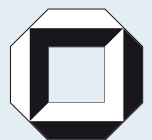


Stephanie Oder

Produktion und Charakterisierung biogener anorganischer, nanoskaliger und nano- strukturierter Partikel

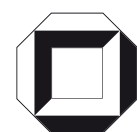


Stephanie Oder

**Produktion und Charakterisierung biogener anorganischer,
nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel**

Produktion und Charakterisierung biogener anorganischer, nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel

von
Stephanie Oder



universitätsverlag karlsruhe

Dissertation, Universität Karlsruhe (TH)

Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik, 2006

Referenten: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten, Prof. Dr. Anne Ulrich

Impressum

Universitätsverlag Karlsruhe

c/o Universitätsbibliothek

Straße am Forum 2

D-76131 Karlsruhe

www.uvka.de



Dieses Werk ist unter folgender Creative Commons-Lizenz
lizenziiert: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/de/>

Universitätsverlag Karlsruhe 2007

Print on Demand

ISBN: 978-3-86644-118-7

Produktion und Charakterisierung
biogener anorganischer,
nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)
von der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik
der Universität Fridericiana zu Karlsruhe (TH)
genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Ing. (FH) Stephanie Oder
aus Langenhagen

Tag des Kolloquiums: 11. Mai 2006

Referent: Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten

Korreferent: Prof. Dr. Anne Ulrich

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik (MVM) der Universität Karlsruhe.

Ich danke

Herrn Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Frau Dr. Anne Ulrich für die anregenden Diskussionen und die Übernahme des Korreferats.

Meinen Kollegen für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die konstruktiven Diskussionen – und Pascale Fleck für's Korrekturlesen.

Allen Studenten, die im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten durch ihr Engagement und ihren Fleiß zu dieser Arbeit beitrugen.

Uli Teipel und Uli Förther-Barth (Fraunhofer Institut, ICT, Berghausen) für die tolle Zusammenarbeit und ihr lebhaftes Engagement.

Rainer Bornemann für seinen unermüdlichen Enthusiasmus bei den Einzelmolekülanalysen und beim Korrekturlesen.

Allen Kollegen, die eine erfolgreiche Bearbeitung dieses intradisziplinär ausgerichteten Projektes erst möglich gemacht haben. Mein besonderer Dank gilt Winfried Send und Mohammed Fotouhi (Labor für Elektronenmikroskopie), Sabine Purper (Botanisches Institut), Sabine Hucke (BFEL, Karlsruhe) und Rainer Sembritzki (Wasserchemie).

Allen Kollegen in den USA, die meinen Auslandsaufenthalt beruflich und privat zu einem erfolgreichen und unvergesslichen Erlebnis machten.

Allen Freunden, die immer ein offenes Ohr für mich hatten – und mich in der entscheidenden Phase mit „Nervennahrung“ versorgten.

Meinen Eltern, die immer für mich da sind, und die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Meinem Mann Dirk für seine Unterstützung, Liebe, Begeisterung, Motivation... und vieles, vieles mehr!

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ausgangssituation	1
1.2	Gegenstand dieser Arbeit	3
2	Biomineralisation: Prinzipien und Partikeleigenschaften	5
2.1	Prinzipien der Biomineralisation.....	5
2.1.1	Gewinnung biogener Cadmiumsulfid-Nanopartikel.....	7
2.1.2	Gewinnung biogener nanostrukturierter Partikel.....	11
2.2	Nanospezifische Partikeleigenschaften	18
3	Marktvolumen und Konkurrenzverfahren	21
3.1	Biomineralisation	21
3.1.1	Bedeutung der Biomineralisation für die Verfahrenstechnik	21
3.1.2	Materialien- und Formenvielfalt bei biogenen Partikeln	23
3.2	Der Nano(bio)technologie-Markt.....	25
3.2.1	Märkte und Applikationen für nanoskalige Partikel	28
3.2.2	Märkte und Applikationen für nanostrukturierte Partikel.....	29
3.3	Biomimetische Verfahren.....	30
3.4	Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren	34
3.4.1	Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren zur Herstellung nanoskaliger Cadmiumsulfid-Partikel.....	34
3.4.2	Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren zur Herstellung nanostrukturierter Partikel.....	37
4	Material und Methoden	39
4.1	Auswahl der Mikroorganismen.....	39
4.1.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> und <i>Candida glabrata</i>	39
4.1.2	<i>Emiliania huxleyi</i> (<i>Ehux</i>).....	39
4.1.3	Kommerzielle Referenzsubstanzen und -organismen	40
4.2	Kultivierung	41
4.2.1	Heterotrophe Kultivierung der Hefen <i>S. pombe</i> und <i>C. glabrata</i>	41
4.2.2	Photoautotrophe Kultivierung der Alge <i>Emiliania huxleyi</i>	43
4.2.3	Analysen zur Untersuchung des Wachstumsverlaufes	44
4.2.4	Abgasanalytik	46
4.3	Analytische Verfahren.....	47
4.3.1	Bestimmung der Glucosekonzentration	47
4.3.2	Bestimmung der Ethanolkonzentration	48
4.3.3	Bestimmung der Cadmiumkonzentration	48
4.4	Aufreinigung.....	50
4.4.1	Zellabtrennung und Zellaufschluss bei <i>S. pombe</i> und <i>C. glabrata</i>	50
4.4.2	Zellabtrennung bei <i>Emiliania huxleyi</i>	52
4.4.3	Reinigungsverfahren für nanoskalige Partikel.....	53
4.4.4	Reinigungsverfahren für nanostrukturierte Partikel.....	57
4.5	Elektronenmikroskopische Analysen	58

4.5.1	Transmissionselektronenmikroskopie	58
4.5.2	Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX)	59
4.5.3	EFTEM ESI	60
4.5.4	Rasterelektronenmikroskopie	60
4.6	Elektrophoretische Verfahren	61
4.6.1	Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels SDS PAGE	61
4.6.2	Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung	62
4.7	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung	63
4.7.1	Dynamische Lichtstreuung	63
4.7.2	Differentielle Mobilitätsanalyse	64
4.7.3	Laserlicht-Beugung	64
4.8	Absorptionsmessungen	65
4.9	Fluoreszenzbestimmungen	65
4.9.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	65
4.9.2	Bestimmung der Fluoreszenzspektren	65
4.9.3	Fluoreszenz-Einzelmolekülanalyse	66
5	Ergebnisse zur Produktion und Charakterisierung nanoskaliger Partikel	68
5.1	Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen	68
5.2	Kultivierung	68
5.2.1	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	69
5.2.2	<i>Candida glabrata</i>	72
5.2.3	Zusammenfassung	76
5.3	Zellaufschluss	76
5.3.1	Ergebnisse der Aufschlussverfahren	78
5.3.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Zelllysates	81
5.3.3	Schnellmethode zur qualitativen Bewertung der Aufschlusseffizienz	81
5.3.4	Zusammenfassung	82
5.4	Partikelreinigung	83
5.4.1	Elektrophoretische Verfahren	84
5.4.2	Thermische Verfahren	86
5.4.3	Chromatographische Verfahren	87
5.4.4	Dichtegradientenzentrifugation	94
5.4.5	Weitere Reinigungsverfahren	96
5.4.6	Zusammenfassung	96
5.5	Partikelcharakterisierung	96
5.5.1	Partikelgrößenverteilung	97
5.5.2	Fluoreszenzeigenschaften	100
5.5.3	Zusammenfassung	103
6	Ergebnisse zur Produktion und Charakterisierung nanostrukturierter Partikel	104
6.1	Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen	104
6.2	Kultivierung	104
6.2.1	Gewinnung biogener Calciumcarbonat-Partikel	104
6.2.2	Gewinnung biogener Silica-Partikel	107
6.2.3	Zusammenfassung	107

6.3	Partikelreinigung	108
6.3.1	Ergebnisse unterschiedlicher Reinigungsverfahren	108
6.3.2	Zusammenfassung	109
6.4	Partikelcharakterisierung	110
6.4.1	Coccolithen	110
6.4.2	Diatomeen	110
6.4.3	Zusammenfassung	113
7	Diskussion	114
7.1	Nanoskalige Partikel	114
7.1.1	Kultivierung	114
7.1.2	Zellaufschluss	120
7.1.3	Partikelreinigung	121
7.1.4	Partikelcharakterisierung	126
7.1.5	Bewertung der Wettbewerbsfähigkeit	130
7.2	Nanostrukturierte Partikel	133
7.2.1	Kultivierung	133
7.2.2	Reinigung.....	136
7.2.3	Charakterisierung	137
7.2.4	Bewertung der Wettbewerbsfähigkeit	139
8	Zusammenfassung.....	143

Abbildungsverzeichnis / Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines cadmiuminduzierten Biosyntheseweges zur Bildung von Cadmiumsulfid/Peptid-Clustern [4].	9
Abbildung 2: Modell eines Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes: Cadmiumsulfid-Kern (\varnothing ca. 2 nm) mit Phytochelatinhülle [7].	10
Abbildung 3: Satellitenbild einer Algenblüte von <i>Emiliana huxleyi</i> vor der Ostküste Kanadas (© NASA) [39].	13
Abbildung 4: (A) Schematischer Aufbau einer Algenzelle von <i>Emiliana huxleyi</i> [46], (B) elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) einer vollständig kalzifizierten <i>Ehux</i> Zelle und (C) Detailaufnahme eines Coccolithen.	14
Abbildung 5: (A) Schema zur Vervielfältigung der Frusteln [11]; (B) Veränderung der Frustelgröße bei Diatomeen in Abhängigkeit der Generationszahl [55].	17
Abbildung 6: Ausgewählte Beispiele zur Formenvielfalt bei biogenen Partikeln [96-98].	24
Abbildung 7: Segmente des Nanotechnologie-Marktes; Weltmarktvolumen in Prozent [99].	25
Abbildung 8: (A) Entwicklungstendenzen in der Physik, Biologie und Chemie in Bezug zur Nanotechnologie [100], (B) Zukunftsfeld Nanobiotechnologie [77].	27
Abbildung 9: Schema der Kristallstrukturen bei Cadmiumsulfid [142].	36
Abbildung 10: Ergebnisse von Schüttelkolbenkultivierungen (\diamond) und Reaktorkultivierungen (\blacklozenge) von <i>S. pombe</i> : Spezifische Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit von Kultivierungsmedium und Cadmiumkonzentration.	70
Abbildung 11: Reaktorkultivierung <i>S. pombe</i> : Batchkultivierung in Komplexmedium, einmalige Zugabe von 1 mM Cadmium.	71
Abbildung 12: Ergebnisse von Schüttelkolbenkultivierungen (\diamond) und Reaktorkultivierungen (\blacklozenge) von <i>C. glabrata</i> : Spezifische Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit der zugegebenen Cadmiumkonzentration.	72
Abbildung 13: Ergebnisse diverser Schüttelkolbenkultivierungen (\diamond) und Reaktorkultivierungen (\blacklozenge): Darstellung der finalen Cadmiumkonzentration im Medium in Abhängigkeit der zugegebenen Cadmiumkonzentration.	74
Abbildung 14: Reaktorkultivierung, <i>C. glabrata</i> , zweimalige Zugabe à 0,5 mM Cadmium bezogen auf das Medienvolumen, Feedback-Fedbatch Kultivierung mit RQ-Regelung.	75
Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Analysen mittels EFTEM ESI von (A) <i>S. pombe</i> und (B) <i>C. glabrata</i> ; Cadmiumverteilung ist in rot, Schwefelverteilung in grün dargestellt.	77
Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Analysen mittels TEM EDX von <i>C. glabrata</i> : (A) EDX-Spektrum, (B) TEM-Aufnahme der untersuchten Zelle.	77

Abbildung 17: EFTEM ESI Analyse des Zelllysates von <i>C. glabrata</i> nach Kälteaufschluss und Probenkonzentrierung.	81
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme der Proben von <i>S. pombe</i> nach Zellaufschluss mittels Schwingmühle. Bildausschnitt oben: Vollständig zerstörte Hefezellen, Bildausschnitt unten: Intakte Hefezelle.	82
Abbildung 19: (A) Gelelektrophorese (SDS PAGE) von <i>C. glabrata</i> aus Kultivierung mit 3,5 mM Cadmium, Zelllysate nach Kälteaufschluss und Gefriertrocknung, M: Proteinstandard, A: 20 µL cadmiumfreies Zelllysate, B: 5 µL cadmiumhaltiges Zelllysate. (B) Gelelektrophorese (SDS PAGE) von cadmiumhaltigem Zelllysate von <i>S. pombe</i> , M: Proteinmarker, A: Zelllysate direkt nach Zellaufschluss, B: Tiefgekühltes Zelllysate.	84
Abbildung 20: Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF), M: Proteinmarker, A: 10 µL cadmiumhaltiges und B: 2x je 10 µL cadmiumfreies Zelllysate von <i>S. pombe</i>	86
Abbildung 21: Bestimmung der Referenzfunktion zwischen Partikelradius und Retentionszeit, analytische Säule, 67 mM Phosphatpuffer.	88
Abbildung 22: SEC, <i>S. pombe</i> , hitzebehandeltes Zelllysate nach mechanischem Aufschluss einer cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Probe, 67 mM Phosphatpuffer.	89
Abbildung 23: SEC, <i>C. glabrata</i> , Zelllysate nach Kälteaufschluss einer cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Probe, 67 mM Phosphatpuffer.	90
Abbildung 24: Ergebnisse für IEC mit maximaler Cadmiumwiederfindung, Zelllysate von <i>C. glabrata</i> : Darstellung der Cadmiumverluste (dunkel) und der eluierten Cadmiumanteile (hell).	93
Abbildung 25: Dichtegradientenzentrifugation, <i>C. glabrata</i> , Zelllysate nach Kälteaufschluss, Fraktionierung (F1 – F8) in einem 20 - 50 %-igen Saccharose-Gradienten.	95
Abbildung 26: Partikelgrößenverteilung, Proben von <i>S. pombe</i> , Zelllysate aus cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Kultivierung nach Hitzefällung; Bestimmung mittels PCS.	97
Abbildung 27: Partikelgrößenverteilung, kommerzielle Quantenpunkte [188]; Bestimmung mittels PCS.	98
Abbildung 28: Partikelgrößenverteilung, Proben von <i>S. pombe</i> , verdünntes Zelllysate aus cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Kultivierung nach Hitzefällung und Filtration (0,2 µm); Bestimmung mittels DMA.	99
Abbildung 29: Fluoreszenzsignal cadmiumhaltiger Zelllysate-Proben von <i>S. pombe</i> : (A) Kombiniertes Anregungs- und Emissionsspektrum, (B) Emissionsspektrum bei Anregungswellenlänge von 355 nm.	100
Abbildung 30: (A) Fluoreszenz-Emissionsspektrum, (B) Fluoreszenz-Abklingdauer kommerzieller Quantenpunkte; Bestimmung mittels Einzelmolekülanalyse.	102

Abbildung 31: Bestimmung der Fluoreszenzemission und Fluoreszenzabklingdauer mittels Einzelmolekülanalyse; Zellysat von <i>S. pombe</i> einer (A) cadmiumhaltigen Probe und (B) einer cadmiumfreien Probe nach Hitzefällung.	103
Abbildung 32: Reaktorkultivierung von <i>Ehux</i> , phototrophe Batchkultivierung im 15 L-Bioreaktor	105
Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten Schüttelkolbenkultur von <i>Emiliana huxleyi</i> : (A) REM-Aufnahme einer vollständig kalzifizierten Algenzelle, (B) Übersichtsabbildung.	106
Abbildung 34: REM-Aufnahme der Frusteln von <i>T. weissflogii</i> : (A) Übersichtsaufnahme, (B) Detailaufnahme.	107
Abbildung 35: REM-Aufnahmen von <i>Ehux</i> -Schalen nach unterschiedlichen Reinigungsverfahren: (A) Stoll-Methode, (B) Glühen in Bunsenbrennerflamme, (C) Glühprozess bei 500 °C, (D) Ultraschallbehandlung.	108
Abbildung 36: REM-Aufnahme gereinigter Schalen von <i>Emiliana huxleyi</i>	110
Abbildung 37: Diatomeenschalen von <i>T. weissflogii</i> : (A) Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeugung, (B) REM-Aufnahme.	111
Abbildung 38: REM-Aufnahmen von Frusteln der Diatomeenalge <i>Cyclotella cryptica</i> , (a) Detailaufnahme einer Diatomeenschale; (b) Ausschnittsvergrößerung: Poren auf der Schalenoberseite, verschlossen durch einen feinporigeren Siebboden.	112
Abbildung 39: REM-Aufnahme von Kieselgur (Merck)	112
Tabelle 1: Übersicht über die hierarchische Organisation der Materie bei der Biomineralisation [11]	6
Tabelle 2: Spezifische Cadmiumfreisetzung nach Zellaufschluss unter Verwendung organischer Lösungsmittel.	79
Tabelle 3: pK _S -Werte der Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein [161]. .	91
Tabelle 4: Abschätzung der Nettoladung der Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein in Abhängigkeit des pH-Wertes.	92
Tabelle 5: Vergleich technischer und biologischer Syntheseverfahren zur Herstellung strukturierter SiO ₂ -Matrizen [11].	140

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Absorption
ATCC	“American Tissue and Cell Culture Collection”
ATP	Adenosintriphosphat
BaSIC	“Bioclastic and shape-preserving inorganic conversion”
BET	Methode zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche nach <u>B</u> runauer, <u>E</u> mmett und <u>T</u> eller
BTM	Biotrockenmasse
°C	Grad Celsius
CCAP	“Culture Collection of Algae and Protozoe”
<i>C. cryptica</i>	<i>Cyclotella cryptica</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
Cd	Cadmium
CdS	Cadmiumsulfid
CPR	Kohlendioxid-Produktionsrate
Cys	Cystein
d	Tag
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMA	Differentielle Mobilitätsanalyse
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
€	Euro
EDX	Energiedispersive Röntgenstrahlanalyse
<i>Ehux</i>	<i>Emiliana huxleyi</i>
EPA	„Environmental Protection Agency“, USA
FL	Fluoreszenz
g	Gramm
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
HRTEM	Hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie
Hz	Hertz

ICP OES	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
λ	Wellenlänge (Lambda)
L	Liter
μ	Wachstumsrate
μ_{\max}	Maximale Wachstumsrate
μm	Mikrometer
m	Meter
m^2	Quadratmeter
m^3	Kubikmeter
M	Molare Konzentration ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
mA	Milliampère
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
Mio.	Million
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Molare Konzentration ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
Mrd.	Milliarde
mS	Millisiemens
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
nm	Nanometer
ns	Nanosekunde
OD	Optische Dichte
OUR	Sauerstoffaufnahme

PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie
PGV	Partikelgrößenverteilung
pl	Isoelektrischer Punkt
PLS	Prozessleitsystem
pO ₂	Gelöstsauerstoffanteil in der Lösung
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RQ	Respirationsquotient
\$	Dollar
S	Schwefel
SEC	Größenausschlusschromatographie („ <u>S</u> ize <u>E</u> xclusion <u>C</u> hromatography“)
SDS PAGE	<u>S</u> odium- <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat- <u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
<i>T. weissflogii</i>	<i>Thalassiosira weissflogii</i>
U	Umdrehung
UV	Ultravioletter Wellenlängenbereich
V	Volt
VIS	Visueller Wellenlängenbereich

1 Einleitung

1.1 Ausgangssituation

Die Bio- und Nanotechnologie zählen zu den zukunftssträchtesten Technologien des 21. Jahrhunderts. An der Schnittstelle beider Wissenschaften hat sich das interdisziplinäre Forschungsfeld der Nanobiotechnologie herausgebildet. Eine Disziplin der Biotechnologie beschäftigt sich mit der Herstellung oder Umwandlung von Verbindungen in verfahrenstechnischen Prozessen. Dabei wird die biologische Aktivität von lebenden Zellen oder von Enzymen genutzt. In diesem Zusammenhang wird auch von der „weißen Biotechnologie“ gesprochen [1, 2]. Im Bereich der Nanotechnologie liegt der Schwerpunkt in der Erzeugung sowie Charakterisierung atomarer bzw. molekularer Bausteine und Strukturen. Die Nanotechnologie liefert so die Grundlagen für die Entwicklung von Werkzeugen zur Erforschung biologischer Prozesse und zur Herstellung nanobiotechnologischer Produkte [2].

Die Herstellung anorganischer nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel erfolgt derzeit in erster Linie durch den Einsatz physikalischer und chemischer Verfahren. Zum Stand der Technik zählen dabei Fällungsreaktionen im Bereich der Nanopartikelsynthese, und der Einsatz von Ätztechniken und lithographischen Verfahren zur Herstellung nanostrukturierter Oberflächen. Als alternative Herstellungsverfahren werden biologische Syntheseverfahren untersucht. Die Bildung der biogenen Partikel beruht auf Selbstorganisationsprozessen der Moleküle und Molekülkomplexe. Dabei ermöglichen die biologisch geregelten Mineralisationsprozesse die Generierung von nanoskaligen und/oder nanostrukturierten Partikeln mit spezienspezifischen Eigenschaften¹. Diese Mineralisationsprozesse werden auch unter der Kurzbezeichnung „Biominalisation“ zusammengefasst [3].

Biologische Systeme wie z. B. Bakterien ermöglichen dabei die Biosynthese vielfältiger anorganischer Partikel unter Steuerung der Partikelsynthese auf molekularer Ebene. Über Biominalisationsprozesse ist die Erzeugung von Partikeln mit hochdefinierten Strukturen, komplexen Morphologien und engen Partikelgrößenverteilungen möglich [3, 4].

¹ Spezienspezifische Eigenschaften: Generierte Partikeleigenschaften variieren in Abhängigkeit vom jeweiligen Mikroorganismus (Spezies).

Ein Qualitätsmerkmal der biogenen Nanopartikel ist dabei die hohe Monodispersität, also die Gleichförmigkeit und enge Größenverteilung der synthetisierten Partikel. Daneben sind vor allem die hohe Reproduzierbarkeit der mikro- und nanostrukturierten Oberflächen, die Einheitlichkeit der Kristallstruktur und die erzielbare mechanische und/oder chemische Stabilität der biogenen Partikel hervorzuheben. Über physikalisch-chemische Syntheseverfahren sind diese Eigenschaften derzeit meist nicht erreichbar [5].

Eine OECD-Studie hat ergeben, dass der Einsatz biotechnologischer Verfahren zur industriellen Produktherstellung häufig eine kostengünstige und umweltfreundliche Alternative zu bestehenden chemischen Syntheseverfahren darstellt [6]. Bestimmte Stufen/Grade in der Produktqualität sind darüber hinaus nur durch den Einsatz biologischer Verfahren erzielbar, z. B. bei der Herstellung enantiomerenreiner Produkte.

Die Bedeutung biotechnologischer Prozesse für industrielle Anwendungen wurde in zahlreichen Produktionsprozessen nachgewiesen. Das zeigen z. B. Verfahren zur Produktherstellung im pharmazeutischen Bereich. Hier gehören Bioprozesse zum Stand der Technik, z. B. zur Insulinherstellung. Bei der Herstellung von Feinchemikalien ist seit einigen Jahren ebenfalls ein eindeutiger Trend zu enzymatisch katalysierten Produktionsprozessen festzustellen [1]. Die Fortschritte im Bereich der Biokatalyse sind dabei u. a. durch genetische Modifikationen der eingesetzten Mikroorganismen erzielt worden. Ein Einsatz genetischer Verfahren zur gezielten Beeinflussung anorganischer Partikelstrukturen ist bislang nicht bekannt.

Zur Synthese von anorganischen Nanopartikeln mittels Biomineralisationsprozessen ist trotz vielfältiger Forschungsaktivitäten ausschließlich der Einsatz im Labormaßstab bekannt. Eine ähnliche Beobachtung gilt für biogene nanostrukturierte Partikel. Trotz ihrer komplexen Oberflächenstrukturen werden sie derzeit nahezu ausschließlich als Filterhilfsmittel eingesetzt („Kieselgur“). Von der einzigartigen Komplexität der von der Natur gebildeten Materialien sind Forscher schon seit langer Zeit fasziniert. Allerdings waren bislang die Kenntnisse für eine technische Nutzung biologischer Mineralisationsprozesse nicht vorhanden. Mittlerweile hat sich das Verständnis biologischer Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene entscheidend verbessert. Die an der Partikelsynthese beteiligten Biomineralisationsprozesse sind gut erforscht. Nun besteht die Zielsetzung darin, diese natürliche Rohstoffquelle in technischen Prozessen nachhaltig zu nutzen.

1.2 Gegenstand dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Herstellung anorganischer Partikel durch Biomineralisationsprozesse und in der Charakterisierung ihrer spezifischen Partikeleigenschaften. Dabei liegt der Schwerpunkt in der Bestimmung des Potenzials biogener Partikel für technische Applikationen. Hierzu wurde zunächst dargestellt, welche Möglichkeiten seitens der Biomineralisation für die Herstellung von Partikeln mit bestimmten Eigenschaften existieren und welche technischen Anwendungsbereiche sich dadurch erschließen. Dabei wurde auch eine Übersicht über alternative Produktionsverfahren zur Herstellung nanoskaliger und nanostrukturierte Partikel erstellt.

Die Untersuchungen wurden sowohl an biogenen nanoskaligen wie auch an biogenen nanostrukturierten Partikeln mit anorganischer Zusammensetzung durchgeführt. Dabei erfolgte die Auswahl der Forschungsobjekte entsprechend folgender Bedingungen: Bei den Organismen wurde vorausgesetzt, dass diese in der Literatur bereits biologisch gut untersucht sind und ihre Fähigkeit zur Bildung biogener Partikel eindeutig nachgewiesen wurde. Um eine technische Relevanz erzielen zu können, müssen die gebildeten Partikel qualitativ hochwertig und in relativ großer Menge verfügbar sein. Dabei sollen die von den ausgewählten Organismen generierten biologischen Materialien Eigenschaften aufweisen, welche für spätere technische Anwendungen Potenzial bieten.

Im Bereich der Nanopartikel wurde daraufhin die Herstellung biogener Cadmiumsulfid-Nanokristalle untersucht. Diese Partikel besitzen aufgrund ihrer möglichen Fluoreszenz- und Halbleitereigenschaften ein hohes Potenzial für technische Applikationen. Zusätzlich besitzen sie durch ihre Peptidschicht eine hydrophile Oberfläche und sind biokompatibel [7]. Als Organismen wurden die Hefestämme *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* ausgewählt.

Die Bildung biogener nanostrukturierter Partikel wird in der Literatur für eine Vielzahl von Algenarten beschrieben. Die synthetisierten Partikel weisen dabei häufig komplexe Oberflächenstrukturen auf und bestehen entweder aus Siliziumdioxid oder Calciumcarbonat. Als Forschungsobjekt wurde im Rahmen dieser Arbeit für jede der beiden Materialgruppe ein Organismus gewählt. Dabei handelt es sich um die Algen *Emiliania huxleyi* (Calciumcarbonat-Partikel) und *Thalassiosira weissflogii* (Partikel aus Siliziumdioxid). Beide sind in großem Umfang in jährlichen Algenblüten vertreten.

Zur Bestätigung des industriellen Potenzials wurden die Herstellkosten biogener anorganischer Partikel abgeschätzt. Damit kann eine Wettbewerbsfähigkeit biogener Partikel im Vergleich zu Partikeln aus physikalisch-chemischen Syntheseverfahren nachgewiesen werden.

2 Biomineralisation: Prinzipien und Partikeleigenschaften

Zunächst erfolgt eine kurze Einführung in die Grundlagen der Biomineralisation. Hierbei wird eine Übersicht über die allgemeinen Prinzipien zur Bildung biogener anorganischer Partikel erstellt. Anschließend erfolgt die Beschreibung der Bildungsmechanismen, welcher der Generierung von Cadmiumsulfid-Nanopartikel zugrunde liegen (Kapitel 2.1.1). Die biologischen Prozesse zur Bildung nanostrukturierter Calciumcarbonat- und Silica-Partikel werden in Kapitel 2.1.2 dargestellt.

2.1 Prinzipien der Biomineralisation

Der Begriff „Biomineralisation“ umfasst die Gesamtheit aller biologisch geregelten Mineralisationsprozesse. Die Besonderheit der Biomineralisation liegt in der Generierung anorganischer Partikel durch Selbstorganisation der beteiligten Moleküle und Molekülkomplexe. Der Bildungsprozess umfasst die selektive Aufnahme von Elementen aus der lokalen Umgebung und ihre Einbindung in funktionale Strukturen unter strikter biologischer Steuerung [3]. Die Partikelsynthese ist dabei von der molekularen Größenebene ($< 1,5 \text{ nm}$) bis in den makroskopischen Bereich ($> 100 \text{ }\mu\text{m}$) gesteuert [8].

Die tabellarische Darstellung (Tabelle 1) gibt eine Übersicht über die verschiedenen hierarchischen Ebenen der Biomineralisation. Allgemein ist festzustellen, dass die Bildung biogener Partikel auf physikalischen Parametern und biologischen Prinzipien basiert, wie z. B. Wechselwirkungen zwischen Proteinmatrix und Kristallkeim [9]. Die Steuerung der Partikelsynthese auf verschiedenen hierarchischen Ebenen ermöglicht die Bildung einer Vielzahl unterschiedlicher funktioneller Strukturen mit komplexen Nanoarchitekturen [9]. Konkretisiert wird diese Ausführung am Beispiel der Bildung von Calciumcarbonat-schalen bei Mikroalgen.

Bei der Biomineralisation sind zwei grundlegende biologische Prozesse zu unterscheiden: Die Partikelbildung mit bzw. ohne Nutzung einer organischen Matrix. Bei einer matrixgebundenen Partikelbildung wird von dem Organismus eine Matrix aus organischem Material gebildet. Diese dient im Allgemeinen dazu Zwischenräume auszufüllen, Oberflächenstrukturen vorzugeben und Oberflächenladungen auszugleichen. Die Strukturen der Partikel entstehen durch biologisch kontrollierte

Fällungsreaktionen [8]. Die entstehenden Strukturen werden somit genetisch gesteuert [10].

Stoffhierarchie	Wechselwirkung (WW)	Bsp. Bildung von Calciumcarbonat-schalen bei Mikroalgen
Atome, Ionen, Moleküle	Kovalente Bindungen, Ionenbindungen, Wasserstoff- Brückenbindungen, van der Waals Kräfte	Ca^{2+} , CO_3^{2-} , Aminosäuren
Supramoleküle		Kristallkeim-Protein-Komplexe
Membrankompartimente, Organellen	Hydrophobe WW, kooperative WW wie z. B. Epitaxie	Membran-Einkristall- Nanokomposite, Kristalltexturen
Zellen	Adhäsion	Einzelne Bauelemente, sog. „Tektone“
Gewebe, Organe, Organismus	Reibung, mechanische Passung, Gravitation	Bauelement-Verbände „Architektur“, „Tektonik“, vollständige Schale

Tabelle 1: Übersicht über die hierarchische Organisation der Materie bei der Biomineralisation [11]

Biomineralien sind dementsprechend Verbundwerkstoffe aus einer speziellen organischen Matrix und einer anorganischen Komponente, wobei die organische Matrix einen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie der anorganischen Komponente hat. Bei der Bildung anorganischer Kristalle dient die organische Matrix zur Regulation von Keimbildung und Kristallwachstum. Teilweise werden Einzelkristalle durch Adhäsion an eine organische Matrix zu einem Partikelkomplex zusammengefügt. Diese Matrix bildet hier zusätzlich eine elastische Schutzhülle, welche den Abbau des anorganischen Formkörpers verhindert [11]. Die Prägung der Struktur anorganischer Partikel durch eine organische Matrix wird auch bei amorphen Biomineralien beobachtet. Als „amorph“ werden Materialien bezeichnet, deren anorganische Komponenten kein ausgeprägtes Kristallgefüge aufweisen [11].

Weitere Biomineralisationsprozesse basieren z. B. auf Bioreduktionsreaktionen oder der zellulären Einlagerung einer funktionellen Komponente in wasserunlösliche,

nicht-toxische Nanocluster. Diese treten z. B. bei Entgiftungsprozessen, so genannten Detoxifikationsprozessen, auf. Der Ablauf von Oxidations- und Kondensationsreaktionen führen z. B. zu einer geregelten Biosynthese von Magnetit- oder Silica-Partikeln [4].

Bei einigen Bakterien und Algen ist in der Natur eine matrixfreie Partikelbildung zu beobachten. Die biologisch induzierte Mineralisation ohne organische Matrix ist gekennzeichnet durch extra- oder intrazelluläre Kristallformation. Dabei läuft die Mineralisation im Vergleich zur Biomineralisation mit organischer Matrix allerdings weniger geregelt ab [12]. Das Ergebnis sind meist polykristalline Aggregate, wobei die Kristalleigenschaften mit jenen chemischer Fällungsreaktionen vergleichbar sind [10].

2.1.1 Gewinnung biogener Cadmiumsulfid-Nanopartikel

Die Bildung von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln beruht auf einem spezifischen Detoxifikationsmechanismus. Dieser ist bei einigen Mikroorganismen in cadmiumhaltiger Umgebung zu beobachten. In diesem Abschnitt wird zunächst die Toxizität von Cadmium und mögliche Detoxifikationsreaktionen bei Mikroorganismen beschrieben. Anschließend erfolgt eine detaillierte Darstellung der intrazellulären Biomineralisationsprozesse bei *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* – jenen Hefestämmen, welche im Rahmen dieser Arbeit zur Generierung biogener Nanopartikel zum Einsatz kamen.

Toxische Wirkung von Cadmium und Prinzipien der Cadmiumresistenz

Cadmium gehört zur Gruppe der Schwermetalle. Schwermetalle gelangen häufig durch Transportsysteme in die Zelle, welche normalerweise der zellulären Aufnahme von essentiellen Metallionen dienen. So erfolgt eine Aufnahme von Cadmiumionen in die Zelle z. B. durch das Transportsystem für Mangan- oder Magnesiumionen [13, 14]. Cadmium ist ein nicht-essentielles Element mit einer hohen Toxizität [15]. Die Toxizität von Cadmium beruht auf der Eigenschaft von Schwermetallen, funktionelle intrazelluläre Metalle zu ersetzen und eine Denaturierung von Proteinen und der DNA zu bewirken. Viele eukaryotische und prokaryotische Organismen haben daher im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, den durch Schwermetalle hervorgerufenen cytotoxischen Effekten entgegenzuwirken.

Zu diesen Entgiftungsmechanismen zählen z. B. intrazelluläre [16, 17] oder extrazelluläre [4, 13, 16, 18, 19] Fällungs- und Kompartimentierungsreaktionen. Bei einigen Mikroorganismen wird eine Verringerung der zellulären Cadmiumionen-Aufnahme durch eine Modifikation der Membrantransportsysteme [16, 20] beobachtet. Andere Organismen nutzen einen energieabhängigen Efflux-Prozess zur Ausschleusung toxischer Schwermetallionen [14, 21, 22]. Weiter ist eine enzymatische Oxidation oder Reduktion von Metallionen zu weniger toxische Verbindungen möglich [4, 16, 23].

Bildung von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln

Die Bildung biogener Cadmiumsulfid-Nanopartikel basiert auf einer biologisch induzierten Mineralisation unter Nutzung einer organischen Matrix. In eukaryotischen Zellen existieren zwei Klassen cysteinreicher Moleküle, die im Rahmen von Detoxifikationsprozessen eine wichtige Rolle spielen: Die Metallothionine und glutathion-ähnliche Polypeptide.

Die Gruppe der Metallothionine umfasst niedermolekulare Proteine und Polypeptide mit hohen Metall- und Schwefelgehalten, zu denen die Phytochelatine (Synonyme: PC, Metallothionin Klasse 3, Cadystin) gehören [24, 25]. Phytochelatine sind Polypeptide, die aus dem Peptid Glutathion als Reaktion auf Schwermetalle z. B. in Pflanzen, Hefen und Pilzen gebildet werden.

Die Phytochelatinbildung erfolgt durch Enzym Phytochelatin-Synthase. Phytochelatine werden dabei unter Abspaltung von Glycin aus Glutathion-Molekülen gebildet. Glutathione (GSH oder γ -Glu-Cys-Gly) sind Tripeptide, die aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin zusammengesetzt sind. Sie sind in zahlreiche zelluläre Prozesse involviert, wie z. B. dem Erhalt des Redoxzustandes und der Konjugation reaktiver Metabolite [26]. Glutathione stehen daher nur übergangsweise für die Bindung von Metallionen zur Verfügung. Sie bilden die Vorstufe für andere metallbindende Peptide, wie z. B. den Phytochelatinen [26]. Der entsprechende Bildungsprozess ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

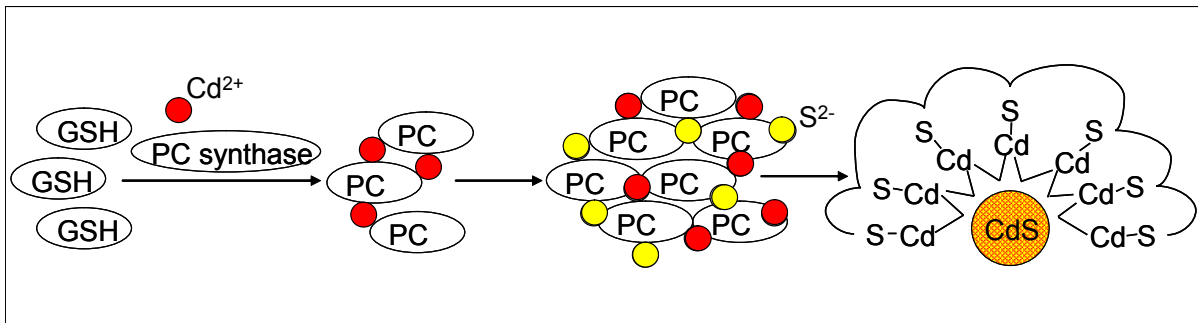


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines cadmiuminduzierten Biosyntheseweges zur Bildung von Cadmiumsulfid/Peptid-Clustern [4].

Bei der Biotransformation erfolgt im ersten Schritt die Bildung von Cd^{2+} /Glutathion-Clustern. Diese werden enzymatisch zu Cd^{2+} /Phytochelatin-Komplexen umgewandelt, wobei die Bildung des beteiligten Enzyms durch die Anwesenheit von Cadmiumionen induziert wird [4]. Phytochelatine besitzen die allgemeine Struktur $(\gamma\text{-Glutaminsäure-Cystein})_n\text{-Glycin}$,

mit „n“: Anzahl der sich wiederholenden Glutaminsäure-Cystein-Sequenzen².

Die Kettenlänge der Phytochelatine steigt dabei spezienspezifisch mit der Dauer der Cadmiumexposition [26]. Nach Abschluss der Phytochelatinsynthese ordnen sich die Cadmiumionen innerhalb der Peptidmatrix an und führen so zur Bildung von Cd^{2+} /Phytochelatin-Komplexen [4].

Die Phytochelatine binden dabei mit den Thiolgruppen der Cysteine an die Metallionen. Dies entspricht dem Prinzip der schwachen und starken Säuren und Basen („hard and soft acids and bases“, HSAB) von Parr und Pearson, woraufhin sich die Cd^{2+} -Ionen als schwach elektronegative Metallionen an die schwach elektronegative schwefelhaltige Aminosäure Cystein binden [4].

Diese Cluster bilden eine Matrix für einen geregelten sulfid-induzierten Mineralisationsprozess, der die Bildung von Cadmiumsulfid-Clustern bewirkt [7]. Die Anwesenheit von Cadmium fördert die Bildung von säure-instabilem Cadmiumsulfid [27]. Durch die Einlagerung von Sulfid in die Cd^{2+} /Phytochelatin Komplexe entstehen chemisch stabile Cadmiumsulfid/Phytochelatin-Komplexe [26]. Zusätzlich ermöglichen sie durch die Bildung peptidumhüllter Nanokristalle die Einlagerung einer größeren Menge Cadmium [7].

Phytochelatine sind in der Natur weit verbreitet und u. a. in Hefen, Pilzen und Pflanzen isoliert worden. Je nach (Mikro-)Organismus variiert die Größe der

² Alternative Schreibweisen: $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ bzw. $(\gamma\text{EC})_n\text{G}$.

gebildeten Cadmiumsulfid-Kristallite und die Länge der gebildeten Phytochelatin-Einheiten [4]. Bei Hefen liegt der Wert für „n“ in der Regel bei $n = 2 - 4$ [7].

Im Rahmen dieses Projektes wurden die Hefen *S. pombe* und *C. glabrata* eingesetzt. Diese bilden peptidbeschichtete Cadmiumsulfid-Nanopartikeln basierend auf dem beschriebenen Detoxifikationsmechanismus. Für beide Hefestämme ist in der Literatur ein Einfluss der Sulfidkonzentration auf die Phytochelatin-Komposition beschrieben. Eine steigende Sulfidkonzentration führt demzufolge zu einem erhöhten Anteil der stabilen langkettigen Phytochelatine ($n = 3$, $n = 4$) und zur Reduzierung des Anteils kurzkettiger Peptide ($n = 2$) [3, 27, 28].

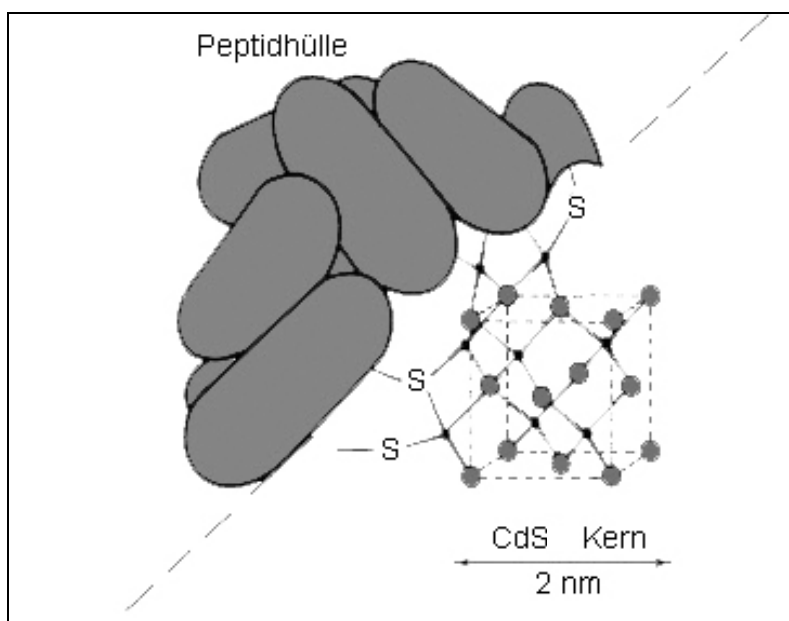


Abbildung 2: Modell eines Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes: Cadmiumsulfid-Kern (\varnothing ca. 2 nm) mit Phytochelatinhülle [7].

Die Abbildung 2 zeigt ein von Dameron entwickeltes Modell eines Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes [7]. Die Nanopartikel besitzen dabei einen durchschnittlichen Kristalldurchmesser von ca. 2 nm. Die Cadmiumsulfid-Kristalle bestehen aus ca. 85 Cadmiumsulfid-Einheiten, welche kristallin in einer Wurtzitstruktur angeordnet sind [4]. Der Cadmiumsulfid-Kern ist jeweils von ca. 30 Phytochelatin-Molekülen umgeben [7]. Diese Peptidhülle führt zu einer Stabilisierung der Nanopartikel und verhindert zugleich ein weiteres Partikelwachstum.

2.1.2 Gewinnung biogener nanostrukturierter Partikel

In der Natur existiert eine Vielfalt an biogenen Partikeln mit nanostrukturierten Oberflächen. Die entsprechenden Partikel werden dabei vorwiegend als Außenskelett von Mikroalgen gebildet. Das Außenskelett besteht hierbei aus Partikeln mit artenspezifischer Oberflächenstrukturierung. Im Allgemeinen sind dabei Partikel aus kristallinem Calciumcarbonat oder amorphem Silica vorzufinden [11]. Die biogenen Partikel sind speziell an die Bedürfnisse der Algenzelle angepasst. Sie können daher im Vergleich zu ihren chemischen Analoga veränderte physikalische Eigenschaften z. B. bezüglich der Bruchfestigkeit oder Porosität aufweisen [11, 29].

Die Funktion des Außenskelettes in der Natur ist nicht geklärt [30]. Es existieren diesbezüglich allerdings unterschiedliche Theorien, wie z. B. dem Schutz vor Fressfeinden oder zur Lichtregulation der Algenzelle [11, 31].

Zunächst wird in diesem Kapitel eine allgemeine Übersicht über die allgemeinen Mechanismen zur Strukturbildung bei biogenen Partikeln erstellt. Anschließend werden die Bildungsmechanismen am Beispiel des jeweiligen Referenzorganismus ausgeführt.

Allgemeine Bildungsmechanismen

Bei einzelligen Organismen mit Außenskelett ist der Mineralisationsprozess stets an den Zellzyklus gekoppelt. Dabei werden insbesondere bei der Zellteilung auftretende Änderungen des Cytoskelettes und des Zellinnendrucks genutzt, um mineralisierte Zellbestandteile zu positionieren oder dauerhaft zu verformen. Die Bedeutung von Proteinen und Peptiden in den verschiedenen Phasen der Biomineralisation wurde dabei in verschiedenen *in vitro* Studien gezeigt [32].

Der Mineralisationsprozess lässt sich im Allgemeinen in die folgenden Stufen unterteilen [11]: Zunächst werden die im Medium gelösten anorganischen Komponenten über membrangebundene Pumpen in das Zellinnere transportiert. Zur Vermeidung spontaner Fällungsreaktionen werden die Komponenten in Vesikeln räumlich getrennt angereichert bzw. durch die Bindung an spezifische Cofaktoren maskiert. Parallel zur aktiven Anreicherung der anorganischen Komponenten beginnt die Biosynthese einer spezifischen organischen Mineralisationsmatrix. Dazu zählen z. B. Polypeptide und Polysaccharide.

Die nächste Stufe der Biomineralisation besteht in der Vereinigung der Mineralisationsmatrix und der anorganischen Komponente(n). Dieser Vorgang findet

meistens in speziellen Mineralisationskompartimenten unter Nutzung von Wechselwirkungen zwischen der organischen Matrix und dem Mineral statt [33]. In der letzten Stufe werden die synthetisierten Strukturelemente zu dreidimensionalen Gefügen zusammengefügt. Neben dem Einsatz einer organischen Matrix werden zusätzlich für das funktionelle Differenzieren der Partikelstruktur teilweise Oberflächenkräfte genutzt. Dieser Effekt tritt z. B. bei der Biomineralisation der Außenskelette bestimmter Kieselalgen (Radiolarien) auf. Die dreidimensional strukturierten Formen werden in diesem Fall häufig nicht durch biochemisch kontrollierte Reaktionen, sondern in einem einzigen Vorgang durch die Nutzung von Oberflächenkräften erzeugt [33].

Calciumcarbonathaltige nanostrukturierte Partikel

Am bekanntesten sind die Calciumcarbonat-Partikel der Coccolithophoriden³. Diese Algengruppe besitzt ein Außenskelett aus calciumcarbonathaltigen Schuppen. Die Coccolithophoriden sind regional weit verbreitet und kommen u. a. in großen Mengen im Meerwasser vor [31].

Die Fläche der jährlichen Algenblüte wird auf bis zu 1,4 Mio. km² geschätzt [34, 35]. Die entsprechende Coccolithenkonzentration beträgt ca. 100 - 300 mg·m⁻³ mit einer Coccolithenanzahl von bis zu 400.000 cm⁻¹ [35, 36]. In den Ozeanen wurden ca. 200 Arten von Coccolithophoriden identifiziert [37].

Aufgrund der Partikelform (Abbildung 4) wird durch die kalzifizierten Algenzellen ein Großteil des einstrahlenden Lichts reflektiert. Die Blütegebiete sind daher auf Satellitenaufnahmen (Abbildung 3) gut sichtbar und auch unter dem Begriff „White Waters“ bekannt [30, 38].

³ Coccolithophoriden: Untergruppe der haptophyten Algen. Haptophyte Algen sind einzellige Organismen, welche durch einen goldbraunen Chloroplasten, ein schuppenartiges Außenskelett und einen speziellen Bewegungsapparat charakterisiert sind.

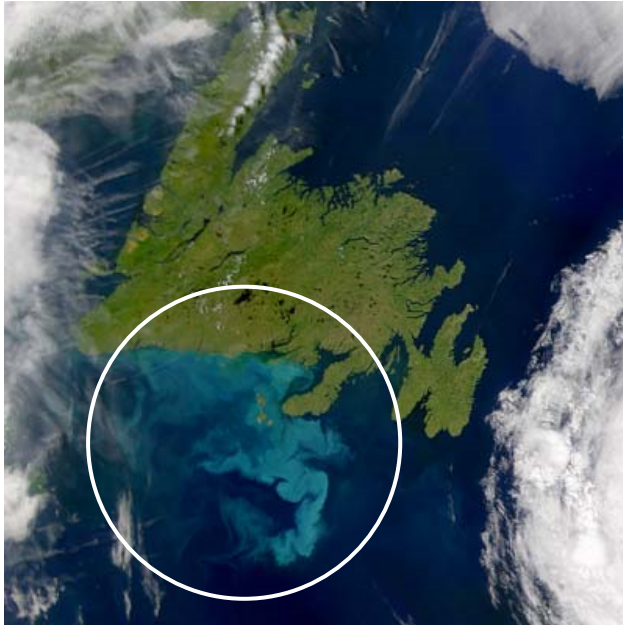


Abbildung 3: Satellitenbild einer Algenblüte von *Emiliana huxleyi* vor der Ostküste Kanadas (© NASA) [39].

Die meisten Coccolithophoriden bilden kompakte, wenig poröse Partikel. Die schuppenartigen Partikel variieren dabei je nach Algenart in Form und Größe. Typischerweise befindet sich auf der Zelloberfläche eine einfache Schicht aus ca. 10 Coccolithen. Bei einigen Algenzellen wurde ein vielschichtiges Gefüge aus Hunderten von Coccolithen beobachtet [40].

Nach der Gruppe der Coccolithophoriden bilden die Foraminiferen gemeinsam mit den Korallen die zweitwichtigste Gruppe zur Bindung von Calciumcarbonat aus Meerwasser [41].

Emiliana huxleyi

Der bekannteste Vertreter der Coccolithophoriden ist die Alge *Emiliana huxleyi*, welche auch unter dem Synonym *Ehux* bekannt ist. Mit Ausnahme der Polarmeere ist diese Mikroalge in sämtlichen Meeren vorzufinden. *Ehux* tritt dabei vorwiegend im oberflächennahen Wasser (Tiefen < 30 m) tropischer bis subtropischer Meere auf [42]. *Ehux* gilt aufgrund der riesigen Algenblüten [38] als weltweit größter Produzent von biogenem Calciumcarbonat [30, 37]. Während der Algenblüte bestehen 80 - 90 % der im Meerwasser vorhandenen kalzifizierten Algenzellen aus *Ehux*-Zellen [38].

Die Abwesenheit eines Photoinhibitionseffektes ermöglicht *Emiliana huxleyi* ein Wachstum bei hohen Lichtintensitäten [30, 42]. Sie toleriert zudem einen weiten

Temperaturbereich (1 - 31 °C), wobei die Algenblüten hauptsächlich in Gewässern mit Temperaturen von 10 - 20 °C auftreten [30].

Im Lebenszyklus von *Emiliana huxleyi* existieren unterschiedliche Zelltypen [43]. Dabei sind unbewegliche coccolithtragende Zellen, unbewegliche unbeschichtete Zellen und beweglichen Zellen mit organischen Schuppen zu beobachten [30, 44, 45]. Zusätzlich treten innerhalb der Spezies Generationen mit haploidem oder diploidem Chromosomensatz auf [44].

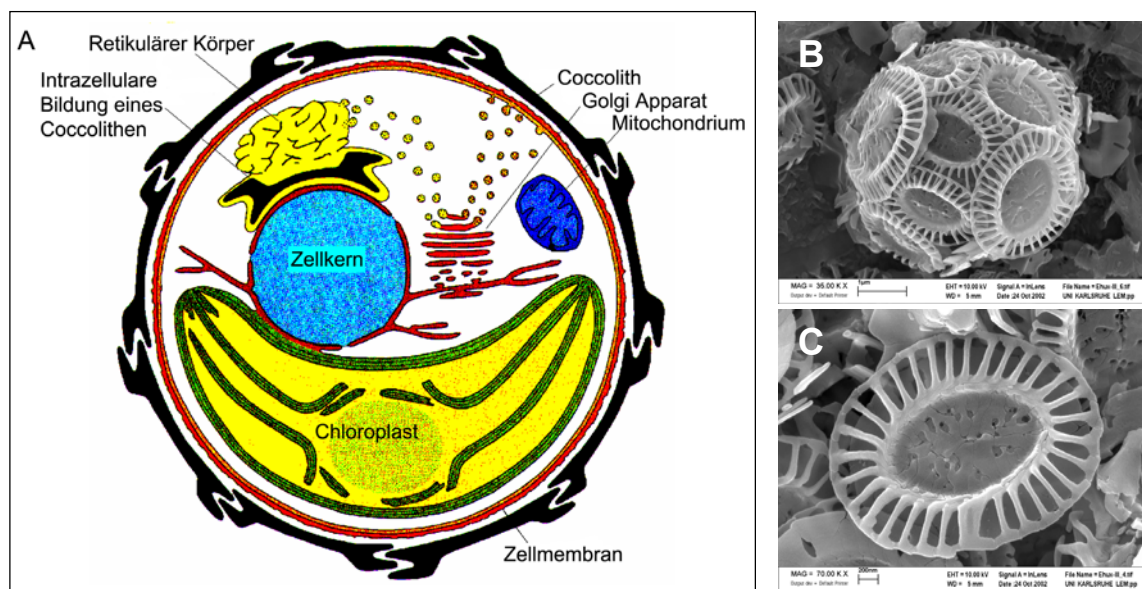


Abbildung 4: (A) Schematischer Aufbau einer Algenzelle von *Emiliana huxleyi* [46], (B) elektronenmikroskopische Aufnahme (REM) einer vollständig kalzifizierten *Ehux* Zelle und (C) Detailaufnahme eines Coccolithen.

Die Abbildung 4 A zeigt den schematischen Aufbau einer *Ehux*-Zelle. Im Zellinneren dominiert ein gelbbrauner Chloroplast, welcher von dem Organismus für die Photosynthese benötigt wird. In diesem Chloroplast wurde das Enzym Carbonanhydrase nachgewiesen. Die Carbonanhydrase katalysiert die Umwandlung des aus dem Medium aufgenommenen Hydrogencarbonats (HCO_3^-) in Kohlendioxid zur anschließenden Kohlenstoff-Fixierung [30].

In Abbildung 4 B ist eine mit Coccolithen bedeckte Zelloberfläche zu sehen. Die einzelnen Coccolithen besitzen dabei einen Durchmesser von ca. 2,5 μm und ein Gewicht von jeweils ca. 2 pg [47, 48]. In der Partikelmitte ist eine kanalförmige Struktur erkennbar, welche sich an beiden Enden zu zwei Schilden weitet (Abbildung 4 C). Die Krümmung der Schilde entspricht dabei der Rundung der Zellwand. Die untere (proximale) Oberfläche ist der Algenzelle zugewandt. Die obere (distale)

Oberfläche weist in die entgegengesetzte Richtung [40]. Die Fläche im Kanalinneren ist zur distalen Oberfläche geöffnet. Zur proximalen Seite ist sie durch eine Gitterstruktur verschlossen. Charakteristisch für Coccolithen sind die spaltenförmigen Öffnungen zwischen den hammerförmigen Einzelelementen des distalen Schildes [40].

Die Coccolithensynthese findet im Zellinneren statt. Dieser Prozess wird auch Coccolithogenese genannt [30, 46, 47]. Die Partikelbildung kann dabei im Wesentlichen in drei Schritte unterteilt werden: 1) Konzentrierung von Calcium-Ionen an der Zelloberfläche, 2) Transport der Calcium-Ionen in speziellen Vesikeln und 3) Calcitablagerung in Coccolithvesikeln.

Die Herstellung des Coccolithenvesikels erfolgt durch das endoplasmatische Retikulum (ER). Oberhalb des Vesikels befindet sich in unmittelbarer Nähe des Golgi Apparates ein retikulärer Körper (RK). Dieser steuert die Coccolithenbildung. In Mikrovesikeln findet der Transport zwischen ER und RK statt.

Die Partikelbildung im Coccolithenvesikel beginnt mit der Bildung eines elliptischen Ringes aus Calcitkristallen. Dieser Ring bildet später den Boden des Kanals in der Coccolithenmitte [48]. Im kanal-auswärts gerichteten Wachstum kommt es ausgehend von diesem Ring zur Bildung eines konkav gebogenen (proximalen) Schildes. Im kanal-inwärts gerichteten Wachstum ist die Bildung einer Bodenplatte zu beobachten. Die Kristallbildung wird bei der Bodenplatte vermutlich durch funktionelle Gruppen auf einer organischen Matrix induziert [3]. Das beschriebene Strukturwachstum basiert dabei ausschließlich auf einer Vergrößerung der Kristalle des ursprünglichen Rings. Ein Coccolith besteht aus ca. 30 Einzelkristallen [40, 48].

Durch einen biochemisch kontrollierten Mineralisationsprozess kommt es zur Bildung kristalliner Calcitstrukturen. Die zugrunde liegenden biochemischen Prozesse sind hierbei nicht bekannt [40, 49]. Ist die Synthese des Coccolithen abgeschlossen, bewegen sich die Coccolithenvesikel in Richtung Zellwand und verschmelzen mit der Zellmembran. Die äußeren Teile der Membran werden resorbiert und der Coccolith gelangt so auf die Zellaußenseite. Dort wird er mittels extrazellulärer Polysaccharide auf der Zellaußenseite fixiert [50]. Das nachfolgende Verzahnen der einzelnen Coccolithen (Abbildung 4 A) resultiert dabei aus zufälligen Bewegungen des gesamten Schalengefüges [51].

Nanostrukturierte Silica-Partikel

Die Bildung nanostrukturierter Silica-Partikel erfolgt durch so genannte Kieselalgen. Ihr Name stammt von der Kieselsäure ($\text{Si}(\text{OH})_4$), aus der ihr Außenskelett gebildet wird [3]. Die Silica-Partikel werden auch „Kieselschalen“ oder „Frusteln“ genannt [52]. Kieselschalen sind weitgehend säurefest, chemisch inert, temperaturbeständig und weisen eine große Härte auf. Sie haben eine amorphe Struktur und besitzen auf ihrer Oberfläche eine große Anzahl von Hydroxylgruppen (siehe Anhang A) [3, 53].

Fossile Kieselschalen sind kommerziell unter dem Handelsnamen Kieselgur bekannt. Bei Kieselgur handelt es sich um ein Sediment unterschiedlicher Kieselschalenarten, welches sich im Verlauf der erdgeschichtlichen Entwicklung auf dem Meeresboden gebildet hat. Aufgrund seiner Entstehung zeigt Kieselgur im Vergleich mit frisch kultivierten Kieselschalen vielfach veränderte Eigenschaften [37]. So weisen die fossilen Kieselschalen z. B. nahezu ausschließlich kristalline Strukturen auf [54].

Diatomeen

Zu den bekanntesten Kieselalgen zählt die Gruppe der Diatomeen. In den jährlich auftretenden Kieselalgenblüten liegt der Anteil von Diatomeen bei bis zu 90 %. Damit tragen sie wesentlich zur gesamten primären Kohlenstoffproduktion weltweit bei [55, 56].

Insgesamt wurden ca. 10.000 verschiedene Diatomeenarten identifiziert [37],[55]. Bei den Diatomeen werden auf Basis der Schalenmorphologie die Diatomeengruppen „Centrales“ und „Pennales“ unterschieden [55]. Die Schalen der zentrischen Diatomeen („Centrales“) zeichnen sich durch eine Rotationssymmetrie aus [57]. Zu ihnen zählen z. B. die Algen *Cyclotella cryptica* und *Thalassiosira weissflogii*. Die Schalen von „federförmigen“ Diatomeen („Pennales“) sind im Gegensatz dazu achsensymmetrisch [4, 57]. Beide Schalentypen besitzen unabhängig von ihrer Makromorphologie auf der Nanoebene Poren mit ähnlicher Größenverteilung [58]. Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich zentrische Diatomeen untersucht.

Diatomeen-Frusteln bestehen aus zwei nahezu gleichen Hälften, wobei die Seitenteile der einen Hälfte (Epitheka) die der anderen (Hypotheka) wie bei einer Schachtel überlappen [4, 55]. Die Schalenflächen werden Valven genannt (Abbildung 38). Im Schaleninneren befindet sich die Algenzelle.

Die Oberflächenmorphologie wird von einer vielfältigen Vernetzung von Poren, Kanälen und Rippenstrukturen bestimmt [58]. Durch die Abwesenheit von Bruch- und

Spaltebenen in den amorphen Strukturen ist eine Bildung komplexer Schalenarchitekturen ohne Härteverlust möglich [3]. Oberflächenstrukturen wie z. B. Vorsprünge und Rippen tragen zur Steigerung der mechanischen Belastbarkeit der Partikel bei [59, 60]. An anderen Stellen ist die Partikeloberfläche durch regelmäßig angeordnete Poren oder Rillen durchbrochen, um einen Kontakt zwischen Algenzelle und Umgebung zu gewährleisten.

Die Schalenbildung ist bei den Diatomeen an den Zellzyklus gekoppelt (Abbildung 5). Der Protoplast teilt sich bei der Zellteilung innerhalb der Frusteln, wobei die beiden Schalenhälften nur so weit wie nötig auseinanderweichen. Von den Tochterzellen wird die jeweils fehlende Schalenhälfte neu gebildet, wobei die neue Schale stets als kleinere Hypotheka ausgebildet wird. Die von Generation zu Generation immer kleiner werdenden Frusteln erreichen schließlich eine artspezifische Minimalgröße. Diese liegt bei ca. 30 bis 40 % der ursprünglichen Frustelgröße [4]. Wird die Minimalgröße erreicht, findet ein sexueller Reproduktionsvorgang zur Wiedererlangung der artspezifischen Frustelgröße statt.

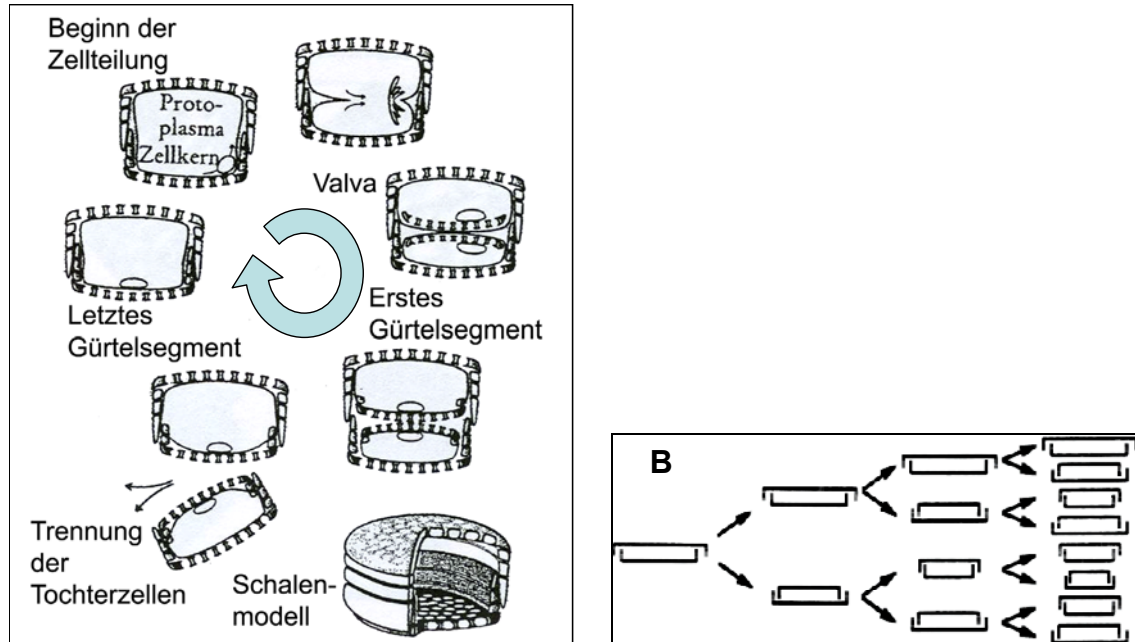


Abbildung 5: (A) Schema zur Vervielfältigung der Frusteln [11]; (B) Veränderung der Frustelgröße bei Diatomeen in Abhängigkeit der Generationszahl [55].

Als Substrat für die Schalenbildung dient die Kieselsäure. Die Kieselsäure-Aufnahme erfolgt aktiv über ein Transportmolekül, welches in der äußeren Zellmembran lokalisiert ist [3, 29]. Zur Vermeidung einer unkontrollierten Ausfällung der

Kieselsäure bei der Anreicherung im Zellplasma erfolgt eine Maskierung der Kieselsäure-Moleküle. Dazu werden aus dem Kieselsäuredepot der Zelle kleine Transportvesikel (STV, „silica transport vesicles“) abgesondert. Nach der Zellteilung wird zur Frustelbildung ein zelleigenes Mineralisationsvesikel (SDV, „silica deposition vesicle“) gebildet, welches als flacher Membransack entlang der Innenseite der bei der Zellteilung neu entstandenen Plasmamembran wächst.

