

**Immobilisierung von Enzymen
auf Polyestervliesen und deren
Anwendungen**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von

MERIEM NOUAIMI-BACHMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juni 2003

Dekan: Prof. Dr. H. Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bisswanger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

Meiner Familie

und

Stefan

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen im Zeitraum von 1998 bis 2003 angefertigt.

Herrn Professor Dr. Hans Bisswanger danke ich sehr herzlich für die Themenstellung und für sein Interesse an dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung hervorragender Arbeitsbedingungen. Ebenso bedanke ich mich für seine stetige Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Voelter danke ich für seine Hilfe zu Beginn meiner Arbeit. Nur durch seine tatkräftige Unterstützung wurde mir die Promotion an der Universität Tübingen überhaupt ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. U. Weser danke ich für seine Unterstützung bei der Korrektur meiner Dissertation.

Besonderer Dank gilt Saida Senhaji für die fachliche aber vielmehr auch für die fachfremde Diskussionsfreudigkeit und tiefe Freundschaft.

Mein Dank gilt zudem all meinen gegenwärtigen und früheren Arbeitskreiskollegen, die durch die zahlreichen Diskussionen einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben.

Ein großes Dankeschön gilt daher:

Ulrike Wöll für die Durchführung zahlreicher Experimente und Unterstützung während meiner Arbeit.

Camilla Oxley für ihre große Einsatzbereitschaft und Durchführung zahlreicher Tests zur Co-Immobilisierung.

Christa Steinbrenner, Klaus Möschel, Liu Xiaqiong, Eva Galinsky, Sven Schaaf, Meike Kowallik, Christine Theiss, Philip Schumann und allen oben genannten Personen für das sehr angenehme und freundschaftliche Arbeitsklima und viele unvergessliche Momente. Ein Dankeschön gilt ebenfalls Dr. Anna Haberditzl.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Schäfer und Frau Schoor für ihre Hilfe bei sämtlichen Verwaltungsarbeiten.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die Finanzierung und Förderung im Rahmes des Papier-Spalt-Projektes.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt meiner Familie: Nur durch die uneingeschränkte Hilfe meiner Eltern sowie meiner Geschwister Mokthar, Najat, Nadia, Mâati, Khadija, Hicham, Mohammed, Abdelalah und Soufian wurde dieses Studium überhaupt möglich.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für seine tägliche Unterstützung und seine Liebe.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Immobilisierung von Enzymen	1
1.2	Trägermaterialien.....	5
1.3	Anwendung von immobilisierten Enzymen	6
1.3.1	Papierspaltverfahren	7
1.3.2	Polyester-Vliese	8
1.3.3	Eigenschaften von PET	10
1.3.4	Gelatine.....	10
1.4	Co-Immobilisierung von Enzymen	13
2	PROBLEMSTELLUNG	14
3	MATERIAL UND METHODEN.....	17
3.1	Materialien	17
3.1.1	Chemikalien und Lösungsmittel	17
3.1.2	Vliesstoff	17
3.1.3	Photometer.....	18
3.2	Methoden.....	18
3.2.1	Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervliesen	18
3.2.1.1	Darstellung von hydroxysuccinimid-aktiviertem Vlies.....	18
3.2.1.2	Immobilisierung des BSA-Spacers.....	19
3.2.1.3	Darstellung und Immobilisierung von Aldehyd-Dextran	19
3.2.1.4	Darstellung und Immobilisierung von Amino-Dextran	20
3.2.1.5	Immobilisierung von PEG-Diamin.....	20
3.2.1.6	Direkte Anbindung von Trypsin.....	20
3.2.1.7	Immobilisierung von Trypsin über verschiedene Spacer	21

3.2.2	Co-Immobilisierung von α -Amylase und Trypsin über den BSA-Spacer ...	22
3.2.3	Protease-Test	22
3.2.3.1	Trypsin-Test mit N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid	22
3.2.3.2	Azocasein-Test	23
3.2.3.3	Ninhydrin-Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität	23
3.2.3.4	Gelatine als Substrat	24
3.2.4	Test von α -Amylase	24
3.2.5	Protein-Bestimmung	25
3.2.5.1	BCA-Test	25
3.2.5.2	Ninhydrin-Test zur Proteinbestimmung	26
3.2.6	Untersuchung der Abbauprodukte der Gelatine	27
3.2.6.1	Probenvorbereitung	27
3.2.6.2	Size-Exclusion-Chromatographie (SEC)	27
3.2.6.3	Reversed-Phase-HPLC der Gelatinefragmente	27
3.2.7	Untersuchung der Abbauprodukte von β -Casein	28
3.2.7.1	Probenvorbereitung	28
3.2.7.2	Reversed-Phase-HPLC der β -Caseinfragmente	28
3.2.8	Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)	29
3.2.9	Antikörper-Test für α -Amylase und Trypsin	29
3.2.9.1	Alpha-Amylase	29
3.2.9.2	Trypsin	30
3.2.10	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	30
3.2.11	Antikörper-Antigen-Reaktion am Co-Immobilisat	30
4	ERGEBNISSE	32
4.1	Polyester-Vliesmaterialien	32
4.2	Synthesestrategie zur Bindung von Trypsin an die Polyesteroberfläche	34

4.2.1	Immobilisierungstechnik	35
4.2.1.1	Aktivierung der Vlies-Oberfläche	35
4.2.1.2	Direkte Bindung von Trypsin.....	35
4.2.1.3	Bindung von Trypsin über Spacer	37
4.3	Entwicklung einer Proteinbestimmungsmethode für immobilisierte Enzyme	39
4.3.1	Proteinbestimmung über den Ninydrintest	39
4.3.1.1	Entwicklung des Ninhydrintests für immobilisierte Proteine.....	39
4.3.1.2	Optimierter Ninhydrintest: Eichgerade von löslichem BSA	43
4.3.1.3	Ninhydrintest an immobilisiertem BSA	44
4.3.2	Proteinbestimmung über den BCA-Test.....	46
4.3.2.1	Eichgerade von löslichem BSA.....	46
4.3.2.2	BCA-Test an immobilisiertem Protein.....	47
4.3.3	Vergleich von Ninhydrin- und BCA-Test	48
4.4	Bestimmung der Trypsin Aktivität in Abhängigkeit der verschiedenen Spacer	50
4.4.1	BAPNA als Substrat	50
4.4.2	Azocasein als Substrat	51
4.4.3	Aktivität des immobilisierten Trypsins.....	52
4.4.4	Charakterisierung des immobilisierten Trypsins	53
4.4.4.1	Temperaturstabilität.....	53
4.4.4.2	pH-Stabilität	55
4.4.4.3	Stabilität in Ethanol/Wasser	56
4.4.4.4	Einfluß unterschiedlicher Lagerbedingungen	58
4.4.4.5	Stabilität nach wiederholtem Einsatz	59
4.4.5	Reaktionsverfolgung mittels NMR-Spektroskopie	61
4.4.5.1	¹ H-Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	61
4.4.5.2	¹³ C-Festkörper-NMR-Spektroskopie.....	63

4.4.6	Untersuchung mittels SEM-Aufnahmen	65
4.5	Anwendung des immobilisierten Trypsins.....	69
4.5.1	Abbau von Gelatine.....	69
4.5.1.1	Charakterisierung über den Ninhydrintest	69
4.5.1.2	Charakterisierung mittels der Size Exclusion Chromatographie	71
4.5.1.3	Charakterisierung mittels der Reversed-Phase-HPLC	76
4.5.2	Abbau von β -Casein.....	80
4.5.2.1	RP-HPLC an löslichem Trypsin ohne β -Casein-Substrat	80
4.5.2.2	RP-HPLC an immobilisiertem Trypsin ohne β -Casein-Substrat	81
4.5.2.3	RP-HPLC an nativem β -Casein	82
4.5.2.4	RP-HPLC an β -Casein-Abbauprodukten.....	83
4.6	Co-Immobilisierung	86
4.6.1	Aktivität der co-immobilisierten Enzyme	86
4.6.2	Fluoreszenzmessungen von immobilisierten Proteinen bzw. Enzymen	87
4.6.3	Markierung von Antikörpern zur Verfolgung der Co-Immobilisierung	93
5	DISKUSSION	97
5.1	Immobilisierung von Trypsin über verschiedene Spacer	98
5.1.1	Aktivierung des Polyestervlieses.....	98
5.1.2	Einführung von Spacern.....	99
5.2	Charakterisierung des immobilisierten Trypsin	100
5.3	Anwendungen des über den BSA-Spacer gebundenen Trypsins.....	105
5.3.1	Abbau von Gelatine.....	105
5.3.2	Abbau von β -Casein.....	107

5.4	Co-Immobilisierung von Trypsin und α-Amylase	109
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	111
7	LITERATURVERZEICHNIS	114

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

BAPNA	N-Benzoyl-D,L-arginin-p-nitroanilid
BCA	2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure
BSA	Rinder-Serum-Albumin
cm	Zentimeter
CP	Cross Polarization
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
K	Kelvin
k	Kilo
kDa	Kilo-Dalton
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LC	Flüssigkeitschromatographie
MAS	Magic Angle Spinning
MeOH	Methanol
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PEG	Polyethylenglykol
PET	Polyethylenterephthalat
pH	potentia hydrogenii (lat.), „Stärke des Wasserstoffs“
ppm	Parts per Million
RBI	Rhodamin-B-Isothiocyanat
RF	Rotationsfrequenz
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat (Natriumdodekylsulfat)
SEM	Scanning Electron Microscope
TCA	Trichloressigsäure

TFA	Trifluoressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
w/v	weight per volume

1 Einleitung

1.1 Immobilisierung von Enzymen

Für technische Anwendungen ist der Einsatz löslicher Enzyme zumeist ungünstig, da sie nicht zurückgewonnen werden können. Daher ist es vorteilhaft, sie durch Immobilisierung in eine wiederverwendbare Form zu bringen. Die auf diese Weise unlöslichen Enzyme bieten dabei alle Vorteile der klassischen heterogenen Katalyse. Sie sind durch eine Filtration oder Zentrifugation leicht zurückgewinnbar, können in kontinuierlichen Verfahren als Schüttung in Festkörperreaktoren und in Fließbettreaktoren oder Rührreaktoren eingesetzt werden. Damit wird eine kontinuierliche Reaktionsführung möglich, die meist einfache technische Ausführungen mit einer weitgehenden Automatisierung verbindet (Buchholz & Kasche, 1997).

Enzyme lassen sich immobilisieren, indem sie als gelöste Moleküle in einem definierten Raum eingeschlossen werden oder indem sie in einen unlöslichen Zustand überführt werden. Als immobilisiert bezeichnet man dabei Biokatalysatoren, die durch chemische oder physikalische Methoden in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt werden. Die erste künstliche nicht kovalente Immobilisierung eines Enzyms, das dabei aktiv blieb und definitiv nicht abgewaschen wurde, gelang schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Dennoch wurde die Bedeutung dieser Arbeit, bei der das Enzym Invertase auf Holzkohle gebunden wurde, lange nicht erkannt. Der Einschluß von Enzymen in quervernetztes Polyacrylamid wurde Silman & Katchalski, 1966 publiziert. Von ersten Ergebnisse über kovalent gebundene Enzyme wurden schon in den fünfziger Jahren von Grubenhofer und Schleith, 1954 berichtet. Die erste großtechnische Anwendung gelang, indem L-Aminosäuren aus Racematen mit kovalent fixierter Aminoacylase hergestellt wurden. Weitere Anwendungen stellten die Immobilisierung der Glucose-Oxidase nach Campbell *et al.*, 1975 und die Co-Immobilisierung von Hexokinase mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase nach Morris *et al.*, 1975 zur automatischen Glucose-Analytik dar.

Dabei existieren fünf klassische Methoden der Immobilisierung von Enzymen und Zellen. Hierbei wird unterschieden, ob das Enzym kovalent oder adsorbtiv gebunden ist oder in einer verkapselten Form vorliegt (Zaborsky, 1974, Hartmeier, 1986, Klein, 1988, Kennedy & Melo, 1990). In Abbildung 1 sind die unterschiedlichen Methoden zur Immobilisierung von Enzymen dargestellt. Die Klassifizierung erfolgt dabei nach der Bindungsstärke der einzelnen Modelle. Es treten starke Bindungskräfte durch kovalente Bindungen, schwache oder mäßige Kräfte durch Adsorption und keinerlei Bindungskräfte durch Einschluß der Enzyme in ein 3D Netzwerk auf.

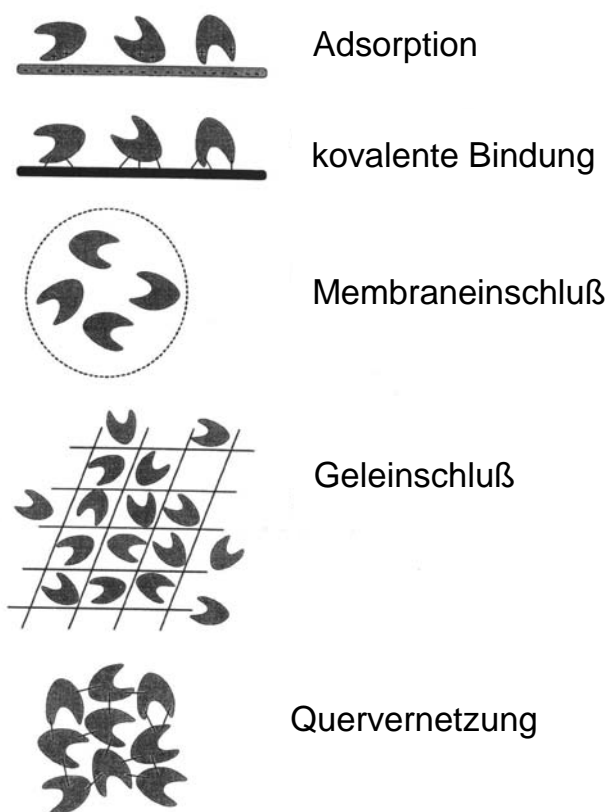


Abbildung 1: Unterschiedliche Immobilisierungstechniken für Enzyme. Die Methoden sind nach der Bindungsstärke klassifiziert (Bickerstaff 1997).

Adsorption:

Adsorption ist die einfachste Methode der Immobilisierung und kann über elektrostatische (z.B. van der Waals), ionische oder Wasserstoffbrücken-Bindungen erfolgen; aber auch hydrophobe Wechselwirkungen können ausschlaggebend sein (Messing, 1976, Woodward, 1985). Diese Bindungen sind relativ schwach aber in genügend großer Anzahl vorhanden, um eine ausreichende Bindungsstärke zu

gewährleisten. Der große Vorteil der Adsorption ist die schnelle Durchführung, bei der das Trägermaterial mit den Enzymen unter geeigneten Bedingungen (pH, Temperatur, Lösungsmittel) inkubiert wird. Der größte Nachteil ist das relativ leichte Ablösen der Biokatalysatoren vom Adsorbens. So können Schwankungen im pH-Wert, der Temperatur oder der Ionenstärke des Lösungsmittels zu Desorption der immobilisierten Enzyme führen.

Geleinschluß:

Bei der Immobilisierung durch Geleinschluß, dem sog. *Entrapment*, liegen die Enzyme in ihrer gelösten Form vor, sind aber in ihrer Bewegungsfreiheit durch den Einschluß in das Netzwerk eines Gels stark eingeschränkt (Bickerstaff, 1995, O'Driscoll, 1976). Dabei muß die Porosität des durch das Gelsystem gebildeten dreidimensionalen Gitters genau eingestellt werden, um ein Ausbluten des Enzymes zu verhindern. Die Poren des Netzwerkes müssen wiederum größer sein als die Substrate, damit diese ungehindert zu den Enzymen vordringen zu können (Brodelius, 1985, Bucke, 1983). Zudem führt eine eingeschränkte Diffusion von Substrat und Produkt zur Substratverarmung bzw. Produktanhäufung am Reaktionsort, wodurch die Reaktion gehemmt werden kann. Als Gelmaterialien werden vor allem Polyacrylamide, aber auch Agar oder Gelatine verwendet. Bei den zuerst genannten Systemen wird in einer Polymerisation aus monomeren Einheiten, wie Acrylamid, und einem häufig zugesetzten Quervernetzer das dreidimensionale Netzwerk aufgebaut. Die Porengröße und mechanischen Eigenschaften des Gels werden durch das Verhältnis der Monomere zum Quervernetzer-Anteil bestimmt.

Membraneinschluß:

Eine Einkapselung der Enzyme oder Zellen kann durch eine semipermeable Membran erfolgen (Kierstan & Coughlan, 1991, Nilsson, 1987, Groboillot *et al.*, 1994). Diese Methode besitzt eine gewisse Ähnlichkeit zum Geleinschluß, bei dem die Enzyme zwar in ihrer löslichen Form vorliegen, aber ebenfalls stark in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind. Große Proteine oder Enzyme können die Membran nicht passieren, während die kleineren Substrate oder Produkte durch die semipermeable Membran hindurchwandern. Bis vor wenigen Jahren wurde diese Methode noch wenig

angewandt, inzwischen werden Mikro kapseln als Modelle für Zellen benutzt (Sliwka, 1975). Als Polymere eignen sich besonders Cellulosenitrat oder Polyamid, aber auch Liposomen können zur Verkapselung eingesetzt werden. Beide Formen werden als Arzneistoffträger eingesetzt (Schreier, 1984).

Quervernetzung:

Diese Art von Immobilisierung ist trägerfrei, wobei die einzelnen Enzyme zu einem großen dreidimensionalen Netzwerk miteinander verbunden werden. Das kann durch physikalische oder chemische Methoden erreicht werden (Broun, 1976). Beim Einsatz von chemischen Methoden werden kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Enzymen oder Zellen durch den Einsatz von bi- oder multifunktionellen Reagenzien eingebaut. Dabei kommen vor allem Glutaraldehyd oder Toluoldiisocyanat zum Einsatz. Auch Gelatine und Albumin wurden benutzt, um weitere Proteine mit Spacerfunktion einzuführen. Auf diese Weise lassen sich Probleme, die durch die große Nähe der Enzyme oder Zellen verursacht werden, minimieren. Wegen den schlechten mechanischen Eigenschaften und schlechter Stabilität wird die Methodik der Quervernetzung nur selten benutzt. Sie dient dann im wesentlichen zur Verstärkung von anderen Immobilisierungstechniken, indem das Ausbluten der Enzyme reduziert wird.

kovalente Bindungen:

Bei der Anbindung über kovalente Bindungen werden chemische Bindungen zwischen den Enzymen oder Zellen und dem Trägermaterial ausgebildet (Woodward, 1985, Porath & Axèn, 1976, Cabral & Kennedy, 1991). Die Bindungen werden zumeist zwischen funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägers und zwischen funktionellen Gruppen der Enzyme, in der Regel Aminosäureresten, gebildet. Dabei werden oft die Aminogruppen von Lysin oder Arginin, die Carboxylgruppen von Aspargin- oder Glutaminsäure, sowie die Hydroxylgruppen von Serin oder Threonin oder die Thiol-Gruppen von Cystein verwendet (Srere & Uyeda, 1976). Durch die kovalente Anbindung wird die Immobilisierung sehr stabil, was allerdings Auswirkungen auf die Aktivität haben kann. Als Träger selbst kommt eine Vielzahl von Materialien in Frage. Das Trägermaterial hat einen wesentlichen Einfluß auf die

Art der Kopplungsreaktion. (White & Kennedy, 1980, Taylor, 1991). Auch ist seine Oberflächenbeschaffenheit, insbesondere seine Polarität, für den Erhalt der Enzymaktivität von entscheidender Bedeutung (Gemeiner, 1992).

1.2 Trägermaterialien

Wie schon im vorigen Abschnitt beschrieben, stellt die Enzymimmobilisierung spezifische Anforderungen an die eingesetzten Trägermaterialien. Dabei müssen die chemischen Wechselwirkungen der Trägeroberfläche mit dem Protein so angepaßt werden, daß keine unerwünschten Nebenwirkungen wie z.B. Inaktivierung entstehen. Die festen Träger lassen sich dabei in anorganische und organische Materialien einteilen. Organische Materialien können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Diese Materialien besitzen je nach Herkunft spezifische Eigenschaften. Anorganischen Träger weisen meist eine hervorragende Druckstabilität auf, während die organischen Materialien eine gute chemische Stabilität zeigen. Als natürliche organische Träger werden Polysaccharide wie z.B. Cellulose, Stärke, Dextran, Agarose oder Chitin eingesetzt. Aber auch Proteine wie Kollagen, Gelatine oder Albumin kommen zur Anwendung. Als synthetische organische Polymere dienen Polyacrylate, Polymethacrylate, Polyacrylamide, Vinyl- und Allylpolymeren, Polyester oder Polyamide. Als anorganische Träger überwiegen poröse Materialien auf der Basis von Silicium- oder Aluminiumoxiden bzw. Gemischen daraus. Von besonderer Bedeutung ist die Porosität. Poröse Träger verfügen über eine große Oberfläche für die Enzymimmobilisierung, so daß hohe Aktivitäten erzielt werden. Dabei müssen die Porenradien groß genug sein, um den Zugang für das jeweilige Protein zu gewährleisten. Ein geringes Quellverhalten, gute chemische Stabilität gegenüber Säuren und Basen, eine gute mikrobiologische Stabilität und eine gute Druckfestigkeit sind weitere Voraussetzungen, die an die Trägermaterialien gestellt werden. Auch die an der Oberfläche zugänglichen funktionellen Gruppen spielen eine wesentliche Rolle.

1.3 Anwendung von immobilisierten Enzymen

Für technische Anwendungen werden Enzyme auf einer Vielzahl von Trägermaterialien immobilisiert (White & Kennedy, 1980, Taylor, 1991, Gemeiner, 1992). Dabei werden die immobilisierten Proteine zunehmend in der medizinischen (Chang, 1977, Wingard *et al.*, 1980) und klinischen Analyse (Weetall, 1975), der Affinitätschromatographie (Dunlap, 1974, Mohr & Pommerening, 1985, Scouten, 1981, Dean *et al.*, 1985) und bei chemischen Anwendungen (Mosbach, 1988, Pitcher, 1979) eingesetzt. Synthetische Polymervliese kommen jedoch nur selten zur Anwendung. Immobilisierte Enzyme werden hauptsächlich in großtechnischen Prozessen eingesetzt, bei denen die Immobilisierung auf sphärischen Partikeln erfolgt. Für spezielle Anwendungen sind solche Anordnungen aber nicht zielführend und spezielle Techniken müssen entwickelt werden. Soll das Enzym nur mit bestimmten Regionen eines Objektes in Verbindung kommen, bietet sich eine Immobilisierung auf flachen zweidimensionalen Trägern an, wo sich ein direkter Oberflächenkontakt herstellen läßt. Nach der Anwendung läßt sich das immobilisierte Enzym quantitativ durch einfaches Abziehen des Trägers entfernen. Für solche Anwendungen eignen sich synthetische Polymerfasern mit einer hohen Flexibilität und guter Resistenz gegen mechanischen Stress. Hierbei kommen vor allem Polyamide, Polyester und Rayon-Polyester in Frage.

Die wenig reaktiven Polymerstrukturen dieser Materialien verursachen aber bei der Immobilisierung von Enzymen einige Probleme. Zur Schaffung von freien funktionellen Gruppen, die zur Anbindung der Enzyme dienen, müssen die Träger mit relativ drastischen Mitteln aktiviert werden. Zudem stellt die wenig polare Oberfläche dieser Polymere eine ungünstige Umgebung für die Enzyme dar. Dies gilt vor allem für Polyester, ein Material, das aber dank seiner strukturellen und chemischen Stabilität von besonderem technischen Interesse ist.

Das Problem der schonenden Oberflächenbehandlung stellt sich besonders bei der Restaurierung wertvoller Dokumente. Als Beispiel für eine praktische Anwendung sei hier das Papierspaltverfahren erwähnt.

1.3.1 Papierspaltverfahren

Der Zerfall der Archiv- und Bücherbestände stellt in den Bibliotheken ein großes Problem dar. Vor allem Dokumente, die vom 18. bis in die Mitte des 20. Jahrhundert gefertigt wurden, sind durch säurehaltige Produkte im Papier stark gefährdet. Im letzten Drittel des 19. Jahrhunderts wurde damit begonnen, die bis dahin zur Papierherstellung verwendeten Textilreste und Lumpen durch Holzschliff zu ersetzen. Für das neue Verfahren wurde dem Leim zur Steigerung der Papierqualität und zur Erzeugung einer glatten, wasserabweisenden Oberfläche Aluminiumsulfat zugesetzt. Durch Überdosierung des Aluminiumsulfates, aber auch durch freie Harzsäure aus dem Holz und Einflüsse des Luftsauerstoffs kam es zur Bildung von Aluminiumhydroxid und Schwefelsäure, d.h. zu säurehaltigem Papier. Aber auch die verwendeten Tinten können aufgrund ihres sehr sauren Charakters (pH 1,4 bis 3) zur Hydrolyse der Cellulose, und damit zur Zerstörung des Papiers beitragen (Krekel, 1990, Neevel & Reißland, 1998). Aber auch äußere Einflüsse wie Temperatur, Strahlung, Feuchtigkeit und Luftschadstoffe spielen im Alterungsprozeß des Papiers eine wichtige Rolle. Mikroorganismen leisten ebenfalls ihren Beitrag und schädigen Papier auf verschiedenste Arten. Sie produzieren die celluloseabbauenden Enzyme (Cellulasen und β -Glucosidasen) oder bilden Milchsäure, die das Fasermaterial hydrolytisch angreift.

Durch die Methode der Papierspaltung ist es möglich, Dokumente, die stark beschädigt sind, unter Erhalt der Originalsubstanz, zu restaurieren (Müller, 1987, Wächter *et al.*, 1996). Dabei eignet sich die Methode sowohl für Handschriften, Zeichnungen und Einzeldokumente (Höge, 1981) als auch zur Restaurierung und Verfestigung jeglicher Art von Papier, das die verschiedensten Schadensbilder aufweist (Liers *et al.*, 1996).

Zur Restaurierung mittels der Papierspalttechnik werden die einzelnen Seiten zuerst mit flüssigen Papierbrei angefasert und in einem weiteren Schritt zwischen zwei Filterpapierbögen eingebettet und einige Zeit gepresst. Die Filterpapiere sind mit Gelatine als Klebstoff beschichtet (Bansa & Barga, 1979 und 1980, Wächter *et al.*, 1996, Brückle & Dambrogio, 2000). In dem die beiden Filterpapierbögen wieder auseinandergezogen werden, kommt es zur Spaltung des Blattes. Anschließend wird

zwischen die beiden Hälften ein sehr dünnes aber stabiles Papier als neuer Kern eingelegt, der mit einem gepuffertem, säurefreien Klebstoff verklebt wird. Das auf diese Weise gebildete Sandwich-Blatt kommt nun in ein 50°C warmes Enzymbad, das zur Ablösung der Gelatine verwendet wird. Meistens werden keine reinen Enzyme, sondern partiell gereinigte Extrakte z.B. aus *Bacillus subtilis* eingesetzt. In einem anschließenden Inaktivierungsbad bei 85°C werden einerseits die Spaltprodukte abgespült, andererseits noch verbleibende Restenzymanteile auf dem Papier inaktiviert. Danach lassen sich die Filterpapiere wieder entfernen, wobei das Dokument nun mit einem neuen Papierkern gestärkt ist.

Durch die Verwendung von kostengünstigen Proteaseextrakten kann es jedoch zu Verfärbungen des Restaurationsobjektes kommen. Außerdem besteht die Gefahr, daß nach dem Inaktivierungsverfahren noch Enzyme vorhanden sind, die durch ihre Celluloseaktivität das restaurierte Objekt wieder schädigen. Ein weiterer Nachteil ist der hohe Verbrauch des hochwertigen und damit teuren Filterpapiers, das jeweils nur einmal eingesetzt werden kann.

Durch die Immobilisierung an feste Trägermaterialien lassen sich die Enzyme leicht und vollständig vom Dokument entfernen und stehen zur weiteren Verwendung zur Verfügung. Auf diese Weise kann das Inaktivierungsbad, das ebenfalls zu Schädigungen empfindlicher Objekte führen kann, umgangen werden. Allerdings sind hierfür passende Trägermaterialien erforderlich. Nur Träger, die pflegeleicht, form- und druckstabil als auch stabil gegenüber den eingesetzten Chemikalien sind, können zur Modifizierung herangezogen werden. Außerdem ist eine Resistenz gegenüber Mikroorganismen nötig. Diese Trägermaterialien müssen leicht modifizierbar sein, also freie funktionelle Gruppen besitzen und dürfen die Aktivität der immobilisierten Enzyme nicht negativ beeinflussen. Polyester-Vliese besitzen verschiedene dieser Eigenschaften und sollten daher für den Papierspaltprozeß tauglich sein.

1.3.2 Polyester-Vliese

Jahr für Jahr werden weltweit mehr als 24 Millionen Tonnen von Kunstfasern hergestellt. Der größte Produktions-Zuwachs geht auf Polyester-Fasern zurück, die für

1.3.3 Eigenschaften von PET

Eine der herausragenden Charakteristiken des PET-Materials ist der in das polymere Netzwerk eingebundene aromatische Benzolring. Dieser aromatische Charakter führt zu einer hohen Steifigkeit und verhindert somit die Umorientierung von ungeordneten Polymerregionen, was zum Auftreten von relativ schwachen van der Waals-Wechselwirkungen führt. Daher ist PET auch schlecht zu kristallisieren. Die aromatischen, sowie die aliphatischen Gruppen und die Carboxylgruppen liegen in nahezu planarer Konfiguration vor. Die stabilisierenden Wechselwirkungen zwischen den Molekülen gehen dabei einerseits auf van der Waals-Kräfte zurück. Andererseits liegt der Schmelzpunkt von PET (200 - 260°C) im Vergleich zu aliphatischen Polyestern relativ hoch und geht auf die Esterverbindungen zurück. Die gute Kohäsion der PET-Ketten ist also ein Ergebnis von Wasserstoffbrückenbindungen und van der Waals- Wechselwirkungen, die durch Dipolwechselwirkungen, Induktions- und Dispersionskräfte unter den Polymerketten hervorgerufen werden.

Polyestervliese zeichnen sich dabei durch eine relativ hohe Zugfestigkeit, gute Chemikalien-Beständigkeit, schnelle Trockenfähigkeit sowie ein geringes Ausdehnungs- und Schrumpfverhalten aus. Zudem besitzt PET eine gute UV- und Mikrowellen-Beständigkeit, was eine mögliche Desinfektion erleichtert. Das hydrophobe Material besitzt ein niedriges Wasserrückhaltevermögen und bietet Enzymen eine eher destabilisierende, da unpolare Umgebung. Das Vliesmaterial zeichnet sich außerdem durch einen verminderten Faltenwurf, als auch eine erhöhte Beständigkeit gegenüber Bakterien und Pilze aus. Durch Alkylierungsreaktionen oder partielle Hydrolyse über die Carboxyl- oder die Hydroxylgruppen können zudem weitere Immobilisierungsreaktionen durchgeführt werden.

1.3.4 Gelatine

Die für die Verleimung im Papierspaltverfahren benötigte Gelatine wird durch chemisch-thermische Verfahrensschritte aus dem faserartig aufgebauten Protein Kollagen gewonnen. Haut, Knochen, Sehnen und Bindegewebe enthalten Kollagen und dienen somit als Ausgangsmaterial für die Gelatineherstellung. Im tierischen und

menschlichen Organismus stellen diese Kollagene die am häufigsten vorkommende Proteinklasse dar. Kollagen besteht zu einem Drittel aus Glycin und zu weiteren 22 % aus den Iminoverbindungen Prolin und Hydroxyprolin; die restlichen 45 % entfallen auf 17 weitere Aminosäuren.

Der faserartige Aufbau des Kollagens ergibt sich aus dem Tripelhelixaufbau. Dabei sind zwei α 1- und eine α 2-Ketten in einer Tripelhelix miteinander verwoben und bilden die sogenannte γ -Einheit. Das tripelhelicale Molekül ist dabei etwa 300 nm lang und mißt ca. 1,4 nm im Querschnitt. Die α 1- und α 2-Ketten besitzen eine Molmasse von etwa 95000 g/mol und enthalten ungefähr 1000 Aminosäuren. Die einzelnen Sequenzen unterscheiden sich dabei nur sehr wenig in der Zusammensetzung der Telopeptide (C und N-terminal), wobei α 2 einen höheren Anteil an basischen Aminosäuren besitzt. Kollagen bildet Einheiten mit hoch geordneten Strukturen (kristalline Bereiche), die sich mit weniger geordneten Regionen (amorphe Bereiche) abwechseln. Der hohe Anteil an den Aminosäuretripeln Glycin-Prolin-Hydroxyprolin ist für die kompakte kristalline Struktur der α -Ketten verantwortlich. Die amorphen Regionen treten meist innerhalb der Telopeptide auf. Diese formen globuläre Schwanzbereiche mit hohen Anteilen an polaren, sauren Aminosäuren mit sperrigen Seitenketten wie Arginin, Lysin, Asparaginsäure und Glutaminsäure. Unterschiede in der Länge, der Ladungsverteilung und der Struktur der Telopeptide führen zu verschiedenen Anordnungen der Quartärstruktur des Proteins (Dupont, 2002).

Ziel der Gelatineherstellung ist die schonende und quantitative Umwandlung von hoch quervernetzten, wasserunlöslichen, kollagenreichen Rohmaterialien in wasserlösliche Gelatine mit bestimmten physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Gelstärke, Viskosität, Farbe und Klarheit. Durch Partialhydrolyse wird dabei die Struktur stufenweise aufgelöst, wie in Abbildung 3 gezeigt. Bei thermischem und säurekatalysiertem Abbau (Typ A Gelatine) überwiegen hydrolytische Spaltungen innerhalb einzelner Kollagenketten, während es bei alkalischer Hydrolyse (Typ B Gelatine) zu vermehrten Spaltungen von inter- und intramolekularen Quervernetzungen kommt.

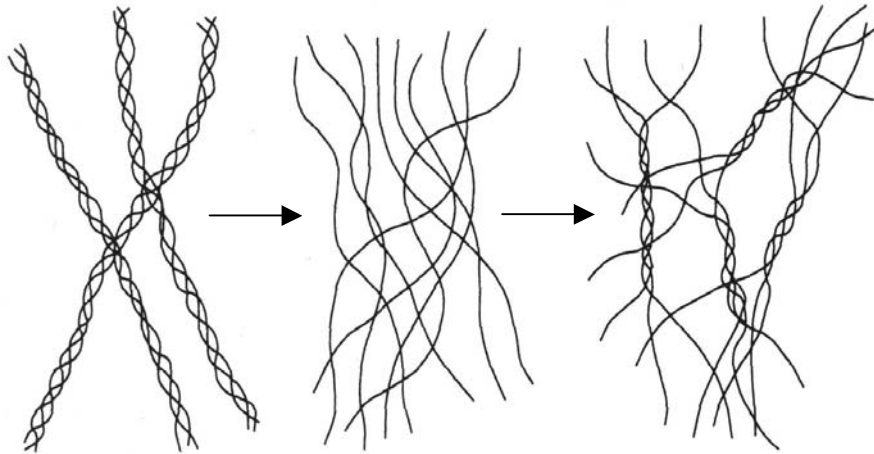


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vorgänge bei der Partialhydrolyse von Kollagen zu Gelatine nach Babel, 1996.

Gelatine vom Rind wird alkalisch hergestellt, aus Schweinen und Fischgelatine wird sie sauer produziert. Die partielle Hydrolyse führt, wie in der obigen Abbildung beschrieben, zu einer Vereinzelung einer großen Anzahl der α -Ketten. Gelatine besitzt neben den vereinzelt α -Ketten in kleinerer Konzentration Multimere von α -Ketten, die noch miteinander verwoben sind. Solche Einheiten können aus β -Ketten (α -Ketten-Dimer), und nicht hydrolysierten oder teilweise renaturierten tripelhelicalen Ketten bestehen. Dabei können Peptide mit kleiner Molmasse von 500 – 4000 g/mol und Proteine mit einer Molmasse von über 10^6 g/mol gebildet werden. Tabelle 1 beschreibt die Einteilung der Gelatinebestandteile in unterschiedliche Molmassenbereiche.

Tabelle 1: Klasseneinteilung der Gelatineeinheiten nach unterschiedlicher Molmasse nach Farrugia & Groves (1999).

Klasseneinteilung	Molmasse [kDa]	abgeschätzter Anteil an α -Ketten
niedermolekularer Bereich	< 50	-
sub- α	50 – 80	-
Alpha (α)	80 – 125	1
Beta (β)	125 – 225	2
Gamma (γ)	225 – 340	3
Epsilon (ϵ)	340 – 700	6 (2 γ)
Zeta (ζ)	700 – 1000	9 (3 γ)
Delta (δ)	1000 – 1800	12 (4 γ)
Microgel	> 1800	> 12

1.4 Co-Immobilisierung von Enzymen

Die Co-Immobilisierung von Zellen oder Enzymen wird aus mehreren Gesichtspunkten heraus durchgeführt. Zum einen wird die Produktvielfalt durch die unterschiedlichen katalytischen Fähigkeit von verschiedenen Enzymen vergrößert. Andererseits können auf diese Weise zwei- oder mehrstufige Reaktionen deutlich vereinfacht werden, da das Reaktionsprodukt eines Enzyms als Substrat für ein weiteres Enzym dienen kann (Martin & Perlman, 1975; Janse & Pretorius, 1995). Vor allen für Enzyme, die in Sequenzen arbeiten, schafft die Co-Immobilisierung ein gutes Mikroklima für das zweite Enzym, da die Diffusionszeiten des Substrates zum Enzym deutlich verkürzt werden. Da Metabolismen eine ganze Reihe von Reaktionen beinhalten, können co-immobilisierte Multienzymsysteme als Modell für intrazelluläre, regional begrenzt wirkende Enzyme und *in vitro*-Modelle für Zellprozesse dienen. Theoretisch kann eine unbegrenzte Zahl an Enzymen auf dem gleichen Träger co-immobilisiert werden. Praktisch jedoch treten häufig Probleme durch starke Abweichungen des optimalen pH-Bereiches, des Temperaturoptimums oder durch unterschiedliche Stabilisatoren auf (Hahn-Hägerdahl, 1983).

2 Problemstellung

In dieser Arbeit soll am Beispiel des Papierspaltverfahrens die praktische Anwendung von auf Polyestervlies immobilisierten Proteasen untersucht werden. Bei diesem Prozeß wird das zu restaurierende Dokument durch die Einführung eines neuen Kernpapiers in seiner Mitte stabilisiert. Wie beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.1) dient dabei eine Gelatineschicht als eine Art von Klebstoff, der es ermöglicht, das Dokument in zwei Hälften zu teilen. Bei Verwendung von löslichen Enzymen ist eine abschließende Behandlung in einem Inaktivierungsbad bei erhöhten Temperaturen unumgänglich.

Um die dadurch resultierenden Nachteile zu umgehen, soll die Immobilisierung dieser Proteasen untersucht und optimiert werden. Dadurch soll eine bessere Kontrolle des Gelatine-Abbauprozesses erreicht werden, der Inaktivierungsschritt kann dann entfallen. Dennoch sind für einen Einsatz im Papierspaltverfahren zahlreiche Probleme zu lösen. Die Verwendung von Filterpapier ist als Träger für die Proteasen ungeeignet, da ein wiederholter Einsatz unmöglich ist. Das Trägermaterial muß eine stabile, flexible und wasserdurchlässige Struktur besitzen. Nur Polyester-Vliese erfüllen diese Forderungen in einem zufriedenstellenden Maß.

