

Zentrum für Angewandte Chemie

Institut für Technische Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

**Enzymimmobilisierung an oberflächenmodifizierten
superparamagnetischen Silica-Partikeln**

Von der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover,

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Chem. Heiko Rackel
geboren am 05.01.1972 in Ruit (a.d. Fildern)

Hannover, 2006

Referent: Prof. Dr. Thomas Scheper

Korreferent: Prof. Dr. Bernd Hitzmann

Tag der Promotion: 17. November 2006

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel, sowie eventuell zu Hilfsleistungen herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere ferner, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, September 2006

Heiko Rackel

Abstract (D)

Rackel, Heiko

Die Anzahl enzymkatalysierter Produktionsprozesse beispielsweise in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie hat in den vergangenen Jahren stetig zugenommen. Da die Enzymgewinnung jedoch sehr kostenintensiv ist, wird nach Möglichkeiten gesucht, die eingesetzten Enzyme wieder zu verwenden. Durch die kovalente Immobilisierung an superparamagnetischen Silica-Partikeln können Enzyme in eine unlösliche Form überführt und nach Reaktionsende leicht magnetisch von der Reaktionslösung abgetrennt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die kovalente Enzymimmobilisierung an superparamagnetischen Silica-Partikeln mit einer Größe von 1-10 μm untersucht. Es werden sowohl die vom Hersteller bereits oberflächenfunktionalisierten SiMAG-Partikel als auch unfunktionalisierte MagPrep[®]-Partikel verwendet.

Die Eignung der auf den SiMAG-Partikeln aufgebrachtten Chlormethyl-, Thiol- und Polyglutaraldehydgruppen für die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin wird untersucht und die Immobilisierungsreaktionsbedingungen optimiert.

Da die funktionellen Gruppen für die kovalente Enzymimmobilisierung jedoch direkt auf der Oberfläche der SiMAG-Partikel lokalisiert sind, treten bei der kovalenten Immobilisierung erhebliche Aktivitätsverluste auf. Durch die Modifizierung der Partikeloberfläche mit unterschiedlichen Spacern wird die spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins gesteigert und so die Immobilisierungseffektivität deutlich verbessert.

Im zweiten Teil der Arbeit werden verschiedenen Silanisierungsverfahren zur Oberflächenaktivierung der MagPrep[®]-Partikel präsentiert. Durch die Verwendung von Silangemischen werden unterschiedliche Belegungsdichten der funktionellen Bindungsanker auf der Partikeloberfläche realisiert. Die Reduzierung der Belegungsdichte führt zu einer deutlichen Steigerung der resultierenden spezifischen Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins. Die aktivierte Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel wird analog zu den Versuchen an SiMAG-Partikeln mit unterschiedlichen Spacern modifiziert, wodurch eine weitere Verbesserung des Immobilisierungsergebnisses erreicht wird.

Abschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse auf ein zweites Modellenzym übertragen. Die Immobilisierung von Pepsin an MagPrep[®]-Partikeln wird untersucht und die erhaltenen Immobilisate werden zur Biotransformation von Lactoferrin zu Lactoferricin eingesetzt.

Schlagworte:

superparamagnetische Silica-Partikel, Oberflächenmodifizierung, Enzymimmobilisierung

Abstract (E)

Rackel, Heiko

The number of processes catalyzed by enzymes in food, pharmaceutical and chemical industries is increasing steadily. High costs for enzyme extraction necessitates its reapplication. To meet this necessity, immobilization can provide several advantages such as easy separation, easy recovery of the enzyme, and repeated or continuous use of the biocatalyst.

Enzymes can be immobilized to a variety of different carriers by covalent binding. Nanometer sized superparamagnetic particles, which can be efficiently captured in a magnetic filter device during high-gradient magnetophoresis, are of particular interest as matrices for covalent enzyme immobilization.

Within the scope of this thesis miscellaneous procedures of covalent α -chymotrypsin immobilization on different matrices are presented. Therefore the uniform magnetic Silica-beads SiMAG (Chemicell) and MagPrep[®] (Meck) were used as carriers.

In the first part of the thesis, the suitability of SiMAG beads as carrier for the enzyme immobilization is examined. Three types of SiMAG-particles, bearing different functional groups, are investigated. The immobilisation parameters were optimized in order to obtain high enzyme loadings and high specific activity of the immobilized enzyme. Due to conformational deformation of the immobilized enzyme, diminished residual catalytic activity of the immobilized α -chymotrypsin was observed. To enhance the efficiency of immobilization and to achieve a higher residual enzyme-activity, the surface of the SiMAG beads was modified with spacers before the immobilization occurred.

The second part of the thesis is concerned with unfunctionalized MagPep[®] particles as solid support. Their surface was activated by the use of miscellaneous compositions of a mixture of Glycidyoxypropyltrimethoxysilane/n-Propyltriethoxysilane. Various silanization procedures were presented for the surface activation. It was shown that decreasing density of binding sites on the particle's surface leads to an obvious increase in the enzyme's residual activity. Analogous to the experiments with the SiMAG beads, the activated surface of the MagPrep[®]-particles was modified with various spacers, to achieve further advancement.

Finally the experience gained has been applied to a second model enzyme system. The immobilization of Pepsin is researched and the immobilisates obtained have been used for the biotransformation of Lactoferricin to Lactoferrin.

Keywords:

superparamagnetic silica-particles, enzyme immobilization, surface modification

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von März 2003 bis August 2006 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper durchgeführt. Für die interessante Themenstellung, für optimale Arbeitsmöglichkeiten, zahlreiche Hilfestellungen und uneingeschränkte Unterstützung möchte ich ihm an dieser Stelle danken.

Prof. Dr. Bernd Hitzmann danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft sowie die vielen Diskussionen und kreativen Ideen danke ich Dr. Hellmuth Wurm und Dr. Johann Bauer.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Dr. Sascha Beutel, der mich nicht nur in fachlichen Fragen stets kompetent unterstützt hat, sondern mit mir weit über den Uni-Alltag hinaus immer freundschaftlich verbunden war.

Bei Dr. Johann Schwarz und Rafael Steinhof möchte ich mich für die vielen anregenden Diskussionen, ihre Hilfsbereitschaft und die kurzweiligen Montagsgeschichten bedanken.

Auch Christoph Rehbock möchte ich für seine Untersuchungen im Rahmen seiner Diplomarbeiten, die zum Gelingen dieses Projektes beigetragen haben, danken.

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Angestellten des Instituts für Technische Chemie danke ich für die angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft.

Meinen Eltern, meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Liebe und die jahrelange Unterstützung, ohne die mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

„Die Naturwissenschaft braucht der Mensch zum Erkennen, die Religion zum Handeln, weil wir mit unseren Willensentscheidungen nicht warten können, bis die Erkenntnisse vollständig, und bis wir allwissend geworden sind“

Max Planck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Enzyme.....	5
2.1 α-Chymotrypsin (EC 3.4.21.1).....	5
2.1.1 Katalyse-Mechanismus von α -Chymotrypsin.....	6
2.1.2 pH-Abhängigkeit von α -Chymotrypsin.....	7
2.1.3 Temperaturverhalten von α -Chymotrypsin.....	8
2.1.4 Inhibitoren von α -Chymotrypsin	9
2.2 Enzymimmobilisierung.....	9
2.2.1 Immobilisierung von Enzymen in löslicher Form.....	12
2.2.2 Enzymimmobilisierung in unlöslicher Form.....	13
3. Magnetpartikel.....	15
3.1 Magnetismus.....	15
3.1.1 Superparamagnetismus.....	17
3.2 Synthese superparamagnetischer Partikel	18
3.3 Anwendungen superparamagnetischer Partikel	19
3.3.1 Medizinische Anwendungen superparamagnetischer Partikel.....	20
3.3.2 Einsatz von Magnetpartikeln zur magnetischen Zellseparation.....	23
3.3.3 Isolierung und Detektion von Biomolekülen mit Magnetpartikeln	25
3.3.4 „High Gradient Magnetic Fishing“ zur in-situ Produktabtrennung.....	30
3.4 SiMAG-Partikel.....	31
3.5 MagPrep[®]-Partikel	32
4. Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikeln.....	33
4.1 Modellrechnung zur maximal möglichen Beladung von SiMAG-Partikeln mit α-Chymotrypsin.....	33
4.2 Analyseverfahren.....	35
4.2.1 Bradford-Test.....	35
4.2.2 Fluoreszenzspektroskopie.....	37
4.2.3 BTEE-Aktivitätstest.....	38
4.3 Optimierung der α-Chymotrypsinimmobilisierung an SiMAG-Partikeln mit unterschiedlichen funktionellen Ankergruppen	43

4.3.1 Reaktionsmechanismen der kovalenten Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikeln.....	44
4.3.2 Variation der mechanischen Durchmischung während der Enzymimmobilisierung.....	46
4.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion.....	47
4.3.4 Variation der Immobilisierungsdauer.....	49
4.3.5 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymimmobilisierung.....	51
4.3.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymimmobilisierung.....	53
4.3.7 Zusammenfassung und Diskussion der ermittelten optimierten Immobilisierungsparameter.....	56
4.4 Charakterisierung von immobilisiertem α-Chymotrypsin	59
4.4.1 Kinetische Parameter des immobilisierten α -Chymotrypsins.....	59
4.4.2 Langzeitstabilität des immobilisierten α -Chymotrypsins.....	61
4.4.2.1 Temperaturabhängigkeit der spezifischen Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins.....	63
5. Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel.....	66
5.1 Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel	66
5.2 Aktivierung der modifizierten SiMAG-Partikel mit Glutardialdehyd.....	68
6. Enzymimmobilisierung an oberflächenmodifizierten SiMAG-Partikeln	69
6.1 Einfluss der Spacer auf das Immobilisierungsergebnis.....	69
6.2 Charakterisierung von immobilisiertem α -Chymotrypsin.....	72
6.2.1 Langzeitstabilität der spacermodifizierten Immobilisate	72
6.2.2 Temperaturverhalten der spacermodifizierten Immobilisate	74
6.2.3 pH-Stabilität der spacermodifizierten Immobilisate	77
7. MagPrep[®]-Partikel	80
7.1 Modellrechnung zur maximal möglichen Beladung von MagPrep [®] -Partikeln mit α -Chymotrypsin.....	80
7.2 Titrations-Assay zur quantitativen Detektion der Oxirangruppen.....	81
7.3 Oberflächenfunktionalisierung der MagPrep [®] -Partikel mit Glycidylpropyltrimethoxysilan.....	83

7.3.1 Acidimetrische Bestimmung der Epoxidgruppen auf den silanisierten Magnetpartikeln	83
7.3.2 Berechnung der pro α -Chymotrypsinmolekül auf den MagPrep [®] -Partikeln zur Verfügung stehenden Anzahl an Epoxidgruppen	84
7.3.3 Immobilisierung von α -Chymotrypsin an aktivierten MagPrep [®] -Partikeln.....	85
7.4 Oberflächenfunktionalisierung der MagPrep[®]-Partikel mit einem Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan-Gemisch.....	87
7.5 Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel mit N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan.....	90
7.6 Oberflächenfunktionalisierung mit 1,5 μmol Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/g MagPrep[®]-Partikel	93
7.7 Oberflächenmodifizierung der funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel mit 1,6-Diaminohexan.....	95
8. Vergleich der Enzymimmobilisierung an SiMAG- und MagPrep[®]-Partikeln.....	99
8.1 Vergleich der Immobilisierungsergebnisse an unmodifizierten Partikeln	99
8.2 Vergleich der Immobilisierungsergebnisse an oberflächenmodifizierten SiMAG- und MagPrep [®] -Partikeln.....	101
9. Pepsinimmobilisierung an MagPrep[®]-Partikeln.....	106
10. Zusammenfassung und Ausblick.....	110
11. Anhang.....	116
11.1 Standard-Vorschriften.....	116
11.1.1 Standard-Immobilisierungsvorschrift (α -Chymotrypsin).....	116
11.1.2 Bradford-Proteinassay.....	116
11.1.3 BTEE-Aktivitätsassay.....	117
11.1.4 Standardversuchsvorschrift zur silanisierenden Oberflächenmodifizierung der MagPrep [®] -Partikel.....	118
11.1.5 Titrations-Assay zur quantitativen Bestimmung von Epoxidgruppen.....	118
11.1.6 Standardversuchsdurchführung für die Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd.....	119
11.1.7 Pepsin-Aktivitätsassay mittels bLF-Verdau	119
11.2 Fehlerrechnung für $K_{M,app}$, $v_{max, app}$ und $k_{cat, app}$	120

11.3	Abkürzungsverzeichnis.....	121
11.4	Geräteverzeichnis.....	122
11.5	Chemiekalienverzeichnis.....	123
12.	Literaturverzeichnis	124

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Anwendung von Mikroorganismen und Enzymen zur Verarbeitung von Rohstoffen ist eine seit langem angewandte Technik. Bereits die frühen Hochkulturen der Sumerer und der Ägypter nutzten, wenn auch ohne das Wissen von der Existenz von Mikroorganismen, bereits vor über 6.000 Jahren biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln. Im 4. Jahrtausend v. Chr. wurden Mikroorganismen bei der alkoholischen Gärung zur Produktion von Bier und Wein eingesetzt. Und auch der Einsatz der Hefefermentation von Teig zur Brotherstellung hat eine lange Tradition und wurde schon von den Ägyptern angewandt [Uhlig, 1991].

Diese als „historische Biotechnologie“ bezeichnete, empirische Nutzung biotechnologischer Prozesse setzte sich bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts fort. Letztendlich ist es wohl Antonie von Leeuwenhoek (1632-1723) zu verdanken, dass sich die Biotechnologie zu einer eigenständigen Wissenschaft entwickeln konnte. Er entdeckte 1676 mit Hilfe des von ihm entwickelten Mikroskops erstmals Mikroorganismen.

Erst Mitte des 19. Jahrhunderts waren es Wissenschaftler wie Louis Pasteur und Theodor Schwann, die mit Hilfe der Mikroskopie und der Biochemie den Zusammenhang zwischen den Mikroorganismen und der Stoffumwandlung erkannten [Ulber, 1996].

Das Spektrum der Anwendungsmöglichkeiten der modernen Biotechnologie ist heute weit gestreut und man unterscheidet drei große Bereiche.

Unter dem Begriff „rote Biotechnologie“ werden die Anwendungen zusammengefasst, die den medizinischen Bereich und die Gentechnik abdecken.

Die „grüne Biotechnologie“ umfasst die Anwendungen im Agrarsektor. Hierzu zählen neben dem Einsatz transgener Pflanzen und der biologischen Schädlingsbekämpfung auch die Anwendungen in der Lebensmittelindustrie wie z.B. functional food und nutraceuticals. Nach Schätzungen der WHO werden derzeit mehr als 60% der Nahrungsmittel weltweit durch fermentative Prozesse hergestellt oder konserviert [BIO, 2004].

Im Fokus der „weißen Biotechnologie“ steht die industrielle Herstellung von Produkten mit biotechnologischen Verfahren. Eine recht allgemeine Definition des Begriffes „weiße Biotechnologie“ wurde 2003 von EuropaBio aufgestellt: „*White Biotechnology is the application of nature's toolset to industrial production*“ [DECHEMA, 2004].

Neben den drei etablierten Biotechnologierichtungen werden manchmal noch weitere Unterdisziplinen unterschieden. Die Nomenklatur ist jedoch nicht allgemein einheitlich.

Der Bereich der Biotechnologie auf Grundlage mariner Organismen wird als „blaue Biotechnologie“ bezeichnet. Er besitzt hohes wirtschaftliches Potential, dass in Deutschland

jedoch kaum genutzt wird [Forschungszentrum Jülich, 2004].

Die „Grau Biotechnologie“ umfasst den Bereich der Umwelttechnik, wobei biotechnologische Verfahren zum Nachweis von Umweltschadstoffen und zur Umweltsanierung verwendet werden [Lippold, 2006].

Wie Ernst & Young in ihrem Biotechnologie-Report „Beyond Borders 2006“ berichten, lagen die weltweiten Einnahmen der Biotechnologie-Branche im Jahr 2005 erstmals in der 30jährigen Geschichte über 60 Mrd. US-\$ [Ernst & Young, 2006]. Experten sehen in der weißen Biotechnologie noch weiteres Wachstumspotential und rechnen mit einem Anstieg auf 310 Mrd. US-\$ bis zum Jahr 2010. Der größte Anstieg wird dabei im Bereich der Wirkstoffproduktion erwartet. 2003 wurden knapp 32 Mrd. US-\$ mit Humanproteinen, die in gentechnisch veränderten Organismen hergestellt wurden, umgesetzt [Wess, 2006]. Ein Drittel davon waren Medikamente, mit einem Jahresumsatz von mehr als 1 Mrd. US-\$, wie beispielsweise Insulin, Erythropoietin oder Interferone.

Seit Sommer 1926 erstmals Enzyme kristallisierte und den endgültigen Beweis dafür lieferte, dass Enzyme unabhängig von lebenden Zellen als rein chemische Substanzen wirken, finden isolierte, technisch hergestellte Enzyme ihre Anwendung. Heute werden Enzyme vor allem in der Waschmittelindustrie, der Lebens- und Futtermittelbranche sowie der Leder- und Textilproduktion verwendet. Aufgrund der Stereo- und Regiospezifität der Enzyme, die meistens nur ein Enantiomer chiraler Substrate transformieren, hat sich ihre Verwendung aber auch in der Produktion von Feinchemikalien und Vorstufen pharmazeutischer Wirkstoffe etabliert.

Da freie Enzyme nur gelöst eingesetzt werden können und nach Reaktionsende meist nur mit aufwendigen, kostenintensiven Aufarbeitungsschritten aus der Reaktionslösung abzutrennen sind, die Gewinnung von Enzymen bisweilen jedoch sehr kostenintensiv ist, muss nach Möglichkeiten gesucht werden, diese Biokatalysatoren mehrfach zu verwenden.

Die Enzymimmobilisierung stellt hier eine Möglichkeit dar, Enzyme so zu modifizieren, dass ein mehrfacher Einsatz möglich wird. Ein weiterer Vorteil immobilisierter Enzyme liegt darin, dass sich mit ihnen hohe Katalysatordichten realisieren lassen, so dass bei kontinuierlichen Prozessen hohe Raum-Zeit-Ausbeuten resultieren.

Der Einsatz magnetischer Partikel als Trägermatrix für die Enzymimmobilisierung stellt eine Weiterentwicklung bei der Suche nach geeigneten Immobilisierungsmatrizes dar. Die Partikel lassen sich leicht in der Reaktionslösung homogen suspendieren und ebenso einfach durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes von der Reaktionslösung separieren, so dass zeitaufwendige Filtrations- und Zentrifugationsschritte entfallen. Die magnetische Separation

tion ist außerdem eine sehr schonende Separationstechnik, was diese Trägermatrix für den technischen Einsatz noch interessanter macht.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit soll die Enzymimmobilisierung auf para- und superparamagnetischen Partikeln untersucht werden. Als Modellenzym kommt α -Chymotrypsin zum Einsatz, da es sich aufgrund seines geringen Preises und seiner geringen Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten Immobilisierungsparametern wie z.B. pH-Wert- und Temperaturveränderungen für die Immobilisierung in besonderem Maße eignet. Als Trägermatrizes wurden die kommerziell verfügbaren Magnetpartikel SiMAG der Firma Chemicell (Berlin) und MagPrep[®] der Firma Merck (Darmstadt) verwendet. SiMAG-Partikel besitzen bereits funktionelle Gruppen zur kovalenten Enzymimmobilisierung auf der Oberfläche, wohingegen die MagPrep[®]-Partikel unfunktionalisiert vorliegen und durch entsprechende Oberflächenmodifizierung für die Immobilisierung vorbereitet werden müssen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin durch Variation der Immobilisierungsparameter Temperatur, Immobilisierungs-pH-Wert, Immobilisierungsdauer und Konzentration der eingesetzten Enzymlösung optimiert werden. Im Anschluss an die Optimierung der Immobilisierungsbedingungen soll das immobilisierte Enzym charakterisiert und mit dem nativen Enzym verglichen werden. Dazu sind die kinetischen Parameter des immobilisierten Enzyms zu bestimmen. Außerdem soll die Temperatur- und Langzeitstabilität des an SiMAG-MeCl-Partikel gebundenen α -Chymotrypsins untersucht werden. Um die konformative Belastung des immobilisierten Enzyms zu verringern, soll die Oberfläche der SiMAG-MeCl Partikel mit Spacern modifiziert werden. Dabei ist zu untersuchen, welchen Einfluss die Spacermoleküle auf die Restaktivität des immobilisierten Enzyms haben.

Im zweiten Teil der Arbeit wird im Anschluss an diese Untersuchungen die Eignung der MagPrep[®]-Partikel, nach Variation ihrer Oberflächenaktivierung, für die Enzymimmobilisierung untersucht werden. Durch die Funktionalisierung sollte eine Enzymimmobilisierung direkt an der Partikeloberfläche ebenso möglich sein, wie die Immobilisierung über Spacer, analog der Immobilisierungsversuche an SiMAG-Partikeln.

Da neben den konformativen Belastungen auch die Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums die Restaktivität beeinflusst, sollen an den MagPrep[®]-Partikel unterschiedliche Belegdichten der funktionellen Ankergruppen untersucht werden. Durch einen größeren Abstand der Enzymmoleküle untereinander, wird eine bessere Substratzugänglichkeit und damit eine höhere Restaktivität erwartet.

Abschließend werden die gewonnenen Erkenntnisse auf ein weiteres, industriell relevantes

Enzysystem übertragen, wobei die Eignung der MagPrep[®]-Partikel zur Immobilisierung von Pepsin untersucht werden soll. Der Immobilisierungserfolg wird anhand der immobilisierbaren Enzymmenge und der erhaltenen Restaktivität des kovalent gebundenen Enzyms beim enzymatischen Lactoferrin-Verdau beurteilt. Die dafür benötigten Aktivitätsassys sind im Vorfeld zu entwickeln und zu etablieren.

2. Enzyme

2.1 α -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)

Chymotrypsin ist ein Enzym, das von den Acinuszellen des Pankreas synthetisiert, anschließend ins Duodenum sezerniert wird und eine wichtige Funktion bei der Verdauung von Eiweißen einnimmt. Es gehört zur Familie der Serinendoproteasen und katalysiert die Hydrolyse von Proteinen bzw. Peptiden hinter großen, hydrophoben Aminosäuren.

Chymotrypsin existiert in mehreren Formen, dem α -, δ -, γ - und π -Chymotrypsin [Barrett et al., 1998]. Das α - und γ -Chymotrypsin weisen dabei die gleiche Primärstruktur auf.

Wie in Abbildung 2.1-1 gezeigt, wird durch eine spezifische Spaltung der Arg¹⁵-Ile¹⁶-Peptidbindung das zuerst gebildete Zymogen Chymotrypsinogen zum π -Chymotrypsin aktiviert. Das π -Chymotrypsin wird anschließend autokatalytisch gespalten. So entsteht neben den beiden Dipeptiden Ser¹⁴-Arg¹⁵ und Thr¹⁴⁷-Asn¹⁴⁸ schließlich α -Chymotrypsin mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und einem Moleküldurchmesser von ca. 51 Å [Köhling, 2004]. Es besteht aus drei, durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbundenen, Polypeptidketten.

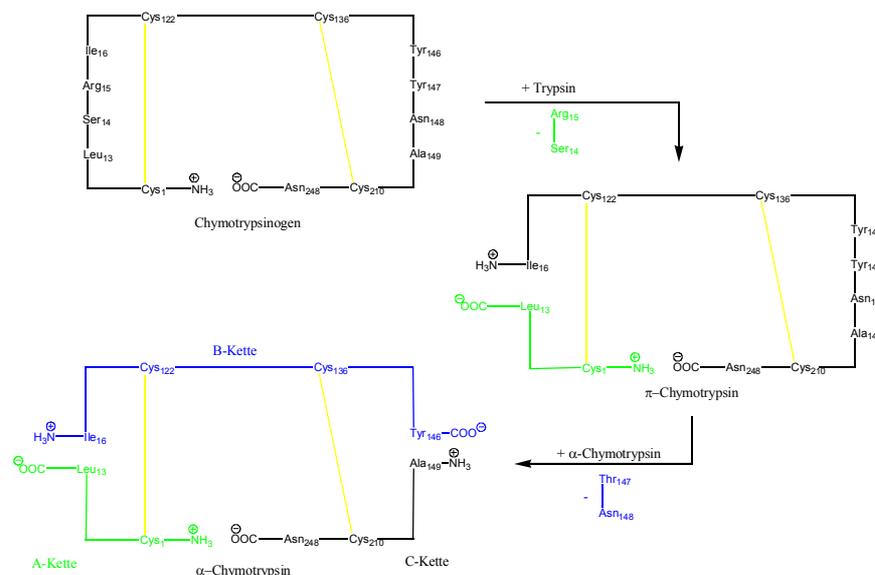


Abbildung 2.1-1: Bildung von α -Chymotrypsin aus Chymotrypsinogen [Voet; Voet, 1994]

Chymotrypsinogen ist katalytisch inaktiv, obwohl es den gleichen katalytischen Rest wie das aktive Chymotrypsin besitzt. Das aktive Zentrum des Enzyms bildet sich jedoch erst aus, wenn das Enzym eine neue Konformation einnimmt, nachdem die beiden Dipeptide abgespalten wurden. Dabei bildet die Carboxylation der Seitenkette des Asparaginsäurerestes (Asp₁₉₄) in der Nähe des aktiven Serins mit der protonierten Aminogruppe des Isoleucins (Ils₁₆) ein Ionenpaar, das das aktive Zentrum in der erforderlichen Konfiguration fixiert.

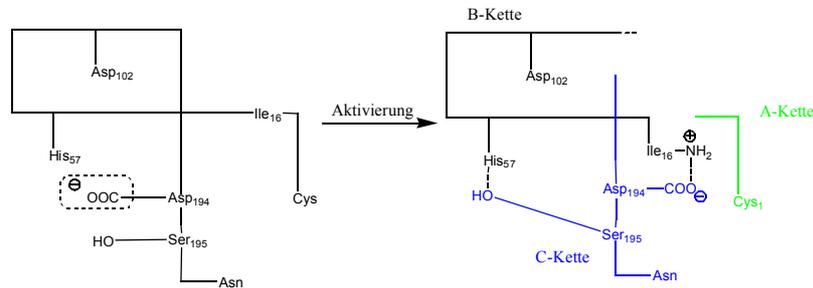


Abbildung 2.1-2: Aktivierungsmechanismus von α -Chymotrypsin [Schellenberger, 1989]

Kann sich dieses Ionenpaar nicht ausbilden, z.B. weil das Molekül in der nichtprotonierten Form (oberhalb pH 9) vorliegt, wird die aktive Konfiguration zerstört und die enzymatische Aktivität geht verloren [Gray, 1976].

2.1.1 Katalyse-Mechanismus von α -Chymotrypsin

α -Chymotrypsin ist eine Endoprotease, die interne Peptidbindungen des Proteingerüsts aber auch Esterbindungen spaltet. Die Proteolysegeschwindigkeit wird durch das Enzym um den Faktor $\approx 10^{10}$ im Vergleich zur nicht katalysierten Reaktion beschleunigt. Dabei werden für das jeweilige Protein spezifische Peptidmuster erzeugt. So trennt α -Chymotrypsin beispielsweise C-terminal die Peptidbindung von Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan. Aber auch die Peptidbindungen von Leucin, Methionin, Alanin, Asparagin- und Glutaminsäure werden, zwar mit einer geringeren Hydrolyserate, von α -Chymotrypsin gespalten. Den genauen Katalysezyklus zeigt Abbildung 2.1-3.

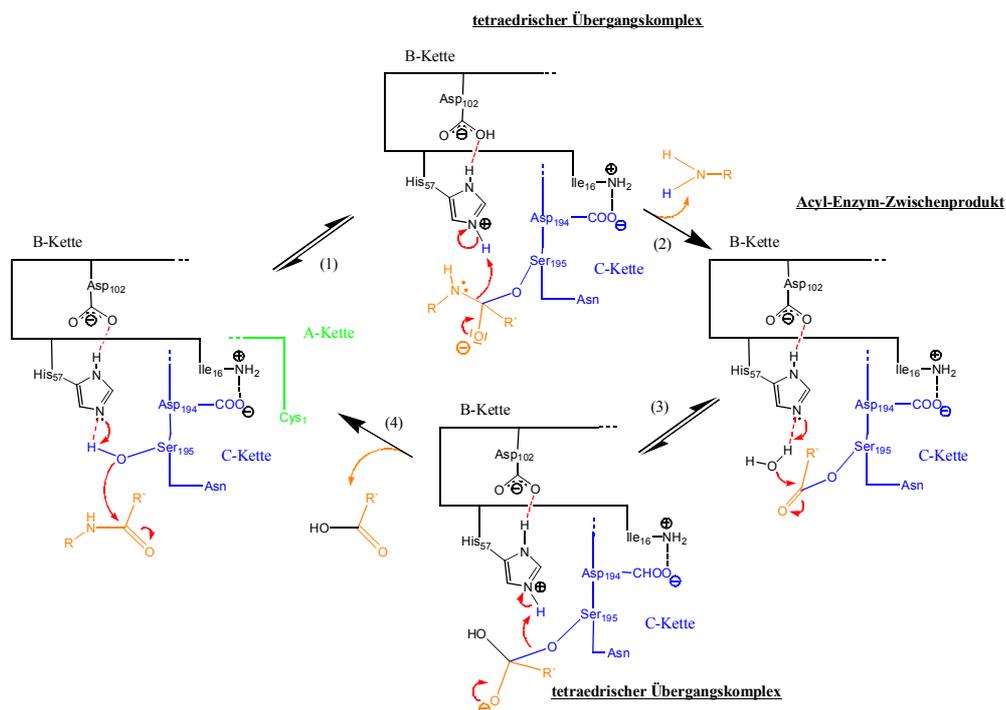


Abbildung 2.1-3: Hydrolysemechanismus von α -Chymotrypsin

Die katalytische Aktivität des Chymotrypsins beruht auf der, unter physiologischen Bedingungen ungewöhnlich hohen Reaktivität des Ser¹⁹⁵. Serin, Aspartat und Histidin liegen im Chymotrypsin benachbart und bilden die katalytische Triade. Dabei fungiert His⁵⁷ als allgemeine Base, die die Nucleophilie des Ser¹⁹⁵ erhöht. Bei einem nucleophilen Angriff des Sauerstoffatoms des Ser¹⁹⁵ auf das Substrat kann das His⁵⁷ das Proton dieser OH-Gruppe aufnehmen. Der positiv geladene Imidazolring wird dann durch das negativ geladene Asp¹⁰² stabilisiert und so im tetraedrigen Übergangszustand in der richtigen Lage gehalten (Abb. 2.1-3, (1)). Anschließend wird das Proton vom positiven His⁵⁷ auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen, wodurch diese gespalten und das Acyl-Enzym-Zwischenprodukt gebildet wird (Abb. 2.1-3,(2)). Die darauf folgende Deacylierung beginnt damit, dass Wasser den Platz der Aminkomponente des Substrates einnimmt, nachdem diese abdifundiert ist. Das His⁵⁷ zieht ein Proton vom Wassermolekül ab, und das verbleibende OH-Ion greift nucleophil die Acylgruppe am Ser¹⁹⁵ an. Erneut bildet sich dadurch eine tetraedrische Zwischenverbindung (Abb. 2.1-3,(3)). Die Regeneration des α -Chymotrypsins erfolgt, indem das positiv geladene His⁵⁷ ein Proton auf das Sauerstoffatom von Ser¹⁹⁵ überträgt. Dieses setzt dann die saure Gruppe des Substrates frei (vgl. Abb. 2.1-3,(4)).

Ein Großteil der katalytischen Aktivität des α -Chymotrypsins ist dabei auf die bevorzugte Anbindung des tetraedrigen Zwischenproduktes zurückzuführen. Verantwortlich dafür ist die Stabilisierung des Übergangszustands und das Eindringen des Carbonylsauerstoffs des zu spaltenden Peptids in das Oxyanion-Loch, in dem er an die Gerüst-NH-Gruppen von Gly¹⁹³ und Ser¹⁹⁵ bindet [Voet; Voet, 1994].

2.1.2 pH-Abhängigkeit von α -Chymotrypsin

Aufgrund der polyionischen Struktur von α -Chymotrypsin hängt die Aktivität des Enzyms stark vom pH-Wert ab. Seine optimale Aktivität entfaltet α -Chymotrypsin in einem pH-Bereich zwischen pH=7,5 bis pH=8,5 [Barrett et al., 1998]. Dabei hängt das pH-Optimum größtenteils vom Protonierungszustand des Imidazolrings der His⁵⁷-Gruppe ab. Bei niedrigen pH-Werten liegt das Histidin protoniert vor und die Wechselzahl k_{cat} hat den Wert Null. Das Enzym setzt kein Substrat um. Bei höheren pH-Werten dissoziiert das Proton ab und das Enzym setzt Substrat um. Es gilt:

$$k_{cat} = f_- k_{cat}^0 = \frac{k_{cat}^0}{1 + \frac{[H^+]}{K_1}} \quad ; \text{ mit } f_- = \text{Anteil der Enzymmoleküle mit der Wechselzahl } k_{cat}^0 \quad (2.1-1)$$

Durch die Immobilisierung des Enzyms kann dieses pH-Optimum abhängig vom eingesetzten Trägermaterial um mehrere pH-Einheiten verschoben werden [Hartmeier, 1986]. Besitzt die Trägermatrix Ladungen auf der Oberfläche, wird die Mikroumgebung des Enzyms durch die Immobilisierung nachhaltig verändert. Beispielsweise führen polykationische Trägermaterialien dazu, dass Anionen zur Trägeroberfläche gezogen werden. Dadurch sinkt der pH-Wert in der Mikroumgebung des Enzyms an der Trägeroberfläche. Um in dieser veränderten Mikroumgebung den für das Enzym optimalen pH-Wert zu erhalten, muss in der Reaktionslösung (Makroumgebung) ein pH-Wert eingestellt werden, der kleiner als der optimale pH-Wert des nativen Enzyms ist (Abbildung 2.1-4).

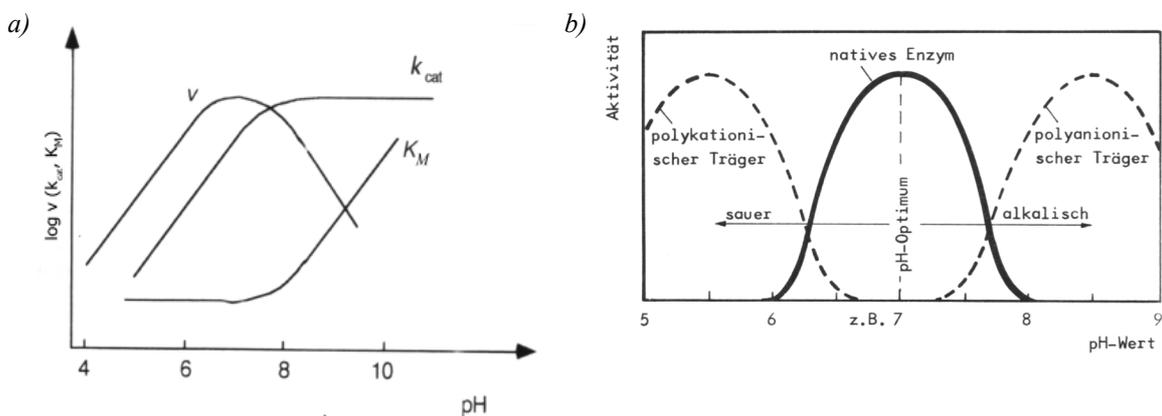


Abbildung 2.1-4: (a) pH-Abhängigkeit von v , k_{cat} und K_M bei α -Chymotrypsin [Buchholz; Kasche, 1997]
 (b) Verschiebung des pH-Optimums immobilisierter Enzyme in Abhängigkeit von der Trägermatrix [Hartmeier, 1986]

In der Mikroumgebung des Enzyms kann die lokale Protonenkonzentration durch die Maxwell-Boltzmann-Verteilung beschrieben werden. Die Differenz zwischen dem pH-Wert der Mikroumgebung pH' und dem pH-Wert der Makroumgebung pH^0 des immobilisierten Enzyms wird dann durch folgende Gleichung beschrieben [Schellenberger, 1989]:

$$\Delta pH = pH' - pH^0 = 0,43 \frac{e \cdot \psi}{k \cdot T}; \text{ mit } \psi = \text{elektrostatisches Potential des Enzym-Matrix-Komplex,} \quad (2.1-2)$$

k= Boltzmann-Konstante und
T= Temperatur

2.1.3 Temperaturverhalten von α -Chymotrypsin

Die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen ist temperaturabhängig. Diese Abhängigkeit beruht hauptsächlich auf zwei Faktoren. Gemäß der Arrhenius-Gleichung führt eine Temperaturerhöhung zu einer gesteigerten Katalysegeschwindigkeit. Es gilt folgende Faustregel:

Pro 10 °C steigt die Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor 2-3.

Da α -Chymotrypsin jedoch ein thermolabiles Enzym ist, führt ein Temperaturanstieg zur Destabilisierung des Enzyms, aus der schließlich, bei zu hohen Temperaturen, eine irreversible Denaturierung und damit der Verlust der katalytischen Aktivität resultiert.

Aus der gegenseitigen Überlagerung dieser beiden Effekte ergibt sich dann das Temperaturoptimum der Aktivität, wie dies in Abbildung 2.1-5 (a) gezeigt ist.

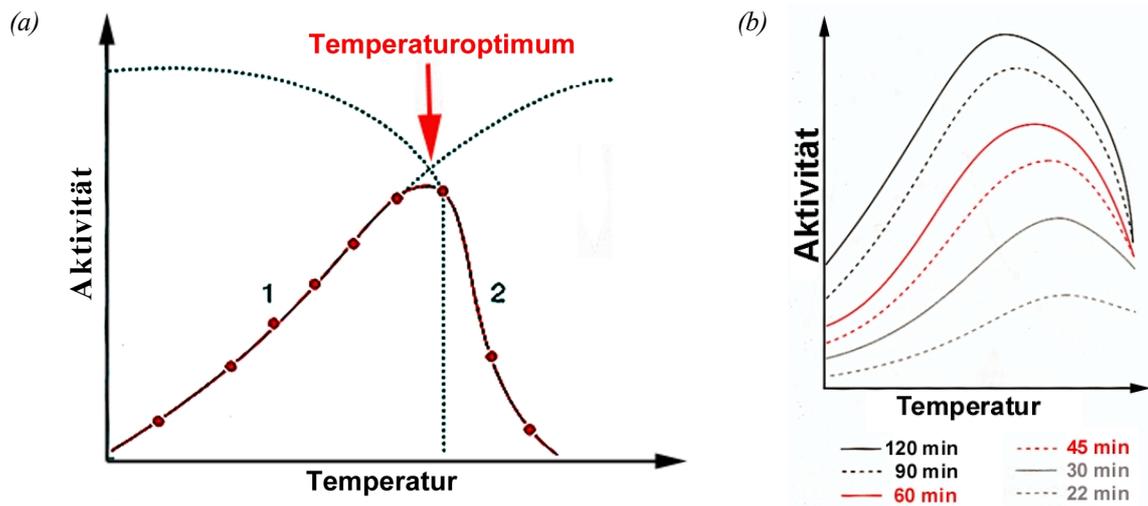


Abbildung 2.1-5:

(a) *Temperaturoptimum der Enzymaktivität aufgrund der Überlagerung des Aktivitätsanstiegs nach dem Arrhenius-Ansatz (1) und der temperaturbedingten Destabilisierung des Enzyms (2)*

(b) *Einfluss der Einwirkzeit auf das Temperaturoptimum*

[Lottspeich; Zorbas, 1998]

Das Temperaturoptimum eines Enzyms ist jedoch keine Konstante, da die Hitzedenaturierung zeitabhängig ist. Je kürzer die Temperatureinwirkung ist, umso höher liegt das Temperaturoptimum (Abbildung 2.1-5 (b)).

2.1.4 Inhibitoren von α -Chymotrypsin

Die Aktivität von α -Chymotrypsin wird weiterhin von verschiedensten chemischen Verbindungen beeinflusst. So wirken Schwermetalle, natürliche Trypsininhibitoren, Polyphosphate, starke Oxidationsmittel, Diisopropylfluorphosphat (DFP) und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) als Inhibitoren, die die Aktivität des Enzyms herabsetzen.

2.2 Enzymimmobilisierung

Die immer wichtiger werdenden Aspekte des Umweltschutzes und die wachsenden Anforderungen an Produktionsvorgänge bezüglich Abfallvermeidung führten dazu, dass enzymkatalysierte Reaktionen in den vergangenen Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen haben. So werden heute zunehmend rein chemische Verfahren durch enzymbasierte Pro-

zesse vollständig aus der industriellen Anwendung verdrängt. In Tabelle 2.2-1 sind einige industrielle Enzymverfahren exemplarisch aufgeführt.

Tabelle 2.2-1: Industriell, mittels Enzymkatalyse hergestellte Produkte [Buchholz et al., 2005]

Produkt	Enzym	freies/immobilisiertes Enzym	Firmen
> 10.000.000 t · a⁻¹			
High Fructose Corn Syrup (HFCS)	Amylase	frei	mehrere verschiedene
	Glucose Isomerase	immobilisiert	
Ethanol	Amylase	frei	mehrere verschiedene
	Glucoseamylase	frei	
>10.000 t · a⁻¹			
Acrylamid	Nitrilase	immobilisiert	Nitto, DMS
6-Aminopenicillansäure (6-APA)	Penicillin Amidase	immobilisiert	mehrere verschiedene
Kakao-Butter	Lipase	immobilisiert	Fuji Oil, Unilever
Isomaltulose	Isomaltulose	in immobilisierten Zellen	Südzucker
Lactosefreie Milch/Molke	β-Galactosidase	frei & immobilisiert	mehrere verschiedene

Der Einsatz von Enzymen ist allerdings nicht nur unter ökologischen Gesichtspunkten vorteilhaft, sondern besitzt auch großes ökonomisches Potential. Im Gegensatz zu synthetischen Katalysatoren können enzymkatalysierte Reaktionen meistens in wässrigen Lösemitteln bei Normaldruck, neutralem pH-Wert und bei Temperaturen von 20-60 °C durchgeführt werden. Dies führt gerade in industriellen Prozessen zu einer erheblichen Kostensparnis. Weiterhin wird in enzymkatalysierten Prozessen häufig eine höhere katalytische Aktivität erreicht, da Enzyme in der Lage sind, Reaktionen um einen Faktor von 10^6 - 10^{12} zu beschleunigen.

Als „immobilisiert“ werden Enzyme bezeichnet, die durch chemische oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt wurden [Hartmeier, 1986]. Die Immobilisierung von Enzymen ist eine besonders interessante Variante der Enzymmodifizierung, die zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Die Enzyme werden durch die Immobilisierung außer in ihrer Beweglichkeit auch in ihrer Löslichkeit und Zugänglichkeit für Effektoren und Substrate verändert. Damit verbunden ist eine Veränderung der chemischen, biologischen und physikochemischen Eigenschaften des Immobilisates. Das Enzym liegt nach der Immobilisierung nicht mehr homogen gelöst, sondern als unlöslicher Komplex vor. Dies ermöglicht eine leichte Produktabtrennung ebenso, wie die Rückgewinnung des Enzyms [Hartmeier, 1986]. Das Anwendungsspektrum der Enzyme wird durch die Immobilisierung erheblich erweitert.

Viele Vorteile der klassischen heterogenen Katalyse, wie z.B. leichte Rückgewinnung des

Enzyms durch Filtration, Zentrifugation oder magnetische Separation, werden durch Enzymimmobilisierung realisierbar.

In großtechnischen Produktionsprozessen wird durch die Immobilisierung eine kontinuierliche Prozessführung in Festbett-, Wirbelschicht- oder Membranreaktoren möglich. Die Immobilisierung des Enzyms ermöglicht hier die Schaffung und Aufrechterhaltung hoher Biokatalysatordichten, wodurch die Verweilzeit des Produktes unter den erforderlichen Reaktionsbedingungen sehr kurz gehalten und damit eine Produktschonung erreicht werden kann [Hartmeier, 1986]. Außerdem zeigen immobilisierte Enzyme häufig eine verbesserte Langzeitstabilität und größere Toleranz gegenüber erhöhten Temperaturen. Heute werden etliche, industrielle Verfahren in einem Produktionsmaßstab von mehr als $10.000 \text{ t} \cdot \text{a}^{-1}$ mit immobilisierten Enzymen realisiert (vgl. Tabelle 2.2-1, S.10).

Auch in der analytischen Chemie hat sich der Einsatz immobilisierter Enzyme beispielsweise in der Affinitätschromatographie und der Sensortechnik etabliert [Doretti; Ferrera, 1996]. Immobilisierte Enzyme ermöglichen hier durch ihre hohe Substratspezifität die quantitative Bestimmung von Substanzen in komplexen Reaktionsmedien, ohne dass zuvor eine Auftrennung erfolgen muss [Bowers; Carr, 1980].

Diesen Vorteilen der Enzymimmobilisierung stehen jedoch auch einige Nachteile gegenüber. Die Immobilisierung von Enzymen geht häufig mit einem beträchtlichen Aktivitätsverlust einher [Chmiel (Hrsg), 2006]. Grund dafür können irreversible Veränderungen am aktiven Zentrum des Enzyms bei der Immobilisierungsreaktion, eine erschwerte oder zum Teil vollständig verhinderte Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums sowie konformative Belastungen des immobilisierten Enzyms sein. Weiterhin wird in einigen Fällen auch eine geringere Stereospezifität beobachtet [Bozhinova et al., 2004]. Wie bei allen heterogenen Katalysatoren, kann auch bei immobilisierten Enzymen eine Diffusionslimitierung auftreten, die vor allem bei porösen Trägermaterialien prozessrelevant werden kann.

Und letztlich schränken auch die zum Teil sehr hohen Kosten der Trägermaterialien den Einsatz immobilisierter Enzyme ein. So muss bei der Entwicklung eines enzymatischen Prozesses stets individuell abgewogen werden, ob die aufgeführten Vorteile die beschriebenen Nachteile kompensieren können, damit ein wirtschaftlicher Einsatz der Immobilisierungstechnik gewährleistet ist. Bei preiswerten Enzymen wird sich der Immobilisierungsaufwand nicht lohnen und das Enzym am Ende des Prozesses verworfen werden. Bestimmen die Enzymkosten jedoch die Produktionskosten, so stellt die Enzymimmobilisierung eine Möglichkeit dar, die Turnover-Zahl des Enzyms zu erhöhen und so den Enzymkostenanteil an den Gesamtkosten zu verringern.

Abbildung 2.2-1 zeigt eine Unterteilung der allgemeinen Immobilisierungsprinzipien. Es lassen sich zwei grundlegende Gruppen unterscheiden. Zum einen die Immobilisierung durch Einschluss, bei der das Enzym in gelöster Form immobilisiert wird. Zum anderen die Immobilisierung durch Bindung, wobei das Enzym in eine unlösliche Form überführt wird.

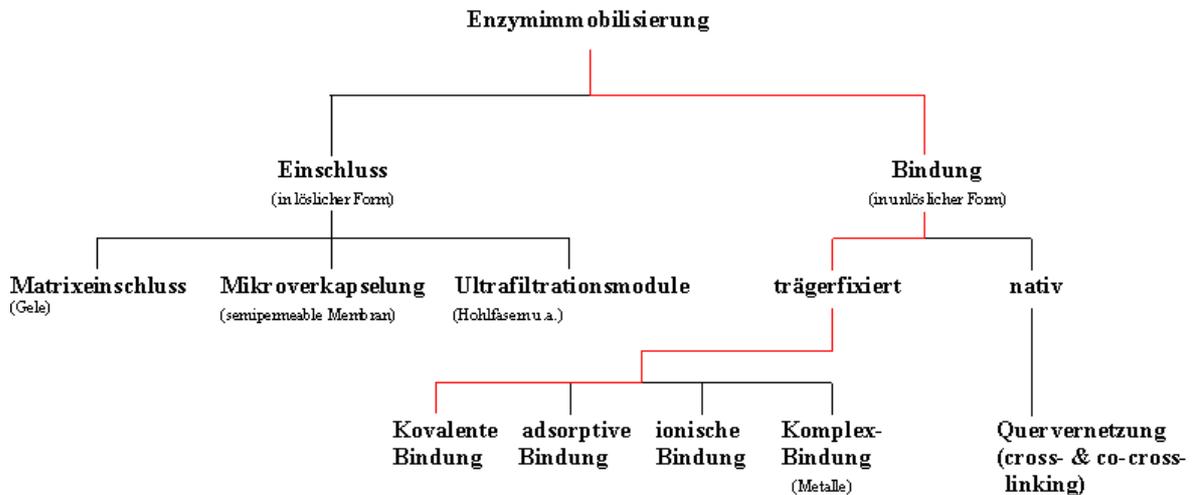


Abbildung 2.2-1: Prinzipien der Enzymimmobilisierung

Im Folgenden soll auf einige der in Abbildung 2.2-1 dargestellten Immobilisierungsprinzipien näher eingegangen werden.

2.2.1 Immobilisierung von Enzymen in löslicher Form

Der physikalische Immobilisierungsmechanismus ist bei allen Einschlussmethoden gleich. Die Enzymmoleküle werden durch semipermeable Membranen oder Netzstrukturen von Gelen in einem begrenzten Reaktionsraum zurückgehalten, während niedermolekulare Verbindungen ihre freie Beweglichkeit beibehalten. Abbildung 2.2-2 zeigt die einzelnen Varianten der Enzymimmobilisierung durch Einschluss.

Diese Immobilisierungsmethode verursacht zwar die geringsten sterischen Belastungen am immobilisierten Enzym, ist jedoch für Enzyme mit großen Substrat- oder Produktmolekülen ungeeignet, da hier starke Aktivitätsverluste aufgrund von Transportlimitierungen (z.B. Diffusionslimitierung) auftreten. Technische Anwendung findet die Enzymimmobilisierung durch Einschluss beispielsweise bei dem Enzym Glucose Isomerase [Buchholz; Kasche, 1997].

