, das erstmals 1990 von Lindsay und Pain aufgenommen wurde, verwendet.

Die Silica-Nanopartikel wurden mit Glutardialdehyd aktiviert (bestätigt durch IR) und das Enzym durch eine Iminbindung (Lysin- und Arginin-Seitenketten) kovalent immobilisiert.

Die Beladung der Partikel wurde bis zur Sättigung (55.8 mg/g) erhöht, um zu sehen, ob eine dichte Anordnung der Enzymmoleküle auf der Oberfläche die Sekundärstruktur oder die spezifische Aktivität verändert. Die zunehmende Beladung der Partikel mit Enzym erforderte aber einen stärker zunehmenden Überschuss an eingesetzter Enzymmenge, so dass die Ausbeute von 37 auf 14% sank. Die „spezifische Nanopartikel Aktivität“, also die Aktivität des Enzyms (in U) pro Silica-Nanopartikel (in g) stieg durch die Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge um den Faktor 10 nur um 50% von 330 U/g auf 510 U/mg an.

Es stellte sich heraus, dass die kovalente Immobilisierung von Penicillin G Acylase auf Silica-Nanopartikel (12 nm Durchmesser) nur eine minimale Strukturänderung verursacht. Diese beträgt +0.5% für die  $\alpha$ -Helix und +2.2% für das  $\beta$ -Faltblatt, sowie -1.6% für die  $\beta$ -Schleife und -1.1% für den ungeordneten Anteil.

Durch die Immobilisierung wurde eine deutliche Verminderung der spezifischen Aktivität mit steigender Beladung bewirkt (Verlust von 59% der spezifischen Aktivität mit zunehmender Beladung). Ein Grund für die geringen Strukturänderungen war die hydrophile Oberfläche des Trägers, die nur geringe störende Wechselwirkungen mit dem Enzym verursacht, wie es schon für PMS-Savinase auf Silica-Nanopartikeln immobilisiert belegt wurde (Norde und Giacomelli, 2000, Maste et al, 1997). Die Silica-Nanopartikel besitzen eine Größe (12 nm), die in der Größenordnung der Penicillin G Acylase (9 nm) liegt, so dass die sterische Hinderung durch die Träger sehr gering ist.

Die Bindung des Trägers an Aminogruppen des Enzyms (Seitengruppen von Lysin oder Arginin) erfolgt statistisch orientiert. Dadurch ist auch eine Bindung in der Nähe des akti-

ven Zentrums möglich, so dass die Umsetzung des Substrates bei der Enzymkatalyse durch sterische Hinderung oder Änderungen der Sekundärstruktur vermindert werden würde. Es ergaben sich aber keine signifikanten Änderungen der Sekundärstruktur des immobilisierten Enzyms.

Der hier verwendete sehr kurze Spacer (0.63 nm) verringerte nicht die Diffusionslimitierung des Substrates, da der Abstand zwischen den einzelnen Enzymmolekülen sehr gering war. Eine Verlängerung des zur Immobilisierung verwendeten Spacers ermöglicht bei negativ geladenen Partikeln eine Zunahme der spezifischen Aktivität mit zunehmender Spacerlänge (vgl. Kapitel 3.5.6.). Diese Experimente mit längeren Spacern waren nicht möglich, da dies wieder zu Agglomeration der Silica-Nanopartikel führte.

### **QCM-Messungen**

Der Vergleich der Beladung durch die Immobilisierung des Modellenzym Penicillin G Acylase auf einem QCM-Chip, bestimmt durch die Quarzkristallmikrowaage und durch Aktivitätsmessungen war erfolgreich, allerdings konnte der Verlauf dieser Immobilisierung (104 min) nicht unmittelbar mit jenem der Partikel (40 h) verglichen werden.

Die Beladung des QCM-Chips betrug 2.11  $\mu\text{g}$ , die aktive Menge an immobilisiertem Enzym 1.40  $\mu\text{g}$ , daraus ergibt sich eine spezifische Aktivität von 27.9 U/mg. Das bedeutet, dass 66% der auf dem Chip immobilisierten Penicillin G Acylase katalytisch aktiv war.

Die QCM-Technik lässt sich als schnelle Screening-Methode für Immobilisierungen von Enzymen verwenden, da diese schnell und mit geringen Probenmengen durchgeführt werden kann.

## 5. Ausblick

Die bisherigen Arbeiten zeigen, dass das Immobilisat, bestehend aus Polymer-Mikropartikeln (Polymethylacrylat), Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer und Penicillin G Acylase (EC 3.5.1.11, *E.coli*) einen hochwertigen Biokatalysator darstellt.

Dennoch gibt es bei der Verwendung längerkettiger Spacer, vor allem jenen aus Aminosäuren, ein großes Problem: Die Partikel weisen, vor allem wenn sie mit Enzym beladen sind, eine starke Agglomeration auf. Die Erhöhung des Zetapotentials der Partikel durch zusätzliche, nicht an der Spacerreaktion teilnehmende geladene funktionelle Gruppen, könnte die Agglomeration vermindern. Gerade die mit dem Asparaginsäure-Spacer funktionalisierten Mikropartikel, die ein Zetapotential von -5.5 mV (statt -28.0 mV wie für die unmodifizierten Partikel) bei pH 7.5 besitzen, agglomerierten besonders stark, da diese zusätzlichen funktionellen Gruppen das Zetapotential verminderten.

Alle Versuche wurden mit dem Modellenzym Penicillin G Acylase durchgeführt, wobei der Schwerpunkt in der Partikelsynthese, der Darstellung der Spacer und der jeweiligen Charakterisierung lag. Daher wurden nur die Beladung, die Menge an aktivem Enzym auf dem Träger und die spezifische Aktivität bestimmt. Weitere kinetische Messungen, die Bestimmung des Synthese / Hydrolyse Verhältnisses, die Substratspezifität und die Stereoselektivität sind den bisherigen Ergebnissen hinzuzufügen.

Anschließend sollten diese funktionalisierten Partikel mit anderen Enzymen beladen und untersucht werden, um eine allgemein gültigere Aussage treffen zu können. Dabei sollten vor allem je ein Enzym mit deutlich geringer molarer Masse und eines mit deutlich größerer molarer Masse, sowie Enzyme, die Substrate mit unterschiedlicher molarer Masse katalysieren, verwendet werden.

Die Kombination von Polymer-Mikropartikel, funktionalisiert mit einem Spacer zeigt das Potential für eine industrielle Anwendung. Durch die Variation des Spacers kann das Immobilisat auf die spezifischen Anforderungen des jeweiligen Enzyms ausgelegt werden. Die Kosten für diese Anwendung belaufen sich mit 6 € pro g Partikel im rentablen Bereich für biotechnologische Anwendungen in der Pharmazie.

## 6. Fehlerbetrachtung

### 6.1. Experimentelle Randbedingungen und verfahrensbedingte Fehler

Bei der Betrachtung von Fehlern bei analytischen Messungen müssen zwei Ursachen unterscheiden werden:

**Zufällige Fehler:** Diese sind von Messung zu Messung unterschiedlich groß und führen zur einer Streuung der Messwerte

- Unkonstantes Arbeiten des Experimentators
- Inhomogenität der Proben bei Mehrfachmessungen
- Begrenzte Präzision der Messanlagen (z. B. Waage, Spektrometer)

→ Limitieren die Präzision

**Systematische Fehler:** Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie auch bei mehrmaligem Messen in erster Näherung immer gleich bleiben

- Inhomogenität mehrerer Probenentnahmen einer Probenstelle
- Falsch justierte Messgeräte
- Ungenaue Kalibrierfunktionen

→ Limitieren die Richtigkeit

### 6.2. Fehlerabschätzungen

Alle Fehlerabschätzungen beziehen sich auf Literaturangaben und Standardabweichungen von mindestens drei Einzelmessungen derselben Probe. Bei Geräten wurden die Angaben des Herstellers zur Standardabweichung übernommen und mit den Standardabweichungen von mindestens drei Einzelmessungen derselben Probe verglichen.

- Aktivitätsmessungen (spektroskopisch, NIPAB):  $\pm 10\%$
- Aktivitätsmessungen (spektroskopisch, Aktive Site Titration):  $\pm 4\%$
- Bestimmung der Aminogruppen (spektroskopisch):  $\pm 10\%$
- Bestimmung der Beladung mittels UV-Messungen:  $\pm 5\%$
- Bestimmung der Epoxygruppen:  $\pm 20\%$
- Gravimetrische Bestimmungen:  $\pm 3\%$
- Größenverteilung:  $\pm 10\%$
- Magnetische Sättigung:  $\pm 5\%$

- Oberflächenbestimmung mittels BET:  $\pm 20\%$
- Zetapotential:  $\pm 20\%$

## 7. Abkürzungen und Definitionen

Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
AS-Spacer	Aminosäurespacer, basierend auf der adaptierten Merrifield Synthese (ASS)
AT-Spacer	Auftragsspacer (ATS)
ATR-FT-IR	Attenuated Total Reflection Fourier Transformed Infrared Spectroscopy
Beladung	Immobilisierte Menge an Enzym auf einem Träger
BPO	Dibenzoylperoxid
°C	Grad Celsius
DIC	Diisopropylcarbodiimid
CD	Circulardichroismus
DMF	Dimethylformamid
DRIFTS	Diffusion Reflexion Infrared Fourier Transformed Spectroscopy
DVB	Divinylbenzen
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
I	Ionenstärke ([I] = mol/l)
Immobilisat	Gesamtsystem aus Träger, Spacer und immobilisiertem Enzym
HG-Spacer	Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer (HGS)
HOBT	1-Hydroxybenzotriazol
M	Molare Masse (g/mol), mit Zahl: Molar (mol/l)
min	Minuten
M <sub>s</sub>	Magnetische Sättigung
NIPAB	6 – Nitro – 3 – phenylacetamidbenzoesäure
nPP	Maghemit-Nanopartikel mit Polymethylmethacrylat-Hülle
Nullspacer	Ein Spacer, der verknüpft, dabei selber aber nicht zur Spacerlänge beiträgt
OL / TL	Oktaederlücken / Tetraederlücken
PGA	Penicillin G Acylase (von <i>E. coli</i> , wenn nicht anders angegeben)
PmaP	Polymethylacrylat-Partikel
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PvacP	Polyvinylacetat-Partikel
QCM	Quarzkristallmikrowaage
RT	Raumtemperatur
Spacer	Verbrückendes Molekül zwischen Träger und Enzym (engl. Abstandshalter)

## Abkürzungen und Definitionen

sPR	Silica-Nanopartikel
Substrat	Substanz, die von einem Enzym katalytisch umgesetzt wird
Tab	Tabelle
T <sub>C</sub>	Curie–Temperatur
TNBS	2, 4, 6-Trinitrobenzosulfonsäure
U	Unit, 1 U = 1 $\mu\text{mol}_{\text{Substanzumsatz}}/\text{min}$ bei 25 °C
U/min	Umdrehungen pro Minute
w/v	Verhältnis von Masse pro Volumen (g/100ml)

## 8. Referenzen

### 8.1. Literaturangaben zu Kapitel 1

- Bruggink, A.; Roos, E., C.; de Vroom, E. Penicillin Acylase in the industrial production of beta-lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 128-133.
- Kallenberg, A., I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Immobilization of Penicillin G Acylase: The key to optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905–926.
- Leuchtenberger, A. Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie. *Teubner Verlag Stuttgart, Germany* **1998**.