Die Transportvesikel verschmelzen mit dem Mineralisationsvesikel, und in den SDV findet über die Kondensation der Kieselsäure die Schalensynthese statt. Das starre Skelett der Mutterzelle dient dabei als Template⁴. Der genaue Prozess der Frustelbildung bislang nicht bekannt. Auch über die bei der Biomineralisation beteiligten biochemischen Reaktionen und die Wirkungsweisen der organischen Matrizen ist wenig bekannt [29, 52, 57]. Es wird jedoch vermutet, dass die von Parkinson als „Sintern“ bezeichnete diffusionslimitierte Silica-Fällung in dem Prozess eine wesentliche Rolle spielt [55].

2.2 Nanospezifische Partikeleigenschaften

Nanopartikel sind keine Erfindung der letzten Jahre. Schon im Mittelalter wurden Nanopartikel bei der Herstellung von farbigen Kirchenfenstern verwendet. Im Jahr 1857 hat Michael Faraday mit der wissenschaftlichen Erforschung größenspezifischer Eigenschaften bei Nanopartikeln begonnen [61, 62].

Ein wesentlicher Unterschied von Volumenmaterial zu Nanopartikeln ist das Oberflächen- zu Volumenverhältnis der Partikel. Bei sphärischen Nanopartikeln steigt dabei das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen mit abnehmendem Durchmesser mit dem Faktor $\frac{1}{d}$ proportional an. Bei Nanopartikeln mit 10 nm Durchmesser befinden sich ca. 20 % aller Atome an der Oberfläche. Bei Partikeln mit 2 nm Durchmesser sind es bereits 80 % aller Atome [61]. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Nanopartikel werden daher maßgeblich von ihrer Oberflächenbeschaffenheit und ihrer Oberflächenenergie beeinflusst [63]. Zur Oberfläche bzw. Grenzfläche zählen ausgehend von der Partikeloberfläche alle Atomschichten, deren Bindungsverhältnisse oder Bindungssymmetrien anders sind als im Volumenmaterial. Hierzu zählen z. B. nicht gesättigte Bindungen, Bindungen

⁴ Template: Vorlage, Schablone

mit anderen Atomen und Bindungen mit anderen Bindungsenergien. Die Elektronen können somit andere energetische Zustände als im Volumenmaterial aufweisen [64]. Dadurch weisen viele Substanzen im nanoskaligen Maßstab partikelgrößenabhängig Eigenschaften auf, die völlig von den Eigenschaften in makroskopischer Form abweichen [61]. Prinzipiell lässt sich für unterschiedliche Materialgruppen sagen: Je kleiner die Partikel, desto

- höher die katalytische Aktivität,
- höher die mechanische Festigkeit,
- höher die elektrische Leitfähigkeit von keramischen Stoffen,
- niedriger die elektrische Leitfähigkeit von metallischen Stoffen,
- höher die Härte von Metallen und Legierungen,
- höher die Härte und Formbarkeit von keramischen Stoffen,
- größer die Blauverschiebung der optischen Spektren von Nanokristallen und
- desto höher die Lumineszenzintensität von Halbleitern [65].

Materialien aus Primärpartikeln mit Durchmessern bis 50 nm sind zudem transparent, da sie für eine Lichtstreuung im sichtbaren Wellenlängenbereich zu klein sind [66]. Weitere partikelgrößenabhängige Eigenschaften resultieren aus dem Phänomen des „Größenquantisierungseffekts“ bei Nanokristallen:

Als „Quanten“ werden dabei allgemein die kleinsten, unteilbaren Einheiten in der Physik bezeichnet. Bei einer kristallinen Partikelstruktur weisen Nanokristalle Eigenschaften auf, die jenen von Halbleitermaterialien gleichen. Als Größenquantisierungseffekt bezeichnet man die Erhöhung des Abstandes zwischen Leitungs- und Valenzband bei sinkender Kristallgröße. Die Nanokristalle werden auch als „Quantenpunkte“ bezeichnet. Die Nanopartikel sind dabei mit ca. 1 - 5 nm [67] kleiner als die Bohr-Radien ihrer über Coulomb-Kräfte gebundenen Elektron-Loch-Paare⁵. Diese Anordnung ähnelt der Anordnung in einem Wasserstoffatom und lässt sich quantenmechanisch analog beschreiben. Eine charakteristische Größe ist die so genannte Quantenausbeute η .

$$\eta = \frac{N_{FL}}{N_{Abs}}$$

Die Quantenausbeute η ist definiert als das Verhältnis der Anzahl emittierter Photonen N_{FL} zur Anzahl der absorbierten Photonen N_{Abs} .

⁵ Elektron-Loch-Paare in einem Halbleiter werden auch als „Exzitonen“ bezeichnet.

Detaillierte Beschreibungen der spezifischen Eigenschaften von Quantenpunkten sind in zahlreichen Literaturstellen zu finden [61, 63, 64, 66, 68-74].

3 Marktvolumen und Konkurrenzverfahren

Zunächst erfolgt eine Bewertung der Bedeutung von Biomineralisationsprozessen für die Verfahrenstechnik. Anschließend werden ausgehend von dem derzeitigen Markt für Nanopartikel und nanostrukturierte Partikel potenzielle Einsatzbereiche für biogene Partikel aufgezeigt.

Zusätzlich wurde eine Recherche zu alternativen Verfahren zur Herstellung nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel durchgeführt. Diese ergab, dass die biogenen Partikel vor allem mit Partikeln aus physikalischen und chemischen Produktionsprozessen im Wettbewerb stehen werden. Neben Herstellungsverfahren zur kommerziellen Partikelproduktion wurden in dieser Recherche auch Verfahren berücksichtigt, die derzeit wie die Biomineralisationsprozesse ausschließlich im Labormaßstab eingesetzt werden.

3.1 Biomineralisation

Als Biomineralisation bezeichnet man die Generierung anorganischer Partikel durch biologische Formprozesse [11]. Die unterschiedlichen Bildungsprinzipien wurden bereits in Kapitel 2 beschrieben. Im ersten Teil dieses Kapitels wird gezeigt, welche Bedeutung der Biomineralisation für Anwendungen in der Verfahrenstechnik zukommt. Im Anschluss daran wird ein Überblick über die vielfältigen Materialienkompositionen und Partikelstrukturen erstellt, welche sich über Biomineralisationsprozesse erzeugen lassen.

3.1.1 Bedeutung der Biomineralisation für die Verfahrenstechnik

Biogene Materialien finden bislang nur vereinzelt Verwendung in industriellen Applikationen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um fossile Kieselschalen, so genanntes „Kieselgur“, welches z. B. als Filterhilfsmittel in der Getränkeindustrie eingesetzt wird. Des Weiteren finden fossile Algenschalen in dem von Alfred Nobel entwickelten Prozess zur Dynamitherstellung Verwendung [75]. Die Partikel werden dabei aus Algensedimenten in der Natur gewonnen.

Ein Einsatz von Biomineralisationsprozessen zur gezielten Synthese anorganischer Partikel für technische Anwendungen ist nicht bekannt. Um das Potenzial biologischer Mineralisationsprozesse für die Verfahrenstechnik darzustellen, werden

daher einige Besonderheiten im Vergleich zu physikalisch-chemischen Syntheseverfahren dargestellt. Zum Stand der Technik zählen hierbei Fällungsreaktionen im Bereich der Nanopartikelsynthese und der Einsatz von Ätztechniken bzw. lithographischen Verfahren zur Herstellung oberflächenstrukturierter Partikel.

In Biomineralisationsprozessen ist eine exakte Kontrolle über das Partikelwachstum und die Gestalt der biogenen Kristalle vorhanden: Organische Moleküle beeinflussen die Mineralisation über die einfachen Kristallisationsvorgänge hinaus. Neben thermodynamischen und kinetischen Faktoren spielen hierbei Wechselwirkungen mit Peptiden und Proteinen eine wichtige Rolle [76]. Die biologische Partikelsynthese findet somit in wässriger Lösung unter Verwendung von Biomakromolekülen statt. Im Gegensatz zu den meisten physikalisch-chemischen Verfahren ist so eine Prozessführung bei Raumtemperatur und unter Normaldruck möglich [9, 77]. Durch den Einsatz biologischer Mineralisationsverfahren können Partikeln mit unterschiedlicher

- Oberflächenstruktur, z. B. Kieselschalen (siehe Kapitel 3.2.1);
- Morphologie, z. B. tetragonale Partikel aus elementarem Silber;
- Funktionalität, z. B. Eisenoxid/Magnetit als intrazellulärer Magnet;
- Qualität, z. B. biogene Nanopartikel aus elementarem Gold;
- Kristallinität und
- Monodispersität [4]

erzeugt werden.

Biogene Materialien weisen dabei teilweise andere Eigenschaften als ihre chemisch synthetisierten Analoga auf [10]. Bezogen auf Cadmiumsulfid-Nanopartikel sind dabei z. B. unterschiedliche Kristallstrukturen zu beobachten (siehe Abbildung 9). Für die meisten der physikalisch-chemischen Produktionsverfahren wird die Bildung einer Zinkblendestruktur beschrieben [63, 78]. Bei biologisch synthetisierten Partikeln tritt hingegen eine Wurtzitstruktur auf [4]. Es bleibt zu untersuchen, welche Unterschiede bezüglich der nanospezifischen Partikeleigenschaften aus einer veränderten Kristallstruktur resultieren.

Des Weiteren besitzen die biogenen Partikel durch ihre Peptidhülle hydrophile Oberflächeneigenschaften und sind biokompatibel. Die Peptidhülle verhindert gleichzeitig eine Agglomeration der Nanopartikel. Partikel aus chemischen

Fällungsreaktionen weisen im Gegensatz dazu meistens hydrophobe Oberflächeneigenschaften auf. Zur Agglomerationsvermeidung ist zudem eine entsprechende Oberflächenbehandlung erforderlich (siehe Kapitel 3.4.1).

Besondere Partikeleigenschaften sind auch bei den biogenen nanostrukturierten Partikeln zu beobachten. Die Bildung anorganischer Partikel mit komplexen dreidimensionalen Oberflächenstrukturen ist in der Natur bei einer Vielzahl von Algenarten zu beobachten (Kapitel 3.1.2). Die Formen und Anordnungen der biogenen Materialien sind hierbei hochfunktionell und speziell an die Bedürfnisse der Algenzelle angepasst [33]. Über physikalisch-chemische Verfahren lassen sich solch komplexe Strukturen meistens nicht erzeugen. Die in diesem Bereich üblichen Techniken ermöglichen die Herstellung dreidimensionaler Strukturen nur bis in den Submikrometerbereich [9]. Eine kostengünstige Massenfertigung von nanostrukturierten, nicht-planaren Partikeln ist derzeit nicht möglich [55].

Biogene Partikel können darüber hinaus bei gleicher Materialzusammensetzung andere physikalische Eigenschaften als chemisch synthetisierte Partikel aufweisen. Dazu zählt z. B. eine höhere Bruchfestigkeit der Partikel [11, 29].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es sich bei der Biomineralisation um ein leistungsstarkes Verfahren zur Herstellung anorganischer Partikel mit besonderen Eigenschaften handelt. Biogene Partikel stellen eine viel versprechende Ergänzung zu den bisher am Markt erhältlichen Partikeln dar. Auf die Materialien- und Formenvielfalt biogener Partikel wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen. Eine entsprechende Übersicht über potenzielle Einsatzgebiete ist in Kapitel 3.2 dargestellt.

3.1.2 Materialien- und Formenvielfalt bei biogenen Partikeln

Aufgrund der Vielfältigkeit der Biomineralisationsprozesse ist durch die Auswahl entsprechender biologischer Systeme bei biogenen Partikeln eine große Materialien- und Formenvielfalt möglich. Je nach Mikroorganismus können dabei z. B. biogene Nanopartikel aus elementarem Silber [79, 80], Gold [32, 81], Quecksilber [81-83] und Schwefel [84-88], den Metallsalzen Silbersulfid [13, 79, 89], Cadmiumsulfid [4], Bleisulfid [90], Zinksulfid [4], Nickel- und Eisensulfid [91], Greigit [92], Silberphosphat [4] und Silberchlorid [4] und dem Metalloxid Magnetit [4, 10, 93-95] synthetisiert

werden. Eine kurze Beschreibung ausgewählter biogener Materialien und zugehöriger Mikroorganismen befindet sich in Anhang A.

Die Bildung biogener meso- und nanostrukturierter Partikel kann in der Natur vorwiegend bei schalenbildenden Mikroalgen beobachtet werden. Je nach Algenart ist die Bildung unterschiedlich poröser und komplexer, dreidimensionaler, nicht-planarer Strukturen mit engen Partikelgrößenverteilungen möglich. Dabei bestehen die Partikel in der Regel aus amorphem Siliziumdioxid (Silica) oder aus Calciumcarbonat.

Es gibt eine Vielzahl von Organismen, die komplexe Strukturen aus amorphen Silica bilden [3]. Dabei handelt es sich bei den Mikroalgen vorwiegend um die Gruppe der Diatomeen und Radiolarien. Bei den Diatomeen wurden bislang mehr als 10.000 verschiedene Spezies identifiziert [29]. Neben Silica-Strukturen gibt es in der Natur auch vielfältige Schalenstrukturen aus Calciumcarbonat [31, 45, 48]. Partikel aus Calciumcarbonat werden dabei vorwiegend von Coccolithophoriden und Foraminiferen gebildet. Im Bereich der Coccolithophoriden wurden bislang ca. 200 Arten identifiziert [37].

Eine Auswahl biogener nano- und mesostrukturierter Partikel ist in Abbildung 6 zu sehen. Dabei wurde jeweils eine Spezies aus der Gruppe der Diatomeen, Radiolarien, Coccolithen und Foraminiferen ausgewählt.

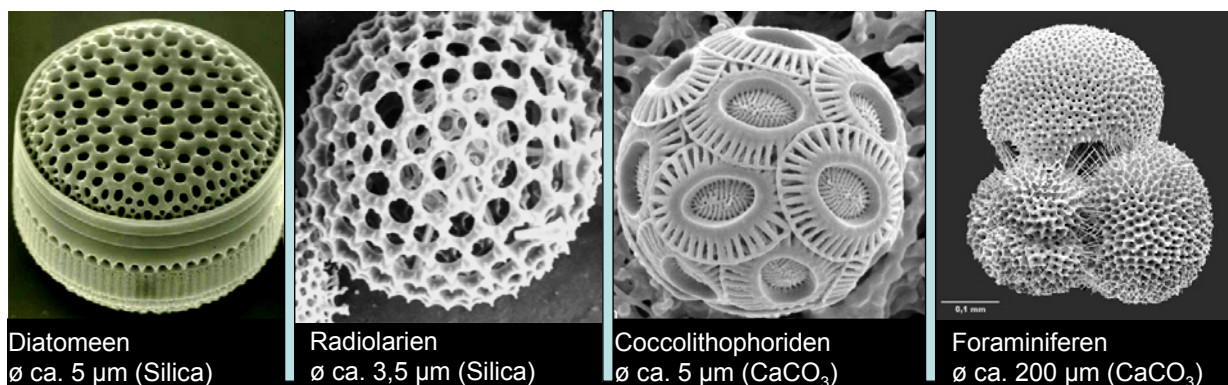


Abbildung 6: Ausgewählte Beispiele zur Formenvielfalt bei biogenen Partikeln [96-98]

Die Bilder geben einen kleinen Einblick in die Partikelformen und -strukturen, die durch biologische Mineralisationsprozesse herstellbar sind. Aufgrund ihrer Materialeigenschaften besitzen dabei vor allem die Partikel von Diatomeen und Radiolarien ein hohes Potenzial für technische Anwendungen [29]. Die meisten der

dreidimensionalen Strukturen biogener Partikeln sind aufgrund ihrer Komplexität durch den Einsatz physikalischer oder chemischer Verfahren zum derzeitigen Stand der Technik nicht herstellbar (Kapitel 3.4.2). Dazu zählen z. B. Strukturen wie die perforierte Hohlkugel, die von Radiolarien gebildet werden (Abbildung 6 B).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Schalen von Diatomeen und Coccolithophoriden als Referenzmaterialien untersucht.

3.2 Der Nano(bio)technologie-Markt

Der Nanotechnologie-Markt hat in den letzten Jahren ein sehr starkes Wachstum erfahren. Dies gilt sowohl hinsichtlich der Produktvielfalt wie auch für die erzielten Umsätze in diesem Marktsegment. Der weltweite Nanotechnologie-Umsatz lag 2001 bei ca. 53 Mrd. Euro [99]. Davon entfielen ca. 23 % auf Nanopartikel und Nanokomposite. Für 2010 wird für diese Produktgruppe ein Anteil von 28 % prognostiziert, bei einem Gesamtumsatz von 220 Mrd. Euro (Abbildung 7).

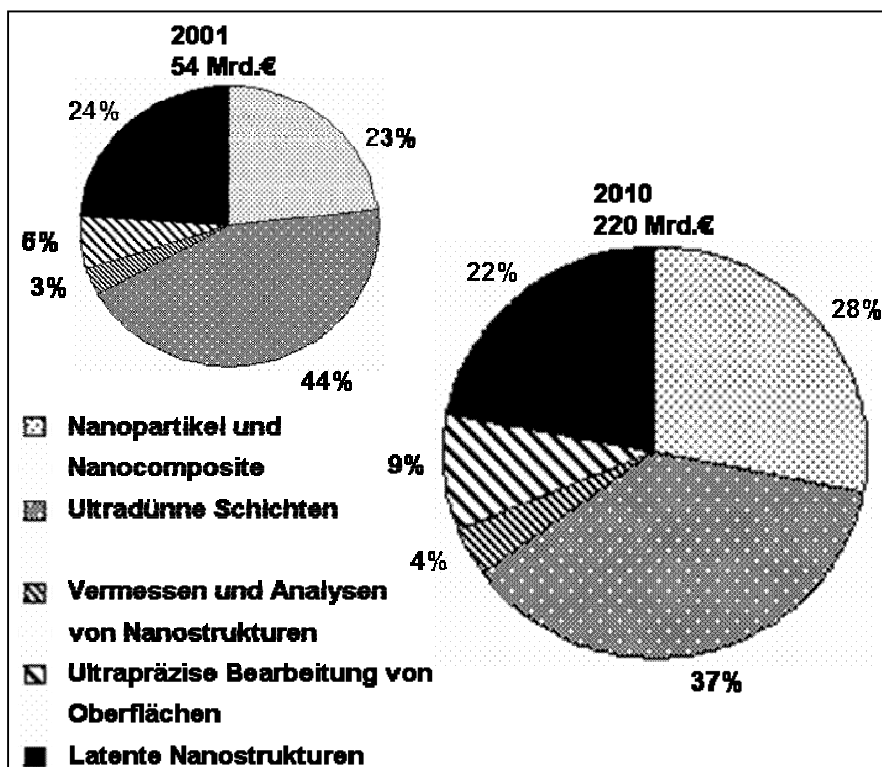


Abbildung 7: Segmente des Nanotechnologie-Marktes; Weltmarktvolumen in Prozent [99].

Der Bereich der Nanopartikel und Nanokomposite wird dabei derzeit im Wesentlichen durch Produkte der chemischen Nanotechnologie dominiert. Dazu zählen z. B. Pigmentpartikel, Katalysatoren und Beschichtungsmaterialien. Der Weltmarkt für

Biomarker lag im Jahr 2000 bei ca. 4 Mrd. US-Dollar [99]. Für das Jahr 2005 wurde der Umsatzanteil für Anwendungen im Bereich Biomedizin und Pharmazie auf ca. 16 % geschätzt. Die Bereiche Energie, Katalyse und strukturelle Anwendungen betragen zusammen ca. 10 % [99].

Bei der regionalen Verteilung von Nanotechnologie-Kompetenzen wird Europa weltweit führend in den Bereichen Pharma, Materialien und Chemie angesehen. Den USA wird die weltweite Führung im Bereich der Nanostrukturierung zugesprochen [99].

Die Nanotechnologie stellt eine der Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts dar. In Kombination mit der Biotechnologie und der Informationstechnik gilt sie als eine der möglichen Basistechnologien des nächsten langjährigen Wachstumszyklus [100]. In den vergangenen Jahren kam es zu entscheidenden Weiterentwicklungen im Bereich der Biotechnologie und zu einem verbesserten Verständnis der biologischen Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene. Diese Fortschritte bilden die Grundlage für einen Transfer der biologischen Synthesemechanismen auf technische Systeme [100]. Die Nutzung entsprechender Verfahren zur Herstellung biogener anorganischer Partikel ist dabei entweder über den direkten Einsatz von Mikroorganismen oder über die Entwicklung biomimetischer Prozesse möglich.

Die Abbildung 8 gibt eine Übersicht über generelle Entwicklungstendenzen der Biotechnologie und stellt einen Bezug zur Nanotechnologie her. Dabei wird eine starke Annäherung der Disziplinen Technische Physik, Biologie und Chemie im Bereich der Nanotechnologie dargestellt. Zukünftig basieren nanotechnologische Entwicklungen vermehrt auf Synergieeffekten durch eine integrierte Nutzung von physikalischen Gesetzen, biologischen Prinzipien und chemischen Eigenschaften (Abbildung 8 A).

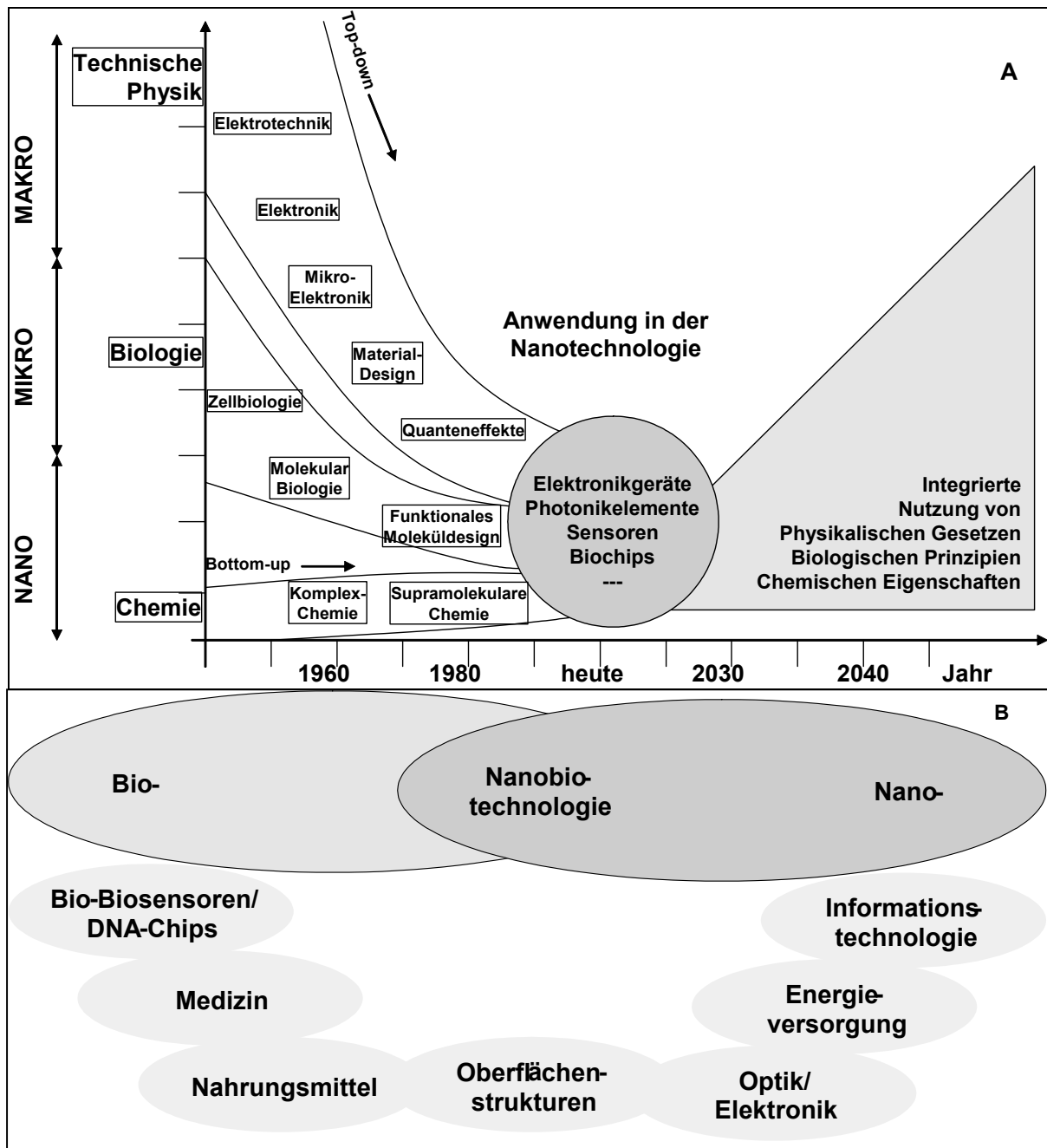


Abbildung 8: (A) Entwicklungstendenzen in der Physik, Biologie und Chemie in Bezug zur Nanotechnologie [100], (B) Zukunftsfeld Nanobiotechnologie [77].

Die Forschungsschwerpunkte im Bereich der Nanobiotechnologie konzentrieren sich u. a. auf die Entwicklung von Syntheseverfahren durch biologische Selbstorganisationsprozesse [77]. Zukünftige Märkte erschließen sich z. B. durch den therapeutischen und diagnostischen Einsatz von Nanopartikeln, sowie der Nutzung der Nanostrukturtechnik als Basis für mikroskopische Instrumente im Bereich der Pharmaforschung und medizinischen Diagnostik (Abbildung 8 B) [100].

Dabei ist eine Entwicklung von ökonomischeren und/oder ökologischeren Verfahren zur Herstellung bereits existierender Produkte nicht ausreichend. Es ist wichtig, dass

die biologischen Syntheseverfahren zusätzlich die Herstellung von Produkten mit neuen Eigenschaften ermöglichen [6]. Dieses Ziel ist nur durch die Ausrichtung wissenschaftlicher Fragestellungen der Nanotechnologie auf anwendungs- und produktbezogene Aspekte realisierbar [65, 101].

3.2.1 Märkte und Applikationen für nanoskalige Partikel

Im Rahmen dieser Arbeit werden Cadmiumsulfid-Nanopartikel untersucht. Diese sind aufgrund des gewählten biologischen Herstellungsverfahrens von einer Peptidschicht umgeben. Die Partikel zeigen daher hydrophile Oberflächeneigenschaften und sind biokompatibel [7]. Zu den potenziellen Anwendungsgebieten organisch beschichteter Nanopartikel zählen die Bereiche Medizin, Diagnostik und die biologische Analytik. Nanopartikel finden Anwendung in spezifischen SONDENSYSTEME für Applikationen im Lifescience-Bereich [70, 102], in Immunoassays basierend auf molekularen Erkennungsmechanismen [70] und als Biomarker zur Analyse intrazellulärer Prozesse verwendet [71, 103]. Als Biomarker werden fluoreszierende Nanokristalle verwendet, deren Oberfläche durch angelagerte Biomoleküle für eine Vielzahl biologischer Applikationen modifiziert worden sind [67, 72]. Im Vergleich zu traditionellen Fluorophoren zeigen diese Nanokomposite ein enges, partikelgrößenabhängiges Emissionsspektrum und sind über einen längeren Zeitraum photochemisch stabil [104]. Durch ihre besonderen Fluoreszenzeigenschaften ermöglichen sie so Langzeituntersuchungen von intra- und extrazellulären Prozessen in biologischen Systemen mit hoher Empfindlichkeit und Selektivität [67, 105, 106]. Für sämtliche Anwendungen kommen dabei bislang ausschließlich chemisch synthetisierte Nanopartikel zum Einsatz.

Im nichtbiologischen Bereich werden Nanomaterialien unter kommerziellen Gesichtspunkten hauptsächlich in der Informationstechnologie und Elektronik eingesetzt. Dazu zählt die Verwendung von ultrafeinem, magnetischen Puder als Ausgangsmaterial für Datenträger [66], als Sensor- und Elektrodenmaterial [61], in optoelektronischen Materialien (z. B. Herstellung von optischen Schaltern und Diodenproduktion) [61, 68, 69, 103, 107, 108], in der Oberflächenbehandlung [99] und in der Beschichtungstechnik [61].

Aufgrund ihrer Halbleitereigenschaften werden Nanopartikel darüber hinaus zur Herstellung von Katalysatoren [61, 66] Solarzellen [61, 63, 107, 109] und

Brennstoffzellen [61, 62] eingesetzt. Nanopulver dienen als Basis für transparente Keramiken, als Ausgangsmaterial zur Erzeugung kratz- und abriebfester Lacke und als nanoskalige Bauelemente in der Mikrosystemtechnik [9].

In Form von Nanokompositen erschließen sich weitere Einsatzgebiete, z. B. zur Verringerung des Gewichtes für Bauteile durch verringerte Wandstärken [99]. Eine kommerzielle Nutzung dieser Nanokomposite wird allerdings nicht berichtet.

3.2.2 Märkte und Applikationen für nanostrukturierte Partikel

Nanostrukturierte Partikel haben eine Vielzahl potenzieller Einsatzgebiete. Das Anwendungsspektrum der Mikrokomponenten reicht vom Einsatz in der Medizin (z. B. als Kapsel für pharmazeutische Produkte) bis zum Einsatz als Miniaturbauteile für mikroelektromechanische Systeme (MEMS) [61].

Für eine kommerzielle Nutzung eines entsprechenden Verfahrens zur Partikelsynthese ist im Wesentlichen die Herstellung von komplexen Oberflächenstrukturen mit reproduzierbarer Qualität unter ökonomischen Gesichtspunkten erforderlich [55]. Die Herstellung strukturierter Keramikpartikel ist durch den Einsatz physikalisch-chemischer, biomimetischer oder biologischer Verfahren möglich. Dabei kommen für technische Anwendungen nahezu ausschließlich physikalisch-chemische Verfahren zum Einsatz.

Biogene keramische Mikropartikel werden vorwiegend unter Nutzung ihrer porösen Struktur für technische Applikationen eingesetzt. Dazu zählt z. B. der Einsatz von Kieselgur als Filterhilfsstoff und als Säulenmaterial in der Chromatographie [55]. Potenzielle Anwendungsbereichen ergeben sich z. B. durch eine Nutzung von Kieselschalen als Trägermaterial für (Bio-)Katalysatoren [8, 43] oder als Filtereinsatz in Mikrofiltrationsanwendungen [55, 110].

Aufgrund ihrer komplexen Oberflächenstruktur erschließen sich allerdings weitere, anspruchsvollere Einsatzbereiche. So können Diatomeenschalen aufgrund ihrer schachtelartigen Struktur zur Mikroverkapselung unterschiedlicher Materialien dienen, z. B. für Medikamente, Additive, Düngemittel und Pigmente [65, 111, 112]. Ein anderer Ansatz basiert auf einer Filtrations- und Kapselungsfunktion durch Diatomeenschalen zum Schutz von transplantiertem Gewebe vor Abstoßungsreaktionen. Gleichzeitig wird aufgrund der porösen Schalenstruktur die Versorgung des Gewebes mit Nährstoff und Sauerstoff gewährleistet [55].

Die Herstellung von Biosensoren zum Einsatz in komplexen Medien wird z. B. durch die Generierung biogener Keramik-Matrix-Verbundmaterialien ermöglicht [8]. Hierbei wird der Filtereffekt der Schalen genutzt: Der immobilisierte Biosensor befindet sich dabei eingekapselt im Schaleninneren [55]. Die Limitierung der Molekülgröße, die mit dem Sensor in Kontakt kommen kann, soll dabei Wechselwirkungen mit Störsubstanzen minimieren.

Bei der Einlagerung biogener Partikel in die Oberfläche eines Werkstückes kann durch Ätzung ein Negativabdruck der Partikelstruktur auf der Materialoberfläche erzeugt werden [55]. Ein weiterer Bereich erschließt sich durch den Einsatz biogener Partikel als Template für die Herstellung von Nanostrukturen. Mesoporöse Silica-Strukturen wurden im Labormaßstab z. B. zur Herstellung von Polyethylen-Nanofasern, Nanopartikeln und Nanodrähten eingesetzt [113, 114].

3.3 Biomimetische Verfahren

Als „biomimetisch“ werden Verfahren bezeichnet, bei denen natürliche Funktionsweisen für technische Problemlösungen imitiert werden. Die Begriffe Bionik und Biomimetik werden dabei häufig als Synonyme verwendet [115]. Biologische Strukturen und Organisationsprinzipien dienen entweder direkt als Vorlage (Analogie-Bionik) oder werden abstrahiert als Inspiration (Abstraktions-Bionik) für technische Problemlösungen genutzt [32, 115].

Im Bereich der oberflächenstrukturierten Materialien zählen dazu z. B. der Klettverschluss, schmutzabweisende Materialien basierend auf dem Lotus-Effekt oder Folien mit Haifischschuppen-Struktur zur Minimierung des Strömungswiderstandes („Riblet“-Effekt) [116]. Eine kommerzielle Nutzung biomimetisch synthetisierter Nanopartikel und nanostrukturierter Mikropartikel ist nicht bekannt. Es gibt allerdings eine Reihe von Forschungsaktivitäten zur Entwicklung von biomimetischen Syntheseverfahren [3, 4, 9, 12, 27, 32, 70, 117-121].

Die molekulare Biomimetik bietet generell drei Ansätze für die Bildung funktionaler Nanostrukturen [9]. Der erste Ansatz basiert auf der spezifischen Bindung synthetischer Einheiten an Materialoberflächen unter Nutzung der molekularen und nanoskaligen Erkennung von Proteinen. Dies umfasst die Bindung von

Nanopartikeln, funktionellen Polymeren oder anderen Nanostrukturen auf der Oberfläche molekularer Templates. Der zweite Ansatz nutzt die Fähigkeit zur Selbstorganisation von biologischen Molekülen in organisierte Nanostrukturen. Dies verspricht aufgrund der Selbstorganisationsprozesse ein stabiles Produktionsverfahren zur Gewinnung komplexer Nanostrukturen. Gegebenenfalls lassen sich unter geeigneten Versuchsbedingungen hierarchische Strukturen auch *in vitro* herstellen. Der dritte Ansatz ist eine DNA-basierte Technologie. Sie kennzeichnet das Maßschneiden einer Proteinmatrix durch genetische Verfahren zur vollständigen Kontrolle über die molekulare Struktur des Proteintemplates. Für eine erfolgreiche Nachahmung der biologischen Syntheseverfahren sind genaue Untersuchungen der (bio)chemischen Prozesse, welche bei den jeweiligen Biomineralisationsprozessen beteiligt sind, notwendig [3].

Zu den biomimetischen Verfahren zählen auch Verfahren unter Nutzung von Kompartimenten mit membranähnlichen Oberflächen [32]. Dabei wird die Partikelgröße durch die Größe des Reaktionsraumes limitiert. Zur Kompartimentierung werden z. B. Mizellen [117], inverse Mizellen [63, 72], Mikroemulsionen [122] oder Dendrimere [122-124] verwendet. In weiteren Herstellungsverfahren werden Polymermatrizen oder Schäume verwendet [8]. Nanokristalle vieler Materialien lassen sich in Form kolloidaler Lösungen oder eingebettet in poröse Matrizen herstellen. Die Partikel sind so gegen Agglomeration geschützt [63]. Je nach Definition können diese Syntheseverfahren auch zu den physikalisch-chemischen Herstellungsverfahren gezählt werden.

Weitere Synthesen unter Nutzung limitierender Kompartimente sind Präparationen in Vesikeln, Tonmineralien, porösen Titandioxid-Schichten oder Langmuir-Blodgett-Filmen [11, 63, 117]. Präparationsverfahren auf elektrisch leitenden Gläsern führen zur Bildung von agglomerierten Quantenpunkten. Zeolithsysteme werden z. B. zur Herstellung von kolloidalen Cadmiumsulfid- und Cadmiumselenid-Clustern verwendet [63, 73].

Das Prinzip der limitierenden Reaktionsräume scheitert häufig daran, dass die einzelnen Reaktionsschritte bei der Keimbildung, beim Wachstum und der Stabilisierung der Partikel unzureichend bekannt sind und daher nicht ausreichend kontrolliert werden können. Minimale Variationen der Präparationsbedingungen

führen aufgrund der Komplexität der Reaktionsschritte häufig zu sehr unterschiedlichen Versuchsergebnissen [63].

Viel versprechende Resultate werden für Versuche mit so genannten Dendrimeren⁶ berichtet [117, 123, 124]. Ausgangsmaterial der Synthese sind nanoporöse Komplexe, an deren innere Oberfläche z. B. Kupfer-, Platin- oder Goldionen angelagert sind [123, 124]. Eine nachfolgende Reduktion der Metallionen führt zu Bildung eingekapselter Nanopartikel mit Durchmessern von 1 - 3 nm [125]. Die Nanokristalle sind aufgrund ihrer Größe im Komplexinneren gefangen. Die positiv geladene Dendrimeraußenseite verhindert dabei eine Agglomeration der Komplexe. Durch Einbringen von zwei unterschiedlichen Metallionen ist die Herstellung von Nanopartikel-Legierungen möglich. Stufenweises Einbringen und Fällern der unterschiedlichen Metallionen ermöglicht zudem die Herstellung von beschichteten Nanokristallen, z. B. palladiumbeschichtete Platinpartikel (Pd/Pt), palladiumbeschichtete Goldpartikel (Pd/Au) und goldbeschichtete Silberpartikel (Au/Ag).

In weiteren biomimetischen Verfahren erfolgt eine *in vitro* Synthese von Nanopartikeln unter Einsatz von organischen Matrizen [9]. Biologische Makromoleküle zeigen einen großen Einfluss auf das Wachstum nanoskaliger Materialien und ermöglichen die Synthese unter Umgebungsbedingungen [71]. Zur gezielte Herstellung von Mikrostrukturen können z. B. die Helix- und Faltblattstrukturen biologischer Materialien genutzt werden [118, 121]. Des Weiteren kommen Proteinkäfige aus globulären Proteinen [12] und viroide Kapseln des TMV-Virus zur Herstellung von Kohlenstoff-Nanotubes [118] zum Einsatz. Darüber hinaus werden DNA [70, 121], das Protein Rinderserum-Albumin (BSA) [12, 126], Glutathione [4], bakterielle S-Layer [32], diatomeenspezifische Peptide [127], multizelluläre Superstrukturen [128], Biolipid-Zylinder [128] und schwefelhaltige Aminosäuren [4, 32] als organische Matrizen verwendet. Aus Mikroorganismen isolierte Phytochelatin- und Glutathionmoleküle wurden im Labormaßstab ebenfalls für die *in vitro* Synthese von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln eingesetzt [27]. Aus Organismen isoliertes Silicatein ermöglicht in kleinen Reaktionsvolumina die *in vitro*-Herstellung von Silica-Strukturen [129-131].

⁶ Dendrimere sind strukturierte Polymere. Sie dienen zugleich als Stabilisator und Template für anorganische Nanocluster in Lösung. Die Dendrimere haben abhängig von ihrer Generationszahl typischerweise einen Durchmesser von 5 - 10 nm.

Vereinzelt werden Proteinstrukturen für biomimetische Syntheseverfahren auch künstlich hergestellt. Beispiel hierfür ist der Einsatz synthetisch hergestellter Phytochelatine für die *in vitro* Synthese von Cadmiumsulfid-Nanokristallen [27]. Ebenfalls im Labormaßstab getestet wurden synthetische Cystein/Lysin-Block-Copolymerpeptide zur Nachahmung der Eigenschaften von natürlichem Silicatein. Dabei entstehen transparente, mesoporöse Silica-Kugeln, die allerdings einen Durchmesser von ca. 100 µm aufweisen [132].

Ein weiterführender Ansatz ist eine gentechnische Modifikation von Proteinen zur gezielten Beeinflussung der entstehenden nanoskaligen und nanostrukturierten Partikel. Das Maßschneiden von Proteinen ist derzeit noch nicht möglich, da die zu erwartenden Proteinfaltungen und chemische Oberflächenbindungen nicht verlässlich vorherzusagen sind. Um dieses Problem zu umgehen, entstehen derzeit umfangreiche Bibliotheken mit Informationen über die Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Peptide bzw. Aminosäuren und anorganischen Oberflächen [9]. Die Bibliotheken sollen die Identifikation jener Sequenzen ermöglichen, die eine besonders starke Affinität zu dem gewünschten anorganischen Material zeigen.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Entwicklung von Peptidsequenzen unter Verwendung eines theoretischen molekularen Ansatzes vergleichbar mit der Herstellung pharmazeutischer Wirkstoffe. Darüber hinaus ist eine Isolierung entsprechender Proteine aus Mikroorganismen-Kulturen denkbar [9].

Weitere Ansätze für biomimetische Verfahren basieren auf der Kombination von lithographischen Technologien oder Oberflächen-Mikroskopietechniken⁷ mit den komplexen Funktionen und Erkennungsfähigkeiten biologischer Systeme zur Erzeugung von nanoskaligen Strukturen mit spezifischen Bindungsstellen. Mögliche Anwendungen haben diese Partikel z. B. als vorkodierte Oberflächenbeschichtungen für klinische Screening-Verfahren und zur Aufklärung von Struktur-Funktion-Zusammenhängen [9].

Zur Änderung der chemischen Zusammensetzung von Kieselschalen existieren unterschiedliche Ansätze. Eine Technik basiert auf einem thermischen Umformungsprozess („Bioclastic and Shape-Preserving Inorganic Conversion Process“, BaSIC-Prozess) [133, 134]. Durch dieses Verfahren soll sich eine Änderung der Materialzusammensetzung unter Erhalt der Partikelstruktur realisieren

⁷ Oberflächen-Mikroskopietechniken: Z. B. Rasterkraft- (AFM) oder Rastertunnelmikroskopie (STM)

lassen. Durch eine Reaktion mit Magnesium ist somit z. B. die Erzeugung strukturierter Magnesiumoxid-Partikel möglich [133, 134].

Für Kultivierungen in Gegenwart von Germanium wurde die Generierung von Kieselschalen-Strukturen aus Germaniumoxid beobachtet. Voraussichtlich ist auch die Herstellung anderer Materialzusammensetzungen über die Veränderung der Kultivierungsbedingungen möglich [29, 55].

3.4 Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren

Die Nanopartikelsynthese hat ihren Ursprung in der Kolloidchemie, welche sich seit Jahrzehnten mit der Erzeugung von Partikeln im Nano- und Submikrometermaßstab beschäftigt. Sie gilt als Vorläufer der heutigen Nanotechnologie. Allerdings waren zu Anfang des 20. Jahrhunderts Analysen von Nanostrukturen nahezu unmöglich. Ein Meilenstein der Nanotechnologie stellt die Entwicklung des Rastertunnelmikroskops 1981 dar, welche 1989 mit dem Physik-Nobelpreis ausgezeichnet wurde [100]. Die ersten systematischen Studien an nanoskaligen Halbleiterkristallen aus gesteuerten Synthesen wurden 1985 von Ekimov und Éfros durchgeführt [72].

3.4.1 Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren zur Herstellung nanoskaliger Cadmiumsulfid-Partikel

Die Synthese nanoskaliger Partikel kann generell in der Gasphase oder in der Flüssigphase erfolgen [65, 135, 136]. Des Weiteren werden die Syntheseverfahren in Bottom-up und Top-down Strategien unterteilt. Im Bottom-up Ansatz erfolgt die Partikelsynthese ausgehend von atomaren oder molekularen Substraten. Diese Strategie ermöglicht eine gute Kontrolle über die Produkteigenschaften. Top-down Strategien basieren hingegen auf einer Partikelproduktion aus Volumenmaterial durch Zerkleinerungsverfahren. Die Feinstzerkleinerung von Materialien führt im Vergleich zu Bottom-up Ansätzen zu qualitativ nicht so hochwertigen Produkten [66, 137, 138].

Im Rahmen dieser Arbeit werden ausschließlich Bottom-up Ansätze in der Flüssigphasensynthese als Konkurrenzverfahren zur Biomineralisation betrachtet.

Viele Syntheseverfahren basieren auf Fällungsreaktionen in wässrigen oder unpolaren Lösungsmitteln. Metallsulfide, -selenide und -telluride (z. B. CdTe, ZnS,

PbSe) werden meist durch Fällungsreaktionen in einer metallionenhaltigen Lösung mit H_2S , H_2Se bzw. H_2Te oder deren Alkalimetallsalzen hergestellt. Durch Zusatz von Stabilisatoren entstehen kolloidale Lösungen. Als Stabilisatoren werden z. B. Tenside oder Polymere verwendet. In weiteren Verfahren kommen Thiole oder Natriumpolyphosphat als Stabilisator zum Einsatz [63].

Aus der Kolloidchemie entwickelte sich mit dem Sol-Gel-Prozess ein gut untersuchtes und kommerziell genutztes Herstellungsverfahren für nanoskalige Metalloxide und Halbleitermaterialien [61, 108, 139]. Nachteilig für die Nanopartikelsynthese ist die zunächst amorphe Struktur der synthetisierten Metalloxide, die eine thermische Nachbehandlung zur Erzeugung eines kristallinen Materials erfordert. Dabei besteht das Risiko, dass sich durch die Erhitzung die Partikelform ändert oder ein unkontrolliertes Kristallwachstum auftritt. Ein weiterer Nachteil ist die hohe Reaktivität der Metalloxide gegenüber Wasser, wodurch der Hydrolyseschritt schwer kontrollierbar ist. Weiterentwickelte Sol-Gel-Prozesse basieren dabei auf Syntheseverfahren für Metalloxide, die z. B. durch Verwendung von Metallchloriden und Alkoholen in nicht-wässrigen Medien stattfinden.

Die „hot soap“ Synthese [67, 70, 140] beschreibt eine Fällungssynthese in unpolaren Lösungsmitteln zur Herstellung von oberflächenbeschichteten hydrophoben Nanokristallen im „Gramm“-Maßstab. Sie basiert auf einer Hochtemperaturreaktion im Lösungsmittel Tri-*n*-octylphosphinoxid (TOPO) unter inerter Atmosphäre [141]. Je nach Prozessführung lassen sich dabei zum Teil enge Partikelgrößenverteilungen erzielen [104].

Die „Benzylalkohol-Route“ beschreibt ein weiteres Verfahren zur Nanopartikelsynthese durch Fällung von Metallionen in einem unpolarem Lösungsmittel. Es ermöglicht die Herstellung unterschiedlicher Metalloxid-Nanopartikel ohne Zugabe von Additiven. Dies führt zu einer hohen Reinheit der synthetisierten Nanopartikel. Eine weitere Methode zur Synthese von Nanokristallen in organischen Lösungsmitteln basiert auf einem diffusionslimitierten Partikelwachstum [72].

Allen Syntheseverfahren in unpolaren Medien ist gemein, dass die gewonnenen Nanopartikel wasserunlöslich und damit inkompatibel mit biologischen Systemen sind. Zur Erzeugung hydrophiler Oberflächeneigenschaften wurden daher

unterschiedliche Strategien entwickelt. Entsprechende Referenzen werden im Verlauf dieses Kapitels angegeben.

Alternativ besteht die Möglichkeit zur Partikelsynthese in wässrigen Lösungen. Diese Verfahren führen zur Gewinnung von Nanokristallen mit hydrophilen Oberflächeneigenschaften. Allerdings sind die Partikelgrößenverteilung in diesen Fällungsreaktionen im Allgemeinen breiter und die Fluoreszenz-Quantenausbeute geringer als bei Synthesen in unpolaren Lösungsmitteln [70, 106]. Zu den Syntheseverfahren in wässrigen Lösungen zählt z. B. die Polyphosphat-Präparation zur Synthese von Cadmiumsulfid [63]. Bei der Synthese von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln wird abhängig von den kinetischen Faktoren die Bildung von Wurtzit- oder Zinkblende-Strukturen beobachtet (Abbildung 9) [78]. Unter geeigneten Versuchsparametern ist dabei eine Steigerung der Fluoreszenz-Quantenausbeute möglich. Allerdings weisen die synthetisierten Nanopartikel eine breite Partikelgrößenverteilung auf [73].

Für modifizierte Fällungsmethoden wird die Bildung vergleichsweise monodisperser Cadmiumsulfid-Partikel beschrieben, welche auch bei Raumtemperatur relativ hohe Fluoreszenz-Quantenausbeuten besitzen [73].

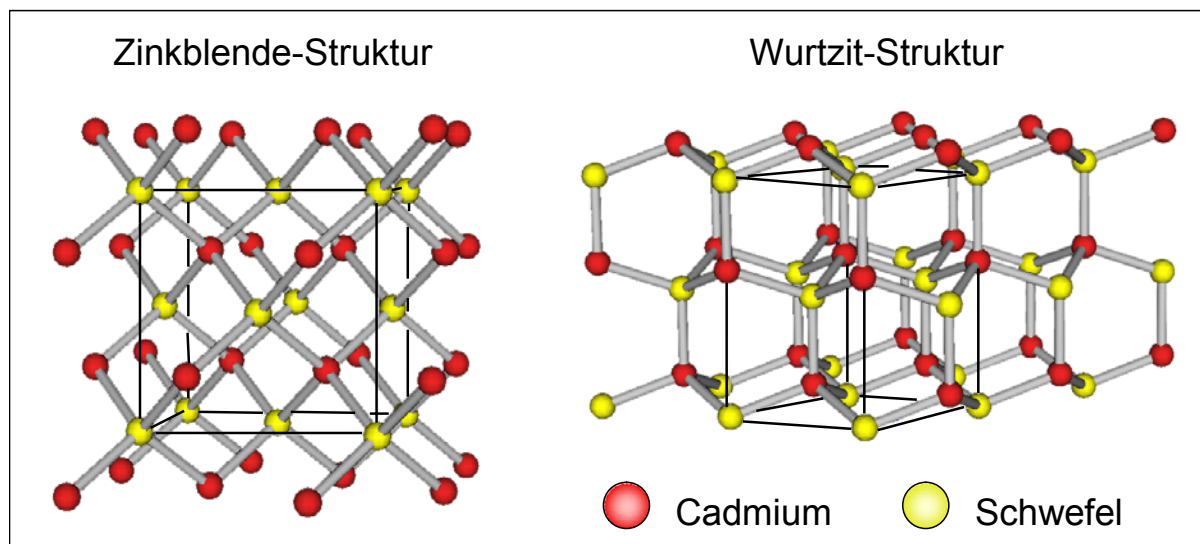


Abbildung 9: Schema der Kristallstrukturen bei Cadmiumsulfid [142].

Weitere chemische Verfahren zur Nanopartikel-Synthese basieren z. B. auf einer Kombination von Flüssigphasen- bzw. Vakuumabscheidung und nachfolgendem Wachstumsprozess. Die Produkteigenschaften sind dabei überwiegend von den thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Synthesystems bestimmt

[9]. Durch die Flüssigphasenabscheidung können z. B. kristalline Dünnschichten im Submikrometer-Bereich aus Cadmiumsulfid (\varnothing 5 nm \pm 15 %) hergestellt werden [143]. Ein anderes Verfahren zur Herstellung von Cadmiumsulfid-Kristallen basiert auf der Abscheidung einer cadmiumionen-haltigen Schwefellösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) [63].

Die Gewinnung von Cadmiumsulfid-Kristallen ist auch unter Anwendung von so genannten Vakuumtechniken (z. B. Molekularstrahlepitaxie) möglich [9, 78, 144]. Andere Ansätze kombinieren Schmelz- und Erstarrungsprozesse gefolgt von thermomechanischen Behandlungen zur Beeinflussung von Partikelgröße und Partikeleigenschaften [9].

Die Übersicht zeigt, dass eine Reihe physikalisch-chemischer Herstellungsverfahren zur Produktion von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln existieren. In der Literatur sind weitere Beispiele zu den verschiedenen Produktionsverfahren zu finden [61, 63, 67, 70-72, 102, 104, 106, 108, 121, 145-147]. Den Verfahren ist gemein, dass bei nahezu allen bekannten physikalisch-chemischen Syntheseverfahren Cadmiumsulfid-Kristalle mit Zinkblendestruktur entstehen (Abbildung 9). Makrokristallines Cadmiumsulfid und biogene Cadmiumsulfid-Nanopartikel liegen im Gegensatz dazu fast ausschließlich in der Wurtzitstruktur vor [63]. Die Ursache hierfür ist bislang nicht bekannt.

Zusätzlich zu den verschiedenen Synthesemethoden existiert eine Vielzahl von Beschichtungsmethoden zur gezielten Modifikation der Eigenschaften von Partikeloberflächen. Dabei sind vor allem zur Erzeugung hydrophiler Oberflächeneigenschaften diverse Verfahren entwickelt worden [63, 70, 104-106, 108, 148]. Des Weiteren dienen die Beschichtungen zur Vermeidung einer Agglomeration der Nanopartikel.

3.4.2 Physikalisch-chemische Konkurrenzverfahren zur Herstellung nanostrukturierter Partikel

Zur Erzeugung komplexer keramischer Oberflächenstrukturen werden verschiedene physikalisch-chemische Verfahren eingesetzt. Dabei gehören vorwiegend Ätztechniken und lithographische Verfahren zum Stand der Technik [55]. Diese Verfahren sind kostenintensiv und nur bedingt upscale-fähig. Zur Erzeugung komplexer, nicht-planarer Geometrien sind sie nur eingeschränkt geeignet [9]. Eine

kostengünstige Massenfertigung von dreidimensionalen Mikrokomponenten ist derzeit nicht möglich [55]. Der folgende Abschnitt gibt eine Übersicht über physikalisch-chemische Verfahren, die eine Herstellung nanostrukturierter Partikel ermöglichen.

Am weitesten verbreitet sind lithographische Verfahren [101, 149, 150]. Weitere Verfahren basieren auf dreidimensionalen Stempelkonzepten [101, 150], trägergestützten Kristallisationsreaktionen [151] und Laserbohrverfahren zur Erzeugung großflächiger Edelstahl-Mikrosiebe (Poren $> 10 \mu\text{m}$) [110]. Mikrobearbeitende Prozesse ermöglichen das Kombinieren und Verbinden verschiedener meso- und nanoskaliger Materialien durch robotische Anordnung oder mittels Selbstorganisation über funktionalisierte Oberflächen. Dabei sind dreidimensionale Strukturen bis in den Submikrometerbereich möglich [63, 77, 150, 152].

Die Stöber-Methode beschreibt ein Verfahren zur Herstellung halbleiterdotierter Siliziumdioxid-Partikeln mit Durchmessern im Submikrometerbereich. Diese Komposite können z. B. als Bausteine für 3-dimensionale Strukturen genutzt werden [106, 108]. Faserige Strukturen aus Kieselsäure lassen sich z. B. über einen Sol-Gel-Prozess in wässrigen Lösungen synthetisieren. Unter speziellen Synthesebedingungen kann die Partikelmorphologie in eine kugelförmige Gestalt übergehen. Die Generierung von Partikeln mit morphologischen Ähnlichkeiten zu den komplexen Strukturen von Diatomeenschalen ist jedoch nicht möglich [11]. Abschließend ist zur Herstellung strukturierter Partikel die Zeolithsynthese zu nennen. Chemisch synthetisierte Zeolithkristalle zeichnen sich aufgrund ihrer Hohlraumstruktur durch ihre hohe innere Oberfläche aus [153-157]. Kontrollierte Oberflächenstrukturen sind bei diesem Verfahren allerdings nicht generierbar.

Trotz aller Forschungs- und Technologiefortschritte in der Nanotechnologie bleibt die gesteuerte Synthese komplexer zwei- und dreidimensionaler Nanostrukturen unter Einsatz physikalisch-chemischer Verfahren jedoch weitgehend unerreicht [9].

4 Material und Methoden

4.1 Auswahl der Mikroorganismen

4.1.1 *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Mikroorganismen *Schizosaccharomyces pombe* (DSM 70576, ATCC 24969, ATCC 24843) und *Candida glabrata* (ATCC 2001) zur Gewinnung biogener Cadmiumsulfid-Nanopartikel eingesetzt. Die Organismen wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) [158] bzw. der American Tissue and Cell Culture (ATCC) [159] bezogen. Beide Hefestämme besitzen die Fähigkeit zur Bildung peptidbeschichteter Cadmiumsulfid-Nanopartikeln [27].

Die Hefe *S. pombe* wurde von Lindner im 19. Jahrhundert aus einem ostafrikanischen Hirsebier, dem so genannt „Pombe“, isoliert [160]. Es handelt sich bei *S. pombe* um eine so genannte Spaltheefe, d. h., sie vermehrt sich durch Zellspaltung statt durch Zellsporeung [161]. Diese Eigenschaft ist auch auf lichtmikroskopischen Bildern deutlich erkennbar. Der genetische Code der Hefe ist vollständig entschlüsselt [162]. Dies birgt Potenzial für gentechnische Modifikationen des Organismus zur Beeinflussung der Nanopartikelsynthese.

Candida glabrata ist auch unter dem Synonym *Torulopsis glabrata* bekannt. Aufgrund der asexuellen Vermehrung gehören sie zu der Gruppe der *Fungi imperfecti*. *C. glabrata* ist weit verbreitet. Der potenziell pathogene Organismus kommt unter anderem im Nasen-, Rachen- und Urogenitaltrakt des Menschen vor [163]. Die Zellen der Hefe *C. glabrata* weisen eine runde bis ovale Form auf. Die Vermehrung erfolgt durch Sprossung [161].

4.1.2 *Emiliana huxleyi* (Ehux)

Zur Gewinnung nanostrukturierter anorganischer Partikel wurde die Mikroalge⁸ *Emiliana huxleyi* Stamm CCAP 920/5 verwendet. Der 1992 an der Universität von Bergen isolierte *Ehux*-Stamm wurde von der „Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP)“, Großbritannien, bezogen [158].

⁸ Mikroalge: Ein- und mehrzellige Algen mit Zelldurchmesser im Mikrometerbereich.

Die Mikroalge ist weltweit verbreitet und tritt alljährlich in großen Algenblüten auf [38]. Sie gilt als weltweit größter Produzent von biogenem Calciumcarbonat. Aufgrund ihrer großen natürlichen Verbreitung und der von ihr gebildeten Schalenstrukturen ist sie als Organismus zur Gewinnung biogener nanostrukturierter Partikel ausgewählt worden.

4.1.3 Kommerzielle Referenzsubstanzen und -organismen

Als Referenzsubstanz für die biogenen Nanopartikel wurden chemisch synthetisierte Nanopartikel der Quantum Dot Corporation, USA verwendet [164]. Die Partikel (Qdot 565 Streptavidin Conjugate®) bestehen aus einem Halbleiterkern aus kristallinem Cadmiumselenid. Der Kern ist umgeben von einer nanometerdicken Schicht aus kristallinem Zinksulfid und einer äußeren Polymerschicht, an die biologische Makromoleküle angelagert sind. Die Komplexe haben einen Durchmesser von maximal ca. 10 nm [164].

Als fossiles Referenzmaterial für biogene nanostrukturierte Partikel wurden Kieselgur-Proben verwendet (BECOGUR, Firma Begerow [165]; Kieselgur 107910, Firma Merck [166]).

Als nicht-fossile Referenzmaterialien wurden die frisch kultivierten Kieselalgen *Cyclotella cryptica* und *Thalassiosira weissflogii* verwendet. Bei beiden Mikroalgen handelt es sich um Diatomeenarten (siehe Kapitel 2.1.2). Die Spezifikationen des Probenmaterials von *Cyclotella cryptica* sind in der Veröffentlichung von Csögör, 1999 [54] zu finden. Die Proben der Mikroalge *Thalassiosira weissflogii* (TW 1800) wurden über die Firma Reed Mariculture, USA bezogen [167]. Diese werden häufig als Futtermittel für Garnelen und andere Schalentiere eingesetzt. Die Proben enthalten Diatomeen mit Durchmessern von 5 - 16 µm, wobei die Schalendurchmesser saisonal entsprechend der Größe der Algenzellen variieren⁹. Laut Hersteller handelt es sich bei den Proben um ein Zellkonzentrat mit 320 Mio. – 4,6 Mrd. Zellen pro Liter. Dies soll einem Volumen von 1800 Liter unkonzentrierter Algensuspension direkt nach der Kultivierung entsprechen.

⁹ Die Kultivierung findet in Gewächshäusern in großen Tanks statt. Die Größe der Algenzellen hängt von den saisonalen Temperatur- und Lichtbedingungen während der Kultivierung ab.

4.2 Kultivierung

4.2.1 Heterotrophe Kultivierung der Hefen *S. pombe* und *C. glabrata*

Zur Kultivierung wurden unterschiedliche Kultivierungsmedien eingesetzt. Die Stammhaltung erfolgte in Petrischalen auf Malzextrakt-Agar. Die Medienzusammensetzung ist in Anhang B beschrieben. Die Inokkulation erfolgte mittels einer Animpf-Öse von einer älteren Hefekultur. Die Agarplatten wurden 2 – 3 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend bis zu 2 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Kultivierung in Flüssigmedien wurden unterschiedliche Medien mit Glucose als Kohlenstoffquelle eingesetzt. Als synthetisches Medium wurde das Edinburgh Minimalmedium (EMM *S. pombe* Expressionsmedium, Q 800-01, Firma Invitrogen) verwendet. Zusätzlich kamen die Komplexmedien 186D und YM zum Einsatz [168]. Die Zusammensetzung der Komplexmedien ist in Anhang B zu finden. Um einer Schwefellimitierung bei der Partikelbildung vorzubeugen, wurden den Kultivierungsmedien 10 mM Ammoniumsulfat zugesetzt. Die Induzierung der Nanopartikelbildung erfolgte durch die Zugabe von Cadmium in Form von Cadmiumnitrat. Dazu stand eine 1 M Cadmiumnitrat-Stammlösung zur Verfügung.

Die Schüttelkolbenkultivierungen beider Hefestämme wurden in 100 mL- bis 2 L-Schüttelkolben durchgeführt. Dazu wurden die Kolben zu jeweils ca. 30 % des maximalen Füllvolumens mit dem jeweiligen Flüssigmedium befüllt und 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Zur Kultivierung in Flüssigmedien kam bei *S. pombe* vorwiegend das Medium 186D zum Einsatz. *C. glabrata* wurde in Medium YM kultiviert. Anschließend erfolgte die Glucosezugabe zum Medium. Zum Überimpfen wurde der jeweilige Hefestamm mittels einer Animpf-Öse von einer Agarplatte in das Flüssigmedium transferiert. Die angeimpften Kolben wurden bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler bei einer Schüttelfrequenz von ca. 100 min⁻¹ inkubiert. Falls erforderlich erfolgten nach dem Animpfen weitere Glucosezugaben. Die Probenahme wurde steril unter einer Cleanbench durchgeführt.

Die Reaktorkultivierungen wurden in einem Rührkesselreaktor (KLF 2000, Firma Bioengineering) mit 4 Liter Volumen durchgeführt. Die Peripherie des Reaktors bestand aus Vorratsflaschen mit jeweils 4 M Salzsäure bzw. 4 M Natronlauge zur pH-

Regelung und bei Fedbatch-Kultivierungen zusätzlich aus einer Vorratsflasche mit Kultivierungsmedium. Für die Probenahme standen eine sterile Probenahme-Einheit und sterile Probengefäße zur Verfügung. Allen Medien wurde 1 mL Antischaummittel zugesetzt. Dabei handelt es sich um eine ölige Substanz, welche durch Erhöhung der Oberflächenspannung die Schaumbildung im Reaktor minimiert.

Vor Kultivierungsbeginn wurde der mit Medium gefüllte Reaktor 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Die Glucose wurde zur Vermeidung der Maillard-Reaktion¹⁰ separat autoklaviert und dem Medium vor Kultivierungsbeginn zugegeben. Im Kultivierungsverlauf wurden Temperatur und pH-Wert konstant auf 30 °C und pH= 5,8 geregelt. Dies entspricht den optimalen Wachstumsbedingungen der Hefen. Die Drehzahl des Sechsstab-Scheibenrührers wurde konstant bei 600 U·min⁻¹ gehalten. Für die aeroben Kultivierungsbedingungen wurde Luft mit einer konstanten Begasungsrate von 2 L·min⁻¹ in den Reaktor eingeleitet. Dabei kam ein Durchflussregler (Firma MKS Instruments) mit einer maximalen Flussrate von 5 L·min⁻¹ zum Einsatz.

Die Glucosezugabe erfolgte je nach Kultivierung manuell im Batch-Modus oder kontinuierlich über eine so genannte Feedback-Fedbatchregelung [169, 170]. „Feedback“ bedeutet, dass der Einfluss der Substratzugabe auf einen bestimmten Online-Messwert beobachtet und die Zugabe entsprechend geregelt wird. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen wurde der Respirationsquotient auf RQ= 1 geregelt, um einer Ethanolbildung aufgrund des Crabtree-Effektes¹¹ entgegenzuwirken.

