

# Sachbericht zum Verwendungsnachweis

## Teil I: Kurzbericht

### „Janus-Partikel-basierter Biosensor für die nächste Generation der Überwachung von pharmazeutischen Schadstoffen“

## JaBaS

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

November 2025

**Förderkennzeichen:**

031B1118 A-C

**Vorhabentitel:** Janus-Partikel-basierter Biosensor für die nächste Generation der Überwachung von pharmazeutischen Schadstoffen (JaBaS)

**Verbundpartner:**

Prof. Dr. Martin Hofrichter, IHI Zittau, TU Dresden

Prof. Dr. Katrin Scheibner, BTU Cottbus-Senftenberg

PD. Dr. habil. Alla Synytska, BPI Bayreuth, Universität Bayreuth

**Koordination:**

Prof. Dr. Martin Hofrichter, IHI Zittau, TU Dresden

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

**Laufzeit des Vorhabens:** 01.12.2021 – 30.11.2024

### Aufgabenstellung sowie wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Das Hauptziel von JaBaS bestand in der Entwicklung eines innovativen Beschichtungs- und Herstellungsverfahrens für mikro- und nanostrukturierte Halbleiter-Sensor-Arrays auf der Grundlage chemisch anisotroper Janus-Partikel (JP) mit gerichteter Immobilisierung von unspezifischen Peroxygenasen (UPOs; EC 1.11.2.1). Die im Verbund entwickelte biohybride Immobilisierungstechnik ermöglicht den Zugang zu bisher nicht in der elektrochemischen Biosensorik eingesetzten Oxidoreduktasen (UPOs sowie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generierende Oxidasen).

Im Unterschied zu herkömmlichen Partikeln, die in der Materialwissenschaft und Analytik zum Einsatz kommen, gewähren hybride Janus-Partikel Asymmetrie- und Richtungsabhängigkeit. Zudem ist es möglich, eigentlich inkompatible Eigenschaften in einem Partikel zu vereinen. Die Oberflächenanisotropie dieser Partikel führt zu einer Entkopplung räumlich analytischer Funktionen (z. B. Target-Immobilisierung und Sensorik), die sonst nur schwer innerhalb eines einzelnen Partikels kombinierbar sind. Dies verleiht Janus-Partikeln einzigartige Eigenschaften und Funktionen, die insbesondere in Kombination mit den herausragenden katalytischen Eigenschaften von oxyfunktionalisierenden UPOs interessante Möglichkeiten für neuartige multimodale Analysemethoden eröffnen. So können enzymbasierte Janus-Partikel die Bildgebung oder die elektrochemische Detektion und Quantifizierung von Arzneimitteln und ihren Metaboliten verbessern. Vor allem das breite Substratspektrum verschiedener UPOs in unterschiedlichen Oxyfunktionalisierungsreaktionen – die nicht zuletzt diverse Pharmazeutika und Desinfektionsmittel (unabhängig davon, ob sie eine aromatische, terpenoide oder steroidale Struktur aufweisen) betreffen – prädestiniert diese Biokatalysatoren für den Einsatz in der biosensorischen Analyse von pharmazeutischen Spurenstoffen.

Daher wurden im Verbundprojekt Engpässe bei Biosensoren wie unzureichende Nachweisbereiche, mangelnde ortsgerichtete Immobilisierung und die Integration von Nanomaterialien zur Verbesserung der Empfindlichkeit durch die Synthese geeigneter Janus-UPO-Nanopartikel (Janus-UPO-NPs) angegangen. Eine Strategie zur Reduzierung von Mikroschadstoffen in der aquatischen Umwelt besteht darin, die Wege ihres Eintrags in natürliche Gewässer (sowohl Grund- als auch Oberflächenwasser) zu kontrollieren (Monitoring). Hinzu kommt, dass die Konzentration der Wirkstoffe von Desinfektionsmitteln trotz deren zunehmenden Einsatzes derzeit nicht als analytische Standardmaßnahme erfasst wird, da dies immense zusätzliche Kosten für Analysen zur Folge hätte. Dabei werden Desinfektionsmittel im Abwasser für den Menschen immer mehr zu einem Problem, da sie zusätzlich zu den bereits bestehenden Eintragungspfaden klassischer Antibiotika und ihrer Umwandlungsprodukte (z. B. über Toiletten) die Entwicklung von mikrobiellen Resistenzen fördern. Mit dem neu zu entwickelnden Biosensor-Konzept sollte ein Frühwarnsystem entwickelt werden, das den „Bediener“ vor kritischen Schadstoffbelastungen warnt. Nicht zuletzt könnten solche Systeme in Zukunft auch in anderen klinischen und mikrobiellen Kontrollpfaden zum Einsatz kommen.

Zusammengefasst bestanden folgende zentrale Aufgaben im Verbundvorhaben JaBaS:

- Entwicklung neuartiger polymerbasierter Janus-UPO-Biosensoren und Sensorsysteme auf Basis von Mikroelektroden zur Detektion von klinischen Schadstoffen und deren Metaboliten über Oxyfunktionalisierung für den Einsatz in der Prozess- und Umweltanalytik
- Etablierung einer universell und modular an gezielte Sensor- oder Biokatalyse-Anwendungen angepasste Immobilisierungstechnologie mit funktionellen, intelligenten Materialien zur Sensor- und Cofaktor-Generierung
- Innovative Beschichtungs- und Herstellungsverfahren für mikro- und nanostrukturierte Janus-Biosensor-Arrays
- Grundlagenforschung an der Janus-Oberfläche unter Berücksichtigung von „Mikro“- und „Nano“-Aspekten bzgl. der UPO-basierten, oxyfunktionalisierenden Sensorentwicklung
- Entwicklung eines neuen Sensorkonzepts zur Messung von pharmazeutischen Rückständen/Schadstoffen und Desinfektionsmittelbestandteilen in Abwässern (z. B. aus Krankenhäusern)
- Entwicklung von neuartigen, maßgeschneiderten, oxidativen Janus-Biokatalysatoren für die Biosensorik und Biokatalyse

#### Ablauf des Vorhabens

Am Verbundvorhaben waren drei Partner beteiligt: die Technische Universität Dresden (TUD, IHI Zittau), Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg (BTU) und das Bayerische Polymerinstitut (BPI) im Verbund mit der Universität Bayreuth (UBT). Die in JaBaS geplanten Arbeiten waren in vier große Arbeitspakete gegliedert, deren Unterpakete miteinander eng verzahnt waren. Im Lauf der Projektlaufzeit wurden die Arbeitsinhalte in den Kernthemen „Enzymproduktion“ (Leitung BTU), „Janus-Partikel-Synthese“ (Leitung BPI), „Immobilisierung“ (Leitung TUD) und „Biosensorentwicklung“ (Leitung TUD) umfänglich bearbeitet. Dabei wurden alle gesetzten Meilensteine vollständig erreicht.

#### Wesentliche Ergebnisse

In JaBaS wurde die Hauptzielstellung die Entwicklung eines innovativen Beschichtungs- und Herstellungsverfahrens für mikro- und nanostrukturierte Halbleiter-Sensor-Arrays auf der Basis geometrisch und chemisch anisotroper Biohybrid-Janus-Partikel mit gerichteter Immobilisierung von oxyfunktionalisierenden Biokatalysatoren vom Peroxygenase-Typ (UPO) vollumfänglich erfüllt. Besonders hervorzuheben ist die erfolgreiche Synthese eines leitfähigen hybriden Janus-Partikel-Systems unter Verwendung von polymerem DMAEMA auf einem leitfähigen Ag-Kern (Ag-PDMAEMA). Für dieses Partikelsystem gelang es erstmals, drei Peroxygenasen (UPOs: *AaeUPO*, *rAaeUPO*, *MroUPO*) und drei Oxidasen (zwei Laccasen und eine Glucose-Oxidase) zu immobilisieren. Das innovative Verfahren zur Herstellung von polymerbasierten, leitfähigen Janus-Partikelsystemen auf Ag-PDMAEMA-Basis unter Verwendung oxyfunktionalisierender Biokatalysatoren leistet einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung

neuer, multifunktionaler Nanomaterialien für verschiedene biotechnologische Anwendungen. Der aus Hybridpartikeln bestehende Modellsensor mit immobilisierter *Trametes-versicolor*-Laccase (*TveLac*) zeigte eine hervorragende analytische Leistung mit einer Empfindlichkeit von  $0,14 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$ , einer Nachweisgrenze von  $0,1 \mu\text{M}$  und einem breiten linearen Bereich von  $0,3\text{--}750 \mu\text{M}$ . Damit übertrifft er die meisten vergleichbaren Systeme, und das auch ohne weitere Optimierung. Diese neuen Erkenntnisse eröffnen nicht nur neue Perspektiven für die Entwicklung von enzymbasierten Biosensoren im Allgemeinen, sondern auch für eine neue Generation hochsensibler Biosensoren mit niedriger Nachweisgrenze.