### 8.2. Literaturangaben zu Kapitel 2

- Adriano, W., S.; Filho, E., H., C.; Silva, J., A.; Giordano, R., L., C.; Gonçalves, L., R., B. Stabilisation of Penicillin G Acylase by immobilization on glutardialdehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2005a**, *22*, 529 - 538.
- Adriano, W., S.; Filho, E., H., C.; Silva, J., A.; Gonçalves, L., R., B. Optimization of penicillin G acylase multipoint immobilization on to glutaraidehyde-chitosan beads. *Biotechnology and applied Biochemistry* **2005b**, *41*, 201-207.
- Akgöl, S.; Kacar, Y.; Denizil, A.; Arica, M., Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry* **2001**, *74*, 281-288.
- Arias, J., L.; Gallardo, V.; Gomez-Lopera, S., A.; Plaza, R., C.; Delgado, A., V Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *Journal of Controlled Release* **2001**, *77*, 309–321.
- Arshady, R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. *Colloid and Polymer Science* **1992**, *270*, 717-732.
- Atkins, P., W. Physikalische Chemie. *VCH* **1996**.
- Balcao, V., M.; Paiva, A., L.; Malcata, X., F. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 392-416.
- Basso, A.; De Martin, L.; Gardossi, L.; Margetts, G.; Brazendale, I.; Bosma, A., Y.; Ulijn, R., V.; Flitsch, S., L. Improved biotransformations on charged PEGA supports. *Chem. Commun.* **2003a**, 1296–1297.

- Basso, A.; De Martin, L.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; Fabrizio, S. Organically modified xerogels as novel tailor-made supports for covalent immobilisation of enzymes (penicillin G acylase). *Tetrahedron Letters* **2003b**, *44*, 5889–5891.
- Basso, A.; De Martin, L.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. Controlling the hydration of covalently immobilised penicillin G amidase in low-water medium: properties and use of Celite R-640. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000a**, *8*, 245–253.
- Basso, A.; De Martin, L.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Tomat, A.; Casarcib, M.; Li Rosib, O. A novel support for enzyme adsorption: properties and applications of aerogels in low water media. *Tetrahedron Letters* **2000b**, *41*, 8627–8630.
- Bianchi, D.; Golini, P.; Bortolo, R.; Cesti, P. Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 592–598.
- Bryjak, J.; Noworyta, A. Immobilisation of Penicillin Acylase on Copolymer of Butyl Acrylate and Ethylend Glycol Dimethacrylate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1993**, *57*, 79–85.
- Bryjak, J.; Trochimczuk, A.; Noworyta, A. Immobilization of penicillin acylase on acrylic carriers. *Bioprozess Engineering* **1989**, *4*, 159–162.
- Buchholz, K.; Kasche, V. Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. *VCH Weinheim, Germany* **1997**.
- Busto, M., D. An experiment illustrating the effect of immobilization on enzyme properties. *Biochemical Education* **1998**, *26*, 304–308.
- Cao, L.; van Langeny, L.; Sheldon, R., A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, *14*, 387–394.
- Cao, L.; van Langen, L., M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Cross-linked aggregates of penicillin acylase: robust catalysts for the synthesis of b-lactam antibiotics. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11*, 665–670.
- Cao, L.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Cross-Linked Enzyme Aggregates: A Simple and Effective Method for the Immobilization of Penicillin Acylase. *Organic Letters* **2000**, *2*, 1361–1364.
- Cao, L.; Bornscheuer, U., T. ; Schmid, R., D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, *6*, 279–285.
- Carpenter, E., E. Iron nanoparticles as potential magnetic carriers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2001**, *225*, 17–20.

- Celej, M., Soledad; D'Andrea, M., G.; Campana, P., T.; Fidelio, G., D.; Bianconi, M., Lucia Superactivity and conformational changes on  $\alpha$ -chymotrypsin upon interfacial binding to cationic micelles. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1059–1066.
- Chatterjee, J.; Haik, Y.; Jen Chen, C. Biodegradable magnetic gel: synthesis and characterization. *Colloid Polym Sci* **2003**, *281*, 892–896.
- Chong, M., A., S.; Zhao, X., S. Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. *Catalysis Today* **2004**, *93*, 293–299.
- Corma, A.; fornes, V.; Rey, F. Delaminated Zeolites: An Efficient Support for Enzymes. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 71-74.
- Corma, A.; Fornes, V.; Jorda, J., L.; Rey, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J., M.; Mateo, C. Electrostatic and covalent immobilisation of enzymes on ITQ-6 delaminated zeolitic materials. *Chem. Commun.*, **2001**, 419-420.
- Cornell, R., M.; Schwertmann, U. The Iron Oxides. *Wiley – VCH* **1996**.
- De Lathouder, K., M.; Bakker, J.; Kreutzer, M., T.; Kapteijn, F.; Moulijn, J., A.; Wallin, S., A. Structured reactors for enzyme immobilization: advantages of tuning the wall morphology. *Chemical Engineering Science* **2004**, *59*, 5027 – 5033.
- De Martin, L.; Ebert, C.; Garau, G.; Gardossi, L.; Linda, P. Penicillin G amidase in low-water media: immobilisation and control of water activity by means of celite rods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, *6*, 437–445.
- Dumitriu, E.; Secundo, F.; Patarin, J.; Fechete, I. Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003**, *22*, 119–133.
- Eldin, M., M., S.; Schrön, C., G., P., H.; Janssen, M., H., A.; Mita, D., G.; Tramper, J. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10*, 445–451.
- Esquena, J.; Pons, R.; Azemar, N.; Caelles, J.; Solans, C. Preparation of monodisperse silica particles in emulsion media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *123*, 575-586.
- Fernandez-Lafuente, R.; Roseli, C., M.; Alvaro, G.; Guisan, J., M. Additional stabilisation of Penicillin G Acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde. *Enzyme Microbiology Technology* **1992**, *14*, 489-495.
- Franzreb, M.; Holey, T., J.; Siemann-Herzberg, M.; Owen, T., R., T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. *Appl Microbiol Biotechnol* **2006**, 1-12.

- Gemeiner, P. Enzyme engineering: Immobilized biosystems. *Ellis Horwood Ltd. and Alfa Publishers* **1992**.
- Georgiadou, S.; Brooks, B., W. Suspension polymerisation of methyl methacrylate using ammonium polymethacrylate as a suspending agent. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 6892 – 6901.
- Georgiadou, S.; Brooks, B., W. Suspension polymerisation of methyl methacrylate using sodium polymethacrylate as a suspending agent. *Chemical Engineering Science* **2005**, *60*, 7137 – 7152.
- Gomez-Lopera, S., A.; Plaza, R., C.; Delgado, A., V. Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *240*, 40–47.
- Guan, Y., H.; Lilley, T., H.; Brook, A., H. Production of immobilized penicillin acylase using aqueous polymer systems for enzyme purification and in situ immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 218–224.
- Guisan, J., M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microbiology Technology* **1988**, *10*, 375-282.
- Gupta, A., Kumar; Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **2005**, *26*, 3995–4021.
- Häring, D.; Schreier, P. Cross-linked enzyme crystals. *Biocatalysis and biotransformation* **1999**, *3*, 35-38.
- Henglein, A.; Schnabel, W.; Wendenburg, J. Einführung in die Strahlenchemie mit praktischen Anleitungen. *Verlag Chemie GmbH Weinheim* **1969**.
- Jakubke, H. D.; Karcher, R. Lexikon der Chemie - Band 3. *Spektrum Akademischer Verlag* **1999**.
- Janssen, M., H., A.; van Langen, L., M.; Pereira, S., R., M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Evaluation of the performance of immobilized Penicillin G Acylase using Active Site Titration. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *78*, 425-432.
- Kallenberg, A., I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Immobilization of Penicillin G Acylase: The key to optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905 –926.
- Katchalski-Katzir, E.; Kraemer, D., M. EupergitC, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10*, 157–176.
- Kirby, B., J.; Hasselbrink Jr., E., F. Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 203–213.

- Liu, X.; Guan, Y.; Liu, H.; Maa, Z.; Yang, Y.; Wub, X. Preparation and characterization of magnetic polymer nanospheres with high protein binding capacity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005a**, *293*, 111–118.
- Liu, X.; Guan, Y.; Shen, R.; Liu, H. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. *Journal of Chromatography B* **2005b**, *822*, 91–97.
- Ma, Z.-Y.; Guan, Y.; Liu, H. Synthesis of monodisperse nonporous crosslinked poly(glycidyl methacrylate) particles with metal affinity ligands for protein adsorption. *Polymer International* **2005**, *54*, 1502-1507.
- Mateo, C.; Palomo, J., M.; van Langen, L., M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. A New, Mild Cross-Linking Methodology to Prepare Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *86*, 273-276.
- Mateo, C., Abian, O., Fernandez-Lorente, G., Pedroche, J., Fernandez-Lafuente, R. and Guisan, J., M. (2002) *Biotechnol. Prog.*, **18**, 629-634.
- Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J., M. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules*, **2000**, *1*, 739-745.
- Müller-Schulte, D.; Brunner, H. Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycosylated haemoglobin. *Journal of Chromatography A* **1995**, *711*, 53-60.
- Norouzian, D.; Javapour, S.; Moazamib, N.; Akbarzadeha, A. Immobilization of whole cell penicillin G acylase in open pore gelatin matrix. *Enzyme and Microbial Technology* **2002**, *30*, 26–29.
- Peng, Z., G.; Hidajat, K.; Uddin, M., S. Selective and sequential adsorption of bovine serum albumin and lysozyme from a binary mixture on nanosized magnetic particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *281*, 11–17.
- Phadtare, S.; Parekh, P.; Gole, A.; Patil, M.; Pudle, A.; Prabhune, A.; Sastrz, M. Penicillin G Acylase-Fatty Lipid Biocomposite Films Show Excellent Catalytic Activity and Long Term Stability/Reusability. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 483-488.
- Pribyl, M.; Chmelikova, R.; Hasal, P.; Marek, M. Penicillin G hydrolysis in an electro-membrane reactor with immobilized penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, *33*, 793–801.
- Reetz, M., T. Entrapment of Biocatalysts in Hydrophobic Sol-Gel Materials for Use in Organic Chemistry. *Advanced Materials* **1997**, *9*, 943-954.

