

Aus dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung in Golm

**Mikro- und Nanokapseln aus Funktionspolymeren,
Biopolymeren und Proteinen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

Corinna Schüler
aus
Hamburg

Golm 2000

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ziele dieser Arbeit	1
1.2	Schichtaufbau mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen	2
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1.1	Adsorption von Polymeren an Oberflächen	5
2.1.2	Adsorption von Proteinen an Oberflächen	6
2.1.3	Nichtkovalente zwischenmolekulare Wechselwirkungen	7
2.1.4	Elektrische Doppelschicht	7
2.2	Enzymkinetik	9
2.2.1	MICHAELIS-MENTEN-Kinetik	10
3	METHODEN	12
3.1	Zeta-Potential	
3.1.1	Photonenkorrelationsspektroskopie	13
3.2	Mikroskopie	14
3.2.1	Elektronenmikroskopie	15
3.2.2	Konfokale Mikroskopie	17
3.3	Rasterkraftmikroskopie	17
3.4	Energy-Dispersive X-ray Analysis (EDAX)	19
3.5	Einzelteilchenlichtstreuung (Single Particle Light Scattering, SPLS)	19
3.6	UV/VIS Spektroskopie/Absorptionsspektroskopie	20
3.7	Quarzmikrowaage	21
4	HERSTELLUNG DER SCHICHTEN UND HOHLKUGELN	23
4.1	Allgemein	23
4.1.1	Beschichtung mit eisenhaltigem Metallo-supramolekularem Polymer	24
4.1.2	Herstellung von hohlen Kapseln aus Metallo-supramolekularem Polymer- und PSS- haltigen Filmen	24
4.1.3	Beschichtung von Teilchen mit einem Durchmesser kleiner 100 nm	25
4.1.4	Beschichtung mit Glucose Oxidase (GOD)	25
4.1.5	Beschichtung mit GOD nach dem „Premix“-Verfahren	26
4.1.6	Beschichtung mit Peroxidase (POD)	26
4.1.7	Beschichtung mit POD nach dem „Premix“-Verfahren	26
4.1.8	Sequentielle Beschichtung mit POD/GOD	27
4.1.9	Enzymatische Aktivitätstests für GOD und POD	27
4.1.10	Beschichtung durch spezifische Erkennung	28
4.1.11	Beschichtung mit DNA/Spermidin	28
4.1.12	Herstellung von hohlen Kapseln aus DNA- und Spermidinhaltigen Filmen	28
4.1.13	Zersetzung von DNA/ Spermidin-haltigen Filmen	29
4.1.14	Beschichtung mit p-Lysin/Alginaten	29
4.1.15	Darstellung von CaCO ₃ -Teilchen nach der Methode von KITANO	29
4.1.16	Beschichtung von (Block-Copolymer stabilisierten) CaCO ₃ -Teilchen	30
4.1.17	Zersetzung der Block-Copolymer stabilisierten CaCO ₃ -Teilchen	30

5	ERGEBNISSE	31
5.1	Aufbau von Multischichten mit eisenhaltigem Metallo-supramolekularem Polymer	31
5.1.1	Charakterisierung der mit Fe-PE-beschichteten Kolloide	32
5.2	Herstellung hohler Kapseln aus Polyelektrolyt/Fe-PE	36
5.2.1	Charakterisierung der hohlen Kapseln	37
5.3	Beschichtung von 70 nm PS-Latex Partikeln mit Polyelektrolyt/eisenhaltigen Metallo-supramolekularen Polymer-Schichten	39
5.3.1	Charakterisierung der beschichteten 70 nm Latices	40
5.3.2	Diskussion	44
5.4	Aufbau von Enzym/Polyelektrolyt-Multischichten	47
5.4.1	Aufbau von GOD/Polykation-Multischichten	47
5.4.2	Aufbau von POD/Polyelektrolyt-Multischichten	47
5.4.2.1	Charakterisierung der Filme	48
5.4.2.2	Filmstruktur	53
5.4.2.3	Stabilität der immobilisierten Enzyme	60
5.4.2.4	Einfluß der äußeren Polyelektrolytschichten	64
5.4.3	Multi-funktionale Kolloide	65
5.4.4	Aufbau von sequentiellen Multienzym-Polyelektrolyt-Schichten	67
5.4.4.1	Charakterisierung der Filme	67
5.4.5	Premixing –Experimente	70
5.4.5.1	Charakterisierung der Filme	70
5.4.5.2	Filmstruktur	72
5.4.5.3	Einfluß der äußeren Polyelektrolytschichten	78
5.4.6	Diskussion	79
5.5	Spezifische Erkennung	82
5.5.1	Avidin-Biotin-GOD-Schichten	83
5.5.2	Concanavalin A-GOD	88
5.5.2.1	Charakterisierung der Filme	89
5.5.3	Diskussion	91
5.6	Hohlkugeln aus Biopolymeren	93
5.6.1	DNA/Spermidin-Schichten	93
5.6.1.1	Zersetzen der Schichten mit NaCl	95
5.6.1.2	Charakterisierung der DNA/Spermidin-Hohlkugeln	98
5.6.2	Charakterisierung der p-Lysin/Alginsäure-Schichten	101
5.6.3	Diskussion	104
5.7	Templatierungen von CaCO₃	106
5.7.1	Beschichtung von CaCO ₃ -Partikeln	106
5.7.2	Herstellung von Hohlkugeln	108
5.7.3	Diskussion	111
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	113
6.1	Zusammenfassung	113
6.2	Ausblick	116
7	DANKSAGUNG	117
8	LITERATUR	118
9	ANHANG	123

9.1	Analytische Methoden	123
9.2	Zentrifugationsgeschwindigkeiten und –dauern	124

1 Einleitung

Ein in der Wissenschaft noch nicht vollständig verstandener Aspekt ist die Abhängigkeit der Funktion von Proteinen von ihrer Umgebung. Durch ein gezieltes Einstellen der Umgebung soll ein besseres Verständnis für diese Prozesse gewonnen werden, die in Anwendungen in der Biotechnologie und Medizin nützlich sein könnten. Bei Verwendung von Enzymen ist es notwendig, daß die Substrate einen schnellen Zugang zu den Enzymen haben und das die Produkte abdiffundieren können. Daher ist eine Immobilisierung der Enzyme in dünnen Schichten mit hoher spezifischer Oberfläche eine sinnvolle Art zur Untersuchung. Als Trägermaterial zur Immobilisierung sind kolloidale Template gut geeignet, da sie eine Kontrolle sowohl über die Größe als auch über die Beschaffenheit der Oberfläche erlauben. Als Immobilisationstechnik eignet sich der schrittweise Schichtaufbau mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen, mit dem eine Strukturierung auf molekularer Ebene erreicht werden kann.

1.1 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollen die oben erwähnten vorteilhaften Eigenschaften der kolloidalen Template ausgenutzt werden. Es wird die Layer-by-layer self-assembly Technik angewendet, um definierte dünne Schichten herzustellen. Nach einer Einführung und einer Beschreibung der verwendeten Techniken werden die Ergebnisse, gegliedert in fünf Abschnitte, dargestellt.

Zuerst werden, durch die Verwendung eines eisenhaltigen Polymers, Metallionen in die Schichten eingebaut. Diese Schichten werden auf lösliche Template aufgebracht, um danach Hohlkugeln mit Metallionen in der Hülle herzustellen. Die Eigenschaften dieser Kugeln werden untersucht.

In einem weiteren Teil der Arbeit wird untersucht, ob die Layer-by-layer Technik der Beschichtung auch für sehr kleine (<100 nm Durchmesser) Partikel anwendbar ist, bei denen die Partikeldimensionen im Bereich der Moleküldimensionen liegen.

Durch Beschichtung mit Enzymen können die Partikel katalytische Eigenschaften bekommen. Die Bedingungen, unter denen eine Beschichtung möglich ist, werden untersucht. Es werden drei prinzipielle Möglichkeiten zum Schichtaufbau mit Enzymen dargestellt. Durch den

Aufbau von Multischichten soll geklärt werden, ob die enzymatische Aktivität mit zunehmender Schichtzahl ansteigt und so durch Anpassung der Schichtzahl die gewünschte Aktivität eingestellt werden kann. Die Stabilität der Schichten gegenüber äußeren Einflüssen wird untersucht.

In einem weiteren Abschnitt werden lösliche Template mit Biopolymeren beschichtet, um völlig biokompatible Hohlkugeln zu erhalten, welche unter bestimmten Bedingungen selbst auflösbar sind.

In einem letzten Teil werden anorganische Partikel, die unter bestimmten Bedingungen löslich sind, als Template verwendet. Es soll festgestellt werden, wie weit sich die bisher verwendeten Polymerlatices durch diese Template ersetzen lassen.

Diese Arbeit hat einen exploratorischen Charakter, d. h. es soll festgestellt werden, wie weit sich die Layer-by-layer Technik eignet. Sie soll den Weg für weitere, mehr in die Tiefe gehende Arbeiten ebnen.

1.2 Schichtaufbau mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen

Die Modifizierung von Oberflächen durch Aufbringung von organischen (Multi-)Schichten ist schon seit langem Gegenstand der Forschung. Eine (schon lange) bekannte Methode ist die Langmuir-Blodgett (LB) Technik [Lan, 1917; Blo, 1934; Lan, 1935], bei der Amphiphile an der Wasser/Luft Grenzfläche erst gespreitet und danach komprimiert werden. Diese molekularen Schichten werden anschließend auf feste Substrate übertragen. Auf diese Weise ist es auch möglich, Multischichten herzustellen. Diese Methode ist aber auf eine bestimmte, planare Topologie der Substrate und amphiphile Moleküle beschränkt.

Eine neuere Methode, sehr dünne Filme reproduzierbar und mit gut definierten Eigenschaften herstellen zu können, ist der Aufbau von Polyelektrolytschichten mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen (Layer-by-Layer Technik). Diese Methode wurde von *Iler* theoretisch entwickelt [Ile, 1966], ist aber erst Anfang der Neunziger von *Decher et al.* praktisch umgesetzt worden [Dec, 1991a; 1997; Lvo, 1993]. Die damaligen Arbeiten wurden an planaren Oberflächen durchgeführt. Man nahm dazu ein geladenes Substrat, tauchte es für einige Minuten in eine Polyelektrolytlösung mit entgegengesetzter Ladung, wusch das beschichtete Substrat anschließend mit Wasser. Zum Aufbau weiterer Schichten wurde das Substrat erneut in eine entsprechend entgegengesetzt geladene Polyelektrolytlösung getaucht, anschließend gewaschen und mit den Beschichtungs- und Waschzyklen fortgefahren.

Diese Zyklen lassen sich beliebig oft wiederholen, bis man die gewünschte Schichtdicke erreicht hat. Nach Aufbringung jeder einzelnen Polyelektrolytschicht kommt es zu einer Umladung der Oberfläche, die eine Adsorption der folgenden Schicht ermöglicht. Dieses Verhalten wurde zuerst durch Physisorption von homobifunktionellen Molekülen wie Boladianionen und Boladikationen studiert [Dec, 1991b]. Später wurden Polyelektrolyte eingesetzt, zuerst in Verbindung mit Bolaamphiphilen, wobei auch bei deren Adsorption eine Umladung der Oberfläche gefunden wurde [Dec, 1991c, 1992b]. Diese Umladung konnte später durch theoretische Betrachtungen erklärt werden [Net, 1999b], und es wurden verschiedene Mechanismen postuliert [Low, 1998; Dub, 1999; Ary, 2000; Cas, 2000]. Es konnte nachgewiesen werden, daß die so geformten Filme, trotz Verschlaufungen mit benachbarten Polymerschichten und einer gewissen Durchdringung doch eine definierte Schichtstruktur aufweisen [Sch, 1993b; Dec, 1994]. Die hier verwendeten Polyelektrolyte können neben synthetischen Polymeren auch biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine oder geladene Viruspartikel [Lvo, 1993b; Dec, 1993; Lvo, 1994; Suk, 1996; Car, 1997, He, 1998], oder kolloidale Partikel darstellen [Kot, 1995; Car, 1998a und b; Ber, 2000].

Mitte der Neunziger Jahre wurde dieses Verfahren dann auch dazu verwendet, gekrümmte Oberflächen wie zum Beispiel Kolloide zu beschichten [Suk, 1998a und b; Don 1998]. Die Layer-by-layer Technik erlaubt, im Gegensatz zur LB-Technik, also nicht nur die Beschichtung mit einer großen Anzahl von Molekülen, sie ist auch unabhängig von der Geometrie und Größe der Substrate.

Die Beschichtung kolloidaler Template erfolgt analog der Beschichtung der planaren Substrate. Um die Partikel von der Polyelektrolytlösung abzutrennen, können die Teilchen zentrifugiert [Suk, 1998] und der den Polyelektrolyt enthaltende Überstand abgenommen werden. Eine Alternative dazu ist die Filtration [Voi, 1999]. Bei der Beschichtung kolloidaler Template muß allerdings auch immer die Stabilität der Dispersion berücksichtigt werden. Eine große Anzahl von Einflüssen kann zu einer Aggregation oder Ausflockung führen [Don, 1997; Peu, 1997; Mol, 1999]

Es wurde mittlerweile eine große Anzahl verschiedener Polyelektrolyte, Biomakromoleküle, wie Proteine oder DNA und Nanopartikel zum Aufbau dünner Filme mit Hilfe der elektrostatischen Wechselwirkung verwendet [Low, 1998; Car, 1999d Ali, 1999; Kur, 1999; Car, 1999; Sus, 2000; Sch, 2000].

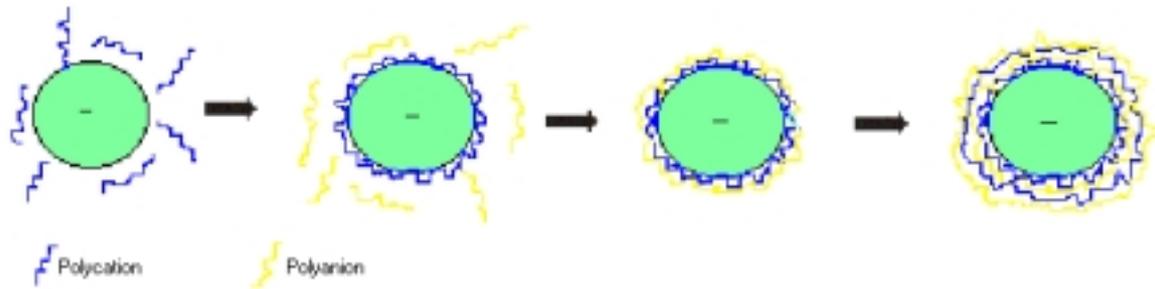


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Layer-by-Layer Beschichtung von kolloidalen Templaten

Ein Unterschied der Anwendung kolloidaler Teilchen gegenüber flachen Substraten ist die sehr große Oberfläche, welche über die Teilchenzahl sehr genau eingestellt werden kann. Diese kann sowohl für die Katalyse als auch für die Sensorik ausgenutzt werden. Eine weitere mögliche Anwendung ist der Einsatz für die Arzneimitteldarreichung „*drug-delivery systems*“.

Ein weiteres Feld möglicher Einsatzgebiete, z. B. als Nanoreaktoren, erschließt sich durch die Möglichkeit, die kolloidalen Template herauszulösen und auf diese Weise Hohlkugeln mit einer gut definierten dünnen Hülle zu erhalten [Don, 1998; Car, 1998b, Ber, 1999].

2 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Adsorption von Polymeren an Oberflächen

Polymere wie die in der Arbeit verwendeten Polyelektrolyte können aus verschiedenen Gründen an (Partikel-)Oberflächen adsorbieren. In dieser Arbeit wird nur die Adsorption von Polyelektrolyten an entgegengesetzt geladenen Oberflächen auf Grund elektrostatischer Wechselwirkungen betrachtet. Die Polyelektrolyte liegen in Lösung und bei niedrigem Salzgehalt in (relativ) gestreckter Konformation vor, da die Ladungen entlang der Kette sich abstoßen. Fügt man Salz zu dieser Lösung hinzu, so werden die Ladungen durch die entsprechenden Gegenionen abgeschirmt und der Polyelektrolyt geht in eine geknäulte Konformation über. Bei der Adsorption von Polyelektrolyten an einer Oberfläche verändert sich ihre Konformation ebenfalls. Die Knäuel gehen in Konformere über, bei denen einige Teile der Kette in Strängen (*trains*) direkt auf der Oberfläche aufliegen, während andere Schlaufen (*loops*) bilden. Die Enden können als Schwänze (*tails*) in die Lösung ragen [Pap, 1985; Coh, 1988].

Die in Lösung bei niedriger Ionenstärke gestreckt vorliegenden Polyelektrolyte behalten auch an der Oberfläche eine gestrecktere Konformation und bilden dünnere Schichten aus. Es wird bei geringer Ionenstärke weniger Polyelektrolyt adsorbiert. Durch theoretische Untersuchungen wurde dieses Verhalten ebenso wie die Notwendigkeit einer gewissen Salzkonzentration in der Lösung bestätigt [Net, 1998]. Mit zunehmender Ionenstärke knäulen sich die Ketten mehr zusammen und es werden dickere Schichten gebildet [Cla, 1997, Net, 1999a und b]. Es müssen dabei aber auch andere Faktoren, wie die Ladungsdichte der Oberfläche, die Flexibilität des Polyelektrolyten und, bei Adsorption auf Partikeloberflächen, die Größenverhältnisse des Polyelektrolyten zum Partikel mit berücksichtigt werden [Net, 1999a].

Im Gegensatz zur Adsorption von niedermolekularen Verbindungen kann bei der Adsorption von Polyelektrolyten manchmal bei höherer Temperatur eine Zunahme der adsorbierten Menge gemessen werden [Nev, 1996].

Die Ionisation von Polyelektrolyten wird häufig über den pH-Wert gesteuert, z. B. wenn Ladungen durch Dissoziation entstehen [Fle, 1996]. Die an einer entgegengesetzt geladenen Oberfläche adsorbierte Menge Polyelektrolyt kann damit vom pH-Wert abhängen. Eine

zunehmende Ladung des Polyelektrolyten fördert die Adsorption, bei zu hoher Ladungsdichte kommt es allerdings zu lateralen Abstoßungen, welche die Adsorption wieder verringern.

2.1.2 Adsorption von Proteinen an Oberflächen

Proteine sind biologische Makromoleküle, die meist aus den 20 natürlichen Aminosäuren zusammengesetzt sind. Diese einzelnen Bausteine sind über eine Amidbindung verknüpft. Sie haben eine Vielzahl von Aufgaben in allen Lebensformen, beispielsweise können sie so als strukturierende Materialien wirken. Eine große Klasse der Proteine wird als Enzyme bezeichnet, das sind diejenigen Proteine, die biochemische Reaktionen katalysieren.

Damit ein Protein an einer Oberfläche adsorbieren kann, muß die Änderung der freien Energie dieses Vorgangs negativ sein. Es muß für das Protein also energetisch vorteilhaft sein, an der Oberfläche zu adsorbieren, sonst verbleibt es in der Lösung. Dieser Vorteil kann enthalpischen oder entropischen Ursprung haben. Einer der entropischen Gründe ist die Freisetzung von Gegenionen in die Lösung während der Adsorption.

Die enthalpischen Vorteile für eine Adsorption von Proteinen sind in der Protein-Oberflächen-Wechselwirkung zu suchen. Bei der Adsorption von Proteinen spielen verschiedene Wechselwirkungen eine Rolle: hydrophobe, *van der Waals* und elektrostatische Wechselwirkungen [Peu, 1993; Peu, 1994, Kat, 1995] sind die wichtigsten, daneben gibt es noch z.B. Wasserstoffbrücken, Säure-Base Interaktionen und spezifische Wechselwirkungen die auf molekularer Erkennung beruhen [Lyk, 1996; Yoo, 1998; Kam, 1999].

Weitere wichtige Parameter für die Proteinadsorption sind die Proteinlöslichkeit (in einem schlechten Lösemittel steigt die Tendenz zur Adsorption) und die Selbst-Assoziation eines Proteins. Welcher Effekt für die Adsorption am wichtigsten ist, hängt sowohl von dem Protein als auch von der Oberfläche ab.

Generell unterscheidet man leicht deformierbare Proteine, wie z.B. das *Bovine Serum Albumine (BSA)*, ein im Blutserum der Rinder vorkommendes Protein, die auch häufig einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren aufweisen. Diese Proteine adsorbieren am besten bei einem pH-Wert nahe ihrer isoelektrischen Punkte auf hydrophoben Oberflächen. Es finden hier also fast nur hydrophobe Wechselwirkungen statt, während die elektrostatischen Wechselwirkungen vernachlässigt werden können.

Andere, in ihrer Konformation durch die Adsorption nicht deformierte Proteine folgen einer elektrostatischen Adsorption. Sie adsorbieren besser bei einem pH-Wert, der sich von dem

ihrer isoelektrischen Punkte unterscheidet. Die Adsorption auf hydrophilen und geladenen Oberflächen wird von dieser Sorte Protein bevorzugt. Da Proteine aber aus hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren bestehen, welche sich zudem sehr unterschiedlich über das Molekül verteilen, ist es komplizierter als bei synthetischen Polymeren vorherzusagen, welche der Wechselwirkungen überwiegt.

Je nachdem wie groß die konformelle Stabilität eines Proteins während der Adsorption ist, unterscheiden sich auch die adsorbierten Schichten [Obe, 1999; Lvo, 2000].

2.1.3 Nichtkovalente zwischenmolekulare Wechselwirkungen

Die Supramolekulare Chemie beruht auf nicht kovalenten, intermolekularen Wechselwirkungen der Molekül(-teile) untereinander [Leh, 1995]. Diese Wechselwirkungen können *van der Waals*- oder Wasserstoffbrückenbindungen sein, aber auch Metall-Ligand- oder elektrostatische Wechselwirkungen. Beruhend auf diesen Wechselwirkungen ist es möglich, große Strukturen aufzubauen. Solche großen Strukturen spielen auch in anderen Fachgebieten wie der Biologie [Leh, 1966] oder der Physik (*molecular electronics*) [Car, 1982; Ash, 1992; Sap, 1999] eine große Rolle. In dieser Arbeit wurde ein Polymer verwendet, welches unter Ausnutzung von Metall-Ligand-Wechselwirkungen synthetisiert wurde [Sch, 1998].

2.1.4 Elektrische Doppelschicht

Die verwendeten Polystyrol- oder Melaminformaldehyd- Latex-Partikel besitzen alle Oberflächenladungen. Diese Ladungen werden in der Nähe der Fest/Flüssig-Grenzfläche durch entgegengesetzte Ladungen, meist Ionen aus der Lösung ausgeglichen. Da sich die Schwerpunkte der entgegengesetzten Ladungen nicht in einer Ebene befinden, bildet sich eine elektrische Doppelschicht aus.

Man unterscheidet im Modell zwischen starren Doppelschichten, die besonders an stark geladenen Oberflächen auftreten und entgegengesetzt geladene Ionen aus der Lösung stark adsorbieren und diffusen Doppelschichten an schwächer geladenen Grenzflächen und geringer Elektrolytkonzentration in der Lösung. Die Doppelschicht der meisten realen Systeme enthält Anteile beider Arten.

Die starre Doppelschicht wird über einen *Helmholtz*'schen Ansatz berechnet. Das Grenzflächenpotential kann in diesem Fall genau berechnet werden.

Um eine diffuse Doppelschicht zu beschreiben, gibt es die Ansätze von *Gouy* und *Chapman* und das *Debye-Hückel*-Modell.

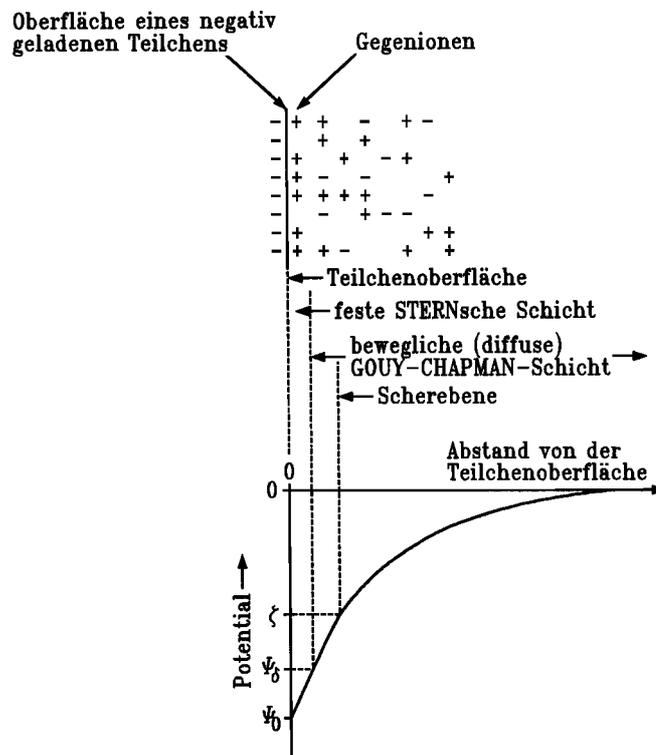


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Oberflächenpotentiale eines negativ geladenen Teilchens

In der *Debye-Hückel*-Theorie der Elektrolyte folgt aus der *Poisson-Boltzmann*-Gleichung für das Grenzflächenpotential:

$$\Psi_0 = \frac{\sigma}{\epsilon \epsilon_0 \kappa} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

Hierbei ist Ψ_0 das Grenzflächenpotential, σ die Flächenladungsdichte, ϵ die Dielektrizitätskonstante, ϵ_0 die Influenzkonstante und κ die reziproke Dicke der diffusen Doppelschicht.

Dieser Ansatz gilt aber nur für geringe Grenzflächenpotentiale, da für monovalente Ionen schon bei einem Potential von etwa 25 mV die potentielle Energie im elektrischen Feld der thermischen Energie kT bei 25°C entspricht. Der Wert des Grenzflächenpotentials verringert sich dementsprechend bei höher geladenen Ionen.

Bei höheren Grenzflächenpotentialen, wo der *Debye-Hückel*-Ansatz nicht mehr gilt, kann aus dem nichtlinearen Ansatz der *Gouy-Chapman*-Theorie eine Lösung erhalten werden.

Da normalerweise weder eine ausschließlich starre noch eine ausschließlich diffuse Doppelschicht vorliegt, wurden beide Modelle kombiniert. In der dadurch erhaltenen, sogenannten *Stern*'schen Doppelschicht fällt das Grenzflächenpotential wegen der adsorbierten Ionen zuerst linear, wie bei einer starren Doppelschicht bis auf einen bestimmten Wert ab. Anschließend nähert sich das Potential wie bei der diffusen Doppelschicht in einem exponentiellen Abfall null.

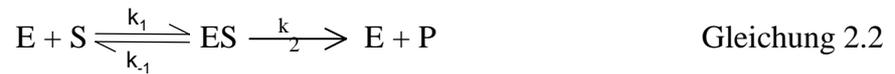
Bei einer spezifischen Adsorption geladener Teilchen kann es jedoch auch zu einer Erhöhung des Potentials oder zu einer Potentialumkehr kommen.

2.2 Enzymkinetik

Fast alle chemischen Reaktionen in biologischen Systemen laufen nur dann in der benötigten Zeit ab, wenn sie mit zelleigenen Katalysatoren beschleunigt werden. Diese Katalysatoren sind in der Regel Proteine, sogenannte Enzyme. Die Reaktionen werden durch Enzyme um Faktoren zwischen 10^6 und 10^{14} beschleunigt. Enzyme sind aber nicht nur sehr effektiv, was die Geschwindigkeit betrifft, sie sind außerdem spezifisch in der Auswahl der Substrate und sehr selektiv in der katalysierten Reaktion. Dadurch fallen kaum unerwünschte Nebenprodukte an. Während der Reaktion bildet sich häufig ein Enzym-Substrat-Komplex aus, welcher eine Konformationsänderung oder andere Beeinflussung des Substrates durch hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen oder durch Wasserstoffbrückenbindungen verursachen kann. Enzyme sind sehr substratspezifisch, da die Reaktionen in dem sogenannten aktiven Zentrum des Enzyms ablaufen, welches eine charakteristische dreidimensionale Struktur besitzt, in die das Substrat hineinpassen muß. 1890 prägte *E. Fischer* dafür den Begriff des Schlüssel-Schloß-Prinzipes.

2.2.1 MICHAELIS-MENTEN-Kinetik

Bei dem von *L. Michaelis* und *M. Menten* entwickelten Ansatz zur quantitativen Bestimmung der Kinetik enzymatischer Reaktionen geht man davon aus, daß das Enzym E und das Substrat S zuerst einen Komplex bilden, der dann in das Enzym und das Produkt P zerfällt:



k_2 soll dabei der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion sein. Daraus folgt für die Dissoziationskonstante K_D des ES-Komplexes:

$$K_D = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{mit } [E] = [E_{\text{ges}}] - [ES] \quad \text{Gleichung 2.3}$$

$[E_{\text{ges}}]$ ist dabei $[E]$ (freies Enzym in Lösung) plus dem Anteil Enzym, welches gerade in einem Enzym-Substrat-Komplex $[ES]$ gebunden ist.

Daraus folgt:

$$[ES] = \frac{[E_{\text{ges}}][S]}{[S] + K_D} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

Unter der Voraussetzung, daß der zweite Schritt der Reaktion geschwindigkeitsbestimmend ist, ergibt sich für die Reaktionsgeschwindigkeit r :

$$r = \frac{k_2[E_{\text{ges}}][S]}{[S] + K_D} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Bei hohen Substratkonzentrationen nähert sich die Reaktionsgeschwindigkeit einem Grenzwert r_{max} , da irgendwann jedes aktive Zentrum von einem Substrat belegt ist. Dann folgt für die *MICHAELIS-MENTEN-Gleichung*:

$$r = \frac{r_{\max} [S]}{[S] + K_D} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Durch die Messung der maximalen Geschwindigkeit r_{\max} kann die Geschwindigkeitskonstante $[K_D]$ bestimmt werden.

Die *MICHAELIS-MENTEN*-Kinetik kann als Modell für die in dieser Arbeit durchgeführten enzymatischen Aktivitätsmessungen durchaus verwendet werden, auch wenn sie häufig eine gewisse Vereinfachung der komplexen Vorgänge, die bei der Enzymkatalyse ablaufen, darstellt.

3 Methoden

3.1 ζ -Potential

Für die Beschichtung von Partikeln mit Hilfe der Layer-by-layer Technik ist es notwendig, die Oberflächenladung der Partikel zu kennen. Diese wird durch die Bewegung der Teilchen im elektrischen Feld, also eine Elektrophorese, gemessen. Beim Massentransport bleibt in der Nähe der Grenzfläche immer eine dünne Schicht an Lösemittelmolekülen und Ionen. Zu den elektrokinetischen Effekten tragen aber nur die Potentiale der Scherfläche bei. Dieses ist die Grenzfläche zwischen der unbewegten Lösemittelgrenzschicht und der Lösung, die sich relativ zur Grenzfläche bewegt. An dieser Grenzfläche liegt ein Potential vor, das sogenannte ζ -Potential.

Das ζ -Potential ist im Allgemeinen nicht identisch mit dem Grenzflächenpotential. Die genauen Zusammenhänge zwischen dem ζ -Potential und dem Grenzflächenpotential sind noch nicht bekannt und variieren von System zu System.

Das ζ -Potential errechnet sich nach der *Smoluchowski*-Gleichung:

$$\zeta = \frac{u\eta}{\epsilon\epsilon_0 E} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Hierbei ist u die Mobilität, η die Viskosität, ϵ die Dielektrizitätskonstante und E das elektrische Feld. Gemessen wird die Mobilität im elektrischen Feld. Für die Polyelektrolytschichten ist diese Formel aber nur eingeschränkt richtig, da die *Smoluchowski*-Gleichung nur für glatte, planare Oberflächen genau ist. Die Oberfläche der mit Polyelektrolyt beschichteten Partikel ist aber nicht glatt, da die Polyelektrolyte nicht plan an der Oberfläche adsorbieren, sondern sogenannte Loops bilden können und auch die Enden der Moleküle schwimmen zum Teil frei in der Lösung. Bei Partikel mit einem Radius von (weit) mehr als 100 nm kann man in erster Näherung von einer planaren Oberfläche ausgehen, bei kleineren Partikeln, bei denen der Radius in der gleichen Größenordnung wie die elektrische Doppelschichtdicke liegt, ist diese Vereinfachung nicht mehr korrekt. Die genaue Berechnung

des ζ -Potentials für die mit Polyelektrolyt beschichteten Latex Partikel verschiedener Größe ist kompliziert und wurde nicht angewandt. Das ζ -Potential hängt außerdem stark von der Elektrolyt-Konzentration und dem pH-Wert in der Lösung ab. Um das ζ -Potential von Partikeln berechnen zu können, wird ihre elektrophoretische Mobilität in der stationären Ebene in einer Kapillarelektrophorese gemessen. Die Teilchen werden über Photonenkorrelationspektroskopie detektiert.

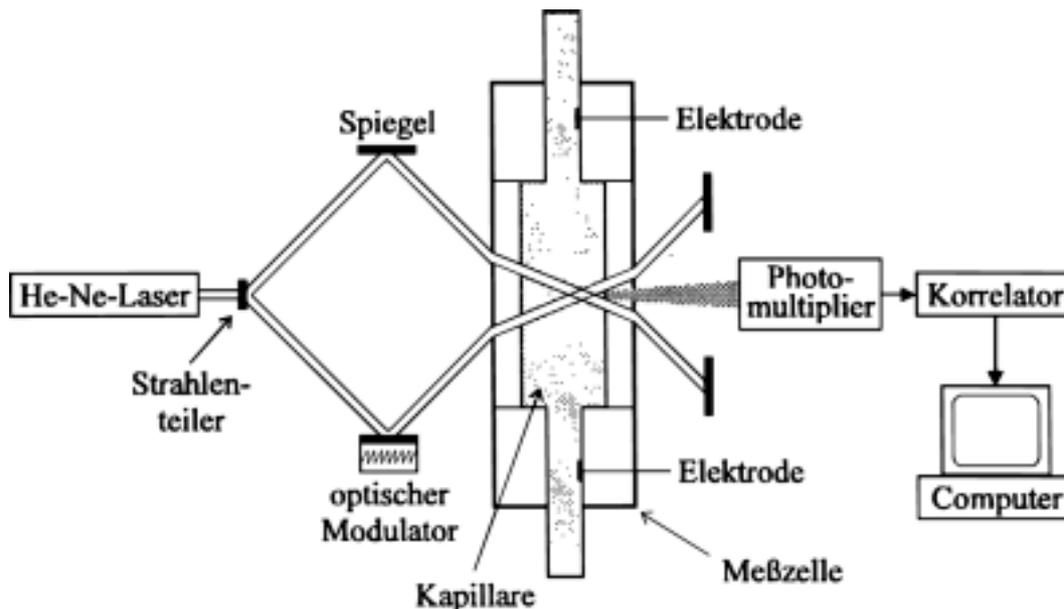


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau des Zeta-Sizers.

3.1.1 Photonenkorrelationspektroskopie

Die Photonenkorrelationspektroskopie ist eine Methode der dynamischen Lichtstreuung. Dabei ist die Dauer der Registrierung des von einer Lösung gestreuten Lichts lang im Vergleich zu den Bewegungen der Teilchen. Es wird ein Laserstrahl auf die Probe gerichtet, welche untersucht werden soll. Ein Teil des eingestrahlt Licht wird von den in der Lösung enthaltenen Partikeln oder Makromolekülen gestreut. Die Zahl der gestreuten Photonen in einem bestimmten Zeitintervall wird in einem Streuwinkel 2Θ von einem Photomultiplier detektiert. Die Zahl der Photonen ändert sich auf Grund der Bewegung der Teilchen mit der Zeit, der sogenannten *Brownschen Molekularbewegung*.

Information über Bewegungsmoden wie die Translation bekommt man aus der Intensitätskorrelationsfunktion $C(t)$ des Streulichts. Zu ihrer Berechnung wird die Photonenintensität des Streulichts zu einer bestimmten Zeit mit der einer späteren Zeit, der

Delayzeit t_0 multipliziert. Dieses wird für alle Streulichtintensitäten mit denselben Delayzeiten (im μs -Bereich) durchgeführt, die Ergebnisse summiert und durch die Anzahl der Operationen geteilt:

$$C(t) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_s(t_i) I_s(t_i + t_0) \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Die Korrelationsfunktion kann oft durch einen oder mehrere Exponentialterme beschrieben werden. Bei kleinen Winkeln bzw. kleinen Werten des Streuvektors Q ($Q = (4\pi n_L / \lambda) \sin\theta$) und in verdünnter Lösung trägt meist nur die Translationsbewegung zur Zeitkorrelationsfunktion bei und $C(t)$ besteht aus einem Exponentialterm:

$$C(t) = A_1 + A_2 e^{-2DQ^2 t} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

wobei D der Translationsdiffusionskoeffizient und A_1 und A_2 Konstanten sind. Um den Diffusionskoeffizienten mit dem hydrodynamischen Radius zu verknüpfen, benutzt man für sphärische Teilchen die *Stokes-Einstein-Beziehung*:

$$D = \frac{k_B T}{\eta} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

Bei bekannter Viskosität η der Lösung kann der hydrodynamische Radius berechnet werden:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

Diese Beziehung gilt für sphärische Teilchen, die im Fall der gemessenen Latices auch vorliegen.

Man kann also aus der Korrelationsfunktion $C(t)$ die Bewegung der Teilchen errechnen und damit bei bekannter Feldstärke, Viskosität und Dielektrizitätskonstante daraus das ζ -Potential. Man kann aber über Gleichung 3.5 auch Informationen über die Größe der Partikel bekommen.

3.2 Mikroskopie

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops, d. h. der Abstand zweier Punkte d , die noch getrennt abgebildet werden können, ist nach *Abbe* abhängig von dem Öffnungswinkel α des

Objektivs, dem Brechungsindex n des Mediums zwischen Objektiv und Probe und von der Wellenlänge λ des benutzten Lichtes:

$$d = \frac{0,61\lambda}{n \sin(\alpha/2)} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

Daraus folgt, daß die Entfernung zweier Objektpunkte, die gerade noch auflösbar sind, im besten Fall etwa

$$d \approx \lambda/2 \quad \text{Gleichung 3.7}$$

beträgt. Für blaues Licht der Wellenlänge von 400 nm wären das 200 nm.

3.2.1 Elektronenmikroskopie

Wenn diese Vergrößerung nicht ausreichend ist, müssen an Stelle von Photonen Elektronen verwendet werden. Materieteilchen wie Elektronen können wie Wellen beschrieben werden. Die Wellenlänge hängt dabei von der Geschwindigkeit ab:

$$\lambda = \frac{h}{m_e v} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

Hierbei ist h das Plancksche Wirkungsquantum, m_e die Masse des Elektrons und v die Geschwindigkeit.

Man kann die Geschwindigkeiten der Elektronen so einstellen, daß Wellenlängen bis 0,001 nm möglich sind. Mit einer Apertur von 10^{-3} bekommt man ein Auflösungsvermögen, das im Vergleich zu einem Lichtmikroskop um einen Faktor 1000 besser ist. Um ein gutes Auflösungsvermögen zu gewährleisten, müssen, damit die Elektronen nicht gestreut werden, Zusammenstöße von Elektronen und Gasmolekülen vermieden werden. Deshalb sind die optischen Wege eines Elektronenmikroskops meistens evakuiert.

Bei der Elektronenmikroskopie unterscheidet man zwei grundlegend verschiedene Bau- und Funktionsweisen, das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) und das Rasterelektronenmikroskop (REM).

Ein TEM ist im Aufbau einem Lichtmikroskop sehr ähnlich. Statt einer Lichtquelle wird eine Glühkathode als Elektronenstrahler verwendet, Kondensator, Objektiv und Okular werden durch elektromagnetische Linsen ersetzt. Diese sind meist magnetische Felder stromdurchflossener Spulen.

Durch die Glühkathode wird eine Hochspannung geleitet, wodurch Elektronen emittiert werden. Diese werden durch eine durchbohrte Anode beschleunigt und gebündelt. Der Elektronenstrahl wird über mehrere Linsen durch das zu betrachtende Objekt auf einen Leuchtschirm oder einen anderen Analysator gelenkt. Die Abbildung der Probe entsteht durch die Streuung des Elektronenstrahls an den Stellen der Probe mit hoher Elektronendichte. An dieser Stelle gelangen die Elektronen des Strahls nicht durch die Materie und der Leuchtschirm erscheint dunkel. Je weniger Materie sich im Elektronenstrahl befindet, um so heller ist das Bild.

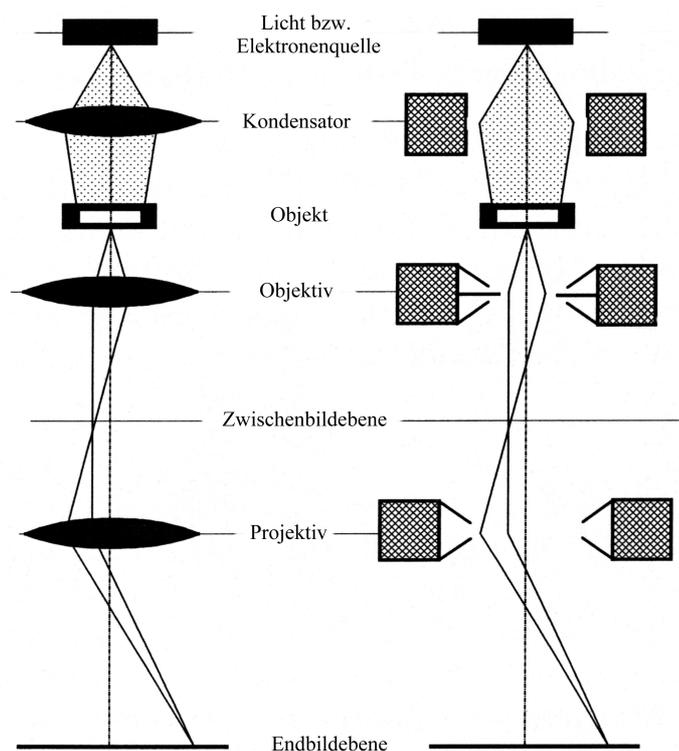


Abbildung 3.2 Schematischer Vergleich eines Lichtmikroskops (links) und eines Transmissionselektronenmikroskops (rechts).

Bei einem TEM werden die Elektronen, welche die Probe durchdringen, direkt gemessen, im REM werden die gestreuten Sekundärelektronen detektiert. Deswegen ist es bei Proben mit einer geringen Dichte nötig, diese vor der Messung im REM mit Metallen zu bedampfen.

3.2.2 Konfokale Mikroskopie

Mit Hilfe eines konfokalen Laserscanningmikroskops ist es, anders als bei einem normalen Lichtmikroskop, möglich, dreidimensionale Darstellungen der Präparate zu erhalten. Auch ist die Auflösung deutlich verbessert, weil bei dieser Methode das Streulicht unterdrückt wird.

Bei einem konfokalen Laserscanningmikroskop wird das Präparat mit einer punktförmigen Lichtquelle, einem Laser der in die Öffnung einer Lochblende fokussiert ist, bestrahlt. Anschließend fällt das Licht über einen Strahlteiler auf einen beweglichen Spiegel, von wo es auf die Mikroskopoptik umgelenkt wird. Dort wird der Lichtstrahl auf das Präparat fokussiert. Das von dem Präparat ausgehende Licht wird wiederum durch die Mikroskopoptik auf einen Spiegel gelenkt, von wo es auf einen Strahlteiler und dann eine weitere Lochblende trifft.

Das Laserlicht wird in Pulsen auf die Probe gestrahlt und regt zur Fluoreszenz fähige Moleküle an. In der Zeit zwischen den Pulsen wird dann diese Fluoreszenz detektiert.