Der Erfolg des JaBaS-Forschungsverbundes wird zukünftig in die Entwicklung neuer Forschungsideen und die Einwerbung neuer Forschungsprojekte einfließen, die sich gezielt mit der Übertragung der im Projekt entwickelten Plattformtechnologie (hybride Enzym-Janus-Partikel) auf weitere Anwendungsfelder beschäftigen werden. Ziel dieser Maßnahmen ist letztlich eine ökonomische Umsetzung.

#### Wesentliche Ergebnisse im Verbundvorhaben JaBaS waren:

- Identifizierung 24 neuartiger, v.a. kurzer („short“) UPO-Sequenzen aus sechs *de-novo* isolierten seltenen Pilzarten für die homologe und heterologe Proteinexpression,
- Nachweis substantieller Umsätze (25 bis 100 %) für sieben der zwölf ausgewählten Schadstoffe: Diclofenac (DCF), Ibuprofen (IBU), Biphenol-2-ol (2PP), Benzalkoniumchlorid (BAC), Ethinylestradiol (EE), Sulfamethoxazol (SMZ), Metoprolol (MTP) unter Verwendung von neun unterschiedlichen UPOs,
- lediglich geringe Umsätze wurden für Carbamazepin (CBZ), Naproxen (NPX), Bezafibrat (BZF) und Valsartan (VAL) beobachtet; Gabapentin (GAB) wurde nicht umgesetzt,
- die Schadstoffe DCF, CBZ, NPX, EE und 2PP erwiesen sich schließlich für die Messung mittels eines Biosensors als geeignet, da sie ihrem Reaktionstyp nach 1.) freie Elektronen generieren, die 2.) bei ausreichend hohem Umsatz durch die UPOs elektrische Signale detektieren lassen,
- Unterschiede bei der Produktbildung wurden zwischen den UPO-Clades der langen und kurzen UPOs (d.h. *AaeUPO* vs. *MroUPO*) bzgl. fast aller umgesetzten Schadstoffe festgestellt,
- erfolgreiche Immobilisierung von drei UPOs (*AaeUPO*, *rAaeUPO*, *MroUPO*) und einer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generierenden Oxidase (Glukose-Oxidase) auf leitfähigen Janus-Partikel-Systemen,
- Nachweis der erfolgreichen Immobilisierbarkeit einer UPO auf einem Janus-Partikel-System mit ausreichend hoher spezifischer Enzymaktivität ( $rAaeUPO = 6,6 \text{ U mg}^{-1}$ ,  $MroUPO = 8,6 \text{ mg}^{-1}$ ),
- Bestimmung projektrelevanter enzymkinetischer Parameter vor und nach der Immobilisierung: pH-Abhängigkeit und pH-Optimum sowie *total turnover number* (TTN) für die Umsetzung von DCF durch drei UPOs (*AaeUPO*, *rAaeUPO*, *MroUPO*); dabei

wurden die Kennzahlen durch die Immobilisierung an Janus-Partikeln nicht negativ beeinflusst,

- Selektion der *MroUPO*-Janus-Partikel als besonders geeignete Mikroaggregate für die Umsetzung von 2PP und EE,
- erfolgreiche Immobilisierung der *MroUPO* auf Ag@PDMAEMA-Janus-Partikeln, was allerdings mit einem erheblichen Einfluss auf das pH-Profil *MroUPO*-basierter Oxygenierungsreaktionen einherging (Verschiebung des Optimums für die Oxidation von Veratrylalkohol und DCF von pH 5,5 zu pH 7,0),
- Nachweis der grundsätzlichen Wiederverwendbarkeit des Materials durch Neubeladung („*Recycling*“) der UPO-Janus-Partikel,
- die biosensorische Detektion von Oxidations- und Reduktionssignalen wies Abhängigkeiten von Parametern wie Substratkonzentration, pH-Wert und Enzymaktivität an den Janus-Partikeln auf,
- die Bildung unterschiedlicher Reaktionsprodukte äußerte sich in der Generierung von Reduktionspeaks bei verschiedenen Potentialen,
- die Überlagerung der Signale mehrerer Potentiale erschwerte die Detektion von Einzelverbindungen in einem Schadstoffgemisch,
- erfolgreiche Neuetablierung von Synthesewegen für die Herstellung von polymerbasierten, leitfähigen Janus-Partikel-Systemen und Identifikation der zwei besten Partikelsysteme auf der Basis von Silber als Kernmaterial und PDMAEMA [Poly(2-(dimethylamino)ethyl acrylat)] als bürstenartiger Schale zur effizienten Immobilisierung von Laccasen aus *Trametes versicolor* (*TveLa*) und *Pycnoporus cinnabarinus* (*PciLac*) und UPOs unterschiedlicher Herkunft (*MroUPO*, *AaeUPO*, *rAaeUPO*) sowie zur Herstellung von elektrochemischen Biosensoren,
- erfolgreiche Optimierung der Pfropfdichte und Länge der Polymerketten für die kontrollierbare und effiziente Enzymbeladung (Laccasen und UPOs) unter Bewahrung der Aktivität,
- kontrollierte Leitfähigkeit der synthetisierten Janus-Partikel-basierten Systeme,
- erfolgreiche Beschichtung von kommerziell erhältlichen Siebdruckelektroden mit den enzymbeladenen Hybrid- oder Janus-Partikeln (für Laccase und UPOs),
- erfolgreiche Etablierung eines Modell-Sensors unter Einsatz von Laccase (*TveLac*) zur Detektion von Hydrochinon. Erfassung von zahlreichen elektrochemischen Kenndaten und Interpretation der elektrochemischen Prozesse im erhaltenen Biosensor,
- hybride Träger auf Partikel-Polymer-Basis sind einfach zu handhaben und zu lagern und ermöglichen die reproduzierbare Herstellung von Sensoren mit exakt definierter Enzymbeladung,
- erfolgreiche Kalibrierung und Bestimmung des LOD (*low detection limit*, untere Nachweisgrenze) für den *TveLac*-basierten, elektrochemischen Modell-Biosensor zur Detektion von Hydrochinon,

- erstmaliger Nachweis der Eignung büstendekorierter haariger Träger mit physikalisch adsorbierten Enzymen zur Detektion von Hydrochinon und Feststellung der prinzipiellen Eignung solcher Systeme für die Enzymspeicherung und den Einsatz in der Bioelektrokatalyse,
- Nachweis hervorragender analytischer Leistungen für einen Modellsensor aus Hybridpartikeln mit immobilisiertem *TveLac* mit einer Empfindlichkeit von  $0,14 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$ , einer Nachweisgrenze von  $0,1 \mu\text{M}$  und einem breiten linearen Bereich von  $0,3\text{-}750 \mu\text{M}$ , der die meisten vergleichbaren Systeme auch ohne weitere Optimierung übertrifft.

## Sachbericht zum Verwendungsnachweis

### Teil II: Eingehende Darstellung

„Janus-Partikel-basierter Biosensor  
für die nächste Generation der Überwachung von pharmazeutischen Schad-  
stoffen“

**JaBaS**

GEFÖRDERT VOM



November 2025

Förderkennzeichen:

031B1118 A-C

Vorhabentitel: Janus-Partikel-basierter Biosensor für die nächste Generation der Überwachung von pharmazeutischen Schadstoffen (JaBaS)

Verbundpartner:

Prof. Dr. Martin Hofrichter, IHI Zittau, TU Dresden

Prof. Dr. Katrin Scheibner, BTU Cottbus-Senftenberg

PD. Dr. habil. Alla Synytska, BPI Bayreuth, Universität Bayreuth

Koordination:

Prof. Dr. Martin Hofrichter, IHI Zittau, TU Dresden

Sachbericht zum Verwendungsnachweis

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Laufzeit des Vorhabens: 01.12.2021 – 30.11.2024

### Konsortium und Koordination:

Das JaBaS-Konsortium vereinte drei Partner aus der akademischen Wissenschaft zu einem erfolgreichen Forschungsverbund:

- Professur für Umweltbiotechnologie (Prof. Dr. Martin Hofrichter), IHI Zittau, Technische Universität Dresden (TUD; Koordination)
- FG Enzymtechnologie (Prof. Dr. Katrin Scheibner), Brandenburgische Technische Universität Cottbus-Senftenberg (BTU);
- Bayerisches Polymerinstitut, FG Funktionelle Polymer-Grenzflächen, Universität Bayreuth (PD. Dr. habil. Alla Synytska) (BPI).