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Immobilisierung von BSA auf Rayon/Polyester (Howlett *et al.*, 1991, Boyd & Yamazaki, 1993) und die Immobilisierung von Thermolysin auf Polyamid (Möschel *et al.*, 2002) untersucht. Beide Materialien sind jedoch für das Papierspaltverfahren nicht geeignet. Vielmehr kommt Polyester zum Einsatz, der aus Ethylenglycol- und Terephthalsäureeinheiten aufgebaut ist. Eine direkte Anbindung des Enzyms ist daher nur über das Sauerstoffatom durch eine O-Alkylierung der Carbonylgruppe möglich. Die drastischen Bedingungen dieser Reaktion führen allerdings zu einer deutlichen Veränderung der Oberflächeneigenschaften des verwendeten PET-Materials. Daher müssen durch eine partielle Hydrolyse des PET-Vlieses freie Carboxylgruppen erzeugt werden, die zur weiteren Modifizierung als funktionelle Gruppen zur Verfügung stehen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die letztere Synthesestrategie auf die Immobilisierung von

Trypsin auf Polyestervlies anzuwenden und zu optimieren. Einerseits soll untersucht werden, wie sich das direkt immobilisierte Trypsin auf dieser hydrophoben Oberfläche verhält. Da die relativ unpolare Trägeroberfläche die Langzeitstabilität des Enzymes verschlechtern kann, sollen Spacer-Moleküle eingesetzt werden, um das Trypsin von der Vliesoberfläche abzuschirmen. Dabei sollen unterschiedliche Arten von Spacern getestet werden. Vor allem die Spacerlänge sowie dessen Polarität und Flexibilität haben einen deutlichen Einfluß auf die räumliche Umgebung und damit die Stabilität bzw. Aktivität des immobilisierten Enzyms. Daher werden lange und kurze Spacer sowie Spacer mit unterschiedlicher Polarität und Form untersucht. Einerseits soll der relativ hydrophile synthetische Spacer Polyethylenglykol-Diamin (PEG-Diamin), ein Dextran-Spacer und ein Protein-Spacer untersucht werden. Bei den ersten Typen handelt es sich jeweils um lineare Ketten. Der Proteinspacer dagegen stellt ein sehr großes raumerfüllendes Molekül dar, das selbst durch das über ihn immobilisierte Enzym angegriffen werden könnte. Für die einzelnen Spacer sollen jeweils geeignete Synthesewege geprüft werden. Ein geeigneter Spacer sollte zumindest die Langzeitstabilität des nativen Enzyms erhalten.

Die Stabilität des über die verschiedenen Spacer immobilisierten Trypsins soll in Hinblick auf den pH-Wert, die Temperatur, unpolare Lösungsmittel und wiederholten Einsatz untersucht werden.

Für die Untersuchungen des immobilisierten Trypsins müssen geeignete Proteintests entwickelt werden. Für immobilisierte Proteine existieren nur wenig Bestimmungsmethoden, die zudem stark vom jeweiligen Trägermaterial abhängig sind. Daher müssen die jeweiligen Tests auf das Gesamtsystem angepaßt werden. Auf diese Weise soll untersucht werden, welche Mengen an Protein auf dem Trägermaterial immobilisiert werden konnten.

Durch NMR-Spektroskopie und Scanning Electron Microscope (SEM)-Aufnahmen soll verfolgt werden, in wie weit die einzelnen Syntheseschritte, insbesondere die partielle Hydrolyse, Auswirkungen auf die Polymerstruktur des eingesetzten Polyester-Vlieses zeigen. Dies dient zur Kontrolle der Syntheseschritte, die die Grundstruktur des Polyester-Vlieses nicht angreifen sollen. Nur mit einem strukturell intakten

Vliesmaterial ist der Einsatz im Papierspaltverfahren durchführbar. Zudem soll das Trägermaterial wiederholtem Einsatz standhalten.

Durch einen geeigneten Aktivitätstest soll verfolgt werden, in wie weit das immobilisierte Trypsin für den Abbau von Gelatine herangezogen werden kann. Daher soll der Ninhydrintest auf die Untersuchung von Gelatine-Abbauprodukten als qualitative Methode angepaßt werden. Die Gelatine-Abbauprodukte sollen ebenfalls durch chromatographische Methoden untersucht werden. Dazu sollen sowohl die Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) als auch die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) herangezogen werden. Durch Vergleiche von unverdauter und mit immobilisiertem Trypsin behandelter Gelatine lassen sich qualitative Aussagen über den Abbauprozess treffen. Auf diese Weise läßt sich untersuchen, ob das Verfahren für den Papierspaltprozeß tauglich ist.

Das Papierspaltverfahren dient als Beispiel einer möglichen Anwendung der Immobilisierung von Proteasen an einem zweidimensionalen Träger, dem Polyestervlies. Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis der generellen Tauglichkeit von auf zweidimensionalen Trägern immobilisierten Enzymen zur schonenden Oberflächenbehandlung. Hierzu kommen nicht nur Proteasen, sondern auch andere Enzymaktivitäten in Betracht. In einer weiteren Studie sollen daher zwei unterschiedliche Enzyme, Trypsin und Amylase, auf dem PET-Vlies über den BSA-Spacer in einer Co-Immobilisierung gebunden werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Rinderserumalbumin (BSA), Azocasein, N-Hydroxysuccinimid, Dextran (MW 6,000) und α -Amylase waren von Fluka (Buchs, Schweiz). N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid, Natriumperjodat, Natriumborhydrid, N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (BAPNA), Bicinchoninsäure (2,2-Bichinoyl-4,4-dicarbonsäure, BCA), Na₂-salz, Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris ultra pure) und 3,5-Dinitrosalicylsäure wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen, Trypsin (aus Rinderpankreas) von Roche (Mannheim, Deutschland). Dioxan und Methanol sowie die Pufferreagenzien und die Salze stammten von Merck (Darmstadt, Deutschland), Glutaraldehyd-Lösung (25%), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Rhodamin-B-iosthiocyanat (RBI) waren von Serva (Heidelberg, Deutschland), Polyethylenglykol-diamin (PEG-Diamin) (MW 2,000) von Shearwater Polymers Inc. (Huntsville, USA). Der Bortrimethylamin-Komplex stammte von Aldrich Feinchemikalien (Deisenhofen, Deutschland).

Zur Untersuchung der Aktivität des immobilisierten Trypsins wurde Gelatine G20 Typ B, Gelfestigkeit 250 Bloom von DGF Stoess, Eberbach (Deutschland) verwendet.

Anti-Trypsin wurde von Rockland (PA, USA) bezogen.

Anti- α -Amylase aus Kaninchen wurde nach der von Harlow & Lane, 1988 beschriebenen Methode hergestellt.

3.1.2 Vliesstoff

Es wurde das PET-Vlies FO 2413 von Freudenberg (Weinheim, Deutschland) eingesetzt. Die Fasern sind thermisch gebunden, und besitzen ein Gewicht von 100 g/m². Die Dicke beträgt 0.19 mm.

3.1.3 Photometer

Für die Enzym- bzw. Proteintests wurden die Spektral-Photometer UV2100 und UV-120-01 von Shimadzu, für die fluoreszenzmarkierten Farbstoffen ein Spektral-Fluorimeter (Typ SPF-500) von Aminco-Bowmann verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervliesen

3.2.1.1 Darstellung von hydroxysuccinimid-aktiviertem Vlies

Die zur Immobilisierung von Enzymen benötigten Carboxylgruppen wurden durch teilweise Hydrolyse des Polyestervlieses freigesetzt. Dazu wurden 1,0 g des Vliesmaterials (in Stücken zu je 1 cm²) über 1h mit 50 ml 3.65 M HCl bei 50°C behandelt. Durch mehrmaliges Aufschlännen im destilliertem Wasser mit anschließendem 30-minütigen Absaugen mittels eines Büchner-Trichters wurde das Vlies sorgfältig gewaschen. Anschließend wurde zweimal mit Dioxan gewaschen, wobei eine längere Behandlung mit Dioxan keinerlei strukturelle Schäden am Vliesmaterial verursachte. Zum Vliesmaterial, das in den 1 cm²-Stücken in Dioxan gelegt wurde (1 g Vlies pro 10 ml), wurde bis zu einer Konzentration von 0.2 M festes N-Hydroxysuccinimid zugeben. Danach wurde N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid ebenfalls bis zu einer Konzentration von 0.2 M zugegeben (Cuatrecasas & Parikh, 1972). Nach 70 minütigem Schütteln bei Raumtemperatur wurde das auf diese Weise aktivierte Polyestervlies für 15 min mit 8 Volumeneinheiten Dioxan gewaschen und anschließend mit 4 Volumeneinheiten Methanol für 10 min behandelt, um den sich niedergeschlagenen Dicyclohexylharnstoff aufzulösen. Danach wurde nochmals mit Dioxan gewaschen. Der Überschuß an Dioxan wurde durch Trocknen des Vlieses auf Filterpapier entfernt. Das N-hydroxysuccinimid-aktivierte Vliesmaterial wurde sofort zur weiteren Kupplungsreaktion verwendet oder in Dioxan bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.1.2 Immobilisierung des BSA-Spacers

Nach Entfernung des Überschusses an Dioxan wurde das N-hydroxysuccinimid-aktivierte Vlies über Nacht mit einer eiskalten Protein-Lösung aus 1% (w/v) BSA in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 behandelt (100 µl BSA-Lösung pro 1 cm² Vlies). Das nicht kovalent gebundene Protein wurde nach 12-stündiger Einwirkung bei 4°C durch Waschen mit 500 ml 0.5 M NaCl in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 entfernt. Anschließend wurde das Vlies mit 500 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 durch Absaugen über einem Büchner-Trichter gewaschen. Das BSA-modifizierte Vlies-Material wurde in der gleichen Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

3.2.1.3 Darstellung und Immobilisierung von Aldehyd-Dextran

Aldehyd-Dextran wurde durch teilweise Oxidation (50%) von Dextran mit Perjodat erhalten (Schacht, 1987; Drobchenko *et al.*, 1993; Guisàn *et al.*, 1997; Penzol *et al.*, 1998). Zur Oxidationsreaktion wurde eine Lösung von 0.41 g Dextran (3.33 mM) in 12,5 ml destilliertem Wasser hergestellt. Nach Zugabe von 1 g festem Natriumperjodat zu dieser Lösung wurde diese für 3 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung viermal gegen das 10-fache Volumen destilliertes Wasser dialysiert. Nach jedem Dialysezyklus von 3 h wurde das Wasser ausgetauscht.

Das mit N-Hydroxysuccinimid aktivierte Vlies (1,0 g in Stücken zu 1 cm²) wurde für 1h bei 4°C in 10 ml 2 M Ethylendiamin/HCl bei pH 8.5 eingelegt und geschüttelt, um Amino-Gruppen für die Reaktion mit dem Aldehyddextran-Spacer zu generieren. Das mit Ethylendiamin modifizierte Vlies wurde sorgfältig mit 500 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit 10 ml Aldehyd-Dextran-Lösung, sowie einer Lösung aus 10 ml 100 mM Natriumphosphat pH 7.0 mit 150 mM Bortrimethylaminkomplex für 2 h bei 25°C gerührt. Nach Abkühlen auf 4°C wurde der pH-Wert auf 10 eingestellt. Danach wurden 150 mg Natriumborhydrid zugeführt, um alle nicht abreagierten Aldehydgruppen des Dextrans zu Hydroxylgruppen und Schiff'sche Basen zu sekundären Aminen zu reduzieren.

3.2.1.4 Darstellung und Immobilisierung von Amino-Dextran

Das Dextran wurde, wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben, oxidiert. Amino-Dextran wurde durch Zugabe von 54.7 mg Bortrimethylamin zu 3 ml oxidiertem Dextran synthetisiert. Dabei wurde eine Konzentration von 125 mM an Bortrimethylamin in der Reaktionsmischung erreicht. Die Lösung wurde in einem Eisbad gekühlt und mit 3 ml 0.5 M Ethylendiamin/HCl pH 5 über 4 Zugabeschritte von 15 min Dauer versetzt. Nach dieser portionsweisen Zugabe wurde die Lösung weiter bei 4°C gehalten und mit einer 10 M Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Anschließend wurden 120 mg festes Natriumborhydrid zugegeben, um die verbliebenen Aldehyd-Gruppen, als auch die sich gebildeten Schiff'schen Basen zu reduzieren. Nach 1 h bei 4°C wurde die Lösung einer vierfachen Dialyse gegen destilliertes Wasser mit einer Zykluszeit von 3 h unterzogen.

Nach Einstellung des pH-Wertes der Amino-Dextran-Lösung auf 7.5, wurde anschließend die Kupplungsreaktion mit dem N-hydroxysuccinimid-aktivierten Vlies bei 4°C über Nacht durchgeführt. Nach der Bindungsreaktion wurde das Vlies intensiv mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 gelagert.

3.2.1.5 Immobilisierung von PEG-Diamin

Das N-hydroxysuccinimid-aktivierte Vlies wurde über Nacht mit einer eiskalten gepufferten PEG-Diamin-Lösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 behandelt (100 µl PEG-Diamin-Lösung pro 1 cm² Vlies). Das nicht kovalent gebundene PEG-Diamin wurde nach 12-stündiger Einwirkung bei 4°C durch Waschen mit 500 ml 0.5 M NaCl in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 entfernt. Anschließend wurde das Vlies mit 500 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 durch Absaugen über dem Büchner-Trichter gewaschen. Das PEG-Diamin-modifizierte Vlies-Material wurde in der gleichen Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

3.2.1.6 Direkte Anbindung von Trypsin

Das N-hydroxysuccinimid-aktivierte Vlies wurde mit einer eiskalten Lösung von Trypsin (10 mg/ml) in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 (0.1 ml pro 1 cm² Vlies) über

Nacht behandelt. Zur Entfernung von nicht gebundenem Trypsin, wurde das Vliesmaterial mit 500 ml 0.5 M NaCl in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 und 500 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 mittels eines Büchner-Trichters gewaschen. Das trypsin-modifizierte Vlies wurde anschließend in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 bei 4°C gelagert.

3.2.1.7 Immobilisierung von Trypsin über verschiedene Spacer

Aldehyd-Dextran-Spacer:

Für die Bindung des Trypsins an den Aldehyd-Dextran-Spacer wurde das immobilisierte Dextran mit einer 0.1 M Lösung von Natriumperjodat in destilliertem Wasser über 2 h bei 25°C behandelt. Das auf diese Weise hergestellte Aldehyd-Dextran wurde mit einem Überschuß an destilliertem Wasser gewaschen und direkt für die Bindung mit Trypsin verwendet. Dazu wurde eine Lösung von Trypsin (10 mg/ml) in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 (0.1 ml pro 1 cm² Vlies) mit dem immobilisierten Aldehyd-Dextran-Spacer über Nacht bei 4°C zur Reaktion gebracht. Die dabei entstandene Schiff'sche Base wurde wie oben beschrieben mit Natriumborhydrid reduziert.

Aminodextran-, PEG-Diamin- und BSA-Spacer:

Für die Bindung von Trypsin an Amino-Dextran, PEG-Diamin, als auch BSA als Spacer wurde jeweils die gleiche Vorgehensweise gewählt. Im ersten Schritt wurde pro 1 g des mit Spacer modifizierten PET-Vlieses (in 1 cm²-Stücke aufgeteilt) über eine 5%ige Glutaraldehyd-Lösung (v/v) in 0.2 M Natriumborat pH 8.5 (Hornby & Goldstein, 1976; Onyezili, 1987) ein bifunktionaler Linker eingeführt. Nach 20 minutigen Rühren bei 25°C wurde der Überschuß an Glutaraldehyd durch Waschen mit destilliertem Wasser gefolgt von 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 entfernt. Im zweiten Schritt wurden direkt nach den oben beschriebenen Waschvorgängen 2 ml einer Lösung von 10 mg Trypsin in 1 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 zugegeben. Nach Einwirkung über Nacht (bei 4°C) wurde das mit Trypsin immobilisierte Vliesmaterial mit 500 ml 0.5 M NaCl in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 und 500 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 mittels eines Büchner-Trichters gewaschen. Das trypsin-modifizierte Vlies wurde anschließend in derselben Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

3.2.2 Co-Immobilisierung von α -Amylase und Trypsin über den BSA-Spacer

Zur Co-Immobilisierung wurden dieselben Techniken verwendet, wie zur Immobilisierung von Trypsin (vgl. Abschnitt 3.2.1). Die Bindung der beiden Enzyme erfolgte über den BSA-Spacer (vgl. 3.2.1.7). Nach der Verknüpfung des Spacers mit Glutaraldehyd als Linker wurden folgende Enzymlösungen eingesetzt:

- 10 mg α -Amylase und 10 mg Trypsin gelöst in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5
- 5 mg α -Amylase und 10 mg Trypsin gelöst in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5
- 2 mg α -Amylase und 10 mg Trypsin gelöst in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5
- 1 mg α -Amylase und 10 mg Trypsin gelöst in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5
- 0.5 mg α -Amylase und 10 mg Trypsin gelöst in 2 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5

Die oben beschriebenen Lösungen wurden jeweils direkt nach den in Kapitel 3.2.1.7 beschriebenen Waschvorgängen zugegeben. Nach Einwirkung über Nacht bei 4°C wurde das mit α -Amylase und Trypsin immobilisierte Vliesmaterial mit 500 ml 0.5 M NaCl in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 und 500 ml 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 mittels eines Büchner-Trichters gewaschen. Das mit α -Amylase und Trypsin co-immobilisierte Vlies wurde anschließend in derselben Puffer-Lösung bei 4°C gelagert.

3.2.3 Protease-Test

3.2.3.1 Trypsin-Test mit N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid

Die Aktivität von Trypsin wurde über die Zunahme der Absorption von N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid (BAPNA) bei 405 nm und 25°C verfolgt. Dabei wurde die Aktivität als die Enzymmenge definiert, die in 1 Minute 1 μ mol BAPNA (Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{405} = 96201 \text{ (mol cm)}^{-1}$) hydrolysiert (Wachsmuth *et al.*, 1966).

Um die Aktivität des löslichen Trypsins zu bestimmen, wurden 0.167 ml einer 20 mM Lösung von BAPNA in DMSO zusammen mit 0.667 ml Wasser und 0.1 ml 0.3 M Kaliumphosphat, pH 8 gelöst. Anschließend wurden 67 μ l einer Trypsin-Lösung (25

$\mu\text{g/ml}$ in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5) hinzugegeben, um eine Konzentration von 0.07 $\mu\text{mol/l}$ Trypsin zu erreichen.

Für die Aktivitätsmessung des immobilisierten Trypsins wurden 0.5 ml einer 20 mM BAPNA-Lösung in DMSO zusammen mit 2 ml Wasser und 0.3 ml 0.3 M Kaliumphosphat, pH 8 gelöst. Das mit Trypsin immobilisierte Vlies (1.0 cm^2) wurde zu dieser Lösung hinzugefügt und für 30 min bei 25°C geschüttelt. Danach wurde die Absorption gemessen.

3.2.3.2 Azocasein-Test

Die Aktivität des löslichen als auch des immobilisierten Enzyms wurde mittels des Azocasein-Tests bestimmt (Brock *et al.*, 1982). Zur Bestimmung der Aktivität des löslichen Enzyms wurden 0.5 ml einer 0.2 %igen Azocasein-Lösung in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 zusammen mit 0.2 ml der Enzymlösung geschüttelt. Für Trypsin wurde eine Reaktionsführung bei 25°C für 30 min gewählt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0.2 ml 10%iger TCA gestoppt. Nach Entfernung des Niederschlags durch fünf minütige Zentrifugation wurde die Absorption des Überstandes bei 350 nm gegen eine Kontrollreaktion ohne Vlies vermessen. Die Aktivität ist definiert als die Enzymmenge, die unter Testbedingungen eine Absorptionsänderung von 1 pro 30 min bei 25°C bewirkt (Kundu *et al.*, 2000).

Um die Aktivität des immobilisierten Enzyms auf makromolekularen Substraten zu bestimmen, wurde ein 1 cm^2 großes Vliesstück zu 0.5 ml einer 0.2 %igen Azocasein-Lösung in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 mit zusätzlich 0.2 ml des gleichen Puffersystems gegeben. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben dargestellten Verfahren.

Für die Protease-Tests mit BAPNA und Azocasein wurde durch Kontrollexperimente zu verschiedenen Zeiten festgestellt, daß sich die Aktivität während der 30-minütigen Reaktionsdauer noch vollständig im linearen Bereich befindet (siehe Abbildung 15).

3.2.3.3 Ninhydrin-Test zur Bestimmung der Proteaseaktivität

Der Ninhydrin-Test wurde nach Rosen (1957) durchgeführt. Aus einer frisch

dargestellten 10 mM KCN-Lösung wurde durch Verdünnen mit 2.0 M Natriumacetat pH 5.4 eine 0.2 mM KCN-Lösung hergestellt. Anschließend wurde eine 3%ige Ninhydrin-Lösung in Methyl-Cellosolve hergestellt. Zusätzlich wurde eine 1:1 Mischung von Isopropanol und Wasser hergestellt.

Verschiedene Mengen des Waschwasser aus dem nachfolgend beschriebenen Gelatine-Test (50 – 200 μ l) wurden mit 2.0 M Natriumacetat pH 5.4 auf 200 μ l aufgefüllt. Dazu wurden 100 μ l der KCN-Acetatpufferlösung zu 100 μ l Ninhydrinlösung gegeben und gut vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 100°C wurde 1 ml der Isopropanol/Wasser-Mischung hinzugefügt, geschüttelt und für 5 Minuten abgekühlt. Die Absorption wurde bei 570 nm gemessen.

3.2.3.4 Gelatine als Substrat

33%ige Gelatine G20 wurde in 0.2 M Tris/HCl pH 7.5 bei 60°C gelöst. Je 1 ml dieser Gelatinelösung wurde in Sterilplatten von 3.5 cm Durchmesser gegossen. Zum Test der Aktivität des immobilisierten Enzyms wurde das feuchte Vlies auf die Gelatineplatten gelegt und bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Platten auf Eis abgekühlt, um die nicht gespaltene Gelatine zu verfestigen. Dann wurden 2 ml destilliertes Wasser vorsichtig auf die Oberfläche gegeben und das Vlies wurde abgehoben. Der Überstand wurde mit einer Pipette aufgenommen und mit dem Ninhydrintest untersucht. Als Leerwert wurde ein unbehandeltes Vlies herangezogen, das nach der oben beschriebenen Prozedur behandelt wurde.

3.2.4 **Test von α -Amylase**

Die α -Amylase gehört zu den Endoglykosidasen. Sie spaltet polymere Kohlenhydrate, wie Stärke, in Maltose, Maltotriose und α -Dextrinen. Maltose besteht aus zwei Glukosemolekülen, die α -1,4-glykosidisch miteinander verbunden sind. Das α -Dextrin besteht aus verschiedenen Glukoseeinheiten, die zusätzlich noch durch eine α -1,6-glykosidische Bindung miteinander verbunden sind.

Zum Test muß die Dinitrosalicylsäurereagenz frisch hergestellt werden. Dazu werden 0.25 g 3,5-Dinitrosalicylsäure und 75 g NaK-tartrat in 50 ml einer 2 M NaOH-Lösung

gelöst und mit dest. Wasser auf 250 ml verdünnt (um die Lösung länger aufbewahren zu können, muß mit Helium oder Stickstoff begast werden, da diese sonst mit dem CO₂ der Luft reagieren würde). Als Substrat wird Stärkelösung (10 mg/ml in 0.1 M Kaliumphosphat pH 6.9) eingesetzt (Chaplins, 1994).

Zum α -Amylase-Test wurde 1 ml Stärkelösung im Wasserbad auf 37°C erhitzt, das Vliesstück (1 cm²) mit der immobilisierten α -Amylase für 1h eingetaucht, 100 μ l der Lösung entnommen und jeweils 1 ml Dinitrosalicylsäurereagenz dazu gegeben. Dies wurde nun 10 min bei 100°C geschüttelt, abgekühlt und dann die Absorption der Lösung im Photometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

3.2.5 Protein-Bestimmung

3.2.5.1 BCA-Test

Für das lösliche Protein wurde eine Eichgerade mit 1.0 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 im Bereich von 0 – 50 μ g aufgenommen. Dabei wurden 0 bis 50 μ l der Proteinlösung vorgelegt und mit 0.1 M Kaliumphosphat, pH 7.5 auf 50 μ l aufgefüllt. Anschließend wurden 950 μ l einer Testlösung C, bestehend aus 50 Volumenanteilen einer Lösung A und einem Volumenteil einer Lösung B, zugegeben (Smith *et al.*, 1985).

Zur Herstellung von Lösung A wurden 1.00 g BCA, 2.00 g Na₂CO₃ · 2 H₂O, 0.16 g Na-tartrat, 0.40 g NaOH und 0.95 g NaHCO₃ in 50 ml Wasser gelöst und mit 5 N NaOH auf pH 11.25 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

Lösung B bestand aus 1 g CuSO₄ · 5 H₂O gelöst in 25 ml bidestilliertem Wasser.

Zur Bestimmung des immobilisierten Proteins wurde ein Stück Vlies der Größe 1 cm² in 1 ml der Lösung C für 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde das Vlies aus der Lösung entfernt und die Absorption bei 562 nm gegen Wasser gemessen. Als Leerwert wurde ein unbehandeltes Vlies gleicher Größe herangezogen.

Da Vliese neben den kovalent gebundenen Proteinen noch Anteile nicht kovalent

gebundener Proteine enthalten, werden die Vliese vor der Proteinbestimmung in 1 ml einer 1%igen Lösung von Natriumdodecylsulfat (SDS) für 10 min gekocht und anschließend sowohl mit dieser Lösung als auch mit destilliertem Wasser jeweils dreimal gewaschen. Auf diese Weise werden nicht kovalent gebundenen Proteine abgelöst. Ein nicht SDS behandeltes und nicht mit Protein immobilisiertes Vlies diente als Blindwert.

3.2.5.2 Ninhydrin-Test zur Proteinbestimmung

Mit dieser Methode können die durch saure Hydrolyse aus den an Vlies immobilisierten Enzymen freigesetzten Aminosäuren nachgewiesen werden. Daher ist sie nur für säurestabile Trägermaterialien, wie z.B. Polyestervliese geeignet.

Zur Hydrolyse wurden die mit Enzymen immobilisierten Vliese (1 cm²) in 1 ml 6 N HCl über Nacht bei 100°C im Heizblock in speziell dicht verschlossenen Gefäßen inkubiert. Anschließend wurden die Vliese entnommen und das Hydrolysat wie folgt aufgearbeitet: 200 µl wurden mit 200 µl 6 N NaOH und 600 µl 2.0 M Natriumacetat pH 5.4 gemischt. Diese Mischung wurde mit dem Ninhydrin-Test (siehe 3.2.3.3) untersucht. Die Quantifizierung des Proteins erfolgte über die Aufnahme einer Eichgeraden einer 2%igen BSA-Standardlösung. Dazu wurden 20 µl dieser Lösung mit 1 ml 6 N HCl über Nacht bei 100°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wurde wie oben beschrieben aufgearbeitet und dem Ninhydrin-Test unterzogen.

3.2.6 Untersuchung der Abbauprodukte der Gelatine

3.2.6.1 Probenvorbereitung

Zum Test der Wirksamkeit des Gelatineabbaus durch die immobilisierten Enzyme wurde das feuchte Vlies auf Gelatineplatten gelegt. 1 ml einer Lösung von 33% Gelatine in 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 wurde bei 60°C gelöst und auf Sterilplatten von 3.5 cm Durchmesser gegossen. Ein Stück Vliesmaterial (1 cm²) wurde mit 0.1 ml Tris-HCl pH 7.5 befeuchtet und für 1 h bei Raumtemperatur in direkten Kontakt mit der Gelatineoberfläche gebracht. Anschließend wurden die Abbauprodukte der Gelatine mit 500 µl 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, wovon jeweils 20 µl nach Sterilfiltration auf die Säule gespritzt wurden.

3.2.6.2 Size-Exclusion-Chromatographie (SEC)

SEC der Gelatine G-20 erfolgte auf einer TSK3000 Säule (Partikelgröße 13 µm, Porengröße 200 Å, Hersteller: Toyo Soda Company, Japan). Als mobile Phase diente 0.08 M Natriumphosphat, pH 7.0 mit 0.32 M NaCl und 20% Ethanol (v/v). Als Flußrate wurde 1 ml/min gewählt, die Aufnahme erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm.

Von der nativen Gelatine wurden 20 µl einer 0,1 %igen Lösung in 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 auf die Säule gegeben. Die Abbauprodukte der Gelatine wurden mit 500 µl 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, wovon jeweils 20 µl nach Sterilfiltration auf die Säule gespritzt wurden.

3.2.6.3 Reversed-Phase-HPLC der Gelatinefragmente

Die chromatographischen Trennungen der Gelatinefragmente wurden auf einer C18-Säule (5 µm, 300 Å, ProntoSil, 150 mm x 4.6 mm) von Bischoff-Chromatography, Leonberg durchgeführt. Die Flußrate war 1 ml/min, die UV-Detektion erfolgte bei 215 nm. Eluent A: 0.05 % TFA in Wasser, Eluent B: Acetonitril/0.045% TFA in Wasser 90:10, Gradient: 0-60 min: 5-30% B.

Von der nativen Gelatine wurden 20 µl einer 0.1 %igen Lösung der Gelatine in 0.2 M

Tris-HCl pH 7.5 auf die Säule gegeben. Die Gelatine-Abbauprodukten wurden mit 500 μ l 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, wovon jeweils 20 μ l nach Sterilfiltration auf die Säule gespritzt wurden.

3.2.7 Untersuchung der Abbauprodukte von β -Casein

3.2.7.1 Probenvorbereitung

2.4 mg /ml β -Casein wurden in 0.1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 gelöst. Zur Untersuchung der Abbauprodukte wurden jeweils 5 ml dieser Stammlösung eingesetzt.

Probe 1: 5 ml der β -Casein-Lösung

Probe 2: 5 ml der β -Casein-Lösung mit 120 μ g Trypsin (Trypsin wird im Verhältnis 1:100 eingesetzt).

Probe 3: 5 ml der β -Casein-Lösung mit 2 x 1cm² Vliesstücken (BSA-Trypsin)

Probe 4: 2 x 1 cm² Vliesstücke in 5 ml 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0

Probe 5: 120 μ g Trypsin in 5 ml Ammoniumhydrogencarbonat pH 8.0 gelöst

Diese Proben wurden über Nacht bei 35°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 5% TFA gestoppt und auf 100 μ l in einer Vakuumzentrifuge konzentriert.

3.2.7.2 Reversed-Phase-HPLC der β -Caseinfragmente

Die chromatographischen Trennungen wurden auf einer C18-Säule (ODS, 2 μ m, 300 Å, 0,3 x 125 mm) von der Fa. Grom, Hailfingen durchgeführt. Die Flußrate war 5 μ l/min, die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95% B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075% TFA in Wasser 80:20). Zur Untersuchung der Casein-Abbauprodukte wurden jeweils 5 μ l der konzentrierten Lösung auf 100 μ l mit Lösung A verdünnt. Davon wurden 5 μ l auf die Säule gegeben.

3.2.8 Kernresonanz-Spektroskopie (NMR)

¹³C-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ¹³C-Festkörper-NMR-Spektren wurden an einem Bruker ASX300 Spektrometer (Magnetfeldstärke: 7.05 T) bei einer Sendefrequenz von 75.43 MHz (¹³C) und 300.13 MHz (¹H) aufgenommen. Die Protonenpulswinkel wurden mit Adamantan eingestellt. Die Hartmann-Hahn-Einstellung und die Referenzierung erfolgte mit Glycin.

Rf = 10000Hz, 4 mm Probenkopf, Wartezeit 1 s, Kontaktzeit 3 ms, 90° Pulssequenz 3.5 μs.

¹H-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-Festkörper-Spektren wurden an einem Bruker AMX400 Spektrometer (Magnetfeldstärke: 9.4 T) bei Sendefrequenzen von 400.13 MHz (¹H) aufgenommen. Rotationsfrequenzen 4500 Hz, 4 mm Probenkopf, Wartezeit 2 s, 90°-Pulslänge 11.0 μs.

3.2.9 Antikörper-Test für α-Amylase und Trypsin

3.2.9.1 Alpha-Amylase

Vor und nach der Fluoreszenzmarkierung wurden die gegen Amylase gerichteten polyklonalen Antikörper mittels Antigen-Antikörper-Reaktion auf ihre Reaktionsfähigkeit getestet. Auf diese Weise sollte ausgeschlossen werden, dass die Funktion der Antikörper durch die Markierung beeinflusst wird.

Zur Durchführung dieses Tests wurde eine siebenteilige Versuchsreihe aufgestellt. In jedes Reaktionsgefäß kamen 10 μl einer α-Amylase-Lösung (0.5 mg/ml), dazu wurde jeweils eine unterschiedliche Menge der Antikörperlösung (90 mg/ml in 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0) (0 μl; 1 μl; 2 μl; 4 μl; 6 μl; 8 μl; 10 μl; 20 μl) hinzugegeben und mit 0.1 M Kaliumphosphat pH 6.9 auf 100 μl aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, danach 30 min in Eis gestellt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml Stärke (10 mg/ml) versetzt und in ein Wasserbad bei

37°C gestellt. Anschließend wurden aus jedem Reaktionsgefäß 100 µl entnommen, mit 1 ml Dinitrosalicylsäurereagenz versetzt und bei 100°C für 10 min inkubiert. Nach Abkühlen wurde die Absorption der Lösung bei 570 nm gemessen.

3.2.9.2 Trypsin

Es wurde eine Versuchsreihe mit 8 Reaktionsgefäßen aufgestellt. Jeweils 10 µl einer Trypsinlösung (0.5 mg/ml) wurden mit verschiedenen Mengen der Antikörperlösung (90 mg/ml in 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0) (0 µl; 1 µl; 2 µl; 4 µl; 6 µl; 8 µl; 10 µl; 20 µl) versetzt. Das Gemisch wurde mit 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 auf 100 µl aufgefüllt, für 1 h bei RT inkubiert, 30 min auf Eis gelegt und 10 min zentrifugiert. Davon wurden jeweils 66.6 µl entnommen, 666 µl dest. Wasser, 100 µl 0.3 M Kaliumphosphat pH 8.0 und 167 µl 20 mM BAPNA Substrat hinzugegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm gemessen.

3.2.10 **Fluoreszenzmarkierung von Proteinen**

Aus den Antikörpern sowie BSA, α -Amylase und Trypsin wurde jeweils eine Lösung mit einer Konzentration von 6 mg Protein pro ml 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0 hergestellt. In einem Dunkelraum wurde das Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Rhodamin-B-isothiocyanat (RBI) in wasserfreiem DMSO mit der Konzentration von 1 mg/ml gelöst werden. Anschließend wurden 100 µl FITC bzw. RBI pro ml der Proteinlösung hinzugegeben. Die Gemische wurden ca. 8 h bei 4°C im Dunkelraum gerührt. Das freie FITC bzw. RBI wurde mittels einer Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule abgetrennt. FITC wurde bei 480 nm angeregt und besitzt ein Emissionsmaximum bei 520 nm, die Anregung von RBI erfolgte bei 530 nm, die Emission bei 580 nm.

3.2.11 **Antikörper-Antigen-Reaktion am Co-Immobilisat**

Die konzentrierten und markierten Antikörper (Anti-Trypsin: RBI; Anti- α -Amylase: FITC) (90 mg/ml in 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0) wurden im Verhältnis 1:10 mit 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0, das 0.1 M NaCl, 1% Tween 20 und 1% BSA enthält,

verdünnt. Diese Lösung wurde über Nacht mit den auf dem Vlies co-immobilisierten Enzymen (Trypsin + α -Amylase) bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde mit 0.1 M Natriumcarbonat pH 9.0, das 0.1 M NaCl und 1% Tween 20 enthält, gewaschen und die Fluoreszenz bei 520 nm (FITC) bzw. 580 nm (RBI) gemessen.

4 Ergebnisse

Im folgenden wird die Synthesestrategie zur Immobilisierung von Trypsin auf PET-Vliesen beschrieben. Da die Struktur des Vlieses für die Anwendung im Papierspaltverfahren von besonderer Bedeutung ist, wird in einem ersten Schritt das PET-Vlies über spektroskopische Methoden charakterisiert. Weiterhin wird die Bindung von Trypsin an die PET-Oberfläche mit verschiedenen Spacern untersucht, um eine optimale, aktive und stabile Immobilisierung zu erhalten.

4.1 Polyester-Vliesmaterialien

Die eingesetzten Polyester-Fasern bestehen aus PET, das durch Polykondensation aus Terephthalsäure und Ethylenglykol gewonnen wird. In Abbildung 4 ist das ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektrum der verwendeten PET-Faser dargestellt. Es sind jeweils die Signale der aliphatischen Kohlenstoffatome der Ethylenglykoleinheiten bei 61.5 ppm (c), die Resonanzen der aromatischen Kohlenstoffatome des Terephthalsäuregrundgerüsts bei 130.1 ppm (b) und 133.5 ppm (a), sowie deren Carboxylgruppen bei 163.6 ppm (d) zu erkennen.

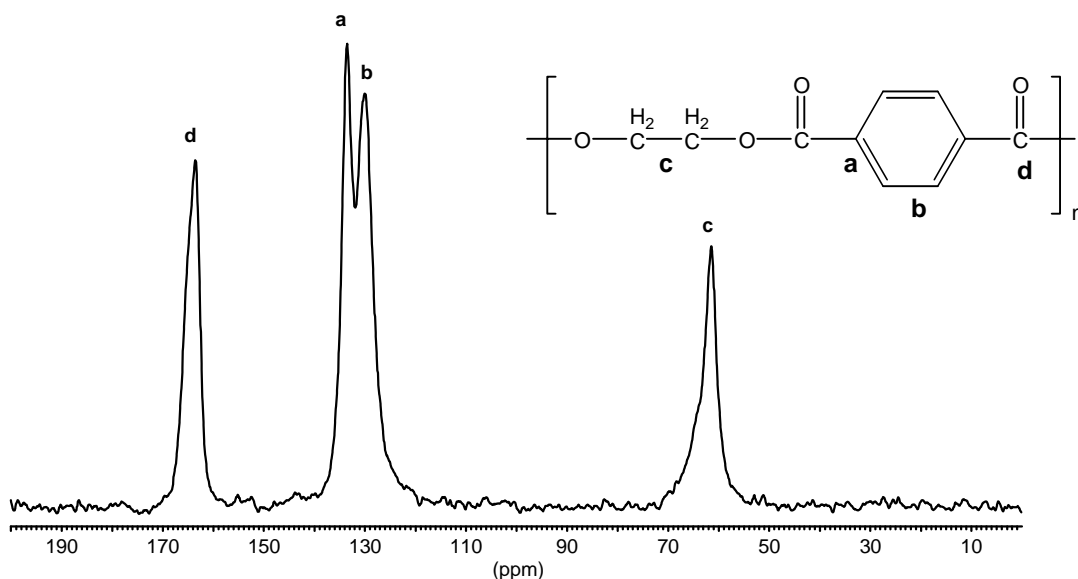


Abbildung 4: ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektrum des unbehandelten PET-Vlieses, d: Carboxyleinheiten, a, b: aromatische Reste, c: Ethylenglykoleinheiten.