Ein in der Arbeitsgruppe entwickeltes softwarebasiertes Prozessleitsystem (PLS) wurde für die Datenerfassung und Regelung der verschiedenen Kultivierungsparameter verwendet (LabView, Firma National Instruments).

Die Datenübertragung der Messsignale an den Prozessrechner von den Messverstärkern erfolgte über die digitalen und analogen Schnittstellen einer MikroNet-Einheit¹². Die Prozess-Waagen wurden über die seriellen Schnittstellen mit dem Prozessrechner verbunden. Über das PLS wurden die Parameter Temperatur und pH-Wert online erfasst und geregelt. Ebenso wurden der Gelöstsauerstoffanteil

¹⁰ Maillard-Reaktion: Reaktion reduzierender Zucker mit Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen, begleitet von einer Braunfärbung des Mediums

¹¹ Crabtree-Effekt: Ethanolbildung unter aeroben Bedingungen bei Überschreitung einer kritischen Substratkonzentration, meist Glucose; kritische Substratkonzentration ist eine stammspezifischer Parameter.

¹² MikroNet: Netzwerkgeeignetes Bauteil mit analogen, digitalen und seriellen Schnittstellen zur Datenübertragung (Universität Karlsruhe, Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik)

im Medium (pO_2), die Rührerdrehzahl und die Kohlendioxid- und Sauerstoffkonzentrationen in der Abluft erfasst. Die mittels des PLS nicht erfassbaren Parameter wie z. B. das Probenvolumen wurden manuell durch den Benutzer eingegeben. Die graphische Darstellung der Prozessparameter während der laufenden Kultivierung ermöglichte eine zeitnahe Verfolgung des Kultivierungsverlaufes und ggf. eine frühzeitige Reaktion des Benutzers auf den Kultivierungsverlauf.

Die Kultivierungsverläufe wurden durch Offline-Bestimmungen ergänzt. Die Proben wurden nach der Entnahme gekühlt gelagert, um die Stoffwechselaktivitäten zu stoppen und so eine Veränderung der Proben zu verhindern. Bei den Proben der Hefekultivierung erfolgte eine Bestimmung der Glucose-, Ethanol- und Cadmiumkonzentration. Dazu wurden jeweils zwei Mikroreaktionsgefäße mit 1,5 mL Zellsuspension gefüllt. Die Abtrennung der Biomasse erfolgte mittels Zentrifugation für 10 Minuten bei $10.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$. Das am Gefäßboden gebildete Zellpellet wurde verworfen und der flüssige Überstand bis zur Untersuchung bei $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.2.2 Photoautotrophe Kultivierung der Alge *Emiliana huxleyi*

Als Kultivierungsmedium wurde ein synthetisch angereichertes Meerwasser-Medium mit einer Leitfähigkeit von 52 mS und pH 8,0 verwendet [171]. Dazu wurde Ostseewasser mit Nährsalzen angereichert. Die Medienzusammensetzung ist in Anhang B aufgeführt.

Die Stammhaltung erfolgte in 500 mL Erlenmeyerkolben. Die mit je 250 mL gefüllten Kolben wurden 20 Minuten bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ autoklaviert und anschließend bei Raumtemperatur mit 2 mL der Vorkultur überimpft. Die Inkubation der Kolben erfolgt auf einem Horizontalschüttler im Wasserbad bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Schüttelfrequenz von 100 min^{-1} . Zur Beleuchtung wurden zwei Lampen (Typ L8W/32-930, Firma Osram) mit hohem Rotlicht-Anteil und eine Lampe (Typ L8W/41827, Firma Osram) mit hohem Blaulicht-Anteil verwendet. Ein natürlicher Tageszyklus wurde durch einen Beleuchtungszyklus von 16 Stunden hell und 8 Stunden dunkel simuliert.

Die Reaktorkultivierungen wurden in einem Rührkesselreaktor mit 10 L Füllvolumen (Firma GBF, Braunschweig) durchgeführt. Die Peripherie des Reaktors besteht aus Vorratsflaschen mit jeweils 4 M Natronlauge zur pH-Regelung. Für die Probenahme standen eine sterile Probenahmeeinheit und sterile Probengefäße zur Verfügung.

Vor Kultivierungsbeginn wurde der mit Flüssigmedium gefüllte Reaktor mittels eines externen Dampferzeugers 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Im Kultivierungsverlauf wurde die Temperatur konstant auf 25 °C und der pH-Wert auf pH= 8,0 geregelt. Dies entspricht den optimalen Wachstumsbedingungen der Mikroalge. Die Drehzahl des Propellerrührers wurde konstant bei 300 U·min⁻¹ gehalten. Für die Kultivierungsbedingungen wurde ein auf 2 Vol-% Kohlendioxid angereichertes Luftgemisch mit einer konstanten Begasungsrate von 10 L·min⁻¹ in den Reaktor eingeleitet. Das entsprach der maximalen Flussrate des verwendeten Durchflussreglers (Firma MKS Instruments). Zur Beleuchtung wurden zwei Leuchtstofflampen (Typ TLD-58W/25, Firma Philips) im Abstand von 30 cm von der Reaktorwand positioniert. Der Beleuchtungszyklus wurde wie bei den Schüttelkolbenkultivierungen auf 16 Stunden hell und 8 Stunden dunkel eingestellt. Für die Datenerfassung und Regelung verschiedener Kultivierungsparameter wurde ein Prozessleitsystem eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.1). Die Kultivierungsverläufe wurden durch eine Offline-Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration ergänzt.

4.2.3 Analysen zur Untersuchung des Wachstumsverlaufes

Spektrometrische Bestimmung der optischen Dichte

Während der Kultivierung wurde der Verlauf der Biotrockenmassekonzentration indirekt über die Messung der optischen Dichte bestimmt (Spektrometer UV2, Firma Unicam). Die optische Dichte wurde bei 550 nm mit vollentsalztem (VE) Wasser als Referenz gemessen. Bei einer Extinktion zwischen 0,1 und 0,4 besteht bei dem eingesetzten Gerät eine lineare Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Biotrockenmassekonzentration. Bei Überschreitung des Maximalwertes wurde die Probe mit VE-Wasser vor der Messung entsprechend verdünnt.

Gravimetrische Bestimmung der Biotrockenmassekonzentration

Zur Bestimmung des Korrelationsfaktors wurde für einige Proben die Biotrockenmassekonzentration gravimetrisch bestimmt. Dafür wurden Stahl-Zentrifugenröhrchen zunächst 24 Stunden bei 80 °C getrocknet, anschließend im Exsikkator abgekühlt und das Leergewicht der Röhrchen bestimmt. In jedes Röhrchen wurden 20 mL Zellsuspension bekannter optischer Dichte pipettiert und 10 Minuten bei 5.000 U·min⁻¹ zentrifugiert. Der flüssige Probenüberstand wurde

verworfen und das Zellpellet dreimal in je 20 mL VE-Wasser zum Entfernen der Medienrückstände resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Waschüberstand wurde nach jedem Waschschrift vorsichtig abdekantiert, um ein Mitreißen von Biomasse zu vermeiden. Danach wurde die Probe 24 Stunden bei 80 °C getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und anschließend gewogen. Die Berechnung der Biotrockenmassekonzentration erfolgte nach der Formel:

$$\text{BTM} \left[\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{m_{\text{Röhrchen+trockene Biomasse}} - m_{\text{Röhrchen}}}{V_{\text{Zellsuspension}}}$$

Von jeder Probe wurden jeweils drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt.

Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl fand mittels einer so genannten Thoma-Zählkammer bei 1250-facher Vergrößerung unter einem Lichtmikroskop (Firma Leitz Biomed) statt. In die Kammer sind 16 Großquadrate eingraviert, die wiederum in jeweils 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Zwischen Kammerboden und Deckglas befindet sich ein definierter Hohlraum mit einer Höhe von 0,1 mm und einer Fläche von 0,0025 mm².

Das Deckglas wurde fest auf die Thomakammer aufgelegt, so dass die Newtonschen Ringe¹³ sichtbar wurden. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette an den Glasrand pipettiert. Über Kapillarkräfte gelangt die Lösung in den Hohlraumraum und füllt diesen vollständig aus.

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in den Quadraten gezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Die Zellzahl pro Volumen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} \left[\text{mL}^{-1} \right] = \frac{n(\text{Zellen pro Zählkreuz})}{\text{Kammervolumen}[\text{mL}]} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

¹³ Newtonsche Ringe: Interferenzfarben, welche durch Interferenz von Lichtwellen an dünnen transparenten Schichten entstehen.

Berechnung der Wachstumskinetik

Die Wachstumsgeschwindigkeit beschreibt die zeitliche Änderung der Biomassekonzentration im Medium. Für den Bereich des exponentiellen Wachstums wird sie nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$\frac{dm_x}{dt} = \mu \cdot m_x$$

mit m_x : Biomasse, μ : spezifische Wachstumsrate.

4.2.4 Abgasanalytik

Die Messung des Sauerstoff- und Kohlendioxidanteils in der Abluft wurde mit einem Gasanalysator (Multor 610, Firma Maihak) durchgeführt. Zur Kalibrierung des Gerätes wurde ein Referenzgas bestehend aus 18,5 % Sauerstoff und 2,5 % Kohlendioxid verwendet. Die Atmungsaktivität ist durch die volumetrische Sauerstoffaufnahme- und die volumetrische Kohlendioxidproduktionsrate gekennzeichnet:

$$\text{OUR} \approx T_{R,O_2} = \frac{p_E \cdot \dot{V}_E(t)}{R \cdot T_E \cdot V_F(t)} \cdot M(O_2) \cdot \frac{x_{O,E} \cdot (1 - x_{C,A}) - x_{O,A} \cdot (1 - x_{C,E})}{1 - x_{O,A} - x_{C,A}}$$

$$\text{CPR} \approx -T_{R,CO_2} = -\frac{p_E \cdot \dot{V}_E(t)}{R \cdot T_E \cdot V_F(t)} \cdot M(CO_2) \cdot \frac{x_{C,E} \cdot (1 - x_{O,A}) - x_{C,A} \cdot (1 - x_{O,E})}{1 - x_{O,A} - x_{C,A}}$$

mit T_R : Transferrate, p : Druck, V : Volumen, \dot{V} : Volumenstrom, R : Allgemeine molare Gaskonstante, T : Temperatur, M : Molmasse, O_2 : Sauerstoff, CO_2 : Kohlendioxid, x_i : Volumenanteil der Komponente i ; Indices: O: Sauerstoff, C: Kohlenstoff, E: Zuluft, A: Abluft, F: Flüssigphase (Kultivierungsmedium).

Diese Gleichungen gelten unter der Annahme, dass die Gase als ideal angesehen werden können bei den in biologischen Systemen herrschenden Temperaturen und Druckbedingungen. Des Weiteren wurden die folgenden Annahmen getroffen: 1) Es kommt ausschließlich zum Austausch von Sauerstoff und Kohlendioxid zwischen Gasphase und Flüssigphase. Wasser und Ethanol werden am Abluftkühler vollständig kondensiert und können in der Abluft vernachlässigt werden. 2) Die Speicherkapazität der Flüssigphase ist vernachlässigbar. Die Sauerstoffaufnahme- bzw. Kohlendioxidproduktionsrate können den Transferraten dieser Komponenten gleichgesetzt werden.

Berechnung des Respirationsquotienten

Eine Kenngröße für die Stoffwechselaktivität bei Mikroorganismen ist der so genannte Respirationsquotient (RQ). Er wird berechnet aus dem Quotienten der Kohlendioxidproduktionsrate und der Sauerstoffaufnahme.

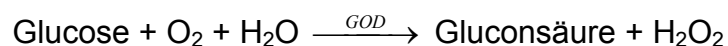
$$RQ = \frac{CPR}{OUR} \cdot \frac{M(O_2)}{M(CO_2)} = \frac{x_A^C \cdot (1 - x_E^O) - x_E^C \cdot (1 - x_A^O)}{x_E^O \cdot (1 - x_A^C) - x_A^O \cdot (1 - x_E^C)}$$

Auf die möglichen Schlussfolgerungen auf die Stoffwechselaktivität basierend auf den aus den experimentellen Daten berechneten RQ-Werten wird in Kapitel 5.2 eingegangen.

4.3 Analytische Verfahren

4.3.1 Bestimmung der Glucosekonzentration

Die Glucosekonzentration wurde photospektrometrisch in einem Absorptionsspektrometer (UV2, Firma Unicam) unter Einsatz eines Glucose-Testkits (Glucose liquicolor, Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH) durchgeführt. Der Nachweis basiert auf der enzymatischen Oxidation der Glucose in Gegenwart von Glucoseoxidase (GOD). Als Indikatorstoff dient Chinonimin, dessen Bildung durch das Enzym Peroxidase (POD) aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und 4-Aminophenazon unter Anwesenheit von Phenol katalysiert wird.



Die Konzentration des Reaktionsproduktes lässt sich über Absorptionsmessungen bei 500 nm bestimmen.

Für die Analyse wurde die Reagenzlösung auf Raumtemperatur erwärmt. Es wurden 1 mL Reagenzlösung in eine Halbmikroküvette pipettiert, 5 µL der Probe zugegeben und die Lösung vorsichtig gemischt. Für den Referenzwert wurden statt der Probe 5 µL VE-Wasser verwendet. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei 500 nm gemessen.

Die Berechnung der Glucosekonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$c(\text{Glucose}) \left[\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{\text{Extinktion (Probe)}}{\text{Extinktion (Standard)}}$$

Um die lineare Korrelation zwischen gemessener Absorption und Glucosekonzentration zu gewährleisten, wurde die Probe ab einer zu erwartenden Konzentration von $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Glucose entsprechend verdünnt.

4.3.2 Bestimmung der Ethanolkonzentration

Der Bestimmung des Ethanolgehalt erfolgte unter Einsatz eines Gaschromatographen (5790 A, Firma Hewlett Packard).

Als Trägergas wurde Helium verwendet. Die Detektion erfolgte mittels eines integrierten Flammenionisationsdetektors (FID). Die Identifizierung der Substanzen erfolgte über die Retentionszeit. Die entsprechende Konzentration wurde mittels eines Integrators (HP 3396A, Firma Hewlett Packard) über die Flächeneinheiten unterhalb des Signalpeaks berechnet. Die Kalibrierung erfolgte mittels einer wässrigen Lösung aus $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Butanol und $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Ethanol.

Die Bestimmung wurde unter Einsatz eines so genannten Standardzusatzverfahrens durchgeführt. Dazu wurden 1 mL Probe $13.000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ für 10 Minuten zentrifugiert und dem flüssigen Probenüberstand eine Standardlösung ($5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ Butanol) im Volumenverhältnis 1:1 zugegeben. Zur Analyse wurde $1 \mu\text{L}$ des Probengemisches in den Chromatographen injiziert.

4.3.3 Bestimmung der Cadmiumkonzentration

Die Cadmiumkonzentration in festen und flüssigen Proben wurde mittels optischer Emissionsspektrometrie in Kombination mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP OES) analysiert. Die Analysen wurden am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie der Universität Karlsruhe durchgeführt. Der lineare Messbereich dieses Gerätes (Vista-Pro, Firma Varian) lag für Cadmium zwischen $0,001$ und $1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Die Probe wurde zerstäubt und die in der Probe enthaltenen Komponenten bei Temperaturen von $5.000 - 7.000 \text{ K}$ ionisiert. Die Atome wurden zur Lichtemission angeregt und das emittierte Licht spektral zerlegt. Dabei dienten die spezifischen Wellenlängen zur Elementidentifizierung und die Strahlungsintensitäten zur Konzentrationsbestimmung. Die Detektion von Cadmium erfolgte bei einer

Wellenlänge von $\lambda(\text{Cd}^{114}) = 214,439 \text{ nm}$. Alternativ können für die Bestimmung Emissionsbanden bei 226,502 nm und 228,802 nm verwendet werden. Zusätzlich war die Bestimmung der Schwefelkonzentration bei $\lambda(\text{S}) = 181,972 \text{ nm}$ möglich. Jeder Messpunkt entspricht dem arithmetischen Mittel aus fünf unabhängigen Messwerten. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Zweipunktkalibrierung durchgeführt.

Probenvorbereitung für flüssige Proben, z. B. Medium

Die zu analysierende Probe wurde zentrifugiert und der flüssige Überstand anschließend mit einer wässrigen Lösung von 1 %-iger Salpetersäure verdünnt.

Probenvorbereitung für feste Proben, z. B. Zellpellet

Das Präparationsverfahren basiert auf einem modifizierten Standardverfahren der EPA (Environmental Protection Agency, USA)¹⁴. Die Probengefäße (50 mL) wurden 24 Stunden bei 80 °C getrocknet und das Trockengewicht der Proberöhrchen bestimmt. Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 3 g Zellpellet eingewogen und 24 Stunden bei 80 °C getrocknet.

Konzentrierte Salpetersäure wurde im Verhältnis 1:1 mit Wasser verdünnt. 10 mL dieser verdünnten Lösung wurden zum Zellpellet gegeben und gemischt. Das Probengefäß wurde abgedeckt und die Probe 10 – 15 Minuten auf $95 \pm 5 \text{ °C}$ erhitzt. Die Probe wurde abgekühlt. Nach der Zugabe von 5 mL konzentrierter Salpetersäure wurden die Probengefäße erneut abgedeckt und 30 Minuten bei $95 \pm 5 \text{ °C}$ erhitzt. Dabei war das Aufsteigen von braunen Dämpfen zu beobachten. Die Säurezugabe wurde mit anschließendem 30-minütigen Erhitzen so oft wiederholt, bis keine braunen Dämpfe mehr zu beobachten waren.

Im nächsten Schritt wurden 2 mL Wasser und 3 mL 30 %-ige Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und die Probe erneut auf $95 \pm 5 \text{ °C}$ erhitzt. Dabei waren Verluste aufgrund der möglichen Schaumbildung zu vermeiden. Die Zugabe von maximal 10 mL H_2O_2 wurde in Schritten von jeweils 1 mL fortgesetzt, bis lediglich eine leichte Schaumbildung zu beobachten war. Die Probe wurde 2 Stunden bei $95 \pm 5 \text{ °C}$ erhitzt und das Probenvolumen dabei auf ca. 5 mL reduziert. Anschließend wurde die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zum Resuspendieren ggf. ausgefallter Komponenten wurden 10 mL konzentrierte Salzsäure zu der Probe gegeben und das Gemisch 10 – 15 Minuten bei $95 \pm 5 \text{ °C}$

¹⁴ EPA standard procedure SOP 405 (Preparation of solid samples for GFAA & ICP-AES analysis)

erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Probevolumen mit Reinstwasser (Maxima Ultra Pure Water, Firma Elga) auf 100 mL verdünnt. Die Probe wurde 10 Minuten bei 2.000 – 3.000 U·min⁻¹ zentrifugiert und der flüssige Überstand anschließend zur Analyse ggf. mit 1 %-iger Salpetersäure verdünnt.

4.4 Aufreinigung

4.4.1 Zellabtrennung und Zellaufschluss bei *S. pombe* und *C. glabrata*

Die Hefesuspension wurde 5 Minuten bei 8.000 U·min⁻¹ zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Zur Entfernung anhaftender Medienbestandteile und Salze wurde das Zellpellet dreimal mit VE-Wasser gewaschen, zentrifugiert und die Waschlösung verworfen. Die Probenlagerung erfolgte bei 4 °C.

Chemischer Zellaufschluss

Beim chemischen Zellaufschluss wurde die Wirkung der organischen Lösungsmittel n-Hexan, Trichlormethan (Chloroform) und 1-Octanol auf Hefezellen untersucht [172]. In weiteren Versuchen kamen Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid in wässriger Lösung zum Einsatz [173].

Die Aufschlüsse mit organischem Lösungsmittel wurden in 15 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5 mL Zellsuspension 15 Minuten bei 5.000 U·min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu jedem Zellpellet wurde 1 mL des jeweiligen organischen Lösungsmittels gegeben. Nach einer Reaktionszeit von 4 Stunden wurden 5 mL VE-Wasser zugegeben. Nach weiteren 20 Stunden wurde das Lösungsmittel im Exsikkator unter Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 1 mL Reinstwasser resuspendiert und 15 Minuten bei 13.000 U·min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde für nachfolgende Analysen bei 4 °C aufbewahrt.

Die Probenvorbereitung für den Natriumhypochlorit/Wasserstoffperoxid-Aufschluss verlief analog zu den Versuchen mit den organischen Lösungsmitteln. Statt einem organischem Lösungsmittel wurden dem Zellpellet unmittelbar nacheinander 1 mL einer wässrigen 2,8 %-igen NaOCl-Lösung und 1 mL einer 30 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung zugegeben. Während der folgenden zweistündigen Reaktionszeit wurde der Aufschluss jeweils nach einer Viertelstunde für 3 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex RK52, Firma Bandelin) bei einer Frequenz von 35 kHz

behandelt. Dabei war während des Aufschlusses eine deutliche Blasenentwicklung zu beobachten.

Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden wurde 1 mL der Suspension in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und 15 Minuten bei $13.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde für weitere Analysen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Thermischer Zellaufschluss

Als thermisches Aufschlussverfahren wurde die Kälteeinwirkung auf die Zellen untersucht [23]. Dazu wurde 1 mL Zellsuspension in Mikroreaktionsgefäßen 15 Minuten bei $13.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ bzw. $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ tiefgefroren. Nach einer Woche wurden die Proben aufgetaut und in jeweils 1 mL Reinstwasser resuspendiert. Die Proben wurden 15 Minuten bei $13.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde für weitere Analysen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Mechanischer Zellaufschluss

Der mechanische Zellaufschluss wurde mittels einer Schwingmühle (MM300, Firma Retsch) und einem Rotor-Stator-System (Ultraturrax T25, IKA-Werke) durchgeführt. Bei der Schwingmühle wurden unterschiedliche Versuchsparmeter getestet. In einer ersten Versuchsreihe wurden sechs Glaskugeln ($\varnothing 5 \text{ mm}$) bzw. 1 g Glaskugeln ($\varnothing 1 \text{ mm}$) zusammen mit 1 mL Zellsuspension in 1,5 mL-Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Zellsuspension bestand dabei aus gewaschenen Zellen, welche in Reinstwasser resuspendiert wurden. Die Proben wurden 20 Minuten bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz aufgeschlossen. Die aufgeschlossene Probe wurde anschließend 15 Minuten bei $13.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde für weitere Analysen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Bei der zweiten Versuchsreihe fand mit einem größeren freien Volumen in den Reaktionsgefäßen statt. In 30 mL große Aufschlussgefäße wurden dazu je 7,5 g Glaskugeln ($\varnothing 0,5 \text{ mm}$), 7,5 mL Reinstwasser und 1,5 g gewaschenes Zellpellet gegeben. Die Proben wurden 20 Minuten bei einer Schüttelfrequenz von 30 Hz aufgeschlossen. Um die thermische Belastung zu minimieren, wurde die Aufschlussdauer in vier identische Intervalle unterteilt und die Proben auf Eis zwischengelagert.

Für den Ultraturrax-Aufschluss wurden 50 mg gewaschenes Zellpellet in 5 mL Reinstwasser resuspendiert und 2 Minuten im Ultraturrax gemixt. Nach Beendigung des Aufschlusses wurde die Probe 5 Minuten bei $10.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Analysen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Enzymatischer Zellaufschluss

Für den Aufschluss wurde das Enzym Zymolase zur Zerstörung der Zellwand eingesetzt. Über den Aufbau der Zellwand ist lediglich bekannt, dass das Stützgerüst der Hefezellwand Zuckerpolymere enthält, welche über β -1,3-Bindungen miteinander vernetzt sind [161]. Das Enzym Zymolase hydrolysiert diese Bindungsstellen und führt so zur Destabilisierung der Zellwand [174]. Die Zellmembran der Hefen bleibt bei dieser Reaktion erhalten.

Für den Zellaufschluss wurden 10 mL Pufferlösung (SCE) mit 1 g Zellpellet gemischt. Dem Probenansatz wurden $2,5 \mu\text{L}$ einer Stammlösung (Dithiothreitol, DTT) je mL Reaktionsvolumen zugegeben. Die Endkonzentration entsprach 5 mM DTT. Anschließend wurden einige Mikroliter einer Zymolase-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 5 mg Zymolase je mL Reaktionsvolumen zugegeben¹⁵. Die Zusammensetzung der Pufferlösung und der Stammlösungen sind in Anhang B beschrieben.

Die Probe wurden gemischt und anschließend 45 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. In 5-Minuten-Intervallen wurden die Proben vorsichtig geschüttelt. Nach dem Aufschluss wurden die Proben 10 Minuten bei $2.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ zentrifugiert, um die Sphäroplasten¹⁶ zu separieren. Der flüssige Überstand wurde verworfen und durch das gleiche Volumen Reinstwasser ersetzt. Das Gemisch wurde heftig geschüttelt. Danach wurde 5 Minuten gewartet, um die Zellen zum Platzen zu bringen. Der Probenansatz wurde anschließend 15 Minuten bei $14.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der flüssige Überstand für weitere Analysen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

4.4.2 Zellabtrennung bei *Emiliana huxleyi*

Zur Zellernte wurde die Algensuspension 3 Minuten bei $3.000 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet fünf Mal mit Leitungswasser

¹⁵ Getestet wurden Zymolasekonzentrationen von $0,1$ - 10 mg/mL und Reaktionszeiten von 10 - 80 min .

¹⁶ Sphäroplasten: Zellen, deren Zellwand unter Erhalt der Zellmembran (nahezu) vollständig entfernt wurde.

gewaschen. VE-Wasser ist für den Waschvorgang ungeeignet, da es aufgrund seines leicht sauren pH-Wertes (pH = 6) zum Auflösen der Calciumcarbonatstrukturen führt. Es ist darauf zu achten, Wasser mit einer hohen Wasserhärte und somit einem hohen Carbonatgehalt zu verwenden. Diese Bedingung wurde von dem verwendeten Karlsruher Leitungswasser erfüllt.

4.4.3 Reinigungsverfahren für nanoskalige Partikel

Chromatographische Verfahren

Als chromatographische Verfahren kamen die Größenausschlusschromatographie und die Ionenaustauschchromatographie zum Einsatz.

Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) (Serie 1100, Firma Hewlett Packard) wurde am Forschungszentrum Umwelt der Universität Karlsruhe durchgeführt.

Die Trennung der Probenbestandteile erfolgt bei der SEC entsprechend des Molekulargewichtes der Komponenten. Das Säulenmaterial besteht dabei aus Polymerpartikeln mit unterschiedlichen Porendurchmessern. Je nach Molekulargewicht diffundieren die Proteine in diese Poren und verbleiben damit unterschiedlich lange auf der Säule. Unter geeigneten Versuchsbedingungen besteht folgende Korrelation zwischen der Retentionszeit t_R und dem Partikelradius R [63]:

$$t_R = k_1 + k_2 \cdot \lg(R)$$

mit k_1 , k_2 : experimentell bestimmbare Konstanten, t_R : Retentionszeit, R : Partikelradius.

Da wenige Informationen über den Partikelradius bei Proteinen verfügbar sind, wurde die Annahme getroffen, dass es sich bei den analysierten Proteinen um sphärische Proteine mit vergleichbarer Dichte handelt. Daraus folgt, dass eine Verdopplung des Molekulargewichts zur Verdopplung des Partikelvolumens führt. Als Partikelradius wurde ein relativer Partikelradius R_{rel} verwendet. Dieser beschreibt das Verhältnis des jeweiligen Partikelradius zum Partikelradius eines Referenzproteins. Als Referenzprotein wurde Lysozym mit einem Molekulargewicht von $MW_{ref} = 14$ kDa verwendet. Die Berechnung des relativen Radius erfolgte entsprechend der folgenden Gleichung:

$$R_{\text{rel}} = \frac{r_i}{r_{\text{ref}}} = \left[\frac{V_i}{V_{\text{ref}}} \right]^{1/3} = \left[\frac{MW_i}{MW_{\text{ref}}} \right]^{1/3}$$

mit R_{rel} : relativer Radius, V : Volumen, MW : Molekulargewicht.

Um Wechselwirkungen der Probe mit dem Säulenmaterial auszuschließen, ist eine ausreichende Ionenstärke der mobilen Phase notwendig. Dies wurde durch den Einsatz von Standardproteinen getestet. Der ermittelte Korrelationsfaktor ermöglichte zugleich einen Vergleich von Proteinvolumen und Proteinmasse. Zur Erstellung der Kalibriergeraden wurden Rinderserum-Albumin (BSA, 67 kDa), Albumin (45 kDa) und Lysozym (14 kDa) verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine analytische Säule und eine halbpräparative Säule eingesetzt. Das Säulenmaterial der analytischen Säule (TSK 4000SW, Firma Toso Haas) besteht aus porösen, sphärischen Partikeln (Partikeldurchmesser ca. 30 μm , Porendurchmesser ca. 400 nm). Es ist zur Trennung von Proteinen mit Molekulargewichten von 20 – 1000 kDa geeignet. Die Chromatographiesäule besitzt eine Länge von 300 mm und einen Innendurchmesser von 7,5 mm. Das Säulenvolumen beträgt 13,25 mL und das Totvolumen¹⁷ mit 75 % des Säulenvolumens ca. 10 mL.

Als Puffer wurde ein 67 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet. Bei einer Flussrate von 0,3 mL \cdot min⁻¹ betrug die Analysendauer 60 Minuten. Vor Beginn der Analyse wurde die Säule 60 Minuten mit Puffer gespült.

Das Säulenmaterial der halbpräparativen Säule (HW 55S, Firma Toso Haas) besteht ebenfalls aus porösen, sphärischen Partikeln (Partikeldurchmesser ca. 30 μm , Porendurchmesser ca. 30 nm). Es ist zur Trennung von Proteinen mit Molgewichten von 1 – 200 kDa geeignet. Die Chromatographiesäule besitzt eine Länge von 300 mm und einen Innendurchmesser von 20 mm. Das Säulenvolumen beträgt 94,2 mL und das Totvolumen mit 75 % des Säulenvolumens ca. 70,6 mL.

Als Puffer wurden 1 mM und 67 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) verwendet. Bei einer Flussrate von 0,3 mL \cdot min⁻¹ betrug die Analysendauer 212 Minuten. Vor Beginn der Analyse wurde die Säule 13 Stunden mit Puffer gespült.

Zur Detektion wurde ein UV-Vis Detektor (DAD G1315A, Firma Hewlett Packard) mit einer Nachweisgrenze von 5 \cdot 10⁻¹⁰ g \cdot mL⁻¹ und ein Fluoreszenzdetektor (FLD G1321A,

¹⁷ Totvolumen: Volumen an mobiler Phase, das zum Füllen aller Poren und Zwischenräume einer Säulenpackung notwendig ist.

Firma Hewlett Packard) mit einer Nachweisgrenze von ca. 10^{-12} mg·mL⁻¹ eingesetzt [175]¹⁸.

Ionenaustauschchromatographie

Das Trennprinzip der Ionenaustauschchromatographie (IEC) basiert auf relativen Affinitäten der unterschiedlichen Probenkomponenten mit den geladenen Kontaktstellen der stationären Phase. Das Säulenmaterial weist dabei kovalent gebundene Gruppen auf, wie z. B. Carboxylgruppen oder Aminogruppen [176].

Die Nettoladung einer Proteinoberfläche ist abhängig vom pH-Wert des umgebenden Mediums und der Aminosäurezusammensetzung. Bei einem pH-Wert unterhalb des isoelektrischen Punktes des Proteins ist die Nettoladung positiv. Das Protein bindet in diesem Fall an ein Kationenaustauscher-Material. Oberhalb des isoelektrischen Punktes ist das Protein negativ geladen. Es bindet an eine Anionenaustauscher-Matrix. Die Elution¹⁹ der gebundenen Proteine erfolgt durch Verwendung einer entsprechenden Elutionslösung, deren Ionen aufgrund einer stärkeren Affinität zu der Matrix das gebundene Protein verdrängen.

Die IEC wurde mittels einer Anionenaustauschchromatographie (Vivapure IEX, Mini D & Q Zentrifugensäulen, Firma VivaScience) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte analog der Betriebsvorschrift des Herstellers zur Reinigung von Proteinen mit niedrigem isoelektrischen Punkt (Anhang B). Als Ladungspuffer wurde ein 25 mM Tris/HCl-Puffer mit pH 7, 8 bzw. 9 eingesetzt. Zur Proteinelution wurden der wässrigen 25 mM Tris/HCl-Pufferlösung unterschiedliche Kochsalzkonzentrationen zugegeben. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,5 und 2 M NaCl. Der pH-Wert der Pufferlösung entsprach dem des jeweils verwendeten Ladungspuffers.

Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation basiert auf der Fraktionierung von Nukleinsäuren, Peptiden und Proteinen in einer entsprechenden Dichtegradientensäule. Dazu wurde eine isopyknische Zentrifugation eingesetzt [177]. Die Probenzentrifugation wurde bei dieser Technik bis zum Erreichen des Sedimentationsgleichgewichtes der Probenbestandteile fortgesetzt. Dabei fand eine Anreicherung der verschiedenen

¹⁸ Nachweisgrenze gilt für Aromaten.

¹⁹ Elution: Bezeichnung für das Ab- oder Herauslösen von Stoffen. Die austretende Lösung wird als Eluat bezeichnet.

Komponenten entsprechend ihrer Dichte in verschiedenen Positionen der Gradientensäule statt.

Für die Analyse wurden Dichtegradienten aus Saccharose in 10,4 mL Polycarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen (Firma Beckman) hergestellt. Als Gradientenmaterial wurde Saccharose gewählt, da sie nicht ionisch und relativ inert gegenüber den biologischen Zellbestandteilen ist.

Zur Herstellung der Gradienten wurden Saccharoselösungen unterschiedlicher Konzentration in einem Zentrifugenröhrchen mittels einer Spritze und einer dünnen Injektionsnadel, die bis zum Boden der Röhrchen reicht, eingebracht. Dabei wurde jede Saccharoseschicht mit Lösung der nächsthöheren Saccharosekonzentration unterschichtet [178]. Die Gradienten wurden mindestens 12 Stunden bei 4 °C aufbewahrt, um durch Diffusion einen nahezu linearen Gradienten zu erhalten.

Das Gesamtvolumen von Gradienten und aufgetragener Probe betrug 10 mL. Beim Befüllen der Zentrifugenröhrchen war ein Vermischen der unterschiedlich konzentrierten Lösungen zu vermeiden.

Zur Fraktionierung wurden auf den Dichtegradienten 200 – 600 µL Probevolumen aufgetragen. Als Probe wurde der Überstand nach dem Zellaufschluss eingesetzt. Als Referenzwert wurde statt der Probe das gleiche Volumen VE-Wasser aufgetragen. Die Aufschluss-Probe einer cadmiumfreien Kultivierung diente als Negativstandard. Die Zentrifugation erfolgte in einer Ultrazentrifuge (Optima XL, Firma Beckman) mit einem 25° Festwinkel-Rotor (Typ 90Ti, Firma Beckman). Die Proben wurden 40 Stunden bei 47.000 U·min⁻¹ und 4 °C zentrifugiert. Das entsprach ca. einer 100.000-fachen Erdbeschleunigung.

Während der Zentrifugation bildete sich der lineare Dichtegradient im Zentrifugenröhrchen vollständig aus. Die Proteine wanderten am Gradienten entlang, bis sie eine Schicht entsprechend ihrer eigenen Dichte erreichten.

Nach der Zentrifugation wurden jeweils 1 mL-Fractionen von der oberen Röhrchenöffnung entnommen. Die Dichte der Fractionen wurde über die Bestimmung des Brechungsindexes bestimmt. Die entsprechende Korrelationsfunktion zwischen Brechungsindex, Saccharosekonzentration und gemessener Dichte befindet sich in Anhang B. Eine Abschätzung der Saccharosedichte bei unterschiedlichen Temperaturen und Saccharosekonzentrationen kann zusätzlich unter Anwendung der empirischen Formel von Barber erfolgen [179].

Dialyse

Die Proben wurden dialysiert, falls eine Störung der Analysen durch anwesende Salze in der Probe zu erwarten war. Die eingesetzten Dialysekassetten („Slide-A-Lyzer“, Firma Piercenet) verfügen über eine Probenkapazität von 3 mL und einem MWCO²⁰ von 7 kDa. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der beiliegenden Gebrauchsanweisung gegen ein entsprechend großes Volumen Reinstwasser bei 4 °C. Die Dialysedauer betrug mindestens 12 Stunden.

4.4.4 Reinigungsverfahren für nanostrukturierte Partikel

Glühprozess

Das Reinigen mittels eines Glühprozesses basiert auf der Oxidation der organischen Zellbestandteile bei hohen Temperaturen. Die Bestimmung des anorganischen Anteils an der Biotrockenmasse erfolgte bei 500 °C in einem Muffelofen.

Das Ausgangsmaterial wurde ein gewaschenes und in Leitungswasser resuspendiertes Zellpellet verwendet. Jeweils 30 mL der Suspension wurden in einen Porzellantiegel mit bekanntem Trockengewicht m_T pipettiert. Die Probe wurde 24 Stunden bei 100 °C getrocknet und das Trockengewicht m_{tr} bestimmt. Anschließend wurden die Proben zur Oxidierung der organischen Bestandteile auf 500 °C erhitzt und anschließend ausgewogen. Der Massenanteil x_{cocc} der Coccolithen berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$x_{cocc} = \frac{m_{tr} - m_{glüh}}{m_{tr} - m_T}$$

Alternativ zu diesem Verfahren wurde die Probe 10 Minuten über einer Bunsenbrennerflamme erhitzt. Die erzielten Ergebnisse sind in Kapitel 6.3.1 entsprechend des eingesetzten Glühprozesses gekennzeichnet.

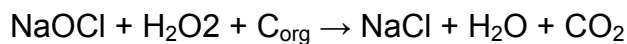
Chemischer Zellaufschluss

Für den chemischen Zellaufschluss wurden ein Säureaufschluss und die Stoll-Methode unter Einsatz von starken Oxidationsmitteln durchgeführt [173]. Beim Säureaufschluss wurde konzentrierte Schwefelsäure tropfenweise zu dem in Wasser resuspendierten Zellpellet gegeben. Die Zugabe wurde gestoppt, sobald keine

²⁰ MWCO: „Molecular Weight Cut Off“, Wert beschreibt die Trennschärfe bei Membranverfahren anhand des Molekulargewichts einer Substanz.

Gasentwicklung mehr zu beobachten war. Das Pellet wurde anschließend dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Die Waschlösung wurde abzentrifugiert und dekantiert. Der Säureaufschluss ist ausschließlich für Silica-Partikel geeignet, da die Säure zum Auflösen der Calciumcarbonat-Partikel führt.

Die Stoll-Methode bezeichnet ein Reinigungsverfahren unter Oxidation der organischen Substanz durch Zugabe von Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid. Beide Substanzen sind starke Oxidationsmittel, die zu einer Zersetzung der organischen Bestandteile führen:



Für den Aufschluss wurde die Zellsuspension mit einer wässrigen 3 %-igen Natriumhypochlorit-Lösung und einer 30 %-igen Wasserstoffperoxid-Lösung im gleichen Verhältnis gemischt. Dadurch stellte sich ein pH-Wert von ca. 8,5 ein. So wurde die Zersetzung der säureempfindlichen Calciumcarbonat-Partikel verhindert. Während der dreistündigen Inkubationszeit wurde der pH-Wert regelmäßig kontrolliert. Beim Sinken unter pH 8,0 wurde Natriumhypochlorit-Lösung tropfenweise zugegeben. Nach Ende der Reaktionszeit wurden die Partikel dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Die Probe wurde zentrifugiert und die Waschlösung entfernt.

Ultraschallreinigung

Die mechanische Reinigungsmethode erfolgte unter Einsatz von Ultraschall (Sonorex RK52, Firma Bandelin). Die Probensuspension wurde 5 Minuten in einem Ultraschallbad bei einer Frequenz von 35 kHz behandelt und anschließend dreimal mit Leitungswasser gewaschen. Die Probe wurde zentrifugiert und die Waschlösung entfernt.

4.5 Elektronenmikroskopische Analysen

4.5.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ist ein Verfahren zur Strukturabbildung von Festkörpern in dünnen Probeschnitten, bei dem das Probenmaterial mit Elektronen durchstrahlt wird. Die Analysen wurden am Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Karlsruhe durchgeführt. Die

Probenpräparation erfolgte am Botanischen Institut I der Universität Karlsruhe. Als Einbettungsmittel kam LR White zum Einsatz.

Zur Probenpräparation wurde zunächst eine 30-minütige Fixierung der gewaschenen Mikroorganismen in wässriger 5 %-iger Glutaraldehyd-Lösung bei 4 °C durchgeführt. Die Probe wurde zentrifugiert und der flüssige Überstand verworfen. Anschließend wurde das Pellet mit wässriger 0,1 M PIPES-Lösung 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Zentrifugation der Probe und Entfernen des Überstandes erfolgte die Einbettung der Zellpellets. Dazu wurde das Pellet in einer 1,5 %-igen Agarlösung bei 45 °C unter Vermeidung von Luftblasen resuspendiert. Die Probe wurde im Eisbad abkühlt und nach Erstarrung des Agars in kleine Würfel geschnitten.

Die Entwässerung der Probe erfolgte mittels Ethanol. Dabei wurde die Ethanolkonzentration stufenweise auf ca. 100 % erhöht. Zur Einbettung der Probe in das Harz (LR White) wurde eine stufenweise Erhöhung der Harzkonzentration durchgeführt. Dazu wurden stufenweise 1:1 und 1:2 Ethanol/Harz-Lösungen zu den Probewürfeln gegeben. Die Proben wurden jeweils 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und der flüssige Überstand anschließend vollständig entfernt. Abschließend wurden die Proben mit der reinen Harzlösung versetzt. Die Proben wurden weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Die präparierten Probenwürfel wurden in Gelatine kapseln gegeben, die Kapseln mit der Harzlösung aufgefüllt, verschlossen und bei 60 °C auspolymerisiert.

Für die Analyse wurden 70 – 100 nm dicke Probeschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Kupfer-Netze (S160, Firma Plano) aufgebracht.

4.5.2 Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX)

Soweit erforderlich wurden die TEM-Analysen in Kombination mit elementanalytischen Verfahren wie z. B. energiedispersiver Röntgenanalyse (EDX) durchgeführt. Die Analysen fanden am Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Karlsruhe statt. Für die Analysen wurde ein hochauflösendes Transmissionselektronenmikroskop (HRTEM CM 200 FEG/ST, Firma Philips) eingesetzt.

Die Bestrahlung der Probe mit Elektronen führt zu einer Emission von charakteristischer Röntgenstrahlung. Die erzeugten Elektronen stoßen bei dem zu analysierenden Material Elektronen aus kernnahen Atomschalen. In die

entstandenen Lücken fallen Elektronen aus energetisch höher liegenden Elektronenschalen. Dabei kommt es zur Emission von Röntgenstrahlung, wobei die Energiedifferenz zwischen den beteiligten Elektronenschalen elementspezifisch ist. Die Auswertung der im Röntgenspektrum erhaltenen Spektrallinien ermöglichte die Bestimmung der Elementzusammensetzung innerhalb der Probe.

4.5.3 EFTEM ESI

Als weiteres Verfahren zur Durchführung elementspezifischer Analysen wurde EFTEM ESI („energy-filtering transmission electron microscopy, element specific imaging“) eingesetzt. Die Analysen wurden am Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Karlsruhe durchgeführt. Für die Analysen wurde ein Transmissionselektronenmikroskop (TEM 912 Omega, Firma Zeiss) eingesetzt.

Der Nachweis von Elementen mittels EFTEM ESI basiert auf Wechselwirkungen, die beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe hervorgerufen werden. Dabei werden Elektronen aus der Hülle der Probenatome herausgeschlagen und verlieren dabei eine elementspezifische Energiemenge. Entsprechend der Energieverluste treten im Energieverlustspektrum elementspezifische Sprungsignale (Kanten) auf. Für Cadmium liegt das elementspezifische Sprungsignal bei 424 eV.

Mit Hilfe einer Blende wurden die entsprechenden Energiebereiche aus dem Spektrum ausgewählt und elementspezifische Bilder erstellt. Dabei wurden die Cadmium- und Schwefelverteilungen mittels einer Falschfarben-Abbildung²¹ in den analysierten Probenquerschnitten dargestellt. Die Übereinanderlagerung der Verteilungen ermöglichte die orts aufgelöste Bestimmung intrazellulärer Elementverteilungen.

4.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) diente im Rahmen dieser Arbeit zur Charakterisierung nanostrukturierter Partikeloberflächen. Die elektronenmikroskopischen Analysen wurden am Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Karlsruhe unter Einsatz eines hochauflösenden Rasterelektronenmikroskops (LEO 1530, Gemini 1998) durchgeführt. Der Einsatz

²¹ Falschfarben: RGB-Codierung der Elemente.

einer energiedispersiven Röntgenanalyse (EDX) ermöglicht quantitative Analysen der Elemente ab der Ordnungszahl 11 (Natrium). Qualitative und semiquantitative Analysen sind für Elemente ab der Ordnungszahl 5 (Bor) möglich. Die Analysentiefe beträgt bei diesen Messungen ca. 10 nm.

Für die REM-Analyse wurden 5 mL gewaschene Zellsuspension auf einem Oberflächenfilter aus Celluloseester mit einer Porenweite von 25 nm aufgetragen. Das Filtertuch wurde 24 Stunden bei 80 °C getrocknet. Ein geeigneter Ausschnitt wurde auf den REM-Probenaufnehmer aufgetragen. Unter einer Argonatmosphäre wurde auf die Oberfläche hierbei eine ca. 8 Atomlagen dicke Platin-Rhodium-Schicht mittels eines Sputter-Verfahrens²² aufgetragen. Diese Beschichtung erzeugt die für die REM-Analyse erforderliche Leitfähigkeit auf der Probenoberfläche.

4.6 Elektrophoretische Verfahren

4.6.1 Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels SDS PAGE

Die SDS PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht die Auftrennung eines Proteingemisches entsprechend des Molekulargewichtes der Proteine. Bei Sodiumdodecylsulfat (SDS) handelt es sich um ein anionisches Detergenz, das Proteine denaturiert und zu einer negativen Ladung der Proteine führt. Diese Ladung ist die proportional zur Proteingröße [180].

Zur Gelelektrophorese (Mini PROTEAN 3 Kammer, Firma Biorad) wurde ein Polyacrylamidgel aus einem Sammelgel und einem 12 %-igen Trenngel verwendet. Die Anleitung zur Gelherstellung befindet sich in Anhang B. Ein Proteinmarker ermöglichte die Abschätzung des Molekulargewichtes der Proteinkomponenten in unbekanntem Proben.

Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µL der Probe mit dem gleichen Volumen Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 80 °C erhitzt. Die Zusammensetzung des Probenpuffers ist in Anhang B zu finden.

Je nach Proteinkonzentration wurde ein Probevolumen von 5 – 20 µL bzw. 3 µL Proteinmarker auf das Sammelgel aufgetragen. Die Stromstärke betrug maximal 15 mA bis die Proben das Sammelgel passiert hatten. Anschließend wurde die Stromstärke auf 25 – 30 mA erhöht. Der gesamte Elektrophoresevorgang dauerte ca.

²² Sputtern: Probenbeschichtung im nm-Bereich. Mittels einer Kathodenzerstäubung wurde hierbei die auf der Anode liegende Probe mit Metallatomen der Kathode unter Argonatmosphäre beschichtet.

2 – 3 Stunden. Er wurde beendet, sobald die Frontlinie der Proben das Gelende erreicht hatte. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entfernt und angefärbt. Je nach Proteinkonzentration wurde zur Färbung die Coomassie-Färbung oder Silberfärbung verwendet. Die entsprechenden Anleitungen sind in Anhang B eingefügt.

In weiteren Versuchen wurden vorbereitete Gele (NuPAGE Novex Bis-Tris Gele, Firma Invitrogen) verwendet. Für die Gelelektrophorese („XCell SureLock Mini“ Kammer, Firma Invitrogen) wurden die beiliegenden Proben- und Laufpuffer eingesetzt. Der verwendete Proteinmarker (Mark 12, Firma Invitrogen) enthält ein Mix aus Proteinen mit Molekulargewichten von 2,5 bis 200 kDa. Die Probenvorbereitung erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung.

Je nach Proteinkonzentration wurden 5 – 20 μL Probenvolumen auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit der Gelelektrophorese betrug ca. 35 Minuten bei einer konstanten Spannung von 200 Volt. Die Färbung fand mittels SimplyBlue (Invitrogen) entsprechend der Gebrauchsanweisung statt.

4.6.2 Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung

Die Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) basiert auf der Oberflächenladung der nativen Proteine. Die Proteine wandern entlang eines pH-Gradienten, bis der pH-Wert ihrem isoelektrischen Punkt entspricht [177].

Zur Gelelektrophorese („XCell SureLock Mini“ Kammer, Firma Invitrogen) wurden Gele (Novex IEF Pre-Cast Gel, Firma Invitrogen) mit einem Gradienten von pH 3 – 7 verwendet. Als Proteinmarker wurde ein Marker mit Standards von pH 3 – 10 (SERVA liquid mix, Invitrogen) verwendet. Die Probenvorbereitung und Herstellung der Pufferlösungen erfolgte entsprechend der Gebrauchsanweisung.

Je nach Proteinkonzentration wurden 5 - 10 μL Probevolumen auf das Gel aufgetragen. Im Verlauf der Elektrophorese wurde die anliegende Stromspannung stufenweise erhöht. Es wurden jeweils eine Stunde konstant 100 V und 200 V und abschließend für 30 Minuten 500 V angelegt. Die Stromstärke lag während des gesamten Trennvorganges bei ca. 5 mA.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese 30 Minuten in 12 % Trichloressigsäure (TCA) fixiert und anschließend zweimal 5 Minuten mit Reinstwasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel zur Entfernung sämtlicher Säurereste über Nacht in

Reinstwasser stengelassen. Die Färbung fand mittels SimplyBlue (Invitrogen) entsprechend der Gebrauchsanweisung statt. Zur Entfernung des überschüssigen Färbemittels wurde das Gel eine Stunde in Wasser aufbewahrt. Anschließend wurden zur Erhöhung der Sensitivität 20 mL einer 20 %-igen NaCl-Lösung zugegeben und das Gel für mindestens 12 Stunden in dieser Lösung aufbewahrt.

4.7 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung

4.7.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) ist ein auf der dynamischen Lichtstreuung (DLS) basierende Methode zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung. Zur Analysedurchführung wurde ein ALV-NIBS High Performance Particle Sizer (HPPS, Firma Malvern Instruments) eingesetzt. Bei den Versuchsführungen im Rahmen der Arbeiten bei der Firma DuPont, USA wurden die Analysen am dortigen Analysezentrum²³ durchgeführt.

Die PCS basiert auf der Brownschen Molekularbewegung von Partikeln in einer Flüssigkeit [181]. Bei kleineren Partikeln sind dabei durch Zusammenstöße mit den Solvensmolekülen schnellere Bewegungen zu beobachten als bei größeren Partikeln. Dieser Zusammenhang wird über die Stokes-Einstein Gleichung zur Brownschen Molekularbewegung beschrieben [182]:

$$d = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

mit D: Diffusionskoeffizient, k: Boltzmann-Konstante, T: Temperatur, η : Viskosität und d: hydrodynamischer Partikeldurchmesser.

Die dynamische Lichtstreuung ist sehr gut für sphärische Partikel mit einer engen Partikelgrößenverteilung im Nano- und Submikrometermaßstab geeignet. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Brownschen Molekularbewegung ist bei der Messung der Partikelgrößenverteilung die Einhaltung einer konstanten Temperatur essentiell. Konstante Temperaturbedingungen führen zur Minimierung störender Konvektionsströmungen innerhalb der Messprobe. Diese würden sonst die Brownsche Bewegung überlagern. Des Weiteren sind Staubpartikel in der Probe oder in der Messküvette zu vermeiden. Da die Staubpartikel größer sind als die Probenpartikel, führen sie zu unerwünschten Streueffekten.

²³ Corporate Center for Analytic Sciences (CCAS), DuPont, USA

Zur Analyse wurden Zellysat-Proben verwendet. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt.

4.7.2 Differentielle Mobilitätsanalyse

Die Partikelgrößenverteilung mittels differentieller Mobilitätsanalyse (DMA) basiert auf der elektrischen Mobilität geladener Partikel unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld in der Gasphase. Über eine Elektrospray-Einheit wurde das flüssige Zellysat in die Versuchseinheit eingebracht. Die Analysen wurden am Chemie-Institut der Universität Delaware, USA [183] durchgeführt.

Zur Analyse kamen dialysierte und undialysierte Zellaufschlussproben zum Einsatz. Die Proben wurden vor der Analyse verdünnt, zentrifugiert und gefiltert (Porenweite 0,2 µm). Die Aerosolbildung erfolgte mittels einer Elektrospray-Einheit. Den dialysierten Proben wurde zur Erhöhung der Leitfähigkeit 1 µL einer wässrigen 0,1 M Natriumchlorid-Lösung zugegeben.

4.7.3 Laserlicht-Beugung

Die Laserlicht-Beugung dient der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bei Kieselshalen. Die Analysen wurden am Fraunhofer Institut für Chemietechnik (ICT, Berghausen) unter Einsatz eines Laserlicht-Beugungsspektrometers (Helos H9236, Firma Sympatec) durchgeführt. Die Laserlicht-Beugung (kurz: Laserbeugung) ist zur Bestimmung von Partikelgrößenverteilungen im Mikrometer-Bereich geeignet.

Bei der Laserbeugung wird bei der Durchstrahlung einer wässrigen Probe ein Beugungsbild entsprechend der Partikelgrößenverteilung der Probenpartikel erzeugt. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung beruht auf der Auswertung der Winkel- und Intensitätsverteilung des gebeugten Lichtes. Aus dem Beugungsbild wurde bei bekannter Wellenlänge des Lichtes und bekanntem Brechungsindex des Lösungsmittels die Partikelgrößenverteilung der Probe unter der Annahme sphärischer Partikel berechnet [184]. Die Messung der Algenproben fand in einer stark verdünnten Probe statt, um eine mehrfache Lichtstreuung zu vermeiden.

Für die Analysen wurden gereinigte Algenschalen in Leitungswasser resuspendiert.

4.8 Absorptionsmessungen

Die Absorption kann durch folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$A(\lambda) = 1 - \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}$$

mit $I_0(\lambda)$: Intensität des eintretenden Lichtstrahls und $I(\lambda)$: Intensität des austretenden Lichtstrahls.

Der Zusammenhang zwischen Extinktion und Probenkonzentration wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$E(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot d$$

mit E: Extinktion, c: Probenkonzentration, d: Schichtdicke, ε : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient.

4.9 Fluoreszenzbestimmungen

4.9.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Proteinquantifizierungskit (EZQ R33200, Firma Molecular Probes) verwendet. Der Probenansatz in Mikrotiterplatten erfordert nur kleine Probevolumina ermöglicht die parallele Analyse von bis zu 96 Proben incl. Standards. Das Verfahren ist für Proben mit Proteinkonzentrationen von $0,02 - 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ geeignet.

Es wurden jeweils Probevolumina von $1 \mu\text{L}$ auf ein Filterpapier aufgegeben und entsprechend der beiliegenden Gebrauchsanweisung behandelt. Dabei wurden Begleitsubstanzen wie z. B. Salze und Saccharose entfernt. Die Proteinfärbung erfolgte mit einem fluoreszierenden Proteinquantifizierungsreagenz. Mittels einer Referenzkurve wurde der Korrelationsfaktor zwischen der Fluoreszenzintensität und der Proteinkonzentration bestimmt.

4.9.2 Bestimmung der Fluoreszenzspektren

Die Bestimmung von Emissions- und Anregungsspektren und die Erstellung von mehrdimensionalen Spektren erfolgten mit einem Fluoreszenzspektrometer (Aminco Bowman Series 2, Firma Thermo Spectronic). Fluoreszenzmessungen sind dabei im

Allgemeinen um ca. zwei bis drei Größenordnungen empfindlicher als Absorptions- bzw. Extinktionsmessungen [185].

Für die Messung wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm eingesetzt. Für die Erstellung von mehrdimensionalen Spektren wurde die Anregungswellenlänge von 300 bis 400 nm variiert. Zu jeder Anregungswellenlänge wurde das entsprechende Emissionsspektrum im Bereich von 450 bis 600 nm aufgenommen. Zum Nachweis von Cadmiumsulfid-Nanopartikel wurde die Probe bei 355 nm angeregt und ein Emissionsspektrum von 450 – 600 nm aufgenommen.

4.9.3 Fluoreszenz-Einzelmolekülanalyse

Die Analysen wurden am Lichttechnischen Institut der Universität Karlsruhe durchgeführt. Im Gegensatz zu herkömmlichen Fluoreszenzspektrometern bot der Versuchsaufbau die Möglichkeit, Fluoreszenzspektren und zeitliche Fluoreszenzabklingkurven von mikroskopischen Probevolumina zu bestimmen.

Zur Fluoreszenzanregung stand ein gepulster Laser (Ti:Sa, Mira, Firma Coherent) mit einer Repetitionsrate von 80 MHz zur Verfügung und einer ca. 1 ps Pulsdauer. Die Laserleistung betrug 1 mW. Als Fluoreszenzdetektor wurde ein Photomultiplier (PM R5900, Firma Hamatsu) eingesetzt, welcher neben einer hohen Empfindlichkeit ein hohes Signal-zu-Rauschen-Verhältnis zeigt. Zur Einzelmoleküldetektion wurde der zeitliche Verlauf der Emission registriert, die in einem begrenzten Detektionsvolumen auftritt.

Zur Abschirmung des Anregungs- und Streulichtes wurden Interferenzfilter eingesetzt. Neben gestreutem Anregungslicht können fluoreszierende Verunreinigungen Einfluss auf den Signaluntergrund nehmen. Diese führen zu unerwünschten Signalen und erschweren so die Detektion der eigentlichen Zielmoleküle.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzabklingdauer wurde die Methode der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung verwendet, das so genannte TCSPC („time-correlated single photon counting“). Bei dieser Methode wird die Probe mit einem kurzen Lichtpuls angeregt und gleichzeitig eine Zeitmessung gestartet. Diese Zeitmessung wird mit der Detektion des ersten registrierten Fluoreszenzphotons gestoppt. Durch wiederholte Messungen und dem Eintragen der ermittelten Emissionszeiten in ein Histogramm ergibt sich eine charakteristische

Fluoreszenzabklingkurve der betreffenden Substanz. Stammt die Fluoreszenz von einem einzelnen angeregten Zustand, so wird ein monoexponentielles Abklingverhalten erwartet:

$$I(t) = I_0 \exp\left\{-\frac{t}{\tau}\right\}$$

Die Abklingdauer definiert die Zeit, nach der die Fluoreszenzintensität auf den Faktor 1/e des Anfangswertes abgeklungen ist.

Für die Einzelmolekülmessung wurde die Probe auf einen Glas-Objektträger mit Vertiefung aufgegeben, getrocknet und anschließend orts aufgelöst abgescannt. Um einzelne Moleküle einer bestimmten Spezies zu analysieren, sollte die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein solches Molekül im Detektionsvolumen befindet, deutlich geringer als eins sein. Dazu wurde eine Lösung mit einer geringen Probenkonzentration verwendet und ein kleines Beobachtungsvolumen gewählt. Ein Bild bestand dabei aus 256*256 Bildpunkten. Die Schrittweite in x- und y-Richtung betrug $dx = dy = 500 \text{ nm}$. Daraus ergab sich ein Bildausschnitt mit den Abmessungen $128 \mu\text{m} \times 128 \mu\text{m}$. Zu jedem Bildpunkt wurde jeweils ein Emissions- und Abklingspektrum aufgenommen. Diese Spektren bestanden aus 1024 spektralen Wellenlängenkanälen je Spektrum und 1024 Zeitkanälen je Zeitkurve. Aus der Fokussierung des Lasers, der eingesetzten Lochblende und der Auflösung des Objektivs (Numerische Apertur: 1,4) ergab sich eine optische räumliche Auflösung von ca. 400 – 500 nm je Bildpunkt.

5 Ergebnisse zur Produktion und Charakterisierung nanoskaliger Partikel

5.1 Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen

Die Arbeit zur Untersuchung biogener nanoskaliger Partikel wurde in die Teilbereiche Partikelherstellung und Partikelcharakterisierung unterteilt. Die Partikelherstellung gliederte sich in die Unterbereiche Kultivierung, Zellaufschluss und Partikelreinigung. Das Ziel lag in einer Optimierung der einzelnen Teilbereiche. Anschließend wurden zur Partikelcharakterisierung die Partikelgrößenverteilung und die Fluoreszenzeigenschaften bestimmt. Die in den einzelnen Teilbereichen zugrunde liegenden Konzepte werden in der Einleitung des jeweiligen Abschnitts erläutert.

5.2 Kultivierung

Für die Kultivierung wurden die Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* verwendet. Beide Hefestämme besitzen bei entsprechenden Kultivierungsbedingungen die Fähigkeit zur Bildung peptidbeschichteter Cadmiumsulfid-Nanopartikel (siehe Kapitel 2.1.1). Der Schwerpunkt der Kultivierungsversuche lag in einer Optimierung der spezifischen Cadmiumakkumulation durch Modifikation der Kultivierungsparameter. Die spezifische Cadmiumakkumulation wird dabei definiert als Menge des intrazellulär angereicherten Cadmiums bezogen auf die Biotrockenmasse:

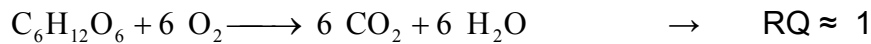
Es wurde der Einfluss unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Cadmiumakkumulation und damit der potenziellen Bildung cadmiumhaltiger Nanopartikel untersucht. Die Cadmiumzugabe wurde dazu bezüglich des Zugabezeitpunktes, Zugabeprofiles und der zugegebenen Gesamtmenge variiert.

Bei der Kultivierungsdurchführung wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse ein ähnlicher zeitlicher Verlauf zugrunde gelegt. Die Versuche zeigten, dass bereits wenige Stunden nach Beendigung der Cadmiumzugabe keine Cadmiumakkumulation mehr stattfindet. Die Kultivierungen wurden daher spätestens 24 Stunden nach der Cadmiumzugabe gestoppt.

Informationen über die aktuellen Stoffwechselaktivitäten wurden bei den Reaktorkultivierungen online unter Berechnung des Respirationsquotienten (RQ) aus

den Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen im Abgas ermittelt (siehe Kapitel 4.2.4). Entsprechend der Stoffwechselforgänge waren die folgenden RQ-Werte zu erwarten:

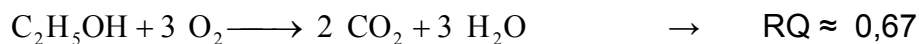
Aerober Stoffwechsel mit Glucose als Substrat:



Anaerober Stoffwechsel mit Glucose als Substrat unter Bildung von Ethanol:



Aerober Stoffwechsel mit Ethanol als Substrat:



Die Ergebnisse der verschiedenen Kultivierungsansätze werden im Folgenden getrennt nach Mikroorganismen dargestellt.

5.2.1 *Schizosaccharomyces pombe*

Am Beispiel von *S. pombe* fand experimentell die Auswahl eines geeigneten Nährmediums statt. Dazu wurden Schüttelkolbenkultivierungen unter Einsatz von einem Komplexmedium bzw. einem Minimalmedium durchgeführt. Die Medienauswahl erfolgte basierend auf der maximalen finalen Biotrockenmasse-Konzentration und der maximalen spezifische Cadmiumakkumulation, die im Verlauf der Versuchsreihen erzielt wurden.

Die Kultivierungen unter Verwendung des Komplexmediums führten zu Biotrockenmasse-Konzentrationen von 5,5 - 6,0 g·L⁻¹. Für Kultivierungen mit Minimalmedium lag der Wert mit 3,5 g·L⁻¹ deutlich geringer. Eine Verdoppelung der Medienkonzentration bei Minimalmedien führte zu einer Steigerung der Biotrockenmasse-Konzentration auf bis zu 5,0 g·L⁻¹. Unter vergleichbaren Kultivierungsbedingungen ergaben sich damit abhängig vom Kultivierungsmedium unterschiedliche finale Biotrockenmasse-Konzentrationen. In cadmiumfreien Medien lagen die spezifischen Wachstumsraten in der exponentiellen Wachstumsphase dabei unabhängig vom Kultivierungsmedium bei ca. 0,1 – 0,2 h⁻¹.

Für die Medienauswahl war die maximal erzielbare spezifische Cadmiumakkumulation entscheidend. Die Abbildung 10 zeigt einen Vergleich der spezifischen Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium und der zugegebenen Cadmiumkonzentration. Der Vergleich basiert auf den Ergebnissen diverser Reaktorkultivierungen (◆) und Schüttelkolbenkultivierungen (◇).