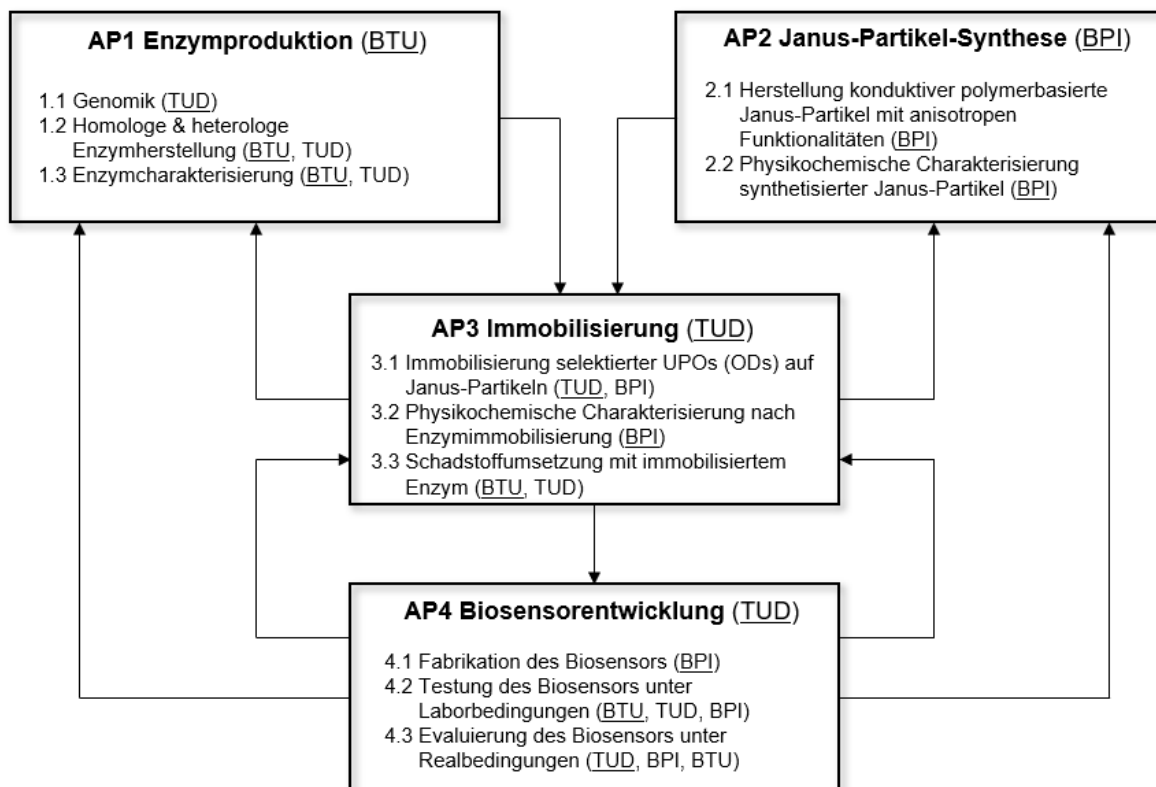
Die zur Erfüllung der Projektziele notwendigen Arbeiten in JaBaS wurden vier großen Arbeitspaketen zugeordnet, die, ausgehend von den Kernkompetenzen, unter die Leitung der einzelnen Partner gestellt wurden (Abbildung 1):

Arbeitspaket 1: Enzymproduktion unter Leitung der BTU;

Arbeitspaket 2: Janus-Partikel-Synthese unter Leitung des BPI;

Arbeitspaket 3: Immobilisierung unter Leitung der TUD;

Arbeitspaket 4: Biosensorentwicklung unter Leitung der TUD.



**Abb. 1:** Schematische Übersicht über die Hauptarbeitspakete im JaBaS-Verbundvorhaben mit den wesentlichen Inhalten und den beteiligten Partnern (Leitung unterstrichen).

Gemäß der in JaBaS vorgesehenen Projektstruktur waren die geplanten Arbeiten in voneinander abhängige Teilpakete zu unterteilen. Dies machte eine enge Zusammenarbeit und gute Kommunikation zwingend erforderlich, um die Projektziele zu erreichen. Um aktuelle Projektergebnisse und neu entstandene Problemstellungen schnell und zeitnah diskutieren und lösen zu können, wurden alle Projekttreffen sowie kleinere Arbeitsgruppentreffen online durchgeführt. Die Treffen wurden entweder vom Koordinator TUD oder von der AP-Leitung organisiert und geleitet (Tab. 1). Neben der Organisation der Treffen lag die fristgerechte Verabschiedung der Kooperationsvereinbarung durch alle Partner, die Überwachung der arbeits- und termingerechten Umsetzung, die Kommunikation mit dem Projektträger sowie das Berichtswesen in der Verantwortung der TUD.

**Tab. 1:** Übersicht der Meilensteine

Wann	Was	Wo	Bemerkungen
06.05.2021	Vorbesprechung (Kooperationsvertrag, Organisatorisches)	online	alle Partner
02/2022	Unterzeichnung Kooperationsvertrag		fristgerecht erfolgt
18.02.2022	Kick-Off-Meeting	online	alle Partner
30.03.2022	Projektplanung		alle Partner
29.07.2022	Enzymlieferungen	online	alle Partner
02.11.2022	1. Jahrestreffen	online	alle Partner
29.06.2023	Projektplanung	online	alle Partner
17.10.2023	Statusseminar	Berlin	alle Partner
25.10.2023	2. Jahrestreffen	online	alle Partner
13.01.2024	Projektplanung	online	alle Partner
23.04.2024	Projektplanung	online	alle Partner
24.05.2024	Projektplanung	online	TUD & BTU
03.06.2024	Projektplanung	online	alle Partner
08.10.2024	3. Jahrestreffen	online	alle Partner
14.01.2025	Zwischen- und Abschlussberichte	online	alle Partner
20.03.2025	Zwischen- und Abschlussberichte	online	alle Partner

## **Erzielte Ergebnisse**

### Zusammenfassung

In dem Projekt JaBaS wurde das Hauptziel, die Entwicklung eines UPO-basierten hybriden Biosensors (sog. Janus-Partikel) zur Detektion von problematischen Abwasserschadstoffen und Pharmazeutika, vollständig erfüllt. Besonders hervorzuheben ist die erfolgreiche Herstellung von leitfähigen UPO-Janus-Partikeln, die sowohl für zum Verfolgen des Schadstoffabbaus als auch für die Detektion elektrischer Signale verwendet werden können. Gemäß den Bestimmungen des BMBF und dem Verwertungsplan wurden alle Projektergebnisse vor einer anderweitigen Veröffentlichung auf Patentfähigkeit geprüft. Die Ergebnisse sowie weitere Resultate wurden in zwei Publikationen zusammengefasst, die sich aktuell im Begutachtungsprozess befinden. Sie werden voraussichtlich bis 07/2025 der wissenschaftlichen Öffentlichkeit zugänglich gemacht. Darüber hinaus ist innerhalb der nächsten 24 Monate die Einwerbung eines Anschlussprojektes seitens des JaBaS-Forschungsverbundes anvisiert. In diesem Projekt sollen UPO-basierte Janus-Partikel für weitere industrielle Anwendungen, z.B. im Bereich der Feinchemikalien- und pharmazeutischen Industrie, demonstriert und etabliert werden. Die Verwendung der biohybriden Partikel in Reaktionskaskaden birgt ebenfalls ein interessantes Anwendungsspektrum, das Bestandteil neuer Forschungsansätze sein wird und zur Etablierung nachhaltiger, bioökonomischer Produktionsprozesse beitragen kann. Die im JaBaS-Projektplan vorgesehenen Arbeiten und Meilensteine wurden vollumfänglich durchgeführt bzw. erreicht.