Das ^1H -Festkörper-NMR-Spektrum bestätigt die Struktur des PET-Vlieses (siehe Abbildung 5). Wiederum sind nur die Signale der PET-Struktureinheiten zu erkennen. Die Resonanzen der Ethylenglykoleinheiten liegen bei 4.7 ppm, die Signale der aromatischen H-Atome der Terephthalsäurereste bei 8.1 ppm. Zusätzlich treten noch Signale von CH_2 - und CH_3 -Endgruppen auf.

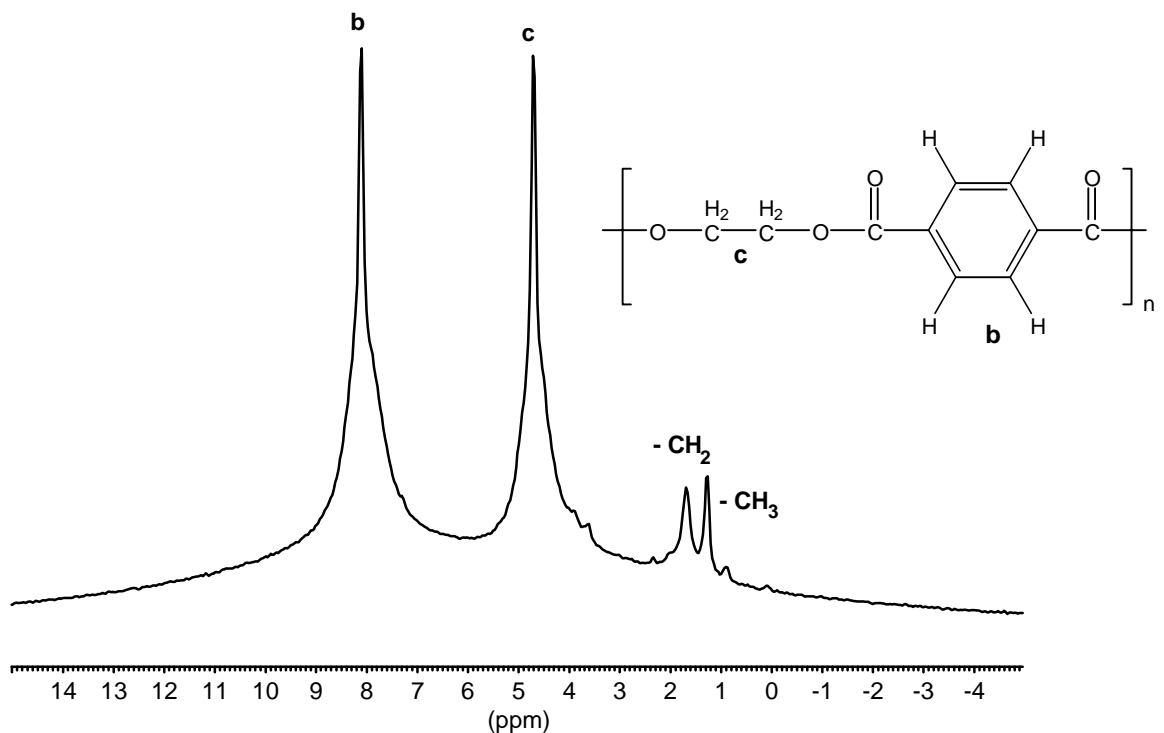


Abbildung 5: ^1H -Festkörper-NMR-Spektrum des unbehandelten PET-Vlieses, *b*: aromatische Protonen, *c*: Ethylenglykoleinheiten, $-\text{CH}_2$ und $-\text{CH}_3$ Signale der Endgruppen des Polyesters.

Aus den NMR-Spektren wird deutlich, daß nur Signale von PET zu erkennen sind. Weitere Zusatzstoffe sind zumindest in einer größeren Konzentration nicht enthalten.

4.2 Synthesestrategie zur Bindung von Trypsin an die Polyesteroberfläche

Zur Immobilisierung von Trypsin auf der Polyesteroberfläche wurden verschiedene Synthesewege herangezogen. Dabei wurden sowohl die direkte Kupplung als auch die Anbindung des Trypsins über verschiedene Spacer untersucht. In Abbildung 6 sind die unterschiedlichen Synthesestrategien schematisch dargestellt. Das direkt auf die Vlies-Oberfläche immobilisierte Trypsin kommt dabei in unmittelbarem Kontakt mit dem Trägermaterial (a). Bei der Verwendung von Abstandshaltern wird das Trypsin räumlich von der PET-Oberfläche getrennt. Mit dem bifunktionellen Polyethylenglykol (PEG)-Diamin werden kürzere lineare Verknüpfungen zwischen dem Vlies und Trypsin erzeugt (b). In Abbildung 6 sind die unterschiedlichen Synthesestrategien schematisch dargestellt. Das direkt auf die Vlies-Oberfläche immobilisierte Trypsin kommt dabei in unmittelbarem Kontakt mit dem Trägermaterial (a). Bei der Verwendung von Abstandshaltern wird das Trypsin räumlich von der PET-Oberfläche getrennt. Mit dem bifunktionellen Polyethylenglykol (PEG)-Diamin werden kürzere lineare Verknüpfungen zwischen dem Vlies und Trypsin erzeugt (b).

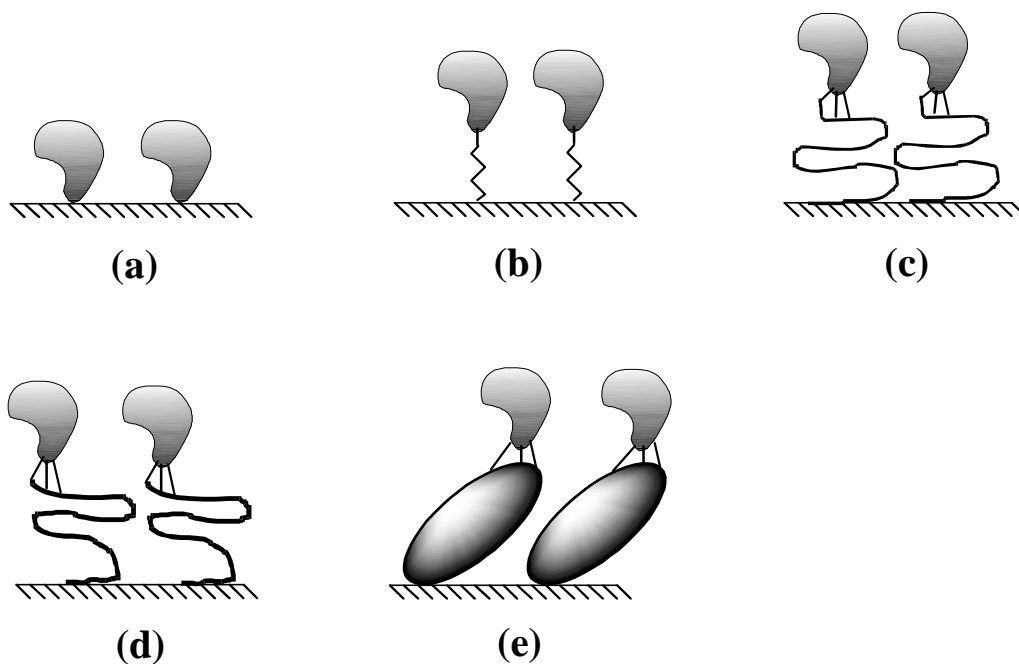


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen Spacerarten zur Immobilisierung von Trypsin auf der PET-Oberfläche. (a) direkte Anbindung an die Vlies-Oberfläche, (b) Immobilisierung über einen relativ kurzen, linearen Spacer, z.B. PEG-Diamin, (c) Immobilisierung mittels eines langen kettenartigen hydrophilen Spacers, z.B. Aldehyd-Dextran, (d) Amino-Dextran-Spacer, (e) Immobilisierung über einen großen, raumfüllenden Spacer, z.B. BSA.

Aldehyd-Dextran (c), Amino-Dextran (d) und BSA (e), besitzen mehrere freie Verknüpfungsstellen, was zur Ausbildung von Mehrfachbindungen zwischen Trypsin und den Spacern führen kann (Multi-Point-Attachment). Diese Art der Anbindung reduziert die Beweglichkeit des immobilisierten Enzyms, wobei dieser Effekt vor allem im Falle des BSA-Spacers zum Tragen kommt, wo ein sehr großes und fülliges Spacersystem eingesetzt wird.

4.2.1 Immobilisierungstechnik

4.2.1.1 Aktivierung der Vlies-Oberfläche

Zur Immobilierung des Trypsins über die zuvor beschriebenen unterschiedlichen Spacersysteme wurde die in Abbildung 7 und Abbildung 8 beschriebene Reaktionsführung gewählt. Da das Polyester-Material nur wenig freie funktionelle Gruppen enthält, die für die Bindung der Spacer oder direkte Verknüpfung mit Trypsin geeignet sind, muß das Vlies-Material durch eine vorgeschaltete Reaktion vorbereitet werden. Zur Erzeugung von freien Bindungsstellen werden durch eine partielle Hydrolyse des PET-Vlieses freie Carboxyl- und Hydroxylgruppen erzeugt, die danach als reaktive Zentren zur Anknüpfung der Spacer zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 7a).

Die auf diese Weise erzeugten Carboxylgruppen werden über Nacht mit N-Hydroxy-succinimid und Dicyclocarbodiimid (DCC) zur Reaktion gebracht, wobei eine aktivierte Vliesoberfläche erhalten wird, die durch vielfältige Synthesewege modifiziert werden kann (siehe Abbildung 7 b). Die Aktivierung wurde nicht nur im Falle der weiteren Modifizierung mit Spacern, sondern auch bei der direkten Anbindung des Trypsins an die Vliesoberfläche angewendet.

4.2.1.2 Direkte Bindung von Trypsin

Die direkte Bindung des Trypsins erfolgt über die Reaktion der aktivierten Carboxylgruppen des hydrolysierten Polyesters und den freien Aminogruppen des Enzyms. Die Reaktion entspricht dabei dem in Abbildung 7c dargestellten Syntheseweg ($\text{NH}_2\text{-Spacer-NH}_2$ entspricht hier dem Trypsin).

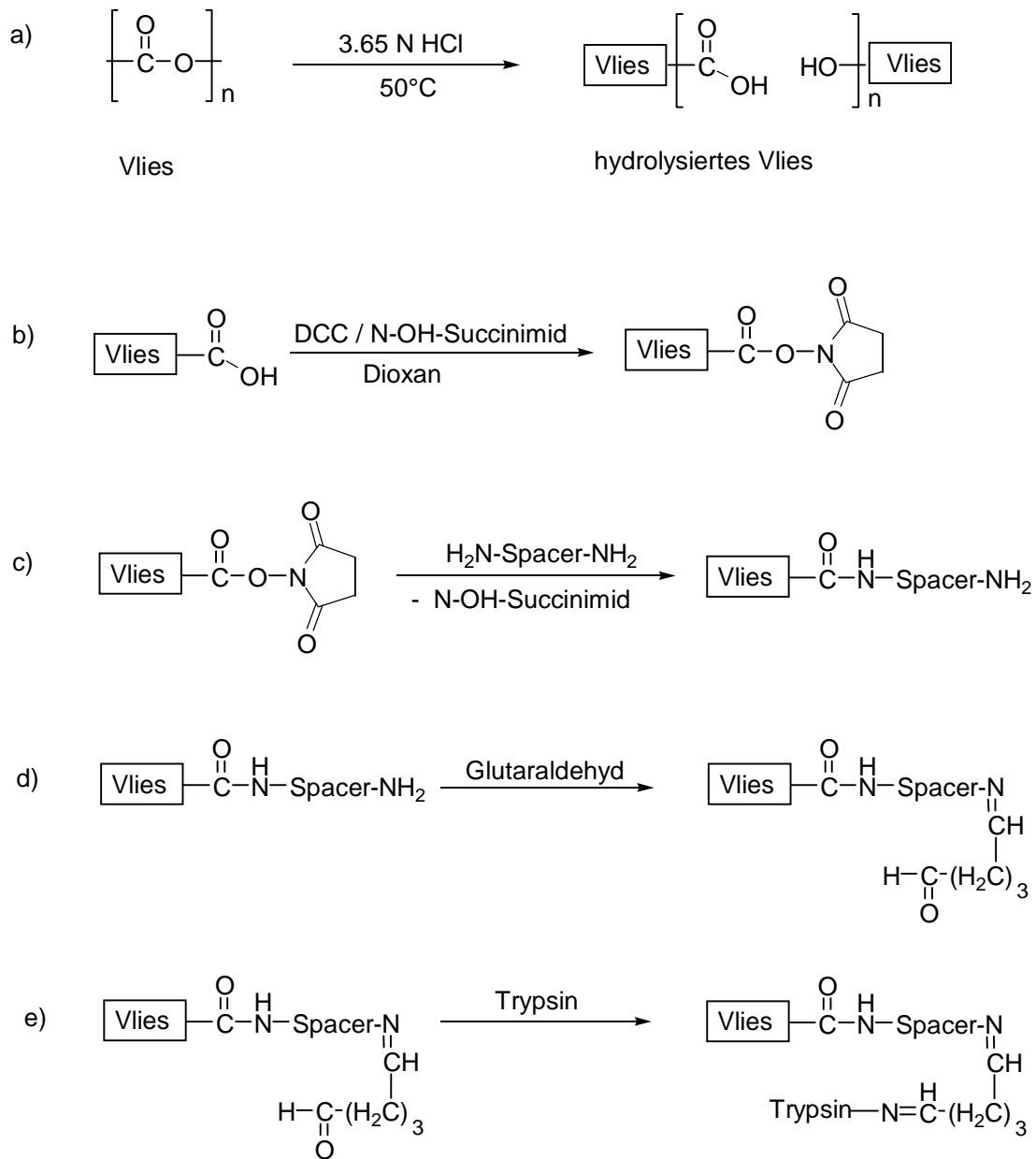


Abbildung 7: Syntheschema zur Darstellung von immobilisiertem Trypsin: (a) partielle Hydrolyse des Polyester-Vlieses, (b) Aktivierung der freien Carboxylgruppen mit *N,N*-Dicyclocarbodiimid und *N*-Hydroxysuccinimid, (c) Bindung der Spacer über freie Aminogruppen; Spacer-NH₂ repräsentiert hierbei die Spacer BSA, PEG-Diamin und Aminodextran, (d) Anbindung von Glutaraldehyd als Verbindungsglied (Linker) für die (e) Knüpfung von Trypsin durch Ausbildung einer Schiff'schen Base.

4.2.1.3 Bindung von Trypsin über Spacer

Zur Bindung von Trypsin einerseits über den Spacer Aldehyddextran sowie andererseits über PEG-Diamin, Aminodextran bzw. BSA wurden jeweils unterschiedliche Synthesewege gewählt. In Abbildung 8 sind diese schematisch dargestellt.

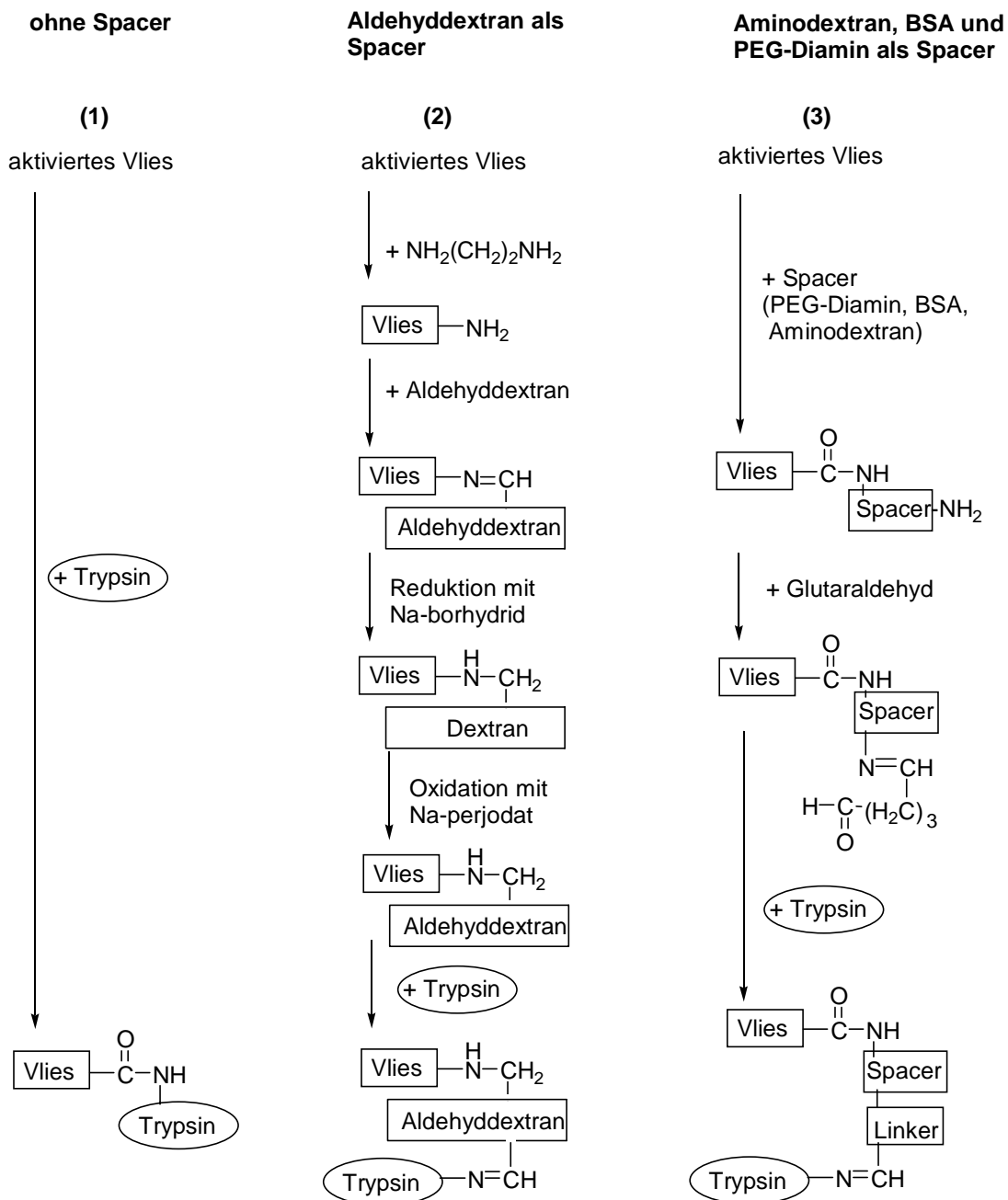


Abbildung 8: Schematische Darstellung der verschiedenen Synthesewege für die Immobilisierung von Trypsin mittels eines Spacers an PET-Vlies; (1) direkte Bindung des Trypsins, (2) Aldehyddextran als Spacer, (3) BSA, Aminodextran oder PEG-Diamin als Spacer, als Linker wird Glutaraldehyd eingesetzt.

4.2.1.3.1 Bindung von Trypsin über PEG-Diamin, Aminodextran und BSA-Spacer

Aminodextran wurde, wie in Abschnitt 3.2.1.4 beschrieben, über eine Reaktion aus Aldehyddextran mit Ethylendiamin und nachfolgender Reduktion der gebildeten Schiff'schen Base hergestellt (siehe Abbildung 9).

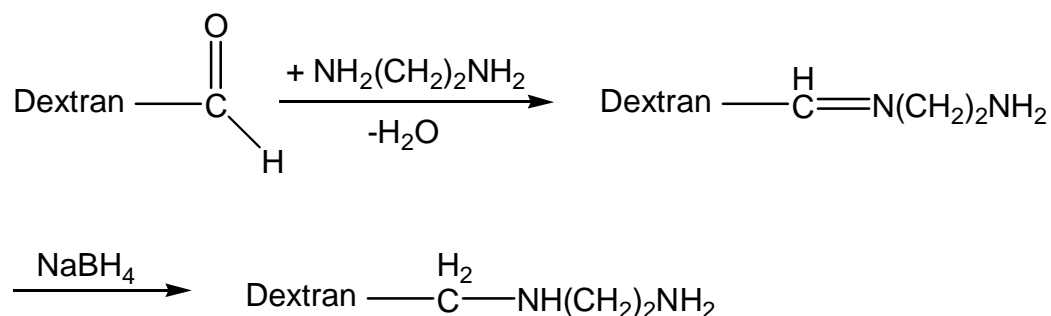


Abbildung 9: Darstellung von Aminodextran über Aldehyddextran.

Die Spacer PEG-Diamin, Aminodextran sowie BSA lassen sich durch direkte Reaktion der jeweils vorhandenen freien Aminogruppen an die mit N-hydroxysuccinimid-aktivierte PET-Oberfläche binden (siehe Abbildung 7c). Bei diesen Spacern stehen noch weitere freie Aminogruppen zur Verfügung, die zur Bindung des Trypsins verwendet wurden. Dazu wird das bifunktionelle Glutaraldehyd als Bindeglied zwischen Spacer und Enzym eingesetzt. Somit wird das Enzym durch die Bildung von zwei Schiff'schen Basen an das Trägermaterial gebunden.

4.2.1.3.2 Bindung von Trypsin über den Aldehyd-Dextran-Spacer

Um die freien Aldehydgruppen des Spacers an das PET-Vlies zu binden, muß im Vergleich zu den oben beschriebenen Spacern eine veränderte Synthesestrategie gewählt werden. Das aktivierte Trägermaterial wird in einer vorgeschalteten Reaktion mit Ethylendiamin modifiziert. Auf diese Weise lassen sich freie, auf dem Poylestermaterial immobilisierte Aminogruppen generieren, die zur Anbindung mit den Aldehydgruppen über eine Schiff'sche Base zur Verfügung stehen (siehe Abbildung 8). Um eine Stabilisierung zu erreichen, werden die Schiff'schen Basen reduziert. Bei dieser Reduktion werden allerdings auch zwangsläufig die restlichen freien Aldehydgruppen zu Alkoholen reduziert. Um die Bindung des Enzyms zu ermög-

lichen, müssen diese Hydroxylgruppen durch eine Oxidation wieder in Aldehyde überführt werden. Das Trypsin kann dann wieder über eine Schiff'sche Base Bindung an den Aldehyddextran-Spacer gebunden werden.

Im folgenden werden zunächst die Methoden zur quantitativen Bestimmung des Proteingehaltes beschrieben. Die Untersuchung der Enzymaktivität in Abhängigkeit der unterschiedlichen Spacer wird im Abschnitt 4.4 erläutert.

4.3 Entwicklung einer Proteinbestimmungsmethode für immobilisierte Enzyme

Zur Gehaltsbestimmung der auf Vliesen immobilisierten Proteine war ein reproduzierbarer Test erforderlich. Da die eingesetzten PET-Vlies-Materialien selbst in stärkeren Mineralsäuren stabil sind, können für diese Vliese ähnliche Tests wie bei löslichen Proteinen angewendet werden. Bei Vliestoffen kann es allerdings durch Auswaschung von Bestandteilen zu Beeinträchtigungen der Proteinbestimmung kommen, so daß die angewandte Methode jeweils auf das Vliesmaterial abgestimmt werden muß.

Eine Möglichkeit zur Bestimmung von immobilisierten Proteinen bietet eine Modifikation des Ninhydrintests (Rosen, 1957). Dabei wird der Proteingehalt nach einer sauren Hydrolyse bestimmt. Andererseits kann der Proteingehalt über einen modifizierten BCA Test bestimmt werden.

4.3.1 Proteinbestimmung über den Ninhydrintest

4.3.1.1 Entwicklung des Ninhydrintests für immobilisierte Proteine

Zur Bestimmung des Gehalts des auf dem PET-Vlies immobilisierten Proteins muß zuerst der Ninhydrintest nach Rosen (1957) auf die Versuchsbedingungen angepaßt werden. Bei der Ninhydrin-Reaktion tritt beim Erhitzen von Aminosäuren mit einer verdünnt wässrigen Ninhydrin-Lösung eine Blauviolett färbung auf. Dabei werden die Aminosäuren zum Amin decarboxyliert. Dieses unterliegt einer oxidativen Desami-

nierung zum Aldehyd, dabei wird Ninhydrin reduziert. Mit einem weiteren Molekül Ninhydrin bildet sich ein blau-violettes Reaktionsprodukt. Färbung und Stabilität des Farbstoffes hängen dabei stark von den Reaktionsbedingungen und den eingesetzten Chemikalien ab. So mußte das Ninhydrin stets frisch hergestellt werden, und die verwendeten Lösungsmittel mußten absolut peroxidfrei sein. Die eingesetzte KCN-Lösung wurde ebenfalls jeweils frisch hergestellt und der pH-Wert war streng zu kontrollieren.

Die immobilisierten Proteine wurden in einem ersten Schritt durch saure Hydrolyse gespalten. Da die verwendeten PET-Vliese im Gegensatz zu anderen Materialien (z.B. Polyamid-Vliesen) in sauren Medien stabil sind, konnte zur Hydrolyse der Proteine jeweils 6 N HCl eingesetzt werden.

Um die Menge des immobilisierten Proteins bestimmen zu können, mußte eine Eichgerade mit löslichem Protein herangezogen werden. Auch diese Versuchsbedingungen mußten wiederum auf das Protein abgestimmt werden. Dazu wurden 20 µl einer 2%-igen BSA-Lösung mit 1 ml 6 N HCl über Nacht bei 100°C hydrolysiert. In Methode 1 wurde das erhaltene Hydrolysat mit 3 ml Wasser und 1 ml 6 N Natronlauge versetzt. Dabei resultiert ein pH-Wert von 12.3, der aber sehr instabil ist und in einzelnen Proben auf 5.5 fällt. Um den pH-Wert besser zu kontrollieren zu können, wurde in Methode 2 das Hydrolysat mit 3 ml 2 M Acetat-Puffer pH 5.4 und 1 ml 6 N Natronlauge versetzt, wobei hierbei entsprechend der Pufferlösung ein stabiler pH-Wert von 5.4 vorliegt.

Zum Ninhydrintest wurden unterschiedliche Mengen (50 – 200 µl) der oben beschriebenen Lösungen (Methode 1 und 2) jeweils mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Anschließend wurden 100 µl des KCN/Na-acetat pH 5.4 und 100 µl Ninhydrinlösung (3%ige Methylcellulosol-Lösung) zugegeben. Nach 15 min Kochen wurde mit Eiswasser abgekühlt und nach Versetzen mit 1 ml 50%igem Isopropanol wurde die Absorption gemessen.

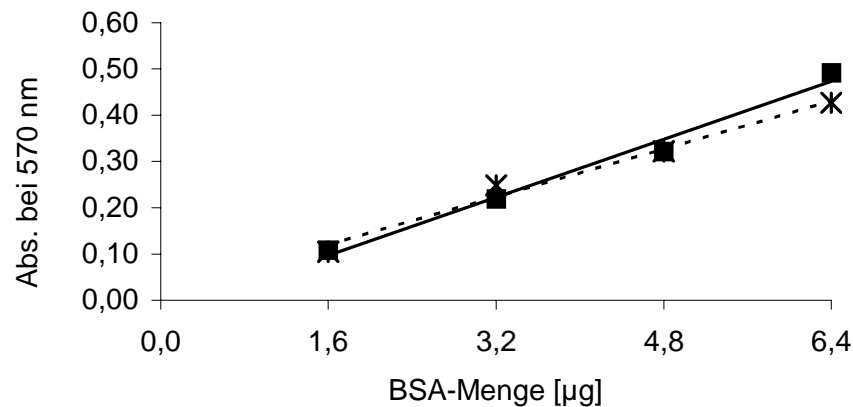


Abbildung 10: Optimierung des Ninhydrin-Tests für lösliches BSA. 20 µl einer 2 %igen BSA Lösung wurden über Nacht bei 100°C mit 1 ml 6 N HCl hydrolysiert und anschließend wie folgt behandelt: Methode 1 (*): Zugabe von 3 ml Wasser und 1 ml 6 N NaOH; Methode 2 (■): Zugabe von 3 ml Acetat-Puffer pH 5.4 und 1 ml 6 N NaOH.

Aus Abbildung 10 wird deutlich, daß bei beiden Methoden eine gute Linearität zwischen der gemessenen Absorption bei 570 nm und der Menge an löslichem BSA erzielt wurde. Nur bei Verwendung eines Puffersystems war es möglich, den pH-Wert zu kontrollieren (Methode 2). Da die erhaltenen Absorptionswerte relativ hoch waren, wurden die Probemengen zur Versuchsdurchführung weiter reduziert. In einer weiteren Modifikation (Methode 3) wurden 200 µl des auf die gleiche Weise hergestellten Hydrolysats mit 600 µl des 2.0 M Natriumacetat pH 5.4 und 200 µl 6 N NaOH versetzt. Die Relativ-Mengen blieben damit erhalten.

In Tabelle 2 sind die Auswirkungen von unterschiedlichen pH-Werten dargestellt. Dabei wurden jeweils 600 µl Puffer, der auf unterschiedliche pH-Werte eingestellt wurde, zu 200 µl Hydrolysat und 200 µl 6 N NaOH eingesetzt. Es wird deutlich, daß bei den eingesetzten Mengen ein stabiler pH-Wert von 5.4 nur im Pufferbereich des Acetatpuffers erhalten wird.

Tabelle 2: Auswirkungen der eingesetzten Pufferlösungen auf den resultierenden pH-Wert der Reaktionslösung nach der Methode 3 des Ninhydrintests. Es wurden 200 µl des Hydrolysats mit 200 µl 6 N NaOH und 600 µl unterschiedlichen Puffer umgesetzt.

pH-Wert des Puffers	resultierender pH-Wert in der Reaktionslösung
9	12.4
7.2	12.3
6.3	11.8
5.4	5.3
5.0	4.8

Der Einfluß des pH-Wertes auf die resultierende Absorption bei 570 nm wurde mit unterschiedlichen Mengen an BSA untersucht. Dabei wurde das Acetat-Puffersystem auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Nach Methode 3 wurden zu 200 µl des Hydrolysats jeweils 200 µl 6 N NaOH und 600 µl des Puffers mit unterschiedlichem pH-Wert hinzugegeben.

Tabelle 3: Absorptionswerte bei 570 nm nach dem Ninhydrintest bei Verwendung eines 2 M Acetatpuffers mit unterschiedlichen pH-Werten.

Menge an BSA [µg]	pH 9.0	pH 7.2	pH 5.4	pH 5.0
4	0.347	0.291	0.297	0.231
8	0.608	0.540	0.480	0.443
12	0.769	0.727	0.539	0.584
16	0.851	0.947	0.621	0.709

Aus Tabelle 3 wird deutlich, daß der pH-Wert einen großen Einfluß auf die erhaltenen Absorptionswerte bei 570 nm zeigt. Mit zunehmender Menge an BSA werden jeweils zunehmende Absorptionswerte erhalten. Die deutliche Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt aber, daß bei der Bestimmung nach dem Ninhydrintest sehr genau auf die Versuchsdurchführung geachtet werden muß.

Nicht nur einzelne Werte selbst, sondern vor allem die Reproduzierbarkeit spielt bei der Proteinbestimmung eine wichtige Rolle. Zur Untersuchung in Tabelle 4 wurden jeweils 100 μl (entsprechend 8 μg BSA) der Reaktionsmischung zum Ninhydrintest eingesetzt und der Versuch dreimal wiederholt. Nur bei einem pH-Wert von 5.4 wird eine gute Reproduzierbarkeit der gemessenen Absorptionswerte erhalten. In niedrigeren oder höheren pH-Werten tritt eine große Streuung der Meßwerte auf. Diese Bereiche sind daher für eine quantitative Aussage nicht geeignet.

Tabelle 4: Reproduzierbarkeit des Ninhydrintests nach Methode 3 bei unterschiedlichen pH-Werten des eingesetzten Acetat-Puffers; Absorptionswerte bei 570 nm, entsprechend 8 μg BSA wurden bestimmt.

	pH 9.0	pH 5.4	pH 5.0
Test 1	0.541	0.580	0.671
Test 2	0.782	0.516	0.538
Test 3	0.658	0.536	0.549

4.3.1.2 Optimierter Ninhydrintest: Eichgerade von löslichem BSA

Aus der oben beschriebenen Untersuchung ergab sich folgende Methode als optimal: Hydrolyse des immobilisierten bzw. des löslichen Proteins in 1 ml 6 N HCl über Nacht bei 100°C und anschließende Umsetzung von 200 μl diesen Hydrolysats mit 200 μl 6 N Natronlauge und 600 μl 2.0 M Natriumacetat pH 5.4. Zur Bestimmung der Eichgeraden des löslichen Proteins wurden jeweils unterschiedliche Mengen (50-200 μl) dieser Reaktionsmischung auf 200 μl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt. Mit dieser Mischung wurde der Ninhydrintest durchgeführt.

In Abbildung 11 ist die Eichgerade des löslichen BSA dargestellt. Dabei wurde eine große Meßwertedichte auf den Bereich bis zu einer Menge von 4.6 μg BSA gelegt. In diesem Bereich sollten auch die Meßwerte des immobilisierten BSA liegen. Es wird deutlich, daß im Meßbereich eine gute Linearität zwischen der BSA-Menge und der Absorption bei 570 nm erhalten wird.

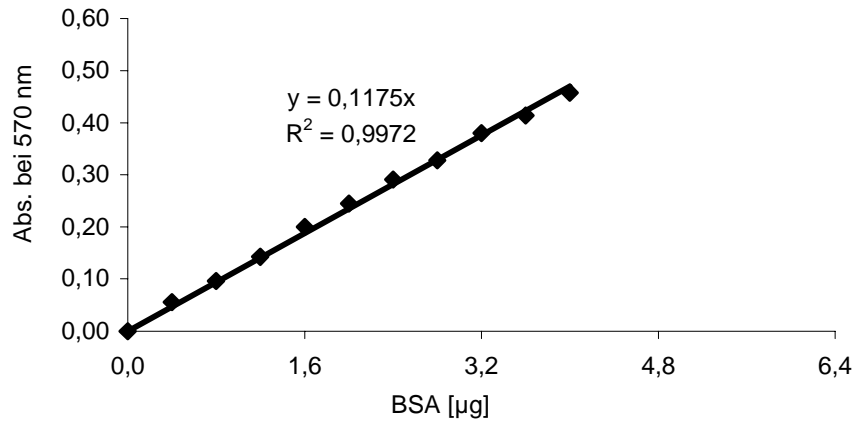


Abbildung 11: Eichgerade zur Bestimmung der BSA-Konzentration über den Ninhydrin-Test. 20 µl einer 2%igen-BSA Lösung wurden über Nacht bei 100°C mit 1 ml 6 N HCl hydrolysiert und anschließend wie folgt behandelt: Methode 3: Einsatz von 200 µl BSA-Hydrolysat, Zugabe von 600 µl Acetat-Puffer pH 5.4 und 200 µl 6 N NaOH.

4.3.1.3 Ninhydrintest an immobilisiertem BSA

Der Ninhydrintest am immobilisierten BSA wurde vergleichbar zum löslichen BSA durchgeführt. Das immobilisierte Protein (Vliesstücke mit 1 cm²) wurde in 1 ml 6 N HCl über Nacht bei 100°C hydrolysiert, wobei nach der Hydrolyse noch ein Volumen von 650 µl gemessen wurde. Anschließend wurden 200 µl dieses Hydrolysats mit 200 µl 6 N Natronlauge und 600 µl 2.0 M Natriumacetat pH 5.4 umgesetzt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der Ninhydrintest mit unterschiedlichen Mengen (50-200 µl) dieser Reaktionsmischung, die jeweils auf 200 µl Gesamtvolumen mit Wasser aufgefüllt wurde, durchgeführt.

Abbildung 12 zeigt die Meßwerte von Vliesstücken mit 1 x 1cm² und 2 x 1 cm². Dabei wurde bei den unterschiedlichen Vliesgrößen eine gute Linearität zwischen den unterschiedlichen Mengen an eingesetzter Reaktionsmischung und den Meßwerten der Absorption bei 570 nm erhalten. Zudem wird deutlich, daß bei der doppelten Menge an Vliesmaterial auch die doppelten Absorptionswerte erhalten wurden.

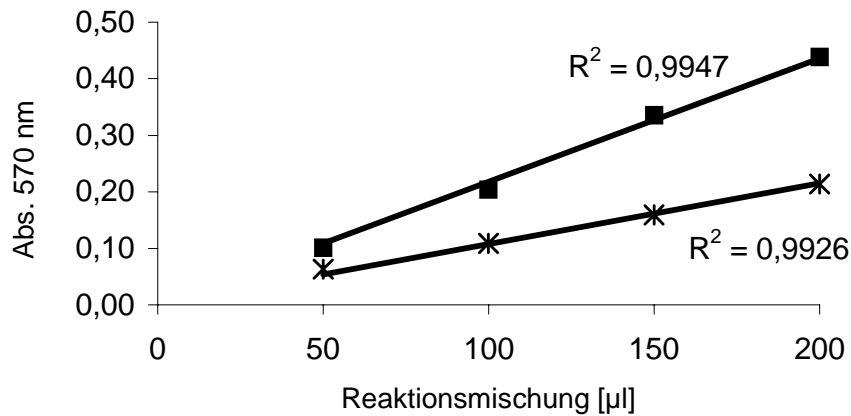


Abbildung 12: Ninhydrintest zur Bestimmung der Menge an immobilisiertem BSA auf den PET-Vliesen, die Vliese (1 cm²: *; und 2 x 1cm²: ■) wurden über Nacht bei 100°C mit 1 ml 6 N HCl hydrolysiert und anschließend wie folgt behandelt: Methode 3: Einsatz von 200 µl BSA-Hydrolysat, Zugabe von 600 µl Acetat-Puffer pH 5.4 und 200 µl 6 N NaOH, davon wurden jeweils 50-200 µl mit Wasser auf 200 µl verdünnt und zum Ninhydrintest eingesetzt.

Über die Meßwerte aus Abbildung 12 läßt sich mittels der Eichgeraden, die anhand von löslichem BSA bestimmt wurde (siehe Abbildung 11), die Menge an immobilisiertem BSA auf dem PET-Vlies abschätzen.

Tabelle 5: Absorption bei 570 nm nach dem Ninhydrintest und die daraus resultierende Menge des auf PET-Vlies immobilisiertem BSA.

Reaktionsmischung [µl]	Abs. 570 nm, Vliesgröße 1cm ²	Abs. 570 nm Vliesgröße 2 x 1 cm ²	Menge an BSA pro 1 cm ² [µg]	Menge an BSA pro 2 x 1 cm ² [µg]
50	0.063	0.101	34.85	55.87
100	0.109	0.204	30.15	56.43
150	0.159	0.336	29.32	61.96
200	0.214	0.439	29.60	60.71
Mittelwert			31.0 ± 2.6	58.7 ± 3.1

In Tabelle 5 sind die abgeschätzten Mengen an immobilisiertem BSA dargestellt. Die Gesamt-Mengen wurden jeweils auf das eingesetzte Vliesstück berechnet. Dabei wird deutlich, daß bei allen Messungen sehr vergleichbare Mengen resultieren. Es werden ca. 30 µg BSA pro cm² Vliesoberfläche auf dem PET-Vlies erhalten. Dies kann sowohl mit der Messung von einem Vliesstück mit 1 cm², als auch mit einem doppelt so großen Vliesstück von 2 cm² bestätigt werden. Um den Gehalt an kovalent-immobilisiertem Protein abschätzen zu können, wurden in einem Kontrollexperiment die Vliesstücke vor dem Proteintest mit einer 1%igen SDS-Lösung für 10 min bei 100°C gekocht. Auf diese Weise läßt sich das adsorbierte BSA entfernen, wobei das kovalent-immobilisierte BSA zurückbleibt (siehe 4.3.3).