Neben Gelen (häufig Dextran oder Acrylamidderivate) werden auch Membranen in Form von Mikrokapselfen, Liposomen und vor allem im technischen Bereich von Hohlfasern verwendet [Schellenberger, 1989].

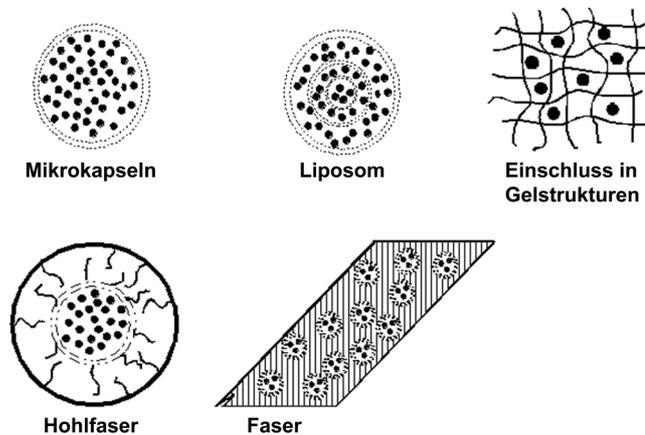


Abbildung 2.2-2: Varianten der Enzymimmobilisierung durch Einschluss

• Enzym; === Membran

2.2.2 Enzymimmobilisierung in unlöslicher Form

Die Immobilisierung von Enzymen, bei der diese in eine unlösliche Form überführt werden, lässt sich ebenfalls in zwei Gruppen einteilen. So kann das Enzym entweder nativ oder trägerfixiert immobilisiert werden (vgl. Abbildung 2.2-1, S.12).

Bei der Immobilisierung des nativen Biokatalysators (cross- & co-cross-linking) wird das Enzym über bifunktionelle Moleküle, wie beispielsweise Glutardialdehyd oder Metylen-diisocyanat quervernetzt, so dass stabile Enzymaggregate höherer molekularer Masse gebildet werden [Lang et al., 1972]. Ab einem bestimmten Vernetzungsgrad sind diese Aggregate wasserunlöslich und lassen sich leicht durch Filtration oder Zentrifugation aus dem Reaktionsmedium abtrennen. Es werden gelatineartige Immobilisate erhalten, die in ihrer Form an verschiedene Oberflächen angepasst werden können. Aufgrund der guten Verformbarkeit der Immobilisate eignet sich diese Immobilisierungsvariante besonders gut zur Herstellung von Biosensoren [Koudelka-Hep et al., 1997]. Nachteilig an diesem Immobilisierungsverfahren ist die geringe mechanische Stabilität der erhaltenen Immobilisate. Auch die häufig auftretende Verzerrung der Tertiärstruktur des immobilisierten Enzyms, die mit Aktivitätsverlusten einhergehen können, schränkt die Anwendungsmöglichkeiten dieser Immobilisierungstechnik weiter ein. Die Stabilität des Immobilisates lässt sich allerdings durch Co-Immobilisierung eines inerten Proteins wie Rinderserumalbumin (BSA) erhöhen.

Bei der zweiten Gruppe, den trägerfixierten Immobilisierungen, wird das Enzym über Adsorption, ionische Wechselwirkungen oder kovalente Bindung an ein festes Trägermaterial gebunden. Die Eigenschaften der äußeren, zugänglichen Oberfläche der Trägermatrix und der sich darauf befindenden funktionellen Gruppen spielen eine Schlüsselrolle bei dieser Form der Immobilisierung.

So hängt die Adsorption beispielsweise von der Hydrophilie bzw. Hydrophobie der Trägeroberfläche ab. Die Stärke der ionischen Wechselwirkungen ist maßgeblich von der Ladung der potentiell ionischen Aminosäurereste an der Enzymoberfläche abhängig, die wiederum durch den pH-Wert der Reaktionslösung beeinflusst wird. Die adsorptive sowie die ionische Immobilisierung sind schonender als die kovalente Anbindung, jedoch erfolgt die Enzymimmobilisierung reversibel und das Enzym kann leicht durch Veränderung der Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, etc.) vom Träger abgelöst werden.

Die kovalente Enzymimmobilisierung führt hingegen zu einer irreversiblen Anbindung des Enzyms an die Trägermatrix, da durch chemische Reaktion reaktiver, funktioneller Gruppen auf der Oberfläche des Enzyms (-OH, -SH, -NH₂, ect.) kovalente Bindungen mit den funktionellen Ankergruppen auf der Matrixoberfläche ausgebildet werden. Die Ankergruppen der Trägeroberfläche liegen entweder schon im Träger vor oder müssen durch Derivatisierung vor der Immobilisierung eingeführt werden. Zur kovalenten Enzymimmobilisierung ist prinzipiell jede chemische Reaktion geeignet, die in wässriger Lösung erfolgt [Rosevear et al., 1987]. Aber auch verschiedenste Reaktionen in organischen Lösemitteln wurden schon erfolgreich zur kovalenten Enzymimmobilisierung verwendet.

Mit der bei der kovalenten Enzymimmobilisierung auftretenden chemischen Modifizierung des Enzyms geht allerdings häufig eine Abnahme der spezifischen Aktivität einher. Ein möglicher Grund dafür können chemische Reaktionen am Enzym sein, die das Reaktionszentrum irreversibel beeinträchtigen oder den Substratzugang zum aktiven Zentrum erheblich erschweren bzw. ganz verhindern. Aber auch die Fixierung direkt an der starren Oberfläche der Trägermatrix führt zu Deformierungen und damit zu Veränderungen der Tertiärstruktur des Enzyms. Im Hinblick auf die Enzymstabilität sind weiterhin alle ionischen, hydrophilen bzw. hydrophoben Wechselwirkungen sowie der Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Matrixoberfläche zu beachten. Diese können ebenfalls zu starken sterischen Belastungen und damit verbundenen Aktivitätsverlusten führen. Eine Reduzierung der aktivitätsvermindernden Einflüsse kann durch Einführung von Spacern zwischen Partikeloberfläche und Enzym erreicht werden. Etabliert haben sich Spacerlängen von 3-8 Kohlenstoffatomen, da sie zu den besten Ergebnissen führten. Die aus der Einführung der Spacer resultierende Vergrößerung des Abstands zwischen Enzym und Trägeroberfläche kann zu geringeren Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Trägermaterial führen, so dass sich möglicherweise eine höheren Restaktivität des immobilisierten Enzyms ergibt. Findet das Enzym zudem nach der Immobilisierung eine physiologische Umgebung vor, kann dies den Aktivitätsverlust weiter reduzieren.

3. Magnetpartikel

Magnetismus ist wahrscheinlich eines der ältesten Wissenschaftsgebiete. Sei Beginn unserer Zivilisation werden magnetische Phänomene beobachtet und auch genutzt. Eine Vielzahl technischer Anwendungen und Geräte beruhen auf magnetischen Eigenschaften. Dabei reicht die Bandbreite der Anwendungen von der einfachen Kompassnadel bis hin zu modernen Transportsystemen wie der Magnetschwebebahn Transrapid.

Der Magnetismus war aber auch immer von der Aura der Magie umgeben, da bis ins Mittelalter nur wenige magnetische Phänomene verstanden waren. Erst zu Beginn des 17. Jahrhundert wurde die erste wissenschaftliche Abhandlung dieses Themas von Sir William Gilbert, die „*De Magnete, Magneticisque Corporibus, et de Magno tellure; Physiologia nova, plurimum & argumentii, & experimentis demonstrata*“. Londra, Pie Short, 1600“, verfasst.

3.1 Magnetismus

Eine qualitative Beschreibung magnetischer Erscheinungen kann auf Basis des Rutherford-Bohrschen Atommodells erfolgen. Die um den Atomkern rotierenden Elektronen können demnach als bewegte Ladungen bzw. Kreisstrom betrachtet werden, der ein bestimmtes magnetisches Moment erzeugt. Die Stärke des magnetischen Momentes ist gegeben durch:

$$\vec{p}_m = I \cdot \vec{A} \quad ; \text{ mit } I = \text{Stromstärke und } \vec{A} = \text{Flächennormalenvektor} \quad (3.1-1)$$

Die Elektronen der Atome eines Festkörpers besitzen zwei magnetische Momente. Das Spinmoment \vec{s}_m wird durch die Rotation des Elektrons um die eigene Achse verursacht. Das Bahnmoment \vec{p}_m wird durch die Rotation des Elektrons um den Atomkern hervorgerufen. Das magnetische Moment des Atomkerns kann in erster Näherung vernachlässigt werden, da es im Vergleich zu den beiden anderen etwa drei Zehnerpotenzen kleiner ist. Die beiden magnetischen Momente in der Elektronenhülle können auf unterschiedliche Weisen miteinander wechselwirken. Dies ist abhängig vom Umlaufsinn und von der Spinorientierung der einzelnen Elektronen, ihrem Energieniveau und von der Besetzung der Elektronenschalen.

In diamagnetischen Stoffen sind die Zahl der Elektronen und ihre Bewegungsrichtungen so aufeinander abgestimmt, dass sich die einzelnen Teilmomente gegenseitig kompensieren, und der Gesamtdrehimpuls $J=0$ ist. Ein äußeres Magnetfeld verursacht eine Larmor-Präzession, die eine dem äußeren Feld entgegengesetzte Magnetisierung induziert. Diamagnetismus ist demnach ein reiner Bahndrehimpulseffekt, da sich die Spins gepaarter Elektronen

gegenseitig kompensieren. Durch die dem äußeren Magnetfeld entgegengesetzte induzierte Magnetisierung ist das Gesamtfeld kleiner als im Vakuum. Ohne Einwirkung eines äußeren Magnetfeldes sind diamagnetische Stoffe unmagnetisch. Diamagnetismus tritt bei allen Stoffen auf, wird jedoch bei einigen von wesentlich stärkeren Effekten (z.B. Para- oder Ferromagnetismus) überlagert.

Paramagnetische Stoffe besitzen wenigstens eine ungepaarte Ladung. Dadurch weisen sie ein permanentes magnetisches Moment auf [Tipler, 1994]. Diese Stoffe besitzen eine positive magnetische Suszeptibilität ($\chi_m > 0$), die proportional der Anzahl ungepaarter Ladungen ist. Ohne äußeres Magnetfeld sind die Orientierungen der einzelnen magnetischen Momente jedoch durch die thermische Bewegung willkürlich verteilt. Es resultiert keine makroskopische Magnetisierung. Im Magnetfeld jedoch, versuchen sich paramagnetische Stoffe parallel zu den Feldlinien auszurichten. Durch ihr eigenes magnetisches Moment bewirken sie so eine temperaturabhängige, lokale Erhöhung der Feldstärke. Das Gesetz von Pierre Curie beschreibt diesen Zusammenhang [Gerthsen, 2004]:

$$\chi_m = \frac{C}{T} ; \quad \begin{array}{l} \text{mit C=Curie-Konstante (materialabhängig)} \\ \text{und T=Temperatur} \end{array} \quad (3.1-2)$$

Ferromagnetismus ist ein typisch kollektives Phänomen. Hervorgerufen durch Austauschwechselwirkungen zwischen den ungepaarten Elektronenspins benachbarter Atome koppeln in ferromagnetischen Stoffen die magnetischen Momente der einzelnen Atome miteinander [Tipler, 1994]. Sie können unterhalb der sogenannten *Curie-Temperatur* T_c in einer spontanen Magnetisierung ohne Einwirkung eines äußeren Feldes in einen magnetisch geordneten Zustand übergehen. Dabei richten sich die magnetischen Momente über größere Kristallbereiche, sogenannte *Weißsche Bezirke* ($0,001-0,1 \text{ mm}^3$), parallel aus. Oberhalb der Curie-Temperatur geht die Orientierung der magnetischen Momente jedoch aufgrund von thermischer Bewegung verloren. Das Material verhält sich dann paramagnetisch.

Das magnetische Moment eines Festkörpers ergibt sich als vektorielle Summe aller atomaren magnetischen Momente pro Volumeneinheit (V) und heißt Magnetisierung \vec{M} :

$$\vec{M} = \frac{1}{V} \cdot \sum_1^n (\vec{p}_m + \vec{s}_m) \quad (3.1-3)$$

In einem unmagnetisierten, ferromagnetischen Festkörper ist die Ausrichtung der Weißschen Bezirke statistisch verteilt, und ihre magnetischen Wirkungen heben sich nach außen hin gegenseitig auf. Wird ein Magnetfeld angelegt, richten sich die magnetischen Momente der Weißschen Bezirke mit zunehmender Feldstärke parallel zueinander aus. Sind alle Do-

mänen ausgerichtet, ist die Sättigungsmagnetisierung erreicht. Wird nun das Magnetfeld unterhalb der Curie-Temperatur abgeschaltet, so verbleibt eine Remanenzmagnetisierung. In Abbildung 3.1-1 ist die typische Magnetisierungskurve eines ferromagnetischen Stoffes dargestellt. Deutlich ist die Hystereseschleife zu erkennen.

3.1.1 Superparamagnetismus

Beim Übergang zu mesoskopischen Systemen treten allerdings ganz neue magnetische Eigenschaften auf. Je stärker die Dimension oder die Geometrie eingeschränkt sind, desto mehr weicht das magnetische Verhalten von dem ausgedehnter Festkörper ab, da Oberflächen- und Randeffekte dominierend werden [Meicken, 1998].

Sehr interessante magnetische Eigenschaften besitzen beispielsweise ferromagnetische Partikel einer Größe von nur wenigen Nanometern. Aufgrund der reduzierten Größe (Durchmesser < 50 nm) zeigen derartige, suspendierte Partikel plötzlich paramagnetisches Verhalten. Die Partikel sind Eindomänenpartikel und besitzen eine hohe Magnetisierbarkeit bei nur geringen Feldstärken. Sie richten sich beim Anlegen eines äußeren Magnetfeldes in paralleler Richtung aus. Im feldfreien Raum kehren sie dann wieder in den ungeordneten, frei beweglichen Zustand zurück. Eine residuale Restmagnetisierung und Partikelaggregation wie bei ferromagnetischen Permanentmagneten tritt dabei nicht auf.

Dieses Phänomen erklärt sich folgendermaßen: Unterschreitet ein ferromagnetisches Partikel ein kritisches Volumen V_c , ist die Multidomänenstruktur energetisch nicht mehr günstig. Alle Spins in diesem Partikel tendieren dann dazu, sich in einer einzelnen ferromagnetischen Domäne zu ordnen [Ryazanov, 2004]. Die Spins der einzelnen Atome sind hier zwar noch korreliert, die thermische Energie ist allerdings größer als die Kristallanisotropieenergie [Bergmann; Schaefer, 2006]. Dadurch folgt die Magnetisierungsrichtung in Abwesenheit eines ordnenden, äußeren Magnetfeldes der thermischen Fluktuation, und es kommt zu einem Verlust der Remanenz.

Dieses hysteresefreie Verhalten wird als Superparamagnetismus bezeichnet. Die Fluktuationsfrequenz in Eindomänenteilchen ist stark größenabhängig. Unterhalb einer kritischen Temperatur, der „blocking“ Temperatur T_B , sind die Fluktuationen eingefroren. Statt superparamagnetischem tritt dann ferromagnetisches Verhalten auf. Steigt die Temperatur über die Curie-Temperatur, wird paramagnetisches Verhalten beobachtet [Bergmann; Schaefer, 2006]. Abbildung 3.1-1 zeigt typische Magnetisierungskurven ferro-, para-, dia- und superparamagnetischer Stoffe.

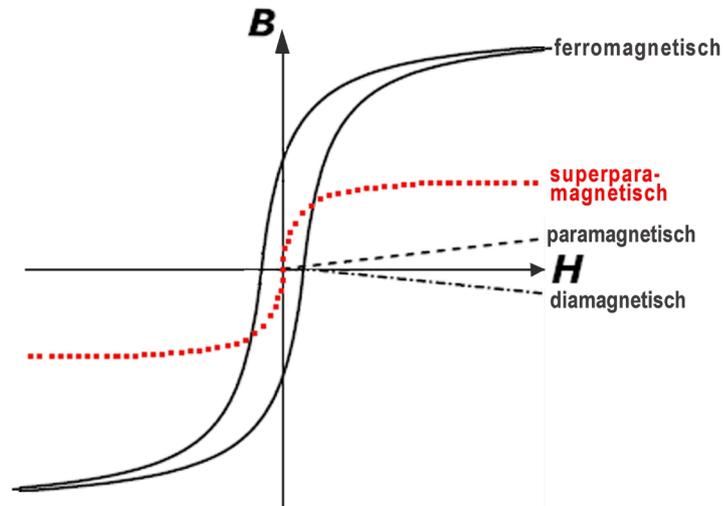


Abbildung 3.1-1: Typische Magnetisierungskurven ferro- para-, dia- und superparamagnetischer Stoffe

3.2 Synthese superparamagnetischer Partikel

Ein Verfahren zur Herstellung superparamagnetischer Partikel ist die Emulsionspolymerisation von Methacrylat und Divinylbenzol in Anwesenheit von Magnetit Nanopartikeln, die mit Ölsäure beschichtet sind [Liua et al., 2005]. Bei diesem Verfahren werden Partikel mit einem Durchmesser von 390 nm und einer sternförmigen Struktur erhalten, die eine sehr große spezifische Oberfläche aufweisen.

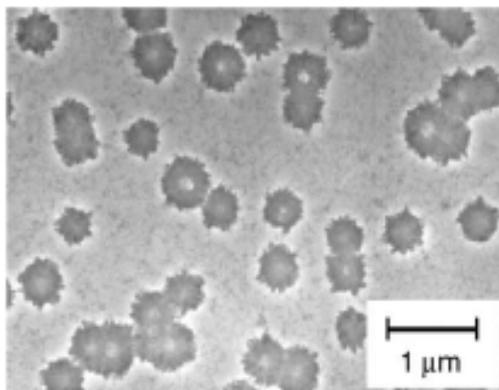


Abbildung 3.2-1: TEM-Aufnahme der sternförmigen Poly(metacrylat-divinylbenzol)-Partikel [Buchholz; Kasche, 1997]

Durch Gasphasenkondensation von Eisen(III)-acetylacetonat mit Tetraethylortosilicat bei einer Reaktionstemperatur von 1.000 °C und einem Druck von 40 mbar ist es möglich, superparamagnetische Silica-Partikel herzustellen [Yu et al., 2003]. Dabei werden Partikel mit einer Größe von 20 -30 nm Durchmesser erhalten.

Vereinzelt werden superparamagnetische Partikel, sogenannte Magnetosomen, auch semi-synthetisch durch Kultivierung magnetotaktischer Bakterien hergestellt [Wacker et al., 2006].

Aber auch durch basische Fällung einer Eisen (II)-/ Eisen(III)-Chloridlösung können superparamagnetische Partikel hergestellt werden [Bruce et al., 2004]. Die auf diesem Wege erhaltenen Magnetit-Nanopartikel (Fe_3O_4) können dann anschließend entweder über einen Sol-Gel-Prozess oder über langsame Polymerisation einer Natriumsilikatlösung mit Silica beschichtet werden. Hierbei kommt es zur Ausbildung kovalenter Fe-O-Si- und Si-O-Si-Bindungen und die Magnetitkerne werden vollständig durch die Silica-Matrix umhüllt.

Die Größe der magnetischen Silica-Partikel kann dabei sowohl über das Fe/Si-Verhältnis, als auch über den pH-Wert und die Temperatur der Reaktionslösung beeinflusst werden.

Um die superparamagnetischen Partikel für die kovalente Anbindung von Biomolekülen zugänglich zu machen, müssen in weiteren Reaktionsschritten reaktive Gruppen als Bindungsanker auf die Partikeloberfläche aufgebracht werden. Dies kann z.B. durch Kondensationsreaktion der Si-OH-Gruppen mit entsprechend funktionalisierten Silanen erfolgen, wie dies am Beispiel der Aktivierung mit Chlormethyl-Gruppen in Abbildung 3.2-2 dargestellt ist. Diese Methode findet auch bei der Oberflächenaktivierung zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten SiMAG-MeCl Partikel Anwendung (s. Kap. 3.4, S. 31).

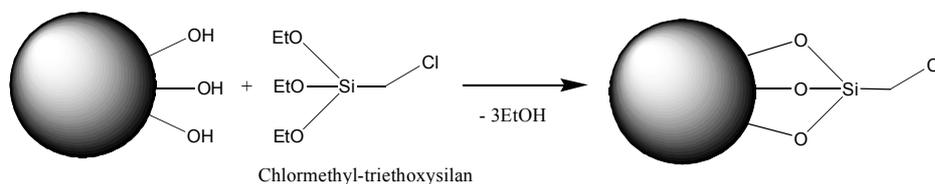


Abbildung 3.2-2: Oberflächenaktivierung superparamagnetischer Silica-Partikel mit Chlormethyl-triethoxysilan

3.3 Anwendungen superparamagnetischer Partikel

Biomolekular funktionalisierte magnetische Partikel werden aufgrund ihres großen Anwendungspotentials intensiv erforscht [Katz; Willner, 2004]. Vor allem zur Aufkonzentrierung, Trennung, mechanischen Translokation und zum Targeting von Biomaterialien werden diese Hybride verwendet.

Neben den biotechnologischen/medizinischen Anwendungen solcher magnetischen Partikel, von denen einige in den folgenden Kapiteln (3.3.2-3.3.4) kurz beschrieben werden, findet man auch in zahlreichen Organismen, wie z.B. Bakterien (*Magnetospirillum sp.*), Wanderameisen (*Pachycondyla marginata*), Honigbienen, Tauben, Regenbogenforellen oder Lachsen, kleine kristalline Magnetit-Partikel [Safarik; Safarikova, 2002]. Sie stellen eine Art Kompass dar, mit dem sich die Tiere am Erdmagnetfeld orientieren. Der exakte physikalische Mechanismus, der den magnetischen Sinnesreiz in Nervensignale umwandelt, ist bisher

jedoch noch weitgehend unbekannt [Winklhofer, 2004] und Gegenstand aktueller Untersuchungen [Desoil et al., 2005].

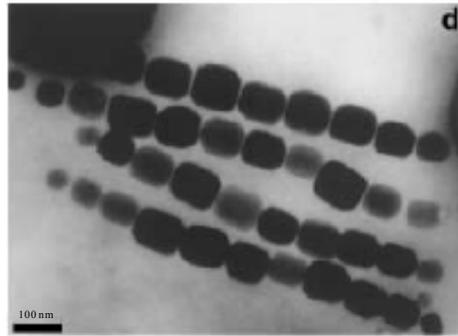


Abbildung 3.3-1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von intrazellulären Magnetosomen in magnetotaktischen Bakterien [Safarik; Safarikova, 2002]

3.3.1 Medizinische Anwendungen superparamagnetischer Partikel

Superparamagnetische Partikel finden heute vielfältige medizinische Anwendung [Gravina et al., 2002]. Der biomedizinische Einsatz von Magnetpartikeln kann prinzipiell in zwei Kategorien eingeteilt werden. Man unterscheidet zwischen dem Einsatz *in vitro* und *in vivo* [Gijs, 2004].

In vivo werden Magnetpartikel beispielsweise bei der Hyperthermie oder als magnetisch manipulierbare Träger von Arzneimitteln in der Krebstherapie genutzt. Aber auch als Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie (MRT) finden magnetische Partikel Ihre Anwendung.

Um die Magnetpartikel gezielt im Tumorgewebe anreichern zu können, werden sie bei der *Magnet Flüssigkeits-Hyperthermie (MFH)* mit biomolekular spezifischen Hüllen versehen. Anschließend werden die Magnetpartikel durch Anlegen eines äußeren magnetischen Wechselfelds lokal auf 45-48 °C aufgeheizt. Durch die Wärmeeinwirkung kommt es dann zur Zerstörung der Tumorzellen. Das Verfahren der Hyperthermie ist minimalinvasiv und lokal effektiv, so dass das umliegende, gesunde Gewebe weitestgehend unversehrt bleibt [Jordan, 2001].

Entwickelt wurde die MFH von Dr. Jordan et. al. an der Charité in Berlin. Seit 2003 führte er zusammen mit den Unternehmen MFH Hyperthermiesysteme GmbH (Deutschland) und MagForce Applications GmbH (Deutschland) mehrere klinischen Machbarkeits- und Wirksamkeitsstudien dieses Verfahrens an der Charité durch [Schattenfroh, 2003], [MagForce Nanotechnologies AG, 2006]. In Kombination mit anderen Behandlungsverfahren, wie Chemotherapie oder Bestrahlung, soll dieses Verfahren den Therapieerfolg bei der Krebsbehandlung positiv unterstützen [Pankhurst et al., 2003], [Johannsen et al., 2005].

Neben der thermischen Zerstörung des Tumorgewebes kann die Behandlung auch durch Beladen der Magnetpartikel mit therapeutischen Radionucleotiden erfolgen, die gezielt in den Zellen des Tumorgewebes angereichert werden [Häfeli et al., 2001], [Yu et al., 2002]. Eine weitere medizinische Applikation superparamagnetischer Partikel ist der Einsatz in sogenannte „magnetically guided drug delivery“-Systemen [Kaminski et al., 2003], [Jain et al., 2005]. Durch maßgeschneiderte Oberflächen lassen sich die Magnetpartikel reversibel mit Wirkstoff beladen. Die beladenen Teilchen können dann zielgerichtet durch den Körper geleitet werden (drug targeting). Am gewünschten Wirkort werden die Magnetpartikel durch Anlegen eines starken, äußeren Magnetfeldes ($\nabla(H^2/2) \approx 10^7 \text{ Oe}^2/\text{cm}$; [Makhmudov et al., 1997]) aufkonzentriert und festgehalten. Die Verweilzeit des Medikamentes im Wirkgebiet kann so erheblich verlängert werden. Zusätzlich besteht bei einigen „drug delivery“-Systemen die Möglichkeit, die Wirkstofffreisetzung am Wirkort gezielt durch einen äußeren Impuls zu induzieren. So ist der Wirkstoff nicht nur am richtigen Ort verfügbar, sondern auch zur vorgeschriebenen Zeit (controlled release). Die Wirkstoffkonzentration im Rest des Organismus kann dadurch sehr gering gehalten werden, so dass insgesamt eine Reduzierung der eingesetzten Wirkstoffdosis und eine Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen erreicht wird [Koneracká et al., 2002].

Anwendungsgebiete magnetischer „Drug delivery“-Systeme sind beispielsweise die Krebstherapie und der Schutz von Implantaten im Herz-Kreislauf-System [Hoheisel, 2004].

Die Verwendung von Magnetpartikeln in der Gentherapie ist Gegenstand neuerer Untersuchungen [Pankhurst et al., 2003]. Hierzu wird ein viraler Genvektor, der das therapeutische Gen enthält, auf der Partikeloberfläche aufgebracht. Ein äußeres Magnetfeld hält die Partikel ebenso wie bei den „magnetically guided drug delivery“-Systemen gezielt am Wirkort fest. Daraus resultiert ein verlängerter Kontakt des Vektors mit dem zu behandelnden Gewebe, wodurch eine höhere Transfektionsrate und gesteigerte Genexpression erreicht wird [Mah et al., 2002].

Die Möglichkeit mit Hilfe von Magnetpartikeln spezifisch Zellen oder Biomoleküle zu markieren, führte in den vergangenen Jahren zu einem breiten Spektrum an in vitro Anwendungen. Ein Beispiel dafür ist die magnetische Transfektion, das Analogon der oben beschriebenen Methode zur Erhöhung der Transfektionsrate in der Gentherapie. Die magnetische Transfektion wird jedoch auf Zellkulturen angewandt [Plank et al., 2003], [Morishita et al., 2005].

Kommerziell erhältliche Reagenzien wie MagnetofectionTM (Chemicell GmbH, Berlin) oder MATra (IBA GmbH, Göttingen) ermöglichen in diesem Bereich eine sehr effiziente Trans-

fektion adhärenter Zellen ebenso wie von Suspensionszellen (z.B. K-562, HeLa, CHO, HepG2 oder USOS) [IBA GmbH, 2005]. Im Vergleich mit Standardtransfektionsverfahren liegen die erreichbaren Transfektionsraten bei der magnetischen Transfektion um drei Zehnerpotenzen höher [Chemicell GmbH, 2006]. Damit verbunden ist eine entsprechend höhere Genexpression, so dass bei der magnetisch vermittelten Transfektion mit deutlich geringen Vektordosen gearbeitet werden kann. Weiterhin reduziert sich die Inkubationszeit bei diesem Verfahren von bisher mehreren Stunden auf wenige Minuten. Mit der Verwendung von Magnetpartikeln bei der Gentransfektion steht somit ein Verfahren zur Verfügung, das ein großes Potential zur Reduzierung der Kosten des Transfektionsprozesses sowohl in der Gentherapie als auch in der biomedizinischen Forschung birgt.

Auch in der Diagnostik finden Magnetpartikel Anwendung [Saiyed et al., 2003]. Mit Hilfe von Ferrofluiden können beispielsweise Krebszellen aus den Blutproben von Patienten mit Brust-, Lungen- oder Prostatakrebs isoliert werden [Liberti et al., 2001]. Auch bei der Prostatakrebsvorsorge werden Magnetpartikel in einem immunomagnetischen Assay zum Nachweis des Antigens PSA eingesetzt [Fischer et al., 2005].

Ein Hauptanwendungsgebiet superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel (SPIO) *in vitro* ist die Verwendung als bildgebende Kontrastmittel bei der Magnetresonanztomographie (MRT) [Princea et al., 2003]. Aufgrund ihrer magnetischen Eigenschaften verändern diese Partikel die T_1 - und T_2 -Relaxationszeit und beeinflussen dadurch das Resonanzsignal. Neben ihrer höheren magnetischen Wirkung im Vergleich zu Gadolinium-haltigen Kontrastmitteln, besitzen SPIO-Partikel auch unter toxikologischen Aspekten deutliche Vorteile. Die Magnetpartikel sind physiologisch unbedenklich und werden letztlich in der Milz und der Leber wie körpereigenes Eisen abgebaut [Taupitz, 2004]. Für diesen Anwendungsbereich zugelassene, kommerziell erhältliche Kontrastmittel sind z.B. Endorem[®] (seit 1994) und Resovist[®] (seit 2002).

Bei der Magnetresonanztomographie der Leber und Milz eignen sich SPIO besonders als intravenös verabreichbares MRT-Kontrastmittel, da die Zellen des Mononukleären Phagozytierenden Systems (MPS) unspezifisch Partikel aus der Blutbahn aufnehmen können [Saini et al., 1987]. So wurde die Detektion von fokalen Leberläsionen mit MRT-Verfahren durch den Einsatz von superparamagnetischen Eisenoxid-Partikeln deutlich verbessert. Die Sensitivität der SPIO-verstärkten MR-Tomographie ist vergleichbar mit der weit verbreiteten arteriportalen Computertomographie (CTPA). Doch zeigt das MRT-Verfahren eine geringere Rate an falsch positiv Befunden [Ba-Ssalamah et al., 2000] und ist im Gegensatz zur CTAP nicht invasiv [Buchholz; Kasche, 1997]. Außerdem liefert die

Verwendung von SPIO-Partikeln Zusatzinformationen zur Tumorcharakterisierung [Taupitz, 2004]. Neben der Tumordiagnostik in Leber und Milz, ist ein weiterer Einsatzschwerpunkt die Lymphknotendiagnostik und die morphologische und funktionelle MR-Untersuchung des Knochenmarks. Endorem[®]-Partikel können auch zu MR-angiographischen Untersuchungen verwendet werden [Schmitz et al., 1999]. Mittlerweile wurden aber speziell für die kontrastverstärkte MR-Angiographie ultrakleine Magnetpartikel (USPIO) entwickelt. Die USPIOs sind besser zur Gefäßdarstellung geeignet [Allkemper et al., 2002], da sich in der Regel mit geringerer Partikelgröße die intravasale Verweildauer verlängert und das Verhältnis zwischen signalsteigernder T_1 - und signalschwächerer T_2 -Relaxivität zunimmt.

3.3.2 Einsatz von Magnetpartikeln zur magnetischen Zellseparation

Es gibt eine Vielzahl von Anwendungsgebieten für die magnetische Zellseparation. Neben den vielen Anwendungen in der Molekularbiologie findet magnetische Zellseparation auch in der klinischen Diagnostik [Häfel et al., 1997] (vgl. Kap. 3.3.1, S. 22) und der Lebensmittelanalytik Verwendung. So wurden beispielsweise 1984 erstmals Salmonellen mittels immunomagnetischer Separation direkt von Lebensmittel- und Fäkalproben isoliert [Mittingly, 1984]. *Legionella* Bakterien in Wasserproben können ebenfalls mit Magnetpartikeln isoliert werden [Kronick; Gilpin, 1986]. Und auch die Isolierung von *E. coli* aus Gemüse ist mit immunomagnetischen Partikeln möglich [Deponte et al., 2004], [Safarik; Safarikova, 2001]. Da im Rahmen dieser Arbeit nur ein kurzer Einblick in diese Technik gegeben werden kann, soll hier auf die umfangreich verfügbare Literatur verwiesen werden (s. z.B. [Elaissar, 2004], [Safarik; Safarikova, 1999], [Safarik; Safarikova, 1995], [Uhlen et al., 1994], [Payne 1993], [Payne 1992]).

Grundsätzlich können zwei Typen magnetischer Zellseparation unterschieden werden. Zum einen können die abzutrennenden Zielzellen ein intrinsisches magnetisches Moment besitzen, so dass eine magnetische Separation direkt, ohne weitere Modifikation der Zellen, möglich ist. Zu diesen Zellen gehören Erythrozyten, die eine hohe Konzentration an paramagnetischem Hämoglobin aufweisen und magnetotaktische Bakterien, die in ihrem Zellinneren Magnetit-Partikel besitzen (vgl. Kap. 3.3, S.19).

Beim zweiten Typ magnetischer Zellseparation besitzen die Zellen kein eigenes magnetisches Moment. Sie müssen mit einer magnetischen Komponente (Magnetpartikel) ausgestattet werden, um einen genügend großen Unterschied zwischen der magnetischen Suszeptibilität der Zelle bzw. des Partikel/Zell-Komplexes und des Mediums zu erhalten.

Der Prozess der immunomagnetischen Zellseparation lässt sich grundsätzlich in drei Arbeitsschritte unterteilen, wie dies in Abbildung 3.3-2 schematisch dargestellt ist:

- (1) Zuerst werden die mit Affinitätsliganden oder Antikörpern ausgestatteten Magnetpartikel zu einer Suspension der Zielzellen gegeben. Während dieser etwa 30-60 Minuten andauernden Inkubationsphase interagieren die Magnetpartikel mit den Zielzellen, wobei ein magnetischer Partikel/Zell-Komplex gebildet wird.
- (2) Dieser wird anschließend in einem magnetischen Separator vom Überstand abgetrennt und mehrfach gewaschen, um noch anhaftende Fremdstoffe zu entfernen. Jetzt können die abgetrennten Zellen mit den anhaftenden Magnetpartikeln beispielsweise direkt in Kultivierungen weiter verwendet werden.
- (3) Es gibt jedoch auch Anwendungsgebiete der magnetischen Zellseparation, bei denen sich die anhaftenden Magnetpartikel als störend erweisen, so dass sie in einem dritten Reaktionsschritt wieder von den Zellen abgelöst werden müssen.

Neben der Möglichkeit, die Zellseparation in einem batch-Prozess durch zu führen, lässt sich die magnetische Zellseparation auch kontinuierlich, analog zu chromatographischen Techniken in einem sogenannten „*magnetically stabilized fluidised bed*“ Verfahren (MSFB) durchführen. Hierfür gibt es bisher allerdings nur wenige Beispiele [Putnam et al., 2003], [Terranova; Burns, 1990].

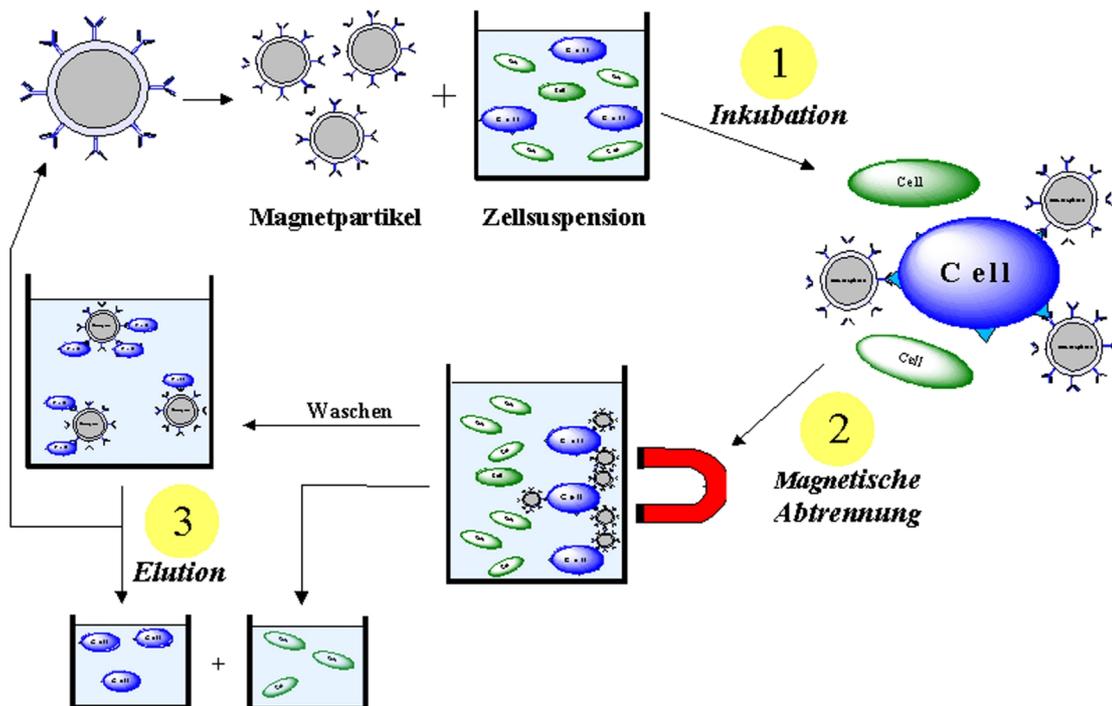


Abbildung 3.3-2: Mechanismus der immunomagnetischen Zellseparation

Gegenüber anderen Separationstechniken besitzt die magnetische Zellseparation deutliche Vorteile. So können die Zielzellen direkt aus Blutproben, Gewebehomogenaten, Fermentationsbrühen, Stuhl- oder Lebensmittelproben isoliert werden, ohne dass dafür zeitaufwendige Arbeitsschritte, wie Kultivierung in selektierenden Medien, Zentrifugation oder Extraktion erforderlich sind. Zudem ist die immunomagnetische Zellseparation ein besonders schonendes Verfahren zur Zellabtrennung, da die hierbei auftretenden Scherkräfte deutlich geringer als bei der Zentrifugation oder Filtration sind. Ein weiterer Vorteil dieser Separationstechnik ist die Möglichkeit, auch beschädigte oder tote Zellen zu isolieren [Mansfield; Forsythe, 1993]. Häufig ist dies mit alternativen Separationsverfahren nicht möglich. Zudem kann die magnetische Zellseparation leicht automatisiert werden. So gibt es mittlerweile automatisierte Apparaturen zur Isolierung von humanen Zellen, wie beispielsweise die *CliniMACS* oder *AutoMACS* Anlagen der Firma Miltenyi Biotech (Deutschland).

3.3.3 Isolierung und Detektion von Biomolekülen mit Magnetpartikeln

Die Isolierung und Aufreinigung von Biomolekülen aus unterschiedlichsten Reaktionslösungen ist ein wichtiges Aufgabengebiet in der Biotechnologie. Magnetpartikel werden nach entsprechender Modifikation sowohl zur Separation als auch bei der Detektion von Biomolekülen, wie Proteinen, Aminosäuren, DNA oder RNA verwendet.

Im Vergleich zu chromatographischen, elektrophoretischen und Ultrafiltrations-Verfahren besitzen magnetische Separationsverfahren deutliche Vorteile. Beispielsweise ist der Einsatz von Magnetpartikeln schon in sehr frühen Stadien der Isolierung von Biomolekülen möglich. Viele magnetische Separationstechniken können direkt mit Rohextrakten und Lösungen, die einen hohen suspendierten Feststoffgehalt aufweisen, durchgeführt werden, ohne dass störende Bestandteile zuvor aufwendig abgetrennt werden müssen [Safarik; Safarikova, 2004]. Die Isolierung von Biomolekülen mit Magnetpartikeln ist ein sehr einfaches Verfahren mit nur wenigen Arbeitsschritten, das ohne teure Chromatographie-Systeme oder Zentrifugen durchgeführt werden kann. Magnetische Separationsverfahren sind zudem sehr produktschonend. Mit ihnen ist beispielsweise die Isolierung großer Proteinkomplexe möglich, die durch konventionelle Chromatographieverfahren häufig nicht abzutrennen sind, da sie auf der Säule auseinander brechen.

Um Biomoleküle gezielt aus einer Reaktionslösung abzutrennen, wird ein breites Spektrum an magnetischen Separationsverfahren verwendet. Neben der magnetischen Affinitäts-, Ionenaustausch-, hydrophoben und adsorptiven batch-Separation werden auch magnetisch modifizierte Zweiphasen-Systeme und magnetisch stabilisierte Fließbett-Systeme (vgl. 3.3.2,

S.24) verwendet. Die Größe der eingesetzten Magnetpartikel variiert von 50 nm bis 10 μm . Ein Beispiel für den Einsatz von Magnetpartikeln in einem kontinuierlichen Prozess ist die erfolgreiche Aufreinigung von Immunoglobulin G (IgG) aus humanem Plasma in einem magnetisch stabilisierten Fließbettreaktor (MSFB). Poly(ethylenglycol dimethacrylat-N-methacryl-L-histidinmethylester)-Partikel (m-poly (EGDMA-MAC)) mit einem Durchmesser von weniger als 5 μm wurden dafür von Özkara et al. verwendet [Özkara et al., 2004].

Deutlich größere Partikel ($\text{Ø}=80\text{-}240 \mu\text{m}$) verwendeten X.-D. Tong und Y. Sun in ihrem MSFB-Reaktor, in dem sie Lysin an magnetische Agarose-Partikel adsorbierten [Tong; Sun, 2003]. Noch größere Partikel kamen bei der Isolierung von α -Amylase zum Einsatz, wo magnetische Alginatpartikel mit Durchmessern im Millimeterbereich eingesetzt wurden [Teotia; Gupta, 2001].

Ein Anwendungsbeispiel magnetischer Ionenaustausch-Separation ist die Isolierung von Aminosäuren. Als magnetische Komponente eignen sich dabei Partikel mit einem Stahlkern und einer Hülle aus Poly(styrol-divinylbenzol) [Tong; Sun, 2004].

Zur Isolierung von Proteinen und Peptiden wird häufig die Affinitäts-Separation verwendet. Mit Streptavidin, Antikörpern, Protein A und Protein G modifizierte Magnetpartikel finden hier ihre Anwendung. Bei der Isolierung His-getagter Proteine werden z.B. mit Tris(carboxymethyl)amin modifizierte Nanopartikel als Affinitätsligand verwendet. Wie Xu et al. zeigen konnten, werden mit entsprechend modifizierten Magnetpartikeln Proteinbindungskapazitäten von 2-3 mg/mg Partikel erreicht [Xu et al., 2004].

Die Abtrennung von DNA aus dem Zelllysate von Blut, Speichel oder auch Bakterienkulturen kann ebenfalls mittels magnetischer Separation erfolgen. Die zu isolierende DNA wird dabei reversibel an die Magnetpartikel gebunden. Nach der magnetischen Separation des konjugierten Nanobead-DNA Komplexes wird die DNA anschließend von den Magnetpartikeln eluiert [Xie et al., 2004]. Im Vergleich mit alternativen Methoden, wie der DNA-Isolierung durch die Phenol/Chloroform-Methode, liefert die magnetische Separation zwar geringere Ausbeuten (nur etwa 53% der Ausbeute der Phenol/Chloroform-Methode), ist allerdings erheblich schneller (20 min statt 2,5 h).

Die Verwendung von Magnetpartikel beschränkt sich allerdings nicht nur auf die Isolierung von Biomolekülen. In unterschiedlichsten Sensorsystemen werden Magnetpartikel auch zur Detektion von Biomolekülen verwendet.

Zur Detektion von DNA werden beispielsweise Magnetpartikel gekoppelt mit PCR-ELISA eingesetzt. Dabei werden zur Ziel-DNA komplementäre DNA-Einzelstränge auf den Magnetpartikeln immobilisiert. Durch Hybridisierung der in einer zu untersuchenden Probe ent-

haltenen Ziel-DNA mit dem immobilisierten DNA-Strang wird diese an die Magnetpartikel gebunden und kann leicht magnetisch abgetrennt werden. Die Detektion erfolgt anschließend durch PCR-ELISA, wobei die DNA auf den Magnetpartikeln verbleiben kann. Ein Beispiel für die Anwendung dieses Verfahrens ist die von Fuentes et al. beschriebene Detektion der cDNA des Hepatitis C Virus (HCV) [Fuentes et al., 2006]. Durch den Einsatz von Magnetpartikeln war es möglich, HCV cDNA in einer Konzentration von 10^{-18} g/mL ($\hat{=}$ zwei Molekülen HCV cDNA) zu detektieren, wobei ein $2,5 \cdot 10^6$ -facher Überschuss an nicht komplementärer DNA in der Probe keinen Einfluss auf den Nachweis hatte. Aufgrund der hohen Spezifität dieser Methode und ihrer Unempfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl an Versuchsbedingungen, besitzt dieses Verfahren ein hohes Potential, zukünftig in der Molekulardiagnostik Anwendung zu finden.

Magnetpartikel werden allerdings noch in einer Vielzahl weiterer Sensorsysteme zur Detektion unterschiedlichster Biomoleküle verwendet. In Immunoassay-Systemen beispielsweise, werden Antigen- und Antikörper-funktionalisierte Magnetpartikel als Sensoren eingesetzt. Derart modifizierte Magnetpartikel können magnetisch auf der Oberfläche einer Quarzkristall-Mikrowaage fixiert werden [Marquette; Blum, 2006]. Durch Reaktion der Magnetpartikel mit dem Targetmolekül kommt es dann zu einer Masseanlagerung auf der Oberfläche der Mikrowaage, womit eine messbare Änderung der Resonanzfrequenz des Quarzkristalls einhergeht. Der Charme eines solchen Sensorsystems liegt in der schnellen Regeneration der Sensoroberfläche, die durch den einfachen Austausch der Magnetpartikel möglich ist [Katz; Willner, 2004].

Ein weiterer sehr verbreiteter Ansatz zur Detektion von Biomolekülen besteht darin, an das Zielmolekül einen Marker zu binden, der unter den gegebenen Analysebedingungen ein extern beobachtbares Signal erzeugt. Die biomolekulare Erkennung zwischen dem Zielmolekül und dem Marker erfolgt dabei über spezifische Rezeptoren (z.B. Antikörper), die an den Marker gebunden sind. Traditionelle Marker sind z.B. Radioisotope und Fluoreszenzfarbstoffe. Aber auch superparamagnetische Partikel können als Marker genutzt werden. Sie besitzen einige Vorteile gegenüber den herkömmlichen Markern. So sind die magnetischen Eigenschaften der Partikel zeitlich konstant und werden nicht durch die Chemie der Reagenzien beeinflusst. Außerdem besitzen biologische Proben keine signifikanten magnetischen Eigenschaften, so dass es zu keinen störenden Wechselwirkungen zwischen Probe, Marker und Sensor kommt und das Hintergrundrauschen minimal ist [Gijs, 2004]. Auch tritt das bei Fluoreszenzmarkern manchmal zu beobachtende Ausbleichen bei der Verwendung von Magnetpartikeln als Marker nicht auf. Die Möglichkeit, die Magnetpartikel durch

ein äußeres Magnetfeld lenken und damit an gewünschte Positionen auf dem Sensor fixieren zu können, stellt einen weiteren Vorteil dieser Sensoren dar [Reiss et al., 2005]. Zusätzlich besitzen magnetische Biosensoren eine deutlich höhere Selektivität, die mit herkömmlichen Markern bislang nicht erreichbar ist.

Die Detektion der Magnetpartikel erfolgt mit sogenannten x-magnetoresistiv-Sensoren (XMR-Sensoren), wie beispielsweise Riesen-Magnetwiderstand-Sensoren (GMR; *Giant Magneto Resistance*), Tunnel-Magnetwiderstand-Sensoren oder Anisotrop-Magnetoresistiv-Sensoren (AMR-Sensoren).

Das Messprinzip beruht auf der Widerstandsänderung des schichtartig aufgebauten Sensorsystems (Abbildung 3.3-3). Gelangen die Magnetpartikel über die Sensorfläche, werden sie durch ein äußeres Magnetfeld magnetisiert und bauen ein magnetisches Störfeld auf. Dieses Störfeld ändert die Magnetisierung der Sensorschichten wodurch der elektrische Widerstand des Sensors um ca. 8-9 % erhöht wird. Die Veränderung des Widerstand kann anschließend als elektrisches Messsignal ausgelesen werden.

Durch die Kopplung der Sensoren an etablierte Halbleitertechnik können magnetische lab-on-a-chip-Systeme aufgebaut werden, welche die direkte Auswertung der Analyseergebnisse ermöglichen [Brückl et al., 2006].

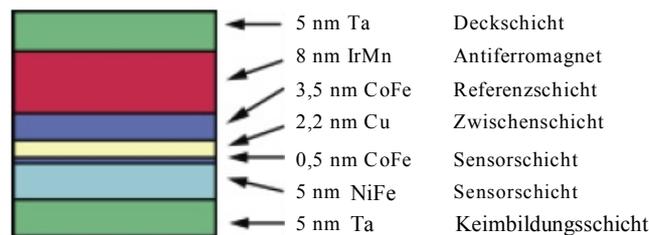


Abbildung 3.3-3: GMR-Schichtstapel. Der Antiferromagnet pinnt die Magnetisierung der Referenzschicht. Bei Magnetisierung der Sensorschicht parallel zur Referenzschicht ist der Widerstand des Sensorsystems minimal. Wird die Sensorschicht antiparallel zur Referenzschicht magnetisiert, erhöht sich der Widerstand aufgrund des GMR-Effekts um 8 – 9 %. [VDI, 2006].