**Tab. 2:** Übersicht der Meilensteine

Meilenstein		Partner	Monat
MS1	Erfolgreich etablierte Analytik zur qualitativen und quantitativen Substrat- und Produktbestimmung	BTU	✓
MS2	Identifizierung und Auswahl von mindestens 15 spezifischen Sequenzen und 5 Organismen für die homologe und heterologe UPO / OD-Produktion	TUD	✓
MS3	Produktion von mindestens drei Peroxygenasen in einem Rührkesselreaktor	BTU	✓
MS4	Erfolgreiche Etablierung einer Methodik für das Design von leitfähigen Hybrid-Janus-Partikeln mit sphärischer Geometrie als Modellsystem	BPI	✓
MS5	Herstellung von mindestens einer Oxidase in einem Rührkesselreaktor	TUD	✓
MS6	Umsetzung der entwickelten Route und der erfolgreich etablierten Vorgehensweise für das Design leitfähiger Hybrid-Janus-Partikel mit unterschiedlichen Funktionalitäten - Aufbau einer Bibliothek	BPI	✓
MS7	Bereitstellung von mindestens einer neuen rekombinanten Peroxygenase	BTU	✓
MS8	UPO-Immobilisierung und OD-Co-Immobilisierung auf Janus-Partikeln	TUD	✓
MS9	Bereitstellung von Janus-Partikeln zur Entwicklung eines Janus-UPO-(OD)-Modell-Biosensors	BPI	✓
MS10	Evaluierung des Janus-UPO-(OD)-Biosensors und Kenntnis seiner Leistungsfähigkeit	TUD	✓

**Tab. 3:** Ergebnisse der vollumfänglich erfüllten Meilensteine

Meilenstein	
MS1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LC-MS/MS basierte Analytik zum quantitativen und qualitativen Nachweis ausgewählter Abwasser schadstoffe in geringen, umweltrelevanten Ausgangskonzentrationen;</li> <li>- Auswahl der projektrelevantesten Abwasserschadstoffe: DCF, CBZ, NPX, EE, 2PP</li> </ul>
MS2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sechs sequenzierte Arten mit 24 neuen UPO-Sequenzen identifiziert und für weitere Expressionsstu dien zur Verfügung gestellt</li> </ul>
MS3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Homologe Produktion von fünf Wild-Typ UPOs (<i>Agrocybe aegerita</i>, <i>Marasmius rotula</i>, <i>Coprinellus radians</i>, <i>Candolleomyces eurysporus</i>, <i>Truncatella angustata</i>);</li> <li>- Heterologe Expression von zwei UPOs (<i>Agrocybe aegerita</i>, <i>Truncatella angustata</i>) in Hefe</li> </ul>
MS4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erfolgreiches Design von leitfähigen Hybrid-Janus-Partikeln mit sphärischen Geometrien basierend auf Ag-PDMAEMA und Ag-Janus-PDMAEMA</li> </ul>
MS5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Phenoloxidase (Laccase) und zwei Arylalkohol-Oxidasen (AAO) von <i>Pleurotus ostreatus</i> und einem nicht näher spezifizierten Ascomyceten in größeren Mengen im Rührkesselreaktor hergestellt</li> </ul>
MS6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Design leitfähiger Hybrid-Janus-Partikel (Bibliothek mit Ag-PDMAEMA Kern-Schale-Partikeln und Ja nus-Design sowie „Patchiness“) mit unterschiedlichen Funktionalitäten - Aufbau einer umfangreichen Bibliothek erfolgreich</li> </ul>
MS7	<ul style="list-style-type: none"> <li>- eine neue rekombinante Peroxygenase (<i>rTanUPO</i>) konnte mittels eines heterologen Expressions systems in Hefe (<i>Pichia pastoris</i>) erfolgreich hergestellt werden</li> </ul>
MS8	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immobilisierung mit ausreichend hoher spezifischer Enzymaktivität von zwei UPOs auf einem Janus-Partikel-System (<i>rAaeUPO</i> = 6,6 U/mg &amp; <i>MroUPO</i> = 8,6 U/mg);</li> <li>- Co-Immobilisierung einer Glukose-Oxidase mit <i>AaeUPO</i> auf einem Janus-Partikel-System</li> </ul>
MS9	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Synthese von verschiedenen Batches des favorisierten Janus-Partikel-Systems,</li> <li>- erfolgreiche Beschichtung von kommerziell erwerbba ren Siebdruckelektroden mittels <i>Drop-Casting</i> mit dem Enzym-beladenen Janus-Partikeln,</li> <li>- Beschichtung der Arbeitselektroden mit Janus-Partikeln mittels <i>RegeHu</i>-Drucker zur nachträglichen Beladung mit <i>MroUPO</i>.</li> </ul>
MS10	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Erfolgreiche Detektion von Hydrochinon mit einem Laccase-basierten Modellsensor</li> <li>- <i>MroUPO</i>-basierter Biosensor für Diclofenac-Detektion in niedrigen Konzentrationen (10 µM) geeignet</li> </ul>

## Arbeitspaket 1 – Leitung BTU: Enzymproduktion

### AP1.1 Genomik (TUD; M1-12)

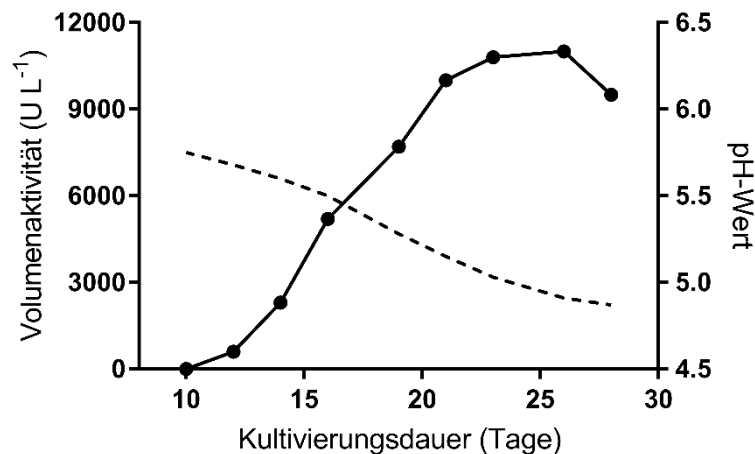
Um neue katalytisch aktive UPOs (unspezifische Peroxygenasen, EC 1.11.2.1) aus neuen und wenig untersuchten Braun- und Weißfäulepilzen zu identifizieren, hat die **TUD sechs Pilzgenome** (*Amyloporia xantha*, *Phaeolus schweinitzii*, *Ganoderma sessile*, *Fomitopsis cajanderi*, *Junghuhnia nitida* sowie *Hypholoma capnoides*) *de novo* sequenziert. Interessanterweise besitzen all diese Pilze ausschließlich „kurze“/„short“ und keine „langen“/„long“ UPOs im Genom. Das ist deshalb von Interesse, weil die kurzen UPOs einen relativ weiten Häm-Zugangskanal aufweisen. Dadurch sind sie imstande auch sperrige Moleküle und schlecht wasserlösliche Verbindungen umzusetzen. Die genannten Pilze und ihre Gene wurden in anschließenden Studien zur homologen und heterologen Enzymherstellung getestet. Insgesamt konnten anhand der sechs sequenzierten Arten 24 neue UPO-Sequenzen identifiziert und für verschiedene Expressionsstudien zur Verfügung gestellt werden.

### AP1.2 Homologe & heterologe Enzymherstellung (BTU, TUD; M1-30)

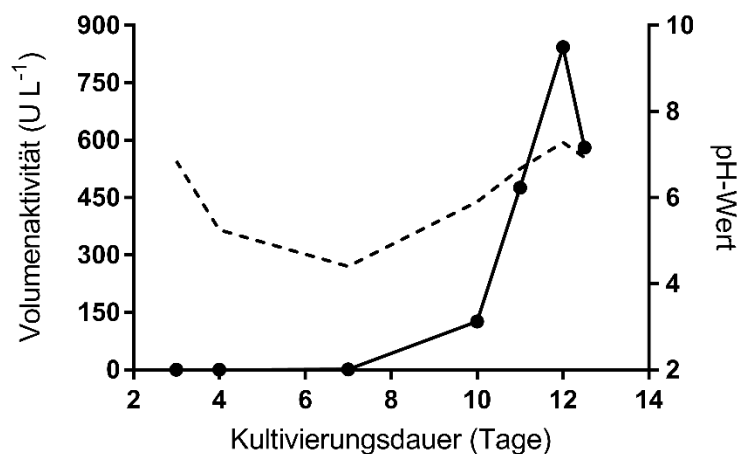
Sowohl an der **BTU** als auch an der **TUD** wurden im Projektverlauf **ausgewählte UPOs (> 3)** in unterschiedlich skalierten Rührkesselreaktoren **heterolog und homolog produziert**.