4.3.2 Proteinbestimmung über den BCA-Test

Der BCA-Test basiert auf der Bildung eines stabilen violetten Kupfer-Komplexes. Bei der Gegenwart von Proteinen wird Cu²⁺ zu Cu⁺ reduziert. Im alkalischen Milieu bildet sich aus BCA und den Cu⁺-Ionen der typisch violett gefärbte [Cu(BCA)₂]⁺-Komplex, dessen Absorption bei 562 nm über einen große Bereich zur Proteinkonzentration proportional ist. Die Reduktion von Kupfer wird dabei durch die Peptidbindungen und durch oxidierbare Aminosäuren wie z.B. Tyrosin, Tryptophan oder Cystein verursacht.

4.3.2.1 Eichgerade von löslichem BSA

Zur Bestimmung der Menge an immobilisiertem Protein, ist die Korrelation mit einer bekannten Proteinmenge notwendig. Dazu wurde eine Eichgerade von löslichem BSA aufgenommen. Als Stammlösung wurden 1.0 mg/ml BSA in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 gelöst. 0 – 50 µl der Proteinlösung wurden vorgelegt und mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 950 µl einer Lösung C, mit BCA und CuSO₄ als Hauptbestandteile (siehe Kapitel 3.2.5.1) hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm gemessen. Abbildung 13 zeigt die Eichgerade. Es wird deutlich, daß eine sehr gute Linearität zwischen der Menge an BSA und der erhaltenen Absorption bei 562 nm erhalten wird. Im Absorptionsbereich zwischen 0 und 1.20 läßt sich die Menge an immobilisiertem BSA bestimmen.

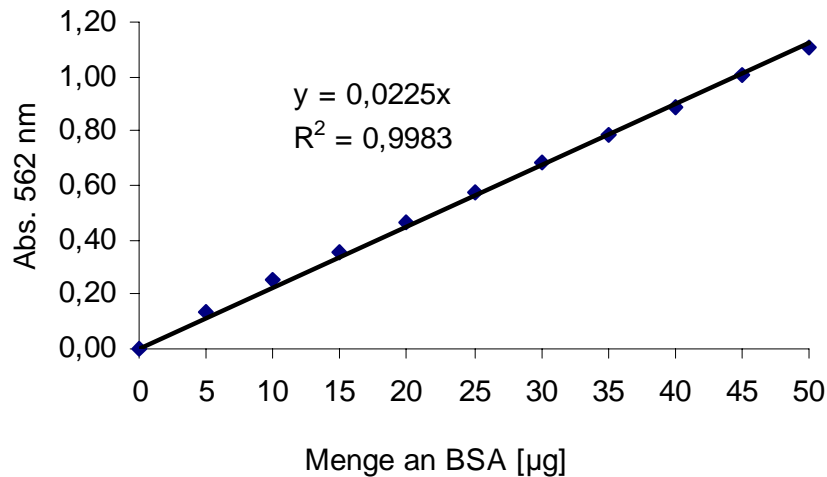


Abbildung 13: Eichgerade zur Bestimmung der BSA-Konzentration über den BCA-Test
Es wurden 0 bis 50 µl einer BSA-Stammlösung vorgelegt (1 mg/ml), mit destilliertem Wasser auf 50 µl aufgefüllt und mit 950 µl der BCA-Testlösung C versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Proben bei 562 nm gegen Wasser gemessen.

4.3.2.2 BCA-Test an immobilisiertem Protein

Der große Vorteil dieser Protein-Bestimmungsmethode liegt in der einfachen Durchführung. Das mit BSA immobilisierte Vlies-Material wurde in 1 ml der BCA-Testlösung C bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Vlies entfernt und die Absorption bei 562 nm gemessen. Durch einen Vergleich mit einer Eichgeraden von löslichem BSA konnte die Konzentration des auf dem Vlies vorhandenen Proteins bestimmt werden.

Abbildung 14 zeigt eine sehr gute Korrelation zwischen der Vliesgröße und der Proteinmenge. Über die Eichgerade aus Abbildung 13 läßt sich die immobilisierte BSA-Menge berechnen. Pro 1 cm²-Vlies waren etwa 25-30 µg Protein gebunden.

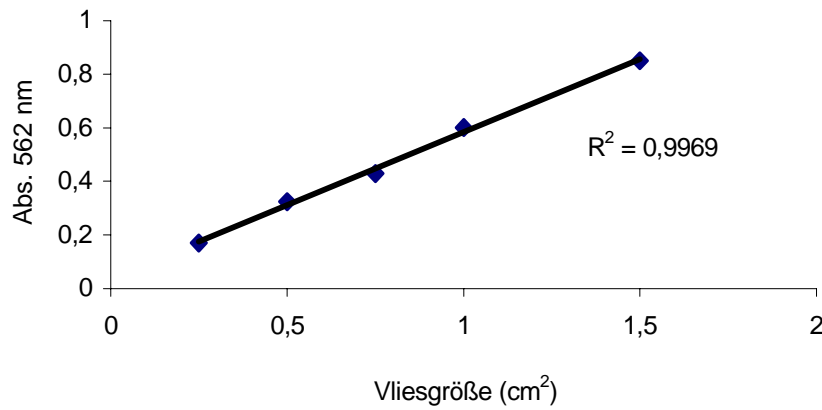


Abbildung 14: BCA-Proteinbestimmung der mit BSA immobilisierten PET-Vliese. Die Vliesstücke mit der angegebenen Größe wurden mit 1 ml der BCA-Testlösung C versetzt und nach 30 min Inkubation bei 37°C bei 562 nm gegen Wasser gemessen.

4.3.3 Vergleich von Ninhydrin- und BCA-Test

Aus der Beschreibung beider Testmethoden wird deutlich, daß die jeweilige Methodik zu vergleichbaren Ergebnissen führt. Bei der Proteinbestimmung werden etwa 30 µg BSA pro 1 cm² Vlies erhalten. Der BCA-Test ist aber dank seiner einfachen Durchführung dem Ninhydrin-Test klar vorzuziehen. Es sind keine Hydrolyseschritte nötig und die Proteinmenge wird ohne weitere Verdünnung oder Nachbehandlung direkt mit dem Vlies bestimmt. Allerdings handelt es sich bei der durch den jeweiligen Test bestimmten Menge nicht um rein kovalent-immobilisiertes Protein; es ist auch noch ein größerer Anteil an nicht kovalent angebundenem, adsorbiertem Protein enthalten. Um diesen Anteil abschätzen zu können, wurden in einem Kontrollexperiment die Vliesstücke vor dem Proteintest mit einer 1%igen SDS-Lösung für 10 min bei 100°C gekocht. Auf diese Weise läßt sich das adsorbierte BSA entfernen, wobei das kovalent-immobilisierte BSA zurückbleibt.

Tabelle 6: BSA-Proteinmenge nach dem Ninhydrin- und dem BCA-Test. Unterschied von immobilisiertem und adsorbiertem Protein (Menge pro 1 cm² PET-Vlies).

Vorbehandlung des Vlieses	Ninhydrin-Test	BCA-Test
ohne SDS	27,9 µg	28,6 µg
mit SDS	16,1 µg	16,5 µg

Aus Tabelle 6 wird deutlich, daß neben dem immobilisiertem BSA noch ein großer Anteil von adsorbiertem BSA vorhanden war. Nach der Entfernung des nicht kovalent gebundenen BSA werden etwa 60% des Ausgangswertes erhalten. Beide Methoden liefern wiederum vergleichbare Ergebnisse und bestätigen einen Anteil von ca. 40 % nicht kovalent gebundenem BSA.

4.4 Bestimmung der Trypsin Aktivität in Abhängigkeit der verschiedenen Spacer

Um die Effizienz der verschiedenen Synthesewege bewerten zu können, wurde die Aktivität des immobilisierten Trypsins direkt nach der Immobilisierungsreaktion und auch nach einer Woche Lagerung bei 4°C in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 bestimmt. Zur Bestimmung der Aktivität wurden N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid (BAPNA) und Azocasein als Substrat eingesetzt.

4.4.1 BAPNA als Substrat

Hierbei wurde die Aktivität von Trypsin über die Zunahme der Absorption bei 405 nm und 25°C verfolgt. Die Aktivität wurde als $\mu\text{mol BAPNA}$ definiert, das in einer Minute bei einem Absorptionskoeffizienten $\epsilon_{405} 96201 \text{ (mol cm)}^{-1}$ hydrolysiert wird.

Zur Bestimmung des Absorptionsverlaufs über der Inkubationszeit wurde Trypsin über den BSA-Spacer immobilisiert und in seiner Aktivität verfolgt. Nur wenn im linearen Ast der Kurve gemessen wird, kann die Aktivität auf die Menge an immobilisiertem Trypsin bezogen werden. In Abbildung 15 ist der zeitliche Verlauf der Absorption bei 405 nm dargestellt. Es wird deutlich, daß der Meßpunkt bei 30 min noch innerhalb des linearen Bereiches liegt und damit Aussagen über die Trypsinaktivität pro Zeit- und Flächeneinheit zuläßt.

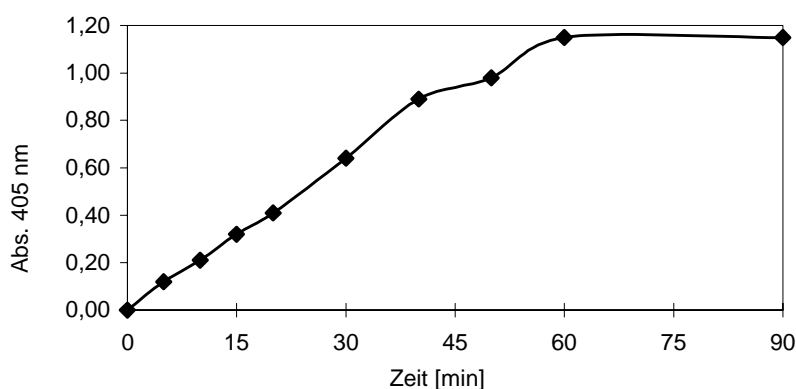


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei 405 nm, Immobilisierung des Trypsins über den BSA-Spacer.

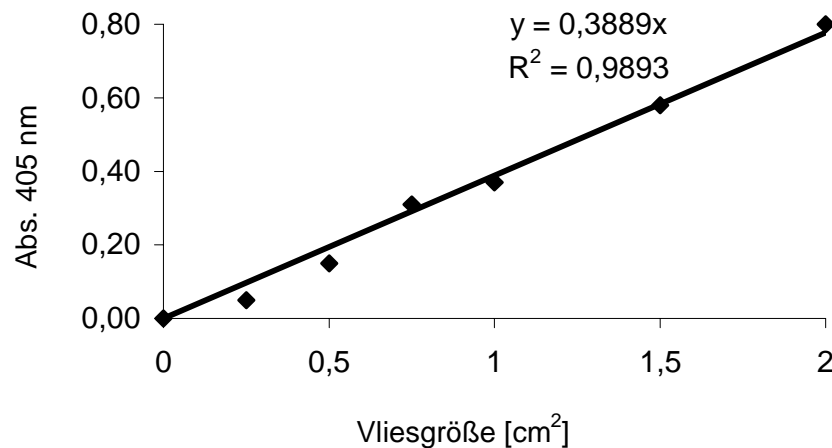


Abbildung 16: Abhängigkeit der Absorption bei 405 nm von der Vliesgröße, Messung über das BABNA-Substrat nach 15 min, Immobilisierung des Trypsins über den BSA-Spacer.

Abbildung 16 zeigt die Abhängigkeit der Absorption von der Größe der eingesetzten Vliese, die mit Trypsin über den BSA Spacer modifiziert wurden. Die einzelnen Meßpunkte wurden mit 15 Minuten innerhalb des linearen Bereiches der Absorption über der Zeit gewählt (siehe Abbildung 15). Daher ist der lineare Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Vliesgrößen und der Absorption direkt in Verbindung mit einer homogenen Verteilung des immobilisierten Proteins zu bringen. Je mehr Trypsin auf der Vliesoberfläche gebunden ist, bzw. je größer die eingesetzten Vliesstücke sind, desto schneller findet die Zersetzung des BAPNA-Substrates statt.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der verschiedenen Immobilisierungstechniken mit den unterschiedlichen Spacern im Überblick dargestellt.

4.4.2 Azocasein als Substrat

Um die Aktivität des immobilisierten Enzyms auf makromolekularen Substraten (Azocasein) zu bestimmen, wurde das Vliesstück (1 cm²) in einer Lösung von Azocasein bei 25°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde das Vlies entnommen und die Absorption des Überstandes bei 350 nm gegen eine Kontrollreaktion ohne Vlies vermessen. Die Aktivität ist definiert als die Menge Enzym, die unter Testbedingungen eine Absorptionsänderung von 1 pro 30 min bewirkt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

4.4.3 Aktivität des immobilisierten Trypsins

Zur Bestimmung der Aktivität anhand der unterschiedlichen Substrate wurden die verschiedenen Synthesewege jeweils mehrfach durchgeführt. Die zuvor beschriebenen Kupplungsreaktionen (siehe Kapitel 4.2) erwiesen sich dabei als gut reproduzierbar. Die Enzymaktivität der jeweils unabhängig voneinander immobilisierten Proben variierte dabei um ca. 20%, wovon der Mittelwert in Tabelle 7 aufgetragen ist.

Tabelle 7: Abhängigkeit der Aktivität des auf Polyestervlies FO 2413 über verschiedene Spacer immobilisierten Trypsins. Die Trypsin-Aktivität wurde über das Substrat N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA), als auch über das Azocasein-Substrat bestimmt. (A) wurde direkt nach der Immobilisierung getestet, (B) wurde nach Lagerung in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7,5 bei 4°C über eine Woche aufgenommen.

Spacer	Proteingehalt ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Trypsin-Aktivität		
		BAPNA ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{cm}^2 \cdot 10^{-2}$)		Azocasein ($\Delta\text{E}/\text{cm}^2$)
		(A)	(B)	
direkte Immobilisierung	23,12	2,9	0,4	nicht detektierbar
Aldehyd-Dextran	11,26	4,9	3,9	0,13
PEG-Diamin	18,23	9,7	9,3	0,30
Amino-Dextran	33,52	11,3	10,0	0,33
BSA	38,17	15,0	14,2	0,45

Es wird deutlich, daß das direkt gebundene Trypsin die niedrigste Aktivität zeigte und diese innerhalb einer Woche Lagerung fast vollständig verlor. Relativ kleine Werte wurden auch bei der Immobilisierungsvariante über den Aldehyd-Dextran Spacer erhalten. Diese Werte blieben allerdings innerhalb einer Woche Lagerzeit weitgehend stabil. Die größten Ausbeuten an immobilisierter Trypsinaktivität ergaben sich mit den Spacern PEG-Diamin, Amino-Dextran und BSA. Sie zeigten innerhalb einer Woche eine gute Lagerstabilität mit nur geringen Abnahmen der Enzymaktivitäten. Dabei stellte sich der Weg über den BSA-Spacer als sehr effiziente Immobilisierungsmethode heraus. Es wurden sowohl beim BAPNA-Test als auch mit dem Azocasein-Test die höchsten Werte erhalten.

4.4.4 Charakterisierung des immobilisierten Trypsins

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften des immobilisierten Trypsins wurden jeweils im Vergleich zum freien Enzym über verschiedene Stabilitätstests untersucht. Da Trypsin, welches über die Spacer PEG-Diamin, Amino-Dextran und BSA gebunden wurde, im Vergleich zum direkt immobilisierten Trypsin und dem auf Aldehyd-Dextran-Spacer gebundenen Trypsin deutlich höhere Aktivitäten zeigte, wurde im folgenden nur über die drei erstgenannten Spacer gebundenes Trypsin weiter untersucht.

4.4.4.1 Temperaturstabilität

Um den Einfluß der Spacer PEG-Diamin, Amino-Dextran und BSA auf die Temperaturstabilität des immobilisierten Trypsins zu untersuchen, wurde die Aktivität des Trypsins nach unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 50°C in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 bestimmt. Parallel dazu wurde lösliches Trypsin untersucht.

Das über Spacer gebundene Trypsin zeigte dabei fast keine Veränderung der Aktivität. Es wurde ein nahezu stabiler Verlauf über der Inkubationszeit erhalten. Dabei fällt auf, daß das über den BSA-Spacer immobilisierte Trypsin, auch nach über 6 h bei 50°C praktisch den Ausgangswert besaß. Der Aminodextran-Spacer ergab ebenfalls kaum abnehmende Aktivitätswerte. Trypsin, das über PEG-Diamin gebunden wurde, nahm

zu Beginn der Inkubation leicht ab, zeigte im weiteren Verlauf wiederum ein stabiles Verhalten und besaß nach 6 h bei 50°C noch etwa 80 % des Ausgangswertes (siehe Abbildung 17).

Lösliches Trypsin zeigte dem gegenüber ein völlig anderes Verhalten. Schon nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei 50°C verlor es die Hälfte seiner ursprünglichen Aktivität. Nach 30 Minuten sank die Aktivität auf ein Drittel des Ausgangswertes, nach 1 h war schon ein Großteil der Aktivität verloren gegangen. Im Vergleich zum immobilisierten Trypsin verlor lösliches Trypsin im weiteren Verlauf bis auf 6 h seine Aktivität vollständig.

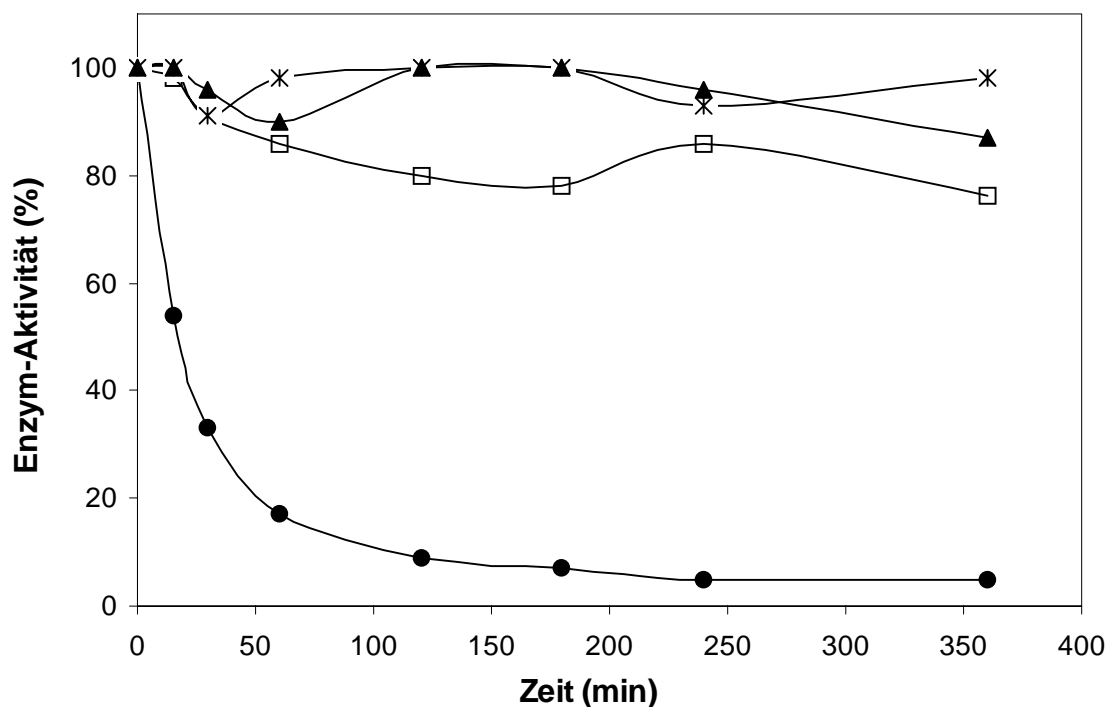


Abbildung 17: Temperaturstabilität von immobilisiertem und löslichem Trypsin. Freies Trypsin (●, 25 µg/ml) und Vlies-Stücke von jeweils 1 cm² mit über den PEG-Diamin- (□), Amino-Dextran- (▲) und den BSA-Spacer (*) immobilisiertem Trypsin wurden bei 50°C in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden repräsentative Proben gezogen, wobei die Enzymaktivität über das BAPNA-Substrat bestimmt wurde.

4.4.4.2 pH-Stabilität

Der Effekt der unterschiedlichen Spacer wurde ebenfalls in Hinsicht auf die pH-Stabilität im Bereich von pH 4 bis pH 12 untersucht. Dazu wurden die immobilisierten PET-Vliese (1 cm²) für jeweils 1 h bei Raumtemperatur in Theorell-Stenhagen-Puffer mit den unterschiedliche pH-Werten gelagert. In Abbildung 18 sind die Aktivitätswerte nach Lagerung bei unterschiedlichen pH-Werten aufgetragen. Im Vergleich zum löslichen Trypsin wird ein bemerkenswerter Stabilisierungseffekt der Spacer deutlich. Trypsin, das über Spacer immobilisiert wurde, zeigt eine hervorragende pH-Stabilität in einem weiten Bereich von pH 4 bis pH 11. Selbst bei einem pH-Wert von 12 bleiben noch über 50 % der Ausgangsaktivitäten erhalten. Dabei fällt auf, daß sich das an unterschiedlichen Spacer immobilisierte Trypsin sehr ähnlich verhielt. Lösliches Trypsin dagegen war nur in einem pH-Bereich von 4-6 stabil und besaß schon bei pH 7 nur noch 70 % seiner Ausgangsaktivität. Über einem pH-Wert von 9 verlor es seine Aktivität fast vollständig. Dies zeigt, daß kleine pH-Werte weder auf die Aktivität von freiem Trypsin noch auf die Aktivität von immobilisiertem Trypsin einen Einfluß besitzen. Bei höheren pH-Werten ist der stabilisierende Effekt der Spacer deutlich sichtbar.

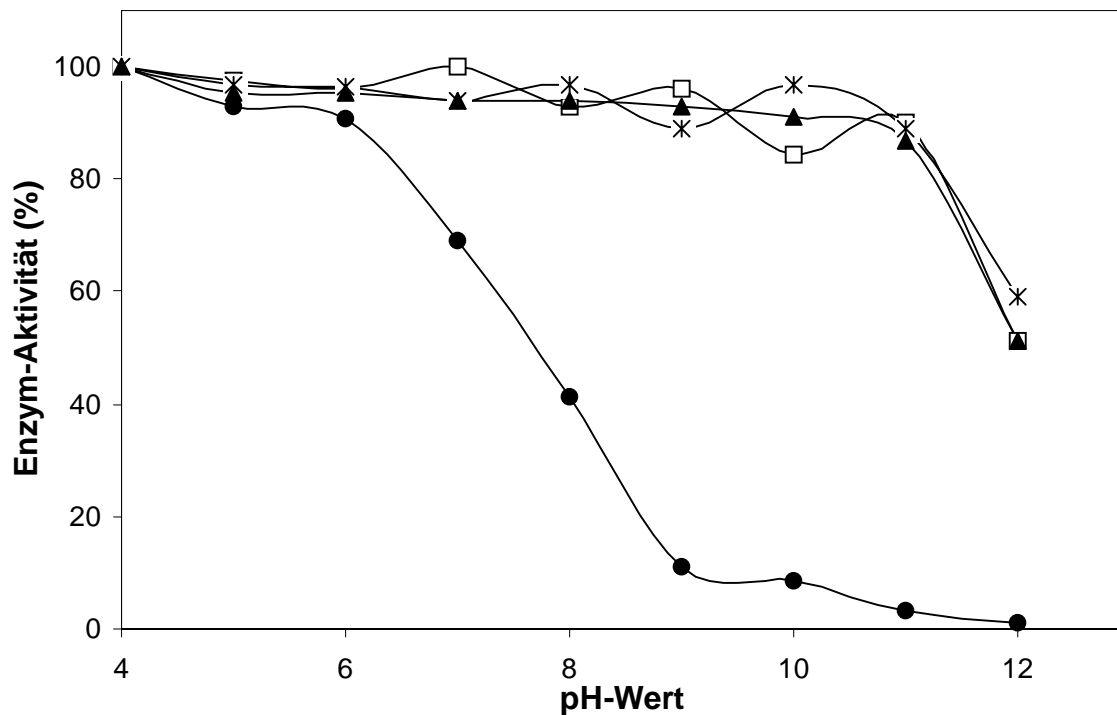


Abbildung 18: Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität des über verschiedene Spacer immobilisierten Trypsins im Vergleich zum pH-Verhalten von löslichem Trypsin. Vlies-Stücke von 1 cm^2 wurden für 1 h bei Raumtemperatur in unterschiedlichen pH-Werten von pH 4 bis pH 12 inkubiert und anschließend mit 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 gewaschen. Direkt danach wurde die Aktivität über das BAPNA-Substrat getestet. PEG-Diamin- (□), Amino-Dextran- (▲) und BSA-Spacer (*). Freies Trypsin (●, 25 $\mu\text{g/ml}$) wurde bei den gleichen Bedingungen inkubiert und vermessen.

4.4.4.3 Stabilität in Ethanol/Wasser

Nicht zuletzt für technische Anwendungen ist sehr wichtig, daß die immobilisierten Enzyme relativ harte Umweltbedingungen tolerieren können. Dazu wurde die Stabilität des immobilisierten Trypsins in Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Polarität untersucht. Das über verschiedene Spacer immobilisierte Trypsin wurde in Ethanol-Wasser Lösungen mit zunehmender Ethanol-Konzentration für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Solche Lösungen werden für längere Lagerung der Vliese zur Verhinderung von mikrobiellen Befall eingesetzt. Abbildung 19 zeigt das Verhalten der Enzymaktivität in Lösungen mit zunehmender Ethanol-Konzentration. Dabei wird deutlich, daß in reinem Wasser durchweg sehr hohe Aktivitätswerte

erhalten wurden. Das lösliche Trypsin verlor bei zunehmender Ethanol-Konzentration deutlich an Aktivität. Nach einer Inkubation von 30 Minuten in 60 % Ethanol waren nur noch etwa 20 % der Ausgangsaktivität erhalten. Noch höhere Ethanolkonzentration führten zum völligen Absinken der Aktivität des freien Trypsins. Diese hohen Ethanolkonzentration desaktivieren das freie Trypsin demnach vollständig.

Das immobilisierte Trypsin dagegen besaß auch bei hohen Ethanolkonzentrationen noch relativ hohe Aktivitäten. Selbst in 80 % Ethanol behielt das immobilisierte Trypsin noch über 80 % seiner ursprünglichen Aktivität. Erst in 100 % Ethanol kam es zum Absinken der Aktivität, aber auf einem hohen Niveau von etwa 70-80 %. Es wird deutlich, daß das über die verschiedenen Spacer immobilisierte Trypsin in schwach polaren Lösungen eine im Vergleich zum freien Trypsin stark verbesserte Stabilität besitzt.

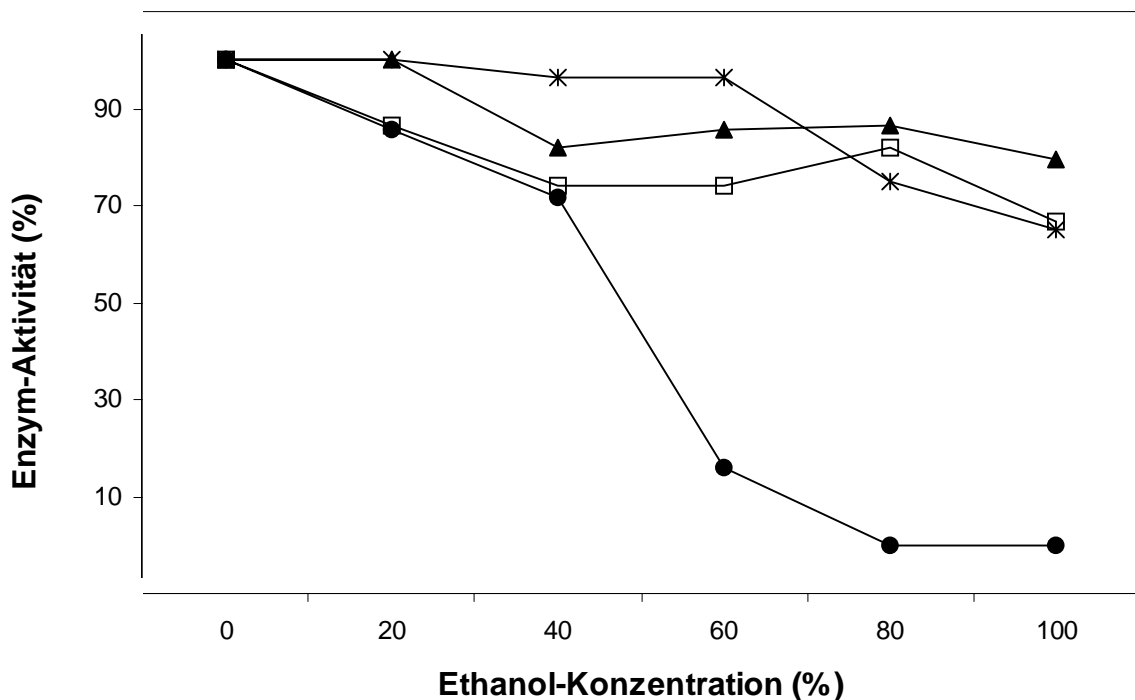


Abbildung 19: Stabilität von freiem (●, 25 µg/ml) und immobilisiertem Trypsin in Ethanol/Wasser-Mischungen (v/v) mit unterschiedlichen Konzentrationen. PEG-Diamin- (□), Amino-Dextran- (▲) und BSA-Spacer (*). Jeweils 1 cm² des modifizierten Vliesmaterials sowie das freie Trypsin wurden bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert, die Aktivität wurde anschließend über das BAPNA-Substrat bestimmt.

4.4.4.4 Einfluß unterschiedlicher Lagerbedingungen

Für eine technische Verwendung des immobilisierten Trypsins mußte eine einfache Lagerform gefunden werden, die die Aktivität des Enzyms stabil erhält. Eine Möglichkeit dafür war die Trocknung der immobilisierten Enzyme direkt aus der wässrigen Puffer-Lösung. Die meisten Enzyme erleiden durch eine solche Behandlung große Verluste in ihrer Aktivität. Um die optimalen Lagerformen zu untersuchen, wurden die über den BSA-Spacer immobilisierten Enzyme unter unterschiedlichen Bedingungen getrocknet und anschließend in ihrer Aktivität untersucht. Im Vergleich dazu wurden andere Proben im feuchten Zustand ohne einen Trocknungsschritt untersucht. In Abbildung 20 sind die Aktivitäten des über den BSA-Spacer immobilisierten Trypsins nach den unterschiedlichen Behandlungen und einer Lagerung von 2 Wochen aufgetragen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Vlies nach der Immobilisierungsreaktion mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet wurde. Dabei wurde das 1 cm² große Vliesstück aus 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 entfernt und dreimal mit 5 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einem Filterpapier und an der Luft über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Aus Spalte (1) der Abbildung 20 wird deutlich, daß im Vergleich zu einer Referenzmessung direkt nach der Immobilisierung die Aktivität praktisch vollständig erhalten bleibt.

Wurde das immobilisierte Trypsin über 2 Wochen bei 4°C in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 gelagert, so ist ebenfalls kein nennenswerter Verlust zur Ausgangsaktivität feststellbar (Abbildung 20, Spalte 2). Wurde allerdings dieser Puffer vor dem Trockenschritt nicht durch Waschschrte mit Wasser entfernt, so tritt nach der zweiwöchigen Lagerung ein deutlicher Aktivitäts-Verlust von über 50 % auf (Spalte 4). Eine Trocknung direkt aus dem Herstellungsprozeß heraus ist demnach nicht zu empfehlen. Waschen von immobilisiertem Trypsin vor dem Trocknen mit einer 70 %igen Ethanol/Wasser-Mischung erhielt nach einer zweiwöchigen Lagerung im trockenen Zustand 80 % der Aktivität (Spalte 3). Wurde dagegen auf den Trocknungsschritt verzichtet und die Lagerung in einer 70 %ige Ethanol/Wasser-Mischung durchgeführt, so trat ein deutlicher Aktivitäts-Verlust auf (Spalte 5). Nach zwei Wochen bei 4°C waren nur noch 43 % des Ausgangswertes meßbar.

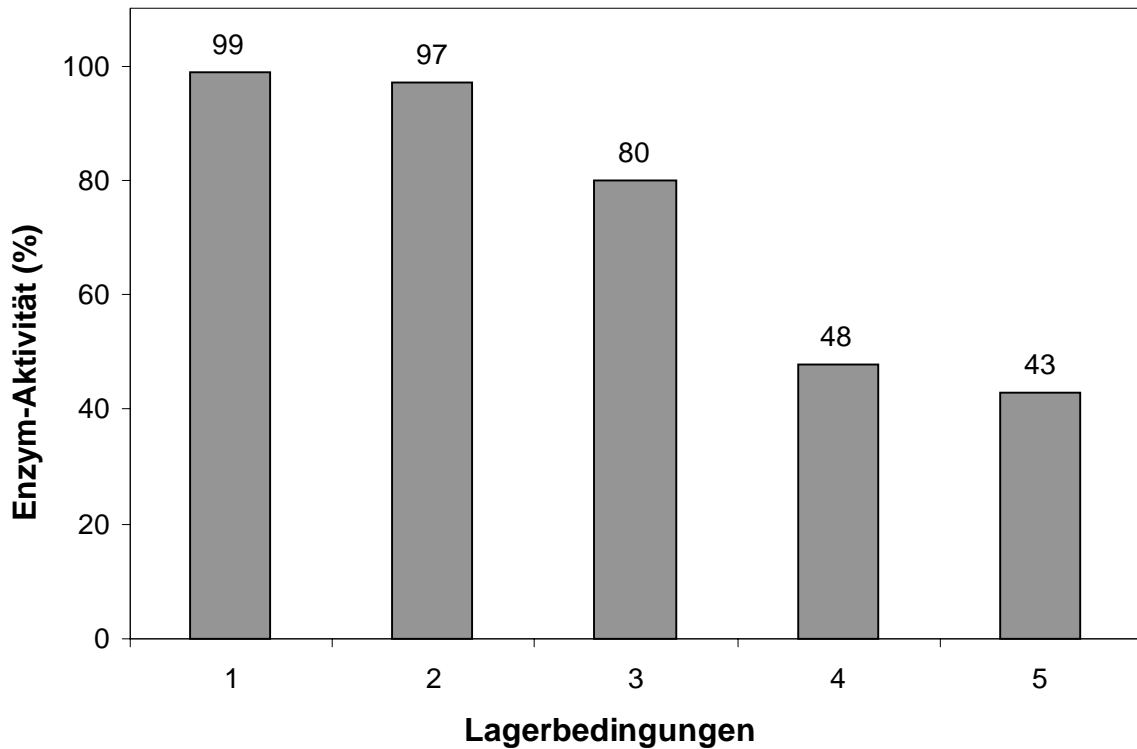


Abbildung 20: Einfluß von verschiedenen Lagerbedingungen auf immobilisiertes Trypsin, das über den BSA-Spacer gebunden wurde. Die Aktivität direkt nach der Immobilisierung ($0.15 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{cm}^2$) diente als 100%-Referenz. Für das Trocknen wurde der Überstand mit einem Filterpapier entfernt. Zur Aktivitätsmessung wurde 1 cm^2 Vlies mit $0.1 \text{ ml } 0.1 \text{ M}$ Kaliumphosphat pH 7.5 befeuchtet, die Aktivität wurde mittels des BAPNA-Substrates gemessen; (1) Waschen mit Wasser und Trocken, Lagerung für 2 Wochen bei Raumtemperatur; (2) zweiwöchige Lagerung in 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 bei 4°C ; (3) Waschen mit 70 %igen Ethanol und Trocken; (4) Trocken direkt nach dem Herstellungsprozeß ohne zusätzliche Waschschrirte; (5) zweiwöchige Lagerung in einer 70 % Ethanol/Wasser-Mischung bei 4°C

4.4.4.5 Stabilität nach wiederholtem Einsatz

Für einen Einsatz des immobilisierten Trypsins in technischen Prozessen ist wichtig, daß das Trypsin seine Aktivität auch nach wiederholten Einsätzen beibehält. Um solche Einsätze zu simulieren, wurde das Trägermaterial mit 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 mehrmals gewaschen, wobei die Aktivität des über den BSA-Spacer immobilisierten Trypsins mittels des BAPNA-Substrats nach den Waschvorgängen jeweils neu bestimmt wurde. Die direkt nach dem Herstellungsprozeß gemessene

Aktivität diene als Referenz für 100 %.

Aus Abbildung 21 wird deutlich, daß die wiederholten Waschvorgänge, die sich nach einer Verwendung des Trypsins zur Spaltung des BAPNA-Substrates bzw. zur gleichzeitigen Messung der Aktivität anschlossen, keinen wesentlichen Einfluß auf die resultierende Aktivität besaßen. Damit kann immobilisiertes Trypsin wiederholt eingesetzt werden, ohne Einbußen in seiner Aktivität zu erleiden. Ein wesentlicher Vorteil zur löslichen Variante besteht hierbei in einer leichten Abtrennung des immobilisierten Trypsins von der Testmischung.

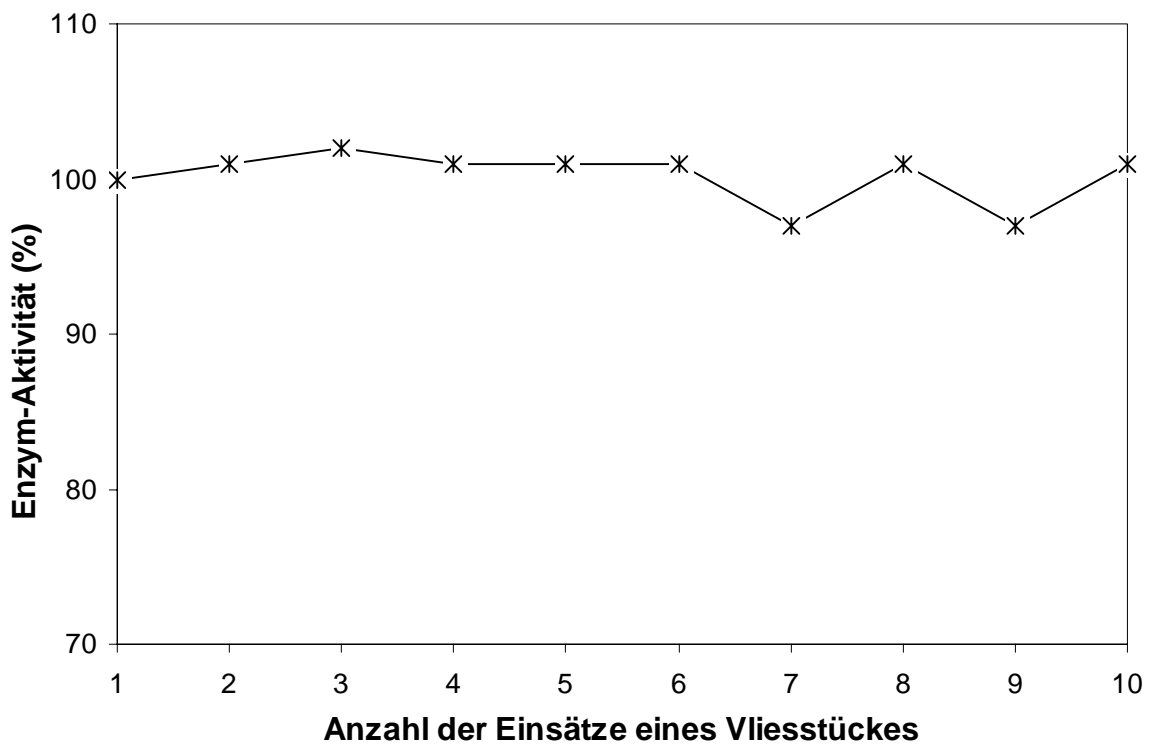


Abbildung 21: Einfluß einer mehrmaligen Verwendung des über den BSA-Spacer immobilisierten Trypsins. Das 1 cm^2 große Vliesstück wurde mit BAPNA als Substrat getestet und anschließend jeweils dreimal mit 0.1 M Kaliumphosphat pH 7.5 gewaschen und wiederholt getestet.