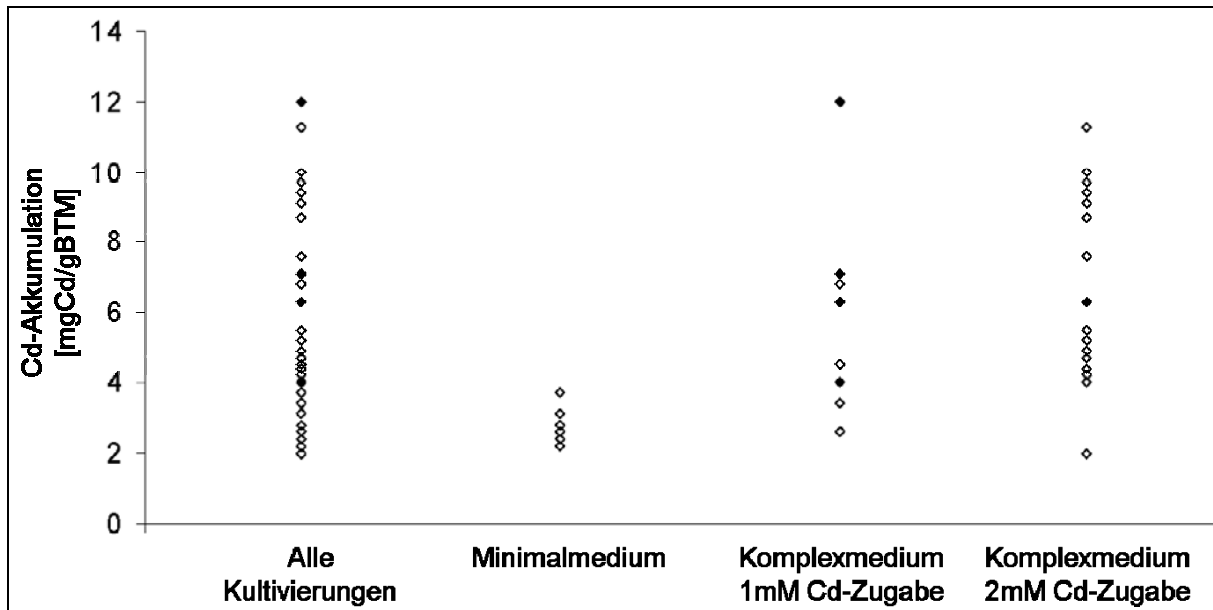


Abbildung 10: Ergebnisse von Schüttelkolbenkultivierungen (◇) und Reaktorkultivierungen (◆) von *S. pombe*: Spezifische Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit von Kultivierungsmedium und Cadmiumkonzentration.

Bei Kultivierungen in einem ausgewählten Komplexmedium wurde eine spezifische Cadmium-Akkumulation von 2 - 5 mgCd/g BTM erzielt. In Batchkultivierungen konnten diese Werte durch eine Glucosezugabe unmittelbar vor der Cadmiumzugabe auf bis zu 12 mgCd/g BTM erhöht werden. Bei Schüttelkolben-Kultivierungen in einfach oder doppelt konzentriertem Minimalmedium waren maximal ca. 4 mgCd/g BTM realisierbar. Eine Erhöhung der zugegebenen Cadmiumkonzentration von 1 mM auf 2 mM Cadmium zeigte keinen Effekt auf die spezifische Cadmiumakkumulation. Ebenso konnte für *S. pombe* kein Unterschied zwischen der Kultivierungsdurchführung im Bioreaktor oder im Schüttelkolben beobachtet werden. Die Kultivierungen in Komplexmedium führten somit sowohl hinsichtlich der finalen Biotrockenmassekonzentration sowie bezüglich der spezifischen Cadmiumakkumulation zu höheren Werten. Um Rahmenbedingungen für eine maximale spezifische Cadmiumakkumulation zu schaffen, wurden die Kultivierungen daher mit Komplexmedium durchgeführt. Die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bei *S. pombe* die Limitierung der Cadmiumanreicherung durch eine maximale spezifische Cadmiumakkumulation erfolgt. Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen lag der maximale Wert für die spezifische Cadmiumakkumulation bei 12 mgCd/g BTM.

Die nachfolgende Abbildung zeigt einen typischen Kultivierungsverlauf einer Reaktorkultivierung von *S. pombe*.

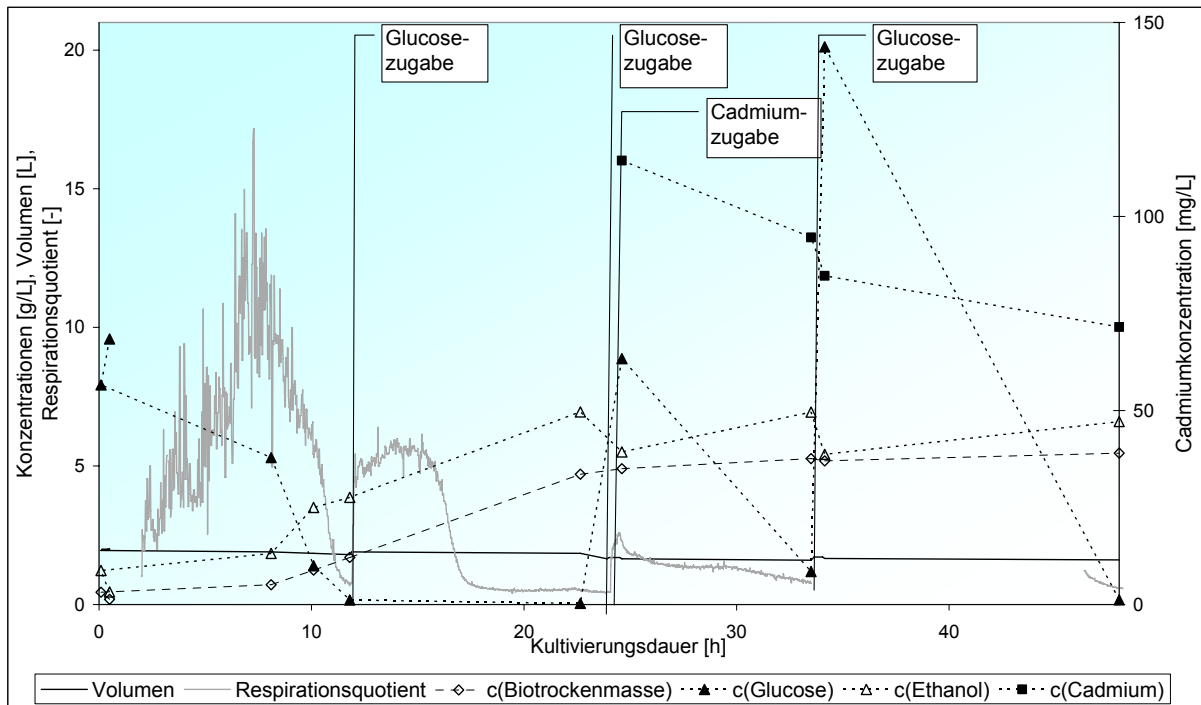


Abbildung 11: Reaktorkultivierung *S. pombe*: Batchkultivierung in Komplexmedium, einmalige Zugabe von 1 mM Cadmium.

In Abbildung 11 ist der Verlauf einer Batch-Kultivierung von *S. pombe* mit dreimaliger Glucosezugabe dargestellt. Es ist zu beobachten, dass die hohen Glucosekonzentrationen im Medium direkt nach der Substratzugabe zur Ethanolbildung führten. Der Effekt ist auf den so genannten Crabtree-Effekt (siehe Kapitel 4.2.1) zurückzuführen. Dies bestätigt auch der hohe Respiationsquotient ($RQ \gg 1$) direkt nach der Glucosezugabe.

Die Zugabe von 1 mM Cadmium erfolgte einmalig in der frühen stationären Wachstumsphase nach einer Kultivierungsdauer von 24,5 Stunden. Die Gesamtkonzentration im Reaktor betrug ca. $114 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cadmium. Die Kultivierung wurde 24 Stunden nach der Cadmiumzugabe beendet. Die finale Biotrockenmasse-Konzentration lag zum Zeitpunkt des Kultivierungsabbruchs bei ca. $5,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Zu diesem Zeitpunkt war die Cadmiumkonzentration im Medium auf $73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ gesunken. Die spezifische Cadmiumakkumulation lag damit bei ca. 12 mgCd/g BTM .

5.2.2 *Candida glabrata*

Die Kultivierungen von *C. glabrata* fanden ausschließlich in Komplexmedium statt. In den durchgeführten Versuchsreihen betrug die maximale Biotrockenmasse-Konzentration ca. $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ für Schüttelkolbenkultivierungen. Für Kultivierungen im Bioreaktor wurden unter den gewählten Kultivierungsbedingungen ca. $5 - 9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Biotrockenmasse erzielt.

Für *C. glabrata* wurde die Abhängigkeit der spezifischen Cadmiumakkumulation von der Cadmiumkonzentration im Medium und unter Verwendung unterschiedlicher Cadmium-Zugabeprofile untersucht. Die Cadmiumkonzentrationen variierten dabei von $0,5 - 10 \text{ mM}^{24}$ Cadmium. Die Cadmiumzugabe erfolgte entweder batchweise oder kontinuierlich über mehrere Stunden.

In Schüttelkolbenkultivierungen wurde nachgewiesen, dass eine Cadmiumzugabe vor Erreichen der stationären Wachstumsphase zu einer starken Limitierung des Mikroorganismenwachstum führte. Daraus resultierten geringe Wachstumsraten und niedrige finale Biotrockenmasse-Konzentrationen. Für eine optimale Cadmiumkonzentration wurde eine möglichst hohe Biotrockenmasse-Konzentration bevorzugt. Die Cadmiumzugabe fand daher ausschließlich in der frühen stationären Wachstumsphase statt.

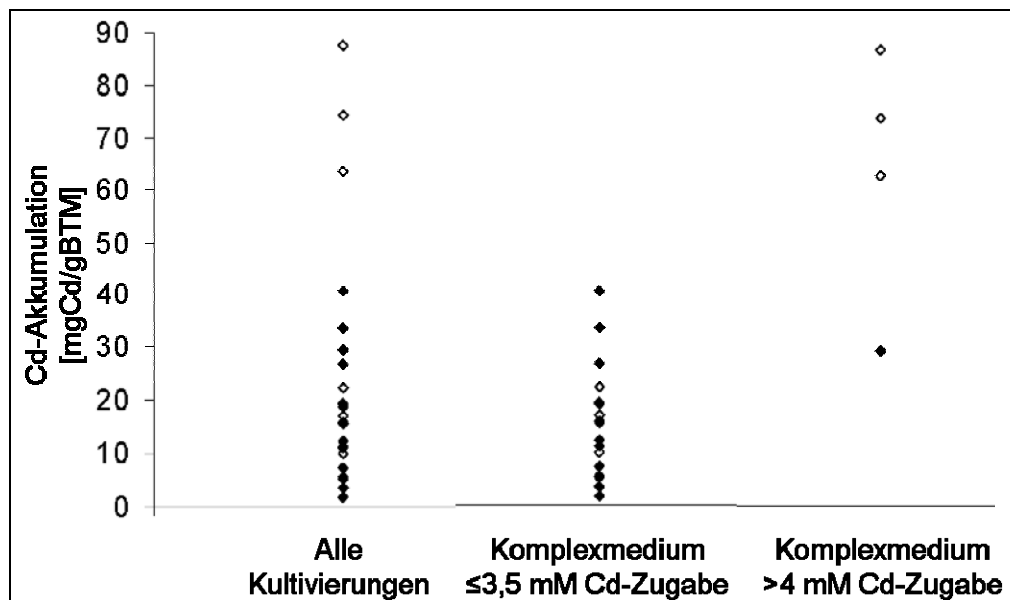


Abbildung 12: Ergebnisse von Schüttelkolbenkultivierungen (◇) und Reaktorkultivierungen (◆) von *C. glabrata*: Spezifische Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit der zugegebenen Cadmiumkonzentration.

²⁴ $0,5 \text{ mM} - 10,0 \text{ mM}$ entsprechen einer Cadmiumkonzentration von $56 - 1120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Die Abbildung 12 zeigt eine Übersicht der spezifischen Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit von der Gesamt-Cadmiumkonzentration im Kultivierungsmedium. Dabei wurden die Resultate diverser Reaktorkultivierungen (◆) und Schüttelkolbenkultivierungen (◇) berücksichtigt. Bei Cadmiumkonzentrationen von 0,5 mM - 3,5 mM²⁵ Cadmium im Medium lag die spezifische Cadmiumakkumulation je nach Kultivierung zwischen 2 mgCd/g BTM bis maximal 40 mgCd/g BTM. Dieser Wert konnte für Konzentrationen von 4,0 mM – 10,0 mM²⁶ Cadmium auf bis zu 60 – 90 mgCd/g BTM gesteigert werden.

In weiteren Versuchsreihen wurde der Einfluss unterschiedlicher Zugabeprofile auf die spezifische Cadmiumakkumulation untersucht (siehe Anhang C). Die Messdaten ließen bei Konzentrationen bis 3,5 mM Cadmium keinen entsprechenden Einfluss des Zugabeprofils erkennen. Bei Cadmiumkonzentrationen ≥ 4 mM erschien die spezifische Cadmiumakkumulation für kontinuierliche Zugabeprofile höher und die verbleibende Cadmiumkonzentration im Medium geringer als bei batchweiser Cadmiumzugabe.

Einschränkend ist zu bemerken, dass die Bestimmung des akkumulierten Cadmiums auf der Änderung der Cadmiumkonzentration im Medium basiert. Aufgrund der beschränkten Löslichkeit von Cadmiumsalzen in Wasser können Fällungsreaktionen vor allem bei höheren Cadmiumkonzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Dieser Aspekt wird in Kapitel 7.1.1 eingehend diskutiert.

Die Versuchsergebnisse in Abbildung 12 zeigen, dass eine Einflussnahme auf die spezifische Cadmiumakkumulation durch Variation der Kultivierungsbedingungen möglich ist. Im Gegensatz zu Kultivierungen mit *S. pombe* trat eine maximale spezifische Cadmiumakkumulation bei Versuchen mit *C. glabrata* nicht auf. Dieser Parameter wurde somit als limitierender Faktor bei der Cadmiumakkumulation ausgeschlossen.

Eine weitere Möglichkeit für die Limitierung der Cadmiumakkumulation besteht darin, dass *C. glabrata* eventuell eine gewisse Cadmiumtoleranz aufweist. Unterhalb einer bestimmten Cadmiumkonzentration würde demnach kein spezifischer Detoxifikationsprozess ablaufen. Für Versuchsansätze ausgehend von einem cadmiumfreien Medium liegt ein entsprechender Schwellenwert nicht vor, da bei Kultivierungen mit Konzentrationen von 0,5 mM Cadmium im Medium bereits eine

²⁵ 0,5 mM – 3,5 mM entsprechen einer Cadmiumkonzentration von 56 – 392 mg·L⁻¹.

²⁶ 4,0 mM – 10,0 mM entsprechen einer Cadmiumkonzentration von 448 – 1120 mg·L⁻¹.

Cadmiumakkumulation stattfindet. Dies konnte z. B. in der dargestellten Reaktorkultivierung (Abbildung 14) nach der ersten Cadmiumzugabe beobachtet werden.

Es wurde untersucht, ob für adaptierte Zellen aus einer cadmiumhaltigen Kultur eventuell ein entsprechender Schwellenwert für den Detoxifikationsmechanismus existiert. Dazu wurden die finalen Cadmiumkonzentrationen im Kultivierungsmedium bei den unterschiedlichen Kultivierungsansätzen verglichen. Die Kultivierungen fanden dabei sowohl im Schüttelkolben- wie auch im Reaktormaßstab statt.

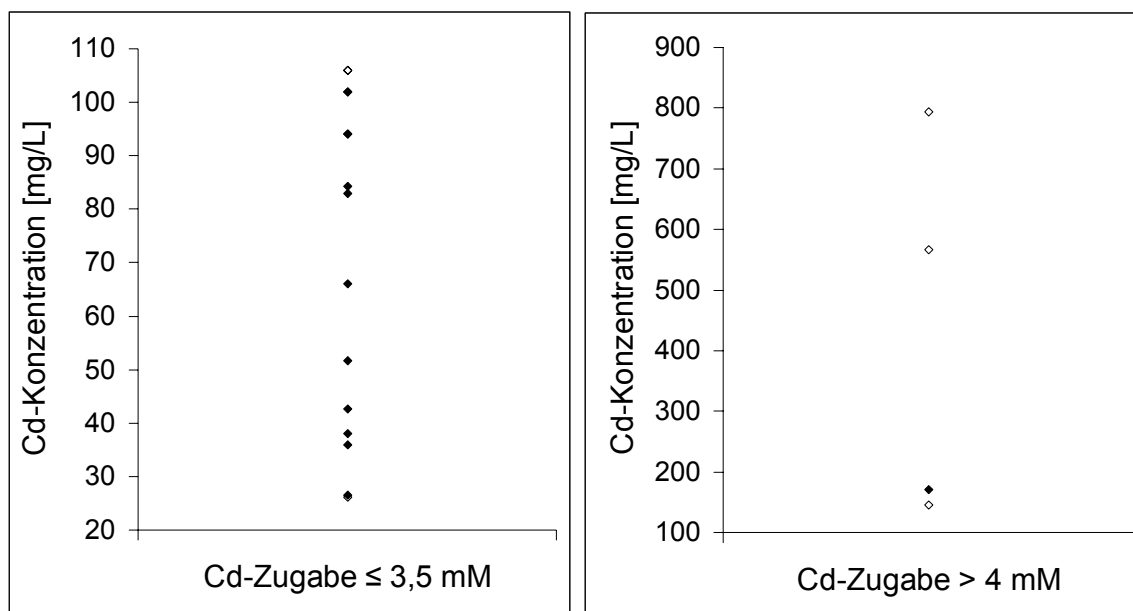


Abbildung 13: Ergebnisse diverser Schüttelkolbenkultivierungen (◇) und Reaktorkultivierungen (◆): Darstellung der finalen Cadmiumkonzentration im Medium in Abhängigkeit der zugegebenen Cadmiumkonzentration.

Die Abbildung 13 zeigt die finalen Cadmiumkonzentrationen im Kultivierungsmedium für Kultivierungen von *C. glabrata* in Gegenwart von 0,5 – 10 mM Cadmium. Dabei lag die Cadmiumkonzentration im Medium zum Zeitpunkt des Kultivierungsabbruchs für die meisten Kultivierungen zwischen ca. 20 und 200 mg·L⁻¹. Die Extremwerte > 200 mg·L⁻¹ resultierten aus Kultivierungen mit extrem hohen Cadmiumkonzentrationen von 7 mM und 10 mM Cadmium. Sie blieben daher in den Betrachtungen unberücksichtigt.

Aufgrund der großen Variation der finalen Cadmiumkonzentration wurde das Unterschreiten eines Schwellenwertes als limitierender Parameter für die Cadmiumaufnahme ebenfalls ausgeschlossen. Basierend auf den vorliegenden

experimentellen Daten war damit für *C. glabrata* keine limitierende Größe für den Detoxifikationsprozess nachweisbar.

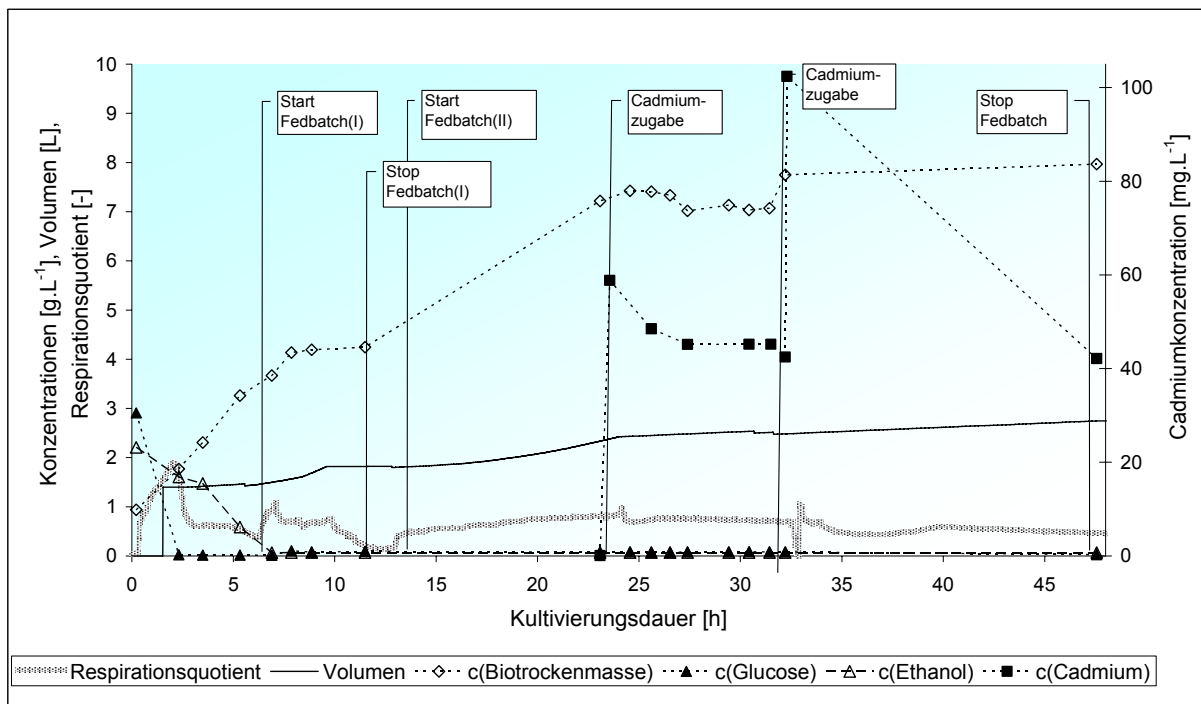


Abbildung 14: Reaktorkultivierung, *C. glabrata*, zweimalige Zugabe à 0,5 mM Cadmium bezogen auf das Medienvolumen, Feedback-Fedbatch Kultivierung mit RQ-Regelung.

In Abbildung 14 ist ein typischer Verlauf einer Reaktorkultivierung von *C. glabrata* dargestellt. Dabei handelt es sich um eine Feedback-Fedbatch Kultivierung (siehe Kapitel 4.2.1), bei welcher die Glucosezugabe entsprechend des Respirationsquotienten (RQ) geregelt wurde. Um eine Ethanolbildung aufgrund des Crabtree-Effektes (siehe Kapitel 4.2.1) zu vermeiden, fand eine Regelung des Respirationsquotienten auf $\text{RQ} = 1$ statt.

Die Glucosezugabe erfolgte mit Ausnahme eines kurzen Zeitfensters von ca. 5 Stunden kontinuierlich über die gesamte Kultivierungsdauer. Insgesamt wurden im Verlauf der Kultivierung ca. 1,8 Liter Substrat mit $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glucose zugegeben. In der Batchphase ergab sich in den ersten acht Kultivierungsstunden eine Wachstumsrate von $\mu_{\text{max}} = 0,19 \text{ h}^{-1}$. Der Verlauf der Glucosekonzentration zeigt, dass die im Reaktor vorhandene Glucose bereits nach ca. 2 Stunden aufgebraucht war. Das weitere Wachstum bis zum Start der Fedbatch-Prozedur fand mit Ethanol als Substrat statt.

Zu Beginn der Kultivierung wurde eine Ethanolkonzentration von ca. $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ im Medium bestimmt. Das Ethanol stammt dabei aus dem Inokulum. Bei Überschreitung einer kritischen Substratkonzentration konnte analog zu den

Stoffwechselfvorgängen bei *S. pombe* das Auftreten des Crabtree-Effektes beobachtet werden. Bei *C. glabrata* fand jedoch eine Umstellung des Stoffwechsels von Glucose auf Ethanol nahezu ohne nachweisbare Adaptionszeit statt. Zur Eliminierung des Ethanols im Medium wurde die Fedbatch-Prozedur erst gestartet, nachdem kein Ethanol mehr im Medium nachweisbar war.

Die Cadmiumzugabe erfolgte nach einer Kultivierungsdauer von 24 und 32,5 Stunden. Dabei wurden jeweils $0,5 \text{ mM}^{27}$ Cadmium bezogen auf das Medienvolumen zugegeben. Die Biotrockenmasse-Konzentration lag zum Zeitpunkt des Kultivierungsabbruchs nach 48 Stunden bei ca. $9,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Die Cadmiumkonzentration war zu diesem Zeitpunkt auf ca. $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ gesunken. Damit lag die spezifische Cadmiumakkumulation bei ca. 8 mgCd/gBTM .

5.2.3 Zusammenfassung

Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen wurde festgestellt, dass sich durch die Wahl der Mikroorganismen und Kultivierungsbedingungen ein deutlicher Einfluss auf die spezifische Cadmiumakkumulation erzielen ließ. Dabei wurden im Allgemeinen für Kultivierungen mit *C. glabrata* höhere spezifische Cadmiumakkumulationen erreicht als für Kultivierungen mit *S. pombe*.

5.3 Zellaufschluss

Zur Untersuchung der intrazellulären Cadmiumakkumulation wurde eine elementspezifische Analyse in Zellquerschnitten von *S. pombe* und *C. glabrata* durchgeführt. In den entsprechenden transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellpräparate (Abbildung 15) sind die zugehörigen Elementverteilungen für Cadmium (rot) und Schwefel (grün) dargestellt.

Die Analysen zeigen, dass die Hefen *S. pombe* und *C. glabrata* das Cadmium intrazellulär anreichern. Für beide Hefestämme war dabei weder eine Cadmiumadsorption an der Zelloberfläche, noch eine Anreicherung von Cadmium im Periplasma zu beobachten. Schwefel war entsprechend der allgemeinen Zusammensetzung von biologischen Komponenten im gesamten Zellquerschnitt nachweisbar.

²⁷ Die zweimalige Zugabe von $0,5 \text{ mM}$ Cadmium entspricht einer gesamten Cadmiumkonzentration von $112 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

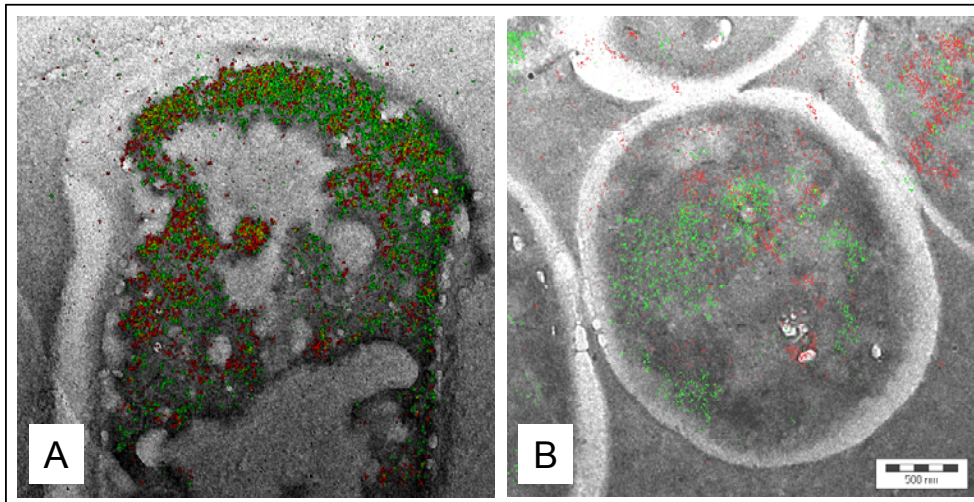


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Analysen mittels EFTEM ESI von (A) *S. pombe* und (B) *C. glabrata*; Cadmiumverteilung ist in rot, Schwefelverteilung in grün dargestellt.

Die Analysen ermöglichen dabei ausschließlich Aussagen über die Anwesenheit von Cadmium und Schwefel. Die Bildung von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln und der Nachweis kristalliner Strukturen sind aufgrund der Art der Probenpräparation technisch nicht möglich.

Die Ergebnisse der EFTEM ESI Untersuchungen wurden durch Resultate der elektronenmikroskopischen Analysen mittels TEM EDX bei *C. glabrata* bestätigt.

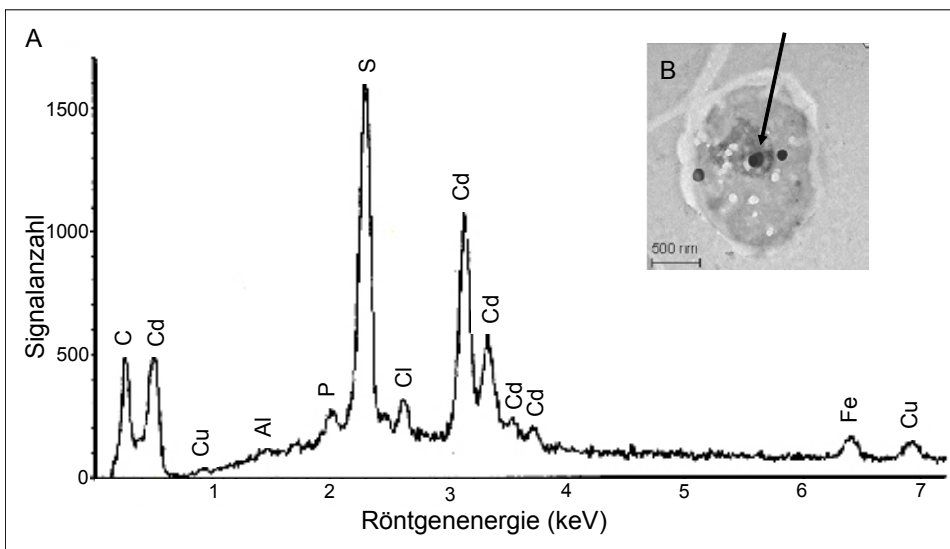


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Analysen mittels TEM EDX von *C. glabrata*: (A) EDX-Spektrum, (B) TEM-Aufnahme der untersuchten Zelle.

Die Abbildung 16 zeigt die Elementzusammensetzung für einen intrazellulären Analysepunkt. Dieser ist in der TEM-Aufnahme mit einem Pfeil gekennzeichnet. Dabei konnten sowohl Cadmium wie auch Schwefel im Zellinneren nachgewiesen

werden. Cadmium wurde dabei an den Röntgen-Linien $L_{\alpha 1}$ (3,133 eV), $L_{\beta 1}$ (3,316 eV) und $L_{\beta 2}$ (3,528 eV) eindeutig identifiziert.

Die elektronenmikroskopischen Analysen bestätigen, dass zur Freisetzung und Isolierung der biogenen Cadmiumsulfid-Partikel ein vollständiger Zellaufschluss notwendig ist.

5.3.1 Ergebnisse der Aufschlussverfahren

Zur Isolierung der intrazellulär vorliegenden Cadmiumsulfid-Partikel wurden unterschiedliche Zellaufschluss-Verfahren getestet. Diese wurden entsprechend ihres Aufschlussprinzips in chemische, thermische, mechanische und enzymatische Verfahren unterteilt. Die Biomasse für den Zellaufschluss stammte dabei aus unterschiedlichen Kultivierungen. Sie variierte daher in ihrem spezifischen Cadmiumgehalt. Zur Ermittlung der Aufschlusseffektivität wurde der prozentuelle Anteil des freigesetzten Cadmiums am spezifischen Cadmiumgehalt der Zellen als Bezugsgröße gewählt:

$$\text{Cadmiumfreisetzung [\%]} = \frac{\text{Masse (freigesetztes Cadmium nach Aufschluss)}}{\text{Masse (akkumuliertes Cadmium im Pellet)}} \cdot 100$$

Zur Bewertung der Qualität der durchgeführten Analysen wurde die Cadmiumwiederfindung berechnet. Hierbei wurde eine Massenbilanz über alle Aufschlussfraktionen erstellt. Bei den Versuchsdurchführungen sollte die prozentuale Wiederfindung bei mindestens 80 % liegen.

$$\text{Cadmiumwiederfindung [\%]} = \frac{\sum \text{Masse}_i (\text{Cadmium nach Aufschluss})}{\text{Masse (akkumuliertes Cadmium im Pellet)}} \cdot 100$$

Das Ziel dieses Arbeitsabschnittes bestand in der Entwicklung eines Aufschlussverfahrens, bei dem eine möglichst hohe Cadmiumfreisetzung erfolgt. Bei dem Zellaufschluss sollte die Peptidschicht der Nanopartikel möglichst unbeschädigt erhalten bleiben, um einer Destabilisierung der Nanopartikel entgegenzuwirken. Die Aufschlussversuche wurden separat sowohl mit *S. pombe* wie auch mit *C. glabrata* durchgeführt. Die experimentell ermittelten Daten dienten der Bestimmung der Cadmiumfreisetzung und damit der Bewertung der unterschiedlichen Aufschlussmethoden.

Zu den chemischen Aufschlussverfahren zählte der Einsatz der Lösungsmittel n-Hexan, Chloroform und n-Octanol. Der spezifische Cadmiumgehalt der eingesetzten Zellpellets betrug 6,62 mgCd/g BTM für *S. pombe* und 10,5 mgCd/g BTM für *C. glabrata*. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die spezifische Cadmiumfreisetzung je Gramm eingesetzter Biotrockenmasse in Abhängigkeit des eingesetzten Lösungsmittels.

Lösungsmittel	<i>S. pombe</i> mg·g ⁻¹	<i>C. glabrata</i> mg·g ⁻¹
n-Hexan	0,038	0,59
Chloroform	0,041	0,79
n-Octanol	0,73	0,93

Tabelle 2: Spezifische Cadmiumfreisetzung nach Zellaufschluss unter Verwendung organischer Lösungsmittel.

Die aus den experimentellen Daten (Tabelle 2) berechnete prozentuale Cadmiumfreisetzung fiel für alle organischen Lösungsmittel sehr gering aus. Sie lag bei maximal 9 % der gesamten Cadmiummenge im Zellpellet. Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass es beim Zellaufschluss kaum zu einer sichtbaren Zellschädigung kommt. Diese Beobachtung deckt sich mit der geringen Cadmiumfreisetzung.

Eine höhere Cadmiumfreisetzung war bei Verwendung eines Natriumhypochlorit-Wasserstoffperoxid-Gemisches zu beobachten. Der spezifische Cadmiumgehalt der eingesetzten Zellpellets betrug auch hier 6,62 mgCd/g BTM für *S. pombe* und 10,5 mgCd/g BTM für *C. glabrata*. Nach dem Aufschluss wurde für *S. pombe* eine freigesetzte Cadmiummenge von 3,73 mgCd/g BTM ermittelt. Daraus ergab sich eine prozentuale Cadmiumfreisetzung von 56 %. Für *C. glabrata* entsprach die freigesetzte Cadmiummenge 3,46 mg/g BTM. Daraus ergab sich eine Cadmiumfreisetzung von 33 %. Allerdings war aufgrund der eingesetzten Chemikalien beim Zellaufschluss eine Schädigung der Peptidhülle zu erwarten. Diese Schädigung war unerwünscht, da sie in einer Destabilisierung der Nanopartikel resultieren kann.

Einen Zellaufschluss unter Erhalt der schützenden Peptidhülle der Nanopartikel versprochen dagegen thermische, mechanische und enzymatische Verfahren. Der in

der Literatur im Zusammenhang mit Hefen beschriebene Kälteaufschluss [23] führte zu einer geringen Cadmiumfreisetzung. Die Untersuchungen ergaben eine prozentuale Cadmiumfreisetzung von ca. 6 % (siehe Anhang C). Die geringen Werte deckten sich mit den Ergebnissen lichtmikroskopischer Untersuchungen, bei denen keine nennenswerte Zellzerstörung zu beobachten war.

Die höchsten Werte für die Cadmiumfreisetzung wurden bei den mechanischen Zellaufschluss-Verfahren durch den Einsatz einer Schwingmühle erzielt. Dabei wurden für den Schwingmühlen-Aufschluss unterschiedliche Versuchsparameter getestet (siehe Kapitel 4.4.1). Die Versuche wurden separat für Zellen von *S. pombe* und *C. glabrata* durchgeführt. Die besten Resultate wurden bei einem Aufschluss von 1,5 g Biomasse mit 7,5 g Glaskugeln erzielt. Für *S. pombe* wurden dabei 3,2 mgCd/g BTM freigesetzt. Entsprechend des spezifischen Cadmiumgehalts der eingesetzten Hefezellen von 4,9 mgCd/g BTM entsprach dies einer Cadmiumfreisetzung von ca. 66 % für *S. pombe*. Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen wurde für Versuche mit *C. glabrata* eine Cadmiumfreisetzung von ca. 30 %²⁸ erzielt. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigten hierbei, dass durch den Einsatz der Schwingmühle nahezu alle Zellen zerstört wurden (Abbildung 18).

Bei Verwendung eines enzymatischen Zellaufschlusses mittels Zymolase wurden für *S. pombe* ähnliche Werte wie unter Einsatz der Schwingmühle erzielt. Dabei wurden bis zu 50 %²⁹ der ursprünglichen Cadmiummenge freigesetzt. Enzymatische Aufschlüsse mit *C. glabrata* wurden nicht durchgeführt.

Die Cadmiumbestimmungen zur Ermittlung der Cadmiumfreisetzung wurden aus präparativen Gründen fast ausschließlich im flüssigen Medium durchgeführt. Daher wurde experimentell überprüft, dass die so ermittelte Cadmiumfreisetzung der akkumulierten Cadmiummenge durch die Zellen entsprach. Zu diesem Zweck wurde exemplarisch für einige Aufschlussproben der Cadmiumgehalt im Zellpellet untersucht. Die Resultate wurden ins Verhältnis zur Cadmiumabnahme im Medium

²⁸ Spezifischer Cadmiumgehalt der Hefezellen: 18,9 mgCd/g BTM; freigesetztes Cadmium entspricht 6,0 mgCd/g BTM.

²⁹ Spezifischer Cadmiumgehalt der Hefezellen: 3,1 mgCd/g BTM; freigesetztes Cadmium entspricht 1,5 mgCd/g BTM.

gesetzt. Die Analysen ergaben dabei für *S. pombe* eine Abweichung von ca. 10 %³⁰. Für Untersuchungen mit *C. glabrata* ergab sich eine Abweichung von ca. 3 %³¹.

5.3.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Zelllysates

Für eine TEM-Analyse wurde eine konzentrierte Zelllysate-Probe durch Ultraschall zerstäubt und auf einen Probenträger aufgetragen. Die Untersuchungen des Zelllysates von *C. glabrata* zeigten dabei in den Probentröpfchen das gemeinsame Vorliegen von Cadmium und Schwefel (Abbildung 17).

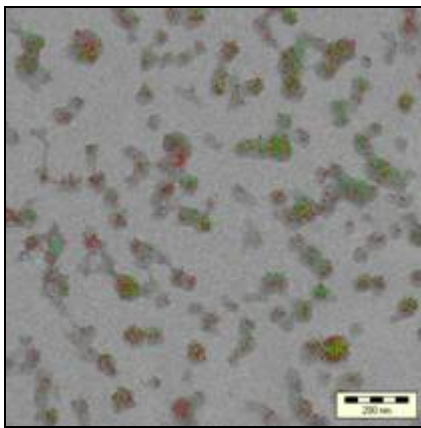


Abbildung 17: EFTEM ESI Analyse des Zelllysates von *C. glabrata* nach Kälteaufschluss und Probenkonzentrierung.

Der Durchmesser der in der Aufnahme sichtbaren dunklen Bereiche entspricht dabei dem Durchmesser der getrockneten Probentröpfchen. Ein Nachweis kristalliner Cadmiumsulfid-Nanopartikel steht noch aus.

5.3.3 Schnellmethode zur qualitativen Bewertung der Aufschlusseffizienz

Zur Bewertung der Effizienz der Aufschlussverfahren wurde neben einer Bestimmung der Cadmiumgehalte auch die Verringerung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm als Routineverfahren getestet. Die Untersuchungen ergaben für Zellaufschlüsse mittels Schwingmühle unter geeigneten Versuchsbedingungen eine Verringerung der optischen Dichte um 70 % im Vergleich zur Ausgangsprobe. Die Analyse des

³⁰ Cadmiumfreisetzung: 9,0 mg/g bei Analyse des Zellpellets, 9,4 mg/g bei Berechnung aus Medium.

³¹ Cadmiumfreisetzung: 19,39 mg/g bei Analyse des Zellpellets, 18,85 mg/g bei Berechnung aus Medium.

Cadmiumgehalt ergab eine Cadmiumfreisetzung von 66 %³². Dabei lag die Cadmiumfreisetzung in der gleichen Größenordnung wie die Verringerung der optischen Dichte.

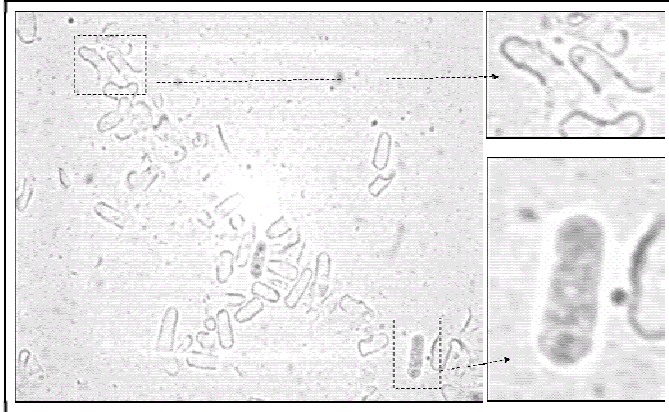


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahme der Proben von *S. pombe* nach Zellaufschluss mittels Schwingmühle. Bildausschnitt oben: Vollständig zerstörte Hefezellen, Bildausschnitt unten: Intakte Hefezelle.

Die Abbildung 18 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von Hefezellen nach einem Aufschluss mit der Schwingmühle. Darauf ist eine nahezu 100 %-ige Zellzerstörung erkennbar. Die Aufnahme ist repräsentativ für sämtliche Aufschlüsse mittels Schwingmühle unter den oben beschriebenen optimalen Versuchsbedingungen (siehe Kapitel 4.4.1).

Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ergibt sich durch die Messung der optischen Dichte ein qualitatives Bewertungsinstrument, um die Effizienz eines Zellaufschlusses mittels Schwingmühle festzustellen.

5.3.4 Zusammenfassung

Basierend auf den Ergebnissen der unterschiedlichen Aufschlussverfahren wurde der Einsatz einer Schwingmühle als Standardverfahren zum Zellaufschluss ausgewählt. Die Messung der Differenz der optischen Dichte hat sich dabei zur qualitativen Bewertung der Zellaufschluss-Effizienz bewährt.

³² Spezifischer Cadmiumgehalt der Hefezellen: 4,9 mgCd/g BTM; freigesetztes Cadmium entspricht 3,2 mgCd/g BTM.

5.4 Partikelreinigung

Der Schwerpunkt dieses Arbeitsbereiches lag in einem Vergleich verschiedener Verfahren zum Entfernen organischer Verunreinigungen wie z. B. intrazelluläre Proteine. Das Ziel bestand in einer möglichst verlustfreien Fraktionierung der Nanopartikel. Dazu wurde für verschiedene Verfahren die Änderung der Cadmium- und Proteinkonzentration in den Zellaufschluss-Proben analysiert. Als positiv wurden Reinigungsverfahren bewertet, die eine Reduktion der Proteinkonzentration kombiniert mit geringen Cadmiumverlusten ermöglichten. Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze werden getrennt nach dem jeweiligen Reinigungsprinzip dargestellt.

Zur Auswahl geeigneter Reinigungs- und Nachweismethoden fand eine Abschätzung der Versuchparameter basierend auf dem in Kapitel 2.1.1 vorgestellten Modells eines Cadmiumsulfid/Peptid-Komplex statt [7]. Demzufolge besitzt der Cadmiumsulfidkern einen Durchmesser von ca. 2 nm und besteht aus je 85 Cadmium- und Schwefelatomen [78]. Für das Molekulargewicht des Cadmiumsulfid-Kerns ergibt sich somit:

$$85 \cdot (M(\text{Cd}) + M(\text{S})) = 85 \cdot (112 + 32) \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \approx 12 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Die Peptidhülle besteht aus ca. 30 Phytochelatin-Molekülen der allgemeinen Struktur $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$. Für einen mittleren Wert mit $n = 3$ für Phytochelatine aus Hefen (siehe Kapitel 2.1.1) ergibt sich daraus folgendes Molekulargewicht der Peptidhülle:

$$30 \cdot [(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}] = 30 \cdot [(129 + 103) \cdot 3 + 57] \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \approx 23 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Das Molekulargewicht der Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe beträgt damit ca. 35 kDa. Die Abschätzung der spezifischen Anzahl gebildeter Nanopartikel und des zu erwartenden Peptidhüllenanteils am Gesamtproteingehalt im Zelllysate erfolgte aus der experimentell bestimmten spezifischen Cadmiumakkumulation von wenigen Milligramm Cadmium pro Gramm Biotrockenmasse in Kombination mit den oben beschriebenen Modellannahmen. Unter der Annahme, dass das akkumulierte Cadmium vollständig der Bildung von Cadmiumsulfid-Nanopartikeln dient, entstehen bis zu 10^{17} peptidbeschichtete Nanopartikel pro Gramm Biotrockenmasse. Daraus ergibt sich für die Phytochelatine ein Proteinanteil von ca. 20 % am Gesamtprotein im Zelllysate.

5.4.1 Elektrophoretische Verfahren

Neben den modellbezogenen Abschätzungen wurden elektrophoretische Untersuchungen durchgeführt, um zusätzliche Informationen über die Eigenschaften des Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes zu gewinnen. Dazu zählen z. B. Informationen über die Oberflächenladung der Proteinhülle und das effektive Molekulargewicht des Gesamtkomplexes. Diese Erkenntnisse unterstützen die Auswahl geeigneter Reinigungsverfahren bzw. Versuchsparameter für die Partikelanalyse.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Gelelektrophorese zur Bestimmung des Molekulargewichtes des Komplexes zusammengefasst. Um Aussagen über charakteristische Proteinbanden im Bandenmuster zu treffen, wurden die Versuche parallel mit Zelllysaten aus cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Kultivierung durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen, dass dabei ein Unterschied in der Proteinzusammensetzung in den Proben in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der Proteinkomponenten nachweisbar ist.

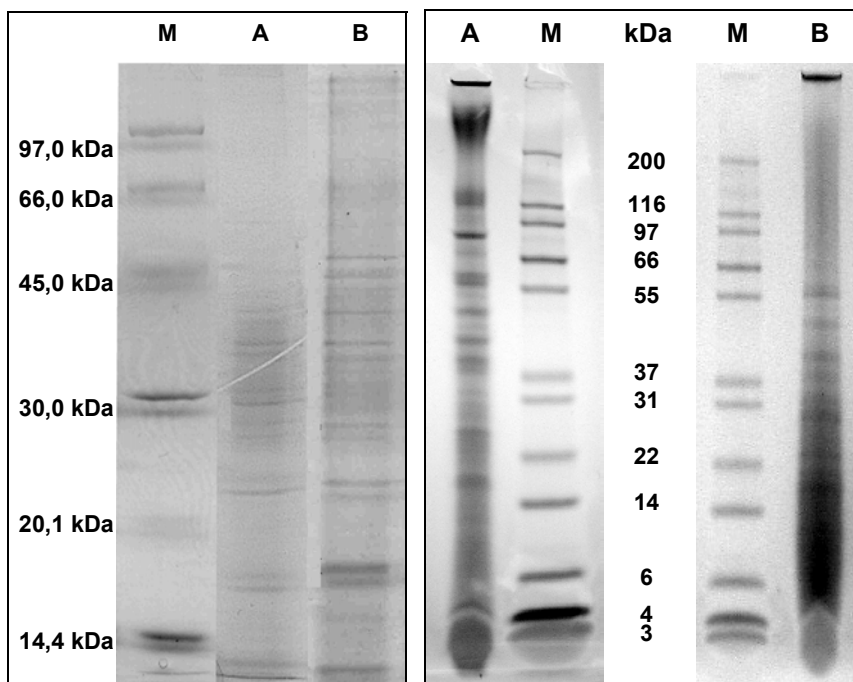


Abbildung 19: (A) Gelelektrophorese (SDS PAGE) von *C. glabrata* aus Kultivierung mit 3,5 mM Cadmium, Zelllysate nach Kälteaufschluss und Gefriertrocknung, M: Proteinstandard, A: 20 µL cadmiumfreies Zelllysate, B: 5 µL cadmiumhaltiges Zelllysate. (B) Gelelektrophorese (SDS PAGE) von cadmiumhaltigem Zelllysate von *S. pombe*, M: Proteinmarker, A: Zelllysate direkt nach Zellaufschluss, B: Tiefgekühltes Zelllysate.

Die Abbildung 19 zeigt die mittels Gelelektrophorese (SDS PAGE) erzielten Bandenmuster unterschiedlicher Zelllysate-Proben. Zunächst wurde untersucht, inwieweit sich nach der Cadmiumzugabe eine Änderung des Stoffwechsels in der

Proteinzusammensetzung widerspiegelt bzw. ob die Änderungen gravierend genug sind, um mittels gelelektrophoretischen Methoden sichtbar zu werden. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 (A) dargestellt. In Bahn M ist das Bandenmuster eines Proteinmarkers und die zugehörigen Molekulargewichte der Standardproteine zu sehen. Bahn A zeigt das Bandenmuster einer cadmiumfreien Zellysate-Probe und Bahn B das entsprechende Muster eines cadmiumhaltigen Zellysates. Das Zellysate stammte aus einer Reaktorkultivierung von *C. glabrata* unter Zugabe von 3,5 mM Cadmium zum Kultivierungsmedium.

Die beiden Bandenmustern A und B zeigen viele Gemeinsamkeiten. Bei genauerer Betrachtung sind allerdings Abweichungen erkennbar. Bahn B zeigt im Zellysate aus cadmiumhaltiger Kultur zwei relativ große Proteine mit Molekulargewichten von 45 und 47 kDa und ein kleineres mit 23 kDa. Diese waren im cadmiumfreien Zellysate nicht nachweisbar. Bei dem Zellysate von Zellen aus cadmiumfreier Kultivierung wurde durch den Zellaufschluss ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kDa freigesetzt, das im Zellysate cadmiumhaltiger Zellen nicht zu beobachten war. Das Ergebnis zeigt, dass Cadmium in gewissem Umfang zu einer Änderung der Stoffwechselaktivitäten führte. Diese Änderungen waren gravierend genug, um bei einer Analyse der Proteinzusammensetzung mittels Gelelektrophorese detektierbar zu sein.

Im zweiten Teil der gelelektrophoretischen Analysen (SDS PAGE) wurde untersucht, ob durch die Lagerungsbedingungen die Beschaffenheit der Zellysate-Proben beeinflusst wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 (B) dargestellt. Auf Bahn M war ein Proteinmarker aufgetragen. Bahn A zeigt das Bandenmuster für cadmiumhaltiges Zellysate von *S. pombe* direkt nach dem Zellaufschluss und Bahn B entsprechender zuvor tiefgekühlter Proben. Bei den tiefgekühlten Proben war eine deutliche Verschiebung zu Proteinkomponenten mit geringerem Molekulargewicht zu beobachten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteine durch das Gefrieren geschädigt wurden.

Neben der SDS PAGE wurden gelelektrophoretische Untersuchungen mit isoelektrischer Fokussierung durchgeführt. Die Abbildung 20 zeigt ein Gel mit den entsprechenden Bandenmustern cadmiumfreier und cadmiumhaltiger Proben. Dabei basiert die Probenfraktionierung auf dem isoelektrischen Punkt (pI) der in der Probe enthaltenen Proteine.

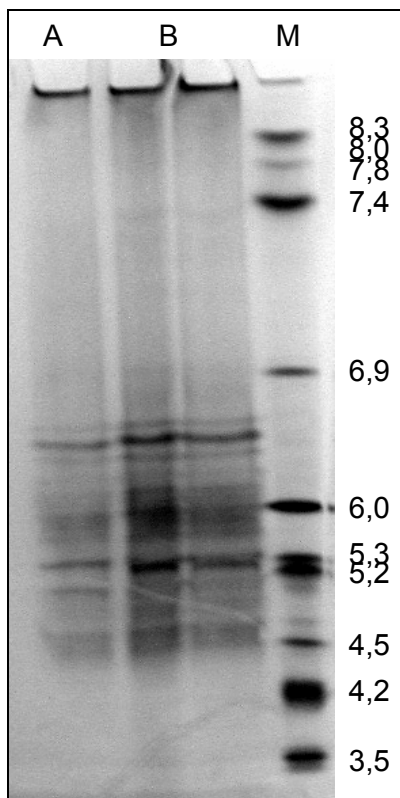


Abbildung 20: Gelelektrophoretische Proteintrennung mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF), M: Proteinmarker, A: 10 μ L cadmiumhaltiges und B: 2x je 10 μ L cadmiumfreies Zellysats von *S. pombe*.

Auf Bahn M war ein Proteinmarker aufgetragen. Bahn A zeigt das Bandenmuster für cadmiumhaltiges Zellysats von *S. pombe* und Bahn B das Bandenmuster des cadmiumfreien Zellysats. Ein Vergleich der Bandenmuster zeigte keinen nennenswerten Unterschied zwischen den beiden Proben.

Weitergehende Aussagen auf Grundlage der gelelektrophoretischen Methoden waren nicht möglich. Die Cadmiumkonzentration war für einen Nachweis aufgrund der geringen Probenmenge und den Verlusten bei der Gelextraktion zu gering. Eine Identifikation der cadmiumhaltigen Bande(n) bei den verschiedenen Gelen war daher nicht möglich.

5.4.2 Thermische Verfahren

Im Rahmen der thermischen Reinigungsverfahren wurden die Effekte einer Hitzefällung und einer Gefrierfällung untersucht. Die Hitzefällung führte dabei bei Zellysats von *S. pombe* zu sehr guten Ergebnissen. Durch die Erhitzung des Lysats konnten ca. 90 % der Proteine entfernt werden, wobei die Cadmiumverluste mit

< 10 % nahezu unverändert blieben (Anhang C). Bei *C. glabrata* erwies sich dieses Verfahren als ungeeignet. Durch die Erhitzung wurden nahezu 100 % der Proteine und des Cadmiums aus der flüssigen Phase entfernt.

Die Gefrierfällung führte bei Proben von *S. pombe* zu einer Proteinfällung von ca. 80 % des Gesamtproteins. Der Cadmiumverlust betrug ca. 25 %. Für Proben von *C. glabrata* liegen keine experimentellen Daten vor.

5.4.3 Chromatographische Verfahren

Bei den chromatographischen Verfahren wurden die Größenausschluss- und die Ionenaustauschchromatographie auf ihre Eignung zur Partikelreinigung untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass chromatographische Trennverfahren stets mit einer Probenverdünnung durch die jeweilige Pufferlösung verbunden sind. Im Anschluss an ein chromatographisches Trennverfahren ist daher häufig eine Probenkonzentrierung erforderlich. Die Konzentrierung führt dabei unweigerlich zu einer Erhöhung der Salzkonzentration in den Proben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Probenkonzentrierung eine Gefriertrocknung eingesetzt. Um einer Proteinfällung aufgrund hoher Salzkonzentrationen entgegenzuwirken, wurden die Proben daher bei Bedarf vor einer Gefriertrocknung dialysiert.

Größenausschlusschromatographie (SEC)

Bei der SEC besteht unter geeigneten Versuchsparametern für Proteine ein Zusammenhang zwischen dem Molekulargewicht der Proteinkomponenten und der Retentionszeit [63]. Auf diesen Zusammenhang wurde bereits in Kapitel 4.4.3 hingewiesen. Vor der Probenfraktionierung wurde mit Hilfe von Proteinstandards eine Korrelation zwischen der Retentionszeit und dem Molekulargewicht der Proteine bestimmt. Das nachfolgende Diagramm zeigt die entsprechende Referenzkurve eine analytische Säule (Spezifikationen: Kapitel 4.4.3) mit 67 mM Phosphatpuffer als mobile Phase.

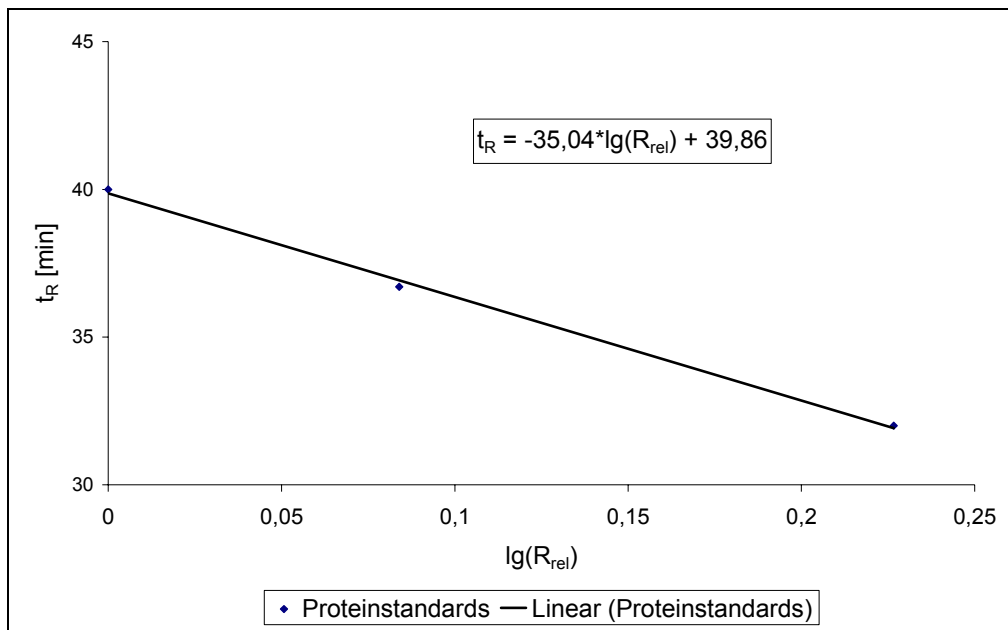


Abbildung 21: Bestimmung der Referenzfunktion zwischen Partikelradius und Retentionszeit, analytische Säule, 67 mM Phosphatpuffer

Die Abbildung 21 zeigt einen Zusammenhang zwischen der Retentionszeit und dem Logarithmus des relativen Proteinradius bei Verwendung eines 67 mM Phosphatpuffers.

In Abbildung 22 ist das Ergebnis einer Fraktionierung des Zelllysates von *S. pombe* unter Einsatz der analytischen Säule dargestellt. Die Graphen zeigen den Verlauf der Absorption bei 300 nm. Die Kurvenverläufe dienen dem Nachweis proteinhaltiger Fraktionen. Die Fraktionierungsdauer betrug jeweils 60 Minuten.

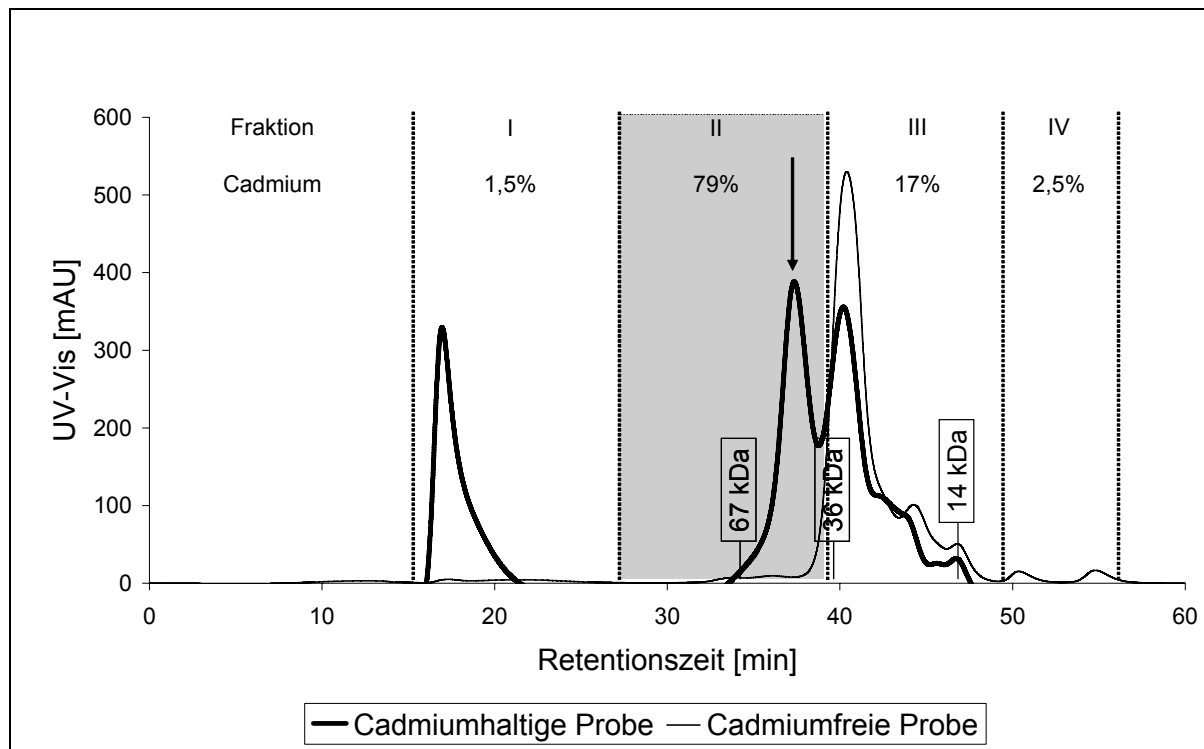


Abbildung 22: SEC, *S. pombe*, hitzebehandeltes Zellysate nach mechanischem Aufschluss einer cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Probe, 67 mM Phosphatpuffer.

Dabei wurde ein Vergleich der Absorption bei cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Proben in Abhängigkeit von der Retentionszeit durchgeführt. Der Vergleich der Kurvenverläufe zeigte bei einer Retentionszeit von ca. 37 Minuten einen signifikanten Peak für die cadmiumhaltige Probe. Ausgehend von dem Chromatogramm wurden während der SEC vier Fraktionen gesammelt und auf ihren Cadmiumgehalt untersucht. Die entsprechenden Fraktionen sind in dem obigen Diagramm gekennzeichnet. Aufgrund des berechneten Molekulargewichtes von 35 kDa wurden die Nanopartikel/Peptid-Komplexe in der 2. Fraktion erwartet.

Die Analyse des Cadmiumgehaltes in den Fraktionen zeigte eine eindeutige Anreicherung von Cadmium in der 2. Fraktion. Insgesamt konnten 80 % des detektierten Cadmiums in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Bei der SEC traten Cadmiumverluste von ca. 20 % auf. Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Probenfraktionen konnte nur qualitativ über das UV-Vis Signal erfolgen, da die Proteinkonzentration in den Fraktionen unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Proteinquantifizierungskits von $0,02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ lag.

Die Abbildung 23 zeigt das Ergebnis einer Fraktionierung des Zellysates von *C. glabrata* unter identischen Versuchsbedingungen. Dabei wird der Verlauf der

Absorption bei 300 nm in Abhängigkeit von der Retentionszeit dargestellt. Die Fraktionierungsdauer betrug wie bei den Proben von *S. pombe* 60 Minuten.

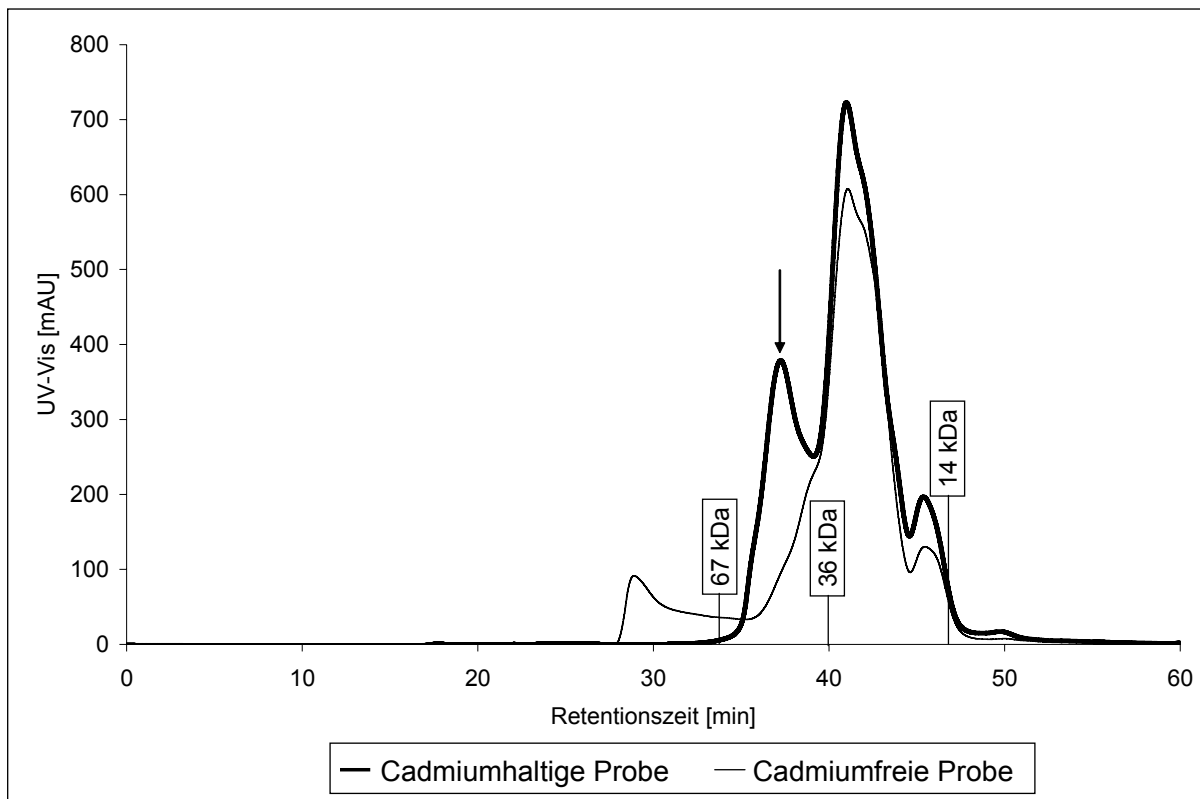


Abbildung 23: SEC, *C. glabrata*, Zellysate nach Kälteaufschluss einer cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Probe, 67 mM Phosphatpuffer.