Die **homologe UPO-Produktion** an der **BTU** erfolgte unter Verwendung des bekannten UPO-Produzenten *Marasmius rotula* (*MroUPO*) sowie mit *Truncatella angustata* (*TanUPO*), einem völlig neuen UPO-Bildner. Es konnten UPO-Aktivitäten von bis zu 10.000 U L<sup>-1</sup> (Abb. 2, entspricht ca. 0,13 g UPO-Protein L<sup>-1</sup>) in einem Gesamtvolumen von 4,0 L für die *MroUPO* mit einer spezifischen Aktivität von 58 U mg<sup>-1</sup> und einem Reinigungsfaktor von 3,7 erreicht werden. Die neuartige UPO von *T. angustata* wurde in einem 30-L-Bioreaktor mit einem Arbeitsvolumen von 25 L hergestellt (Abb. 3). Die dabei sekretierte *TanUPO* erreichte eine Volumenaktivität von bis zu 840 U L<sup>-1</sup> (vgl. ZB 2022). Im weiteren Projektverlauf konnte eine erfolgreiche Reinigungsstrategie (drei Schritte auf Basis von Anionenaustausch- und Größenausschluss-Chromatographie) für dieses neue UPO-Protein erarbeitet werden. Dabei erfolgten zunächst zwei Konzentrierungsschritte (Ultrafiltration), eine Ammoniumsulfat-Fällung und dann die drei chromatographischen Isolationsschritte (Q-Sepharose FF, Mono Q, SEC/Größenausschluss).

Der Projektpartner **TUD** produzierte in unterschiedlich skalierten Bioreaktoren **vier UPOs von vier verschiedenen agaricalen Basidiomycota** (*Agrocybe aegerita*, *Coprinellus radians*, *Candolleomyces eurysporus*, *Marasmius wettsteinii*) sowie eine Laccase aus *Pycnoporus cinnabarinus* (*PciLac*). Die für das Vorhaben besonders wichtige UPO von *A. aegerita* (*AaeUPO*) wurde in 5- und 7-Liter-Reaktoren projektbegleitend produziert und gereinigt (vgl. ZB 2022). Im Projektverlauf wurden diese ständig hergestellten und gereinigten Präparate der *AaeUPO* (12 x 1 ml) und der *PciLac* (12 x 1,5 ml) dem Projektpartner BPI für Immobilisierungsversuche zur Verfügung gestellt.

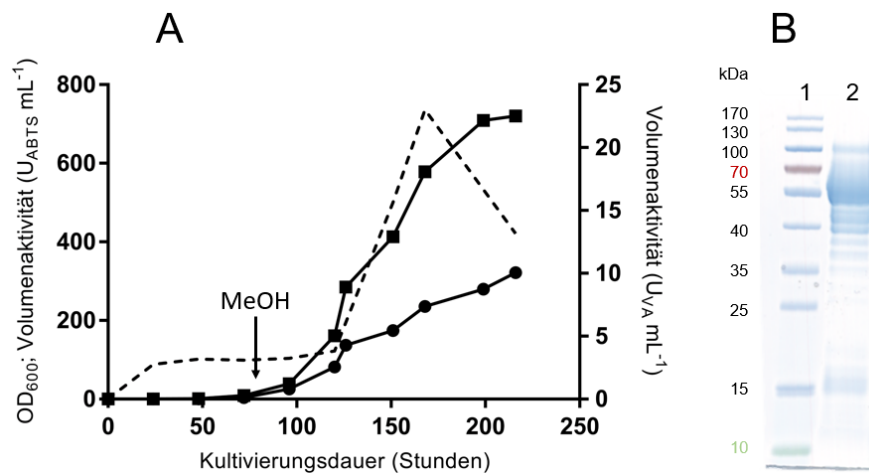


**Abb. 2:** Zeitlicher Verlauf der UPO-Aktivität von *M. rotula* (*Mro*UPO, schwarze Punkte) sowie des pH-Wertes (gestrichelte Linie) während der Kultivierung des Pilzes in einem N-reichen Kulturmedium. Die Volumenaktivität wurde mit Veratrylalkohol bei pH 5,5 gemessen.



**Abb. 3:** Zeitlicher Verlauf der UPO-Aktivität von *T. angustata* (*Tan*UPO, schwarze Punkte) sowie des pH-Wertes (gestrichelte Linie) während der Kultivierung des Pilzes in einem N-reichen Kulturmedium. Die Aktivität wurde mit ABTS bei pH 4,5 bestimmt.

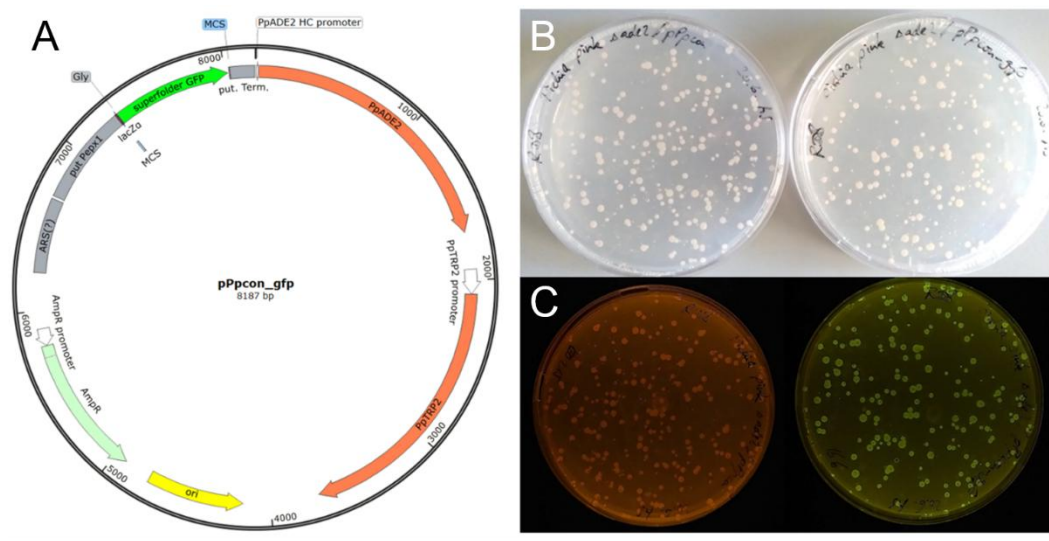
Die **Produktion rekombinanter UPO** durch die **BTU** erfolgte im Berichtszeitraum durch die heterologe Expression der *A.-aegerita*-UPO (*rAae*UPO) in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*); sie wurde über Methanol-Zugabe initiiert (Abb. 4). Das sekretierte rekombinante Enzymprotein erreichte im Rohextrakt eine Aktivität von bis zu 266.000 U L<sup>-1</sup> (bei pH 4,5 mit ABTS gemessen) bzw. 27.700 U L<sup>-1</sup> (bei pH 7,0 mit Veratrylalkohol als Testsubstrat).



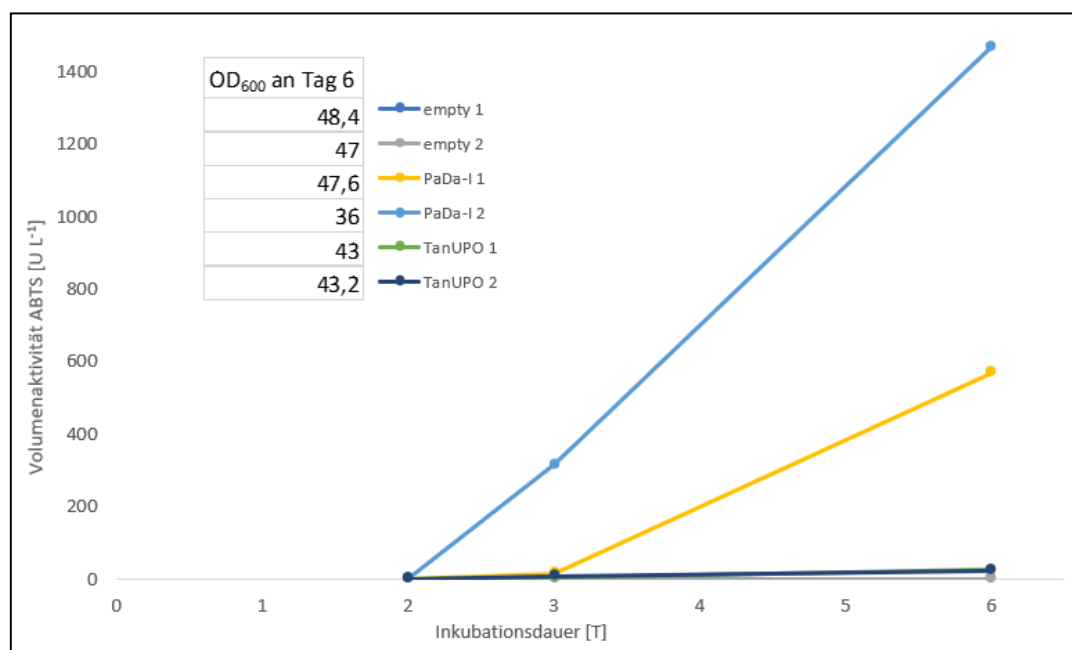
**Abb. 4:** (A) Zeitlicher Verlauf der Aktivität der rekombinanten UPO von *A. aegerita* (rAaeUPO) mit ABTS (Kreise, linke y-Achse) und Veratrylalkohol (Vierecke, rechte y-Achse) als Substraten und der Biomassebildung (gestrichelte Linie, linke y-Achse). (B) SDS-Gel der gereinigten rAaeUPO (2), Marker (1).