- Reichert, C.; Höll, W., H.; Franzreb, M. Mass transfer enhancement in stirred suspensions of magnetic particles by the use of alternating magnetic fields. *Powder Technology* **2004**, *145*, 131–138.
- Ren, L.; He, J.; Zhang, S.; Evans, D., G.; Duan, X. Immobilization of penicillin G acylase in layered double hydroxides pillared by glutamate ions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, *18*, 3–11.
- Röhm-GmbH Immobilisation of Enzymes on Eupergit C and Eupergit C 250I. *Eupergit Information Sheet, Document code INFO EP 3/E* **1995**.
- Römpf-CD-Chemie-Lexikon-Version1.0 *Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag* **1995**.
- Safarik, I.; Safarikova, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *BioMagnetic Research and Technology* **2004**, *2*, 1-17.
- Sajjadi, S.; Jahanzad, F. Nanoparticle formation by highly diffusion-controlled emulsion polymerisation. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61*, 3001 – 3008.
- Schoevaart, R.; Wolbers, M., W.; Golubovic, M.; Ottens, M.; Kieboom, A., P., G.; van Rantwijk, F.; van der Wielen, L., A., M.; Sheldon, R., A. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering* **2004**, *87*, 754-762.
- Schwertmann, U.; Cornell, R., M *Iron Oxides in the Laboratory*, 2nd edition. *Wiley – VCH* **2000**.
- Sharma, S.; Kaur, P.; Jain, A.; Rajeswari, M., R.; Gupta, M., N. A Smart Bioconjugate of Chymotrypsin. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 330-336.
- Shen, L.; Laibinis, P., E.; Hatton, A., T. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. *Langmuir* **1999**, *15*, 447-453.
- Shinkai, M. Functional Magnetic Particles for Medical Application. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2002**, *94*, 606-613.
- Sigg, L.; Stumm, W. *Aquatische Chemie - eine Einführung in die Chemie wässriger Lösungen und natürlicher Gewässer*. *Teubner Verlag Stuttgart, Germany* **1994**.
- Stöcker, H. *Taschenbuch der Physik*. *Verlag Harri Deutsch* **1998**.
- Tanyolac, D.; Ozdural, A., R. A new low cost magnetic material: magnetic polyvinylbutyral microbeads. *Reactive & Functional Polymers* **2000**, *43*, 279–286.
- Tischer, W.; Kasche, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *TIBTECH* **1999**, *17*, 326-335.

- Van Roon, J., L.; Boom, R., M.; Paasman, M., A.; Tramper, J.; Schroen, C., G., P., H.; Beeftink, H., H. Enzyme distribution and matrix characteristics in biocatalytic particles. *Journal of Biotechnology* **2005a**, *119*, 400–415.
- Van Roon, J., L.; Groenendijk, E.; Kieft, H.; Schroen, C., G., P., H.; Tramper, J.; Beeftink, H., H. Novel Approach to Quantify Immobilized-Enzyme Distributions. *Biotechnology and Bioengineering* **2005b**, *89*, 660-669.
- Van Roon, J., L.; Joerink, M.; Rijkers, M., P., W., M.; Tramper, J.; Schroen, C., G., P., H.; Beefink, H. Enzyme Distribution Derived from Macroscopic Particle Behavior of an Industrial Immobilized Penicillin-G Acylase. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1510-1518.
- Wu, C.-W.; Lee, J.-G.; Lee, W.-C. Protein and enzyme immobilization on non-porous microspheres of polystyrene. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1998**, *27*, 225-230.
- Xue, B.; Sun, Y. Fabrication and characterization of a rigid magnetic matrix for protein adsorption. *Journal of Chromatography A* **2002**, *947*, 185–193.
- Yanga, C.; Liu, H.; Guan, Y.; Xinga, J.; Liu, J.; Shan, G. Preparation of magnetic poly(methylmethacrylate–divinylbenzene–glycidylmethacrylate) microspheres by spraying suspension polymerization and their use for protein adsorption. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293*, 187–192.
- Zadrazil, A.; Chmelikova, R.; Hasal, P. Continuous penicillin G hydrolysis in an electro-membrane reactor with immobilized penicillin G acylase. *Biotechnology Letters* **2003**, *25*, 485–490.

### 8.3. Literaturangaben zu Kapitel 3

- Adams, L., A.; Cox, R., J. ; Gibson, J., S. ; Mayo-Martín, M., Belén ; Walterb, M.; Whittinghamb, W. A new synthesis of phosphoramidates: inhibitors of the key bacterial enzyme aspartate semi-aldehyde dehydrogenase. *Chem. Commun.* **2002**, 2004–2005.
- Adriano, W., S.; Filho, E., H., C.; Silva, J., A.; Giordano, R., L., C.; Gonçalves, L., R., B. Stabilisation of Penicilin G acylase by immobilization on glutardialdehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2005a**, *22*, 529 - 538.
- Adriano, W., S.; Filho, E., H., C.; Silva, J., A.; Gonçalves, L., R., B. Optimization of penicilin G acylase multipoint immobilization on to glutaraidehyde-chitosan beads. *Biotechnology and applied Biochemistry* **2005b**, *41*, 201-207.

- Akgöl, S.; Kacar, Y.; Denizil, A.; Arica, M., Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres. *Food Chemistry* **2001**, *74*, 281-288.
- Arica, M., Yakup; Bayramogul, G.; Bicak, N. Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochemistry* **2004**, *39*, 2007–2017.
- Arica, M., Yakup; Yavuz, H.; Patir, S.; Denizil, A. Immobilization of glucoamylase onto spacer-arm attached magnetic poly(methylmethacrylate) microspheres: characterization and application to a continuous flow reactor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *11*, 127–138.
- Arica, M., Yakup; Senel, S.; Alaeddinogul, G., N.; Patir, S.; Denizil, A. Invertase Immobilized on Spacer-Arm Attached Poly(hydroxyethyl methacrylate) Membrane: Preparation and Properties. *Journal of Applied Polymer Science* **1999**, *75*, 1685–1692.
- Bianchi, D.; Golini, P.; Bortolo, R.; Cesti, P. Immobilization of penicillin G acylase on aminoalkylated polyacrylic supports. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *18*, 592-598.
- Bruggink, A.; Roos, E., C.; de Vroom, E. Penicillin Acylase in the industrial production of beta - lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 128-133.
- Bryjak, J.; Noworyta, A. Immobilisation of Penicillin Acylase on Copolymer of Butyl Acrylate and Ethylend Glycol Dimethacrylate. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1993**, *57*, 79-85.
- Bryjak, J.; Trochimczuk, A.; Noworyta, A. Immobilization of penicillin acylase on acrylic carriers. *Bioprozess Engineering* **1989**, *4*, 159-162.
- Bubnis, W., A.; Offner, C., M. The determination of e-amino groups in soluble and poorly soluble proteinaceous materials by a spectrophotometric method using trinitrobenzenesulfonic acid. *Analytical Biochemistry* **1992**, *207*, 129-133.
- Buchholz, K.; Kasche, V. Biokatalysatoren und Enzymtechnologie. *VCH Weinheim, Germany* **1997**.
- Burteau, N.; Burton, S.; Crichton, R., R. Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *Febs Letters* **1989**, *258*, 185-189.
- Chan, W., C.; White, P., D. Fmoc solid phase peptide synthesis. *Oxford University Press* **2003**.

- De Maio, A.; El-Masry, M., M.; Portaccio, M.; Diano, N.; Di Martino, S.; Mattei, A.; Ben-civenga, U.; Mita, D., G. Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes Part 1. Isothermal conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003a**, *21*, 239–252.
- De Maio, A.; El-Masry, M., M.; De Luca, P.; Grano, V.; Rossi, S.; Pagliuca, N.; Gaeta, F., S.; Portaccio, M.; Mita, D., G. Influence of the spacer length on the activity of enzymes immobilised on nylon/polyGMA membranes Part 2: Non-isothermal conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2003b**, *21*, 253–265.
- Dhal, P., K.; Babu, G., N. Immobilization of penicillin acylase by covalent linkage on vinyl copolymers containing epoxy groups. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1985**, *6*, 91-95.
- Dodson, G., G. Catalysis in Penicillin G Amidase – a member of the Ntn (N Terminal Nucleophile) hydrolase family. *Croatica Chemica Acta* **2000**, *73*, 901-908.
- Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. Activity of immobilised penicillin amidase in toluene at controlled water activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1998**, *5*, 241–244.
- Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P. Control of Enzyme Hydration in Penicillin Amidase Catalysed Synthesis of Amide Bond. *Tetrahedron Letters* **1996**, *37*, 9377-9380.
- Eldin, M., M., S.; Schrön, C., G., P., H.; Janssen, M., H., A.; Mita, D., G.; Tramper, J. Immobilization of penicillin G acylase onto chemically grafted nylon particles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *10*, 445–451.
- Fadnavis, N., W.; Bhaskar, V.; Kantam, L., Mannepalli; Choudary, B., Manoranjan, Highly Efficient “Tight Fit” Immobilization of R-Chymotrypsin in Mesoporous MCM-41: A Novel Approach Using Precursor Immobilization and Activation. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 346-351.
- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C., M.; Caanan-Haden, L.; Rodes, L.; Guisan, J., M. Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 96–103.
- Fernandez-Lafuente, R.; Armisen, P.; Sabuquillo, P.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J., M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, *93*, 185–197.