Zur Detektion von Biomolekülen mit diesen Sensoren wird ein Sandwich-System aufgebaut. Sowohl auf der Sensoroberfläche als auch auf der Oberfläche der Magnetpartikel werden für das Zielmolekül spezifische Rezeptoren aufgebracht. Abbildung 3.3-4 zeigt eine schematische Darstellung der „Sandwich“-Konfiguration eines GMR-Sensors.

Durch Auftragen der Probe auf den Sensor werden die Magnetpartikel, vermittelt über das Zielmolekül, an die Sensoroberfläche fixiert und können dort detektiert werden.

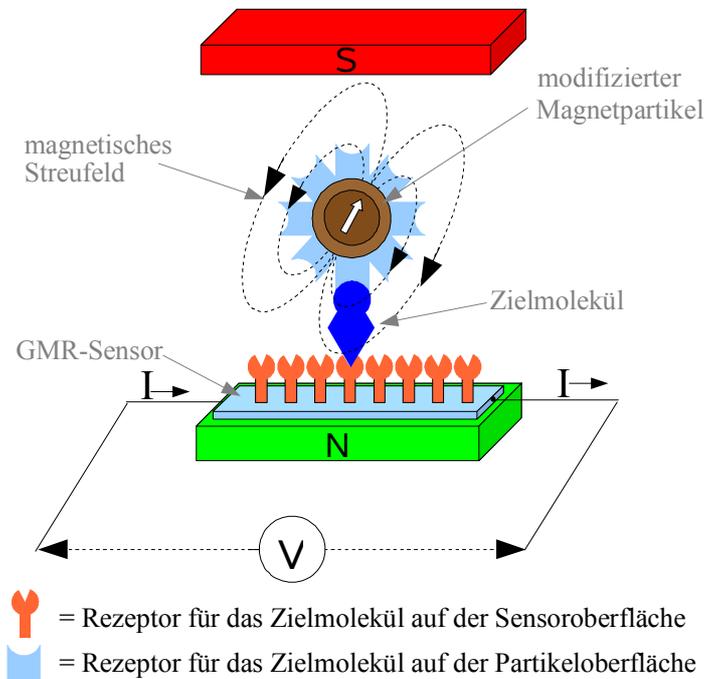


Abbildung 3.3-4: „Sandwich“-Konfiguration der magnetischen Markierung und Detektion eines Biomoleküls mit einem GMR-Biosensor (BARC; Bead Array Counter); das magnetisch markierte Biomolekül ist auf der Oberfläche des Sensors mittels biomolekularer Ligand-Rezeptor-Erkennung fixiert

Mit modernen GMR-Sensoren ist es möglich, extrem schwache magnetische Felder zu messen. Besitzt der Sensor eine ähnliche Größe wie der Marker und ist die Sensorschicht dünn genug, ist es mit GMR-Sensoren sogar möglich, einzelne Magnetpartikel mit einem Durchmesser von 200 nm zu detektieren [Wood et al., 2005].

Eine noch größere Sensitivität als GMR-Sensoren besitzen Tunnel-Magnetwiderstand-Sensoren (TMR; Tunnel Magneto Resistance). Wie Brückl et al. zeigten, geben TMR-Sensoren bei gleicher Sensorgröße ein vier mal stärkeres Messsignal als GMR-Sensoren [Brückl et al., 2005].

Neben GMR- und TMR-Sensoren werden auch ringförmige AMR-Sensoren als Biosensoren eingesetzt [Schotter, 2004]. Ihr Durchmesser wird ebenfalls auf die Größe der Magnetpartikel abgestimmt. Befindet sich ein Magnetpartikel über dem Sensorring, führt dies zu einer Änderung der Magnetisierung des Rings, woraus ein messbares AMR-Signal resultiert. AMR-Sensoren können als Ein/Aus-Partikelzähler verwendet werden und bieten vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Biosensorik.

3.3.4 „High Gradient Magnetic Fishing“ zur in-situ Produktabtrennung (ISPR=in-situ product removal)

Die oftmals hohen Kosten heutiger biotechnologischer Produktionsverfahren sind unter anderem darin begründet, dass sowohl Herstellung als auch Aufreinigung (downstream processing) über viele diskrete Verfahrensschritte erfolgen, wobei Methoden wie Filtration, Zentrifugation oder Aufkonzentrierung nur je eine Funktion erfüllen [Franzreb, 2003].

Die Verwendung magnetischer Sorbenspartikel bei der in-situ Produktabtrennung aus komplexen Medien bietet hier die Möglichkeit einer schnelleren und kostengünstigeren Aufarbeitung in deutlich weniger Reaktionsschritten. Hierbei kommt das sogenannte „High Gradient Magnetic Fishing“-Verfahren (HGMF) zum Einsatz [Hatch; Stelter, 2001].

Ein Anwendungsbeispiel für dieses Verfahren ist die Isolierung von Lectinen aus Hülsenfrüchten. Die Aufarbeitung und Klärung von Extrakten aus Hülsenfrüchten, einer der wichtigsten Quelle für Lectine, ist aufgrund des großen Anteils an suspendierten, weichen Feststoffpartikeln sehr schwierig [Heebøll-Nielsen et al., 2004]. Mit dem HGMF-Verfahren steht hierfür ein einfaches und schnelles Verfahren zur direkten Gewinnung der Lectine aus dem Rohextrakt zur Verfügung. Am *Center for Process Biotechnology, BioCentrum-DTU* der Technischen Universität von Dänemark konnte mit diesem Verfahren beispielsweise Concanavalin A aus einem Jackbohnenextrakt isoliert werden [Heebøll-Nielsen et al., 2004], [Heebøll-Nielsen et al., 2001]. Mit Dextran oberflächenmodifizierte Magnetpartikel werden in einem batch-Reaktor vorgelegt und im Bohnenextrakt suspendiert, wobei das Concanavalin A reversibel an die Partikel bindet. Mit Hilfe eines Hochgradienten-Magnetseparators (HGMS) werden die Magnetpartikel anschließend vom Bohnenextrakt abgetrennt. Das auf den Partikeln gebundene Protein wird eluiert, bevor die Magnetpartikel wieder dem Bohnenextrakt zugesetzt und dort erneut mit Protein beladen werden.

Eine andere Quelle zur Gewinnung von Lectinen stellen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) dar. Aus dem Extrakt der Knolle und dem Kartoffelfruchtwasser können Lectine ebenfalls durch Adsorption an magnetischen Chitosan-Partikeln und anschließende magnetische Separation der beladenen Magnetpartikel isoliert werden [Safarikova; Safarik, 2000].

Die Abtrennung von Lactoperoxidase [Justesen et al., 2001] oder Superoxid-Dismutase (SDO) [Meyer et al., 2005] direkt aus der bei der Käseerzeugung in große Mengen anfallenden Süßmolke ist ebenfalls durch die Verwendung von Magnetpartikeln als Separationsmatrix möglich. Die Erschließung dieser bislang fast ungenutzten Quelle ernährungsphysiologisch wertvoller Proteine hat in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Durch den Einsatz des HGMF-Verfahrens konnten die Proteine direkt aus der

anfallenden Süßmolke isoliert und damit eine neue Wertschöpfungsquelle erschlossen werden.

Im Gegensatz zu anderen Verfahren ist eine vorherige Aufarbeitung der Reaktionslösung bei der HGMF-Methode nicht nötig, da sie mit einer Vielzahl suspendierter Feststoffe kompatibel ist (vgl. 3.3.3, S. 25). Diese Separationstechnik stellt ein schnelles, schonendes Verfahren zur in-situ Produktabtrennung dar, das auch in komplexen, stark feststoffhaltigen Medien möglich ist. Die Methode weist eine hohe Flexibilität bezüglich des *scale-up* auf, so dass von Anlagen im Labormaßstab bis zu Anlagen, die im Kubikmetermaßstab arbeiten, eine große Bandbreite erschlossen werden kann [Hubbuch et al., 2001].

3.4 SiMAG-Partikel

Die kommerziell erhältlichen SiMAG-Partikel der Firma Chemicell (Berlin, Deutschland) bestehen aus einer inertierten Silica-Matrix und enthalten 80 % superparamagnetisches Eisenoxid. Die Partikel haben einen Durchmesser von 1-10 μm . Trotz ihres sehr geringen Durchmessers besitzen SiMAG-Partikel eine hohe spezifische Oberfläche von $A=100 \text{ m}^2/\text{g}$ und eignen sich deshalb gut zur Anbindung von Biomolekülen wie z.B. Proteinen, Enzymen oder Antikörpern.

Die in dieser Arbeit verwendeten SiMAG-Partikeln sind bereits aktiviert, d.h. die Partikel tragen bereits funktionelle Gruppen als Bindungsanker auf der Oberfläche, über die Biomoleküle kovalent gebunden werden können. Die Versuche zu dieser Arbeit wurden mit Partikeln mit Methylchlorid- (SiMAG-MeCl), Thiol- (SiMAG-SH) und Polyglutaraldehydgruppen (SiMAG-PGL) als Ankergruppen durchgeführt. Abbildung 3.4-1 zeigt eine (a) lichtmikroskopische und eine (b) elektronenrastermikroskopische Aufnahme von SiMAG-MeCl Partikeln. Deutlich ist die poröse Oberfläche mit der himbeerartigen Struktur der Partikel zu erkennen.

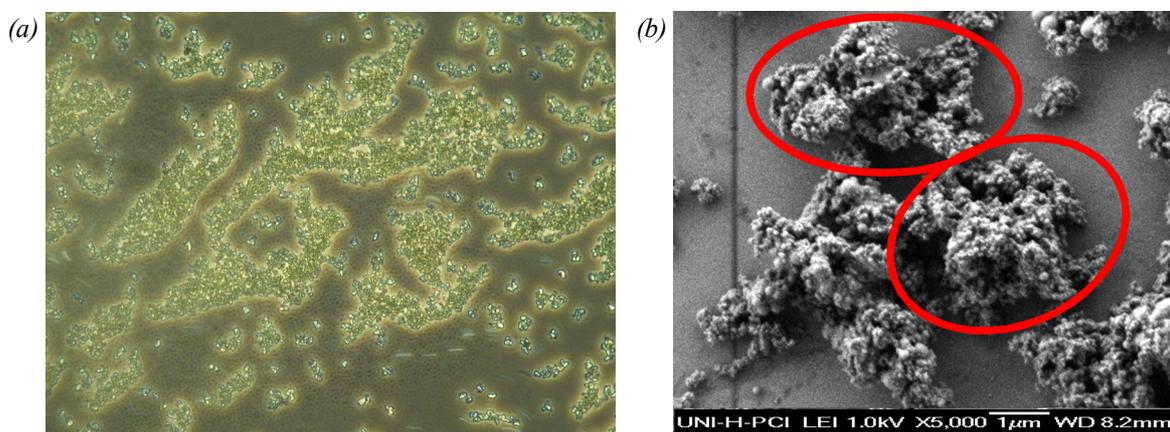


Abbildung 3.4-1: Aufnahmen von SiMAG-MeCl-Partikeln, aufgenommen mit einem

(a) Lichtmikroskop

(b) Rasterelektronenmikroskop

3.5 MagPrep[®]-Partikel

Die MagPrep[®]-Partikel der Firma Merck sind paramagnetische Silica-Partikel mit einem Eisenoxidanteil von 80%. Die Partikel werden als Suspension vertrieben. Sie besitzen eine Dichte von $\delta_{20\text{ °C}}=1,01\text{ g/cm}^3$ und einen Durchmesser von 0,5-5 μm . Die spezifische Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel beträgt 14-25 m^2/g (BET).

Die in dieser Arbeit verwendeten MagPrep[®]-Partikel besitzen keine funktionellen Ankergruppen für die Anbindung von Biomolekülen. Bevor sie zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden können, ist eine Oberflächenaktivierung nötig (vgl. Kap. 7, S. 80). Abbildung 3.5-1 zeigt eine REM-Aufnahme der MagPrep[®]-Partikel.

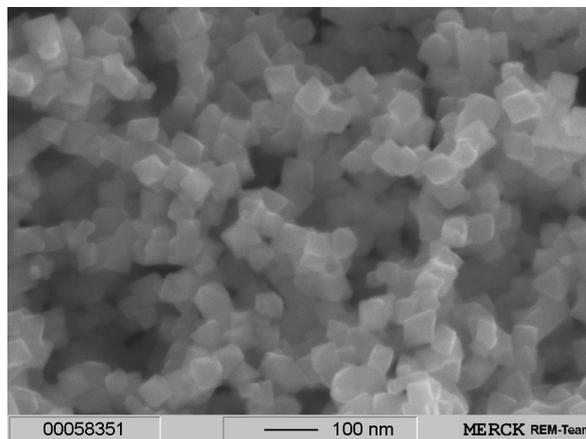


Abbildung 3.5-1: REM-Aufnahme von MagPrep[®]-Partikeln [REM-Team der Firma Merck KGaA]

4. Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikeln

Superparamagnetische Partikel eignen sich in besonderem Maße als Trägermatrizes bei der Enzymimmobilisierung, da sich die Partikel leicht in der Reaktionslösung homogen suspendieren lassen. Durch Anlegen eines äußeren Magnetfeldes sind sie nach Reaktionsende aber auch einfach von der Reaktionslösung zu separieren, wodurch zeitaufwendige Filtrations- und Zentrifugationsschritte entfallen. Die magnetische Abtrennung erfolgt zudem sehr viel schonender als mit anderen Separationstechniken, weshalb diese Trägermatrix für den technischen Einsatz sehr interessant ist. Ein bei der Separation durch Filtration und Zentrifugation häufig beobachteter Aktivitätsverlust, der auf die Beschädigung der labilen dreidimensionalen Struktur der Trägermatrix zurückzuführen ist, tritt bei der magnetischen Separation nicht auf.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur kovalenten Enzymimmobilisierung an Magnetpartikeln erfolgten hauptsächlich mit α -Chymotrypsin als Modellenzym. Sowohl durch seinen geringen Preis als auch seine geringe Empfindlichkeit gegenüber ausgewählten Immobilisierungsparametern, eignete es sich in besonderem Maße für die angestrebten Untersuchungen. Außerdem findet α -Chymotrypsin in der Enzymtherapie zur Krebsbehandlung und Stärkung des Immunsystems [Kosaris, 2001] und wegen seiner antiinflammatorischen Wirkung bei Entzündungen und Knochenbrüchen Verwendung [Uhlig, 1991]. Aus diesem Grund erscheint die Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf Magnetpartikeln vor dem Hintergrund einer möglichen Verwendung als „magnetic guided drug delivery“-System von Interesse. Auch bei bestehenden technischen Anwendungen von α -Chymotrypsin z.B. zusammen mit anderen Pankreasenzymen in der Lederindustrie, besitzen enzymmodifizierte Magnetpartikel ein großes Anwendungspotential.

4.1 Modellrechnung zur maximal möglichen Beladung von SiMAG - Partikeln mit α -Chymotrypsin

Um bei der Enzymimmobilisierung eine adäquate Enzymmenge einsetzen zu können, wurde zu Beginn der Arbeiten unter Annahme eines vereinfachten Modells die maximale Enzymbelegungsichte der Magnetartikel abgeschätzt. Tabelle 4.1-1 fasst die benötigten Daten für die Modellrechnung zusammen.

Tabelle 4.1-1: Partikel- und Enzymkenndaten zur Berechnung der maximalen Enzymbelegung

Partikelradius [μm]	0,5 – 5 (Herstellerangabe)
Partikelzahl/mg	$5 \cdot 10^8$ (Herstellerangabe)
Radius von α -Chymotrypsin [m]	$2,55 \cdot 10^{-9}$
Molmasse von α -Chymotrypsin [g/mol]	$25 \cdot 10^3$

Dem Modell liegt die Näherung zugrunde, die Magnetartikel seien glatte Kugeln mit einem Radius von 0,5 – 5 μm . Daraus ergibt sich die Partikeloberfläche (A) für den maximalen und minimalen Partikelradius nach Gleichung (4.1-1) und Gleichung (4.1-2):

$$A_{(0,5 \mu\text{m})} = 4 \cdot \pi \cdot (0,5 \mu\text{m})^2 = 3,14 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \quad (4.1-1)$$

$$A_{(5 \mu\text{m})} = 4 \cdot \pi \cdot (5 \mu\text{m})^2 = 3,14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \quad (4.1-2)$$

Auch die Enzymmoleküle werden modellhaft als nicht deformierbare Kugeln mit einem Durchmesser von 0,51 nm genähert. Ihr Platzbedarf auf der Partikeloberfläche soll der projizierten Kreisfläche dieser Kugeln entsprechen (Abbildung 4.1-1):

$$A_{\text{Enzym}} = \pi \cdot (2,55 \cdot 10^{-9} \text{ m})^2 = 2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2 \quad (4.1-3)$$

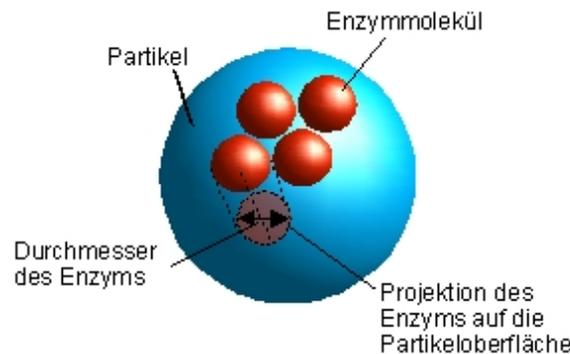


Abbildung 4.1-1: Projizierte Kreisfläche von kugelförmigen Enzymmolekülen auf die Partikeloberfläche

Eine weitere Annahme ist, dass die Enzymmoleküle maximal 75 % der zur Verfügung stehenden Partikeloberfläche belegen können, da selbst bei dichtester Belegung unbesetzte Lücken zwischen den Enzymmolekülen verbleiben (Abbildung 4.1-1). Die Anzahl der Enzymmoleküle die auf 1 mg Magnetpartikeln Platz finden, wird dann aus der zur Verfügung stehenden Partikeloberfläche und dem Platzbedarf des Enzyms nach folgenden Gleichungen berechnet:

$$Z_{(0,5 \mu\text{m})} = \frac{3,14 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot 5 \cdot 10^8}{2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2} \cdot 0,75 = 5,89 \cdot 10^{13} \quad (4.1-4)$$

$$Z_{(5 \mu\text{m})} = \frac{3,14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot 5 \cdot 10^8}{2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2} \cdot 0,75 = 5,89 \cdot 10^{15} \quad (4.1-5)$$

Die auf einem Milligramm SiMAG-Partikeln maximal immobilisierbare Enzymmenge in Abhängigkeit des Partikeldurchmessers ergibt sich schließlich über die Avogadro-Konstante (N_A) und die Molmasse von α -Chymotrypsin zu:

$$m_{(0,5 \mu m)} = \frac{5,89 \cdot 10^{13}}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} \cdot 25.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = \underline{\underline{2,45 \mu \text{g}}} \quad (4.1-6)$$

$$m_{(5 \mu m)} = \frac{5,89 \cdot 10^{15}}{6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}} \cdot 25.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = \underline{\underline{245 \mu \text{g}}} \quad (4.1-7)$$

Nach dieser Modellrechnung sollte auf 1 mg SiMAG-Partikel eine maximale Enzymmenge von 2,45–245 μg α -Chymotrypsin immobilisierbar sein. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass den Berechnungen ein stark vereinfachtes Modell zu Grunde liegt. Vor allem die Annahme der glatten Oberfläche der SiMAG-Partikel stellt hier eine grobe Vereinfachung dar, die in den folgenden Kapiteln nicht beibehalten wird.

4.2 Analyseverfahren

Eine Vielzahl an standardisierten Analysemethoden stehen heute zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen zur Verfügung. Um effektiv die Menge immobilisierten Enzyms bestimmen zu können, bieten sich photometrische Assays an, die schnell und direkt Auskunft über die Enzymkonzentration liefern. Zu Beginn der Arbeit wurde neben dem Bradford-Test auch der Bicinchinonsäure-Test (BCA-Assay) zur Bestimmung der Enzymkonzentration genutzt. Die Messergebnisse des BCA-Tests wiesen jedoch immer eine deutliche Streuung auf, so dass dieser Assay für die durchzuführenden Untersuchungen ungeeignet war und verworfen wurde. Zudem ist der Bradford-Test etwa um den Faktor 2 empfindlicher als der BCA-Test [Lottspeich; Zorbas, 1998]. Da bei sehr geringen Enzymkonzentrationen ($c < 0,1 \text{ mg/mL}$) auch beim Bradford-Tests Probleme (großer relativer Messfehler) auftraten, wurde ein weiteres Verfahren zur Bestimmung geringer Enzymkonzentrationen etabliert. Diese Methode nutzt die Eigenfluoreszenz des Enzyms, die hauptsächlich auf den fluorophoren Tryptophan-Gruppen des α -Chymotrypsins beruht. Der genaue Versuchsaufbau wird ebenso wie die Versuchsbedingungen in Kapitel 4.2.2, S.37 näher beschrieben. Die proteolytische Aktivität (\mathcal{A}) des α -Chymotrypsins wurde ebenfalls photometrisch bestimmt. Dabei wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolysereaktion von N-Benzoyl-L-Tyrosin-ethylester (BTEE) im UV-Bereich mit dem BTEE-Assay bestimmt (vgl. 4.2.3, S. 38).

4.2.1 Bradford-Test

Der Protein-Assay nach Bradford [Buchholz; Kasche, 1997] basiert auf der Farbreaktion des Farbstoffs Coomassie-Blue G250 mit dem Enzym. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs im sauren Milieu von $\lambda_{\text{max}}=465 \text{ nm}$ zu $\lambda_{\text{max}}=595 \text{ nm}$. Ursache

dieses veränderten Absorptionsmaximums ist die unspezifische Komplexbildung des Farbstoffs in seiner anionischen Sulfonat-Form mit kationischen und unpolaren, hydrophoben Seitenketten des Proteins [Lottspeich; Zorbas, 1998]. Dabei ist die Zahl der Farbstoffmoleküle, die an ein Enzymmolekül gebunden wird, proportional zur Anzahl der positiven Ladungen des Proteins und beträgt zwischen 1,5 – 3 Farbstoffmoleküle pro kationischer Ladung [Pierce, 2001].

Mit einer Nachweisgrenze von 0,05-0,5 μg Protein/mL besitzt der Bradford-Test eine sehr hohe Empfindlichkeit. Ein Nachteil des Bradford-Assays ist die geringe Spezifität der Farb-reaktion. Für die gleiche Konzentration unterschiedlicher Proteine ergeben sich unterschiedliche Absorptionswerte, so dass für jedes Protein eine individuelle Kalibration durchgeführt werden muss. Eine genaue Durchführungsanweisung des Bradford-Tests ist im Anhang (Kapitel 11.1.2, S. 116) aufgeführt.

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit des Verfahrens wurde eine Kalibrationsreihe ausgehend von einer Enzymkonzentrationen von 1,5 mg/mL angesetzt. Die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Verdünnungen erfolgte in Dreifachbestimmung, wobei ein Probenvolumen von 10 μL im Bradfordtest eingesetzt wurde. Das gemittelte Ergebnis ist in Abbildung 4.2-1 dargestellt.

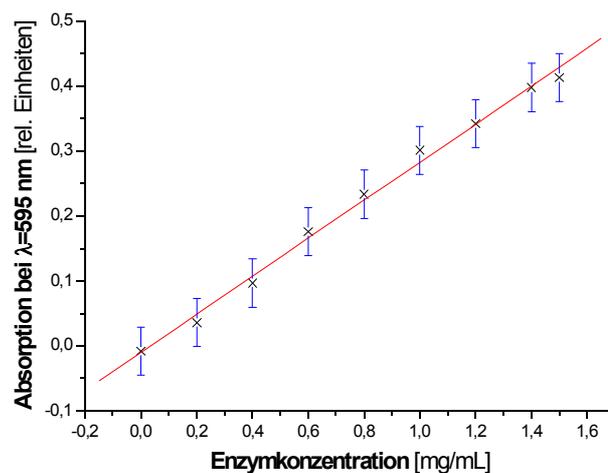


Abbildung 4.2-1: Kalibrationsgerade zur Bestimmung des Messfehlers

Die Kalibration erfolgte durch lineare Regression der gemittelten Absorptionswerte. Es wurde eine Regressionsgerade mit einer Steigung von $m=0,2922$ bei einer Standardabweichung der linearen Regression von $SD=0,0123$ erhalten. Die maximale Abweichung eines Messwertes vom berechneten Mittelwert betrug 0,037 relative Einheiten, was einer Enzymkonzentration von $\pm 0,13$ mg/mL entspricht. Die Enzymmenge kann demnach bei

Verwendung eines Probenvolumens von 10 μL mit einer Genauigkeit von $\pm 1,3 \mu\text{g}$ bestimmt werden.

4.2.2 Fluoreszenzspektroskopie

Für sehr geringe Enzymkonzentrationen (0-0,1 mg/mL) wurde eine zweite Analyseverfahren eingesetzt. Die Eigenfluoreszenz des Enzyms (Tryptophan-Gruppen) wurde bei einer Exzitationswellenlänge (Ex) $\lambda=290 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge (Em) von $\lambda=340 \text{ nm}$ gemessen. Aus den erhaltenen relativen Fluoreszenzsignalen konnten dann nach Kalibration des Messgerätes Rückschlüsse auf die Enzymkonzentration gezogen werden. Abbildung 4.2-2 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten Versuchsanordnung.

Aus dem Probengefäß wird die Enzymprobe mit einer Peristaltikpumpe in die Messzelle gepumpt. Die Messzelle hat ein Volumen von $V=0,5 \text{ mL}$. Sie hat einen Zulauf am unteren Ende und einen Auslauf am oberen Rand, so dass eventuell in die Messzelle eingetragene Luftblasen die Messzelle schnell wieder verlassen. Der Fluoreszenzsensor sitzt am Kopf der Messzelle direkt am Auslauf und wird von der Enzymlösung umspült.

Ein Vorteil dieser Methode ist, dass die Proben direkt vermessen werden können. Es müssen keine Nachweisreagenzien zugegeben werden, da keine chemische Reaktion wie beim Bradford-Test stattfindet.

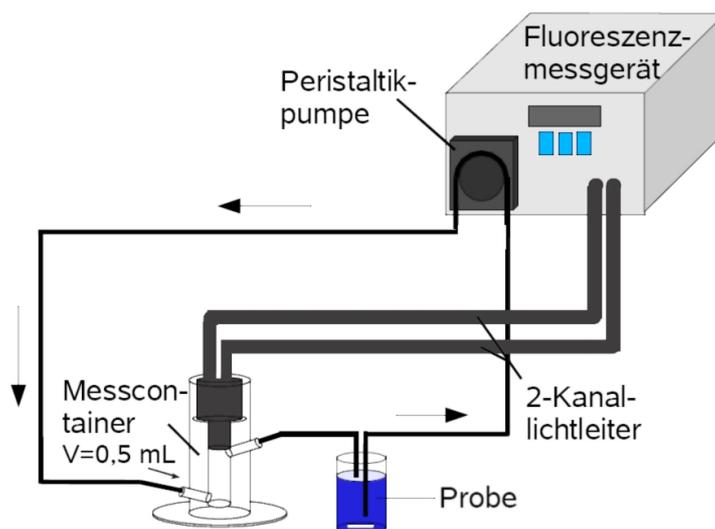


Abbildung 4.2-2: Skizze des Versuchsaufbaus zur fluorimetrischen Konzentrationsbestimmung

Lediglich bei zu hohen Enzymkonzentrationen müssen die Proben entsprechend verdünnt werden, da es aufgrund von Fluoreszenzauslöschung (Quenching) zu Abweichungen vom linearen Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und relativer Fluoreszenzintensität kommt (vgl. Abbildung 4.2-3). Im Konzentrationsbereich $c > 0,1 \text{ mg/mL}$ steht mit dem Bradfordtest ein geeigneteres Verfahren zur Bestimmung der Enzymkonzentration zur Verfügung.

gung (vgl. Abbildung 4.2-3).

Im Konzentrationsbereich zwischen 0-0,1 mg/mL können mit der Fluoreszenzmessung jedoch sehr geringe Konzentrationsunterschiede erfasst werden. Aufgrund der gerätebedingten Schwankung des Messsignals von ± 1 relativen Fluoreszenzeinheit (RFI) ist allerdings auch bei dieser Methode ein Fehler von 3 $\mu\text{g/mL}$ nicht zu vermeiden.

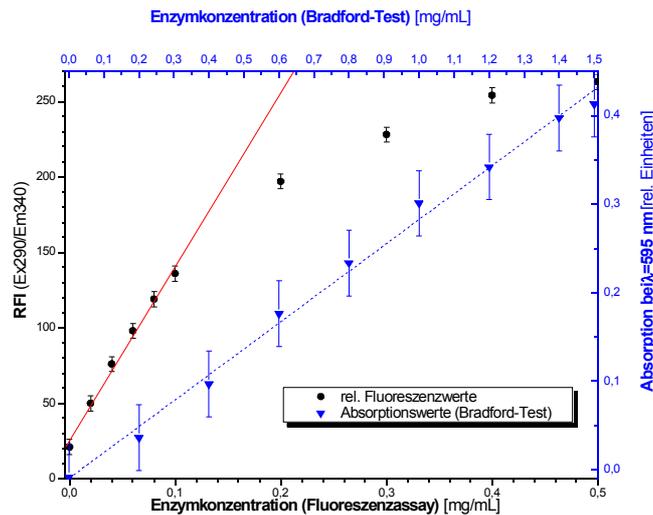
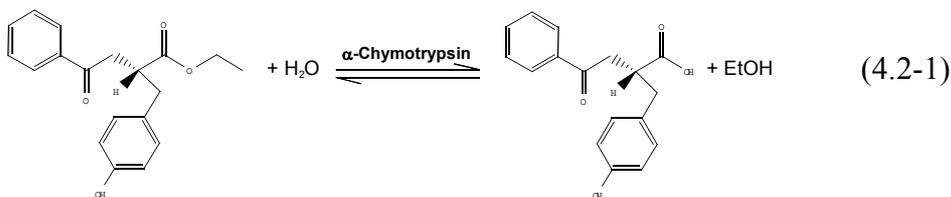


Abbildung 4.2-3: Kalibration des Fluoreszenzensors (Ex290/Em340) im Vergleich mit der Kalibration beim Bradford-Test

4.2.3 BTEE-Aktivitätstest

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität von α -Chymotrypsin wurde der BTEE-Assay verwendet. Der Test beruht auf der enzymkatalysierten, hydrolytischen Spaltung von N-Benzoyl-L-Tyrosin-ethylester (BTEE):



Neben Ethanol wird bei dieser Reaktion das UV-Strahlung absorbierende N-Benzoyl-L-Tyrosin freigesetzt. Der molare Extinktionskoeffizient von N-Benzoyl-L-Tyrosin beträgt $\epsilon=964 \text{ L} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ [Calzyme Laboratories, 2006]. Der Reaktionsverlauf der enzymkatalysierten, hydrolytischen BTEE-Spaltung kann leicht photometrisch anhand der gebildeten Produktmenge bei einer Wellenlänge von $\lambda=256 \text{ nm}$ verfolgt werden. Aus der Anfangssteigerung der erhaltenen Absorptions-Zeit-Kurven wird anschließend die enzymatische Aktivität

(\mathcal{A}) von α -Chymotrypsin unter Berücksichtigung des Reaktionsvolumens (V_R), der Schichtdicke (d) der Küvette und des molaren Extinktionskoeffizienten (ε) berechnet:

$$\mathcal{A} = \frac{\Delta Abs. \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta Zeit \cdot \varepsilon \cdot d} \quad (4.2-2)$$

Die Messung der Aktivität erfolgte im kontinuierlichen Betrieb mit einer Durchflussküvette. 10 mL BTEE-Reaktionslösung wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einem Volumenstrom von $\dot{V}=5,2$ mL/min im Kreislauf durch die Durchflussküvette gepumpt. Die Absorption der Reaktionslösung wurde alle 0,1 min bei einer Wellenlänge von $\lambda=256$ nm gemessen. Eine genaue Versuchsvorschrift zum BTEE-Assay ist ebenso wie eine Skizze des Versuchsaufbaus und eine Aufnahme der Versuchsanordnung im Anhang (Kapitel 11.1.3, S. 117) aufgeführt.

Um die Restaktivität des auf den Magnetpartikeln immobilisierten Enzyms bestimmen zu können, musste jedoch verhindert werden, dass die Magnetpartikel in den Strahlengang gelangten, da anderenfalls eine Absorptionsmessung aufgrund der starken Trübung der Lösung nicht mehr möglich war. Gleichzeitig sollten die Partikel aber gut von der Reaktionslösung umspült werden, um eine ausreichende Substratversorgung des immobilisierten Enzyms zu gewährleisten. Eine einfache magnetische Fixierung der Partikel an der Wandung des Reaktionsgefäßes kam deshalb nicht in Betracht. Durch Anbringen von starken Permanentmagneten an der äußeren Gefäßwandung würden die Magnetpartikel zwar im Reaktionsgefäß festgehalten, es würde sich aber eine zu dicke Magnetpartikelschicht an der Gefäßwand bilden. Partikel, die im Inneren dieser Schicht oder direkt an der Gefäßwand lokalisiert wären, würden durch diese Versuchsanordnung massiv von der konvektiven Substratversorgung abgeschirmt. Das Substrat könnte diese Partikel nur noch durch Diffusion erreichen, so dass die erhaltenen Aktivitätswerte durch diese Limitierung zu niedrig wären. Deshalb musste nach einem Versuchsaufbau gesucht werden, der eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in der Reaktionslösung gewährleistet, gleichzeitig aber verhindert, dass die Partikel in die Messküvette gelangen.

Die Lösung dieses Problem lag in der Verwendung mit Stahlwolle gefüllter Mobicol-Kartuschen, die in den Versuchsaufbau integriert wurden.

Werden die Stahlwollfäden in ein äußeres Magnetfeld gebracht und stehen senkrecht zu den Feldlinien, so baut sich ein eigenes Magnetfeld um sie auf. An der Oberfläche der Stahlwollfäden kommt es zu einer Verdichtung der Magnetfeldlinien und damit zu einer Verstärkung des externen Magnetfeldes (vgl. Abbildung 4.2-4).

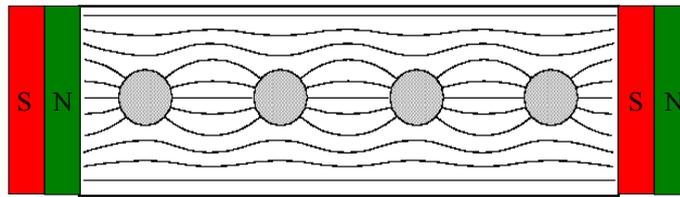


Abbildung 4.2-4: Skizze der Magnetfeldlinien um die senkrecht im Magnetfeld stehenden Stahlwollfäden

Wird nun die Partikelsuspension über die mit Stahlwolle gefüllte Mobicol-Kartusche gegeben, haften die Magnetpartikel an den Stellen, an denen die Stahlwollfäden senkrecht zum äußeren Magnetfeld ausgerichtet sind, auf der Oberfläche der Stahlwolle an. Dadurch wird eine möglichst gleichmäßige Verteilung in der Kartusche erreicht, bei der die Magnetpartikel ausreichend von der Reaktionslösung umspült werden. Der beschriebene Versuchsaufbau verhindert bei ausreichender Strömungsgeschwindigkeit der Reaktionslösung zusätzlich die Ausbildung eines nennenswerten Substratgradienten durch Substratverbrauch, wodurch eine gleichmäßige Substratversorgung des Enzyms sichergestellt ist.

Zur Etablierung des BTEE-Aktivitätsassays wurden verschiedene Stahlwollsorten mit unterschiedlichen Feinheitsgraden getestet. Es wurde nach einer Stahlwolle gesucht, die fein genug war, um eine möglichst große Oberfläche für die magnetische Fixierung der Magnetpartikel zur Verfügung zu stellen. Außerdem musste sie den korrosiven Reaktionsbedingungen der BTEE-Reaktionslösung standhalten und durfte die Absorptionsmessung nicht beeinflussen. Verwendet wurde schließlich die langfaserige, magnetisierbare Chrom/Molybdän-Edelstahlwolle „Panther“ der Firma Haiss GmbH (Berlin), da diese unter den gegebenen Versuchsbedingungen die größte Beständigkeit zeigte. Im Gegensatz zu den anderen getesteten Stahlwollsorten waren bei dieser Stahlwolle auch nach über 24-stündiger Versuchsdauer keine Korrosionserscheinungen zu beobachten.

Abbildung 4.2-5 zeigt den Ausschnitt eines Stahlwollfadens mit anhaftenden SiMAG-Partikeln in 20.000 facher Vergrößerung (siehe S. 41). Die Partikel sind über weite Bereiche gleichmäßig auf der Oberfläche der Stahlwollfäden verteilt, wodurch eine gute Substratversorgung der Magnetpartikel während des Aktivitätstests gewährleistet ist. Solange sich die Kartusche im Magnetfeld befindet, verhindert der gewählte Versuchsaufbau erfolgreich die Beeinträchtigung der Absorptionsmessung durch in die Messküvette eindringende Magnetpartikel.

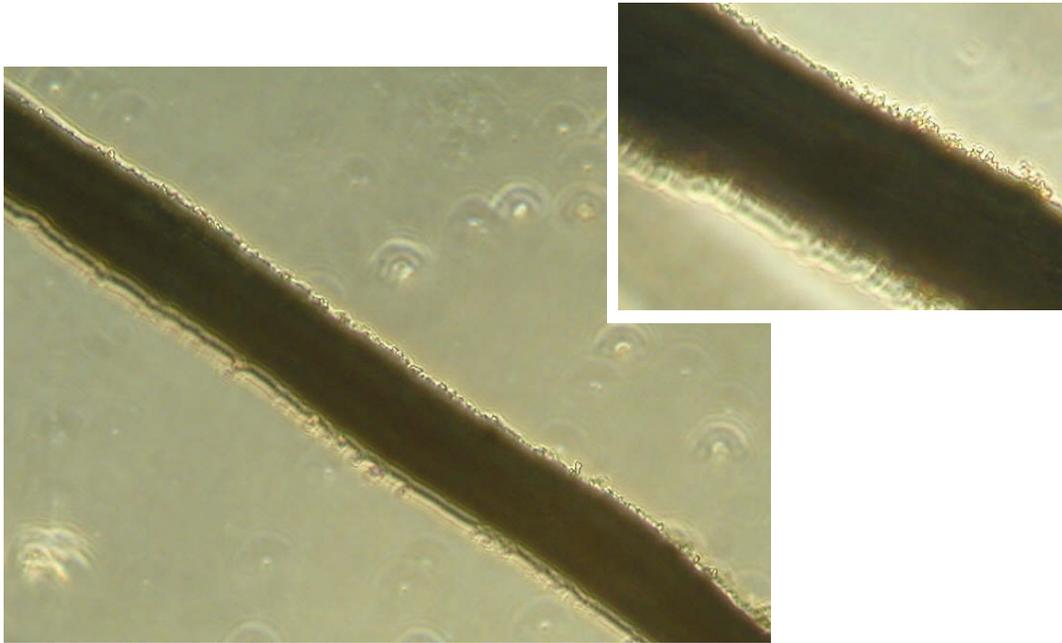


Abbildung 4.2-5: Aufnahme der beim BTEE-Assay auf Stahlwolle fixierten Magnetpartikel (20.000 fache bzw. 30.000fache Vergrößerung)

Zur Qualifizierung des BTEE-Assays wurde untersucht, unter welchen Versuchsbedingungen dieser Nachweis zuverlässige Messergebnisse liefert. Dazu wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen Anfangssubstratkonzentrationen, bei gleichbleibender Menge eingesetzten, nativen Enzyms ($100 \mu\text{g}$ Enzym/mL BTEE-Reaktionslösung) angesetzt. Es sollte überprüft werden, in welchem Konzentrationsbereich Substratsättigung des Enzyms eintritt. Nur in diesem Konzentrationsbereich ist sicher gestellt, dass ausreichend Substrat vorhanden ist, so dass die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit unter den gewählten Versuchsbedingungen unabhängig von der Substratkonzentration ist. Denn nur unter dieser Voraussetzung entspricht die beobachtete zeitliche Absorptionsänderung der Aktivität des Enzyms. Abbildung 4.2-6 zeigt die Ergebnisse dieser Versuchsreihe. Unterhalb einer Substratkonzentration von $0,25 \text{ mmol/L}$ steigt die Reaktionsgeschwindigkeit annähernd linear an, da die Substratsättigung des Enzyms noch nicht erreicht und nicht alles Enzym an der Reaktion beteiligt ist. In diesem Bereich liegt mit zunehmender Substratkonzentration mehr Enzym als Enzym-Substrat-Komplex vor und trägt damit zur beobachteten Reaktionsgeschwindigkeit bei. Im Konzentrationsbereich zwischen $c_s=0,25-0,35 \text{ mmol/L}$ flacht die Kurve immer mehr ab. Bei einer Substratanfangskonzentration von $c_s>0,4 \text{ mmol/L}$ liegt schließlich vollständige Substratsättigung des Enzyms vor. Eine weitere Steigerung der Substratkonzentration führt zu keiner weiteren Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mehr, so dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist.

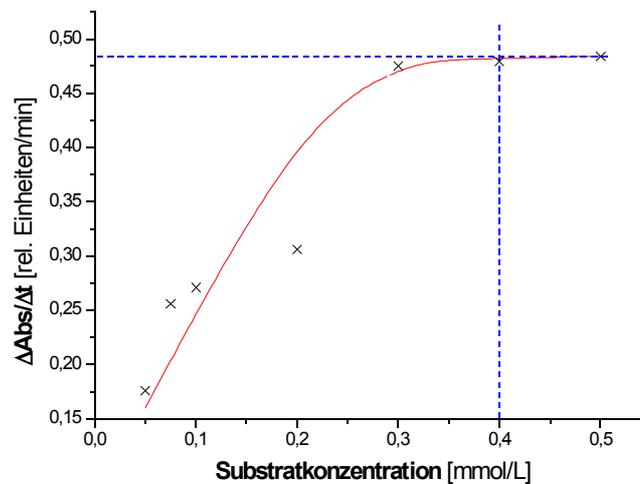


Abbildung 4.2-6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für den BTEE-Assay eine Substratkonzentration von 0,5 mmol BTEE-Reagenz eingesetzt (vgl. Kapitel 11.1.3, S. 117), bei der die vollständige Substratsättigung des Enzyms bis zu einer Enzymmenge von 1 mg α -Chymotrypsin/10 mL BTEE-Reaktionslösung sichergestellt ist. Größere Substratkonzentrationen einzusetzen erschien nicht sinnvoll, da aus früheren Untersuchungen bekannt war, dass dies zu einer Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt, die möglicherweise auf eine Substratinhibierung des Enzyms zurückzuführen ist.

Neben der Bestimmung des Substratsättigungsbereichs des α -Chymotrypsins kann aus diesen Versuchen auch die Aktivität des nativen Enzyms bestimmt werden. Die Anfangssteigung der Absorptions-Zeit-Kurve beträgt bei einer Substratkonzentration von 0,5 mmol/L $\Delta\text{Abs}/\Delta t = 0,484$ rel. Einheiten/min. Daraus berechnet sich die Aktivität der eingesetzten Enzymmenge nach Gleichung 4.2-2 zu 5,02 U. Aus dieser Aktivität kann die spezifische Enzymaktivität, als die Aktivität pro mg Enzym, abgeleitet werden. Die experimentell gefundene spezifische Aktivität des nativen α -Chymotrypsins beträgt 50,2 U/mg, was gut mit der vom Hersteller angegebenen spezifischen Aktivität von ≥ 50 U/mg Enzym übereinstimmt.

Zur weiteren Charakterisierung des Aktivitätsassay wurde auch das Umsatzverhalten untersucht. Dazu wurde die Absorption der Reaktionslösung am Ende der Reaktion ($t > 8$ min) gemessen und die erhaltenen Absorptionswerte anschließend in Produktkonzentrationen umgerechnet (Gleichung 4.2-3).

$$c(P) = \frac{\text{Absorption}}{d \cdot \varepsilon} \quad (4.2-3)$$

Aus der zu Reaktionsbeginn eingesetzten Substratkonzentration ($c_0(S)$) und der Konzentration an gebildetem Produkt ($c(P)$) wird dann der Umsatz der Reaktion nach folgender Gleichung berechnet:

$$U = \frac{c_0(S) - c(S)}{c_0(S)} = \frac{c_0(S) - [c_0(S) - c(P)]}{c_0(S)} = \frac{c(P)}{c_0(S)} \quad (4.2-4)$$

Für die hydrolytische Spaltung von BTEE durch α -Chymotrypsin liegt der durchschnittliche Umsatz bei $U=0,8 \pm 0,15$. Die enzymkatalysierte Reaktion läuft demnach nicht vollständig ab. Vielmehr stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein.

Geht man in erster Näherung jedoch von vollständigem Umsatz aus, können die Messwerte dieser Versuchsreihe zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von N-Benzoyl-L-Tyrosin genutzt werden. Werden die Absorptionen zu Reaktionsende gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen, wird eine Gerade erhalten (Abbildung 4.2-7 (b)), deren Steigung dem molaren Extinktionskoeffizient entspricht. Der unter den verwendeten Versuchsbedingungen experimentell erhaltene molare Extinktionskoeffizient von N-Benzoyl-L-Tyrosin betrug $\varepsilon=722 \pm 20 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ und war etwa 25 % kleiner als der Literaturwert. Da der experimentell ermittelte Extinktionskoeffizient unter der Annahme eines vollständigen Reaktionsumsatzes bestimmt wurde, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich der Literaturwert verwendet.

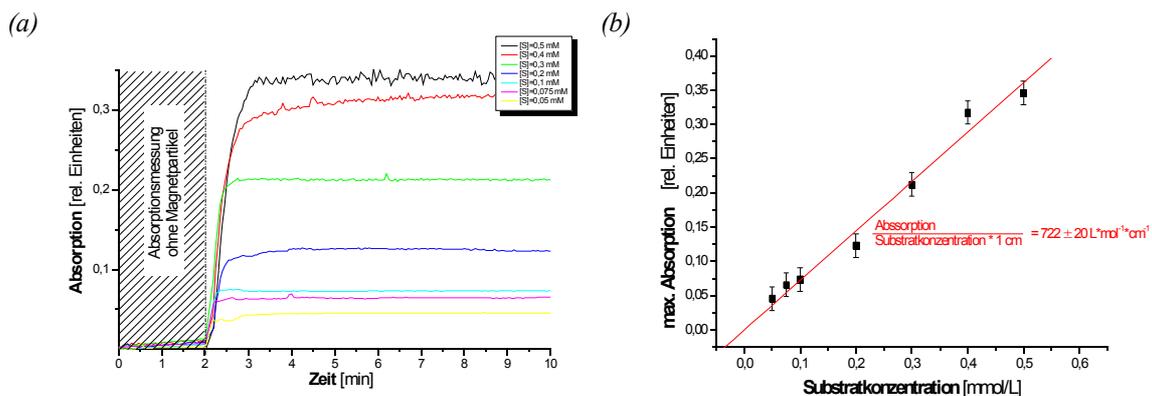


Abbildung 4.2-7: (a) Absorptions-Zeit-Kurven bei Variation der Substratkonzentration
(b) Kalibrationsgrade zur Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten von N-Benzoyl-L-Tyrosin

4.3 Optimierung der α -Chymotrypsinimmobilisierung an SiMAG-Partikeln mit unterschiedlichen funktionellen Ankergruppen

Die in dieser Arbeit verwendeten SiMAG-Partikel (Chemicell GmbH, Berlin) sind bereits mit unterschiedlichen Ankergruppen für die kovalente Enzymimmobilisierung ausgestattet.

Verwendet wurden Partikel mit Chlormethyl- (SiMAG-MeCl), Thiol- (SiMAG-SH) und Polyglutaraldehydgruppen (SiMAG-PGL) als funktionelle Bindungsstellen für die Immobilisierung des Enzyms.

Ziel der Untersuchungen war, die unterschiedlichen Bindungsanker auf ihre Eignung für die Enzymimmobilisierung zu untersuchen. Weiterhin sollte die Immobilisierung hinsichtlich der zu verwendenden Immobilisierungsparameter Immobilisierungstemperatur, Immobilisierungs-pH-Wert, eingesetzte Enzymkonzentration und Immobilisierungsdauer optimiert werden. Eine detaillierte Standard-Immobilisierungsvorschrift befindet sich im Anhang (Kap. 11.1.1, S. 116).