Ein Vergleich der Messdaten zeigte einen signifikanten Peak nach einer Retentionszeit von ca. 37 Minuten. Dieser Peak war zuvor bereits bei Proben von *S. pombe* beobachtet worden (Abbildung 22). Eine Untersuchung der Cadmium- und Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Fraktionen wurde für *C. glabrata* nicht durchgeführt.

Zusätzlich wurden Fraktionierungsversuche mit einer halbpräparativen Säule durchgeführt. Diese ermöglicht aufgrund ihres größeren Säulendurchmessers die Auftragung einer größeren Probemenge. Statt maximal 100 μL können hier bis zu 500 μL Probevolumen aufgetragen werden. Als mobile Phase wurde die Eignung eines 1 mM und eines 67 mM Phosphatpuffers untersucht. Dazu wurde vor der Probenfraktionierung wiederum mit Hilfe von Proteinstandards eine Korrelation zwischen der Retentionszeit und dem Molekulargewicht der Proteine bestimmt. Dabei war lediglich für die höhere Pufferkonzentration ein Zusammenhang zwischen Proteinradius und Retentionszeit nachzuweisen. Die entsprechenden

Chromatogramme befinden sich in Anhang C. Es wird vermutet, dass es aufgrund der geringen Pufferkonzentration zu Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Säulenmaterial kam. Bei der Fraktionierung des Zelllysats von *C. glabrata* zeigte sich eine schlechte Trennleistung bei Einsatz der halbpräparativen Säule mit 67 mM Phosphatpuffer als mobiler Phase (siehe Anhang C). Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Zusätzlich zum Absorptionsdetektor bestand die Möglichkeit, die SEC-Fractionen online mittels eines Fluoreszenzdetektors zu analysieren. Versuche mit kommerziellen Quantenpunkten (siehe Kapitel 4.1.3) zeigten jedoch, dass die Sensitivität des Detektors nicht ausreicht, um die Quantenpunkte zu detektieren. Bei den entsprechenden Analysen war erst bei einer relativ hohen Probenkonzentration ein schwaches Fluoreszenzsignal zu beobachten. Der angeschlossene Fluoreszenzdetektor war somit zur Detektion der nanopartikelhaltigen Fraktion nicht geeignet.

Ionenaustauschchromatographie (IEC)

Wie bereits in Kapitel 4.4.3 erläutert, basiert das Trennprinzip der IEC auf den Wechselwirkungen der zellulären Bestandteile mit der stationären Phase der Chromatographiesäule. Vor der IEC wurde eine Abschätzung der Nettoladung der Peptidhülle des Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes in Abhängigkeit vom pH-Wert der umgebenden Lösung durchgeführt. Diese diente der Entscheidung zwischen dem Einsatz eines Anionen- oder Kationenaustauschers. Entsprechend der Zusammensetzung von Phytochelatinen besteht die Peptidhülle aus den Aminosäuren Glutaminsäure (Glu), Glycin (Gly) und Cystein (Cys). Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die pK_s -Werte dieser Aminosäuren.

Aminosäure	Glutaminsäure	Glycin	Cystein
$pK_{s,1}$ (α -COOH)	2,10	2,35	1,92
$pK_{s,R}$ (R Gruppe)	4,07	-	8,33
$pK_{s,2}$ (α -NH ₃ ⁺)	9,47	9,78	10,78

Tabelle 3: pK_s -Werte der Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein [161].

Für die Abschätzung der Nettoladung wurde ausschließlich die Oberflächenladung in neutralen und basischen Lösungsmitteln betrachtet. Saure Medien kamen für die

Chromatographie nicht in Betracht, da eine Absenkung des pH-Wertes aufgrund der besseren Löslichkeit von Cadmiumsulfid bei niedrigeren pH-Werten zur Auflösung des Cadmiumsulfid-Kerns führen könnte [186]. Basierend auf den pK-Werten sind in Abhängigkeit vom pH-Wert die folgenden Nettoladungen der Aminosäuren zu erwarten (Tabelle 4):

	Glutaminsäure	Glycin	Cystein
Erwartete Nettoladung bei pH 7	$pK_{S,R} < pH < pK_{S,2}$ Nettoladung: Neutral bis negativ 0 bis -1	$pK_{S,1} < pH < pK_{S,2}$ Nettoladung: Neutral bis negativ Ladung 0 bis -1	$pK_{S,1} < pH < pK_{S,R}$ Nettoladung: Positiv Ladung +2 bis +1
Erwartete Nettoladung bei pH 8	$pK_{S,R} < pH < pK_{S,2}$ Nettoladung: Negativ, stärker dissoziiert im Vergleich zu pH 7; Ladung \rightarrow -1	$pK_{S,1} < pH < pK_{S,2}$ Nettoladung: Negativ, stärker dissoziiert im Vergleich zu pH 7; Ladung \rightarrow -1	$pH \approx pK_{S,R}$ Nettoladung: Positiv bis neutral, pH-Wert entspricht nahezu pK_R ; Ladung +1 bis 0

Tabelle 4: Abschätzung der Nettoladung der Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein in Abhängigkeit des pH-Wertes.

Zusammenfassend ist damit festzustellen, dass bei Lösungsmitteln mit neutralem pH-Wert aufgrund der Aminosäurezusammensetzung eine negative Nettoladung der Komplexoberfläche zu erwarten ist. Die negative Nettoladung wird durch eine Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich verstärkt. Basierend auf dieser Abschätzung wurde für die IEC ein Anionenaustauscher eingesetzt.

Zur IEC wurden Zellysate-Proben von *C. glabrata* verwendet. Dabei wurde für die Säulenbeladung und Probenelution der pH-Wert der jeweiligen Pufferlösungen variiert.

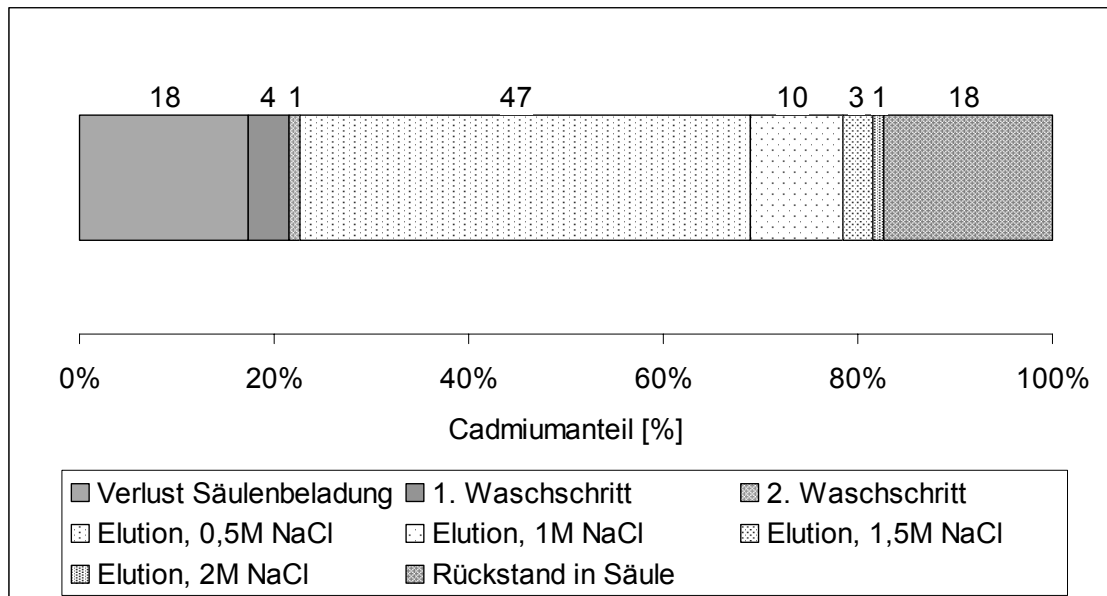


Abbildung 24: Ergebnisse für IEC mit maximaler Cadmiumwiederfindung, Zelllysate von *C. glabrata*: Darstellung der Cadmiumverluste (dunkel) und der eluierten Cadmiumanteile (hell).

Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis einer IEC in Abhängigkeit der Cadmiumkonzentrationen der verschiedenen Fraktionen. Der Balken in der Grafik symbolisiert das gesamte Cadmium, welches auf die Chromatographiesäule aufgegeben wurde. Die eluierten Cadmiumanteile sind hell dargestellt, die dunklen Felder zeigen die aufgetretenen Cadmiumverluste. Entsprechend der Ergebnisse in Vorversuchen erfolgten die Säulenbeladung bei pH 7,0 und die Probenelution bei pH 9,0. Unter diesen Versuchsparametern waren die geringsten Cadmiumverluste zu beobachten.

Insgesamt betrug der Cadmiumverlust somit selbst unter den günstigsten Versuchsbedingungen ca. 40 %. Bei der Beladung der Säule konnten bereits 18 % des in der Probe enthaltenen Cadmiums nicht an die Säule gebunden werden und gingen somit unmittelbar verloren. Durch die Waschschriffe traten weitere Verluste von 5 % des gesamten Cadmiumgehalts auf. In den verschiedenen Elutionsfraktionen waren insgesamt maximal 61 % der ursprünglichen Cadmiummenge enthalten. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration in den unterschiedlichen Fraktionen war nicht möglich, da diese unterhalb der Nachweisgrenze des eingesetzten Proteinkits von $0,02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ lag.

Die Cadmiumwiederfindung betrug 82 % der ursprünglichen Cadmiummenge unter Berücksichtigung sämtlicher IEC-Fractionen. Es wird vermutet, dass es aufgrund der hohen Salzkonzentration des Elutionspuffers zu Fällungsreaktionen in der

Chromatographiesäule gekommen ist. Die entstehenden Agglomerate waren möglicherweise zu groß für die Porenstruktur der Säulenmatrix und konnten somit nicht mehr eluiert werden.

Aufgrund der hohen Cadmiumverluste wurde die IEC daher nicht weiter zur Partikelreinigung eingesetzt. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass sich die Cadmiumverluste durch eine Optimierung der Versuchsbedingungen und ggf. der Verwendung eines anderen Säulenmaterials reduzieren lassen.

5.4.4 Dichtegradientenzentrifugation

Neben den chromatographischen Verfahren wurde die Eignung einer Dichtegradientenzentrifugation zur Partikelreinigung untersucht. Bei der Dichtegradientenzentrifugation handelt es sich um eine Methode zur Proteinfractionierung, die auch zur Isolierung von intrazellulären Zellkomponenten wie z. B. Mitochondrien eingesetzt wird. Für die Fraktionierung von biologischem Material werden dabei in der Regel Saccharose- oder Cäsiumchlorid-Gradienten verwendet [178]. Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde Saccharose als Gradientenmaterial gewählt, da Saccharose nicht ionisch und weitgehend inert gegenüber biologischen Zellbestandteilen ist. Dadurch sollte einer Proteinfällung durch hohe Salzkonzentrationen, dem so genannten „Aussalzen“ von Proteinen, vorgebeugt werden.

Entsprechend der Literaturangaben liegt die Dichte der meisten Proteinkomponenten im Bereich von ca. 1000 – 1300 g·L⁻¹ [176]. Für die Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe ist im Vergleich dazu aufgrund der Dichte von Cadmiumsulfid (ca. 4800 g·dm⁻³) eine höhere Dichte zu erwarten. Auf diesen Aspekt wird in der Diskussion (Kapitel 7.1.3) ausführlicher eingegangen. Die Abbildung 25 zeigt eine Proteinfractionierung in einem 20 bis 50 %-igen Saccharose-Gradienten. Dies entspricht einem Dichtegradienten von ca. 1080 bis 1190 g·L⁻¹ (Anhang C). Als Probe wurde ein Zellysats von *C. glabrata* nach einem Kälteaufschluss verwendet.

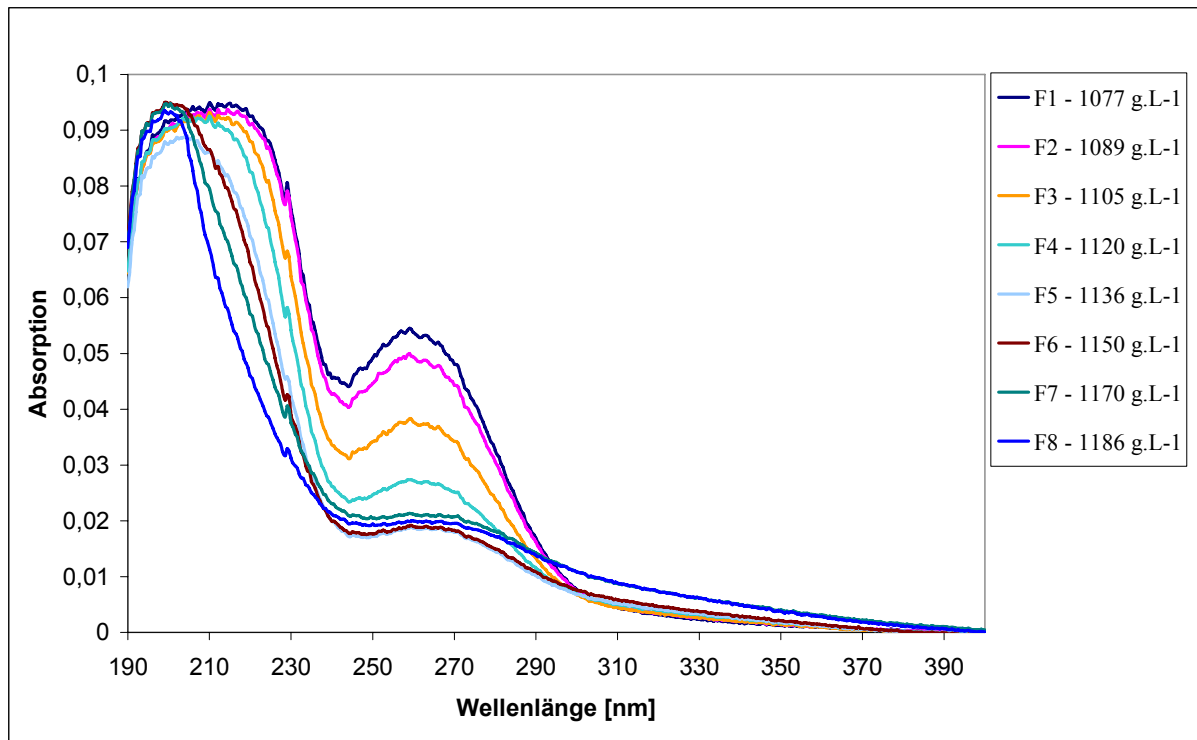


Abbildung 25: Dichtegradientenzentrifugation, *C. glabrata*, Zellysats nach Kälteaufschluss, Fraktionierung (F1 – F8) in einem 20 - 50 %-igen Saccharose-Gradienten.

Entsprechend der Absorptionsspektren wurden Proteine in den Fraktionen 1 bis 4 nachgewiesen. Diese Fraktionen weisen eine entsprechende Dichte von 1077 bis 1120 g·L⁻¹ auf. Die Absorptionsspektren zeigten, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Proteinfractionierung basierend auf der unterschiedlichen Dichte der intrazellulären Proteinkomponenten möglich war.

Bei der Dichtegradientenzentrifugation handelt sich um einen viel versprechenden Ansatz zur Partikelreinigung. Allerdings müssen nachfolgende Untersuchungen zeigen, dass der Dichteunterschied der Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe im Vergleich zu den übrigen intrazellulären Proteinkomponenten ausreichend groß ist. Nur unter dieser Voraussetzung ist bei diesem Verfahren eine Anreicherung von Cadmium in einer bestimmten Fraktion möglich. Ebenso steht die anschließende Reduzierung der hohen Saccharosekonzentration in den Probenfraktionen, z. B. durch den Einsatz von Dialyseverfahren, aus. Zur Bewertung der Dichtegradientenzentrifugation trägt bei, ob bzw. in welchem Umfang Cadmiumverluste bei dem Entfernen der Saccharose auftreten.

5.4.5 Weitere Reinigungsverfahren

Neben den bisher beschriebenen Reinigungsverfahren wurden zwei weitere Reinigungsmethoden getestet. Die erste Methode basierte auf einer Fällungsreaktion durch eine gezielte Beeinflussung des pH-Wertes. Im zweiten Ansatz wurde eine Ammoniumsulfat-Fällung untersucht. Ammoniumsulfat wird z. B. bei der Reinigung intrazellulärer Enzyme unter Erhalt der enzymatischen Aktivität eingesetzt [187].

Beide Verfahren erwiesen sich zur Reinigung der Proben von *S. pombe* aufgrund hoher Cadmiumverluste als ungeeignet. Bei der Ammoniumsulfat-Fällung kam es zu Cadmiumverlusten von ca. 50 %. Gezielte Absenkungen des pH-Wertes führten zu Cadmiumverlusten von 50 – 80 %. Die entsprechenden Grafiken befinden sich in Anhang C. Für Proben von *C. glabrata* wurden diese Versuche nicht durchgeführt.

5.4.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich durch den Einsatz der Größenausschlusschromatographie ein großer Anteil der organischen Verunreinigungen aus den Zellysate-Proben entfernen ließ. Dabei traten im Vergleich zu den anderen Reinigungsverfahren die geringsten Cadmiumverluste auf. Durch die SEC wurden damit gute Bedingungen für nachfolgende Verfahren zur Partikelcharakterisierung geschaffen. Zum Entfernen der aus der Pufferlösung stammenden Salze konnten geeignete Parameter für eine anschließende Dialyse entwickelt werden.

Der Einsatz der Hitzefällung bei Zellysate von *S. pombe* ermöglichte das Entfernen von Proteinverunreinigungen ohne nennenswerte Cadmiumverluste. Bei *C. glabrata* führte sie zur Fällung sämtlicher Proteine und Cadmiumkomponenten in der Probe. Die Hitzefällung wurde daher für Proben von *S. pombe* als erster Reinigungsschritt eingesetzt, gefolgt von chromatographischen Reinigungsschritten.

5.5 Partikelcharakterisierung

Im Rahmen der Partikelcharakterisierung sind Untersuchungen zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung und der Fluoreszenzeigenschaften der Partikel durchgeführt worden. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

5.5.1 Partikelgrößenverteilung

Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und differentieller Mobilitätsanalyse (DMA).

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels dynamischer Lichtstreuung wurde die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) eingesetzt. Die Abbildung 26 zeigt die Partikelgrößenverteilung bei hitzebehandeltem Zellysat von *S. pombe*. In der Grafik ist das relative Volumen der detektierten Fraktionen in Abhängigkeit des zugehörigen Partikeldurchmessers dargestellt.

Es ist darauf hinzuweisen, dass bei der PCS die Intensitäten auf die höchste Signalintensität normiert dargestellt werden (Maximalwert: 100). Daher ist mittels PCS lediglich ein qualitativer Vergleich der Partikelgrößenverteilung in verschiedenen Proben möglich. Quantitative Aussagen hinsichtlich der Häufigkeit der unterschiedlichen Partikel können durch einen Vergleich der Kurvenverläufe nicht getroffen werden.

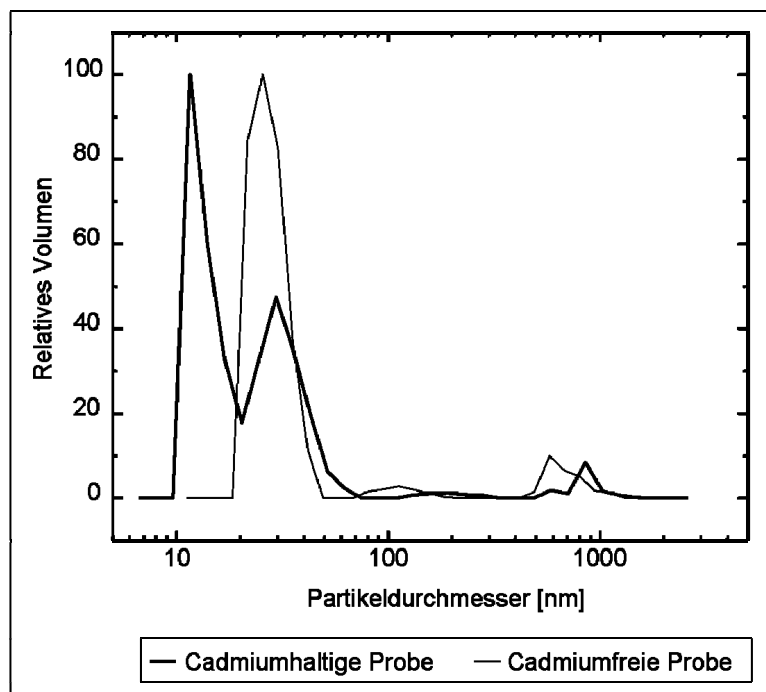


Abbildung 26: Partikelgrößenverteilung, Proben von *S. pombe*, Zellysat aus cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Kultivierung nach Hitzefällung; Bestimmung mittels PCS.

Der Vergleich der Verteilungskurve für cadmiumhaltige Zellysat-Proben von *S. pombe* mit cadmiumfreien Zellysat als Negativstandard zeigt ein signifikantes Maximum bei

einem Partikeldurchmesser von 10 – 20 nm, der in der cadmiumfreien Probe im Vergleich zu Fraktionen mit größerem Partikeldurchmesser vernachlässigbar zu sein scheint. Ansonsten zeigten beide Kurvenverläufe einen nahezu identischen Verlauf. Die Schlussfolgerungen, die aufgrund dieser Daten möglich waren, werden in Kapitel 7.1.4 diskutiert. Die Untersuchung der Partikelgrößenverteilung bei Zellysate von *C. glabrata* ergab ein ähnliches Resultat wie bei Proben von *S. pombe*. Auch hier war für cadmiumhaltiges Zellysate ein Maximum für Partikelgrößen kleiner 10 nm zu beobachten. Die entsprechende Messkurve befindet sich in Anhang C.

Zum Vergleich wurden mittels PCS die Partikelgrößenverteilungen von kommerziellen Quantenpunkten (siehe Kapitel 4.1.3) bestimmt. Die entsprechende Partikelgrößenverteilung ist in Abbildung 27 dargestellt.

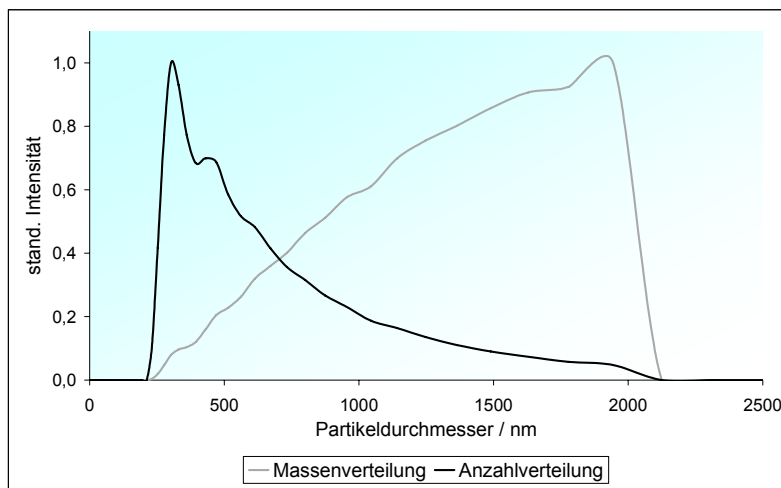


Abbildung 27: Partikelgrößenverteilung, kommerzielle Quantenpunkte [188]; Bestimmung mittels PCS.

Die Abbildung zeigt die Anzahl- und Massenverteilung der Partikelgrößenverteilung der Quantenpunkte. Die Analyse ergab eine sehr breite Partikelgrößenverteilung mit Partikeldurchmesser von ca. 200 nm bis 2 μm . Das Maximum in der Anzahlverteilung lag dabei bei einem Durchmesser von ca. 300 - 400 nm. Der Kurvenverlauf ließ vermuten, dass es trotz der Polymer- und Peptidbeschichtung der Quantenpunkte eine Agglomeratbildung stattgefunden hat. Der Durchmesser der Primärpartikel liegt nach Herstellerangaben bei ca. 10 nm [188]. Basierend auf diesen Analysedaten war keine Aussage möglich, ob bei der Agglomeration die Primärpartikel in ihrer ursprünglichen Größe erhalten blieben. Hierzu war die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften notwendig. Die entsprechenden Ergebnisse werden in Kapitel 5.5.2 vorgestellt.

Die Analyseverfahren zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung bei Nanopartikeln sind sehr stöempfindlich, da die Untersuchungen mit sehr gering konzentrierten Proben durchgeführt werden. Daher wurde zur Verifizierung der PCS-Ergebnisse ein weiteres Verfahren zur Partikelgrößenbestimmung eingesetzt. Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

Differentielle Mobilitätsanalyse

Als weiteres Verfahren zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung wurde die differentielle Mobilitätsanalyse (DMA) eingesetzt. Die DMA-Analyse ermöglicht im Gegensatz zur PCS eine halbquantitative Bestimmung der Partikelgrößenverteilung. Die Analysen wurden exemplarisch für Proben von *S. pombe* durchgeführt.

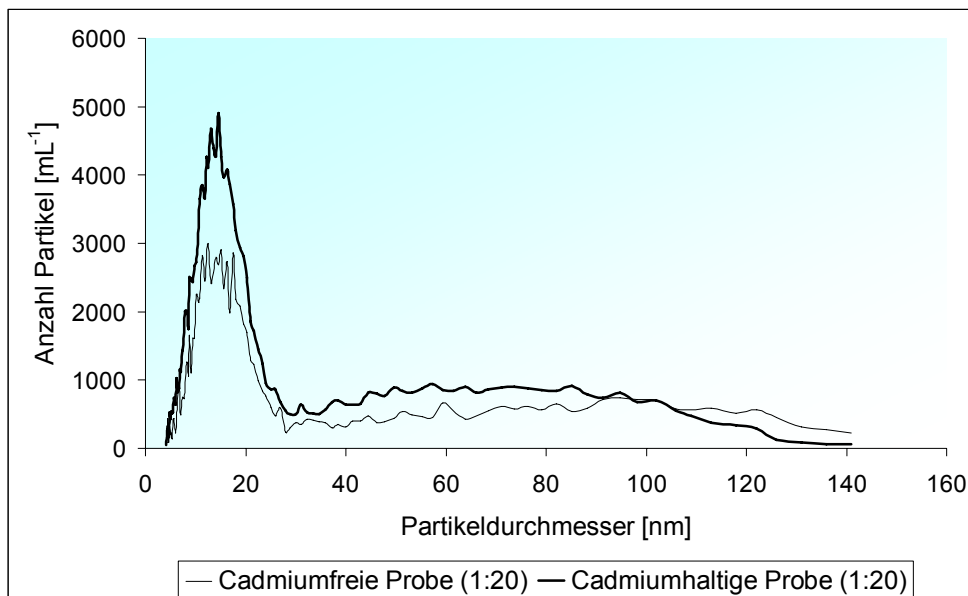


Abbildung 28: Partikelgrößenverteilung, Proben von *S. pombe*, verdünntes Zellysate aus cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Kultivierung nach Hitzefällung und Filtration (0,2 μm); Bestimmung mittels DMA.

Die Abbildung 28 zeigt eine Partikelgrößenverteilung eines Zellysates von *S. pombe*. Dabei fand analog zu den vorherigen Analysen ein Vergleich von cadmiumhaltigen und cadmiumfreien Proben statt. Der Vergleich der Kurvenverläufe in Abbildung 28 zeigt für die cadmiumhaltige Probe ein signifikantes Maximum bei einem Partikeldurchmesser von ca. 10 - 20 nm. Die Signalintensität war dabei bei gleicher Probenvorbereitung und Versuchsdurchführung ca. 40 % höher als bei der cadmiumfreien Probe. Bei dem verwendeten Versuchsaufbau ist ab einer Änderung der Signalintensität von ca. 20 % sichergestellt, dass diese auf einen realen Effekt

zurückzuführen ist [183]. Somit ist ausgeschlossen, dass es sich bei dem beobachteten Maximum um ein Artefakt handelt. Mittels der DMA-Analyse konnte so spezifisch für die cadmiumhaltige Probe die Anwesenheit einer nanoskaligen Komponente eindeutig nachgewiesen werden. Der ermittelte Partikeldurchmesser deckt sich dabei mit den Ergebnissen der dynamischen Lichtstreuung.

5.5.2 Fluoreszenzeigenschaften

Chemisch synthetisierte Cadmiumsulfid-Kristalle mit einem Partikeldurchmesser von ca. 2 nm zeigen ein Emissionsmaximum bei ca. 480 nm bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm [74]. Für biogene Cadmiumsulfid-Nanokristalle sind ähnliche Fluoreszenzeigenschaften zu erwarten [189]. Im Rahmen dieser Versuchsreihen wurde untersucht, ob sich in den Zellysat-Proben biogene Cadmiumsulfid-Nanopartikel mittels Fluoreszenzanalysen nachweisen lassen.

Bestimmung mehrdimensionaler Fluoreszenzspektren

Zunächst wurden experimentell die optimalen Parameter für die Aufnahme eines Emissionsspektrums bei Zellysat-Proben ermittelt. Dazu wurden während der Messung die Anregungs- und Emissionswellenlängen variiert und so ein mehrdimensionales Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Die Abbildung 29 zeigt ein entsprechendes Fluoreszenzspektrum für Zellysat-Proben von *S. pombe*.

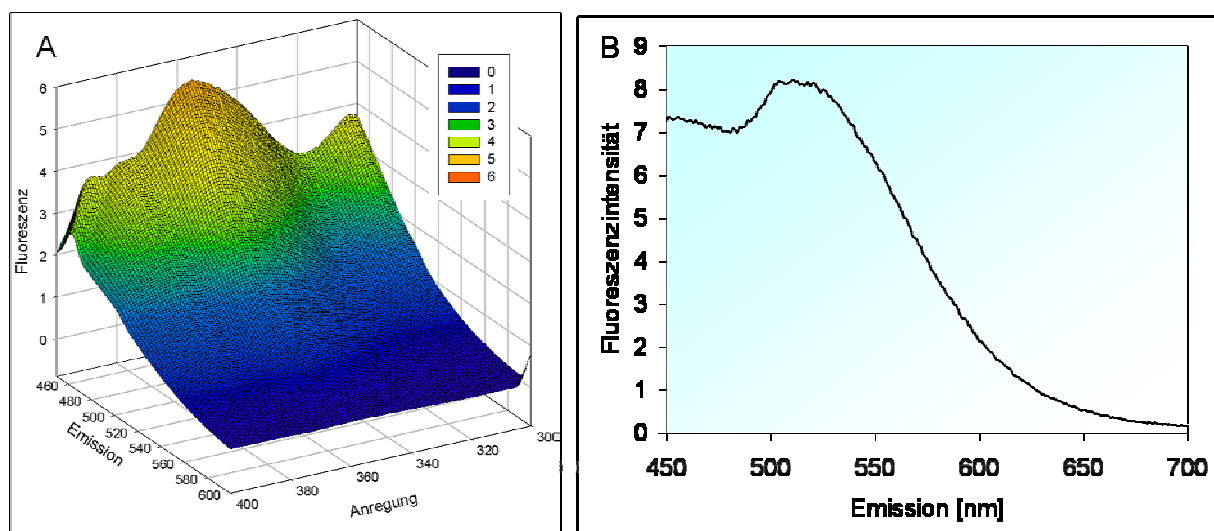


Abbildung 29: Fluoreszenzsignal cadmiumhaltiger Zellysat-Proben von *S. pombe*: (A) Kombiniertes Anregungs- und Emissionsspektrum, (B) Emissionsspektrum bei Anregungswellenlänge von 355 nm.

Abbildung 29 A zeigt dabei eine maximale Emissionsintensität bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm. Die Anregung der Zellysat-Probe bei 355 nm führte zu einer breiten Emissionbande mit einem Maximum im Bereich von 480 - 550 nm (Abbildung 29 B). Die Fluoreszenzuntersuchungen bei cadmiumfreien Proben zeigten einen ähnlichen spektralen Verlauf (siehe Anhang C).

Die Ähnlichkeit der Spektren ist vermutlich auf die komplexe Zusammensetzung der Zellaufschluss-Proben zurückzuführen. Es ist wahrscheinlich, dass in der biologischen Probe weitere fluoreszierende Komponenten enthalten sind und das zu beobachtende Fluoreszenzspektrum somit aus einer Vielzahl fluoreszierender Einzelkomponenten zusammengesetzt ist. Auf diesen Aspekt wird in der Diskussion (Kapitel 7.1.4) ausführlicher eingegangen. Zur Fluoreszenzmessung wurden in diesen Messreihen Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke eingesetzt. Eine Minimierung der Störeinflüsse durch eine Probenverdünnung war nicht möglich, da dies lediglich zu einer Reduzierung der Fluoreszenzintensität führte. Weitere Veränderungen des Spektrenverlaufs waren nicht zu beobachten. Daher wurden die Fluoreszenzeigenschaften biologischen Proben mittels Einzelmolekülanalyse untersucht. Die entsprechenden Ergebnisse werden im folgenden Absatz beschrieben.

Fluoreszenz-Einzelmolekülanalyse

Die Einzelmolekülanalyse ermöglicht durch Auswahl eines geeigneten Bildausschnittes die Bestimmung der Fluoreszenzemission und Fluoreszenz-Abklingdauer einzelner Moleküle.

Überprüfung der Detektorsensitivität

Vor der Untersuchung der Zellysat-Proben wurde überprüft, ob die erzielbaren Auflösungen des Versuchsaufbaus die Anforderungen eines Einzelmolekülnachweises erfüllen. Zu diesem Zweck wurden Tests mit kommerziellen Quantenpunkten durchgeführt [190]. Bei den Quantenpunkten handelt es sich um das in Kapitel 4.1.3 spezifizierte Referenzmaterial.

Die Ergebnisse der Bestimmung des Emissionsspektrums (Abbildung 30 A) und der Fluoreszenzlebensdauer (Abbildung 30 B) der Quantenpunkte sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

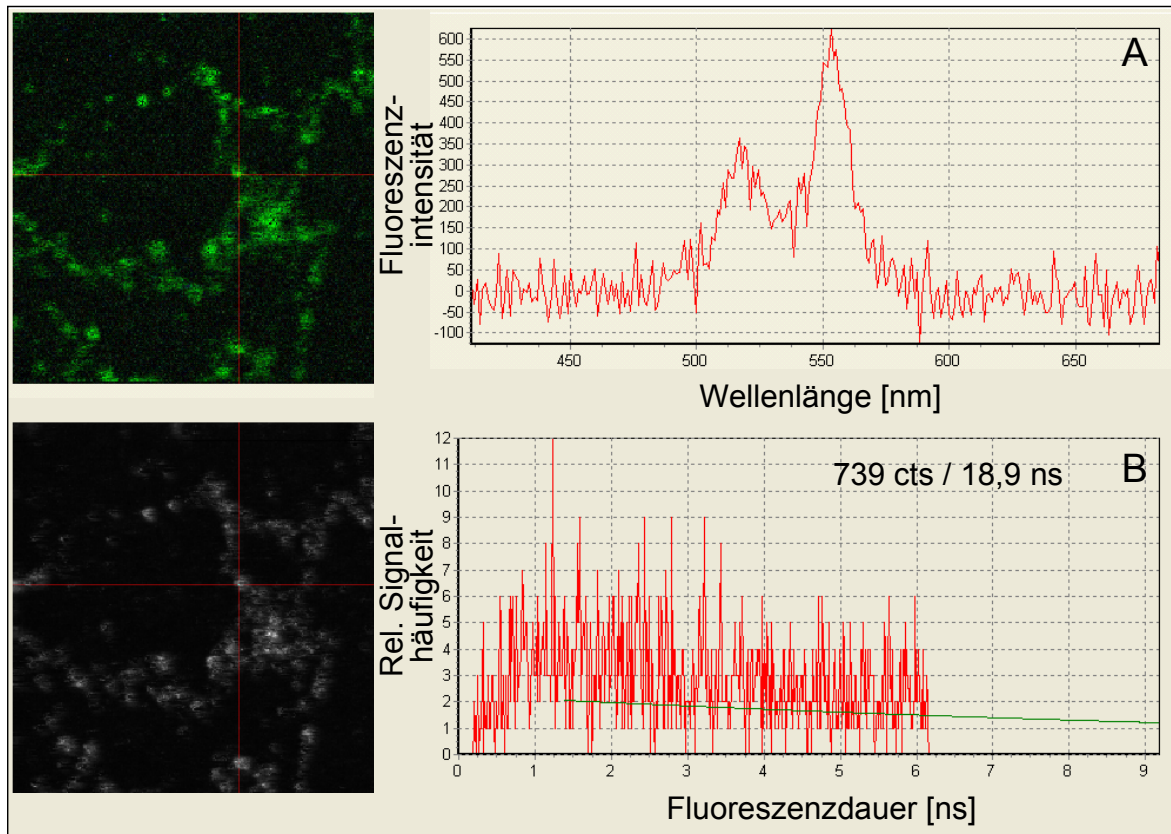


Abbildung 30: (A) Fluoreszenz-Emissionsspektrum, (B) Fluoreszenz-Abklingdauer kommerzieller Quantenpunkte; Bestimmung mittels Einzelmolekülanalyse.

Die Quantenpunkte weisen laut Hersteller ein Emissionsmaximum bei 565 nm mit einer Halbwertsbreite von ca. 40 nm auf [188]. Dies stimmt mit den experimentell bestimmten Daten überein (Abbildung 30 A). Die Fluoreszenz-Abklingfunktion (Abbildung 30 B) zeigte bei den Quantenpunkten eine langsame Abnahme der Fluoreszenzintensität. Berechnungen zur Fluoreszenzlebensdauer führten zu Werten von ca. 20 ns basierend auf dem einfachen Modell einer monoexponentiellen Abklingfunktion (siehe Kapitel 4.9.3). Aufgrund der relativ langen Fluoreszenzlebensdauer der Quantenpunkte konnte die Fluoreszenz-Abklingfunktion nicht exakt bestimmt werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Auflösung des Versuchsaufbaus zum Nachweis fluoreszierender Nanopartikel ausreichend ist.

Ergebnisse der Einzelmolekülanalyse für Zelllysate von *S. pombe*

Die Abbildung 31 zeigt die Ergebnisse der Einzelmolekülanalyse für cadmiumhaltige und cadmiumfreie Zelllysateproben von *S. pombe*. Auffällig war dabei die Ähnlichkeit der Fluoreszenzspektren beider Proben. Zudem wiesen die fluoreszierenden Komponenten ausschließlich kurze Fluoreszenzlebensdauern in der Größenordnung

weniger Nanosekunden auf. Für Quantenpunkte wurden hingegen längere Fluoreszenzlebensdauern erwartet.

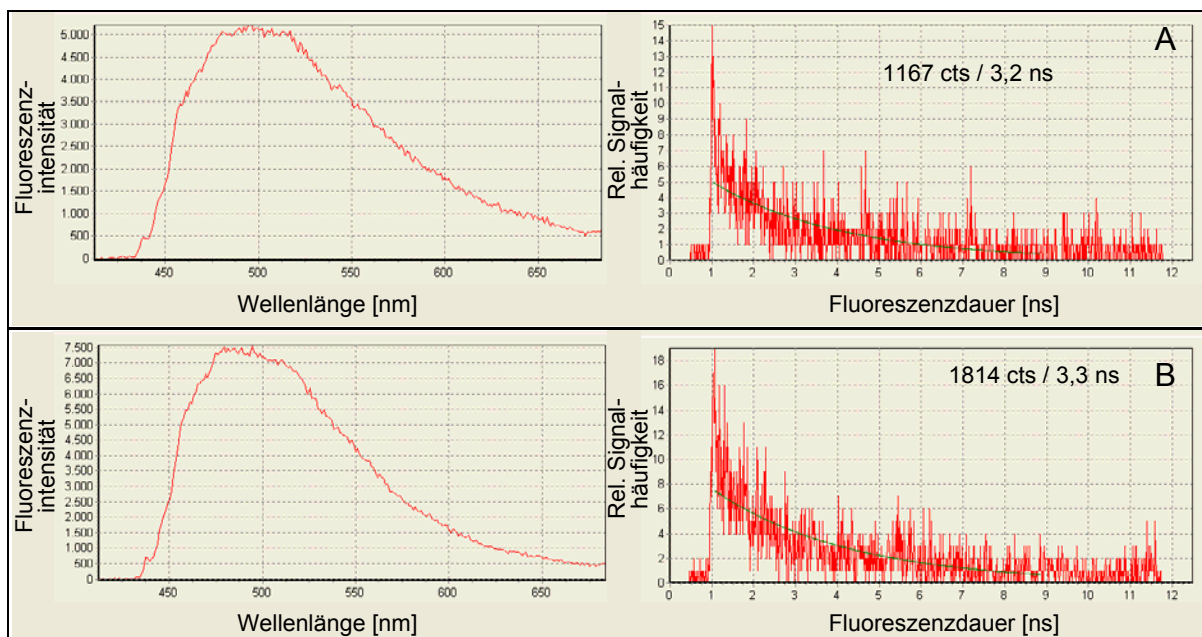


Abbildung 31: Bestimmung der Fluoreszenzemission und Fluoreszenzabklingdauer mittels Einzelmolekülanalyse; Zelllysat von *S. pombe* einer (A) cadmiumhaltigen Probe und (B) einer cadmiumfreien Probe nach Hitzefällung.

Neben der Untersuchung von Zelllysat-Proben wurden auch Fraktionen nach einem SEC-Reinigungsschritt untersucht (siehe Abbildung 22). Dabei war auffallend, dass auch hier unabhängig von der jeweiligen Probenfraktion ähnliche Emissionsspektren und Fluoreszenzlebensdauern zu beobachten waren. Die entsprechenden Abbildungen sind in Anhang C aufgeführt. Eine charakteristische Emissionsbande konnte in keiner der cadmiumhaltigen Proben identifiziert werden.

5.5.3 Zusammenfassung

Die Untersuchungen zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung zeigten ein charakteristisches Maximum für Partikeldurchmesser von 10 – 20 nm. Dies ergaben unabhängige Analysen der Partikelgrößenverteilung mittels PCS und DMA. Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften basierte auf den zu erwartenden Fluoreszenzeigenschaften von Cadmiumsulfid-Nanokristallen [74, 189]. Neben Analysen in großen Probevolumina wurden dabei auch Einzelmolekülanalysen durchgeführt. Eine charakteristische Emissionsbande konnte jedoch nicht identifiziert werden. Die möglichen Ursachen werden in Kapitel 7.1.4 ausführlich diskutiert.

6 Ergebnisse zur Produktion und Charakterisierung nanostrukturierter Partikel

6.1 Zielsetzung der experimentellen Untersuchungen

Der Schwerpunkt der experimentellen Untersuchungen lag in der Herstellung, Reinigung und Charakterisierung biogener nanostrukturierter Partikel. Die Herstellung erfolgte durch die Kultivierung von Mikroalgen, welche die Fähigkeit zur Partikelbildung besitzen. Dazu wurden die Kultivierungsbedingungen untersucht, welche zur Gewinnung oberflächenstrukturierter Partikel unter Laborbedingungen notwendig sind. Die Versuche wurden exemplarisch an der Coccolithophoriden *Emiliana huxleyi* durchgeführt. Es wird vermutet, dass diese aufgrund ihres vielfältigen Lebensraums und ihrer weltweiten Verbreitung (siehe Kapitel 2.1.2) relativ geringe Ansprüche an die Kultivierungsbedingungen stellt.

Der Einsatz der biogenen Partikel für technische Anwendungen erfordert zunächst das Entfernen sämtlicher organischer Zellbestandteile. Bei der Untersuchung entsprechender Reinigungsverfahren lag der Fokus auf der Etablierung eines Verfahrens, welche das Entfernen der organischen Bestandteile ohne Beschädigung der Partikelstruktur ermöglicht.

Für die Partikelcharakterisierung wurde die Partikelgrößenverteilung der biogenen Partikel bestimmt und eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Oberflächenstruktur durchgeführt. Dabei wurden u. a. die Unterschiede der Partikeleigenschaften von frisch gewonnenen Partikeln im Vergleich zu fossilem Material (Kieselgur) untersucht.

6.2 Kultivierung

6.2.1 Gewinnung biogener Calciumcarbonat-Partikel

Zur Gewinnung oberflächenstrukturierter Calciumcarbonat-Partikel wurde die Mikroalge *Emiliana huxleyi* kultiviert. Die Kultivierungen fanden unter phototrophen Bedingungen im Schüttelkolben und im Bioreaktor statt.

Zunächst fand die Entwicklung eines geeigneten Nährmediums statt, nachdem in Versuchsreihen mit synthetischem Meerwasser kein Mikroorganismenwachstum zu

beobachten war. Dem Medium wurde natürliches Meerwasser in Form von Ostseewasser zugesetzt. Im Vergleich zu Ozeanwasser wies dieses jedoch einen geringeren Salzgehalt auf. Durch eine Salzzugabe wurde daher die Leitfähigkeit des Mediums von ca. 29 mS auf ca. 52 mS erhöht (siehe Kapitel 4.2.2). Dies entspricht der durchschnittlichen Leitfähigkeit von Ozeanwasser [191]. Ozeanwasser stand im Rahmen der Versuche nicht zur Verfügung.

Der pH-Wert des Mediums wurde zur Vermeidung von sauren Kultivierungsbedingungen auf pH 8,0 eingestellt. Basierend auf dem Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht liegt bei pH 8,0 das Kohlendioxid nahezu ausschließlich als Hydrogencarbonat im Medium vor. Die Konzentration an freier Kohlensäure ist auf ein Minimum reduziert.

Die Abbildung 32 zeigt den Verlauf einer Reaktorkultivierung von *Emiliana huxleyi* unter Verwendung des modifizierten meerwasserhaltigen Mediums. Die Kultivierung von *Emiliana huxleyi* fand im Batchbetrieb unter phototrophen Bedingungen statt. Die Kultivierungsdauer betrug 24 Tage. In den ersten 10 Kultivierungstagen war ein lineares Zellwachstum zu beobachten. Dabei wurde eine Biotrockenmasse-Konzentration von ca. $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Die Zellsuspension wies eine gelbgrüne Färbung auf.

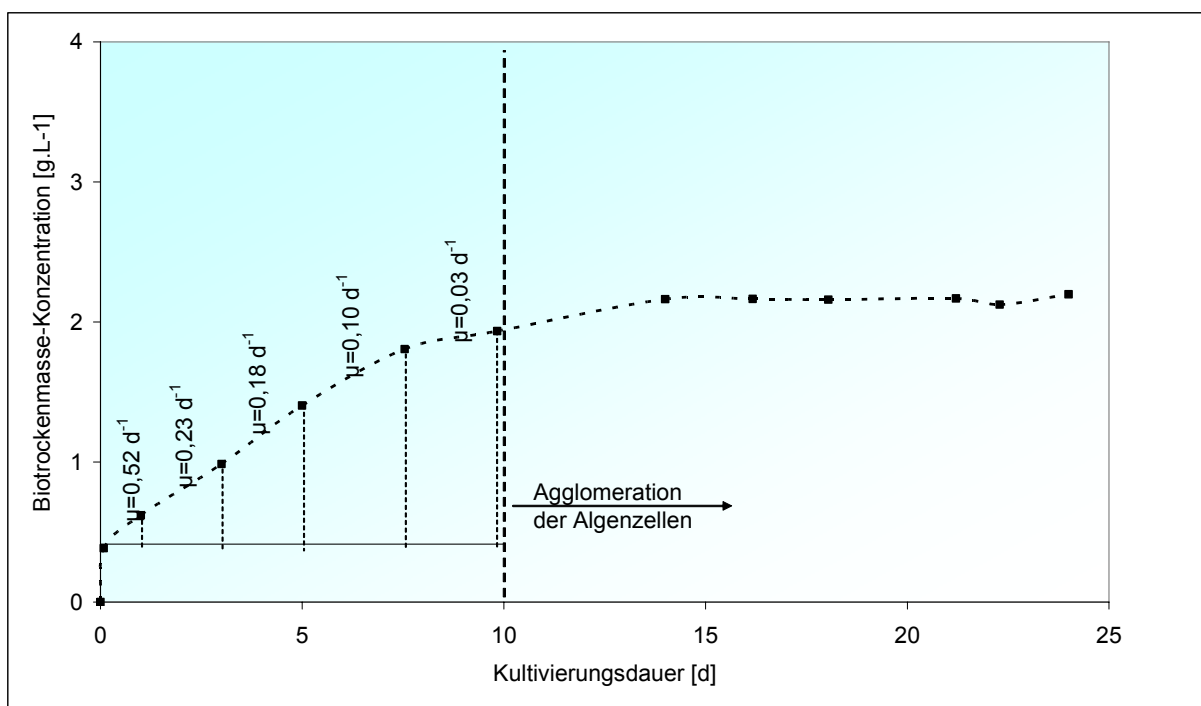


Abbildung 32: Reaktorkultivierung von *Ehux*, phototrophe Batchkultivierung im 15 L-Bioreaktor

Eine exponentielle Wachstumsphase war im Kultivierungsverlauf nicht feststellbar. Im Verlauf der ersten 10 Kultivierungstage sank die spezifische Wachstumsrate vielmehr von $0,5 \text{ d}^{-1}$ auf $0,03 \text{ d}^{-1}$. Ab dem 10. Kultivierungstag kam es zur Bildung von Zellaggregaten im Medium und zu Ablagerungen an der lichtzugewandten Reaktorwand. Zum Zeitpunkt des Kultivierungsabbruchs nach 24 Tagen betrug die Biotrockenmasse-Konzentration $2,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ im Medium.

In Schüttelkolben-Kultivierungen wurden wesentlich geringere Wachstumsgeschwindigkeiten erzielt (siehe Anhang C). In Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium wurde hier einer nach Kultivierungsdauer von 50 Tagen eine maximale Biotrockenmasse-Konzentration von ca. $1,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht. Dies entspricht einer optischen Dichte von ca. 0,35. Die Zellsuspension wies dabei wie bei der Reaktorkultivierung eine gelbgrüne Färbung auf.

Abbildung 33 zeigt REM-Aufnahmen von Proben direkt nach der Zellernte. Die Analysen wurden dabei mit ungewaschenen Algenzellen durchgeführt, um einen Einfluss weiterer Behandlungsmethoden auf die Probeneigenschaft auszuschließen.

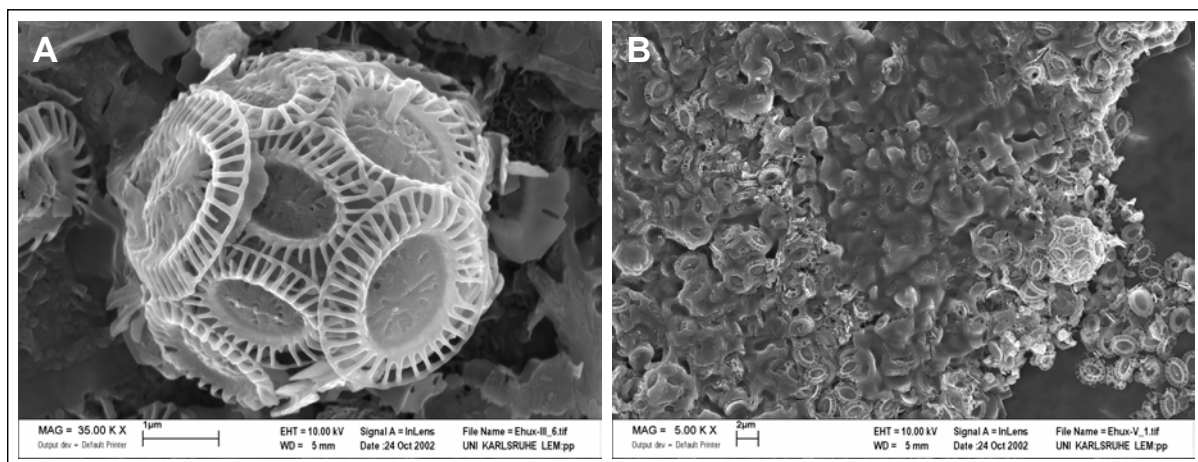


Abbildung 33: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer unbehandelten Schüttelkolbenkultur von *Emiliana huxleyi*: (A) REM-Aufnahme einer vollständig kalzifizierten Algenzelle, (B) Übersichtsaufnahme.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Zellsuspensionen zeigten, dass unter den beschriebenen Kultivierungsbedingungen bei *Ehux* eine Schalenbildung durch die Mikroalgen erfolgte. Bei der Auswertung fiel auf, dass ein Großteil der Calciumcarbonat-Partikel ungebunden als Einzelpartikel vorliegt. Daneben waren allerdings auch vollständig kalzifizierte Algenzellen nachzuweisen.

Die Abbildung 33 A zeigt die Detailaufnahme der Oberfläche einer vollständig kalzifizierten Algenzelle. Auf der Zelloberfläche waren dabei ca. 20 – 30 Coccolithen

angelagert. Der Durchmesser kalzifizierter Zellen lag bei ca. 5 μm . Der diffuse Grauschleier in Abbildung 33 B resultierte aus den aus dem Kultivierungsmedium ausgefällten Salzen.

6.2.2 Gewinnung biogener Silica-Partikel

Als Probenmaterial dienten die Frusteln der Diatomeenart *Thalassiosira weissflogii*. Die Algenzellen wurden von einer kalifornischen Algenzucht bezogen (siehe Kapitel 4.1.3). Die Biotrockenmasse-Konzentration betrug im Durchschnitt ca. 63 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in der aufkonzentrierten Zellsuspension.

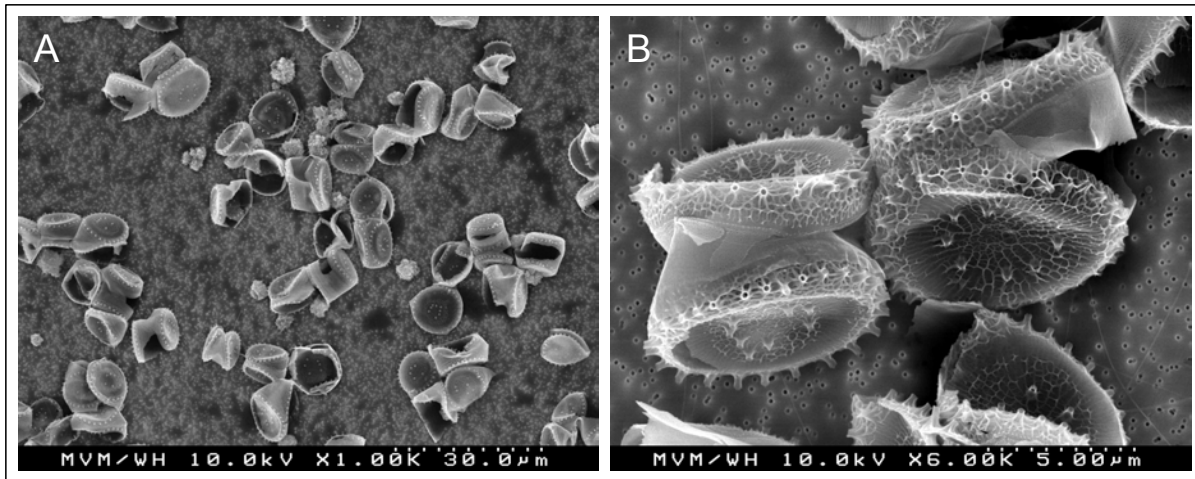


Abbildung 34: REM-Aufnahme der Frusteln von *T. weissflogii*: (A) Übersichtsaufnahme, (B) Detailaufnahme.

In Abbildung 34 sind die REM-Aufnahmen unbehandelter Proben von *T. weissflogii* dargestellt. Die Aufnahmen zeigen regelmäßig geformte Frusteln mit den für Diatomeenschalen typischen Oberflächenstrukturen. Allerdings fällt bei der Analyse eine starke Deformierung der Schalen auf, in der Gestalt vergleichbar mit Getränkedosen, die zusammengedrückt wurden. Die weitgehend einheitliche Größe der Schalen ließ eine enge Partikelgrößenverteilung erwarten.

6.2.3 Zusammenfassung

Zur Kultivierung von *Ehux* unter Laborbedingungen ist eine Anreicherung des synthetischen Meerwassermediums mit natürlichem Meerwasser erforderlich. Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 10 Tagen wurde für *Ehux* in einer Reaktorkultivierung eine Biotrockenmasse-Konzentration von ca. 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ erreicht.

Als Referenzmaterial für die Diatomeen wurden Algen von einer Algenzucht bezogen. Diese zeigten trotz ihrer Deformierungen in den REM-Aufnahmen regelmäßige Partikelstrukturen.

6.3 Partikelreinigung

Für die Partikelcharakterisierung und die Verwendung der Partikel in technischen Applikationen ist ein Entfernen sämtlicher organischer Komponenten erforderlich. Zur Partikelreinigung wurden chemische, thermische und physikalische Verfahren eingesetzt. Die Beurteilung der Reinigungsverfahren erfolgte hinsichtlich ihrer Effektivität beim Entfernen organischer Verunreinigungen und der Vermeidung eventueller Strukturschädigungen der Partikel.

6.3.1 Ergebnisse unterschiedlicher Reinigungsverfahren

Die Reinigungsverfahren wurden an den im Vergleich zu den Kieselschalen chemisch und mechanisch instabileren Calciumcarbonat-Partikeln getestet. Die Bewertung der Reinigungsmethoden fand aufgrund der geringen Probenmengen durch rasterelektronenmikroskopische Analysen statt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.

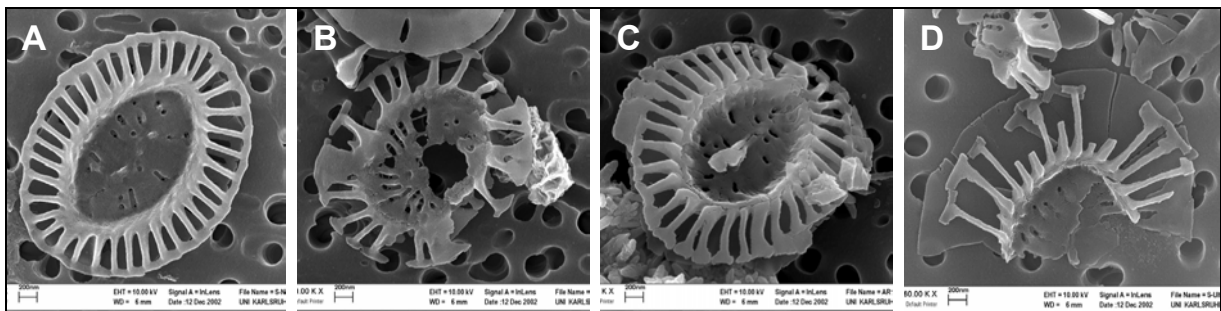


Abbildung 35: REM-Aufnahmen von *Ehux*-Schalen nach unterschiedlichen Reinigungsverfahren: (A) Stoll-Methode, (B) Glühen in Bunsenbrennerflamme, (C) Glühprozess bei 500 °C, (D) Ultraschallbehandlung.

Unbeschädigte, singulär vorliegende Coccolithen wurden durch Einsatz der Stoll-Methode unter Verwendung von Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorit gewonnen (Abbildung 35 A). Dabei waren trotz der mit diesem Reinigungsverfahren verbundenen Salzzugaben nahezu keine Verunreinigungen durch Fremdkristalle zu beobachten. Der Glühprozess führte im Verlauf der Partikelreinigung zu einer

teilweisen Zerstörung der Coccolithen von *Emiliana huxleyi* (Abbildung 35 B+C). Dabei fiel die Zerstörung bei der Verwendung des Bunsenbrenners etwas intensiver aus. Bei Anwendung einer Ultraschall-Reinigung waren eine starke Zerstörung und ein Zersplittern der Partikeln zu beobachten (Abbildung 35 D).

Bei den Diatomeen wurde zusätzlich die Reinigung durch Säurezugabe getestet. Dieses Verfahren war bei den Calciumcarbonat-Partikeln nicht einsetzbar, da sich diese im sauren Milieu auflösen. Für die Diatomeen wurden für den Säureaufschluss und die Stoll-Methode ähnliche Resultate wie beim Einsatz der Stoll-Methode für Calciumcarbonat-Partikel erzielt. Bei der Schalenreinigung kam es sowohl bei dem Glühprozess wie auch bei der Stoll-Methode bezogen auf die Biotrockenmasse zu einer Massenreduzierung um 60 % bei den *Ehux*-Proben. Das ließ auf einen anorganischen Anteil von ca. 40 % schließen. Dieser Wert entspricht mit hinreichender Genauigkeit dem Schalenanteil in der Probe.

6.3.2 Zusammenfassung

Die Stoll-Methode unter Verwendung von Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid erwies sich für die Diatomeen- und Coccolithenreinigung gleichermaßen geeignet. Sie ermöglichte eine schonende Entfernung der organischen Bestandteile ohne Schädigung der anorganischen Partikelstrukturen. Der organische Anteil der Proben wurde zu ca. 60 % bestimmt.

6.4 Partikelcharakterisierung

6.4.1 Coccolithen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Coccolithen (Abbildung 36) zeigen einheitlich geformte Partikel mit Partikeldurchmesser von ca. 2 μm und reproduzierbaren Oberflächenstrukturen.

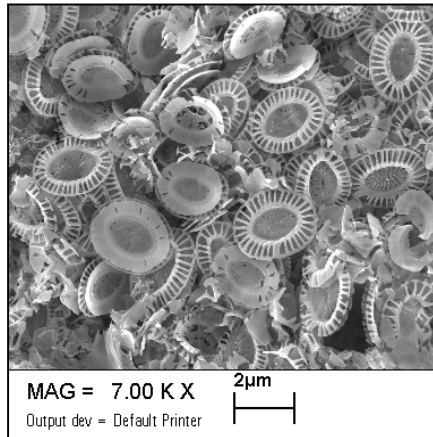


Abbildung 36: REM-Aufnahme gereinigter Schalen von *Emiliana huxleyi*.

Entsprechend dieser Ergebnisse ist daher eine enge Partikelgrößenverteilung zu erwarten. Allerdings wurde aufgrund der tellerartigen Form der *Ehux*-Partikel eine entsprechende Bestimmung des Äquivalentdurchmessers mittels Laserlicht-Beugung nicht durchgeführt.

6.4.2 Diatomeen

Die Abbildung 37 A zeigt die mittels Laserbeugung bestimmte Partikelgrößenverteilung bei gereinigten Schalen von *Thalassiosira weissflogii*. Dargestellt ist die Volumenverteilung der Partikel in Abhängigkeit des Äquivalentdurchmessers. Die Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeugung führte bei den zylindrischen und nahezu würfelförmigen Partikeln zu einem Äquivalentdurchmesser von 5 - 15 μm , mit einem Maximum bei einem Äquivalentdurchmesser von ca. 10 μm .

Die Abbildung 37 B zeigt das Ergebnis der elektronenmikroskopischen Analysen. Entsprechend dieser Aufnahmen weisen die meisten Partikel einen Partikeldurchmesser von ca. 10 μm auf.

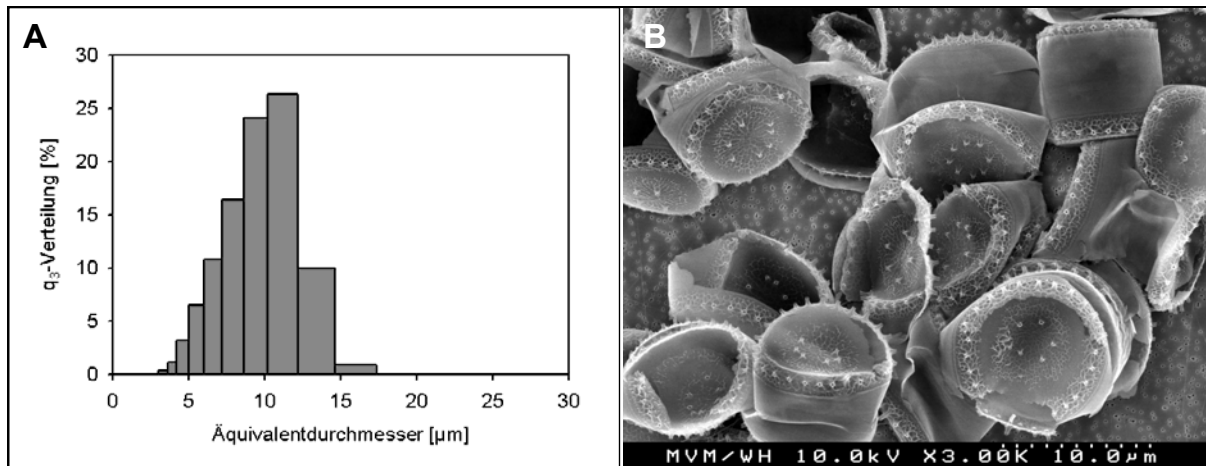


Abbildung 37: Diatomeenschalen von *T. weissflogii*: (A) Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeugung, (B) REM-Aufnahme.