- Fernandez-Lafuente, R.; Rosell, C., M.; Alvaro, G.; Guisan, J., M. Additional stabilisation of Penicillin G Acylase-agarose derivatives by controlled chemical modification with formaldehyde. *Enzyme Microbiology Technology* **1992**, *14*, 489-495.
- Ferreira, J., S.; Straathof, A., J., J.; Franco, T., T.; van der Wielen, L., A., M. Activity and stability of immobilized penicillin amidase at low pH values. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2004**, *27*, 29–35.
- Gabor, E., M.; de Vries, E., J.; Janssen, D., B. A novel penicillin acylase from the environmental gene pool with improved synthetic properties. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *36*, 182–190.
- Gabor, E., M.; Janssen, D., B. Increasing the synthetic performance of penicillin acylase PAS2 by structure-inspired semi-random mutagenesis. *Protein Engineering, Design & Selection* **2004**, *17*, 571–579.
- Galunsky, B.; Schlothauer, R.-C.; Böckle, B.; Kasche, V. Direkt spektrophotometric measurement of enzyme activity in heterogeneous systems with insoluble substrate or immobilised enzyme. *Analytical Biochemistry* **1994**, *221*, 213-124.
- Gemeiner, P. Enzyme engineering: Immobilized biosystems. *Ellis Horwood Ltd. and Alfa Publishers* **1992**.
- Guisan, J., M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. *Enzyme Microbiology Technology* **1988**, *10*, 375-282.
- Hewitt, L.; Kasche, V.; Lummer, K.; Lewis, R., J.; Murshudov, G., N.; Verma, C., S.; Dodson, G., G.; Wilson, K., S. Structure of a Slow Processing Precursor Penicillin Acylase from *Escherichia coli* Reveals the Linker Peptide Blocking the Active-site Cleft. *J. Mol. Biol.* **2000**, *302*, 887-898.
- Ignatova, Z.; Hörnle, C.; Nurk, A.; Kasche, V. Unusual Signal Peptide Directs Penicillin Amidase from *Escherichia coli* to the Tat Translocation Machinery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *291*, 146–149.
- Ignatova, Z.; Taruttis, S.; Kasche, V. Role of the intracellular proteolysis in the production of the periplasmic penicillin amidase in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **2000a**, *22*, 1727–1732.
- Ignatova, Z.; Enfors, S.-O.; Hobbie, M.; Taruttis, S.; Vogt, C.; Kasche, V. The relative importance of intracellular proteolysis and transport on the yield of the periplasmic enzyme penicillin amidase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* **2000b**, *26*, 165–170.

- Ivanov, A., E.; Edink, E.; Kumar, A.; Yu.Galaev, I.; Arendsen, A., F.; Bruggink, A.; Mattiasson, B. Conjugation of Penicillin Acylase with the Reactive Copolymer of N-Isopropylacrylamide: A Step Toward a Thermosensitive Industrial Biocatalyst. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 1167-1175.
- Janssen, M., H., A.; van Langen, L., M.; Pereira, S., R., M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Evaluation of the performance of immobilized Penicillin G Acylase using Active Site Titration. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *78*, 425-432.
- Kaiser, E.; Colecott, R., L.; Bossinger, C., D.; Cook, P., I. Colour Test for Detection of free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Short communications* **1970**, 595-598.
- Kallenberg, A., I.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Immobilization of Penicillin G Acylase: The key to optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 905–926.
- Kasche, V.; Lummer, K.; Nurk, A.; Piotraschke, E.; Rieks, A.; Stoeva, S.; Voelter, W. Intramolecular autoproteolysis initiates the maturation of penicillin amidase from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1433*, 76-86.
- Kasche, V.; Haufler, U.; Markowsky, D.; Melnyk, S.; Zeich, A. Penicillin Amidase from *E. coli* – Enzyme heterogeneity and stability. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, *501*, 97–102.
- Manecke, G.; Polakowski, D. Some Carriers for the Immobilization of Enzymes based on Derivatized Poly(vinyl alcohol) and copolymers of Mehtacrylates with different spacer length. *Journal of Chromatography* **1981**, *215*, 13-24.
- Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lorente, G.; Pedroche, J.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J., M. Epoxy Sepabeads: A Novel Epoxy Support for Stabilization of Industrial Enzymes via Very Intense Multipoint Covalent Attachment. *Biotechnol. Prog.* **2002**, *18*, 629-634.
- Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Cortes, E.; Garcia, J., L.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J., M. One-Step Purification, Covalent Immobilization, and Additional Stabilization of Poly-His-Tagged Proteins Using Novel Heterofunctional Chelate-Epoxy Supports. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *76*, 269-276.
- Mateo, C.; Fernandez-Lorente, G.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J., M. Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage. *Biomacromolecules*, **2000**, *1*, 739-745.

- Merrifield, R., B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide'. *J. Amer. Chem. Soc.* **1963**, *86*, 2149-2154.
- Migneault, I.; Dartiguenave, C.; Bertrand, M., J.; Waldron, K., C. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques* **2004**, *37*, 790-802.
- Milovicova, D.; Masarove, J.; Vikartovska, A.; Gemeiner, P.; Michalkova, E. Biospecific immobilization of mannan–penicillin G acylase neoglycoenzyme on Concanavalin A-bead cellulose. *Journal of Biotechnology* **2004**, *110*, 11–19.
- Mincheva, Z.; Stambolieva, N.; Petrova, K.; Galunsky, B. Penicillin Amidase-catalysed preparative synthesis of cephem-7-(2-benzoxazolone-3-yl-acetamido)-desacetoxycephalosporanic acid using a non-specific polyethylenglycol modified acyl donor. *Biotechnology Techniques* **1996**, *10*, 727-730.
- Morillas, M.; McVey, C., E.; Brannigan, J., A.; Ladurner, A., G; Forney, L., J.; Virden, R. Mutations of penicillin acylase residue B71 extend substrate specificity by decreasing steric constraints for substrate binding. *Biochemical Journal* **2003**, *371*, 143-150.
- Nouaimi, M.; Möschel, K.; Bisswanger, H. Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *29*, 567–574.
- Olah, G., A.; Narang, S., C. Iodotrimethylsilane - a versatile synthetic reagent. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 2225-2277.
- Onyezili, F., N. Glutaraldehyde Activation Step in Enzyme Immobilization on Nylon. *Biotechnology and Bioengineering* **1986**, *29*, 399-402.
- Ospina, S.; Barzaua, E.; Ramirez, O., T.; Lopez-Munguia, A. Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology* **1996**, *19*, 462-469.
- Ragnitz, K.; Syldatk, C.; Pietzsch, M. Optimization of the immobilization parameters and operational stability of immobilized hydantoinase and L-N-carbamoylase from *Arthrobacter aurescens* for the production of optically pure L-amino acids. *Enzyme and Microbial Technology* **2001**, *28*, 713–720.
- Römpf-CD-Chemie-Lexikon-Version1.0 *Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag* **1995**.
- Sadler, K.; Tam, J., P. Peptide dendrimers: applications and synthesis. *Reviews in Molecular Biotechnology* **2002**, *90*, 195/229.
- Schroen, C., G., P., H.; Fretz, C., B.; DeBruin, V., H.; Berendsen, W.; Moody, H., M.; Ross, E., C.; van Roon, J., L.; Kroon, P., J.; Strubel, M.; Janssen, A., E., M.; Tramper, J.

- Modelling of the Enzymatic Kinetically Controlled Synthesis of Cephalexin: Influence of Diffusion Limitation. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *80*, 331-340.
- Schroen, C., G., P., H.; Eldin, M., M., S.; Janssen, A., E., M.; Mita, D., G.; Tramper, J. Cephalexin synthesis by immobilised penicillin G acylase under non-isothermal conditions: reduction of diffusion limitation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *15*, 163–172.
- Schroen, C., G., P., H.; Nierstrasz, V., A.; Kroon, P., J.; Bosma, R.; Janssen, A., E., M.; Beeftink, H., H.; Tramper, J. Thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 498-506.
- Shao, W.-H.; Zhang, X.-E.; Liu, H.; Zhang, Z.-P. Anchor-Chain Molecular System for Orientation Control in Enzyme Immobilization. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 822-826.
- Shewale, J., G.; Sudhakaran, V., K. Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid. *Enzyme and Microbial Technology* **1997**, *20*, 402-410.
- Sio, C., F.; Quax, W., J. Improved b-lactam acylases and their use as industrial biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* **2004**, *15*, 349-355.
- Smith, M., B.; March, J. March's advanced organic chemistry. *Wiley and Sons* **2001**, *5th edition*.
- Spieß, A., C.; Kasche, V. Direct Measurement of pH Profiles in Immobilized Enzyme Carriers during Kinetically Controlled Synthesis Using CLSM. *Biotechnol. Prog.* **2001**, *17*, 294-303.
- Svedas, V.; Margolin, A., L.; Sherstyuk, S., F.; Klesov, A., A.; Berezin, I., V Inactivation of soluble and immobilized penicillinamidase from *E. coli* under the activation of phenylmethanesulfonyl fluoride: Kinetic analysis and titration of the active centers. *Bio-org. Chemistry* **1977**, *3*, 412–418.
- Szymonilka, M., J.; Chapman, K., T. Magnetically Manipulable Polymeric Supports for Solid Phase Organic Synthesis. *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 1597-1600.
- Valle, F.; Balbas, P.; Merino, E.; Bolivar, E. The role of Penicillin Amidase in nature and in industries. *TIBS* **1991**, *16*, 36-40.
- Van Langen, L., M.; Oosthoek, N., H., P.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Penicillin Acylase Catalysed Synthesis of Ampicillin in Hydrophilic Organic Solvents. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 797-801.
- Van Langen, L., M.; Janssen, M., H., A.; Oosthoek, N., H., P.; Pereira, S., R., M.; Svedas, V., K.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Active site titration as a tool for the evalua-

tion of immobilisation procedures of Penicillin Acylase. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *79*, 224-228.

Vandamme, E., J. Peptide antibiotic production through immobilized biocatalyst technology. *Enzyme Microb. Technol.* **1983**, *5*, 403-416.

Webb, C.; Kang, H.-K.; Moffat, G.; Williams, R., A.; Estevez, A.-M.; Cuellar, J.; Jaraiz, E.; Galan, M.-A. The magnetically stabilized fluidized bed bioreactor: a tool for improved mass transfer in immobilized enzyme systems? *The Chemical Engineering Journal* **1996**, *61*, 241-246.

Wegman, M., A.; Janssen, M., H., A.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Towards Biocatalytic Synthesis of b-Lactam Antibiotics. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 559-576.

Yasui, M.; Shiroya, T.; Fujimoto, K.; Kawaguchi, H. Activity of enzymes immobilized on microspheres with thermosensitive hairs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1997**, *8*, 311-319.