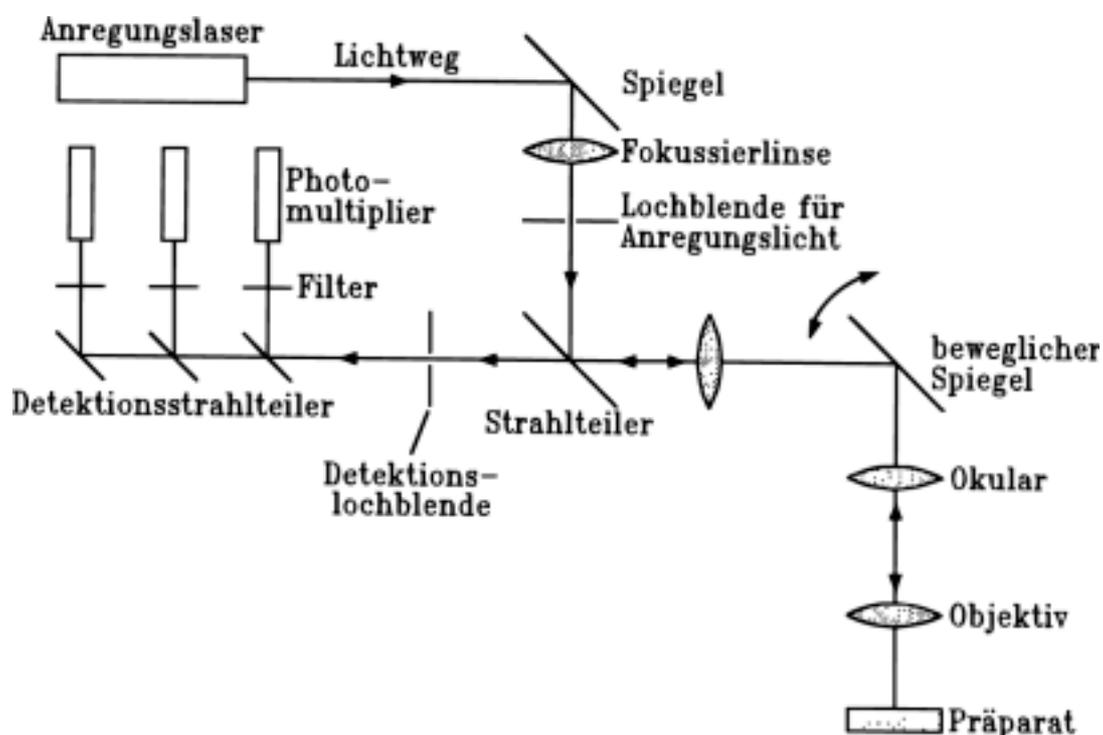


Abbildung 3.3 Schematischer Aufbau eines konfokalen Mikroskops.

3.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl.: Atomic Force microscopy, AFM) wurde von *Binnig et al.* Mitte der achtziger Jahre entwickelt [Bin, 1986]. Diese Methode, die einen großen Fortschritt

bei der direkten Abbildung atomarer Dimensionen darstellte, ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops. Man kann die Topographie und andere materialspezifische Eigenschaften fester, im Gegensatz zum Rastertunnelmikroskop auch nichtleitender Oberflächen aufnehmen. Es ist mit dieser Methode möglich, Strukturen im Bereich von einigen μm bis zu 0,1 nm abzubilden.

Die prinzipielle Idee eines Rasterkraftmikroskops besteht darin, daß eine pyramidale, sehr feine Spitze mit einem Öffnungswinkel zwischen 5° und 45° und einem Spitzenkrümmungsradius zwischen 1 und 50 nm als Sonde bis auf einen sehr geringen Abstand an die Probe angenähert wird. Die Bewegung wird durch einen piezo-elektrischen Antrieb gesteuert. Durch diese Annäherung treten die Oberfläche der Probe und die Sonde in Wechselwirkung. Mögliche Wechselwirkungen attraktiver und repulsiver Art sind hierbei elektrostatische-, *Coulombsche*-, oder *van der Waals*- Wechselwirkungen. Die Spitze befindet sich auf einer mikroskopischen Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, die typische Federkonstanten zwischen 1 und 100 N/m hat. Die Auslenkung des Cantilevers wird durch einen Laserstrahl, der an der Goldoberfläche des Cantilevers reflektiert und von einer Photodiode detektiert wird, gemessen.

Die Probe wird unter der Spitze bewegt und so abgerastert.

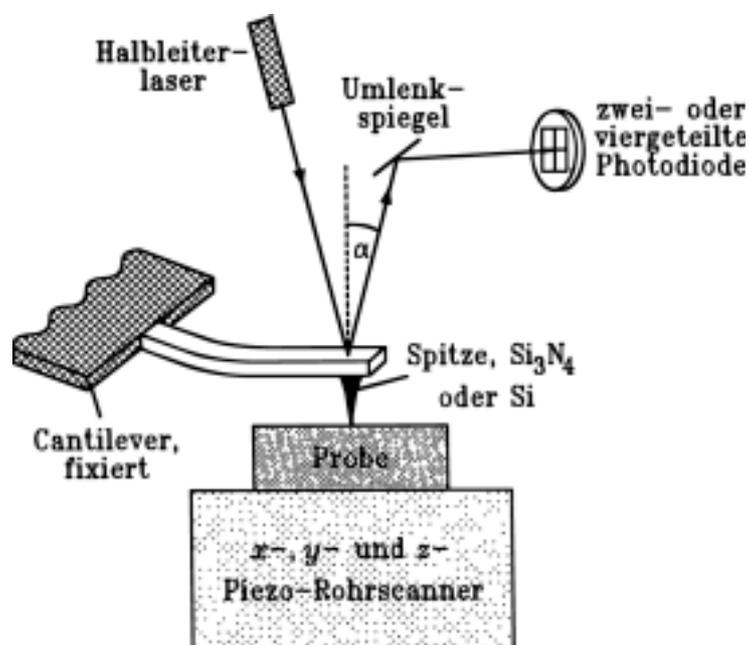


Abbildung 3.4 Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops.

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurden alle im „Tapping“-Modus aufgenommen. Dies ist eine Methode, bei der die Spitze sich in einem Abstand zwischen 2 und 20 nm von

der Oberfläche entfernt befindet. Dort wird die Eigenfrequenz der Spitze durch die Wechselwirkungen mit der Oberfläche gedämpft. Dadurch kann die Oberflächentopographie bestimmt werden. Die laterale Auflösung ist in diesem Modus etwa 1 nm.

Im Gegensatz zu dieser Methode gibt es noch den „Contact“-Modus, bei dem die Spitze direkt über die Oberfläche fährt. Durch die Auslenkung der Spitze wird die Topographie bestimmt. In diesem Fall ist die laterale Auflösung besser, bis zu 0,1 nm. Diese Methode wurde aber nicht angewendet, da sie zu Deformationen weicher Proben und damit zu Artefakten führen kann.

3.4 Energy-Dispersive X-ray Analysis (EDAX)

Mit Hilfe der EDAX-Methode ist es möglich, die in einer Probe enthaltenen Elemente nachzuweisen. Dazu befindet sich die Probe in einem Elektronenmikroskop mit zusätzlichem Röntgendetektor. Wenn die auf die Probe gestrahlten Elektronen genügend Energie besitzen und dann ein bestimmtes Atom treffen, emittiert das betreffende Atom Röntgenstrahlen. Die Energie, die ein Elektron haben muß um eine bestimmte Atomart zu veranlassen Röntgenstrahlen zu emittieren, sowie die Energie der ausgestrahlten Röntgenstrahlen selbst ist dabei abhängig von der Art des Elements. Auf diese Art können die in einer Probe enthaltenen Elemente identifiziert werden.

3.5 Einzelteilchenlichtstreuung (Single Particle Light Scattering, SPLS)

Der Versuchsaufbau der SPLS ist in Abb. 2.4 dargestellt. Dabei wird ein He/Ne-Laser-Strahl durch einen Raumfilter geschickt und dann aufgeweitet. Man erhält einen fast parallelen Strahl, der über ein Linsensystem auf die Probenzelle fokussiert wird. In einer, in bezug auf Lichtintensität, Geometrie und Flankensteilheit geeigneten Zone, wird dann der Dispersionsstrom gemessen, der mit Hilfe einer Dosiervorrichtung durch eine Kapillare mit einer 10 µm großen Öffnung gedrückt wird. Der Teilchenstrom wird nach Austritt aus der Kapillare durch eine hydrodynamische Fokussierung so verjüngt, daß sich bei geeigneter Partikelkonzentration ($3 \cdot 10^8 \text{ cm}^{-3}$) im Normalfall nur ein Teilchen im Streuvolumen aufhält.

Der Primärstrahl wird anschließend abgeblockt. Die Streulichtimpulse der Teilchen im Laserfokus werden in einem Winkelbereich von 5 bis 10° detektiert. Durch einen Photomultiplier werden die Impulse in elektrische Signale umgewandelt und verstärkt. Die Auswertung erfolgt am PC mit Hilfe eines Auswerteprogramms (multi-channel-analyser, Maestro II, EG&G ORTEC) [Bus, 1980; Lic, 1995; Lic, 1998].

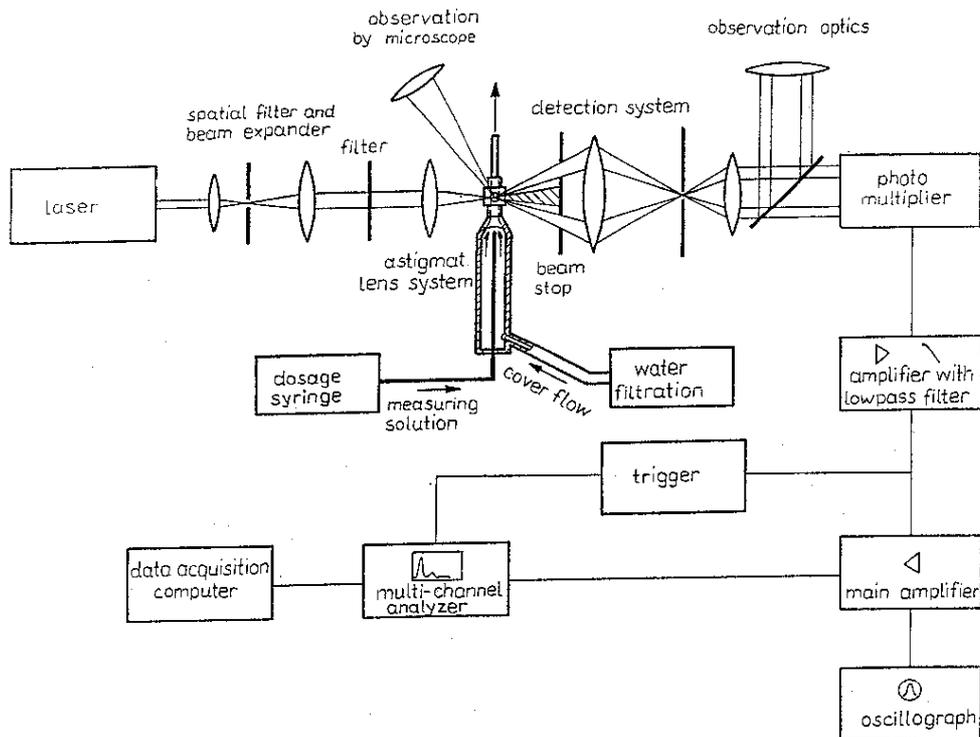


Abbildung 3.5 Schematischer Aufbau der Einzelteilchenlichtstreuung.

3.6 UV/VIS Spektroskopie/Absorptionsspektroskopie

Bei der Absorptionsspektroskopie wird sichtbares und ultraviolettes Licht (180 – 900 nm) in eine Probe eingestrahlt. Daraus wird von der Probe Licht der Energie absorbiert, das Elektronen von dem Grundzustand in einen angeregten Zustand überführt. Deswegen ist die austretende Intensität geringer als die einfallende. Dies ist beschrieben durch das LAMBERT-BEERSche Gesetz:

$$I = I_0 e^{-\epsilon c d} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

I ist die detektierte Intensität, I_0 die eingestrahlte Intensität, ε der molare Extinktionskoeffizient der Probe, c die Konzentration der Probe und d die Weglänge des Lichtes durch die Probe.

3.7 Quarzmikrowaage

Eine Quarzmikrowaage besteht aus einem piezoelektrischen Plättchen, meistens aus Quarz („Schwingquarze“), mit kreisförmigen Goldelektroden auf beiden Seiten [Abbildung 3.6]. Die Schwingungen verlaufen mit einer Ausbreitungsrichtung senkrecht zur Oberfläche durch das Material, die Auslenkung ist parallel zur Oberfläche. Für die Resonanzfrequenz der Schwingungen gilt:

$$f = \frac{n}{2d} v = \frac{n}{2d} \sqrt{\frac{c}{\rho}} = n \frac{N}{c} \quad \text{Gleichung 2.10}$$

mit d als Dicke des Quarzes, ρ seiner Dichte, n als der n -ten Oberschwingung, c als Elastizitätskoeffizient in der Ausbreitungsrichtung der akustischen Welle und v als Ausbreitungsgeschwindigkeit.

Es wird ausgenutzt, daß sich die Resonanzfrequenz eines Schwingquarzes verschiebt, sobald sich die Massenbelegung seiner Oberfläche ändert. Bei kleinen Massenänderungen (Δm) kann mit der Sauerbrey-Gleichung [Sau, 1959] die zugehörige Frequenzänderung beschrieben werden:

$$\Delta f_{\text{Analyt}} = f_{\text{beladen}} - f_0 = -C_f \frac{f_0^2}{A} \Delta m \quad \text{Gleichung 2.11}$$

mit A als Elektrodenfläche des Quarzes, C_f als Massensensitivitätskonstante und f_0 als Grundschwingungsfrequenz. Da die Grundfrequenz quadratisch eingeht, kann die Sensitivität durch höhere Grundfrequenzen gesteigert werden. Die Grundfrequenz wird durch die Dicke des Quarzes und die Wellenausbreitung im Material bestimmt, da für die Wellenlänge λ der stehenden Welle gilt:

$$\lambda = \frac{c}{f_0} = \frac{2d}{n}$$

Gleichung 2.12

aber gleichzeitig die mechanische Stabilität abnimmt, werden als Kompromiß Quarze mit Grundfrequenzen zwischen 5 und 50 MHz verwendet [Ald, 1983].

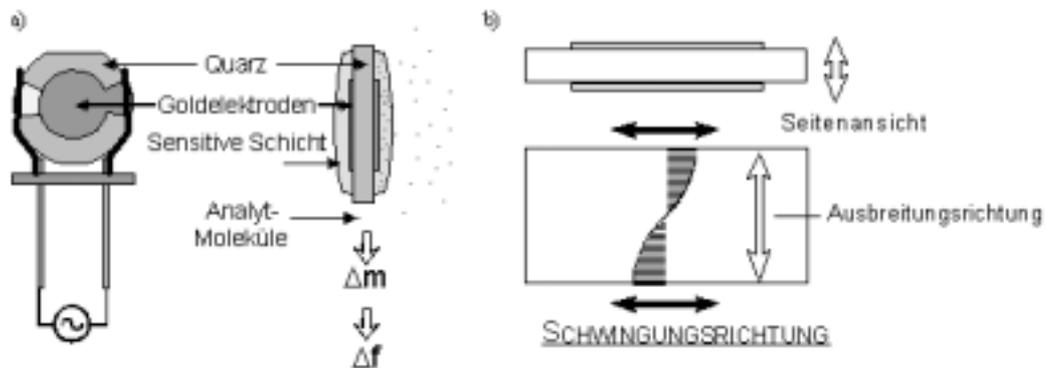


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung einer Quarzmikrowaage: a) Aufbau eines Schwingquarzes, b) Schnitt durch einen Schwingquarz mit schematischer Darstellung der Schwingungsrichtung

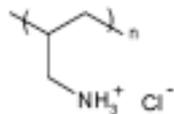
4 Herstellung der Schichten und Hohlkugeln

4.1 Allgemein

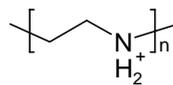
Für die Beschichtung von Partikeln mit Polyelektrolyten wurden normalerweise etwa 10^{10} Partikel genommen, in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt und mit einem Milliliter der Polyelektrolyt-Lösung versetzt. Der Polyelektrolyt hatte die dem Partikel entgegengesetzte Ladung. Die Konzentration der Polyelektrolyt-Lösung variierte je nach verwendetem Polyelektrolyt zwischen 1 und 4 mg/mL. Der Salzgehalt der Polyelektrolyt-Lösung variierte zwischen 0 und 0,5 M NaCl. Die Beschichtungsdauer betrug zwischen 15 Minuten und 1 Stunde, wobei die Ansätze etwa alle zehn Minuten einmal kurz geschüttelt wurden. Die Beschichtung erfolgte entweder bei Raumtemperatur oder, im Falle der Protein-Beschichtungen, bei 4°C. Nach der Inkubationszeit wurden die beschichteten Partikel zentrifugiert, wobei die Dauer und Geschwindigkeit wiederum von der verwendeten Partikelart abhingen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Partikelpellet wurde zwei bis drei Mal mit bidestilliertem Wasser gewaschen, wobei bei jedem Waschschrift das Pellet in Wasser resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert wurde. Danach erfolgte der Aufbau der nächsten Schicht analog mit einem entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten.

Verwendete Polyelektrolyte:

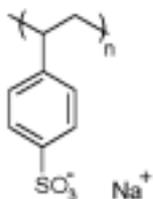
-Polyallylamin-hydrochlorid (PAH):



Polyethylenimin (PEI):



-Polystyrolsulfonsäure (PSS) (Natriumsalz):



Als Partikel wurden sulfatgruppenstabilisierte Polystyrol-Latices (PS Latices) mit 640 bzw. 470 nm Durchmesser, CTAB-stabilisierte Polystyrol-Latices mit 70 nm Durchmesser und Melaminformaldehyd-Latices mit 1,7 μm Durchmesser verwendet.

4.1.1 Beschichtung mit eisenhaltigem Metallo-supramolekularem Polymer

Für die Beschichtung mit eisenhaltigem metallo-supramolekularem Polymer wurden sowohl PS-Latices von 70 bis 640 nm Durchmesser, als auch schwach vernetzte und daher auflösbare Melaminformaldehyd-Latices von etwa 2 μm Durchmesser verwendet. Auf die negativ geladenen PS-Latices wurde erst eine Schicht von positiv geladenem PAH aufgebracht, dann eine Schicht negativ geladenes PSS, worauf dann die Beschichtung mit dem positiv geladenen eisenhaltigen Metallo-supramolekularen Polymer folgte. Anschließend wurden abwechselnd Schichten aus PSS und dem eisenhaltigen Polymer aufgebaut. Alle Polyelektrolyt-Lösungen hatten eine Konzentration von 1mg/mL. Es wurde komplett salzfrei gearbeitet, da die Zugabe von Salz zum Ausfallen des Metallo-supramolekularen Polymers geführt hätte. Die Beschichtung der positiv geladenen schwach vernetzten Melaminformaldehyd-Latices erfolgte analog. Hier wurde aber bei der Beschichtung mit PSS begonnen. Alle Arbeiten wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Beschichtungsdauer betrug je Schicht etwa 20 Minuten.

4.1.2 Herstellung von hohlen Kapseln aus Metallo-supramolekularem Polymer- und PSS- haltigen Filmen

Es wurden hohle Kapseln aus eisenhaltigem Metallo-supramolekularem Polymer- und PSS-haltigen Filmen hergestellt, indem die mit diesen beiden Substanzen beschichteten Melaminformaldehyd-Latices für 30 min mit Salzsäure pH 1 behandelt wurden. Dadurch lösten sich die Melaminformaldehyd-Partikel auf und die daraus entstandenen Mono- bzw. Oligomere konnten durch mehrmaliges Waschen mit Wasser von den Hohlkugeln abgetrennt werden.

4.1.3 Beschichtung von Teilchen mit einem Durchmesser kleiner 100 nm

Die Beschichtung von kleinen Partikeln erfolgt analog der unter 4.1 bzw. 4.1.1 beschriebenen Prozedur. Bei der Verwendung solcher kleiner Partikel ist darauf zu achten, daß die Länge des verwendeten Polyelektrolyten nicht den Durchmesser des Partikels übersteigt, da es sonst zu einer Verbrückung zwischen den Partikeln kommen kann. Das für diese Partikel verwendete PSS hatte ein mittleres Molekulargewicht von $1\,100\text{ g mol}^{-1}$, das PAH von $15\,000\text{ g mol}^{-1}$. Das verwendete Fe-PE war in allen Fällen dasselbe und hatte ein Molekulargewicht von etwa $14\,900\text{ g mol}^{-1}$.

4.1.4 Beschichtung mit Glucose Oxidase (GOD)

Die Beschichtung mit GOD erfolgte auf 640 nm oder 470 nm PS-Latices, welche Sulfatgruppen-stabilisiert sind.

Als erstes wurde eine Schicht PEI oder PAH aufgebracht. Die Konzentration der PEI-Lösung betrug 3 mg/mL , der Lösung wurde kein zusätzlicher Elektrolyt zugesetzt. Die Konzentration der PAH-Lösung betrug 1 mg/mL und es wurde zusätzlich $0,5\text{ M NaCl}$ zugesetzt. Die Beschichtungszeit für PEI oder PAH betrug etwa 20 min.

Anschließend wurde eine Schicht GOD aufgebracht. Wenn PEI die erste Schicht bildet, betrug die Konzentration der GOD-Lösung 2 mg/L in einem 10 mM oder 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-Puffer bei pH 8,0-8,2. Bei diesem pH-Wert ist die GOD negativ geladen und wurde alternierend mit PEI eingesetzt.

Alternierend mit PAH wurde GOD in Konzentrationen von $2,0\text{-}2,5\text{ mg/mL}$ in einem 50 mM Puffer eingesetzt. Es wurden hierbei Tris- und Morpholinoethan-sulfonsäure (MES)-Puffer verschiedener pH-Werte (von 6,0-8,2) verwendet.

Die Beschichtungszeit betrug bei GOD etwa 1 h, diese und alle folgenden Schichten wurden bei 4°C aufgebracht. Anschließend wurde wieder eine Schicht PEI bzw. PAH, dann wieder GOD usw. aufgebracht.

4.1.5 Beschichtung mit GOD nach dem „Premix“-Verfahren

Bei diesem Verfahren wurden in einem 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) oder einem 50 mM MES-Puffer (pH 6,0) 2 mg/mL GOD mit 4 mg/mL PEI oder PAH gemischt. Dadurch entstanden GOD/PEI- bzw. GOD/PAH- Aggregate, die auf Grund des größeren Anteils an kationischen Polyelektrolyten positiv geladen waren. Diese Aggregate wurden analog der oben beschriebenen Prozedur alternierend mit PSS (1 mg/mL, 0,5 M NaCl) auf 640 nm PS-Latices aufgebracht.

4.1.6 Beschichtung mit Peroxidase (POD)

Diese Beschichtungen erfolgten ebenfalls auf 640 nm oder 470 nm PS-Latices. Als erstes wurde eine Schicht positiv geladenes PAH (1 mg/mL, 0,5 M NaCl), dann eine Schicht negativ geladenes PSS (1 mg/mL, 0,5 M NaCl) aufgebracht. Darauf folgte dann eine Schicht POD, welche aus einer 2 mg/mL Lösung aufgebracht wurde. Die POD-Lösung enthielt entweder 10 mM Natriumacetat oder 10-50 mM HEPES und die pH-Werte der Lösungen betragen 5,2-6,8. Unter diesen Bedingungen ist die POD positiv geladen und adsorbiert auf einer PSS-Schicht. Die Beschichtungszeit betrug etwa 1 h bei 4°C. Auch alle weiteren Beschichtungen wurden bei dieser Temperatur durchgeführt. Anschließend wurde wieder eine Schicht PSS, dann wieder eine Schicht POD usw. aufgebracht.

Eine weitere Möglichkeit, POD-Schichten aufzubauen, ist, als erstes eine Schicht PEI auf den PS-Latex aufzubringen und anschließend eine Schicht POD, wobei die POD aus einer 2 mg/mL-Lösung in 10 mM Tris, pH 10,0 aufgebracht wird. Unter diesen Bedingungen ist POD negativ geladen.

4.1.7 Beschichtung mit POD nach dem „Premix“-Verfahren

Es wurden 2 mg/mL POD in einem 50 mM HEPES-Puffer (pH 5,2) mit 4 mg/mL PSS gemischt. Es bildeten sich negativ geladene Aggregate, da das PSS im Überschuß vorlag. Diese Aggregate wurden alternierend mit PAH nach der oben beschriebenen Methode auf die oben beschriebenen PS-Latex Partikel aufgebracht.

4.1.8 Sequentielle Beschichtung mit POD/GOD

Die beiden verwendeten Enzyme POD und GOD können auch auf dem gleichen Partikel immobilisiert werden. Es wurden auch hierfür 640 nm und 470 nm PS-Latices verwendet. Dazu wurden zuerst ein bis zwei Schichten POD nach der oben beschriebenen Methode aufgebracht. Die nächste Schicht war PSS. Anschließend wurden ein bis zwei Schichten PEI/GOD aufgebracht.

4.1.9 Enzymatische Aktivitätstests für GOD und POD

Um die Aktivität von GOD zu messen, wurden 2,4 mL einer 0,21 mM o-Dianisidin-Lösung (in 50 mM Natriumacetat-Puffer mit pH 5,1 gelöst), 0,5 mL einer 10 %igen (w/v) β -D-Glucose-Lösung und 0,1 mL einer POD-Lösung (mit etwa 60 units mL⁻¹) in einer Küvette gemischt. Es wurde gewartet, bis die Absorption bei 500 nm konstant war. Dann wurden die mit GOD beschichteten Partikel oder die GOD-Lösung dazugegeben. Sofort danach wurde der Anstieg der Absorption bei 500 nm in einem UV/VIS-Spektrometer verfolgt. Innerhalb jedes Experiments wurde die gleiche Anzahl von Partikeln verwendet (etwa 10⁷-10⁸ Partikel in 0,1 mL Lösung). Die Zahl der Partikel wurde mit Hilfe der SPLS bestimmt und jede Meßreihe wurde auf die Partikelzahl normiert.

Die Aktivität von POD wurde gemessen, indem ebenfalls 2,4 mL einer 0,21 mM o-Dianisidin-Lösung (in 50 mM Natriumacetat-Puffer mit pH 5,1 gelöst), 0,5 mL einer 10 %igen (w/v) β -D-Glucose-Lösung und zusätzlich 0,1 mL einer 30 %igen H₂O₂-Lösung in einer Küvette gemischt wurden. Nach Zugabe von POD, auf Partikeln oder in Lösung, wurde wiederum der Anstieg der Absorption bei 500 nm verfolgt.



Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des enzymatischen Aktivitätstest

4.1.10 Beschichtung durch spezifische Erkennung

Die Beschichtung erfolgte auf 470 nm sulfatgruppen-stabilisiertem PS-Latex. Als erstes wurden je eine Schicht PAH und eine Schicht PSS (1 mg/mL, 0,5 M NaCl) aufgebracht. Anschließend wurde eine Schicht des Proteins Avidin (aus Eiweiss, pI = 7,2) aufgebracht. Dabei war 1 mg/mL Avidin in 50 mM NaAc (pH 5,1) gelöst; das Protein ist unter diesen Bedingungen positiv geladen. Danach wurde mit Biotin gekoppelte GOD (über eine Amidocaproyl-Bindung verbunden)-Lösung zu den Partikeln gegeben. Die Konzentration der Lösung betrug 1 mg/mL. Diese Beschichtungen wurden in 50 mM NaAc-Puffer (pH 5,1) (GOD ist hier nur sehr schwach negativ geladen) und in 50 mM Tris-Puffer (pH 8,1) (GOD ist stark negativ geladen) durchgeführt.

4.1.11 Beschichtung mit DNA/Spermidin

Die Beschichtung von DNA, welche durch das phosphatgruppenhaltige Rückrad in Wasser negativ geladen ist, erfolgte alternierend mit Spermidin (N-(3-Aminopropyl)-1,4-diaminobutan), welches in Wasser positiv geladen ist. Es ist bekannt, daß Spermidin mit DNA Komplexe ausbildet. Von beiden Substanzen wurde jeweils eine 1,5 mg/mL Lösung in 0,5 M NaCl hergestellt. Es wurden sowohl 640 oder 470 nm PS-Partikel, die negativ geladen sind, als auch positiv geladene Melaminformaldehyd-Partikel (1,8-5,7 μm) beschichtet. Auf die negativen Partikel wurde zuerst nach oben beschriebener Methode eine Schicht Spermidin aufgebracht. Anschließend wurde eine Schicht DNA aufgebracht. Bei den positiv geladenen Melaminformaldehyd-Partikeln war die Reihenfolge genau umgekehrt. Dieses wurde bis zur gewünschten Schichtzahl wiederholt. Die Beschichtungsdauer betrug pro Schicht 60 min und alle Arbeiten wurden bei 4°C durchgeführt.

4.1.12 Herstellung von hohlen Kapseln aus DNA- und Spermidinhaltigen Filmen

Zur Darstellung hohler Kapseln aus DNA/Spermidin-Filmen wurden die oben beschriebenen, beschichteten Melaminformaldehyd-Partikel 30 min mit HCl bei einem pH-Wert von 1 behandelt. Dadurch wurde der Melaminformaldehyd-Kern aufgelöst. Das verbliebene Mono-

bzw. Oligomer wurde anschließend mit Wasser herausgewaschen. Die Waschprozedur wurde dreimal wiederholt.

4.1.13 Zersetzung von DNA/ Spermidin-haltigen Filmen

Die DNA/Spermidin-Filme auf den Partikeloberflächen wurden durch Behandlung mit 1, 2 und 5 M NaCl-Lösung zersetzt. Dazu wurde zu 0,1 mL der Partikellösung 1 mL der entsprechenden Salzlösung gegeben. Die Mischung wurde für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Partikel drei Mal mit Wasser gewaschen.

4.1.14 Beschichtung mit p-Lysin/Alginaten

Die Beschichtung von negativ geladenen PS-Latices oder positiv geladenen Melaminformaldehyd-Partikeln mit positiv geladenem p-Lysin und negativ geladenen Alginaten im Wechsel erfolgte in PBS-Puffer (pH 7,2). Die Beschichtung erfolgte analog der für DNA/Spermidin beschriebenen.

4.1.15 Darstellung von CaCO₃-Teilchen nach der Methode von KITANO

Es werden 5 g CaCO₃ in 2 l Wasser gegeben. Durch diese Mischung wird für 1 h CO₂ geleitet. Anschließend wird das noch nicht gelöste CaCO₃ abfiltriert. Durch die filtrierte Lösung wird für weitere 0,5 h CO₂ geleitet. Diese mit CaCO₃ übersättigte Lösung wird jetzt zur Darstellung der Teilchen benutzt.

Um Block-Copolymer stabilisierte Teilchen zu erhalten, wird 0,5 g des gewünschten Polymers in einem Liter der oben beschriebenen Lösung gelöst und diese offen für mindestens 12 h stehen gelassen. Durch Verdampfung von CO₂ sinkt die Löslichkeit von CaCO₃ und es werden Partikel gebildet, welche das Polymer enthalten. Als Polymer wurde in dieser Arbeit ein Blockcopolymer der Struktur PEG-[PEI-(C₁₁H₂₃)(CH₂COOH)] benutzt.

Beim Stehenlassen der Lösung ohne Zugabe von Polymer, fallen ebenfalls Partikel aus. Die Form und die Größe der Partikel ist bei den verschiedenen Herstellungsarten unterschiedlich, der genaue Mechanismus ist aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

4.1.16 Beschichtung von (Block-Copolymer stabilisierten) CaCO₃-Teilchen

Die Block-Copolymer stabilisierten CaCO₃-Teilchen sind wegen der Carboxylgruppen am Block-Copolymer schwach negativ geladen. Sie haben ein ζ -Potential von etwa -10 mV. Daher wurde zuerst eine Schicht PAH aufgebracht. Die Beschichtung erfolgte bei einer Polyelektrolytkonzentration von 1 mg/mL bei einem Salzgehalt von $0,5$ M NaCl. Die Beschichtungszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Die Teilchen wurden 5 min bei etwa 5000 g abzentrifugiert und drei Mal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde analog eine Schicht PSS aufgebracht. Diese Zyklen wurden bis zur gewünschten Schichtdicke wiederholt. Die reinen CaCO₃ Partikel ohne Polymer tragen im alkalischen Bereich negative Ladungen. In reinem Wasser dagegen sind sie annähernd neutral. Die Beschichtung dieser Teilchen erfolgte daher wie unter 3.1.14, nur daß das PAH, welches für die erste Schicht verwendet wurde, in einer Lösung des pH-Wertes $9,5$ gelöst wurde.

Zur Analyse der Partikel im konfokalen Mikroskop, wurde zum Teil mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertes PAH verwendet. Die Beschichtungsprozedur entspricht der für nicht markiertes PAH.

4.1.17 Zersetzung der Block-Copolymer stabilisierten CaCO₃-Teilchen

Die beschichteten Teilchen wurden mit Salzsäure (pH 1 bis $3,5$) oder gesättigter EDTA-Lösung behandelt. Unter diesen Bedingungen löst sich CaCO₃ auf. Die entstandenen Kapseln wurden analog der unter 4.1.2 beschriebenen Prozedur gewaschen.

5 Ergebnisse

5.1 Aufbau von Multischichten mit eisenhaltigem Metallo-supramolekularem Polymer

Es sollte untersucht werden, ob die Technik des Schichtaufbaus durch elektrostatische Selbstorganisation („electrostatic self-assembly“, SA) auf Kolloiden auch mit funktionalisierten Polymeren möglich ist. Hierfür wurde ein Eisen-haltiger Koordinationspolyelektrolyt mit einem Terpyridin-Liganden (Fe-PE) ausgewählt, welcher durch Metall-Ligand-Wechselwirkung aufgebaut wurde. Die Terpyridylgruppe bildet mit Eisen, wie mit vielen anderen Metallionen auch, oktaedrische Komplexe mit D_{2d} -Symmetrie. Daher sollte das Molekül linear und relativ starr sein, mit zweifach positiven Ladungen entlang der Molekülachse. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation wurde ein durchschnittliches Molekulargewicht von etwa $15\,000\text{ g mol}^{-1}$ bestimmt [Sch, 1998]. Dieser sogenannte Koordinationspolyelektrolyt eignet sich für den Schichtaufbau durch die elektrostatische SA- Technik, alternierend mit dem negativ geladenen PSS. Auf planaren Substraten wurde dieses schon demonstriert [Sch, 1998]. Es sollte hier geklärt werden, ob die Unflexibilität des Fe-PE es trotzdem erlaubt, es auf gekrümmten Oberflächen zu immobilisieren.

Die Verwendung dieser Klasse von Polymeren sollte zudem einen Zugang zu einer schaltbaren Stabilität und damit auch zu einer schaltbaren Permeabilität von Kapseln bieten, da sich diese Art der Metall-Ligand-Bindung zum Beispiel durch Zugabe von chelatierenden Agenzien selektiv wieder lösen lässt.

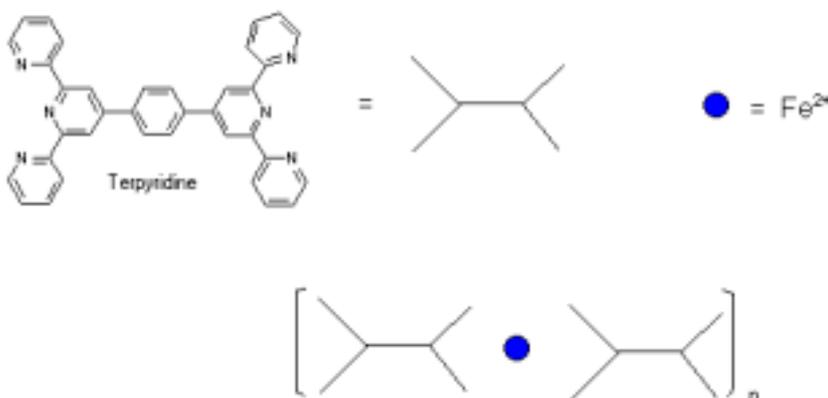


Abbildung 5.1 Eisenhaltiges supramolekulares Polymer (Fe-PE)

5.1.1 Charakterisierung der mit Fe-PE-beschichteten Kolloide

ζ-Potential

Zur Untersuchung des Schichtaufbaus wurde als erstes die elektrophoretische Mobilität der mit Fe-PE und PSS alternierend beschichteten Teilchen in einem Zeta-Sizer gemessen und daraus das ζ -Potential errechnet (Abbildung 5.2). Je nach verwendeter Partikelart und -größe variierte das ζ -Potential zwar im Betrag, aber das Vorzeichen war immer positiv, wenn die äußere Schicht aus dem Fe-PE, und negativ wenn sie aus PSS bestand. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß eine Ladungsüberkompensation stattgefunden hat und somit das Aufbringen der Schichten erfolgreich war [Kur, 1999]. Es ist aber kein endgültiger Beweis, da es unter Umständen auch vorkommen kann, daß sich eine oder mehrere Schichten ablösen und die darunterliegende Ladung „sichtbar“ wird.

Das ζ -Potential beträgt -45 mV wenn die äußere Schicht aus PSS besteht und beträgt $+10$ mV wenn die äußere Schicht aus dem Fe-PE besteht und 640 nm PS Latex Partikel verwendet werden. Bei der Verwendung der größeren, positiv geladenen Melaminformaldehyd-Partikel verschieben sich die Werte für das ζ -Potential auf $+30$ bis $+45$ mV, wenn das Fe-PE die äußere Schicht bildet. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede im ζ -Potential ist, daß die darunterliegende, in diesem Fall positive Ladung des Partikels mit seiner hohen Ladungsdichte durchscheinen kann. Weil die Schichten ohne weitere Zugabe von Elektrolyt aufgebracht wurden, da das Fe-PE bei Zugabe von Salz ausfällt, sind die Schichten sehr dünn und machen eine solche Begründung wahrscheinlich.

Auf Grund der entgegengesetzten Ladung der beiden verwendeten Partikel, sind auch die Kurven gegenläufig.

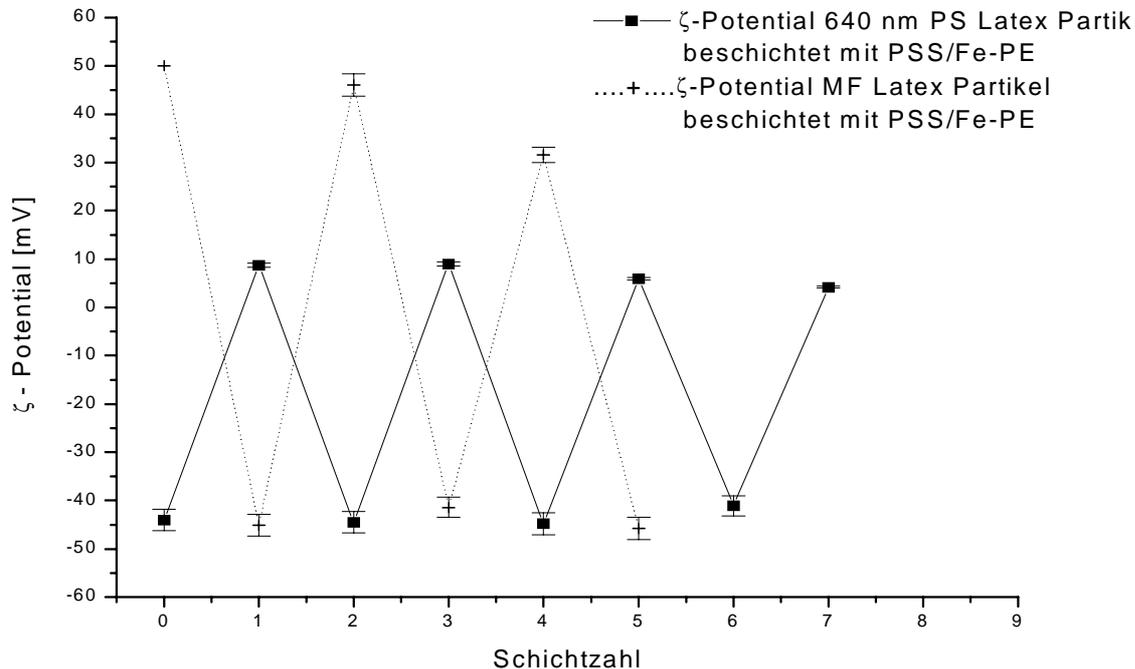


Abbildung 5.2 ζ -Potential der mit Fe-PE und PSS beschichteten PS (durchgezogene Linie)- und MF (gestrichelte Linie)-Latex-Partikel. Die Graphik zeigt einen Wechsel des Vorzeichens nach jeder aufgetragenen Schicht, was auf einen erfolgreichen Schichtaufbau hindeutet.

UV/VIS-Spektroskopie

Eine gute Methode zur Überprüfung des erfolgreichen Schichtaufbaus ist die UV/VIS-Spektroskopie. In Abbildung 5. sind die Spektren des Fe-PE in Lösung und des mit Fe-PE/PSS beschichteten Latex dargestellt. Das Fe-PE zeigt in Lösung ausgeprägte Banden bei 300 nm, 366 nm und 583 nm. Die Bande bei 583 nm kommt von der Ladungsübertragung von dem Metall auf den Liganden und ist eine sogenannte MLCT-Bande (metall-to-ligand-charge-transfer-Bande). Die Absorption bei dieser Wellenlänge sorgt für die tiefblaue Farbe des Polymers. Diese blaue Farbe nehmen auch die Latex-Partikel nach der Beschichtung mit dem Polymer an. Wenn die Partikel anschließend vermessen werden, erkennt man eine MLCT-Bande bei 595 nm. Diese Bande ist in dem Spektrum der unbeschichteten Latex-Partikel nicht zu erkennen. Die Rotverschiebung der MLCT-Bande ist auf Polaritätsänderungen in der veränderten Umgebung zurückzuführen [Car, 1999a].

Es wurden keine quantitativen Auswertungen durchgeführt, da die Partikel das Licht stark streuen und die Anzahl der Partikel sich auch von Schicht zu Schicht ändert, da im Laufe der

Präparation ein gewisser Verlust an Partikeln nicht zu vermeiden ist und so eine Auswertung nur schwer möglich ist.

Trotzdem kann mit der UV/VIS-Spektroskopie eindeutig die Beschichtung der Partikel gezeigt werden.

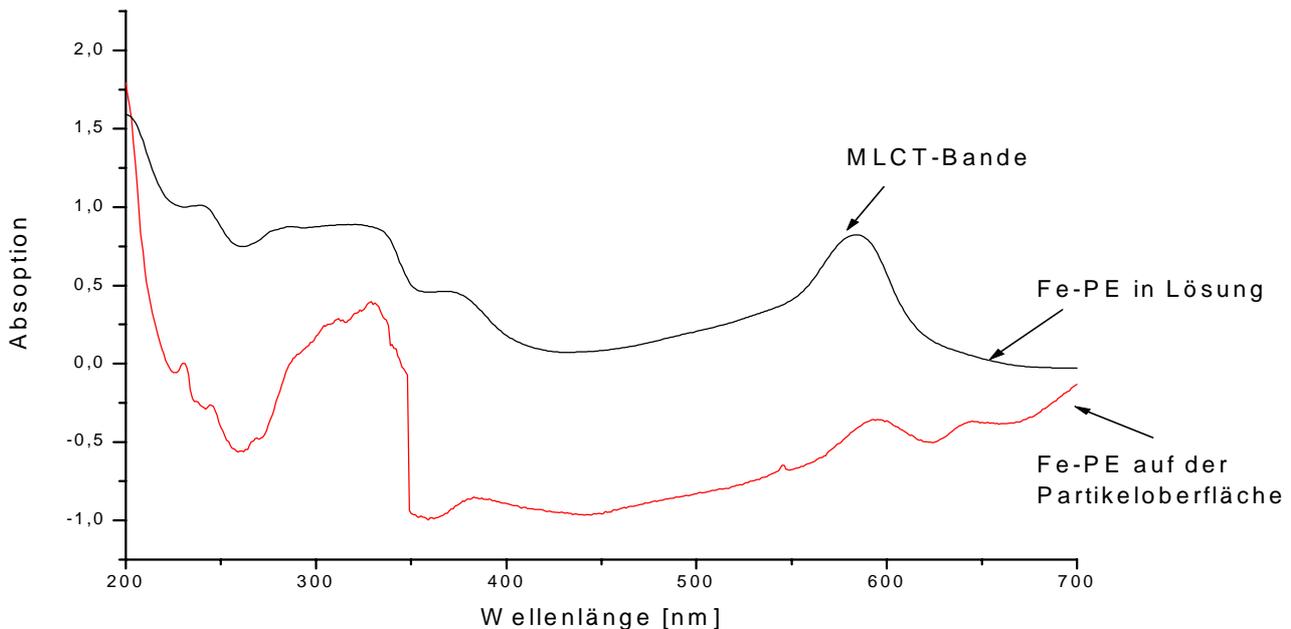


Abbildung 5.3 UV/VIS-Spektren des Fe-PE in Lösung und des mit Fe-PE und PSS beschichteten PS Latex. Die MLCT-Bande (und auch andere Banden, die zum Teil aber mit denen des reinen Latex überlagern) des Polymers ist, mit einer leichten Rotverschiebung, auch auf der Partikeloberfläche zu sehen.

Elektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) kann man sehen, daß sich die Oberflächenmorphologie der Latex-Partikel ändert. Besonders gut ist dies bei den Partikeln < 650 nm zu erkennen, wenn diese mit dem eisenhaltigen, supramolekularen Polymer beschichtet werden. In Abbildung 5.4 sind ein unbeschichtetes Latexteilchen und ein mit Fe-PE und PSS beschichtetes dargestellt. Die Rauigkeit der Oberfläche des beschichteten Latex im getrockneten Zustand erhöht sich, und zwar stärker, als dieses bei Beschichtungen mit anderen Polyelektrolyten zu beobachten ist. Dieses kann zwei Gründe haben: Zum einen, daß das Polymer auf Grund des langen, konjugierten π -Systems und der Symmetrie des Terpyridin-Eisen-Komplexes sehr starr ist und sich somit der gekrümmten Partikeloberfläche schlechter als andere Polyelektrolyte anpassen kann. Bei den ebenfalls verwendeten

Melaminformaldehyd-Partikeln, die eine Größe von mehr als $1,5\ \mu\text{m}$ aufweisen, ist die Oberflächen-Rauhigkeit wesentlich geringer (ohne Abbildung). Zum anderen sind die Abstände der Ladungen beim PSS und beim Fe-PE verschieden, während sie beim PAH fast identisch zum PSS sind. Das kann dazu führen, daß die Bindung und damit die Packung der Polyelektrolyte auf der Oberfläche unregelmäßiger wird.

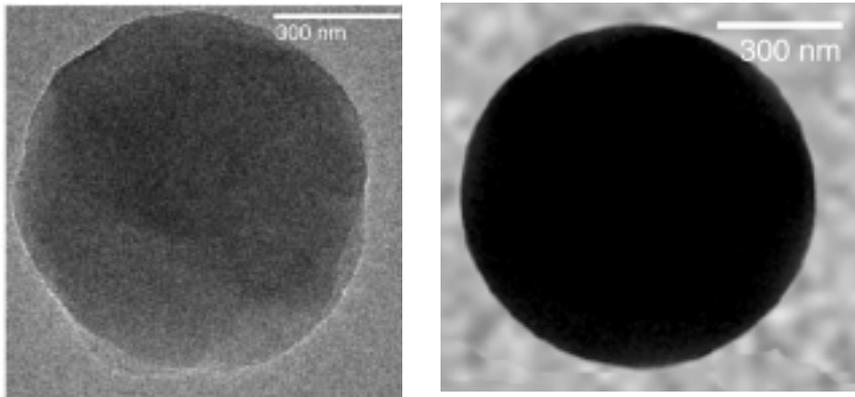


Abbildung 5.4 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des beschichteten Latex (links) und des unbeschichteten Latex (rechts). Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die Oberflächenrauhigkeit bei der Beschichtung im getrockneten Zustand stark erhöht.

EDAX (energy-dispersive X-ray analysis)

Es wurden ebenfalls am Elektronenmikroskop energy-dispersive X-ray analysis-Messungen durchgeführt. Hierbei ist klar eine Bande zu erkennen, welche von dem aus dem Polymer stammenden Eisen herkommt (Daten nicht abgebildet). Es ist aber schwierig, an diesen einzelnen Teilchen eine Quantifizierung zu treffen, da die Menge an Eisen sehr gering ist im Vergleich zu allen anderen vorhandenen Elementarten. Auch diese Messungen bestätigen das erfolgreiche Beschichten der Latex-Partikel mit dem Fe-PE, ohne eine genaue Quantifizierung des Fe-PE-Gehalts pro Partikel zu ermöglichen.

AFM

Auch bei den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen ist im getrockneten Zustand die erhöhte Rauigkeit der Partikeloberflächen zu erkennen (Abbildung 5.5). Außerdem kann man sehen, daß die beschichteten Partikel, im Gegensatz zu den unbeschichteten, keine dichte Packung beim Trocknen der Probe ausbilden.

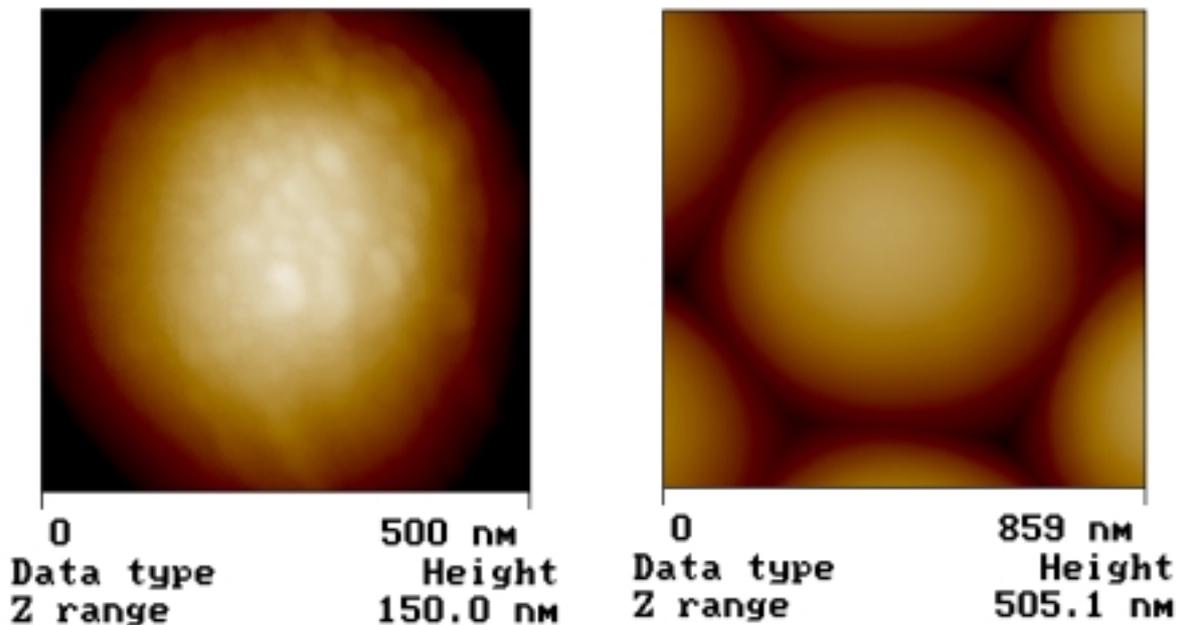


Abbildung 5.5 Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen des beschichteten Latex (links) und des unbeschichteten Latex (rechts). Die Partikeloberfläche des beschichteten Latex ist deutlich rauher als die des reinen Latex.

5.2 Herstellung hohler Kapseln aus Polyelektrolyt/Fe-PE

Die mit dem Fe-PE und PSS beschichteten, nur schwach vernetzten Melaminformaldehyd-Partikel wurden anschließend mit Salzsäure (pH 1) oder einem organischen Lösemittel wie DMSO behandelt. Durch diese Behandlung ist es möglich, den Melaminformaldehyd-Kern der Partikel aufzulösen. Dieser zerfällt hierbei in Oligomere. Die Fe-PE/PSS-Hülle bleibt bei dieser Behandlung unbeschädigt. Dabei werden die Oligomere aus der entstandenen Kapsel herausgewaschen. Auf diese Art ist es möglich, Kapseln im μm -Maßstab herzustellen, welche durch das enthaltene Polymer funktionalisiert sind. Eine mögliche Anwendung dieser

Hohlkugeln wäre die, als Mikroreaktor für spezielle Kristallisationen, wobei die in der Hülle enthaltenen Eisenatome für eine Nukleation eine Rolle spielen könnten.

5.2.1 Charakterisierung der hohlen Kapseln

Elektronenmikroskopie

In der Transmissionselektronenmikroskopie sind die Hohlkugeln bestehend aus Fe-PE und PSS gut zu erkennen (Abbildung 5.6). Der etwas größere Durchmesser der Kapseln im Vergleich zu dem Durchmesser der beschichteten Partikel kommt dadurch zustande, daß die Partikel bei der Probenpräparation getrocknet werden und sich dadurch flach auf der Oberfläche ausbreiten. Die Dicke der Kapselwand hat nur geringen Einfluß hierauf, da die Wand im Vergleich zum Gesamtdurchmesser vernachlässigbar dünn ist. Die zu erkennenden Falten in den Kapseln sind ebenfalls auf die Trocknung der Proben zurückzuführen. Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist auch zu erkennen, daß die große Mehrheit der Kapseln (> 90 %) intakt sind. Die wenigen gebrochenen Kapseln kommen wahrscheinlich durch osmotische Belastung während der Templatauflösung zustande. Die Hohlkugeln aus Fe-PE/PSS unterscheiden sich in den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen von Hohlkugeln bestehend aus anderen Polyelektrolyten wie z.B. PAH/PSS oder PDADMAC/PSS [Don, 1998] nur darin, daß sie auf Grund des enthaltenen Eisens kontrastreicher erscheinen. Die Struktur der Wand zeigt keine größeren Unterschiede. Bei einem Durchmesser des verwendeten Templats von mehr als 1 µm hat die erhöhte Starrheit des Fe-PE auch keinen großen Einfluß mehr in Bezug auf eine erhöhte Rauigkeit, da die Partikeloberfläche im Verhältnis zur Länge des Fe-PE als planar angesehen werden kann.

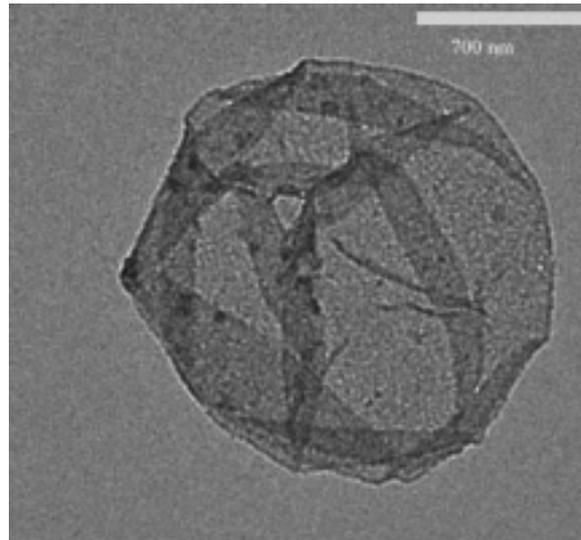


Abbildung 5.6 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Hohlkugel bestehend aus sieben Schichten Polyelektrolyt (PAH/(PSS/Fe-PE)₃).

AFM

Die Rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 5.7 bestätigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Zusätzlich kann man bei diesen Messungen die Wanddicke der Kapselwände im getrockneten Zustand messen. Wenn man einen Bereich betrachtet, wo die beiden Wände faltenfrei und direkt übereinander liegen, kann man davon ausgehen, daß die halbe der dort gemessenen Höhe in etwa der Wandstärke der Kapsel entspricht. Da bekannt ist, daß eine Schicht PSS unter den gegebenen Beschichtungsbedingungen etwa 1 nm dick ist, kann so indirekt auf die Schichtdicke des eisenhaltigen, supramolekularen Polymers geschlossen werden. Man kommt so auf eine Schichtdicke von etwa 1 nm für diese Schichten. In dieser Beziehung, wie auch in dem sonstigen Erscheinungsbild, unterscheidet sich das Fe-PE also nicht wesentlich von den anderen, bekannten Polyelektrolyten. Man muß aber berücksichtigen, daß aus diesen Messungen nur die Schichtdicken für den getrockneten Zustand bestimmt werden können, es kann keine Aussage über ein mögliches Quellen der Schichten im wässrigen Medium getroffen werden.

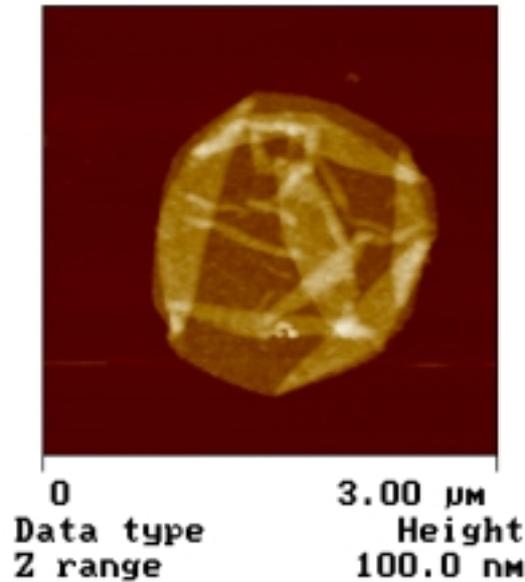


Abbildung 5.7 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Hohlkugel bestehend aus sieben Schichten Polyelektrolyt (PAH/(PSS/Fe-PE)₃). An Hand dieser Aufnahmen konnte eine Schichtdicke von 1 nm pro Schicht abgeschätzt werden.

5.3 Beschichtung von 70 nm PS-Latex Partikeln mit Polyelektrolyt/eisenhaltigen Metallo-supramolekularen Polymer-Schichten

Bisher wurde die Beschichtung von Latex-Partikeln mit der *Layer-by-Layer self assembly*-Methode nur bei Partikeln angewendet, deren Durchmesser deutlich größer als 100 nm war. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Methode auch zur Beschichtung von deutlich kleineren Partikeln geeignet ist. Bei solch kleinen Partikeln können Krümmungseffekte auftreten, welche die Beschichtung verhindern könnten. Es wurde hierbei ein PS-Latex mit einem Durchmesser von etwa 70 nm ausgewählt. Dieser Latex besitzt eine positive Oberflächenladung, welche durch Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) zustande kommt, das bei der Synthese der Latices als Tensid verwendet wurde. Der Latex wurde nach der Methode der Miniemulsionspolymerisation hergestellt [Lan, 1999]. Kleinere PS-Latices lassen sich kaum noch von dem Polyelektrolytüberschuss abtrennen, da eine höhere Zentrifugalkraft zur Sedimentation nötig wäre, als sie mit handelsüblichen Geräten erreicht werden kann und auch eine Filtrationstechnik nicht in Frage kommt, da der Durchmesser der Partikel in der Größenordnung der Polyelektrolyt-Kettenlänge wäre. Es sollte aber kein Latex aus einem anderen Material verwendet werden, da auch das Material Einfluß auf die

Beschichtung haben kann und deshalb die Vergleichbarkeit zu den größeren PS-Latices nicht mehr gegeben wäre. Es wurden zwei Polyelektrolyt-Systeme zur Beschichtung verwendet. Das schon gut charakterisierte PAH/PSS [Suk, 1998a und b] und dann das oben beschriebene PSS/Fe-PE.

Für die Beschichtung dieser kleinen Partikel wurden nur Polyelektrolyte mit geringem Molekulargewicht verwendet, da bei einer Länge des Polyelektrolyten, welche den Durchmesser des Partikels weit überschreitet, eine Verbrückung zwischen einzelnen Partikeln auftreten kann, die zu einer irreversiblen Aggregation führt.

5.3.1 Charakterisierung der beschichteten 70 nm Latices

Eine Charakterisierung der Filme auf solch kleinen Partikeln mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm ist schwierig, da diese Partikel nicht der Einzelteilchenlichtstreuung zugänglich sind. Es ist ebensowenig möglich, intakte Hohlkugeln durch Templatierung dieser Latices zu erhalten, da bei einem Auflösungsversuch das Polystyrol so stark gequollen wird, daß die Schichten zerstört werden. Daher kann ein erfolgreiches Schichtwachstum hier nur mit wenigen Methoden und zum Teil auf indirekte Art nachgewiesen werden.

ζ-Potential

Auch bei der Beschichtung dieser 70 nm PS-Latices wurde als erster Hinweis, ob die Beschichtung erfolgreich war, die elektrophoretische Mobilität gemessen und daraus das ζ -Potential errechnet (Abbildung 5.8). Es konnten wiederum sehr gleichmäßig alternierende Werte beobachtet werden. Wenn die äußere Schicht ein Polykation war, wurde ein positives ζ -Potential von etwa 20 mV gemessen, bei einem Polyanion ein negatives zwischen -30 bis -50 mV. Innerhalb einer Meßreihe sind die Werte für die Polykationen, bzw. Polyanionen auch sehr konstant, sie schwanken innerhalb des experimentellen Fehlers. Zwischen den beiden Systemen gibt es nur kleine Unterschiede. Die Werte für das System mit dem FE-PE sind leicht zu negativen Werten verschoben. Dieses könnte an der geringeren Ladungsdichte liegen. Die Meßwerte unterscheiden sich nicht von denen, die für größere Partikel gemessen

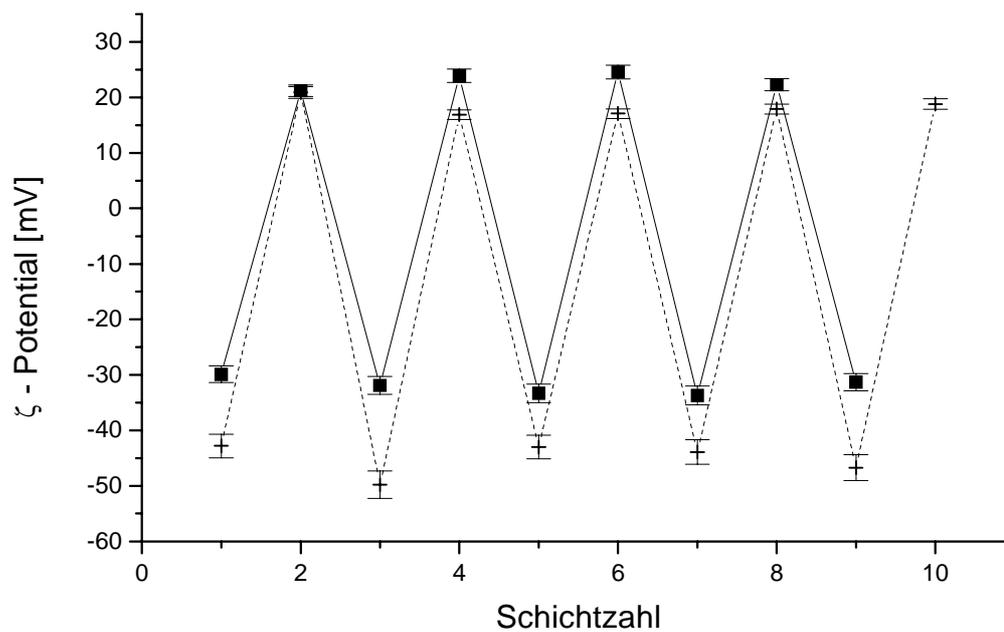


Abbildung 5.8 ζ -Potential-Messungen der 70 nm PS Latices beschichtet mit PAH/PSS (durchgezogene Linie) oder PSS/Fe-PE (gestrichelte Linie). Bei beiden Systemen ist die Vorzeichenumkehr des ζ -Potentials nach jeder Schicht zu sehen, was auf einen erfolgreichen Schichtaufbau hindeutet.

wurden (5.1.1) und deuten auf ein reguläres, schrittweises Schichtwachstum hin.

UV/VIS-Spektroskopie

Die Beschichtung des 70 nm PS-Latex mit dem Fe-PE wurde qualitativ mit UV/VIS-Spektroskopie untersucht. In Abbildung 5.9 ist wiederum das Spektrum des Fe-PE in Lösung, des unbeschichteten und des mit Fe-PE und PSS beschichteten Latex dargestellt. Auch bei den kleinen Latexpartikeln konnte nach der Beschichtung eine blaue Färbung der Partikel festgestellt werden. In dem Absorptionsspektrum ist dann auch wiederum die MLTC-Bande mit einer leichten Rotverschiebung zu erkennen. Es gibt bei den kleinen Latexpartikeln keine qualitativen Unterschiede im Spektrum zu dem der größeren, oben beschriebenen Partikel. Auch hier war es auf Grund der Streuung der Partikel nicht möglich, quantitative Aussagen zu treffen.

Die Beschichtung mit PAH/PSS lässt sich auch qualitativ nicht durch UV/VIS-Spektroskopie verfolgen, da PAH keine Banden in dem meßbaren Bereich aufweist und sich die aromatischen Banden des PSS mit denen des PS-Latex überlagern.

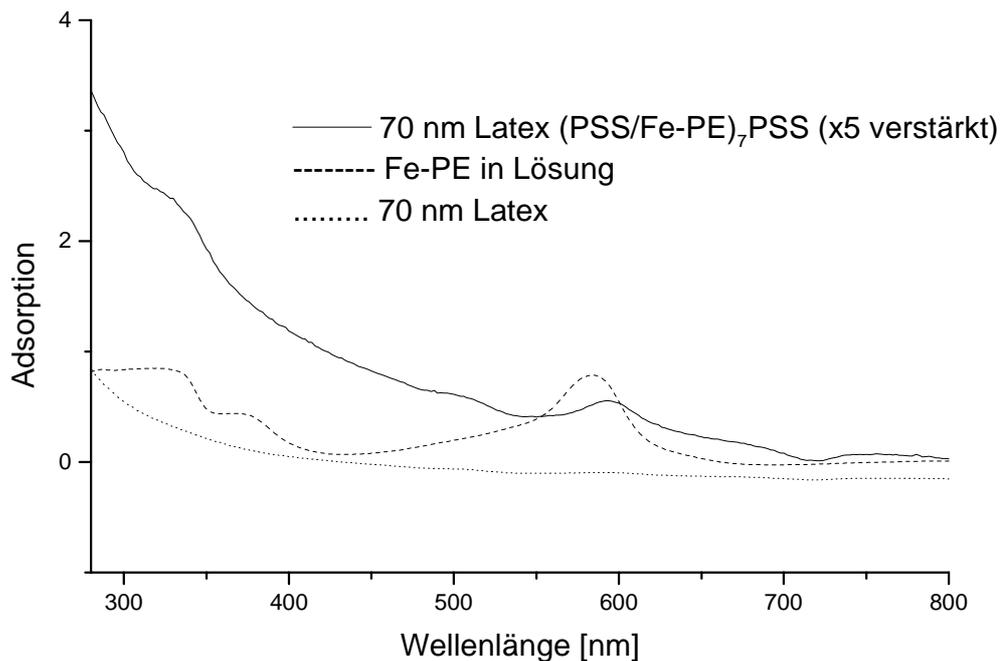


Abbildung 5.9 UV/VIS-Spektren des FE-PE in Lösung (gestrichelte Linie), des unbeschichteten Latex (gepunktete Linie) und des mit supramolekularem Polymer und PSS beschichteten PS Latex (durchgezogene Linie). Die MLCT-Bande des Polymers ist, mit einer leichten Rotverschiebung, auch bei dem beschichteten Latex zu erkennen.

Elektronenmikroskopie

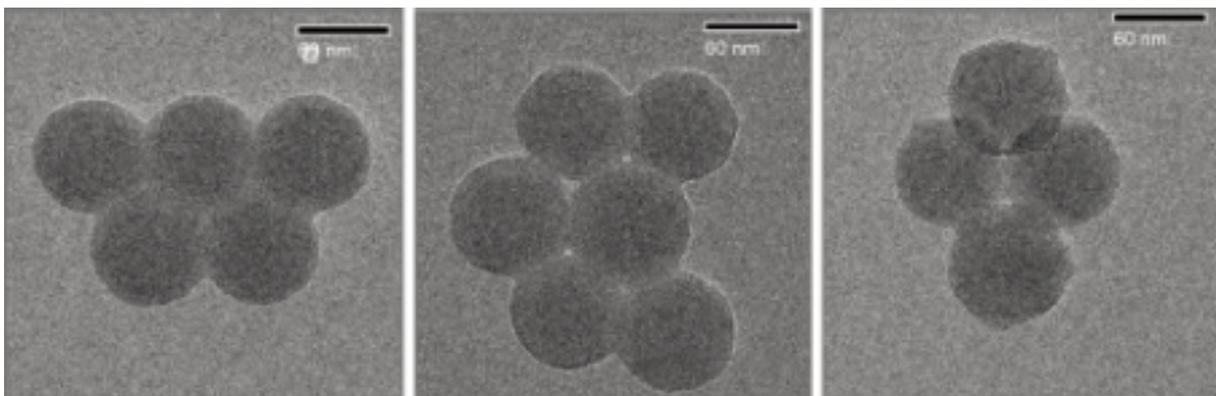
Um das Schichtwachstum zu bestätigen und die Veränderung in der Oberflächenmorphologie zu untersuchen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der unbeschichteten und der beschichteten Teilchen aufgenommen. Der unbeschichtete Latex hat eine sehr glatte Oberfläche. Es sind viele separat liegende Partikel und nur wenige Agglomerate auf der Kohlenstoff-Oberfläche des TEM-Substrats zu sehen (Abbildung 5.10 linke Spalte).

Die beschichteten Teilchen haben, mit beiden Polyelektrolyt-Systemen, ein vom unbeschichteten Latex verschiedenes Packungsverhalten. Sie kleben mehr aneinander und liegen zum Teil auch übereinander (Abbildung 5.10 mittlere und rechte Spalte). Dieses Verhalten kann zum Teil auf Trocknungseffekte zurückgeführt werden. Mit der Einzelteilchenlichtstreuung (SPLS) konnte gezeigt werden, daß in Lösung nur sehr wenige Aggregate vorliegen. Eine Messung der Schichtdicke ist bei Partikeln mit einem so geringen Radius nicht möglich.

Eine genauere Betrachtung der Oberfläche zeigt, daß sich die Oberflächenmorphologie verändert hat. Bei den beschichteten Teilchen, unabhängig davon, mit welchen Polyelektrolyten sie beschichtet wurden, ist eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit festzustellen. Dies läßt auf eine erfolgreiche Beschichtung schließen. Bei den mit PAH/PSS beschichteten Teilchen ist diese Zunahme der Oberflächenrauigkeit dabei wesentlich geringer als bei den mit PSS/eisenhaltigem Koordinationspolymer beschichteten Teilchen. Diese Teilchen weisen zum Teil sogar Ecken auf. Diese Unterschiede in der Oberflächenmorphologie lassen sich auf die recht starre, lineare Konformation des eisenhaltigen Koordinationspolymers, im Gegensatz zum PAH, zurückführen.

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß eine Beschichtung dieser Partikel erfolgreich war.

a)



b)

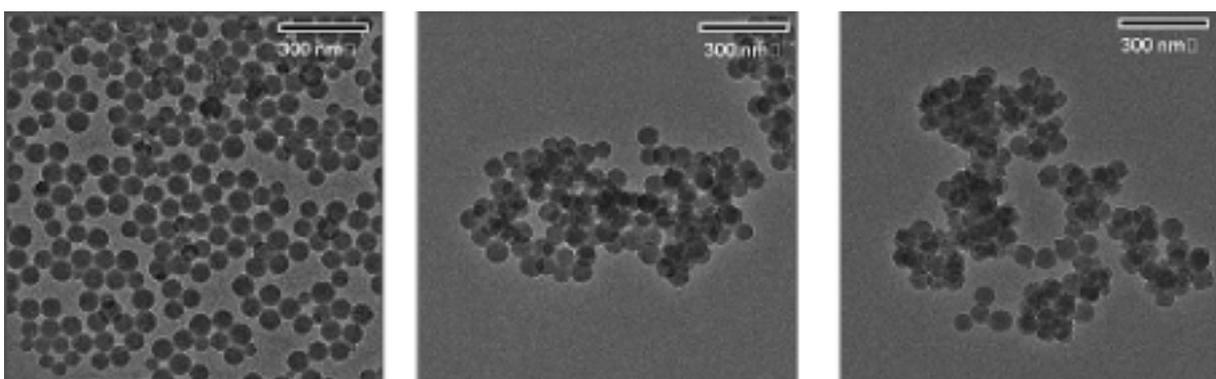


Abbildung 5.10 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des 70 nm, PS Latex. Linke Spalte unbeschichtet, mittlere Spalte mit sieben Schichten PSS/PAH, rechte Spalte mit sieben Schichten PSS/Fe-PE. In Abb. a sind Aufnahmen von Einzelteilchen zu sehen, in Abb. b sind Übersichtsaufnahmen abgebildet. Die beschichteten Latices weisen eine deutlich rauhere Oberfläche auf, wobei dieses bei den mit PSS/PAH beschichteten Latices nicht so stark ausgeprägt ist. In Abb. b ist außerdem zu sehen, daß die beschichteten Latices beim Trocknen aggregieren, während die unbeschichteten Latices dieses Verhalten nicht aufweisen.

5.3.2 Diskussion

In diesem Teil der Arbeit wurde eine neue Art von Polymer, ein eisenhaltiges Koordinationspolyelektrolyt, welches unter Zuhilfenahme supramolekularer Wechselwirkungen synthetisiert wurde, dazu benutzt, um mit Hilfe elektrostatischer Wechselwirkungen schrittweise dünne Schichten (*Layer-by-Layer self-assembly* Technik) auf kolloidalen Templaten aufzubauen. Die Beschichtung der Partikel mit dem Fe-PE konnte durch die intensive Blaufärbung der Partikel gezeigt werden. Die MLCT-Bande in der UV/VIS-Spektroskopie belegt dieses spektral aufgelöst.

Der schrittweise Schichtaufbau konnte nur indirekt nachgewiesen werden, da die Mikroelektrophorese-Experimente keinen Beweis darstellen, da sich eine darunterliegende Schicht abgelöst haben könnte. Ein Vermessen des Radius der Partikel in der Einzelteilchenlichtstreuung, sonst ein klarer Beweis für den schrittweisen Schichtaufbau, war nach Aufbringung des Fe-PE nicht möglich, da das Polymer im Bereich der Wellenlänge des Argon-Lasers absorbiert und so eine Auswertung der Messdaten verhindert. Ebenso ist ein Verfolgen des Schichtaufbaus mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie nicht möglich, da die Streuung der Partikel im Bereich der Absorptionsbanden die Auswertung nicht erlaubt. Mit dieser Methode konnte aber gezeigt werden, daß es möglich ist, das Fe-PE auf den Partikeln zu immobilisieren. Mit Hilfe mikroskopischer Techniken konnte gezeigt werden, daß sich die Oberflächenmorphologie der Partikel durch die Beschichtung verändert. Die Oberflächenrauigkeit (zumindest im getrockneten Zustand) steigt stark an.

Der Beweis, daß ein Schichtaufbau erfolgte, wurde dadurch erbracht, daß es möglich war, nach der Beschichtung von auflösbaren Melaminformaldehyd-Partikeln mit fünf Schichten Polyelektrolyt Hohlkugeln herzustellen. Mit rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen wurde die Schichtdicke einer einzelnen Schicht auf etwa 1 nm bestimmt.

Eine weitere Besonderheit der Schichten ist ihre große Stabilität. In wäßriger Lösung ist es möglich, daß Fe-PE mit Hilfe chelatierender Agenzien, die eine höhere Affinität zum Eisenion haben als die Terpyridin-Liganden, das Fe-PE aufzulösen. Eine solche Substanz, die in wäßriger Lösung verwendet wurde ist Salicylsäure. In organischen Lösemitteln wurde o-Phenanthrolin verwendet. Mit beiden Substanzen war die Auflösung des Fe-PE in einer Lösung der Konzentration 1 mg mL^{-1} in weniger als einer Minute an dem Verschwinden der für das Fe-PE charakteristischen tiefblauen Farbe zu erkennen. Die Lösungen waren anschließend farblos. Auf einer Partikeloberfläche immobilisiert, war es nicht möglich, das Fe-PE aufzulösen. Dabei spielte es keine Rolle, was für eine Partikelart verwendet wurde. Um eine zu starke Bindung mit einer darunterliegenden PSS-Schicht auszuschließen, wurde eine

Schicht Fe-PE auf einen Carboxyl-stabilisierten Latex aufgebracht. Dieser Latex ist nur schwach negativ geladen und sollte keine starke Wechselwirkung mit dem Fe-PE eingehen. Aber selbst in diesem Fall war es nach mehrstündiger Einwirkung, auch bei erhöhten Temperaturen, nicht möglich, die Schicht aufzulösen. Für eine Auflösung des Fe-PE ist also ein Angriff der chelatierenden Agenzien von Ober- und Unterseite Bedingung. Daß eine Auflösung nicht erfolgte, spricht dafür, daß die Schichten, wie erwartet, plan auf der Oberfläche aufliegen. Auch gegen andere Einflüsse, wie die Säurebehandlung oder die Behandlung mit organischen Lösemitteln wie DMF zur Auflösung der Melaminformaldehyd-Partikeln sind die Schichten, wie auch andere Polyelektrolyt-Schichten, inert. Um schaltbare Stabilitäten, also eine Auflösung der Schichten wenn gewünscht erreichen zu können, müßte man zu schwächeren Bindungen übergehen. Dafür sollten sich, wenn man bei ähnlichen Systemen bleiben will, Bipyridin-Ligand-Metall Koordinationspolymere eignen. Eine Verwendung von anderen Metalle scheint dagegen wenig sinnvoll, da die Terpyridin-Liganden mit den meisten Übergangsmetallen sehr starke Komplexe ausbilden. Durch eine Mischung von Bi- und Terpyridin-Liganden könnte man eventuell die Stabilität einstellen.

Die Fe-PE-Schichten lassen sich wie andere Polyelektrolytschichten auf Partikeloberflächen aufbringen. Sie unterscheiden sich von bisher verwendeten Polyelektrolyten in der Hinsicht, daß sie wesentlich starrer in ihrer Konformation sind und so eine größere Oberflächenrauigkeit verursachen. Trotz dieser geringen Flexibilität des Fe-PEs zeigen die daraus geformten Hohlkugeln ein gleiches Erscheinungsbild wie die aus anderen, bisher untersuchten Polyelektrolyten.

Die Beschichtung der Partikel mit einem Durchmesser von 70 nm zeigte, daß auch Partikel mit einem Durchmesser der Konturlänge der Polymere sich noch genau wie größere beschichten lassen. Krümmungseffekte lassen sich in dieser Größenordnung, zumindest für die Beschichtung, noch vernachlässigen. Eine Verbrückung der Teilchen wurde nicht festgestellt.

Eine Charakterisierung dieser kleinsten Teilchen ist nur indirekt möglich, da es mit der Einzelteilchenlichtstreuung nicht möglich ist, die Schichtdicke für so kleine Teilchen zu vermessen. Mit der Einzelteilchenlichtstreuung wurde gezeigt, daß bei der Beschichtung dieser Partikeln kaum Aggregation auftritt. Die Mikroelektrophorese-Experimente und die transmissionselektronischen Aufnahmen deuten aber stark darauf hin, daß die Beschichtung erfolgreich war. Durch UV/VIS-Spektroskopie wurde das Fe-PE auf den Partikeln nachgewiesen, auf Grund der Streuung der Partikel war aber keine Quantifizierung möglich. Eine Auflösung der Partikel mit organischen Lösemitteln wie THF ist zwar möglich, dabei

quellen die Partikel aber so stark, daß sie, wenn sie beschichtet sind, diese Hülle zerstören. Daher war es nicht möglich, durch Templatierung dieser Latices intakte Hohlkugeln zu gewinnen, es waren immer nur Fragmente in der Elektronenmikroskopie zu erkennen.

Trotzdem gibt es genug indirekte Beweise durch Mikroelektrophorese, UV/VIS-Spektroskopie und Elektronenmikroskopie, die einen erfolgreichen Schichtaufbau belegen. Die Polyelektrolyte sind also flexibel genug, sich der Krümmung der Partikeloberfläche anzupassen, obwohl ohne zusätzlichen Elektrolyt gearbeitet wurde. In den Polyelektrolyten war anscheinend eine Ionenstärke vorhanden, die ausreichend war, die Polyelektrolyte in eine geknäulte Konformation zu überführen um eine Verbrückung der Partikel zu vermeiden und eine Anpassung an die Oberfläche zu erlauben. Andererseits war sie gering genug, um eine kolloidale Stabilität zu gewährleisten.

5.4 Aufbau von Enzym/Polyelektrolyt-Multischichten

In diesem Teil der Arbeit wurden Polyelektrolyt/Enzym-Multischichten durch elektrostatisches *Layer-by-Layer self-assembly* auf Latexpartikel aufgebracht. Diese Enzym-Multischichten wurden auf ihre katalytische Wirkung hin geprüft. Es sollte untersucht werden, unter welchen Bedingungen sich die Enzyme auf den Latexoberflächen immobilisieren lassen und ob der Aufbau von Multischichten zu einem Anstieg in der katalytischen Aktivität führt. Als Modellsysteme wurden dazu zwei Glycoproteine ausgewählt, Glucose Oxidase (GOD) aus *Aspergillus niger* und Peroxidase (POD) aus Meerrettich (*Armoracia rusticana*). Diese Enzyme wurden als Modellsysteme ausgewählt, weil sie sehr gut charakterisiert, leicht zugänglich und recht stabil sind. Es sind beides sehr hydrophile, geladene Proteine. Zudem gibt es viele potentielle Anwendungsmöglichkeiten, z.B. als Glucose-Sensor für die Blutzuckerbestimmung. Der Schichtaufbau mit diesen Enzymen mit der Layer-by-layer Technik [Lvo, 1995; Sun, 1996; Ond, 1996b; Sin, 1997; Sun, 1999] und über kovalente Bindungen [Li, 1998] wurde zudem schon auf planaren Substraten gezeigt.

5.4.1 Aufbau von GOD/Polykation-Multischichten

GOD aus *A. niger* (EC 1.1.3.4.) hat einen isoelektrischen Punkt von 4,2. Für die Herstellung der Schichten wurden immer pH-Werte größer 4,2 verwendet, bei denen GOD daher negativ geladen ist. Als Zwischenschichten wurden positiv geladene Polykationen wie PEI und PAH verwendet. Der Schichtaufbau erfolgte wie unter 4.1.4 beschrieben. Es wurden sowohl PEI als auch PAH als Polykationen für die Zwischenschicht zwischen den einzelnen GOD-Schichten verwendet, um den Einfluß der Zwischenschicht beobachten zu können.

5.4.2 Aufbau von POD/Polyelektrolyt-Multischichten

Peroxidase (POD) aus Meerrettich (EC 1.11.1.7.) hat einen isoelektrischen Punkt von 8,8. Normalerweise wurde bei einem pH-Wert darunter gearbeitet (pH 5,8-6,8), so daß POD positiv geladen ist. In diesen Fällen wurden die Filme alternierend mit dem Polyanion PSS

aufgebaut. Es ist aber auch möglich bei einem pH-Wert größer 8,8 zu arbeiten. Da POD dann negativ geladen ist, wurde für die Zwischenschichten das Polykation PEI verwendet. Da ein pH-Wert größer 8,8 aber sehr hoch ist und PEI bei diesem pH nur zu einem geringen Teil protoniert ist, wurde nur gezeigt, daß es prinzipiell möglich ist, POD bei diesem pH zu immobilisieren. Diese Schichten wurden aber nicht eingehender untersucht.

5.4.2.1 Charakterisierung der Filme

ζ-Potential-Messungen der GOD/Polykation-Schichten

Die Beschichtung wurde qualitativ anhand von mikroelektrophoretischen Messungen verfolgt. Aus diesen Messungen wurden die ζ-Potentiale für die beschichteten Partikel berechnet. Wenn die Polykationen PAH oder PEI die äußere Schicht bilden, hat das ζ-Potential einen positiven Wert von etwa +35 bis +50 mV (Abbildung 5.11 und Abbildung 5.12). Die unterschiedlichen Werte kommen durch die unterschiedlichen Polyelektrolyte und durch die Beiträge der darunterliegenden Schichten zustande. Diese können unter anderem durch mögliche Konformationsänderungen und unterschiedliche Packungsdichte von GOD bedingt sein [Sch, 2000].

Wenn die äußere Schicht aus GOD bestand, waren die Werte schwach negativ bis leicht positiv. Unter den Meßbedingungen (in Wasser; pH 5,6; kein weiterer Elektrolyt zugesetzt) wurde ein negatives ζ-Potential erwartet, da aber GOD wie alle Proteine ein Ampholyt ist und damit sowohl positive als auch negative Ladungen aufweist und nicht bekannt ist, in welcher Konformation das Enzym immobilisiert wird, ist auch ein schwach positives ζ-Potential denkbar. Auch ist der Bedeckungsgrad der Oberfläche bei einer Enzymschicht möglicherweise nicht so groß, wie bei einer Polyelektrolytschicht, so daß die darunterliegende Schicht einen größeren Beitrag als normal zum ζ-Potential leistet. Obwohl das ζ-Potential positiv ist, alterniert es doch deutlich mit den für PAH und PEI gemessenen Werten, so daß die ζ-Potential-Messungen einen deutlichen Hinweis auf einen Schichtaufbau geben.

Die ζ -Potential-Messungen alleine lassen aber weder Rückschlüsse auf den Bedeckungsgrad (Monolage oder Submonolage) zu, noch sind sie allein ein echter Beweis für schrittweisen Multischichtaufbau.

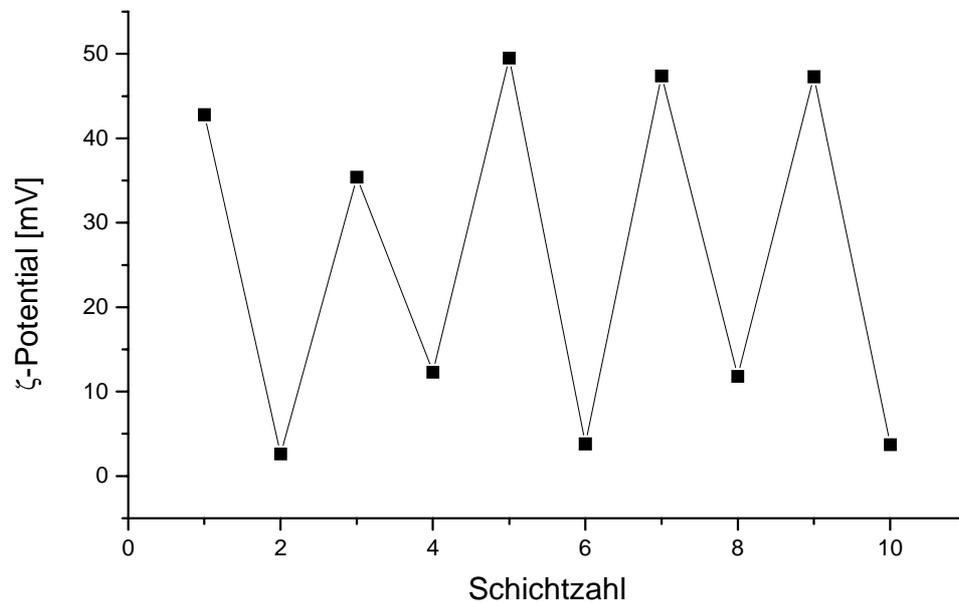


Abbildung 5.11 ζ -Potential-Messungen der PS Latices, beschichtet mit PAH/GOD. GOD wurde aus 50 mM MES-Puffer (pH 6,0) aufgebracht. Das ζ -Potential alterniert nach jeder Schicht, wobei kein Vorzeichenwechsel zu erkennen ist. Das alternierende ζ -Potential läßt trotzdem auf einen erfolgreichen Schichtaufbau schließen.