4.4.5 Reaktionsverfolgung mittels NMR-Spektroskopie

Um den Verlauf der durchgeführten Synthese verfolgen zu können, wurde im Falle der Bindung des Trypsins über den BSA-Spacer die NMR-Spektroskopie herangezogen. Da bei der Immobilisierung auf Vliesmaterialien feste, unlösliche Stoffe untersucht werden, muß eine spezielle Technik der NMR-Spektroskopie, die sogenannte Festkörper-NMR-Spektroskopie, zum Einsatz kommen.

4.4.5.1 ¹H-Festkörper-NMR-Spektroskopie

Um in Festkörpern ein gut aufgelöstes Spektrum zu erhalten, wurde das sogenannte „Magic Angle Spinning“ (MAS) eingeführt. Dabei wird die Probe im Magnetfeld um den magischen Winkel von 54.7° rotiert. Zusätzlich kann durch eine Steigerung der Beweglichkeit der zu untersuchenden Kerne eine deutliche Linienverschmälerung erreicht werden. Dazu wurden die Proben jeweils in CDCl_3 suspendiert und somit im aufgeschlammten Zustand vermessen.

In Abbildung 22 sind die ¹H-MAS-NMR-Spektren der unterschiedlichen Syntheseschritte bei der Anbindung des Trypsins über den BSA-Spacer dargestellt. Wie schon in Kapitel 4.1 beschrieben, besteht das Vliesmaterial aus Polyesterfasern. Das Spektrum des reinen, unbehandelten Vliesmaterials zeigt daher nur die Resonanzen der Ethylenglykoleinheiten bei 4.7 ppm (c), als auch die Signale der aromatischen H-Atome der Terephthalsäurereste bei 8.1 ppm (b). Zusätzlich sind noch Signale von CH_2 - und CH_3 -Endgruppen im Spektrum zu erkennen. Das hydrolysierte Vlies zeigt einen großen Peak bei 4.7 ppm, der einerseits durch die nun beweglicheren Ethylenglykoleinheiten, andererseits aber auch durch Hydroxylgruppen (auch Wasser) verursacht werden kann. Die Aktivierung mit N-Hydroxysuccinimid kann im Spektrum ebenfalls nachvollzogen werden. Ein zusätzlicher Peak bei 3.7 ppm deutet die Anbindung des N-Hydroxysuccinimids an die PET-Oberfläche an.

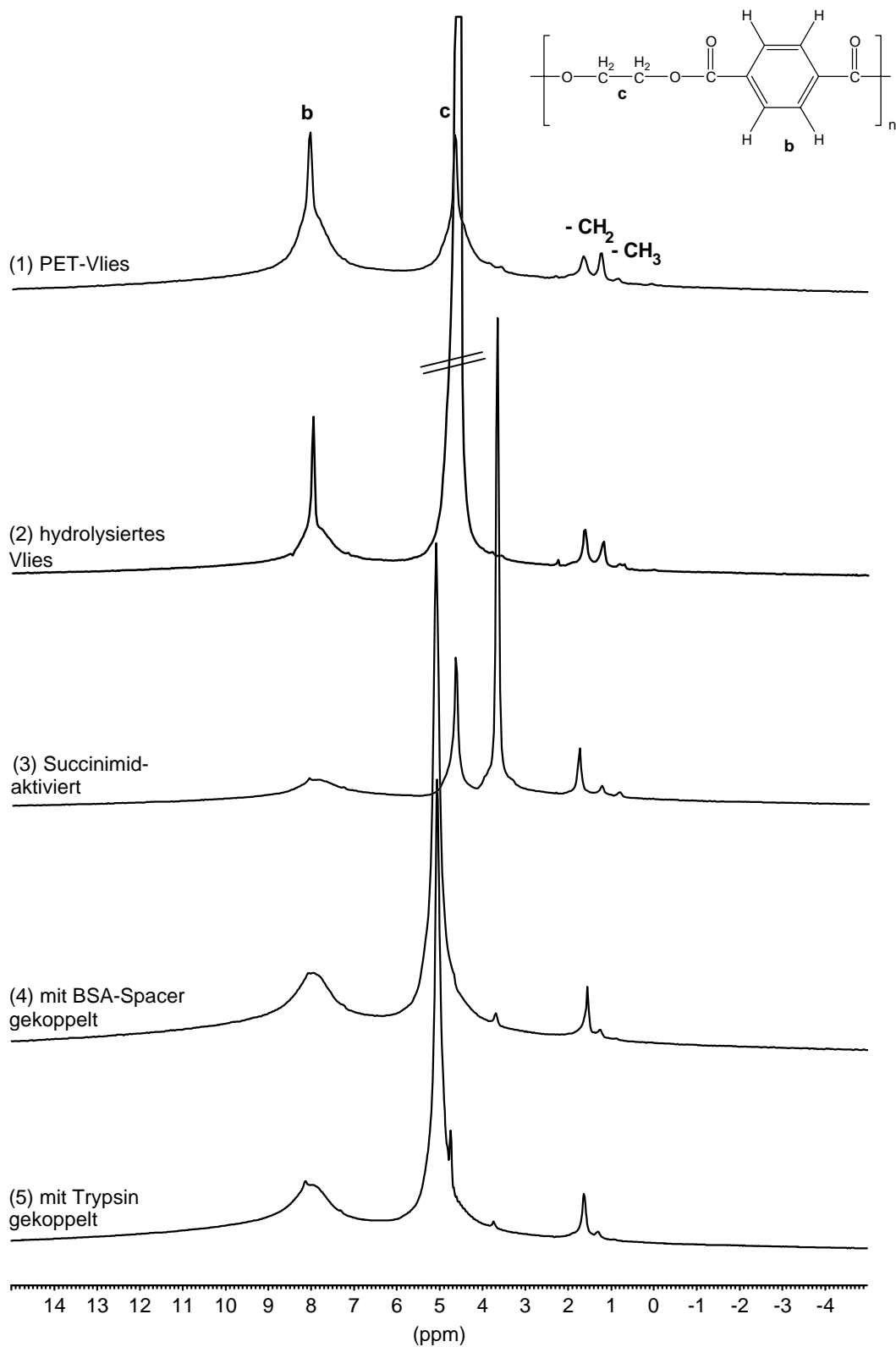


Abbildung 22: $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie zur Reaktionsverfolgung der Bindung von Trypsin über den BSA-Spacer; die Messungen erfolgten in suspendiertem Zustand (CDCl_3) und Rotation um den magischen Winkel (Rotationsfrequenz = 10000 Hz).

Nach der Bindung des BSA-Spacers ist im Spektrum nur noch ein kleines Restsignal bei 3.7 ppm sichtbar. Dies deutet darauf hin, daß die Umsetzung mit BSA nahezu vollständig abläuft. Zusätzlich tritt ein breites Signal bei 5.1 ppm auf, das wiederum durch Wassermoleküle, als auch durch den gebundenen BSA-Spacer verursacht werden kann. Aufgrund der eingeschränkten Mobilität können dabei im ^1H -Festkörper-NMR-Spektrum keine einzelnen Signale des BSA-Spacers aufgelöst werden.

Das Spektrum des trypsin-gebundenen Vlieses zeigt keine wesentlichen Veränderung mehr. Es sind wiederum Signale von aromatischen Wasserstoffatomen (Terephthalsäure des PET-Vlieses als auch aromatische Aminosäuren des BSA und Trypsins) sowie das Signal der Ethylenglycoleinheiten bei 4.7 ppm als Schulter sichtbar. Zusätzlich tritt ein breites Signal bei 5.1 ppm auf, das hauptsächlich durch Resonanzen von Hydroxylgruppen (auch Wasser) verursacht sein dürfte.

Prinzipiell ist die Konzentration an über den BSA-Spacer gebundenen Trypsin aber gering. Daher zeigen die ^1H -NMR-Spektren hauptsächlich die Signale des PET-Trägermaterials, das in wesentlich größerer Konzentration vorliegt und somit die Spektren dominiert. Die Signale des BSA-Spacers als auch des Trypsins liegen dank der mehr unbeweglichen großen Moleküle mit starken Dipolwechselwirkungen eher im Untergrund des Spektrums mit sehr breiten Signalen.

4.4.5.2 ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie

Aus den ^{13}C -NMR-Spektren in Abbildung 23 wird deutlich, daß die verschiedenen Synthesewege keinen wesentlichen Einfluß auf die chemische Struktur des Trägermaterials besitzen. In den Spektren des unbehandelten PET-Vlieses, des hydrolysierten Vlieses, als auch der mit Succinimid aktivierten und mit BSA und Trypsin umgesetzten Polyesterfasern treten keine wesentlichen Unterschiede auf. Dies bedeutet, daß während der Synthese die Grundstruktur des PET-Materials erhalten bleibt. Es sind jeweils die Signale der Ethylenglykoleinheiten bei ca. 61 ppm, als auch die Signale des Terephthalsäuregrundgerüsts bei 130 und 133.5 ppm sowie deren Carboxyleinheiten bei 163 ppm sichtbar. Wegen der geringen Konzentration der Proteine sind diese im Spektrum nicht auflösbar.

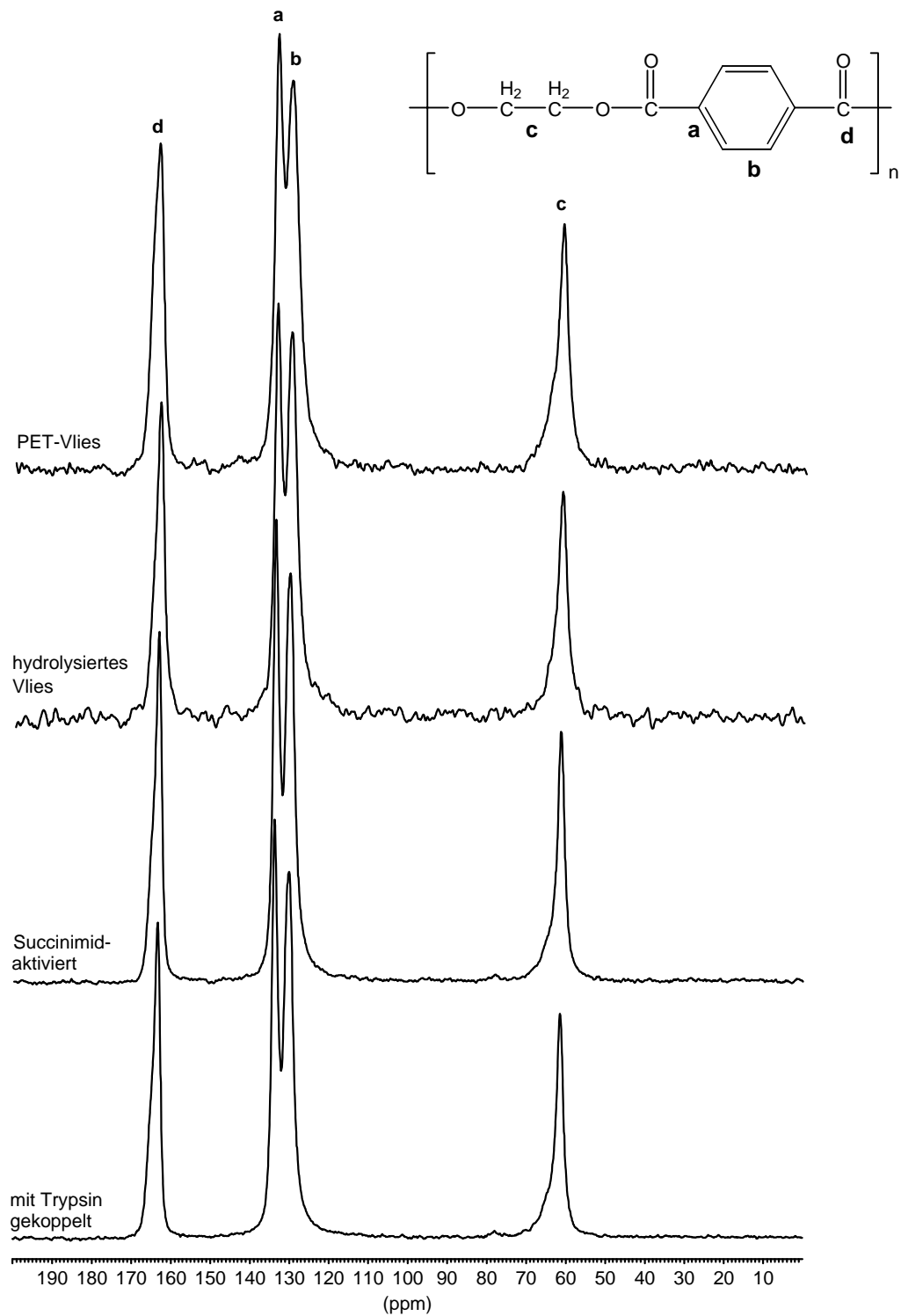


Abbildung 23: ^{13}C -NMR-Spektroskopie zur Reaktionsverfolgung der Anbindung von Trypsin über den BSA-Spacer; die Messungen erfolgten in suspendiertem Zustand (CDCl_3) und Rotation um den magischen Winkel (Rotationsfrequenz = 10000 Hz).

4.4.6 Untersuchung mittels SEM-Aufnahmen

Über die Aufnahme von SEM (Scanning electron microscope)-Bildern lassen sich die verschiedenen Syntheseschritte zur Darstellung des immobilisierten Trypsins optisch verfolgen. Auf diese Weise wurde die Reaktionsführung über BSA als Spacer charakterisiert.

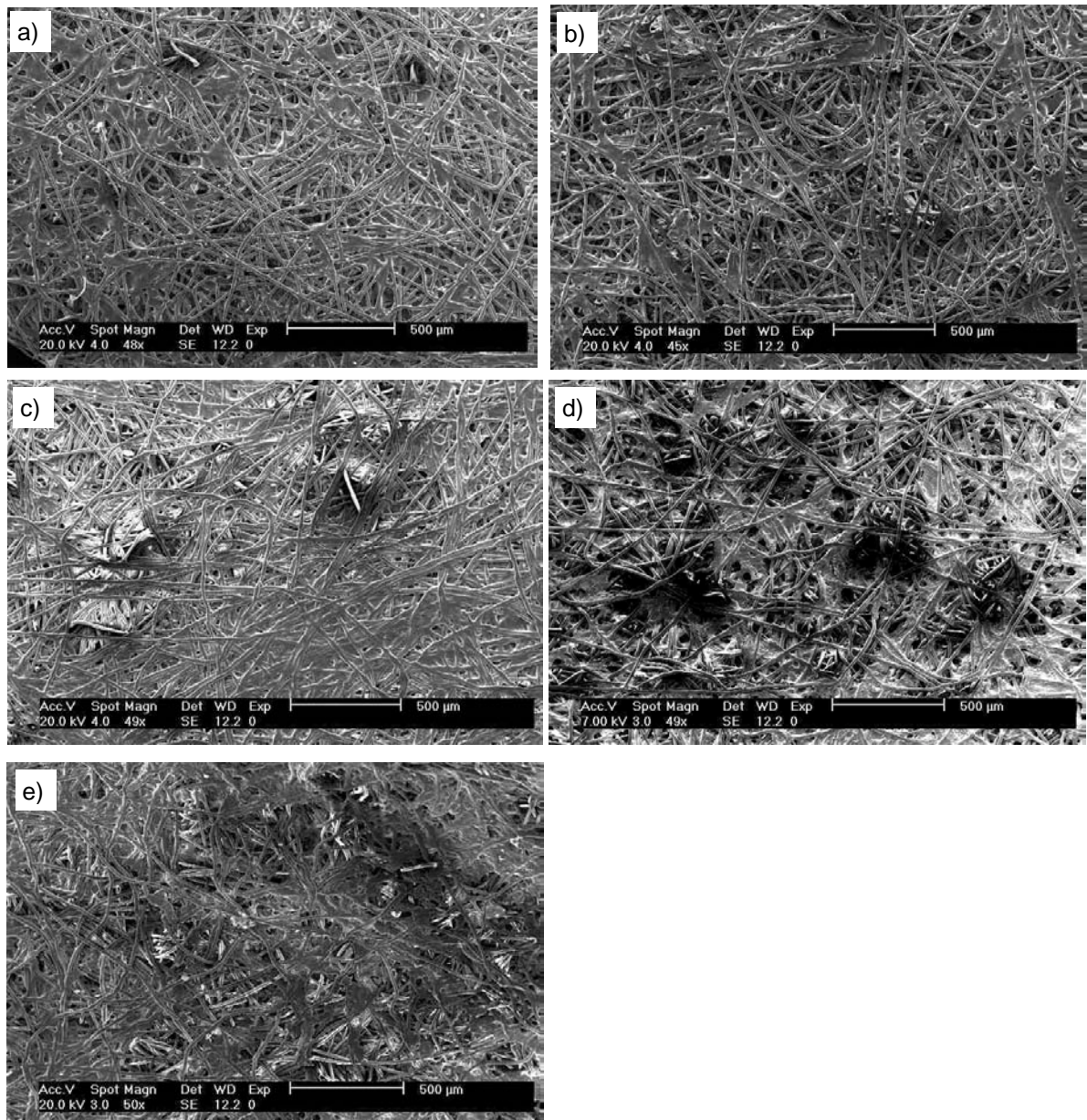


Abbildung 24: SEM-Aufnahmen (kleine Vergrößerung: skaliertes Ausschnitt 500 µm) des Polyestervlieses FO 2413: (a) unbehandeltes Vlies, (b) hydrolysiertes Vlies, (c) mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Vlies, (d) mit BSA-Spacer immobilisiertes, (e) mit Trypsin via BSA-Spacer gebundenes Vlies.

Die SEM-Aufnahmen mit einem skalierten Ausschnitt von 500 μm zeigen keine wesentlichen Unterschiede der Struktur des PET-Vlieses nach den unterschiedlichen Behandlungen. Aus Abbildung 24 wird deutlich, daß die Struktur des verwendeten Vliematerials als eine verwobene Struktur einzelner Fasern beschrieben werden kann, welche ungeordnet über- und untereinander liegen.

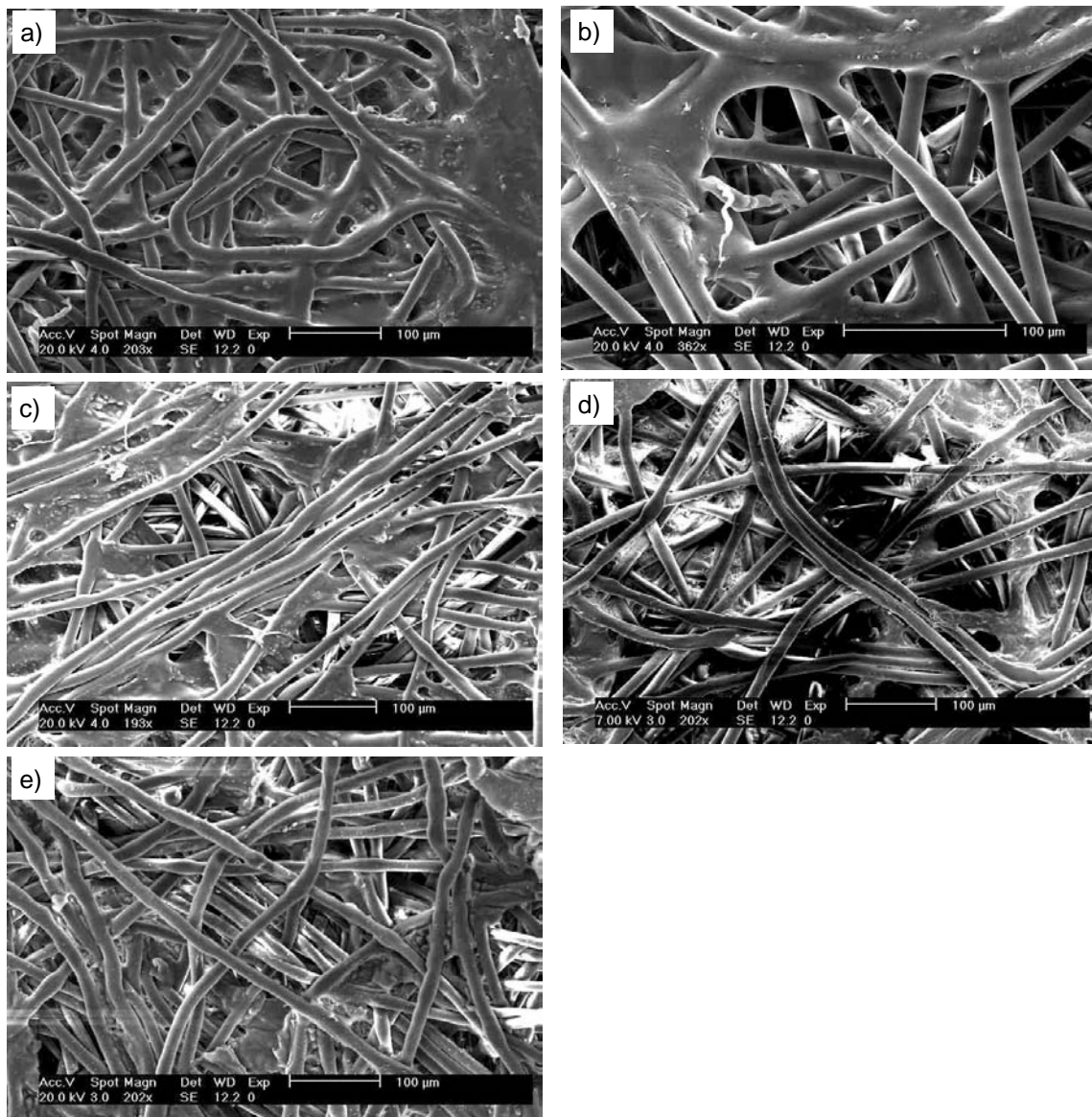


Abbildung 25: SEM-Aufnahmen (mittlere Vergrößerung, skaliertes Ausschnitt 100 μm) des Polyestervlieses FO 2413: (a) unbehandeltes Vlies, (b) hydrolysiertes Vlies, (c) mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Vlies, (d) mit BSA-Spacer immobilisiertes Vlies, (e) mit Trypsin via BSA-Spacer gebundenes Vlies.

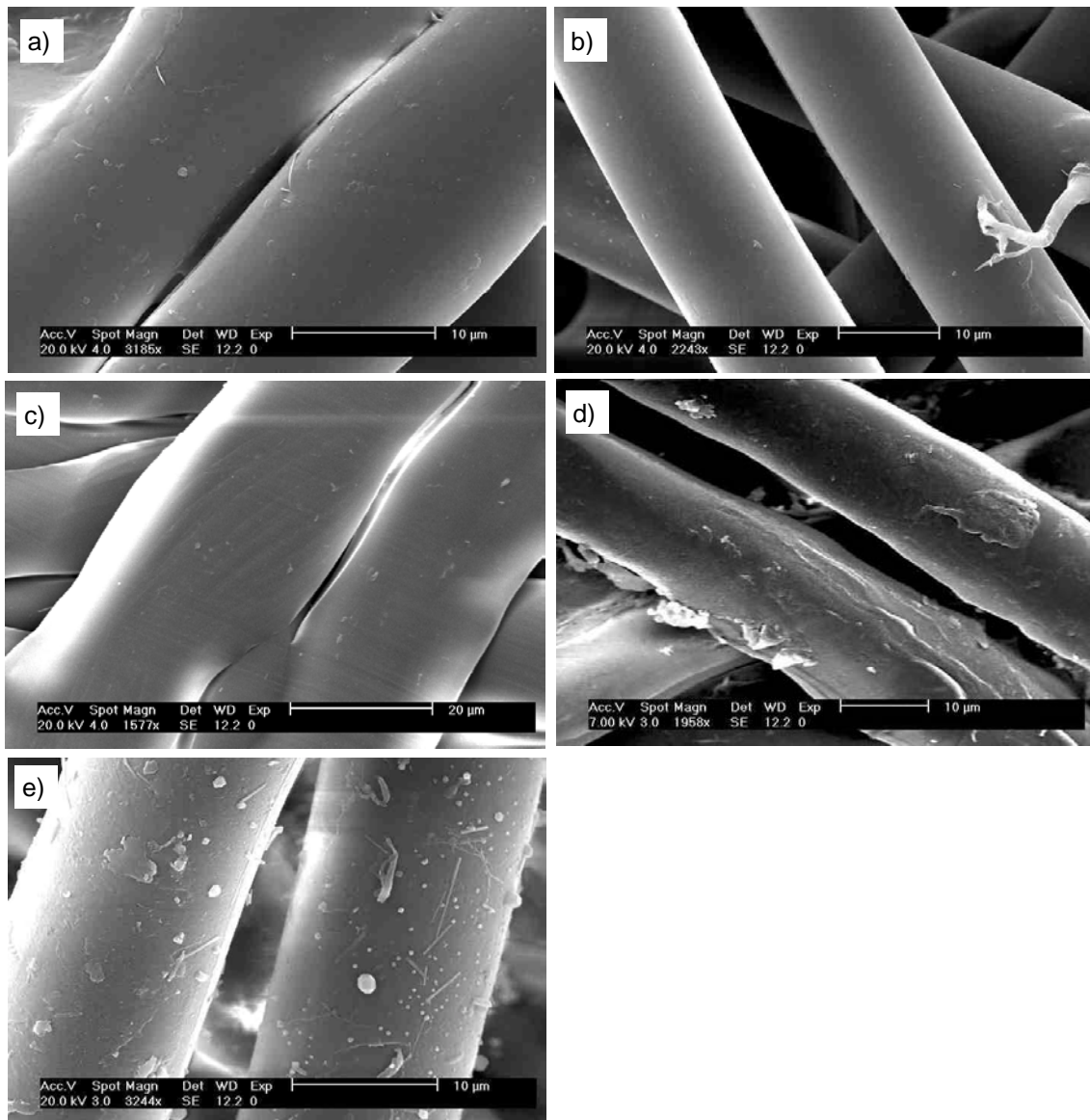


Abbildung 26: SEM-Aufnahmen (hohe Vergrößerung, skaliertes Ausschnitt 10/20 µm) des Polyestervlieses FO 2413: (a) unbehandeltes Vlies, (b) hydrolysiertes Vlies, (c) mit N-Hydroxysuccinimid aktiviertes Vlies, (d) mit BSA-Spacer immobilisiertes, (e) mit Trypsin via BSA-Spacer gebundenes Vlies.

Die in Abbildung 25 gezeigten Aufnahmen mit einem skalierten Ausschnitt von 100 µm bestätigen nochmals, daß auch bei einem genaueren Blick auf die Faserstruktur (Aufnahmen mit höherer Vergrößerung), keine Auswirkungen der Behandlungsmethoden auf die Struktur der PET-Vliese festzustellen sind. Im Gegensatz dazu, ist bei der Verwendung einer noch höheren Vergrößerung ein Unterschied nach den chemischen Modifizierungen zu erkennen. In Abbildung 26 sind die Aufnahmen mit einem skalierten Ausschnitt von 10 bzw. 20 µm dargestellt. Dabei

sind sich die Aufnahmen vom Ausgangsmaterial (PET-Vlies FO 2413), dem hydrolysierten PET-Vlies als auch vom N-hydroxysuccinimid aktivierten Vlies sehr ähnlich. Die einzelnen Fasern zeigen jeweils eine relativ glatte, unstrukturierte Oberfläche. Selbst die Behandlung des Vlieses mit 3.65 M Salzsäure bei 50°C für eine Stunde hat keinen strukturverändernden Einfluß auf die PET-Fasern. Die Aufnahmen sowohl der mit BSA als Spacer gebundenen Vliese wie auch der mit Trypsin auf den BSA Spacer modifizierten Vliese zeigen ebenfalls ein ähnliches Verhalten. Auf den Oberflächen der einzelnen Fasern sind im Vergleich zum unmodifizierten, hydrolysierten und aktivierten Vlies deutliche Veränderungen zu erkennen. Die Fasern erscheinen weniger glatt und zeigen verschiedene Struktureinheiten auf ihrer Oberfläche, die durch die Modifizierungsreaktionen verursacht werden.

4.5 Anwendung des immobilisierten Trypsins

4.5.1 Abbau von Gelatine

Der Abbau der Gelatine kann zum einen über den Ninhydrintest verfolgt werden (vgl. Kapitel 3.2.3.3). Zum anderen läßt sich die Molmasse der Gelatine über die Size-Exclusion-Chromatographie (SEC) untersuchen (Gao & Groves, 1998; Farrugia & Groves, 1999). Durch Vergleiche von Gelatine, die mit den auf Vlies immobilisierten Enzymen behandelte wurde, mit unbehandelter Gelatine kann so die Abbaureaktion durch Trypsin genau studiert werden. Zudem können die Abbauprodukte auch in der Reversed Phase-HPLC untersucht werden.

4.5.1.1 Charakterisierung über den Ninhydrintest

Der Ninhydrintest wurde zur Untersuchung der Abbauprodukte von Gelatine herangezogen. Feuchtes, über BSA-Spacer mit Trypsin immobilisiertes PET-Vlies (1 cm^2) wurde auf Gelatineplatten mit 3.5 cm Durchmesser und einer Schichtdicke von ca. 1 mm gelegt und für unterschiedliche Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden auf Eis gekühlt, um die nicht gespaltene Gelatine zu verfestigen. Dann wurden 2 ml destilliertes Wasser vorsichtig auf die Oberfläche gegeben und das Vlies wurde abgehoben. Der Überstand wurde mit dem Ninhydrintest untersucht. Als Leerwert diente ein unbehandeltes Vlies.

In Tabelle 8 sind die Absorptionswerte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten dargestellt. Bereits der Leerwert zeigte eine beträchtliche Absorption. Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß einige freien Aminogruppen der Gelatine mit Ninhydrin reagierten. Im Vergleich dazu zeigte ein nur mit dem BSA Spacer immobilisiertes Vlies nach Kontakt mit der Gelatineoberfläche sehr ähnliche Absorptionswerte. Daraus kann geschlossen werden, daß nur durch das BSA keine Spaltung der Gelatine stattfand. Wurde die Gelatineoberfläche allerdings mit immobilisiertem Trypsin in Kontakt gebracht, so erfolgte mit zunehmender Zeit eine fortschreitende Spaltung der Gelatine. Die erhaltenen Werte lassen außerdem auf ein nahezu lineares Verhalten der

Abbaugeschwindigkeit innerhalb der Meßpunkte schließen.

Durch den Ninhydrin-Test läßt sich demnach die proteolytische Wirkung des Trypsins auf die Gelatine nachweisen.

In Abbildung 27 ist die Wirkungsweise des immobilisierten Trypsins verdeutlicht. Nur die Gelatine, die direkten Kontakt mit dem modifizierten Vlies (Trypsin über den BSA Spacer gebunden) besaß, wurde verflüssigt. In der Abbildung ist der Bereich, der von dem viereckigen Vliesstück abgedeckt wurde, nach dessen Entfernung sehr gut zu erkennen. Die verflüssigte Gelatine wurde vom Vlies weitgehend aufgenommen und ist in der Abbildung nicht mehr zu erkennen.

Tabelle 8: Untersuchung der Abbauprodukte nach Kontakt verfestigter Gelatine mit immobilisiertem Trypsin, Ninhydrintest bei 570 nm mit unterschiedlichen Inkubationszeiten bei Raumtemperatur.

Absorption (570 nm)	Leerwert	BSA-Vlies	Inkubationsdauer [h]			
			1	2	3	4
absolut	0,224	0,228	0,415	0,720	0,886	1,353
abzüglich Leerwert	0	0,004	0,191	0,496	0,662	1,129

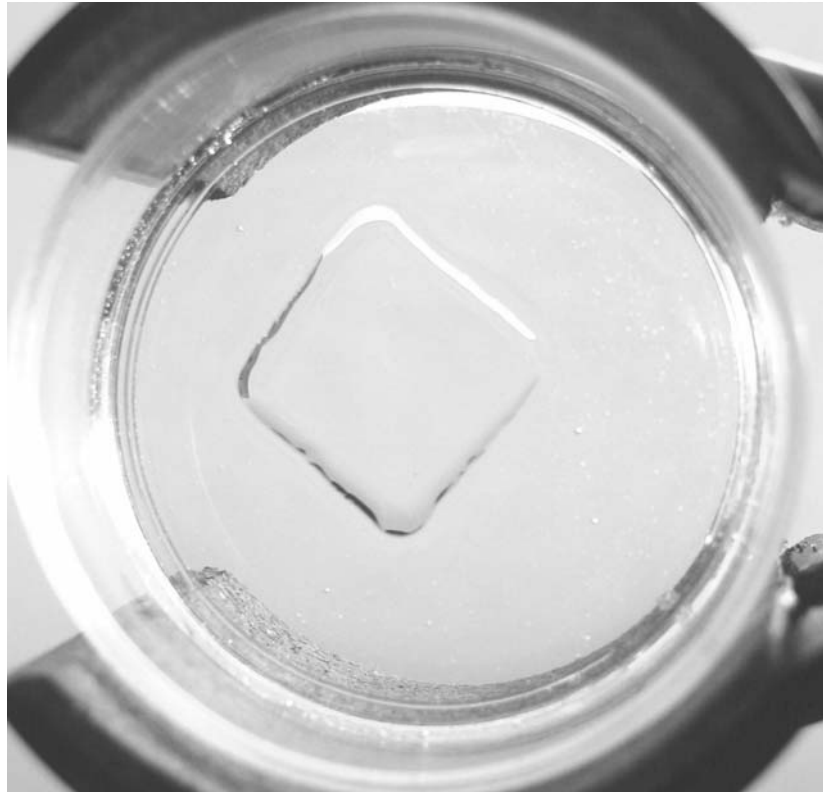


Abbildung 27: Wirkungsweise des immobilisierten Trypsins auf verfestigter Gelatine. Ein mit Trypsin immobilisiertes Vliesstück (1 cm^2) wurde für 3 h bei 25°C auf die Gelatineplatte aufgelegt. Nach der Entfernung des Vliesstückes zeichnete sich auf der Kontaktfläche eine deutliche Vertiefung ab.

4.5.1.2 Charakterisierung mittels der Size Exclusion Chromatographie

4.5.1.2.1 Kalibrierung

Mit Hilfe der Methode der SEC lassen sich die Molmassen von Proteinen bestimmen. Die Proteine werden dabei in der mobilen Phase gelöst und trennen sich nach Größe auf, wobei größere Moleküle vor kleineren eluieren (Hefti, 1992; Jenik & Porter, 1981). Die Retentionszeiten von den verwendeten Standard-Proteinen sind in Tabelle 9 dargestellt. Trypsin mit einer relativ kleinen Molmasse eluiert nach 9.3 min, während Catalase mit einer Molmasse von ca. 240 kDa bereits nach 7 min eluiert. Die

Messungen wurden jeweils 3 mal wiederholt und zeigen eine gute Reproduzierbarkeit. In Abbildung 28 sind die Mittelwerte der Retentionszeiten der verwendeten Standardproteine in Abhängigkeit der Molmasse aufgetragen.

Tabelle 9: Retentionszeiten von Standard-Proteinen mit bekannter Molmasse zur Bestimmung der Eichgerade der SEC-Chromatographie auf einer TSK3000-Säule; mobile Phase: 0.08 M Natriumphosphat, pH 7.0 mit 0.32 M NaCl und 20 % Ethanol (v/v), Flußrate: 1 ml/min, die Detektion der Proteine erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm, es wurden 20 µl einer 0.1 %ige Protein-Lösung in der mobilen Phase eingespritzt.

Standardproteine	M_r [kDa]	Retentionszeit [min]
Catalase	240	6.94 (\pm 0.04)
LDH	140	7.57 (\pm 0.03)
BSA	64.5	9.22 (\pm 0.00)
α -Amylase	50	8.91 (\pm 0.07)
Thermolysin	37	9.29 (\pm 0.05)
Trypsin	23	9.68 (\pm 0.23)

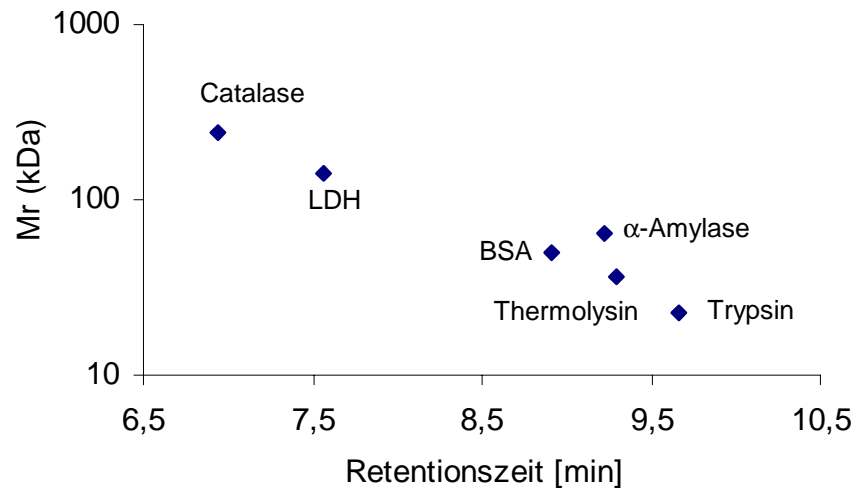


Abbildung 28: Beziehung zwischen der Retentionszeit und dem Logarithmus der Molmasse für Standardproteine zur Ermittlung der Eichgeraden zur Bestimmung der Molmasse von Gelatine auf einer TSK 3000 Säule.

Auf den meisten kommerziell erhältlichen Size-Exclusion-Säulen, die mit reinen Phosphatpuffern betrieben werden, bleiben viele Proteine länger auf den Säulen als ihrer Molmasse entspricht. Solche verlängerte Retentionszeiten gehen meist auf das Konto von ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen mit der stationären Phase des Säulenmaterials. Die ionischen Wechselwirkungen wurden bei dieser Untersuchung durch eine hohe Ionen-Konzentration im Lösungsmittel, die hydrophoben Wechselwirkungen durch die Zugabe von Ethanol minimiert. Mit dieser mobilen Phase wurde ab einem Molekulargewicht von 40 kDa eine gute lineare Korrelation zwischen der Retentionszeit und dem Logarithmus der Molmasse verschiedener Standardproteine erreicht (siehe Abbildung 28).