#### 8.4. Literaturangaben zu Kapitel 4

Adriano, W., S.; Filho, E., H., C.; Silva, J., A.; Giordano, R., L., C.; Gonçalves, L., R., B. Stabilisation of Penicillin G acylase by immobilization on glutardialdehyde-activated chitosan. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2005**, *22*, 529 - 538.

Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R., W. Circular dichroism: Principles and applications. *Wiley – VCH* **2000**, *2nd ed.*

Bienvenut, W., V.; Deon, C.; Pasquarello, C.; Campbell, J., M.; Sanchez, J.-C.; Vestal, M., L.; Hochstrasser, D., F. Matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem mass spectrometry with high resolution and sensitivity for identification and characterization of proteins. *Proteomics* **2002**, *2*, 868–876.

Bruggink, A.; Roos, E., C.; de Vroom, E. Penicillin Acylase in the industrial production of beta - lactam antibiotics. *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 128-133.

Burteau, N.; Burton, S.; Crichton, R., R. Stabilisation and immobilisation of penicillin amidase. *Febs Letters* **1989**, *258*, 185-189.

Bustamente, C.; Maestre, M., F. Statistical effects in the absorption and optical activity of particulate suspensions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1988**, *85*, 8482-8486.

Busto, M., D. An experiment illustrating the effect of immobilization on enzyme properties. *Biochemical Education* **1998**, *26*, 304-308.

- Caessens, P., W., J., R.; De Jongh, H., H., J.; Norde, W.; Gruppen, H. The adsorption-induced secondary structure of L-casein and of distinct parts of its sequence in relation to foam and emulsion properties. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, *1430*, 73-83.
- Calleri, E.; Massolina, G.; Lubda, D.; Temporini, C.; Loiodice, F.; Caccialanza, G. Evaluation of a monolithic epoxy silica support for penicillin G acylase immobilization. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1031*, 93–100.
- Cao, L.; Bornscheuer, U., T. ; Schmid, R., D. Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1999**, *6*, 279–285.
- Celej, M., Soledad; D'Andrea, M., G.; Campana, P., T.; Fidelio, G., D.; Bianconi, M., Lucia Superactivity and conformational changes on  $\alpha$ -chymotrypsin upon interfacial binding to cationic micelles. *Biochem. J.* **2004**, *378*, 1059–1066.
- Chong, M., A., S.; Zhao, X., S. Design of large-pore mesoporous materials for immobilization of penicillin G acylase biocatalyst. *Catalysis Today* **2004**, *93*, 293–299.
- Dodson, G., G. Catalysis in Penicillin G Amidase – a Member of the Ntn (N Terminal Nucleophile) Hydrolase Family. *Croatica Chemica Acta* **2000**, *73*, 901-908.
- Duysens, L., N., M. The flattening of the absorption spectrum of suspensions, as compared to that of solutions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1956**, *19*, 1-12.
- Edelhoch, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* **1967**, *6*, 948-1954.
- Esquena, J.; Pons, R.; Azemar, N.; Caelles, J.; Solans, C. Preparation of monodisperse silica particles in emulsion media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **1996**, *123*, 575-586.
- Galunsky, B.; Schlothauer, R.-C.; Böckle, B.; Kasche, V. Direkt Spektrophotometric Measurement of Enzyme Activity in Heterogeneous Systems with Insoluble Substrate or Immobilised Enzyme. *Analytical Biochemistry* **1994**, *221*, 213-124.
- Ganesan, A.; Price, N., C.; Kelly, S., M.; Petry, I.; Moore, B., D.; Halling, P., J. Circular dichroism studies of subtilisin Carlsberg immobilised on micron sized silica particles. *Biochimica et Biophysica Acta* **2006**, *1764*, 1119-1125.
- Giacomelli, C., E.; Norde, W. The Adsorption–Desorption Cycle. Reversibility of the BSA–Silica System. *Journal of Colloid and Interface Science* **2001**, *233*, 234–240.
- Gill, S., C.; von Hippel, P., H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **1989**, *182*, 319 326.

- Glaeser, R., M.; Jap, B., K. Absorption Flattening in the Circular Dichroism Spectra of Small Membrane Fragments. *Biochemistry* **1985**, *24*, 6398-6401.
- Greenfield, N., J. Applications of circular dichroism in protein and peptide analysis. *trends in analytical chemistry* **1999**, *18*, 236-244.
- He, J.; Li, X.; Evans, D., G.; Duan, X.; Li, C. A new support for the immobilization of penicillin acylase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2000**, *11*, 45–53.
- Heitz, F.; Van Mau, N. Protein structural changes induced by their uptake at interfaces. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1597*, 1 – 11.
- Höök, F.; Kasermo, B. Variations in Coupled Water, Viscoelastic Properties, and Film Thickness of a Mefp-1 Protein Film during Adsorption and Cross-Linking: A Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring, Ellipsometry, and Surface Plasmon Resonance Study. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5796-5804.
- Janssen, M., H., A.; van Langen, L., M.; Pereira, S., R., M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Evaluation of the performance of immobilized Penicillin G Acylase using Active Site Titration. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *78*, 425-432.
- Kabsch, W.; Sander, C. Dictionary of Protein Secondary Structure: Pattern Recognition of Hydrogen Bonded and Geometrical Features. *Biopolymers* **1983**, *22*, 2577-2637.
- Kasche, V.; Haufler, U.; Markowsky, D.; Melnyk, S.; Zeich, A. Penicillin Amidase from *E. coli*. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1987**, *501*, 97–102.
- Kelly, S., M.; Jess, T., J.; Price, N., C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2005**, *1751*, 119-139.
- Lahm, H.-W.; Langen, H. Mass Spectrometry: A tool for the identification of proteins separated by gels. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2105-2114.
- Lindsay, C., D.; Pain, R., H. The folding and solution conformation of penicillin G acylase. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *192*, 133-141.
- Liu, Y.-C.; Wang, C.-M.; Hsiung, K.-P. Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay. *Analytical Biochemistry* **2001**, *299*, 130–135.
- Lobley, A.; Whitmore, L.; Wallace, B., A. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 211-212.
- Mao, D.; Wachter, E.; Wallace, B., A. Folding of the Mitochondrial Proton Adenosinetriphosphatase Proteolipid Channel in Phospholipid Vesicles. *Biochemistry* **1982**, *21*, 4960-4968.

- Markus, K.; Immler, D.; Sternberger, J.; Meyer, H., E. Identification of platelet proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis and analyzed by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry and detection of tyrosin phosphorylated proteins. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2622-2636.
- Marx, K., A. Quartz Crystal Microbalance: A Useful Tool for Studying Thin Polymer Films and Complex Biomolecular Systems at the Solution-Surface Interface. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 1099-1120.
- Maste, M., C., L. ; Norde, W.; Visser, A., J., W., G. Adsorption-Induced Conformational Changes in the Serine Proteinase Savinase: A Tryptophan Fluorescence and Circular Dichroism Study. *Journal of Colloid and Interface Science* **1997**, *196*, 224–230.
- Morillas, M.; McVey, C., E.; Brannigan, J., A.; Ladurner, A., G; Forney, L., J.; Virden, R. Mutations of penicillin acylase residue B71 extend substrate specificity by decreasing steric constraints for substrate binding. *Biochemical Journal* **2003**, *371*, 143-150.
- Norde, W.; Giacomelli, C., E. BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states. *Journal of Biotechnology* **2000**, *79*, 259–268.
- Norde, W.; Zoungrana, T. Surface-induced changes in the structure and activity of enzymes physically immobilized at solid/liquid interfaces. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1998**, *28*, 133–143.
- Oberg, K., A.; Ruyschaert, J.-M.; Goormaghtigh, E. The optimization of protein secondary structure determination with infrared and circular dichroism spectra. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2937–2948.
- Peng, Z., G.; Hidajat, K.; Uddin, M., S. Conformational change of adsorbed and desorbed bovine serum albumin on nano-sized magnetic particles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2004**, *33*, 15–21.
- Sharma, S.; Kaur, P.; Jain, A.; Rajeswari, M., R.; Gupta, M., N. A Smart Bioconjugate of Chymotrypsin. *Biomacromolecules* **2003**, *4*, 330-336.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 850-858.
- Sreerama, N.; Woody, R., W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra. *Methods in Enzymology, Numerical Methods part D* **2004a**, 1-27.
- Sreerama, N.; Woody, R., W. On the analysis of membrane protein circular dichroism spectra. *Protein Science* **2004b**, *13*, 100–112.

- Sreerama, N.; Woody, R., W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 252-260.
- Sreerema, N.; Venyaminov, S., Y.; Woody, R., W. Estimation of the number of  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Science* **1999**, *8*, 370-380.
- Svedas, V.; Margolin, A., L.; Sherstyuk, S., F.; Klesov, A., A.; Berezin, I., V Inactivation of soluble and immobilized penicillinamidase from *E. coli* under the activation of phenylmethanesulfonyl fluoride: Kinetic analysis and titration of the active centers. *Bio-org. Chemistry* **1977**, *3*, 412–418.
- Tischer, W.; Kasche, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? *TIBTECH* **1999**, *17*, 326-335.
- Van Langen, L., M.; Janssen, M., H., A.; Oosthoek, N., H., P.; Pereira, S., R., M.; Svedas, V., K.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R., A. Active site titration as a tool for the evaluation of immobilisation procedures of Penicillin Acylase. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, *79*, 224-228.
- Van Mierlo, C., P., M.; Steensma, E. Protein folding and stability investigated by fluorescence, circular dichroism (CD), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy: the flavodoxin story. *Journal of Biotechnology* **2000**, *79*, 281–298.
- Van Stokkum, I., H.; Spoelder, H., J., W.; Bloemendal, M.; Van Grondelle, R.; Groen, F., C., A. Estimation of protein secondary structure and error analysis from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.* **1990**, *191*, 110-118.
- Vermeer, A., W., P., Norde, W. CD Spectroscopy of Proteins Adsorbed at Flat Hydrophilic Quartz and Hydrophobic Teflon Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* **2000**, *225*, 394–397.
- Wallace, B. A.; Lees, J., G.; Orry, A., J., W.; Lobley, A.; Janes, R., W. Analyses of circular dichroism spectra of membrane proteins. *Protein Science* **2003**, *12*, 875–884.2007/04/17.
- Wallace, B. A.; Teeters, C., L. Differential Absorption Flattening Optical Effects Are Significant in the Circular Dichroism Spectra of Large Membrane Fragments. *Biochemistry* **1987**, *26*, 65-70.
- Wallace, B., A.; Mao, D. Circular dichroism analyses of membrane proteins: An examination of light scattering and absorption flattening in large membrane vesicles and membrane sheets. *Anal. Biochem.* **1984**, *142*, 317-328.