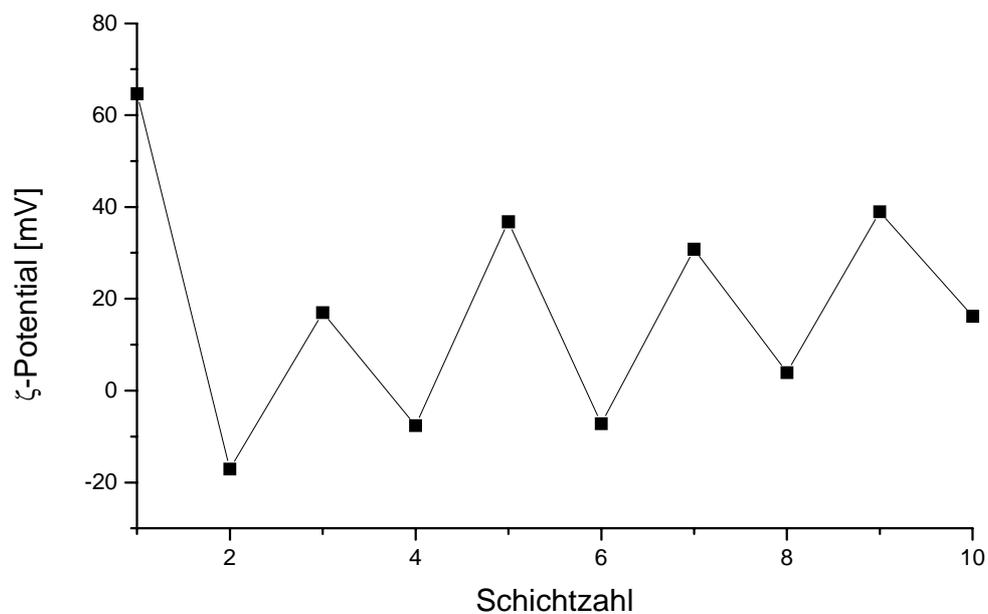


Abbildung 5.12 ζ -Potential-Messungen der PS Latices, beschichtet mit PEI/GOD. GOD wurde aus 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgebracht.

ζ-Potential-Messungen der POD/Polykation-Schichten

Auch die Beschichtung von PS Latex Partikeln mit POD und PSS wurde qualitativ mit Mikroelektrophorese-Experimenten verfolgt (Abbildung 5.13). Die aus diesen Messungen errechneten ζ -Potentiale ergaben erwartungsgemäß stark negative Werte (-40 bis -50mV), wenn PSS die äußere Schicht bildet. Wenn die äußere Schicht aus POD bestand, waren die Werte schwach negativ. Unter den Meßbedingungen (in Wasser; pH etwa 5,6; kein weiterer Elektrolyt zugesetzt) wurde ein positives ζ -Potential erwartet, aber analog zu den bei GOD-Schichten beobachteten Ergebnissen ist ein schwach negatives ζ -Potential gemessen worden. Die Gründe sind die gleichen, die auch dazu führen, daß bei den GOD-Filmen ein positives ζ -Potential gemessen wurde. Auch bei POD ist die Konformation im immobilisierten Zustand unbekannt. Ebenso kann auch hier der Bedeckungsgrad möglicherweise gering genug sein, so daß die darunterliegende PSS-Schicht noch einen großen Beitrag zum ζ -Potential leistet oder eine teilweise Penetration der Enzyme in die darunterliegende (Multi-)Schicht erfolgt ist. Trotzdem ist auch hier für die POD- und die PSS-Schichten jeweils ein alternierendes ζ -Potential festzustellen, was auch hier stark auf einen Schichtaufbau hindeutet. Wie bei den ζ -Potentialen für die GOD-Schichten gilt auch hier, daß die ζ -Potential-Messungen alleine weder Rückschlüsse auf den Bedeckungsgrad (Monolage oder Submonolage) zulassen, noch als echter Beweis für schrittweisen Multischichtenaufbau dienen können.

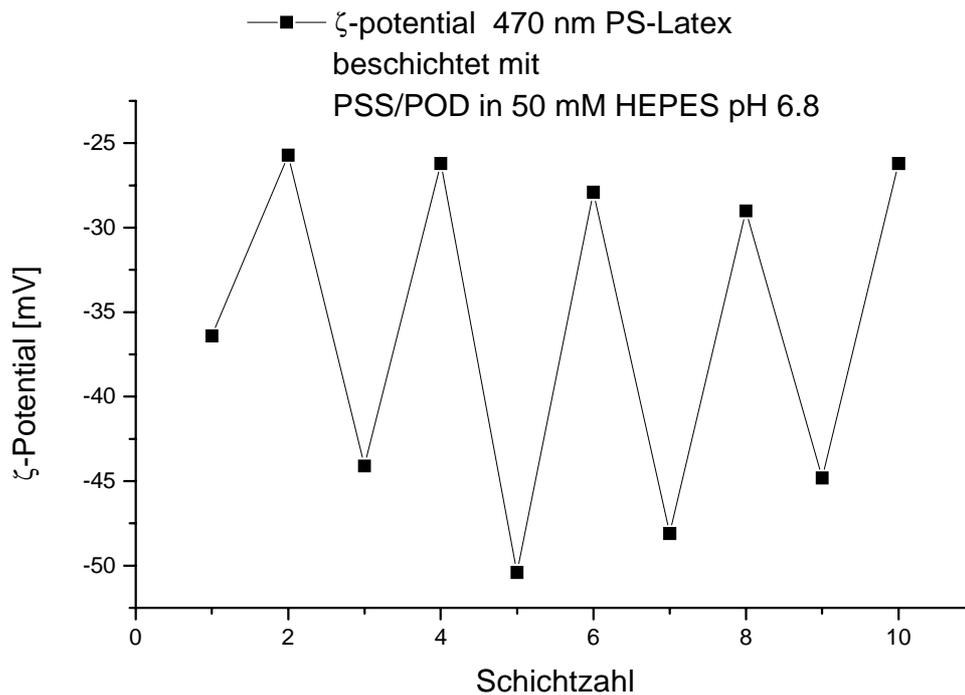


Abbildung 5.13 ζ -Potential-Messungen der PS Latices beschichtet mit PSS/POD. POD wurde aus 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8) aufgebracht.

Messung der adsorbierten Enzymmenge mittels UV/VIS-Spektroskopie

Mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie lässt sich die auf den Partikeln adsorbierte Enzymmenge detektieren. Dazu nutzt man aus, daß die in den Proteinen enthaltenen Tryptophanreste eine starke Absorption bei 280 nm zeigen. Mit vorher für jedes Enzym unter den verwendeten Bedingungen (Puffer, Salzkonzentration) erstellten Kalibrierungen lässt sich anhand von Messungen der Proteinkonzentration der eingesetzten Lösung und des nach erfolgter Beschichtung abgetrennten Überstandes die Menge des adsorbierten Enzyms berechnen. Ebenso lässt sich durch die Messung des Polyelektrolytüberstandes nach erfolgter Beschichtung, sofern der Polyelektrolyt keine Absorption im Bereich von 280 nm aufweist, die Menge des durch die Aufbringung der Polyelektrolytschicht abgelösten Enzyms nachweisen.

Es wurde zuerst das System GOD alternierend mit PAH näher untersucht, wobei GOD (2mg mL^{-1} in einem 50 mM MES -Puffer ($\text{pH } 6,0$) gelöst war und PAH in Wasser mit $0,5\text{ M NaCl}$. Diese Bedingungen ergaben die größte Absorption an GOD. Es zeigte sich in den Messungen, daß pro Schicht eine große Menge GOD absorbiert wird (Abbildung 5.14), aber wie in der Abbildung 5.14 zu sehen, löst die nachfolgend aufgebraachte Schicht PAH bis zu 80% des Enzyms wieder ab. Trotzdem verbleibt immer ein gewisser Anteil GOD auf der Partikeloberfläche, so daß insgesamt ein Anstieg der Menge des immobilisierten Enzyms mit steigender Schichtzahl zu verzeichnen ist.

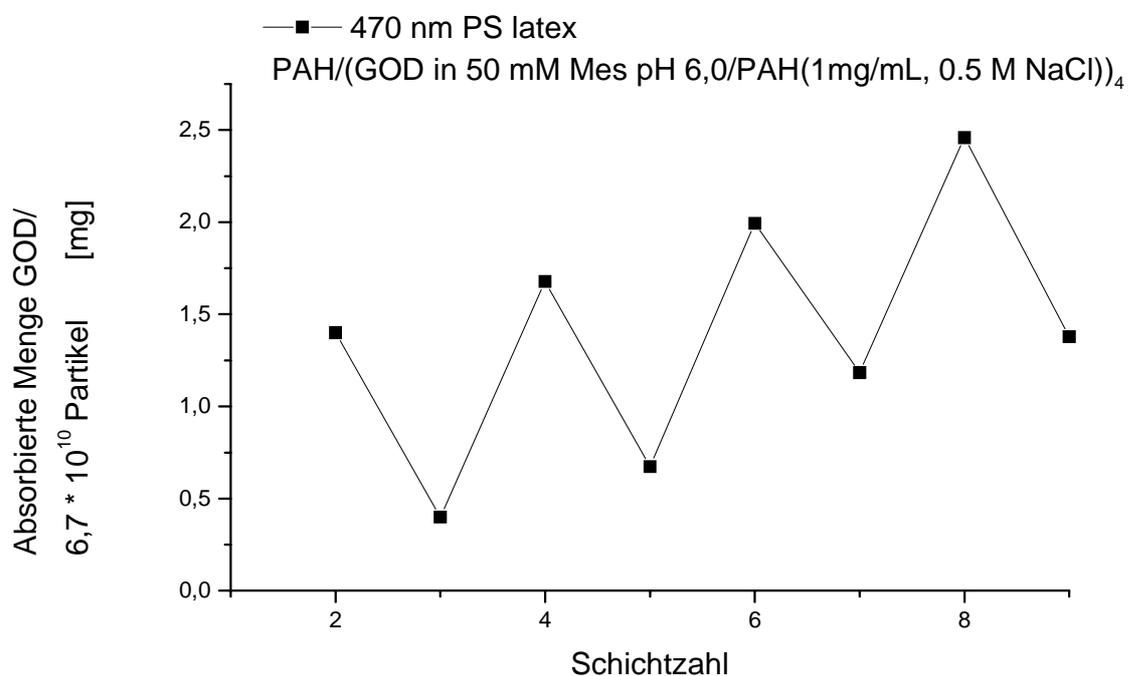


Abbildung 5.14 Messung der adsorbierten Enzymmenge mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie. Ein großer Teil des adsorbierten Enzyms wird mit der Aufbringung der folgenden PAH-Schicht wieder abgelöst. Trotzdem verbleibt genug Enzym auf dem Partikel, so daß die Gesamtmenge des immobilisierten Enzyms mit jeder zweiten Schicht ansteigt.

Auch bei dem POD/PSS-System wurde mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie untersucht, wieviel Enzym auf der Partikeloberfläche immobilisiert ist. Das Prinzip und die Vorgehensweise sind dabei die gleichen, wie sie für die Messung von GOD angewendet wurden.

POD wurde in einem 50 mM HEPES -Puffer $\text{pH } 6,8$ gelöst und war also positiv geladen. PSS wurde in Wasser mit $0,5\text{ M NaCl}$ gelöst. Auch hier zeigte sich in den Messungen, daß pro

Schicht eine große Menge POD adsorbiert wird (Abbildung 5.15). Wie in der Abbildung 5.15 zu sehen, löst auch hier die nachfolgend aufgebrauchte Schicht Polyelektrolyt (hier PSS) bis zu 80 % des Enzyms wieder ab. Trotzdem verbleibt auch hier immer ein gewisser Anteil POD auf der Partikeloberfläche, so daß insgesamt auch bei diesem System immer ein Anstieg der Menge des immobilisierten Enzyms mit steigender Schichtzahl zu verzeichnen ist.

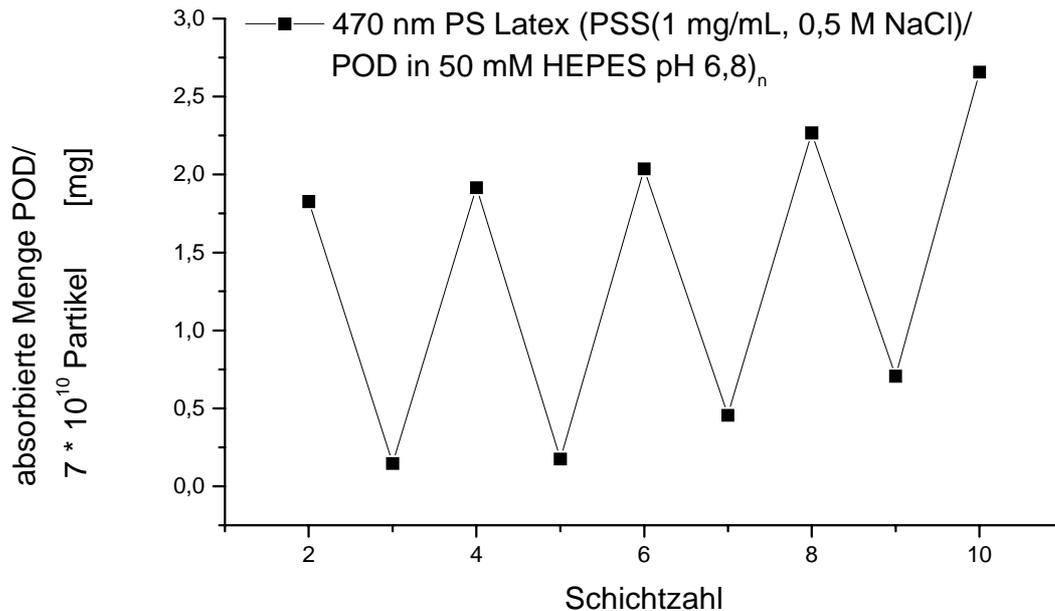


Abbildung 5.15 Messung der adsorbierten Enzymmenge mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie. Eine zuerst auf den Latex aufgebrauchte Schicht PAH bleibt bei der Messung unberücksichtigt. Ein großer Teil des adsorbierten Enzyms wird mit der Aufbringung der folgenden PSS-Schicht wieder abgelöst. Trotzdem verbleibt auch im Fall von POD-Schichten genug Enzym auf dem Partikel, so daß die Gesamtmenge des immobilisierten Enzyms mit jeder Schicht ansteigt.

5.4.2.2 Filmstruktur

GOD/Polykation-Schichten

Zur Aufklärung der Filmstruktur wurden mit GOD/Polykation beschichtete Partikeloberflächen mit Hilfe der Rasterkraftmikroskopie untersucht. In Abbildung 5.16 sind die Phasenbilder eines Teils einer Partikeloberfläche abgebildet, welche mit GOD und verschiedenen Polykationen beschichtet sind. Das linke Bild zeigt einen

PAH/GOD-Film. Man kann einen relativ kompakten, strukturierten Film erkennen. Das rechte Bild zeigt einen PEI/GOD-Film, welcher deutlich poröser ist. Es ist keine ausgeprägte Strukturierung zu erkennen. Das verwendete Polykation hat also einen Einfluß auf die gebildete Filmstruktur. Die Auswirkungen dieser Strukturen auf die enzymatische Aktivität werden im Folgenden noch genauer untersucht.

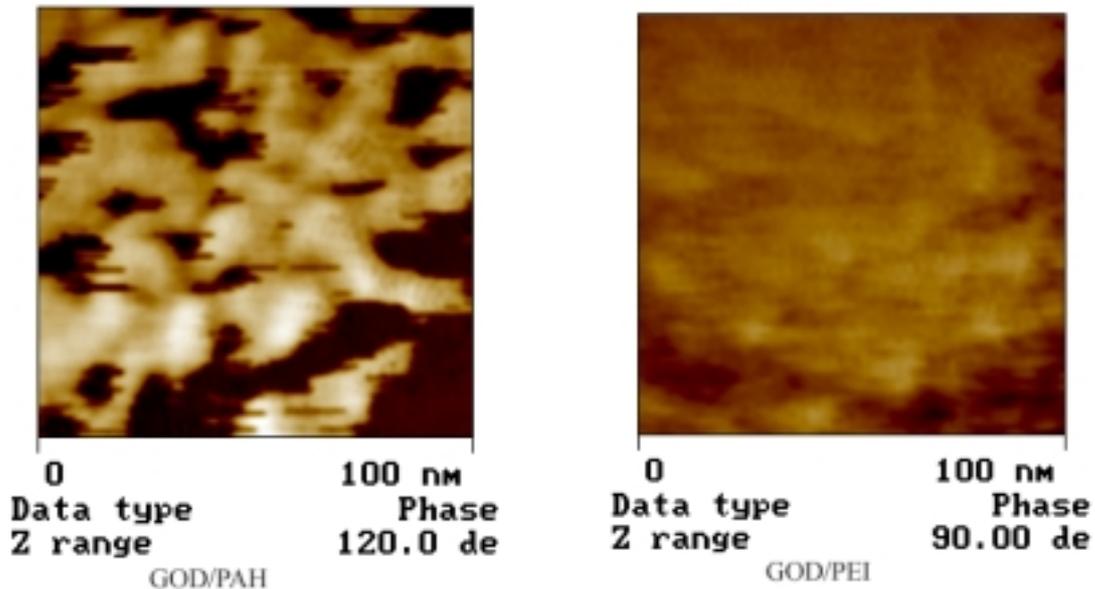


Abbildung 5.16 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Partikeloberfläche, die links mit PAH/GOD und rechts mit PEI/GOD beschichtet sind. Die Aufnahme links zeigt einen deutlich kompakteren, strukturierteren Film. Der GOD/PEI-Film ist dagegen deutlich poröser.

POS/PSS-Schichten

In Abbildung 5.17 ist ein Teil einer Partikeloberfläche eines mit POD/PSS beschichteten Latex abgebildet. Diese rasterkraftmikroskopische Aufnahme zeigt, daß sich ein sehr poröser, unstrukturierter Film gebildet hat. Es sind keine Aggregate zu erkennen, dafür bis zu 30 nm große Poren. Der Film zeigt große Ähnlichkeit mit dem von GOD/PEI gebildeten Filmen. Es muß in den folgenden Messungen geklärt werden, ob diese Ähnlichkeit in der Filmstruktur auch ein ähnliches Verhalten z.B. einen Zuwachs der enzymatischen Aktivität pro Schicht nach sich zieht.

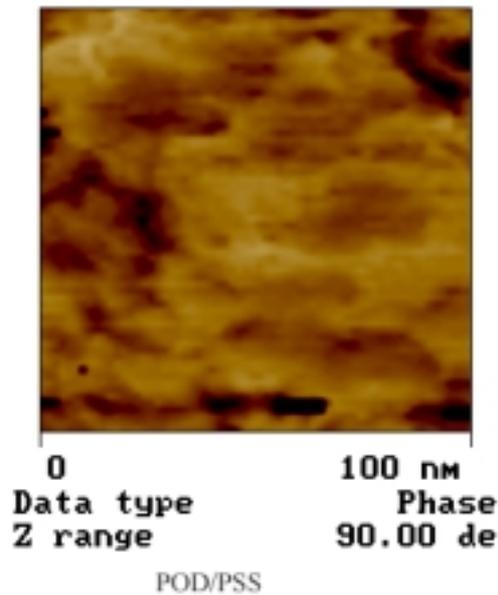


Abbildung 5.17 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Partikeloberfläche eines Latexteilchens, daß mit PSS/POD beschichtet ist. Es ist ein unstrukturierter, poröser Film zu erkennen.

Einzelteilchenlichtstreuung

GOD/Polykation-Schichten

In Tabelle 4.1 sind die mit Einzelteilchenlichtstreuung (SPLS) gemessenen Schichtdicken der GOD/Polykationen aufgeführt. Es wurde immer nach jeder zweiten Schicht gemessen, das heißt, immer wenn die äußere Schicht Polyelektrolyt war. Es wurden Messungen für zwei verschiedene Polykationen in verschiedenen Puffern durchgeführt. Die Werte zeigen ein stetiges Wachstum bei jeder Schicht. Die Messung ist damit Beweis für das schrittweise Wachstum der Schichten. Die Schichten weisen dabei aber eine geringere Dicke auf, als man für eine Monolage GOD mit einer Monolage Polykation erwarten würde (die molekularen Abmessungen von GOD betragen $6,6 \times 6,6 \times 21,4$ nm [Hec, 1993], die Dicke einer normalen Polyelektrolytschicht beträgt $0,5 - 1,5$ nm). Es liegt also keine vollständige Monolage vor. An Hand der vorher beschriebenen UV/VIS-spektroskopischen Messungen ist bekannt, daß ein großer Teil des immobilisierten Enzyms mit der folgenden Polyelektrolytschicht abgelöst wird. Die aus den UV/VIS-spektroskopischen Messungen abgeschätzten Schichtdicken für GOD sind im Bereich von knapp einer Monolage.

Es ist außerdem zu erkennen, daß der Anstieg in der Schichtdicke nicht linear ist, sondern daß die erste Schicht eine größere Dicke aufweist als die folgenden. Das kann mehrere Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist, daß die Oberflächenladung des Partikels noch großen Einfluß auf die ersten zwei bis drei Schichten hat und danach abgeschirmt ist. Die Partikeloberfläche weist eine hohe Ladungsdichte auf, die gerade bei den Enzymschichten nicht gegeben ist und kann daher die elektrostatischen Wechselwirkungen stärken.

(PEI/GOD) _n in 50 mM Tris Puffer pH 8,0 auf 640 nm PS Latex		(PAH/GOD) _n in 50 mM MES Puffer pH 6,0 auf 470 nm PS Latex	
Anzahl Doppelschichten	Schichtdicke [nm]	Anzahl Doppelschichten	Schichtdicke [nm]
1	2,3	1	4,3
2	3,5	2	7,7
3	5,1	3	9,9

Tabelle 5.1 Schichtdicke der Polyelektrolyt/GOD Schichten, aufgebracht unter verschiedenen Beschichtungsbedingungen auf negativ geladene PS Latex Partikel. Die Schichtdicke wurde mit SPLS gemessen.

POD/PSS-Schichten

In Tabelle 4.2 sind die mit Hilfe der SPLS gemessenen Schichtdicken der POD/Polyanion-Schichten aufgeführt. Es wurde immer nach jeder zweiten Schicht gemessen, das heißt, immer wenn die äußere Schicht Polyelektrolyt war. Es wurden auch hier Messungen für zwei verschiedene Puffersysteme durchgeführt. Es wurde aber nur ein Polyanion, PSS, verwendet. Auch hier zeigen die Werte ein stetiges Wachstum bei jeder Schicht. Die Messung ist damit Beweis für das schrittweise Wachstum der Schichten. Die Schichten weisen dabei aber auch im Fall von POD eine geringere Dicke aus, als für eine Monolage POD mit einer Monolage PSS erwartet werden würde (der Durchmesser von POD ist etwa 3,5 nm, die Dicke einer normalen PSS-Schicht beträgt 0,5 –1,5 nm je nach Präparation). An den oben beschriebenen UV/VIS-spektroskopischen Messungen ist zu sehen, daß ein großer Teil auch der POD mit der folgenden Polyelektrolytschicht abgelöst wird, weil die Bindung zwischen POD und freiem PSS stärker ist als die Bindung zwischen POD und der Partikeloberfläche. Die aus den UV/VIS-spektroskopischen Messungen abgeschätzten Schichtdicken für POD sind im

Bereich von knapp einer Monolage. Die molekularen Abmessungen der POD sind 4,1 x 6,7 x 11,9 nm [Hen, 1999]

Es ist außerdem zu erkennen, daß der Anstieg in der Schichtdicke nicht linear ist, sondern, daß die erste Schicht eine größere Dicke aufweist als die folgenden. Die Ursachen dafür sind analog denen für GOD. Die Partikeloberfläche hat einen großen Einfluß auf die ersten zwei bis drei Schichten und kann durch ihre hohe Ladungsdichte zu größeren elektrostatischen Anziehungen führen, als es bei weiteren Schichten der Fall ist. Der Unterschied in der Dicke der ersten Doppelschicht kann auch darauf zurückzuführen sein, daß PAH bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedlich dicke Schichten ausbildet, da sich die Ladungsdichte an dem Polyelektrolyt bei höherem pH-Wert erniedrigt.

PAH/(PSS/POD) _n in 10 mM NaAc Puffer pH 5,2 auf 640 nm PS Latex		PAH/(PSS/POD) _n in 50 mM HEPES Puffer pH 6,8 auf 470 nm PS Latex	
Anzahl Doppelschichten	Schichtdicke [nm]	Anzahl Doppelschichten	Schichtdicke [nm]
1	3,3	1	3,8
2	3,8	2	5,6
3	7,2	3	7,0
4	7,9		
5	8,3		

Tabelle 5.2 Schichtdicke von PSS/POD Schichten, aufgebracht unter verschiedenen Beschichtungsbedingungen auf negativ geladene PS Latex Partikel. Die Schichtdicke wurde mit SPLS gemessen. Unter der ersten Schicht wurde eine Schicht PAH aufgebracht.

Aktivitätsmessungen der GOD-Schichten

Zunächst wurde die Aktivität der immobilisierten GOD im Vergleich zu GOD in Lösung untersucht. Mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie wurde dabei wie oben beschrieben die Menge Enzym berechnet, die auf einer für den Test verwendeten Anzahl Partikel adsorbiert war. Es wurden für diesen Test Partikel verwendet, die nur mit einer Enzymschicht beschichtet waren. Mit diesen Partikeln wurde ein Aktivitätstest wie in Kapitel 4.1.9 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurde ein Aktivitätstest mit der gleichen Menge GOD in Lösung durchgeführt. Die gemessenen Aktivitäten waren im Rahmen der Meßgenauigkeit identisch. GOD verliert durch die Immobilisierung keine Aktivität.

In der Abbildung 5.18 und der Abbildung 5.19 sind die Aktivitätsmessungen für die PS Latex Partikel dargestellt, welche mit fünf Schichten PAH/GOD (Abb. 4.15) oder vier Schichten PEI/GOD (Abb. 4.16) beschichtet sind. Für jede der Messungen wurde die gleiche Anzahl an Partikeln verwendet. Die Partikelzahl wurde mit Hilfe der SPLS gemessen. In diesen Abbildungen ist zu erkennen, daß die Gesamtaktivität immer mit steigender Anzahl an GOD-Schichten ansteigt. Bei den mit PEI/GOD beschichteten Partikeln erfolgt der Anstieg mindestens linear mit der Schichtdicke, wohingegen bei den mit PAH/GOD beschichteten Partikeln der Anstieg der Aktivität pro aufgebrauchte Schicht von der zweiten Doppelschicht an sinkt.

Die Erklärung für das unterschiedliche Verhalten ist vermutlich die unterschiedliche Filmstruktur. Die SPLS-Daten haben gezeigt, daß die PAH/GOD-Schichten dicker als die PEI/GOD-Schichten sind. Da die PEI-Schichten ohne zusätzliches Salz auf die Partikel aufgebracht wurden, während bei den PAH-Schichten noch 0,5 M NaCl zugesetzt war, ist es wahrscheinlich, daß die PAH-Schichten dicker sind, da bekannt ist, daß die Zugabe von Salz zu einer größeren Schichtdicke führt [Dec, 1992a]. Diese größere Schichtdicke kann zum einen dazu führen, daß die aktiven Zentren des Enzyms so bedeckt werden, daß sie für die Katalyse nicht mehr zu Verfügung stehen. Dieses wird auch durch die rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen bestätigt, die zeigen, daß die PAH/GOD-Schichten eine dichtere Struktur aufweisen, während die PEI/GOD-Schichten poröser sind. Diese porösere Struktur erleichtert die Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle.

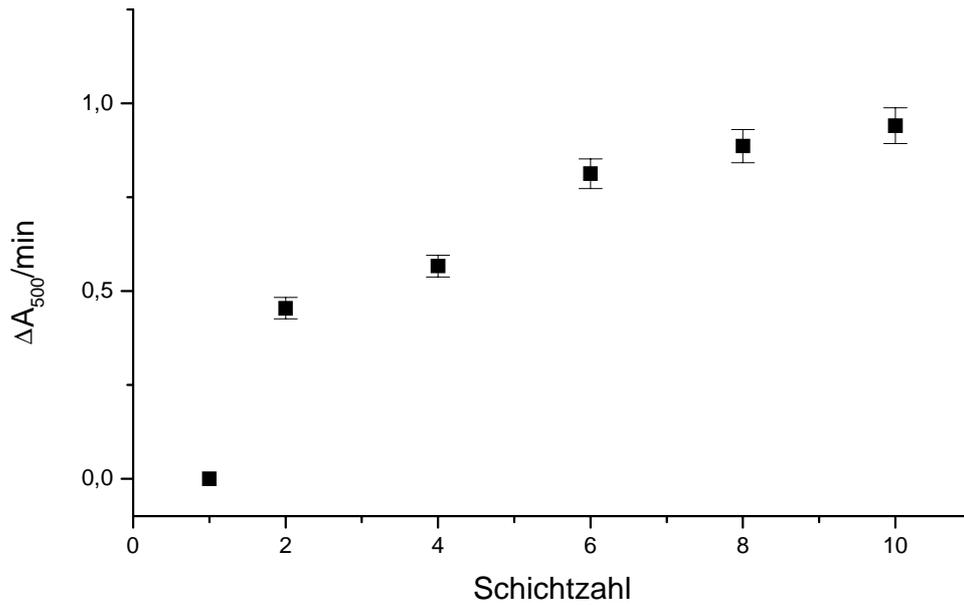


Abbildung 5.18 Aktivitätstest der mit PAH/GOD beschichteten Latices. GOD wurde aus 50 mM MES-Puffer (pH 6,0) aufgebracht. Der Anstieg in der enzymatischen Aktivität wird mit jeder Schicht geringer.

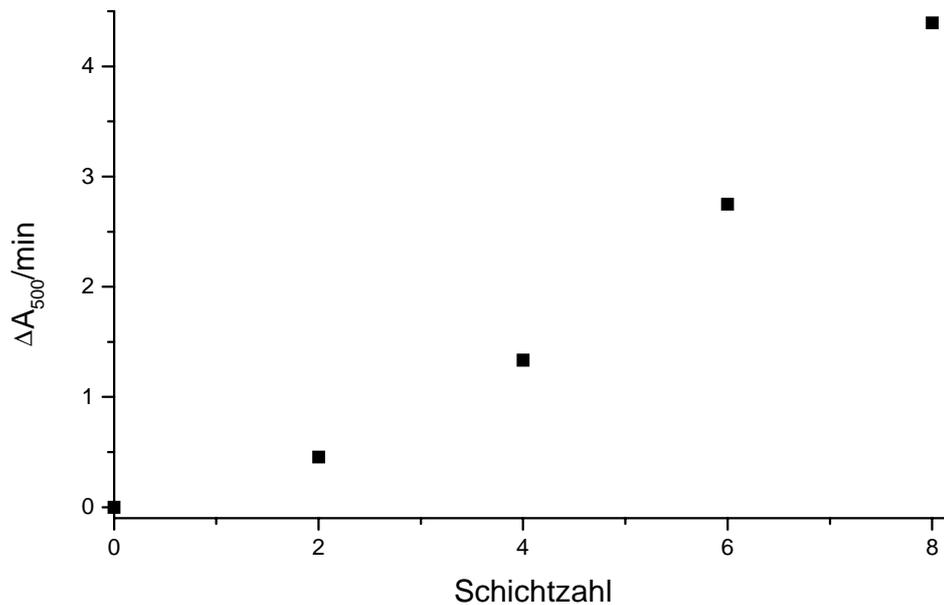


Abbildung 5.19 Aktivitätstest der mit PEI/GOD beschichteten Latices. GOD wurde aus 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) aufgebracht.

Aktivitätsmessungen der POD-Schichten

Es wurde auch für POD zuerst untersucht, ob das Enzym durch die Immobilisierung Aktivität verliert. Dazu wurden, wie für GOD auch, die gleichen Enzymmengen, zum einen in Lösung und zum anderen auf Partikeln immobilisiert, auf ihre Aktivität hin untersucht. Auch im Fall von POD war kein Aktivitätsverlust durch die Immobilisierung zu messen.

Die Aktivitätsmessungen der PS Latex Partikel die mit PSS/POD (Abbildung 5.20) beschichtet sind, zeigen große Ähnlichkeit zu denen der PEI/GOD-Schichten. Auch hier ist ein fast stetiger Anstieg der enzymatischen Aktivität pro aufgebrauchte Schicht POD zu erkennen. Die absoluten Werte unterscheiden sich allerdings. Die PSS/POD-Schichten sind zwar etwas dicker, es sind aber bei den rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 5.17), jeweils poröse Strukturen, die sich sehr ähnlich sehen, zu erkennen.

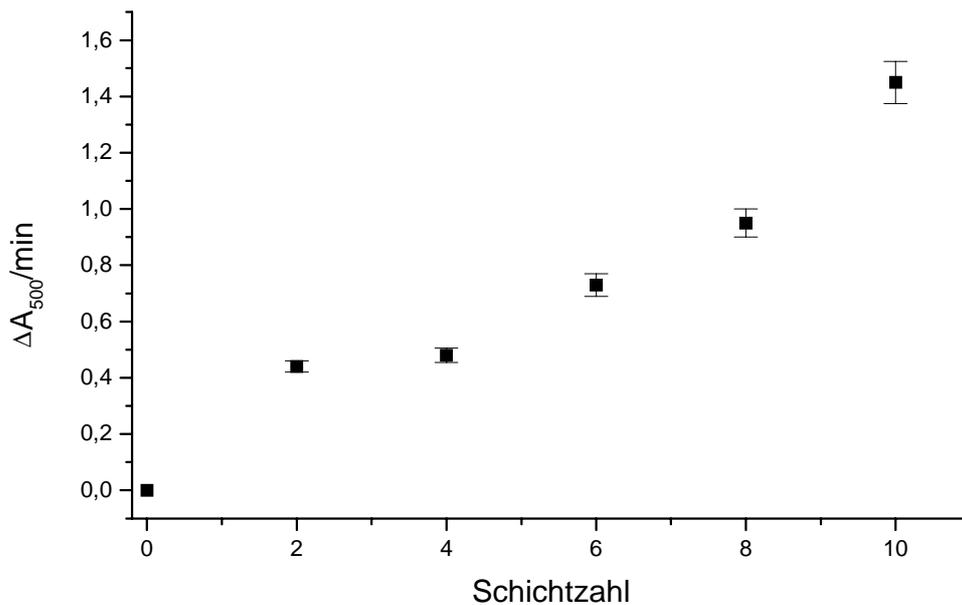


Abbildung 5.20 Aktivitätstest der mit PSS/POD beschichteten Latices. POD wurde aus 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,8) aufgebracht.

5.4.2.3 Stabilität der immobilisierten Enzyme

Mit der Immobilisierung von Enzymen kann man zum einen eine bessere Wiedergewinnung erreichen, indem das Substrat, auf dem das Enzym immobilisiert, ist leicht aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden kann. Ein weiterer potentieller Vorteil der Immobilisierung

von Enzymen ist die vergrößerte Stabilität gegenüber äußeren Einflüssen. Zwei dieser Einflüsse, Temperatur und pH-Wert wurden im folgenden näher untersucht.

Temperaturstabilität

Die Temperaturstabilität der auf PS-Latex immobilisierten GOD wurde mit GOD in Lösung verglichen. Dazu wurde eine GOD-Lösung, bzw. eine die gleiche Menge auf Partikeln immobilisierte GOD enthaltende Lösung, für 10 min bei einer bestimmtem Temperatur inkubiert. Sofort anschließend wurde dann mit diesen Lösungen ein Aktivitätstest durchgeführt.

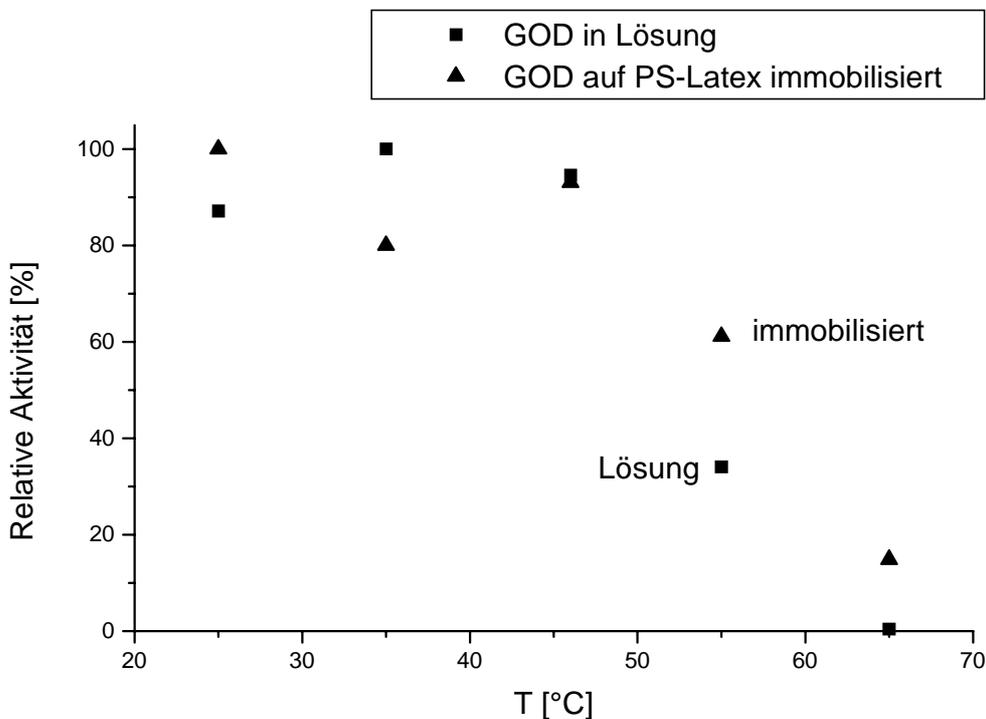


Abbildung 5.21 Aktivitätstest mit GOD-Lösung (Quadrate) und auf PEI-beschichteten Partikeln immobilisierter GOD (Dreiecke) nach 10 minütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Immobilisierte GOD zeigt bei 65°C noch deutlich Aktivität, während die freie GOD bei dieser Temperatur nicht mehr aktiv ist.

Wie in Abbildung 5.21 zu sehen ist, hat die freie GOD ihr Aktivitätsmaximum zwischen 25°C und 45°C. Ab 45°C verliert die GOD schnell an Aktivität, allerdings ist der Abfall bei dem freien Enzym wesentlich schneller als bei dem immobilisierten. Bei einer Inkubation der beschichteten Partikel bei 65°C für 10 min verliert das freie Enzym seine gesamte Aktivität,

während das immobilisierte Enzym im Gegensatz dazu noch 20 % seiner Ausgangsaktivität aufweist. Die gefundenen Werte stimmen gut mit den Werten überein, die für auf flachen Substraten immobilisierte GOD gefunden wurden [Ond, 1998].

Es wurde im folgenden die Temperaturstabilität von immobilisierter POD im Vergleich zur Lösung untersucht. POD ist aber auch in Lösung schon relativ temperaturunempfindlich (Abbildung 5.22). Bis 65°C nimmt die Aktivität in der Lösung nur geringfügig ab (etwa 20 %) und das Enzym verliert seine enzymatische Aktivität erst bei 85°C vollständig. Im immobilisierten Zustand nimmt die Aktivität früher ab, schon ab 55°C, dafür war über den gesamten gemessenen Bereich eine Aktivität von 10 – 20 % festzustellen, auch bei 85°C war noch Aktivität vorhanden. Im immobilisierten Zustand ist also auch POD bei größeren Temperaturen noch aktiv, es ist allerdings noch nicht klar, warum der große Abfall in der Aktivität im immobilisierten Zustand früher eintritt als in Lösung.

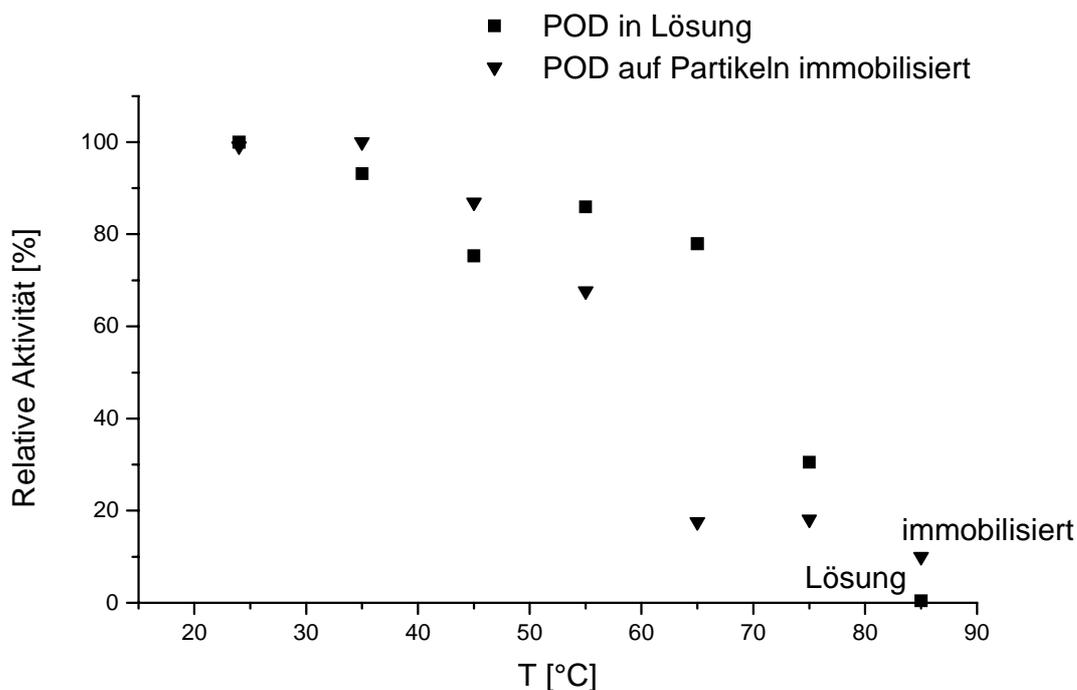


Abbildung 5.22 Aktivitätstest mit POD-Lösung (Quadrate) und auf PAH/PSS-beschichteten Partikeln immobilisierter POD (Dreiecke) nach 10 minütiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen.

pH-Stabilität von GOD

Die Aktivität von Enzymen kann generell stark von dem pH-Wert der Umgebung abhängen. Es wurde deshalb hier auch die Aktivität der immobilisierten GOD mit dem freien Enzym in

Lösung verglichen. Die Stabilität von immobilisierter POD im Vergleich zu POD in Lösung wurde nur in bezug auf die Temperaturstabilität untersucht, da POD über einen sehr großen pH-Bereich (pH 3 bis pH 11) eine hohe enzymatische Aktivität aufweist.

Die Werte für freie GOD wurden aus der Literatur entnommen [Avn, 1994]. Für diesen Test wurde das o-Dianisidin in Puffern verschiedener pH-Werte gelöst und anschließend wurde mit diesen Lösungen ein Aktivitätstest mit dem auf den Partikeln immobilisierten Enzym durchgeführt.

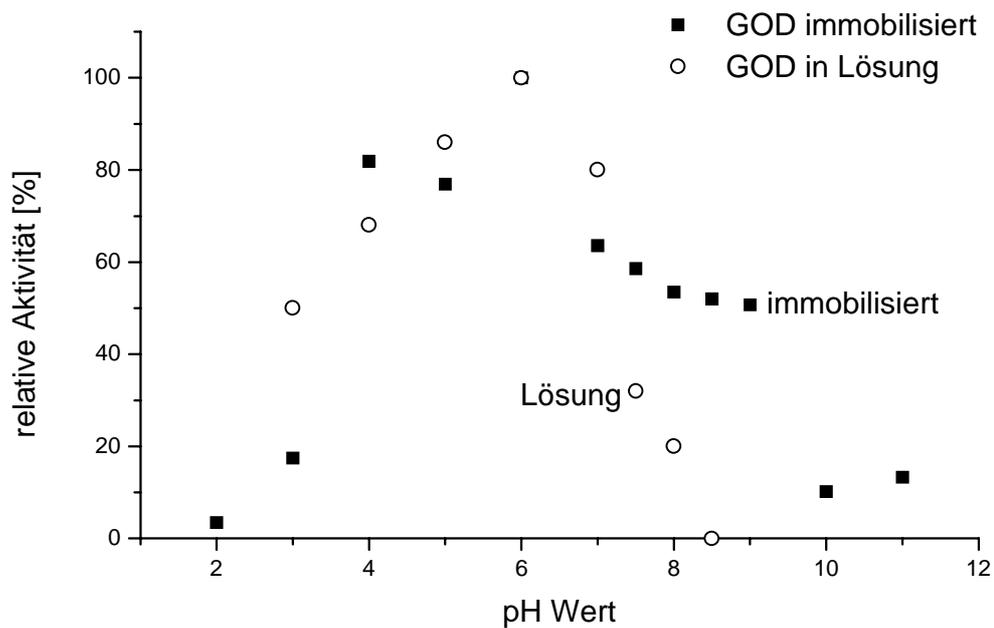


Abbildung 5.23 Aktivitätstest mit auf Partikeln immobilisierter GOD (aufgebracht aus MES-Puffer, pH 6,8; PAH als Polykation) bei verschiedenen pH-Werten. Die Aktivität des immobilisierten Enzyms (gefüllte Quadrate) bleibt auch bei höheren pH-Werten erhalten als die des Enzyms in Lösung (offene Kreise).