Zur **Produktion neuer rekombinanter UPOs** verfolgte die **BTU** darüber hinaus die Strategie der Etablierung eines episomalen Plasmids, welches in einem adeninauxotrophen *Pichia pastoris*-Stamm (syn. *Komagataella phaffii*) verwendet werden kann. In einem Vortest wurde zunächst die Sequenz des *green fluorescent protein* (GFP) als Reportergen in die *multiple cloning site* (MCS) eines kommerziellen Plasmids *via* Restriktionsverdau und Ligation kloniert. Die Verifizierung des Einbaus erfolgte durch Restriktionsanalyse und partielle Sequenzierung. In Abb. 5 (schwarzer Hintergrund) werden Agarplatten mit dem Kontroll-Plasmid (links, ohne GFP) und mit GFP-Plasmid (rechts) nach Anregung mit blauem Licht gezeigt. Die unter Lichtanregung grün fluoreszierenden Kolonien beweisen, dass das Reportergen erfolgreich exprimiert und GFP translatiert wurde. Dies macht wiederum deutlich, dass sowohl die autonom replizierende Sequenz (ARS) als auch der Promotor und Terminator funktional aktiv waren.

Die erfolgreiche **Etablierung eines Expressionssystems in *Pichia pastoris*** basierte auf der Integration eines episomal stabilen Plasmids, das mit einem konstitutiven Promotor gekoppelt war. Die Sequenz des zuvor als *proof-of-concept* verwendeten Reporterproteins GFP wurde anschließend gegen die Sequenz der AaeUPO PaDa-I (Positivkontrolle) und TanUPO (Zielprotein) ausgetauscht. Die *Pichia*-Varianten wurden in Schüttelkolben kultiviert und die Kulturüberstände auf UPO-Aktivität mit ABTS als Substrat getestet. Die höchste Aktivität, die mit der gut exprimierbaren Positivkontrolle PaDa-I erreicht wurde, betrug 1.468 U L<sup>-1</sup> (Abb. 6) und war vergleichbar mit anderen etablierten Expressionssystemen wie *Saccharomyces*. Damit konnte gezeigt werden, dass die heterologe Expression von UPOs im modifizierten *Pichia*-System prinzipiell funktioniert. Die höchste Aktivität, die für eine TanUPO-Sequenz erreicht wurde, lag bei 26 U L<sup>-1</sup>. Es ist bekannt, dass einzelne UPO-Gene sehr variabel mit unterschiedlichen Expressionssystem herstellbar sind. Mit den hier durchgeführten Arbeiten konnte erstmals eine TanUPO als rekombinantes Protein hergestellt werden, womit der entsprechende Meilenstein erfüllt wäre.



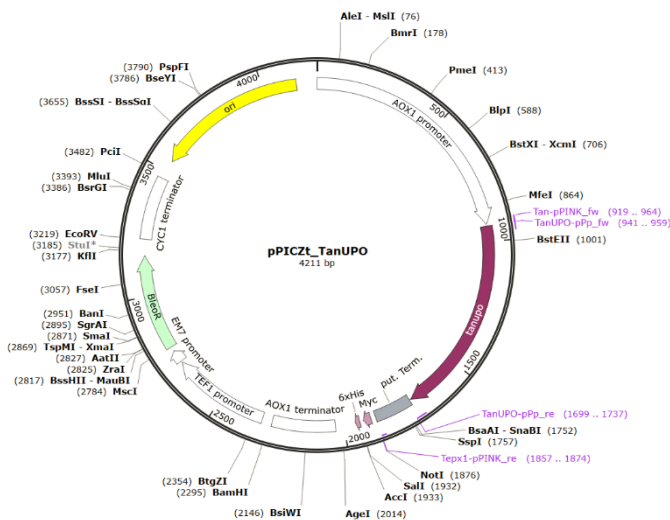
**Abb. 5:** (A) Testplasmid mit inseriertem GFP-Reportergen, (B) Platten mit Kontroll-Plasmid (links, 215 koloniebildende Einheiten) und dem GFP-Plasmid (rechts, 166 koloniebildende Einheiten), die unter Lichtanregung (C) orange (Kontroll-Plasmid) oder grün (GFP-Plasmid) leuchten, wodurch die erfolgreiche Expression und Translation des Reportergens bestätigt wurde.



**Abb. 6:** Aktivitätsverlauf (UPO-Aktivität gemessen mit ABTS) während der Kultivierung von *Pichia-pastoris*-Varianten in Schüttelkolben, die mit einem Leervektor, einem Plasmid mit dem *AaeUPO*-Gen (*PaDa-I-2* Variante, Positivkontrolle) oder den Genen der *TanUPO* 1 & 2 transformiert worden waren.

In weiteren Versuchen wurde eine chromosomale Integration des *TanUPO*-Gens in *Pichia pastoris* untersucht (Abb. 7). Das verwendete Expressionssystem mit dem Methanol-induzierbaren AOX1-Promotor gilt als der „Goldstandard“ in der *Pichia*-Expression und wäre somit eine vielversprechende Variante, um eine verbesserte und stabile Produktion rekombinanter *TanUPO*s zu realisieren. Es wurden zwei Plasmide für die Transformationen verwendet, die

unterschiedliche Terminatoren in der Expressionskassette enthielten. Von den erhaltenen *Pichia*-Transformanten wurden 15 pro Plasmid im Mikrotiterplatten-Format kultiviert und die Überstände auf UPO-Bildung getestet. Die höchste, gemessene Volumenaktivität mit ABTS als Substrat betrug jedoch weniger als  $5 \text{ U L}^{-1}$  und lag damit unter dem vorher verwendeten episomalen Expressionssystem. Somit wurde die rekombinante Herstellung der *TanUPO* weiter mit dem ersten Expressionsansatz durchgeführt.



**Abb. 7:** Expressionssystem zur chromosomalen Integration eines *Tan*-UPO-Gens in *Pichia pastoris*. Die *TanUPO*-Bildung ist im dargestellten System aufgrund des enthaltenen AOX1-Promotors durch Zugabe von Methanol induzierbar.

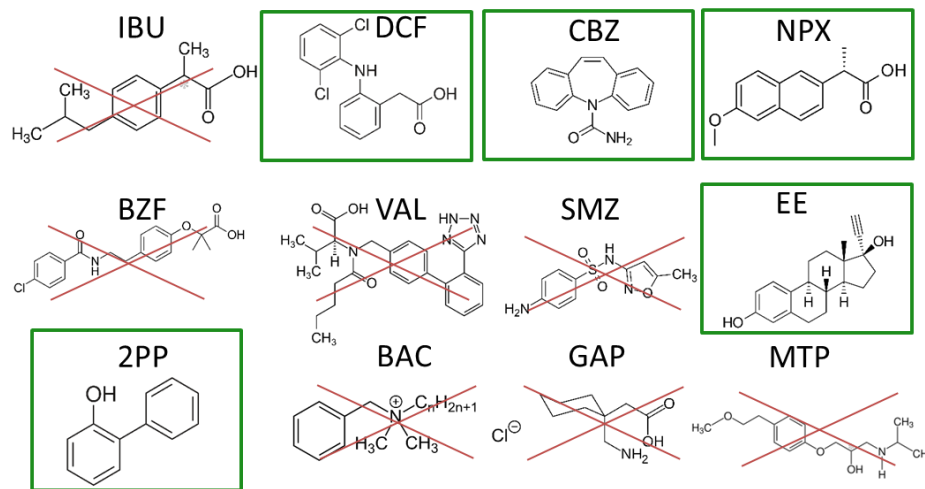
Weitere wichtige Projektergebnisse, die durch die **TUD über den** gesamten Projektverlauf erzielt werden konnten, waren die **erfolgreiche Produktion  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generierender Oxidasen** (z.B. zweier Arylalkohol-Oxidasen / AAO aus *Pleurotus ostreatus* und einem nicht näher spezifizierbaren Ascomycoten), die in größeren Mengen in Bioreaktoren hergestellt wurden.