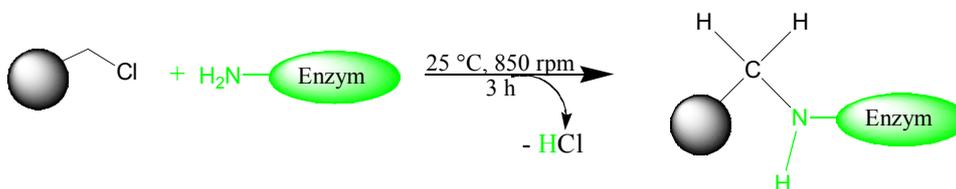
Nach der Immobilisierung wurden die Magnetpartikel von der Reaktionslösung abgetrennt, wobei zur magnetischen Separation NeoDeltaMagnet (NeFeB) Hochenergie-Permanentmagnete der Firma IBS-Magnet GmbH (Berlin), Typ NE 2010, verwendet wurden (vgl. Tabelle 11.4-1, S. 122). Reste nicht kovalent gebundenen Enzyms wurden im Anschluss durch mehrere Waschgänge mit Puffer von den Magnetpartikeln abgespült. Die Waschwasser wurden aufgefangen und gepoolt. Aus der Differenz der eingesetzten Enzymmenge und der Summe der am Reaktionsende noch im Überstand und den gepoolten Waschwassern enthaltenen Enzymmenge, wurde die auf den Partikeln immobilisierte Enzymmenge nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Immobilisierte Enzymmenge [mg]} = c_0 \cdot V_0 - (c_{\bar{U}} \cdot V_{\bar{U}} + \sum_i c_{(w)i} \cdot (V)_{(w)i}) \quad (4.3-1);$$

mit c_0 =eingesetzte Enzymkonzentration; V_0 =eingesetztes Volumen der Enzymlösung; $c_{\bar{U}}$ =Enzymkonzentration im Überstand; $c_{(w)}$ =Enzymkonzentration im Waschwasser; $V_{(w)}$ =Volumen des Waschwassers

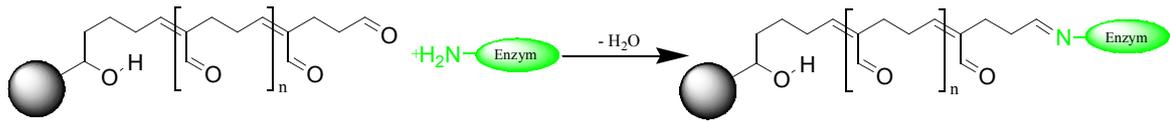
4.3.1 Reaktionsmechanismen der kovalenten Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikeln

Die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-MeCl Partikel erfolgt durch Substitutionsreaktion. Eine Aminogruppe des Enzyms greift das Kohlenstoffatom der Chlormethylgruppe nucleophil an. Unter Austritt eines Chlorid-Ions kommt es zur nucleophilen Substitution und der Ausbildung einer kovalenten Bindung.



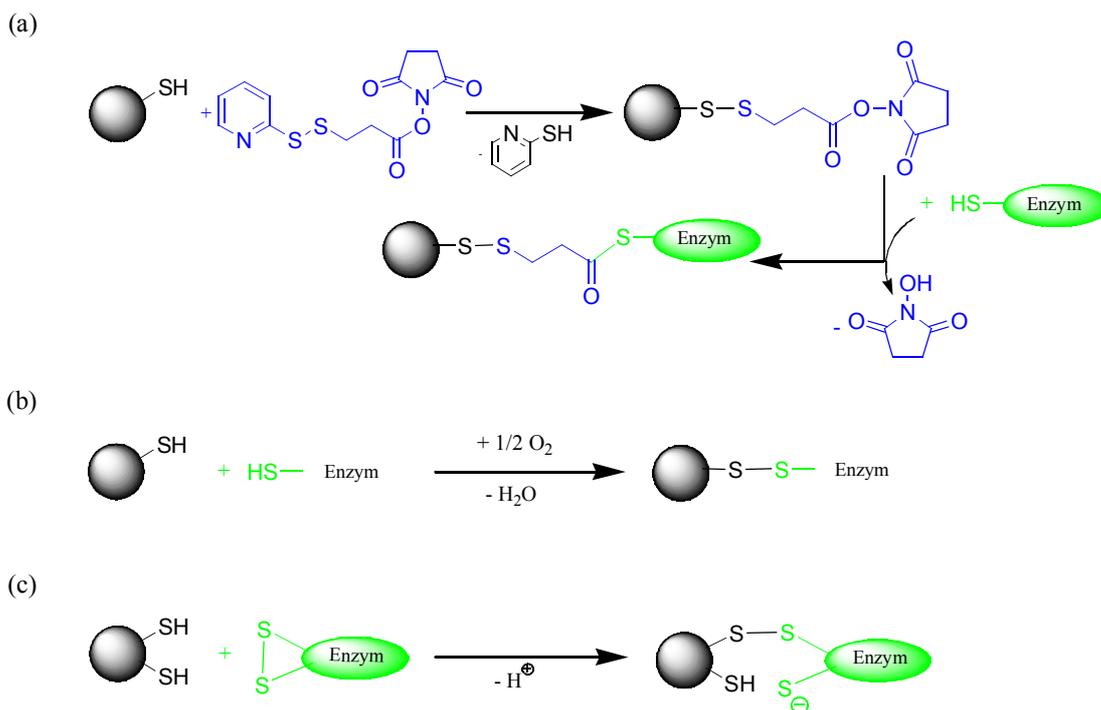
Reaktionsgleichung 4.3-1: Enzymimmobilisierung an SiMAG-MeCl-Partikeln

Säurekatalysiert erfolgt dagegen die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-PGL Partikel in einer Kondensationsreaktion. Durch Protonierung der Aldehydgruppe wird die Austrittsbereitschaft des Carbonylsauerstoffs erhöht, so dass schließlich unter Wasseraustritt das Imin mit dem Enzym gebildet wird (Reaktionsgleichung 4.3-2).



Reaktionsgleichung 4.3-2: Enzymimmobilisierung an SiMAG-PGL

Die kovalente Anbindung von α -Chymotrypsin an SiMAG-SH Partikel kann über mehrere Reaktionswege erfolgen. Nach Aktivierung der Partikel mit Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat (SPDP) (Reaktionsgleichung 4.3-3 (a)) steht hier der gleiche Reaktionsweg wie bei den PGL-Partikeln offen. Ohne diese Aktivierung kann das Enzym über seine freien Cystein-Reste oxidativ an die Partikel gebunden werden, wobei Disulfid-Brücken ausgebildet werden (Reaktionsgleichung 4.3-3 (b)). Eine dritte Möglichkeit zur kovalenten Anbindung von α -Chymotrypsin an SiMAG-SH-Partikel ist der nucleophile Angriff von Thiolat-Ionen an den Disulfidbrücken des Enzyms, wie dies in Reaktionsgleichung 4.3-3 (c) dargestellt ist.



Reaktionsgleichung 4.3-3: Enzymimmobilisierung an SiMAG-SH

4.3.2 Variation der mechanischen Durchmischung während der Enzymimmobilisierung

Der Immobilisierungsgrad der kovalenten Anbindung von α -Chymotrypsin an SiMAG-Partikel hängt neben den zu untersuchenden Immobilisierungsparametern wie z.B. Reaktionsdauer und -temperatur maßgeblich von der homogenen Verteilung der Magnetpartikel in der Reaktionslösung ab. Da die Dichte der Partikel größer als die der Reaktionslösung ist, setzen sie sich mit der Zeit am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Unter diesen Bedingungen stehen nur noch die oberen Partikel in direktem Kontakt mit der Reaktionslösung, wodurch die Immobilisierungsreaktion stark verlangsamt wird. Um dies zu verhindern, erfolgten die Immobilisierungen im Thermoschüttler. Bei ausreichender Drehzahl war so eine mechanische Durchmischung gewährleistet, die die Sedimentation der Magnetpartikel erfolgreich verhinderte.

Bei der Einstellung der Drehzahl ist jedoch zu berücksichtigen, dass eine zu hohe mechanische Belastung zu einer Beschädigung der Partikel z.B. durch Abrieb führen kann. Außerdem wurde bei den Untersuchungen zur Auswahl einer geeigneten Schüttlergeschwindigkeit festgestellt, dass das Enzym bei zu hohen Drehzahlen aufgrund der auftretenden Scherkräfte und der in die Lösung eingebrachten Luftblasen irreversibel denaturiert [Drevon, 2002].

Wie in Abbildung 7.3-1 dargestellt ist, wird bei Drehzahlen von 1.000 Umdrehungen pro Minute (1.000 rpm) innerhalb von 24 h eine fast vollständige Zersetzung des α -Chymotrypsins beobachtet.

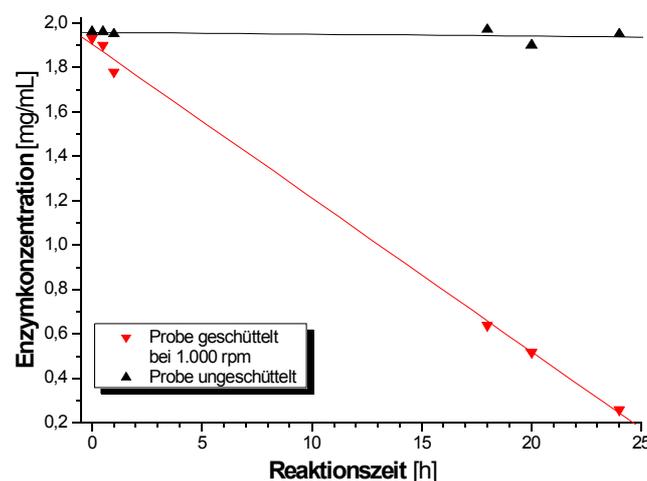


Abbildung 4.3-1: Abnahme der Enzymkonzentration durch Schütteln der Probe bei 1.000 rpm;

Reaktionsbedingungen: $c_0=2,0$ mg/mL, $T=20^\circ\text{C}$, $\text{pH}=7,4$

Die Enzymkonzentration in der Probe beträgt nach einer Inkubationszeit von 24 h lediglich

0,26 mg/mL, was nur noch 13% der eingesetzten Enzymkonzentration entspricht. Die ungeschüttelte Probe zeigt ebenfalls eine Abnahme der Enzymkonzentration, jedoch nur um 0,05 mg/mL, so dass nach 24 h noch 97,5 % der eingesetzten Enzymkonzentration nachzuweisen sind.

Für die Immobilisierungsversuche wurde aus diesem Grund eine Schüttelgeschwindigkeit von 850 rpm gewählt. Unter diesen Bedingungen kann die Sedimentation der Magnetpartikel erfolgreich verhindert werden und das Enzym hält der mechanischen Belastung über die gesamte Immobilisierungsdauer stand.

4.3.3 Konzentrationsabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion

Ein im Rahmen dieser Arbeit zu optimierender Reaktionsparameter ist die bei der Enzymimmobilisierung einzusetzende Konzentration des α -Chymotrypsins. Um die optimale Enzymkonzentration zu bestimmen, wurde eine Versuchsreihe mit Enzymkonzentrationen von $c=0,025\text{--}4$ mg/mL angesetzt. Die Immobilisierung wurde unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 7,4 (1x PBS-Puffer) und Raumtemperatur für eine Immobilisierungsdauer von 3 h durchgeführt (vgl. Kapitel 11.1.1, S.116). Anschließend wurden die Partikel dreimal mit je 1 mL 1x PBS-Puffer gewaschen und die Menge immobilisierten Enzyms durch Bilanzierung nach Gleichung 4.3-1 (S.44) bestimmt. Abbildung 4.3-2 zeigt die Abhängigkeit der auf der jeweiligen Partikelsorte immobilisierten Menge α -Chymotrypsin von der eingesetzten Enzymkonzentration.

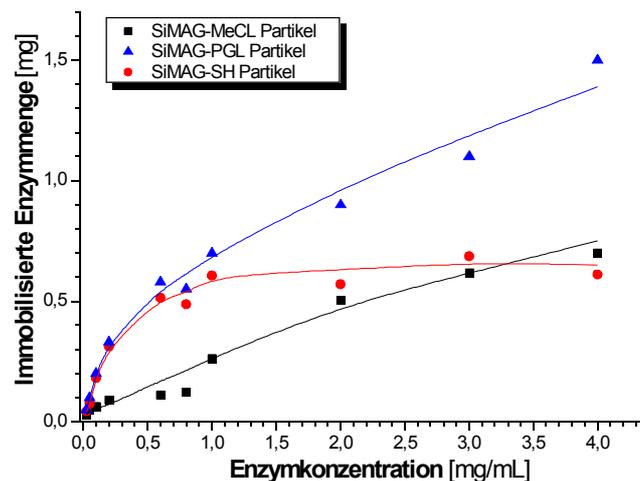


Abbildung 4.3-2: Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge von der eingesetzten α -Chymotrypsinkonzentration; Reaktionsbedingungen: $c_0=0,025\text{--}4$ mg/mL, RT, $t=3$ h

Mit steigender Enzymkonzentration ist bei allen drei Partikelsorten eine deutliche Zunahme der immobilisierten Enzymmenge zu beobachten. Die höchste Belegungsdichte wird bei

SiMAG-PGL Partikeln mit einer maximalen α -Chymotrypsinmenge von 1,5 mg erreicht. Auffällig ist, dass bei den Chlormethyl-Partikeln die Zunahme der immobilisierten Enzymmenge mit der eingesetzten Enzymkonzentration deutlich langsamer als bei den beiden anderen Partikelsorten und nahezu linear mit der eingesetzten Enzymkonzentration erfolgt. Bei einer Enzymkonzentration von 4 mg/mL liegt die Bindungskapazität allerdings über der der Thiol-Partikel. Diese zeigen als einzige Partikelsorte eine deutliche Sättigung im untersuchten Konzentrationsbereich. Bei ihnen führt eine Erhöhung der eingesetzten Enzymkonzentration über 1 mg/mL zu keiner signifikanten Steigerung der immobilisierten Enzymmenge mehr, da dann möglicherweise alle Bindungsplätze belegt sind. Sowohl bei den Polyglutaraldehyd- als auch den Chlormethyl-Partikeln ist diese Sättigung deutlich schwächer ausgeprägt. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine geringere Dichte der funktionellen Ankergruppen auf den Thiol-Partikeln sein. Ein weiterer denkbarer Grund für diesen Verlauf könnte auch die unterschiedlich gute Enzymzugänglichkeit der Bindungsstellen auf der porösen Oberfläche der Magnetpartikel sein. Bei geringen Enzymkonzentrationen erfolgt die Enzymanbindung vorwiegend an den gut zugänglichen Ankergruppen auf der Partikeloberfläche. Erst mit zunehmender Enzymkonzentration ist der Konzentrationsgradient zwischen der Oberfläche und dem Inneren der Poren groß genug, so dass ein vermehrter Stofftransport in die Poren stattfindet und auch dort die Anbindung des Enzyms erfolgt. Die Abhängigkeit der auf den Partikeln immobilisierten enzymatischen Aktivität von der eingesetzten Enzymkonzentration ist in Abbildung 4.3-3 dargestellt.

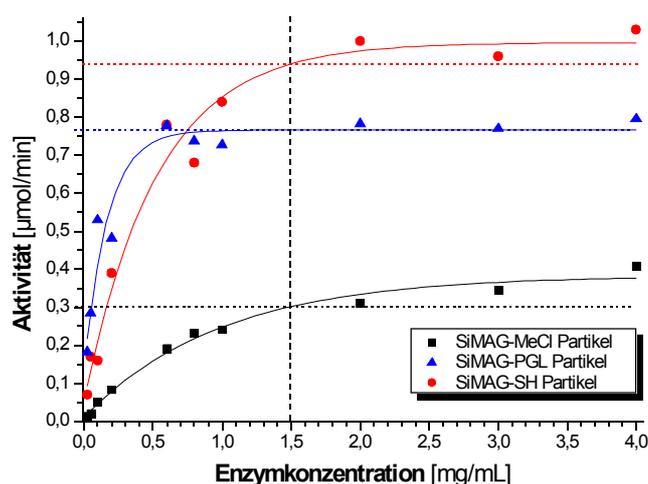


Abbildung 4.3-3: Abhängigkeit der Restaktivität des auf SiMAG-MeCl, SiMAG-PGL und SiMAG-SH Partikeln immobilisierten α -Chymotrypsins von der eingesetzten Enzymmenge; Reaktionsbedingungen: $c_0=0,025-4$ mg/mL, RT, $t=3$ h

Hier ist für alle Partikel eine deutliche Sättigungskurve zu erkennen. Bei den Thiol-Partikeln ergibt sich eine gute Korrelation der Restaktivität mit der immobilisierten Enzymmenge. Oberhalb einer α -Chymotrypsinkonzentration von 1 mg/mL steigt die auf den Partikeln immobilisierte Aktivität nicht weiter an. Auch bei den MeCl- und PGL-Partikeln tritt eine Sättigung ein. Trotz steigender Menge immobilisierten Enzyms, nimmt die Aktivität auf den Partikeln oberhalb einer Enzymkonzentration von 1,5 mg/mL nicht mehr deutlich zu. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass die weitere Enzymanbindung nur noch am Poreninneren erfolgt. Bei der Aktivitätsuntersuchung wird dies deutlicher, da neben den Wechselwirkungen zwischen Trägeroberfläche und Substratmolekül besonders die Diffusion des Substrats ins Innere des Enzym-Träger-Komplexes die katalytische Wirksamkeit des immobilisierten Enzyms beeinflusst. Der Substrattransport in die Poren erfolgt ausschließlich durch Diffusion und wird für Enzymmoleküle, die im Poreninneren immobilisiert sind, geschwindigkeitsbestimmend. Verstärkt wird dieser Effekt durch die wachsende Belegungsdichte auf der Partikeloberfläche. Die Porenöffnungen werden durch die an der Porenöffnung immobilisierten Enzymmoleküle blockiert, was die Diffusion des Substrats ins Poreninnere zusätzlich erschwert.

Aufgrund der hohen Belegungsdichte auf der Partikeloberfläche werden weiterhin die aktiven Zentren der immobilisierten Enzymmoleküle durch benachbarte α -Chymotrypsinmoleküle in ihrer Substratzugänglichkeit behindert. Der Aktivitätszuwachs, basierend auf der steigenden Menge immobilisierten Enzyms, wird so durch die zunehmend erschwerte Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums des Enzyms kompensiert, so dass der beobachtete Sättigungsverlauf der enzymatischen Aktivität auf den Magnetpartikeln resultiert.

Wie durch die Experimente gezeigt werden konnte, wird durch den Einsatz von Enzymkonzentrationen von mehr als 1,5 mg/mL keine Verbesserung des Immobilisierungsergebnisses erreicht. Diese Konzentration stellt somit das Optimum bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-Partikeln dar und wurde für die weiteren Optimierungsversuche verwendet.

4.3.4 Variation der Immobilisierungsdauer

Zur Realisierung einer effizienten Enzymimmobilisierung ist die genaue Kenntnis des zeitlichen Verlaufs der Immobilisierungsreaktion erforderlich. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der Immobilisierungsdauer auf den Immobilisierungsverlauf untersucht. Es sollte festgestellt werden, in wie weit sich die Geschwindigkeit der Immobilisierung bei den einzelnen Partikelsorten unterscheidet. Mit allen drei Partikelsorten wurden entsprechende

Versuchsreihen angesetzt. Die Immobilisierung erfolgte an 10 mg Magnetpartikeln bei einer Enzymkonzentration von $c_0=1,5$ mg/mL bei RT in 2 mL 1x PBS-Puffer (pH=7,4). Nach Reaktionszeiten zwischen 40 s und 3 h wurde die Immobilisierungsreaktion abgebrochen und die Menge immobilisierten Enzyms durch Bilanzierung bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 4.3-4 graphisch dargestellt. Deutlich ist der schnelle Immobilisierungsverlauf bei allen drei Partikelsorten zu erkennen. Nach einer Reaktionsdauer von fünf Minuten erreicht die immobilisierte Enzymmenge Werte über 60% der maximal auf der jeweiligen Partikelsorte immobilisierten Enzymmenge von 0,3 mg (MeCl), 0,47 mg (SH) und 0,71 mg (PGL). Die Immobilisierung verläuft bei den Thiolpartikeln am schnellsten und ist bereits nach 5 Minuten abgeschlossen. Nach einer Reaktionsdauer von 12 min ist bei den MeCl-Partikeln kein Zuwachs der immobilisierten Enzymmenge mit der Reaktionszeit mehr zu erkennen. Am langsamsten ist die Reaktion an den Polyglutaraldehyd-Partikeln. Die Menge immobilisierten Enzyms steigt bei dieser Partikelsorte bis zu einer Reaktionsdauer von 30 min. Diese Ergebnisse zeigen, dass die in den vorangegangenen Experimenten gewählte Immobilisierungsdauer von 3 h für die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin ausreichend war. Eine Optimierung der Enzymimmobilisierung durch Variation der Immobilisierungsdauer kann nur in soweit erfolgen, dass die Immobilisierungsdauer bei den weiteren Versuchen zur Optimierung der Enzymimmobilisierung von 3h auf 1h verkürzt wird.

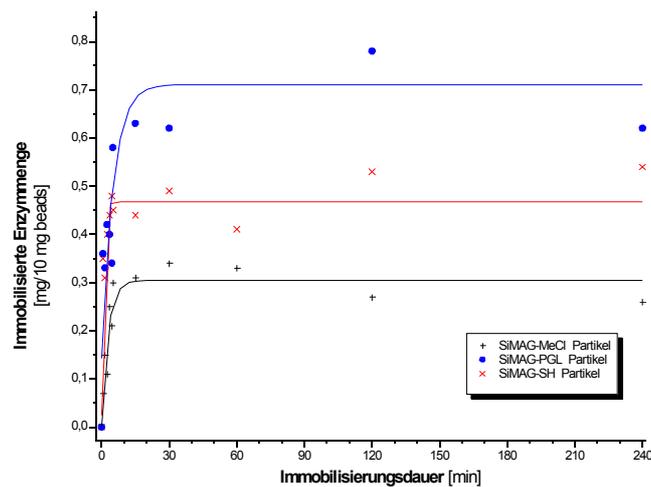


Abbildung 4.3-4: Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge von der Immobilisierungsdauer bei SiMAG-MeCl-, SiMAG-PGL- und SiMAG-SH-Partikeln; Reaktionsbedingungen: $c_0=1,5$ mg/mL, RT, pH=7,4

4.3.5 Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymimmobilisierung

Der Einfluss der Reaktionstemperatur auf den Immobilisierungsverlauf wurde durch Immobilisierungsversuche bei Temperaturen zwischen 5-35 °C untersucht. Da die Immobilisierung sehr schnell abläuft (vgl. Kapitel 4.3.4, S.49), wurden sowohl die eingesetzten Magnetpartikel als auch die eingesetzte Enzymlösung vor Reaktionsbeginn für 10 min bei der jeweiligen Reaktionstemperatur vortemperiert. Die Immobilisierung erfolgte an 10 mg Magnetpartikeln mit einer Enzymkonzentration von $c_0=1,5$ mg/mL für die verkürzte Reaktionsdauer von $t=1$ h. Nach Reaktionsende wurden die Partikel mit PBS-Puffer bei 20°C gewaschen, bevor die immobilisierte Enzymmenge durch Bilanzierung bestimmt wurde. Abbildung 4.3-5 zeigt die Ergebnisse der Temperaturuntersuchungen.

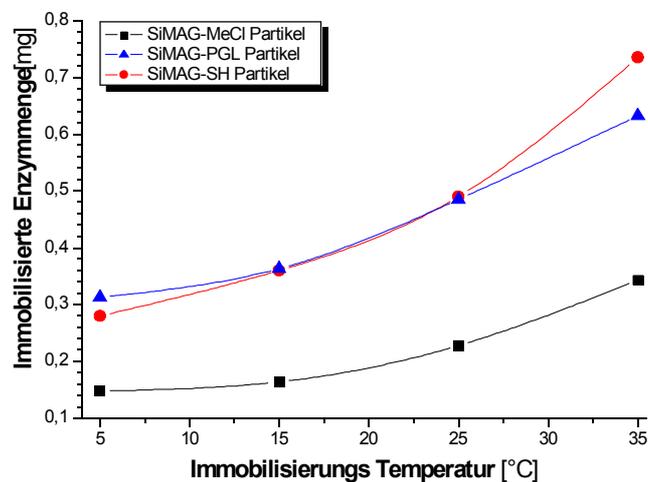


Abbildung 4.3-5: Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge von der Immobilisierungstemperatur;
Reaktionsbedingungen: $c_0=1,5$ mg/mL, $pH=7,4$, $T= 5-35$ °C

Über den gesamten betrachteten Temperaturbereich nimmt die auf den Magnetpartikeln gebundene Enzymmenge bei allen drei Partikelsorten mit steigender Immobilisierungstemperatur zu. Bei einer Reaktionstemperatur von 35 °C wird mehr als doppelt so viel α -Chymotrypsin immobilisiert wie bei einer Immobilisierungstemperatur von 5 °C.

Die Thiolpartikel besitzen die größte Bindungskapazität. Erfolgt die Immobilisierung bei einer Temperatur von 35 °C, werden 735 μ g α -Chymotrypsin an diesen Partikeln kovalent gebunden. An den SiMAG-PGL Partikeln können bei gleicher Temperatur etwa 85 % dieser Enzymmenge immobilisiert werden. Die Bindungskapazität der Methylchloridpartikel ist mit maximal 343 μ g immobilisiertem α -Chymotrypsin ($T=35$ °C) am geringsten und nur etwa halb so groß wie bei den Thiolpartikeln.

Die Erhöhung des Immobilisierungsgrades mit steigender Temperatur ist durch die Aktivie-

rung der reaktiven Ankergruppen auf den Magnetpartikeln zu erklären. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei erhöhter Reaktionstemperatur eine Denaturierung des α -Chymotrypsins zu beobachten ist. Da die immobilisierte Enzymmenge durch Bilanzierung der eingesetzten und am Reaktionsende im Überstand und den gepoolten Waschwassern wiedergefundenen Enzymmenge berechnet wird, führt die Denaturierung des α -Chymotrypsins zu überhöhten Werten an immobilisiertem Enzym. Um diesen Effekt abschätzen zu können, wurden Proben aus 2 mL Enzymlösung mit einer Konzentration von 1,5 mg/mL angesetzt und bei 5 °C, 25 °C und 35 °C für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Enzymkonzentration mittels Bradford-Test bestimmt. Bei Reaktionstemperaturen von 5 °C und 25 °C war keine Denaturierung zu beobachten. In den Proben, die bei 35 °C inkubiert wurden, war nach einer Stunde jedoch nur noch eine Chymotrypsinkonzentration von 1,28 mg/mL nachzuweisen.

Um das Temperaturverhalten von α -Chymotrypsin bei der Immobilisierung weiter zu untersuchen, wurde die Restaktivität des immobilisierten Enzyms mittels BTEE-Assay bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3-6 aufgeführt.

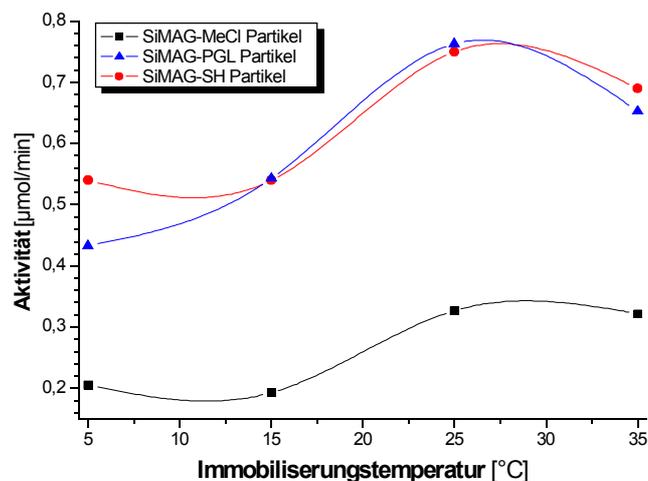


Abbildung 4.3-6: Aktivität des an SiMAG-MeCl, SiMAG-PGL und SiMAG-SH Partikeln immobilisierten α -Chymotrypsins bei Variation der Immobilisierungstemperatur; Reaktionsbedingungen: $c_0=1,5$ mg/mL, $pH=7,4$, $T= 5-35$ °C

Bei allen drei Partikelsorten ist ein Temperaturoptimum der Restaktivität des Enzym-Träger-Komplexes zu beobachten. Die Immobilisate der MeCl-Partikel besitzen jedoch über den gesamten Temperaturbereich die geringste enzymatische Aktivität. Sie beträgt nur ca. 1/3 der Aktivität auf den SiMAG-SH und SiMAG-PGL Partikeln.

Aus der Zunahme der immobilisierten Enzymmenge resultiert bis zu einer Temperatur von

25 °C ein Anstieg der Aktivität des Immobilisates. Bei weiter ansteigender Immobilisierungstemperatur sinkt die Restaktivität des immobilisierten Enzyms allerdings wieder. Bei einer erhöhten Reaktionstemperatur von 35 °C ist der Aktivitätsverlust durch die einsetzende Denaturierung schließlich größer als der Aktivitätszuwachs durch die vermeintlich weiter ansteigende Menge gebundenen Enzyms. Das Optimum der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-Partikeln liegt demnach bei 25 °C. SiMAG-PGL Partikel zeigen bei dieser Immobilisierungstemperatur die höchste spezifische Restaktivität von $\bar{A}=1,57$ U/mg. Das auf den Thiol-Partikeln immobilisierte Enzym besitzt eine Aktivität von $\bar{A}=1,52$ U/mg, die nur knapp unter der der SiMAG-PGL Partikel liegt. Die geringste Aktivität wird bei MeCl-Partikeln mit einem Wert von $\bar{A}=1,43$ U/mg gemessen.

4.3.6 Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymimmobilisierung

Um den Einfluss des Immobilisierungs-pH-Wertes auf das Immobilisierungsergebnis zu untersuchen, wurden Versuche mit pH-Werten zwischen pH=5,5-8,5 durchgeführt. Auf Immobilisierungsversuche bei extrem hohen bzw. extrem niedrigen pH-Werten wurde bewusst verzichtet, da unter diesen Reaktionsbedingungen mit einer irreversiblen Enzymdenaturierung zu rechnen ist. Die Enzymimmobilisierung erfolgte für eine Inkubationsdauer von $t=1$ h, mit einer Enzymkonzentration von $c_0=1,5$ mg/mL bei $T=25$ °C. Aufgrund der pH-Abhängigkeit der Farbreaktion des Bradford-Tests, musste zur Bestimmung der Enzymkonzentration für jeden pH-Wert eine separate Kalibrationskurve aufgenommen werden. Die Abhängigkeit der immobilisierten Enzymmenge vom Immobilisierungs-pH-Wert ist in Abbildung 4.3-7 gezeigt.

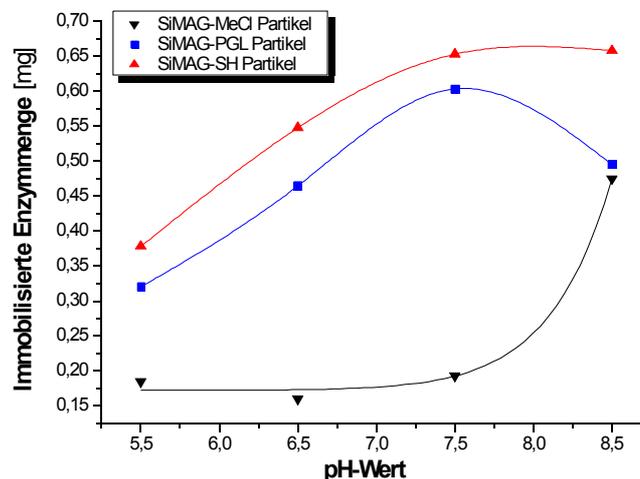


Abbildung 4.3-7: Immobilisierte Enzymmenge in Abhängigkeit vom Immobilisierungs-pH-Wert;

Reaktionsbedingungen: $c_0=1,5$ mg/mL, $t=1$ h, $T=25$ °C

Der Immobilisierungsverlauf der MeCl-Partikel unterscheidet sich deutlich von dem der SiMAG-PGL und -SH Partikel. Im pH-Bereich von pH=5,5-7,5 ändert sich die Menge des an SiMAG-MeCl Partikel immobilisierten Enzyms nicht signifikant. Erst oberhalb eines Immobilisierungs-pH-Wertes pH>7,5 steigt die gebundene Enzymmenge deutlich an. Dieses pH-Verhalten deutet auf die Beteiligung von Aminogruppen des Enzyms an der Immobilisierungsreaktion hin, die erst im basischen Bereich deprotoniert vorliegen. Beispielsweise können dies die Arginin-Reste des α -Chymotrypsins sein, deren Guanidino-Gruppe einen pK_s -Wert von $pK_s=12,48$ hat. So befindet sich im α -Chymotrypsin beispielsweise eine Arginin-Gruppe in Position 145 direkt benachbart zum C-terminalen Ende der Peptidkette (vgl. Abbildung 4.3-8). Da dieses Ende aus dem Enzymmolekül herausragt, ist das Arg¹⁴⁵ aufgrund seiner guten Zugänglichkeit möglicherweise eine bevorzugte Bindungsstelle für die dicht an der Partikeloberfläche gebundenen MeCl-Gruppen.

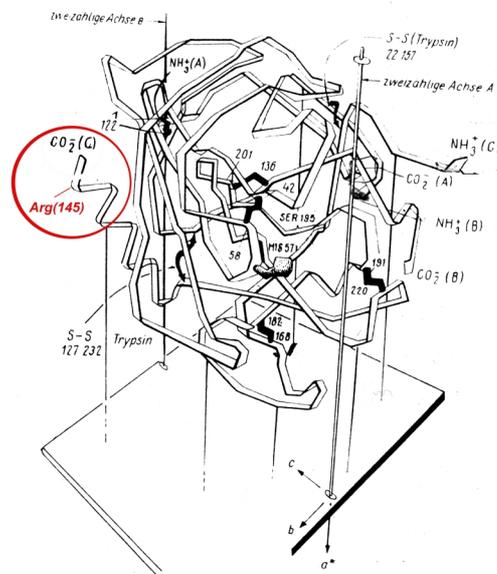


Abbildung 4.3-8: Dreidimensionale Struktur des α -Chymotrypsins. Das Arg¹⁴⁵ ist durch die rote Markierung hervorgehoben; [Gray, 1976]

Das pH-Verhalten der PGL-Partikel unterscheidet sich deutlich von dem der MeCl-Partikel. Hier steigt die Menge gebundenen Enzyms bis zu einem pH-Wert von pH=7,5, wo sie mit 60,3 $\mu\text{g}/\text{mg}$ PGL-Partikel ein Maximum erreicht. An der Immobilisierungsreaktion ist demnach eine stärker saure Aminogruppe als bei der Immobilisierung an MeCl-Partikeln beteiligt. Hierfür kommt neben der ϵ -Aminogruppe der Lysin-Reste ($pK_s=10,54$) auch das N-terminale Ende der Peptidkette in Betracht. Die Polyglutaraldehyd-Gruppen besitzen als Makromoleküle eine höhere Beweglichkeit als die direkt auf der Partikeloberfläche gebundenen MeCl-Gruppen und erreichen so auch weniger gut zugängliche Aminogruppen des α -Chymotrypsins. Der Abfall der immobilisierten Enzymmenge im basischen Bereich bei pH-

Werten von $\text{pH} > 7,5$ resultiert aus dem zugrunde liegenden Reaktionsmechanismus der Immobilisierungsreaktion. Die Anbindung des Enzyms an die PGL-Partikel erfolgt säurekatalysiert über die Imine (vgl. Kapitel 4.3.1, S.45) und läuft deshalb im Basischen nicht mehr ab.

Das pH-Verhalten der Thiol-Partikel zeigt einen ähnlichen Verlauf wie das der PGL-Partikel, weist jedoch kein Optimum der immobilisierten Enzymmenge auf. Vielmehr nähert sich die immobilisierte Enzymmenge mit zunehmendem pH-Wert einem Sättigungswert von $65 \mu\text{g}/10 \text{ mg SH-Partikel}$. Eine Erklärung dieses pH-Verlaufs kann anhand des Reaktionsmechanismus der Immobilisierungsreaktion erfolgen. Die Anbindung des Enzyms an die SH-Partikel erfolgt über den nucleophilen Angriff der deprotonierten Thiol-Gruppen an den Disulfidbrücken des Enzyms (vgl. Kapitel 4.3.1, S. 45). Mit steigendem pH-Wert nimmt die Zahl der Thiolat-Gruppen auf der Partikeloberfläche zu. Dadurch steigt auch die immobilisierte Enzymmenge über den untersuchten Konzentrationsbereich an. Die Sättigung tritt ein, wenn alle Thiol-Gruppen deprotoniert vorliegen und das Enzym die gesamte Partikeloberfläche belegt, da dann keine Bindungsstellen für die weitere Enzymimmobilisierung mehr verfügbar sind.

Die immobilisierte Enzymmenge alleine ist jedoch kein ausreichendes Optimierungskriterium. Aus diesem Grund wurden die spezifischen Aktivitäten der Immobilisate mittels BTEE-Assay bei einem einheitlichen pH-Wert von $\text{pH}=7,4$ bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4.3-9 dargestellt. Steigt die immobilisierte Enzymmenge mit zunehmendem pH-Wert in erster Näherung bei allen drei Partikelsorten, ergibt sich für die spezifische Restaktivität der Immobilisate ein ganz anderer Verlauf der pH-Abhängigkeit.

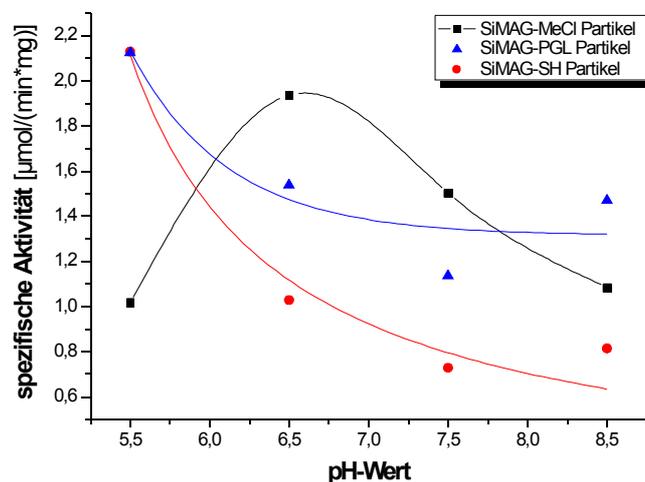


Abbildung 4.3-9: Spezifische Aktivität der MeCl-, PGL- und SH-Immobilisate bei Variation des Immobilisierungs-pH-Wertes; Reaktionsbedingungen: $c_0=1,5 \text{ mg/mL}$, $t=1\text{h}$; $T=25 \text{ }^\circ\text{C}$

Die Proben der MeCl-Partikel besitzen ein deutliches Maximum der spezifischen Aktivität bei einem Immobilisierungs-pH-Wert von pH=6,5. Die Immobilisate der PGL- und SH-Partikel zeigen trotz Zunahme der immobilisierten Enzymmenge mit steigendem Immobilisierungs-pH-Wert einen fallenden Verlauf der spezifischen enzymatischen Aktivität.

Trotz deutlicher Zunahme der immobilisierten Enzymmenge auf den PGL-Partikeln, ist die Aktivität der Enzym-Träger-Komplexe über den gesamten pH-Bereich nahezu konstant. Aufgrund der mit steigendem pH-Wert zunehmenden Deprotonierung der ϵ -Aminogruppen nimmt die Nucleophilie der Lysin-Reste zu. Dadurch werden die α -Chymotrypsinmoleküle mehrfach an die Partikeloberfläche gebunden, was zu einer Deformation des Enzyms führt. Diese vermehrte konformative Belastung des α -Chymotrypsins führt zu Aktivitätsverlusten, die den Aktivitätszuwachs durch die steigende immobilisierte Enzymmenge an den SiMAG-PGL Partikeln letztlich kompensieren. Die Aktivität nimmt somit über den gemessenen pH-Bereich nicht zu, weshalb die spezifische Aktivität der PGL-Immobilisate abnimmt.

Auch bei den Thiol-Partikeln führt die Variation des pH-Wertes bei der Enzymimmobilisierung zu einer Deformation des Enzyms. Bei steigendem Immobilisierungs-pH-Wert resultiert daraus ebenfalls eine Abnahme der Aktivität der Immobilisate. Mit der fortschreitenden Deprotonierung der Thiol-Gruppen bei steigendem pH-Wert werden auch zunehmend Disulfidbrücken des Enzyms angegriffen, was die Enzymkonformation destabilisiert. Zusätzlich nehmen die ionischen Wechselwirkungen der deprotonierten Thiol-Gruppen mit den geladenen Seitenketten des α -Chymotrypsins zu. Beide Effekte führen schließlich dazu, dass die dreidimensionale Struktur des immobilisierten Enzyms verzerrt wird und die Aktivität sinkt.

Da bei einer effektiven Enzymimmobilisierung eine möglichst große Aktivität der erhaltenen Enzym-Träger-Komplexe erzielt, dabei aber nicht unnötig viel Enzym verbraucht werden soll, erfolgte die Auswahl des optimierten Immobilisierungs-pH-Wertes ausschließlich basierend auf den Ergebnissen der Aktivitätstests. Für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an PGL- und SH-Partikeln ist demnach ein pH-Wert von pH=5,5, für die Immobilisierung an SiMAG-MeCl Partikeln ein pH-Wert von pH=6,5 optimal und führt zur größten spezifischen Restaktivität des immobilisierten Enzyms.

4.3.7 Zusammenfassung und Diskussion der ermittelten optimierten Immobilisierungsparameter

Die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen idealen Versuchsparameter der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-MeCl, SiMAG-PGL und SiMAG-SH Parti-

keln sind noch einmal in Tabelle 4.3-1 zusammenfassend aufgeführt. Bis auf den Immobilisierungs-pH-Wert sind die Immobilisierungsparameter für alle drei Partikelsorten identisch.

Tabelle 4.3-1: Optimierte Immobilisierungsparameter

Immobilisierungsparameter		Optimierter Wert
Schüttlerdrehzahl		850 rpm
Eingesetzte α -Chymotrypsinkonzentration		1,5 mg/mL
Immobilisierungsdauer		1 h
Immobilisierungstemperatur		25 °C
Immobilisierungs-pH-Wert	MeCl-Partikel	6,5
	PGL- & SH-Partikel	5,5

Um nun den Erfolg der Optimierungsversuche zur Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-Partikel zu beurteilen, werden im Folgenden die Restaktivitäten des immobilisierten Enzyms zu Beginn und am Ende der Optimierung miteinander und mit der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms verglichen.

In Tabelle 4.3-2 sind hierzu die spezifischen Aktivitäten sowie die spezifischen Restaktivitäten bezogen auf das native Enzym, die im ersten und letzten Optimierungsschritt erreicht wurden, aufgelistet.

Tabelle 4.3-2: Spezifische Aktivitäten des auf SiMAG-MeCl, -PGL und -SH Partikeln immobilisierten α -Chymotrypsins vor und nach der Optimierung

Partikelsorte	Spezifische Aktivität (Optimierungsbeginn) [U/mg]	Spezifische Aktivität (Optimierungsende) [U/mg]	Spez. Restaktivität (Optimierungsbeginn) [%]	Spez. Restaktivität (Optimierungsende) [%]
SiMAG-MeCl	0,88	1,94	2,4	5,4
SiMAG-PGL	1,28	2,13	3,5	5,9
SiMAG-SH	0,86	2,13	2,3	5,9

Bei allen drei Partikelsorten wurde durch die optimierte Auswahl der untersuchten Immobilisierungsparameter eine deutliche Steigerung der auf den Partikeln immobilisierten enzymatischen Aktivität erreicht. Der größte Optimierungserfolg ist bei den SiMAG-PGL Partikeln zu verzeichnen. Hier gelang es, durch die gezielte Veränderung der Reaktionsbedingungen die Aktivität des Immobilisates um 147 % von 0,86 auf 2,13 U/mg immobilisierten Enzyms zu steigern. Etwas geringer war die Aktivitätssteigerung bei den MeCl-Partikeln, bei denen die spezifische Aktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins nach Abschluss der Optimierung um 120 % von 0,88 auf 1,94 U/mg immobilisiertes Enzym stieg. Der geringste Optimierungserfolg wurde bei den SiMAG-SH Partikeln realisiert. Die Optimierung der Immobilisierungsparameter führte bei dieser Partikelsorte auch noch zu einer Aktivitäts-

steigerung des immobilisierten Enzyms um 66% von 1,28 auf 2,13 U/mg immobilisierten Enzyms. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass bei der Immobilisierung an SiMAG-SH Partikeln die spezifische Aktivität schon zu Beginn der Optimierung um 45 % größer war, als bei den beiden anderen Partikelsorten.

Aber auch nach der Optimierung der Immobilisierungsparameter besitzt das immobilisierte α -Chymotrypsin, unabhängig von der Trägermatrix, weniger als 10 % der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms. Die möglichen Ursachen für diese geringe Restaktivität sind vielfältig. Das an die Partikel gebundene α -Chymotrypsin ist einer starken sterischen Belastung ausgesetzt, da die Immobilisierung zu einer Verzerrung der dreidimensionalen Konformation des Enzyms führt. Durch die Mehrfachanbindung eines einzelnen Enzymmoleküls an die Magnetpartikel wird dieser aktivitätsmindernde Einfluss der Immobilisierung weiter verstärkt.

Die hohe Belegungsdichte des Enzyms auf der Partikeloberfläche ist eine weitere Ursache für die verminderte Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins. Wie schon in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert, treten durch die gegenseitige Behinderung der dicht nebeneinander sitzenden Enzymmoleküle zusätzlich sterische Hinderungen im Hinblick auf die Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums auf, die einen negativen Einfluss auf die Restaktivität des trägerfixierten α -Chymotrypsins ausüben.

Diffusionseffekte, die durch die poröse Struktur der Trägermatrix auftreten, verringern die Restaktivität des Enzyms ebenfalls. So sind die Konzentrationen von Substrat und Produkt im Poreninneren der Magnetpartikel unterschiedlich von denen in der umgebenden Reaktionslösung. Der Substrattransport zum aktiven Zentrum erfolgt ebenso wie der Produkttransport im Inneren der Poren ausschließlich durch Diffusion. Diffusive Transportvorgänge sind jedoch wesentlich langsamer als der konvektive Transport. So kommt es im Poreninneren möglicherweise zu Diffusionslimitierungen, die die messbare Restaktivität des dort immobilisierten α -Chymotrypsins herabsetzen.

Durch die Optimierung der Immobilisierungsparameter konnte die Restaktivität des Enzyms zwar deutlich gesteigert werden, liegt aber immer noch unter 10 %. Um die Immobilisierung weiter zu verbessern und noch höhere Restaktivitäten zu erreichen, soll die Partikeloberfläche modifiziert werden (vgl. Kapitel 5 und 6). Durch den Einbau von Spacer-Molekülen lassen sich möglicherweise die sterischen Belastungen des immobilisierten α -Chymotrypsins abbauen, so dass eine höhere spezifischen Restaktivität resultiert.

4.4 Charakterisierung von immobilisiertem α -Chymotrypsin

Enzymimmobilisierungen bieten neben der einfachen Abtrennung des Katalysators den Vorteil, dass trägergebundene Enzyme häufig eine größere Beständigkeit gegenüber physikalischen Parametern aufweist. Aus diesem Grund wurden zur Charakterisierung des direkt an die Partikeloberfläche gebundenen α -Chymotrypsins die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} , die Michaelis-Menten-Konstante K_M sowie die Langzeitstabilität und das Temperaturverhalten des immobilisierten α -Chymotrypsins untersucht.

4.4.1 Kinetische Parameter des immobilisierten α -Chymotrypsins

Neben der Enzymaktivität ist die Beschreibung der enzymatischen Effizienz ein Hauptziel enzymkinetischer Untersuchungen. Zur Charakterisierung des immobilisierten Enzyms sind die Michaelis-Menten-Konstante K_M , die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} sowie die Wechselzahl k_{cat} (*turnover number*) wichtige Kenngrößen, deren Kenntnis auch zum Verständnis von Enzymfunktionen unerlässlich ist.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter des immobilisierten α -Chymotrypsins wird in erster Näherung davon ausgegangen, dass die beobachtete hydrolytische Spaltung eine Ein-Substrat-Reaktion ist. In verdünnten, wässrigen Lösungen kann dieser Ansatz erfolgen, da die Wasserkonzentration über den gesamten Reaktionsverlauf annähernd konstant ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die experimentellen, enzymkinetischen Untersuchungen zur Charakterisierung des immobilisierten α -Chymotrypsins mit Substratanfangskonzentrationen von $[S]_0=0,05-0,5$ mmol/L durchgeführt. Die Enzymimmobilisierung an den Magnetpartikeln erfolgte zuvor unter den in Tabelle 4.3-1 aufgeführten optimierten Immobilisierungsbedingungen.

Abbildung 4.4-1 zeigt die mittels BTEE-Assay erhaltenen Absorptions-Zeit-Kurven der Aktivitätsuntersuchungen am Beispiel der SiMAG-SH Trägermatrix. Aus der jeweiligen Anfangssteigung der Absorptions-Zeit-Kurven werden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten berechnet.

Durch geeignete Auftragung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit v gegen die eingesetzte Substratkonzentration $[S]_0$ in einem Hanes-Diagramm (Abbildung 4.4-2) lassen sich anschließend v_{\max} und K_M nach Gleichung 4.4-1 graphisch ermitteln:

$$\frac{[S]_0}{v} = \frac{1}{v_{\max}} \cdot [S]_0 + \frac{K_M}{v_{\max}} \quad (4.4-1)$$

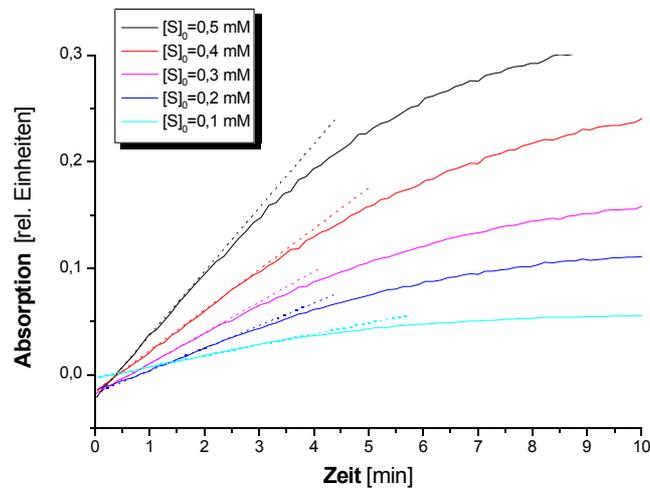


Abbildung 4.4-1: Absorptions-Zeit-Verlauf bei variierten Substratanfangskonzentrationen $[S]_0$ zur Bestimmung der kinetischen Parameter des auf SiMAG-SH Partikeln immobilisierten Enzyms

Die durch dieses Linearisierungsverfahren erhaltenen Geraden haben eine Steigung von $1/v_{\max}$ und schneiden die Abszisse bei $-K_M$. Die Darstellung der Messergebnisse im Hanes-Diagramm wurde der häufig verwendeten Darstellung im Lineweaver-Burk-Plot vorgezogen, da bei dieser Darstellungsmethode nur eine unwesentliche Fehlervverzerrung auftritt und eine einfache lineare Regression möglich ist [Bisswanger, 1994].