In Lösung zeigt GOD bei pH 5,8 die höchste Aktivität (Abbildung 5.23). Bei pH 3 sinkt die Aktivität auf etwa 50 % des Maximalwerts. Bei höheren pH-Werten verliert GOD sehr schnell an Aktivität, bei pH 8,5 ist keine Aktivität mehr zu detektieren. Immobilisiert ist das Enzym wesentlich stabiler gegenüber höheren pH-Werten. Bei pH 8,0 sind noch 50 % der Maximalaktivität vorhanden und selbst bei so extremen Bedingungen wie pH 11,0 sind noch 10 % der Aktivität zu beobachten. Es ist also Aktivität über einen größeren pH-Bereich detektierbar. Diese Ergebnisse stimmen sehr gut mit dem überein, was für andere Immobilisierungsarten, wie Sol-Gel-Prozesse, gefunden wurde [Sht, 1994, Avn, 1994].

5.4.2.4 Einfluß der äußeren Polyelektrolytschichten

Es ist bekannt, daß der Abstand zwischen zwei Enzymschichten wichtig sein kann, weil zum Beispiel nicht ausreichende Trennung zweier verschiedener Enzymschichten voneinander auf einem Filter bei einer sequentiellen Reaktion zu einem beträchtlichen Absinken der enzymatischen Aktivität führen kann [Lvo, 2000]. Deshalb wurde der Effekt der Trennschichten untersucht. Dazu wurde eine Schicht GOD auf einem PS-Latex immobilisiert. Anschließend wurden mehrere Schichten PAH und PSS auf diese Lage aufgebracht. Es wurde dann die enzymatische Aktivität in Abhängigkeit der außen aufgetragenen Schichten gemessen (Abbildung 5.24).

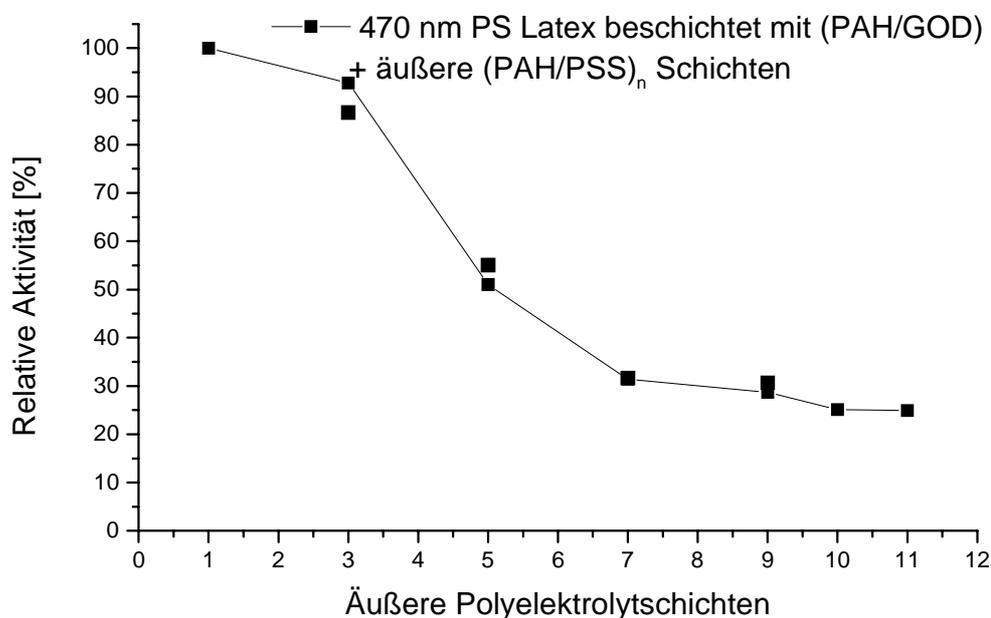


Abbildung 5.24 Relative Aktivität einer auf Partikeln immobilisierten Schicht GOD nach Auftragung äußerer Polyelektrolyt-Schichten (die nach Auftragung einer Polyelektrolytschicht gemessene Aktivität entspricht 100 %).

Die Aktivität nach der ersten Schicht Polyelektrolyt wurde bei dieser Messung gleich 100 % gesetzt, da bei dieser Beschichtung eine unbekannte Menge GOD abgelöst wird.

Die Beschichtung mit zwei Schichten Polyelektrolyt führt zu einer etwa 10 %igen Abnahme der enzymatischen Aktivität. Nach insgesamt fünf Polyelektrolytschichten sieht man eine starke Abnahme der Aktivität auf etwa 50 %. Diese Abnahme setzt sich fort bis zur siebten Schicht, wo noch etwa 30 % der ursprünglichen Aktivität zu beobachten sind. Bei den darauffolgenden Schichten ist nur noch eine geringe Abnahme der Aktivität zu beobachten.

Die Abnahme der enzymatischen Aktivität läßt sich auf zwei Hauptgründe zurückführen: Zum einen eine verlangsamte Diffusion der Substrate und Produkte durch die Schichten und zum anderen eine Blockade der aktiven Zentren des Enzyms.

Polyelektrolyte können sich innerhalb von Polyelektrolyt-Multischichten bis zu vier Schichten gegenseitig durchdringen [Lvo, 2000]. Daher können gerade die ersten Schichten zu einer Blockade der aktiven Zentren führen. Die darauffolgenden Schichten verdichten eher den Polyelektrolyt-Film und sorgen so für eine verlangsamte Diffusion der Substrate und Produkte. Diese verlangsamte Diffusion kann unter Umständen auch zu einer Veränderung der direkten Umgebung des Enzyms führen (z.B. zu einem leicht veränderten pH-Wert), welche dann die enzymatische Aktivität verlangsamt.

Die Polyelektrolyt-Schichten können auch durch ihre geladenen Gruppen als Puffersystem wirken und so lokal einen zu der Umgebung verschiedenen pH-Wert verursachen, der die enzymatische Aktivität beeinflussen kann.

5.4.3 Multi-funktionale Kolloide

Um die enzymbeschichteten Partikel in technischen oder medizinischen Anwendungen einsetzen zu können, ist es kostengünstiger, wenn diese mehr als einmal zu benutzen sind. Dazu ist es notwendig zu untersuchen, ob die enzymatische Aktivität auch nach einer erfolgten Reaktion noch vorhanden ist. Zusätzlich müssen sich die Partikel von dem Reaktionsgemisch nach erfolgter Reaktion wieder abtrennen lassen. Dieses kann durch Zentrifugation oder Filtration geschehen, was im Labor sehr einfach, in der technischen Anwendung allerdings unpraktisch ist.

Ein einfacherer Weg zur Abtrennung der Partikel ist das Einfügen einer magnetischen Funktion. Materialien mit magnetischer Funktionalität werden schon seit längerem in der Biotechnologie, bei Trennprozessen, Immuntests und der Immobilisierung von Proteinen eingesetzt [Dun, 1974; Hir, 1982; Uhl, 1989; Nak, 1991].

Um die Abtrennung der beschichteten Teilchen zu ermöglichen, wurden 200 nm PS-Latex Partikel verwendet, welche mit vier Schichten Fe_3O_4 -Nanopartikeln (Magnetit) und Poly(diallyldimethylammoniumchlorid) beschichtet waren [Car, 1999b]. Diese Partikel wurden mit weiteren zwei Polyelektrolytschichten und einer äußeren Schicht GOD beschichtet. Diese mit Hilfe der Layer-by-layer Technik hergestellten magnetischen und

enzymatisch aktiven Partikel können mit Hilfe eines Magneten am Boden des Reaktionsgefäßes oder der Küvette gesammelt werden.

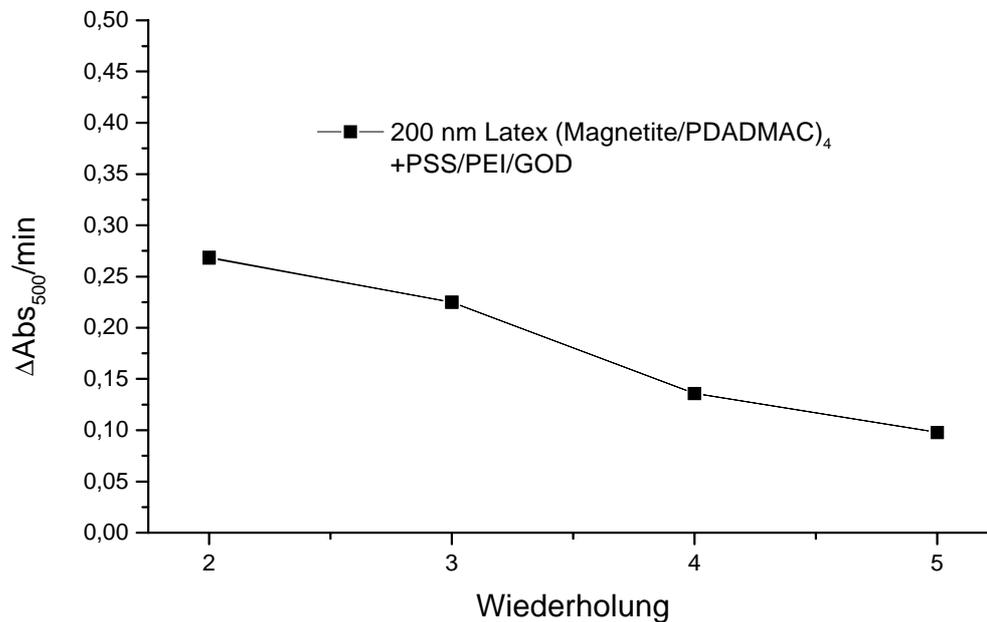


Abbildung 5.25 Aktivitätstest mit auf magnetische Partikel aufgebracht Schicht GOD. Nach jedem Test wurden die Partikel mit einem Magneten gesammelt und gewaschen.

Die enzymatische Aktivität der GOD auf den Partikeln wurde anschließend in einem Standardtest gemessen, dann wurden die Partikel mit einem Magneten gesammelt und fünf Mal mit Wasser gewaschen. Dieser Zyklus wurde fünfmal wiederholt. In Abbildung 5.25 ist zu sehen, daß es möglich ist, die Partikel wiederzugewinnen und daß dabei die Aktivität erhalten bleibt. Der Abfall in der Aktivität ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß die Rückgewinnung der Partikel mit Hilfe des Magneten nicht vollständig ist und so für jeden Test weniger Partikel zur Verfügung standen.

5.4.4 Aufbau von sequentiellen Multienzym-Polyelektrolyt-Schichten

Für einige mögliche Anwendungen kann eine Beschichtung mit zwei verschiedenen Enzymen von Vorteil sein, da mehr als ein Enzym für z. B. zweistufige Reaktionen benötigt werden kann. Da die Aktivität der beiden verwendeten Enzyme in einem gekoppelten Enzymtest nachgewiesen werden kann, lag es nahe, beide Enzyme auf dem gleichen Partikel zu immobilisieren und eine gekoppelte Reaktion durchzuführen. Dieses wurde auf planaren Substraten schon demonstriert [Ond, 1996a]. Es ist dann zwar nicht mehr möglich die Aktivität jedes einzelnen Enzyms zu bestimmen, da für eine solche Bestimmung alle anderen Komponenten im Überschuß vorliegen müssen. Hier sollte geprüft werden, ob es prinzipiell möglich ist, solche Filme mit zwei aktiven Enzymen zu erhalten.

5.4.4.1 Charakterisierung der Filme

ζ-Potential

Die einzelnen Schichten wurden genauso präpariert, als wenn nur ein einzelnes Enzym auf dem Partikel immobilisiert werden sollte. Die ζ -Potentiale (Abbildung 5.26) sind daher auch fast identisch mit denen, die man messen kann, wenn nur ein einzelnes Enzym immobilisiert wird. Das ζ -Potential für die POD/PSS-Schichten, die zuerst aufgebracht wurden, alternieren zwar, haben aber immer ein negatives Vorzeichen, wie es auch schon vorher beschrieben war. Das ζ -Potential für die anschließend aufgebrachten GOD/PEI-Schichten alterniert ebenfalls, aber nun mit positiven Vorzeichen, wie schon vorher für die GOD/PEI-Schichten beobachtet. Die beiden verschiedenen Enzymschichten sind durch zwei Schichten Polyelektrolyt getrennt. Die untere Lage Enzym scheint auch, zumindest in Bezug auf das ζ -Potential, keinen Einfluß auf die obere Lage zu nehmen, da nach den zwei Polyelektrolytschichten die ζ -Potentiale die gleichen Werte wie für die einzelnen Enzymsysteme aufwiesen.

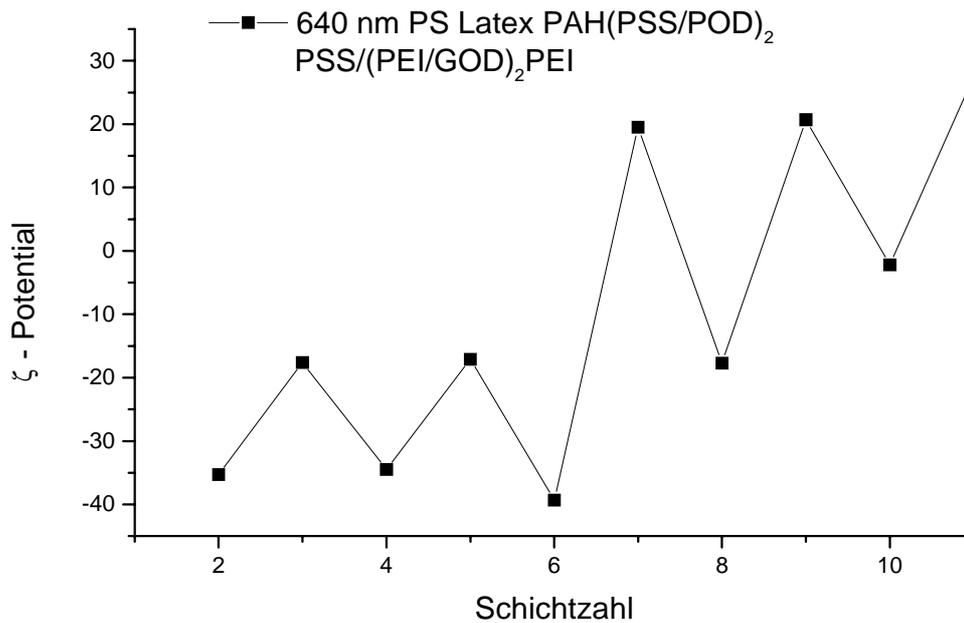


Abbildung 5.26 ζ -Potential-Messungen der PS Latices beschichtet mit PSS/POD und anschließend mit PEI/GOD. Das ζ -Potential gleicht demjenigen, das für Schichten nur eines Enzyms gemessen wurde.

Einzelteilchenlichtstreuung

Die Dicke der Schichten PAH/PSS/POD/PSS, aufgebracht auf PS Latex Partikel, wurde mit Hilfe der SPLS auf insgesamt 4 nm gemessen. Auf diese Schichten wurden die folgenden Schichten aufgebracht: PEI/GOD/PEI. Dieses führte zu einem weiteren Anwachsen in der Schichtdicke um insgesamt 4,6 nm (gemessen mit SPLS), so daß sich eine totale Filmdicke von 8,6 nm ergab. Diese Messungen bestätigen, daß ein schrittweiser Aufbau von verschiedenen Enzymschichten möglich ist.

Aktivitätsmessung

Wie schon oben erwähnt, ist es nicht möglich, die Aktivität jedes einzelnen Enzyms in einem Multienzymsystem mit einem gekoppelten Enzymtest zu bestimmen. Um die Aktivität eines einzelnen Enzyms zu bestimmen, müssen alle anderen Komponenten im Überschuß vorliegen. Wenn, wie hier, beide Enzyme auf einem Partikel immobilisiert sind, steht aber nur eine begrenzte Menge jedes Enzyms zur Verfügung. Für den Aktivitätstest brauchen nur die

Substrate Glucose und o-Dianisidin zu den Partikeln gegeben zu werden. Durch die gekoppelte Reaktion wird erst die Glucose von der GOD oxidiert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht. Dieses wird von der POD reduziert und gleichzeitig wird das o-Dianisidin oxidiert. Die Oxidation wird dann durch den Farbumschlag gemessen. Es liegen also nicht nur nicht alle Komponenten im Überschuß vor, sie müssen zum Teil auch noch durch einige Schichten diffundieren, um an den Reaktionsort zu gelangen. Dieses kann zusätzlich zu einer Verlangsamung der Reaktion führen.

Obwohl keine quantitative Aussage über die Aktivität eines einzelnen Enzyms gemacht werden kann, ist hier eine deutliche Aktivität meßbar (Abbildung 5.27). Die Absolutwerte sind wesentlich geringer, als bei den Aktivitätsmessungen für jedes einzelne Enzym. Es ist also möglich zwei aktive Enzyme auf einem Partikel zu immobilisieren und für gekoppelte Aktivitätstests zu nutzen.

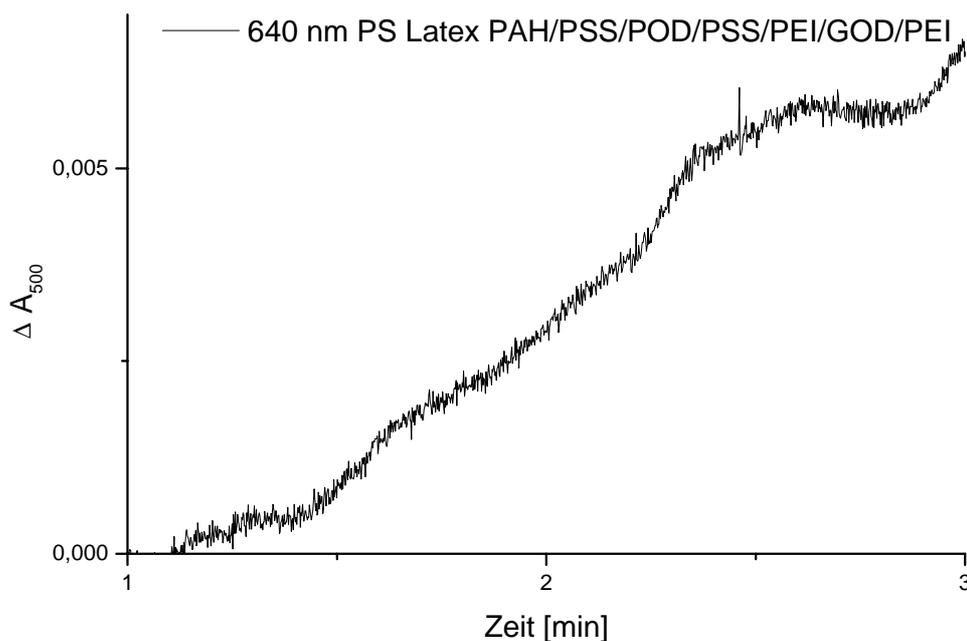


Abbildung 5.27 Aktivitätstest einer Partikellösung auf denen sowohl GOD (aufgebracht aus 50 mM Tris-Puffer pH 8,0) als auch POD (aufgebracht aus 50 mM NaAc-Puffer pH 5,8) immobilisiert sind. Es ist eine Aktivität zu erkennen, auch wenn der Absolutwert sehr gering ist.

5.4.5 Premixing –Experimente

Um das Problem zu überwinden, daß die nachfolgende Schicht Polyelektrolyt immer einen großen Teil des immobilisierten Enzyms ablöst, wurden Experimente durchgeführt, bei welchen das Enzym vor der Beschichtung in Lösung mit der doppelten Gewichtsmenge eines entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten vorkomplexiert wurde („Premixing“). Dieser Komplex hat dann die Ladung des Polyelektrolyten, da dieser im Überschuß dazugegeben wurde. Diese Experimente wurden schon zur besseren Adsorption von Farbstoffmolekülen und auch Proteinen auf flachen Substraten durchgeführt [Ari, 1997]. Da Polyelektrolyt/Polyelektrolyt-Schichten stabiler als Polyelektrolyt/Enzym-Schichten sind, war zu hoffen, daß auch die so gebildeten „Premix“-Polyelektrolyt-Schichten eine große Stabilität aufweisen. Es wurde zum einen GOD in 50 mM MES pH 6,0 mit PAH vorkomplexiert, was auf Grund des Überschusses an PAH zu einem positiv geladenen Komplex führte. Mit den positiv geladenen GOD/PAH-Komplexen wurden Filme alternierend mit PSS aufgebaut. Zum anderen wurde POD in 50 mM HEPES pH 6,8 mit der doppelten Menge PSS komplexiert, was auf Grund des PSS-Überschusses zu einem negativ geladenen Komplex führte. Diese negativ geladenen POD/PSS-Komplexe wurden alternierend mit PAH zu Multischichten aufgebaut.

5.4.5.1 Charakterisierung der Filme

UV/VIS-Spektroskopie

Es war hier nicht möglich, die absorbierte Menge des Enzyms mit Hilfe der UV/VIS-Spektroskopie zu bestimmen, da die in Lösung vorliegenden Komplexe so groß sind, daß sie das Licht erheblich streuen.

ζ-Potential

Die ζ-Potentiale der „Premix“-Systeme sind fast identisch mit denen, die man erwarten würde, wenn man nur die beiden Polyelektrolyte alleine zum Schichtaufbau verwenden würde. Sie alternieren von + 30 bis + 45 mV wenn Polykationen die äußere Schicht bilden,

wenn Polyanionen die äußere Schicht bilden, variieren sie zwischen -35 bis -50 mV (Abbildung 5.28). Die Schwankungen in den Werten sind meßtechnisch bedingt, wobei der experimentelle Fehler bei etwa $\pm 5 - 7$ mV liegt. Es lassen sich aber keine Unterschiede zwischen einer reinen Polyelektrolyt-Schicht und einer mit einem Enzym vorkomplexierten Polyelektrolyt-Schicht feststellen. Der Überschuß an Polyelektrolyt führt zu einer kompletten Kompensation der Ladungen am Enzym, und zusätzlich stehen noch genug Ladungen zur Verfügung, um dem Komplex eine Oberflächenladung zu geben, die dem reinen Polyelektrolyten entspricht.

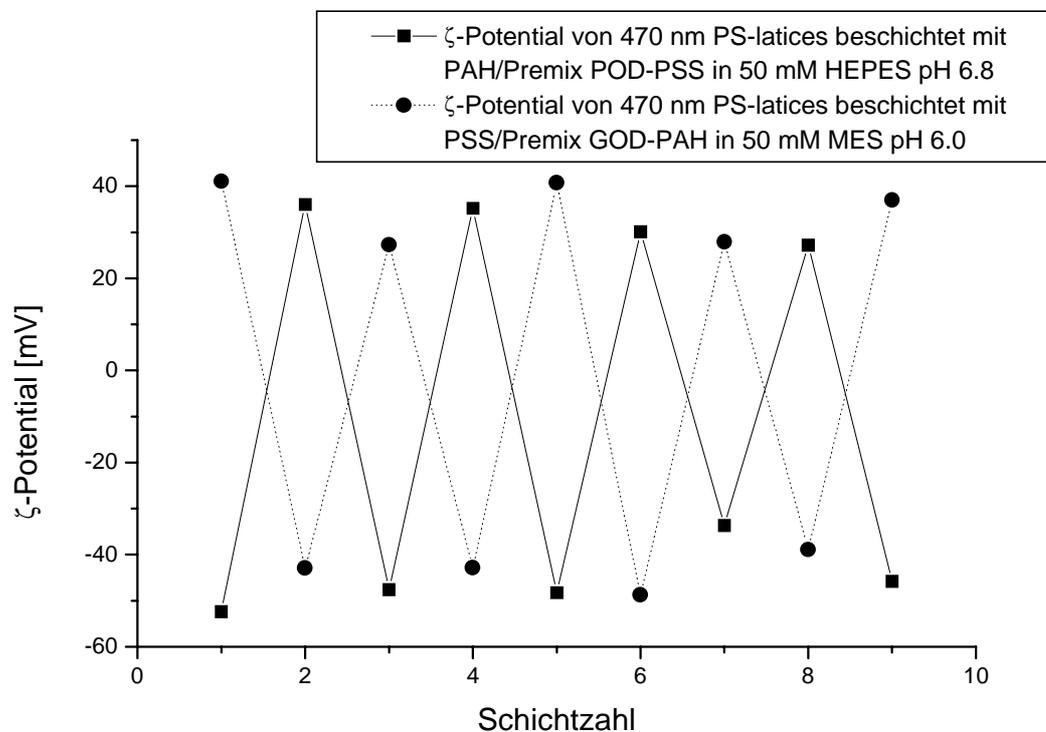


Abbildung 5.28 ζ -Potential-Messungen der PS Latices beschichtet mit (Premix GOD/PAH)/PSS (gestrichelte Linie) und (Premix POD/PSS)/PAH (durchgezogene Linie). Hier wurde die darunterliegende PAH-Schicht nicht berücksichtigt. Das ζ -Potential alterniert in jedem Fall. Die Werte gleichen denen, die für reine Polyelektrolyt-Schichten gemessen werden.

5.4.5.2 Filmstruktur

In Abbildung 5.29 ist eine rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Premix(GOD/PAH)/PSS-Films abgebildet. Dieser Film weist eine sehr kompakte Struktur ohne erkennbare Poren auf. Die abgebildeten Erhebungen von etwa 20 – 30 nm könnten die komplexierten Enzyme sein, wobei dieses nicht eindeutig zu beweisen ist. Der Film weist eine große Ähnlichkeit zu den unkomplexierten GOD/PAH-Filmen auf (Abbildung 5.16). Es scheint also keinen Einfluß auf die Filmstruktur zu haben, ob GOD und PAH erst im Film Komplexe bilden, oder ob sie schon vorher in Lösung vorkomplexiert werden. Das PSS, welches die Zwischenlage bildet, scheint auf die Struktur des Films keinen großen Einfluß zu haben. Es muß an Hand weiterer Messungen festgestellt werden, ob diese Ähnlichkeit in der Filmstruktur auch ein ähnliches Verhalten bezüglich der enzymatischen Aktivität bedingt.

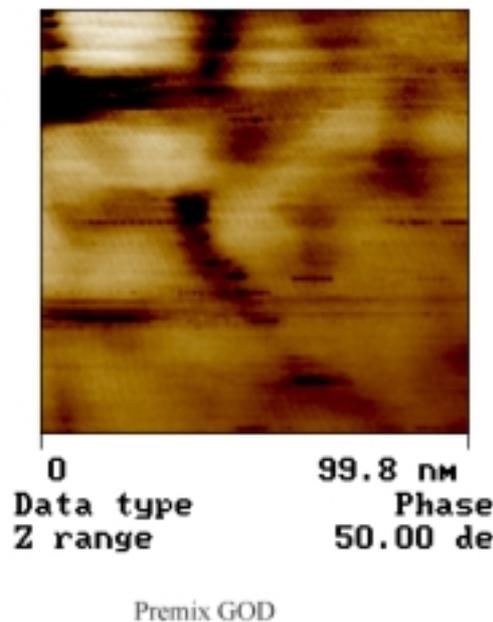


Abbildung 5.29 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme der Partikeloberfläche, die mit Premix (GOD/PAH)/PSS beschichtet ist. Es ist eine kompakte Filmstruktur erkennbar, die der von GOD/PAH-Schichten ähnelt.

In Abbildung 5.30 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Partikeloberflächen abgebildet, die in der linken Spalte von oben nach unten mit ein bis vier Schichten (PremixGOD/PAH)/PSS beschichtet sind, in der rechten Spalte sind gleiche Aufnahmen mit (PremixPOD/PSS)/PAH-Schichten abgebildet. Bei beiden Reihen ist ein deutlicher Anstieg in der Oberflächenrauigkeit pro aufgebracht Schicht zu erkennen. Bei

dem (PremixPOD/PSS)/PAH-Schichten ist die Oberflächenrauigkeit größer als bei den (PremixGOD/PAH)/PSS-Schichten. Wenn Partikel dieses Durchmessers nur mit Polyelektrolyten oder nicht vorkomplexierten Proteinen beschichtet werden, ist es normalerweise bei einer vergleichbaren Schichtzahl nicht möglich, eine Oberflächenrauigkeit mit einem Transmissionselektronenmikroskop darzustellen. Diese Aufnahmen zeigen also, daß die Komplexe nicht völlig auf der Oberfläche spreiten, wenn sie auf Latexpartikel aufgebracht werden, sondern, daß sie in gewissem Maße ihre Form erhalten. Auf diese Weise lassen sich sehr rauhe Oberflächen erzeugen.

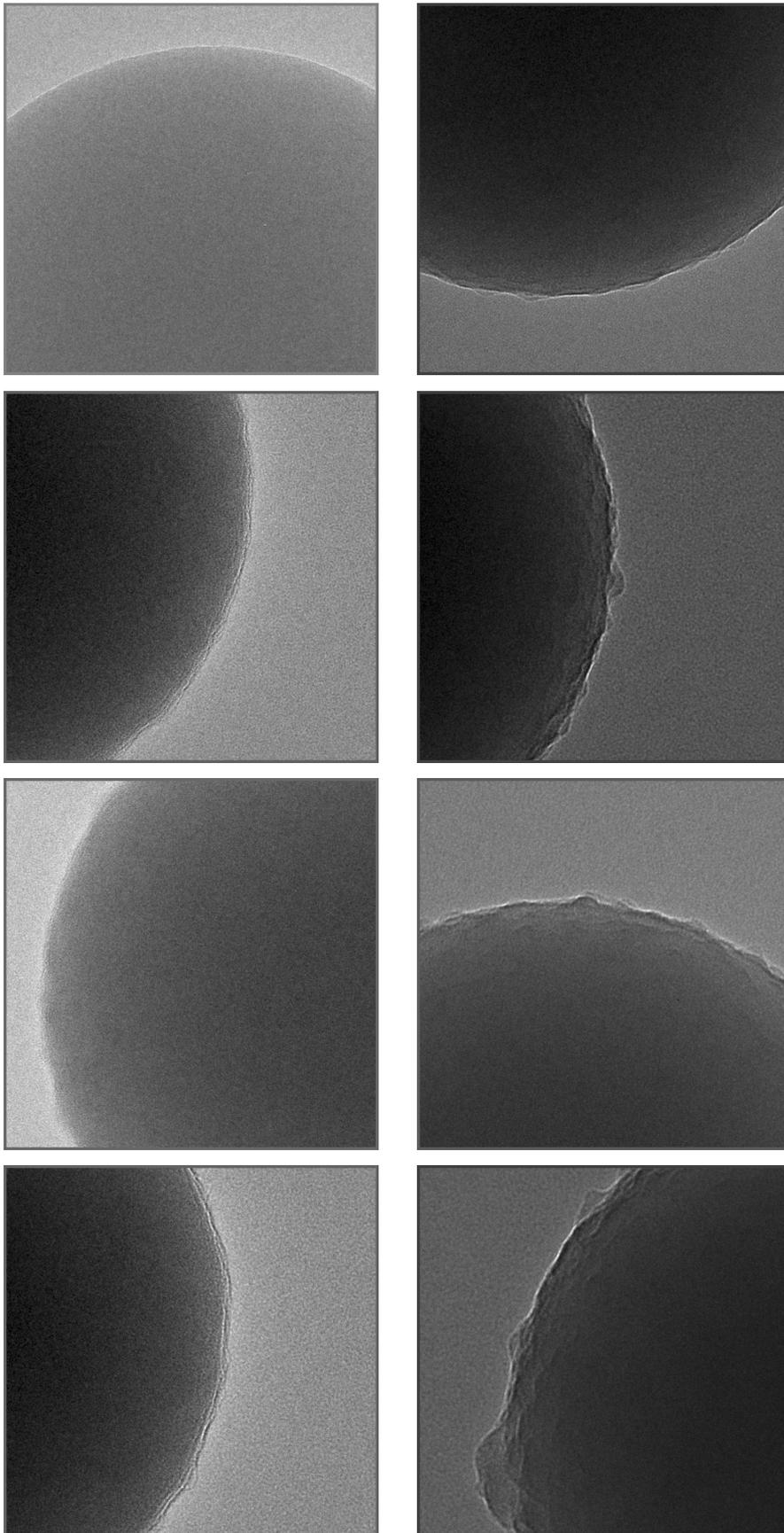


Abbildung 5.30 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Partikeloberflächen, die links mit von oben nach unten 1-4 Schichten ((Premix GOD/PAH)/PSS) und rechts mit 1-4 Schichten ((Premix POD/PSS)/PAH) beschichtet sind.

Einzelteilchenlichtstreuung

In Tabelle 4.3 sind die mit SPLS gemessenen Schichtdicken der Premix-Enzym/Polyelektrolyt-Schichten aufgeführt. Es wurde immer jede zweite Schicht gemessen. Es wurden die Schichtdicken für GOD und POD Komplexe gemessen. Wie bei den Messungen für die unkomplexierten Enzymschichten steigen auch hier die Werte stetig an und beweisen so das schrittweise Wachstum der Schichten. Die Schichten sind, wie zu erwarten war, dicker als wenn die Enzyme ohne vorherige Komplexierung aufgebracht worden wären. Sie liegen mit im Durchschnitt 2,9 nm für die GOD-Komplexe und 2,1 nm für die POD-Komplexe in den Bereichen, die für eine Schicht Enzym plus Schicht Polyelektrolyt erwartet werden. Die Schichtdicke ist immer noch geringer, als es für eine Schicht bei vollständiger Bedeckung erwartet werden würde, aber da aus den oben gezeigten Transmissionselektronenmikroskopbildern hervorgeht, daß die Oberfläche sehr rauh ist, und da die Komplexe stark geladen sind, wird auch keine dichte Packung der Komplexe erwartet werden können. Die Methode der SPLS mittelt zudem über den Durchmesser eines Partikels, man bekommt den Wert der mittleren Schichtdicke und nicht den Maximaldurchmesser. Bei dieser Art der Beschichtung wird mit der folgenden Schicht Polyelektrolyt nichts von der darunterliegenden Schicht abgelöst. Auch hier sind gerade bei den ersten Schichten wieder Unregelmäßigkeiten im Wachstum zu erkennen.

((Premix PAH/GOD)/PSS) _n in 50 mM MES Puffer pH 6,0 auf 470 nm PS Latex		(PAH/(Premix PSS/POD)) _n in 50 mM HEPES Puffer pH 6,8 auf 470 nm PS Latex	
Schichtzahl	Schichtdicke [nm]	Schichtzahl	Schichtdicke [nm]
1	2,8	2	4,0
3	11,6	4	6,1
5	16,4	6	11,7
7	20,3	8	16,8

Tabelle 5.3 Schichtdicken von Polyelektrolyte/Enzym-Premix Schichten aufgebracht auf negativ geladene PS Latex Partikel. Die Schichtdicken wurden mit SPLS gemessen. Es ist in allen Fällen ein Anstieg in der Schichtdicke zu erkennen.

Aktivitätsmessungen

Die Aktivitätsmessungen der mit Polyelektrolyt-Enzym-Komplex/Polyelektrolyt beschichteten Latex Partikel (Abbildung 5.31 für GOD, bzw. Abbildung 5.32 für POD) zeigen, daß die absolute Aktivität im Vergleich zu den reinen Enzym/Polyelektrolyt-Schichten deutlich geringer ist. Dabei macht es keinen Unterschied, welches Enzym auf diese Weise immobilisiert wurde. Daß die Aktivität hier gering ist, hat zwei Gründe. Zum einen zeigen die Komplexe in Lösung schon weniger Aktivität als das freie Enzym (die Enzyme verlieren durch die Komplexierung 60 bis 70 % ihrer ursprünglichen Aktivität, siehe auch 5.4.5.3), zum anderen ist an Hand der rasterkraftmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 5.29) zu erkennen, daß die Filmstruktur sehr dicht ist und so die Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle hemmt. Eine vergrößerte Stabilität der Schichten hat also in diesem Fall den Nachteil, daß die absolute Aktivität erniedrigt wird und so entweder mehr Schichten aufgebracht werden müssen (was nur bis zu einer bestimmten Schichtzahl zu einem deutlichen Anstieg in der enzymatischen Aktivität führt), oder mehr Partikel eingesetzt werden müssen, um die gleiche Absolutaktivität zu erreichen.

Die enzymatische Gesamtaktivität steigt trotzdem bis zu fünf Doppelschichten für beide Enzyme an. Es ist aber schwer, den Verlauf der Kurven mit denen für unkomplexierte Enzymschichten zu vergleichen, da die absolute Aktivität schon in Lösung wesentlich geringer ist.

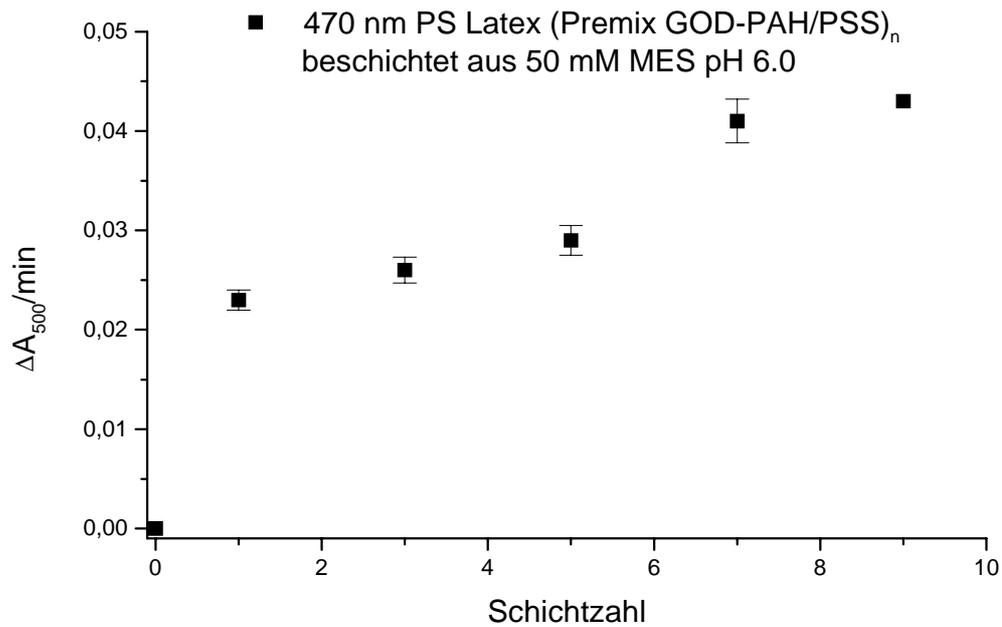


Abbildung 5.31 Aktivitätstest einer Partikellösung die mit Premix (GOD/PAH)/PSS beschichtet ist. Die Aktivität steigt pro aufgebrauchte Enzymschicht an.

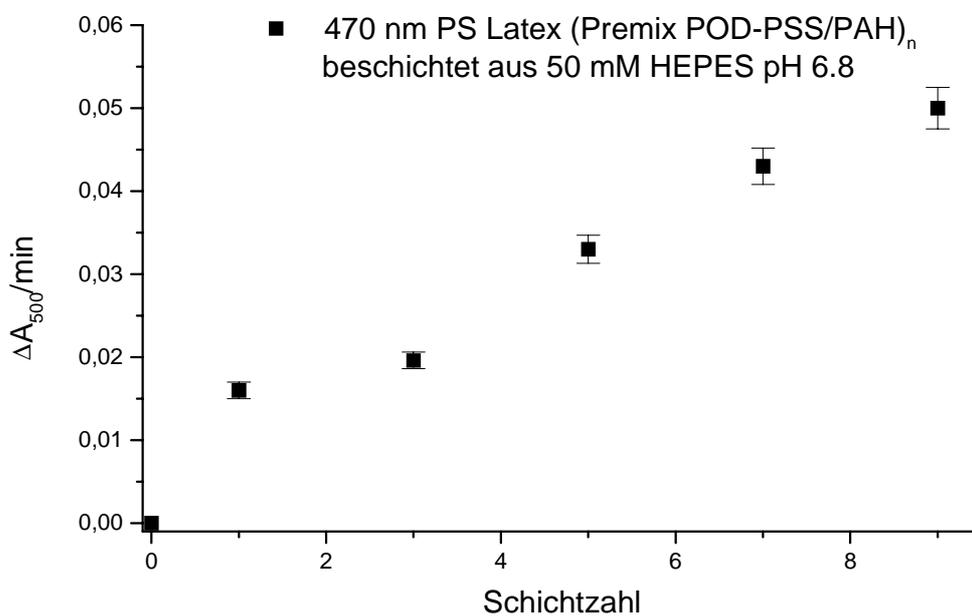


Abbildung 5.32 Aktivitätstest einer Partikellösung die mit Premix (POD/PSS)/PAH beschichtet ist. Auch hier steigt die enzymatische Aktivität stetig.

5.4.5.3 Einfluß der äußeren Polyelektrolytschichten

Es sollte geprüft werden, ob zum einen das Vorkomplexieren der Enzyme und zum anderen außen auf die Premix-Enzym-Schichten aufgebrauchte Polyelektrolyt-Schichten Einfluß auf die Aktivität haben.

Als erstes wurde gemessen, wie sich die Aktivität verhält, wenn erstens eine bestimmte Menge reines Enzym gelöst wird, wenn zweitens die doppelte und drittens die zehnfache Menge entgegengesetzt geladener Polyelektrolyt dazu gegeben wird. Es wurde sowohl für GOD als auch für POD gemessen, daß die Aktivität bei Zugabe von Polyelektrolyt um 60 bis 70 % abnimmt. Der Polyelektrolyt scheint die aktiven Zentren des Enzyms zu blockieren, so daß die Substratmoleküle nicht mehr an das aktive Zentrum gelangen können. Es macht keinen Unterschied, ob die zweifache oder die zehnfache Menge an Polyelektrolyt dazugegeben wird, was darauf schließen läßt, daß schon die zweifache Menge ausreicht, das Enzym zu umschließen und weitere Zugabe das Verhalten nicht mehr verändert. Daraus folgt, daß die Enzymaktivität in dem System generell 60 – 70 % niedriger ist, als wenn das Enzym in nicht vorkomplexierter Form vorliegt.

Wenn diese Komplexe jetzt auf die Partikel aufgebracht werden, ist die Aktivität geringer, wenn man eine Schicht mit derselben unkomplexierten, immobilisierten Enzymmenge vergleicht. Das schichtweise Immobilisieren reduziert die enzymatische Aktivität also nicht in dem Maße, wie es eine Vorkomplexierung in Lösung mit dem gleichen Polyelektrolyten tut. Das spricht dafür, daß die Konformation des Enzyms erhalten bleibt, sobald es auf der Partikeloberfläche immobilisiert ist.

Der Vorteil der vorkomplexierten Schichten besteht also darin, daß beim Aufbringen der nächsten Polyelektrolytschicht kein Enzym abgelöst wird, da sich die Schichten wie reine Polyelektrolyt-Schichten verhalten.