Die Analysen bestätigen die mittels Laserbeugung ermittelte Partikelgrößenverteilung. Allerdings zeigen sie ebenfalls die bereits erwähnte Deformierung der Frusteln. In den Aufnahmen erscheinen die Partikel trotz dieser Verformung intakt. Partikelbruchstücke waren in der Probe nicht nachweisbar. Es handelt sich somit vermutlich um eine plastische Verformung mit geringer Bruchbildung. Abgesehen von der Deformierung zeigten die Partikel gleichmäßige Oberflächenstrukturen, ähnlich der Struktur bei Diatomeenschalen von *Cyclotella cryptica* (Abbildung 38 A). Allerdings scheinen die Kieselschalen von *T. weissflogii* ein breiteres Gürtelband zu besitzen.

Für die Analyse der Kieselschalenstruktur von *C. cryptica* wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Abbildung 38 dargestellt. Auf der Aufnahme sind die beiden Hälften der Diatomeenschale (Abbildung 38 A) zu erkennen. Die REM-Aufnahmen zeigen bei den Schalenhälften eine große Pore an jeder Verstärkungsrippe. Der Durchmesser dieser Poren beträgt ca. 100 nm. Die Porendurchmesser an der Außenseite des Schalenbodens beträgt ca. 30 – 70 nm (Abbildung 38 B). Diese Poren sind durch einen Siebboden verschlossen. Der Porendurchmesser im Siebbodens beträgt ca. 20 nm beträgt.

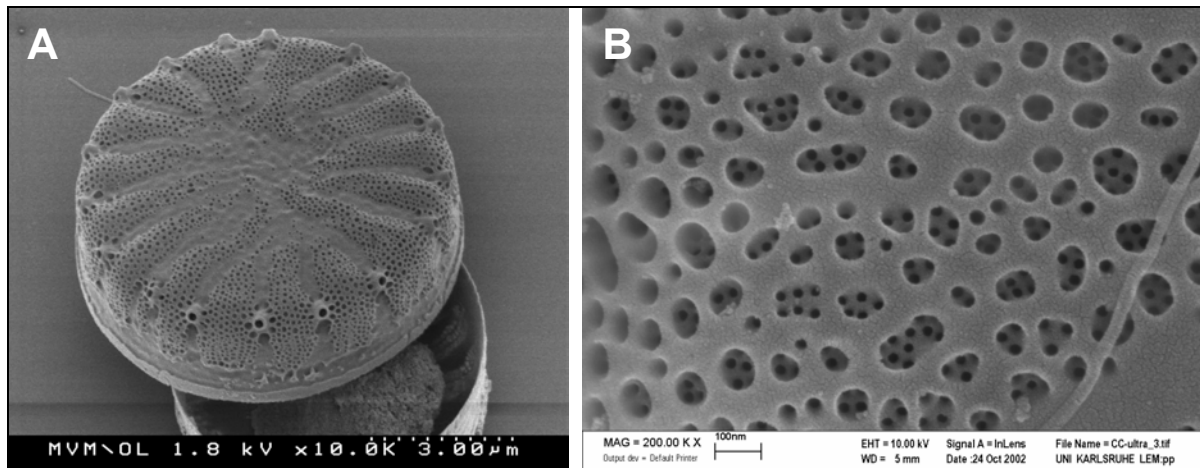


Abbildung 38: REM-Aufnahmen von Frusteln der Diatomeenalge *Cyclotella cryptica*, (a) Detailaufnahme einer Diatomeenschale; (b) Ausschnittsvergrößerung: Poren auf der Schalenoberseite, verschlossen durch einen feinporigeren Siebboden.

Zum Vergleich der Partikel aus frischen Algenkulturen mit den Partikelcharakteristika fossiler Algenschalen wurden Untersuchungen an Kieselgur-Proben durchgeführt. Die Abbildung 39 zeigt, dass es sich bei der Kieselgur-Probe um ein Gemisch unterschiedlicher Schalenarten handelt. Neben intakten Schalenstrukturen sind auch zahlreiche Bruchstücke vorhanden (siehe Abbildung 39).

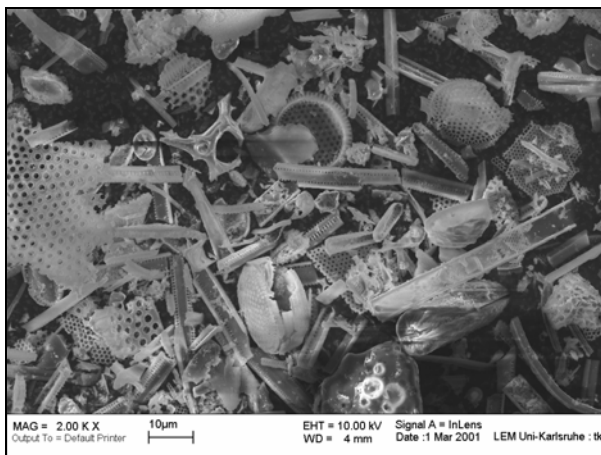


Abbildung 39: REM-Aufnahme von Kieselgur (Merck)

Die Partikel besitzen Abmessungen in der Größenordnung von wenigen Mikrometern bis zu ca. 30 μm . Die REM-Aufnahme lässt bei dieser Kieselgur-Probe eine breite Partikelgrößenverteilung erwarten. Das Ergebnis der mittels Laserbeugung bestimmten Partikelgrößenverteilung wird in Kapitel 7.2.3 vorgestellt.

6.4.3 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Partikelcharakterisierung zeigen, dass die Kultivierung schalenbildender Mikroalgen in Reinkultur wie erwartet zu einer Formenreinheit bei den gewonnenen Partikel führt. Im Gegensatz dazu besteht das fossile Referenzmaterial (Kieselgur) aus einem Gemisch von Schalen mit unterschiedlicher Formen und Strukturen. Weitere Unterschiede zwischen frisch gewonnenen biogenen Partikeln und Kieselgur-Proben werden in Kapitel 7.2.3 aufgeführt und diskutiert.

7 Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit lag der Schwerpunkt in der Produktion und Charakterisierung biogener, nanoskaliger und nanostrukturierter Partikel. Dazu wurden am Beispiel ausgewählter Mikroorganismen das Wachstum und die Produktbildung in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen untersucht. Zur Untersuchung der Partikeleigenschaften wurden unterschiedliche Reinigungs- und Charakterisierungsmethoden ausgewählt und entsprechend der Probenbedingungen modifiziert. Die Ergebnisse werden im Folgenden für die Gewinnung von nanoskaligen und nanostrukturierten Partikeln separat diskutiert. Basierend auf den experimentell gewonnenen Daten wird zusätzlich eine erste Abschätzung der Herstellkosten biogener Partikel durchgeführt. Soweit möglich findet ein Vergleich mit kommerziell erhältlichen Referenzmaterialien statt.

7.1 Nanoskalige Partikel

7.1.1 Kultivierung

Biotrockenmasse-Konzentration und Wachstumsraten

Für Kultivierungen mit *S. pombe* werden in der Literatur für Schüttelkolbenkultivierungen finale Biotrockenmasse-Konzentrationen von ca. $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ beschrieben [192, 193]. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen überein, welche im Rahmen dieser Arbeit in Kultivierungsreihen mit *S. pombe* erzielt wurden (siehe Kapitel 5.2.1).

Bei der Kultivierung wurde in der ersten Kultivierungsphase meist eine Batchkultivierung durchgeführt. Dies führte dazu, dass zum Kultivierungsbeginn meist ein Substratüberschuss vorhanden war. Die hohe Substratkonzentration führte zum Auftreten des hefetyrischen Crabtree-Effektes, wobei es zur Umsetzung der Glucose zu Ethanol kam. Bei hohen Ethanolkonzentration ist eine Wachstumsinhibierung möglich. Nach einigen Kultivierungsstunden trat in der Batchphase eine Substratlimitierung auf, wodurch es bis zum Wachstumsstillstand kam.

Die maximalen Wachstumsraten für *S. pombe* in cadmiumfreien Kultivierungen liegen entsprechend den vorliegenden Literaturwerten zwischen $0,25 - 0,35 \text{ h}^{-1}$ [168, 194]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stellten sich bei

Batch-Kultivierungen im Schüttelkolben oder Bioreaktor Wachstumsraten von ca. 0,2 h⁻¹ ein.

Für *C. glabrata* zeigte sich bei einer Kultivierungsdurchführung im Bioreaktor ein deutlicher Einfluss auf die maximale Biotrockenmasse-Konzentration verglichen mit Kultivierungen im Schüttelkolben. Im Fall der Reaktorkultivierungen kam es dabei nahezu zu einer Verdoppelung der Biotrockenmasse-Konzentration von 5 g·L⁻¹ auf bis zu 9 g·L⁻¹ bei vergleichbaren Ausgangsbedingungen. Bei Kultivierungen von *S. pombe* konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Zur Erklärung kommen zwei Parameter in Betracht. Zum einen besteht im Fall der Schüttelkolbenkultivierungen die Möglichkeit einer Wachstumslimitierung durch eine Limitierung des Sauerstoffangebots. Zum anderen ist eine Wachstumsinhibierung aufgrund des niedrigen pH-Wertes möglich, welcher sich bei Schüttelkolbenkultivierungen durch fehlende pH-Regelung im Medium einstellt. Daher sind im Allgemeinen in Reaktorkultivierungen unter vergleichbaren Ausgangsbedingungen höhere Biotrockenmasse-Konzentrationen erzielbar. Ein Vergleich der Biotrockenmasse-Konzentrationen mit Literaturwerten ist für *C. glabrata* nicht möglich, da keine entsprechenden Werte verfügbar sind.

Stoffwechsel

In Kapitel 5.2 wurde der Kultivierungsverlauf für eine Reaktorkultivierung von *S. pombe* und *C. glabrata* vorgestellt. Dabei war in beiden Kultivierungen das Auftreten des Crabtree-Effektes zu beobachten. Dies zeigte sich durch den Anstieg der Ethanolkonzentration und des RQ-Wertes bei hohen Glucosekonzentrationen.

Bei einer genauen Betrachtung des Verlaufs der Ethanolkonzentration wurden Unterschiede in den Stoffwechseleigenschaften von *S. pombe* und *C. glabrata* sichtbar. Im Fall von *S. pombe* war festzustellen, dass das gebildete Ethanol im Verlauf der Kultivierung nicht abgebaut wurde. Selbst bei Glucosemangel fand kein Mikroorganismenwachstum mit Ethanol als Substrat statt (Abbildung 11). Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturangaben, nach denen bei *S. pombe* nur bedingt diauxisches Wachstum³³ auftritt. Falls dieser Effekt überhaupt zu beobachten ist, werden Adaptionphasen von ca. fünf Tagen berichtet [195]. Diese Zeitspanne stand

³³ Diauxie: Zweiphasiges Wachstum; hier: In einem Gemisch aus Glucose und Ethanol induziert die Glucose zunächst die zu seiner Verwertung notwendigen Enzyme und unterdrückt die Synthese von Enzymen zur Ethanolverwertung. Nach Verbrauch der Glucose findet in einer Adaptionphase die Bildung der Enzyme zur Ethanolverwertung statt. Anschließend ist eine zweite Wachstumsphase mit Ethanol als Substrat zu beobachten.

den Hefen bei den Kultivierungen im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Es besteht die Möglichkeit, dass auch bei dem verwendeten Stamm von *S. pombe* nach einer entsprechend mehrtägigen Adaptionszeit ein Wachstum auf Ethanol stattfindet. Für die Versuchsauswertung ist dieser Aspekt allerdings irrelevant.

Im Gegensatz zu den Stoffwechseleigenschaften von *S. pombe* zeigte sich in Versuchen mit *C. glabrata* eine ausgeprägte Fähigkeit zum diauxischen Wachstum. In den Kultivierungsverläufen war bereits nach einer kurzen Adaptionsphase bei Substratmangel ein Wachstum mit Ethanol als Substrat zu beobachten (Abbildung 14).

In beiden Fällen ist jedoch das Auftreten einer Ethanolbildung mit einer Ausbeuteminimierung verbunden. Im Vergleich zu einer vollständigen Umsetzung von Glucose in Kohlendioxid und Wasser fällt die Energiebilanz einer Ethanolbildung wesentlich geringer aus [161]. Daher ist eine Ethanolbildung durch die Wahl geeigneter Kultivierungsbedingungen nach Möglichkeit zu vermeiden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Kultivierung eine Feedback-Fedbatch-Regelung eingesetzt. Die kontinuierliche Glucosezugabe wurde hierbei über den online ermittelten Respirationsquotienten geregelt. Dadurch konnte eine Ethanolbildung weitgehend vermieden werden. Dies zeigte sich in einem entsprechenden Kultivierungsverlauf (Abbildung 14). Dabei besteht Anlass zu der Annahme, dass vergleichbar mit Kultivierungen von *S. cerevisiae* bei entsprechender Prozessführung eine Durchführung von Fedbatch-Kultivierungen mit höheren Wachstumsraten ohne Ethanolbildung möglich ist [196].

Cadmiumakkumulation

Zur Untersuchung der spezifischen Cadmiumakkumulation wurden in Versuchsreihen mit *S. pombe* und *C. glabrata* sowohl die Zugabepprofile wie auch die Gesamtmenge des zugegebenen Cadmiums je nach Kultivierungsansatz variiert. Die Werte für die spezifische Cadmiumakkumulation waren dabei für Kultivierungen mit *C. glabrata* im Allgemeinen höher als für Kultivierungen mit *S. pombe*. Für Kultivierungen von *C. glabrata* lagen diese in der Regel bei bis zu 40 mgCd/g BTM. Für Kultivierungen von *S. pombe* wurde maximal eine spezifische Cadmiumakkumulation von ca. 10 mgCd/g BTM erzielt. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Cadmiumakkumulation vorwiegend in den ersten Stunden nach der Cadmiumzugabe stattfand.

In der Literatur wird für *S. pombe* und *C. glabrata* eine hohe Cadmiumresistenz berichtet [27]. Dies zeigten auch die Kultivierungen mit *C. glabrata* in Medien mit hohen Cadmiumkonzentrationen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Bei den Kultivierungen trat erst ab einer Konzentration von 10 mM³⁴ Cadmium eine starke Limitierung der Stoffwechselaktivität von *C. glabrata* auf.

In der Literatur sind nur wenige Veröffentlichungen zur Gewinnung biogener Cadmiumsulfid-Partikeln in Hefekultivierungen zu finden. Diese beziehen sich fast ausschließlich auf eine Kultivierung von *S. pombe* in Schüttelkolben ohne genaue Spezifikation der Kultivierungsbedingungen. Ergebnisse zu Reaktorkultivierungen wurden bislang lediglich von einer Forschergruppe veröffentlicht. Dabei wurde *S. pombe* unter Zugabe von 1 mM Cadmium kultiviert und eine Abhängigkeit des Zeitpunktes der Cadmiumzugabe auf die Cadmiumakkumulation untersucht [193, 195]. Darüber hinaus sind keine weiteren Untersuchungen zu den Einflüssen der Prozessführung auf die Cadmiumakkumulation bei Kultivierungen von *S. pombe* und *C. glabrata* bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Cadmiumzugabe ausschließlich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen. Kultivierungen mit einer Cadmiumzugabe in der frühen exponentiellen Phase wurden aufgrund der resultierenden geringen Wachstumsrate nicht näher untersucht. Darüber hinaus war bei einer frühen Cadmiumzugabe eine Reduzierung der Cadmiumakkumulation und damit eine Minimierung der Partikelbildung zu erwarten [193].

Das Prinzip der Cadmiumakkumulation und der Bildung peptidumhüllter Cadmiumsulfid-Nanopartikel wurde in Kapitel 2.1.1 für beide Hefestämme detailliert beschrieben. Die Peptidhülle der Hefe *S. pombe* besteht dabei aus Phytochelatinen mit $n = 2 - 4$ [28]. Für *C. glabrata* beträgt der Wert mindestens $n = 2$ [197]. Entsprechend der Beobachtungen von Dameron weisen die von *S. pombe* gebildeten Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe aufgrund der längerkettigen Phytochelatine eine höhere Stabilität gegenüber Partikelwachstum auf als die von *C. glabrata* gebildeten Komplexe [7]. Williams beschreibt für Kultivierungen von *S. pombe* nach der Zugabe von Cadmium erhöhte intrazelluläre Sulfidgehalte. Er schließt daraus auf die gesteigerte Bildung von Phytochelatinen und einer erhöhten Bildung von peptidumhüllten Cadmiumsulfid-Partikeln [193].

³⁴ 10 mM entsprechen einer Cadmiumkonzentration von ca. 1,1 g·L⁻¹

Die Bildung dieser Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe ist aus biologischen Aspekten für die Hefezellen sinnvoll, da durch die Sulfideinlagerung vergleichsweise mehr Cadmium gebunden werden kann als durch reine Cadmium-Peptid-Komplexe (siehe Kapitel 2.1.1). Hoher Sulfidgehalt in Zelle führt dabei vermutlich zu einer dickeren Peptidschicht, welche die Cadmiumsulfid-Partikel umhüllt [197].

Bei den in Kapitel 5.2 vorgestellten Kultivierungsversuchen wurde auf die höhere spezifische Cadmiumakkumulation bei Kultivierungen von *C. glabrata* hingewiesen. Unter der Annahme, dass unspezifische Fällungsreaktionen vernachlässigt werden können, bleibt zu berücksichtigen, dass die Bildung von Cadmiumsulfid-Kristallen nur eine Möglichkeit des zellulären Detoxifikationsmechanismus darstellt (siehe Kapitel 2.1.1). Es besteht prinzipiell die Möglichkeit, dass bei *C. glabrata* parallel zur Cadmiumsulfid-Bildung weitere Detoxifikationsreaktionen stattfinden [27]. Entsprechende experimentell bestimmte Daten liegen dabei nicht vor.

Die Wahrscheinlichkeit möglicher nicht-biologisch induzierter Fällungsreaktionen wird basierend auf Literaturangaben zur Löslichkeit von Cadmiumnitrat in Wasser abgeschätzt. In dem unter Kultivierungsbedingungen relevanten Temperaturbereich (25 – 35 °C) beträgt die maximale Löslichkeit von Cadmiumnitrat in Wasser 613 – 643 g·L⁻¹ [186]. Das entspricht einer Konzentration von ca. 2,3 – 2,4 M Cadmium. Im Rahmen dieser Arbeit wird Cadmiumnitrat in Konzentrationen von wenigen mM eingesetzt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die tatsächliche Löslichkeit neben der Temperatur vor allem von der Medienzusammensetzung abhängig ist. So können Fällungsreaktionen z. B. aufgrund von Sulfaten und Sulfiden im Kultivierungsmedium nicht ausgeschlossen werden. Die maximale Löslichkeit von Cadmiumsulfid in wässriger Lösung liegt bei einer Konzentration von 1,3 mg·L⁻¹ [198]. Sobald Sulfide in der Lösung vorhanden sind, kommt es zur Bildung von nahezu unlöslichen Cadmiumsulfid-Verbindungen. Das Löslichkeitsprodukt in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt, dass eine Absenkung des pH-Wertes dabei zu einer Erhöhung der Löslichkeit von Cadmiumsulfid führt [186]. Dementsprechend wurden pH-Werte im sauren Bereich in den nachfolgenden Prozessschritten, wie z. B. der Partikelreinigung, vermieden.

Die Bestimmung der spezifischen Cadmiumakkumulation erfolgte über Cadmiumbestimmungen im Medium. Daher wurde für beide Hefestämme der spezifische Cadmiumgehalt im Zellpellet untersucht. Die daraus berechnete

Cadmiumwiederfindung zeigte Abweichungen von maximal 10 %. Somit wird die Analyse der Cadmiumkonzentration im Medium zur Berechnung der Cadmiumakkumulation als hinreichend genau angenommen.

Basierend auf der intrazellulären Cadmiumkonzentration wird im Folgenden überprüft, ob es sich bei der Cadmiumakkumulation durch die Hefezellen um einen aktiven Prozess handelt. Für die Abschätzung wird von einer spezifischen Cadmiumakkumulation von 10 mgCd/g BTM ausgegangen. Daraus ergibt sich bei einem zellulären Wassergehalt von 90 % eine Cadmiumkonzentration von $1,11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ im Cytoplasma. Unter der Annahme, dass das Cadmium gelöst im Cytoplasma vorliegt, entspricht dies unter Berücksichtigung der Molmasse für Cadmium einer intrazellulären Cadmiumkonzentration von ca. 10 mM. Die meisten Kultivierungen wurden mit Cadmiumkonzentrationen von ca. 2 mM Cadmium im Medium durchgeführt. Somit entspricht die intrazelluläre Cadmiumkonzentration der fünffachen Konzentration im Medium. Es ist daher ausgeschlossen, dass die Cadmiumakkumulation auf einem reinen Diffusionseffekt basiert. Vielmehr ist ein von der Zelle aktiv betriebener Akkumulationsmechanismus notwendig.

Aufgrund der Toxizität von Cadmium ist es unwahrscheinlich, dass das akkumulierte Cadmium intrazellulär in den geschätzten Konzentrationen im gelösten Zustand vorliegt. Es ist daher zu vermuten, dass in Gegenwart von Sulfid die in der Literatur beschriebene Bildung von intrazellulären Cadmiumsulfid-Partikeln stattfindet.

Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass die Untersuchungen unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die Biomasse-Produktion und Cadmiumakkumulation zu viel versprechenden Ergebnissen geführt haben. Die erzielten Wachstumsraten liegen in der gleichen Größenordnung wie bei anderen Hefekultivierungen und die spezifische Cadmiumakkumulation weist bereits zum jetzigen Zeitpunkt Werte im mg-Bereich auf. Die beiden Hefestämme zeigen damit ein hohes Potenzial für die Herstellung größerer Mengen biogener Cadmiumsulfid-Partikel. Neben der Beeinflussung der Cadmiumakkumulation durch die Wahl entsprechender Kultivierungsbedingungen können auch genetische Optimierungseffekte genutzt werden. Diese bieten sich besonders bei *S. pombe* an, da hier das Genom bereits vollkommen entschlüsselt vorliegt [162, 199].

7.1.2 Zellaufschluss

Bei der Kultivierung der Hefen *S. pombe* und *C. glabrata* in cadmiumhaltigem Medium ist entsprechend der Literaturangaben die intrazelluläre Bildung von peptidbeschichteten Cadmiumsulfid-Nanopartikeln zu erwarten [7]. Eine Anreicherung von Cadmium in den Hefezellen konnte mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen in den Zellquerschnitten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 15). Daher wurde zur Isolierung der Partikel ein vollständiger Zellaufschluss durchgeführt.

Unter den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Aufschlussverfahren führte der mechanische Aufschluss unter Einsatz einer Schwingmühle zu den besten Ergebnissen (siehe Kapitel 5.3.1). Die entsprechende Cadmiumfreisetzung betrug bis zu 66 % der maximal verfügbaren Cadmiummenge. Vergleichbare Ergebnisse ließen sich durch einen enzymatischen Aufschluss unter Verwendung von Zymolase erzielen. Der enzymatische Aufschluss ermöglicht die Zerstörung der Zellwand unter Erhalt der Zellmembran und ohne Schädigung der Peptidhülle der Nanopartikel (siehe Kapitel 4.4.1). In der Literatur ist zudem ein so genannter Kälteaufschluss beschrieben [23]. Er soll eine Freisetzung der Cadmiumsulfid-Nanopartikel mit minimaler Zellzerstörung und damit minimaler Probenverunreinigung durch intrazelluläre Proteine ermöglichen. Aufgrund der geringen Cadmiumfreisetzung von 6 % wurde der Ansatz nur anfänglich bis zur Entwicklung eines effizienteren Verfahrens zum Zellaufschluss eingesetzt.

Die höchste Cadmiumfreisetzung wurde durch den Einsatz von Natriumhypochlorit und Wasserstoffperoxid erzielt. Dieses Verfahren führte allerdings aufgrund der eingesetzten Chemikalien vermutlich zur Zerstörung der Peptidhülle der Nanopartikel. Unter den getesteten Methoden wurde der Aufschluss mittels Schwingmühle bevorzugt, da eine Schädigung der Peptidhülle der Nanopartikel unwahrscheinlich ist. Im Gegensatz zum enzymatischen Verfahren gewährleistete es zudem eine vergleichsweise hohe Cadmiumfreisetzung ohne zusätzliche Additive. Darüber hinaus ist die Schwingmühle auch für größere Probevolumina einsetzbar. Bei entsprechender Versuchsauslegung ist sie somit für den Einsatz im industriellen Maßstab geeignet.

Zur Bestimmung der Effektivität von Aufschlussverfahren für Hefezellen werden häufig Kulturen von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet. Die separierten Zellen

stammen meist aus der exponentiellen Wachstumsphase der Hefen. Die Zellernte zur Gewinnung der Cadmiumsulfid-Partikel findet dagegen nicht in der exponentiellen Wachstumsphase statt. Das Mikroorganismenwachstum wurde durch die Cadmiumzugabe deutlich minimiert. Damit hatten die Zellen mehr Zeit, eine stabile Zellwand zu bilden. Allgemein ist davon auszugehen, dass ein Zellaufschluss bei Zellen aus der exponentiellen Phase aufgrund des schnellen Zellwachstums einfacher ist. Somit sind die Testresultate nur bedingt auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Zellaufschlüsse übertragbar. Deutlich wird dies z. B. am enzymatischen Aufschluss mittels Zymolase. Unter Einsatz einer Zymolasekonzentration von $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ wurden mindestens 95 % der Zellen von *S. cerevisiae* zerstört [200]. Der gleiche Versuchsansatz mit Zellen von *S. pombe* führte zu einer Zellzerstörung von ca. 35 %.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine Cadmiumfreisetzung von 66 % akzeptabel. Um das Zellaufschlussverfahren im industriellen Maßstab anzuwenden, ist zuvor eine weitere Optimierung des Aufschlussverfahrens zur Minimierung der Cadmiumverluste notwendig. Für den Zellaufschluss bei Hefen hat sich die Hochdruckhomogenisierung bewährt. Der Vorteil dieser Technik aus industrieller Sicht besteht in der Möglichkeit des kontinuierlichen Betriebs. Dieses Verfahren ist auch zum Zweck der Partikelfreisetzung viel versprechend. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass es bei der Hochdruckhomogenisierung zu einer starken Zerstörung der Zellbruchstücke kommt. Diese sind in der nachfolgende Produktreinigung nur schwer vom Produkt zu trennen [172]. Eine Übersicht möglicher Ansätze ist in der Veröffentlichung von Breddam zur Untersuchung kostengünstiger Verfahren zur Gewinnung intrazellulärer Enzyme aus Zellen von *S. cerevisiae* zu finden [172].

7.1.3 Partikelreinigung

Zur Partikelreinigung wurden zunächst zwei verschiedene Chromatographieverfahren untersucht. Die Größenausschlusschromatographie führte bei Zellysate-Proben von *S. pombe* und *C. glabrata* unter Verwendung der analytischen Trennsäule und eines 67 mM Phosphatpuffers zu viel versprechenden Resultaten.

Größenausschlusschromatographie

Für die Probenfraktionierung mittels SEC wurde eine möglichst niedrige Konzentration des Laufpuffers gewählt, um Fällungsreaktionen aufgrund hoher

Salzkonzentrationen zu vermeiden. Dabei ist bei der Auswahl des Laufpuffers zu beachten, dass eine bestimmte Mindestkonzentration nicht unterschritten wird. Diese Konzentration ist abhängig von der Säulenmatrix und liegt z. B. für das Säulenmaterial der halbpräparativen Säule bei 25 mM Phosphatpuffer [201]. Bei Unterschreitung dieser Mindestkonzentration kommt es zu Wechselwirkungen der Moleküle mit der Säulenmatrix aufgrund der Oberflächenladungen. Diese verhindert Rückschlüsse von der Retentionszeit auf den Partikeldurchmesser der gewonnenen Fraktionen. Wechselwirkungen zwischen dem Probenmaterial und der stationären Phase konnten unter Verwendung eines 1 mM Phosphatpuffers zur Proteinfractionierung beobachtet werden. Die Untersuchungen bestätigten hingegen eine gute Trennleistung der Säule bei Verwendung eines 67 mM Phosphatpuffers (Abbildung 21).

Untersuchungen der Cadmiumwiederfindung ergaben für Proben von *S. pombe* einen prozentualen Anteil von 80 %. Dabei wurde eine eindeutige Konzentrierung der cadmiumhaltigen Komponenten in einer Fraktion mit einer Retentionszeit von ca. 37 Minuten nachgewiesen. Entsprechend der Retentionszeit liegt das Molekulargewicht dieser Proteinfraction im Bereich von ca. 45 kDa. Aufgrund der geringen Anzahl von Proteinstandards entspricht dies hinreichend genau dem zu erwartenden Molekulargewicht des Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes. Der Zusammenhang zwischen Retentionszeit und Molekulargewicht ist dabei eigentlich nur für Proteine gültig, da diese eine ähnliche Dichte aufweisen. Bei dem Cadmiumsulfid/Peptid-Komplex ist aufgrund der höheren Dichte ein leicht verändertes Verhalten zu erwarten.

Eine Änderung der Stoffwechselaktivität durch die Zugabe von Cadmium zeigte sich auch in den gelelektrophoretischen Untersuchungen der intrazellulären Proteinzusammensetzung (Abbildung 19).

Ionenaustauschchromatographie

Die IEC wurde basierend auf der Abschätzung der Nettoladung des Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes unter Einsatz eines Anionenaustauschers für die Partikelseparierung durchgeführt. Dabei waren hohe Cadmiumverluste in der Größenordnung von ca. 40 % zu beobachten (siehe Abbildung 22). Die erste Hälfte der Cadmiumverluste trat dabei unmittelbar bei der Säulenbeladung auf. In diesem Prozessschritt konnten lediglich ca. 80 % der cadmiumhaltigen Komplexe an die

Säulenmatrix gebunden werden, obwohl die Säule über eine ausreichende Bindungskapazität verfügte. Weitere Verluste traten im Verlauf der Chromatographie durch eine unvollständige Cadmiumelution auf. Die Verluste betragen hierbei ebenfalls ca. 20 % der gesamten Cadmiummenge.

Eine mögliche Ursache für die Verluste bei der Probenelution liegt in den lokalen Ladungsverteilungen auf der Proteinoberfläche. Die Ursache hierfür könnte in der Eigenschaft der Nettoladung bei Proteinen liegen. Selbst wenn die Nettoladung aufgrund der Umgebungsbedingungen ausgeglichen ist, sind auf der Oberfläche der Proteine Bereiche mit positiven oder negativen Ladungen vorzufinden. Der isoelektrische Punkt kann daher nur als Richtlinie zur Abschätzung der Versuchsparameter zur Probenelution dienen. Er führt aufgrund der beschriebenen lokalen Ladungsverteilungen nicht unweigerlich zu den Bedingungen, an denen das Molekül keine Affinität mehr für die Matrix zeigt [176].

Eine weitere Ursache für die geringe Cadmiumwiederfindung bei der Probenelution liegt in einer möglichen Proteinfällung in der Trennsäule aufgrund der Salzkonzentrationen in der mobilen Phase. Dabei ist die Bildung von Agglomeraten möglich. Diese Agglomerate verbleiben dann möglicherweise aufgrund ihres großen Durchmessers in der Säulenmatrix. Das Risiko möglicher Fällungsreaktionen ließe sich durch eine Reduzierung der Natriumchlorid-Konzentration in der mobilen Phase verringern. Diese Vorgehensweise ist allerdings nicht empfehlenswert, da dies zu weiteren Cadmiumverlusten bei der Elution führen würde. Dies zeigen die Resultate der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente (siehe Abbildung 24).

Der Erfolg der IEC basiert auf der Voraussetzung, dass ausreichende Unterschiede in der Oberflächenladung des zu separierenden Komplexes vorhanden sind, um eine Abtrennung der intrazellulären Proteine zu erreichen. In diesem Zusammenhang ist auf die Ergebnisse der Gelelektrophorese mittels isoelektrischer Fokussierung hinzuweisen. Dort ist keinen wesentlicher Unterschied zwischen dem Bandenmuster cadmiumhaltiger und cadmiumfreier Proben erkennbar (siehe Abbildung 20). Aufgrund des niedrigen pK_s -Werte der Aminosäuren in den Phytochelatinen wurde eine zusätzliche Proteinbande bei niedrigen pH-Werten erwartet.

Aufgrund der Höhe der auftretenden Cadmiumverluste und den geringen Erfolgsperspektiven zum derzeitigen Zeitpunkt wurde die Fraktionierung mittels IEC nicht weiter verfolgt.

Dichtegradientenzentrifugation

Alternativ zu den chromatographischen Verfahren wurde das Potenzial einer Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Die Ergebnisse in Kapitel 4.4.3 zeigen, dass unter Einsatz eines geeigneten Saccharosegradienten eine Proteinfractionierung basierend auf der Dichte der zellulären Bestandteile möglich ist (siehe Abbildung 25). Die experimentell ermittelten Dichten dieser Fraktionen werden durch Literaturangaben bestätigt [178, 179].

Zur Beurteilung der Effektivität bei der Separierung der Cadmiumsulfid-Partikel ist eine Untersuchung des Cadmiumgehaltes der unterschiedlichen Dichtefractionen erforderlich. Diese Untersuchung ist im Rahmen nachfolgender Arbeiten durchzuführen.

Der Nachteil der Gradientenzentrifugation im Vergleich zu chromatographischen Trennverfahren besteht in einer zeitaufwändigen Versuchsdurchführung. Diese resultiert neben der manuellen Gradientenherstellung aus den trotz Ultrazentrifugation langen Zentrifugationszeiten zur Probenfractionierung.

Trotz dieser Nachteile besitzt die Dichtegradientenzentrifugation ein hohes Potenzial zur Partikelreinigung, da die Probenfractionierung auf einem Dichteunterschied der verschiedenen Probenbestandteile beruht. Es bleibt zu überprüfen, ob durch eine geeignete Wahl der Versuchsparameter der Einsatz einer Ultrazentrifugation vermeidbar ist. Aufgrund der hohen Dichte des Cadmiumsulfid-Kerns ergibt sich für einen wasserfreien Cadmiumsulfid/Peptid-Komplex eine Dichte von ca. $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Die durchschnittliche Dichte von Proteinen liegt unter gleichen Bedingungen bei ca. $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Aufgrund des hohen osmotischen Drucks ist davon auszugehen, dass die biologischen Bestandteile während der Fractionierung im Saccharose-Gradienten stark dehydriert werden [202]. Somit kann bei der Dichteabschätzung näherungsweise von wasserfreien biologischen Komponenten ausgegangen werden. Möglicherweise ist eine Ultrazentrifugation durch den Einsatz eines Dichtegradienten mit höherer Dichte vermeidbar. Über die Dichteerhöhung kann erreicht werden, dass sich sämtliche cadmiumfreien Komponenten auf dem Gradienten anreichern und lediglich die cadmiumhaltigen Komponenten durch den Gradienten wandern. Bei Einsatz eines Saccharose-Gradienten beträgt die maximal einstellbare Dichte ca. $1,3 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Durch Zugabe von Glucose kann diese auf ca. $1,4 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ erhöht werden. Gegebenenfalls ist eine weitere Dichteerhöhung durch Verwendung von schwerem Wasser (D_2O) möglich.

Weitere Reinigungsverfahren

Die Analysen zeigten eine thermische Instabilität der intrazellulären Proteine. Dabei wurde z. B. für eine Probenlagerung bei Temperaturen im Gefrierbereich eine Verschiebung der Probenzusammensetzung hin zu Komponenten mit geringerem Molekulargewicht beobachtet (Abbildung 19). Dies deutet auf eine Schädigung der intrazellulären Komponenten durch Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes hin. Bei Proben von *S. pombe* wurde neben dem Auftreten von Proteinfällungen ein Cadmiumverlust von 25 % beobachtet.

Bei Erhitzung der Probe auf 80 °C wurden ebenfalls Fällungsreaktionen beobachtet. Für Proben von *S. pombe* stellt die Hitzefällung hierbei aufgrund der hohen Proteinfällung in Kombination mit geringen Cadmiumverlusten < 10 % ein viel versprechendes Verfahren zur Probenvorreinigung direkt nach dem Zellaufschluss dar (siehe Kapitel 5.4.2). Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass durch die Erhitzung trotzdem zumindest eine teilweise Denaturierung der Proteinhülle bei den Nanopartikeln hervorgerufen wird. Dies ist gegebenenfalls im Rahmen späterer Arbeiten zu überprüfen.

Für *C. glabrata* zeigte sich die Hitzefällung als ungeeignet. In diesem Fall wurden durch die Erhitzung sämtliche Cadmiumkomponenten aus dem Zellysats gefällt.

Neben der thermischen Instabilität traten bei Änderungen des pH-Wertes deutliche Fällungsreaktionen der intrazellulären Proteine auf. Untersuchungen ergaben, dass der pH-Wert des Zellysats von *S. pombe* und *C. glabrata* im neutralen Bereich liegt. Sobald dieser Wert um $\Delta\text{pH} = 0,5$ gesenkt wurde, trat eine starke Proteinfällung kombiniert mit hohen Cadmiumverlusten von ca. 90 % auf. Die geringe Toleranz der intrazellulären Proteine gegenüber Änderungen des pH-Wertes ist vermutlich durch die gleich bleibenden Bedingungen im Cytoplasma der Zelle erklärbar.

Zusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchungen zeigte die Größenausschlusschromatographie das größte Potenzial für die Produktreinigung. Bei Zellysats-Proben von *S. pombe* ist eine Probenvorreinigung durch Einsatz einer Hitzefällung viel versprechend. Dies zeigen die experimentell gewonnenen Daten.

Der Größenausschlusschromatographie ist auch für eine Produktreinigung im industriellen Maßstab geeignet. Bislang führte der Einsatz chromatographischer Verfahren meist zu einer chargenweise Probenbehandlung. Aufgrund von

Neuentwicklungen im Bereich chromatographischer Verfahren kann nun bei Bedarf eine kontinuierliche Probenfraktionierung durchgeführt werden [203]. Nach genauerer Charakterisierung der Partikeloberfläche ist auch ein Einsatz spezifischer Affinitätsverfahren möglich.

7.1.4 Partikelcharakterisierung

Zur Charakterisierung der Partikeleigenschaften fand die Bestimmung der Partikelgrößenverteilungen und der Fluoreszenzeigenschaften statt.

Partikelgrößenverteilung

Die Partikelgrößenverteilung wurde mittels der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) und der differentiellen Mobilitätsanalyse untersucht. Wie in Kapitel 5.5.1 dargestellt, lieferten die Analysen mittels PCS Partikelgrößenverteilungen mit einem Maximum bei einem Partikeldurchmesser von ca. 10 nm (siehe Abbildung 26).

Dabei erfolgte die Berechnung der Partikelgrößenverteilung aus den gemessenen Streulicht-Intensitäten. Dabei gilt folgender Zusammenhang (aus Rayleigh-Näherung) [181]: $I \sim d^6$, mit I: Intensität des Streulichts und d: Partikeldurchmesser).

Dementsprechend weisen Partikel mit einem großen Durchmesser eine wesentlich höhere Streulichtintensität auf als kleinere Partikel. Da größere Partikel aufgrund der hohen Streulichtanteile die Signale von Partikeln mit wesentlich kleineren Durchmessern überlagern, ist eine verlässliche Analyse in Mischungen mit Partikeldurchmessern unterschiedlicher Größenordnung mittels PCS nahezu unmöglich. Der Streulichtanteil der kleinen Partikel an der Gesamtintensität ist in diesen Fällen sehr gering und für das System nicht detektierbar.

Dieser Effekt ist voraussichtlich auch bei der Analyse des cadmiumfreien Zelllysates von *S. pombe* in Abbildung 26 zu beobachten. Der lineare Kurvenverlauf bei kleinen Partikeldurchmessern deutet auf eine Verschiebung des Messbereiches zu größeren Partikeldurchmessern aufgrund des hohen Anteils von Partikeln mit Durchmessern im Bereich von 20 – 40 nm hin. Die in der Probe möglicherweise enthaltenen Partikel mit Durchmessern kleiner 20 nm werden dadurch nicht mehr detektiert. Im Fall der cadmiumhaltigen Probe ist der Anteil der Partikel mit einem Durchmesser kleiner 20 nm an der Gesamtheit aller Partikel höher. Somit werden auch Partikel < 20 nm detektiert. Die Fläche unterhalb des entsprechenden Peaks deutet auf einen relativ

hohen Anteil dieser Partikelfraktion an der Gesamtheit aller in der Probe enthaltenen Partikel hin.

Bei der Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels differentieller Mobilitätsanalyse (DMA) wurden sowohl für die cadmiumhaltige als auch für die cadmiumfreie Zellysat-Probe Partikel im Größenbereich von 10 – 20 nm nachgewiesen (siehe Abbildung 28). Der Kurvenverlauf zeigt in diesem Bereich bei vergleichbaren Probenkonzentrationen für die cadmiumhaltige Probe allerdings einen um ca. 40 % höheren Maximalwert. Somit bestätigen die Analyseergebnisse den aufgrund der PCS-Analysen vermuteten erhöhten Anteil von Partikeln mit einem Durchmesser im Größenbereich der biogenen Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe.

Bei der Bewertung der mittels DMA bestimmten Partikelgrößenverteilung ist eine Abhängigkeit des detektierten Partikeldurchmessers von der Leitfähigkeit der Probe zu berücksichtigen. Die Bestimmung basiert auf der Annahme, dass die mittels Elektrospray erzeugten Probenröpfchen aufgrund ihrer geringen Größe jeweils nur ein Partikel enthalten. Ist die Leitfähigkeit der Probe zu gering, werden Tröpfchen erzeugt, die mehr als ein Partikel enthalten können. Ist die Leitfähigkeit hingegen zu hoch, führt die hohe Salzkonzentration beim Trocknen der Probenröpfchen vor der Analyse zur Verfälschung des tatsächlichen Partikeldurchmessers. In beiden Fällen tritt eine Verschiebung der Partikelgrößenverteilung zu größeren Partikeldurchmessern statt. Zusätzlich ist das Analyseergebnis von der angelegten Spannung zum Erzeugen des Elektrosprays abhängig. Eine Optimierung der Versuchsdurchführung hat nicht stattgefunden. Im Rahmen der in Kapitel 5.5.1 vorgestellten Ergebnisse ist aufgrund der Probenvorbereitung ggf. von einer zu geringen Leitfähigkeit auszugehen.

Unter den eingesetzten Verfahren zur Partikelgrößenverteilung bot weder die PCS noch die DMA die Möglichkeit der Probenfraktionierung. Somit war leider eine Analyse des Cadmiumgehaltes der Partikelfraktionen nicht möglich. Es konnte somit nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass es sich bei den Partikeln dieses Größenbereiches tatsächlich um die Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexe handelt. Sollte sich dies bestätigen, würde der detektierte Durchmesser von 10 – 20 nm dem Durchmesser des Cadmiumsulfid-Partikels inklusive Peptidhülle entsprechen.

Aussagen zum Durchmesser des Cadmiumsulfid-Kerns sind auf Basis dieser Analysen nicht möglich. Entsprechende Literaturwerte berichten für *S. pombe* die

Bildung von Cadmiumsulfid-Kristallen mit Durchmessern von ca. 2 nm. Dieser Wert gilt für den Fall der Sulfideinlagerung in die zuvor gebildeten Cadmium-Peptid-Komplexe [204].

Fluoreszenzeigenschaften

Die Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften fand sowohl in größeren Probevolumina wie auch mittels Einzelmolekülanalyse statt. Die Auswahl der Versuchsparameter erfolgte entsprechend der in der Literatur berichteten Fluoreszenzeigenschaften chemisch synthetisierter Cadmiumsulfid-Nanokristalle mit Partikeldurchmessern von ca. 2 nm. Entsprechend dieser Angaben führt die Fluoreszenzanregung bei einer Wellenlänge von 360 nm zu einer charakteristischen Emissionsbande bei ca. 500 nm [74].

Die Analysen wurden für die Zellysat-Proben beider Hefestämme durchgeführt. Dabei waren für Zellysat-Proben aus cadmiumfreien und cadmiumhaltigen Kultivierungen Emissionsspektren mit einem breiten Emissionsmaximum bei 400 – 500 nm zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität fiel für die cadmiumhaltigen Proben etwas höher aus.

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass eine analytische Fluoreszenzbestimmung in biologischen Proben aufgrund der Komplexität der Probenzusammensetzung ungeeignet ist. Aufgrund der komplexen Probenzusammensetzung kann das Auftreten so genannter Innerfilter-Effekte nicht ausgeschlossen werden. Diese Effekte beinhalten die Reabsorption emittierter Strahlung durch weitere Probenbestandteile und die Lichtstreuung an Molekülen. Bei einem geringen Abstand zwischen zwei Molekülen ist zusätzlich eine Beeinflussung des Emissionsspektrums durch einen direkten Energieübertrag zwischen den Molekülen möglich.

Durch die Verwendung der Einzelmolekülspektroskopie lassen sich diese Effekte aufgrund des geringen Probevolumens weitgehend minimieren. Zudem ermöglichte die Einzelmolekülspektroskopie eine simultane Bestimmung des Emissionsspektrums und der Fluoreszenzlebensdauer einzelner Moleküle [205].

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden die Fluoreszenzemissionen kommerzieller Quantenpunkte analysiert. Die Untersuchung ergab ein Emissionsspektrum mit einem erwarteten Maximum bei 565 nm. Die zugehörige Fluoreszenzlebensdauer betrug mehr als 10 ns (siehe Abbildung 30) und ist damit

wesentlich länger als das mögliche Hintergrundsignal biologischer Proben. Hierbei liegen die Fluoreszenzlebensdauern in der Größenordnung bis 3 ns [206].

Die Größe der Fluoreszenzpunkte in der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung und die Größe der analysierten Flächen mit einem Durchmesser von ca. 500 nm deuteten darauf hin, dass bei der Fluoreszenzanalyse Quantenpunkttagglomerate nachgewiesen wurden. Das Fluoreszenzsignal setzt sich demnach aus der Emission mehrerer Quantenpunkte zusammen. Die Agglomerationsbildung wurde durch die Ergebnisse der Partikelgrößenverteilung bestätigt (siehe Abbildung 27). Bei der Agglomeration bleiben die Primärpartikel erhalten. Dies bestätigten die Fluoreszenzeigenschaften der Proben. Da das Emissionsmaximum bei Quantenpunkten partikelgrößenabhängig ist, hätte ansonsten eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu größeren Wellenlängen erfolgen müssen. Bei Verlust der quantenspezifischen Eigenschaften wäre keine Fluoreszenz mehr detektierbar gewesen. Die Tendenz zur Bildung von Agglomeraten aus Primärpartikeln wird vom Hersteller bestätigt [164].

Die nachfolgenden Fluoreszenzanalysen von Zellysat-Proben von *S. pombe* und *C. glabrata* mittels Einzelmolekülspektroskopie zeigten vergleichbare Ergebnisse wie zuvor bei der Messung in größeren Probenvolumina (Abbildung 29 und 31). Mögliche Kontaminationen durch intrazelluläre Proteine scheiden als Ursache aus, da die Emissionsmaxima von Proteinen bei ca. 350 nm liegen. Es wird daher vermutet, dass die Hintergrundemission in den Emissionsspektren der Zellaufschluss-Proben von niedermolekularen Probenbestandteilen resultiert, welche sich an die intrazellulären Partikel und Proteine anlagern. Die Vermutung wird gestützt durch die Spektren, welche nach einer Größenausschlusschromatographie gewonnenen Fraktionen einer Zellysat-Probe von *S. pombe* mittels Einzelmolekülspektroskopie bestimmt wurden. Die Emissionsspektren der untersuchten SEC-Fraktionen zeigen den gleichen Kurvenverlauf wie die Zellysat-Probe vor der Fraktionierung.

Bei der störenden Begleitsubstanz kann es sich z. B. um den zellulären Speicherstoff NADH handeln. Für den reduzierten Zustand von NADH und NADPH wird bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm eine Emission bei 445 nm beschrieben [207]. Die oxidierte Form dieser Moleküle zeigt keine Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität von NADH erhöht sich dabei bis auf die 4-fache Intensität von freiem NADH, wenn es proteingebunden vorliegt [206]. Eine Störung der Fluoreszenzmessungen durch NADH bzw. NADPH ist somit möglich.

Als weitere Störkomponente kommen intrazelluläre Flavine (FMN, FAD)³⁵ in Betracht. Für die beiden Komponenten wurden im oxidierten Zustand Fluoreszenzemissionen im Bereich von 440 - 550 nm beobachtet [206, 208]. Im Gegensatz zu NADH zeigen die Flavine im proteingebundenen Zustand so gut wie keine Fluoreszenz mehr [206]. Im Rahmen dieser Betrachtung können sie daher voraussichtlich als Störgröße vernachlässigt werden.

Für die optischen Eigenschaften der Cadmiumsulfid-Partikel wird in der Literatur eine Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von dem Anteil der Peptidhülle am Gesamtkomplex bestimmt [4]. Hohe Sulfidkonzentrationen führen demzufolge zur Bildung größerer Partikel mit einem geringeren Anteil an Hüllprotein. Dabei gilt: Je niedriger die Sulfidkonzentration, desto höher der Peptidanteil. Und: Je höher der Peptidanteil, desto dicker die Peptidhülle – und desto geringer die Fluoreszenz [4].

Die Kultivierungsmedien wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Sulfat angereichert, um den Mikroorganismen ausreichend Substrat zur Sulfidbildung zur Verfügung zu stellen. Daher ist im Fall der Bildung biogener Cadmiumsulfid-Partikel eher von einem geringen Peptidanteil auszugehen. Trotzdem ist keine charakteristische Emissionsbande detektiert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer als einfaches Modell eine monoexponentielle Funktion zugrunde gelegt. Diese ist z. B. häufig bei einfachen Fluorophoren zu beobachten. Multiexponentielle Abklingfunktionen weisen meist auf eine Überlagerung von Fluoreszenzsignalen unterschiedlicher Komponenten hin [63]. Die Fluoreszenz-Abklingdauern biologischer Komponenten wie z. B. Proteine liegen dabei im Bereich weniger Nanosekunden [209]. Für Quantenpunkte liegt sie bis zu einer Größenordnung über der Fluoreszenzlebensdauer von biologischen Komponenten. Dies wird durch die experimentell gewonnenen Daten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt. In Einzelfällen kann sie sogar Werte im Mikrosekundenbereich annehmen [63].

7.1.5 Bewertung der Wettbewerbsfähigkeit

Die im Rahmen der durchgeführten Kultivierungen ermittelten Werte für die spezifische Cadmiumakkumulation zeigen, dass sich für beide Hefestämme mit

³⁵ FMN: Flavin-Mononucleotid, FAD: Flavin-Adenin Dinucleotid.

Konzentrationen im Milligramm-Bereich nennenswerte Cadmiumgehalte erzielen lassen. Im Folgenden wird eine Abschätzung der Kosten für die Partikelproduktion im industriellen Maßstab durchgeführt. Bei der Abschätzung werden die Kosten zur Partikelsynthese und Partikelreinigung berücksichtigt.

Dabei sind die kurzen Prozesszeiten mit Kultivierungsdauern von ca. zwei Tagen positiv hervorzuheben. Mit der Größenausschlusschromatographie wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Reinigungsverfahren gefunden, welches für eine Produktreinigung im industriellen Maßstab geeignet ist. Die Erhöhung der chromatographischen Reinigungseffizienz durch eine Probenvorbehandlung mittels Hitzefällung ist ebenfalls problemlos auf größere Volumina übertragbar.

Im Folgenden findet eine Abschätzung des Reaktorvolumens zur Herstellung von 10 g Partikeln statt. Wie in der obigen Abschätzung erwähnt, sind hierzu bei einer spezifischen Cadmiumakkumulation von 10 mgCd/gBTM ca. 1 kg Biotrockenmasse erforderlich. Die experimentellen Daten zeigten bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kultivierungen eine Biotrockenmasse-Konzentration von mindestens $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Daraus ergeben sich zur Gewinnung von 1 kg Biotrockenmasse ca. 200 Liter Hefesuspension. Bei einer Reaktorbefüllung von typischerweise 67% ergibt das einem Reaktorvolumen von ca. 300 Liter. Für biotechnologische Prozesse kommen für die industrielle Prozessführung Bioreaktoren mit Volumina im Kubikmetermaßstab zum Einsatz. Somit entsprechen die 300 Liter einem vergleichsweise kleinen Bioreaktor [1]. Damit ist eine technische Realisierung des Prozesses unter dem Aspekt des erforderlichen Reaktorvolumens durchaus realistisch.

In den Kultivierungen wurden durchschnittlich spezifische Cadmiumakkumulationen von 10 mgCd/gBTM erzielt. Ausgehend von der Annahme, dass die gesamte akkumulierte Menge an Cadmium zur Bildung von Cadmiumsulfid-Partikeln genutzt wird, entspricht 1 kg Biotrockenmasse unter den entsprechenden Versuchsbedingungen einer Partikelproduktion von ca. 10 g Partikeln. 10 g Nanopartikel entsprechen für Cadmiumsulfid einer Anzahl von ca. 0,8 mmol Partikeln.

Basierend auf den experimentell bestimmten Daten für die Partikelgewinnung wurde eine Kostenabschätzung durchgeführt. Dazu wurde eine Produktionsmenge von 10 g Nanopartikeln je Woche angenommen. Eine detaillierte Darstellung der Abschätzung befindet sich in Anhang C. Unter Berücksichtigung der Kosten für die Kultivierung

und Partikelreinigung liegen die Herstellkosten für 10 g Cadmiumsulfid-Nanopartikeln bei ca. 20.000 €. Dabei wurden auch die beim Zellaufschluss und der Partikelreinigung anfallenden Cadmiumverluste berücksichtigt. Um die Größenordnung der geschätzten Herstellkosten zu überprüfen, wurde nach einem qualitativ hochwertigen Produkt recherchiert, welches ebenfalls biotechnologisch in Hefekultivierungen hergestellt wird. Dabei zeigte sich, dass sich der Preisrahmen von ca. 20.000 € im Wesentlichen bestätigen lässt (Insulinproduktion, Kultivierung von *Pichia pastoris*, Reinigung mittels HPLC) [166].

Die Marktfähigkeit der Nanopartikel basiert auf dem Vorliegen einer reinen Nanopartikelfraktion mit definierten Fluoreszenzeigenschaften. Unter der Annahme der Marktfähigkeit für die Partikel, erfolgt die Beurteilung der Wettbewerbsfähigkeit basierend auf den Preisen für kommerzielle Quantenpunkte. Als Referenz werden die Nettopreise funktionalisierter Cadmiumselenid-Nanopartikeln verwendet. Diese liegen in der Größenordnung von ca. 440 – 660 € für 250 µL einer 50 mM Nanopartikel-Suspension [210]. Die Preise für 1 mmol Cadmiumselenid-Partikeln betragen somit ca. 35.000 – 53.000 €.

Die erzielbaren Preise liegen somit über den geschätzten Herstellungskosten für die biologische Partikelsynthese. Dabei ist zu berücksichtigen, dass dieser Vergleich anhand von Partikeln mit einer bereits funktionalisierten Oberfläche durchgeführt worden ist. Andererseits entspricht die angenommene Jahresproduktion für die biogenen Partikel mit ca. 500 g pro Jahr lediglich einem Weltmarktanteil von ca. 0,25 %³⁶ für Biomarker [99]. Bei einer gesteigerten Produktionsmenge kommt es zu einer starken Reduzierung der spezifischen Kosten. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass der Prozess noch zahlreiche Möglichkeiten für eine Optimierung der Ausbeute und eine Senkung der Kosten bietet. Dazu zählt vor allem eine Prozessoptimierung zur Minimierung von Cadmiumverlusten bei der Aufreinigung.

Neben den Kosten ist die Wettbewerbsfähigkeit der biogenen Nanopartikel im Wesentlichen von den Partikeleigenschaften abhängig. Der Bildungsmechanismus zur Gewinnung biogener Cadmiumsulfid-Partikel verspricht eine enge Partikelgrößenverteilung durch eine bessere Kontrolle der Syntheseparameter als bei den synthetischen Verfahren [7]. Die biologisch gewonnenen Nanopartikel weisen

³⁶ Annahme: 20.000 €, 50 Produktionschargen/Jahr ergeben ca. 1 Mio. €; Weltmarktvolumen für Biomarker: 4 Mrd. US-Dollar.

zudem eine andere Kristallstruktur als die meisten chemisch synthetisierten Cadmiumsulfid-Nanopartikel auf [63]. Dadurch sind Unterschiede in den Partikeleigenschaften möglich.

Entsprechend der Ausführungen von Dameron sind synthetisch produzierte Cadmiumsulfid-Cluster, die über eine Polymerschicht oder durch Mizellen stabilisiert wurden, zudem nicht so effektiv gegen Partikelagglomeration geschützt wie biogene Nanopartikel [7]. Eine entsprechende Agglomerationsbildung war auch bei den kommerziellen Quantenpunkten zu beobachten. Darüber hinaus sind die Partikel je nach gewählter Polymerschicht teilweise nicht so gut vor Schädigung durch Sauerstoffradikale geschützt wie beim Vorhandensein einer Peptidhülle [7].

In jedem Fall ist die Optimierung des Reinigungsverfahrens notwendig, um eine eindeutige Charakterisierung der nanospezifischen Partikeleigenschaften zu erzielen. Im Allgemeinen sind Cadmiumsulfid-Nanopartikel ein viel versprechendes Material für die Herstellung von Quantenpunkten. Im Gegensatz zu den auf dem Markt erhältlichen Cadmiumselenid-Nanopartikeln sind bei Partikeln aus Cadmiumsulfid auch Fluoreszenzemissionen im blauen Wellenlängenbereich erzielbar [74, 164, 211].

7.2 Nanostrukturierte Partikel

7.2.1 Kultivierung

Bei der Bestimmung der Kultivierungsbedingungen zur Gewinnung oberflächenstrukturierter Calciumcarbonat-Partikel lag der Schwerpunkt auf der Schalenbildung des Referenzorganismus *Emiliana huyleyi*. Kultivierungen auf festem Nährmedium führen für *Ehux* entsprechend der Literaturangaben nahezu ausschließlich zur Bildung schalenfreier Algenzellen [43]. Die Kultivierungen fanden daher im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich in flüssigen Kultivierungsmedien statt. Des Weiteren stellte sich in den durchgeführten Experimenten heraus, dass es bei der Verwendung einer rein synthetischen Meerwasserzusammensetzung zu keinem Algenwachstum kommt. Dies war vermutlich auf das Fehlen essentieller Bestandteile im Medium zurückzuführen. Dem Medium wurde daher natürliches Meerwasser zugesetzt.

Zur Vermeidung einer Coccolithenmissbildung wurde ein geringer Anteil an freiem Kohlendioxid im Medium eingestellt [39]. Die Kultivierung fand daher im leicht

basischen Bereich (pH = 8) statt. Unter diesen Bedingungen liegt entsprechend des Kalk-Kohlensäure-Gleichgewichts ein maximaler Hydrogencarbonatgehalt im Medium vor. Das Hydrogencarbonat wird von der Alge enzymatisch zu Kohlendioxid umgesetzt und dient als Kohlenstoffquelle³⁷.

Die Versuchsergebnisse zeigen bei diesen Versuchsparametern eine erfolgreiche Produktion von Calciumcarbonat-Partikeln durch die Alge *Ehux* im Labor (Abbildung 33). In den entsprechenden elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind vollständig kalzifizierte Algenzellen erkennbar. Detailaufnahmen zeigten, dass die Algenzellen von ca. 20 - 30 Coccolithen umgeben sind. Dies deckt sich mit Angaben in der Literatur, wonach sich auf der Zelloberfläche typischerweise eine Schicht aus 10 – 40 Coccolithen befindet [40]. Die Anzahl an gebildeten Calciumcarbonat-Partikeln kann je nach Kultivierungsbedingungen in der Größenordnung von bis zu einigen Milliarden Einzelschalen pro Gramm Zellprobe liegen [31].

Die Auswertung des Wachstumsverlaufes zeigte, dass ein langsames Algenwachstum stattfand. Eine exponentielle Wachstumsphase war bei den gewählten Kultivierungsparametern nicht zu erkennen (Abbildung 32). Als Ursache wird das Auftreten einer Lichtlimitierung vermutet. Für das Wachstum bei Algen gilt, dass die Zunahme der Biomassekonzentration proportional zum Lichteintrag ist.

$$\frac{dc_x}{dt} \propto \text{Lichteintrag}$$

Im Rahmen der durchgeführten Kultivierungen nahm die spezifische Wachstumsrate in den ersten 10 Kultivierungstagen von $\mu = 0,5 \text{ d}^{-1}$ auf $\mu = 0,03 \text{ d}^{-1}$ ab. Die Wachstumsrate sank damit proportional zum Lichteintrag. Limitierungen des Lichteintrags resultieren in Algenkultivierungen meist aus Abschattungseffekten bei hohen Zelldichten. Bei Algenkultivierungen ist dies ab einer Biotrockenmasse-Konzentration von ca. $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ möglich. Die Kultivierung wurde in einem Rührkesselreaktor mit Außenbeleuchtung durchgeführt. Daher ist aufgrund des geringen Oberflächen/Volumen-Verhältnisses eine Lichtlimitierung im Reaktorinneren wahrscheinlich.

In der Literatur werden für *Ehux* im Meer Wachstumsraten zwischen $0,5$ bis $1,2 \text{ d}^{-1}$ berichtet [30, 212]. Die Werte entsprechen somit einer typischen Wachstumsgeschwindigkeit von ca. $1,0 \text{ d}^{-1}$ für Algenkultivierungen. Die Algenblüten sind dabei stickstofflimitiert [35]. Die Wachstumsraten lassen sich somit

³⁷ Das Enzym Carbonanhydrase katalysiert die Umsetzung von Hydrogencarbonat in Kohlendioxid. Dieses wird anschließend zur Kohlenstoff-Fixierung verwendet (siehe Kapitel 2.1.2).

voraussichtlich durch eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen deutlich steigern. Dabei ist das Erreichen einer maximalen Zellkonzentration nach einer Kultivierungsdauer von ca. 200 Stunden (8 - 9 Tagen) zu erwarten [43].

Dabei wurde ein Anstieg des Anteils freigesetzter Coccolithen mit steigender Wachstumsrate der Algenzellen festgestellt [213]. Bei Kultivierung einer anderen Coccolithophoriden wurde bei der Schalenbildung eine maximale Produktivität von ca. $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Coccolithen pro Tag ermittelt. Die gebildeten Coccolithen haben dabei einen Durchmesser von ca. $2,5 \text{ } \mu\text{m}$ [214]. Dies stimmt mit der Größe der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Calciumcarbonat-Partikel überein.

Die Wachstumsraten bei einer Kultivierung der Diatomeenalge *T. weissflogii* liegen typischerweise im Bereich von $0,4 - 1,3 \text{ d}^{-1}$ [215]. Die Resultate vorausgegangener Arbeiten zeigten ein ähnliches Ergebnis für Kultivierungen von *C. cryptica* [216].

Für Diatomeen ist im Gegensatz zu *Ehux* keine Bildung schalenfreier Algenzellen bekannt. Aufgrund von Substratlimitierungen sind allerdings Schädigungen der Diatomeenfrusteln möglich. Die Partikeleigenschaften lassen sich neben der Auswahl entsprechender Algenarten in begrenztem Rahmen durch die Variation der Kultivierungsparameter beeinflussen. So ist für geringe Salzkonzentrationen im Kultivierungsmedium ein Anstieg des Anteils an biogenem Silica beobachtet worden [217]. Eine Eisenlimitierung kann zur Bildung dickerer Silica-Frusteln führen [218].

Neben der phototrophen Kultivierung besitzen die Diatomeen die Fähigkeit zu heterotrophem Wachstum³⁸. Die damit verbundene Veränderung der Stoffwechselaktivitäten kann ebenfalls eine Veränderung der Partikeleigenschaften hervorrufen [219].

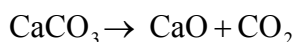
Bei der Gewinnung der Diatomeenschalen ist zu berücksichtigen, dass es in Folge des Bildungsprozesses zu einer Veränderung des Frusteldurchmessers in Abhängigkeit von der Generationszahl kommt. Dabei nehmen die Partikeldurchmesser um bis zu 40 % ab (siehe Kapitel 2.1.2). Durch die Kultivierung im Bioreaktor ist die Durchführung einer so genannten synchronen Kultivierung möglich. Das bedeutet, dass alle Algen gleich alt sind und sich somit in der gleichen Generation befinden. Somit bilden sie Partikel ähnlichen Durchmessers. Durch einen gezielten Kultivierungsabbruch lassen sich so Partikel mit dem gewünschten Schalendurchmesser gewinnen.