- Welle, A. Competitive plasma protein adsorption on modified polymer surfaces monitored by quartz crystal microbalance technique. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn* **2004**, *15*, 357-370.
- Whitmore, L.; Wallace, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* **2004**, *32*, W668–W673.
- Woody, R., W. Circular dichroism. *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 34-71.

## 9. Anhang

### 9.1. Abbildungsverzeichnis

**Abb.1:** Schematische Darstellung der Arbeitsbereiche. (Seite 16)

**Abb.2:** Übersicht über die verschiedenen Eigenschaften eines Immobilisats, die sich aus der Kombination von Enzym und Träger ergeben (Tischer und Kasche, 1999). (Seite 22)

**Abb.3:** Übersicht zu Kapitel 2. (Seite 28)

**Abb.4:** Bruttoreaktionsgleichung zur Synthese von Magnetitkernen (oben). Coating der Magnetitkerne mit Ölsäure (unten). (Seite 31)

**Abb.5:** Copolymerisation des Monomers Methylacrylat zu Polymethylacrylat (oben) und Vinylacetat zu Polyvinylacetat (unten), jeweils mit Divinylbenzen vernetzt. (Seite 32)

**Abb.6:** Gleichung für die Mehrschichtadsorption unreaktiver Gase an polaren Oberflächen.  $p$ : Druck,  $p^*$ : Dampfdruck,  $V_{\text{Mono}}$ : Adsorbiertes Gasvolumen der Monolage. (Seite 37)

**Abb.7:** Ausgewählte ESEM-Bilder obiger Stabilitätsversuche in diversen Lösungsmitteln: 1) PmaP über 24 h in einer Ethanol-Wasser-Mischung (30v% Ethanol). 2) PmaP über 24 h in Tetrahydrofuran. 3) PmaP über 20 min in einer 5 v% Trifluoressigsäurelösung in Wasser / 4) 5v% Trifluoressigsäure in Dimethylformamid. (Seite 44)

**Abb.8:** Veränderung der Partikelgröße durch Agglomeration während der Lagerung. A bedeutet Acetatpuffer (pH 5), B bedeutet Bicarbonatpuffer (pH 10), P bedeutet Phosphatpuffer (pH 7.5). (Seite 45)

**Abb.9:** „Vierhalsseparationszylinder“ zur nachträglichen Optimierung der Partikelgrößenverteilung. (Seite 46)

**Abb.10:** Magnetischen Sättigung der Polymethylacrylat-Partikel. (Seite 48)

**Abb.11:** Magnetische Sättigungen verschiedener Magnetit-Polyvinylacetat-Partikel Proben und die daraus resultierende Farbe (in Reihenfolge der dargestellten magnetischen Sättigungen) der Polymerpartikel. (Seite 49)

**Abb.12:** Größenverteilung der PmaP. (Seite 50)

**Abb.13:** Größenverteilung der PvacP vor der Aufarbeitung. (Seite 50)

**Abb.14:** Größenverteilung der PvacP nach der Aufarbeitung. (Seite 51)

**Abb.15:** ESEM-Bild der PmaP nach der Separierung. (Seite 52)

**Abb.16:** ESEM-Bild der PvacP nach der Separierung. (Seite 52)

**Abb.17:** BET-Isotherme der PmaP. (Seite 53)

**Abb.18:** Zetapotentialkurve der PmaP in Abhängigkeit des pH-Wertes. (Seite 54)

**Abb.19:** Zetapotentialkurve der PvacP in Abhängigkeit des pH-Wertes. (Seite 54)

**Abb.20:** Zetapotentialkurve der Magnetitkerne in Abhängigkeit des pH-Wertes. (Seite 55)

**Abb.21:** UV-Spektren der verschiedenen Waschungen der Partikelsuspension nach der Polymerisation. AE bedeutet Absorptionseinheiten. (Seite 56)

**Abb.22:** Brönstedt-Bjerrum-Gleichung. (Seite 60)

**Abb.23:** Schematische Darstellung der Penicillin G Acylase von *E.coli*. (Seite 63)

**Abb.24:** Übersicht über die Herstellung semisynthetischer Antibiotika (Bruggink et al, 1998). (Seite 64)

- Abb.25:** Übersicht zum Kapitel 3. (Seite 69)
- Abb.26:** Übersicht über die Spacerreaktionen: 1) Aktivierung, 2) Erste Spacerreaktion, 3) 2. Spacerreaktion, 4) Immobilisierung. Oben: Hexamethyldiamin-Glutardialdehyd-Spacer, unten: Aminosäurespacer. (Seite 72)
- Abb.27:** Aktivierte Polymerpartikel mit einer Spacereinheit des HG-Spacers (Markierung). (Seite 73)
- Abb.28:** Aktivierung der Polymethylacrylat-Partikel durch Hexamethyldiamin. (Seite 74)
- Abb.29:** Erste Funktionalisierungsreaktion des HG-Spacers. (Seite 75)
- Abb.30:** Zweite Funktionalisierungsreaktion des HG-Spacers. (Seite 75)
- Abb.31:** Aktivierte Polymerpartikel mit einer Spacereinheit des AS-Spacers (Markierung). (Seite 76)
- Abb.32:** Aktivierung der Polymethylacrylat-Partikel durch Hexamethyldiamin. (Seite 76)
- Abb.33:** Kupplungsreaktion einer Aminosäure an eine Aminogruppe. (Seite 77)
- Abb.34:** Fmoc-Entschützung der Aminogruppe. (Seite 78)
- Abb.35:** Alternative Entschützungsmethode für Boc und <sup>t</sup>Bu –Schutzgruppen (Adams et al, 2002, Olah und Narang, 1982). (Seite 78)
- Abb.36:** Aktivierung der Partikel mit Glutardialdehyd. (Seite 79)
- Abb.37:** Aktivierung der Partikel mit Epichlorhydrin. (Seite 79)
- Abb.38:** Am Partikel gebundener Auftragsspacer. (Seite 80)
- Abb.39:** Aktivierung der Partikel mit Hexamethyldiamin. (Seite 80)
- Abb.40:** Erste Funktionalisierung des Auftragsspacer. (Seite 80)
- Abb.41:** Zweite Funktionalisierung des Auftragsspacer. (Seite 81)
- Abb.42:** Reduktion der Aminogruppen des Auftragsspacer. (Seite 81)
- Abb.43:** Dritte Funktionalisierung des Auftragsspacer. (Seite 81)
- Abb.44:** Vierte Funktionalisierung des Auftragsspacer. (Seite 81)
- Abb.45:** Immobilisierung des Enzyms mittels Glutardialdehyd. (Seite 82)
- Abb.46:** Immobilisierung des Enzyms mittels Epichlorhydrin. (Seite 82)
- Abb.47:** Immobilisierung des Enzyms mittels 1, 1'-Carbonyldiimidazol. (Seite 83)
- Abb.48:** Reaktion der Epoxygruppen mit 6 – Amino-hexansäure. (Seite 85)
- Abb.49:** Reaktion der Aminogruppen mit 2, 4, 6-Trinitrobenzonsulfonsäure (TNBS). (Seite 85)
- Abb.50:** Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB) durch Penicillin G Acylase zu Phenyllessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoessäure. (Seite 86)
- Abb.51:** Menge an immobilisiertem Enzym.  $m_{IE}$ : Menge an immobilisierter Penicillin G Acylase auf trockenem Träger ([mg/g]),  $c_a$  ( $c_e$ ): Anfangskonzentration (Endkonzentration) der Penicillin G Acylase im Überstand ([mg/ml]),  $V_a$  ( $V_s$ ): Anfangsvolumen (Endvolumen) der Enzymlösung ([ml]),  $c_{Wi}$ : Konzentration der Penicillin G Acylase in den Waschungen ([mg/ml]),  $V_{Wi}$ : Volumen der Waschungen ([ml]),  $i$ : Anzahl der Waschungen ( $i = 1-n$ ) [-],  $m_P$ : Trockengewicht der Träger [g]. (Seite 86)
- Abb.52:** Strukturformeln der 20 proteinogenen Aminosäuren und  $\alpha$ -Aminoisobutylsäure (Quelle Römpp-CD-Chemie-Lexikon, 1995). Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäuren sind blau gekennzeichnet. (Seite 93)
- Abb.53:** Zetapotential der PmaP in Abhängigkeit des pH-Wertes mit 2.9 nm AS-Spacer: a) entschütztes Lysin, b) entschützte Asparaginsäure. (Seite 95)
- Abb.54:** Polykondensation von zwei Glutardialdehydmolekülen. (Seite 98)
- Abb.55:** Berechnung der funktionellen Gruppen auf einem Polymethylacrylat-Partikel. (Seite 98)