Im folgenden wurde untersucht, wie äußere Polyelektrolytschichten die Aktivität beeinflussen. Es wurde ein Experiment analog dem für die reinen GOD-Schichten gemacht. Nachdem zwei Polyelektrolytschichten auf die vorkomplexierte Enzymschicht aufgebracht waren, sank die Aktivität um 80 % des Ausgangswertes, und nach insgesamt vier äußeren Schichten war keine Aktivität mehr zu detektieren. Die außen aufgebrauchten Polyelektrolyt-Schichten blockieren die verbleibenden zugänglichen aktiven Zentren der Enzyme. Eine eingeschränkte Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle ist bei einer so kleinen Schichtzahl nur in geringem Ausmaß anzunehmen, da ansonsten auch bei den nicht vorkomplexierten Schichten ein ähnlich schneller Abfall in der Aktivität zu erwarten wäre. Da

dort der Abfall wesentlich langsamer ist und immer eine gewisse Restaktivität meßbar ist, kann nur die Blockade der aktiven Zentren zu diesem starken Abfall führen.

5.4.6 Diskussion

In dem vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, daß ein Aufbau von Enzym-Multischichten auf kolloidalen Templaten mit Hilfe der elektrostatischen *Layer-by-layer Self-Assembly* Technik möglich ist [Sch, 2000]. Der Schichtaufbau wurde zuerst indirekt über Mikroelektrophorese nachgewiesen, wobei Proteine je nach Meßbedingungen nicht zu einer vollständigen Ladungsumkehr der Partikeloberfläche führen müssen. Über direkte Methoden wie die UV/VIS-Spektroskopie und vor allem die Einzelteilchenlichtstreuung konnte bewiesen werden, daß eine schrittweise Adsorption der Schichten erfolgt. An Hand der Einzelteilchenlichtstreuung konnte auch gezeigt werden, daß die beiden gewählten Enzyme keine dichte Monolage ausbilden. Bei diesen, unter den Beschichtungsbedingungen so stark geladenen Enzymen, kann auf Grund der Abstoßung der Moleküle untereinander aber auch keine dichte Packung erwartet werden [Lvo, 2000]. Bei der Adsorption dieser Enzyme auf flachen Substraten wurden Schichtdicken von mehr als einer Monolage gefunden [Lvo, 1995b; Ond, 1996b]. Da die Substrate aber während der Präparation getrocknet wurden, ist hier auch eine unspezifische Adsorption denkbar.

Es wurde aber auch gezeigt, daß diese Enzymschichten, wenn sie die äußere Schicht bilden, nicht so stabil sind, wie andere Polyelektrolytschichten. Die Wechselwirkung zwischen dem Enzym und einem freien Polyelektrolyten ist in vielen Fällen größer, als die Wechselwirkung zwischen Enzym und der Partikeloberfläche. Daher führte die Aufbringung der folgenden Polyelektrolytschicht zu einer teilweisen Ablösung der Enzymschicht. Es verblieb aber immer genug Enzym auf der Partikeloberfläche, um ein weiteres Schichtwachstum zu ermöglichen. Die Tatsache, daß nicht alles Enzym abgelöst wurde, kann auf die ungleiche Ladungsverteilung im Enzym zurückgeführt werden, mit der sich, bei verschiedenen Lagen des Enzyms, eine unterschiedlich starke Adsorption an der Partikeloberfläche erklären läßt.

Die beiden untersuchten Enzyme unterscheiden sich beim Schichtaufbau nicht in ihrem Verhalten [Car, 2000].

Alle untersuchten Enzymschichten zeigen auch enzymatische Aktivität. Es wurde gezeigt, daß die Aktivität nicht durch die Immobilisierung vermindert wird. Pro aufgebrachtener Enzymschicht erfolgte ein Anwachsen der Aktivität, wobei der Anstieg aber mit der

Filmstruktur verknüpft ist. Diese wiederum hängt unter anderem von dem für die Zwischenschicht gewählten Polyelektrolyten ab. Eine dichte Filmstruktur hemmt die Aktivität. Diese Hemmung kann auf mehreren Effekten beruhen: Einer Blockierung der aktiven Zentren des Enzyms, einer Erschwerung der Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle oder eine Veränderung der direkten Umgebung des Enzyms, z.B. durch unterschiedliche Eigenschaften der Polyelektrolyte hinsichtlich ihrer Puffereigenschaften und Dissoziationskonstanten der geladenen Gruppen.

Die Anzahl der Zwischenschichten hat auch einen Einfluß auf die Aktivität. Eine Aufbringung von weiteren Polyelektrolytschichten auf eine Enzymschicht führt zu einer Abnahme der Aktivität. Dieses geschieht in erster Linie, weil die aktiven Zentren des Enzyms blockiert werden. Die Diffusion der Substrat- und Produktmoleküle kann aber auch eingeschränkt sein.

Eine Immobilisierung der Enzyme kann auch eine erhöhte Stabilität der Enzyme mit sich bringen. So wurde gezeigt, daß immobilisierte GOD noch bei höheren Temperaturen und über einen weiteren pH-Bereich enzymatische Aktivität zeigt als das freie Enzym. Dieses Verhalten wurde auch schon für auf flachen Substraten immobilisierte GOD gezeigt [Sht, 1994; Avn, 1994]. Dieser Stabilitätszuwachs läßt sich zum einen durch eine Stabilisierung der aktiven Konformation des Enzyms in der Polyelektrolytmatrix erklären. Zum anderen könnten die Polyelektrolyte aber auch, wie schon oben erwähnt, Puffereigenschaften haben und so die pH-Wert-Schwankungen abfedern. Eine Konformationsstabilisierung ist aber die wahrscheinlichere Erklärung, da auch in einer SiO₂-Matrix immobilisierte GOD eine erhöhte Stabilität aufweist [Avn, 1994] und hier die Matrix keine Puffereigenschaften aufweist.

Um die Stabilität der Enzymschichten zu verbessern, wurden die Enzyme vorher mit einem Polyelektrolyten komplexiert. Diese mit diesen Komplexen geformten Schichten zeichnen sich durch ihre große Stabilität aus. Es wurde auf der anderen Seite aber der Nachteil einer verringerten Aktivität gefunden. Im Gegensatz zu den in der Literatur [Ari, 1997] gefundenen Daten zeigen diese Komplexe sowohl in Lösung (eigene Ergebnisse, noch nicht veröffentlicht), als auch im Film immobilisiert eine geringere enzymatische Aktivität als die unkomplexierten Enzyme. Da eine Komplexierung zu einer schlechteren Zugänglichkeit der aktiven Zentren führt, ist dieses Verhalten auch leicht verständlich. Die Abnahme der enzymatischen Aktivität wird vermutlich daher kommen, daß einige Enzyme noch voll funktionstüchtig sind, während bei anderen die aktiven Zentren total blockiert sind.

Die erhaltenen Filme weisen auch eine sehr kompakte Struktur auf. Die verwendeten Enzyme sind in ihrer Konformation so stabil, daß der Zugewinn an Konformationsstabilität keine so

große Rolle spielen sollte. Daß in der Literatur entgegengesetzte Ergebnisse gefunden wurden, kann auch an den unterschiedlichen Testverfahren liegen. Die dort angewendeten Testverfahren erfordern ein Ablösen der Enzyme von den flachen Substraten, da sonst ein Diffusionsgradient der Substrate und Produkte das Ergebnis verfälschen könnte. Die Prozedur des Ablöses der Enzyme (meist durch Ultraschall) kann zu einem Aktivitätsverlust führen, der bei einer Komplexierung mit Polyelektrolyten geringer ausfallen kann. Der Vorteil der erhöhten Filmstabilität wird also durch eine verringerte Aktivität wieder ausgeglichen. Welche Variante der Immobilisierung angewendet werden sollte, hängt daher also von der jeweiligen Anwendung ab.

5.5 Spezifische Erkennung

Die in dem vorigen Kapitel beschriebenen Enzymschichten haben das Problem der nicht sehr starken Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Partikeloberfläche und daraus folgend einer verringerten Stabilität und Beladung. Um diese Probleme zu lösen, kann eine andere Möglichkeit, definierte dünne Protein-Multischichten aufzubauen, angewendet werden. Diese besteht darin, statt elektrostatischer Anziehungskräfte zwischen den Schichten spezifische Erkennungsreaktionen der Proteinmoleküle untereinander auszunutzen. Durch die hohen Bindungskonstanten solcher spezifischen Wechselwirkungen sollte sich sowohl die Stabilität als auch die Beladung verbessern lassen.

Eine gut charakterisierte und schon häufig zur Anwendung gebrachte Wechselwirkung ist die zwischen den Proteinen Avidin (aus Hühner-Eiweiß) bzw. Streptavidin (aus *S. avidinii*) mit Biotin (Vitamin H) [Cas, 1998; Anz, 1999; Ani, 1999; Per, 1999; Bla, 1999]. Die biologische Bedeutung der hohen Affinität von Avidin bzw. Streptavidin zu Biotin ist, obwohl schon seit geraumer Zeit bekannt und auch in der Biotechnologie häufig angewandt, noch nicht aufgeklärt. Wenn das Biotin kovalent an Enzyme gekoppelt ist, lassen sich Multischichten nach dem folgenden Muster aufbauen: ((Polyelektrolyt)_n/Avidin/Biotin-gekoppeltes Enzym)_n. Im folgenden wurde hier der Schichtaufbau mit Avidin und biotinylierter GOD näher untersucht, da so gute Vergleiche zu Schichten, die über elektrostatische Wechselwirkungen aufgebaut wurden, gemacht werden konnten.

Eine weitere schon länger bekannte und gut untersuchte Wechselwirkung ist die zwischen Lectinen und sowohl Zuckern, als auch Glycoproteinen. Sowohl GOD als auch POD gehören zu den Glycoproteinen, d. h. sie haben kovalent Zuckerreste an die Aminosäurekette gebunden. Lectine sind zur Erkennung von Blutgruppenfaktoren nötig. Verschiedene Blutgruppen unterscheiden sich durch unterschiedliche Zuckerreste, Lectine können diese spezifisch erkennen und binden. Diese Wechselwirkung wurde schon früher zum Schichtaufbau auf flachen Substraten benutzt [Lvo, 1995a; Lvo, 1996; Anz, 2000]. In dieser Arbeit wurde diese Wechselwirkung ausgenutzt, um Enzymschichten auf Partikeloberflächen aufzubringen.

5.5.1 Avidin-Biotin-GOD-Schichten

Im folgenden wurden Multischichten bestehend aus zwei Schichten Polyelektrolyt als Precursor-Schichten, Avidin und biotinylierter GOD untersucht. Das Biotin ist dabei kovalent über eine Amidocaproyl-Bindung an die GOD gebunden. Die Wechselwirkung, die das Avidin an die Polyelektrolyt-Schichten bindet, ist hauptsächlich elektrostatischer Natur. Die Bindung zwischen dem Avidin und der Biotin-GOD ist eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Avidin und dem Biotin-Rest. Diese spezifische Bindung ist mit einer Bindungskonstante von etwa 10^{15} M^{-1} eine der stärksten bekannten Bindungen. Um die elektrostatischen Wechselwirkungen gering zu halten wurde die Beschichtung mit Biotin-GOD nahe dem isoelektrischen Punkt des Enzyms durchgeführt.

Einzelteilchenlichtstreuung

Bevor mit dem System Multischichten aufgebaut wurden, die zu katalytischen Zwecken verwendet werden konnten, sollte zunächst abgeklärt werden, wie groß die Schichtdicke jeder Einzelschicht ist. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.4 dargestellt. Die für Avidin gemessene Schichtdicke von 8,5 nm ist im Bereich einer Monolage. Die Moleküldimension beträgt etwa $8,0 \times 8,0 \times 8,5 \text{ nm}$ [Pug, 1994]. Die Schichtdicke der biotinylierten GOD beträgt 4,1 nm, was immer noch weniger als eine kompakte Monolage wäre. Die Moleküldimensionen betragen für das nicht biotinylierte Enzym etwa $6,6 \times 6,6 \times 21,4 \text{ nm}$ [Hec, 1993]. Es ist auf Grund der Molekülstruktur aber auch möglich, daß die einzelnen GOD-Moleküle sich nicht dicht packen, so daß diese Schichtdicke einer Monolage sehr nahe kommt. Die Schichtdicke ist in jedem Fall wesentlich größer, als sie nach einem Schichtaufbau über elektrostatische Wechselwirkungen gemessen wurde (vgl. 5.4.2.1). Diese Enzymschicht ist auch stabiler, als die durch elektrostatische Wechselwirkungen aufbrachten Schichten. Eine nachfolgend aufbrachte Schicht Polyelektrolyt löst kein Enzym der darunterliegenden Schicht ab, sondern führt zu einem weiteren Anwachsen der Schichtdicke um etwa 1 nm, was der normalen Schichtdicke für eine Polyelektrolytschicht entspricht.

Es wurde zudem sichergestellt, daß der Schichtaufbau hauptsächlich auf spezifische Interaktionen zurückzuführen ist und nicht an den veränderten Bedingungen wie pH-Wert oder Puffer oder der anderen darunterliegenden Schicht liegt. Dazu wurde in einem Kontrollexperiment unter den gleichen Bedingungen nicht biotinylierte GOD eingesetzt. Hier konnte nur ein minimaler Zuwachs in der Schichtdicke von weniger als einem nm gemessen

werden. Dieses Experiment beweist zum einen, daß die Hauptwechselwirkung spezifischer Art ist und daß ein pH-Wert nahe des isoelektrischen Punkts nicht geeignet ist, um einen Schichtaufbau mit GOD basierend auf elektrostatischen Wechselwirkungen durchzuführen.

Art der Schicht	Gesamtschichtdicke in nm	Zuwachs in nm
PAH/PSS	1,3	1,3
Avidin (in 50 mM NaAc pH 5,1)	9,8	8,5
Biotin-GOD (in 50 mM NaAc pH 5,1)	13,9	4,1
PAH	14,8	0,9
GOD in 50 mM NaAc pH 5,1	10,8	1,0

Tabelle 5.4 Schichtdicke von verschiedenen Enzym- und Polyelektrolyt-Schichten aufgebracht unter verschiedenen Beschichtungsbedingungen auf negativ geladene PS Latex Partikel. Die Schichtdicke wurde mit SPLS gemessen.

In weiteren Experimenten wurde dann mit dem System (PAH/PSS/Avidin/biotinylierte GOD)_n Multischichten aufgebaut (Abbildung 5.33). Dabei stellte sich heraus, daß der oben gewählte pH Wert von 5,1 , der nahe dem isoelektrischen Punkts von GOD liegt (4,2), dazu führt, daß nicht genug Ladungen vorhanden sind, um eine stabile Dispersion zu gewährleisten, wenn GOD die äußere Schicht bildet. Beim Aufbringen der ersten Schicht ist die Stabilität noch groß genug, um die Schichten vermessen zu können. Eine Erklärung dafür ist, daß die Ladungen der darunterliegenden Schichten zum Teil noch zugänglich sind, bei Aufbringung weiterer Schichten aber war die Aggregation und Flockulation zu groß, um eine Messung durchführen zu können. Um eine größere Stabilität zu erreichen wurde der pH-Wert bei der Beschichtung mit biotinylierter GOD auf 8,1 erhöht. Bei diesem pH-Wert ist das Enzym stark negativ geladen und gewährleistet so eine Stabilität der Dispersion. Unter diesen Bedingungen wurden Multischichten aufgebaut, deren Schichtdickenmessung mit Hilfe der Einzelteilchenlichtstreuung in Abbildung 5.33 dargestellt ist. Man kann einen nahezu linearen Anstieg in der Schichtdicke erkennen. Da die Polyelektrolytschichten nichts von dem darunterliegenden Enzym ablösen, ist der Schichtaufbau auch regelmäßiger, als wenn die Schichten nur durch elektrostatische Wechselwirkungen aufgebaut werden. Die Schichtdicken der Multischichten sind der einzeln vermessenen Schicht sehr ähnlich. Der pH-Wert hat also

keinen Einfluß auf die Schichtdicke. Daraus kann man sehen, daß der Schichtaufbau hauptsächlich über spezifische Wechselwirkungen abläuft.

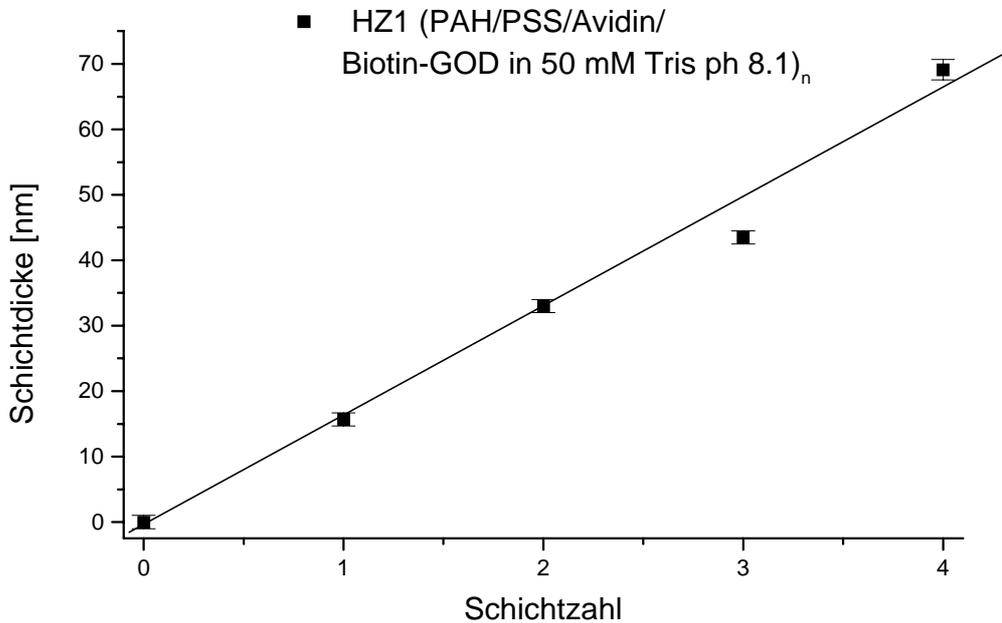


Abbildung 5.33 Schichtdickenmessung der mit Hilfe von spezifischer Wechselwirkung aufgebauten Multischichten. Es ist ein regelmäßiger Schichtdickenzuwachs zu erkennen.

Aktivitätsmessungen

Bei den Aktivitätsmessungen der mit Avidin/biotinylierter GOD beschichteten Partikeln konnte, wie in Abbildung 5.34 gezeigt, ein stetiger Anstieg der Aktivität mit der Schichtzahl festgestellt werden. Auch hier wurde für jede Messung die gleiche Zahl an Partikeln genommen, wobei der Fehler mit steigender Schichtzahl ansteigt, da die Aggregation zunimmt und sich die Teilchenzahl nicht mehr so exakt mit der SPLS messen läßt. Trotzdem ist der Aktivitätsanstieg ziemlich groß. GOD ist auch in der biotinylierten Form sehr aktiv und die dicken Enzymschichten hindern die Substrat- und Produktmoleküle nicht so stark an der Diffusion, wie es gleich dicke Polyelektrolytschichten tun würden. Der sehr starke Anstieg bei der vierten Schicht liegt aber vermutlich daran, daß in dieser Probe schon eine große Zahl an Aggregaten vorliegt (>50%) und deswegen die Teilchenzahl nicht exakt berechnet werden kann. Die Aktivität der GOD in den Filmen (zumindest für die ersten Schichten, bei denen die Partikelzahl noch gut gemessen werden kann) entspricht in etwa den in Lösung gemessenen Werten.

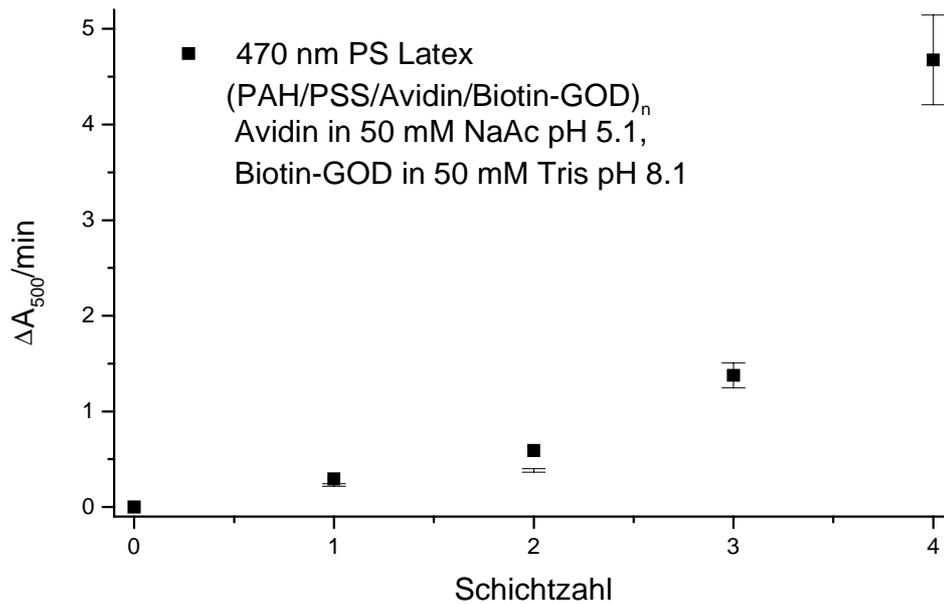


Abbildung 5.34 Aktivitätstest einer Partikellösung die mit PAH/PSS/Avidin/biotinylierter-GOD Multischichten beschichtet ist. Die enzymatische Aktivität steigt mit jeder aufgetragenen Schicht an.

Stabilität der Schichten

Die Stabilität der Enzymschichten, die durch spezifische Interaktionen aufgebaut wurden, gegenüber einer Ablösung durch Aufbringung der nächsten Polyelektrolytschicht, wurde dadurch getestet, daß auf eine äußere Schicht biotinylierte GOD eine Schicht Polyelektrolyt (PAH) aufgebracht wurde und anschließend ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt wurde. Bei Schichtaufbau über elektrostatische Wechselwirkungen führte dies zu einer Ablösung eines Teils des Enzyms und die Aktivität sank dementsprechend.

Bei dem hier durchgeführten Experiment ist die Aktivität auch nach dem Aufbringen einer zusätzlichen Schicht konstant (Abbildung 5.35). Das ist ein weiterer Beweis dafür, daß die so aufgebauten Schichten sehr stabil sind und eine außen auf die Enzymschicht aufgetragene Polyelektrolytschicht nicht zu einer Ablösung von Enzym führt.

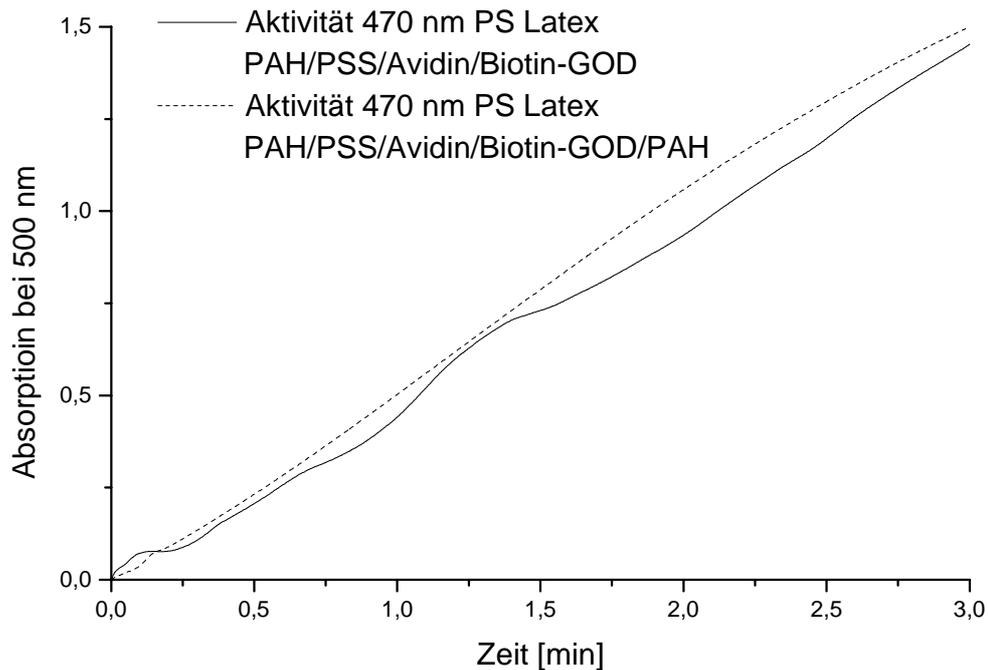


Abbildung 5.35 Überprüfung der Stabilität der mit Hilfe der Avidin-Biotin-Wechselwirkung aufgebauten Schichten. Die Aktivität bleibt nach Aufbringung einer äußeren Polyelektrolytschicht konstant.

Kompetitive Bindung

Bei dem Aufbringen einer Schicht biotinylierter GOD auf eine Schicht Avidin wurden zu der Enzymlösung 1 mg Biotin gegeben. Durch die Zugabe des freien Biotins wurde die Menge des immobilisierten Enzyms auf weniger als ein Fünftel der Menge im Kontrollexperiment ohne zugesetztes Biotin reduziert. Dieses wurde an Hand von Aktivitätsmessungen in Abbildung 5.36 bestimmt.

Das freie Biotin bindet leichter an das Avidin und blockiert damit die Bindungsstellen. Das Enzym kann jetzt nicht mehr über die spezifischen Wechselwirkungen binden.

Die gemessene restliche Enzymaktivität kommt daher, daß ein geringer Anteil der Enzymmenge auch über andere Wechselwirkungen, z.B. elektrostatischer oder hydrophober Art, an die Partikeloberfläche bindet.

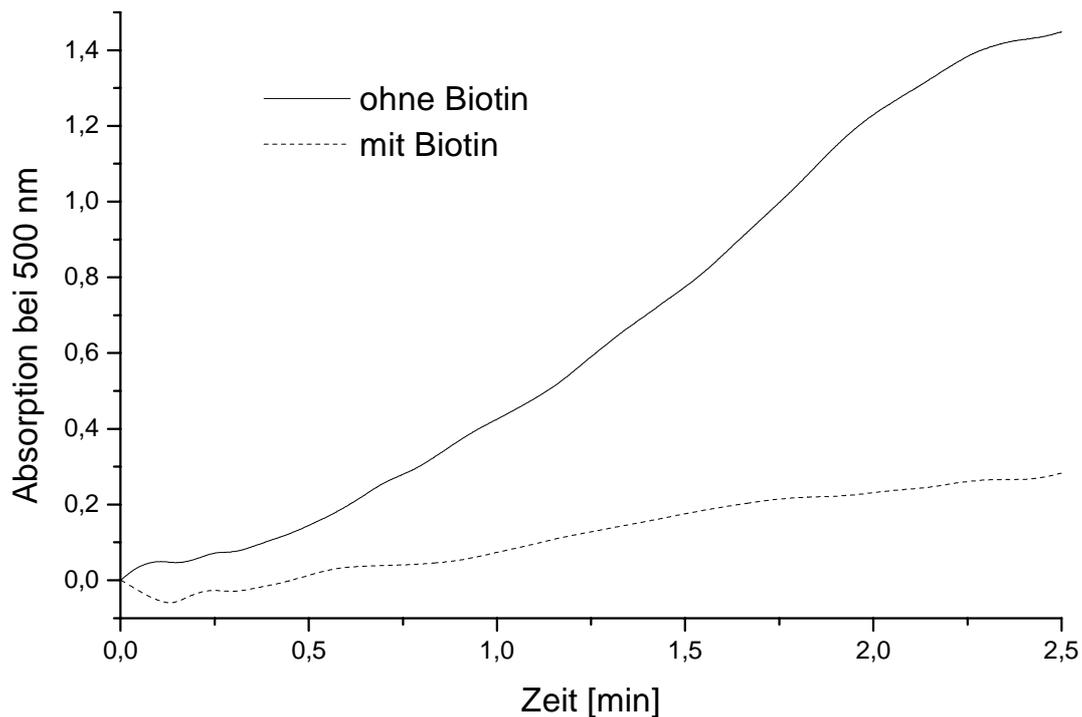


Abbildung 5.36 Messung der enzymatischen Aktivität einer Schicht Biotin-GOD auf einer Schicht Avidin, wobei die Biotin-GOD in einem Fall vor der Beschichtung mit freiem Biotin gemischt wurde. Das freie Biotin bindet schneller an das Avidin und vermindert eine Bindung von Biotin-GOD.

5.5.2 Concanavalin A-GOD

Eine weitere bekannte spezifische Wechselwirkung ist die zwischen Lectinen, wie Concanavalin A (ConA), und Glycogen oder Glycoproteinen, die ausreichend ist, um auf flachen Substraten Filme aufzubauen [Lvo, 1996, Anz, 2000]. In dieser Arbeit sollten diese Wechselwirkungen ausgenutzt werden, um auch auf kolloidalen Templaten Filme nach dem Layer-by-Layer Prinzip aufzubauen.

Es sollte das ConA, welches vier Bindungsstellen für Glucose oder Mannose besitzt, analog zum Avidin über elektrostatische Wechselwirkungen auf der Partikeloberfläche immobilisiert werden und anschließend sollte GOD, ein Glycoprotein, das kovalent mit einem α -D-Mannose-Rest gekoppelt ist, über spezifische Wechselwirkungen darauf immobilisiert werden.

Da ConA einen isoelektrischen Punkt von 5,0 hat, wurde es in PBS Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 gelöst, um eine negative Ladung zu induzieren. ConA wurde so auf einem mit PEI beschichteten PS Latex immobilisiert.

5.5.2.1 Charakterisierung der Filme

Aktivitätsmessung

In Abbildung 5.37 ist die enzymatische Aktivität dargestellt, die gemessen wurde, nachdem eine Schicht GOD auf einer Schicht ConA immobilisiert wurde. Die Aktivität liegt im Bereich dessen, was unter 5.4.2.1 für GOD-Schichten gemessen wurde. Allerdings kann man an Hand der zweiten in Abbildung 5.37 dargestellten Kurve erkennen, daß die Aktivität nach Aufbringung einer weiteren Polyelektrolytschicht sehr stark absinkt. Dieses läßt darauf schließen, daß die ConA-GOD-Bindung schwächer als die GOD-PAH-Bindung ist und daß das PAH den größten Teil des Enzyms wieder von der Partikeloberfläche ablöst.

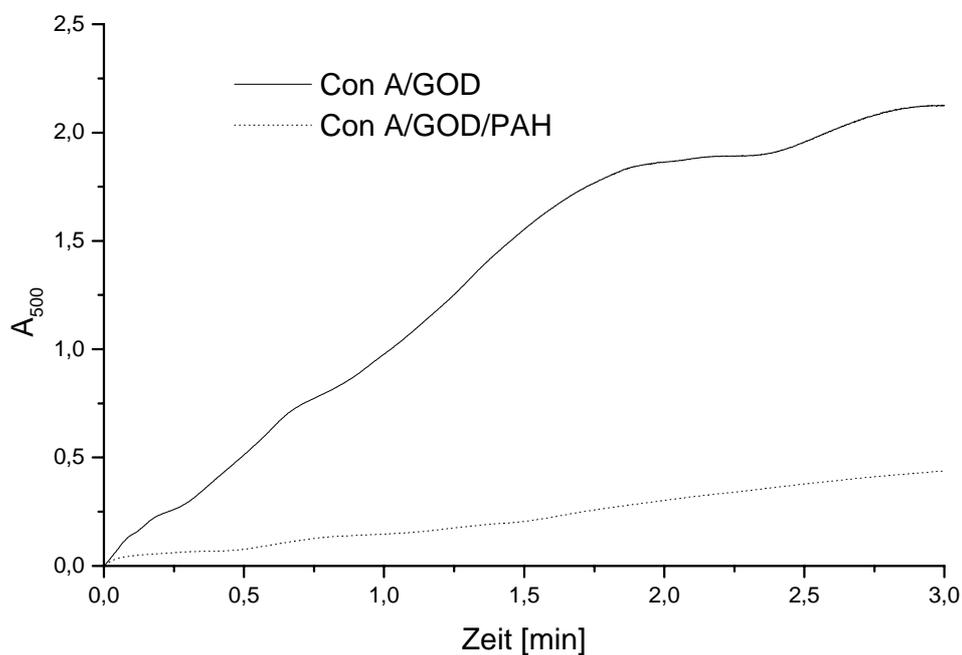


Abbildung 5.37 Messungen der enzymatischen Aktivität von GOD nach Immobilisierung auf einer Schicht ConA und nach Aufbringung einer weiteren Schicht PAH. Die PAH-Schicht löst den größten Teil der GOD-Schicht wieder ab.

Kompetitive Bindung

Bei Beschichtung mit GOD wurde zu der Enzymlösung 1 mg β -D-Glucose gegeben. Da die Bindung zwischen ConA und GOD, falls sie spezifisch ist, über die Zuckerreste erfolgen sollte, müßte in diesem Fall eine verringerte Adsorption von GOD festzustellen sein (Vergleiche mit Abbildung 5.36). Die Aktivität nimmt aber nur in sehr geringem Maß ab. Das läßt darauf schließen, daß die Adsorption von GOD auf ConA in diesem Fall größten Teils auf unspezifische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

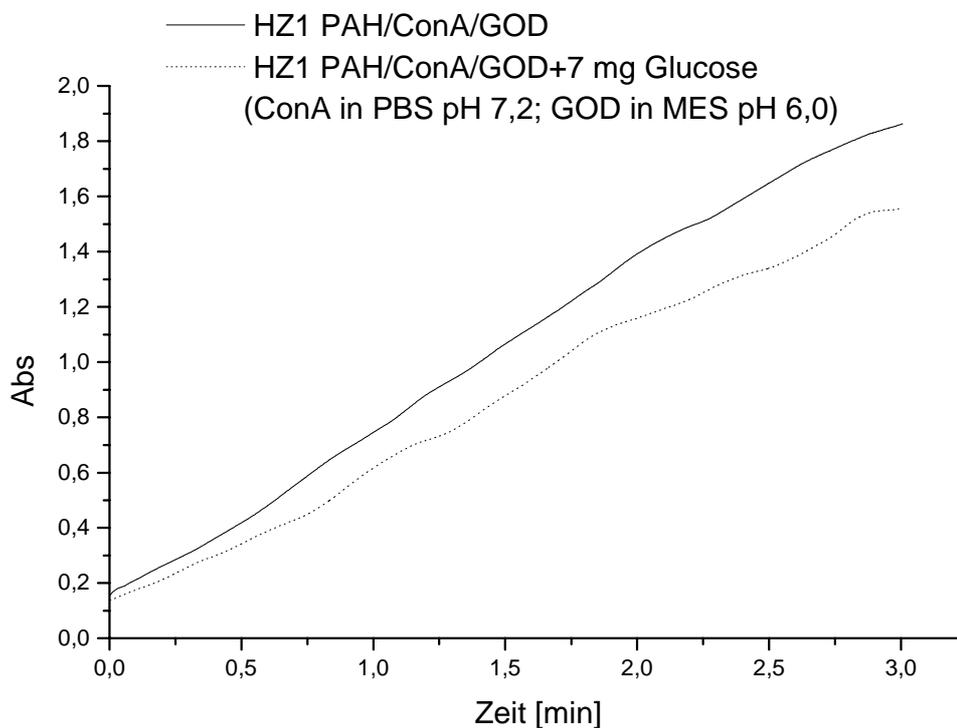


Abbildung 5.38 Messung der enzymatischen Aktivität einer Schicht GOD auf einer Schicht ConA, wobei die GOD in einem Fall vor der Beschichtung mit freier β -D-Glucose gemischt wurde. Es konnte keine kompetitive Bindung festgestellt werden

Eine Schichtdickenbestimmung durch Einzelteilchenlichtstreuung konnte nicht durchgeführt werden, da schon nach Beschichtung mit einer Schicht ConA die Probe so aggregiert war, daß eine Messung nicht möglich war. Auf Grund dieser Tatsache und weil die Bindung zwischen ConA und GOD auch nicht besonders fest ist, wurde auf die Herstellung von Multischichten und weitere Charakterisierung verzichtet.

5.5.3 Diskussion

In dem vorhergehenden Kapitel konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, Enzym-Schichten über spezifische Wechselwirkungen von Avidin und Biotin aufzubauen. Das Avidin wird allerdings immer noch über nicht spezifische Wechselwirkungen, wie Elektrostatik oder hydrophobe Wechselwirkungen immobilisiert, es bildet aber trotzdem eine stabilere und dickere Schicht als GOD. Dafür kann es mehrere Erklärungen geben, die in der Sequenz und Sekundärstruktur des Proteins zu suchen sind. An der Oberfläche weniger stark geladene Proteine stoßen sich untereinander weniger ab und können deshalb dichtere Packungen auf der Oberfläche bilden. Es müssen aber noch Ladungen vorhanden sein, die eine elektrostatische Wechselwirkung ermöglichen.

Die auf der Avidin-Schicht mit Hilfe von Avidin-Biotin-Wechselwirkungen aufgebrachte Schicht Biotin-GOD ist wegen der hohen Bindungskonstante zwischen den beiden Molekülen sehr stabil. Eine darauffolgend aufgebrachte Polyelektrolyt-Schicht löst nichts von dem Protein ab. Es konnte durch Experimente mit nicht biotinylierter GOD und durch kompetitive Bindung gezeigt werden, dass die spezifische Wechselwirkung für den Schichtaufbau verantwortlich sind. Dass keine dichte Monolage GOD gebildet wird kann auch an den Abständen der Biotin-Bindungsstellen der darunterliegenden Avidin-Schicht liegen, über deren Abstände und Zugänglichkeit keine Informationen vorliegen.

Nach Sicherstellung der kolloidalen Stabilität durch Induzierung von Ladungen mit Hilfe von pH-Wert-Änderungen konnten Multischichten aufgebaut werden. Die Schichten zeigen eine hohe Aktivität, wobei der Anstieg pro Schicht größer ist, als bei den über elektrostatische Wechselwirkungen aufgebrachten Enzymen, da nichts von dem Enzym bei Aufbringung einer weiteren Schicht abgelöst wird. Der einzige Nachteil dieser Schichten ist, dass eine große Aggregation nach Aufbringung einiger Schichten auftritt. Die Aggregation geschieht vermutlich deshalb, weil jedes Molekül GOD mehrere Biotin-Gruppen trägt. Es kann also sein, dass ein GOD-Molekül mit zwei Avidin-beschichteten Partikeln wechselwirkt. Um dieses zu verhindern wäre der einfachste Weg, wenn es gelänge, GOD mit nur einer zugänglichen Biotin-Gruppe zu koppeln. Eine zusätzliche sterische Stabilisierung der Partikel, welche die GOD-Moleküle in einer Art Polymerbürste einbetten würde, wäre eine weitere Möglichkeit, die aber starken Einfluss auf das Enzym haben könnte.

Die Aggregation muß aber nicht für jede mögliche Anwendung einen Nachteil darstellen, da die Aktivität trotzdem stark steigt. Es ist neben der reinen elektrostatischen Layer-by-layer Immobilisierung und der „Premixing“-Methode noch ein dritter Weg aufgezeigt worden, um Enzyme auf Partikeln zu immobilisieren. Jedes dieser Verfahren hat seine Vor- und Nachteile.

Die reine elektrostatische Beschichtung führt zu Filmen mit hoher Aktivität und guter kolloidaler Stabilität, die Beladung jedes Partikels mit Enzym ist aber eher gering. Dieses läßt sich mit der „Premixing“-Methode verbessern, wie auch die Stabilität der Enzymschichten, wenn sie die äußere Schicht bilden, aber unter Verlust eines Teils der Aktivität. Durch eine Kombination aus elektrostatischen und spezifischen Wechselwirkungen wie in dem vorigen Kapitel gezeigt, erhält man sehr stabile Filme mit hoher enzymatischer Aktivität und auch eine sehr gute Beladung der Partikeln mit Enzym. Es kann aber verstärkt zu Aggregationen der Partikel kommen.

Die ConA-GOD Wechselwirkung hat sich als sehr viel schwächer und im wesentlichen unspezifisch herausgestellt. Da es bei Verwendung kolloidaler Template außerdem zu einer Aggregation der Partikel kommt, wurde dieses System nicht eingehender untersucht. Es weist keine Vorteile gegenüber den anderen, vorher beschriebenen, auf.

5.6 Hohlkugeln aus Biopolymeren

In diesem Teil der Arbeit wurden aus beschichteten Latices Hohlkugeln hergestellt, deren Wand nur aus Biopolymeren besteht. Für einige Anwendungen, speziell im medizinischen Bereich, kann es notwendig sein, daß Hohlkugeln völlig aus biokompatiblen Materialien bestehen. Es wurden im folgenden zwei unterschiedliche Systeme untersucht. Das erste System besteht aus DNA, die durch die Phosphatgruppen negativ geladen ist. DNA kann also als natürliches Polyanion angesehen werden.

Für die Schichten zwischen der DNA wurde Spermidin verwendet, ein dreifach positiv geladenes Polyamin. Polyamine kommen sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten vor. Sie sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Replikation und Proteinsynthese beteiligt [Pel, 1996; Blo, 1991]. Es ist bekannt, daß Spermidin an DNA bindet und Komplexe bildet [Kab, 1998; Tru, 1999]. Mit Hilfe der Bindung zwischen DNA und Spermidin sollten Schichten schrittweise aufgebaut werden. Die Eigenschaften der Schichten mit dem kleinen Polyamin anstatt eines Polyelektrolyten werden im folgenden näher untersucht.

Das zweite zu untersuchende System war Polylysin, eine Polyaminosäure, deren Reste positiv geladen sind. Alternierend zu Polylysin wurden Alginsäureschichten aufgebaut. Alginsäure ist ein negativ geladenes Polysaccharid-Mischpolymer aus Mannuron- und Galuronsäure. Es wird hauptsächlich aus Braunalgen gewonnen. Da Alginsäure stark wasserhaltige, gelartige Filme bildet und so die Bindung zwischen Alginsäure und Polylysin nicht sehr stark ist [Bar, 1999], sollte gezeigt werden, daß ein stabiler Schichtaufbau möglich ist.

5.6.1 DNA/Spermidin-Schichten

Im folgenden werden die DNA/Spermidin Schichten näher charakterisiert. Es werden dann Versuche zur Auflösung der Schichten dargestellt.

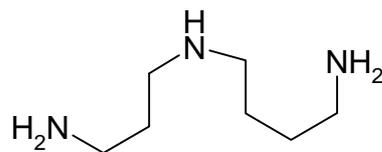


Abbildung 5.39 Schematische Darstellung von Spermidin

Die Schichten wurden sowohl auf planaren Quarzglas-Substraten als auch auf PS-Latices untersucht. Um Hohlkugeln herstellen zu können, wurden die Schichten auf Melaminformaldehyd-Partikel aufgebracht. Durch Auflösung der Partikel wurden dann Hohlkugeln hergestellt. Diese Hohlkugeln wurden mit verschiedenen Mikroskopiertechniken untersucht.

ζ -Potential-Messungen

Bei der Beschichtung von PS Latex Partikeln abwechselnd mit DNA und Spermidin kann man nach jeder Schicht ein im Vorzeichen wechselndes ζ -Potential messen (Abbildung 5.). Wenn die äußere Schicht aus DNA besteht, beträgt das ζ -Potential zwischen -35 und -50 mV. Wenn Spermidin die äußere Schicht bildet, beträgt das ζ -Potential zwischen $+15$ und $+20$ mV (Abbildung 5.40).

Dieses ist ein Hinweis auf einen schrittweisen Schichtaufbau. Da DNA wie auch Spermidin, genau wie synthetische Polyelektrolyte und im Gegensatz zu Proteinen, nur eine Art von Ladung tragen (positiv oder negativ), alterniert das ζ -Potential im Vorzeichen.