### AP1.3 Enzymcharakterisierung (BTU, TUD; M3-30)

Die **TUD testete 12 Substrate** ((Diclofenac (DCF), Ibuprofen (IBU), Naproxen (NPX), Gabapentin (GAB), Carbamazepin (CBZ), Bezafibrat (BZF), Valsartan (VAL), Metoprolol (MTP), Sulfamethoxazol (SMZ), Ethinylestradiol (EE), Biphenol-2-ol (2PP), Benzalkoniumchlorid (BAC)) **auf ihre Umsetzbarkeit durch neun verschiedene UPOs**, u.a. die *Agrocybe-aege-rita*-UPO (*AaeUPO*), deren rekombinante Form *rAaeUPO*, *Marasmius-rotula*-UPO (*MroUPO*), *Candolleomyces-eurysporus*-UPOs (*CeuUPOs*, diverse Isoformen) und die *Chaetomium-globosum*-UPO (*CgUPO*). **Die entsprechende Analytik zum Nachweis dieser 12 Schadstoffe und ihrer Umsetzungsprodukte wurde erfolgreich etabliert.**

Die untersuchten Pharmazeutika konnten durch alle getesteten UPOs umgesetzt und größtenteils oxigeniert werden. Nur im Fall eines Substrats, GAB, konnte keine Produktbildung festgestellt werden. Die übrigen elf Substrate wurden zumindest in geringem Umfang von den getesteten UPOs oxigeniert. Dies macht das vielversprechende Potential der UPOs deutlich, selbst komplexe, verzweigte und stark hydrophobe Substrate umzusetzen.

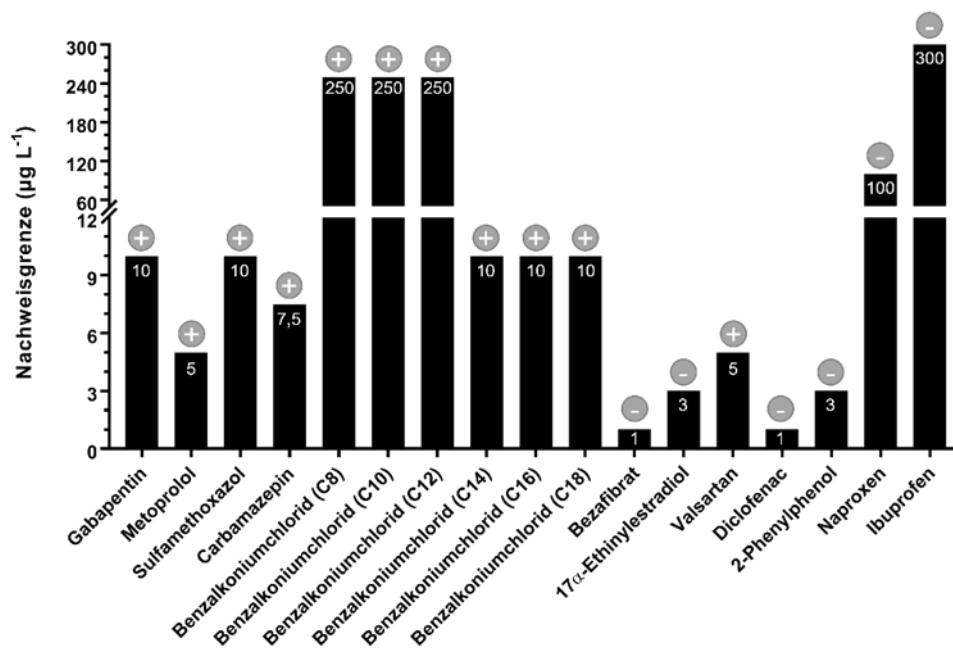
Die entstandenen Metabolite konnten weitestgehend in ihrer Struktur aufgeklärt werden, wobei nicht in allen Fällen die exakte Position der Oxygenierungen ermittelt werden konnte.



**Abb. 8:** Geeignete Schadstoffe (grüner Rahmen) und ungeeignete Schadstoffe (rot durchgestrichen) für die elektrochemische Detektion mittels UPO-dotierter Janus-Partikel in einem Biosensor.

Sechs der getesteten pharmazeutischen Schadstoffe erwiesen sich als gute bis sehr gute Substrate mit entsprechend hohen relativen Umsatzraten (25-100 %; Abb. 8). Von denen wiederum war Diclofenac das vielversprechendste Substrat. Es wurde deshalb als Modellschadstoff für die Evaluierung der Janus-Partikel verwendet, zusammen mit folgenden UPOs, die sich als besonders effizient bzgl. der Diclofenac-Umsetzung herausgestellt hatten: *Aae*UPO, *rAae*UPO und *Mro*UPO. Die pH-Optima dieser drei UPOs für die Oxygenierung von Diclofenac lagen im leicht sauren bis neutralen Bereich (pH 6,0-7,0).

Durch die **BTU** wurde die **Methodik der HESI (-)-Messungen angepasst**, um schwer-ionisierbare Substrate mit höherer Empfindlichkeit detektieren zu können. Die Nachweisgrenzen für die meisten der getesteten Arzneimittel liegen unter 5 bis 10 µg/L (Abb. 9). Um die ausgewählten Abwasserschadstoffe in geringen, umweltrelevanten Konzentrationen nachzuweisen, wurden durch die BTU verschiedene Methoden zur Probenkonzentrierung getestet: Festphasenextraktion mittels SPE-Säulen, Lyophilisation mit anschließender Rückstandsaufnahme in geringeren Volumina und Flüssig-Flüssig-Extraktion mit EXtrelut-Säulen. Zu diesem Zweck wurde ein Modell-Abwasser mit einer Schadstoffkonzentration von 0,1 µg L<sup>-1</sup> hergestellt und mittels der genannten Methoden 200-fach konzentriert. Im Ergebnis zeigte sich, dass Festphasen- und Flüssig-Flüssig-Extraktion zur Konzentrierung von Wasserproben ungeeignet sind, während nach Gefriertrocknung und Rücklösung optimale Ergebnisse erzielt wurden.



**Abb. 9:** Nachweisgrenzen für die Detektion ausgewählter Abwässerschadstoffe. Das Symbol über den Balken gibt den Ionisierungsmodus, HESI (+) oder HESI (-), an. Die Nachweisgrenzen (µg L<sup>-1</sup>) erscheinen in den jeweiligen Balken.

#### AP1: Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten personellen Positionen der **TUD** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (Genomsequenzierung, Proteinbiochemie, enzymatische Biokatalyse), einen Laboringenieur (chemische Analytik der Reaktionsprodukte) sowie studentische Hilfskräfte (Genomsequenzierung & Biokatalyse). Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgte die größten Ausgaben entsprechend der Planung für molekularbiologische Kits, Sequenzierungen, Proteinreinigungssäulen und Feinchemikalien.

Die wichtigsten personellen Positionen der **BTU** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (Homologe und heterologe Enzymherstellung mit anschließender Reinigung, Etablierung notwendiger analytischer Methoden inklusive Probenaufbereitung) und einen technischen Mitarbeiter (unterstützende Arbeiten vorrangig in der heterologen Expression unspezifischer Peroxygenasen). Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Lösungsmittel, UHPLC-Vorsäulen, molekularbiologische und chromatographische Verbrauchsmaterialien, pharmazeutische Wirkstoffe und Chemikalien für Nährmedien.

### AP1: Verwertung der Ergebnisse und Veröffentlichungen

Die generierten UPO-Sequenzen der sequenzierten Pilze wurden in öffentlichen Datenbanken (NCBI) hinterlegt und zugänglich gemacht, um sie im wissenschaftlichen Kontext für weitere Interessenten nutzbar zu machen. Da es sich bei den sequenzierten Pilzen um seltene Arten handelt, die interessanterweise über lediglich eine von zwei existierenden UPO-Genfamilien im Genom verfügen, ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse im Rahmen einer Publikation in einer Zeitschrift (*peer-reviewed*) geplant. Darüber hinaus wird sowohl die homologe als auch heterologe Herstellung der entsprechenden UPO-Proteine die wissenschaftliche Verwertung der molekularbiologischen Daten forcieren. Nicht zuletzt wird das in AP1 neu etablierte, rekombinante Expressionssystem in der akademischen Lehre zu einer verbesserten praktischen Ausbildung der Studierenden bei den Projektpartnern beitragen. Die im Projekt beschäftigten wissenschaftlichen Hilfskräfte haben die in AP1 etablierten Methoden erlernt (Expressionssysteme, Analytik von niedrig konzentrierten Schadstoffen und ihren enzymatisch erzeugten Reaktionsprodukten) und damit ihre wissenschaftliche Expertise ausgebaut, was die Chancen auf dem nationalen und internationalen Arbeitsmarkt verbessert (z.B. bzgl. einer Promotionen).