- Abb.56:** Schematisches Beispiel einer Verstrickung des Spacers. (**Seite 99**)
- Abb.57:** Schematisches Beispiel des erhöhten Raumvolumens der Enzymmoleküle durch längere Spacer. (**Seite 99**)
- Abb.58:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PvacP immobilisiert. (**Seite 101**)
- Abb.59:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PmaP immobilisiert. (**Seite 102**)
- Abb.60:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des HG-Spacers auf PmaP und auf PvacP immobilisiert. (**Seite 103**)
- Abb.61:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Glycin-Einheiten) auf PmaP immobilisiert. (**Seite 104**)
- Abb.62:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Glycin-Einheiten) auf PmaP immobilisiert. (**Seite 105**)
- Abb.63:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers (Spacer aus jeweils denselben Aminosäurebausteinen) auf PmaP immobilisiert. (**Seite 106**)
- Abb.64:** Aktivität (Direktmessung) der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers auf PmaP immobilisiert. (**Seite 107**)
- Abb.65:** Spezifische Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Spacerlänge. Das Enzym wurde mittels des AS-Spacers auf PmaP immobilisiert. (**Seite 107**)
- Abb.66:** ESEM-Bild der PmaP nach Entschützen der Lysin-Seitenkette mittels TMSI (1) im Vergleich zu mit Wasser gewaschenem PmaP (2). (**Seite 109**)
- Abb.67:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Lagerstabilität). Die Punkte sind zur besseren Übersicht durch Linien verbunden. (**Seite 112**)
- Abb.68:** Aktivität der freien Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Lagerstabilität). (**Seite 113**)
- Abb.69:** Vergleich der Lagerstabilitäten der immobilisierten und freien Penicillin G Acylase. Diese ist auf 1.0 bei gleicher Stabilität normiert. Der Graph für die Aufbewahrung in Bicarbonatpuffer (B-0.2M) ist als einziger der rechten y-Achse zugeordnet. (**Seite 114**)
- Abb.70:** Aktivität der immobilisierten Penicillin G Acylase als Funktion der Zeit (Betriebsstabilität). (**Seite 115**)
- Abb.71:** Übersicht zum Kapitel 4: Circular dichroismus. (**Seite 124**)
- Abb.72:** Übersicht zum Kapitel 4: Quarzkristallmikrowaagen-Technik. (**Seite 125**)
- Abb.73:** Funktionalisierung der Silica-Nanopartikel mit Glutardialdehyd. (**Seite 127**)
- Abb.74:** Immobilisierung der Penicillin G Acylase mittels Glutardialdehyd an Silica-Nanopartikel. (**Seite 128**)
- Abb.75:** Hydrolyse von 6-Nitro-3-phenylacetamidobenzoessäure (NIPAB) durch Penicillin G Acylase zu Phenyllessigsäure und 5-Amino-2-nitrobenzoessäure. (**Seite 130**)
- Abb.76:** Menge an immobilisiertem Enzym.  $m_{IE}$ : Menge an immobilisierter Penicillin G Acylase auf trockenem Träger ([mg/g]),  $c_a$  ( $c_e$ ): Anfangskonzentration (Endkonzentration) der Penicillin G Acylase im Überstand ([mg/ml]),  $V_a$  ( $V_s$ ): Anfangsvolumen (Endvolumen) der Enzymlösung ([ml]),  $c_{wi}$ : Konzentration der Penicillin G Acylase in den Waschungen ([mg/ml]),  $V_{wi}$ : Volumen der Waschungen ([ml]),  $i$ : Anzahl der Waschungen ( $i = 1-n$ ) [-],  $m_P$ : Trockengewicht der Träger [g]. (**Seite 130**)

- Abb.77:** Zetapotential der Silica-Nanopartikel Ludox<sup>®</sup>-HS40 in Abhängigkeit des pH-Wertes. (**Seite 134**)
- Abb.78:** IR-Spektren von reinen Silica-Nanopartikeln (rot) und mit Glutardialdehyd funktionalisierten Silica-Nanopartikeln (blau). (**Seite 135**)
- Abb.79:** MS-Spektrum der durch enzymatischen Abbau gebildeten Peptidfragmente der Penicillin G Acylase. (**Seite 137**)
- Abb.80:** Beladung der Silica-Nanopartikel als Funktion der eingesetzten Enzymmengen. (**Seite 138**)
- Abb.81:**  $\alpha$ -Helix: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum. (**Seite 139**)
- Abb.82:**  $\beta$ -Faltblatt: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum. (**Seite 140**)
- Abb.83:**  $\beta$ -Schleife: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum. (**Seite 140**)
- Abb.84:** Statistisches Knäuel: Sekundärstruktur und Darstellung der Bande im CD-Spektrum. (**Seite 141**)
- Abb.85:** Referenzspektrum für die CD-Analyse: Myoglobin. (**Seite 141**)
- Abb.86:** Referenzspektrum für die CD-Analyse: Bence-Jones-Protein. (**Seite 142**)
- Abb.87:** CD-Spektrum der reinen Polymermikro-Partikel. (**Seite 143**)
- Abb.88:** CD-Spektrum einer Mischung der reinen Polymermikro-Partikel und Penicillin G Acylase. (**Seite 144**)
- Abb.89:** CD-Spektrum der Silica-Nanopartikel mit hoher Konzentration an Penicillin G Acylase. (**Seite 145**)
- Abb.90:** CD-Spektren der freien und auf Silica-Nanopartikeln kovalent immobilisierten Penicillin G Acylase im Vergleich. (**Seite 146**)
- Abb.91:** Vergleich der experimentellen CD-Messung der freien Penicillin G Acylase mit den berechneten Daten aus den Algorithmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3. (**Seite 148**)
- Abb.92:** Vergleich der experimentellen CD-Messung der kovalent immobilisierten Penicillin G Acylase mit den berechneten Daten aus den Algorithmen CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3. (**Seite 149**)
- Abb.93:** Darstellung der prozentualen Sekundärstrukturanteile (CONTINLL) als Funktion der Beladung. (**Seite 150**)
- Abb.94:** QCM-Messung von Penicillin Amidase auf einem QCM-Chip mit Polymethylacrylat-Beschichtung und einer HG-Spacereinheit. Die Frequenzerniedrigung (blaue Linien) ist auf Achse F3/3 und die Dämpfung (orange Linien) ist auf Achse D3 aufgeführt. (**Seite 151**)
- Abb.95:** ESEM-Bild eines einzelnen Polymethylacrylatpartikel. (**Seite 183**)
- Abb.96:** ESEM-Bild eines einzelnen Polyvinylacetatpartikel. (**Seite 184**)
- Abb.97:** ESEM-Bild eines Quarzmikroaagenchips: Der obere Teil stellt den äußeren Rand des Chips dar, der untere Teil den inneren Teil des Chips, der beschichtet wird (vgl. Abb.85). (**Seite 184**)
- Abb.98:** ESEM-Bild eines Quarzmikroaagenchips: Der obere Teil stellt den nicht beschichteten Rand des inneren Bereichs (810  $\mu\text{m}$ ) dar, der untere, dunklere Bereich ist mit Polymethylacrylat beschichtet. (**Seite 185**)
- Abb.99:** IR-Vergleichsspektrum von reinem  $\text{SiO}_2$ . (**Seite 185**)

## 9.2. Tabellenverzeichnis

**Tab.1:** Auflistung ausgewählter Versuche zur Modifizierung der Magnetitgelsynthese. (**Seite 39**)

**Tab.2:** Auflistung ausgewählter Versuche zur Modifizierung der Polymerpartikel-Synthese. (**Seite 42**)

**Tab.3:** Auflistung der Eigenschaften der Polymethylacrylat-Partikel (PmaP) und der Polyvinylacetat-Partikel (PvacP). (**Seite 58**)

**Tab.4:** Auflistung ausgewählter Reaktionen zur Optimierung der Hexamethyldiamin-Aktivierung. (**Seite 80**)

**Tab.5:** Auflistung ausgewählter Reaktionen zur Optimierung der ASS-Synthese. (**Seite 90**)

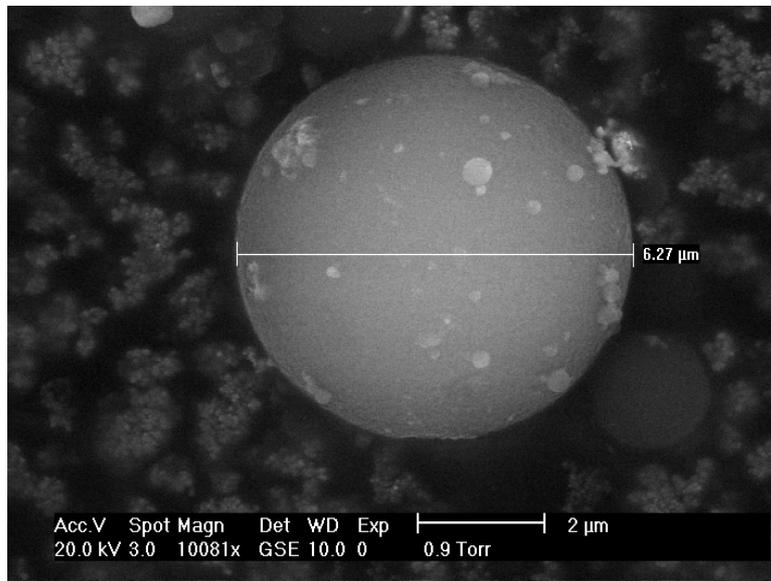
**Tab.6:** Auflistung der wichtigsten Eigenschaften der am häufigsten verwendeten Aminosäuren (Jakubke und Karcher, 1998). (**Seite 94**)

**Tab.7:** Massenbilanz (MB), Direktmessung (DM) und spezifische Aktivität (sA) von vier Spacerversuchen (mit einer Länge von je 2.9 nm) als Variation des Lysin-Spacers. (**Seite 108**)

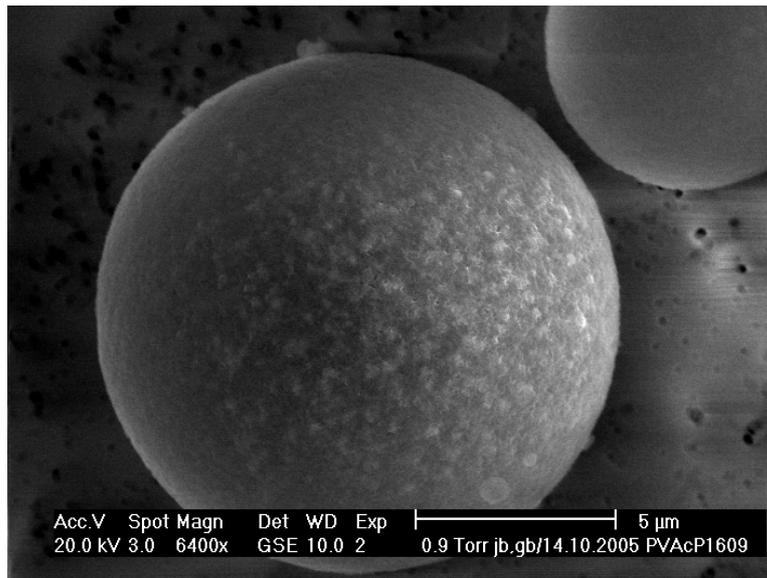
**Tab.8:** CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3 –Auswertung der CD-Spektren der freien Penicillin G Acylase zusammen mit den Röntgenstrukturdaten aus der Proteindatenbank (PDB). (**Seite 147**)

**Tab.9:** CONTINLL, CDSSTR und SELCON 3 –Auswertung der CD-Spektren der immobilisierten Penicillin G Acylase. (**Seite 148**)