4.5.1.2.2 Bestimmung der Molmasse der nativen Gelatine

Zur Charakterisierung der nativen Gelatine wurde eine unbehandelte Probe mittels der Size-Exclusion-Chromatographie untersucht. Dazu wurden 20 μ l einer 0.1 %igen Lösung der Gelatine in 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 auf die Säule gegeben. In Abbildung 29 ist das Profil der Gelatine dargestellt. Die Hauptmasse der Gelatine eluiert als eine Bande nach einer Retentionszeit von 8.6 Minuten (Peak C) und kann damit einer

Molmasse von etwa 90 kDa zugeordnet werden. Dies läßt sich dem Größenbereich der α -Ketten zuordnen (vgl Tabelle 1). Eine Schulter bei etwa 7 Minuten entsprechend einer Molmasse von 210 kDa liegt im Größenbereich der β -Ketten.

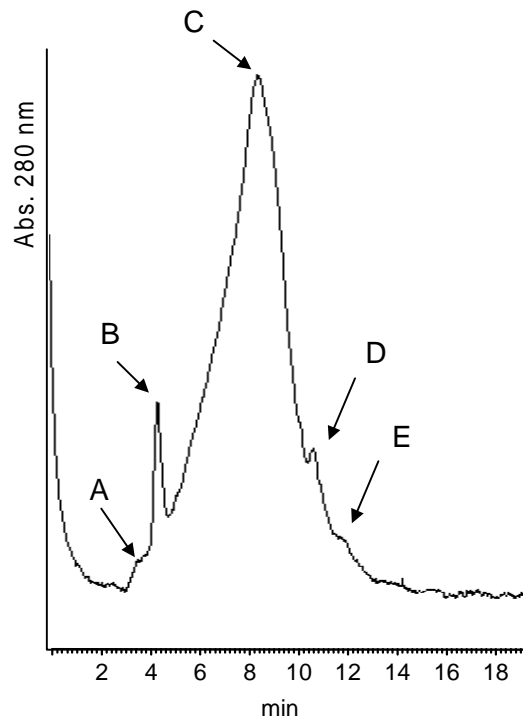


Abbildung 29: Size-Exclusion-Chromatographie von Gelatine G-20 auf einer TSK3000 Säule. Als mobile Phase diente 0.08 M Natriumphosphat, pH 7.0 mit 0.32 M NaCl und 20 % Ethanol (v/v). Als Flußrate wurde 1 ml/min gewählt, die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Es wurden 20 μ l 0.1 % Gelatine gelöst in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.5 aufgetragen.

Im Bereich sehr hoher Molmassen traten zusätzlich ein Peak von ca. 340 kDa (Signal B) und eine Schulter von über 450 kDa (Signal A) auf. Diese beiden Signale konnten unzerstörten oder renaturierten γ -Ketten und hochmolekularen Bestandteilen (ϵ -Anteilen) zugeordnet werden. Beide konnten sich nach dem Herstellungsprozeß der Gelatine bilden. Proteine mit diesen sehr hohen Molmassen werden aus Multimeren von α -Ketten geformt und entstehen wahrscheinlich durch den abschließenden Abkühlvorgang im Herstellungsprozess der Gelatine durch Vernetzungsvorgänge aus α -, β - und γ -Ketten.

Im geringen Größenbereich sind zwei Schultern mit Molmassen von unter 50 kDa zu erkennen. (siehe Abbildung 29, Peak D und E). Diese Proteine entstanden wahrscheinlich durch Degradation des Kollagens während des Herstellungsprozesses.

4.5.1.2.3 Identifizierung von Abbau-Produkten der Gelatine durch SEC

Die Wirkung des mit Trypsin modifizierten Vlieses auf Gelatine wurde mittels der SEC an den Abbau-Produkten nach einem direkten Kontakt der Gelatineoberfläche mit dem immobilisierten Trypsin untersucht.

Zum Test der Aktivität der immobilisierten Enzyme wurde das feuchte Vlies auf Gelatineplatten gelegt. Dazu wurde 1 ml einer Lösung von 33 % Gelatine in 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 bei 60°C gelöst und auf Sterilplatten von 3.5 cm Durchmesser gegossen. Ein Stück Vliesmaterial (1 cm²) wurde mit 0.1 ml Tris-HCl pH 7.5 befeuchtet und für 1 h bei Raumtemperatur in direkten Kontakt mit der Gelatineoberfläche gebracht. Anschließend wurden die Abbauprodukte der Gelatine mit 500 µl 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, wovon 20 µl nach Sterilfiltration auf die SEC-Säule gespritzt wurden.

Abbildung 30 zeigt das erhaltene Chromatogramm. Dabei ist ein deutlicher Peak von 340 kDa zu erkennen, der wiederum auf γ -Ketten zurückgeführt werden kann (Peak-B). Im Bereich von Retentionszeiten von über 8 Minuten sind mehrere Peaks und breite Schultern zu erkennen. So ist ein deutliches Signal bei einer Retentionszeit von über 13 min sichtbar (Peak F). Im Vergleich zum Chromatogramm der unbehandelten Gelatine (siehe Abbildung 29) wurde demnach ein deutlich erhöhter Anteil an niedermolekularen Bestandteilen erhalten. Die langen Retentionszeiten zeigen die Protein- und Peptideinheiten der Abbauprodukte mit Molmassen von deutlich unter 50 kDa an. Zusätzlich ist zu erkennen, daß kein eindeutiger Peak der α -Ketten mehr auftritt. Vielmehr wurde ab einer Retentionszeit von 6 min ein ganzer Bereich von Molekülen mit abnehmender Größe erhalten. Da sich die verwendete Säule in diesem Bereich der Molmasse nicht mehr im linearen Bereich befindet, ist eine Zuordnung zu bestimmten Molekülgrößen nur näherungsweise möglich. Die Signale bei kürzeren Retentionszeiten zeigen, daß in den Abbauprodukten noch höhermolekulare Gelatinebestandteile

enthalten waren. Der Peak bei ca. 5 min zeigt einen noch hohen Anteil an γ -Ketten.

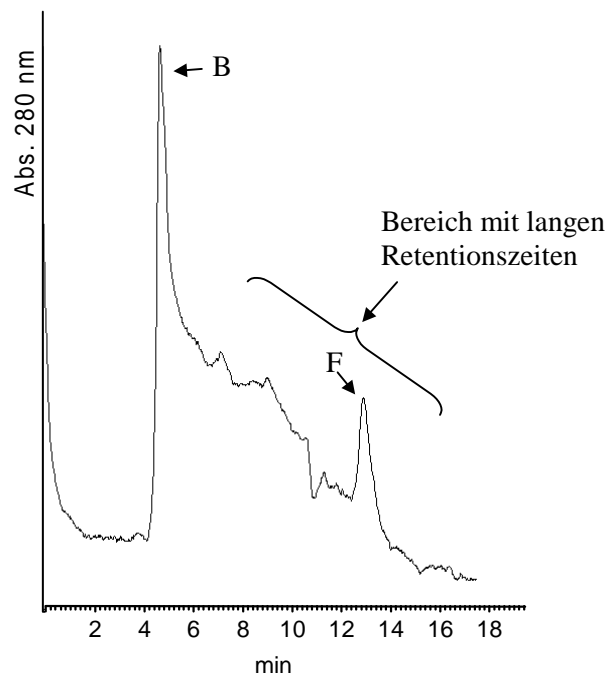


Abbildung 30: Chromatogramme der Gelatine-Abbauprodukte nach Behandlung mit immobilisiertem Trypsin; Säule TSK3000; mobile Phase: 0.08 M Natriumphosphat, pH 7.0 mit 0.32 M NaCl und 20 % Ethanol (v/v), Flußrate: 1 ml/min, Absorptionsmessung bei 280 nm; 20 μ l Gelatine-Abbauprodukte wurden in 500 μ l mobiler Phase aufgenommen.

4.5.1.3 Charakterisierung mittels der Reversed-Phase-HPLC

Da die SEC keine definierten Abbauprodukte ergab, wurde versucht, mit Hilfe der Reversed-Phase HPLC Chromatographie den durch Kontakt mit dem trypsin-immobilisierten Vlies hervorgerufenen Abbau der Gelatine qualitativ nachzuweisen. Die RP-HPLC verwendet hydrophobe, relativ unpolare stationäre Phasen, vor allem Kieselgele mit chemisch gebundenen Liganden unterschiedlicher Struktur, Funktionalität und Kettenlänge. Als mobile Phase werden hydrophile Solventien verwendet, meist Gemische aus Wasser oder wässriger Pufferlösung und einem organischen Lösungsmittel wie Acetonitril, Methanol oder Tetrahydrofuran. Während bei der Ionenaustausch-, der Ionenpaar- und der Adsorptionschromatographie an polaren stationären Phasen Dipol-Dipol- und ionische Wechselwirkungskräfte für die

chromatographische Trennung verantwortlich sind, beruht der Trennmechanismus der RP-HPLC prinzipiell auf ungerichteten dispersen Wechselwirkungen der gelösten Probensubstanzen mit der stationären Phase.

4.5.1.3.1 RP-HPLC an nativer Gelatine

Native Gelatine wurde auf einer C-18 Säule aufgetrennt. Vergleichbar zu den SEC-Experimenten wurde eine 0.1 % Lösung der Gelatine in 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 hergestellt und 20 μ l davon auf die Säule gegeben. In Abbildung 31 ist das Chromatogramm dieses Versuchs dargestellt.

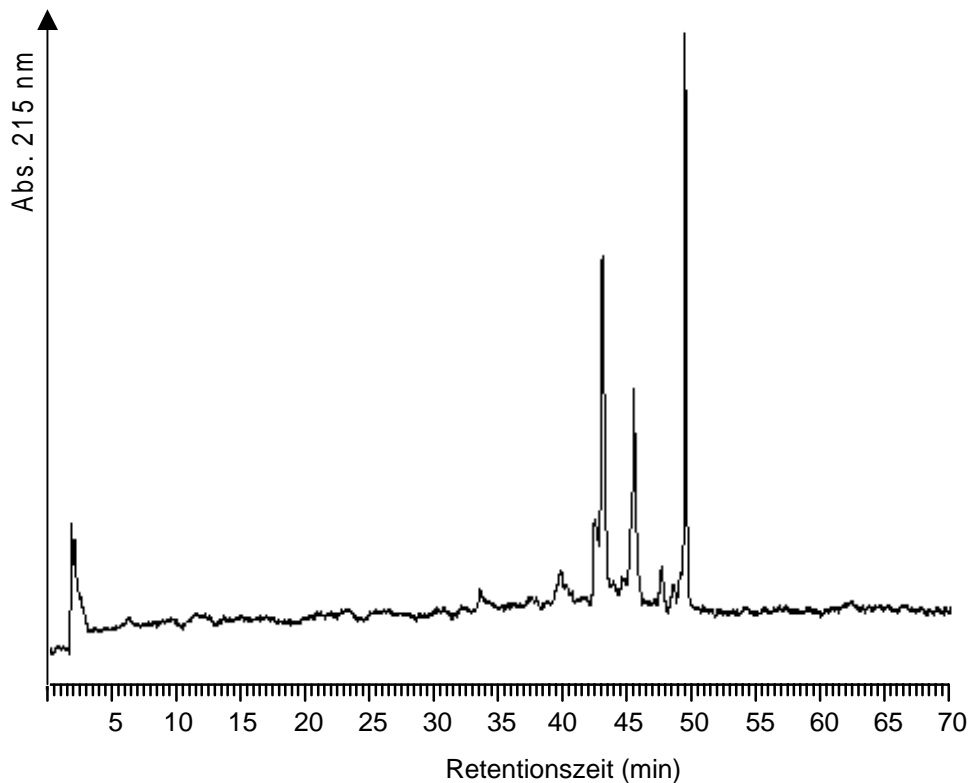


Abbildung 31: Elutionsprofil von nativer Gelatine nach Auftrennung durch eine C-18 Säule mit einer mittleren Korngröße von 5 μ m und einer Porengröße von 300 Å bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Detektion erfolgte bei 215 nm, Gradient: 5-30 % B in 70 min (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.045 % TFA in Wasser 90:10).

Das Chromatogramm zeigt mehrere Signale nach Retentionszeiten von über 40 Minuten. Dies bedeutet, daß die verwendete Gelatine aus Proteinen mit relativ großer

Molmasse aufgebaut war. Diese Proteine besitzen einen unpolaren Charakter und zeigten somit starke Wechselwirkungen mit dem unpolaren Trägermaterial der HPLC-Säule. Zudem wird deutlich, daß innerhalb der Gelatine eine Vielzahl unterschiedlicher Fragmente vorkamen.

4.5.1.3.2 RP-HPLC an den Abbauprodukten der Gelatine

Wie im Falle der SEC beschrieben (siehe Kapitel 4.5.1.2.3), wurden Gelatineplatten in direkten Kontakt mit trypsin-immobilisiertem Vlies gebracht. Die Abbauprodukte der Gelatine wurden wiederum mit 500 µl 0.2 M Tris-HCl pH 7.5 aufgenommen, wovon 20 µl nach Sterilfiltration auf die RP-Säule gespritzt wurden. Im Vergleich zu den langkettigen Proteineinheiten der nativen Gelatine G20 werden bei diesem Versuch kleinere Bruchstücke erwartet. Kleinere Fragmente sollten aufgrund der im Vergleich zu langkettigen Proteinen erhöhten Polarität eine geringere Wechselwirkungsstärke mit der stationären Phase und damit kleinere Retentionszeiten besitzen. Je nach Gradient und damit je nach Polarität der verwendeten mobilen Phase eluieren die einzelnen Abbauprodukte zu unterschiedlichen Retentionszeiten.

In den Abbildung 32 und Abbildung 33 sind zwei unabhängige HPLC-Trennungen der Gelatine-Abbauprodukte dargestellt. Aus beiden HPLC-Läufen mit Gradienten unterschiedlicher Laufzeiten wird klar, daß im Vergleich zur nativen Gelatine eine deutlich erhöhte Peakanzahl erhalten wird. Die zahlreichen Signale können auf die unterschiedlichen Bruchstücke der Gelatine-Abbauprodukte zurückgeführt werden. Die Retentionszeiten hängen wiederum stark von den zur Auftrennung eingesetzten Parametern ab. Daher werden in den HPLC-Trennungen der Abbauprodukte im Vergleich zur Trennung der nativen Gelatine deutlich verminderte Retentionszeiten erhalten. Wird zur Auftrennung der Gelatineabbauprodukte ein leicht veränderter Gradient eingesetzt (vgl. Abbildung 31 und 32), so resultieren ebenfalls unterschiedliche Trennergebnisse. Diese lassen sich mit der unterschiedlichen Polarität der mobilen Phase erklären.

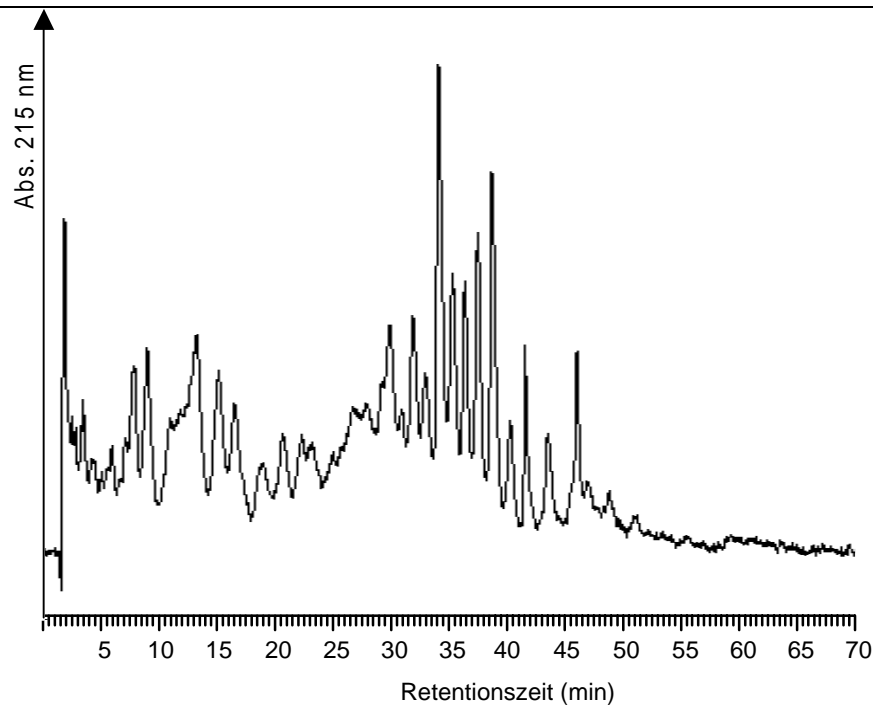


Abbildung 32: RP-HPLC-Trennung der Gelatine nach Abbau durch immobilisiertes Trypsin; C-18 Säule (5 μm , 300 \AA), Flußrate 1 ml/min, Detektion bei 215 nm, Gradient: 5-30 % B in 60 min (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.045 % TFA in Wasser 90:10)

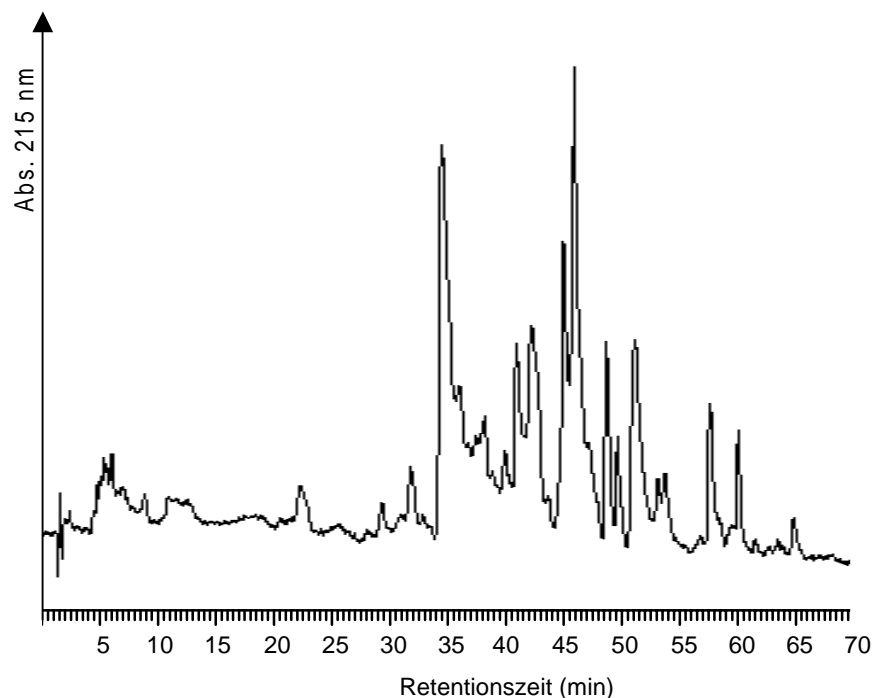


Abbildung 33: RP-HPLC-Trennung der Gelatine nach Abbau durch immobilisiertes Trypsin; C-18 Säule (5 μm , 300 \AA), Flußrate 1 ml/min, Detektion bei 215 nm, Gradient: 5-30 % B in 70 min (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.045 % TFA in Wasser 90:10)

4.5.2 Abbau von β -Casein

Um die Wirksamkeit der mit Trypsin immobilisierten Vliese auf die Abbaureaktion von β -Casein zu untersuchen, wurden dessen Abbauprodukte mittels der RP-HPLC qualitativ verfolgt. Im Vergleich zum über den BSA-Spacer immobilisierten Trypsin wurde dabei zusätzlich lösliches Trypsin in seiner proteolytischen Wirkung auf das Casein betrachtet. Auf diese Weise sollen Unterschiede von löslichem und immobilisiertem Trypsin im Abbau von β -Casein erkannt werden. In einem ersten Schritt mußte allerdings erst das Verhalten des löslichen sowie des immobilisierten Trypsins unter Einwirkung der Inkubationsbedingungen ohne das β -Casein-Substrat untersucht werden. Nur auf diese Weise konnte beurteilt werden, ob die Spaltprodukte vom Substrat oder gar vom Enzym selbst herrühren.

4.5.2.1 RP-HPLC an löslichem Trypsin ohne β -Casein-Substrat

Zur Untersuchung der proteolytischen Wirkung des Trypsins auf das β -Casein-Substrat wurden die im folgenden beschriebenen Proben jeweils über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei diesen Bedingungen findet eine Autoproteolyse von löslichem Trypsin statt, bei der sich das Enzym selbst in mehrere Fragmente zerlegt. Die Stärke dieser Abbaureaktion wurde mittels der HPLC verfolgt. In Abbildung 34 ist das Chromatogramm des löslichen Trypsins nach Inkubation über Nacht bei 37°C ohne Vorhandensein des β -Casein-Substrats dargestellt. Es wird deutlich, daß eine Vielzahl an unterschiedlichen Fragmenten im Chromatogramm enthalten sind. So treten einerseits Banden bei kleineren Retentionszeiten auf. Diese Signale können kleineren Bruchstücken des Enzyms zugeordnet werden. Bei größeren Retentionszeiten dagegen liegen noch große unpolare Peptidfragmente vor, die eine wesentlich stärkere Wechselwirkung mit dem unpolaren RP-Säulenmaterial eingehen.

Prinzipiell wird deutlich, daß eine Inkubation über Nacht schon zu einer deutlichen Autoproteolyse des löslichen Trypsins führt.

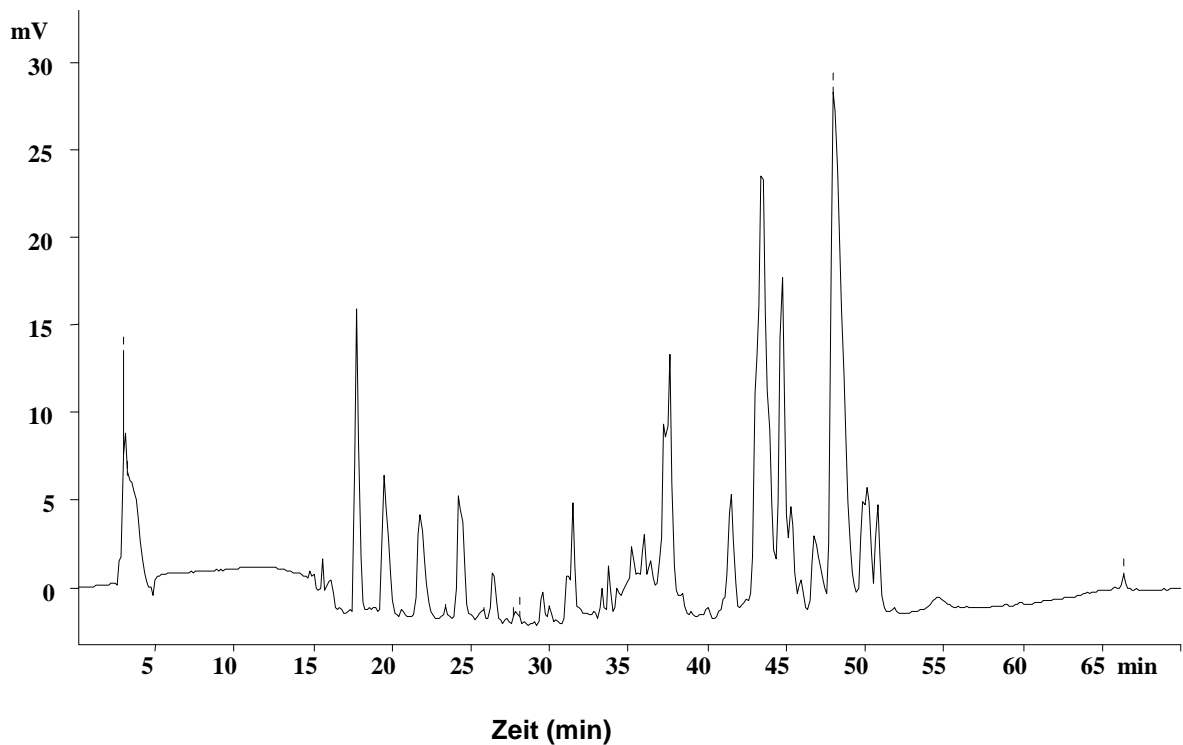


Abbildung 34: RP-HPLC-Chromatogramm des löslichen Trypsins nach Inkubation über Nacht bei 37°C ohne das β -Casein-Substrat; C-18 Säule (2 μm , 300 Å); Säule: 0.3 x 125 mm. Als Flußrate wurden 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet, die Detektion erfolgte bei 214 nm, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95 % B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075 % TFA in Wasser 80:20); 25 pmol Trypsin in Lösung A wurden eingespritzt.

4.5.2.2 RP-HPLC an immobilisiertem Trypsin ohne β -Casein-Substrat

Wie schon in Abschnitt 4.4.4 beschrieben, besitzt das über Spacer immobilisierte Trypsin im Vergleich zum löslichen Trypsin eine deutlich erhöhte Stabilität in Bezug auf den pH-Wert, die Lagertemperatur und gegenüber Lösungsmitteln. Daher wurde das über den BSA-Spacer immobilisierte Trypsin ebenfalls auf seine Stabilität bei Inkubation über Nacht bei 37°C ohne das Vorhandensein des β -Casein-Substrats untersucht. In Abbildung 35 ist das Chromatogramm dieser Untersuchung dargestellt. Im Vergleich zum löslichen Trypsin zeigt das immobilisierte Trypsin nach der gleichen Behandlung kaum erkennbare Signale. Auch der BSA-Spacer selbst wird offensicht-

lich nicht angegriffen. Das Chromatogramm zeigt nur eine kleine Anzahl von Peaks mit geringer Intensität.

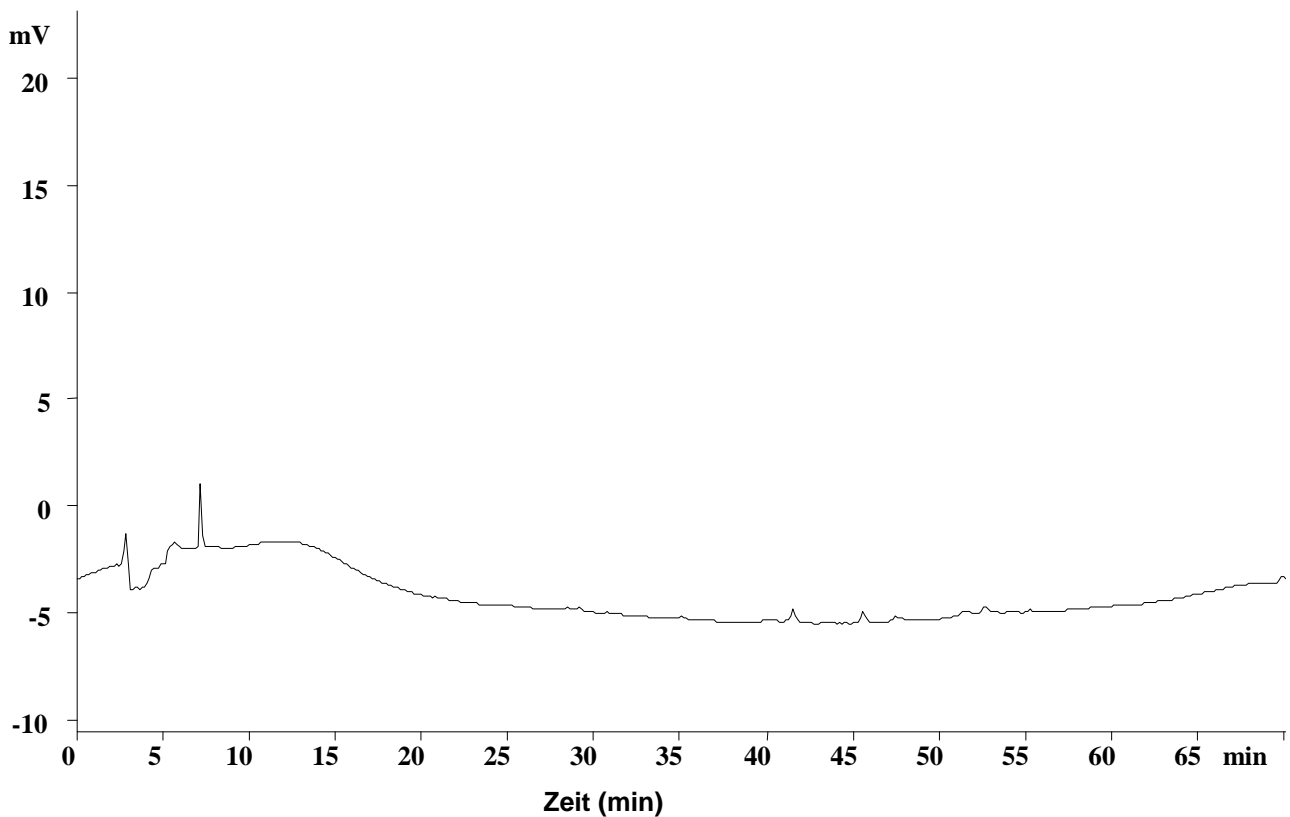


Abbildung 35: RP-HPLC-Chromatogramm des immobilisierten Trypsins (BSA-Spacer) nach Inkubation über Nacht bei 37°C ohne β -Casein-Substrat; C-18 Säule (2 μm , 300 Å); Säule: 0.3 x 125 mm. Als Flußrate wurden 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet, die Detektion erfolgte bei 214 nm, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95 % B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075 % TFA in Wasser 80:20), eingespritzt wurden 5 μl des konzentrierten Überstandes, aufgenommen in 100 μl Lösung A.

4.5.2.3 RP-HPLC an nativem β -Casein

In Abbildung 36 ist das Chromatogramm des nativen β -Caseins dargestellt. Die hohen Retentionszeiten von über 50 Minuten zeigen, daß das Protein gute Wechselwirkungen mit der verwendeten C-18 Säule eingeht.

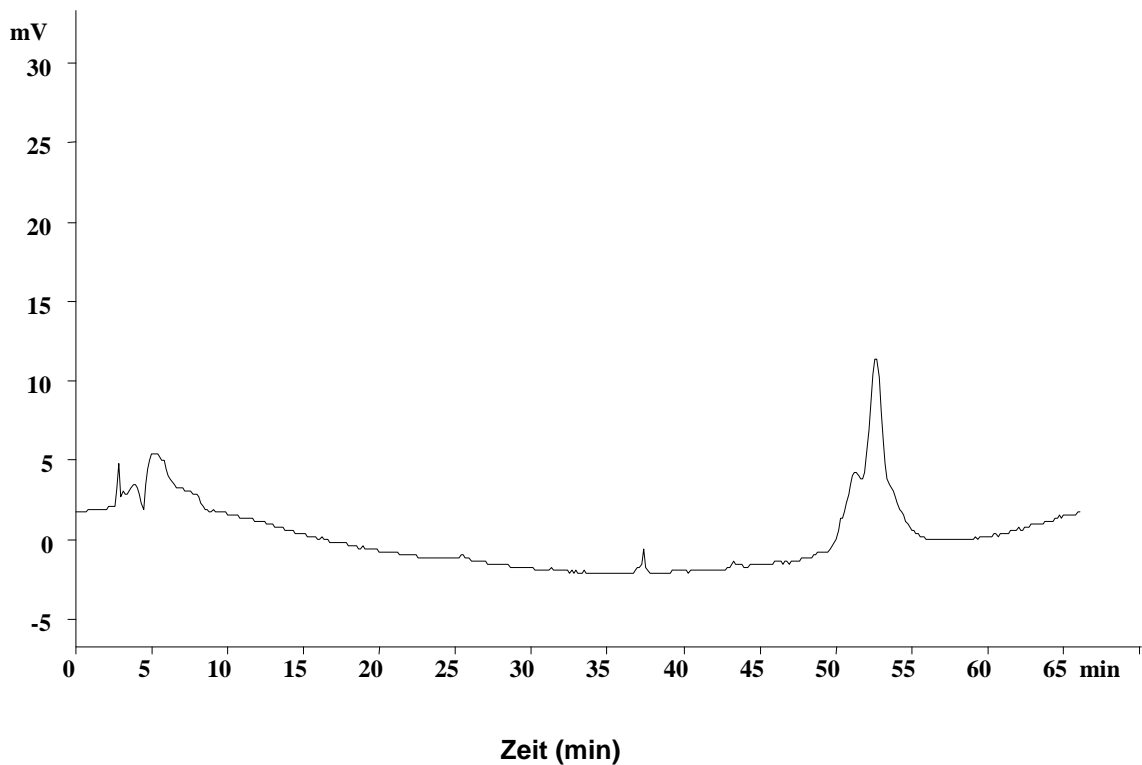


Abbildung 36: RP-HPLC-Chromatogramm des nativen β -Caseins nach Inkubation bei 37°C über Nacht; C-18 Säule ($2\ \mu\text{m}$, $300\ \text{\AA}$); Säule: $0.3 \times 125\ \text{mm}$. Als Flußrate wurden $5\ \mu\text{l}/\text{min}$ verwendet, die Detektion erfolgte bei $214\ \text{nm}$, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95 % B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075 % TFA in Wasser 80:20); $25\ \text{pmol}$ β -Casein in Lösung A wurden eingespritzt.

4.5.2.4 RP-HPLC an β -Casein-Abbauprodukten

Wird lösliches Trypsin zum Abbau des β -Caseins eingesetzt, so werden sowohl Fragmente des β -Casein-Substrates, als auch Fragmente des Trypsins selbst (siehe Abschnitt 4.5.2.1) erwartet. Abbildung 37 zeigt das Chromatogramm der Abbauprodukte. Dabei wird deutlich, daß eine Vielzahl von Fragmenten auftritt. Kleine polare Peptid-Bruchstücke zeigen kurze Retentionszeiten, da Wechselwirkungen mit dem unpolaren Trägermaterial der HPLC-Säule nur eingeschränkt möglich sind. Andererseits treten auch größere Proteinbruchstücke mit höheren Retentionszeiten auf.

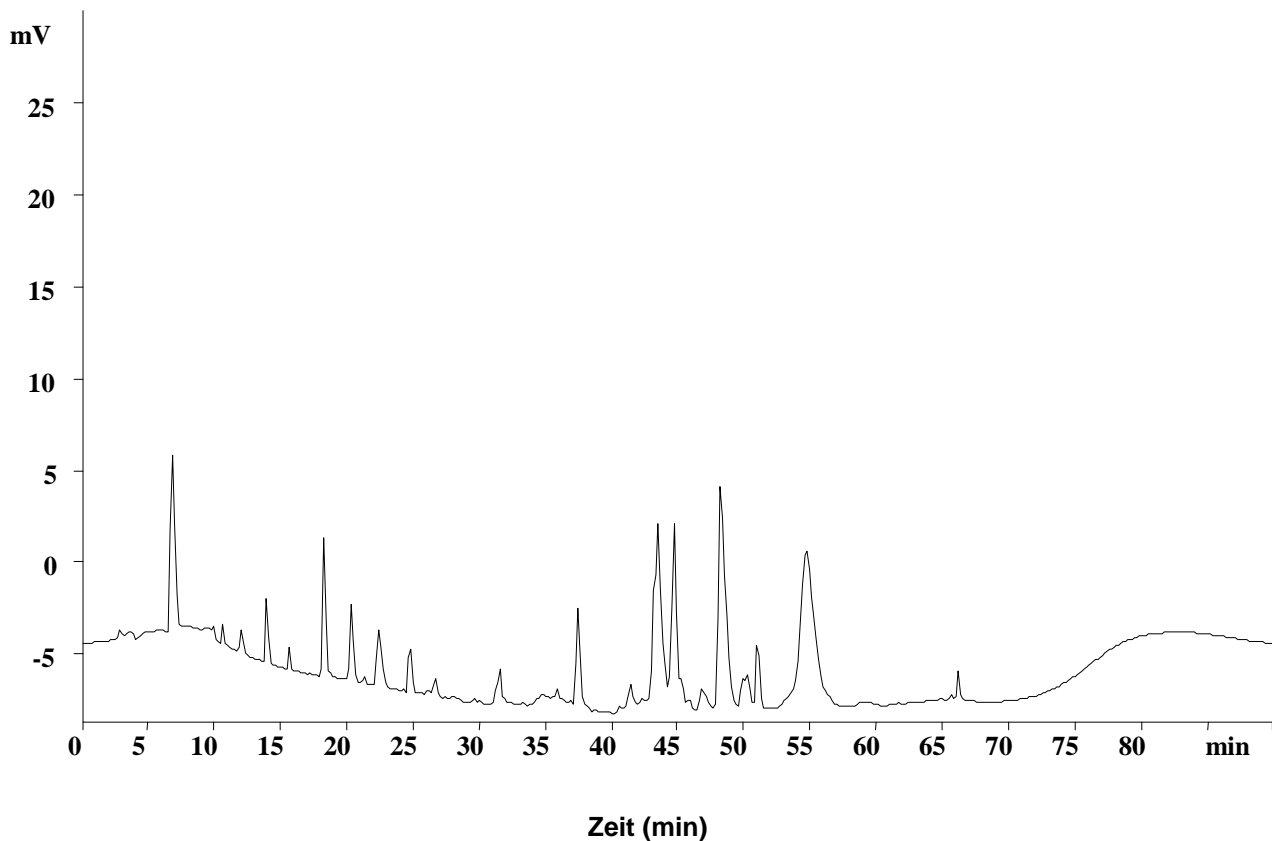


Abbildung 37: RP-HPLC-Chromatogramm der Casein-Abbauprodukte mit löslichem Trypsins nach Inkubation über Nacht bei 37°C; C-18 Säule (2 μm , 300 Å); Säule: 0.3 x 125 mm. Als Flußrate wurden 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet, die Detektion erfolgte bei 214 nm, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95 % B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075 % TFA in Wasser 80:20)

Wird dagegen das immobilisierte Trypsin eingesetzt, so wird im Vergleich zum löslichen Trypsin bei kleinen Retentionszeiten eine verminderte Anzahl an Banden erhalten (siehe Abbildung 38). Dies läßt auf eine verlangsamte Abbaukinetik schließen. Die Reaktionslösung verarmt nur langsam an den großen unpolaren Peptiden, die bei hohen Retentionszeiten eluieren. Die großen Bruchstücke können sowohl von nur unvollständig abgebautem oder unverdaulichem β -Casein stammen. Abbauprodukte von Trypsin selbst oder dessen BSA-Spacer können durch das Kontrollexperiment in Abschnitt 4.5.2.2 weitgehend ausgeschlossen werden.