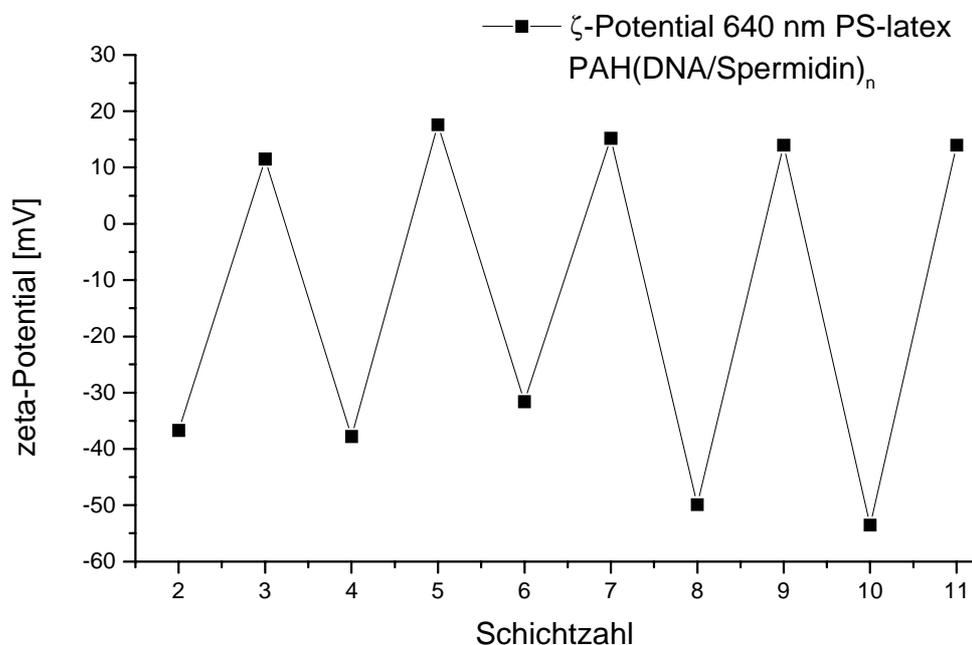


Abbildung 5.40 ζ -Potential-Messungen der PS Latices beschichtet mit DNA und Spermidin. Der Vorzeichenwechsel des ζ -Potentials nach jeder Schicht ist ein deutlicher Hinweis auf schrittweises Schichtwachstum.

Quarz-Kristall-Mikrowaage-Messungen

An Hand von QCM-Messungen [Abbildung 5.41] konnte festgestellt werden, daß zwar insgesamt mit jeder Schicht DNA, die auf den Kristall aufgebracht wurde, ein Massenzuwachs zu verzeichnen war. Die Spermidin-Schichten lösten jedoch immer einen beträchtlichen Teil der DNA wieder ab. Trotzdem war mit jeder Doppelschicht ein Massenzuwachs zu messen. Ein umgekehrtes Verhalten ist beim Aufbau von PAH/Pyrentetrasulfonsäure-Schichten beobachtet worden [Ted, 2000]. Dabei ist festgestellt worden, daß das PAH bei Auftragung Teile des im Film befindlichen kleinen Farbstoffmoleküls Pyrentetrasulfonsäure herauslöst.

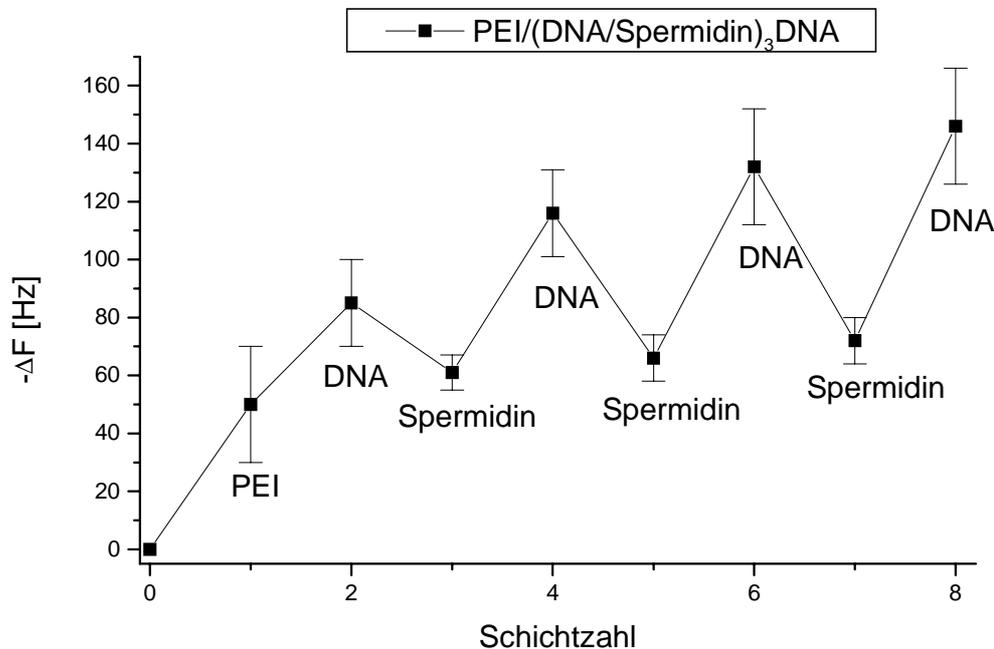


Abbildung 5.41 Massenzuwachs beim Aufbringen von DNA/Spermidin-Schichten auf einen QCM-Piezo. Das Aufbringen von Spermidin führt immer zu einer teilweisen Ablösung der DNA-Schichten.

5.6.1.1 Zersetzen der Schichten mit NaCl

Es ist bekannt, daß hohe Salzkonzentrationen die Bindung zwischen geladenen Farbstoffmolekülen und entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten zerstört [Car, 1999c]. Da Spermidin in Bezug auf die Größe und die Anzahl der Ladungen diesen Molekülen sehr ähnlich ist, sollte untersucht werden, ob auch die DNA/Spermidin Bindungen durch Zugabe

hoher Salzkonzentrationen gelöst werden und die Schichten dadurch zerstört werden können. Dazu wurden PS Latices mit je zwei Schichten DNA und Spermidin beschichtet. Diese Partikel zeigen eine Absorptionsbande bei 260 nm, welche von den DNA-Schichten stammt (Abbildung 5.42). Der unbeschichtete Latex zeigt keine Absorptionsbande bei dieser Wellenlänge.

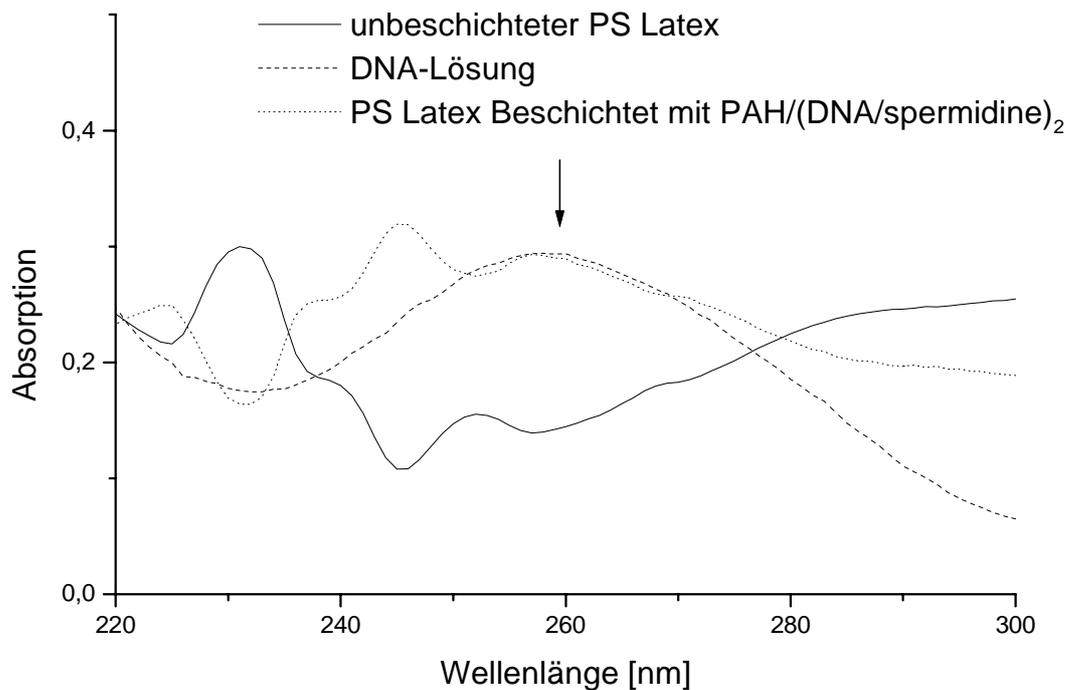


Abbildung 5.42 Absorptionsspektren des reinen PS Latex, der DNA-Lösung, und des mit DNA und Spermidin beschichteten PS Latex. Der Pfeil gibt das Absorptionsmaximum der DNA an.

Für die weiteren Versuche wurde der beschichtete Latex in drei Teile geteilt. Je ein Teil wurde einer 1, 2 oder 5 molaren NaCl-Lösung über Nacht ausgesetzt. Nach einer Reinigung der Partikel mit Wasser wurde eine erneute Aufnahme der Absorptionsspektren der Latices gemacht (Abbildung 5.43). Hierbei konnte keine Bande bei 260 nm mehr detektiert werden. Dies heißt, daß die Schichten durch die Salzzugabe aufgelöst wurden.

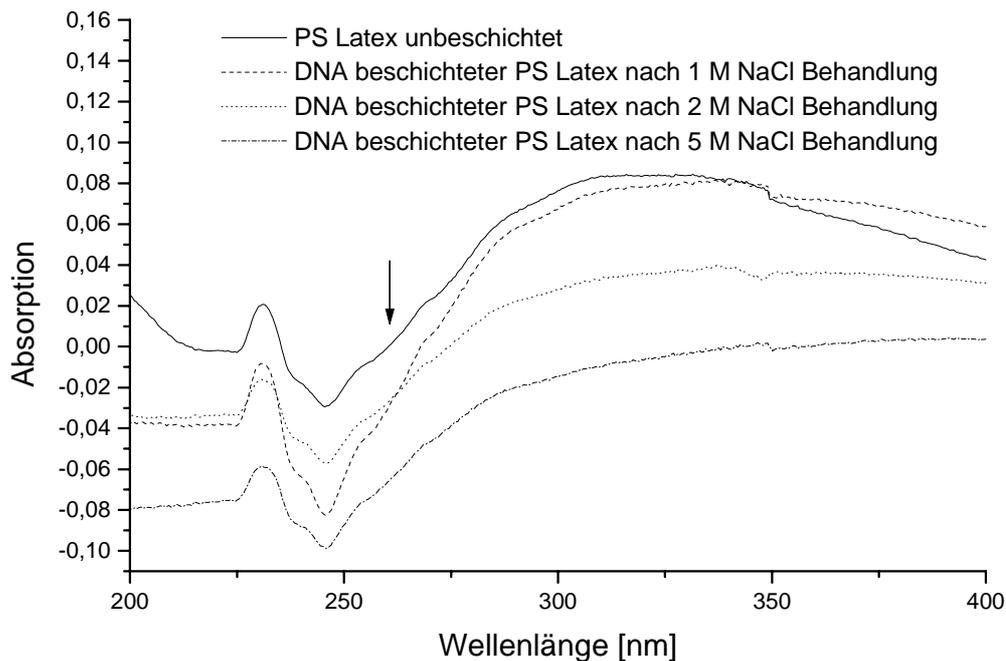


Abbildung 5.43 Absorptionsspektren der mit DNA/Spermidin beschichteten Latices nach NaCl-Behandlung. Der Pfeil gibt die Lage des Maximums an, daß bei vorhandener DNA auftreten würde.

Um einen zeitlichen Verlauf der Zersetzung messen zu können und auch um die Abhängigkeit der Zersetzungsgeschwindigkeit von der Salzkonzentration messen zu können, wurden DNA/Spermidin-Schichten auf planare Quarz-Substrate aufgebracht. Diese Filme wurden anschließend unterschiedlichen Salzkonzentrationen ausgesetzt. Die Auflösung der Filme in Abhängigkeit von der Zeit wurde durch die Verringerung der DNA-Absorptionsbande bei 260 nm UV/VIS-spektroskopisch verfolgt [Abbildung 5.44]. Dabei zeigte sich, daß die Zersetzung einen stetigen Verlauf hat. Bei höheren Salzkonzentrationen verläuft sie erwartungsgemäß schneller. Es ist also möglich, die Zersetzungsgeschwindigkeit der Filme über die Salzkonzentration zu steuern.

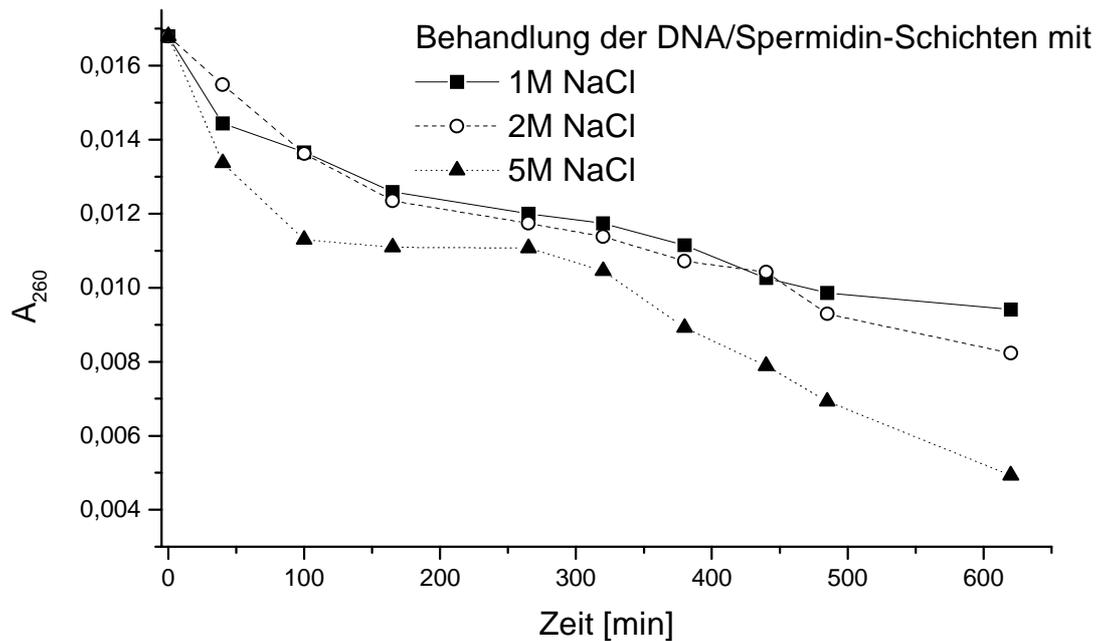


Abbildung 5.44 Zersetzung PEI/(DNA/Spermidin)₄DNA-Filmen in verschiedenen Salzkonzentrationen. Eine Erhöhung der Salzkonzentration führt zu einer schnelleren Zersetzung der Filme.

5.6.1.2 Charakterisierung der DNA/Spermidin-Hohlkugeln

Rasterelektronenmikroskopie

Die DNA/Spermidin Schichten wurden auch auf Melaminformaldehyd-Partikel aufgebracht. Diese Partikel wurden anschließend mit HCl aufgelöst um Hohlkugeln mit einer DNA/Spermidin-Hülle herzustellen. Bei der Auflösung der Partikel ist es wichtig, den pH-Wert der Salzsäure genau auf 1,6 einzustellen. Bei einem höheren pH-Wert lösen sich die Partikel nicht mehr auf, bei einem niedrigeren pH-Wert denaturieren die DNA-Schichten, was zu einer irreversiblen Aggregation und Vernetzung der Hohlkugeln führt. Bei einem pH-Wert von 1,6 erhält man Hohlkugeln, welche in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 5.45 zu sehen sind. Diese Hohlkugeln unterscheiden sich in ihrem Aussehen nicht von den aus synthetischen Polyelektrolyten aufgebauten.

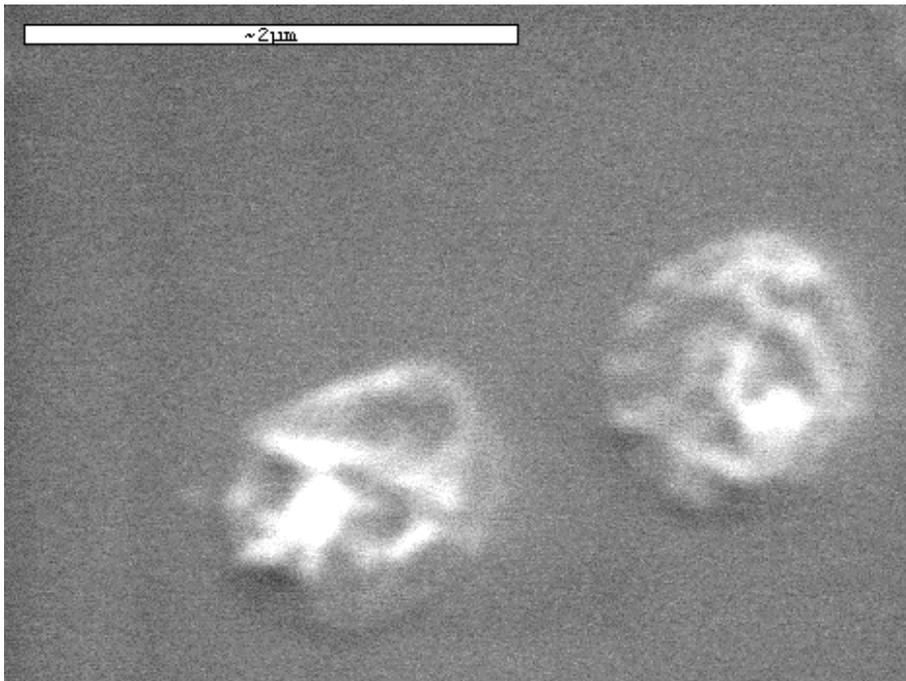


Abbildung 5.45 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der DNA/Spermidin Hohlkugeln.

Rasterkraftmikroskopie

Um die Dicke der einzelnen Schichten abschätzen zu können, wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen gemacht (Abbildung 5.46). Es ist zu erkennen, daß die Hohlkugel sich wie auch Polyelektrolyt-Hohlkugeln faltet. An einigen Stellen liegen dann beide Wände direkt übereinander. Durch Schichtdickenmessungen an diesen Stellen kann dann die Dicke der Wand bestimmt werden. Hier wurde eine minimale Dicke von etwa 30 nm an den Stellen, wo die beiden Wände direkt aufeinander liegen, gemessen. Das heißt, eine Wand ist etwa 15 nm dick. Da die Hohlkugeln aus fünf Schichten bestehen ((DNA/Spermidin)₂DNA), ergibt sich eine gemittelte Schichtdicke von 3 nm. Aus dieser Messung ist aber nicht ersichtlich, wie dick eine einzelne Schicht ist. Es ist durchaus wahrscheinlich, daß die DNA-Schichten wesentlich dicker sind als die Spermidin-Schichten. Möglicherweise führt auch ein Aufbringen einer Spermidin-Schicht zu keinem Anwachsen der Schichtdicke, da sich dieses relativ kleine Molekül in die DNA-Schichten einlagern könnte. Daher erscheint die Schichtdicke sehr groß. Die Gründe hierfür werden später diskutiert.

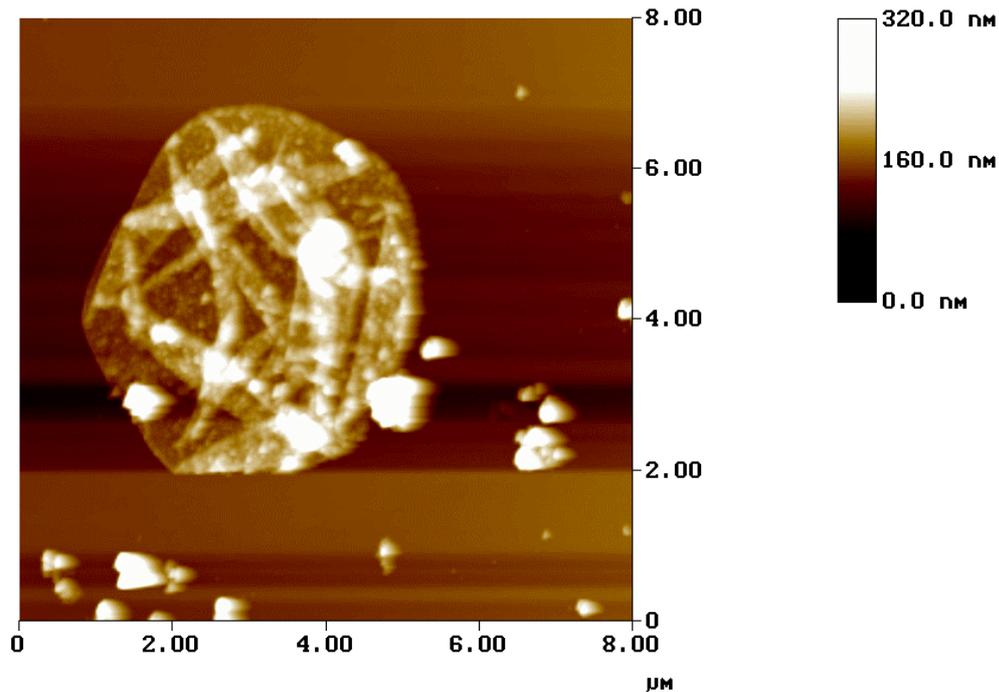


Abbildung 5.46 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Hohlkugel bestehend aus (DNA/Spermidin)₂DNA.

Um den Film besser charakterisieren zu können, wurden DNA/Spermidin-Schichten auf planare Quarzglas-Substrate aufgebracht und ebenfalls mit dem Rasterkraftmikroskop untersucht. In Abbildung 5.47 ist eine typische Aufnahme abgebildet. Man erkennt einen sehr inhomogenen Film, der Cluster von bis zu 100 nm aufweist. Eine solche Filmstruktur ist bei anderen Polyelektrolyt-Schichten nicht festgestellt worden. Bei den schon oben erwähnten PAH/ Pyren-tetrasulfonsäure-Schichten [Ted, 2000] wurde aber ebenfalls eine erhöhte Oberflächenrauigkeit der Filme beobachtet.

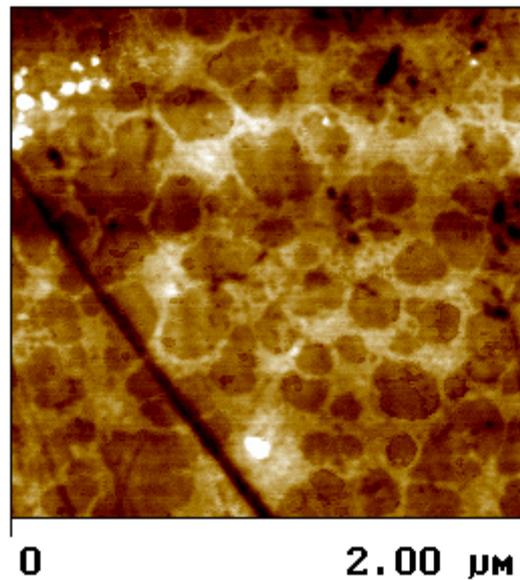


Abbildung 5.47 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme eines Film bestehend aus PEI/(DNA/Spermidin)₃DNA.

5.6.2 Charakterisierung der p-Lysin/Alginsäure-Schichten

Im folgenden Abschnitt ist die Charakterisierung der Polylysin/Alginsäure-Schichten beschrieben. Auch hier wurden die Schichten zunächst auf einen PS-Latex aufgebracht, später dann auf Melaminformaldehyd-Partikeln, welche nachfolgend aufgelöst wurden, wodurch Polylysin/Alginsäure-Hohlkugeln entstanden. Auch hier liegt ein vollständig biokompatibles System vor.

ζ-Potential

Bei der ζ -Potential-Messung von PS Latex Partikeln, die mit Polylysin und Alginsäure beschichtet sind (Abbildung 5.48), kann man sehen, daß das ζ -Potential nach Aufbringung jeder Schicht im Vorzeichen alterniert. Wenn Polylysin die äußere Schicht bildet wurde ein ζ -Potential von etwa + 35 bis + 40 mV gemessen, wenn Alginsäure die äußere Schicht bildet betrug das ζ -Potential etwa – 40 bis – 45 mV. Die Werte sind sehr gleichmäßig, da hier je Biopolymer nur eine Art von Ladung vorliegt. Die Schichten sind auch stabil.

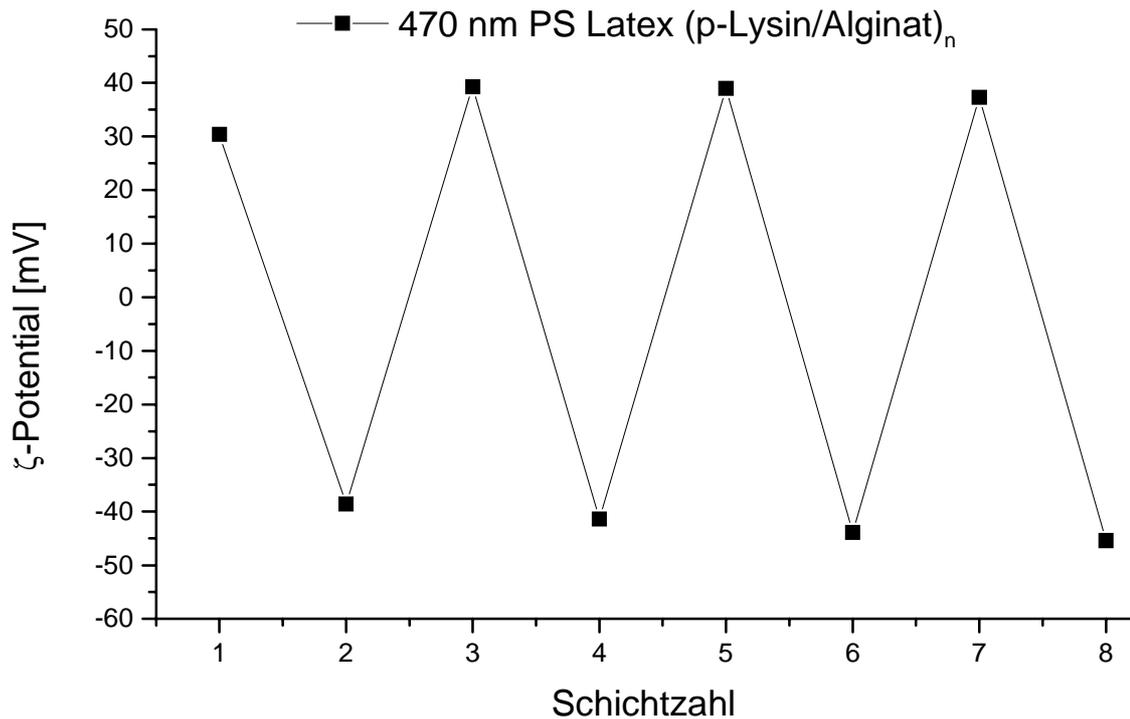


Abbildung 5.48 ζ-Potential-Messungen der PS Latices beschichtet mit Polylysin und Alginsäure. Es ist ein Vorzeichenwechsel nach jeder Schicht zu sehen, was auf einen schrittweisen Schichtaufbau deuten läßt.

Rasterelektronenmikroskopie der Polylysin/Alginsäure Hohlkugeln

Es wurden Melaminformaldehyd-Partikel mit Polylysin und Alginsäure beschichtet und anschließend mit Salzsäure aufgelöst. Es entstanden Hohlkugeln, was zeigt, daß die Schichten trotz des hohen Wassergehalts in den Alginsäureschichten stabil sind. Die Hohlkugeln wurden anschließend im Rasterelektronenmikroskop untersucht. In der Abbildung 5.49 ist zu erkennen, daß die Hohlkugeln eine sehr viel rauhere, porösere Struktur aufweisen. Die Hohlkugeln waren aber alle morphologisch intakt.

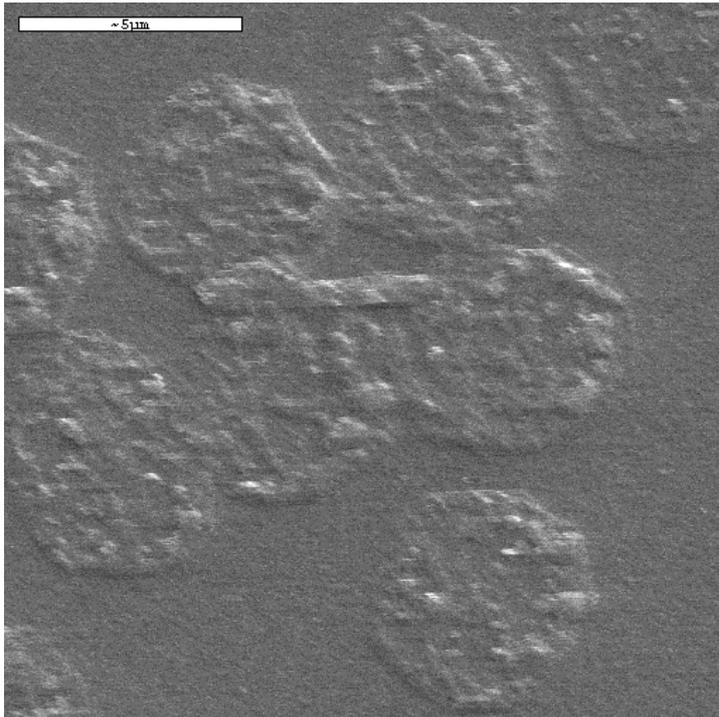


Abbildung 5.49 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Polylysin/Alginsäure Hohlkugeln.

Rasterkraftmikroskopie an den Polylysin/Alginsäure Hohlkugeln

Von den Polylysin/Alginsäure Hohlkugeln wurden rasterkraftmikroskopische Aufnahmen gemacht, um die Rauigkeit der Wände zu untersuchen. Auch in Abbildung 5.50 ist die im getrockneten Zustand poröse Struktur zu erkennen. Es gibt willkürlich verteilte Domänen, die eine größere Höhe aufweisen. Bisher wurden ähnliche Oberflächenstrukturen bei der Templatierung menschlicher roter Blutzellen gefunden [Lep, 2000]. Es war in diesem Fall auf das Templat zurückzuführen, während in dem hier untersuchten Fall die stark körnige Wandstruktur von der Zusammensetzung der Wand selbst zu kommen scheint. Eine mögliche Erklärung ist, daß der große Wassergehalt in den Alginsäureschichten zu Instabilitäten führt und die Schichten daher nicht mehr so homogen sind. Es kann aber keine Aussage über die Veränderung der Wandstruktur durch die Trocknung der Probe gemacht werden.

Auch von diesen Kapseln wurden die Schichtdicken im trockenen Zustand analog zu den DNA/Spermidin-Kapseln gemessen. Es ergab sich hier eine mittlere Schichtdicke von 3,2 nm. Dieses ist etwas mehr als bei den DNA/Spermidin-Kapseln. Es handelt sich hier aber um zwei Polymere, die eine größere Schichtdicke als ein Polyamin verursachen sollten. Die im Gegensatz zu synthetischen Polyelektrolyten größere Schichtdicke kann auch von einem

höheren Wassergehalt kommen, der die Schichten quellen läßt. Auch durch normales Trocknen läßt sich dieses Wasser nicht immer vollständig entfernen.

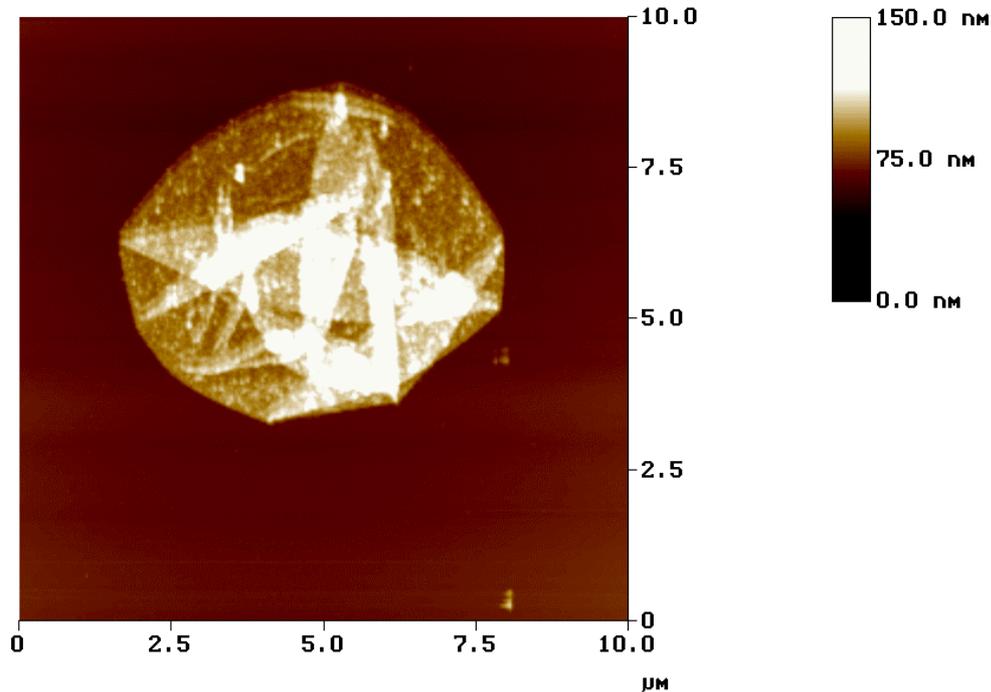


Abbildung 5.50 Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Hohlkugel bestehend aus (Alginsäure/Polylysin)₂Alginsäure

5.6.3 Diskussion

Im vorangegangenen Kapitel wurde ein Schichtaufbau mit Biopolymeren bzw. -molekülen, sowie die Darstellung von Kapseln aus diesen Schichten beschrieben.

Die Charakterisierung des Schichtaufbaus erfolgte über ζ -Potential-Messungen an den Schichten, die ein regelmäßig im Vorzeichen alternierendes Potential ergaben und QCM-Messungen, die ergaben, daß der Aufbau von Schichten mit kleinen Molekülen wie Spermidin nicht linear verläuft, sondern daß das kleine Molekül Spermidin Teile des Polymers DNA ablösen kann. Die mit der Rasterkraftmikroskopie gemessenen Schichtdicken sind sehr groß. Es gibt zwei Gründe, die diese Schichtdicke erklären können. Zum einen ist eine Adsorption von mehreren, sich kreuzenden Molekülen postuliert worden [Net, 1999b]. Zum anderen ist für diese Versuche genomische DNA verwendet worden. Es ist nicht bekannt, in welcher Form diese unter den Beschichtungsbedingungen vorliegt. Sollten sich Doppelhelices ausbilden, könnten diese auch zu solch großen Schichtdicken führen.

Es wurden im folgenden Hohlkugeln aus diesen Schichten hergestellt und an Hand von mikroskopischen Techniken weiter untersucht. Das Erscheinungsbild der Kapseln unterschied sich kaum von dem anderer Kapseln. Nur die Struktur der DNA/Spermidin-Filme war wesentlich grobkörniger als es bisher bei der Templatierung von Melaminformaldehyd-Partikeln beobachtet wurde. Diese Struktur wurde anschließend auch bei den gleichen Filmen auf flachen Substraten gefunden. Da die verwendete DNA genomisch ist, d. h. sie besteht aus sehr langen Fragmenten, von denen die genaue Größe unbekannt ist, kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die beobachtete Körnung durch DNA-Agglomerate zustande kommt.

Die DNA/Spermidin-Schichten zeigen, wie schon erwähnt, im Aufbau Unterschiede zu reinen Polyelektrolyt-Schichten. Diese Instabilitäten, die in der Natur der Bindung liegen, sind auch beabsichtigt, da in der Zelle die DNA/Spermidin-Komplexe aufgelöst werden müssen, wenn die DNA translatiert oder repliziert werden soll. Diese Instabilität der Bindung wurde ausgenutzt, um die Schichten durch Zugabe von erhöhten Salzkonzentrationen aufzulösen. Damit wurde ein System vorgestellt, das sich für drug-delivery-Systeme anbietet, da es vollständig biokompatibel ist und sich die Auflösung mit normalem Kochsalz durchführen läßt. Zusätzlich ist die Freisetzungsgeschwindigkeit über die Salzkonzentration regelbar.

Die Polylysin/Alginsäure-Schichten verhalten sich wie Schichten aus synthetischen Polyelektrolyten. Der Schichtaufbau ist sehr gleichmäßig und auch die mikroskopischen Aufnahmen an den Hohlkugeln zeigen keine Besonderheiten. Alginsäure ist dafür bekannt, viel Wasser zu binden. Daurch lassen sich die großen Schichtdicken erklären. Trotzdem ist der Schichtaufbau genauso wie mit anderen Polyelektrolyten möglich. Die Polylysin/Alginsäure-Kapseln stellen ein völlig biokompatibles System da.

5.7 Templatierungen von CaCO₃

In dem folgenden Kapitel wurden Calciumcarbonat-Partikel als Template für die Beschichtung mit Hilfe der elektrostatischen Layer-by-layer Technik benutzt. Diese anorganischen Template haben den Vorteil, daß sie aus umweltverträglichen Materialien bestehen und prinzipiell vollständig entfernt werden können. Die Partikel bestehen entweder aus reinem Calciumcarbonat oder sind während der Synthese mit sogenannten doppelt-hydrophilen Blockcopolymeren stabilisiert worden [Cöl, 1998; Sed, 1998]. Die Blockcopolymeren enthalten Gruppen, die stark mit Erdalkalimetallen wechselwirken und so Einfluß auf die Kristallisation haben. Die Partikelsynthese erfolgte nach der *Kitano*-Methode [Kit, 1962], bei der eine gefilterte CaCO₃- und CO₂-gesättigte Lösung zum Ausgasen von CO₂ an der Luft stehengelassen wird, wobei sich CaCO₃-Partikel bilden. Dabei kann das Blockcopolymer dazugegeben werden. Je nach Art des verwendeten Polymers lassen sich CaCO₃-Partikel mit unterschiedlicher Morphologie und unterschiedlicher Kristallmodifikation (Vaterit oder Calcit) erzeugen.

Diese Template sollten sich für die Herstellung von Kapseln eignen, da sie nicht säurebeständig sind. Die bei der Auflösung entstehenden Salze sollten sich leicht auswaschen lassen. Diese Partikel könnten eine Alternative zu den sonst verwendeten Melaminformaldehydpartikeln sein.

5.7.1 Beschichtung von CaCO₃-Partikeln

Es wurden CaCO₃-Partikel verwendet, die entweder ohne Zugabe von Polymer oder mit einem Blockcopolymer der Struktur PEG-[PEI-(C₁₁H₂₃)(CH₂COOH)] hergestellt wurden. Der erste Block des Polymers hat ein Molekulargewicht von etwa 5000 g mol⁻¹ und der zweite Block ein Molekulargewicht von etwa 2000 g mol⁻¹. Dieses Polymer wurde über eine Isothiocyanat-Gruppe im folgenden auch mit Flourescein (FITC) markiert. Die Bindung erfolgte an das PEI. Die daraus geformten Partikel waren sphärisch.

Um eine Beschichtung mit Polyelektrolyten über elektrostatische Wechselwirkungen durchführen zu können, wurde als erstes das ζ -Potential der Partikel gemessen. In Wasser zeigen die mit Blockcopolymer stabilisierten Partikel ein schwach negatives ζ -Potential von etwa -10 mV. Die vorhandene Oberflächenladung sollte damit für eine Beschichtung über

elektrostatische Wechselwirkungen ausreichen. Die ohne Zugabe von Polymer dargestellten Partikel haben ein ζ -Potential von etwa 0 mV. Eine Beschichtung über elektrostatische Wechselwirkungen in reinem Wasser ist also nicht möglich. Um eine Ladung zu induzieren wurden die Partikel in basischer Lösung (pH 8,5) suspendiert. Unter diesen Bedingungen betrug das gemessene ζ -Potential -15 mV. Eine Beschichtung sollte also möglich sein, wenn das Polyelektrolyt in einer Lösung entsprechenden pH-Werts gelöst wird.

Die Beschichtung wurde auf zwei Wegen charakterisiert: Zum einen wurde das ζ -Potential gemessen. Das ζ -Potential alternierte dabei zwischen etwa -10 mV für die unbeschichteten Partikel, $+5$ mV für die mit PEI als äußerer Lage beschichteten Partikel und -10 mV für die mit PSS als äußerer Lage beschichteten Partikel. Die Beträge der ζ -Potentiale sind zwar nicht groß, es ist aber eine Ladungsumkehr nach Aufbringen jeder Schicht zu beobachten. Eine direkte Messung der Schichtdicke mit Hilfe der Einzelteilchenlichtstreuung ist nicht möglich, da die Partikel zu polydispers sind. Ein Beweis für eine erfolgreiche Beschichtung mußte also auf anderem Weg erfolgen. Dazu wurde für die Beschichtung (mindestens für eine Schicht) mit Fluorescein gekoppeltes PAH verwendet. Diese Schichten lassen sich anschließend im konfokalen Mikroskop abbilden. In Abbildung 5.51 ist in einem Beispiel eine solche Aufnahme gezeigt. Durch die Schnitte in verschiedenen Ebenen kann eine vollständige und gleichmäßige Beschichtung verifiziert werden. In dem abgebildeten Beispiel sind Blockcopolymer-stabilisierte Partikel mit (FITC-PAH/PSS)₂ abgebildet. Die Beschichtung der anderen Partikel ergab ähnliche Bilder. Eine Beschichtung von CaCO₃-Partikeln, ob mit oder ohne Blockcopolymer hergestellt, ist mit Hilfe der elektrostatischen Layer-by-layer Technik möglich.

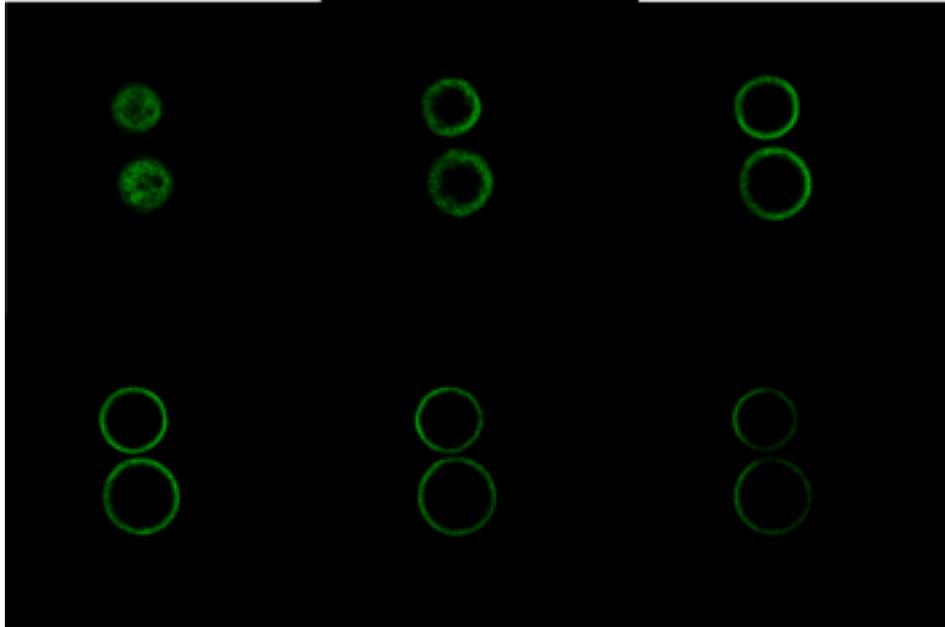


Abbildung 5.51 Schichtweise Abbildungen von CaCO_3 -Partikeln, die mit Fluorescein-gekoppeltem PAH beschichtet sind. Eine vollständige und gleichmäßige Beschichtung ist zu erkennen.

5.7.2 Herstellung von Hohlkugeln

Die unbeschichteten CaCO_3 -Partikel lösen sich, unabhängig davon, ob sie unter Zugabe von Blockcopolymer hergestellt wurden oder nicht, bei einem pH-Wert von etwa 3,5 auf. Werden diese Partikel beschichtet, gelingt dieses nicht mehr komplett. In Abbildung 5.52 sind Blockcopolymer-stabilisierte Teilchen zu sehen, die mit $(\text{PAH/PSS})_2$ beschichtet wurde und anschließend mit Salzsäure (pH 3) behandelt wurden. Unter diesen Bedingungen lösen sich unbeschichtete Partikel auf. Man kann auf der linken Seite eine Hohlkugel erkennen, aber auf dem Übersichtsbild der rechten Seite ist zu erkennen, daß viele Partikel sich nicht vollständig aufgelöst haben. Warum ein Teil der Partikeln scheinbar komplett aufgelöst wurde, während andere Partikeln noch völlig intakt scheinen, konnte nicht abschließend geklärt werden.