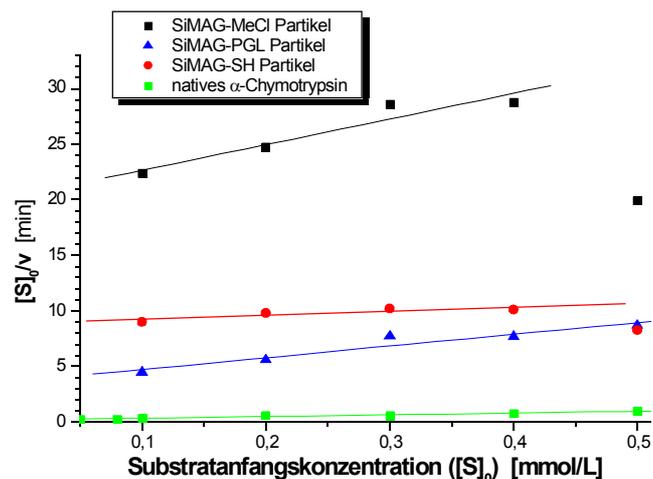


Abbildung 4.4-2: Hanes-Diagramm zur Bestimmung der kinetischen Parameter des auf SiMAG-MeCl, SiMAG-PGL und SiMAG-SH Partikeln immobilisierten α -Chymotrypsins

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits mehrfach beschrieben, werden die charakteristischen Eigenschaften trägergebundener Enzyme durch eine Vielzahl unterschiedlicher Faktoren wie z.B. Wechselwirkungen zwischen Trägermaterial und Substrat, aber auch Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Oberfläche der Trägermatrix beeinflusst.

Je nach Wahl der Trägermatrix beeinflusst auch der Porendurchmesser, die Ladung des Trägers, die Ladung des Substrats, seine Diffusionsgeschwindigkeit und die Porendiffusionsgeschwindigkeit das kinetische Verhalten des immobilisierten Enzyms. Da diese Effekte jedoch nicht im Einzelnen in den kinetischen Modellen berücksichtigt werden können, liefert die Auswertung der experimentell erhaltenen Daten, unter der Annahme einer vorliegenden Michaelis-Menten-Kinetik, deshalb nur scheinbare kinetische Parameter ($K_{M, app}$, $k_{cat, app}$ und $v_{max, app}$).

Tabelle 4.4-1 fasst die Ergebnisse der Experimente und die berechneten kinetischen Parameter zusammen. Die dort angegebenen Fehler für $1/v_{max, app}$ und $K_{M, app}/v_{max, app}$ stammen aus der linearen Regression, die für $K_{M, app}$, $v_{max, app}$ und $k_{cat, app}$ wurden über das Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt (vgl. Kapitel 11.2, S. 120).

Tabelle 4.4-1: $K_{M, app}$ -, $v_{max, app}$ - und $k_{cat, app}$ -Werte aus dem Hanes -Diagramm für immobilisiertes und natives α -Chymotrypsin

Trägermatrix	$1/v_{max, app}$ [(min*L)/mmol]	$K_{M, app}/v_{max, app}$ [min]	$K_{M, app}$ [mmol/L]	$v_{max, app}$ [mmol/(L*min)]	$k_{cat, app}$ [min ⁻¹]
SiMAG-MeCl	23,04 ± 4,96	20,36 ± 1,34	0,88 ± 0,07	0,043 ± 0,009	99 ± 57
SiMAG-PGL	10,54 ± 1,80	3,68 ± 0,60	0,35 ± 0,07	0,095 ± 0,016	79 ± 21
SiMAG-SH	3,75 ± 1,38	8,85 ± 0,38	2,36 ± 0,14	0,267 ± 0,098	185 ± 83
natives α -Chymotrypsin	1,55 ± 0,14	0,21 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,647 ± 0,060	1616 ± 311

Im Vergleich mit dem nativen Enzym ist die molekulare Aktivität $k_{cat, app}$ des immobilisierten α -Chymotrypsins bei allen drei Partikelsorten um ein bis zwei Zehnerpotenzen kleiner. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen zur Optimierung der Immobilisierungsparameter bereits beobachtet, führt die kovalente Anbindung des Enzyms an die Trägermatrix zu einem deutlichen Verlust der enzymatischen Aktivität, die sich hier in den niedrigen Werten der turnover-number k_{cat} widerspiegelt.

Bei den Immobilisaten der Thiol-Partikel ist zudem auffällig, dass der Wert der Michaelis-Menten-Konstante K_M um eine Zehnerpotenz größer als bei den beiden anderen Partikelsorten und dem nativen Enzym ist. K_M ist direkt proportional zur Substrataffinität des Enzyms. Die höhere Michaelis-Menten-Konstante stützt somit die These aus Kapitel 4.3.6, dass es bei der Immobilisierung an den Thiol-Partikeln aufgrund der Spaltung von Disulfidbrücken zu einer Destabilisierung der dreidimensionalen Enzymkonformation kommt.

4.4.2 Langzeitstabilität des immobilisierten α -Chymotrypsins

Für eine technische Verwendung des immobilisierten α -Chymotrypsins ist eine einfache Lagerform von Interesse, die die Aktivität des immobilisierten Enzyms über einen längeren

Zeitraum stabil erhält. Aus diesem Grund wurde die Langzeitstabilität der Immobilisate untersucht. Dazu wurden für jede Partikelsorte jeweils zwei Proben angesetzt und das Enzym unter den in Tabelle 4.3-1 aufgeführten optimierten Reaktionsbedingungen immobilisiert. Die Immobilisate wurden anschließend in 1 mL PBS-Puffer gelagert. Nach einer Lagerungsdauer von 0, 6 und 20 Tagen wurde die enzymatische Aktivität der Proben mittels BTEE-Assay bestimmt. Um den Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms abschätzen zu können, wurde die Lagerung sowohl bei einer Temperatur von $T=5\text{ °C}$ als auch bei $T=22\text{ °C}$ durchgeführt. Tabelle 4.4-2 (a) und (b) zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Langzeitstabilität des Immobilisates.

Die Haltbarkeit der Immobilisate ist, ebenso wie die der nativen Enzymlösung, bei einer Lagerungstemperatur von $T=22\text{ °C}$ deutlich geringer als bei $T=5\text{ °C}$. Sowohl das native Enzym als auch die Immobilisate verlieren bei dieser Temperatur innerhalb des Untersuchungszeitraums deutlich an Aktivität. Das native Enzym besitzt nach 20 Tagen noch etwa zwei Drittel seiner enzymatischen Ausgangsaktivität, wohingegen die Aktivität der Immobilisate im gleichen Zeitraum um 37-95 % abnimmt. Am größten ist der Aktivitätsverlust bei den MeCl-Partikeln. Bereits nach einer Lagerungsdauer von nur sechs Tagen besitzen sie nur noch 19 % der ursprünglichen Aktivität. Die Aktivität der nativen Enzymlösung liegt nach dieser Zeit noch bei 78 %, die der SH- und PGL-Partikel zwischen 30-63 %.

Tabelle 4.4-2: Langzeitstabilität von nativem, auf SiMAG-MeCl, SiMAG-PGL und SiMAG-SH Partikeln immobilisiertem α -Chymotrypsin

(a) Lagerung bei $T=5\text{ °C}$

Lagerungsdauer [Tage]	Spezifische Aktivität (natives Enzym) [U/mg]	Spezifische Aktivität (MeCl-Partikel) [U/mg]	Spezifische Aktivität (PGL-Partikel) [U/mg]	Spezifische Aktivität (SH-Partikel) [U/mg]
0	36,2	2,8	1,9	2,3
6	35,0	1,0	1,4	1,1
20	37,0	0,5	1,4	0,8

(b) Lagerung bei $T=22\text{ °C}$

Lagerungsdauer [Tage]	Spezifische Aktivität (natives Enzym) [U/mg]	Spezifische Aktivität (MeCl-Partikel) [U/mg]	Spezifische Aktivität (PGL-Partikel) [U/mg]	Spezifische Aktivität (SH-Partikel) [U/mg]
0	36,2	2,1	1,9	2,7
6	28,5	0,4	1,9	0,9
20	26,3	0,1	1,2	0,2

Bei einer Lagerungstemperatur von $T=5\text{ °C}$ ist die Langzeitbeständigkeit aller Immobilisate etwas größer. Die Aktivität der MeCl-Immobilisate beträgt nach einer Lagerungsdauer von

sechs Tagen noch 36 % der ursprünglichen Aktivität. Nach 20 Tagen ist der Aktivitätsverlust mit 82 % aber auch bei dieser Temperatur im Vergleich mit den beiden anderen Partikelsorten am größten. PGL- und SH-Partikel besitzen nach diesem Zeitraum noch eine spezifische Restaktivität von 35-74 %. Das native Enzym besitzt nach sechs Tagen noch eine spezifische Aktivität von 35,0 U/mg und nach zwanzig Tagen von 26,3 U/mg, wobei der Aktivitätsverlust der Enzymlösung größtenteils auf den Selbstverdau des α -Chymotrypsins zurück zu führen ist. Bei den Immobilisaten ist davon auszugehen, dass der auftretende Selbstverdau des α -Chymotrypsins aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Enzymmoleküle von untergeordneter Bedeutung ist. Für die starke Abnahme der enzymatischen Aktivität der Immobilisate muss demnach ein anderer Zersetzungsmechanismus verantwortlich sein. Denkbar ist, dass noch nicht abgesättigte funktionelle Gruppen auf der Partikeloberfläche mit der Zeit mit bereits gebundenem Enzym weiter reagieren. Dadurch nimmt die Zahl der Bindungen zwischen Enzym und Partikeloberfläche zu.

Mit der Anzahl der Bindungen steigt die Wahrscheinlichkeit, dass für die Aufrechterhaltung der dreidimensionalen Struktur des α -Chymotrypsins wichtige Amino- und Thiolgruppen an der Reaktion beteiligt sind, was zu einer Destabilisierung der Enzymkonformation und damit zu einem Aktivitätsverlust führt. Außerdem wird das α -Chymotrypsin in seiner räumlichen Konformation stärker verzerrt, woraus ebenfalls ein deutlicher Aktivitätsverlust resultiert. Gestützt wird diese Vermutung von der Beobachtung, dass die PGL-Immobilisate den geringsten Aktivitätsverlust zeigen. Bei ihnen bindet das Enzym an gefaltete Makromoleküle. Diese besitzen eine größere Beweglichkeit der Ankergruppen als die direkt an der Partikeloberfläche aufgebrachtene MeCl- und SH-Gruppen. Dadurch kann die sterische Belastung des mehrfach gebundenen α -Chymotrypsins besser abgefedert werden und wirkt sich in geringerem Ausmaß auf die enzymatische Aktivität der PGL-Immobilisate aus.

4.4.2.1 Temperaturabhängigkeit der spezifischen Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins

Häufig wird bei der Immobilisierung von Enzymen eine Verbesserung ihrer Temperaturbeständigkeit beobachtet. Aus diesem Grund wurde das Temperaturverhalten der SiMAG-Immobilisate untersucht und mit dem Temperaturverhalten des nativen Enzyms verglichen. Die spezifische Aktivität des nativen und des auf den unterschiedlichen Partikelsorten immobilisierten α -Chymotrypsins wurde dazu bei Reaktionstemperaturen zwischen 30 – 60 °C mittels BTEE-Assay bestimmt. Die Enzymimmobilisierung auf den Partikeln erfolgte zuvor unter den optimierten Versuchsbedingungen aus Tabelle 4.3-1. Die Ergebnisse der Tempe-

raturuntersuchungen sind in Abbildung 4.4-3 graphisch dargestellt.

Natives α -Chymotrypsin zeigt ein deutliches Temperaturoptimum der enzymatischen Aktivität bei einer Reaktionstemperatur von $T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Oberhalb von $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ nimmt die Aktivität des Enzyms dann rapide ab. Bei einer Reaktionstemperatur von $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ sind schließlich nur noch 4,5 % der im Temperaturoptimum vorhandenen spezifischen Aktivität nachzuweisen. Dieser temperaturbedingte Aktivitätsverlust ist auf die irreversible Hitzedenaturierung der Tertiärstruktur des Enzyms zurückzuführen.

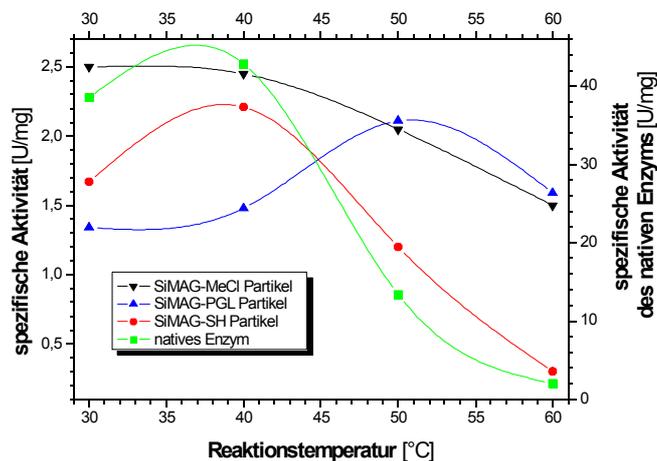


Abbildung 4.4-3: Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins

Das Temperaturverhalten der spezifischen Aktivität der SH-Immobilisate ist dem des nativen Enzyms sehr ähnlich. Bis zu einer Reaktionstemperatur von $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ steigt auch hier die spezifische Aktivität und fällt bei höheren Reaktionstemperaturen ebenfalls deutlich ab. Die große Temperaturempfindlichkeit der SH-Immobilisate ist durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken bei der kovalenten Anbindung zu erklären, das zu einer Destabilisierung der Enzymstruktur führt. Bei den MeCl-Immobilisaten zeigt sich ein deutlich gleichmäßigerer Temperaturverlauf der Aktivität. Es ist kein ausgeprägtes Temperaturoptimum zu erkennen, allerdings ist das Ausmaß des Aktivitätsverlustes auch nicht so deutlich ausgeprägt wie z.B. beim nativen Enzym. Bei einer Reaktionstemperatur von $T=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ besitzen die MeCl-Immobilisate noch 60 % ihrer maximalen spezifischen Aktivität, so dass durch die Immobilisierung eine erhöhte Temperaturstabilität des Enzyms erreicht wird. Noch größer als bei den Immobilisaten der SiMAG-MeCl Partikel ist die beobachtete Erhöhung der Temperaturstabilität der PGL-Immobilisate. Sie zeigen ein deutlich verändertes Temperaturverhalten der spezifischen Aktivität. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur von 30 auf $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ führt bei

den PGL-Partikeln zu keiner nennenswerten Aktivitätssteigerung. Erst oberhalb einer Reaktionstemperatur von 40 °C kommt es zu einem deutlichen Aktivitätszuwachs. Das Temperaturoptimum wird bei T=50 °C erreicht und liegt damit mehr als 10 °C höher als beim nativen Enzym. Durch die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-PGL Partikeln nimmt die Thermostabilität des Enzyms erheblich zu und beträgt bei 60 °C immer noch mehr als 75 % der maximalen spezifischen Aktivität.

Eine mögliche Ursache dieser erhöhten Temperaturstabilität ist die Einschränkung der für die Hitzedenaturierung verantwortlichen thermischen Schwingungen durch die Anbindung des Enzyms an die Trägermatrix. Die einzelnen Enzymsegmente besitzen nach der Immobilisierung eine eingeschränkte Bewegungsfreiheit. Da die Anbindung an die PGL-Partikel über langkettige Makromoleküle erfolgt, die eine größere Flexibilität als die direkt auf der Partikeloberfläche anhaftenden SH- bzw. MeCl-Gruppen besitzen, ist die Deformation des Enzyms nach erfolgter Immobilisierung geringer, woraus eine größere Stabilität resultiert. Bei einer Reaktionstemperatur von T=60 °C besitzen die PGL-Immobilisate eine ähnlich große spezifische Aktivität wie das native Enzym. Bei dieser Temperatur wird der durch die Immobilisierung auftretende Aktivitätsverlust durch die erhöhte Temperaturstabilität im Vergleich mit dem nativen Enzym kompensiert.

5. Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel

Nachdem die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an den unterschiedlichen SiMAG-Partikeln untersucht und die Immobilisierungsparameter optimiert wurden, wird in den folgenden Kapiteln die Modifizierung der SiMAG-MeCl-Partikeloberfläche beschrieben. Um den Einfluss des Enzymabstandes zur Partikeloberfläche zu untersuchen und das Immobilisierungsergebnis weiter zu verbessern, werden unterschiedliche Spacermoleküle auf die Oberfläche der SiMAG-MeCl Partikel aufgebracht. Die Spacer sollen den Abstand des immobilisierten Enzyms zur Oberfläche der Magnetpartikel vergrößern und damit einen Teil der deaktivierenden Wechselwirkungen zwischen Enzym und Partikeloberfläche vom α -Chymotrypsin abschirmen. Zusätzlich soll das aktive Zentrum des immobilisierten Enzyms durch den größeren Abstand zur Oberfläche für Substratmoleküle besser zugänglich werden. Da bei der Enzymimmobilisierung an SiMAG-PGL Partikeln beobachtet wurde, dass die Enzymbindung an langkettige Makromoleküle eine geringere Deformation verursacht, sollte außerdem die konformative Belastung des α -Chymotrypsins durch den Einbau der Spacer verringert werden.

Der Immobilisierung des Enzyms an die modifizierten Magnetpartikel geht allerdings noch eine Aktivierungsreaktion voraus. Prinzipiell könnten sowohl die entsprechenden funktionellen Gruppen des Enzyms als auch die der Trägermatrix für die kovalente Anbindung aktiviert werden. Um die bei der Aktivierung der gelösten Komponente möglicherweise auftretenden inter- und intramolekularen Vernetzungen schon im Vorfeld auszuschließen, wurde die Entscheidung getroffen, die trägerfixierten Ankergruppen zu aktivieren. Dazu soll nach erfolgter Oberflächenmodifizierung die zweite, noch freie terminale Aminogruppe der Spacermoleküle mit Glutardialdehyd umgesetzt werden, so dass nach der Aktivierung Carbonyl-Ankergruppen für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin auf der Partikeloberfläche verfügbar sind (vgl. Kapitel 5.2, S. 68).

5.1 Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel

Die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel wurde mit vier unterschiedlichen homo-bifunktionellen, aliphatischen Diaminen mit unterschiedlichen Kettenlängen durchgeführt (vgl. Tabelle 5.1-1, S. 67). Die Anbindung der Spacer erfolgt dabei analog zum Reaktionsmechanismus bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin. Die Chlormethylgruppen auf der Partikeloberfläche reagieren mit den Aminogruppen des Spacers, wobei unter Wasseraustritt das Imin gebildet wird. Die Spacer wurden im Überschuss eingesetzt, um die Reaktion eines Spacermoleküls mit zwei unterschiedlichen Magnetpartikeln und damit eine

Quervernetzung und ein mögliches Agglomerieren der Partikel zu vermeiden. Zudem sollte durch den verwendeten Überschuss verhindert werden, dass ein Spacermolekül unter Zyklisierung mit zwei funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche reagiert und damit nicht mehr für die Enzymimmobilisierung zur Verfügung steht.

Tabelle 5.1-1: Kettenlänge und molare Massen der einzelnen Spacer-Typen

Nr.	Spacer	Kettenlänge [Anzahl an Bindungen]	Molekulargewicht [g·mol ⁻¹]
1	1,6-Diaminohexan	8	116,2
2	Jeffamine® HK-511	13	220
3	Ethyleneamine E-100	12-18	270-300
4	α,ω -Bis-amino PEG	>200	3000

Zur Modifizierung der Partikeloberfläche wurde für alle vier Spacer die gleiche Vorgehensweise gewählt. 10 mg der Partikel wurden magnetisch aus der Suspension abgetrennt und dreimal mit je 1 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Partikel in 2 mL der jeweiligen Spacerlösung (1 mM in 1x PBS) resuspendiert und für 3 h bei einer erhöhten Reaktionstemperatur von $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 850 rpm mit den Ankergruppen der Magnetpartikel zur Reaktion gebracht. Nach Reaktionsende wurden die Partikel erneut 3x mit je 1 mL PBS gewaschen und bis zur weiteren Verarbeitung in 1 mL PBS bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank gelagert.

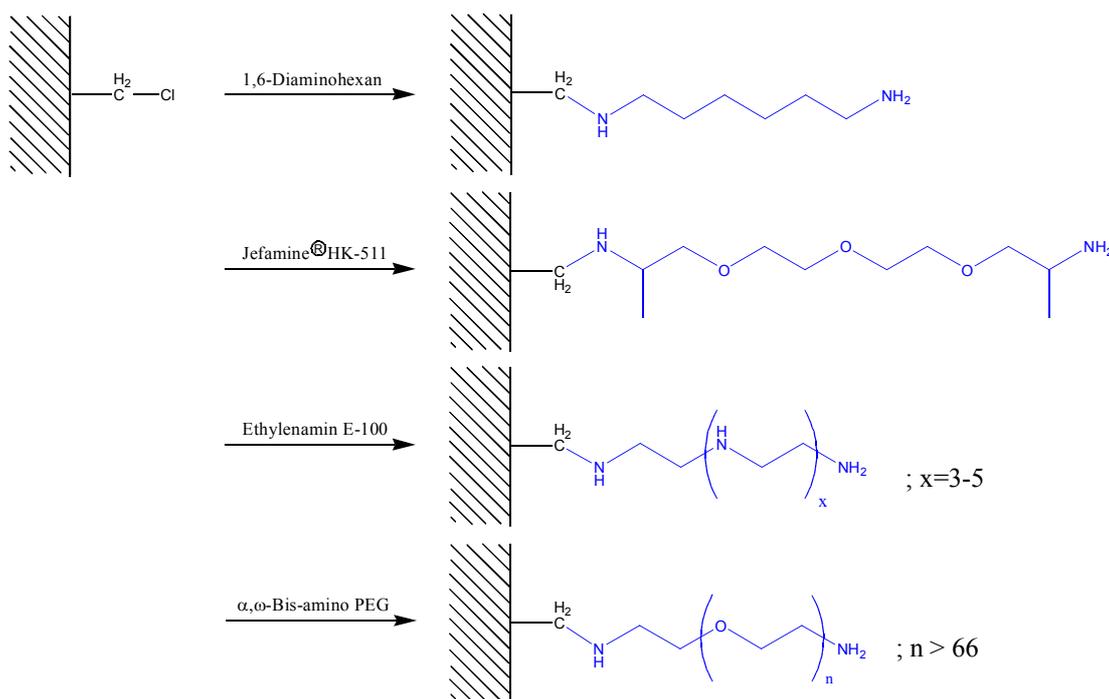


Abbildung 5.1-1: Umsetzung der homo-bifunktionellen Spacer bei der Oberflächenmodifizierung von SiMAG-MeCl Partikeln, Reaktionsbedingungen: $c_{(\text{Spacer})}=1\text{ mM}$, $T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 3h, 850 rpm

5.2 Aktivierung der modifizierten SiMAG-Partikel mit Glutardialdehyd

Bevor die mit den unterschiedlichen Spacermolekülen oberflächenmodifizierten Magnetpartikel zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden können, muss über eine Glutardialdehyd-Lösung (5,53 % (w/v) in 0,2 M Natriumborat pH=8,5 [Nouaimi-Bachmann, 2003] ein bifunktionaler Linker eingeführt werden. Der Linker dient als Verbindungsglied zwischen Spacer und Enzym und stellt die Carbonylfunktionen als Ankergruppen für die kovalente Anbindung des α -Chymotrypsins zur Verfügung. Der vereinfachte Mechanismus zur Aktivierung der spacermodifizierten Magnetpartikel ist in Abbildung 5.2-1 dargestellt. Die zweite, terminale Aminogruppe des Spacermoleküls wird bei der Aktivierung zuerst nucleophil an das Carbonyl-Kohlenstoffatom des Glutardialdehyds addiert. Nach einer anschließenden schnellen Protonenübertragung reagiert das gebildete Hemiaminal in einem weiteren Reaktionsschritt unter Wassereliminierung zum substituierten Imin (Schiffsche Base).

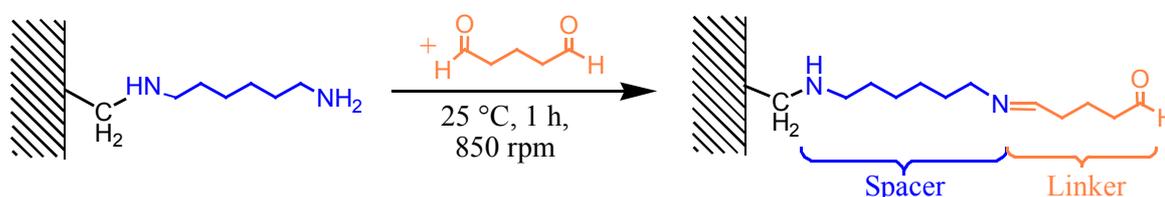


Abbildung 5.2-1: Reaktionsmechanismus der Partikelaktivierung mit Glutardialdehyd am Beispiel mit 1,6-Diaminohexan oberflächenmodifizierter SiMAG-MeCl Partikel;
Reaktionsbedingungen: 25 °C, 1 h, 850 rpm

Da bei allen vier Spacer-Typen endständige, primäre Aminogruppen für die Enzymimmobilisierung aktiviert werden müssen, erfolgte die Reaktion mit Glutardialdehyd unabhängig vom verwendeten Spacer immer nach derselben Versuchsvorschrift.

10 mg der zu aktivierenden, spacermodifizierten SiMAG-Partikel wurden in 2 mL Glutardialdehydreaktionslösung resuspendiert. Die Aktivierungsreaktion erfolgte bei $T=25\text{ °C}$ und 850 rpm für eine Reaktionsdauer von 1h. Durch dreimaliges Waschen der Partikel mit je 1 mL H_2O wurde der Überschuss an Glutardialdehyd nach Reaktionsende entfernt. In einen weiteren Waschschrift wurden die aktivierten SiMAG-MeCl Partikel noch mit 1 mL 1x PBS-Lösung gewaschen und anschließend in 1 mL PBS-Puffer bei $T=7\text{ °C}$ bis zur Enzymimmobilisierung im Kühlschrank gelagert.

6. Enzymimmobilisierung an oberflächenmodifizierten SiMAG-Partikeln

Durch die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel mit unterschiedlichen Spacern sollen die sterischen und konformativen Belastungen des Enzyms bei der kovalenten Immobilisierung verringert werden. Ziel der Untersuchungen ist, durch den Einbau von Spacern zwischen Enzym und Partikeloberfläche, die Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins zu erhöhen und so die Effektivität der Immobilisate zu steigern.

6.1 Einfluss der Spacer auf das Immobilisierungsergebnis

Für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin über verschiedene Spacer ist vor allem die resultierende Restaktivität von Bedeutung. Dabei muss das Enzym nach seiner Immobilisierung über die verschiedenen Spacer einerseits in ausreichender Menge, andererseits aber auch in einer aktiven Form vorliegen.

Um den Einfluss der Spacerlänge auf das Immobilisierungsergebnis bewerten zu können, wurde α -Chymotrypsin auf SiMAG-MeCl Partikeln immobilisiert, deren Oberfläche zuvor mit unterschiedlich langen Spacern belegt und mit Glutardialdehyd aktiviert worden war.

Die Immobilisierung des Enzyms erfolgte unter Standardreaktionsbedingungen (vgl. Kapitel 11.1.1, S. 116) mit einer Enzymkonzentration von 0,5 mg/mL.

Die mit den jeweiligen Spacern erreichten Mengen immobilisierten Enzyms sind in Abbildung 6.1-1 graphisch dargestellt.

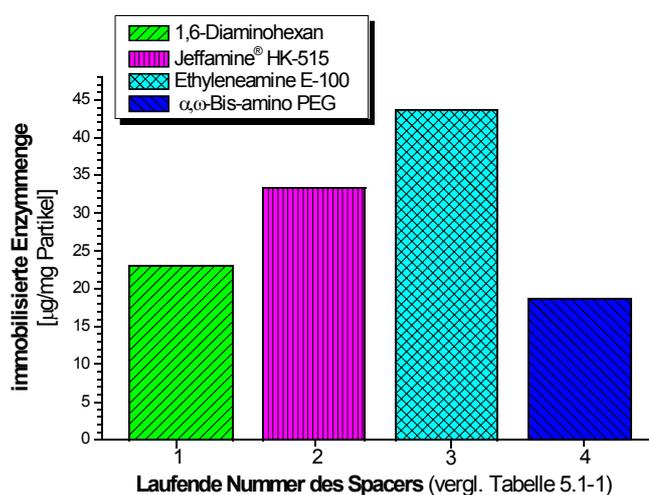


Abbildung 6.1-1: Vergleich der immobilisierten α -Chymotrypsinmenge auf oberflächenmodifizierten SiMAG-MeCl Partikeln; Immobilisierungsbedingungen: $c_0=0,5$ mg/mL, $T=20$ °C, $t=3$ h, 850 rpm

Die höchste Bindungskapazität besitzen die Magnetpartikel, die mit dem Ethylendiamin E-100 Spacer modifiziert wurden. Der Einbau dieses Spacer führt zu einer immobilisierten Enzymmenge von 44 μg pro mg Magnetpartikel. 33 μg α -Chymotrypsin/mg Trägermatrix können auf den mit Jeffamine[®] HK-511 Spacer modifizierten SiMAG-Partikeln immobilisiert werden, was einer um 25 % geringeren Bindungskapazität entspricht. Die Immobilisierung über 1,6-Diaminohexan bzw. α,ω -Bis-amino PEG Spacer führt zu den geringsten Beladungen der modifizierten SiMAG-MeCl Partikel. Mit Enzymmengen von 23 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Partikel bzw. 19 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Partikel wird auf diesen Partikeln nur etwa die Hälfte der Enzymmenge immobilisiert, die bei der Anbindung des Enzyms über den Ethylendiamin E-100 Spacer gebunden wird.

Auffällig ist, dass keine Korrelation der Spacerlänge mit der Bindungskapazität der modifizierten Partikel erkennbar ist. Der Größenzuwachs der Partikel durch die Beschichtung mit unterschiedlich langen Spacern ist anscheinend nicht ausreichend groß genug, um mehr Enzym auf der Partikeloberfläche zu binden. Dies erklärt aber noch nicht, warum die Enzymbeladung bei allen spacermodifizierten Partikeln geringer ist, als bei der Enzymimmobilisierung direkt auf der Partikeloberfläche.

Eine Ursache für diese Beobachtung liegt möglicherweise in dem unterschiedlichen Reaktionsmechanismus der Immobilisierung. Die gewählten Immobilisierungsparameter waren für die Enzymimmobilisierung an die Chlormethyl-Gruppe optimiert. Bei den spacermodifizierten Magnetpartikeln steht diese jedoch für die kovalente Anbindung nicht mehr zur Verfügung. Die modifizierte Partikeloberfläche trägt nach der Aktivierung nur noch Aldehydgruppen als funktionelle Bindungsstellen für das Enzym, so dass der nucleophile Angriff der Amino-Gruppen des Enzyms nur noch an einem Carbonylkohlenstoffatom erfolgen kann.

Die Geschwindigkeit der nucleophilen Substitution hängt maßgeblich von der Natur der Austrittsgruppe ab. Dabei wird die Austrittsbereitschaft der abgehenden Gruppe von Faktoren wie z. B. der Stärke ihrer Bindung, der Polarisierbarkeit der Bindung und der Stabilität der freien Abgangsgruppe bestimmt [Sykes, 2001]. Halogenid-Anionen sind aus diesen Gründen gute Abgangsgruppen, so dass die Substitution durch die Aminogruppe bei der Enzymimmobilisierung leicht abläuft. Ganz anders ist das bei der Anbindung des Enzyms an die Carbonylgruppe. Hierbei handelt es sich um eine Kondensationsreaktion, die im allgemeinen säurekatalysiert abläuft [Streitwieser; Heathcock, 1986]. Da die Immobilisierung in wässriger Lösung durchgeführt wird, ist damit zu rechnen, dass sich der Wasser-
austritt bei der Anbindung des Enzyms an die Carbonylgruppe des Glutaraldehyds negativ

auf die Lage des Reaktionsgleichgewichtes auswirkt. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist außerdem stark vom pH-Wert der Reaktionslösung abhängig, da er den Protonierungsgrad und damit die Nucleophilie der Aminogruppe erheblich beeinflusst. So könnte durch eine, der nucleophilen Addition angepasste, Wahl der Immobilisierungsparameter möglicherweise eine größere Bindungskapazität erreicht werden. Bei unterschiedlichen Immobilisierungsbedingungen wäre dann allerdings die unmittelbare Vergleichbarkeit des Immobilisierungsergebnisses mit den Proben der unmodifizierten SiMAG-MeCl Partikel nicht mehr gegeben.

Neben der Menge des auf den modifizierten Magnetpartikeln immobilisierbaren α -Chymotrypsins ist die enzymatische Aktivität der erhaltenen Immobilisate für die Beurteilung des Immobilisierungserfolges von besonderem Interesse. Um die Effizienz der Immobilisate beurteilen zu können, wurden die Aktivitäten der Immobilisate mit dem BTEE-Assay unter Standardversuchsbedingungen bestimmt (vgl. Kapitel 11.1.3, S. 117). Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchung sind in Abbildung 6.1-2 dargestellt.

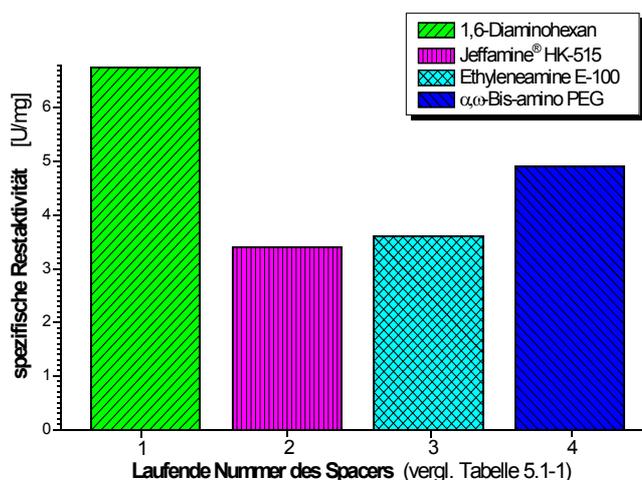


Abbildung 6.1-2: Vergleich der Restaktivitäten des immobilisierten α -Chymotrypsins in Abhängigkeit des bei der Oberflächenmodifizierung aufgetragenen Spacers

Die größte spezifische Restaktivität mit einem Wert von 6,8 U/mg wird durch die Oberflächenmodifizierung mit dem kurzkettigen 1,6-Diaminohexan erreicht. Etwas mehr als 80 % dieser Aktivität wird bei den Immobilisaten der α,ω -Bis-amino PEG modifizierten SiMAG-Partikel gemessen. Hier beträgt die spezifische Restaktivität des immobilisierten Enzyms 4,9 U/mg. Die geringsten Restaktivitäten besitzen die Immobilisate der mit Jeffamine® HK-511 und Ethylendiamine E-100 Spacern beschichteten Partikel mit nahezu gleichgroßen Restaktivitäten von 3,4 U/mg und 3,6 U/mg.

Wie schon bei der Bindungskapazität der oberflächenbehandelten Magnetpartikel beobachtet wurde, stehen auch die Werte der spezifischen Restaktivität des immobilisierten Enzyms in keinem direkten Zusammenhang mit der Kettenlänge des verwendeten Spacers.

Allerdings wird durch die Ergebnisse dieser Versuche deutlich, dass entsprechend der zu Beginn der Untersuchungen bestehenden Erwartungen, das Ziel, die Katalyseeffizienz des an SiMAG-Partikel immobilisierten α -Chymotrypsins durch die Einführung der Spacer zwischen Partikeloberfläche und Enzym zu steigern, in vollem Umfang erreicht wurde. Die spezifischen Aktivitäten der oberflächenmodifizierten Immobilisate sind um den Faktor 1,75 – 3,0 größer, als die des direkt an die Partikeloberfläche gebundenen Enzyms.

Die Oberflächenmodifizierung der Magnetpartikel mit Spacermolekülen führte zusätzlich zu der durch die Optimierung der Immobilisierungsparameter erreichten Aktivitätssteigerung, zu einem Aktivitätszuwachs der Immobilisate von 1,5 – 4,1U/mg.

6.2 Charakterisierung von immobilisiertem α -Chymotrypsin

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der spacermodifizierten Immobilisate wurden im Vergleich zum direkt an die Partikeloberfläche gebundenen Enzym, durch verschiedene Stabilitätsversuche bestimmt. Bei den Untersuchungen zur Charakterisierung der spacermodifizierten Immobilisate wurden allerdings ausschließlich die mit 1,6-Diaminohexan und α,ω -Bis-amino PEG modifizierten Immobilisate untersucht, da sie die größten spezifischen Restaktivitäten besitzen. Gleichzeitig repräsentieren sie den Grenzfall eines kurzen und eines langen Spacers. Die beiden anderen Immobilisate wurden nicht weiter charakterisiert, da die Enzymimmobilisierung über Jeffamine[®] HK-515 bzw. Ethylendiamine E-100 Spacer zu deutlich geringeren spezifischen Restaktivitäten des immobilisierten α -Chymotrypsins führt, und deshalb weniger effektiv ist.

6.2.1 Langzeitstabilität der spacermodifizierten Immobilisate

Ob aus der Modifizierung der Partikeloberfläche mit Spacern eine erhöhte Langzeitstabilität der Immobilisate resultiert, soll durch Aktivitätsuntersuchungen nach entsprechenden Lagerungszeiten bei einer Lagerungstemperatur von $T=20\text{ °C}$ untersucht werden.

Dazu wurde die enzymatische Aktivität der Immobilisate nach einer Lagerungsdauer von 0, 2, 4, 7 und 10 Wochen mittels BTEE-Assay unter Standard-Versuchsbedingungen (vgl. Kapitel 11.1.3, S. 117) bestimmt. In Abbildung 6.2-1 sind die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen graphisch dargestellt. Zur Herstellung der Immobilisate erfolgte die Enzymimmobilisierung zuvor unter den in Kapitel 11.1.1 (S. 116) beschriebenen Immobilisierungsbedingungen.

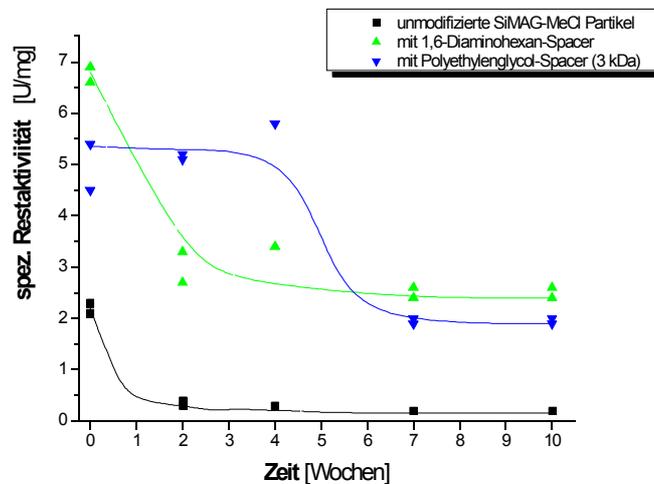


Abbildung 6.2-1: Langzeitverhalten der enzymatischen Restaktivität bei unmodifizierten, mit 1,6-Diaminohexan und mit Polyethylenglykol modifizierten SiMAG-MeCl Immobilisaten

Die schlechtesten Ergebnisse bei diesen Untersuchungen zeigen die unmodifizierten SiMAG-Partikel, da die spezifische Restaktivität beider spacermodifizierten Immobilisate über den gesamten beobachteten Lagerungszeitraum mindestens doppelt so groß ist. Durch den Einbau der Spacer vergrößert sich der Abstand zwischen Enzym und Partikeloberfläche, so dass das aktive Zentrum des α -Chymotrypsins für das Substrat besser zugänglich wird. Nur wenn das aktive Zentrum des immobilisierten Enzyms weit genug vom Trägermaterial entfernt ist, kann es von allen Seiten vom Substrat erreicht werden. Die verbesserte Substratzugänglichkeit stellt wahrscheinlich die Hauptursache für die verbesserte Restaktivität nach der Spacermodifizierung dar.

Die Spacer sollten aber nicht nur den Abstand des Enzyms zur Partikeloberfläche vergrößern, sondern auch als flexible Verbindung zur starren Oberfläche der Magnetpartikel dienen. Durch die Flexibilität der Spacerketten sollen neben den sterischen auch die konformativen Belastungen des immobilisierten α -Chymotrypsins verringert werden. Dies führt dann nicht nur zu einer gesteigerten Restaktivität des immobilisierten Enzyms, sondern auch zu einer verbesserten Standzeit der Immobilisate.

Wie in Abbildung 6.2-1 gut zu erkennen ist, ist der Aktivitätsverlauf der mit 1,6-Diaminohexan Spacer oberflächenbeschichteten Partikel dem der unbehandelten SiMAG-MeCl Partikel sehr ähnlich. Beide Immobilisate verlieren innerhalb der ersten zwei Lagerungswochen einen Großteil ihrer enzymatischen Aktivität, wobei der Aktivitätsverlauf exponentiell abfällt. Durch den Einbau des 1,6-Diaminohexan Spacers ist die Aktivitätsabnahme jedoch wesentlich geringer als bei den unmodifizierten Magnetpartikeln. Die unmodifizierten Im-

mobilisate verlieren innerhalb von zehn Wochen über 85%, die der mit dem kurzkettigen Spacer modifizierten Partikel nur etwa 48 % ihrer anfänglichen Enzymaktivität.

Der stabilisierende Einfluss des α,ω -Bis-amino PEG Spacers auf das immobilisierte α -Chymotrypsin unterscheidet sich deutlich von dem des 1,6-Diaminohexan Spacers, was am sigmoidalen Aktivitätsverlauf der entsprechenden Immobilisate in Abbildung 6.2-2 deutlich erkennbar ist. Die mit dem α,ω -Bis-amino PEG oberflächenmodifizierten Immobilisate zeigen innerhalb der ersten vier Wochen fast keine Aktivitätsabnahme. Zwischen der vierten bis sechsten Lagerungswoche verlieren die Immobilisate dann allerdings massiv an enzymatischer Aktivität und besitzen nach sechswöchiger Lagerung bei 20 °C nur noch 43% ihrer zu Versuchsbeginn gemessenen Restaktivität.

Nach 10 Wochen besitzen beide mit Spacer beladenen Partikelsorten noch 35% ihrer anfänglichen Aktivität. Demnach ist die beobachtete Langzeitstabilität bei den Immobilisaten mit α,ω -Bis-amino PEG Spacer trotz unterschiedlichem Aktivitätsverlauf nach dieser Lagerungsdauer nicht größer als die der mit 1,6-Diaminohexan modifizierten Magnetpartikel. Auf den unmodifizierten MeCl-Partikel waren nach einer Lagerungsdauer von 10 Wochen nur noch 7% der anfänglichen Restaktivität nachzuweisen. Der konformationsstabilisierende Einfluss der Spacer auf das immobilisierte Enzym und die dadurch erhöhte enzymatische Restaktivität der Immobilisate ist bei beiden Spacern deutlich nachzuweisen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorangegangenen Untersuchungen an spacermodifizierten SiMAG-MeCl-Partikeln (vgl. Kapitel 6.1 und 6.2, S. 69), hat die Wahl des Spacers erhebliche Auswirkungen auf den Verlauf der Lagerungsstabilität der Immobilisate. Inwieweit diese auf die unterschiedliche Kettenlänge oder ggf. auf andere Eigenschaften der Spacer zurückzuführen sind, kann anhand der Ergebnissen der in diesem Kapitel beschriebenen Versuche nicht abschließend geklärt werden. Hierzu wären weitere Versuche notwendig gewesen, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden konnten.

6.2.2 Temperaturverhalten der spacermodifizierten Immobilisate

Nachdem im vorangegangenen Kapitel die durch die Einführung der Spacer bewirkten Veränderungen auf die Langzeitstabilität der Immobilisate dargestellt wurde, soll im Folgenden das Temperaturverhalten der spacermodifizierten Immobilisate beschrieben und mit dem des direkt an die Oberfläche der SiMAG-MeCl Partikel gebundenen α -Chymotrypsins verglichen werden. Die Herstellung der einzelnen Immobilisate erfolgte unter Standardbedingungen (vgl. Kapitel 5, S.66).

Die spezifischen Restaktivitäten der einzelnen Immobilisate wurden anschließend mittels BTEE-Assay bei Reaktionstemperaturen von $T=20-60\text{ °C}$ bestimmt. Abbildung 6.2-2 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

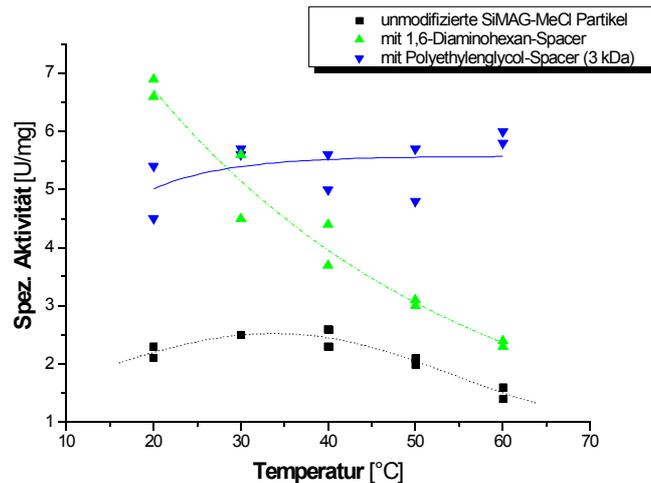


Abbildung 6.2-2: Temperaturabhängigkeit der spezifischen Aktivität des auf unmodifizierten, mit 1,6-Diaminohexan und mit Polyethylenglykol modifizierten MeCl-Partikeln immobilisierten α -Chymotrypsins

Das direkt an die Partikeloberfläche immobilisierte α -Chymotrypsin besitzt ein ausgeprägtes Temperaturoptimum bei 37 °C . Das Enzym erfährt durch die Immobilisierung keine erkennbare Temperaturstabilisierung und zeigt den gleichen Temperaturverlauf seiner Aktivität wie das native α -Chymotrypsin.

Ganz anders sieht der Temperaturverlauf der Aktivität der beiden spacermodifizierten Immobilisate aus. Der 1,6-Diaminohexan Spacer hat zwar ebenfalls keinen temperaturstabilisierenden Einfluss auf das immobilisierte Enzym, doch ist bei den entsprechend oberflächenbehandelten Partikeln auch kein Temperaturoptimum im untersuchten Temperaturbereich erkennbar. Mit steigender Temperatur fällt die enzymatische Aktivität dieser Partikel kontinuierlich. So beträgt die spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins bei einer Reaktionstemperatur von $T=20\text{ °C}$ $\bar{A}=6,8\text{ U/mg}$. Eine Temperaturerhöhung um 10 °C führt bei diesen Immobilisaten zu einem deutlichen Aktivitätsverlust von über 25%. Bei einer Reaktionstemperatur von 40 °C , die leicht über dem Temperaturoptimum des direkt an die Partikeloberfläche gebundenen α -Chymotrypsins liegt, besitzt das über den 1,6-Diaminohexan Spacer gebundene Enzym nur noch eine Restaktivität von $\bar{A}=4\text{ U/mg}$. Das entspricht weniger als 60% seiner spezifischen Restaktivität bei 20 °C . Die bei einer Reaktionstemperatur von $T=60\text{ °C}$ noch nachzuweisende enzymatische Aktivität dieser Immo-

lisate liegt mit $A_E=2,3$ U/mg noch einmal knapp 25 % niedriger.

Wird das α -Chymotrypsin allerdings über α,ω -Bis-amino PEG Spacer an die Partikel gebunden, hat dies einen erheblichen, stabilisierenden Einfluss auf das Temperaturverhalten des Enzyms. Wie in Abbildung 6.2-2 ersichtlich, nimmt mit steigender Temperatur auch die Aktivität der Immobilisate zu. Die spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins steigt um über 10 % von 5 U/mg bei einer Temperatur von $T=20$ °C auf 5,6 U/mg bei $T=60$ °C. Oberhalb einer Reaktionstemperatur von 30 °C besitzen diese Partikel die größte spezifische Aktivität aller drei untersuchten Immobilisate.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es im Temperaturbereich von 0-60°C zu reversiblen Bewegungen ganzer Enzymsegmente kommen kann. Dieses Phänomen ist bei aktiven Enzymen normal, da die Bewegungen für die Substratanbindung, Katalyse oder Produktfreisetzungen notwendig sind. Obwohl das α -Chymotrypsin eine gewisse Bewegungsfreiheit besitzt, wird die Konformation durch ein komplexes Gleichgewicht von intramolekularen Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben, ionischen und van der Waals Wechselwirkungen bestimmt. Treten ab einer bestimmten Temperatur dann zusätzliche, thermisch bedingte, intramolekulare Bewegungen auf, kann das zum Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur des Enzyms führen. Das Enzym denaturiert und liegt dann zunehmend in einer inaktiven Form vor. Diese denaturierenden Bewegungen werden bei der Immobilisierung des Enzyms durch die Fixierung an einem starren Träger vermindert. Gleichzeitig wird durch die kovalente Immobilisierung allerdings das Gleichgewicht der nichtkovalenten, intramolekularen Wechselwirkungen, die die Enzymkonformation maßgeblich bestimmen, nachhaltig beeinflusst. Das Enzym wird durch die kovalente Anbindung deformiert und ist einer konformativen, aktivitätsmindernden Belastung ausgesetzt. Durch die Immobilisierung des α -Chymotrypsins direkt an der Partikeloberfläche überwiegt die Deformation der dreidimensionalen Enzymstruktur gegenüber dem stabilisierenden Effekt der Immobilisierung. Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits diskutiert und auch durch die Ergebnisse der vorangegangenen Immobilisierungsversuche gezeigt wurde (vgl. Kapitel 4.4.2.1, S. 63), führt dies zu einem deutlichen Aktivitätsverlust. Mit steigender Temperatur nimmt die konformative Belastung des immobilisierten Enzyms aufgrund der einsetzenden, thermisch bedingten Schwingungen weiter zu. Dies führt zur weiteren Abnahme der Aktivität des immobilisierten Enzyms. Dabei werden die aktivitätsmindernden Einflüsse nur zum Teil durch die Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Temperatur kompensiert. Das beobachtete Temperaturoptimum des immobilisierten α -Chy-

motrypsins resultiert schließlich aus dem Zusammenspiel dieser beiden Effekte (vgl. Kap. 2.1.3, S.8).