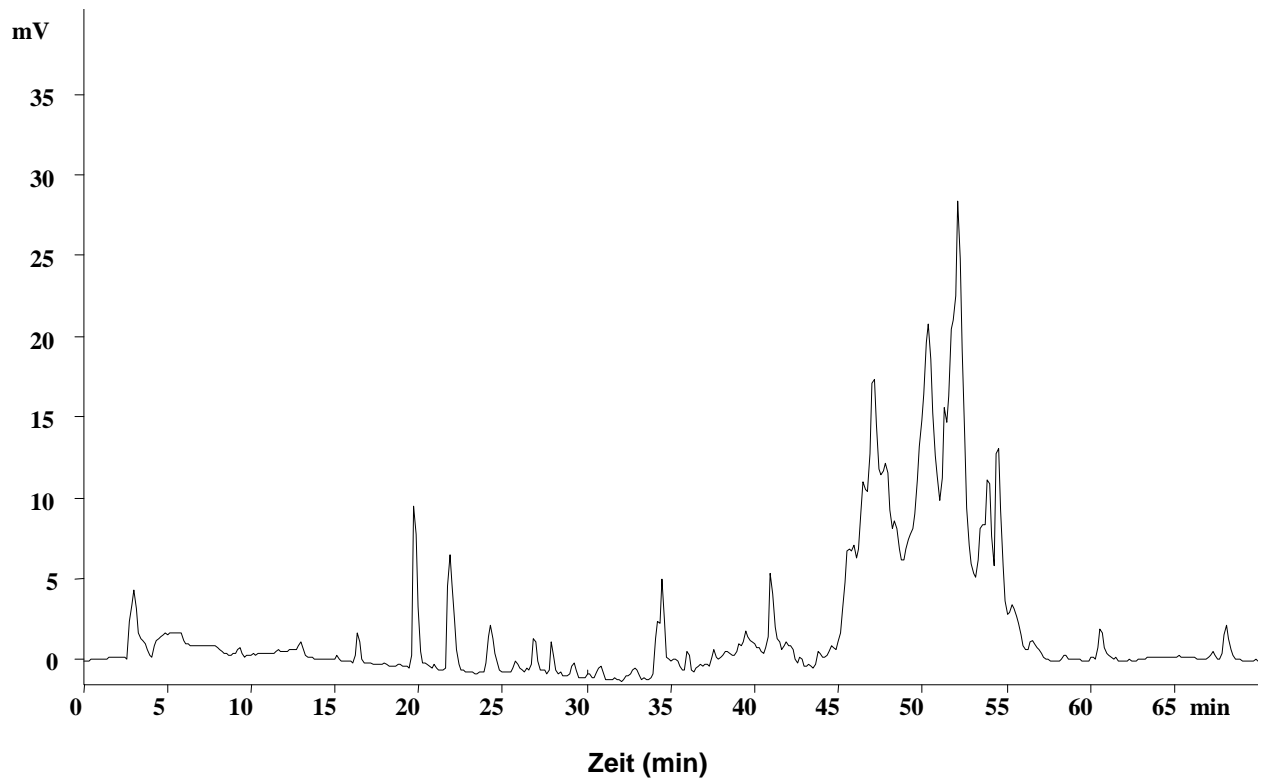


Abbildung 38: RP-HPLC-Chromatogramm der Casein-Abbauprodukte mit immobilisiertem Trypsins (BSA-Spacer) nach Inkubation über Nacht bei 37°C; C-18 Säule (2 μm , 300 \AA); Säule: 0.3 x 125 mm. Als Flußrate wurden 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet, die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm, als Gradient diente das folgende Programm: 0-10 min: 0-20 % B, 10-50 min: 20-60 % B, 50-60 min: 60-95 % B, 60-70 min: 95-5 % B, (A: 0.05 % TFA in Wasser, B: Acetonitril/0.075 % TFA in Wasser 80:20), eingespritzt wurden 5 μl des konzentrierten Überstandes, aufgenommen in 100 μl Lösung A.

4.6 Co-Immobilisierung

Für zahlreiche Anwendungen ist die Immobilisierung von mehreren Enzymen auf dem selben Trägermaterial von Interesse. Besonders bei Oberflächenbehandlungen ist es von Vorteil, unterschiedlich wirkende Enzyme parallel einzusetzen. Voraussetzung zu einer solchen Co-Immobilisierung ist, daß die Enzyme in ihrer aktiven Konformation immobilisiert werden. Dazu wurden α -Amylase und Trypsin über den BSA-Spacer auf dem PET-Vlies co-immobilisiert.

Die qualitative Verteilung der Enzyme Trypsin und α -Amylase bei deren Co-Immobilisierung wurde durch Kopplung mit den fluoreszierenden Substanzen Fluoreszein-isothiocyanat (FITC) und Rhodamin-B-Isothiocyanat (RBI) sichtbar gemacht. Dazu wurden polyklonale Antikörper gegen Trypsin und α -Amylase mit diesen Verbindungen markiert und anschließend mit den auf dem PET-Vlies co-immobilisierten Enzymen zur Reaktion gebracht.

4.6.1 Aktivität der co-immobilisierten Enzyme

Zur Co-Immobilisierung von Trypsin und α -Amylase wurden dieselben Techniken verwendet, die bei der Immobilisierung von Trypsin alleine zum Einsatz kamen (vgl. Kapitel 3.2.1). Die Anbindung der beiden Enzyme erfolgte über den BSA-Spacer (vgl. 3.2.1.7). Dabei wurden die Enzyme in unterschiedlichen Verhältnissen eingesetzt.

Aus Tabelle 10 wird deutlich, daß das jeweils mit konstanter Menge eingesetzte Trypsin bei den verschiedenen Verhältnissen von α -Amylase Aktivitäten der gleichen Größenordnung besitzt. Dabei fällt auf, daß im Falle der Verhältnisse Trypsin: α -Amylase 10:10 bzw. 10:5 etwas höhere Trypsin-Aktivitäten erhalten werden. Die Aktivitäten der α -Amylase zeigen mit abnehmender Menge eine entsprechend verminderte Enzymaktivität.

Tabelle 10: Trypsin und α -Amylaseaktivitäten nach deren Co-Immobilisierung in unterschiedlichen Verhältnissen beider Enzyme. Trypsin wurde jeweils in einer Menge von 10 mg pro 2 ml Kaliumphosphat pH 7.5 eingesetzt, α -Amylase dazu im angegebenen Verhältnis. Pro 1 cm² Vlies wurden 100 μ l dieser Mischungen zur Co-Immobilisierung eingesetzt. Diese wurde jeweils über das BSA-modifizierte PET-Vlies durchgeführt.

Verhältnis (w/w) Trypsin: α -Amylase	Trypsinaktivität:		α -Amylaseaktivität	
	Abs. 405 nm	Abs. 570 nm nach 1h	Abs. 570 nm nach 2h	
10:10	1.315	0.031	0.086	
10:5	1.121	0.019	0.081	
10:2	0.945	0.006	0.075	
10:1	0.903	0.009	0.009	
10:0.5	1.072	0	0.001	

4.6.2 Fluoreszenzmessungen von immobilisierten Proteinen bzw. Enzymen

Zur Visualisierung der gebundenen Proteine bzw. Enzyme können Fluoreszenzchromophore eingesetzt werden. Eine Markierung dieser Proteine mit den stark fluoreszierenden Chromophoren FITC oder RBI kann über die Reaktion der freien Aminogruppen mit den Isothiocyanatgruppe der Chromophore erfolgen.

Diese Methode wurde mit dem immobilisierten BSA-Spacer optimiert. Das BSA wurde jeweils wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben, mit FITC bzw. RBI markiert und anschließend auf das PET-Vlies immobilisiert. Um qualitativ die Menge an fluoreszierender Substanz auf dem Vlies zu bestimmen, wurde eine Eichgerade für verschiedene Konzentrationen an FITC bzw. RBI aufgenommen. In Abbildung 39 sind Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der in Abbildung 40 gezeigten Eichgeraden von FITC dargestellt. Die Werte für die Eichgerade wurden im Fluoreszenzmaximum bei 520 nm bestimmt.

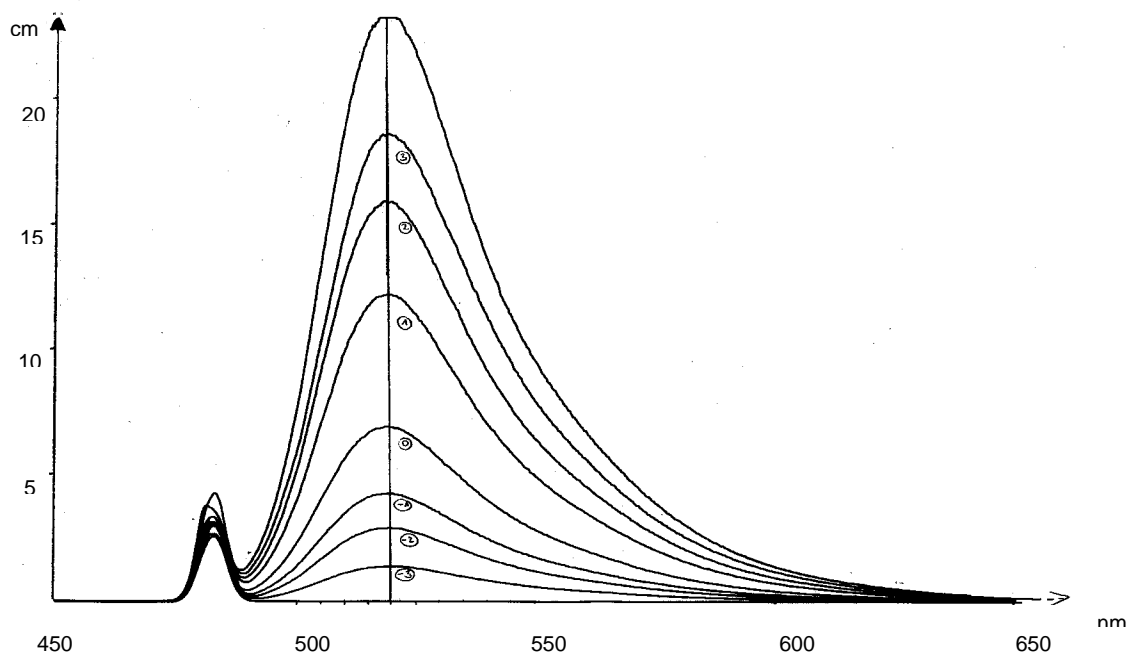


Abbildung 39: Fluoreszenzspektren von FITC, die Anregungswellenlänge lag bei 480 nm. Die Konzentrationen von FITC entsprechen den in Abbildung 40 angegebenen Werten.

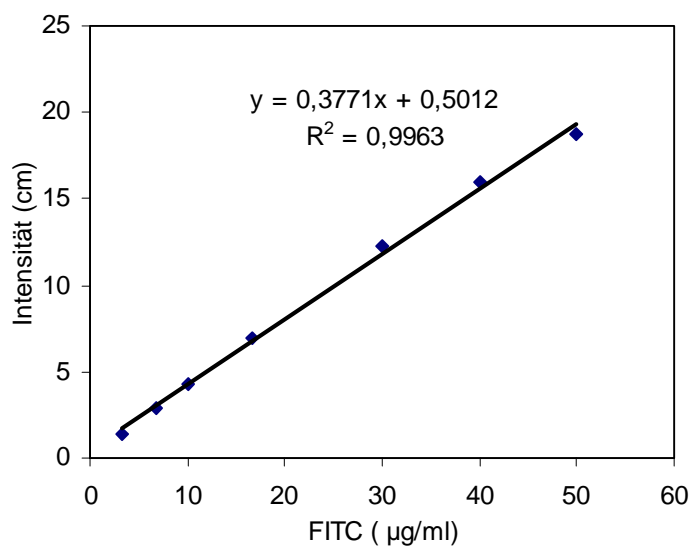


Abbildung 40: Eichgerade für FITC. Darstellung der Fluoreszenzwerte bei 520 nm der in Abbildung 39 gezeigten Spektren.

Die Fluorimeter-Messungen von FITC in unterschiedlichen Konzentrationen zeigen eine gute Korrelation der Signalintensität gegenüber der FITC-Konzentration.

In Abbildung 41 sind die Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der Eichgerade (Abbildung 42) von RBI dargestellt.

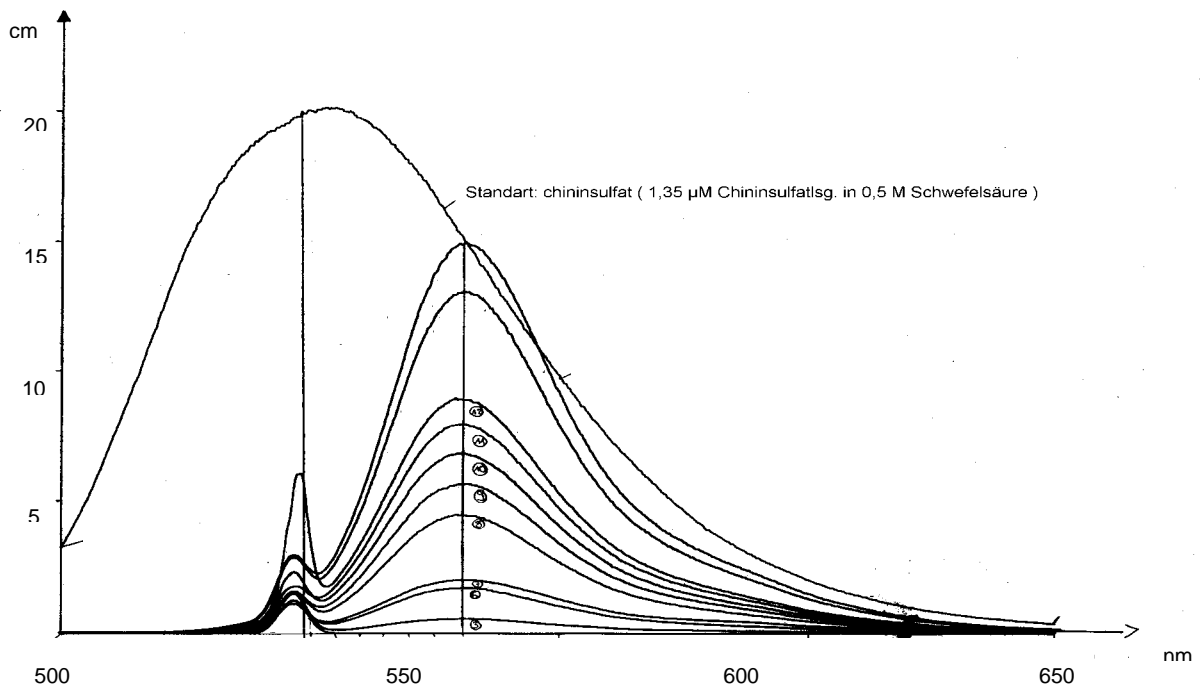


Abbildung 41: Fluoreszenzspektren für RBI, die Anregungswellenlänge lag bei 530 nm. Die Konzentrationen von FITC entsprechen den in Abbildung 42 angegebenen Werten.

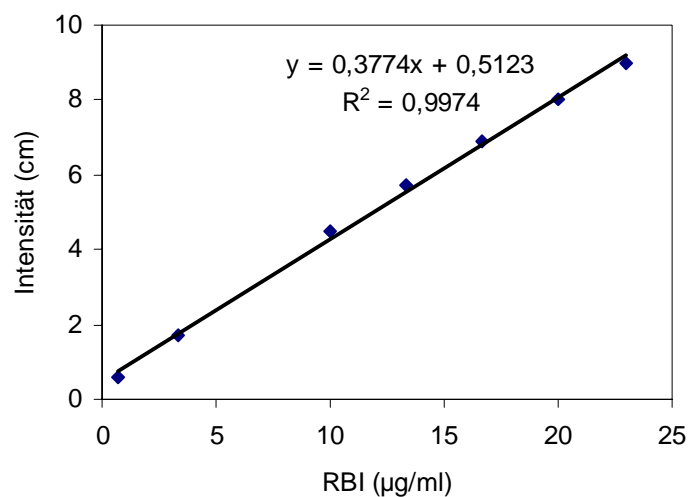


Abbildung 42: Eichgerade für RBI. Darstellung der Fluoreszenzwerte bei 580 nm der in Abbildung 41 gezeigten Spektren.

Auch die Fluorimeter-Messungen von RBI in unterschiedlichen Konzentrationen zeigen eine gute Korrelation der Signalintensität gegenüber der RBI-Konzentration. Die Fluoreszenzmessung am markiertem und auf PET-Vlies immobilisiertem BSA sind in Abbildung 43 und Abbildung 44 dargestellt.

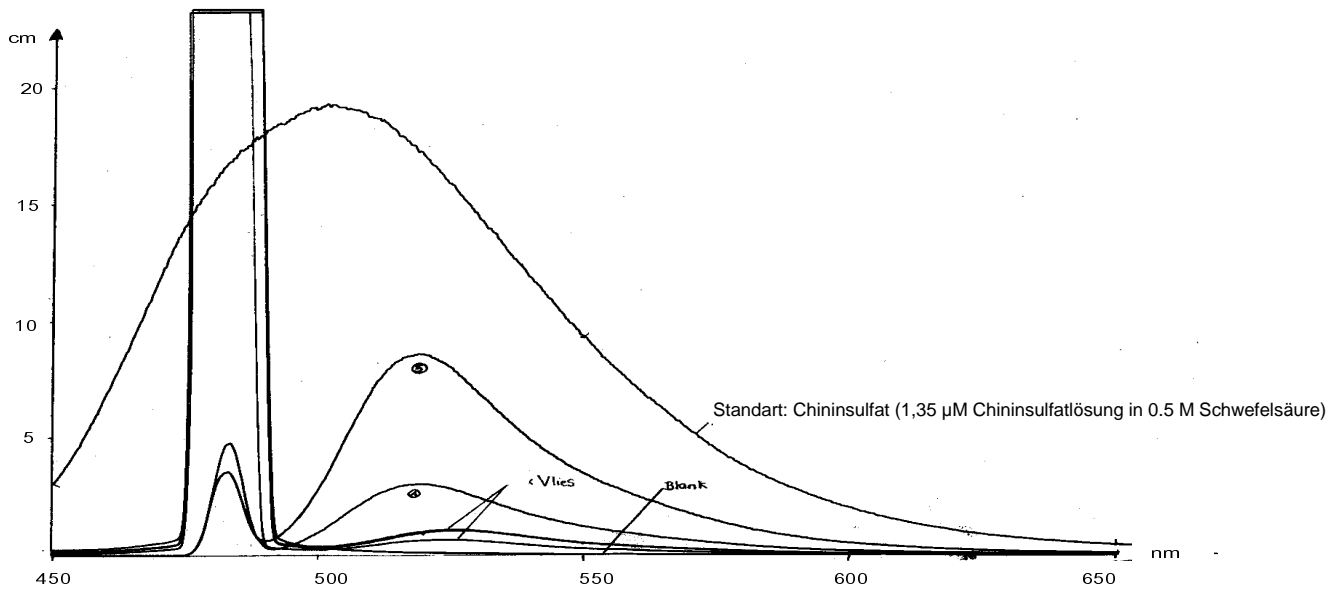


Abbildung 43: Emissionskurve von über BSA auf dem PET-Vlies gebundenem FITC, die Anregungswellenlänge lag bei 480 nm.

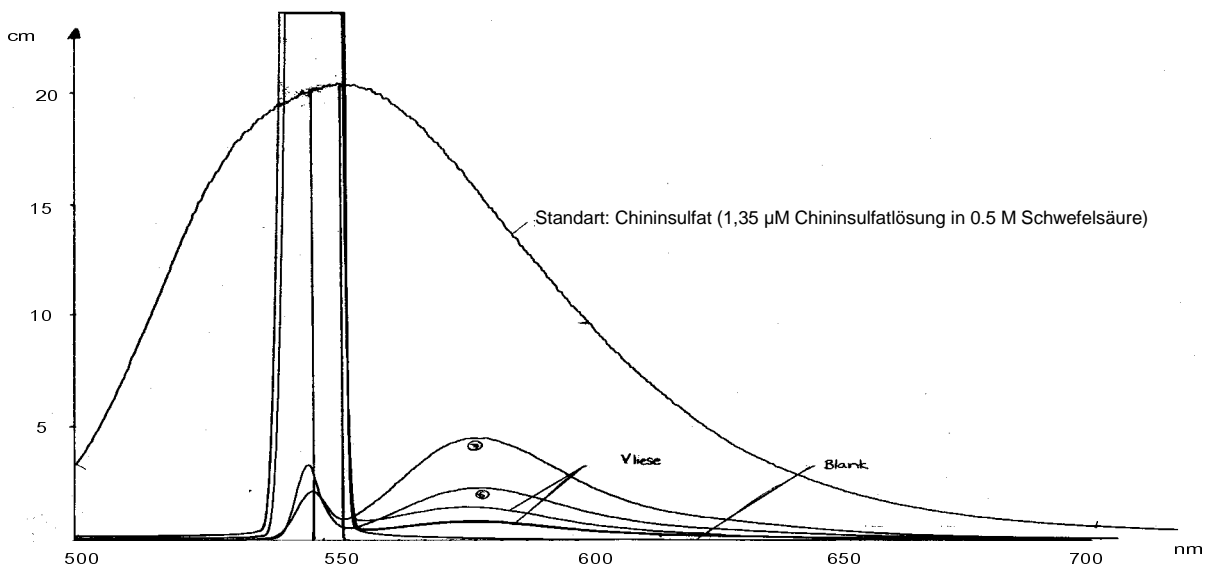


Abbildung 44: Emissionskurve von über BSA auf dem PET-Vlies gebundenem RBI, die Anregungswellenlänge lag bei 530 nm.

Aus den Emissionskurven von FITC und RBI lassen sich über die Eichgeraden die Mengen der jeweils immobilisierten Chromophoren errechnen. Dabei werden die folgenden Werte erhalten:

- Menge an auf BSA immobilisiertem FITC: ca. 1 μg pro 1 cm^2 Vlies
- Menge an auf BSA immobilisiertem RBI: ca. 2,5 μg pro 1 cm^2 Vlies

Durch Aufnahmen im Fluoreszenzmikroskop wurde die räumliche Verteilung des mit FITC markierten und immobilisierten BSA beobachtet. Abbildung 45 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von PET Vlies, an das FITC markierten BSA immobilisiert wurde.

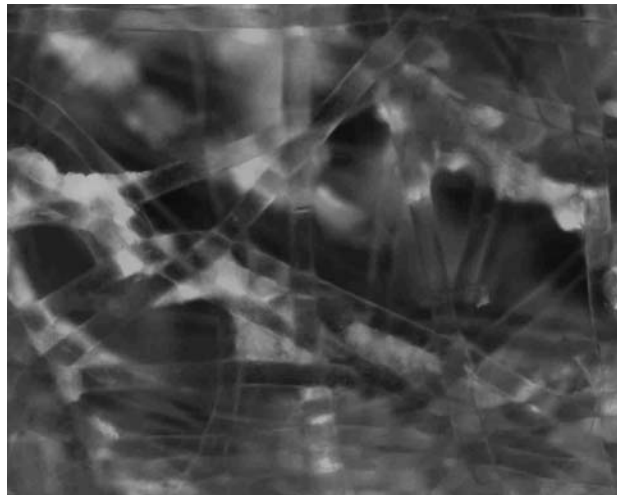


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PET-Vlies, an das FITC markiertes BSA immobilisiert wurde (20 fache Vergrößerung).

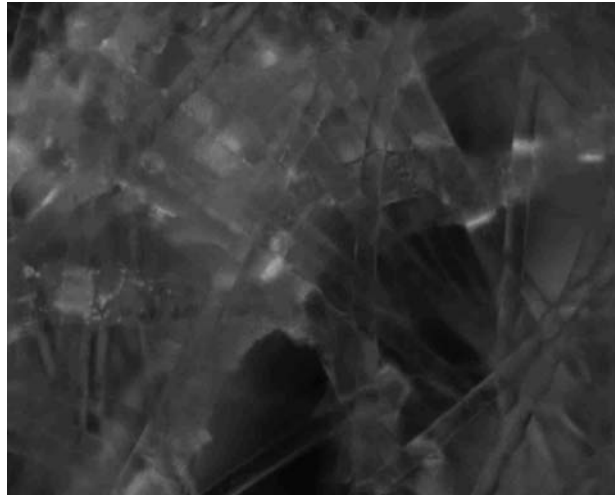


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von PET-Vlies, das mit FITC markiertem Trypsin über unmarkiertes BSA immobilisiert wurde (20 fache Vergrößerung).

Abbildung 46 zeigt die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von mit FITC markiertem und immobilisiertem Trypsin, das über nicht markiertes BSA an die PET-Oberfläche gebunden wurde. Im Vergleich mit Abbildung 45 wird deutlich, daß ein geringerer Anteil an fluoreszierenden Molekülen erhalten wird. Dies kann einerseits mit der Tatsache erklärt werden, daß der große, globuläre Spacer BSA wesentlich mehr Chromophore binden kann. Andererseits werden bei der Markierung von Trypsin bereits zahlreiche Aminogruppen mit den Thioisocyanatgruppen blockiert. Damit stehen zur Immobilisierung des markierten Trypsins nur noch wenig freie Aminogruppen zur Verfügung.

Im folgenden wird die Fluoreszenzmarkierung nicht direkt an Trypsin durchgeführt. Vielmehr wird die Kopplung von fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen Trypsin und α -Amylase an diese aktiven immobilisierten Enzyme untersucht.

4.6.3 Markierung von Antikörpern zur Verfolgung der Co-Immobilisierung

Zum Nachweis der co-immobilisierten Enzyme wurden jeweils polyklonale Antikörper eingesetzt, die die Enzyme Trypsin und α -Amylase jeweils spezifisch erkennen. Um diese Antikörper nachweisen zu können, wurden diese mit den Fluorophoren FITC und RBI markiert. Um in Fluoreszenzaufnahmen zwischen Trypsin und α -Amylase unterscheiden zu können, wurde die für Trypsin spezifischen Antikörper mit RBI, die für α -Amylase spezifischen Antikörper dagegen mit FITC markiert. In einer Voruntersuchung wurde getestet, in wie weit die Markierung dieser Antikörper deren Wechselwirkung mit deren Antigenen, d.h. den Enzymen einschränkt.

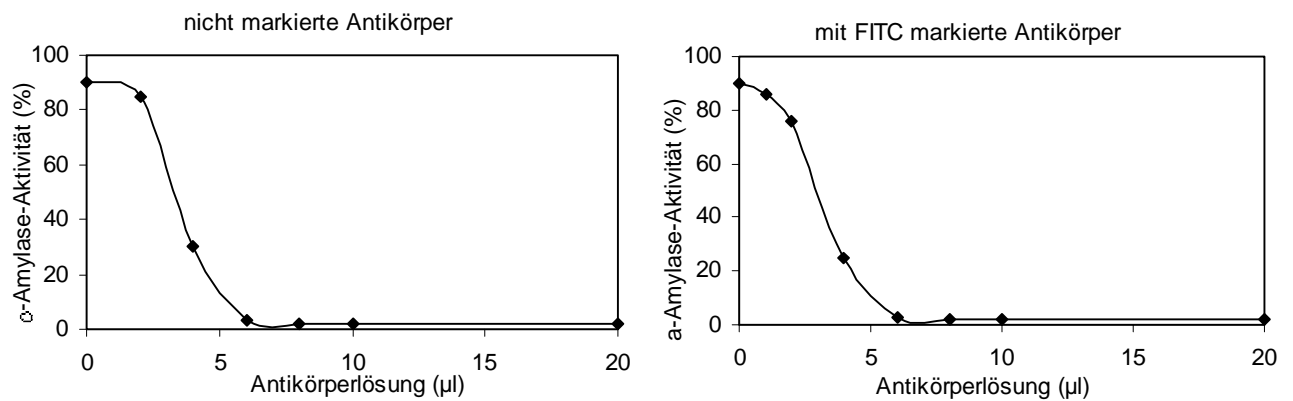


Abbildung 47: Amylase-Test bei 570 nm und 37°C mit nicht markierten und FITC-markierten Antikörpern gegen α -Amylase. Es wurden jeweils 10 µl einer Amylaselösung (0.5 mg/ml) vorgelegt und mit unterschiedlichen Volumina der Antikörper-Lösung versetzt und für 1 h bei RT und 30 min in Eiswasser inkubiert.

Der Amylase-Test zeigt keine Unterschiede der Antikörperbindung an α -Amylase vor und nach der Markierung der Antikörper mit FITC. Nach der Markierung ist ebenfalls eine 100 %-Hemmung bei vergleichbarer vorgelegter Menge an α -Amylase zu erkennen. Die Wirkung der Antikörper wird demnach durch die Markierung nicht beeinträchtigt und es kann geschlossen werden, daß die markierten Antikörper auch mit dem immobilisierten Antigen reagieren.

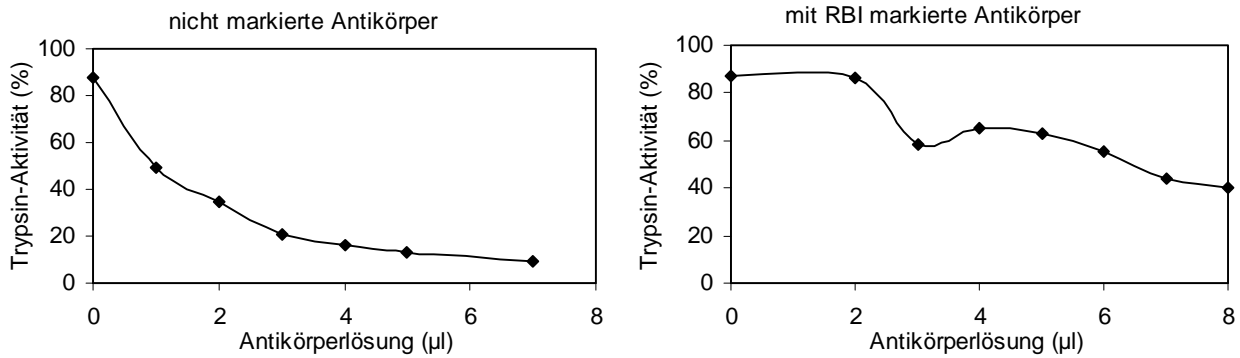


Abbildung 48: Trypsin-Test über BAPNA bei 405 nm und RT mit nicht markierten und RBI-markierten Antikörpern gegen Trypsin. Es wurden jeweils 10 µl einer Trypsinlösung (0.5 mg/ml) vorgelegt und mit unterschiedlichen Volumina der Antikörper-Lösung versetzt und für 1 h bei RT und 30 min in Eiswasser inkubiert.

Abbildung 48 zeigt, daß die Aktivität von nicht markiertem Trypsin durch seine Antikörper nicht vollständig gehemmt wird. Nach der Antikörper-Antigen-Reaktion bleibt bei der angewendeten Höchstmenge eine Restaktivität von ca. 10 % erhalten. Im Falle des mit RBI markierten Antikörpers wird die Trypsinaktivität bei gleichen Antikörpermengen nur auf ca. 40 % inhibiert. Die markierten Antikörper zeigen also noch eine hemmende Wirkung, die allerdings nicht mehr so stark ist wie mit den unmarkierten Antikörpern. Trotzdem können auch diese Antikörper zum Nachweis des an PET Vlies gebundenen Trypsins herangezogen werden.

In Abbildung 49 und Abbildung 50 sind die Fluoreszenzaufnahmen des Co-Immobilisates von Trypsin und α -Amylase dargestellt. Wie beschrieben, wurden die auf Trypsin spezifischen Antikörper mit RBI, die auf α -Amylase spezifischen mit FITC markiert. Durch Anregung mit 480 nm kann das FITC bei 520 nm, also im grünlichen Bereich, zum Fluoreszieren gebracht werden, eine Einstrahlung bei 530 nm führt zur Fluoreszenz von RBI bei 570 nm (rötlicher Bereich). Auf diese Weise kann zwischen den co-immobilisierten Enzymen Trypsin und α -Amylase unterschieden werden.



Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Co-Immobilisates aus Trypsin und α -Amylase. Es wurden FITC-markierte polyklonale Antikörper gegen α -Amylase eingesetzt. Als Anregungswellenlänge wurden 480 nm eingesetzt, das Fluoreszenzmaximum lag bei 520 nm.



Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Co-Immobilisates aus Trypsin und α -Amylase. Es wurden RBIT-markierte polyklonale Antikörper gegen Trypsin eingesetzt. Als Anregungswellenlänge wurden 530 nm eingesetzt, das Fluoreszenzmaximum lag bei 570 nm.

Aus den obigen Abbildungen wird deutlich, daß die RBI- als auch die FITC-markierten Antikörpern jeweils an benachbarten Orten fluoreszieren. Daraus kann geschlossen werden, daß Trypsin als auch α -Amylase nicht homogen über das gesamte Vlies verteilt, sondern jeweils an eng benachbarten Orten des PET-Vlieses gebunden sind.

5 Diskussion

Immobilisierte und damit unlösliche Enzyme bieten alle Vorteile der klassischen heterogenen Katalyse. Bei der Immobilisierung auf zwei-dimensionale Trägermaterialien kann es zu Wechselwirkungen zwischen den gebundenen Enzymen und der Trägeroberfläche kommen, die zur Beeinträchtigung der Katalyseeffizienz führen können. Sind bestimmte Trägermaterialien Voraussetzung für eine bestimmte Anwendung, bieten aber den Enzymen eine ungeeignete Umgebung, so müssen die Enzyme über Abstandshalter stabilisiert werden.

Im Rahmen des Papierspaltverfahrens zur Restaurierung von geschädigten Dokumenten wird ein Enzymbad zur Ablösung der bei diesem Verfahren benötigten Gelatine eingesetzt. Um die Nachteile eines solchen Bades zum umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Immobilisierung von Trypsin auf Polymer-Vliesen untersucht. Dabei kam Polyester zum Einsatz, das einerseits eine große mechanische Festigkeit, andererseits aber auch eine gute Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln und Säuren sowie Laugen besitzt.

Innerhalb des Papierspalverfahrens spielt gerade die mechanische Festigkeit eine große Rolle. Die auf den PET-Vliesen immobilisierten Enzyme sollen schließlich wiederholt zur Anwendung kommen. Da diese Vliese aber nur wenig funktionelle Gruppen zur weiteren Modifikation bzw. Anbindung des Enzyms besitzen, mußte eine Methode zur Schaffung dieser Reaktionszentren entwickelt werden, die nicht zu einer Strukturdestabilisierung des PET-Vliese führte.

5.1 Immobilisierung von Trypsin über verschiedene Spacer

5.1.1 Aktivierung des Polyestervlieses

Durch partielle Hydrolyse des Polyester-Vlieses können funktionelle Gruppen generiert werden, die für die Anbindung der Spacer zur Verfügung stehen (Sundaram & Hornby, 1970, Inman & Hornby, 1972). Obwohl zunächst befürchtet werden mußte, daß die Struktur des Polyestervlieses dabei beschädigt wird, waren erste Ergebnisse mit Polyamid als Trägermaterial durchaus vielversprechend (Möschel *et al.*, 2002). Daher wurde die gleiche Strategie auch im Falle der Polyestervliese angewandt. Durch die saure Hydrolyse konnten reaktive Carboxylgruppen gebildet werden, die im weiteren Verlauf für die Anbindung der Spacer und Enzyme genutzt wurden (Carvajal *et al.*, 1977). Durch die Aufnahme von SEM-Bildern nach der Hydrolyse konnte ebenfalls bewiesen werden, daß die Grundstruktur des Polyester-Vlieses durch die Säurehydrolyse keinen erkennbaren Schaden nimmt. Auch die ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektroskopie bestätigt diese Aussage. Die Spektren der Vliese vor und nach der Hydrolyse zeigen keine zusätzlichen Resonanzen, die auf eine Zerstörung der Vliesstruktur schließen ließen. In den ^1H -Festkörper-NMR-Spektren lassen sich allerdings Unterschiede erkennen. Es wird deutlich, daß nach der Hydrolyse freie OH-Gruppen und damit Carboxylatgruppen zur Modifizierung generiert wurden. Wertet man die SEM-Aufnahmen, die NMR-Spektroskopie zusammen mit der verbleibenden mechanischen Eigenschaften des hydrolysierten Polyester-Vlieses, so kann klar bewiesen werden, daß die Grundstruktur erhalten bleibt.

Ein Nachteil des Polyestervlieses ist dessen relativ hydrophobe Oberfläche, die für das Enzym eine ungeeignete Umgebung darstellt. Eine direkte Anbindung ohne die Verwendung eines Spacers führt daher zu sehr kleinen Aktivitäten des immobilisierten Trypsins. In diesem Falle wurde das Trypsin über die mit Dicyclohexylcarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktivierten Carboxylgruppen immobilisiert. Zudem besitzen die direkt gebundenen Enzyme keine gute Langzeitstabilität. Dies kann auf den direkten Kontakt des Enzyms mit der wenig polaren Vliesoberfläche zurückgeführt

werden. Möglicherweise kommt es trotz der Immobilisierung zur Wechselwirkung von hydrophoben Anteilen des Enzyms mit der Träger-Oberfläche, d.h. die aktive Konformation des Enzyms geht verloren. Eine Einführung von Spacern ist daher unerlässlich. Allerdings muß hierfür eine spezielle Synthesestrategie entwickelt werden.

5.1.2 Einführung von Spacern

Um das immobilisierte Trypsin von der hydrophoben Oberfläche des Polyestervliese abzusichern sind unterschiedliche Spacersysteme vortsellbar. Es können sowohl kurz- und langkettige Spacer als auch solche mit unterschiedlichen Polaritäten sowie voluminöse Spacer mit mehreren Bindungsstellen eingesetzt werden. Bei kurz-kettigen, linearen Spacern kann erwartet werden, daß keine wesentliche Abschirmung des Enzyms von der wenig polaren PET-Oberfläche erreicht wird. Cuatrecasas (1971) und Chim-anage *et al.* (1986) berichteten, daß eine Mindest-Spacerlänge nötig ist, um die sterische Hinderung bei Substrat-Enzym-Wechslewirkungen zu minimieren. Andererseits spielt gerade die Polarität bei der Auswahl eines geeigneten Spacers eine entscheidenen Rolle. Flemming *et al.* (1981) zeigten, daß hydrophile im Gegensatz zu hydrophoben Spacern eine weniger ausgeprägte Abhängigkeit der Bindungskapazität in Bezug auf die Spacerlänge besitzen. Vor allem bei der Immobilisierung von Proteinen mit einer großen Oberfläche ist eine große Spacerlänge von Vorteil. Nur wenn das immbolisierte Protein weit genug vom Trägermaterial entfernt ist, kann es von allen Seiten vom makromolekularem Substrat erreicht werden. Werden lange aliphatische Ketten eingesetzt, so können diese nach Penzol *et al.* (1998) zu unerwünschten Wechselwirkungen mit dem immobilisiertem Enzym, aber auch mit dem Substrat führen. Lange, flexible und hydrophile Spacersysteme sollten dagegen zur Bindung gut geeignet sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Immobilisierung von Trypsin die relativ hydrophilen Spacer Aldehyd-Dextran und Amino-Dextran und das flexible PEG-Diamin, sowie das voluminösen BSA untersucht. Je nach Spacer, mußten jeweils verschiedene Synthesewege entwickelt werden.

Zur Bindung des Aldehyd-Dextran-Spacers wurde das aktivierte Vlies mit Ethylen-

diamin behandelt. Die freien Aminogruppen konnten direkt mit dem Aldehyd-Dextran umgesetzt werden. Nach einer Reduktion der gebildeten Schiff'schen Base und der restlichen Aldehydgruppen und einer anschließenden Oxidation zur Bildung neuer Aldehydgruppen am Dextran wurden diese mit Trypsin umgesetzt.

Aminodextran, PEG-Diamin und BSA wurden jeweils über ihre freien Aminogruppen direkt auf das aktivierte PET-Vlies gebunden. Die Immobilisierung von Trypsin erfolgte über eine Verknüpfung mit Glutaraldehyd.