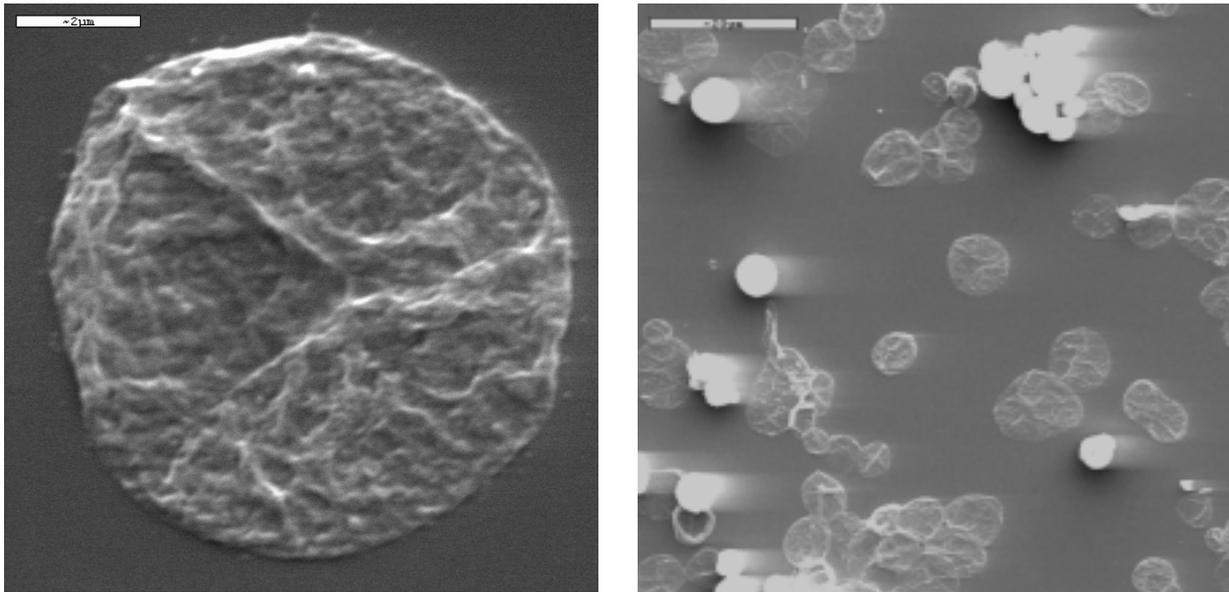


Abbildung 5.52 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit $(\text{PAH/PSS})_2\text{PAH}$ beschichteten, Blockcopolymer-stabilisierten CaCO_3 -Partikeln nach Behandlung mit HCl (pH 3). Es löst sich nur ein Teil der Partikel auf.

In weiteren Experimenten wurden sowohl Blockcopolymer-stabilisierte Partikel als auch Partikel ohne Polymer beschichtet und jeweils mit Salzsäure (pH 2) oder mit gesättigter EDTA-Lösung über Nacht behandelt. In Abbildung 5.53 sind beschichtete, mit Salzsäure behandelte Partikel dargestellt. In den Fluoreszenzaufnahmen in der oberen Zeile kann man sehen, daß die Partikel beschichtet sind. Da nur eine Ebene abgebildet ist, wird nur ein Teil der Beschichtung sichtbar gemacht. In den Transmissionsaufnahmen in der unteren Zeile sieht man, daß die Partikel sich nicht aufgelöst haben. Es macht keinen Unterschied, ob die Partikel mit Blockcopolymer hergestellt wurden oder nicht. In den gesamten Proben wurden wiederum einige Hohlkugeln gefunden, aber die überwiegende Zahl der Partikel war nicht aufgelöst. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigen dieses (nicht dargestellt).

In Abbildung 5.54 wurden die oben beschriebenen Partikel über Nacht mit gesättigter EDTA-Lösung behandelt. In den Fluoreszenzaufnahmen, die in der oberen Zeile abgebildet sind, unterscheiden sich Abbildung 5.53 und Abbildung 5.54 nicht wesentlich. Man kann in beiden Fällen nur erkennen, daß die Partikel beschichtet sind. Die Transmissionsaufnahmen zeigen aber, daß sich durch die Behandlung mit EDTA-Lösung die Partikel aufgelöst haben. Auch hier ist es wiederum nicht entscheidend, ob die Partikel mit Blockcopolymer hergestellt wurden oder ohne.

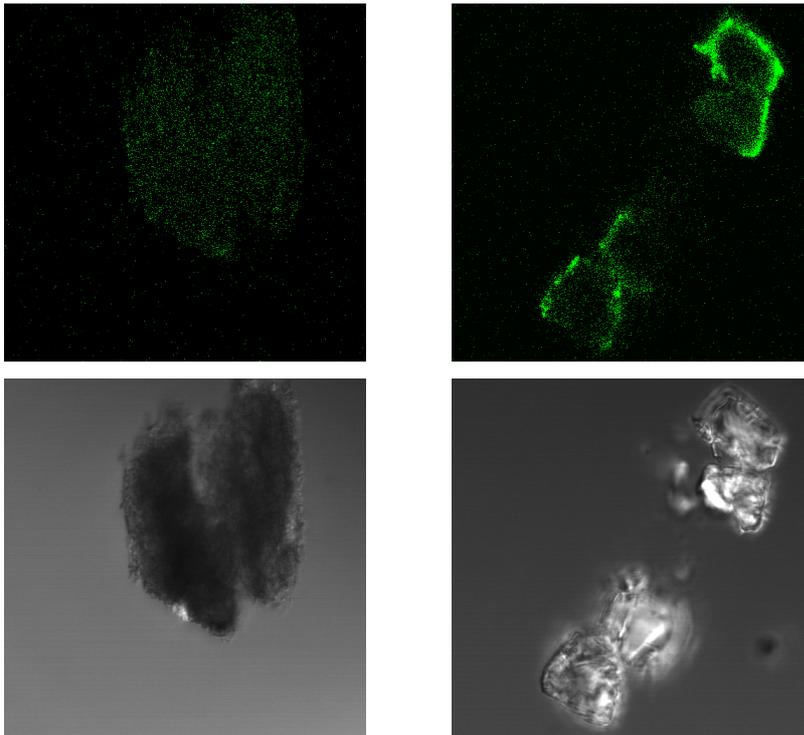


Abbildung 5.53 Linke Seite: mit Blockcopolymer hergestellte und mit $(\text{PAH/PSS})_2\text{FITC-PAH}$ beschichtete CaCO_3 -Partikel nach Behandlung mit HCl (pH 2) über Nacht. Auf der rechten Seite sind die Partikel nicht mit Blockcopolymer hergestellt (sonst identische Behandlung). In der oberen Zeile sind die Fluoreszenz-Aufnahmen dargestellt, in der unteren die dazugehörigen Transmissionsbilder. Die Partikel sind nicht aufgelöst.

Da es mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie schwer ist zu entscheiden, ob alle Partikeln völlig aufgelöst sind, wurden diese Proben auch im Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dabei ist es möglich eine Übersicht über eine große Anzahl von Partikeln zu bekommen. In den Aufnahmen (ohne Abbildung) konnte aber nur ein Film der Polyelektrolyte festgestellt werden. Die reinen Polyelektrolyte neigen dazu, auf der Oberfläche einen Film auszubilden, so daß eine Darstellung einzelner Kapseln nicht möglich war. Es konnten aber keine CaCO_3 -Partikel mehr gefunden werden. Diese sollten auch bei einer Verfilmung der Polyelektrolytschichten noch sichtbar sein. Das ist also eine weitere Bestätigung dafür, daß es möglich ist, die Partikel mit EDTA aufzulösen.

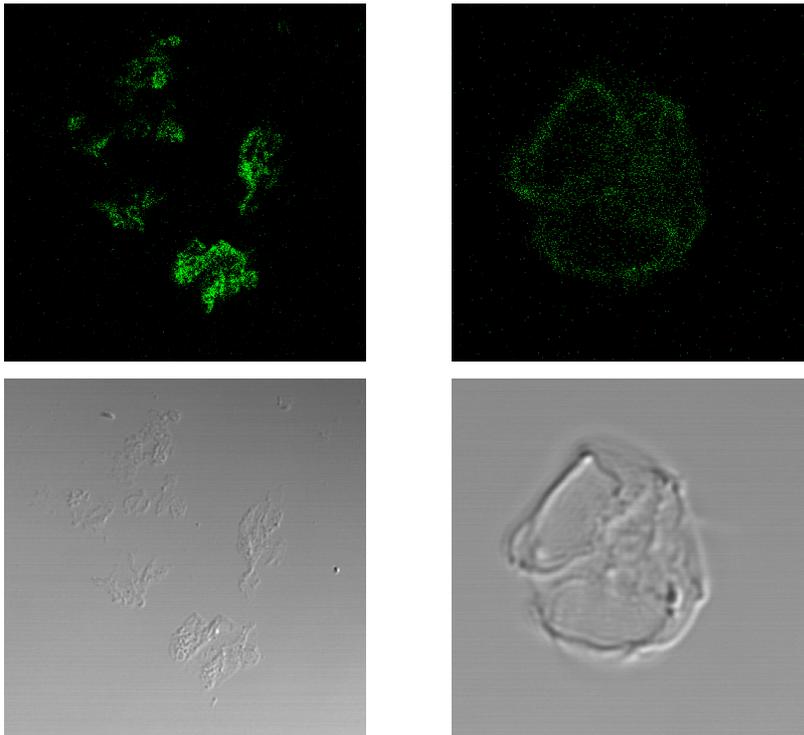


Abbildung 5.54 Linke Seite: mit blockcopolymer hergestellte und mit $(\text{PAH/PSS})_2\text{FITC-PAH}$ beschichtete CaCO_3 -Partikel nach Behandlung mit gesättigter EDTA-Lösung. Auf der rechten Seite sind die Partikeln nicht mit Blockcopolymer hergestellt (sonst identische Behandlung). In der oberen Zeile sind die Fluoreszenz-Aufnahmen dargestellt, in der unteren die dazugehörigen Transmissionsbilder. Die Partikeln sind aufgelöst.

5.7.3 Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Beschichtung und Auflösung von CaCO_3 -Partikeln beschrieben. Diese Partikel, dargestellt nach [Cöl, 1998] sind sphärisch und, unter bestimmten Bedingungen, geladen. Die Partikel lassen sich analog zu den vorher verwendeten PS- bzw. Melaminformaldehyd-Latices mit Polyelektrolyten beschichten. Die Beschichtung läßt sich anhand von ζ -Potential-Messungen und, bei Verwendung von Fluorescein-markiertem Polyelektrolyt, mit konfokaler Mikroskopie nachweisen. Wegen der Polydispersität der Partikel ist eine Messung des Schichtdickenzuwachses mit Einzelteilchenlichtstreuung nicht möglich.

Die Partikel lassen sich unbeschichtet leicht in Salzsäure mit pH 3,5 auflösen. Die beschichteten Partikeln lösen sich selbst bei Verwendung von Salzsäure mit pH 2 nicht vollständig auf. Eine Behandlung mit EDTA, welches eine sehr hohe Affinität zu Calcium hat und in der Lage ist, CaCO_3 aufzulösen, löst auch die Partikel auf, die beschichtet sind. Dieses Verhalten konnte nicht abschließend geklärt werden. Mögliche Erklärungsversuche sind, daß

die Polyelektrolyt-Wand dazu führt, daß sich der pH-Wert im inneren von dem pH-Wert außerhalb unterscheidet. Die Polyelektrolyt-Wände könnten als Puffer wirken. Dagegen sprechen Experimente mit CdCO_3 -Partikeln, die sich durch pH-Änderung auflösen ließen [Ant, 2000]. Ein weiterer Ansatz ist, daß die durch eine Säurebehandlung gelösten freien Ca^{2+} -Ionen mit den Sulfatgruppen des in der Wand enthaltenen PSS schwerlösliches CaSO_4 bilden, welches die Wände dann undurchdringlich macht. Dieses müßte in weiteren Experimenten mit anderen Polyanionen geklärt werden.

Die Tatsache, daß auch bei einer Säurebehandlung immer ein paar hohle Kapseln gefunden werden, läßt sich damit erklären, daß einige Kapseln Defekte aufweisen. Weitere Arbeiten hierzu mit verschiedenen Schichtzahlen stehen noch aus. Eine abschließende Erklärung konnte aber noch nicht gefunden werden.

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Modifikation und Funktionalisierung der Oberfläche von kolloidalen Templaten mit Hilfe der Layer-by-layer Technik und die Herstellung von Hohlkugeln mit neuen Eigenschaften untersucht. Es wurden verschiedene (Bio)-Polymersysteme hinsichtlich ihrer Eignung für diese Methode untersucht.

In dem ersten Teil der Arbeit wurden Kolloide mit einem eisenhaltigen, supramolekularen Polymer beschichtet. Dieses Polymer verleiht der Oberfläche auf Grund seiner Eigenschaften eine große Rauigkeit, sowie die für dieses Polymer charakteristische blaue Farbe. Die so produzierten Schichten weisen eine wesentlich höhere Stabilität auf als das Polymer in Lösung.

Diese Schichten wurden auch auf auflösbare kolloidale Teilchen aufgebracht. Nach Auflösung dieser Teilchen konnten Hohlkugeln dargestellt werden. Diese Hohlkugeln unterscheiden sich in ihrem äußeren Erscheinungsbild nicht wesentlich von denen, die mit anderen Polyelektrolyten hergestellt wurden. Durch das in der Hülle enthaltene Eisen könnten diese Hohlkugeln aber für spezielle Kristallisationen oder Reaktionen in ihrem Inneren interessant werden.

Ein weiterer, neuer Aspekt dieser Arbeit war das Beschichten von Templaten mit einem Durchmesser von weniger als 100 nm. Es konnte gezeigt werden, daß die Beschichtung solcher Teilchen möglich ist, wenn die Kettenlänge der zur Beschichtung verwendeten Polyelektrolyte nicht wesentlich länger als der Durchmesser der Teilchen ist.

In den weiteren Kapiteln konnte gezeigt werden, daß eine schrittweise Beschichtung von kolloidalen Templaten mit Enzymen unter Verwendung der Layer-by-layer Technik möglich ist. Ein schrittweises Wachstum der Schichten konnte über mehrere Methoden wie die Einzelteilchenlichtstreuung oder die UV/VIS-Spektroskopie nachgewiesen werden. Letztere Methode zeigt aber auch, daß die äußeren Enzymschichten nicht sehr fest gebunden sind und die darauffolgend aufgebrachte Polyelektrolytschicht wieder einen Teil der Enzymschicht ablöst. Trotzdem verbleibt immer ein gewisser Teil des Enzyms auf dem Partikel. Die so immobilisierten Enzyme zeigen eine sehr hohe Aktivität. Die Aktivität der äußeren Schicht ist gleich der Enzymaktivität in Lösung. Jede aufgebrachte Enzymschicht führt zu einem Anstieg in der enzymatischen Aktivität, wobei der Anstieg von dem als Zwischenschicht verwendeten

Polyelektrolyten und der dadurch ausgebildeten Filmstruktur abhängt. Eine weitere Beschichtung mit Polyelektrolyten auf der Oberfläche führt zu einer Abnahme der Aktivität durch Blockade der aktiven Zentren oder durch eine Änderung der lokalen Umgebung. Die Immobilisierung der Enzyme in den Multischichten führt gleichzeitig zu einer erhöhten Temperatur- bzw. Säure- und Base-Beständigkeit.

Mit Hilfe der Layer-by-layer Technik ist es außerdem möglich, zwei verschiedene Enzyme auf demselben Partikel zu immobilisieren. Da in dieser Arbeit Enzyme verwendet wurden, die zusammen in einem gekoppelten Enzymtest nachgewiesen werden können, konnte die Aktivität beider Enzyme gleichzeitig auf demselben Partikel nachgewiesen werden und so eine Zwei-Stufen Reaktion durchgeführt werden.

Die Einführung einer zweiten funktionellen Einheit auf demselben Partikel konnte ebenso verwirklicht werden. Den Partikeln wurde durch Beschichtung mit Magnetit-Nanopartikeln eine magnetische Funktion gegeben. Durch eine folgende Beschichtung mit Enzymen, wurde gleichzeitig eine enzymatische Aktivität erzielt. Für mögliche Anwendungen kann dies eine leichtere Wiederverwendung der Partikel bedeuten, da eine einfache Möglichkeit zum Sammeln der Partikel mit einem Magneten gegeben ist.

Um die Beladung der Partikel mit Enzym zu verbessern, sollte die Stabilität der äußeren Enzymschicht verbessert werden. Dieses wurde mit Hilfe der „Premixing“-Methode versucht. Dabei wird das Enzym mit der doppelten Menge eines entgegengesetzt geladenen Polyelektrolyten in Lösung gemischt. Es bildet sich ein Polyelektrolyt-Enzym-Komplex mit der Ladung des Polyelektrolyten. Dieser Komplex wird dann mit der Layer-by-layer Technik auf die Partikel gebracht. Es wurde aber festgestellt, daß diese Komplexe eine 60-70 % geringere Aktivität als die gleiche Menge Enzym unkomplexiert aufwiesen. Durch die Komplexierung wurden die aktiven Zentren der Enzyme blockiert.

Es war eine größere Zunahme in der Schichtdicke, verglichen mit den oben bestimmten Schichtdicken, meßbar, auch wenn hier immer noch Schichtdicken im Submonolagen-Bereich beobachtet wurden. Die nachfolgend aufgebrauchte Polyelektrolytschicht löste nichts von der äußeren Enzym-Polyelektrolyt-Komplex-Schicht ab. Die Stabilität konnte also durch diese Methode deutlich gesteigert werden. Die Schichten zeigten aber, wie schon die Komplexe in Lösung, eine geringere enzymatische Aktivität.

Eine dritte Art der Immobilisierung von Enzymen auf Partikeln war eine Kombination aus Schichtaufbau durch elektrostatische und spezifische Wechselwirkungen. Dabei wurde Avidin über elektrostatische Wechselwirkungen auf Polyelektrolytschichten immobilisiert. Ein kovalent mit Biotin gekoppeltes Enzym wurde anschließend dazugegeben. Auf Grund der

starken Wechselwirkung zwischen Biotin und Avidin fand ein Schichtwachstum statt. Die gebildeten Enzymschichten wiesen eine große Schichtdicke auf. Es wurde in etwa eine komplette Monolage Enzym geformt. Die Schichten wiesen sehr hohe Aktivitäten auf, in etwa gleich der des freien Enzyms in Lösung, es kommt jedoch zur Aggregation der Partikel.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde über die Herstellung biokompatibler Hohlkugeln berichtet. Es wurden dabei zwei Systeme für die Untersuchungen gewählt. Zum einen Alginsäure/Polylysin, zum anderen DNA/Spermidin. Es war möglich, mit diesen geladenen Molekülen Schichten aufzubauen. Die nach der Auflösung des Templats entstandenen Hohlkugeln zeigten eine von Polyelektrolythohlkugeln nur wenig unterschiedliche Erscheinungsform. Die Besonderheit der DNA/Spermidin-Hohlkugeln liegt darin, daß sie sich durch Zugabe von NaCl auflösen lassen. Die Auflösung wurde dabei an flachen Filmen eingehender untersucht. Es wurde gefunden, daß die Auflösungsgeschwindigkeit von der Salzkonzentration abhängt. Dieses System könnte also für Arzneidarreichungsformen sehr interessant werden.

In dem letzten Teil der Arbeit wurden CaCO_3 -Partikel als neue, anorganische Template benutzt. Diese Teilchen sind leicht und kostengünstig herzustellen. Sie eignen sich für die Layer-by-layer Technik durch ihre entweder schon vorhandenen oder durch pH-Wert-Änderungen induzierten Oberflächenladungen. Es konnte durch Mikroelektrophorese und konfokale Mikroskopie ein Schichtaufbau gezeigt werden.

Die Auflösung der beschichteten Teilchen ist schwieriger als die der unbeschichteten. Durch pH-Wert-Änderungen, bei denen sich die unbeschichteten Teilchen gut auflösen, war keine Auflösung möglich. Durch Einsatz eines Komplexbildners für das Calcium, wie z. B. EDTA, konnten die Partikeln schonend aufgelöst werden.

In dieser Arbeit konnten neue Anwendungen für die Layer-by-layer Technik auf kolloidalen Templaten gezeigt werden. Es war auf diese Weise möglich, dünne sehr definierte Filme herzustellen und mit unterschiedlichen Eigenschaften auszustatten. Die Moleküle bewahren ihre Funktion in den Filmen, teilweise wird ihre Beständigkeit erhöht. Neuartige Hohlkugeln lassen neue Anwendungen, z.B. bei Arzneimittelabgaben, zu. Durch Verwendung schonend auflösender Template kann die Herstellung von Hohlkugeln aus sehr empfindlichen Filmen ermöglicht werden.

6.2 Ausblick

Diese Arbeit hatte zur Aufgabe ein relativ neues Arbeitsgebiet ein Stück weiter zu erschließen. Es sollte der Weg für weiterführende Arbeiten geebnet werden. Daher ergeben sich aus dieser Arbeit eine Reihe neuer Fragen, die es loht näher zu beleuchten bzw. zu untersuchen:

Von Interesse wäre es, die mechanischen Eigenschaften der Hohlkugeln sowohl bestehend aus dem Fe-PE als auch aus den Biopolymeren zu untersuchen. Dabei könnten auch andere, vernetzbare Biopolymere, wie z. B. Chitosan untersucht werden.

Eine Variation des Liganden des Fe-PE könnte zu einer selektiven Auflösung des Polymers in den Schichten führen.

Es wird schon an der Frage gearbeitet, ob es möglich ist, noch kleinere Partikel (mit höherer Dichte, z.B. Metallkolloide) zu beschichten.

Es könnten Versuche mit anderen, weniger stabilen Enzymen vorgenommen werden, um festzustellen, ob die Immobilisierung sich vorteilhaft auf die Stabilität und damit Aktivität der Enzyme auswirkt. Es sollten auch die Polyelektrolyte noch weiter variiert werden, um den Einfluß der Schichten auf die Enzyme besser zu verstehen.

Das Verhalten der CaCO_3 -Partikel sollte noch genauer untersucht werden. Es müßten sowohl die verwendeten Polyelektrolyte als auch die Anzahl der Schichten variiert werden.

Eine generelle Untersuchung der Polyelektrolyt-Schichten hinsichtlich ihrer Puffereigenschaften ist für viele Systeme nützlich.

Andere „anorganische“ Kolloide könnten auf ihr Potential als mögliche (auflösbare) Template getestet werden.

Als generelles Problem müßte der Aspekt der kolloidalen Stabilität der Teilchen bei Beschichtungen unter verschiedenen Bedingungen genauer untersucht werden.

7 Danksagung

Ich möchte allen Danken, die zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte zuallererst meinem Betreuer Prof. Helmut Möhwald für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen zu können, sowie die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge danken. Ebenfalls möchte ich Dr. Frank Caruso für die Betreuung und die vielen Diskussionen danken. Auch allen weiteren Mitgliedern der „Caruso-Gruppe“ Andreas Fery, Amir Dibaj, Christine Pilz, David Gittins, Peter Schütz, Björn Schöler, Dayang Wang, Wen Jin, Guruswamy Kumaraswamy, Xiangyang Shi und allen die für mehr oder weniger kurze Zeit in der Gruppe gearbeitet haben für die immer gute Atmosphäre und die hilfreichen Tips und Diskussionen im Labor oder bei den zahlreichen, ausgiebigen Gruppenmeetings. Danken möchte ich auch allen anderen, die mit Kapseln gearbeitet haben wie Andreas Voigt, Gleb Sukhorukov, Edwin Donath, Andrei Susha und Sergio Moya und immer zu Diskussionen bereit waren und mir viele Ratschläge geben konnten.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Heinz Lichtenfeld, Heidi Zastrow, Ingeborg Bartsch, Anne Heilig, Christine Pilz und Ulli Blöck (HMI) für die zahlreichen Messungen an der SPLS, dem Zeta-Sizer, dem AFM und TEM bedanken. Ohne ihre Hilfe hätte die Arbeit wesentlich länger gedauert und ich habe auch viel von ihnen lernen können.

Dann möchte ich mich noch bei allen Kollegen für die stets gute Atmosphäre im Institut bedanken, besonders bei der Adlershofer Teerunde mit Mark, Andrea, Torsten, Inga und wechselnden Gästen, sowie den Mensagängern Pit, Markus, Henning, Inga, Randolph, Björn und Peter und allen die auch sonst immer für einen kleinen Plausch zu haben waren.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für die stetige Unterstützung bedanken.

8 Literatur

- [Ald, 1983] Alder, J. F.; McCallum, J. J., *Analyst*, **108**, (1983), 1169
- [Ali, 1999] Aliev, F. G.; Correa-Duarte, M. A.; Mamedov, A.; Ostrander, J. W.; Giersig, M.; Liz-Marzan, L. M.; Kotov, N. A., *Adv. Mater.*, **11**, (1999), 1006
- [Ani, 1999] Anicet, N.; Bourdillion, C.; Moiroux, J.; Saveant, J.-M., *Langmuir*, **15**, (1999), 6527
- [Ant, 2000] Antipov, A. A.; Sukhorukov, G. B.; Leporatti, S.; Radtchenko, I. L.; Donath, E.; Möhwald, H., zur Veröffentlichung eingereicht
- [Anz, 1999] Anzai, J.-I.; Kobayashi, Y.; Nakamura, N.; Nishimura, M.; Hoshi, T., *Langmuir*, **15**, (1999), 221
- [Anz, 2000] Anzai, J.-I.; Kobayashi, Y., *Langmuir*, **16**, (2000), 2851
- [Ari, 1997] Ariga, K.; Onda, M.; Lvov, Y.; Kunitake, T., *Chemistry letters*, (1997), 25
- [Ary, 2000] Arys, X.; Jonas, A. M.; Laschewsky, A.; Legras, R., in: *Supramolecular Polymers*, Ciferri, A., Ed., Marcel Dekker, New York, (2000), 505
- [Ash, 1992] Ashwell, G. J., Ed., *Molecular Electronics*, Wiley, New York (1992)
- [Avn, 1994] Avnir, D.; Braun, S.; Lev, O.; Ottolenghi, M., *Chem. Mater.*, **6**, (1994), 1605
- [Bar, 1999] Bartkowiak, A.; Hunkeler, D., *Chem. Mater.*, (1999)
- [Ber, 1999] Bergbreiter, D. E., *Angew. Chem.*, **111**, (1999), 3044
- [Ber, 2000] Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewski, A.; Legras, R., *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, (2000), 319
- [Bin, 1986] Binning, G.; Quate, C.; Gerber, C.; *Phys. Rev. Lett.* **56** (1986) 930
- [Bla, 1999] Black, F. E.; Hartshorne, M.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B.; Williams, P. M.; Shakesheff, K. M., *Langmuir*, **15**, (1999), 3157
- [Blo, 1934] Blodgett, K. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, (1934), 495
- [Blo, 1991] Bloomfield, V.A., *Biopolymers*, **31** (1991), 1471
- [Bus, 1980] Buske, N.; Lichtenfeld, H.; Katz, W.; Sonntag, H., *Colloid Polym. Sci.*, **258**, (1980), 1303
- [Car, 1982] Carter, F. L., Ed., *Molecular Electronic Devices*, Dekker, New York, (1982)
- [Car, 1997] Caruso, F.; Niikura, K.; Furlong, D. N.; Okahata, Y., *Langmuir*, **13**, (1997), 3427
- [Car, 1998a] Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Giersig, M.; Möhwald, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, (1998), 8523
- [Car, 1998b] Caruso, F.; Caruso, R. A.; Möhwald, H., *Science*, **282**, (1998), 1111

- [Car, 1999a] Caruso, F.; Schüler, C.; Kurth, D. G., *Chem. Mater.*, **11**, (1999), 3394
- [Car, 1999b] Caruso, F.; Susha, A.S.; Giersig, M.; Möhwald, H., *Adv. Mater.*, **11**, (1999), 950
- [Car, 1999c] Caruso, F.; Lichtenfeld, H.; Donath, E.; Möhwald, H.; *Macromolecules*, **32**, (1999), 2317
- [Car, 1999d] Caruso, F.; Möhwald, H.; *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, (1999), 6039
- [Car, 2000] Caruso, F.; Schüler, C., *Langmuir*, (2000), in press
- [Cas, 1998] Cassier, T.; Lowack, K.; Decher, G., *Supramolecular Science*, **5**, (1998), 309
- [Cas, 2000] Castelnovo, M.; Joanny, J.-F., *Langmuir*, **16**, (2000), 7524
- [Cla, 1997] Clark, S. L.; Montague, M. F.; Hammond, P. T., *Macromolecules*, **30**, (1997), 7237
- [Coh, 1988] Cohen-Suart, M. A., *J. Phys. France*, **49**, (1988), 1001
- [Cöl, 1998] Cölfen, H.; Antonietti, M., *Langmuir*, **14**, (1998), 582
- [Dec, 1991a] Decher, G.; Hong, J.-D.; Schmitt, J., *Thin solid films*, **210/211**, (1991), 831
- [Dec, 1991b] Decher, G.; Hong, J.-D., *Macromol. Chem., Macromol. Symp.*, **46**, (1991), 321
- [Dec, 1991c] Decher, G.; Hong, J.-D., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **95**, (1991), 1430
- [Dec, 1992a] Decher, G.; Schmitt, J., *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **89**, (1992), 160
- [Dec, 1992b] Decher, G.; Hong, J.-D.; Schmitt, J., *Thin solid films*, **210/211**, (1992), 831
- [Dec, 1993] Decher, G.; Eßler, F.; Hong, J.-D.; Lowack, K.; Schmitt, J.; Lvov, Y., *Polymer Preprints*, **34(1)**, (1993), 745
- [Dec, 1994] Decher, G.; Lvov, Y.; Schmitt, J., *Thin solid Films*, **244**, (1994), 772
- [Dec, 1997] Decher, G., *Science*, **277**, (1997), 1232
- [Don, 1997] Donath, E.; Walther, D.; Shilov, V. N.; Knippel, E.; Budde, A.; Lowack, K.; Helm, C. A.; Möhwald, H., *Langmuir*, **13**, (1997), 5294
- [Don, 1998] Donath, E.; Sukhorukov, G. B.; Caruso, F.; Davis, S. A.; Möhwald, H., *Angew. Chem.*, **110**, 2324
- [Dub, 1999] Dubas, S. T.; Schlenoff, J. B., *Macromolecules*, **32**, (1999), 8153
- [Dun, 1974] Dunnill, P.; Lilly, M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, (1974), 987
- [Fle, 1996] Fleeer, G. J., *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **100**, (1996), 936
- [He, 1998] He, J.-A.; Samuelson, L.; Li, L.; Kumar, J.; Tripathy, S. K., *Langmuir*, **14**, (1998), 1674
- [Hec, 1993] Hecht, H.J.; Kalisz, H.M.; Hendle, J.; Schmid, R.D.; Scomburg, D.; *J. Mol. Biol.*, **229** (1993), 153
- [Hen, 1999] Henriksen, A.; Smith, A.I.; Gajhede, M., *J. Biol. Chem.*, **274**, (1999), 35005

- [Hir, 1982] Hirschbein, B.L.; Whitesides, G.M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, (1982), 157
- [Ile, 1966] Iler, R.K.; *J. Colloid Interface Sci.*, **21**, (1966), 569
- [Kab, 1998] Ed. By Kabanov, A.V.; Felgner, P.L.; Seymour, L.W.; Wiley, UK, (1998)
- [Kat, 1995] Kato, K.; Sano, S.; Ikada, Y., *Colloids and Surfaces B*, **4**, (1995), 221
- [Kam, 1999] Kamyshny, A.; Toledano, O.; Madgassi, S., *Colloids and Surfaces B*, **13**, (1999), 187
- [Kit, 1962] Kitano, Y.; Park, K.; Hood, D. W., *J. Geophys. Res.*, **67**, (1962), 4873
- [Kot, 1995] Kotov, N. A.; Dekany, I.; Fendler, J. H., *J. Phys. Chem.*, **99**, (1995), 13065
- [Kur, 1999] Kurth, D. G.; Caruso, F.; Schüler, C., *Chem. Commun.*, (1999), 1579
- [Lan, 1917] Langmuir, I., *J. Am. Chem. Soc.*, **39**, (1917), 1848
- [Lan, 1935] Langmuir, I.; Blodgett, K. B., *Kolloid-Z.*, **73**, (1935), 257
- [Lan, 1999] Landfester, K.; Bechthold, N.; Tiarks, F.; Antonietti, M., *Macromolecules*, **32**, (1999), 2679
- [Leh, 1966] Lehninger, A. L., *Naturwiss.*, **53**, (1966), 57
- [Leh, 1995] Lehn, J.-M.; Ed., *Supramolecular Chemistry*, VCH Weinheim (1995)
- [Lep, 2000] Leporatti, S.; Voigt, A.; Mitlöhner, R.; Sukhorukov, G.; Donath, E.; Möhwald, H., *Langmuir*, **16**, (2000), 4059
- [Li, 1998] Li, Z. F.; Kang, E. T.; Neoh, K. G.; Tan, K. L., *Biomaterials*, **19**, (1998), 45
- [Lic, 1995] Lichtenfeld, H.; Knapschinsky, L.; Sonntag, H.; Shilov, V., *Colloids and Surfaces A*, **104**, (1995), 313
- [Lic, 1998] Lichtenfeld, H.; Shilov, V.; Knapschinsky, L., *Colloids and Surfaces A*, **142**, (1998), 155
- [Low, 1998] Lowack, K.; Helm, C. A., *Macromolecules*, **31**, (1998), 823
- [Lvo, 1993a] Lvov, Y.; Decher, G.; Möhwald, H., *Langmuir*, **9**, (1993), 481
- [Lvo, 1993b] Lvov, Y.; Decher, G.; Sukhorukov, G.B., *Macromolecules*, **26(20)**, (1993), 5396
- [Lvo, 1994] Lvov, Y.; Hass, H.; Decher, G.; Möhwald, H.; Michailov, A.; Mtchedlishvily, B.; Morgunova, E.; Varnshtein, B., *Langmuir*, **10**, (1994), 4232
- [Lvo, 1995] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake T., *Chem. Commun.*, (1995), 2313
- [Lvo, 1995b] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake T., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, (1995), 6117
- [Lvo, 1996] Lvov, Y.; Ariga, K.; Ichinose, I.; Kunitake T., *Thin solid films*, **284/285**, (1996), 797

- [Lvo, 2000] Lvov, Y.; Möhwald, H.; Eds., *Protein Architecture: Interfacing Molecular Assemblies and Immobilisation Biotechnology*, Marcel Dekker, Inc.: New York, (2000)
- [Lyk, 1996] Lyklema, J.; Norde, W., *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **101**, (1996), 9
- [Mol, 1999] Molinar-Bolivar, J. A.; Galisteo-Gonzales, F.; Hidalgo-Alvarez, R., *Colloids and Surfaces B*, **14**, (1999), 3
- [Nak, 1991] Nakamura, N.; Hashimoto, K.; Matsunaga, T., *Anal. Chem.*, **63**, (1991), 268
- [Net, 1998] Netz, R. R.; Joanny, J.-F., *Macromolecules*, **31**, (1998), 5123
- [Net, 1999a] Netz, R. R.; Joanny, J.-F., *Macromolecules*, **32**, (1999), 9026
- [Net, 1999b] Netz, R. R.; Joanny, J.-F., *Macromolecules*, **32**, (1999), 9013
- [Nev, 1996] Nevskaiia, D. M.; Guerrero-Ruiz, A.; Lopez-Gonzales, J. D., *J. Colloid Interface Sci.*, **58**, (1996), 390
- [Obe, 1999] Oberholzer, M. R.; Lenhoff, A. M., *Langmuir*, **15**, (1999), 3905
- [Ond, 1996a] Onda, M.; Lvov, Y., Ariga, K.; Kunitake, T., *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, (1996), 502
- [Ond, 1996b] Onda, M.; Lvov, Y., Ariga, K.; Kunitake, T., *Biotechnology and Bioengineering*, **51**, (1996), 163
- [Ond, 1998] Onda, M.; Ariga, K.; Kunitake, T., *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, (1998), 69
- [Pap, 1985] Papenhuijzen, J.; van der Schee, H. A.; Flier, G. J., *J. Coll. Interf. Sci.*, **104**, (1985), 540
- [Pel, 1996] Pelta, J.; Durand, D.; Doucet, J.; Livolant, F., *Biophysical Journal*, **71**, (1996), 48
- [Per, 1999] Perez-Luna, V. H.; O'Brian, M. J.; Oppermann, K. A.; Hampton, P. D.; Lopez, G. P.; Klumb, L. A.; Stayton P. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, (1999), 6469
- [Peu, 1993] Peula- Garcia, J. M.; de las Nieves, F. J., *Colloids and Surfaces A*, **77**, (1993), 199
- [Peu, 1994] Peula- Garcia, J. M.; de las Nieves, F. J., *Colloids and Surfaces A*, **90**, (1994), 55
- [Peu, 1997] Peula- Garcia, J. M.; Hidalgo-Alvarez, R.; de las Nieves, F. J., *Colloid Polym. Sci.*, **275**, (1997), 198
- [Pug, 1994] Pugliese, L.; Malcovati, M.; Coda, A.; Bolognesi, M.; *J. Mol. Biol.*, **235**, (1994) 42
- [Sap, 1999] Sapp, S. A.; Mitchell, D. T.; Martin, C. R., *Chem. Mater.*, **11**, (1999), 1183
- [Sau, 1959] Sauerbrey, G., *Z. Phys.*, **155**, (1959), 206

- [Sch, 1993] Schmitt, J.; Grünewald, T.; Kjaer, K.; Decher, G.; Lösche, M., *Macromolecules*, **26**, (1993), 7058
- [Sch, 1998] Schütte, M.; Kurth, D.G.; Linford, M.R.; Cölfen, H.; Möhwald, H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, (1998), 2891
- [Sch, 2000] Schüler, C.; Caruso, F., *Macromol. Rapid Commun.*, **21**, (2000), 750
- [Sed, 1998] Sedlak, M.; Antonietti, M.; Cölfen, H., *Macromol. Chem. Phys.*, **199**, (1998), 247
- [Sin, 1997] Singhal, K.; Bartlett, P. N., *Langmuir*, **13**, (1997), 2708
- [Sht, 1994] Shtelzer, S.; Braun, S., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **19**, (1993), 293
- [Suk, 1996] Sukhorukov, G. B.; Möhwald, H.; Decher, G.; Lvov, Y., *Thin solid films*, **284/285**, (1996), 220
- [Suk, 1998a] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Lichtenfeld, H.; Knippel, E.; Knippel, M.; Budde, A.; Möhwald, H., *Colloids and Surfaces A*, **137**, (1998), 253
- [Suk, 1998b] Sukhorukov, G. B.; Donath, E.; Davis, S.; Lichtenfeld, H.; Caruso, F.; Popov, V. I.; Möhwald, H., *Polym. Adv. Technol.*, **9**, (1998), 759
- [Sun, 1996] Sun, Y.; Zhang, X.; Sun, C.; Wang, Y.; Shen, J., *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, (1996), 147
- [Sun, 1999] Sun, Y.; Sun, J.; Zhang, X.; Sun, C.; Wang, Y.; Shen, J., *Thin solid Films*, **327-329**, (1999), 730
- [Sus, 2000] Susha, A. S.; Caruso, F.; Rogach, A. L.; Sukhorukov, G. B.; Kornowski, A.; Möhwald, H.; Giersig, M.; Eychmüller, A.; Weller, H., *Colloids and Surfaces A*, **163**, (2000), 39
- [Ted, 2000] Tedeschi, C.; Caruso, F.; Möhwald, H.; Kirstein, S., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, (2000), 5841
- [Tru, 1999] Trubetskoy, V.S.; Loomis, A.; Hagstrom, J.E.; Budker, V.G.; Wolff, J.A., *Nucleic Acids Research*, **27**, (1999), 3090
- [Uhl, 1989] Uhlen, M., *Nature*, **340**, 733
- [Voi, 1999] Voigt, A.; Lichtenfeld, H.; Sukhorukov, G. B.; Zastrow, H.; Donath, E.; Bäuml, H.; Möhwald, H., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**, (1999), 4037
- [Yoo, 1998] Yoon, J.-Y.; Kim, J.-H.; Kim, W.-S., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **12**, (1998), 15

9 Anhang

9.1 Analytische Methoden

ζ-Potential-Messungen

Die Messungen wurden mit einem ZETASIZER 4 der Firma Malvern durchgeführt. In einer Meßzelle wird eine Kapillarelektrophorese ausgeführt und über eine optische Detektionseinheit mit einem 5 mW Helium-Neon-Laser wird die Wanderungsrichtung- und geschwindigkeit der Teilchen gemessen. Dafür wurde die Probe so verdünnt, daß das Endvolumen etwa 4 mL betrug und die Konzentration von dem Gerät gut zu messen war. Verdünnt wurde entweder mit Wasser oder dem für die Beschichtung verwendeten Puffer. Die optische Detektionseinheit beruht auf der Photonenkorrelationspektroskopie.

Einzelteilchenlichtstreuung (SPLS)

Die Einzelteilchenlichtstreuung wurde in einer nichtkommerziellen Apparatur durchgeführt. Dabei werden die Partikel durch eine Kapillare mit 0,1 mm Durchmesser gespült und an deren Ende mit einem Argon-Laser (Innova 305) detektiert, der so fokussiert ist, daß die Detektion eines Partikels zur Zeit möglich ist. Vorwärts streuende Lichtpulse werden in Winkeln von 5 bis 10° detektiert. Die Intensitätsverteilung wird mit einem Multikanalanalysator gesammelt. Die Auswertung erfolgt am PC mit Hilfe eines Auswerteprogramms (multi-channel-analyser, Maestro II, EG&G ORTEC).

UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-spektroskopischen Messungen und die enzymatischen Aktivitätstests wurden an einem Varian Cary 4E UV-Visible Spektrometer durchgeführt.

Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Rasterkraftmikroskopische Messungen wurden an einem NanoScope 3A multimode der Firma Digital Instruments GmbH, Mannheim durchgeführt. Die Abbildungen erfolgten mit einer Silizium-Spitze im Tapping-Mode.

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Aufnahmen wurden an einem Gerät der Firma Philips, Modell CM 12 durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung betrug 120 kV. Die Proben wurden auf ein mit Kohlenstoff beschichtetes Kupfergrid getropft und wurden nach etwa 1 min trockengetupft.

Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Die SEM-Aufnahmen erfolgten an einem Gerät der Firma Zeiss, Modell DSM 940. Die Beschleunigungsspannung betrug 20 kV. Die Proben wurden vor der Messung mit Pd oder Au bedampft.

Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen wurden an einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop der Firma Leica, Modell TCS durchgeführt. Die Anregungswellenlänge für das Fluorescein betrug 488 nm.

9.2 Zentrifugationsgeschwindigkeiten und –dauern

Es wurden drei verschiedene Zentrifugen benutzt:

-Hettich Universal 30F

-Eppendorf 5417R

-SIGMA 3K30

Alle Zentrifugen wurden mit einem Rotor für 24 Gefäße mit 1,5 bzw. 2 mL Probenvolumen benutzt.

Die 1,8 μm Melaminformaldehyd-Partikeln und die CaCO_3 -Partikeln wurden jeweils 5 min bei 8 000 g zentrifugiert, die 640 nm bzw 480 nm PS-Latices wurden jeweils 10 min bei 13 000 g zentrifugiert und die 70 nm PS-Latices 15 min bei 55 000 g. Nach Aufbringung von Schichten wurde die Zentrifugationszeit und –geschwindigkeit so reduziert, daß der Überstand klar war, sich die Partikeln aber noch gut resuspendieren ließen. Alle Biomoleküle wurden bei 4°C zentrifugiert, alle anderen bei 20°C bzw. Raumtemperatur.