Ähnlich ist dies bei der Anbindung des Enzyms über den 1,6-Diaminohexan Spacer. Der Spacer besitzt aufgrund seiner geringen Kettenlänge keine ausreichende Flexibilität, um die temperaturbedingten, die Enzymstruktur destabilisierenden Bewegungen der Enzymsegmente abzufangen und so die konformative Belastung und die Deformierung des immobilisierten α -Chymotrypsins entscheidend zu verringern. Die Immobilisate besitzen zwar über den gesamten, untersuchten Temperaturbereich eine höhere Restaktivität, als die des direkt an die Partikeloberfläche gebundenen Enzyms, sind aber gegenüber erhöhten Reaktionstemperaturen in ihrer enzymatischen Aktivität nicht beständig.

Im Gegensatz dazu besitzt der α,ω -Bis-amino PEG Spacer eine ausreichend große Flexibilität und ermöglicht so die konformationsschonendste Immobilisierung des α -Chymotrypsins. Die thermischen, intramolekularen Bewegungen des Enzyms können durch den langkettigen Spacer gut abgefedert werden. Offenbar führt dies zu einer Verringerung der Destabilisierung und infolgedessen auch der Denaturierung und zu einer besseren Temperaturstabilität. Durch nichtkovalente Wechselwirkungen des Enzyms mit dem α,ω -Bis-amino PEG Spacer wird die Konformation des immobilisierten α -Chymotrypsins möglicherweise zusätzlich stabilisiert und seine Temperaturbeständigkeit weiter erhöht. Der aktivierende Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enzymaktivität wird so in deutlich geringerem Ausmaß durch die Enzymdenaturierung kompensiert, als dies bei der direkten oder über den kurzkettigen 1,6-Diaminohexan Spacer erfolgenden Anbindung an die Partikeloberfläche beobachtet wird.

6.2.3 pH-Stabilität der spacermodifizierten Immobilisate

Der Effekt der unterschiedlichen Spacer wurde ebenfalls in Hinsicht auf die pH-Stabilität der erhaltenen Immobilisate in einem Bereich von pH 5 bis pH 9 untersucht. Dazu wurden 10 mg Immobilisat für 1 h bei Raumtemperatur in 2 mL Puffer mit den entsprechenden pH-Werten gelagert. Anschließend wurde mittels BTEE-Assay die Aktivität der Immobilisate unter Standardbedingungen bestimmt (vgl. Kapitel 11.1.3, S. 117). Abbildung 6.2-3 zeigt die spezifische Aktivität der Immobilisate in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Im Vergleich zum direkt an die MeCl-Gruppe der SiMAG-Partikel gebundenen α -Chymotrypsin ist durch die Modifizierung der Partikeloberfläche mit Spacern ein deutlich größerer Aktivitätserhalt zu verzeichnen. Die spacermodifizierten Immobilisate besitzen über den gesamten untersuchten pH-Bereich eine etwa dreimal größere spezifische Restaktivität als das

direkt an der Oberfläche der Magnetpartikel fixierte Enzym.

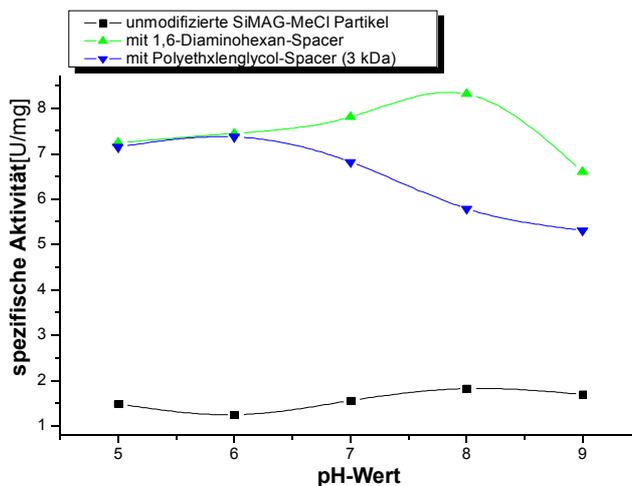


Abbildung 6.2-3: Abhängigkeit der spezifischen Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins nach einstündiger Inkubation vom pH-Wert

Sowohl das über den 1,6-Diaminohexan Spacer immobilisierte α -Chymotrypsin als auch das direkt an die Partikeloberfläche gebundene Enzym besitzen ein Optimum der spezifischen Aktivität bei pH=8. Dabei ist das Optimum bei den Immobilisaten mit spacermodifizierter Oberfläche deutlich stärker ausgeprägt als beim direkt an der Partikeloberfläche gebundenen α -Chymotrypsin. Das native Enzym weist ebenfalls im gleichen pH-Bereich ein Aktivitätsmaximum auf, so dass die Immobilisierung bei diesen Immobilisaten zu keinem veränderten pH-Verhalten führt. Die Mikroumgebung des immobilisierten Enzyms bleibt demnach durch die Trägermatrix bzw. den Spacer unbeeinflusst.

Eine deutlich andere pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität wird bei dem über den α,ω -Bis-amino PEG Spacer immobilisierten α -Chymotrypsin beobachtet. Diese Immobilisate besitzen bei pH=6 ihre größte enzymatische Aktivität. Die Mikroumgebung des Enzyms wird also durch die beiden Spacer unterschiedlich beeinflusst.

Ursache für das beobachtete pH-Verhalten der α,ω -Bis-amino PEG Immobilisate kann die Immobilisierung des Enzyms selbst sein. Möglicherweise wird ein Teil der endständigen Aminogruppen des Enzyms durch die kovalente Verknüpfung mit der Trägermatrix blockiert und so die intramolekulare Beweglichkeit des α -Chymotrypsins eingeschränkt. Der destabilisierende Einfluss des veränderten Protonierungsgrades, dessen Ausmaß vom pH-Wert der Reaktionslösung abhängig ist, kann sich aufgrund dieser eingeschränkten Beweglichkeit einzelner Enzymsegmente weniger stark auswirken. Es resultiert eine erhöhte pH-Stabilität.

Denkbar ist allerdings auch, dass die Struktur des α,ω -Bis-amino PEG Spacers zur beobachteten Veränderung des pH-Verhaltens führt. Der α,ω -Bis-amino PEG Spacer ist ein Polyether, der das in den sauren Bereich verschobene pH-Optimum des immobilisierten α -Chymotrypsins verursachen kann. Ether sind zwar weniger basisch als Wasser, besitzen aber eine um mehrere Zehnerpotenzen höhere Basizität als beispielsweise Aldehyde oder Ketone [Streitwieser; Heathcock, 1986]. Werden die Sauerstoffatome des Spacers protoniert, sinkt die lokale Protonenkonzentration in der Mikroumgebung des Enzyms. Der unmittelbar am immobilisierten α -Chymotrypsin vorherrschende pH-Wert wäre dann geringer als in der Reaktionslösung, wodurch sich die Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich erklärt.

7. MagPrep[®]-Partikel

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Immobilisierungsversuche an den MagPrep[®]-Partikeln der Firma Merck durchgeführt. Da diese Magnetpartikel keine funktionellen Ankergruppen für die kovalente Enzymimmobilisierung auf ihrer Oberfläche tragen, müssen sie durch geeignete Oberflächenmodifizierung für die Anbindung des Enzyms aktiviert werden.

Die aktivierende Oberflächenmodifizierung der MagPrep[®]-Partikel erfolgte durch Silanisierung. Es wurden verschiedene Silanisierungskomponenten eingesetzt, um unterschiedliche funktionelle Ankergruppen, einen unterschiedlichen Abstand der Ankergruppen zur Partikeloberfläche und eine variierende Oberflächendichte der Bindungsanker zu generieren.

Eine der verwendeten Silanisierungskomponenten war Glycidylxypropyltrimethoxysilan, wodurch Oxirangruppen auf die Partikeloberfläche aufgebracht wurden (vgl. Kapitel 7.3 & 7.4, S. 83).

Durch die Silanisierung mit N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan (vgl. Kapitel 7.5, S. 90) wurden Aminogruppen für die kovalente Enzymimmobilisierung auf der Partikeloberfläche bereitgestellt. Die derart modifizierten MagPrep[®]-Partikel besitzen nach der Oberflächenmodifizierung die gleichen Bindungsanker wie die SiMAG-Partikel, so dass die Immobilisierungsergebnisse gut miteinander vergleichbar sind.

7.1 Modellrechnung zur maximal möglichen Beladung von MagPrep[®]-Partikeln mit α -Chymotrypsin

Zur Abschätzung der maximal möglichen Beladung von MagPrep[®]-Partikeln mit α -Chymotrypsin wurde anhand des in Kapitel 4.1 (S. 33) bereits vorgestellten vereinfachenden Modelles berechnet, wie viele Enzymmoleküle auf der Partikeloberfläche Platz finden.

Der Flächenbedarf eines einzelnen α -Chymotrypsinmoleküls beträgt $A_{\text{Enzym}} = 2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$ (vgl. Gleichung (4.1-3), S. 34). MagPrep[®]-Partikel besitzen nach Angabe des Herstellers eine Oberfläche zwischen 14 und 25 m^2/g , so dass unter Berücksichtigung einer Oberflächenbelegung von 75%, eine immobilisierbare Stoffmenge an α -Chymotrypsin von 0,87-1,57 nmol pro mg Partikel errechnet werden kann.

$$Z_{14 \text{ m}^2} = \frac{1,4 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2}{2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2} \cdot 0,75 = 5,25 \cdot 10^{14} ; \quad n_{14 \text{ m}^2} = \frac{Z_{14 \text{ m}^2}}{N_A} = 0,87 \text{ nmol}; \quad (7.1-1a)$$

$$Z_{25\text{ m}^2} = \frac{2,5 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2}{2 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2} \cdot 0,75 = 9,34 \cdot 10^{14}; \quad n_{25\text{ m}^2} = \frac{Z_{25\text{ m}^2}}{N_A} = 1,57 \text{ nmol}. \quad (7.1-1b)$$

Unter Berücksichtigung der Molmasse des α -Chymotrypsins von $M_R=25$ kDa führt dieses Rechenmodell zu einer maximal immobilisierbaren Enzymmenge von 22-40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MagPrep[®]-Partikel.

7.2 Titrations-Assay zur quantitativen Detektion der Oxirangruppen

Nach erfolgter Oberflächenaktivierung der MagPrep[®]-Partikel soll das Enzym kovalent an die Partikel gebunden werden. Um die Beladungskapazität der Partikel mit Enzym vollständig ausschöpfen zu können, muss allerdings sichergestellt sein, dass für die Immobilisierung von α -Chymotrypsin ausreichend viele Ankergruppen auf der Partikeloberfläche verfügbar sind.

Aus diesem Grund musste eine Analysemethode etabliert werden, die es ermöglicht, die Menge der durch die Silanisierung auf den Partikeln aufgetragenen Epoxidfunktionen zu bestimmen. Zur Quantifizierung des Modifizierungserfolges erwies sich hierbei die acidimetrische Bestimmung der Epoxidgruppen mittels Natriumthiosulfat/HCl als grundsätzlich zuverlässig. Die genaue Versuchsanleitung zum Titrations-Assay ist im Anhang (vgl. Kapitel 11.1.5, S. 118) aufgeführt.

Abbildung 7.2-1 zeigt graphisch den Reaktionsmechanismus, der dieser Analysemethode zugrunde liegt. Das Thiosulfat-Ion addiert nucleophil unter Ringöffnung an das Oxirangringsystem, wobei pro Epoxidgruppe ein Hydroxid-Ion freigesetzt wird. Um den pH-Wert der Reaktionslösung über den gesamten Reaktionszeitraum konstant bei $\text{pH}=7$ zu halten, wird durch einen Titrationsautomaten kontinuierlich verdünnte Salzsäure zutitriert. Die am Reaktionsende verbrauchte Menge Salzsäure entspricht dann der auf den eingesetzten Magnetpartikeln vorhandenen Menge an Oxirangruppen.

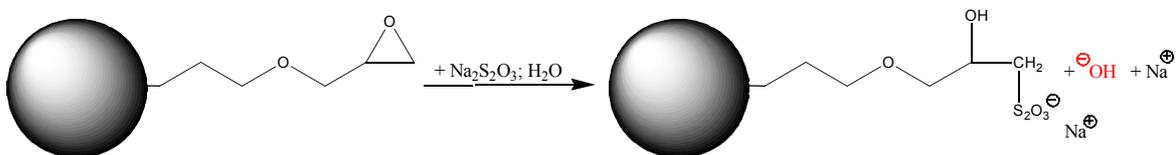


Abbildung 7.2-1: Reaktionsschema zur acidimetrischen Bestimmung der Epoxidgruppen auf der Oberfläche der Magnetpartikel

Da die Magnetpartikel nur in begrenzter Menge zur Verfügung standen, musste der Titrations-Assay qualifiziert werden, bevor er zur Quantifizierung der epoxy-funktionellen Ankergruppen auf den modifizierten MagPrep[®]-Partikeln eingesetzt werden konnte. Dazu

wurden Versuche mit 1,2 Propylenoxid und Eupergit C250 L durchgeführt. Durch den Einsatz unterschiedlich großer Mengen der preiswerten Epoxid-Komponenten konnte die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit dieses Analyseverfahrens überprüft und die Versuchsparameter den Erfordernissen angepasst werden.

Abbildung 7.2-2 zeigt die Ergebnisse der Titration mit Eupergit C250 L. Deutlich ist der Sättigungsverlauf der Titrationskurven erkennbar. Nach einer Reaktionsdauer von zwei Stunden war die Reaktion mit den Epoxidgruppen zwar noch nicht vollständig abgeschlossen, aber es wurde bereits ein Umsatz von mehr als 90 % erreicht. Um einen vollständigen Umsatz zu erzielen und einen zuverlässigen Wert für die Anzahl der Ankergruppen auf der Partikeloberfläche zu erhalten, wurde die Reaktionszeit bei der Oxiran-Titration an den silanisierten MagPrep®-Partikeln auf 6 h heraufgesetzt (vgl. Kapitel 11.1.5, S.118).

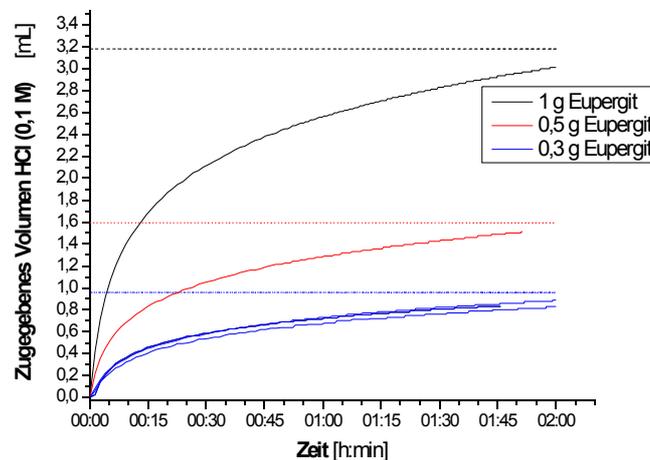


Abbildung 7.2-2: Titration der Epoxidgruppen auf Eupergit C250 L Partikeln zur Qualifizierung des Titrations-Assays (--- maximaler, theoretischer Verbrauch an HCl bei Umsatz aller Oxirangruppen)

Die Reproduzierbarkeit der Titration wurde an drei Proben mit 0,3 g Eupergit-Partikeln untersucht, da hier die geringste Menge an Oxirangruppen eingesetzt wurde. Der relative Messfehler bei der quantitativen Bestimmung der Oxirangruppen ist bei diesen Proben folglich am größten („worst case“-Betrachtung).

Aus den drei Messungen dieser Proben wurde dazu die Standardabweichung der erhaltenen HCl-Verbräuche nach folgender Formel berechnet:

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} ; \quad (7.2-1)$$

mit \bar{X} = arithmetisches Mittel der erhaltenen Messwerte,
 X_i = Messwert bei der Probe i , n = Anzahl der Proben.

Sie betrug $SD = \pm 0,032$ mL. Der relative Fehler bei der Titration der Epoxidgruppen auf den Partikeln ist demnach kleiner als ± 5 %.

7.3 Oberflächenfunktionalisierung der MagPrep[®]-Partikel mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan

In diesem Kapitel sollen die Arbeiten zur Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel dargestellt werden. Um die MagPrep[®]-Partikel für die Enzymimmobilisierung vorzubereiten, muss die Partikeloberfläche vorab mit funktionellen Gruppen ausgestattet werden. Diese sollen die kovalente Anbindung des Enzyms direkt an die Partikeloberfläche ermöglichen, ohne dass ein weiterer Aktivierungsschritt notwendig ist. Als Ankergruppen wurden Epoxidfunktionen ausgewählt. Diese besitzen aufgrund der hohen Ringspannung eine ausreichend hohe Reaktivität, um die Immobilisierung unter milden Reaktionsbedingungen durchführen zu können. So kommt es bei der Oberflächenmodifizierung der MagPrep[®]-Partikel mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan unter Ringöffnung zu einer Umesterung, bei der die Hydroxidgruppen auf der Oberfläche der Magnetpartikel mit den Methoxygruppen der Silanisierungskomponente reagieren (Abbildung 7.3-1).

Die Silanisierung der Magnetpartikel erfolgte mit 0,6 mmol Glycidyloxypropyltrimethoxysilan/g MagPrep[®]-Partikel für 2 h bei 80 °C. Eine detaillierte Standard-Versuchsbeschreibung ist im Anhang (Kap. 11.1.4, S. 118) aufgeführt.

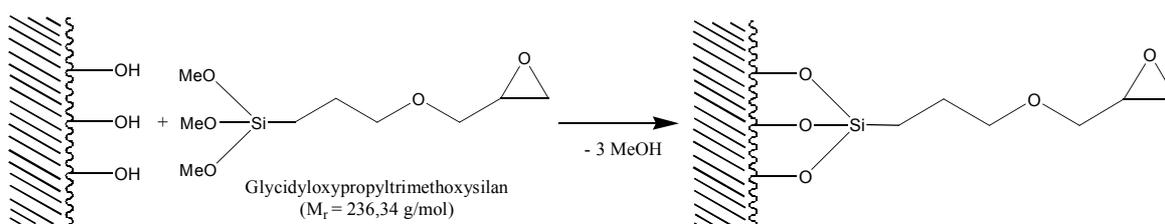


Abbildung 7.3-1: Oberflächensilanisierung von MagPrep[®]-Partikeln mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan

7.3.1 Acidimetrische Bestimmung der Epoxidgruppen auf den silanisierten Magnetpartikeln

Nachdem die Versuchsbedingungen für den acidimetrischen Titrations-Assay zur Quantifizierung der aufgetragenen Epoxidfunktionen angepasst und die Fehlerbreite bestimmt war, wurde der Silanisierungserfolg an den mit Glycidyloxypropyltrimethoxysilan oberflächenmodifizierten MagPrep[®]-Partikeln untersucht. Die auf der Partikeloberfläche aufgetragenen Oxirangruppen wurden unter Standardversuchsbedingungen quantifiziert (vgl. Kapitel 11.1.5, S. 118).

Abbildung 7.3-2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Titration. Es wurden drei Proben eingesetzt, wobei eine der Proben aus einer vorangegangenen Silanisierung stammte. Alle drei Proben zeigen einen sehr ähnlichen Titrationsverlauf.

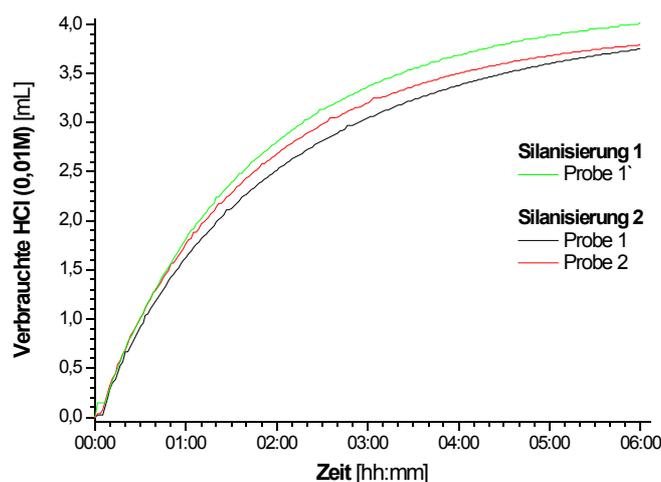


Abbildung 7.3-2: Zeitlicher Verlauf der Titration zur Bestimmung der auf der Partikeloberfläche aufgetragenen Epoxidfunktionen

Die Menge der auf der Partikeloberfläche aufgetragenen Ankergruppen wird nach Titrationsende direkt aus dem HCl-Verbrauch berechnet (vgl. Tabelle 7.3-1).

Tabelle 7.3-1: Ergebnis der Silanisierung (Titration der Epoxid-Gruppen auf 250 μg Partikel)

Probe	HCl-Verbrauch [mL]	Epoxid-Gruppen [μmol]	Epoxid-Gruppen/g Partikel [$\mu\text{mol/g}$]
1	3,750	37,50	150,00
2	3,799	37,99	151,96
1'	4,015	40,15	160,60

Unter den gewählten Standardreaktionsbedingungen werden durch die silanisierende Oberflächenmodifizierung der MagPrep[®]-Partikel mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan durchschnittlich 154 nmol Oxirangruppen/mg Magnetpartikel auf der Oberfläche aufgebracht. Die Ergebnisse der einzelnen Silanisierungsversuche unterscheiden sich dabei um weniger als 5 % im Silanisierungsergebnis. Diese Ergebnisse zeigen somit auch, dass eine reproduzierbare Oberflächenmodifizierung unter den verwendeten Reaktionsbedingungen gewährleistet ist.

7.3.2 Berechnung der pro α -Chymotrypsinmolekül auf den MagPrep[®]-Partikeln zur Verfügung stehenden Anzahl an Epoxidgruppen

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 7.1 (S. 81) berechneten maximal immobilisierbaren

Enzymmenge von 22-40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MagPrep[®]-Partikel, soll im Folgenden die dem α -Chymotrypsinmolekül auf der Partikeloberfläche zur Verfügung stehende Anzahl an Ankergruppen berechnet werden.

Ausgehend von der auf der Partikeloberfläche maximal immobilisierbaren Enzymmenge und der analytisch bestimmten Epoxidgruppendichte von ca. 150 nmol/mg MagPrep[®]-Partikel, ergibt sich folgender Flächenbedarf pro epoxidfunktionellem Silanmolekül; berechnet für den niedrigeren bzw. höheren Bereichswert der für die MagPrep[®]-Partikel angegebenen Oberfläche:

$$A_{14m^2} = \frac{14 m^2}{150 \mu\text{mol} \cdot N_A} = 0,155 \text{ nm}^2 \quad (\text{für eine Oberfläche von } 14 m^2/\text{g Partikel}) \quad (7.3-1a)$$

$$A_{25m^2} = \frac{25 m^2}{150 \mu\text{mol} \cdot N_A} = 0,277 \text{ nm}^2 \quad (\text{für eine Oberfläche von } 25 m^2/\text{g Partikel}) \quad (7.3-1b).$$

Über die Relation der Flächen ist zu sehen, dass bei maximaler Belegung der MagPrep[®]-Partikel mit Epoxidgruppen und Enzym dem einzelnen α -Chymotrypsinmolekül in erster Näherung ein Angebot von 70 bzw. 130 Epoxidgruppen (im Mittel also: 100) als Ankergruppen zur Immobilisierung gegenüberstehen.

MagPrep[®]-Partikel, die ausschließlich mit Glycidyoxypropyltrimethoxysilan, mit maximaler Bedeckung oberflächenmodifiziert werden, bieten demnach α -Chymotrypsinmolekülen Ankergruppen in ca. 100-fachem Überschuss zu deren Immobilisierung an.

7.3.3 Immobilisierung von α -Chymotrypsin an aktivierten MagPrep[®]-Partikeln

Die Immobilisierung des α -Chymotrypsins an die oberflächenaktivierten MagPrep[®]-Partikel erfolgt bei unterschiedlichen Reaktionstemperaturen von $T_1=6$ °C und $T_2=20$ °C. Eine erneute Optimierung der Immobilisierungsbedingungen, wie sie an den SiMAG-Partikeln durchgeführt wurde, erfolgte mit den MagPrep[®]-Partikeln nicht. Die Versuche wurden unter den bekannten Standardbedingungen durchgeführt. Der Einfluss der verschiedenen Oberflächenmodifizierungen auf das Immobilisierungsergebnis steht dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen.

10 mg Magnetpartikel werden vor der Immobilisierungsreaktion dreimal mit je 1 mL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend werden sie in 2 mL α -Chymotrypsin (0,5 mg/mL in 1x PBS, pH 7,4) suspendiert, um das Enzym für 3 h bei 6 °C bzw. 20 °C unter Schütteln mit 850 rpm zu immobilisieren. Nach Reaktionsende werden die Partikel erneut zwei mal mit je 1 mL PBS gewaschen. Die Enzymkonzentration im Überstand und den vereinigten Waschwassern wird mittels Bradford-Test bestimmt. Durch Bilanzierung dieser Ergebnisse

(vgl. Gl. 4.3-1, S. 44) wird dann die Menge an immobilisiertem α -Chymotrypsin berechnet. Die Ergebnisse der Enzymimmobilisierung sind in Tabelle 7.3-2 aufgeführt.

Tabelle 7.3-2: Ergebnis der Enzymimmobilisierung an silanisierten MagPrep[®]-Partikeln bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C bzw. 20 °C

Probe	Reaktionstemperatur	Enzymkonzentration [mg/mL]		Immobil. Enzymmenge/ mg Partikel [μ g/mg]
		Überstand	Waschwasser	
1	6 °C	0,36	0,09	9 \pm 1,4
2		0,39	0,08	7 \pm 1,4
1	20 °C	0,34	0,02	14 \pm 0,8
2		0,33	0,03	13 \pm 0,8

Die Temperaturabhängigkeit der Immobilisierungsreaktion wird anhand dieser Ergebnisse deutlich. Bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C wird mit durchschnittlich 8 μ g/mg Partikel eine erheblich geringere Menge α -Chymotrypsin an die Magnetpartikel gebunden, als bei einer Immobilisierungstemperatur von 20 °C. Erfolgt die Immobilisierung an die oberflächenmodifizierten MagPrep[®]-Partikel bei 20 °C, werden 13-14 μ g α -Chymotrypsin/mg Magnetpartikel immobilisiert. Die geringere Temperatur während der Reaktion führt zu einer Verlangsamung der Reaktionsgeschwindigkeit und dazu, dass nur etwa die Hälfte der Enzymmenge an die aktivierten MagPrep[®]-Partikeln gebunden wird.

Zur weiteren Charakterisierung der Immobilisate wurde die spezifische Restaktivität des gebundenen α -Chymotrypsins mittels BTEE-Assay unter Standardbedingungen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.3-3 dargestellt. Trotz der geringeren Enzymmenge, die unter den milderen Immobilisierungsbedingungen von 6 °C auf der Partikeloberfläche bindet, besitzen die Immobilisate vergleichbare enzymatische Aktivitäten. Im Vergleich mit den Proben des bei 20 °C immobilisierten α -Chymotrypsins, wird bei einer Immobilisierungstemperatur von 6 °C demnach eine um den Faktor zwei größere spezifische Restaktivität des trägergebundenen Enzyms erhalten.

Durch die geringere Reaktionstemperatur wird die Geschwindigkeit der Immobilisierungsreaktion deutlich verlangsamt. Dies führt dazu, dass das α -Chymotrypsinmolekül bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C im beobachteten Reaktionszeitraum mit weniger Ankergruppen reagiert. Die geringere Zahl an Bindungen, die das Enzymmolekül mit der Partikeloberfläche verbinden, führt zu einer geringeren Deformation der dreidimensionalen Enzymstruktur und damit zu einer höheren spezifischen Restaktivität.

Die Ausdünnung des Enzyms auf der Partikeloberfläche führt weiterhin dazu, dass das trägerfixierte α -Chymotrypsin durch benachbarte Enzymmoleküle in seiner Substratzugäng-

lichkeit weniger stark behindert wird, woraus ebenfalls eine höhere spezifische Restaktivität des immobilisierten Enzyms resultiert.

Table 7.3-3: Ergebnis der BTEE-Aktivitätsmessung

Probe	Reaktions- temperatur	$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ [rel. Einheiten/min]	$\Delta c/\Delta t$ [mmol/L*min]	$\Delta n/\Delta t$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Spez. Restaktivität [%]
1	6 °C	0,048	0,049	0,49	16,3
2		0,038	0,039	0,39	18,6
1	20 °C	0,050	0,051	0,51	9,4
2		0,042	0,043	0,43	9,5

Basierend auf den Ergebnissen dieser Experimente wurde der Einfluss der Oberflächenbelegung auf die spezifische Restaktivität des immobilisierten Enzyms genauer untersucht.

7.4 Oberflächenfunktionalisierung der MagPrep[®]-Partikel mit einem Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan-Gemisch

Um die Oberflächendichte der auf den MagPrep[®]-Partikeln aufgebrachtten Epoxidgruppen zu variieren, wurden anstelle von Glycidyoxypropyltrimethoxysilan 1:1-, 1:5- und 1:9-Gemische aus Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan als Silanisierungskomponenten verwendet. Das n-Propyltriethoxysilan stellt dem Enzym keine Ankergruppe für die Enzymanbindung zur Verfügung. Liegen die beiden Silankomponenten im Gemisch vor, konkurrieren sie aber bei der Modifizierung der Magnetpartikel miteinander um die Bindungsstellen auf der Partikeloberfläche. Es wird erwartet, dass sich die Belegungsichte der Ankergruppen mit zunehmender Verdünnung der epoxy-funktionalisierten Silankomponente verringert. Da sich allerdings die Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden Silane mit den Hydroxidgruppen der Partikeloberfläche voneinander unterscheiden, ist nicht damit zu rechnen, dass sich die Oberflächendichte der Oxirangruppe in dieser Versuchsreihe gezielt, direkt proportional zum Verdünnungsgrad, über das Mischungsverhältnis der beiden Silane einstellen lässt.

Schon bei einem 1:1 Mischungsverhältnis der beiden Silankomponenten, sinkt die Oberflächendichte der Epoxidgruppen mit durchschnittlich 15 nmol/mg Partikel auf 10 % des ursprünglichen Wertes.

Auf den mit einem 1:5- und einem 1:9-Gemisch modifizierten Partikeln war eine quantitative Bestimmung der Oxirangruppen mit dem acidimetrischen Titrations-Assay nicht mehr möglich. Durch die weitere Verdünnung des Glycidyoxypropyltrimethoxysilans mit n-Propyltriethoxysilan wurden derart geringe Mengen Epoxidfunktionen auf der Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel aufgebracht, dass diese unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

Um die Vergleichbarkeit der Immobilisierungsergebnisse an MagPrep[®]-Partikeln mit denen

der Immobilisierung an SiMAG-Partikeln zu gewährleisten, erfolgte die sich der Oberflächenmodifizierung anschließende Enzymimmobilisierung unter Standardimmobilisierungsbedingungen. Außerdem kann so auch der Einfluss der Belegungsdichte der Oxirangruppen auf der Partikeloberfläche auf das Immobilisierungsergebnis am besten beurteilt werden. Tabelle 7.4-1 fasst die beobachteten Immobilisierungsergebnisse zusammen.

Zusätzlich zu den in Tabelle 7.4-1 aufgeführten Versuchen wurde die Immobilisierung auch an den Proben des 1:5- und 1:9-Gemisches bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C durchgeführt. Da auf den Partikeln dieser Proben kein immobilisiertes Enzym nachzuweisen war, erfolgten alle weiteren Immobilisierungsversuche ausschließlich bei einer Reaktionstemperatur von 20 °C.

Tabelle 7.4-1: Ergebnis der Immobilisierung an MagPrep[®]-Partikeln, die zuvor mit dem aufgeführten Mischungsverhältnis Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan funktionalisiert wurden

Mischungsverhältnis	Immobilisierungstemperatur [°C]	Absorption [rel. Einheiten]		Enzymkonzentration [mg/mL]		Immobilisierte Enzymmenge/ mg Partikel [µg/mg]
		Überstand	Waschwasser	Überstand	Waschwasser	
1:1	6	0,412	0,070	0,41	0,05	8 ± 2,1
		0,431	0,031	0,43	0,01	12 ± 2,1
	20	0,339	0,023	0,34	0,01	10 ± 0,6
		0,340	0,028	0,35	0,02	9 ± 0,6
1:5	20	0,331	0,053	0,38	0,06	12 ± 0,6
		0,331	0,058	0,38	0,06	11 ± 0,6
1:9	20	0,337	0,053	0,39	0,06	10 ± 0,2
		0,337	0,051	0,39	0,06	11 ± 0,2

Trotz des großen Konzentrationsunterschiedes der auf der Partikeloberfläche aufgetragenen Epoxidgruppen, zeigen die verschiedenen Partikel bei einer Reaktionstemperatur von 20 °C keine korrespondierenden Unterschiede im Immobilisierungsergebnis. Die auf den modifizierten MagPrep[®]-Partikeln immobilisierte Enzymmenge liegt bei allen Proben, unabhängig von der Zusammensetzung des Silangemisches, zwischen 9-12 µg/mg Partikel.

Die Reduzierung der Oberflächendichte der Oxirangruppen führt demnach, auch bei den mit einem 1:5 bzw. 1:9 Gemisch funktionalisierten MagPrep[®]-Partikeln, noch nicht zu einer Verringerung der Enzym-Bindungskapazität. Dem Enzym stehen lediglich weniger Bindungsstellen auf der modifizierten Partikeloberfläche zur Verfügung. Bei der kovalenten Immobilisierung werden darum mit sinkender Oberflächendichte der Ankergruppen im Mittel weniger Bindungen zwischen dem Enzymmolekül und der Trägermatrix geknüpft.

Um den Einfluss der Oberflächenbelegung mit Oxirangruppen auf das Immobilisierungsergebnis weiter zu untersuchen, wurde die Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins

mittels BTEE-Assay bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 7.4-2 zusammengefasst.

Tabelle 7.4-2: Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchung an oberflächenmodifizierten Mag-Prep[®] - Partikeln

Mischungsverhältnis	Immobilisierungstemperatur [°C]	$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ [rel. Einheiten/min]	$\Delta n_{\text{N-Benzoyl-L-Tyrosin}}/\Delta t$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Immobilisierte Enzymmenge [μg]	Spez. Restaktivität [%]
1:1	6	0,065	0,670	82	25,1
		0,048	0,495	125	12,2
	20	0,025	0,261	99	8,1
		0,045	0,465	87	16,5
5:1	20	0,070	0,72	122	15,9
		0,078	0,81	110	19,6
9:1	20	0,071	0,736	100	24,0
		0,082	0,852	110	25,2

Hierbei ist eine klare Tendenz der spezifischen Restaktivität des trägerfixierten Enzyms zu erkennen. Mit zunehmendem Verdünnungsgrad des zur Oberflächenaktivierung eingesetzten Glycidyoxypropyltrimethoxysilans und der daraus resultierenden Abnahme der Oxiran-Gruppen auf den MagPrep[®]-Partikeln steigt die spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins kontinuierlich an (Abbildung 7.4-1).

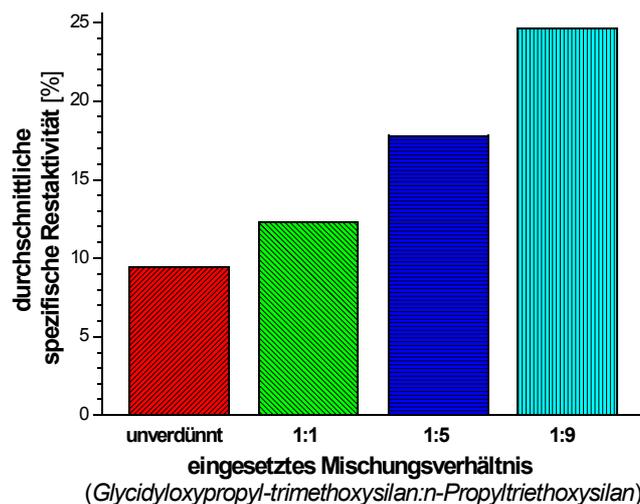


Abbildung 7.4-1: Gemittelte spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins. Die MagPrep[®]-Partikel wurden zuvor mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Silanisierungskomponente aktiviert.

Wird das Enzym an Partikel gebunden, die zuvor mit dem 1:1-Gemisch der Silanisierungskomponenten aktiviert wurden, so beträgt die spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms im Mittel 12,3 % der des nativen Enzyms. Damit ist die mit dieser Oberflächenmodifizierung erreichte spezifische Aktivität des trägergebundenen α -Chymotrypsin fast 3 %

größer als bei der Oberflächenmodifizierung mit reinem Glycidyoxypropyltrimethoxysilan. Um weitere 5,5 % höher liegt die Restaktivität des Enzyms, wenn es an die, mit einem 1:5-Gemisch aktivierten Partikel immobilisiert wird.

Das beste Immobilisierungsergebnis wird jedoch an den MagPrep[®]-Partikeln, deren Oberfläche mit dem 1:9-Gemisch aktiviert wurde, erzielt. Mit der hierbei erreichten Oberflächendichte der Oxiran-Anker besitzt das Enzym nach der Immobilisierung noch ca. 25% der spezifischen Aktivität des nativen α -Chymotrypsins.

Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchung bestätigen demnach die Annahme, dass durch die Reduzierung der Oberflächendichte der für die Immobilisierung des Enzyms geeigneten Ankergruppen, das Enzym bei der Immobilisierung besser in seiner aktiven Konformation erhalten bleibt. Die geringere Anzahl an kovalenten Bindungen zwischen Enzym und Trägermatrix führt aufgrund der geringeren Deformation der dreidimensionalen Enzymstruktur zu einer geringeren konformativen Belastung des trägergebundenen α -Chymotrypsins. Das Resultat ist eine gesteigerte spezifische Restaktivität.

Auch bei den Proben, bei denen die Immobilisierung bei einer Reaktionstemperatur von 6 °C durchgeführt wurde, ist dieser Einfluss erkennbar. Hier ist die Aktivitätssteigerung allerdings nicht so stark ausgeprägt. Die spezifische Restaktivität des immobilisierten Enzyms steigt lediglich von 17,5 % auf 18,7 %.

7.5 Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel mit N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan

Die Silanisierung mit 1 μ mol N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan/g MagPrep[®]-Partikel stellt eine weitere Methode zur Aktivierung der MagPrep[®]-Partikel dar, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Hierbei wird die Partikeloberfläche durch die Silanisierung mit Aminogruppen funktionalisiert. Der Reaktionsmechanismus ist der gleiche wie bei der Oberflächenfunktionalisierung mit Glycidyoxypropyltrimethoxysilan. Allerdings sitzt die Ankergruppe aufgrund der Struktur des Aminosilans (siehe Abbildung 7.5-1) nicht direkt an der Partikeloberfläche. Ihr Abstand zur Partikeloberfläche ist etwas größer. Zwischen der als Ankergruppe fungierenden Aminogruppe und dem Siliciumatom liegen elf Atombindungen. N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan ist damit etwas länger als der 1,6-Diaminohexan Spacer, der bei der Oberflächenmodifizierung der SiMAG-Partikel verwendet wurde.

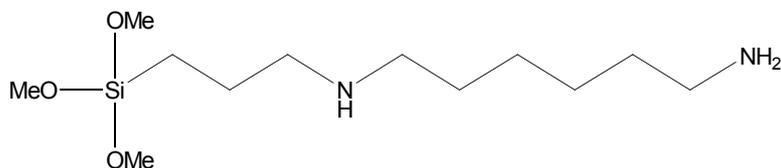


Abbildung 7.5-1: Strukturformel des N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilans

Die Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel mit N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan erfolgte weitestgehend nach der Standardsilanisierungsvorschrift (vgl. Kapitel 11.1.4, S. 118). Da die Konzentration der vorhandenen N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan-Lösung mit 95% für die Silanisierung der Magnetpartikel jedoch zu hoch war, wurde sie um den Faktor 50 verdünnt. Anschließend wurden 25 μL ($\cong 2 \mu\text{mol}$) der verdünnten Lösung mit 3 mL Isopropanol vereinigt und in eine Spritze aufgezogen. Im Unterschied zur Standardversuchsvorschrift wird erst diese, nochmals verdünnte Lösung der Silanisierungskomponente langsam, über einen Zeitraum von 10 min, in das Reaktionsgefäß zu den vorgelegten MagPrep[®]-Partikeln gegeben.

Die aminosilanisierten MagPrep[®]-Partikel werden dann in einem zweiten Reaktionsschritt mit Glutardialdehyd als Linker für die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin aktiviert. Dazu werden die modifizierten Magnetpartikel in 2 mL der Glutardialdehyd-Reaktionslösung resuspendiert. Nach einstündiger Reaktionsdauer bei 25 °C, 850 rpm wird der Überschuss an Glutardialdehyd durch dreimaliges Waschen der Partikel mit 1 mL H₂O, gefolgt von einem Waschschrift mit 1 mL 1x PBS (pH=7,5), entfernt. Anschließend werden die aktivierten Partikel in 1 mL 1x PBS bis zur Enzymimmobilisierung bei 7 °C im Kühlschrank gelagert. Die genaue Versuchsvorschrift für die Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd ist im Anhang aufgeführt (vgl. Kapitel 11.1.6, S. 119).

Die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin wurde abschließend unter den bekannten Standardreaktionsbedingungen durchgeführt. Die Menge immobilisierten Enzyms wurde mittels Bradfordtest, die Restaktivität des trägergebundenen α -Chymotrypsins mittels BTEE-Aktivitätsassay bestimmt.

Tabelle 7.5-1: Ergebnisse der kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsin an aminosilanisierte MagPrep[®]-Partikel

Probe	Immobilisierte Enzymmenge [μg]	Immobil. Enzymmenge/ mg beads [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	$\Delta\text{Abs}/\Delta t$ [rel. Einheiten/min]	$\Delta C/\Delta t$ [mmol/L*min]	$\Delta n/\Delta t$ [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Spez. Restaktivität [%]
1	259	26 \pm 0,9	0,163	0,169	1,69	22,3
2	241	24 \pm 0,9	0,150	0,155	1,55	21,9

Mit durchschnittlich 25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Partikel ist die Menge des an die aminosilanisierten Mag-

Prep[®]-Partikel immobilisierbaren α -Chymotrypsins annähernd doppelt so hoch, wie die Menge, die an die mit Glycidyoxypropyltrimethoxysilan und den Silangemischen aktivierten MagPrep[®]-Partikel gebunden wurde.

Eine mögliche Ursache dafür könnte der vergrößerte Abstand des Enzyms von der Partikeloberfläche sein. Mit zunehmendem Abstand der Ankergruppe von der Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel nimmt der Platz, der den α -Chymotrypsinmolekülen bei der Anbindung an die Trägermatrix zur Verfügung steht, zu und es kann mehr Enzym gebunden werden.

Zusätzlich zu der großen Enzymmenge, die an die aminosilanisierten Partikel gebunden wird, bleiben bei dieser Oberflächenmodifizierung im Mittel 22,3 % der enzymatischen Aktivität des nativen Enzyms nach der Immobilisierung erhalten. Die spezifische Restaktivität ist damit nur etwa 2 % kleiner als bei der Immobilisierung an MagPrep[®]-Partikel, die mit einem 1:9 Gemisch Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan aktiviert wurden.

Wie die Ergebnisse des Bradford-Tests zeigen, besitzen die aminosilanisierten MagPrep[®]-Partikel eine Belegungsdichte mit α -Chymotrypsin von 1 μ mol Enzym/g Partikel. Ausgehend von vollständigem Umsatz der Silanisierungskomponente bei der Oberflächenfunktionalisierung ist demnach jedes Enzymmolekül über eine einzige kovalente Bindung mit der Trägermatrix verknüpft. Aus den Modifizierungsversuchen mit den unterschiedlichen Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan-Gemischen ist bekannt, dass die verbleibende Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins von der Anzahl der Bindungen, über die das Enzym mit der Trägermatrix verknüpft ist, abhängt. Wie in den entsprechenden Kapiteln gezeigt wurde, nimmt der Aktivitätsverlust bei der Immobilisierung mit der Anzahl der Bindungen zwischen Enzym und Trägermatrix zu. Die Anbindung eines Enzymmoleküls über eine einzige kovalente Bindung verursacht demnach die geringste Deformation der dreidimensionalen Struktur des α -Chymotrypsins, so dass eine höhere Restaktivität resultiert. Der lineare Rest des Aminosilans wirkt zusätzlich wie eine flexible Tentakel, die von der Partikeloberfläche absteht. Das immobilisierte α -Chymotrypsin besitzt dadurch eine gewisse Beweglichkeit, wodurch sich die Enzymmoleküle gegenseitig weniger behindern und die Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums erhöht wird.

Die Kombination aus hoher immobilisierbarer Enzymmenge und guter Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins machen die Oberflächensilanisierung mit N-(6-Amino-hexyl)Aminopropyltrimethoxysilan zur erfolgreichsten aller bisher an den MagPrep[®]-Partikeln untersuchten Methoden zur Oberflächenfunktionalisierung.

7.6 Oberflächenfunktionalisierung mit 1,5 μ mol Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/g MagPrep[®]-Partikel

In Kapitel 7.4 konnte gezeigt werden, dass durch die Reduzierung der kovalenten Bindungen zwischen dem Enzymmolekül und der Trägermatrix eine höhere Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsin erreicht wird. Im vorangegangenen Kapitel wurde dann nach der Oberflächenfunktionalisierung der Partikel mit 1 μ mol Aminosilan/g Magnetpartikel (\cong 1 Bindung/Enzymmolekül) das bisher beste Immobilisierungsergebnis erreicht.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse soll im Folgenden bei der Aktivierung der MagPrep[®]-Partikel anstelle der 0,6 mmol des Gemisches aus Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan eine Menge von 1,5 μ mol des reinen Glycidyoxypropyltrimethoxysilans/g Magnetpartikel eingesetzt werden.

Bei vollständigem Umsatz der Silankomponente während der Aktivierungsreaktion und mit maximaler Enzymbelegung der Partikeloberfläche steht dann ebenfalls jedem α -Chymotrypsinmolekül im Mittel nur eine Oxirangruppe als Bindungsanker für die kovalente Anbindung zur Verfügung. Es wird erwartet, dass der Aktivitätsverlust, der bei den Immobilisierungen in Kapitel 7.4 aufgetreten ist, dadurch weiter reduziert werden kann, ohne dabei jedoch die Beladungskapazität der MagPrep[®]-Partikel mit α -Chymotrypsin zu verringern.

Aus der Modellrechnung zur maximalen Belegung der MagPrep[®]-Partikel mit α -Chymotrypsin (vgl. Kapitel 7.1, S. 80) ist bekannt, dass 0,9-1,6 nmol α -Chymotrypsin auf der Oberfläche eines Milligramms MagPrep[®]-Partikel Platz finden. Um derart geringe Silanstoffmengen bei der Modifizierung der MagPrep[®]-Partikel einsetzen zu können, wurde die Glycidyoxypropyltrimethoxysilan-Lösung um den Faktor 5.000 mit Isopropanol verdünnt.

Die Silanisierung erfolgte hauptsächlich nach Standardversuchsvorschrift (vgl. Kapitel 11.1.4, S. 118). Der Unterschied in der Durchführung bestand darin, dass statt 4 g in dieser Versuchreihe 6 g MagPrep[®]-Partikel und anstelle der sonst in Isopropanol gelösten Silanisierungskomponente 5 mL der verdünnten Glycidyoxypropyltrimethoxysilan-Lösung mittels einer Spritze über einen Zeitraum von 10 min zugegeben wurde.

Nach der Oberflächenaktivierung wurde versucht, die auf der Partikeloberfläche aufbrachten Oxirangruppen mit dem acidimetrischen Titrations-Assay zu bestimmen. Die Oberflächendichte der Oxirangruppen auf den Magnetpartikeln lag jedoch, ebenso wie bei den Proben des 1:5- bzw. 1:9-Gemisches unterhalb der Nachweisgrenze des Assays, so dass eine quantitative Bestimmung nicht möglich war.

Bei der anschließenden Enzymimmobilisierung, die unter Standardreaktionsbedingungen bei 20 °C durchgeführt wurde, konnten durchschnittlich 20 µg α-Chymotrypsin/mg MagPrep[®]-Partikel immobilisiert werden. Dieses Immobilisierungsergebnis zeigt in erster Näherung gute Übereinstimmung mit den theoretisch berechneten Enzymmengen aus Kapitel 7.1. Es werden ca. 0,8 nmol α-Chymotrypsin/mg Magnetpartikel immobilisiert. Hierbei ist aber festzustellen, dass etwas weniger als die berechnete maximale Enzymmenge an den MagPrep[®]-Partikeln gebunden wird. Die möglichen Ursachen hierfür sind vielfältig. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Silanisierungen mit Glycidylxypropyltrimethoxysilan und den Silangemischen werden durch die geringe Menge der eingesetzten Silanisierungskomponente nicht alle Hydroxidgruppen auf der Partikeloberfläche mit Silan umgesetzt. Möglicherweise reagiert ein Teil der auf der Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel aufgebracht Oxirangruppen unter Ringöffnung mit den noch verbliebenen, freien Hydroxidgruppen und steht damit nicht mehr als Bindungsanker für die anschließende Enzymimmobilisierung zur Verfügung. Das α-Chymotrypsin wird bei der Anbindung über das Glycidylxypropyltrimethoxysilan außerdem direkt an der Partikeloberfläche gebunden. Dem einzelnen Enzymmolekül steht so weniger Platz als bei der Immobilisierung an den aminosilanisierten Magnetpartikeln zur Verfügung. Eine weitere Ursache dafür, dass nicht die maximal mögliche Enzymmenge an die Partikel immobilisiert werden kann, besteht in der Abschirmung der Oxirangruppen durch bereits immobilisiertes Enzym. Wird ein Teil der aufgebracht Epoxidfunktionen durch bereits gebundenes Enzym verdeckt, sind sie für weitere α-Chymotrypsinmoleküle nicht mehr erreichbar und es wird insgesamt weniger Enzym gebunden.