Aus den oben beschriebenen Synthesewegen wird deutlich, daß die Bindung über den Aldehyd-Dextran-Spacer eine komplexe Reaktionsführung mit Reduktions- und Oxidationsschritten über 5 Stufen erfordert. Die Einführung der Amino-Dextran-, PEG-Diamin- und BSA-Spacer ist dagegen wesentlich einfacher über eine dreistufige Reaktionsführung ohne Oxidations- und Reduktionsschritte möglich. Die Durchführung solcher Oxidations- und Reduktionsreaktionen stellt eine starke Beanspruchung für das Vliesmaterial dar und beeinflußt somit dessen mechanische Stabilität, die gerade für die Anwendung im Papierspaltprozeß wichtig ist. Daher sind die Amino-Dextran, PEG-Diamin und BSA-Spacer unter synthetischen Aspekten vorzuziehen.

5.2 Charakterisierung des immobilisierten Trypsin

Für die Immobilisierung des Trypsins über verschiedene Spacer ist vor allem dessen resultierende Aktivität von Bedeutung. Dabei muß das Enzym nach seiner Immobilisierung über die verschiedenen Spacer einerseits in genügender Menge, andererseits aber in einer aktiven Form vorliegen. Die Immobilisierung muß demnach in einem geeigneten pH Bereich erfolgen, um das Enzym in seiner aktiver Konformation zu binden.

Von den untersuchten Spacern zeigt der Aldehyd-Dextran-Spacer die schlechtesten Ergebnisse. Einerseits werden nur relativ geringe Mengen immobilisiert, andererseits besitzt das gebundene Trypsin nur eine schwache Aktivität. Möglicherweise können diese Tatsachen auf die aufwendigen Reaktionsführung zur Bindung des Trypsins über den Aldehyd-Dextran-Spacer zurückgeführt werden. So können schon im ersten Schritt

der Reaktion von Aldehyd-Dextran mit dem ethylendiamin-gebundenem Vlies eine Großzahl der Aldehydgruppen abreagieren und stehen folglich nicht mehr zur Bindung mit Trypsin zur Verfügung. Daher wurde dieser Spacer im folgenden nicht weiter betrachtet.

Die Spacer PEG-Diamin, Amino-Dextran und BSA dagegen verhalten sich in Bezug ihrer stabilisierenden Wirkung auf das immobilisierte Trypsin sehr ähnlich. So kann in den Untersuchungen zum Temperatureinfluß ein klar stabilisierender Effekt der Spacer erkannt werden. Es ist bekannt, daß es in Temperaturbereichen von 0-60°C innerhalb denen die meisten Enzyme ihre höchsten Aktivitätswerte zeigen, zu reversiblen Bewegungen ganzer Segmente, auch konzertierten Bewegungen, kommt, die für Substratbindungsprozesse, Katalyse oder Produktfreisetzungen notwendig sind, und normale Phänomene für aktive Enzyme darstellen (Karplus & McCammon, 1981). Obwohl das Protein einige Bewegungsfreiheit besitzt, werden die vorherrschenden Konformationen durch ein komplexes Gleichgewicht von intramolekularen, nichtkovalenten Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben, ionischen und van der Waals-Wechselwirkungen bestimmt. Ab einer bestimmten Temperatur treten starke intramolekulare Bewegungen auf, wobei das Protein seine geordnete Sekundär- und Tertiärstruktur zum größten Teil verliert und demnach denaturiert, also in einer inaktiven Form vorliegt (Kauzmann, 1959, Tanford, 1968, Lapanje, 1978, Privalov, 1979 und Pfeil, 1981). Die oben beschriebenen Änderungen lassen sich an löslichem Trypsin gut verfolgen. Schon nach kurzer Zeit bei erhöhter Temperatur ist keine Aktivität mehr messbar. Die eingesetzten Spacer scheinen diesen Denaturierungsprozeß deutlich zu verzögern. Offensichtlich ist das immobilisierte Enzym durch die Anbindung über die Spacer auch in seiner Konformation stabilisiert bzw. benötigt für Konformationsänderungen deutlich größere Aktivierungsenergien als das freie Trypsin. So ist auffallend, daß Enzyme in Zellen oder in hochkonzentrierter Lösung deutlich stabiler sind als gereinigte Enzyme in verdünnter Lösung. Die Proteine können sich demnach selbst stabilisieren, in der Zelle kann es auch Stabilisatoren, z.B. organische Phosphatverbindungen geben. Die Immobilisierung von Trypsin über Spacer bestätigt diese Erkenntnisse. Vor allem im Falle des BSA-Spacers werden klare Stabilisierungseffekte beobachtet. Dies mag durch die enge Anbindung

des Trypsins auf den BSA Spacer verursacht werden.

Die Stabilität von Enzymen nimmt in der Regel im sauren und basischen pH-Bereich stark ab. Als einfache Erklärung wird ein Einfluß der Protonen auf den Entfaltungsprozeß angenommen, da der pKs-Wert von einigen Gruppen innerhalb des Proteins im nativen und entfalteten Zustand unterschiedlich ist (Privalov, 1979, Hermanns & Scheraga, 1961, Baldwin & Baldwin, 1987). Unterschiedliche Seitengruppen wie z.B. -COO^- oder -NH_3^+ zeigen pK-Werte, die stark durch die lokale Umgebung bzw. der lokalen Ladungsverteilung beeinflusst werden. Die Ladungsverteilung kann nun durch den von außen vorgegebenen pH-Wert verändert werden, was zur Umorientierung einzelner funktioneller Gruppen und damit zur Entfaltung führt. Im Falle des immobilisierten Trypsins wird im alkalischen Bereich bis pH 11 eine deutliche Stabilisierung gegenüber dem löslichen Trypsin erhalten. Zudem zeigt das immobilisierte Trypsin eine stark verzögerte Autolyse, die durch dessen Fixierung eingeschränkt wird. Ein Teil der endständigen Aminogruppen von Lysin-Resten im Trypsin ist durch die Verknüpfung mit Carboxylgruppen des Spacers blockiert und sollte damit die Resistenz gegen Autolyse verbessern. Ähnliche Ergebnisse wurde auch von Goldstein *et al.*, 1964 und Levin *et al.*, 1964 berichtet und bestätigen diese Untersuchungen. Im Gegensatz zum basischen Bereich ist das lösliche Trypsin im sauren Bereich von pH 4 bis 6 stabil und zeigt im Vergleich zum immobilisierten die gleichen Eigenschaften.

Um z.B. im Papierspaltverfahren eingesetzte Vliese vor Befall durch Bakterien und Mikroorganismen zu bewahren, müssen günstige Bedingungen für eine längere Lagerung gefunden werden. Vorzugsweise werden dafür die stark bakteriziden Ethanol/Wasser-Gemische eingesetzt. Daher ist es erforderlich, daß das auf den PET-Vliesen immobilisierte Trypsin eine gute Stabilität in Ethanol besitzt. Das lösliche Enzym wird schon in Gemischen mit relativ geringem Enthanolgehalt denaturiert, während das immobilisierte Trypsin sogar in reinem Ethanol seine Aktivität teilweise beibehält. Offensichtlich kommt es durch die Polaritätsabnahme vom Wasser zum Ethanol zu einer konformativen Änderungen der Proteinstruktur, was sich auf die Aktivität auswirkt. Dabei könnte die Immobilisierung einer Umorientierung des

Trypsins entgegenzuwirken. Es ist bekannt, daß im allgemeinen die apolaren Seitenketten, wie sie z.B. in den Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin vorkommen, in das innere des Proteins, also vom Lösungsmittel abgeschirmt, gerichtet sind. Die geladenen, polaren Seitenketten dagegen, sind dem Lösungsmittel zugerichtet, vor allem mit den Stickstoff und Sauerstoffatomen ihrer Seitenketten. Daher ist es gut vorstellbar, daß eine Änderung hin zu schwächeren Polaritäten zur Inaktivierung des löslichen Trypsins führt.

Schon Gaertner & Puigserver, 1992 haben die Modifizierung von Trypsin mit PEG-aktivierten Carbonaten untersucht. Dabei wurde festgestellt, daß die Reaktion der Aminogruppen des Trypsins mit PEG-Carbonaten durch eine Zunahme der Enzymaktivität begleitet wird, was für wasserlösliche Proteine sehr ungewöhnlich ist. Des weiteren soll die Acetylierung der Tyrosin-Reste die Trypsinaktivität ebenfalls steigern (Trenholm *et al.*, Sri ram *et al.*, 1962, Labouesse & Gervais, 1967). Dies läßt den Schluß zu, daß eine Modifizierung in der nächsten Umgebung des Enzyms zu Änderungen von dessen katalytischen Eigenschaften führt (Remy *et al.*, 1985). Als Erklärung schlagen die Autoren eine Konformationsänderung des Trypsins vor, die durch die Anbindung der hydrophilen PEG-Ketten verursacht werden könnte. Die erhaltene hohe Stabilität des PEG-modifizierten Trypsins soll durch die komplexe Bildung einer ganzen Matrix von Wasserstoffbrückenbindungen verursacht werden. Gaertner *et al.* (1992) haben die katalytischen Eigenschaften des mit PEG-modifizierten Trypsins ebenfalls über das BAPNA-Substrat bestimmt. Die Autoren fanden eine Umsetzung, die etwa 4-5 mal größer als von nativem Trypsin war.

Die hier vorgestellten Ergebnisse mit dem PEG-Spacer bestätigen die oben geschilderten Untersuchungen. Durch die Immobilisierung über den PEG-Diamin-Spacer wird ein klarer Stabilitätsgewinn des Trypsins erzielt. Die in Tabelle 7 für den PEG-Diamin Spacer dargestellte Aktivität ist mit den Werten von Gaertner *et al.* (1992) vergleichbar. So kann davon ausgegangen werden, daß die oben beschriebenen Stabilisierungseffekte auch in dieser Untersuchung zutreffend sind.

Da die Ergebnisse des BSA-Spacers die besten Stabilitäten mit den höchsten Enzymaktivitäten zeigten, wird diese Art der Immobilisierung im folgenden

weiterverfolgt. Es ist gut bekannt, daß hohe Proteinkonzentrationen im allgemeinen die Enzym-Denaturierung hemmen. Gerade BSA wird oft verwendet, um diesen Stabilisierungseffekt auf Enzyme, die in verdünnter Lösung vorliegen (z.B. in Enzymtests) auszunutzen. Andererseits ist gerade Trypsin eine Protease, die für Autolyse-Reaktionen sehr anfällig ist. Daher ist die Verwendung eines Proteinspacers eher mit dem Wolf zu vergleichen, den man anstellt, um eine Ziege zu hüten. Allerdings zeigen alle Ergebnisse, daß die Immobilisierung des Trypsins völlig gegen Autolyse schützt. Die katalytischen Zentren der direkt auf ein großes, unflexibles Proteinmolekül immobilisierten Protease sind in ihrer Bewegungsfreiheit offensichtlich so stark eingeschränkt, daß sie den Spacer nicht mehr angreifen können. Um es volkstümlich zu sagen, sägen sie sich nicht den Ast ab, auf dem sie sitzen. Zusätzlich muß das benachbarte immobilisierte Trypsin so weit entfernt sein, daß ebenfalls keine proteolytischen Aktivitäten auftreten. Natürlich kann während der Synthese der immobilisierten BSA-Trypsin-Systeme eine Autolyse nicht völlig ausgeschlossen werden, auch können Anteile an Spacern angegriffen werden. Doch ist davon auszugehen, daß nach erfolgter Immobilisierung dieser Prozeß abgeschlossen ist und weitere Angriffe durch die Fixierung unterbunden werden. Die hohen Aktivitäten an immobilisiertem Trypsin lassen die Ausbeuteverluste nicht ins Gewicht fallen.

Um im Papierspaltverfahren eine kostengünstige kommerzielle Anwendung zu gewährleisten, ist eine Mehrfachanwendung des auf dem PET-Vlies immobilisierten Trypsins unumgänglich. Dabei kann durch das über den BSA-Spacer immobilisierte Trypsin klar gezeigt werden, daß eine wiederholte Anwendung im Rahmen des Papierspaltverfahrens zu keinen Verlusten der Enzymaktivität führt.

5.3 Anwendungen des über den BSA-Spacer gebundenen Trypsins

5.3.1 Abbau von Gelatine

Die Effizienz des immobilisierten Trypsins wurde am Beispiel des Gelatineabbaus getestet und verfolgt. Dies geschah einerseits optisch, andererseits wurden die Abbauprodukte auch qualitativ über chromatographische und photometrische Methoden verfolgt.

Mittels der SEC wurden in der vorliegenden Arbeit die einzelnen Bestandteile der verwendeten Gelatine untersucht. Dabei wurde Gelatine des basischen Typs eingesetzt. Das SEC-Chromatogramm beweist, daß die native Gelatine, wie oben beschrieben, aus einer Vielzahl unterschiedlicher α - und γ -Ketten, sowie hochmolekularer Einheiten zusammengesetzt ist. Dupont (2002) untersuchte den Alterungsprozeß der in Filterpapier eingebundenen Gelatine des Typs B. Die dabei gewonnenen SEC-Daten der nativen Gelatine bestätigen die hier vorgestellten SEC-Untersuchungen. Als Hauptbestandteile werden ebenfalls α - und γ -Ketten identifiziert. Nach einer künstlichen Alterung bei 23°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% über 35 Tage wurde einerseits eine klare Degradation der Gelatine festgestellt. Dabei werden die Peptidbindungen der α -, β - und γ -Ketten gespalten, wobei Fraktionen mit Molmassen von unter 14 kDa gebildet werden. Andererseits kommt es parallel zur Bildung von sehr hohen Molmassen, die im Bereich der γ -Ketten der nativen Gelatine und sogar darüber liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gelatine durch direkten Kontakt mit einem Vliesstück, auf dessen Oberfläche Trypsin immobilisiert wurde, abgebaut. Aus den SEC-Untersuchungen der abgebauten Gelatine wird deutlich, daß ähnlich zu der oben beschriebenen Untersuchung von Dupont (2002) zum einen eine Vielzahl an Fraktionen mit kleinen Molmassen erhalten wird, die sich auf eine Zersetzung der in der verwendeten Gelatine hauptsächlich vorhandenen α - und γ -Ketten zurückzuführen läßt. So treten im SEC-Chromatogramm mehrerer Banden mit hohen Retentionszeiten

auf, wobei die Signale der α -Ketten nahezu verschwinden. Die katalytische Wirkung des Trypsins ist demnach klar nachweisbar. Andererseits zeigt das Chromatogramm der abgebauten Gelatine auch ein deutliches Signal mit relativ hoher Molmasse von etwa 340 kDa. Dies kann auf eine Quervernetzung von α - und β -Einheiten zurückgeführt werden. Diese Renaturierung findet offensichtlich parallel zum Abbau der Gelatine statt und bestätigt die oben beschriebenen Ergebnisse von Dupont (2002).

Eine weitere Erklärung zum Auftreten des deutlichen Signals der γ -Ketten im Chromatogramm der mit Trypsin behandelten Gelatine liefert eine Untersuchung von Gao *et al.*, (1998). Demnach werden Proteine von Trypsin nur in ihrer denaturierten Form abgebaut. Dabei katalysiert das Enzym die Hydrolyse der Lysin- und Argininbindungen, wobei ein Prolinmolekül in der Nachbarschaft diese Abbaureaktion verhindert. Es wird angenommen, daß das Trypsin die Gelatine an den terminalen Peptiden angreift und somit intra- und intermolekulare Querverbindungen zerstört, dabei aber die helikalen Regionen der Gelatine unberührt läßt (Jones, 1987). Es werden also hauptsächlich die α - und β -Ketten angegriffen, wobei die γ -Einheiten im wesentlichen erhalten bleiben und somit den Peak im Chromatogramm erklären.

RP-HPLC-Untersuchungen an nativer und mit immobilisiertem Trypsin behandelter Gelatine zeigen ebenfalls die katalysierende Wirkung des Trypsins auf den Zersetzungsprozeß der Gelatine. Im RP-HPLC-Chromatogramm lassen sich nach der Abbaureaktion deutlich mehr Signale nachweisen als bei nativer Gelatine. Dies bestätigt die SEC-Untersuchungen und beweist das Auftreten von zahlreichen kleinen Bruchstücken.

Der Ninhydrin-Test führt zu den gleichen Aussagen. Durch zunehmende Inkubationszeiten der Gelatine lassen sich die freien Aminogruppen der Spaltprodukte in zunehmendem Maße nachweisen. Eine proteolytische Wirkung des immobilisierten Trypsins ist also nachweisbar.

5.3.2 Abbau von β -Casein

Die Wirkung von über BSA-Spacer immobilisiertem Trypsin wurde im Vergleich zum löslichen Trypsin auch auf das Substrat β -Casein untersucht. Mittels der RP-HPLC auf Kapillarsäulen wurden die jeweiligen Abbauprodukte nach einer Inkubation bei 37°C über Nacht qualitativ charakterisiert.

Wird lösliches Trypsin zum Abbau des β -Caseins eingesetzt, so sind im anschließend aufgenommenen RP-HPLC-Chromatogramm eine Vielzahl von Peaks sichtbar. Ein Vergleich mit einem Chromatogramm des Trypsins selbst, das den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt wurde, zeigt allerdings auch eine Vielzahl an Peaks, die auf Autolyseprodukte des löslichen Trypsins zurückgeführt werden können. Daher können im erstgenannten Chromatogramm nicht alle Peaks durch Spaltprodukte des β -Caseins alleine erklärt werden.

Wird dagegen immobilisiertes Trypsin untersucht, so ist bei einer Inkubation keine Autolyse feststellbar. Da sehr wenig Peaks im entsprechenden Chromatogramm vorhanden sind, kann auch geschlossen werden, daß es nicht zu einer Abbaureaktion des BSA-Spacers kommt.

Durch den Einsatz von immobilisiertem Trypsin zum Abbau von β -Casein wird im Vergleich zum löslichen Trypsin bei kleinen Retentionszeiten eine verminderte Anzahl an Peaks erhalten. Dies läßt auf eine verlangsamte Abbaukinetik des immobilisierten Enzyms schließen. Offensichtlich bestehen gewisse Diffusionsbarrieren in der direkten Umgebung des immobilisierten Trypsins. Im Unterschied zur Inkubation von reinem β -Casein treten aber dennoch eine Vielzahl von Signalen auf, die durch die Kontrollexperimente klar auf die Spaltprodukte des β -Caseins selbst zurückgeführt werden können. Das immobilisierte Trypsin hat seine katalytische Wirkung nicht verloren und kann für den Abbauprozess von β -Casein eingesetzt werden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse der Gelatine und des β -Caseins zeigen, daß das immobilisierte Trypsin nicht nur Aktivität gegenüber dem „low molecular weight“ Substrat BABNA zeigt. Vielmehr kann es auch gegenüber makromolekularen

Substraten eingesetzt werden. Allerdings handelt es sich hierbei nicht mehr um rein kinetisch kontrollierte Abbaureaktionen. Da gerade große Moleküle Probleme haben, die aktiven Zentren des Enzyms zu erreichen, sind gewisse Mindestspacerlängen bzw. Enzymmobilitäten notwendig, um einen guten Massentransfer zu erzielen. Mit dem BSA-Spacer ist es trotz seines voluminösen Charakters möglich, eine gute Zugänglichkeit des Substrats zum Enzym zu gewährleisten.

5.4 Co-Immobilisierung von Trypsin und α -Amylase

Bei der Co-Immobilisierung von Trypsin und α -Amylase wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse beider Enzyme untersucht. Die Trypsin-Menge wurde dabei konstant gehalten, α -Amylase in sinkender Konzentration eingesetzt. Die Aktivitätsmessungen der co-immobilisierten Enzyme zeigen, daß Trypsin eine relativ konstante Aktivität besitzt. Allerdings ist auffällig, daß bei höheren Amylase-Mengen auch etwas höhere Trypsinaktivitäten erhalten werden. Dies kann, wie schon beschrieben, auf den stabilisierenden Effekt höherer Proteinkonzentrationen zurückgeführt werden. Die Aktivitäten der immobilisierten α -Amylase gehen wie erwartet mit sinkender Menge zurück.

Durch eine Weiterentwicklung des Fluoreszenzverfahrens in Lösung konnte gezeigt werden, daß auch FITC markiertes BSA, das auf PET-Vlies immobilisiert wurde, auf diese Weise vermessen werden kann. Dadurch wird es möglich, die Immobilisierung von BSA orts aufgelöst zu verfolgen. Aus den Fluoreszenzaufnahmen wird deutlich, daß es zu keiner homogenen Verteilung des BSA-Spacers innerhalb des Vliesmaterials kommt. Vielmehr werden Fasern mit großem BSA-Gehalt als auch Fasern ohne BSA erhalten. Wird nicht der BSA-Spacer, sondern das Trypsin selbst mit FITC markiert und über einen nicht markierten BSA-Spacer immobilisiert, so zeigt die Fluoreszenzaufnahme ein ähnliches Verhalten. Im Vergleich zum markierten BSA zeigt das markierte Trypsin allerdings eine verminderte Intensität. Durch die Markierung des Trypsins werden eine Vielzahl der für die Bindung an den BSA-Spacer benötigten Aminogruppen durch die Fluorophoren blockiert. Zudem besitzt das markierte Trypsin praktisch keine Aktivität mehr. Offensichtlich kommt es durch die Markierung zu einer Inaktivierung des Enzyms.

Aus Fluoreszenzmessungen mit RBI und FITC markierten Antikörpern sollte die räumliche Verteilung der co-immobilisierten Enzyme sichtbar gemacht werden. Dazu wurden für die einzelnen Enzyme jeweils spezifische Antikörper mit jeweils unterschiedlichen Chromophoren markiert. Auf diese Weise konnte bewiesen werden, daß die Enzyme Trypsin und α -Amylase räumlich eng beieinander co-immobilisiert

werden. Da die Immobilisierung jeweils über den BSA-Spacer erfolgt, ist eine räumliche Nähe beider Enzyme leicht zu erklären. Eine Bindung an das PET-Vlies ist nur möglich, wo schon ein BSA-Spacer vorhanden ist. Dessen Größe ermöglicht offensichtlich die parallel Bindung von Trypsin als auch α -Amylase an dasselbe BSA-Molekül.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Immobilisierung von Trypsin auf PET-Vlies über verschiedene Spacersysteme beschrieben. Da das Polyester-Material nur wenig freie funktionelle Gruppen besitzt, mußten geeignete Synthesewege entwickelt werden, die eine Modifizierung des Vlieses erlauben, ohne dessen strukturelle Integrität zu zerstören. Nur unbeschädigtes PET-Vlies kann im Rahmen des Papierspaltverfahrens zur Hydrolyse der Gelatineschicht eingesetzt werden. Eine partielle Hydrolyse führt einerseits zu genügend Reaktionszentren, andererseits bleibt aber die Festigkeit des Materials erhalten.

Da das PET-Vlies eine relativ hydrophobe Oberflächenbeschaffenheit besitzt, bietet es Enzymen allerdings eine destabilisierende Umgebung. Daher wurden unterschiedliche Spacer in ihrer stabilisierenden Wirkung untersucht. Sowohl lineare, hydrophobe Ketten, hydrophile und polare Systeme als auch Proteinmoleküle selbst wurden auf die Eignung als Spacer getestet. Dabei stellte sich heraus, daß der globuläre BSA-Proteinspacer einerseits zu sehr hohen Mengen an immobilisiertem Trypsin führt. Andererseits wirkt dieser Proteinspacer als Stabilisator für Trypsin. Selbst im hohen pH-Bereich, bei hohen Temperaturen und bei Lagerung in relativ unpolaren Lösungsmitteln zeigt das auf diese Weise immobilisierte Trypsin noch gute Stabilitäten.

Über SEM-Aufnahmen konnte bestätigt werden, daß die Struktur des PET-Vlieses während des Syntheseweges zur Bindung des Trypsins nicht wesentlich beschädigt wird.

Im Rahmen der Anwendung des immobilisierten Trypsins im Papierspaltverfahren konnte gezeigt werden, daß Trypsin auch in immobilisierter Form seine hydrolytische Wirkung auf Gelatine beibehält. Damit können die modifizierten Vliese zur Verflüssigung der Gelatine eingesetzt werden. Durch die gute Langzeitstabilität des immobilisierten Trypsins wird es möglich, das Enzym mehrfach anzuwenden.

Gleichzeitig konnte bewiesen werden, daß das über Spacer immobilisierte Trypsin

auch bei makromolekularen Substraten wie β -Casein und Azocasein eingesetzt werden kann. Im Vergleich zum löslichen Trypsin werden allerdings kleinerer Reaktionsgeschwindigkeiten erhalten. Dies wird indirekt über die Aufnahmen von HPLC- oder SEC-Chromatogrammen deutlich.

Zur Bestimmung der Menge an immobilisierten Proteinen mußten die Tests für lösliche Proteine angepasst werden. Dabei wurden sowohl der Ninhydrin-Test als auch der BCA-Test modifiziert und zeigen jeweils vergleichbare Ergebnisse. Durch zusätzliche Waschschrirte mit SDS konnte gezeigt werden, daß etwa 40 % der immobilisierten Proteine nicht kovalent gebunden sind.

Durch eine Co-Immobilisierung von α -Amylase und Trypsin konnten beide Enzyme in ihrer aktiven Form an das PET-Vlies gebunden werden. In Fluoreszenzaufnahmen wurde die räumliche Verteilung dieser Enzyme visualisiert. Dabei sind beide Enzyme stets in enger Nachbarschaft zueinander co-immobilisiert.

Die vorgestellte Methodik zur Enzymimmobilisierung macht deutlich, daß nicht jedes Enzym wahllos auf unterschiedliche Trägermaterialien immobilisiert werden kann. Vielmehr muß abhängig vom Enzym und den Eigenschaften des Trägermaterials eine geeignete Synthesestrategie entwickelt werden. Eine Immobilisierung über geeignete Spacer ermöglicht eine Abschirmung der Enzyme von unvorteilhaften Trägeroberflächen und kann somit zu deutlich erhöhten Langzeitstabilitäten der immobilisierten Enzyme führen.

Das dieser Arbeit zugrunde gelegte Ziel der Herstellung von auf PET-Vlies immobilisiertem Trypsin in seiner aktiven Form wurde damit erreicht. Solche Vliese lassen sich dank der guten Langzeitstabilität des immobilisierten Trypsins im Rahmen des Papierspaltverfahrens einsetzen. Auf diese Weise kann das Enzym wiederholt verwendet und damit sehr sparsam eingesetzt werden. Andererseits kann das immobilisierte Enzym direkt am gewünschten Reaktionsort (im Falle vom Papierspaltverfahren also direkt auf der Gelatineoberfläche) plaziert werden. Bei Verwendung einer thermophilen Protease, wie Thermolysin, kann die Gelatineschicht, die zur Spaltung des geschädigten Dokumentes dient, sogar direkt auf ein Vlies mit immobilisiertem Enzym aufgebracht werden. Durch eine einfache Temperaturkontrolle

kann der hydrolytische Zersetzungsprozeß der Gelatine dann nach Wunsch gesteuert werden.

Werden unterschiedliche Enzyme wie z.B. Proteasen und Amylasen co-immobilisiert, so können diese als kontrolliertes Reinigungsmittel z.B. bei der Restaurierung von bemalten Oberflächen dienen.

7 Literaturverzeichnis

Babel, W., (1996) *Chemie in unserer Zeit*, **2**, 86-95.

Baldwin, R.L., Eisenberg, D., (1987) *Protein Engineering* (Oxender, D.L, Fox, C.F., ed.), Alan R. Liss, Inc., New York, 127-148.

Bansa, H., Bargetta, G., (1987) *Maltechnik Restauero*, **58**, 320-325.

Bansa, H., Bargetta, G., (1980) *Maltechnik Restauero*, **86**, 67-72.

Bickerstaff, G.F., (1995) *Genet. Engineer Biotechnologist*, **15**, 13-30.

Bickerstaff, G.F., (1997) *Immobilization of Enzymes and cells*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1-11.

Brock, F.M., Forsberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G., (1982) *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 561-569.

Brodelius, P., (1985) *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, (Laskin, A.I., ed.), Benjamin Cummings, London, 109-148.

Broun, G.B., (1976) *Methods in enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, 263-280.

Brückle, I., Dambrogio, J. (2000) *Journal of American Institute for Conservation of Historic and Artistic Works*, **39**, 295-235.

Boyd, S., Yamazaki, H., (1993) *Biotechnol. Techn*, **7**, 277-282.

Buchholz, K., Kasche, V., (1997) *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*, VCH Weinheim.

Bucke, C., (1983), *Phil. Trans. R.. Soc. B*, **300**, 369-389.

Cabral, J.M.S., Kennedy, J.F., (1991) *Protein Immobilization*, (Taykor, R.F., ed.), Marcel Dekker, New York, 73-138.

- Campbell, J., Hornby, W.E., Morris, D.L., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **384**, 304-316.
- Carvajal, N., Martinez, J., Fernandez, M., (1977), *Biochim. Biophys. Acta*, **481**, 177-183.
- Chang, T.M.S., Ed., (1977) *Medical Applications of immobilized Enzymes and Proteins*, Vol. I and II, Plenum Press, New York.
- Chaplins, M.F., (1977) *Monosaccharides in Carbohydrate Analysis – A Practical Approach*, (Chaplins, M.F., Kennedy, J.F., eds.), IRL, Oxford, U.K., 1-41.
- Chim-anage, P., Kashiwagi, Y., Ohta, T., (1986) *Biotechnol. Bioeng*, **28**, 1876-1878.
- Cuatrecasas, P., (1971) *J. Agr. Food Chem*, **19**, 600.
- Cuatrecasas, P., Parikh, I., (1972) *Biochemistry*, **11**, 2291-2299.
- Drobchenko, S., Isaeva-Inova, L., Kleiner, A., Lomanki, A., Kolker, A., Noskin, V.A., (1993) *Carbohydr. Res*, **241**, 189-199.
- Dean, P.D. G., Johnson, W.S., Middle, F. A., Eds., (1985) *Affinity Chromatography*, IRL Press, Washington, D.C.
- Dupont, A.-L., *J. Chromatogr. A*, (2002) (1966) **950**, 113-124.
- Dunlap, B.R., Ed., (1974) *Immobilized Biochemicals and Affinity chromatography*, Plenum Press, New York.
- Farrugia, C.A., Groves, M.J., (1999) *J. Pharm. Pharmacol*, **51**, 643-649.
- Flemming, C., Gabert, A., Wand, H., Zemek, J., (1983) *Collection Czechoslovak Chem. Commun*, **48**, 184-191.
- Gao, X., Groves, M.J., (1998) *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , **45**, 275-284.
- Gaertner, H.F., Puigserver, A.J., (1992) *Enzyme Microb. Technol*, **14**, 150-155.
- Gemeiner, P.; (1992) *Enzyme Engineering* (Gemeiner, P., ed.) Ellis Horwood, New York, , 13-119.
- Goldstein, L., Levin, Y., Katchalski, E., (1964) *Biochemistry*, **3**, 1913.
-

- Groboillot, A. Boadi, D.K., Poncelot, D. Neufeld, R.J., (1994) *Crit. Rev. Biotechnol.*, **14**, 75-107.
- Guisàn, J.M., Penzol, G., Armisén, P., Bastida, A., Blanco, R.M., Fernández-Lafuente, R., García-Junceda, E., (1997) *Immobilization of enzymes and cells*, F. Gordon (ed.), Vol. 1, Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
- Hahn-Hägerdahl, B., (1983) *Immobilized Cells and Organelles*, vol 2 (Mattiasson, B., ed.), CRC, Boca Raton, FL, 79-94.
- Harlow, E., Lane, D., (1988) *Antobodies-A laboratory Manual*, 92ff
- Hartmeier, W., (1986) *Immobilisierte Enzymkatalysatoren*, Springer Verlag, Berlin, 14-16.
- Hefti, F., (1982) *Anal. Biochem.*, **121**, 378-381.
- Hermans, J. Jr., Scheraga, H.A., (1961) *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3283-3292.
- Höge, B., (1981) *Maltechnik Restauero*, **87**, 189-191.
- Hornby, W.E., Goldstein, L., (1976) *Methods in Enzymology*, **44**, 119-134.
- Howlett, J., Armstrong, D., Yamazaki, H., (1991) *Biotechnol. Techn.*, **5**, 395-400.
- Inman, D.J., Hornby, W.E., (1972) *Biochem. J.*, **129**, 255-262.
- Janse, B.J.H., Pretorius, I.S., (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 878-883.
- Jenik, R.A., Porter, J.W., (1981) *Anal. Biochem.*, **111**, 184-188.
- Jones, R.T., (1987) *Hard Gelatin, Development and Technology*, (Ridgeway, K., ed.), Pharma Press, London, 15.
- Karplus, M., McCammon, J.M., (1981) *CRC Crit Rev Biochem.*, **9**, 293-349.
- Kauzmann, W., (1959) *Advan Protein Chem.*, **14**, 1-63.
- Kennedy, J.F., Melo, E.H.M., (1990) *Chem. Eng. Progress*, **86**, 81-89.
- Kierstan, M.P.J., Coughlan, M.P., (1991) *Protein Immobilization*, (Taylor, R.F., ed.), Marcel Dekker, New York, 13-71.
-

- Klein, J., (1990) *Bioreactor Immobilized Enzymes and Cells – Fundamentals and Applications* 1988, (Ed.: Moo-Young, M.), Elsevier Applied Science, London, 1-8.
- Krekel, C, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen.
- Kundu, S., Sundd, M., Jagannadham, M.V., (2000) *J. Agric. Food Chem*, **48**, 171-179.
- Labouesse J., Gervais, M., (1967) *Eur. J. Biochem*, **2**, 215-223.
- Lapanie, S., (1978) *Physicochemical aspects of protein denaturation*, John Wiley and Sons, New York.
- Levin, Y., Pecht, M., Goldstein, L., Katchalski, E., (1964) *Biochemistry*, **3**, 1905-1913.
- Liers, G., Wächter, W., Müller, G., (1996) *Restauro*, **17**, 184-192.
- Martin, C.K.A., Perlman, D., (1975) *Eur. J. Appl. Microbiol*, **3**, 91-95.
- Messing, R.A., (1976) *Methods in Enzymology*, Vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, 148-169.
- Morris, D.L., Campbell, J., Hornby, W.E., (1975) *Biochem. J*, **147**, 593-603.
- Mohr, P., Pommerening, K., (1985) *Affinity Chromatography*, Marcel Dekker, New York.
- Mosbach, K., Ed., (1988) *Methods in Enzymology*, 137.
- Möschel, K., Nouaimi, M., Steinbrenner, C., Bisswanger, H., (2003) *Biotechnol. Bioeng*, **82**, 190-199.
- Müller, G., (1987) *Restauro*, **95-1**, 56-63.
- Neevel, G., Reißland, B., (1998) *Restauro*, **104-3**, 180-185.
- Nilsson, K., (1987) *Trends Biotechnol*, **5**, 73-78.
- O'Driscoll, K.F., (1987) *Methods in enzymology*, 1976, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, 19-45.
- Onyezili, F., *Biotechnol. Bioeng*, (1987) **29**, 399-402.
- Penzol, G., Armisèn, P., Fernández -Lafuente, R., Rodés, L, Guisán, M., (1998) *Biotechnol. Bioeng*, **60**, 518-523.
-

- Pfeil, W., (1981) *Molec Cell Biochem*, **40**, 3-28.
- Pitcher, W.H., Jr., Ed., (1979) *Immobilized enzymes in Food Processing*, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Porath, J., Axén, R., (1976) *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, 19-45.
- Privalov, P.L., (1979) *Advan Protein Chem*, **33**, 167-241.
- Remy, M.H., (1985) Bourdillon, C., Thomas, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **829**, 69-75.
- Rosen, H., (1957) *Arch. Biochem. Biophys*, **67**, 10-15.
- Schacht, E. H., (1987) *Industrial polysaccharides: Genetic engineering, structure/property relation and applications* M. Yalpani (ed), Elsevier Science Publishers B.V, Amsterdam, , 398-400.
- Schreier, H., (1984) *Pharmazie in unserer Zeit*, **11**, 97-103.
- Scouten, W.H., (1985) *Affinity Chromatography*, John Wiley and Sons, New York.
- Silman, I.H., Katchalski, E., (1966) *Ann. Rev. Biochem*, **35**, 873-908.
- Sliwka, W., (1975) *Angewandte Chemie*, **87**, 556-567.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., (1985) *Anal. Biochem*, **150**, 76-85.
- Srere, P.A., Uyeda, K., (1976) *Methods in Enzymology*, vol. XLIV (Mosbach, K., ed.), Academic, New York, 11-19.
- Sri Ram, J., Bier, M., Maurer, P.H., (1962) *Adv. Enzymol*, **24**, 105-160.
- Sundaram, P.V., Hornby, W.E., (1970) *FEBS Lett*, **10**, 325-370.
- Taylor, R.F., (1991) *Protein Immobilization* (Taylor, R.F., ed.), Marcel Dekker, New York, 139-160.
- Tanford, C., (1968) *Advan Protein Chem*, **23**, 121-282 and 1970, **24**, 1-95
- Trenholm, H.L., Spomer, W.E., Wootton, J.F., (1969) *Biochemistry*, **8**, 1741-1747.
-

-
- Wachsmuth, E.D., Fritze, I., Pfeleiderer, G., (1966) *Biochemistry*, **5**, 169-174.
- Wächter, W., Liers, J., Becker, E., (1996) *Restaurator*, **17**, 32-42.
- Weetall, H.H., Ed., (1975) *Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies, and Peptides*, Marcel Dekker, New York.
- White, C.A, Kennedy, J.F., (1980) *Enzyme Microb. Technol*, **2**, 82-90.
- Wingard, L.B., Berizin, I.V., Klyosov, A.A., Eds., (1980) *Enzyme Engineering : Future Directions*, Plenum Press, New York.
- Woodward, J., (1985) in *Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach* (Woodward, J., ed.), IRL, Oxford, 3-17.
- Zaborsky, O.R., (1974) *Immobilized Enzymes*, CRC Press, Cleveland, Ohio, 2-3.
-

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. H. Bisswanger, Prof. Dr. F. Lang, Prof. Dr. Schwarz, Prof. Dr. W. Voelter
Prof. Dr. U. Weser, Prof. Dr. J.C. Stoclet, Prof. Dr. G. Spik, Prof. Dr. J. P. Bohin Prof.
Dr. A. Verbert, Prof. Dr. R. Cacan, Prof. Dr. D. Lesieur, Prof. Dr. J.J. Curgy Prof. Dr.
R. Depreux.

Curriculum Vitae

Meriem Nouaimi-Bachmann

7. September 1969

Settat (Marokko)

verheiratet

marokkanisch

Ausbildung

1975 – 1980	Ecole primaire, Settat (Marokko)
1980 – 1988	College, Settat (Marokko)
1988 – 1993	Biochemiestudium an der Universite des Sciences et Technologies de Lille
1991	Vordiplom in Biologie
September 1993	Diplom Biochemie
1994	Diplomarbeit an der Universite Louis Pasteur Strasbourg unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Poindron über das Thema: „Modell animal de neuropathie peripherique: Etudes Electrophysiologiques et Biochimiques“: Diplome D'Etudes Approfondies de Pharmacologie et Pharmacochemie
1998 – 2003	Dissertation am Physiologisch-Chemischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger über das Thema: „Immobilisierung von Enzymen auf Polyestervlies und deren Anwendungen“