³⁸ Heterotroph: Nutzung organischer Verbindungen als Kohlenstoffquelle.

Bei den aus der Algenzucht bezogenen Diatomeenschalen war eine starke Deformierung der Partikel zu beobachten. Bei einer mixotrophen oder heterotrophen Kultivierung von Diatomeen sind Partikelmissbildungen möglich. Dies kann in diesem Fall jedoch als Ursache ausgeschlossen werden, da laut Hersteller ausschließlich phototrophe Kultivierungen durchgeführt werden [167]. Die Deformierung tritt daher vermutlich bei der Probenkonzentrierung auf.

7.2.2 Reinigung

Wie in Kapitel 6.3.1 gezeigt, führte im Rahmen der Partikelreinigung die Stoll-Methode zu sehr guten Ergebnissen [173, 220]. Dies gilt sowohl für die Calciumcarbonat-Partikel wie auch für die Reinigung der Kieselschalen. Die Stoll-Methode ermöglichte die vollständige Entfernung der organischen Substanz unter Erhalt der partikulären Mikro- und Nanostrukturen. Unter den getesteten Reinigungsverfahren ist sie zudem die einzige zerstörungsfreie Methode. Die Schädigung der Struktur der Calciumcarbonat-Partikel während der Lagerung wurde durch die Aufbewahrung in Wasser mit einem hohen Härtegrad erfolgreich vermieden. Diese Versuchsbedingungen sind in der Literatur beschrieben [220, 221]. Die Entfernung organischer Bestandteile bei hohen Temperaturen unter Verwendung einer Bunsenbrennerflamme führte zu einer deutlichen Schädigung der *Ehux*-Schalen (siehe Abbildung 35). Die Schädigung ist vermutlich auf die Bildung von so genanntem Branntkalk (CaO) zurückzuführen. Dieser bildet sich aus Kalk bei Temperaturen $> 900^{\circ}\text{C}$ durch folgende Reaktion:



Bei der Durchführung des Glühprozesses im Ofen wurde die Temperatur daher auf 500°C limitiert. Allerdings zeigten die elektronenmikroskopischen Aufnahmen auch in diesem Fall eine Schädigung der Schalenstruktur bei Partikeln von *Ehux*. Bei Kieselschalen wurde bei Temperaturen über 800°C eine Änderung der Nanostrukturen hinsichtlich der Porenform und der Oberflächenrauigkeit beobachtet. Dieser Prozess wird auf eine Reduzierung der spezifischen Partikeloberfläche zur Minimierung der freien Gibbschen Energie zurückgeführt [58]. Neben den sichtbaren Veränderungen traten vermutlich weitere Änderungen der Partikeleigenschaften auf: Aufgrund des Bildungsprozesses bei der Schalenbildung befinden sich Hydroxylgruppen auf der Partikeloberfläche [3]. Diese Hydroxylgruppen

führen allerdings zu einer vereinfachten Wasserstoffbrückenbindung und damit zu einem erhöhten Adsorptionspotenzial für polare Substanzen. Durch eine Probenbehandlung bei hohen Temperaturen werden diese teilweise oder vollständig entfernt. Da diese Eigenschaften z. B. für den Einsatz als Trägermaterial zur Immobilisierung von (Bio-)Katalysatormolekülen interessant sind, sollten sie nach Möglichkeit bei der Partikelreinigung erhalten bleiben.

Die Reinigung im Ultraschallbad führte zu einer Zersplitterung der einzelnen Coccolithen und zur Zerstörung der zentralen Bodenplatte in der Mitte der Einzelcoccolithen. Dieses Ergebnis war überraschend, da eine Ultraschallbehandlung zuvor im Zusammenhang mit Coccolithen beschrieben worden ist [3]. Möglicherweise lassen sich unter Verwendung geringerer Leistungen oder anderer Frequenzen bessere Ergebnisse erzielen.

Im Rahmen der Analysen wurde bei *Ehux* ein Schalenanteil von ca. 40 % der Biotrockenmasse bestimmt (siehe Kapitel 6.3.1). Der Wert entspricht der in der Literatur angegebenen Coccolithenausbeute für Versuche mit *Ehux*. Hierbei wurde bei einer Biomassekonzentration von $810 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ eine maximale Coccolithenausbeute von $560 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt [222, 223]. Für die Zellen von *T. weissflogii* gibt der Hersteller einen Proteinanteil von ca. 10 % und einen Schalenanteil von ca. 50 % am Schalen/Algenzellen-Komplex an. Dies deckt sich mit den Werten für Diatomeen in der Literatur. Dort wird für biogenes Silica ein spezienspezifischer Anteil von bis zu 50 % genannt [223].

7.2.3 Charakterisierung

Die REM-Aufnahmen zeigen eine gute Reproduzierbarkeit der biogenen Calciumcarbonat- und Silicapartikel hinsichtlich der gebildeten dreidimensionalen Strukturen. Diese einheitlichen komplexen Partikelstrukturen treten gemeinsam mit einer engen Partikelgrößenverteilung der artspezifischen Partikel auf (siehe z. B. Abbildung 37).

Die Untersuchungen zielten u. a. auf einen Vergleich der Partikeleigenschaften frisch gewonnener Schalen und der Partikelcharakteristika fossiler Kieselgur-Proben. Erste Unterschiede wurden bereits in den REM-Aufnahmen sichtbar. Während bei Kultivierungen unter Verwendung einer Reinkultur die Formeneinheit der gebildeten Partikel gewährleistet ist, besteht Kieselgur aus den sedimentierten Algenschalen unterschiedlicher Kieselalgen (siehe Abbildung 39).

Dieser Unterschied spiegelte sich auch in der breiten Partikelgrößenverteilung für Kieselgur-Proben im Vergleich zu den artenreinen Schalenproben wider. Die Abbildung 37 zeigte, dass die Schalen von *Thalassiosira weissflogii* im Vergleich zu Kieselgur eine enge Größenverteilung aufweist. Dabei liegt der mittlere Partikeldurchmesser bei Kieselgur ca. eine Größenordnung über dem Partikeldurchmesser von Diatomeenfrusteln [54].

Neben der Größenverteilung und den optischen Struktureigenschaften der Partikel existieren eine Reihe weiterer wichtiger Kenngrößen zur Werkstoffcharakterisierung. Dazu zählen u. a. die Dichte, Porosität, Porengrößenverteilung, spezifische Oberfläche, elastische Kenngrößen und der thermische Ausdehnungskoeffizient [224]. Diese sind hinsichtlich der Bewertung von Einsatzmöglichkeiten der biogenen Partikel im Bereich der technischen Keramik interessant. Zusätzlich wurden in der Literatur Versuche zur Bestimmung der mechanischen Belastbarkeit einzelner Diatomeenschalen beschrieben. Diese ergaben für Kieselschalen eine hohe Festigkeit in der Größenordnung von 100 bis 700 t·m⁻² [225].

Frisch kultivierte Frusteln weisen nachweisbar andere Spezifikationen als ihre fossilen Analoga auf. Kieselgur ist für technische Applikationen weniger interessant, da im Verlauf der erdgeschichtlichen Entwicklung zwischen der Frustelentstehung und der Kieselgur-Gewinnung attraktive morphologische Eigenschaften verloren gegangen sind. Es wird z. B. berichtet, dass Diatomeenschalen aus frischen Kultivierungen nahezu ausschließlich eine amorphe Struktur aufweisen [58]. Dieses Ergebnis wurde durch Röntgenbeugungsanalysen an Frusteln von *C. cryptica* bestätigt. Im Gegensatz wiesen Kieselgur-Proben eindeutig kristalline Silica-Strukturen auf [54]. Die Entstehung der kristallinen Strukturen ist dabei wahrscheinlich auf den hohen Druck zurückzuführen, dem die fossilen Kieselschalen ausgesetzt waren.

Des Weiteren werden für Kieselgur geringere Werte bzgl. der spezifischen Partikeloberfläche im Vergleich zu frischen Kieselschalen berichtet. Im Fall der Frusteln einer phototrophen Kultur von *C. cryptica* lag der Wert um eine Größenordnung über jenem von Kieselgur [54]. Dies deckt sich mit Angaben, nach denen die spezifische Oberfläche von Kieselgur bei ca. 22 m²·g⁻¹ liegt. Für Kieselschalen von *Navicula pelliculosa* wurde eine spezifische Oberfläche von ca. 123 m²·g⁻¹ ermittelt [29]. Im Allgemeinen können die spezifischen Oberflächen von

Diatomeen in Abhängigkeit von der Probenreinigung und Behandlung zwischen 10 – 200 m²·g⁻¹ betragen [58]. Im Vergleich dazu besitzen poröse Materialien wie z. B. Bimsstein eine spezifische Oberfläche von lediglich ca. 6 m²·g⁻¹ [226]. Für Aktivkohle beträgt sie ca. 600 – 1500 m²·g⁻¹ [227]. Die spezifische Oberfläche für Aerosil liegt bei ca. 50 – 380 m²·g⁻¹ [228].

Eine Ursache für die Unterschiede in der spezifischen Oberfläche bei Kieselgur und frischen Kieselalgen liegt in den geringeren Partikeldurchmesser der Kieselschalen. Hauptsächlich wird diese allerdings durch einen Verlust der nanoporösen Struktur hervorgerufen. Es wird vermutet, dass diese aus einem Zusetzen der Poren resultiert. Zudem weist Kieselgur meist Verunreinigungen durch eingelagerte Mineralien und ggf. durch Schwermetalle auf.

7.2.4 Bewertung der Wettbewerbsfähigkeit

Einleitend ist festzustellen, dass biogene anorganische Mikropartikel ihre technische Relevanz bereits bewiesen haben. Dies zeigt z. B. der Einsatz von Kieselgur als Filterhilfsstoff in der Getränkeindustrie. Im Rahmen dieses Kapitels soll diskutiert werden, in welchem Umfang die biogenen Calciumcarbonat- und Silica-Schalen entsprechend ihrer Partikelform, Porosität und komplexen Oberflächenstruktur für technische Anwendungen interessant sind. Aufgrund der Materialeigenschaften erschließt sich dabei der Bereich der technischen Keramiken. Die hohe Qualität der biologisch gewonnenen Partikel wurde durch die gute Reproduzierbarkeit bezüglich der Größe, Formen und Oberflächenstrukturen der Partikel bestätigt. Dies zeigten im Rahmen dieser Arbeit sowohl die experimentellen Ergebnisse wie auch Angaben in der Literatur [3].

Die Wirtschaftlichkeitsbetrachtung für die biogenen Partikel basiert auf den besonderen strukturspezifischen Eigenschaften der Partikel. Allerdings ist am Markt kein Referenzverfahren zur Herstellung von Partikeln mit vergleichbaren Oberflächencharakteristika verfügbar. Im industriellen Bereich kommen derzeit vorwiegend Ätztechniken und lithographische Verfahren zum Einsatz [55]. Die Verfahren sind kostenintensiv und nur bedingt upscale-fähig. Dabei sind dreidimensionale Strukturen bis in den Submikrometerbereich möglich [152]. Trotz der Technologiefortschritte in der Nanotechnologie bleibt eine gesteuerte Synthese komplexerer zwei- und dreidimensionalen Nanostrukturen unter Einsatz physikalisch-chemischer Verfahren weitgehend unerreicht [9]. Die kostengünstige

Massenfertigung von dreidimensionalen Mikrokomponenten ist derzeit nicht möglich [55].

Die Forschungsaktivitäten zeigen jedoch, dass ein Bedarf an Partikeln mit komplexen Strukturen vorhanden ist. Den biogenen Partikeln wird dabei allerdings kaum Aufmerksamkeit gewidmet. Ein Vergleich der biologischen Leistung bei der Synthese von Diatomeenschalen mit der chemischen Zeolithsynthese ergab folgendes Resultat:

	Chemisches Verfahren zur Partikelsynthese	Biologisches Verfahren zur Partikelsynthese
Beispiel	Zeolithsynthese	Einzellige Kieselalge
Reaktionszeit	Tage	Schalenbildung in Stunden
pH	6 – 14	6 - 8
Temperatur [°C]	125 - 200	4 - 25
Druck [bar]	1 – 100	1
Strukturbeschreibung	Kompakte Partikel, mikroporös mit einheitlichen Poren mit Durchmessern von 0,3 bis 2 nm	Schalenförmige Partikel, meso- und makroporös mit Porendurchmessern von 5 nm bis einige μm

Tabelle 5: Vergleich technischer und biologischer Syntheseverfahren zur Herstellung strukturierter SiO_2 -Matrizen [11].

Biologische Syntheseverfahren ermöglichen somit neben der Erzeugung komplexer, nicht-planarer Strukturen die Partikelgewinnung unter moderaten Synthesebedingungen. Ein vergleichbares chemisches Syntheseverfahren ist nicht bekannt [11].

Aus technischer Sicht können nur diejenigen Partikel wirtschaftlich an Bedeutung gewinnen, die sich kostengünstig herstellen lassen. Im Rahmen dieser Arbeit sind daher Organismen gewählt worden, die in der Natur weit verbreitet sind und in jährlichen Algenblüten auftreten. Zur Gewinnung der biogenen nanostrukturierten Partikel existieren verschiedene Möglichkeiten: Entweder wird die entsprechende Algenart im Bioreaktor unter Laborbedingungen kultiviert– oder sie wird direkt aus der Natur bezogen.

Die Ergebnisse der Algenkultivierung zeigten dabei das Auftreten von Lichtlimitierungen beim Wachstum und verringerten Wachstumsgeschwindigkeiten. Vor einer Kultivierung der Algen in einem größeren Maßstab ist somit eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Maximierung der Ausbeute

notwendig. Neben der Durchführung einer zeit- und kostenintensiven Grundlagenforschung besteht die Möglichkeit, sich dazu an kommerzielle Forschungsinstitute zu wenden, welche sich auf die Entwicklung von Kultivierungsverfahren für Mikroalgen für technischen Maßstab spezialisiert haben [229].

Da für technische Applikationen ohnehin die Entfernung der organischen Bestandteile notwendig ist, können die entsprechenden Kultivierungen kostengünstig unter unsterilen Bedingungen z. B. in so genannten Plattenreaktoren³⁹ durchgeführt werden. Diese bieten eine große Reaktoroberfläche und vermindern so das Risiko einer Lichtlimitierung. Die Belichtung kann dabei je nach Standort durch natürliches Sonnenlicht erfolgen. Dabei bestehen gute Aussichten, die Wachstumsrate durch Vermeidung von Lichtlimitierung deutlich zu erhöhen.

Für die Calciumcarbonat-Partikel von *Ehux* ist zu bemerken, dass für die technischen Anwendungen ausschließlich die Coccolith-Einzelpartikel einsetzbar sind. Bei einer vollständig kalzifizierten Algenzelle sind die Coccolithen an der Zelloberfläche über Polysaccharide miteinander verbunden. Da beim Reinigungsvorgang die organischen Bestandteile und die Polysaccharide entfernt werden, zerfallen die Komplexe in einzelne Coccolithen.

Die Diatomeen wurden zum Preis von ca. 36 \$ pro Liter Algensuspension von einer Algenzucht bezogen (siehe Kapitel 4.1.3). Entsprechend der ermittelten Biotrockenmasse-Konzentration führt dies zu Kosten von ca. 570 € je kg Biotrockenmasse. Bei einem Schalenanteil von 50 % ohne Berücksichtigung der Reinigungskosten ergibt das für 1 kg Diatomeenfrusteln ca. 1100 €.

Zur Überwindung der Einschränkung für technische Applikationen aufgrund der Materialzusammensetzung der Partikel steht das von Sandhage entwickelte und patentierte BaSIC-Verfahren („bioclastic and shape-preserving inorganic conversion process“) zur Verfügung [133]. Es ermöglicht die Änderung der Materialeigenschaften unter Erhalt der spezifischen Strukturen des Ausgangsmaterials.

Eine weitere Beeinflussung der Partikeleigenschaften ist durch Mutationen möglich. Zum Hervorrufen von Mutationen wird bei Kieselalgen entsprechend der vorliegenden Veröffentlichungen derzeit UV-Bestrahlung eingesetzt [55]. Der Einsatz

³⁹ Plattenreaktor: Reaktor aus zwei parallel angeordneten, lichtdurchlässigen Platten, die seitlich abgedichtet sind.

gentechnischer Verfahren ist prinzipiell zur Modifikation der Mikro- und Nanostrukturen zu bevorzugen. Allerdings ist die gentechnische Forschung im Bereich der Mikroalgen noch nicht so weit fortgeschritten.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit lag in der Herstellung anorganischer Partikel durch Biomineralisationsprozesse und in einer Charakterisierung der spezifischen Partikeleigenschaften. Zur Herstellung biogener Cadmiumsulfid-Nanopartikel wurden Kultivierungen von *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* in cadmiumhaltigem Medium durchgeführt. Der Schwerpunkt lag in einer Untersuchung des Einflusses verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die zelluläre Cadmiumakkumulation. Dazu wurde die Cadmiumzugabe bezüglich des Zugabezeitpunktes, Zugabeprofiles und der zugegebenen Gesamtmenge variiert. Dazu wurde in den Zellsuspensionen die Cadmiumkonzentration in flüssigen Proben und im Zellpellet untersucht. Die Kultivierungen fanden sowohl in einem 4 Liter-Bioreaktor und wie auch in Schüttelkolben statt. Dabei kamen unterschiedliche Kultivierungsmedien zum Einsatz. Zur Vermeidung einer Ethanolbildung wurde in Reaktorkultivierungen erfolgreich eine „Feedback-Fedbatch“-Strategie eingesetzt.

Bei Kultivierungen von *C. glabrata* wurden zelluläre Cadmiumgehalte von bis zu 40 mgCd/g BTM erzielt. Für *S. pombe* lagen diese bei maximal 12 mgCd/g BTM. In Abhängigkeit des eingesetzten Kultivierungsmediums wurde für Kultivierungen in Komplexmedium die höchste Cadmiumakkumulation beobachtet. Für *C. glabrata* führten dabei höhere Cadmiumzugaben zum Kultivierungsmedium zu einer höheren Cadmiumakkumulation. Eine Abhängigkeit der Cadmiumakkumulation vom Cadmium-Zugabeprofil konnte im Rahmen der Versuchsreihen nicht beobachtet werden. Für Cadmiumzugaben in der späten exponentiellen Wachstumsphase der Mikroorganismen fand keine Beeinträchtigung der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen statt. Im Rahmen der Versuchsreihen konnte somit ein deutlicher Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die spezifische Cadmiumakkumulation nachgewiesen werden.

Über transmissionselektronenmikroskopische Analysen wurde eine Anreicherung von Cadmium in den Hefezellen eindeutig bestätigt. Für beide Hefestämme war Cadmium ausschließlich im Cytoplasma der Zellen nachweisbar. Es war weder eine Cadmiumadsorption an die Zelloberfläche, noch eine Anreicherung im Periplasma festzustellen. Zur Freisetzung der Cadmiumsulfid-Partikel wurden unterschiedliche Zellaufschlussverfahren getestet. Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen wurde die höchste Cadmiumfreisetzung durch einen mechanischen Aufschluss

mittels einer Schwingmühle erzielt. Der Zellaufschluss führte bei *S. pombe* zu einer Cadmiumfreisetzung von ca. 66 %. Bei *C. glabrata* betrug diese ca. 30 %.

Nach dem Zellaufschluss wurde eine Produktaufarbeitung zur Isolierung der Nanopartikel durchgeführt. Hierbei hat sich bei Proben von *S. pombe* als erster Reinigungsschritt eine Hitzefällung bewährt. Diese ermöglichte eine Reduzierung der Proteinkonzentration im Zelllysat um ca. 90 % unter geringen Cadmiumverlusten. Als zweiter Reinigungsschritt wurde erfolgreich eine Größenausschlusschromatographie (SEC) eingesetzt. Die Probenfraktionierung führte hierbei zu einer deutlichen Anreicherung von Cadmium in einer der SEC-Fractionen.

Im Rahmen der Partikelcharakterisierung wurden Untersuchungen zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung und der Fluoreszenzeigenschaften der Partikel durchgeführt. Die Partikelgrößenverteilung wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) und differentieller Mobilitätsanalyse (DMA) bestimmt. Dabei konnte bei beiden Analyseverfahren für die cadmiumhaltige Probe ein signifikantes Maximum bei einem Partikeldurchmesser von 10 – 20 nm beobachtet werden.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzeigenschaften wurden Einzelmolekülanalysen durchgeführt. Dabei konnte für die cadmiumhaltigen Proben kein spezifisches Signal detektiert werden. Es wird vermutet, dass die Analysen aufgrund der Komplexität der biologischen Proben durch sog. Innerfilter-Effekte gestört wurden.

Zur Gewinnung oberflächenstrukturierter Calciumcarbonat-Partikel wurde die Mikroalge *Emiliana huxleyi* unter phototrophen Bedingungen kultiviert. Für eine Kultivierung unter Laborbedingungen war dabei die Anreicherung eines synthetischen Kultivierungsmediums mit Meerwasser notwendig. Unter den im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestimmten Kultivierungsbedingungen konnte *Emiliana huxleyi* erfolgreich im Bioreaktor kultiviert werden. Die Bildung gleichförmiger, oberflächenstrukturierter Partikel wurde dabei durch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen bestätigt.

Für eine Partikelcharakterisierung und eine mögliche Verwendung der Partikel für technische Applikationen war ein Entfernen sämtlicher organischer Komponenten erforderlich. Eventuelle Schädigungen der Partikelstruktur sind dabei zu vermeiden. Im Rahmen der durchgeführten Versuchsreihen hat sich dabei die Verwendung einer wässrigen Natriumhypochlorit- Wasserstoffperoxid- Lösung bewährt. Dieses

Reinigungsverfahren war zur Reinigung biogener Calciumcarbonat- und Kieselschalen gleichermaßen geeignet.

Die gereinigten Kieselschalen zeigten ebenso wie die Calciumcarbonat-Partikel von *Emiliana huxleyi* eine enge Partikelgrößenverteilung und gleichmäßig geformte nanostrukturierte Oberflächen.

Zur Bewertung der Wettbewerbsfähigkeit biogener Partikeln mit Partikeln aus physikalisch-chemischen Syntheseverfahren wurden die jeweiligen Kosten für den entsprechenden Biomineralisationsprozess abgeschätzt. Bei der Nanopartikelsynthese liegen die Herstellkosten zur Produktion von 10 g (ca. 1 mmol) Cadmiumsulfid-Partikeln in der Größenordnung von 20.000 €. Im Vergleich dazu werden am Markt Preise von ca. 35.000 - 50.000 €·mmol⁻¹ (Qdot, ITK, Firma tebu-bio) für Nanokristalle erzielt, welche aufgrund ihrer Biokompatibilität für Anwendungen im biologischen Bereich geeignet sind.

Für die biogenen nanostrukturierten Partikel liegen die Kosten für 1 kg Kieselschalen bei ca. 1000 € zzgl. Reinigung. Ein Vergleich mit am Markt erhältlichen nanostrukturierten keramischen Mikropartikeln konnte nicht durchgeführt werden, da zum derzeitigen Stand der Technik außer in Einzelpartikelproduktionen lediglich eine Herstellung von dreidimensionalen Partikelstrukturen im Submikrometerbereich möglich ist. Ein physikalisch-chemisches Verfahren zur kostengünstigen Massenfertigung nicht-planarer Partikel mit komplexen Oberflächenstrukturen ist nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass durch den Einsatz von Biomineralisationsverfahren die Herstellung qualitativ hochwertiger Partikel möglich ist. Dabei ist eine Herstellung relativ großer Partikelmengen zu wirtschaftlich interessanten Konditionen möglich. Die biologischen Mineralisationsverfahren besitzen daher ein hohes Potenzial für technische Applikationen, welches derzeit allerdings noch nicht genutzt wird. Die Untersuchung weiterer spezifischer Eigenschaften der biogenen Partikel für die Bestimmung weiterer Einsatzmöglichkeiten ist Gegenstand der derzeitigen Forschung.

Literaturverzeichnis

1. Festel, G., et al.: *Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie*. Chemie & Wirtschaft, 2004. 3(2), 34.
2. Georgescu, V. and M. Vollborn: *Nanobiotechnologie als Wirtschaftskraft: Neue Märkte, neue Produkte, neue Chancen*, V. Georgescu. Campus Verlag, Frankfurt, 2002.
3. Mann, S.: *Biom mineralization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford Chemistry Masters, R.G. Compton, S.G. Davies, and J. Evans. Oxford University Press, Oxford, 2001.
4. Slocik, J.M., M.R. Knecht, and D.W. Wright: *Biogenic nanoparticles*. Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, 2004. 1, 293.
5. Sarikaya, M.: *Biomimetics: Materials fabrication through biology*. PNAS, 1999. 96(25), 14183.
6. Niiler, E.: *OECD says industrial biotech not realizing potential*. Nature Biotechnology, 2001. 19, 493.
7. Dameron, C.T. and D.R. Winge: *Peptide-Mediated Formation of Quantum Semiconductors*. Trends in Biotechnology, 1990. 8(1), 3.
8. Mann, S. and G.A. Ozin: *Synthesis of inorganic materials with complex form*. Nature, 1996. 382(6589), 313.
9. Sarikaya, M., et al.: *Molecular biomimetics: nanotechnology through biology*. Nature Materials, 2003. 2(9), 577.
10. Lowenstam, H.A.: *Minerals formed by organisms*. Science, 1981. 211, 1126.
11. Volkmer, D.: *Von Biomaterialien zu biomimetischen Materialien: Der Weg ist das Ziel*. Chemie in unserer Zeit, 1999. 33(1), 6.
12. Nayar, S., et al.: *In situ synthesis of nanosized cadmium sulfide using bovine serum albumin*. Journal of Materials Science Letters, 2001. 20, 2099.
13. Holmes, J.D., et al.: *Cadmium-specific formation of metal sulfide 'Q-particles' by Klebsiella pneumoniae*. Microbiology-Uk, 1997. 143, 2521.
14. Nies, D.H.: *Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes*. Plasmid, 1992. 27, 17.
15. Maeda, S. and T. Sakaguchi: *Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae*, in *Introduction to applied phycology*, I. Akatsuka. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 1990.
16. Cunningham, D.P. and L.L. Lundie Jr.: *Precipitation of Cadmium by Clostridium thermoaceticum*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. 59(1), 7.

17. Brennan, R.J. and R.H. Schiestl: *Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1996. 356(2), 171.
18. Surowitz, K.G., J.A. Titus, and R.M. Pfister: *Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of Bacillus subtilis and a selected cadmium resistant mutant*. Arch Microbiol, 1984. 140, 107.
19. White, C., J.A. Sayer, and G.M. Gadd: *Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: Key biogeochemical processes for treatment of contamination*. FEMS Microbiological Reviews, 1997. 20, 503.
20. Burke, B.E. and R.M. Pfister: *Cadmium Transport by a Cd-2+-Sensitive and a Cd-2+-Resistant Strain of Bacillus-Subtilis*. Canadian Journal of Microbiology, 1986. 32(7), 539.
21. Clemens, S., et al.: *Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast*. Embo Journal, 1999. 18(12), 3325.
22. Silver, S. and L.T. Phung: *Bacterial heavy metal resistance: New surprises*. Annual Review of Microbiology, 1996. 50, 753.
23. Williams, P., E. KeshavarzMoore, and P. Dunnill: *Efficient production of microbially synthesized cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites*. Enzyme and Microbial Technology, 1996. 19(3), 208.
24. Binz, P.-A.: *Introduction to Metallothionein*. www.unizh.ch/~mtpage/intro.html, 1999
25. Hamer, D.H.: *Metallothionein*. Annual Review of Biochemistry, 1986. 55, 913.
26. Bae, W. and R.K. Mehra: *Properties of glutathione- and phytochelatin-capped CdS bionanocrystallites*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1998. 69(1-2), 33.
27. Dameron, C.T. and D.R. Winge: *Characterization of Peptide-Coated Cadmium-Sulfide Crystallites*. Inorganic Chemistry, 1990. 29(7), 1343.
28. Reese, R.N., et al.: *Studies on the Gamma-Glutamyl-Transferase Cu-Binding Peptide from Schizosaccharomyces-Pombe*. Journal of Biological Chemistry, 1988. 263(9), 4186.
29. Vrieling, E.G., et al.: *Diatom silicon biomineralization as an inspirational source of new approaches to silica production*. Journal of Biotechnology, 1999. 70, 39.
30. Buitenhuis, E.T.: *Interactions between Emiliana huxleyi and the dissolved inorganic carbon system*. Dissertation, Wiskunde en Natuurwetenschappen, Rijksuniversiteit Groningen, Groningen, 2000.
31. Bown, P.R. and J. Young: *Introduction: What are calcareous nannofossils?*, in *Calcareous nannofossil biostratigraphy*, P.R. Bown. Kluwer Academic, London, 1998.

32. Dujardin, E. and S. Mann: *Bio-inspired materials chemistry*. Advanced Engineering Materials, 2002. 4(7), 461.
33. Nachtigall, W. and K.G. Blüchel: *Das große Buch der Bionik*. Neue Technologien nach dem Vorbild der Natur, W. Nachtigall. Deutsche Verlags-Anstalt, Stuttgart, 2001.
34. Tyrrell, T.: *Biochemical impacts of coccolithophore blooms*. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/biochemistry.html, 2002
35. van der Wal, P., R.S. Kempers, and M.J.W. Veldhuis: *Production and downward flux of organic matter and calcite in a North Sea bloom of the coccolithophore *Emiliana huxleyi**. Marine Ecology - Progress Series, 1995. 126, 247.
36. Tyrrell, T.: *Optical impacts of *Emiliana huxleyi**. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/optics.html, 2002
37. Alfred-Wegener-Institut: www.awi-bremerhaven.de
38. Young, J.: *Emiliana huxleyi*. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/index.html, 2003
39. Anonymous: *Kalk-Recycling und Klimawandel: CO2-Anstieg wirkt bis zum Meeresboden*. www.geoscience.de, 2005
40. Young, J.: *More about coccoliths...* www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/lithsmore.html, 2002
41. Anonymous: *Foraminiferen*. www.paed-quest.de/oekoriff/content/foram.html
42. Tyrrell, T.: *Ecology of *Emiliana huxleyi**. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/ecology.html, 2002
43. Laguna, R., et al.: *Induction of phase variation events in the life cycle of the marine coccolithophoride *Emiliana huxleyi**. Applied and Environmental Microbiology, 2001. 67(9), 3824.
44. Green, J. and J. Young: *Life-cycle of *Emiliana huxleyi**. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/lifecycle.html, 2002
45. Cros, L., et al.: *New examples of holococcolith-heterococcolith combination coccospheres and their implications for coccolithophorid biology*. Marine Micropaleontology, 2000. 39(1), 1.
46. Young, J.: *Description of an *Emiliana huxleyi* cell*. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/cell.html, 2002
47. Young, J.: *Emiliana huxleyi*: www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/index.html, 2003
48. Young, J., et al.: *Coccolith ultrastructure and biomineralisation*. Journal of Structural Biology, 1999. 126, 195.

49. Riebesell, U., I. Zondervan, and B. Rost: *Schlechte Aussichten für Kalkbildner im Meer: Steigende Kohlendioxid-Konzentration vermindert die biologische Kalkproduktion*, A.W. Institut, Research Highlights 2001, Bremerhaven, 2001.
50. Hirokawa, Y., S. Fujiwara, and M. Tsuzuki: *Three types of acidic polysaccharides associated with coccolith of Pleurochrysis haptanemofera: Comparison with Pleurochrysis carterae and analysis using fluorescein-isothiocyanate-labeled lectins*. Marine Biotechnology, 2005. 7, 634.
51. Young, J.: *Emiliana huxleyi coccoliths*. www.soes.soton.ac.uk/staff/tt/eh/coccoliths.html, 2002
52. Crawford, S.A., et al.: *Nanostructure of the diatom frustule as revealed by atomic force and scanning electron microscopy*. J. Phycol., 2001. 37, 543.
53. Perry, C.C.: *Chemical studies of biogenic silica*, in *Biom mineralization: Chemical & biochemical perspectives*, S. Mann, W.W. Webb, and R.J.P. Williams. VCH, 1989.
54. Csögör, Z., et al.: *Production and particle characterization of the frustules of Cyclotella cryptica in comparison with siliceous earth*. Journal of Biotechnology, 1999. 70, 71.
55. Parkinson, J. and R. Gordon: *Beyond micromachining: the potential of diatoms*. Trends in Biotechnology, 1999. 17(5), 190.
56. Tortell, P.D., J.R. Reinfelder, and F.M.M. Morel: *Active uptake of bicarbonate by diatoms*. Nature, 1997. 390, 243.
57. von Sengbusch, P. and P. von Sengbusch: *Bacillariophyceae (Diatomeen)*. www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d44/44d.htm, 2003
58. Vrieling, E.G., et al.: *Nanoscale uniformity of pore architecture in diatomaceous silica: A combined small and wide angle X-ray scattering study*. J. Phycol., 2000. 36, 146.
59. Ball, P.: *Beauty gives diatoms strength*. www.nature.com/nsu/030217/030217-8.html, 2003
60. Sarikaya, M., et al.: *Biomimetic assembly of nanostructured materials*. Materials Science Forum, 1999. 293, 83.
61. Niederberger, M.: *Metalloxide - Nanopartikel mit besonderen Eigenschaften*. LaborPraxis, 2004. Juli/August, 24.
62. Marcinowski, S.: *Nanotechnologie bei der BASF: Experience meets Vision*. BASF, Presse-Information, 2002. P340, 1.
63. Weller, H.: *Kolloidale Halbleiter-Q-Teilchen: Chemie im Übergangsbereich zwischen Festkörper und Molekül*. Angewandte Chemie, 1993. 105, 43.

64. Föll, H. and J. Carstensen: *Oberflächenzustände und Bandverbiegungen*. http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/mw2_ge/kap_6/backbone/r6_1_2.html, 2000
65. Gutsch, A., J. Averdung, and H. Mühlenweg: *Von der technischen Entwicklung zum erfolgreichen nanotechnologischen Produkt*. Chemie Ingenieur Technik (CIT), 2005. 77(9), 1377.
66. Siegel, R.W.: *Nanophasen-Materialien und ihre paradoxen Eigenschaften*. Spektrum der Wissenschaft, 1997. März, 62.
67. Chan, W.C.W. and S.M. Nie: *Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection*. Science, 1998. 281(5385), 2016.
68. Reynolds, J.E. and M. LoCascio: *Semiconductor nanocrystal based saturable absorbers for optical switching applications*. Journal of Quantum Electronics. (submitted), 2.
69. LoCascio, M.: *Engineering semiconductor properties without costly epitaxial growth*. Evident Technologies White Paper, 2002. November, 1.
70. Parak, W.J., et al.: *Biological applications of colloidal nanocrystals*. Nanotechnology, 2003. 14(7), R15.
71. Alivisatos, P.: *The use of nanocrystals in biological detection*. Nature Biotechnology, 2004. 22(1), 47.
72. Michalet, X., et al.: *Properties of fluorescent semiconductor nanocrystals and their application to biological labeling*. Single Molecules, 2001. 2, 261.
73. Eychmüller, A., et al.: *Photochemistry of semiconductor colloids*. 36. *Fluorescence investigations on the nature of electron and hole traps in q-sized colloidal CdS particles*. Ber. Bunsenges. Phys. Chem., 1991. 95(1), 79.
74. Tittel, J.: *Mikroskopie und Spektroskopie einzelner Farbstoffmoleküle und halbleitender Nanokristalle*. Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität, München, 1997.
75. Hamm, C.E.: *Kieselalgen als Muster für Technische Konstruktionen*. BIOSpektrum, 2005. 1, 1.
76. Orme, C.A., et al.: *Formation of chiral morphologies through selective binding of amino acids to calcite surface steps*. Nature, 2001. 411, 775.
77. BMBF: *Nanobiotechnologie: Wenn Moleküle zu Werkzeugen werden*, B.f.B.u.F. (BMBF), Berlin, 2001.
78. Rossetti, R., et al.: *Size Effects in the Excited Electronic States of Small Colloidal CdS Crystallites*. Journal of Chemical Physics, 1984. 80(9), 4464.
79. Klaus, T., et al.: *Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated*. PNAS, 1999. 96(24), 13611.

80. Kierans, M., *et al.*: *Silver tolerance and accumulation in yeasts*. *Biology of Metals*, 1991. 4, 100.
81. von Canstein, H., *et al.*: *Mikrobielle Reinigung von quecksilberhaltigen Industrieabwässern*. *BIOspektrum*, 2003. 2, 150.
82. Wagner-Döbler, I., *et al.*: *Prozessintegrierte Quecksilberentfernung aus Abwässern der Chloralkali-Elektrolyse durch Mikroorganismen*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2002. 74, 1.
83. Wagner-Döbler, I., *et al.*: *Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale*. *Environ. Sci. Technol.*, 2000. 34, 4628.
84. Schulz, H.N. and A. Teske: *Dense populations of a giant sulfur bacterium in Namibian shelf sediments*. *Science*, 1999. 284(16), 493.
85. Sogin, M.: *Giants among the prokaryotes*. *Nature* 362, 1993. 18, 207.
86. Hagedorn, C.: *Beggiatoa alba*.
www.bsi.vt.edu/chagedor/biol_4684/Microbes/Beggiatoa.htm
87. Prange, A., *et al.*: *Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur*. *Microbiology*, 2002. 148, 267.
88. Strohl, W.R., K.S. Howard, and J.M. Larkin: *Ultrastructure of Beggiatoa alba strain B15LD*. *Journal of General Microbiology*, 1982. 128, 73.
89. Pooley, F.D.: *Bacteria accumulate silver during leaching of sulphide ore minerals*. *Nature*, 1982. 296, 642.
90. Sastry, M., *et al.*: *Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete*. *Current Science*, 2003. 85(2), 162.
91. Fortin, D., G. Southam, and T.J. Beveridge: *Nickel sulfide, iron-nickel sulfide and iron sulfide precipitation by a newly isolated Desulfotomaculum species and its relation to nickel resistance*. *FEMS Microbiology Ecology*, 1994. 14, 121.
92. Bazylinski, D.A.: *Bacterial production of iron sulfides*. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 1991. 218, 81.
93. Bahaj, A., P.A.B. James, and F.D. Moeschler: *Continuous cultivation and recovery of magnetotactic bacteria*. *Transactions on magnetics*, 1997. 33(5), 4263.
94. Amann, R., R. Rosello-Mora, and D. Schüler: *Phylogeny and in situ identification of magnetotactic bacteria*, in *Bio-mineralization of Nano- and Microstructures*, E. Baeuerlein. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
95. Tadashi, M., T. Noriyuki, and K. Shinji: *Enhancement of magnetic particle production by nitrate and succinate fed-batch culture of Magnetospirillum sp. AMB-1*. *Biotechnology Techniques*, 1996. 10(7), 495.

96. Oschmann, W.: *Phasen der Evolution des Systems Erde*.
<http://servermac.geologie.uni-frankfurt.de/Staff/Homepages/Oschmann/Oschmann/Homepage/P21-Homepage/P21-9-Evolution.html>
97. Weier, J.: *Changing currents color of the Bering Sea a new shade of blue*.
<http://earthobservatory.nasa.gov/Study/Coccoliths/>, 1999
98. Weiss, W.: *Mikropaläontologie*. <http://www.bgr.de/n304/saob/foram.jpg>, 2005
99. Ebenau, A.: *Wirtschaftliche Perspektiven der Nanotechnologie: Enorme Märkte für kleinste Teilchen*. BASF, Presse-Information, 2002. P350, 1.
100. BMBF: *Nanotechnologie erobert Märkte, Perspektiven und Handlungsfelder für das nächste Jahrzehnt*, B.f.B.u.F. (BMBF), Berlin, 2004.
101. Bachmann, G.: *Innovationsschub aus dem Nanokosmos: Analyse & Bewertung zukünftiger Technologien*, V. Technologiezentrum, Zukünftige Technologien Nr. 25, Düsseldorf, 1998.
102. Ballinger, C.T.: *Field-deployable biological threat detection system using quantum dots*. Evident Technologies White Paper, 2002. July, 1.
103. LoCascio, M.: *Optical switching applications using PbSe IR-Evidot nanocrystals*. Evident Technologies White Paper, 2002. November, 1.
104. Bruchez, M., et al.: *Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels*. *Science*, 1998. 281(5385), 2013.
105. Jaiswal, J.K., et al.: *Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates*. *Nature Biotechnology*, 2003. 21(1), 47.
106. Gerion, D., et al.: *Synthesis and properties of biocompatible water-soluble silica-coated CdSe/ZnS semiconductor quantum dots*. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001. 105(37), 8861.
107. LoCascio, M.: *Application of semiconductor nanocrystals to photovoltaic energy conversion devices*. Evident Technologies White Paper, 2002. August, 1.
108. Rogach, A.L., et al.: *"Raisin bun"-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals*. *Chemistry of Materials*, 2000. 12(9), 2676.
109. Sato, T., et al.: *Photocatalytic properties of layered hydrous titanium oxide/CdS-ZnS nanocomposites incorporating CdS-ZnS into the interlayer*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 1996. 67, 339.
110. Gehrke, I., et al.: *Entwicklung neuartiger Mikrosiebe für filtertechnische Anwendungen*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2005. 77(8), 1001.
111. Comiskey, B., et al.: *An electrophoretic ink for all-printed reflective electronic displays*. *Nature*, 1998. 394(6690), 253.

112. Jandel, A.: *Werkstoffe mit kleinen Zeitzündern*. VDI Nachrichten, 1999. 16.Juli1999.
113. Kageyama, K., J. Tamazawa, and T. Aida: *Extrusion polymerization: Catalyzed synthesis of crystalline linear polyethylene nanofibers within a mesoporous silica*. Science, 1999. 285(5436), 2113.
114. Ichikawa, M.: *'Ship-in-Bottle' catalyst technology*. Platinum Metals Rev., 2000. 44(1), 3.
115. Netzwelt: *Bionik*. www.netzwelt.de, 2005.
116. Röthlein, B.: *Bionik: Aus der Werkstatt der Natur*. Natur & Kosmos, 2000. Februar, 14.
117. Zhao, H., et al.: *Preparation of CdS nanoparticles in salt-induced block copolymer micelles*. Langmuir, 2001. 17, 8428.
118. Shenton, W., et al.: *Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus*. Advanced Materials, 1999. 11(3), 253.
119. Knez, M., et al.: *Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires*. Nano Letters, 2003. 3(8), 1079.
120. Yokoyama, T., et al.: *Selective assembly on a surface of supramolecular aggregates with controlled size and shape*. Nature, 2001. 413(6856), 619.
121. Weiss, P.S.: *Nanotechnology - Molecules join the assembly line*. Nature, 2001. 413(6856), 585.
122. Tiarks, F., K. Landfester, and M. Antonietti: *Silica nanoparticles as surfactants and fillers for latexes made by miniemulsion polymerization*. Langmuir, 2001. 17, 5775.
123. Zhao, M.Q. and R.M. Crooks: *Dendrimer-encapsulated Pt nanoparticles: Synthesis, characterization, and applications to catalysis*. Advanced Materials, 1999. 11(3), 217.
124. Baker, W.S. and R.M. Crooks: *Electrochemical characterization of viologen-functionalized PAMAM dendrimers at Pt disk microelectrode*. The Electrochemical Society Interface, 1999. Winter, 56.
125. Crooks, R.M.: *Function and potential of dendrimers for nanoparticle production*, Vortrag bei DuPont (USA), crooks@cm.utexas.edu, 20.04.2005.
126. Köhler, J.M., et al.: *Bildung von Goldnanopartikeln und Nanopartikelaggregaten in statischen Mikromischern in Gegenwart von Rinderserumalbumin (BSA)*. Chemie Ingenieur Technik (CIT), 2005. 77(7), 867.
127. Brott, L.L., et al.: *Ultrafast holographic nanopatterning of biocatalytically formed silica*. Nature, 2001. 413, 291.

128. Behrens, S., *et al.*: *Nanoscale particle arrays induced by highly ordered protein assemblies*. *Adv. Mater.*, 2002. 14(22), 1621.
129. Müller, W.E.G., *et al.*: *Silicatein-vermittelte Synthese von amorphen Silikaten und Siloxanen und ihre Verwendung*: Deutschland.
130. Müller, W.E.G.: *Silicon biotechnology: Biofabrication of nanostructured silica and use of enzymes involved in metabolism of biogenic silica in industry and medicine*, M. Johannes Gutenberg Universität, Forschungsbericht 2004, Mainz, 2004.
131. Morse, D.E.: *New high-performance nanocomposite materials from marine biomineralization: Biotechnological and interdisciplinary approach*, U.o. California, Research completion reports, California sea grant college, San Diego, 2004.
132. Cha, J.N., *et al.*: *Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides*. *Nature*, 2000. 403(6767), 289.
133. Sandhage, K.H., *et al.*: *A novel hybrid route to chemically-tailored, three-dimensional oxide nanostructures: The basic (bioclastic and shape-preserving inorganic conversion) process*. *Ceramic Engineering and Science Proceedings*, 2002. 23(4), 653.
134. Unger, S.: *Winzige Gehäuse für Nanopartikel: Bio-Verpackung nach dem Vorbild der Natur*. *VDI Nachrichten*, 2002. 22, 25.
135. Kim, C.S., K. Okuyama, and J.F.d.I. Mora: *Performance evaluation of an improved particle size magnifier (PSM) for single nanoparticle detection*. *Aerosol Science and Technology*, 2003. 37, 791.
136. Okuyama, K., *et al.*: *Preparation of ZnS and CdS fine particles with different particle sizes by a spray-pyrolysis method*. *Journal of Materials Science*, 1997. 32(5), 1229.
137. Bath, F.: *Planeten-Kugelmöhlen für die Herstellung von Nanopartikeln*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2005. 77(9), 1276.
138. Juhnke, M. and R. Weichert: *Erzeugung von Nanopartikeln durch Feinstzerkleinerung bei hohen Reinheitsanforderungen*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2005. 77(8), 1008.
139. Hintz, W., *et al.*: *Sol-Gel-Synthese zur Herstellung nanoskaliger Partikel aus Titan(IV)-oxid - Reaktionskinetische Untersuchung der Peptisationsreaktion*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2003. 75(8), 1132.
140. Manna, L., E.C. Scher, and A.P. Alivisatos: *Synthesis of soluble and processable rod-, arrow-, teardrop-, and tetrapod-shaped CdSe nanocrystals*. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000. 122, 12700.
141. Derfus, A.M., W.C.W. Chan, and S.N. Bhatia: *Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots*. *Nano Letters*, 2004. 4(1), 11.

142. Röhr, C.: *Anorganische Strukturchemie: Strukturen kovalenter Verbindungen*. http://ruby.chemie.uni-freiburg.de/Vorlesung/strukturchemie_2_3_2.html, 2002
143. Nemeč, P., et al.: *Ultrafast optical nonlinearities in CdS nanocrystalline thin films prepared by chemical bath deposition*. *Physica Status Solidi B-Basic Research*, 2001. 224(2), 481.
144. Beverly, K.C., et al.: *Quantum dot artificial solids: Understanding the static and dynamic role of size and packing disorder*. *PNAS*, 2002. 99(30), 6456.
145. Dahan, M., et al.: *Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots*. *Optics Letters*, 2001. 26(11), 825.
146. Evidenttech: *EviDots & EviComposites - commercially available quantum dots for a wide range of novel semiconductor applications*. *Nanomaterials Catalog V7*, 2005. September, 1.
147. Haché, A., et al.: *Optical switching spectroscopy of PbS quantum dots with dual-wavelength pump-probe*. *Evident Technologies White Paper*, 1.
148. Correa-Duarte, M.A., M. Giersig, and L.M. Liz-Marzán: *Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure*. *Chemical Physics Letters*, 1998. 286, 497.
149. Armani, D.K., et al.: *Ultra-high-Q toroid microcavity on a chip*. *Nature*, 2003. 421, 925.
150. Clark, T.D., et al.: *Self-assembly of 10- μ m-sized objects into ordered three-dimensional arrays*. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. 123(31), 7677.
151. Schwieger, W., et al.: *Strukturierte zeolithische Komposit-Materialien*. *Chemie Ingenieur Technik (CIT)*, 2005. 77(8), 1237.
152. Aizenberg, J., A.J. Black, and G.M. Whitesides: *Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers*. *Nature*, 1999. 398(6727), 495.
153. Daum, K.D.: *Quick Info: Zeolith*. www.zeolith.de/q-zeolith.html
154. Anonymous: *Zeolithe*. www.uni-essen.de/chemiedidaktik/S+WM/Waschmittel/ZeolithKristalle.html
155. Anonymous: *Übersichtsartikel über Zeolithe*. www.arnold-chemie.de/Zeolith_Molekularsieb/Grundlagen/grundlagen.html
156. Mineralienatlas: *Zeolithe*. www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Mineralgruppe/Zeilithe?redirectfrom=Zeolithe, 2006
157. Wolff, F. and I. Meyer: *Ein neues hydrothermales Syntheseverfahren für Zeolith-NaA*, B.f.G.u. Rohstoffe, Mineralische Rohstoffe, Hannover, 2001.
158. DSMZ: *Stammsammlung*. www.dsmz.de, 2004

159. ATCC: *LGC Promochem*, www.lgcpromochem.de, 2005.
160. Lindner, P.: *Schizosaccharomyces pombe sp., ein neuer Gahrungserreger*. Wochenschrift fur Brauerei, 1893. 10, 1298.
161. Schlegel, H.G. and C. Zaborosch: *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1992.
162. Wood, V., et al.: *The genome sequence of Schizosaccharomyces pombe*. Nature, 2002. 415, 871.
163. Wingard, J.R.: *Importance of Candida Species Other Than Candida-Albicans as Pathogens in Oncology Patients*. Clinical Infectious Diseases, 1995. 20(1), 115.
164. Qdots.com, D.: S. Oder, *Eigenschaften von Qdot Nanokristallen (Domitraskovic)*, Telefonat Frau Domitraskovic, www.tebu-bio.com, Januar 2006.
165. Begerow: *Filterhilfsmittel Kieselgur - Produktubersicht BECOGUR*, B. GmbH, BECO Filtertechnik, Technische Information, Langenlonsheim, 1993.
166. Merck: *Produktinformation: Insulin, Zinc, Human, Recombinant, Pichia pastoris, 407709*. www.merckbiosciences.com/docs/docs/PDS/407709.pdf, 2006
167. Reed, R.: S. Oder, *Kultivierungsbedingungen fur Thalassidra weissflogii*, Email, www.reed-mariculture.com, Januar 2006.
168. Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse: *Molecular Genetic-Analysis of Fission Yeast Schizosaccharomyces-Pombe*. Methods in Enzymology, 1991. 194, 795.
169. Nor, Z.M., et al.: *Automated fed-batch culture of Kluyveromyces fragilis based on a novel method for on-line estimation of cell specific growth rate*. Biochemical Engineering Journal, 2001. 9, 221.
170. Wang, H.Y., C.L. Cooney, and D.I.C. Wang: *Computer-aided baker's yeast fermentations*. Biotechnology and Bioengineering, 1977. 19, 69.
171. Veldhuis, M.J.W. and W. Admiraal: *Influence of phosphate depletion on the growth and colony formation of Phaeocystis pouchetii*. Marine Biology, 1987. 95, 47.
172. Breddam, K. and T. Beenfeldt: *Acceleration of yeast autolysis by chemical methods for production of intracellular enzymes*. Appl Microbiol Biotechnol, 1991. 35, 323.
173. Bairbakhish, A.N., et al.: *Disintegration of aggregates and coccospheres in sediment trap samples*. Marine Micropaleontology, 1999. 37, 219.
174. Knorr, D., K.J. Shetty, and J.E. Kinsella: *Enzymatic lysis of yeast cell walls*. Biotechnology and Bioengineering, 1979. 21, 2011.

175. Gottwald: *RP-HPLC für Anwender*. VCH Verlag, 1993.
176. Wheelwright, S.M.: *Protein purification: Design and scale up of downstream processing*. Proteins - Purification, S.M. Wheelwright. Oxford University Press, New York, 1991.
177. Alberts, Lewis, and Johnson: *Manipulating proteins, DNA, and RNA*, in *Molecular biology of the cell*, Alberts, Lewis, and Johnson. Garland Science, Garland, 2002.
178. Ridge, D.: *Practical aspects of rate-zonal centrifugation*, in *Centrifugal separations in molecular and cell biology*, G.D. Birnie and D. Rickwood. The Butterworth Group, London, 1978.
179. Barber, E.J.: *Calculation of density and viscosity of sucrose solutions as a function of concentration and temperature*. National Cancer Institute Monograph, 1966. 21, 219.
180. Westermeier, R.: *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.
181. Rawle, A. and R. Nitzsche: *Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) in 30 Minuten*, U. Malvern Instruments Ltd.,
182. Wedler, G.: *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, G. Wedler. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
183. Johnston, M.: S. Deseniss, *Differential Mobility Analyser (DMA)*, Persönliches Gespräch, mvj@udel.edu, 2005.
184. Hespel, L. and A. Delfour: *Mie light-scattering granulometer with adaptive numerical filtering. I. Theory*. Applied Optics, 2000. 39(36), 6897.
185. Püschl, R.J.: *Fluoreszenz basierte Methoden und neue Fluoreszenz-Farbstoffe zum Nachweis von Analyten in Lösung*. Ph.d. thesis, Fachbereich Chemie, Universität Siegen, Siegen, 2005.
186. Seidell, A. and W.F. Linke: *Solubilities of Metal-Organic Materials*. Solubilities: inorganic and metall-organic compounds and compilation of solubility data from the periodical literature, A. Seidell. American Chemical Society (ACS), Washington, 1958.
187. Deseniss, S.: *Investigation of the enzymes of the sulfur cycle from Rhodobacter sp.* Diplomarbeit, Bioverfahrenstechnik, Fachhochschule Flensburg, Flensburg, 2000.
188. Qdots.com: *New and improved Qdot Streptavidin Conjugates*. 2004.
189. Kowshik, M., et al.: *Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode*. Biotechnology and Bioengineering, 2002. 78(5), 583.

190. Bornemann, R.: *Untersuchungen zur Leistungsfähigkeit der Einzelmolekülanalyse (unveröffentlichte Ergebnisse)*. www.lti.uni-karlsruhe.de, 2004
191. Thum, W.: *Leitfähigkeit von Salzlösungen*. <http://www.chemie-master.de/index.html?http://www.chemie-master.de/lex/begriffe/106.html>
192. Heslot, H., A. Goffeau, and C. Louis: *Respiratory Metabolism of a Petite-Negative Yeast Schizosaccharomyces-Pombe 972h-1*. *Journal of Bacteriology*, 1970. 104(1), 473.
193. Williams, P., E. KeshavarzMoore, and P. Dunnill: *Production of cadmium sulphide microcrystallites in batch cultivation by Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biotechnology*, 1996. 48(3), 259.
194. Barford, J.P.: *Control of fermentation and respiration in Schizosaccharomyces pombe*. *J. Ferment. Technol.*, 1985. 63(6), 495.
195. Williams, P., E. Keshavarz-Moore, and P. Dunnill: *Schizosaccharomyces pombe fed-batch culture in the presence of cadmium for the production of cadmium sulphide quantum semiconductor dots*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002. 30(3), 354.
196. Raj, A.E., et al.: *High-cell-density fermentation of recombinant Saccharomyces cerevisiae using glycerol*. *Biotechnological Progress*, 2002. 18, 1130.
197. Mehra, R.K., et al.: *Metal-Specific Synthesis of 2 Metallothioneins and Gamma-Glutamyl-Transferase Peptides in Candida-Glabrata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1988. 85(23), 8815.
198. Weast, R.C.: *CRC Handbook of chemistry and physics*, R.C. Weast. CRC Press, Cleveland, Ohio, 1975.
199. Stegemann, T.: *Das Methusalem-Genom: Die Entschlüsselung des Genoms der Spaltheefe verspricht Fortschritte in der Krebsforschung*. Telepolis, 2002.
200. Xue, Z.: S. Deseniss, *Effizienz von Zellaufschlussverfahren in Abhängigkeit der Wachstumsphase bei Hefezellen*, Persönliches Gespräch, www.dupont.com, 2005.
201. Mayer-Rosenkranz, J.: Persönliches Gespräch, S. Oder, *Kosten für Größenausschlusschromatographie (Upscale)*, www.grom.de, 2006
202. Hinton, R. and M. Dobrota: *Density gradient centrifugation*, in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, T.S. Work and E. Work. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1978.
203. PRIOR: *Downstream Processing via Preparative Continuous Annular Chromatography (P-CAC)*. www.prioreng.com
204. Dameron, C.T., et al.: *Biosynthesis of Cadmium-Sulfide Quantum Semiconductor Crystallites*. *Nature*, 1989. 338(6216), 596.

205. Basché, T.: *Einzelmolekülspektroskopie: Von Nanoteilchen bis zu lebenden Zellen*. Chemie Ingenieur Technik (CIT), 2005. 77(8), 970.
206. Lakowicz, J.R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York, 1999.
207. Held, P.: *Determination of NADH or NADPH concentrations using fluorescence or absorbance modes*.
www.biotek.com/products/tech_res_detail.php?id=57
208. Laukel, M., et al.: *The tungsten-containing formate dehydrogenase from Methylobacterium extorquens AM1: Purification and properties*. European Journal of Biochemistry, 2003. 270, 325.
209. Beechem, J.M. and L. Brand: *Time-Resolved Fluorescence of Proteins*. Annual Review of Biochemistry, 1985. 54, 43.
210. tebu-bio: *Preisliste Qdots*, Offenbach, 2006.
211. Qdots.com, K.: S. Deseniss, *Eigenschaften von Qdot Nanokristallen*, persönliches Gespräch, Frau Kautner, www.tebu-bio.com, 1.Juni 2004.
212. Rost, B., I. Zondervan, and U. Riebesell: *Light-dependent carbon isotope fractionation in the coccolithophorid Emiliana huxleyi*. Limnol. Oceanogr., 2002, 24.
213. Fritz, J.J.: *Carbon fixation and coccolith detachment in the coccolithophore Emiliana huxleyi in nitrate-limited cyclostats*. Marine Biotechnology, 1999. 133, 509.
214. Hiroyuki, T., et al.: *Continuous production of extracellular ultrafine calcite particles by the marine coccolithophorid algae Pleurochrysis cartararae*. Applied Microbiology & Biotechnology, 1994. 40(6), 946.
215. Lane, T.W. and F.M.M. Morel: *A biological function for cadmium in marine diatoms*. PNAS, 2000. 97(9), 4627.
216. Butschek, G.: *Biotechnische Produktion und Charakterisierung von anorganischen (Nano-) Partikeln*. Diplomarbeit, Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik, Technische Universität, Karlsruhe, 2001.
217. Vrieling, E.G., et al.: *Growth and silica content of the diatoms Thalassiosira weissflogii and Navicula salinarum at different salinities and enrichments with aluminium*. European Journal of Phycology, 1999. 34(3), 307.
218. Boyle, E.: *Pumping iron makes thinner diatoms*. Nature, 1998. 393, 733.
219. Lewin, J.C.: *Heterotrophy in diatoms*. J. Gen. Microbiol., 1953. 9, 305.
220. Stoll, H.M., J.R. Encinar, and J.I.G. Alonso: *A first look at paleotemperature prospects from Mg in coccolith carbonate: Cleaning techniques and culture measurements*. Geochemistry, Geophysics, Geosystems, 2001. 2, 1.

221. Andrleit, H., *et al.*: *Some comments concerning sample processing and dissolution*. Journal of Nanoplankton Research, 2001. 22(3), 201.
222. Takano, H., *et al.*: *Continuous production of extracellular ultrafine calcite particles by the marine coccolithophorid alga Pleurochrysis carterae*. Applied Microbiological Biotechnology, 1994. 40, 946.
223. Rabovsky, J.: *Biogenic amorphous silica: Future research directions and areas of focus*. Scand J Work Environ Health, 1995. 21(2), 108.
224. Doerschel: *Kapitel 4.2: Werkstoffcharakterisierung*.
225. Hamm, C.E., *et al.*: *Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection*. Nature, 2003. 421, 841.
226. Buchholz: *Biokatalysatoren und Enzymtechnologie*. Wiley-VCH, 1997.
227. Mätzing: *Mechanismen der PCDD/F-Bildung*, Karlsruhe, 2000.
228. Degussa: *Aerosil*, www.aerosil.de, 2003.
229. Blackburn, S.: *Microalgae*, C.M.R.C. (CMARC), Hobart, Tasmanien, Australien,
230. Emeis, K.-C.: *Cruise Report Meteor 48-2*, Warnemünde, 2000.
231. Jorgensen, B.B.: *Die Entdeckung der großen nitratspeichernden Schwefelbakterien*. www.mpi-bremen.de/deutsch/background/thiomarga/thiomargarita.htm, 2001
232. Blakemore, R.P.: *Magnetotactic bacteria*. Ann. Rev. Microbiol., 1982. 36, 217.
233. Schüler, D.: *Formation of magnetosomes in magnetotactic bacteria*. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 1999. 1(1), 79.
234. Spring, S. and K.-H. Schleifer: *Diversity of magnetotactic bacteria*. System. Appl. Microbiol., 1995. 18, 147.
235. Bazylinski, D.A. and R.B. Frankel: *Magnetic iron oxide and iron sulfide minerals within microorganisms*, in *Biomining of Nano- and Microstructures*, E. Baeuerlein. Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
236. Matsunaga, T., *et al.*: *Cloning and characterization of a gene, mpsA, encoding a protein associated with intracellular magnetic particles from Magnetospirillum sp strain AMB-1*. Biochemical And Biophysical Research Communications, 2000. 268(3), 932.
237. Mann, S., N.H.C. Sparks, and R.G. Board: *Magnetotactic bacteria: Microbiology, biomineralization, palaeomagnetism and biotechnology*. Advances in Microbial Physiology, 1990. 31, 125.

238. Schüler, D. and R.B. Frankel: *Bacterial magnetosomes: Microbiology, biomineralization and biotechnological applications*. Appl Microbiol Biotechnol, 1999. 52, 464.
239. Bazylinski, D.A.: *Controlled biomineralization of magnetic minerals by magnetotactic bacteria*. Chemical Geology, 1996. 132, 191.
240. Gomes, D.S., et al.: *Regulation of cadmium uptake by Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2002. 1573(1), 21.
241. Binet, M.R.B., et al.: *Detection and characterization of zinc- and cadmium-binding proteins in Escherichia coli by gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry*. Analytical Biochemistry, 2003. 318(1), 30.
242. Sweeney, R.Y., et al.: *E.coli biosynthesis of cadmium sulfide nanocrystals*. AIChE 2004, Conference proceedings, 2004.
243. Pado, R., L. Pawlowska-Cwiek, and J. Szwaagrzyk: *Heavy metals detoxification in soil performed by sulfate-reducing bacteria*. Ekologia Polska, 1994. 42(1-2), 103.
244. Mergeay, M., et al.: *Alcaligenes-Eutrophus Ch34 Is a Facultative Chemolithotroph with Plasmid-Bound Resistance to Heavy-Metals*. Journal of Bacteriology, 1985. 162(1), 328.
245. Rieder, N.: S. Deseniss, *Herstellung von anorganischen Partikeln durch Kultivierung von Süßwasserarten von Luxodes sp.*, Persönliches Gespräch, <http://www.rz.uni-karlsruhe.de/~zoologie/universitaetsprofessoren.html>, 01.10.2003.

Glossar

Begriff	Bedeutung
Agglomeration	Zusammenlagerung von Partikeln, dabei bleiben die Primärpartikel erhalten.
BaSIC-Verfahren	Verfahren zur Änderung der chemischen Zusammensetzung unter Erhalt der strukturellen Eigenschaften nanostrukturierter Partikel (<u>B</u> ioclastic <u>a</u> nd <u>S</u> hape-preserving <u>I</u> norganic <u>C</u> onversion, BaSIC).
Biomarker	Fluoreszierende Nanokristalle, deren Oberfläche für biologische Applikationen funktionalisiert wurden.
Coccolithen	Strukturierte Calciumcarbonat-Partikel, die von bestimmten Mikroalgen gebildet werden.
Coccolithophoriden	Gruppe von Mikroalgen, welche ein Außenskelett aus strukturierten Calciumcarbonat-Partikeln bilden.
Crabtree-Effekt	Stoffwechseleffekt, der bei einigen Mikroorganismen, besonders Hefen, bei einem Glucoseüberschuss auftritt. Dabei kommt es zur Ethanolbildung.
Diatomeen	Gruppe von Mikroalgen, welche ein Außenskelett aus strukturierten Kieselschalen bilden.
Detoxifikation	Entgiftung.
Diauxie	Zweiphasiges Wachstum.
Effektivität	Auswahl geeigneter Mitteln, die tatsächlich zur Erreichung des Ziels führen. Der dafür notwendige Aufwand ist allerdings nicht zwangsläufig gering (siehe Effizienz).
Effizienz	Aufwandoptimierung: Messung der Effizienz ermöglicht Aussage, ob mit den eingesetzten Mitteln ein möglichst hohes Leistungsergebnis erzielt wird.
Frusteln	Bezeichnung der Partikel des Außenskeletts bei Diatomeen.