Die Anzahl der kovalenten Bindungen (Z_{Bindung}), über die jedes immobilisierte α-Chymotrypsinmolekül bei diesem Immobilisierungsverfahren mit den MagPrep[®]-Partikel verbunden ist, wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$Z_{\text{Bindung}} = \frac{\text{Stoffmenge der Oxirangruppen auf den Partikeln}}{\text{Stoffmenge des immobilisierten } \alpha\text{-Chymotrypsins}} = \frac{1,5 \text{ nmol}}{0,8 \text{ nmol}} = 1,9 \quad (7.6-1)$$

Durch die Aktivierung der MagPrep[®]-Partikel mit stöchiometrischen Mengen Glycidylxypropyltrimethoxysilan (1,5 µmol/g Partikel) wird demnach jedes α-Chymotrypsinmolekül nicht nur über eine, sondern durchschnittlich über zwei kovalente Bindungen an die Partikeloberfläche gebunden. Die Berechnung berücksichtigt allerdings den Anteil, der möglicherweise auf der Partikeloberfläche unter Ringöffnung abreagierten Oxirangruppen nicht, und stellt somit nur einen groben Anhaltspunkt für die Beurteilung der tatsächlichen Bin-

dungsverhältnisse dar.

Die enzymatische Aktivität der erhaltenen Immobilisate wurde mittels BTEE-Assay bestimmt. Insgesamt konnte auf 10 mg dieser MagPrep[®]-Partikel eine enzymatische Aktivität von 1,2 U immobilisiert werden. Das immobilisierte α -Chymotrypsin besitzt eine mittlere spezifische Restaktivität von $6,1 \pm 0,2$ U/mg, was 16,2 % der spezifischen Aktivität des nativen Enzyms entspricht.

Tabelle 7.6-1: Ergebnis der BTEE-Aktivitätsmessung (1,5 μ mol Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/g MagPrep[®]-Partikel)

Probe	Δ Abs/ Δ t [rel. Einheiten/min]	Δ c/ Δ t [mmol/L*min]	Δ n/ Δ t [μ mol/min]	Immobilisierte Enzymmenge [μ g]	Spez. Restaktivität [%]
1	0,121	0,126	1,26	216	15,6
2	0,122	0,127	1,27	204	16,7
3	0,107	0,111	1,11	181	16,5

Diese spezifische Restaktivität entspricht in etwa der, die bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an die mit dem 1:5 Gemisch oberflächenfunktionalisierten Magnetpartikel erreicht wurde.

Da in den Versuchen mit 20 μ g α -Chymotrypsin/mg MagPrep[®]-Partikel jedoch deutlich mehr Enzym immobilisiert wurde, und durch den Wegfall der zweiten Silanisierungskomponente eine erhebliche Vereinfachung der Silanisierungsreaktion erreicht wird, ist dieses Verfahren wesentlich effizienter und stellt somit eine akzeptable Alternative zur Silanisierung mit den Silangemischen dar. Die Effektivität der Aminosilanisierung wird jedoch nicht ganz erreicht. Der größere Abstand des Enzyms zur Partikeloberfläche und die größere Flexibilität des N-(6-Aminoethyl)Aminopropyltrimethoxysilan-Rests führen bei den aminosilanierten MagPrep[®]-Partikeln immer noch zu höheren Restaktivitäten des immobilisierten Enzyms, als durch die Oberflächenfunktionalisierung mit 1,5 μ mol Glycidyoxypropyltrimethoxysilan erreicht wird.

7.7 Oberflächenmodifizierung der funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel mit 1,6-Diaminohexan

In diesem Kapitel sollen die Versuche zur Oberflächenmodifizierung der MagPrep[®]-Partikel durch den Einbau eines Spacers beschrieben werden. Im Gegensatz zu den Spacermodifizierungen der SiMAG-Partikel und auf den Ergebnissen dieser Versuche basierend, wurde die Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel allerdings nur mit dem 1,6-Diaminohexan Spacer modifiziert, da dieser zu den besten Immobilisierungsergebnisse an SiMAG-Partikeln führte (vgl. Kapitel 5, S. 66). Außerdem wurden nur die funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel aus

den Versuchen mit den 1:5- und 1:9-Silangemischen und der Funktionalisierung mit 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Partikel oberflächenmodifiziert, da diese schon bei der direkten Anbindung des Enzyms an die Partikeloberfläche die besten Immobilisierungsergebnisse zeigten.

Ziel dieser Experimente war, den Einfluss des 1,6-Diaminohexan Spacers auf das Immobilisierungsergebnis an MagPrep[®]-Partikeln zu bestimmen. Es sollte untersucht werden, ob durch die Einführung des Spacers zwischen Enzym und Partikeloberfläche eine ähnlich hohe Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins wie bei der Modifizierung der MagPrep[®]-Partikel mit den strukturell ähnlichen N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan erreicht wird.

Zur Anbindung des Spacers wurden 10 mg MagPrep[®]-Partikel 3x mit je 1 mL H₂O gewaschen und in einem Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden 2 mL der 1,6-Diaminohexanlösung zugesetzt und für 3 h bei einer Reaktionstemperatur von T=40 °C unter Schütteln (850 rpm) zur Reaktion gebracht. Nach dem Reaktionsende wurden die MagPrep[®]-Partikel von der Reaktionslösung magnetisch separiert, 3x mit je 1 mL H₂O gewaschen und abschließend in 1 mL 1x PBS resuspendiert.

Der Immobilisierung des α -Chymotrypsins an die oberflächenmodifizierten MagPrep[®]-Partikel ging allerdings noch eine Aktivierung mit Glutarialdehyd voraus. Die Aktivierung der spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikel mit Glutarialdehyd erfolgte nach der Spacermodifizierung unter Standardbedingungen (vgl. Kapitel 11.1.6, S. 119).

Abbildung 7.7-1 zeigt die Ergebnisse der Immobilisierungsversuche an den spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikeln.

Wie auch schon an den unmodifizierten MagPrep[®]-Partikeln beobachtet, nimmt die immobilisierbare Enzymmenge auch an den spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikeln mit zunehmendem Verdünnungsgrad der bei der Oberflächenfunktionalisierung eingesetzten Silanisierungskomponente ab. Durch die Anbindung des Spacers an die Partikeloberfläche wird eine Erhöhung der Enzymbindungskapazität der modifizierten Partikel beobachtet. Ausnahme dabei sind die Partikel, die zuvor mit 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Partikel funktionalisiert wurden. Diese Partikel besitzen eine unveränderte Beladungskapazität mit α -Chymotrypsin von 20 $\mu\text{g/mg}$ Partikel. Die an den mit einem 1:5- bzw. 1:9-Gemisch funktionalisierten MagPrep[®]-Partikeln immobilisierte α -Chymotrypsin-Menge beträgt nach der Spacermodifizierung 21 und 17 $\mu\text{g/mg}$ Partikel und ist damit mehr als 40 % höher als bei den unmodifizierten MagPrep[®]-Partikeln (vgl. Abbildung 7.7-2). Durch die Spaceranbindung vergrößert sich der Enzymabstand von der Partikeloberfläche und damit letztlich auch der effektive Radius

der Partikel, so dass mehr Platz für die Enzymimmobilisierung zur Verfügung steht und mehr Enzym gebunden werden kann.

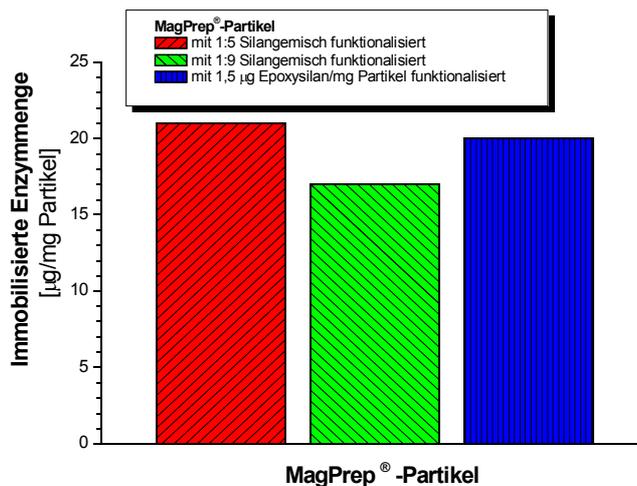


Abbildung 7.7-1: Vergleich der auf den spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikeln (mit 1,6-Diaminohexan oberflächenmodifizierten) immobilisierten α -Chymotrypsinmenge; Immobilisierungsbedingungen; $c_0=0,5$ mg/mL, $T=20$ °C, $t=3$ h, 850 rpm

Zur weiteren Charakterisierung des spacergebundenen α -Chymotrypsins wurde im Anschluss an die Immobilisierungsversuche die spezifische Restaktivität des immobilisierten Enzyms mittels BTEE-Assay unter Standardreaktionsbedingungen bestimmt. Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen sind in Abbildung 7.7-2 graphisch einander gegenüber gestellt.

Analog zu den Ergebnissen der Aktivitätstests mit dem direkt an die Partikel immobilisierten α -Chymotrypsin (vgl. Kapitel 7.4, S.87), nimmt auch die spezifische Restaktivität des spacergebundenen Enzyms mit sinkender Oberflächendichte der Ankergruppen zu. Die höchste spezifische Restaktivität von 24 % besitzt das α -Chymotrypsin, das an MagPrep[®]-Partikel gebunden ist, die zuvor mit dem 1:9 Silangemisch funktionalisiert wurde. Eine um 8% kleinere Restaktivität besitzt das spacergebundene Enzym an den MagPrep[®]-Partikel, die mit 1,5 μ mol Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/g Partikel funktionalisiert wurden. Die spezifische Restaktivität des α -Chymotrypsins auf den Immobilisaten des 1:5-Gemisches ist mit 13 % am geringsten.

Auffällig ist, dass durch die Immobilisierung des α -Chymotrypsin über den 1,6-Diaminohexan Spacer keine Verbesserung der spezifischen Restaktivität des an die MagPrep[®]-Partikel immobilisierten Enzyms erreicht wird. Da das α -Chymotrypsin bei der Immobilisierung an die spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikel allerdings nicht mehr an Oxiran- sondern an

Aldehydgruppen auf den Partikeln bindet, sind an der Immobilisierungsreaktion wahrscheinlich auch andere funktionelle Reste des Enzyms beteiligt. Dies führt möglicherweise zu einer ungünstigeren Anbindung des Enzyms, so dass eine Destabilisierung der Enzymkonformation und damit eine reduzierte Restaktivität des immobilisierten Enzyms resultiert. Möglicherweise wird der positive Einfluss des Spacers auf die spezifische Restaktivität gerade durch die negativen Auswirkungen der veränderten Ankergruppen kompensiert.

Welchen Einfluss der durch die Spacermodifizierung der MagPrep[®]-Partikel hervorgerufene Wechsel der mit dem α -Chymotrypsin reagierenden funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche auf die Restaktivität des immobilisierten Enzyms hat, wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr näher untersucht.

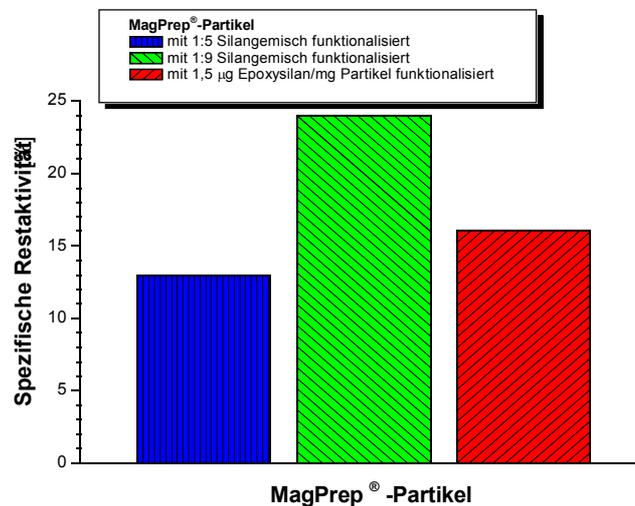


Abbildung 7.7-2: Vergleich der spezifischen Restaktivität des an spacermodifizierten MagPrep[®]-Partikeln (mit 1,6-Diaminohexan oberflächenmodifizierten) immobilisierten α -Chymotrypsins; Immobilisierungsbedingungen; $c_0=0,5$ mg/mL, $T=20$ °C, $t=3$ h, 850 rpm

8. Vergleich der Enzymimmobilisierung an SiMAG- und MagPrep[®]-Partikeln

Mit den SiMAG- und MagPrep[®]-Partikeln standen zwei unterschiedliche Partikelsorten zur Verfügung. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt wurde, eignen sich beide für die kovalente Immobilisierung von α -Chymotrypsin. Im Folgenden sollen nun die auf den jeweiligen Partikelsorten erreichten Immobilisierungsergebnisse einander gegenüber gestellt werden.

Im Gegensatz zu den SiMAG-Partikeln, deren Oberfläche bereits mit unterschiedlichen Bindungsankern für die Enzymanbindung ausgestattet waren, musste die Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel durch entsprechende Funktionalisierung mit Ankergruppen für die Enzymimmobilisierung ausgestattet werden.

Die Reaktionsbedingungen bei der kovalenten Anbindung von α -Chymotrypsin an die unterschiedlichen Magnetpartikel unterschieden sich jedoch nicht wesentlich voneinander. Alle Immobilisierungen erfolgten bei moderaten Reaktionstemperaturen in wässriger Lösung bei pH-Werten zwischen pH=5,5–7,5. Trotzdem wurden deutliche Unterschiede im Immobilisierungsergebnis festgestellt.

8.1 Vergleich der Immobilisierungsergebnisse an unmodifizierten Partikeln

Für die Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikel waren Chlormethyl-, Thiol- und Polyglutaraldehydgruppen als Bindungsanker auf der Partikeloberfläche verfügbar. Die kovalente Anbindung des α -Chymotrypsins an diese Partikel erfolgte dementsprechend über unterschiedliche Reaktionsmechanismen, so dass die Reaktionsbedingungen an die einzelnen Ankergruppen angepasst werden mussten. Unter für die unterschiedlichen Bindungsanker optimierten Immobilisierungsbedingungen, werden pro mg SiMAG-Partikel, abhängig von der jeweiligen funktionellen Gruppe auf der Oberfläche der SiMAG-Partikel, zwischen 15 und 40 μg α -Chymotrypsin gebunden. Mit 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wird dabei die geringste Menge α -Chymotrypsin über die Chlormethyl-Gruppen an den SiMAG-Partikeln immobilisiert. SiMAG-PGL Partikel besitzen eine mehr als doppelt so große Bindungskapazität, so dass 32 μg Enzym/mg Magnetpartikel gebunden werden. Die höchste spezifische Enzymbindungskapazität von 38 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wird an SiMAG-SH Partikeln gemessen.

Die direkte Anbindung des Enzyms an die starre Oberfläche der SiMAG-Partikel verursacht bei der kovalenten Immobilisierung allerdings erhebliche Aktivitätsverluste. Durch die Optimierung der Immobilisierungsbedingungen konnte die erhaltene Restaktivität zwar mehr

als verdoppelt werden, sie beträgt jedoch bei keiner der SiMAG-Partikelsorten mehr als 6 % (vgl. Tabelle 8.1-1).

Ein ganz anderes Bild ergibt sich bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an MagPrep[®]-Partikel. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Partikel hauptsächlich mit Oxirangruppen funktionalisiert, um das Enzym kovalent an die Oberfläche zu binden.

Die Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel mit N-(6-Aminoethyl)Aminopropyltrimethoxysilan wird hier zunächst nicht betrachtet. Aufgrund der Struktur des N-(6-Aminoethyl) Aminopropyltrimethoxysilans erfolgt der Vergleich der an derart funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel erreichten Immobilisierungsergebnisse mit den spacermodifizierten Partikeln im nächsten Kapitel.

Während die Oberflächendichte der Bindungsanker bei den Enzymimmobilisierungen an SiMAG-Partikeln konstant war, wurden die Immobilisierungsversuche an epoxyfunktionalisierten MagPrep[®]-Partikeln mit unterschiedlichen Belegungsdichten der Bindungsanker auf der Partikeloberfläche durchgeführt. Dabei wurde mit abnehmender Oberflächendichte der Ankergruppen immer weniger α -Chymotrypsin an die epoxyfunktionalisierten MagPrep[®]-gebunden. Abhängig von der während der Oberflächenfunktionalisierung an MagPrep[®]-Partikeln eingesetzten Oxiranmenge, beträgt die immobilisierte Enzymmenge 10-25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Magnetpartikel. Die Enzymbelegung der entsprechend funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel ist damit um etwa 50-75 % kleiner als die der SiMAG-Partikel.

Die geringere immobilisierte Enzymmenge wird jedoch durch eine deutlich höhere spezifische Restaktivität der MagPrep[®]-Immobilisate kompensiert. Sie liegt bei der Enzymimmobilisierung an MagPrep[®]-Partikel zwischen 10-25 % und ist damit signifikant größer als bei der Immobilisierung des α -Chymotrypsins an SiMAG-Partikel.

Die Effektivität der Enzymimmobilisierung hängt sowohl von der immobilisierbaren Enzymmenge als auch von der auf den Partikeln immobilisierbaren Restaktivität des trägerfixierten α -Chymotrypsins ab und soll im folgenden zur Beurteilung der unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden herangezogen werden. Aus diesem Grund wird die dimensionslose Kennzahl der Immobilisierungseffektivität (ϵ_1) als Quotient aus spezifischer Restaktivität und immobilisierter Enzymmenge definiert. In Tabelle 8.1-1 sind die Effektivitätswerte der Verfahren aufgelistet, bei denen die Enzymanbindung direkt an der Partikeloberfläche erfolgt. Es ist deutlich zu erkennen, dass, aufgrund der deutlich höheren Restaktivitäten, die Immobilisierung von α -Chymotrypsin an MagPrep[®]-Partikeln effektiver als die an den SiMAG-Partikeln ist. Mit geringeren Enzymmengen werden höhere spezifische Restaktivi-

täten an den MagPrep[®]-Partikeln erreicht.

Tabelle 8.1-1: Gegenüberstellung der bei der Immobilisierung an SiMAG- und MagPrep[®]-Partikeln resultierenden spezifischen Restaktivitäten des α -Chymotrypsins und der dazugehörigen Immobilisierungseffektivität

SiMAG-Partikel			MagPrep [®] -Partikel		
Ankergruppe	Spez. Restaktivität [%]	ϵ_1 [rel. E]	Ankergruppe	Spez. Restaktivität [%]	ϵ_1 [rel. E]
MeCl	5	0,34	Oxiran (rein)	10	0,68
			Oxiran (1:1 Gemisch)	12	1,37
PGL	6	0,18	Oxiran (1:5 Gemisch)	18	1,48
			Oxiran (1:9 Gemisch)	25	2,27

Als Ursache für die größere Effektivität der Enzymimmobilisierung an den MagPrep[®]-Partikeln ist die Reduzierung der Ankergruppe auf der Partikeloberfläche zu sehen. Durch die variable Einstellung der Oberflächendichte der funktionellen Ankergruppen auf den MagPrep[®]-Partikeln, können diese besser an die durchzuführende Enzymimmobilisierung angepasst und die sterische Belastung des α -Chymotrypsins entsprechend verringert werden. Daraus resultiert dann schließlich die höhere Effektivität der Immobilisierungsmethode.

8.2 Vergleich der Immobilisierungsergebnisse an oberflächenmodifizierten SiMAG- und MagPrep[®]-Partikeln

Nachdem aus der Immobilisierung des α -Chymotrypsins direkt an die Oberfläche der Magnetpartikel gerade bei den SiMAG-Partikeln sehr niedrige Restaktivitäten resultierten, wurden die Partikel durch Einführung von Spacern zwischen Enzym und Partikeloberfläche oberflächenmodifiziert. Durch die Modifizierung soll der Abstand des Enzyms zur Partikeloberfläche vergrößert werden. Dadurch sollen die deaktivierenden Wechselwirkungen des Enzyms mit der Trägermatrix reduziert und die Substratzugänglichkeit des immobilisierten Enzyms erhöht werden.

Die Oberflächenmodifizierung wurde allerdings nicht mit allen vier SiMAG-Partikelsorten durchgeführt, sondern erfolgte nur an SiMAG-MeCl Partikel. Vier unterschiedliche Spacer, die sich in ihrer Kettenlänge unterschieden, kamen zum Einsatz (Kapitel 5, S.66). Die Oberflächenmodifizierung der MagPrep[®]-Partikel erfolgte ausschließlich mit 1,6-Diaminohexan, da dieser Spacer bei der Modifizierung der SiMAG-Partikel zu den höchsten Restaktivitäten des immobilisierten α -Chymotrypsins geführt hatte.

Als Besonderheit soll an dieser Stelle die Silanisierung der MagPrep[®]-Partikel mit N-(6-Aminoethyl)Aminopropyltrimethoxysilan erwähnt werden. Hierbei handelte es sich nicht um eine Modifizierung der bereits funktionelle Bindungsanker tragenden Partikeloberfläche, sondern vielmehr um eine Funktionalisierung der MagPrep[®]-Partikel. Sie wird aber trotzdem an dieser Stelle mit aufgeführt, da aufgrund der Struktur des verwendeten Silans, aminofunktionalisierte MagPrep[®]-Partikel mit größerem Enzymabstand zur Partikeloberfläche erhalten werden, deren Oberfläche der der spacermodifizierten sehr ähnlich ist (vgl. Abbildung 8.2-1).

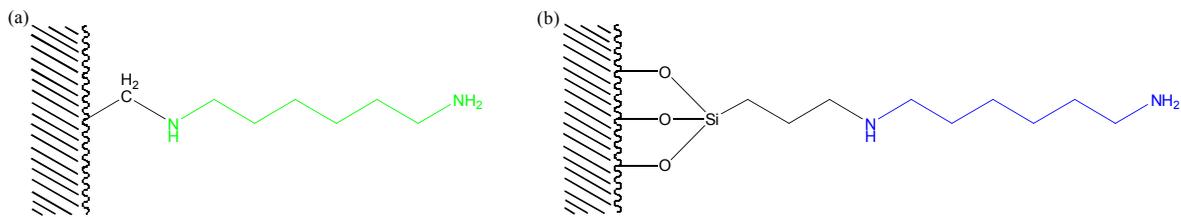


Abbildung 8.2-1: Struktur der Bindungsanker: (a) auf der Oberfläche der SiMAG-Partikel nach Modifizierung mit 1,6 Diaminohexan;
(b) auf der Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel nach der Funktionalisierung mit N-(6-Aminoethyl)Aminopropyltrimethoxysilan

Vor der Verwendung als Trägermatrix bei der Enzymimmobilisierung muss bei allen hier beschriebenen Magnetpartikeln eine Aktivierung der auf der Partikeloberfläche aufgebrachtene Aminogruppen durch Einführung von Glutarialdehyd als Linker erfolgen (vgl. Kapitel 11.1.6, S. 119).

Durch die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel werden deutlich höhere Restaktivitäten des immobilisierten α -Chymotrypsins erhalten. So beträgt die spezifische Restaktivität des trägergebundenen Enzyms bei der Immobilisierung direkt an die unmodifizierte Oberfläche der SiMAG-MeCl Partikel nur knapp 6 %. Durch die Spacermodifizierung wird die spezifische Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins um den Faktor zwei bis drei, auf Werte zwischen 10 % und 21 % gesteigert. Auch die Immobilisierungseffektivität verdreifacht sich annähernd durch die Spacermodifizierung der SiMAG-Partikel und nimmt von 0,34 auf 0,90 zu (vgl. Tabelle 8.2-1). Der 1,6-Diaminohexan Spacer führt dabei zu den besten Immobilisierungsergebnissen. Aufgrund der Kettenlänge des 1,6-Diaminohexan Spacers wird das Enzym bei der Immobilisierung in einem optimalen Abstand zur Partikeloberfläche gebunden, so dass es gut vom Substrat erreichbar ist und ausreichend von möglichen Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche abgeschirmt wird. Zusätzlich

werden durch die Flexibilität des Spacers die konformativen Belastungen des gebundenen Enzyms, die bei der Anbindung an die starre Partikeloberfläche durch die Deformation der dreidimensionalen Enzymstruktur auftreten, verringert. Die Anbindung des Enzyms über den langkettigen α,ω -Bis-amino-PEG Spacer führt zu etwas schlechteren Immobilisierungsergebnissen. Die spezifische Restaktivität des über diesen Spacer immobilisierten α -Chymotrypsins beträgt nur 15 %. Auch die Immobilisierungseffektivität ist mit $\epsilon_I=0,8$ etwas geringer als beim 1,6-Diaminohexan. Möglicherweise ist der Spacer zu lang und liegt nicht mehr als lineares, langgestrecktes Molekül vor. Dadurch können dann unerwünschte, die Enzymaktivität mindernde Wechselwirkungen des Spacers mit dem Enzymmolekül auftreten.

Durch die Spacermodifizierung der SiMAG-MeCl Partikel mit Jeffamine HK-511 und Ethylendiamine E100 werden nur geringfügig bessere Immobilisierungsergebnisse als bei der direkten Anbindung des Enzyms an die Partikeloberfläche erhalten. Zusätzlich liegt die Immobilisierungseffektivität bei diesen Oberflächenmodifizierungen mit $\epsilon_I=0,31$ und $\epsilon_I=0,26$ deutlich unter der der beiden anderen Spacer. Aus diesem Grund wurde die Oberflächenmodifizierung mit diesem beiden Spacern bei weiteren Modifizierungsversuchen nicht fortgesetzt.

Tabelle 8.2-1: Gegenüberstellung der bei der Immobilisierung an spacermodifizierte SiMAG- und MagPrep®-Partikeln resultierenden spezifischen Restaktivität des α -Chymotrypsins und der dazugehörigen Immobilisierungseffektivität

SiMAG-MeCl Partikel			MagPrep®-Partikel		
Spacer	Spez. Restaktivität [%]	ϵ_I [rel. E]	Spacer/Silan	Spez. Restaktivität [%]	ϵ_I [rel. E]
α,ω -Bis-amino PEG	15	0,80	1,6-Diaminohexan (1:5 Gemisch)	13	0,64
1,6-Diaminohexan	21	0,90	1,6-Diaminohexan (1:9 Gemisch)	24	1,42
Jeffamine® HK-511	10	0,31	1,6-Diaminohexan (1,5 μ mol Epoxy)	16	0,77
Ethylendiamine E-100	11	0,26	<i>N</i> -(6-Amino-hexyl)Amino-propyl-tri-methoxysilan	22	0,88

Da aus den Modifizierungsversuchen mit SiMAG-Partikeln bekannt war, dass 1,6-Diaminohexan die besten Modifizierungsergebnisse liefert, erfolgte die Modifizierung der MagPrep®-Partikel ausschließlich mit diesem Spacer.

Modifiziert wurden die mit einem 1:5- und 1:9-Gemisch Glycidylxypropyltrimethoxysilan/N-Propyltriethoxysilan oberflächenfunktionalisierten Partikel und die MagPrep®-Partikel

mit einer Oberflächendichte der Bindungsanker von 1,5 $\mu\text{mol/g}$ Partikel.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Oberflächenmodifizierung der SiMAG-MeCl-Partikel, wird durch die Spacermodifizierung der MagPrep®-Partikel mit 1,6-Diaminohexan keine signifikante Verbesserung der Immobilisierungsergebnisse erreicht. Die Immobilisierungseffektivität sinkt sogar bei allen Proben durch die Anbindung des Spacers geringfügig. Durch die Anbindung des Enzyms über die Carbonylgruppe des Linkers reagieren andere funktionelle Reste des α -Chymotrypsins mit den Ankergruppen auf der Oberfläche der spacermodifizierten MagPrep®-Partikel. Dies führt möglicherweise zu einer Destabilisierung der Enzymstruktur woraus dann die reduzierten spezifischen Restaktivitäten des Enzyms resultierten.

Bei der Beurteilung der Immobilisierungsergebnisse der aminosilanisierten MagPrep®-Partikel in Kapitel 7.5 wurde nur die auf den Partikeln immobilisierbare Enzymmenge und die daraus resultierende enzymatische Aktivität der Immobilisate berücksichtigt. Bezieht man jedoch auch die Immobilisierungseffizienz bei der Beurteilung mit ein, muss festgestellt werden, dass diese Partikelfunktionalisierung eine weniger effektive Immobilisierung des α -Chymotrypsins ermöglicht, als beispielsweise die mit 1,6-Diaminohexan oberflächenmodifizierten Partikel, deren Oberfläche mit einem 1:9 Gemisch aus Glycidylxypropyltrimethoxysilan/N-Propyltriethoxysilan funktionalisiert wurde. Zwar kann an den aminosilanisierten MagPrep®-Partikel eine große Enzymmenge und auch die größte enzymatische Aktivität immobilisiert werden, jedoch besitzt das immobilisierte α -Chymotrypsin eine geringere spezifische Restaktivität als auf den modifizierten Partikeln des 1:9 Gemisches. Die Effektivität der Enzymimmobilisierung an aminosilanisierten MagPrep®-Partikeln beträgt $\epsilon_I=0,88$, die der spacermodifizierten Partikel des 1:9 Gemisches $\epsilon_I=1,42$ (vgl. Tabelle 8.2-1).

Insgesamt hat der Vergleich der Enzymimmobilisierung an oberflächenmodifizierten SiMAG- und MagPrep®-Partikeln gezeigt, dass bei der kovalenten Immobilisierung von α -Chymotrypsin an MagPrep®-Partikel bessere Immobilisierungsergebnisse und eine höhere Immobilisierungseffektivität erreicht werden.

Die SiMAG-Partikel besitzen allerdings den Vorteil, dass sie bereits funktionelle Bindungsanker auf der Oberfläche tragen, so dass ihr direkter Einsatz bei der Enzymimmobilisierung möglich ist. Im Vergleich zur Immobilisierung an MagPrep®-Partikeln entfällt dadurch der Reaktionschritt der Oberflächenfunktionalisierung.

Durch Optimierung der Immobilisierungsbedingungen und durch die Modifizierung der Partikeloberfläche kann sowohl die Bindungskapazität als auch die auf den SiMAG-Parti-

keln immobilisierbare enzymatische Aktivität deutlich gesteigert werden. Trotzdem werden bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin an SiMAG-Partikeln fast immer schlechtere Immobilisierungsergebnisse erhalten, als bei der kovalenten Anbindung des Enzyms an MagPrep[®]-Partikel.

Die MagPrep[®]-Partikel tragen zwar keine für die kovalente Enzymimmobilisierung geeigneten funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche und müssen deshalb vor der Enzymimmobilisierung funktionalisiert werden, doch gerade dadurch besteht bei den MagPrep[®]-Partikeln die Möglichkeit, eine bessere Anpassung der Partikeloberfläche an das Modellenzym vorzunehmen. Die größten Verbesserungen der Immobilisierungsergebnisse werden nicht durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen bei der Immobilisierungsreaktion erreicht, sondern durch die Anpassung der Oberflächendichte der funktionellen Bindungsankern auf den Magnetpartikeln.

Wie experimentell gezeigt werden konnte, hat die Oberflächendichte der Ankergruppen bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin einen wesentlich größeren Einfluss auf das Immobilisierungsergebnis, als der Reaktions-pH-Wertes oder die Reaktionstemperatur.

9. Pepsinimmobilisierung an MagPrep[®]-Partikeln

Zum Abschluss der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin gewonnenen Erkenntnisse auf ein weiteres Modellenzym zu übertragen sind. Hierbei wurde Pepsin als Modellenzym ausgewählt, da es in einem industriell anwendbaren Verfahren zur Biotransformation von Lactoferrin (bLF) eingesetzt wird. Die Gewinnung bioaktiver Proteine aus Agrarprodukten wie z.B. Molke ist aufgrund ihrer funktionellen Eigenschaften von großem Interesse. Durch die Isolierung einzelner Proteine aus den Rohstoffen Zuckerrübe, Kartoffel und Milch wird die Erschließung neuer Märkte wie der Lebensmittel-, Kosmetik- oder Pharmaindustrie möglich, was zu einer erheblichen Steigerung der Wertschöpfung führt. Durch anschließende Biotransformation dieser Proteine kann möglicherweise die Wertschöpfung weiter gesteigert werden, wie dies bei der enzymatischen Transformation von Lactoferrin zu dem antimikrobiell höher wirksamen Lactoferricin der Fall ist.

Ein Verfahren zur Biotransformation von bLF, in dem Pepsin als Biokatalysator eingesetzt wird, wurde in einer am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover angefertigten Dissertation bereits entwickelt [Diss. Johann].

Basierend auf den Ergebnissen dieser Dissertation soll nun untersucht werden, ob MagPrep[®]-Partikel als Trägermatrix für die Immobilisierung des Pepsins verwendet und die erhaltenen Immobilisate bei der Umsetzung von Lactoferrin zu Lactoferricin eingesetzt werden können.

Der Einsatz von immobilisiertem Pepsin bei der Biotransformation würde neben der Wiederverwendung des Enzyms eine einfache und schnelle Abtrennung des Biokatalysators vom Reaktionsmedium ermöglichen. Derzeit wird das Pepsin durch Cross-flow-Filtration vom Produkt abgetrennt. Hierbei ist jedoch bereits nach 20 min eine Verblockung der Filtrationsmembran und damit Membranfouling zu beobachten. Die Verwendung von Magnetpartikeln kann in diesem Verfahren zu einer deutlichen Vereinfachung und einer erheblichen Verbesserung der Pepsinabtrennung führen.

Die Versuche zur Immobilisierung von Pepsin wurden an MagPrep[®]-Partikeln durchgeführt, deren Oberfläche zuvor mit einem 1:9 Gemisch Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan funktionalisiert wurde (vgl. Kapitel 11.1.4, S. 118). Die Immobilisierung des Pepsins erfolgte analog zu den Standardversuchsbedingungen bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin, allerdings wurden statt 20 mg Partikel 50 mg je Probe und statt 1x PBS-Puffer (pH=7,5) KPP-Puffer (0,1 M, pH=5,5) eingesetzt. Der Pufferwechsel wurde

vorgenommen, um eine bessere Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der ursprünglichen, mit nativem Enzym durchgeführten Versuche, zu gewährleisten [Schwarz, 2006]. Die Immobilisierungsergebnisse sind in Tabelle 9-1 (S.109) aufgeführt.

Im Mittel wurden 6 μg Pepsin/mg Magnetpartikel immobilisiert. Erwartungsgemäß ist die Bindungskapazität der MagPrep[®]-Partikel für Pepsin etwas geringer als für α -Chymotrypsin, da sich die beiden Enzyme in der Größe der Moleküle unterscheiden. Pepsin besitzt ein um etwa 45% höheres Molekulargewicht von $M_R=36$ kDa, wodurch sich der größere Platzbedarf des Enzyms erklärt.

Die Aktivität des immobilisierten Enzyms wurde anschließend mit einem Titrationsassay bestimmt. Dabei wird Lactoferrin als Substrat eingesetzt und durch enzymatische Biotransformation zu Lactoferricin umgesetzt. Eine detaillierte Versuchsbeschreibung ist im Anhang aufgeführt (vgl. Kapitel 11.1.7, S. 119).

Der Titrationsassay basiert auf der Freisetzung von Hydroxid-Ionen bei der enzymatischen Biotransformation von Lactoferrin durch Pepsin. Um aber den pH-Wert der Reaktionslösung über den gesamten Reaktionsverlauf konstant bei $\text{pH}=2$ zu halten, muss kontinuierlich 0,1 M Salzsäure zutitriert werden. Über die Zugabegeschwindigkeit der Salzsäure kann schließlich die Aktivität des trägerfixierten Pepsins berechnet werden. Ein Unit wird dabei als die Pepsinmenge definiert, die bei der Reaktion mit Lactoferricin pro Minute bei 37°C und $\text{pH}=2$ ein μmol Hydroxid-Ionen freisetzt.

Die Aktivitätsmessung wurde in einer pH-Stat-Anlage (DL50 Graphix, Mettler Toledo) durchgeführt, wobei der Reaktor über einen Wasserbad-Thermostat temperierbar war.

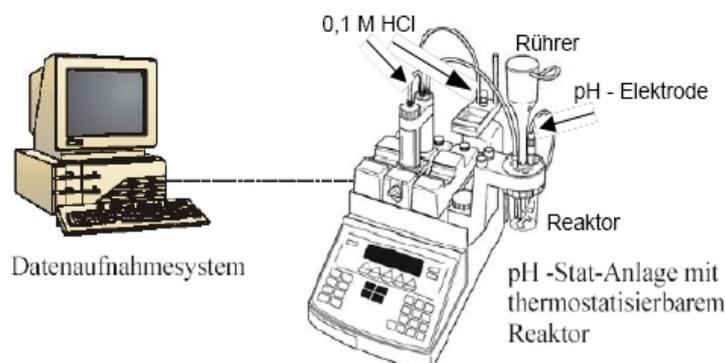


Abbildung 9-1: pH-Stat-Anlage zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des immobilisierten Pepsins [Diss. Johann]

Da für diesen Assay keine Herstellerinformationen über die Aktivität des nativen Pepsins

verfügbar waren, wurde diese in Vorversuchen zur Pepsinimmobilisierung bestimmt. Die spezifische Aktivität des Pepsins beträgt 25 U/mg.

Der zeitliche Verlauf der HCl-Zugabe bei den Aktivitätsuntersuchungen des nativen und an MagPrep[®]-Partikel immobilisierten Pepsins sind in Abbildung 9-2 dargestellt.

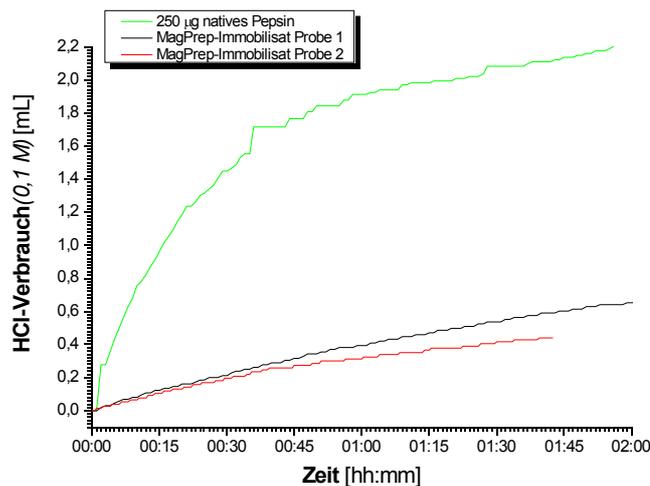


Abbildung 9-2: Titrationsverlauf der Aktivitätsbestimmung von direkt an der Partikeloberfläche gebundenem Pepsin

Für das immobilisierte Enzym ergab sich somit eine spezifische Restaktivität von $A_{E(37^{\circ}C)} = 2,4 \pm 0,6$ U/mg.

Ebenso wie bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin wird auch bei der kovalenten Anbindung von Pepsins an die MagPrep[®]-Partikel ein deutlicher Aktivitätsverlust beobachtet. Nach der Immobilisierung besitzt das Enzym nur noch 9,6 % der ursprünglichen Aktivität. Es konnte mit diesen Versuchen aber gezeigt werden, dass das auf den MagPrep[®]-Partikeln immobilisierte Pepsin prinzipiell für den Einsatz bei der Biotransformation von Lactoferrin zu Lactoferricin geeignet ist.

Ausgehend von den guten Ergebnissen der Oberflächenmodifizierung bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel vor der Enzymimmobilisierung mit 1,6-Diaminohexan modifiziert. Da das Pepsin größer als α -Chymotrypsin ist, wird erwartet, dass sich der positive Einfluss des Spacers auf die Restaktivität des immobilisierten Pepsins noch deutlicher als bei der Immobilisierung von α -Chymotrypsin auswirkt. Um die Immobilisierungsergebnisse der Spacermodifizierung mit den Resultaten der Immobilisierung direkt an der Partikeloberfläche vergleichen zu können, wurde die Oberflächenmodifizierung ebenfalls an MagPrep[®]-Partikeln

durchgeführt, deren Oberfläche zuvor mit einem 1:9 Gemisch Glycidylxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan funktionalisiert wurde. Anschließend an die Oberflächenmodifizierung wurden die MagPrep®-Partikel mit Glutardialdehyd als Linker unter Standardbedingungen aktiviert (vgl. Kapitel 5.2, S. 68). Die Immobilisierung an die aktivierten Partikel erfolgte dann analog zu der oben beschriebenen Methode zur direkten Anbindung auf der Oberfläche der MagPrep®-Partikel.

Durch die Einführung des Spacers konnte nicht mehr Pepsin an den Magnetpartikeln immobilisiert werden. Wie in Tabelle 9-1 dargestellt, wurde auch an die oberflächenmodifizierten MagPrep®-Partikel eine Enzymmenge von 6 µg Pepsin/mg Partikel kovalent gebunden.

Tabelle 9-1: Ergebnis des Titrationsassays zur Bestimmung der Aktivität des an den spacermodifizierten MagPrep®-Partikeln immobilisierten Pepsins

Probe	V_0 [µL/min]	$\Delta n/\Delta t$ [µmol/min]	Menge immobilisiertes Enzym [µg]	Spez. Aktivität [µmol/(min·mg)]	Spez. Restaktivität [%]
1	20,03	2,00	250	8	31,83
2	27,61	2,76	300	9	36,56
Pepsin (250 µg)	62,93	6,29	250	25	100

Der 1,6-Diaminohexan Spacer brachte jedoch eine deutliche Verbesserung der Restaktivität des immobilisierten Enzyms. Die Immobilisate besaßen spezifische Aktivitäten von $9 \pm 0,8$ U/mg immobilisiertes Pepsin. Damit liegt die spezifische Restaktivität des spacergebundenen Pepsins erheblich über der des direkt an die Partikeloberfläche gebundenen Enzyms. Durch die Einführung des Spacers bleiben bei der kovalenten Anbindung über 34 % der enzymatischen Aktivität des Pepsins erhalten. Hier konnte also durch die Modifizierung der Partikeloberfläche mit 1,6-Diaminohexan die spezifische Restaktivität im Vergleich zum direkt an die Partikeloberfläche gebundenen Pepsin mehr als verdreifacht werden. Die erwartete Verbesserung des Immobilisierungsergebnisses durch die Spacermodifizierung der MagPrep®-Partikel wurden damit experimentell eindeutig bestätigt.

Insgesamt kann auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse das Fazit gezogen werden, dass der Einsatz von immobilisiertem Pepsin zur Biotransformation von bLF zu Lactoferricin möglich ist, und nach weiterer Optimierung der Immobilisierungsbedingungen, die im Rahmen dieser Arbeiten allerdings nicht mehr durchgeführt wurden, auch effizient genutzt werden kann.

10. Zusammenfassung und Ausblick

Der Einsatz von Enzymen in technischen Verfahren, beispielsweise in der Lebensmittelbranche oder auch zur Produktion von Vorstufen pharmazeutischer Wirkstoffe, hat in den vergangenen Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Da freie Enzyme jedoch nur gelöst eingesetzt werden können und sich ihre Abtrennung meist nur mit aufwendigen Aufarbeitungsschritten realisieren lässt, wird nach Möglichkeiten gesucht, die Biokatalysatoren mehrfach zu verwenden.

Durch die Immobilisierung des Enzyms an feste Trägermaterialien ist eine einfache Rückgewinnung und eine mehrfache Verwendung möglich. Außerdem lassen sich durch die Immobilisierung hohe Katalysatordichten und damit hohe Raum-Zeit-Ausbeuten realisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen zur Eignung para- und superparamagnetischer Silica-Partikel bei der kovalenten Enzymimmobilisierung erarbeitet. Dabei wurden die mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen auf der Partikeloberfläche ausgestatteten SiMAG-Magnetpartikel der Firma Chemicell (Berlin) und der un-funktionalisierten MagPrep[®]-Partikel der Firma Merck (Darmstadt) als Trägermatrix und α -Chymotrypsin als Modellenzym für die Enzymimmobilisierung eingesetzt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Eignung der unterschiedlichen funktionellen Gruppen, die seitens des Herstellers bereits auf die Oberfläche der superparamagnetischen SiMAG-Partikel aufgebracht werden, für die kovalente Enzymimmobilisierung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich prinzipiell alle drei getesteten Ankergruppen für die Anbindung des α -Chymotrypsins an die Magnetpartikel eignen. Anhand eines Vereinfachten Modells wurde die maximale Oberflächenbelegung der SiMAG-Partikel mit α -Chymotrypsin berechnet und mit den experimentell erhaltenen Immobilisierungsergebnissen verglichen. Im nächsten Schritt wurden dann die für die Immobilisierung des α -Chymotrypsins an SiMAG-Partikel optimalen Immobilisierungsparameter, wie eingesetzte Enzymkonzentration, Reaktionsdauer, pH-Wert der Reaktionslösung, Immobilisierungstemperatur und mechanische Durchmischung der Reaktionslösung bestimmt (s. Kap. 4.3). Die Optimierung der Immobilisierungsparameter erfolgte dabei nicht nur im Hinblick auf eine möglichst große Menge gebundenen Enzyms, sondern auch im Hinblick auf eine möglichst große Restaktivität des trägergebundenen α -Chymotrypsins.

Um die enzymatische Aktivität der Immobilisate bestimmen zu können, wurde ein photometrischer Aktivitätsassay etabliert, mit dem eine kontinuierliche Aktivitätsmessung möglich war.

Anschließend wurden die erhaltenen Immobilisate charakterisiert (s. Kap. 4.4). Die kinetischen Parameter des an SiMAG-Partikel gebundenen α -Chymotrypsins wurden dabei ebenso bestimmt, wie die Temperatur- und Langzeitbeständigkeit der SiMAG-Immobilisate. In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass durch die Immobilisierung des α -Chymotrypsins an SiMAG-MeCl und -PGL Partikel eine Erhöhung der Temperaturbeständigkeit des Enzyms von bis zu 10 °C erreicht wird.

Zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse der Enzymimmobilisierung an SiMAG-Partikel erfolgte die Modifizierung der Partikeloberfläche der SiMAG-MeCl Partikel mit unterschiedlich langen Spacern (Kap. 5). Durch den Einbau der Spacer zwischen Enzym und Trägermatrix sollte der Enzymabstand zur Partikeloberfläche vergrößert werden, um die Substratzugänglichkeit des immobilisierten Enzyms zu verbessern und das α -Chymotrypsin von Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche abzuschirmen. Durch die Spacermodifizierung der Partikeloberfläche konnten die Immobilisierungsergebnisse deutlich gesteigert werden. Nach Einbau der Spacer wurde eine dreifach größere Restaktivität des immobilisierten α -Chymotrypsins erhalten. Auch die Effektivität der Enzymimmobilisierung wurde durch die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-Partikel mit Spacern deutlich verbessert. Zusätzlich zur verbesserten Restaktivität stieg auch die auf den spacermodifizierten Magnetpartikeln immobilisierbare Enzymmenge um über 40 %. Weiterhin wurden Untersuchungen zur Langzeitstabilität und zum Temperatur- und pH-Verhalten der spacermodifizierten Immobilisate durchgeführt (Kap. 6.2.1-6.2.3). Im Vergleich mit dem direkt an die Partikeloberfläche gebundenen α -Chymotrypsin konnte bei den oberflächenmodifizierten Immobilisaten eine erhöhte Langzeitstabilität beobachtet werden. Die beobachtete zeitliche Aktivitätsabnahme des spacergebundenen α -Chymotrypsins war wesentlich geringer. Durch die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-Partikel mit Spacern wurde auch eine veränderte Temperatur- und pH-Stabilität der Immobilisate beobachtet. Die Oberflächenmodifizierung der SiMAG-Partikel mit dem α,ω -Bis-amino PEG Spacer führte zu einer deutlichen Verbesserung der Temperaturstabilität des immobilisierten Enzyms. Die entsprechenden Immobilisate besaßen bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C eine mehr als viermal höhere Aktivität als das direkt an die Partikeloberfläche gebundene α -Chymotrypsin.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden MagPrep[®]-Partikel verwendet, die vom Hersteller unfunktionalisiert geliefert wurden. Bevor die MagPrep[®]-Partikel zur Enzymimmobilisierung eingesetzt werden konnten, mussten sie mit funktionellen Ankergruppen für die Anbindung des Enzyms ausgestattet werden. Die Aktivierung der Partikel erfolgte durch Silanisierung

mit Glycidyoxypropyltrimethoxysilan und N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan, wodurch neben Oxiran- auch Aminogruppen auf der Partikeloberfläche aufgebracht wurden. Die Oberflächendichte der Oxirangruppen wurde dabei durch Verdünnung der eingesetzten Silanisierungskomponente mit N-Propyltriethoxysilan variiert (Kap. 7.4). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Belegungsdichte der Partikeloberfläche mit Oxirangruppen erheblichen Einfluss auf das Immobilisierungsergebnis hat. Bei maximaler Belegung der Partikeloberfläche mit Oxirangruppen und Enzym stehen jedem α -Chymotrypsinmolekül ca. 100 Oxirangruppen als Bindungsanker auf der Partikeloberfläche zur Verfügung. Durch die Verdünnung der Silanisierungskomponente konnte eine Ausdünnung der Oxirangruppen auf der Oberfläche der MagPrep[®]-Partikel erreicht werden. Erfolgte die Enzymanbindung an die Magnetpartikel aufgrund der reduzierten Oberflächendichte der Bindungsanker über weniger kovalente Bindungen, war eine geringere Inaktivierung des Enzyms zu beobachten. Die Effektivität der Immobilisierung stieg mit zunehmender Verdünnung der Silanisierungskomponente deutlich an. Durch die Verwendung eines 1:9 Gemisches Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan bei der Oberflächenfunktionalisierung der MagPrep[®]-Partikel konnte letztlich die Immobilisierungseffektivität im Vergleich zur Immobilisierung an MagPrep[®]-Partikeln mit maximaler Oberflächenbelegung mit Oxirangruppen, mehr als verdreifacht werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die MagPrep[®]-Partikel anschließend mit stöchiometrischen Mengen N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan funktionalisiert, so dass jedem α -Chymotrypsinmolekül nur ein Bindungsanker auf der funktionalisierten Partikeloberfläche zur Verfügung stand. Aufgrund der Struktur des N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilans saß die an der kovalenten Bindung beteiligte funktionelle Aminogruppe jedoch nicht direkt an der Partikeloberfläche, so dass sich der effektive Radius der Magnetpartikel vergrößert. Dies ist ein möglicher Grund dafür, warum mehr als doppelt so viel α -Chymotrypsin an die aminofunktionalisierten, als an die oxiranfunktionalisierten MagPrep[®]-Partikel gebunden wurde. Die spezifische Restaktivität des an die aminosilanierten Partikel immobilisierten α -Chymotrypsins betrug 22 %.