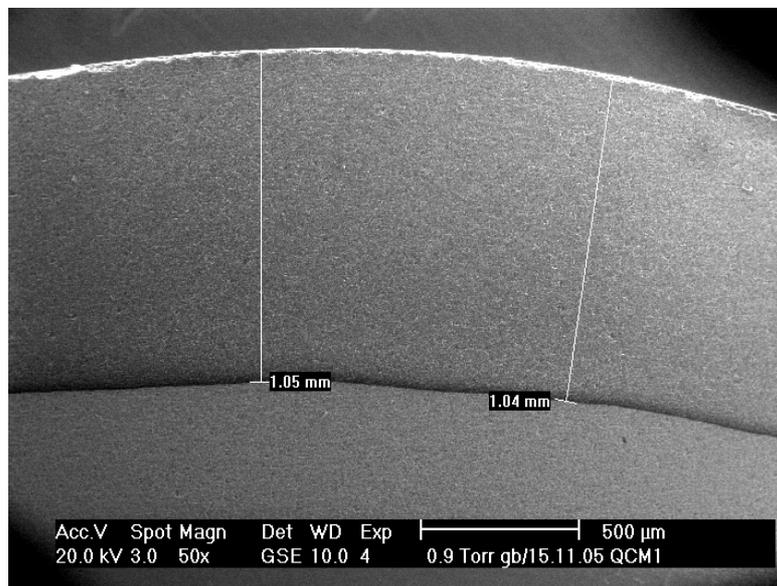
### 9.3. Datenanhang



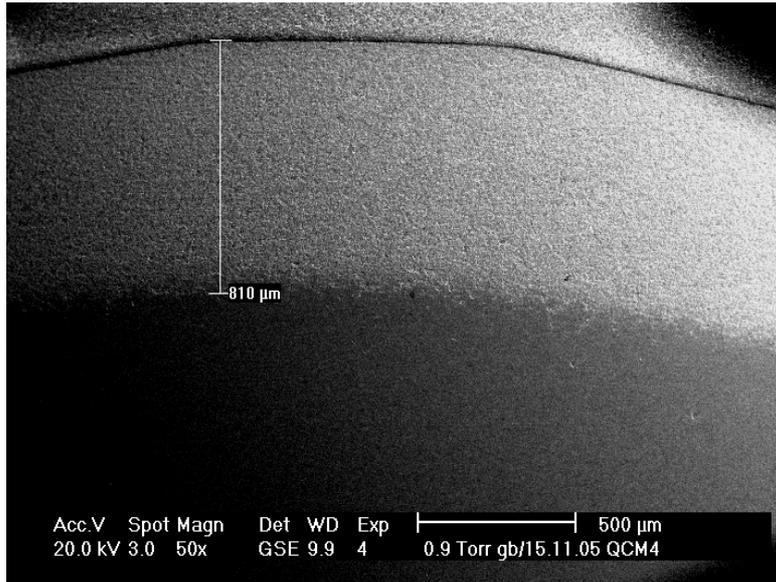
**Abb.95:** ESEM-Bild eines einzelnen Polymethylacrylatpartikel.



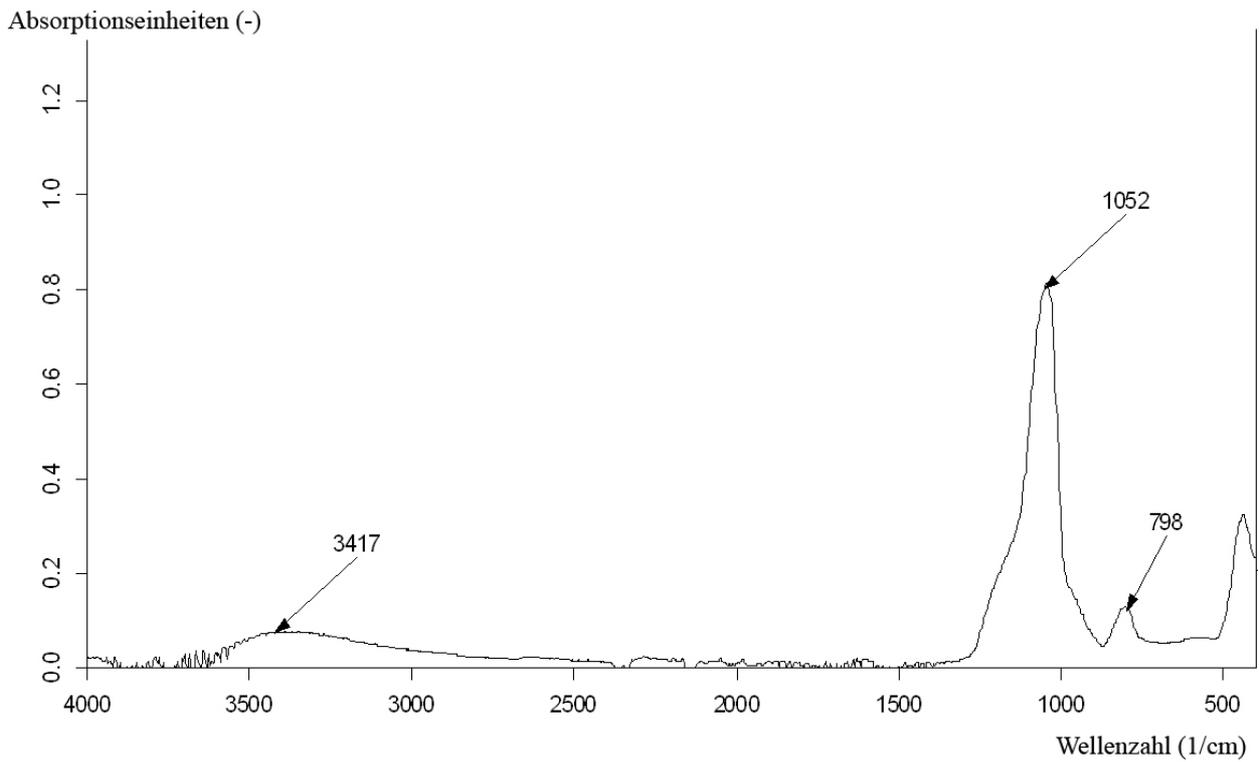
**Abb.96:** ESEM-Bild eines einzelnen Polyvinylacetatpartikel.



**Abb.97:** ESEM-Bild eines Quarzmikrowaagenchips: Der obere Teil stellt den äußeren Rand des Chips dar, der untere Teil den inneren Teil des Chips, der beschichtet wird (vgl. Abb.85).



**Abb.98:** ESEM-Bild eines Quarzmikrowaagenchips: Der obere Teil stellt den nicht beschichteten Rand des inneren Bereichs (810  $\mu\text{m}$ ) dar, der untere, dunklere Bereich ist mit Polymethylacrylat beschichtet.



**Abb.99:** IR-Vergleichsspektrum von reinem SiO<sub>2</sub>.

## Lebenslauf

von Bertolt Kranz, geboren am 31.10.1976 in Regensburg

### Werdegang:

#### Promotion:

Seit 02/2004

Arbeitskreis: Prof. Dr. Rainer Köster  
Naturwissenschaftliche Fakultät IV: Chemie und Pharmazie  
Universität Regensburg

Bereich Wasser- und Geotechnologie

Institut für Technische Chemie

Forschungszentrum Karlsruhe

#### Thema:

Spacermodifizierung und physikalisch chemische Untersuchungen an immobilisierten Enzymsystemen für biotechnologische Anwendungen

#### Akademischer Abschluss:

Dr. rer. nat.

#### Diplomarbeit:

05/2003 bis 01/2004

Arbeitskreis von Prof. Dr. Rainer Köster

Bereich Wasser- und Geotechnologie

Institut für Technische Chemie

Forschungszentrum Karlsruhe

#### Thema:

Optimierung der Immobilisierung von Penicillin Amidase an magnetischen Trägern durch Verwendung von Spacern

#### Akademischer Abschluss:

Diplom-Chemiker Univ.

#### Studium:

WS 98/99 bis WS 03/04

Studiengang: Chemie (Diplom)

Naturwissenschaftliche Fakultät IV: Chemie und Pharmazie

Universität Regensburg

## Lebenslauf

11/2000 bis 08/2001 Studentische Hilfskraft (Arbeitskreis: Prof. Dr. Burkhard König)  
Institut für Organische Chemie  
Universität Regensburg  
Aufgabengebiet:  
HPLC-Analyse mit anschließender Auswertung der HPLC-Spektren

09/2001 bis 04/2002 Auslandsaufenthalt  
King's College der University of Aberdeen, Schottland, UK

### **Wehrdienst:**

07/1997 bis 04/1998 3./ Gebirgspionierbatallion 8, Brannenburg

### **Gymnasium:**

09/1989 bis 07/1997 Werner-von-Siemens-Gymnasium-Regensburg  
Naturwissenschaftlicher Zweig  
Leistungskurse Chemie / Mathematik  
Abschluss:  
Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

### **Grundschule:**

09/1984 bis 07/1988 Grundschule Kareth / Lappersdorf

### **Betreuende Tätigkeiten:**

03/2005 bis 01/2006 Diplomarbeit von Jens Bolle

11/2006 bis 03/2007 Diplomarbeit von Andreas Meichelböck

09/2006 bis 02/2007 Praktikum von Andreas Meichelböck

06/2005 bis 10/2005 Teil der Ausbildung von Ivonne Fuchs (Chemielaborantin)

01/2006 bis 04/2006 Teil der Ausbildung von Stefanie Wagner (Chemielaborantin)

09/2004 bis 02/2006 Betriebsunterricht für Auszubildende zum Chemielaboranten

**Fortbildungen:**

- WS 01/02                      Environmental Chemistry-Project Planning and Management  
Exercise  
King´s College-University of Aberdeen, Schottland, UK
- 11/2005                      Brandschutzhelfer-Lehrgang  
Fortbildungszentrum für Technik und Umwelt  
Forschungszentrum Karlsruhe

**Besondere Kenntnisse:**

**Sprachen:**

- Deutsch      Muttersprache  
Englisch      Umgangssprachlich sicher in Wort und Schrift

**Drittmittleinwerbung:**

Erfahrung im Erstellen von DFG-Anträgen

**EDV-Kenntnisse:**

Sehr gute Kenntnis in ISIS Draw 2.5, End Note Version 6.0  
Gute Kenntnisse in allen gängigen Microsoft-Produkten  
Gute Kenntnisse Opus 5.5, Nanoscope U5.30r1,  
Corel Draw Graphics Suite 12, Adope Photoshop CS2

**Führerschein:**

Klasse III

**Weitere Tätigkeiten:**

**Gesellschaft deutscher Chemiker:**

Seit 01/1999 Mitglied der Fachgruppen Liebig-Vereinigung,  
Wöhler-Vereinigung, FG Biochemie, FG Chemie Information  
Computer