Inokkulum	Mikroorganismenlösung, die zum Animpfen von Nährmedium verwendet wird.
Kieselalgen	Mikroalgen, die ein Außenskelett aus Silica besitzen.
Kieselgur	Fossile Kieselschalen, befinden sich als Sediment auf dem Meeresboden.
Koaleszenz	„Zusammenfließen“ mehrerer kleiner Partikel zu großen Partikeln bei Berührung ihrer Grenzflächen.
Mikroalgen	Uni- und oligozelluläre Algen mit Zelldurchmessern im Mikrometerbereich.
Nannoplankton	Gesamtheit aller calciumcarbonathaltigen fossilen Partikel, die kleiner als 30 µm sind; typischerweise handelt es sich dabei um tellerförmige Calcit-Platten.
Phytochelatine	Gruppe von Peptiden mit der allgemeinen Struktur (Glutaminsäure-Cystein) _n -Glycin.
Quantenpunkte	Nanokristalle mit Halbleitereigenschaften.
Silica-Partikel	Partikel aus Siliziumdioxid.
Stoll-Methode	Zerstörung der organischen Substanz durch Einsatz von Wasserstoffperoxid und Natriumhypochlorid.
Template	Vorlage, Schablone.

Anhang

Anhang A: Grundlagen

A 1: Nanostrukturierte Silica-Partikel

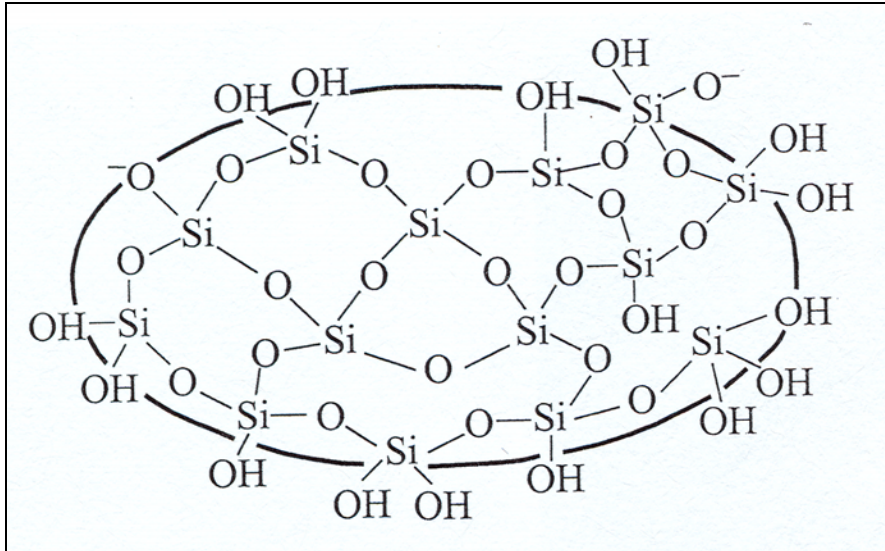


Abbildung A 1: Siliziumdioxid-Struktur im Querschnitt einer Kieselschale [3]

A 2: Materialienvielfalt bei biogenen Nanopartikeln

Elementares Silber

Bekanntestes Bakterium für die Bildung von elementarem Silber basierend auf einem Detoxifikationsmechanismus ist das Bakterium *Pseudomonas stutzeri* (*P. stutzeri*). Das Bakterium ist erstmals aus in der Nähe einer Silbermine (Utah, Arizona, USA) isoliert worden.

Das Bakterium *P. stutzeri* entfernt die Silberionen durch Bildung von regelmäßig geformten Nanokristallen aus elementarem Silber [79]. Das Silber wird im Periplasma angereichert. Der Hauptanteil des Silbers liegt kristallin mit kubischer Kristallstruktur in vakuolenähnlichen Vesikeln mit einem Durchmesser von einigen nm bis 200 nm vor. Die unterschiedlichen Kristallmorphologien werden auf unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten der Kristalle zurückgeführt [79]. Die genetische Information zur Silberresistenz sind dabei plasmidkodiert und ist so leicht unter Mikroorganismen austauschbar.

Weitere Organismen sind die Bakterien *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter intermedius* und der Pilz *Verticillium sp.* [4], wobei die

Partikeleigenschaften ausschließlich bei dem Bakterium *P. stutzeri* eingehender charakterisiert worden sind.

Silberphosphat, Silberchlorid, Silbersulfid

Silberhaltige Salze wie Silberphosphat, Silberchlorid und Silbersulfid werden in Folge eines Detoxifikationsmechanismus aus Silberionen gebildet. Es handelt sich dabei um eine Fällung der Silberionen mit Schwefelwasserstoff (H₂S) oder anderen Gegenionen (Cl⁻, PO₄³⁻). *P. stutzeri* bildet je nach Kultivierungsbedingungen Partikel aus elementarem Silber oder Silbersulfid. Die Silbersulfid-Partikel weisen eine monokline kristalline Struktur von Silbersulfid auf [79]. Es wird vermutet, dass nicht-sulfatreduzierende Bakterien wie *P. stutzeri* den für diese Fällungsreaktion notwendigen Schwefelwasserstoff aus der Entschwefelung von Cystein mittels Cysteindesulphydrase gewinnen [13].

Elementares Gold

Goldionen sind generell weniger toxisch als Silberionen, die Resistenzgene sind daher in der Regel nicht plasmidkodiert. Vielmehr ist eine höhere physische Stabilität der Zelle notwendig, um der hohen Dichte von mineralisiertem Gold entgegenzuwirken [4].

Der erste Organismus, bei dem die Bildung von Goldnanopartikeln beobachtet worden ist, ist ein *Pedomicrobium*-ähnliches Bakterium, das in goldreichen Gegenden Alaskas und Südafrikas vorzufinden ist. Die Gebiete weisen eine hohe Konzentration an Goldionen und goldhaltigen Komplexen auf, welche für Bioakkumulationsprozesse verfügbar sind [4].

Der Mineralisationsprozess beginnt mit der Goldakkumulation in der Zellwand durch Anlagerung der anionischen Goldkomplexe an positiv geladenen Gruppen oder koordinierende Liganden schwefelreicher Polypeptide auf der Zellwandoberfläche. Die Peptidaggregate dienen als Keim zur Partikelbildung. Elektronentransferprozesse induzieren die Reduktion zu elementarem Gold. Die Partikelbildung wird durch die morphologische Beschaffenheit der Bakterienzelle gesteuert und zugleich limitiert. Es kommt zur Bildung unförmiger, physikalisch heterogener Formen aus elementarem Gold [4].

Weitere Organismen, bei denen die Bildung von Goldnanopartikeln beobachtet worden ist, sind *Bacillus cereus*, *Medicago sativa* und der Pilz *Verticillium sp.*

Letzterer bildet Goldnanopartikel ausgehend von einer Bindung von Goldchlorid-Ionen (AuCl_4^-) an die Zelloberfläche. Die gebundenen Goldionen werden anschließend durch Enzyme innerhalb der Zellwand reduziert. Dies führt zur Bildung von Goldnanopartikeln mit einem kubischen Kristallgitter und einem Durchmesser von ca. 20 - 30 nm [32].

Elementares Quecksilber

Einige Bakterien reduzieren die hochgiftigen, wasserlöslichen Hg^{2+} -Ionen intrazellulär durch das Enzym Hg-Reduktase (MerA) unter Einsatz von NADPH zu elementarem Quecksilber. Das unschädliche und wasserunlösliche Quecksilber diffundiert danach aus der Zelle [81, 82].

Der Resistenzmechanismus ist plasmidkodiert. Daher ist die Quecksilberresistenz daher unter Mikroorganismen weit verbreitet. Die Bildung von Quecksilber ist beispielsweise bei *Pseudomonas putida* beobachtet worden. Dieser Effekt wird beispielsweise zur Reinigung quecksilberbelasteter industrieller Abwasser eingesetzt [82]. Bioakkumulation, z.B. durch aktive Aufnahme des Quecksilbers in die Zelle und spätere Absonderung durch Bindung an Metallothionin-Moleküle oder chelatbildende Substanzen ist für Quecksilber nicht beobachtet worden [82].

Elementarer Schwefel

Die Bildung von Partikeln aus elementarem Schwefel ist bei den Organismen *Beggiatoa alba* [86, 87] und *Thiomargarita namibiensis* [84, 85, 230] beobachtet worden. Als Substrat dient Schwefelwasserstoff (H_2S).

Bei *Beggiatoa sp.* handelt es sich um filamentöse Bakterien, die in der Natur hauptsächlich in schwefelwasserstoffreichen Gebieten vorkommen, wie z. B. Schwefelquellen und Schlammschichten in Seen [231]. In diesen Biotopen sind die *Beggiatoa*-Filamente meist mit Schwefelgranula gefüllt. Bei *Thiomargarita namibiensis* handelt es sich um ein Riesenbakterium. Das Bakterium ist gekennzeichnet durch seine Zellgröße und leuchtende Schwefelkörnchen im Zellinneren.

Schwefelbakterien kommen fast überall vor - in Gewässern, im Erdboden und sogar in Kläranlagen [231]. Die gebildeten Schwefelpartikel dienen als Speicherstoff und können bei Bedarf zur zellulären Energiegewinnung weiter zu Sulfat oxidiert werden

(chemolithotropher Stoffwechsel). Die weite Verbreitung der Schwefelbakterien deutet auf ihre wichtige Rolle für den ökologischen Schwefelkreislauf hin.

Magnetit

Bakterien wie *Magnetospirillum sp.* haben die Fähigkeit, intrazellulär Eisenoxid-Partikel (Fe_3O_4) mit magnetischen Eigenschaften zu bilden. Die so genannten „magnetotaktischen“ Bakterien sind die häufigste Quelle für biogenen Magnetit [232-234]. Das Schwimmverhalten der Bakterien zeigt dabei, dass die Magnetitpartikel dem Organismus als biomagnetischer Kompass dienen [10].

Magnetotaktische Bakterien leben meist in aquatischen Gegenden mit niedrigen Sauerstoffkonzentrationen – in Flusssedimenten oder der OATZ⁴⁰ in Gewässern [235].

Die Eisenaufnahme stellt den ersten Schritt der Magnetitbildung dar. Ein entsprechendes Transportprotein wurde identifiziert [236]. Die Eisenionen werden im Folgenden zu hydratisiertem Eisenoxid oxidiert, welches als Zwischenprodukt bei der Magnetitbildung dient. Die Zelle bildet dabei eine Lipid- und Proteinschicht, welche den Magnetitkristall umhüllt. Diese Hülle dient der kontrollierten Fällung der hydratisierten Eisenoxide. Im Anschluss werden die amorphen Magnetitpartikel zu einer spezifischen Stelle innerhalb der Bakterienzelle transportiert. Dort werden die Partikel von der Bakterienzelle erneut gelöst. Durch eine kontrollierte Kristallisation erfolgt die Bildung von Magnetitkristallen [4].

Das Ergebnis sind intrazelluläre Ketten einzelner Magnetitkristalle, die membrangebunden vorliegen [10, 235]. Durchschnittlich besteht eine solche Kette aus ca. 25 Partikeln [4]. Abhängig von dem Bakterienstamm sind verschiedene Kristallmorphologien identifiziert worden [4, 237]. Dabei wird vermutet, dass die Form und Größe der Magnetitkristalle abhängig von dem intrazellulären Platzangebot ist [4].

Die Herstellung biogener Magnetitpartikel wurde bereits im kontinuierlichen Betrieb unter Laborbedingungen realisiert [93]. Dabei werden durchschnittlich Magnetitkonzentrationen von ca. $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ erzielt [238].

⁴⁰ OATZ: „Oxic-anoxic transition zone“, Übergangszone zwischen aeroben und anaeroben Bereichen in Gewässern

Greigit

Magnetotaktische Bakterien besitzen die Fähigkeit, in anaerober Umgebung Greigitkristalle (Fe_3S_4) zu produzieren. Magnetotaktische Bakterien aus der OATZ von Gewässern können Magnetit- und Greigitpartikel enthalten. Je geringer die verfügbare Sauerstoffkonzentration, desto wahrscheinlicher ist die Bildung von Greigitkristallen.

Aus sulfidhaltigen Umgebungen sind zwei verschiedene, nicht näher klassifizierte stäbchenförmige, einzellige Bakterien isoliert worden: Einer dieser Bakterienstämme produziert hochorganisierte Ketten aus bis zu 57 quaderförmigen Greigitkristallen, mit Kristallgrößen von 69 nm·50 nm. Der andere Bakterienstamm synthetisiert Ketten aus je 26 würfelförmigen Kristallen mit einer durchschnittlichen Kristalllänge von 67 nm [239].

Cadmiumsulfid

Die Biomineralisation von Cadmiumsulfid ist bekannt in Pflanzen, einigen Pilzen, Hefen und sulfatreduzierenden Bakterien. Cadmiumionen sind toxisch für die Organismen. In Folge der Detoxifikation kommt es spezienspezifisch zu einer intra- oder extrazellulären Bindung der Cadmiumionen und Fällung mit Sulfidionen zu Cadmiumsulfid-Partikeln [4]. Je nach Spezies und Umgebungsbedingungen werden Cadmiumsulfid-Kristalle mit unterschiedlichen Größen und/oder Kristallstrukturen gebildet [4]. Der Detoxifikationsmechanismus, welcher der Cadmiumsulfid-Bildung bei den Hefestämmen *Schizosaccharomyces pombe* und *Candida glabrata* zugrunde liegt, wird in Kapitel 2.1.1 detailliert beschrieben.

Eine zelluläre Cadmiumaufnahme und die Bildung von Cadmiumsulfid werden bei einigen Stämmen der Hefe *Sacharomyces cerevisiae* beobachtet. Dabei wird das Cadmium in Vakuolen eingeschlossen und in Cadmium/Glutathion-Komplexen gebunden [240]. Allerdings gibt es in diesem Fall bisher noch keinen Nachweis kristalliner Strukturen [193]. Intrazelluläre Metallothionine sind des Weiteren bei *Pseudomonas putida* und *Synechococcus sp.* nachgewiesen worden [16]. Bei einem Stamm von *Escherichia coli* wurde die Fähigkeit zur intrazellulären Synthese von Cadmiumsulfidpartikeln beobachtet. Die Partikel besitzen einen Durchmesser von ca. 2 – 5 nm und weisen eine Wurtzitstruktur auf [241, 242].

Darüber hinaus wurde die Bildung extrazellulär vorliegender Cadmiumsulfid-Nanopartikeln beobachtet. Extrazelluläre Fällungsreaktionen finden meist durch eine spezifische Bindung zu einem Biopolymer statt, üblicherweise der Zellwand [16]. Bei *Bacillus subtilis* liegen z. B. ca. 90 % des akkumulierten Cadmiums zellwandgebunden vor. Es wird vermutet, dass es sich hierbei um einen aktiven Prozess handelt [18]. Extrazelluläre Polymere sind bei cadmiumresistenten Stämmen von *Arthrobacter sp.* und *Vibrio alginolyticus* nachgewiesen worden [16].

Der Pilz *Fusarium oxysporum* bildet Cadmiumsulfid-Partikel basierend auf einem enzymatisch kontrollierten Prozess. Dabei werden sulfatreduzierende Enzyme sekretiert, welche extrazellulär vorliegendes Sulfat zu Sulfid reduzieren. Dies führt im Folgenden zur Bildung von Cadmiumsulfid-Nanoclustern mit Durchmessern von 5 – 20 nm [4].

Bei dem sulfatreduzierenden Bakterium und Krankheitserreger *Klebsiella pneumoniae* (*K.aerogenes*) kommt es durch Sulfatreduzierung zur Bildung extrazellulärer Cadmiumsulfid-Kristalle auf der Zelloberfläche [4, 243]. Die Einzelkristalle mit einem Durchmesser von 4 nm sind dabei in eine biologische Matrix eingelagert und tragen zu ca. 3 – 4 % der Biotrockenmasse bei. Die organische Matrix schützt die Einzelkristalle über einen Zeitraum von mehreren Wochen gegen Agglomeration [13]. Bei den gebildeten Partikeln wurden Halbleitereigenschaften nachgewiesen [13].

Cadmiumsulfid-Partikel können ebenso von dem Bakterium *Clostridium thermoaceticum* bildet werden, wenn bei der Kultivierung eine Sulfidquelle zur Verfügung gestellt wird. Elektronenmikroskopische Untersuchungen lassen darauf schließen, dass die Cadmiumsulfid-Partikel extrazellulär gebunden vorliegen. Dabei wurde sämtliches Cadmium aus dem Medium entfernt [16].

Bei Bakterien ist die Information für Cadmiumresistenzen häufig plasmidkodiert. Cadmium- bzw. Schwermetallresistenzen sind daher unter Bakterien weit verbreitet [244].

Zinksulfid

Die Bildung von Zinksulfid-Nanopartikeln als Folge eines Biomineralisationsprozesses wurde in Pflanzen, einigen Pilzen, Hefen und sulfatreduzierenden Bakterien beobachtet. Die Partikelbildung erfolgt dabei wie bei den Cadmiumsulfid-Partikeln in Folge eines Detoxifikationsprozesses. Die

Eigenschaften von biogenen Zinksulfid-Partikeln sind hinsichtlich der Kristallstruktur, ihren Halbleitereigenschaften und ihres Bindungsverhaltens vergleichbar mit denen von Cadmiumsulfid-Partikeln [4].

Bariumsulfat

Partikel aus Bariumsulfat (BaSO_4) werden z. B. von Pantoffeltierchen der Spezies *Luxodes sp.* gebildet, welche an der Oberfläche von Faulschlämmen leben. Süßwasserarten bilden dabei intrazelluläre Partikel aus BaSO_4 und BaPO_4 . Bei Salzwasserarten wurden bislang Partikel aus BaSO_4 und SrSO_4 nachgewiesen. Es ist nicht auszuschließen, dass es bei den Salzwasserarten auch zur Bildung von Phosphatverbindungen kommt. Bei *Luxodes sp.* erfolgt die Partikelbildung in intrazellulären Vesikeln. Dabei entstehen Partikelkomplexe von ca. 3 μm Durchmesser, welche aus sphärischen Untereinheiten (\emptyset ca. 100 nm) zusammengesetzt sind [245].

A 3: Vergleichswerte zur Dichte biologischer Komponenten

Partikel	Durchmesser [μm]	Dichte [$\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$]
DNA		1,7
Lösliche Proteine	0,001 – 0,01	1,3
Zellkern	3 – 12	1,1 – 1,3
Mitochondrien	0,5 – 4,0	1,1 – 1,2
Hefezellen (allg.)	2 – 15	1,05 – 1,2
<i>S. cerevisiae</i>	4 – 5	1,1

Tabelle A 3: Durchmesser und Dichte verschiedener Organismen und Zellbestandteile [176, 178].

Anhang B: Material und Methoden

B 1: Kultivierungsmedien für *S. pombe* und *C. glabrata*

Malzextrakt-Agar zur Stammhaltung

15 g·L ⁻¹	Pepton aus Casein
3 g·L ⁻¹	Hefeextrakt
6 g·L ⁻¹	NaCl
1 g·L ⁻¹	Glucose
12 g·L ⁻¹	Agar-Agar

Komplexmedien (186D, YM)

Substanz	Medium 186D	Medium YM
Hefeextrakt	6 g·L ⁻¹	3 g·L ⁻¹
Malzextrakt	6 g·L ⁻¹	3 g·L ⁻¹
Glucose	20 g·L ⁻¹	10 g·L ⁻¹
Pepton aus Casein	10 g·L ⁻¹	5 g·L ⁻¹
Ammoniumsulfat	1,3 g·L ⁻¹	1,3 g·L ⁻¹

B 2: Kultivierungsmedium für *Emiliania huxleyi*

F/40 Medium

Herstellung von angereichertem Meerwasser-Medium F/2, anschließende 20-fache Verdünnung zu F/40-Medium.

F/2 Medium

1 mL	7,5 g·L ⁻¹ NaNO ₃
1 mL	5,0 g·L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄
1 mL	F/2 Spurenelement-Stammlösung
0,5 mL	F/2 Vitamin-Stammlösung (nach dem Autoklavieren)

Mit Meerwasser auf ein Volumen von einem Liter auffüllen. Medium autoklavieren und anschließend Vitamin-Stammlösung zugeben.

Spurenelement-Stammlösung (F/2)

3,15 g·L ⁻¹	FeCl ₃ ·6H ₂ O
4,36 g·L ⁻¹	Na ₂ EDTA·2H ₂ O
1 mL	9,8 g·L ⁻¹ CuSO ₄ ·5H ₂ O
1 mL	6,3 g·L ⁻¹ Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O
1 mL	22,0 g·L ⁻¹ ZnSO ₄ ·7H ₂ O
1 mL	10,0 g·L ⁻¹ CoCl ₂ ·6H ₂ O
1 mL	180,0 g·L ⁻¹ MnCl ₂ ·4H ₂ O

Stammlösung mit Reinstwasser auf ein Volumen von einem Liter auffüllen.

Vitamin-Stammlösung (F/2)

1 mL	1,0 g·L ⁻¹ Vitamin B12
10 mL	0,1 g·L ⁻¹ Biotin
200 mg·L ⁻¹	Thiamin HCl

Stammlösung mit Reinstwasser auf ein Volumen von einem Liter auffüllen und filtersterilisieren. Stammlösung nach dem Autoklavieren dem Medium zugeben.

B 3: Gaschromatographie – Ethanolbestimmung

Einstellungen des Gaschromatographen

Trägergasstrom (Helium)	30 mL·min ⁻¹
Wasserstoffstrom	30 mL·min ⁻¹
Luftstrom	240 mL·min ⁻¹
Detektortemperatur	250 °C
Injektortemperatur	150 °C

Temperaturprogramm (Ofen)

80 °C	2 Minuten
Temperaturrampe: Aufheizen auf 150 °C	10 °C·min ⁻¹
2 Minuten	150 °C

B 4: Enzymatischer Zellaufschluss

Zymolase-Stammlösung

100 mg·mL ⁻¹	Zymolase
-------------------------	----------

Enzym in SCE-Pufferlösung lösen. Enzymlösung direkt vor Zellaufschluss herstellen und bei 4 °C lagern.

SCE-Pufferlösung

1 M	Sorbitol
0,1 M	Natriumcitrat
50 mM	EDTA

Den pH-Wert auf pH = 7,0 einstellen und Stammlösung mit Reinstwasser auf ein Volumen von einem Liter auffüllen. Stammlösung filtersterilisieren.

DTT-Stammlösung

308 mg·mL ⁻¹	DTT (Dithiothreitol)
-------------------------	----------------------

Stammlösung mit Reinstwasser auf ein Volumen von 1 mL auffüllen. Die Konzentration entspricht einer 2 M DTT-Stammlösung. Direkt vor Durchführung des enzymatischen Aufschlusses wird die Stammlösung auf eine Konzentration von 5 mM DTT mit Reinstwasser verdünnt.

B 5: Ionenaustauschchromatographie

Durchführung der Ionenaustauschchromatographie

1. Konditionierung des Säulenmaterials: 400 µL Ladungspuffer wurden auf die Säule (Vivapure Q Mini H, Firma VivaScience) aufgetragen und die Chromatographie-Einheit anschließend zentrifugiert.
Sämtliche Zentrifugationsvorgänge finden für 5 Minuten bei 5210 U·min⁻¹ und 4 °C statt. Das Eluat wird nach dem Zentrifugieren jeweils entfernt und ggf. für weitere Analysen aufbewahrt.
2. Beladung der Säule: Es wurden 400 µL Probevolumen aufgetragen und anschließend zentrifugiert.
3. Waschschritt: Zum Entfernen der ungebundenen Probenbestandteile wurden zweimal je 400 µL Ladungspuffer aufgetragen und anschließend zentrifugiert.

4. Probeneluation: Zur Eluation wurden 400 µL Eluationspuffer aufgetragen und zentrifugiert.

(Vivascience, Vivapure Protein Purification Handbook, 2002)

B 6: Gelelektrophorese

Gelherstellung

10 % Trenngel (7, 5 mL)

H ₂ O	3 mL
30% Acryl-Bisacrylamid Mix	2,45 mL
1, 5 M Tris (pH 8, 8)	1,9 mL
10% SDS	0,075 mL
APS	0,075 mL
TEMED	0,003 mL

5 % Sammelgel (3 mL)

H ₂ O	2,1 mL
30% Acryl-Bisacrylamid Mix	0,5 mL
1,5 M Tris (pH 8, 8)	0,38 mL
10% SDS	0,03 mL
APS	0,03 mL
TEMED	0,003 mL

Laufpuffer (500 mL)

Tris Base	7,5 g
Glycin	36 g
10% SDS	2,5 g

Probenpuffer (10 mL)

1,5 M Tris (pH 6,8)	1,0 mL
10% SDS	0,6 mL
Glycerin	3,0 mL
β -Mercaptoethanol	1,5 mL
Bromphenolblau	4,0 mg

Bei der Gelpräparation ist folgende Reihenfolge der Komponentenzugabe dringend einzuhalten: 1) Wasser, 2) Acrylamid, 3) Tris, 4) ggf. 10% SDS, 5) APS, 6) TEMED.

Die Komponenten für das Trenngel zusammengeben und Lösung zum Vermischen der Komponenten leicht schwenken. Das Gel langsam zwischen die Glasplatten der Trennkammer einfüllen, um Luftblasen zu vermeiden. Mindestens 20 Minuten warten, bis das Trenngel vollständig auspolymerisiert ist.

Das Sammelgel wird anschließend mit dem Trenngel überschichtet. Zur Bildung der Probenaufgabe-Kammern den Kamm einstecken. Ca. 10 Minuten warten, bis das Gel auspolymerisiert ist. Dann den Kamm entfernen – das Gel ist jetzt einsatzbereit.

Coomassie Färbung

Die Gele werden mindestens eine Stunde in der Coomassie-Färbelösung kontinuierlich geschwenkt. Nach der Färbung wird die Lösung verworfen. Zur Entfärbung der proteinfreien Bereiche wird anschließend eine essigsäurehaltige Lösung zugegeben. Die zur Entfärbung notwendige Zeit ist abhängig von der Gelkonzentration und variiert für jedes Gel. Nach dem Entfärben können die Gele einige Tage in Reinstwasser aufbewahrt werden.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie blau R250	0,25 g
Ethanol	100 mL
Wasser	100 mL

Das Coomassie-Pulver mindestens eine Stunde in Wasser lösen. Anschließend 25 mL Essigsäure zugeben und die Färbelösung mit Reinstwasser auf 250 mL auffüllen.

Entfärbelösung

Ethanol 400 mL

Essigsäure 400 mL

Komponenten mischen und mit Reistwasser auf ein Volumen von einem Liter auffüllen.

Silberfärbung

Die Silberfärbung (Roti-Black P Silberfärbungskits, Firma Roth) wird für die Färbung geringer Proteinkonzentrationen verwendet. Die Silberfärbung besitzt eine wesentlich geringere Nachweisgrenze als Coomassie blau. Die Nachweisgrenze liegt bei wenigen Nanogramm pro Proteinbande. Die Durchführung findet entsprechend der beiliegenden Anleitung statt.

Anhang C: Ergebnisse

C 1: Hefekultivierungen

Einfluss unterschiedlicher Cadmium-Zugabeprofile auf die spezifische Cadmiumakkumulation

1 x Zugabe von 1,7 mM Cd	
Cd-Konzentration (mmol·L ⁻¹)/(mg ·L ⁻¹)	1.7 / 176
<i>Cadmiumakkumulation (mgCd/gBTM)</i>	19,4

1 x Zugabe von 1 mM Cd, anschl. kontinuierliche Zugabe (lineares Profil)	
Cd-Konzentration (mmol·L ⁻¹)/(mg ·L ⁻¹)	3.2 / 358
<i>Cadmiumakkumulation (mgCd/gBTM)</i>	40,6

Kontinuierliche Zugabe (lineares Profil)	
Cd-Konzentration (mmol·L ⁻¹)/(mg ·L ⁻¹)	3.5 / 389
<i>Cadmiumakkumulation (mgCd/gBTM)</i>	40,6

4 x Zugabe à 1 mM Cd				
Cd-Konzentration (mmol·L ⁻¹)/(mg ·L ⁻¹)	0.8 / 90	1.6 / 185	2.7 / 300	3.6 / 410
<i>Cadmiumakkumulation (mgCd/gBTM)</i>	5,4	19,4	26,8	29,4

Tabelle C 1.1: *C. glabrata*, Reaktorkultivierungen, Cadmiumakkumulation in Abhängigkeit des Zugabeprofiles.

Schüttelkolbenkultivierungen				
Cd-Konzentration (mmol·L ⁻¹)/(mg ·L ⁻¹)	1.0 / 112	4.0 / 448	7.0 / 784	10 / 1120
<i>Cadmiumakkumulation (mgCd/gBTM)</i>	22,3	74,5*	63,3*	87.7*

Tabelle C 1.2: *C. glabrata*, Schüttelkolbenkultivierungen, Zugabe hoher Cadmiumkonzentrationen (* Fällungsreaktionen können nicht ausgeschlossen werden.)

C 2: Zellaufschluss

Kälteaufschluss, *S. pombe*

Kälteaufschluss wurde durchgeführt bei – 70 °C, über einen Zeitraum von 1 – 4 Wochen. Spezifischer Cadmiumgehalt im Zellpellet: 6,62 mgCd/g BTM

Dauer	Cadmiumfreisetzung (mg/g BTM)	Prozentuale Cadmiumfreisetzung (%)
1 Woche	0,013	0,2
2 Wochen	0,019	0,3
3 Wochen	0,029	0,4
4 Wochen	0,034	0,5

Kälteaufschluss, *C. glabrata*

Kälteaufschluss wurde durchgeführt bei – 70 °C, über einen Zeitraum von 1 – 4 Wochen. Spezifischer Cadmiumgehalt im Zellpellet: 10,50 mgCd/g BTM

Dauer	Cadmiumfreisetzung (mg/g BTM)	Prozentuale Cadmiumfreisetzung (%)
1 Woche	0,66	6,3
2 Wochen	0,34	3,2
3 Wochen	0,39	3,7
4 Wochen	0,45	4,3

C 3: Partikelreinigung

Hitze­fällung, *S. pombe*

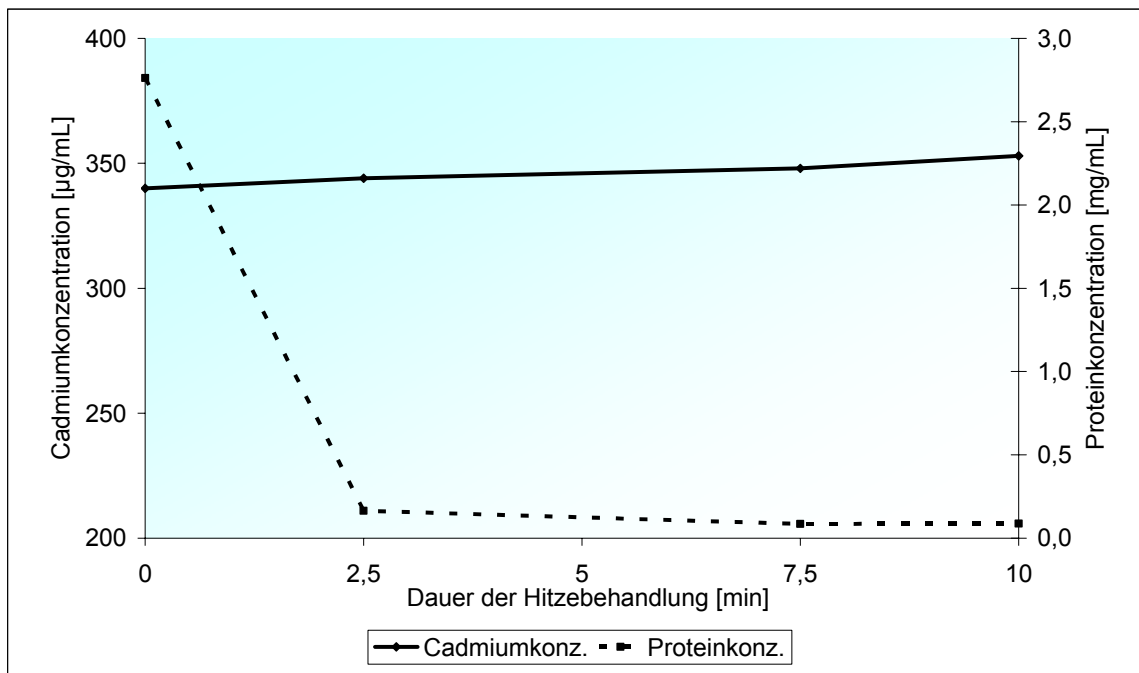


Abbildung C 3.1: Hitze­fällung, Protein- und Cadmiumkonzentration nach 2,5 - 10 Minuten bei 80 °C.

pH-Fällung, *S. pombe*

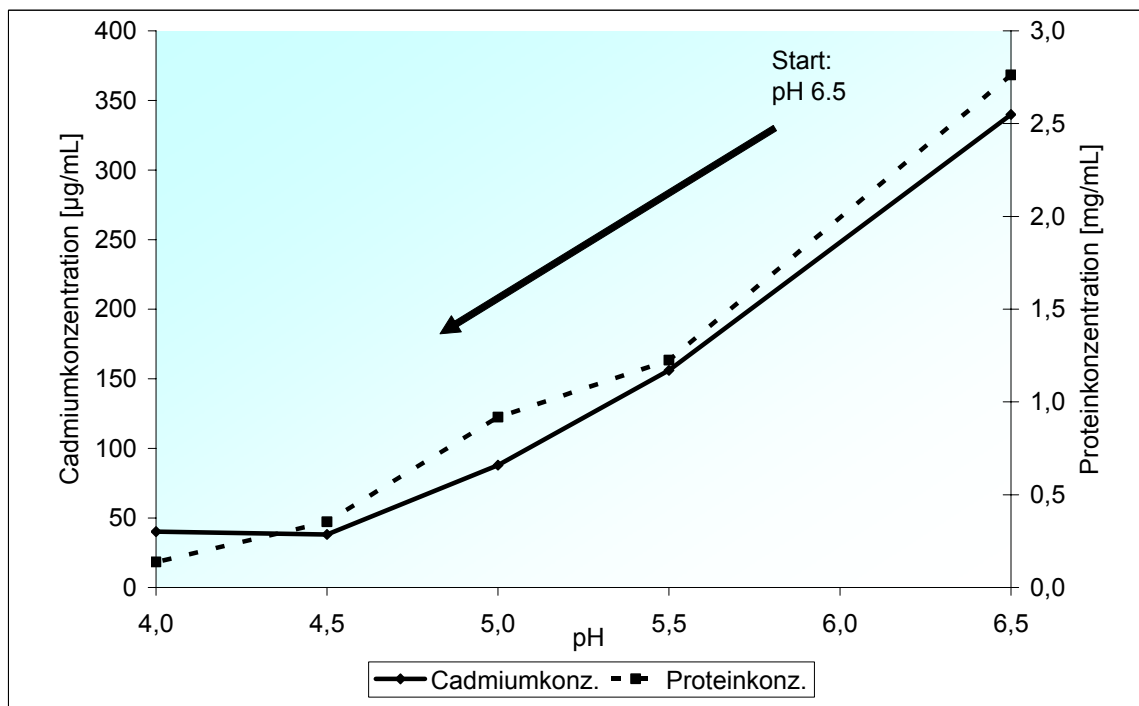


Abbildung C 3.2: pH-Fällung, Protein- und Cadmiumkonzentration bei schrittweiser Reduzierung des pH-Wertes von pH 6,5 auf pH 4,0.

Ammoniumsulfat-Fällung, *S. pombe*

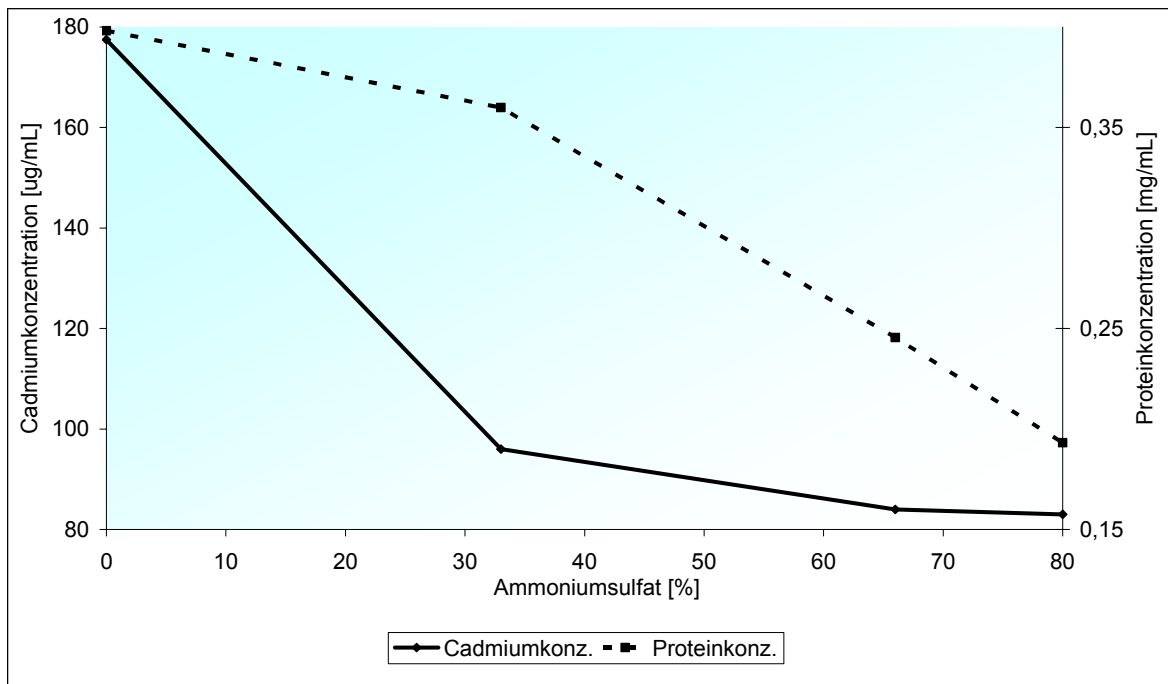


Abbildung C 3.3: Ammoniumsulfat-Fällung, Protein- und Cadmiumkonzentration bei schrittweiser Erhöhung der Ammoniumsulfat-Konzentration.

Größenausschlusschromatographie

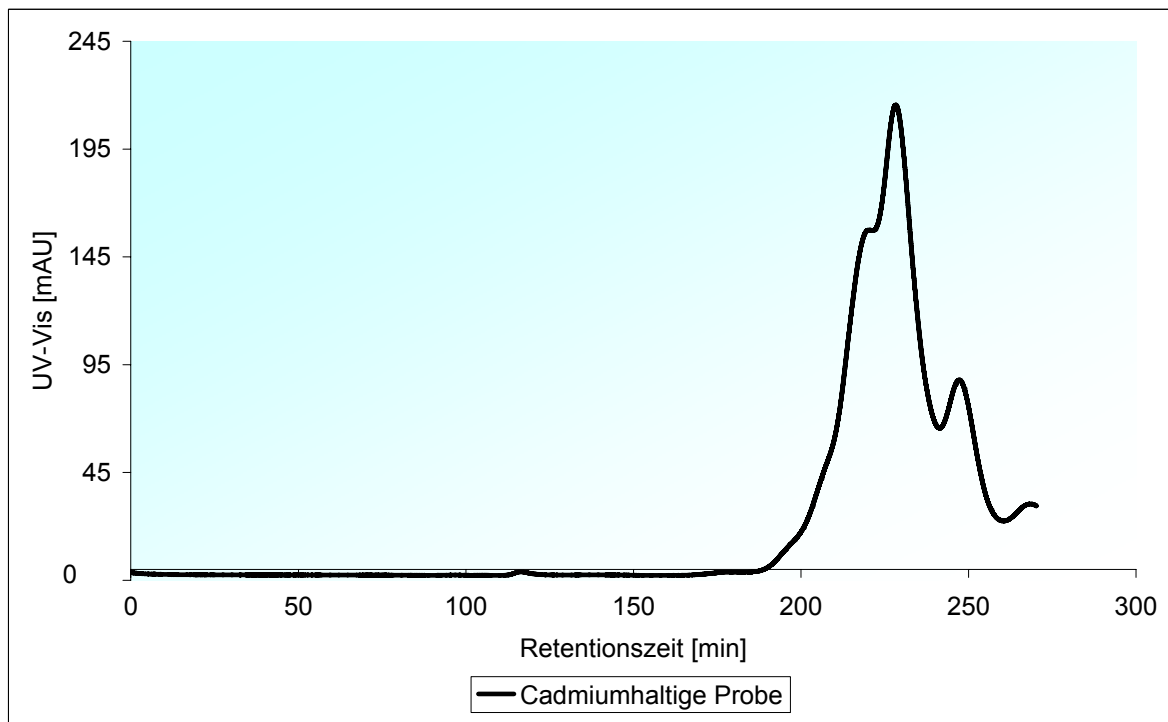


Abbildung C 3.4: SEC, *C. glabrata*, Zellysat nach Kälteaufschluss einer cadmiumhaltigen Probe, halpräparative Säule, 67 mM Phosphatpuffer.

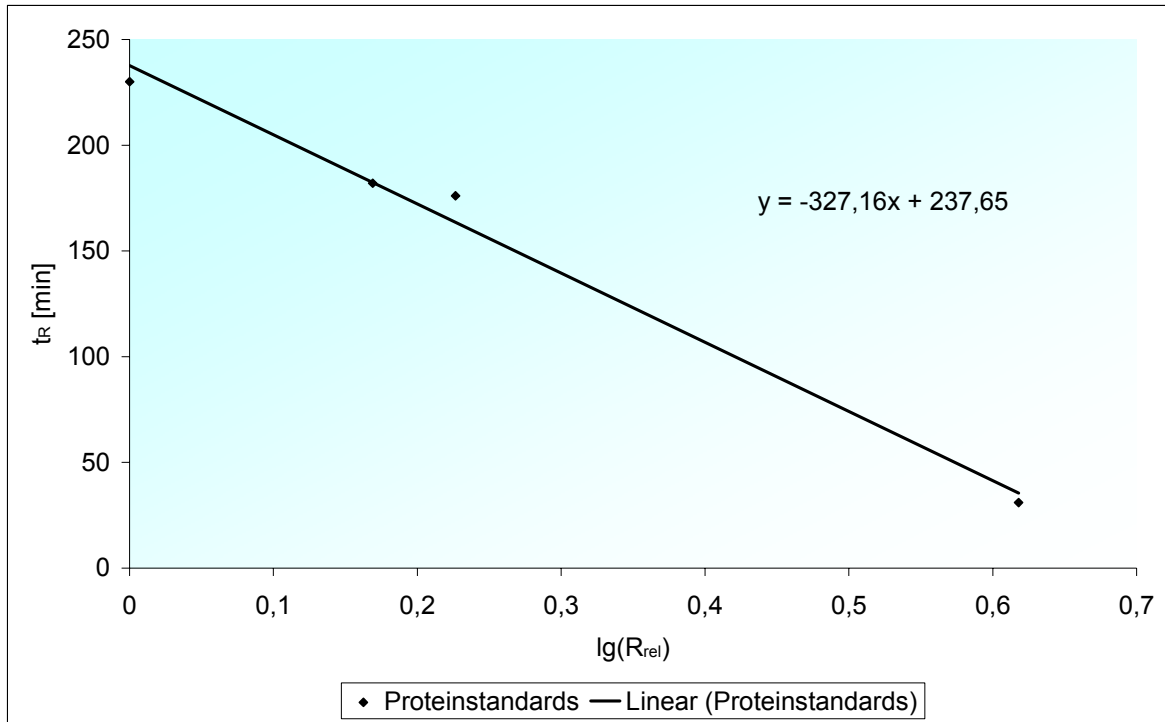


Abbildung C 3.5: Bestimmung der Referenzfunktion zwischen Partikelradius und Retentionszeit, halbpräparative Säule, 67 mM Phosphatpuffer.

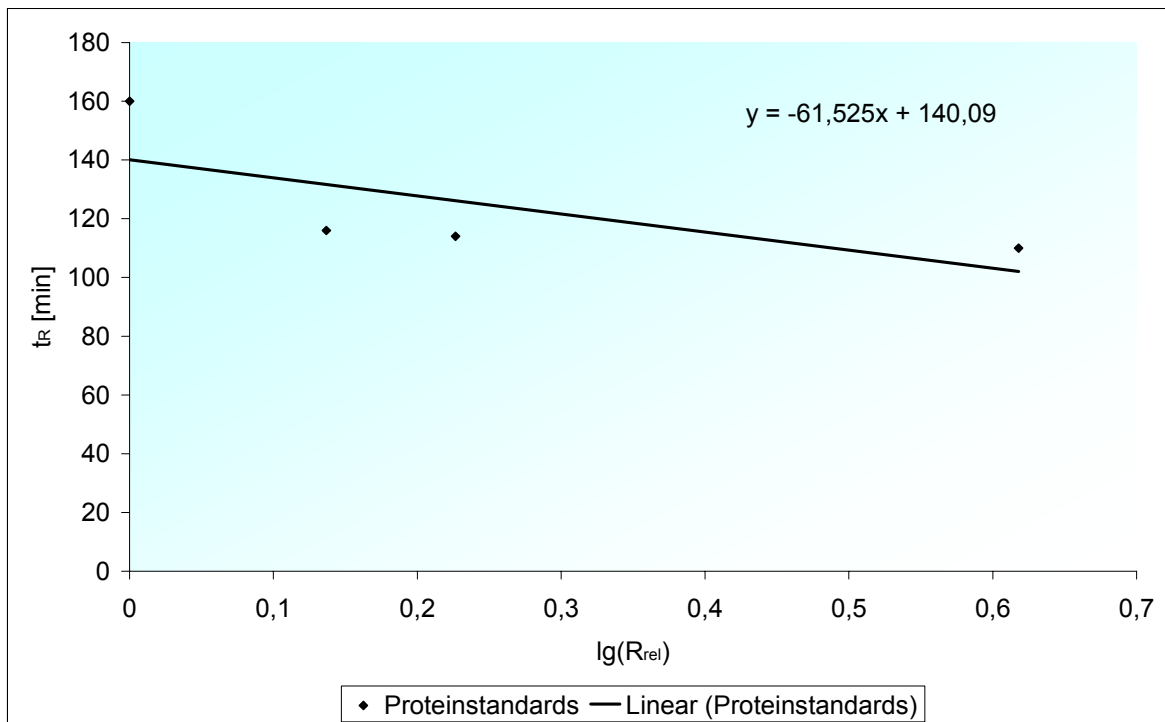


Abbildung C 3.6: Bestimmung der Referenzfunktion zwischen Partikelradius und Retentionszeit, halbpräparative Säule, 1 mM Phosphatpuffer.

Dichteabschätzung von Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexen

Molekulargewicht Komplex: 35 kDa

Molekulargewicht CdS-Kern: 12 kDa

Anteil CdS an Gesamtmasse des Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes:

$$\frac{M(\text{CdS})}{M(\text{CdS/Peptid - Komplex})} = \frac{12 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}}{35 \text{ kg} \cdot \text{mol}^{-1}} = 0,34 = 34 \%$$

Für wasserfreie Proteine kann eine Dichte von ca. $1,2 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$ angenommen werden. Die Abschätzung der Dichte eines wasserfreien Cadmiumsulfid/Peptid-Komplexes ergibt somit:

$$x_{\text{CdS}} \cdot \rho_{\text{CdS}} + x_{\text{Proteine}} \cdot \rho_{\text{Proteine}} = (0,34 \cdot 3,5 + 0,66 \cdot 1,2) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \approx 2,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$$

mit x_i : Massenanteil und ρ_i : Dichte der Komponente i.

Dichtegradientenzentrifugation

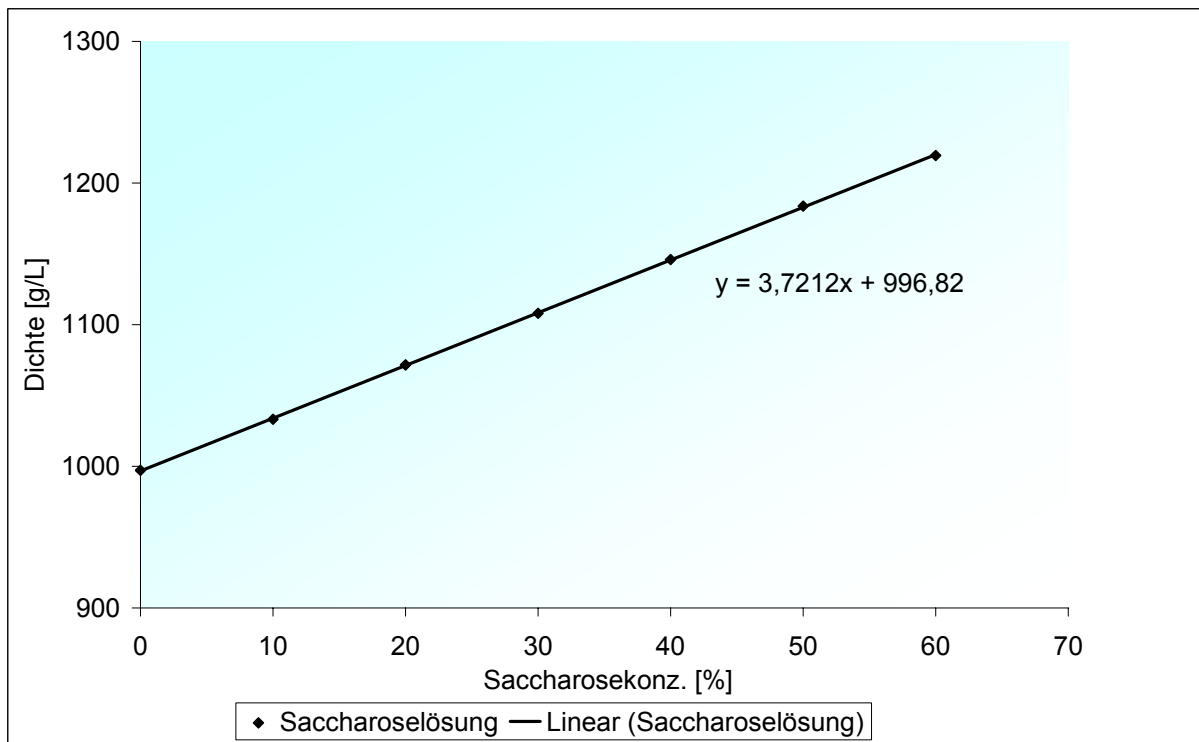


Abbildung C 3.7: Korrelation zwischen Saccharosekonzentration und Dichte der Saccharoselösung bei 4°C.

C 4: Partikelcharakterisierung

Partikelgrößenverteilung

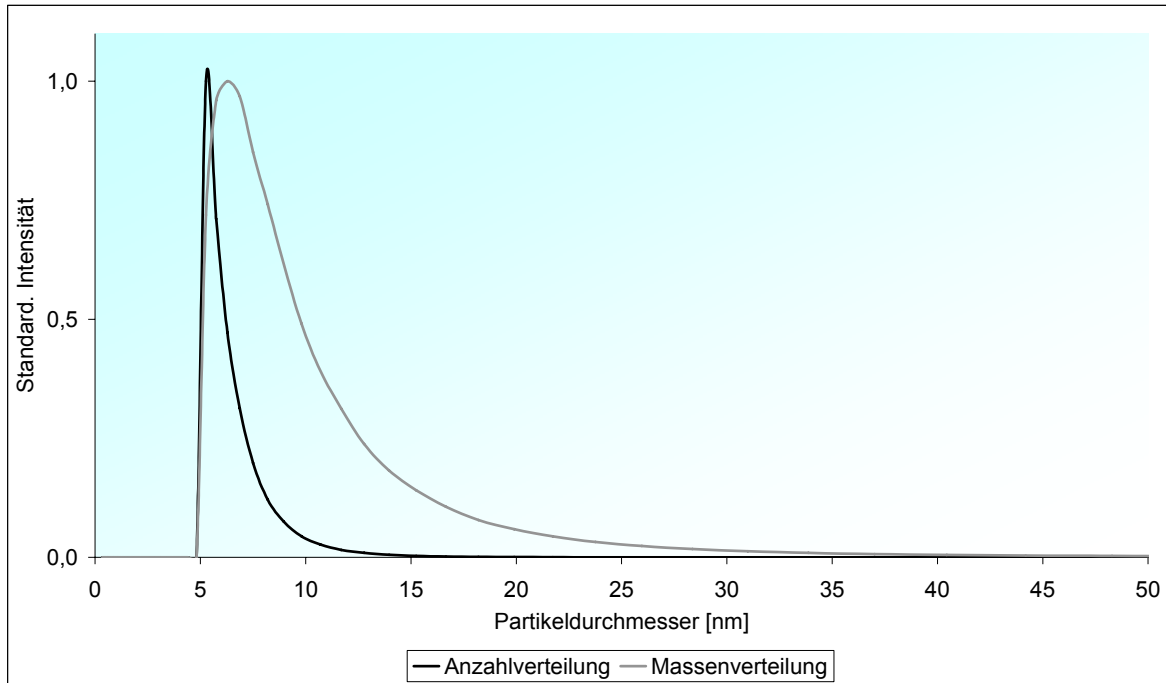


Abbildung C 4.1: Partikelgrößenverteilung, cadmiumhaltige Probe von *C. glabrata*, Kälteaufschluss, Zellysat nach Filtration (0,2 μm); Bestimmung mittels PCS.

Fluoreszenz

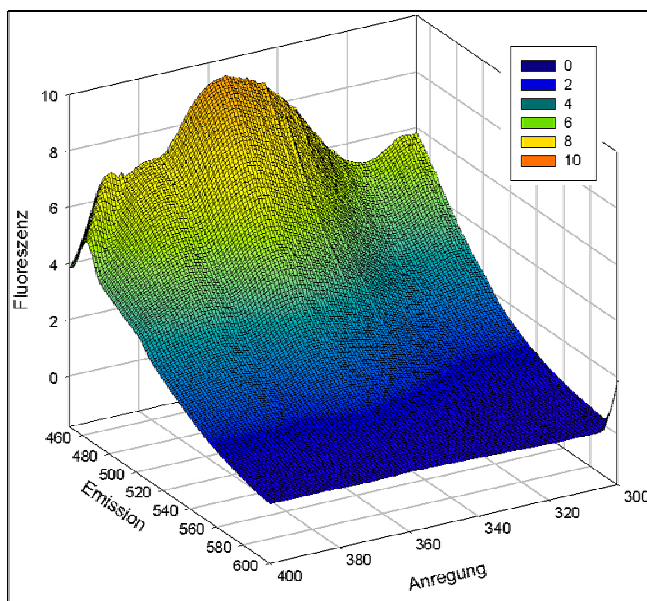


Abbildung C 4.2: Fluoreszenzsignal cadmiumfreier Zellysat-Proben von *S. pombe*: Kombiniertes Anregungs- und Emissionsspektrum.

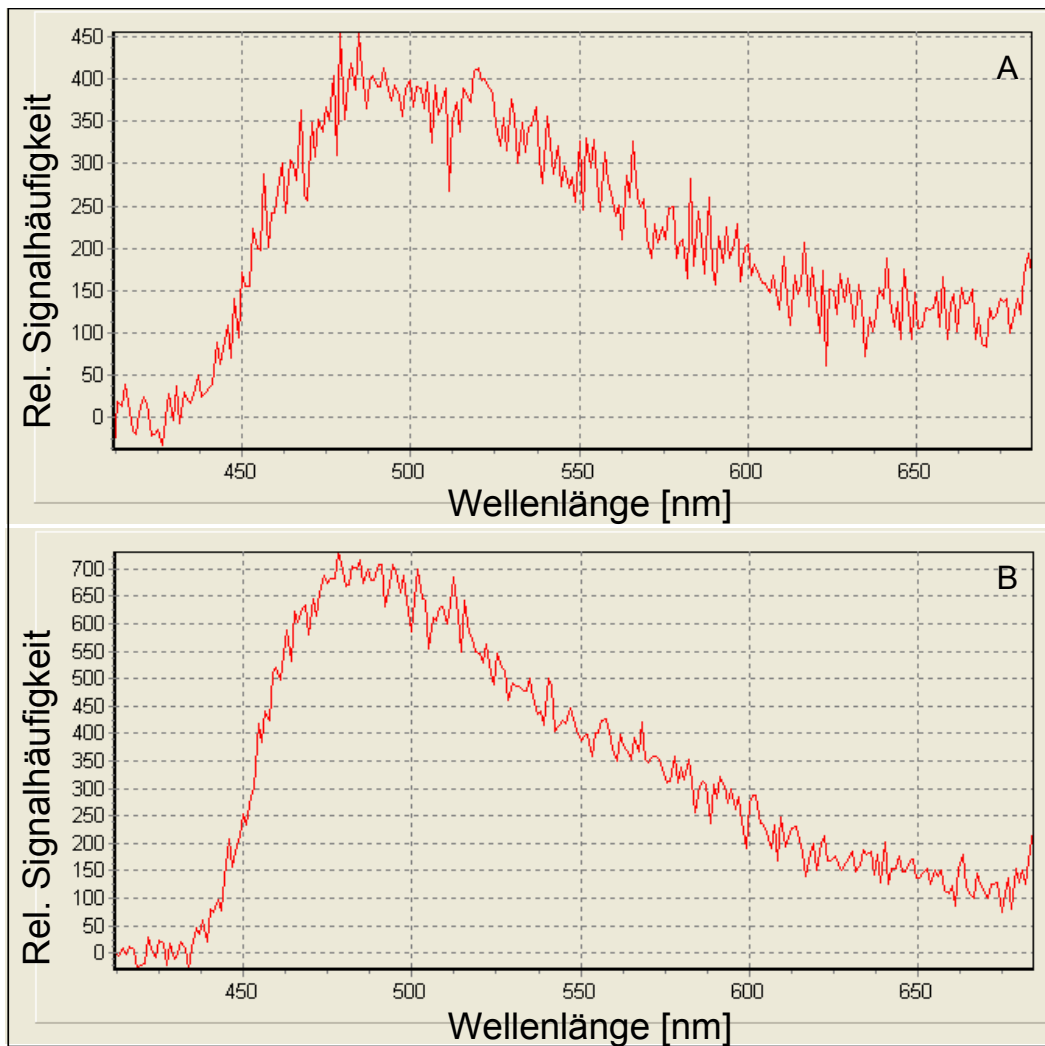


Abbildung C 4.3: Bestimmung der Fluoreszenzemission mittels Einzelmolekülanalyse; Zelllysatsproben von *S. pombe* nach SEC (Abbildung 22): (A) Fraktion 2 und (B) Fraktionen 3.

C 5: Abschätzung der Herstellkosten für biogene Cadmiumsulfid-Nanopartikel

Kostenabschätzung: Herstellung 10 g CdS-Nanopartikel			
Kultivierung			
	g/L	€/kg	Kosten 200 L
Hefeextrakt	6	97,66	117
Malzextrakt	6	32,78	39
Pepton	10	83,27	167
Ammoniumsulfat	1,3	15,9	4
Glucose-Monohydr.	60	4,33	52
Cadmiumnitrat (2mM)	0,5	135,8	13
Material (für 1 kg BTM)		392 €	
Personal	6 Monate (120 Tage)		Laborantenstelle, Universität Karlsruhe
	13920 €		
entspricht	116 €/Tag		
Personal für 10 Tage		1160 €	(Kultivierung, Zellernte, Zellaufschluss)
Chromatographie (SEC)			
	g/L	€/kg	€/L
K-dihydrogenphosphat	3,7583	7,6	0,02856308
Na-hydrogenphosphat	5,6352	5,04	0,028401408
	Material: 0,06 € für 1 L Phosphatpuffer (67 mM)		
Nutzung SEC:	42,5 €/h	Full-Service Forschungszentrum Umwelt (FZU), Karlsruhe	
Zellysate aus 1kg BTM:	90 L	(5 g/L BTM, 90 % Wasser)	
Auftragsvolumen (SEC):	3 L		
Durchläufe:	30		
Trenndauer:	4 h		
Gesamtdauer SEC:	120 h		
Kosten SEC:	5100 €		
Volumen Puffer:	4702 L	(653 mL/min, 120 h)	
Kosten Puffer:	268 €		
Säule, anteilig:	600 €	(30000 € für Säule, 50 Fraktionierungen pro Jahr)	
Gesamtkosten SEC:		5968 €	(Personal und Verbrauchsmaterialien)
Berücksichtigung der Cadmiumverluste bei der Aufreinigung (bezogen auf 10 g CdS)			
	Cadmiumverluste	entspricht (CdS)	Verbleibendes CdS
Verluste durch Aufschluss:	33 %	3,3 g	6,7 g
Verluste durch Hitzefällung:	10 %	0,67 g	6,03 g
Verluste durch SEC:	20 %	1,206 g	4,824 g
D.h., die Cadmiummenge wird in Folge der Verluste halbiert. Zur Kompensierung muss dementsprechend ein ca. doppelt so grosses Volumen hergestellt werden. Zur Herstellung von 10 g Partikel werden dementsprechend 400 L Zellsuspension benötigt. Damit erhöhen sich die Herstellkosten auf ca.: 15040 €			
Die Kosten für 10 g biogene CdS-Partikel betragen damit ca. 20.000 €.			

Verkaufspreise für kommerzielle Nanopartikel

Produkt 1: Funktionalisierte Cadmiumselenidpartikel mit Carboxylgruppen auf Partikeloberfläche (Qdot ITK Carboxyl, Firma tebu-bio) [210]:

Probenvolumen	Probekonzentration	Verkaufspreis o. MwSt.
250 µL	50 mM	439 €

Produkt 2: Funktionalisierte Cadmiumselenidpartikel mit Aminogruppen auf Partikeloberfläche (Qdot ITK Amino (PEG), Firma tebu-bio) [210]:

Probenvolumen	Probekonzentration	Verkaufspreis o. MwSt.
250 µL	50 mM	658 €

C 6: Algenkultivierungen

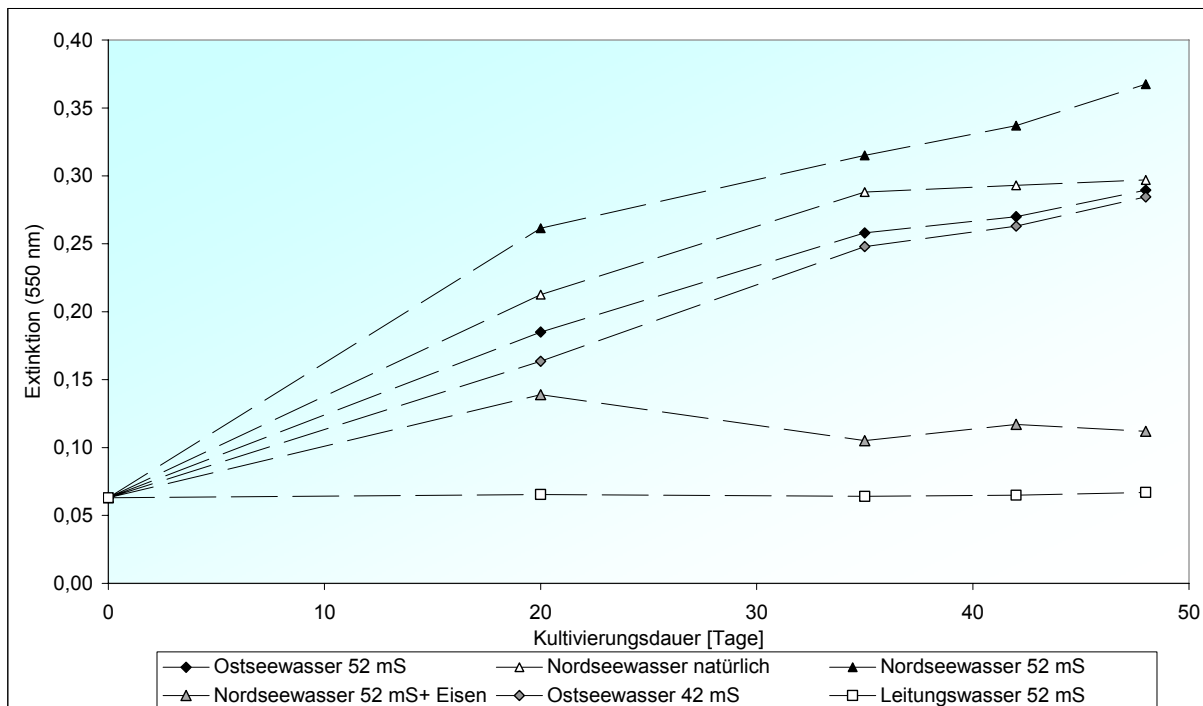


Abbildung C 6: Schüttelkolbenkultivierung von *Emiliana huxleyi*, phototrophe Batchkultivierungen in unterschiedlich angereichertem synthetischem Meerwasser.

ISBN: 978-3-86644-118-7

www.uvka.de