Insgesamt besitzt die direkte Immobilisierung von α -Chymotrypsin an oberflächenfunktionalisierte MagPrep[®]-Partikel im Vergleich mit den Ergebnissen der Enzymimmobilisierung an unmodifizierte SiMAG-Partikel eine bis zu 12fach höhere Immobilisierungseffizienz. Die MagPrep[®]-Partikel mussten zwar zuerst funktionalisiert werden, bevor sie zur kovalenten Enzymimmobilisierung eingesetzt werden konnten, besaßen dadurch aber mehr Flexibilität bei der Anpassung der Partikeloberfläche an die Immobilisierungsreaktion. Daraus resul-

tierten deutlich bessere Ergebnisse bei der Immobilisierung des α -Chymotrypsins, wie anhand der Immobilisierungseffektivität gezeigt wurde.

Ein Teil des Aktivitätsverlustes der bei den Enzymimmobilisierungen beobachtet wurde, kann auf die Enzymdeformation bei der kovalenten Immobilisierung und auf eine verminderte Substratzugänglichkeit des aktiven Zentrums zurückgeführt werden. Durch den Einbau von Spacermolekülen zwischen Enzym und Trägermatrix sollte auch bei den MagPrep[®]-Partikeln der Enzymabstand zur Partikeloberfläche vergrößert und die Substratzugänglichkeit verbessert werden. Auch die konformative Belastung des trägergebundenen Enzyms sollte durch die flexiblen Spacer reduziert werden.

Basierend auf den Ergebnissen der Oberflächenmodifizierung an SiMAG-Partikeln kamen bei der Spacermodifizierung der MagPrep[®]-Partikel allerdings nur noch 1,6-Diaminohexan und α,ω -Bis-amino Polyglutaraldehyd als Spacer zum Einsatz.

Im Gegensatz zu den Resultaten bei den SiMAG-Partikeln konnte durch die Spacermodifizierung der MagPrep[®]-Partikel jedoch keine signifikante Verbesserung des Immobilisierungsergebnisses erreicht werden. Möglicherweise führt die Veränderung der an der kovalenten Bindung beteiligten Ankergruppe dazu, dass die Immobilisierung des Enzyms über andere Aminosäurereste erfolgt und dabei zu einer Destabilisierung des immobilisierten Enzyms führt.

Welchen Einfluss der durch die Spacermodifizierung der MagPrep[®]-Partikel hervorgerufene Wechsels der Ankergruppen auf der Partikeloberfläche auf die Restaktivität des immobilisierten Enzyms hat, wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr näher untersucht. Dies ist möglicherweise eine Fragestellung, die in weiterführenden Untersuchungen zu klären wäre. Hierzu könnten Aldehydgruppen direkt auf der Partikeloberfläche aufgebracht oder Spacer mit endständigen Oxirangruppen an die Partikeloberfläche gebunden werden.

Abschließend wurden die bei der α -Chymotrypsinimmobilisierung gewonnenen Erkenntnisse auf ein weiteres, industriell relevantes Enzym übertragen (Kap. 9). Dazu wurde die kovalente Immobilisierung von Pepsin an MagPrep[®]-Partikel untersucht. Die kovalente Immobilisierung von Pepsin ist im Hinblick auf eine mögliche Verwendung der Immobilisate bei der Biotransformation des Molkebestandteils Lactoferrin zu Lactoferricin von besonderem Interesse, da durch die Biotransformation des Lactoferrins eine weitere Steigerung der Wertschöpfung erreicht werden kann.

Zur Bestimmung der Restaktivität des immobilisierten Pepsins wurde ein auf der enzymatischen Umsetzung von Lactoferrin zu Lactoferricin basierender, kontinuierlicher

Aktivitätsassay entwickelt und etabliert. Die Versuche zur Immobilisierung von Pepsin wurden an mit einem 1:9 Gemisch Glycidylxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan oberflächenfunktionalisierten MagPrep[®]-Partikeln durchgeführt. Die Pepsin-Bindungskapazität der MagPrep[®]-Partikel betrug 6 µg Pepsin/mg Magnetpartikel. Die spezifische Restaktivität des trägerfixierten Pepsins lag bei knapp 10 %, ohne dass im Vorfeld eine Optimierung der Enzymimmobilisierung erfolgte. Die prinzipielle Eignung der MagPrep[®]-Partikel als Trägermatrix bei der kovalenten Pepsinimmobilisierung konnte somit erfolgreich gezeigt werden.

Aus der Spacermodifizierung der MagPrep[®]-Partikel mit 1,6-Diaminohexan resultierte auch bei der kovalenten Immobilisierung von Pepsin eine deutliche Verbesserung des Immobilisierungsergebnisses. Durch diese Oberflächenmodifizierung der Partikel konnte die spezifische Restaktivität des immobilisierten Pepsins verdreifacht werden (Kap. 9), so dass nach der Oberflächenmodifizierung eine wesentlich effektivere Biotransformation des Lactoferricins möglich war.

Analog zur Optimierung der Immobilisierungsparameter bei der α -Chymotrypsinimmobilisierung ist die Optimierung der Immobilisierungsbedingungen bei der Pepsinimmobilisierung eine Aufgabe weiterer Arbeiten. Zusätzlich ist der Aufbau eines Enzymreaktors mit MagPrep[®]-Partikeln zur Biotransformation von Lactoferricin eine weiterführende Aufgabenstellung. Hierbei wäre ein Vergleich der Produktivität (bLF-Ausbeute) des Verfahrens mit der Produktivität des etablierten Crossflow-Prozesses von besonderem Interesse.

Neben der Biotransformation von bLF durch immobilisiertes Pepsin sind eine Vielzahl enzymkatalysierter Prozesse vor allem aus dem Pharma- oder Lebensmittelbereich denkbar, in denen an Magnetpartikel kovalent immobilisierte Enzyme Verwendung finden.

Um mögliche Einsatzbereiche der Magnetpartikel in biotechnologischen Verfahren zu identifizieren und die Vorteile der magnetischen Separation in biotechnologischen Prozessen nutzbar zu machen, könnten Immobilisierungsversuche mit weiteren Enzymen durchgeführt werden. Zur Kostenersparnis bei diesen Untersuchungen wäre es denkbar, die Magnetpartikel selbst herzustellen. Ein entsprechendes Verfahren müsste im Vorfeld entwickelt werden, wobei für die Verwendung der Magnetpartikel in Enzymreaktoren die Größenverteilung der Partikel nicht so eng wie bei den SiMAG- bzw. MagPrep[®]-Partikeln sein müsste.

Denkbar ist auch eine Oberflächenmodifizierung der Magnetpartikel mit funktionellen Polymeren.

Da die Umgebung des immobilisierten Enzyms mit steigendem Massenanteil des Spacers in Bezug auf den Träger und das Enzym zunehmend von diesem beeinflusst wird [Kranz,

2006], können die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Enzyms über die Modifizierung der Partikeloberfläche gezielt manipuliert werden. Durch die Polymere wäre so möglicherweise eine noch bessere Anpassung der Partikeloberfläche an das zu immobilisierende Enzymsystem realisierbar.

Die radikalische Atom-Transfer-Polymerisation (ATPR; atom transfer radical polymerization) stellt dabei eine Möglichkeit dar, die Partikeloberfläche gezielt mit Polymeren bzw. Co-Polymeren definierter Kettenlänge und Zusammensetzung zu modifizieren, da die Polymerketten bei der ATPR nicht auf die Partikeloberfläche aufgepfropft werden, sondern von der Oberfläche weg wachsen. Bei dieser Art der Oberflächenmodifizierung besteht so beispielsweise die Möglichkeit, in definiertem Abstand von der Partikeloberfläche funktionelle Bindungsanker für die kovalente Enzymimmobilisierung zur Verfügung zu stellen, wodurch sich möglicherweise die Enzymbeladung der Magnetpartikel deutlich verbessern ließe, ohne dass dabei größere Aktivitätsverluste des immobilisierten Enzyms einhergehen.

11. Anhang

11.1 Standard-Vorschriften

11.1.1 Standard-Immobilisierungsvorschrift (α -Chymotrypsin)

200 μ L Partikelsuspension (\cong 10 mg Partikel) werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und dreimal mit je 1 mL 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Partikel in 2 mL Enzymlösung (0,5 bzw. 1,5 mg/mL) resuspendiert und das Enzym für 3 h im Thermomixer bei 20 °C und 850 rpm immobilisiert. Nach Reaktionsende werden die Magnetpartikel abgetrennt und dreimal mit je 1 mL 1x PBS gewaschen. Anschließend werden die Magnetpartikel mit 1 mL 1x PBS versetzt und im Kühlschrank bis zur weiteren Verwertung gelagert. Die Enzymkonzentration im Überstand und den vereinigten Waschwässern wird bestimmt und daraus die immobilisierte Enzymmenge berechnet.

11.1.2 Bradford-Proteinassay

Reagenzien:

Auf 100 mL:

0.01%(w/v) \equiv 10 mg Coomassie-Blue G-250

4,7 % (w/v) \equiv 5 mL 95% EtOH

8,5 % (w/v) \equiv 10 mL 85% H₃PO₄

+ bidest. H₂O

10 mg Coomassie-Blue G 250 werden in einem 100 mL Messkolben vorgelegt. 5 mL Ethanol und 10 mL Phosphorsäure werden zugegeben und der Farbstoff unter Rühren gelöst. Anschließend wird mit Wasser (bidest) auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung wird filtriert und es wird eine grün-braune, klare, aber sehr dunkle Lösung erhalten.

Versuchsdurchführung:

Aus der Reaktionslösung wird eine bestimmte Probemenge (10 – 100 μ L) entnommen, mit 1 mL Bradford-Reagenz versetzt und gut durchmischt. Nach ca. 7 Minuten ist die Absorption bei $\lambda_{\max}=595$ nm zeitlich konstant; so dass nach dieser Inkubationszeit die Absorptionswerte zur Bestimmung der Enzymkonzentration gemessen werden können. Die im Bradford-Test eingesetzte Probenmenge hängt von der Enzymkonzentration ab, wobei die Menge so zu wählen ist, dass die Kalibrationsgerade über den relevanten Konzentrationsbereich möglichst linear verläuft.

11.1.3 BTEE-Aktivitätsassay

Reagenzien:

- 0,001 M BTEE in 50% v/v MeOH lösen [$M(BTEE)=313,36 \text{ g/mol}$]

Um das BTEE-Reagenz herzustellen werden 62,67 mg BTEE in 200 mL MeOH (50% v/v) gelöst. Die einzusetzende Reaktionslösung wird dann aus gleichen Teilen des BTEE-Reagenz und 1x PBS-Puffer hergestellt.

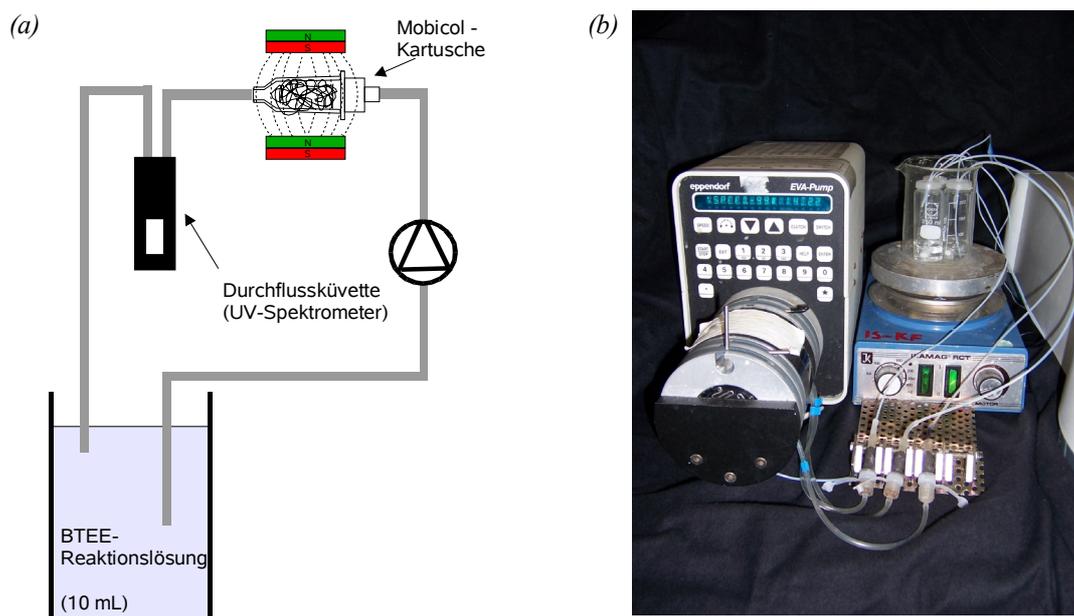


Abbildung 11.1-1: (a) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus beim BTEE-Aktivitätsassay

(b) Versuchsanordnung zur Bestimmung der Restaktivität des immobilisierten Enzyms (BTEE-Assay)

Versuchsdurchführung:

10 mL der Reaktionslösung werden im Versuchskreislauf vorgelegt und auf 25 °C temperiert. Um sicher zu stellen, dass sich kein gelöstes Enzym aus vorangegangenen Versuchen mehr im Kreislauf befindet und sich die Reaktionslösung auch nicht zersetzt, wird zu Versuchsbeginn die Absorption der Lösung bei $\lambda=256 \text{ nm}$ einige Minuten lang gemessen. Bleibt während dieser Zeit ($2 < t < 5 \text{ min}$) die Absorption der Reaktionslösung konstant, ist kein Enzym im System vorhanden und die Mobicol-Kartusche mit den immobilisierten beads wird in den Kreislauf eingebaut.

Zum Testen der Aktivität des nativen Enzyms, wird eine entsprechende Menge Enzymlösung in das Reaktionsgefäß eingespritzt. Anschließend wird die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda=256 \text{ nm}$ für mindestens 30 Minuten gemessen. Aus der Anfangssteigung der so erhaltenen Umsatz-Zeit-Kurve kann dann mit dem molaren Extinktionskoeffizienten und einer Schichtdicke der Küvette von $d=1 \text{ cm}$ die Enzymaktivität be-

rechnet werden:

$$\text{Aktivität } [U] = \frac{\Delta \text{Absorption} \cdot V_R \cdot 10^6}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d}; \text{ mit } V_R = \text{Reaktionsvolumen}, \quad (11.1-1)$$

11.1.4 Standardversuchsvorschrift zur silanisierenden Oberflächenmodifizierung der MagPrep®-Partikel

Bei den Versuchen zur Oberflächenmodifizierung der MagPrep®-Partikel wurden neben dem reinen Glycidyoxypropyltrimethoxysilan auch unterschiedliche Gemische (1:1; 1:5, 1:9) aus Glycidyoxypropyltrimethoxysilan/n-Propyltriethoxysilan als Silanisierungskomponente verwendet. Die Silanisierung erfolgte standardmäßig mit 0,6 mmol Silanisierungskomponente pro Gramm MagPrep®-Partikel.

Reagenzien:

- NaOAc (M=82,03 g/mol)
- Glycidyoxypropyltrimethoxysilan 98% (M_R=236,34 g/mol; d₂₅=1,07 g/mL; F_p=135 °C)
- Isopropanol
- n-Propyltriethoxysilan (M_R=206,36 g/mol; d₂₀=0,8916 g/mL)

Versuchsdurchführung:

40 mL Partikelsuspension (\cong 2 g) werden in einem 100 mL Dreihalskolben (KPG-Rührer, Rückflußkühler, Gummistopfen) vorgelegt und mit 4 mmol (\cong 328 mg) NaOAc versetzt, das unter Rühren gelöst wird.

1,2 mmol der Silanisierungskomponente werden in 2 mL Isopropanol gelöst, auf eine Spritze aufgezogen und innerhalb von 10 min langsam zu den Partikeln gegeben. Dann wird die Lösung für 2 h bei 80 °C gerührt. Nach Abkühlen der Reaktionslösung werden die silanierten Partikel viermal mit je 40 mL H₂O, zweimal mit je 40 mL Isopropanol und erneut einmal mit 40 mL H₂O gewaschen, bevor sie zur Lagerung in 40 mL H₂O resuspendiert werden (c=50 mg beads/mL Suspension).

11.1.5 Titrations-Assay zur quantitativen Bestimmung von Epoxidgruppen

Reagenzien:

- 0,1 M (0,01 M) HCl
- 0,1 M NaOH
- 1,3 M Na₂S₂O₃ (M_R=156,11 g/mol) (10,277g/50 mL)

Versuchsdurchführung:

In einem thermostatisierten 50 mL Reaktionsgefäß (20 °C) werden 20 mL H₂O und 15 mL

Na₂O₃ (1,3 M) vorgelegt und ein pH-Wert von 7 eingestellt. Anschließend werden die vom Überstand abgetrennten Partikel zugegeben. Ein Titrationsautomat hält dann den pH-Wert der Lösung automatisch durch Zugabe von verdünnter HCl konstant auf pH 7. Der Endpunkt der Titration ist erreicht, wenn der pH-Wert der Lösung 10 min bei pH 7 stabil bleibt. Für die Berechnung der Menge Epoxidgruppen wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Stoffmenge Epoxidgruppen} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mg}} \right] = \frac{\text{HCl-Verbrauch [mL]} * \text{konz. HCl} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right]}{\text{mg eingesetzte beads}}$$

11.1.6 Standardversuchsdurchführung für die Aktivierung der Aminogruppen mit Glutardialdehyd

Reagenzien:

- Glutardialdehyd 50% (w/v); (M_R=100,12 g/mol; d=1,106 kg/L)
- 1x PBS (pH=7,4)

Versuchsdurchführung:

Um die Glutardialdehyd-Reaktionslösung herzustellen, werden die in Tabelle 11.1-1 aufgeführten Mengen der einzelnen Reaktanden zusammen gegeben und auf das Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wird der pH-Wert auf pH= 8,5 eingestellt.

Tabelle 11.1-1: Zusammensetzung der Glutardialdehyd-Reaktionslösung

Gesamtvolumen [mL]	Glutardialdehyd 50% (w/v) [mL]	H ₂ O [mL]	Borax [mg]
10	1	9	762,74

Über eine Glutardialdehyd-Lösung (5,53% (w/v)) in 0.2 M Natriumborat pH 8.5 wird der bifunktionelle Linker Glutardialdehyd eingeführt.

10 mg Magnetpartikel werden in 2 mL Glutardialdehydreaktionslösung resuspendiert. Nach einstündigem Rühren bei 25°C, 850 rpm wird der Überschuss an Glutardialdehyd durch dreimaliges Waschen mit 1 mL H₂O und anschließend mit 1 mL 1x PBS pH 7.5 entfernt. Abschließend werden die Partikel in 1 mL PBS bei 7 °C im Kühlschrank gelagert.

11.1.7 Pepsin-Aktivitätsassay mittels bLF-Verdau

Reagenzien:

Lactoferrin (25 mg/mL, pH2)

HCl (0,1 M)

30 mL Lactoferrinlösung (c₀=25 mg/mL) werden im Reaktor vorgelegt, auf 37 °C tempe-

riert und mit 0,1 M HCl auf pH=2 eingestellt. Anschließend werden 50 mg der zu untersuchenden Partikelprobe zugegeben und für 4 h zur Reaktion gebracht, wobei der pH-Wert der Reaktionslösung durch Zugabe von 0,1 M HCl über den gesamten Reaktionszeitraum konstant auf pH=2 gehalten wird. Durch Messung des HCl-Verbrauchs wird der Reaktionsverlauf beobachtet. Aus der Anfangssteigung der erhaltenen Kurve (HCl-Verbrauch/Zeit) kann dann die Aktivität des immobilisierten Pepsins bestimmt werden.

11.2 Fehlerrechnung für $K_{M,app}$, $v_{max, app}$ und $k_{cat, app}$

Bei der Bestimmung der Steigungen und Achsenabschnitte im Hanes-Diagramm wurden die Fehler durch lineare Regression ermittelt. Für die Berechnung der Fehler der kinetischen Parameter $K_{M,app}$, $v_{max, app}$ und $k_{cat, app}$ muss das Fehlerfortpflanzungsgesetz angewendet werden, da diese Größen aus den fehlerbehafteten Steigungen und den Achsenabschnitten berechnet werden. Es gilt:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n) \quad (11.2-1)$$

$$\Delta y = \left| \frac{df(x_1, x_2, \dots, x_n)}{dx_1} \right| \cdot \Delta x_1 + \left| \frac{df(x_1, x_2, \dots, x_n)}{dx_2} \right| \cdot \Delta x_2 + \dots + \left| \frac{df(x_1, x_2, \dots, x_n)}{dx_n} \right| \cdot \Delta x_n \quad (11.2-2)$$

Aus Gleichung 11.2-1 bzw. 11.2-2 ergeben sich die Fehler von $K_{M,app}$, $v_{max, app}$ und $k_{cat, app}$ somit zu:

$$\Delta K_{M, app} = \left(\frac{K_{M, app}}{v_{max, app}} \right) \cdot \Delta v_{max, app} + v_{max, app} \cdot \Delta \left(\frac{K_{M, app}}{v_{max, app}} \right) \quad (11.2-3),$$

$$\Delta v_{max, app} = \left| - \frac{1}{\left(\frac{1}{v_{max, app}} \right)^2} \right| \cdot \Delta \left(\frac{1}{v_{max, app}} \right) \quad (11.2-4)$$

und

$$\Delta k_{cat, app} = \frac{1}{[E]_0} \cdot \Delta v_{max, app} + v_{max, app} \cdot \left| - \frac{1}{[E]_0^2} \right| \cdot \Delta [E]_0 \quad (11.2-5)$$

11.3 Abkürzungsverzeichnis

Æ	enzymatische Resaktivität	Ils	Isoleucin	app	scheinbar (englisch: <i>apparent</i>)
AMR-Sensor	Anisotrop-magneto-resistive Sensoren	KPP	Kaliumhydrogenphosphat	a ⁻¹	pro Jahr
Arg	Arginin	Kap.	Kapitel	bLF	Lactoferrin (bovine)
Asn	Asparagin	λ	Wellenlänge	bzw.	beziehungsweise
ΔAbs	Absorptionsdifferenz	L	Liter	c	Konzentration
BARC	Bead Array Counter	Leu	Leucin	d	Schichtdicke
BSA	Rinderserumalbumin	MRT	Magnetresonanztomographie	e. coli	Escherichia coli
BTEE	N-Benzoyl-L-Tyrosin-ethylester	M	Mol/Liter	ε	Molarer Extinktionskoeffizient
CTAP	Arteriportale Computer-tomographie	MSFB	magnetically stabilized fluidised bed	ε _i	Immobilisierungseffektivität
DFP	Diisopropylfluorophosphat	PBS	Phosphate buffered saline	et al.	und andere
d _{ii}	Dichte bei einer Temperatur von ii °C	PCR	Polymerasekettenreaktion	ggf.	gegebenenfalls
Da	Dalton	Phe	Phenylalanin	h	Stunde
E	Enzym	PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid	k	Reaktionsgeschwindigkeitskonstante
DNA	Desoxyribonucleic Acid	[P]	Produktkonzentration	kat	Katal
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	REM	Rasterelktronenmikroskopie	k _{cat}	Wechselzahl
Em	Emission	S	Substrat	λ	Wellenlänge
Ex	Exzitation	S.	Seite	μ	Mikro (≅ · 10 ⁻⁶)
[E] ₀	Anfangsenzymkonzentration	SDO	Superoxid-Dismutase	mM	Millimol/Liter
Gly	Gicin	Ser	Serin	min	Minute
GMR	Giant Magneto Resistance	SPDP	Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat	mL	Milliliter
HCl	Salzsäure	[S]	Substratkonzentration	nm	Nanometer
HCV	Hepatitis C Virus	[S] ₀	Anfangssubstratkonzentration	rel. E	relative Einheiten
HGMF	High Gradient Magnetic Fishing	T	Temperatur	rpm	rounds per minute
HGMS	Hochgradienten-Magnetseparator	TMR	Tunnel-Magnetwiderstand (<i>Tunnel Magneto Resistance</i>)	t	Zeit
His	Histidin	Try	Tryptophan	v	Reaktionsgeschwindigkeit
I	Lichtintensität	Tyr	Tyrosin	v _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
ISPR	In-situ	U	Unit	vergl.	vergleiche
K _M	Michaelis-Menten-Konstante	USPIO	Ultrakleine	v/v	Volumenanteil
				w/v	Gewicht pro Volumen

11.4 Geräteverzeichnis

Gerät	Hersteller
Durchflussküvetten	Typ 176.000 QS, Hellma
Einwegküvetten	REF 67.742, Sarstedt
UV/VIS-Spektrometer	Cay 50, Varian
	Uvicon 940, Kontron Instruments
	Novaspec II, Pharmacia
Fluoreszenz-Photometer	Texys-Fluoreszenzsensor
Magnetrührer	Ikamag® Reo, Ika Laborgeräte
	IKA-Combining RCT
Peristaltikpumpe	EVA-Pump, Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer Comfort, Eppendorf
Thermostat	C 5B, Julabo
pH-Meter	MP 220, Mettler Toledo
pH-Elektrode	Inlab® 410, Mettler Toledo
Waage	TE 214 S, Sartorius
Pipetten	10 µL, 100 µL, 1000 µL, Eppendorf
Magneten	NeoDeltaMagnet NE2010, IBS Magnet
Kartusche	MoBiTec, Mobicol
Titrationautomat	DL 50 Graphix, Mettler Toledo

Tabelle 11.4-1: Eigenschaften der verwendeten NeFeB-Magnete NE 2010

Magnetischer Wert für Standardmagnete	Energieprodukt (BxH) max. Br		Remanenz Br		Koerzitivfeldstärke (T=20 °C)				Relative remanente Permeabilität	Temperaturbeiwert der Remanenz pro °C	Max. Einsatztemperatur	Dichte	Curie-Temperatur
					B_H		J_H						
Kennzahl 225/135	kJ/m ³	MGOe	MT	G	kA/m	Oe	kA/m	Oe	mT/(kA/m)	°C	g/cm ³	°C	
NeoDeltaMagnet (NdFeB)	223-239	28-30	1080-1120	10800-11200	780-836	9800-10500	>1300	>1600	1,07	-0,10%	100°-120°C	7,4	310°

11.5 Chemiekalienverzeichnis

α,ω -Bis-amino PEG	Rapp Polymere
α -Chymotrypsin	Sigma
1,2 Propylenoxid	VWR
1,6 Diaminohexan	Merck
N-(6-Aminohexyl)Aminopropyltrimethoxysilan	ABCR
N-Benzoyl-L-Tyrosinethylester (BTEE)	Sigma
Coommassie Brilliant Blue G250	Serva
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumtetraborat-Decahydrat	Merck
Ethanol	Sigma
Ethylenamine E-100	Huntsman
Edelstahlwolle (Panther)	Ernst Haiss GmbH
Glutardialdehyd	Sigma
Glycidyloxypropyltrimethoxysilan	Sigma
Isopropanol	Sigma
Jeffamine [®] - HK 511	Huntsman
Kaliumchlorid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Lactoferrin	Institut für Technische Chemie
Methanol (Rotipur [®])	Karl-Roth GmbH
Natriumacetat	Fluka
Natriumchlorid	Fluka
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Sigma
ortho-Phosphorsäure	Fluka
Pepsin	Sigma
n-Propyltriethoxysilan	ABCR

12. Literaturverzeichnis

- Allkemper T.; Bremer C.; Matuszewski L.; Ebert W.; Reimer P., (2002), *Contrast-enhanced blood-pool MR angiography with optimized iron oxides: effect of size and dose on vascular contrast enhancement in rabbits*, *Radiology*, 223, 432-438
- Barrett A. J.; Rawlings N. D.; Woessner J. F., (1998), *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press
- Ba-Ssalamah A.; Heinz-Peer G.; Schima W.; Schibany N.; Schick S.; Prokesch R.W.; Kaider A.; Teleky B.; Wrba F.; Lechner G., (2000), *Detection of focal hepatic lesions: comparison of unenhanced and SHU 555 A-enhanced MR imaging versus biphasic helical CTAP*, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 11, 665-672
- Bergmann L.; Schaefer C., (2006), *Lehrbuch der Experimentalphysik 5. Gase, Nanosysteme, Flüssigkeiten*, Walther de Gryter GmbH & Co KG, Berlin
- [BIO, 2004] - Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg, (2004), *Was ist Biotechnologie?*, <http://wbtd57.biozentrum.uni-wuerzburg.de/old-page/homepage/Allgemein/wasist.htm>
- Bisswanger H., (1994), *Enzymkinetik; Theorie und Methoden*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Bowers D.; Carr P.W., (1980), *Immobilized. Enzymes in Analytical Chemistry*, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 15, 89-129
- Bozhinova D.; Galunsky B.; Yueping G.; Franzreb M.; Köster R.; Kasche V., (2004), *Evaluation of magnetic polymer micro-beads as carriers of immobilized biocatalysts for selective and stereoselective transformations*, *Biotechnology Letters*, 26, 343-350
- Bruce I.J.; Taylor J.; Todd M.; Davies M. J.; Borionib E.; Sangregorioa C.; Sen T., (2004), *Synthesis, characterisation and application of silica-magnetite nanocomposites*, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 284, 145-160
- Brückl H.; Panhorst M.; Schotter J.; Kamp P. B.; Becker A., (2005), *Magnetic particles as markers and carriers of biomolecules*, *IEE Proceedings - Nanobiotechnology*, 152 (1), 41 -46
- Brückl H.; Schotter J.; Heer R.; Eggeling M.; Panhorst M.; Brzeska M.; Kamp P. B.; Becker A., (2006), *Abstract zum Vortrag "Biomolecular diagnostics by a magnetic lab-on-a-chip" auf der Nanotech 2006*, <http://www.nsti.org/Nanotech2006/showabstract.html?absno=455>
- Buchholz K.; Kasche V., (1997), *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Buchholz K.; Kasche V.; Bornscheuer U. T., (2005), *Biocatalysts and Enzyme Technology*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Calzyme Laboratories, Inc., (2006), http://www.calzyme.com/commerce/catalog/spcategory.jsp?category_id=1042
- Chemicell GmbH, (2006), *Magnetofection™ the new gene transfection technology*, <http://www.chemicell.com/products/magnetofection/magnetofection.pdf>

- Chmiel H. (Hrsg.), (2006), *Bioprozesstechnik*, Spektrum Akademischer Verlag, München
- [DECHEMA, 2004] - Positionspapier der DECHEMA e.V., (2004), "*Weißer Biotechnologie: Chancen für Deutschland*"
- Deponte S.; Steingroewer J.; Löser C.; Boschke E.; Bley T., (2004), *Biomagnetic separation of Escherichia coli by use of anion-exchange beads: measurement and modeling of the kinetics of cell-bead interactions*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379, 419-426
- Desoil M.; Gillis P.; Gossuin Y.; Pankhurst Q. A.; Hautot D., (2005), *Definitive identification of magnetite nanoparticles in the abdomen of the honeybee Apis mellifera*, Journal of Physics: Conference Series, 17, 45-49
- Schwarz, J., (2006) *Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen*, Dissertation, Universität Hannover
- Doretti L.; Ferrera D., (1996), *Covalently immobilized enzymes on biocompatible polymers for amperometric sensor applications*, Biosensors & Bioelectronics, 11 (4), 365-373
- Drevon G.F., (2002) *Enzyme Immobilization into Polymers and Coatings*, Dissertation, University of Pittsburgh
- Elaissari A. (Editor), (2004), *Colloidal Biomolecules, Biomaterials, and Biomedical Applications*, Marcel Dekker Inc., New York
- Ernst & Young, (2006), *Biotechnologie-Report "Beyond Borders 2006"*
- Fischer K.; Jurczok A.; Heße C.; Fomara P., (2005), *Evaluation automatisierter PSA-Immunoassays*, Management & Krankenhaus, 54
- Forschungszentrum Jülich, (2004), *Bereiche der Biotechnologie*, <http://www.fz-juelich.de/ptj/projekte/index.php?index=1291>
- Franzreb M., (2003), *Magnetseparation im Dienst der Biotechnologie*, FZK Nachrichten, 3, 117-122
- Fuentes M.; Mateo C.; Rodriguez A.; Casqueiro M.; Tercero J.; Riese H.; Fernández-Lafuente R.; Guis J. M., (2006), *Detecting minimal traces of DNA using DNA covalently attached to superparamagnetic nanoparticles and direct PCR-ELISA*, Biosensors and Bioelectronics, 21, 1574-1580
- Gerthsen C.; Hrsg.: Meschede D., (2004), *Gerthsen Physik*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Gijs M. A. M., (2004), *Magnetic bead handling on chip: new opportunities for analytical applications*, Microfluid Nanofluid, 1, 22-40
- Gravina P. P.; Santos J. S.; Figueiredo L. C.; Skeff Neto K.; Da Silva M. F.; Buske N.; Gansau C.; Morais P. C., (2002), *Biocompatible magnetic fluids: a comparative birefringence investigation*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252, 393-395
- Gray C. R., (1976), *Enzym-katalysierte Reaktionen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Häfel U.; Schütt W.; Teller J.; Zborowski M. (Eds.), (1997), *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York

- Häfeli U.; Pauer G.; Failing S. et al., (2001), *Radiolabeling of magnetic particles with rhenium-188 for cancer therapy*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 225, 73-78
- Hartmeier W., (1986), *Immobilisierte Biokatalysatoren; Eine Einführung*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg NewYork Tokyo
- Hatch G. P.; Stelter R. E., (2001), *Magnetic design considerations for devices and particles used for biological high-gradient magnetic separation (HGMS) systems*, Journal of magnetism and magnetic materials, 225, 262-276
- Heebøll-Nielsen A.; Justesen S.; Thomas O. R. T., (2001), *Product recovery for crude bioprocess liquors by high gradient magnetic fishing*, Poster: 10th European Congress on Biotechnology
- Heebøll-Nielsen A.; Dalkiær M.; Hubbuch J.; Thomas O., (2004), *Superparamagnetic Adsorbents for High-Gradient Magnetic Fishing of Lectins Out of Legume Extracts*, Biotechnology and Bioengineering, 87 (3), 311-323
- Hoheisel W., (2004), *Nanoteilchen in Diagnostik und Therapie*, Dechema Vortrag auf der Gründungsveranstaltung der Fachsektion Nanotechnologie
- Hubbuch J.; Matthiesen D. B.; Hobbey T. J.; Thomas O., (2001), *High gradient magnetic separation versus expanded bed adsorption: a first principle comparison*, Bioseparation, 10, 99-112
- IBA GmbH, (2005), *"MATra" - eine Revolution in der Zelltransfektion*, BIOSpektrum, 1, 119
- Jain T. K.; Morales M. A.; Sahoo S. K.; Leslie-Pelecky D. L.; Labhasetwar V., (2005), *Iron Oxide Nanoparticles for Sustained Delivery of Anticancer Agents*, Molecular Pharmaceutics, 2 (3), 194-205
- Johannsen M.; Thiesen B.; Jordan A.; Taymoorian K.; Gneveckow U.; Waldöfner N.; Scholz R.; Koch M.; Lein M.; Jung K.; Loening S. A., (2005), *Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH) Reduces Prostate Cancer Growth in the Orthotopic Dunning R3327 Rat Model*, The Prostate, 64, 283-292
- Jordan A., (2001), *Nanotechnologie - ein neues Konzept für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren*, Onkologe, 7, 1073-1081
- Justesen S. F. L.; Heebøll-Nielsen A.; Thomas O. R. T., (2001), *High gradient magnetic fishing for the isolation of high-value proteins from sweet whey*, Poster: Danish Biotechnology Conference VII
- Kaminski M. D., Nuñez L.; Ghebremeskel A. N.; Kasza K. E.; Fischer P. F.; Chang F.-C.; Chien T.-H.; Eastman J. A.; Hull J. R.; Rosengart A. J.; Macdonald L.; Xie Y.; Johns L.; Pytel P.; Häfeli U., (2003), *Magnetically responsive microparticles for targeted drug and radionuclide delivery*, ARGONNE NATIONAL LABORATORY ANL-03/28
- Katz E.; Willner I., (2004), *Integrierte Hybridsysteme aus Nanopartikeln und Biomolekülen: Synthese, Eigenschaften und Anwendungen*, Angewandte Chemie, 116, 6166-6235
- Köhling R., (2004), *Kleinstwinkelstreuung - über die Größe und Form von Biomolekülen*, http://www.bunsen.de/jdc/woche12/7_kleinwinkelstr.pdf

- Koneracká M.; Kopčanský P.; Timkova M.; Ramchand C.N., (2002), *Direct binding procedure of proteins and enzymes to fine magnetic particles*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 252, 409-411
- Kosaris G. (Hrsg.), (2001), *Alternative Therapie mit Mistel oder Enzymen*, Ärzte Zeitung online
- Koudelka-Hep M.; de Rooji N. F.; Strike D. J., (1997), *Immobilization of Enzymes on Microelectrodes Using Chemical Crosslinking*, in: Methods in Biotechnology, Vol 1, Immobilization of Enzymes and Cells, Human Press Inc., Totowa, 83-86
- Kranz, B., (2006), *Magnetische Enzymträger*, <http://www.fzk.de/fzk/idcplg?IdcService=FZK&node=2932>
- Kronick P.; Gilpin R. W., (1986), *Use of Superparamagnetic particles for isolation of cells*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 12, 73-80
- Lang H.; Hennrich N.; Orth H. D.; Brümmer W.; Klockow M., (1972), *Synthese und Eigenschaften trägergebundener Enzyme*, Chemiker Zeitung, 11, 595-602
- Liberti P. A.; Rao C. G.; Terstappen L. W. M. M., (2001), *Optimization of ferrofluids and protocols for the enrichment of breast tumor cells in blood*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 225, 301-307
- Lippold, B., (2006), *Der Regenbogen der Biotechnologie*, http://www.analytica-world.com/id/39134/CMEntries_ID/79547/page/1/cubesig/21e856f905459d956b981c5460
- Liua X.; Guana Y.; Liua H.; Ma Z.; Yang Y.; Wu X., (2005), *Preparation and characterization of magnetic polymernanospheres with high protein binding capacity*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 293, 111-118
- Lottspeich F.; Zorbas H., (1998), *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- MagForce® Nanotechnologies AG, (2006), *Neue klinische Studie zur MagForce® Nano-Krebs Therapie gestartet*, Pressemitteilung der MagForce® Nanotechnologies AG vom 01.01.2006
- Mah C.; Fraites T. J.; Zolotukhin I.; Song S.; Flotte T. R.; Dobson J.; Batich C.; Byrne B. J., (2002), *Improved method of recombinant AAV2 delivery for systematic targeted gene therapy*, Molecular Therapy, 6, 106-112
- Makhmudov S. Y.; Kuznetsov A. A.; Filippov V. I., (1997), *Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers*, Plenum Press, New York
- Mansfield L. P.; Forsythe S. K., (1993), *Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonelle detection*, Letters in applied Microbiology, 16, 122-125
- Marquette C. A.; Blum L. J., (2006), *State of the art recent advances in immunoanalytical systems*, Biosensors and Bioelectronics, 21, 1424-1433
- Meicken M., (1998), *Magnetische Eigenschaften von periodisch angeordneten Nanopartikeln aus Nickel*, Diplomarbeit, Universität Konstanz

- Meyer A.; Hansen D. B.; Gomes C. S. G.; Hobley T. J.; Thomas O. R. T.; Franzreb M., (2005), *Demonstration of a Strategy for Product Purification by High-Gradient Magnetic Fishing: Recovery of Superoxide Dismutase from Unconditioned Whey*, Biotechnology Progress, 21 (1), 244-254
- Mittingly J. A., (1984), *An enzymeimmunoassay for the detection of all Salmonella using a combination of myeloma protein and a hybridoma antibody*, Journal of immunological Methods, 73, 147-156
- Morishita N.; Nakagami H.; Morishita R.; Takeda S.; Mishima F.; Terazono B.; Nishijima S.; Kaneda Y.; Tanaka N., (2005), *Magnetic nanoparticles with surface modification enhanced gene delivery of HVJ-E vector*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 334, 1121-1126
- Nouaimi-Bachmann; M., (2003) *Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervliesen und deren Anwendungen*, Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Özkara S.; Akgöl S.; Çanak Y.; Denizli A., (2004), *A Novel Magnetic Adsorbent for Immunoglobulin-G Purification in a Magnetically Stabilized Fluidized Bed*, Biotechnology Progress, 20, 1169-1175
- Pankhurst Q. A.; Connolly J.; Jones S. K.; Dobson J., (2003), *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine*, Journal of Physics D: Applied Physics, 36, 167-181
- Payne M. J.; Campell S.; Patchett R. A.; Kroll R. G., (1992), *The use of immobilized lectins on the separation of Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria and Salmonella spp from pure cultures and foods*, Journal of Applied Bacteriology, 73(1), 41-52
- Payne M. J.; Campell S.; Kroll R. G., (1993), *Lectin-magnetic separation can enhance methods for the detection of Staphylococcus aureus, Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes*, Food Microbiology, 10, 75-83
- Pierce Chemical Company, (2001), *Protein Assay Technical Handbook*
- Plank C.; Scherer F.; Schillinger U.; Bergemann C.; Anton M., (2003), *Magnetofection: Enhancing and Targeting Gene Delivery with Superparamagnetic Nanoparticles and Magnetic Fields*, Journal of Liposome research, 13 (1), 29-32
- Princea M. R.; Zhanga H. L.; Chabraa S. G.; Wang P. J. & Y., (2003), *A pilot investigation of newsuperparamagnetic iron oxide (ferumoxytol) as a contrast agent for cardiovascular MRI*, Journal of X-Ray Science and Technology, 11, 231-240
- Putnam D. D.; Namasivayam V.; Burns M. A., (2003), *Cell affinity separation using magnetically stabilized fluidized beds - Erythrocyte subpopulation fractionation utilizing a lectin-magnetite support*, Biotechnology Bioengineering, 81, 650-665
- Reiss G.; Brueckl H.; Huetten A.; Schotter J.; Brzeska M.; Panhorst M.; Sudfeld D., (2005), *Magnetoresistive sensors and magnetic nanoparticles for biotechnology*, Journal of Materials Research, 20 (12), 3294-3302
- Rosevear A.; Kennedy J. F.; Cabral J. M. S., (1987), *Immobilised Enzymes and Cells*, Adam Hilger, Bristol and Philadelphia
- Ryazanov M., (2004) *Elektrische und magnetische Eigenschaften metallreicher Selten-erdmittelhalogenide*, Dissertation, Universität Stuttgart

- Šafařík I.; Šafaříková M.; Forsythe S. J., (1995), *The application of magnetic separations in applied microbiology*, Journal of Applied Bacteriology, 78, 275-285
- Šafařík I.; Šafaříková M.; (1999), *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*, Journal of Chromatography B, 722, 33-53
- Šafařík I.; Šafaříková M.; (2001), *Immunomagnetic separation of Escherichia coli O26, O111 and O157 from vegetables*, Letters in Applied Microbiology, 33, 36-39
- Šafařík I.; Šafaříková M.; (2002), *Magnetic Nanoparticles and Biosciences*, Monatsheft für Chemie, 3, 737-759
- Šafařík I.; Šafaříková M.; (2004), *Magnetic techniques for the isolation and purification of Proteins and peptides*, BioMagnetic Research and Technology, 2 (7)
- Šafaříková M.; Šafařík I., (2000), *One-step partial purification of Solanum tuberosum tuber lectin using magnetic chitosan particles*, Biotechnology Letters, 22, 941-945
- Saini S.; Stark D.D.; Hahn P.F.; Wittenberg J.; Brady T.J.; Ferrucci J.T., (1987), *Ferrite Particles_ A Superparamagnetic MR Contrast Agent for the Reticuloendothelial System*, Radiology, 162, 211-216
- Saiyed Z. M.; Telang S. D.; Ramchand C. N., (2003), *Application of magnetic techniques in the field of drug discovery and biomedicine*, BioMagnetic Research and Technology, 1 (2),
- Schattenfroh S., (2003), *Krebsbehandlung mit Nanotechnologie*, <http://www.berlinews.de/archiv-2003/1659.shtml>
- Schellenberger A., (1989), *Enzymkatalyse*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Schmitz S. A.; Albrecht T.; Jensen K.; Wolf K. J., (1999), *MR angiography with superparamagnetic iron oxide: feasibility study*, Radiology, 213, 603-607
- Schotter J., (2004) *Development of a magnetoresistive biosensor for the detection of biomolecules*, Dissertation, Universität Bielefeld
- Schwarz, J., (2006) *Downstream-Processing und Biotransformation von nachwachsenden Rohstoffen*, Dissertation, Universität Hannover
- Streitwieser, A.; Heathcock C. H., (1986), *Organische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Sykes, P., (2001), *Wie funktionieren organische Reaktionen*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Taupitz M., (2004), *Ein neues Kontrastmittel für die MRT auf der Basis Citrat-stabilisierter magnetischer Eisenoxid-Nanopartikel: Wirkstofffindung, präklinische Entwicklung und klinische Prüfung*, Dissertation, Charité-Universitätsmedizin Berlin
- Teotia S.; Gupta M.N., (2001), *Purification of alpha-amylases using magnetic alginate beads*, Applied Biochem Biotechnol, 90, 211-220
- Terranova B. E.; Burns M. A., (1990), *Continuous Cell Suspension Processing Using Magnetically Stabilized Fluidized Beds*, Biotechnology Bioengineering, 37, 110-120

- Tipler P. A., (1994), *Physik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Tong X.-D.; Sun Y., (2003), *Application of Magnetic Agarose Support in Liquid Magnetically Stabilized Fluidized Bed for Protein Adsorption*, Biotechnology Progress, 19, 1721-1727
- Tong X.-D.; Sun Y., (2004), *Synthesis of a Novel Magnetic Resin and the Study of Equilibrium in Cation Exchange with Amino Acids*, Industrial & Engineering Chemistry Research, 43, 475-485
- Uhlen M.; Hornes E.; Olsvik Ø., (1994), *Advances in biomagnetic separation*, Eaton Publ.
- Uhlig H., (1991), *Enzyme arbeiten für uns: technische Enzyme und ihre Anwendungen*, Carl Hanser Verlag, München; Wien
- Ulber R., (1996) *Optimierung von Sensorsystemen für die Biotechnologie*, Dissertation, Universität Hannover
- VDI Technologiezentrum GmbH, INFO PHYS TECH, Nr. 63, (2006), *"Hochauflösende Magnetfeldmessung mit neuartigen GMR-Sensoren und miniaturisierten Fluxgate-Sensoren"*
- Voet D.; Voet J.G., (1994), *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Wacker R.; Ceyhan B.; Schröder H.; Disqué C.; Schüler D.; Niemeyer C. M., (2006), *Biogenic magnetite nanoparticles for microarray and separation technology*, <http://www.nanobio.de/symposium2005/zeigen.php?id=44>
- Wess L., (2006), *Die Biotechnologiefirma Genodysee fahndet nach lukrativen Varianten patentierter Wirkstoff-Moleküle. Die Hoffnung: eine deutlich beschleunigte Zulassung als Medikament*, Financial Times Deutschland, 75, 33
- Winklhofer M., (2004), *Vom magnetischen Bakterium zur Brieftaube*, Physik Unserer Zeit, 3, 120-127
- Wood D. K.; Ni K. K.; Schmidt D. R.; Cleland A. N., (2005), *Submicron giant magnetoresistive sensors for biological applications*, Sensors and Actuators A, 120, 1-6
- Xie X.; Zhang X.; Zhang H.; Chen D.; Fei W., (2004), *Preparation and application of surface-coated superparamagnetic nanobeads in the isolation of genomic DNA*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 277, 16-23
- Xu C.; Xu K.; Gu H.; Zhong X.; Guo Z.; Zheng R.; Zhang X.; Xu B., (2004), *Nitrilotriacetic Acid-Modified Magnetic Nanoparticles as a General Agent to Bind Histidine-Tagged Proteins*, Journal American Chemical Society, 126, 3392-3393
- Yu J. F., Häfeli U. O., Dong Y. et al., (2002), *Radiolabeling of magnetic targeted carriers with several therapeutic and imaging radioisotopes*, European Cells and Materials, 3 (2), 16-18
- Yu J.-H.; Lee C.-W.; Lee S.-S. I.; Lee J.-S., (2003), *Structure and Magnetic Properties of SiO₂ Coated Fe₂O₃ Nanoparticles Synthesized by Chemical Vapor Condensation Process*, Reviews on Advanced Materials Science, 4, 55-59

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Heiko, Andreas Rackel
Geburtsdatum: 05. Januar 1972
Geburtsort: Ruit (a.D. Fildern)

SCHULBILDUNG

1978 - 1982 Franz-Kade-Schule
1982 - 1984 Gesamtschule Wallrabenstein
1984 - 1991 Pestalozzischule Idstein/Taunus
11.06.1991 Allgemeine Hochschulreife

STUDIUM

10.1991 – 09.1995 Grundstudium Chemie (Diplom) an der Technischen Hochschule Darmstadt
30.09.1995 Vordiplom Chemie (TH Darmstadt)
10.1995 – 01.2003 Hauptstudium Chemie (Diplom) an der Universität Hannover
16.01.2003 Diplom
Diplomarbeit an der Universität Hannover über das Thema: *Enzymimmobilisierung an aktivierten Membranen* unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper
seit 01.03.2003 Doktorand und wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Scheper

Hannover, den 25.09.2006