### Arbeitspaket 2 – Leitung BPI: Janus-Partikel-Synthese

#### AP2.1 Herstellung leitfähiger polymerbasierter Janus-Partikel mit anisotropen Funktionalitäten (BPI; M1-30)

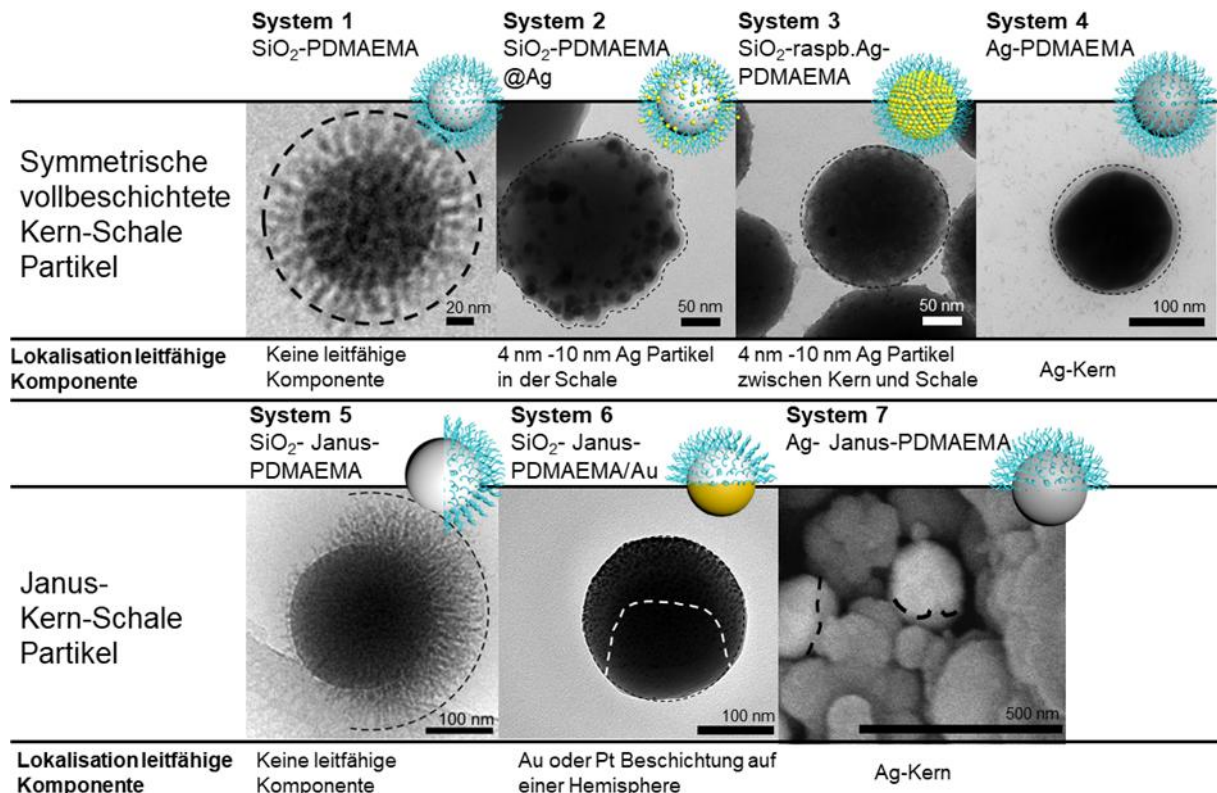
Das Ziel von AP2 (**BPI**) war eine **ortsselektive Modifikation von Partikeln mit Polymeren und leitfähigen Materialien**, um den Elektronentransport zwischen den Zielenzymen (UPOs) und der Elektrodenoberfläche zu gewährleisten. Deshalb wurde die Position der leitfähigen Komponente (Kern oder Schale) im Partikelsystem variiert. Die PDMAEMA-Bürsten [auf Basis von Poly(2-(dimethylamino)ethylmethacrylaten)] wurden mittels oberflächeninitierter, kontrollierter radikalischer Pfropfungspolymerisation auf den Kern aufgebracht [*„Grafting from surface initiated atomic radical polymerization“* (SI-ATRP)].

Das als erstes etablierte System war das Modellsystem ohne leitfähige Komponente. Es handelte sich um SiO<sub>2</sub>-Partikel mit einer PDMAEMA-Schale (System 1, SiO<sub>2</sub>-PDMAEMA, Abb. 10). Beim zweiten System wurden ca. 4-10 nm große Ag-Partikel in die PDMAEMA-Schale abgeschieden (System 2, SiO<sub>2</sub>-PDMAEMA@Ag, Abb. 8). Im dritten System wurden die leitfähigen Partikel (Ag oder Au) himbeerartig um die SiO<sub>2</sub>-Partikel assembliert (System 3, SiO<sub>2</sub>-rasp. Ag-PDMAEMA, Abb. 10). Danach wurden die PDMAEMA-Bürsten auf die Ag- oder Au-Partikel aufgepfropft. Das vierte System verfügte über einen leitfähigen Kern aus Ag (System 4, Ag-PDMAEMA, Abb. 10).

Die Ausgangssysteme wurden weiteren Modifikationen unterzogen, mit dem Ziel, Partikel mit sphärischen Geometrien und unterschiedlicher Lokalisation der leitfähigen Komponente sowie unterschiedlicher Architektur herzustellen. Folgende Parameter wurden variiert:

→ Partikel-Kerngröße: 100 nm, 200 nm, 800 nm (SiO<sub>2</sub>), 10 nm und 150 nm (Ag), 10 nm Au

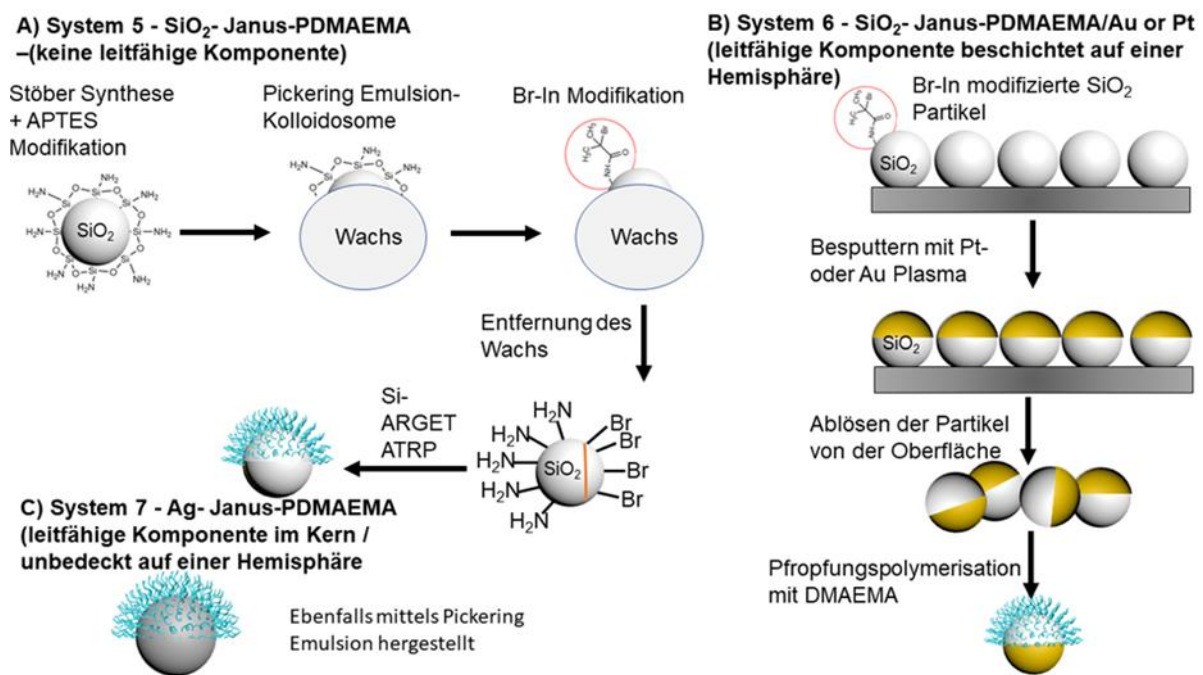
- chemische Zusammensetzung mit Einführung einer leitfähigen Komponente (Kern oder Schale): Pt, Ag, Au
- Pflropfungsdichte der Polymerschale: 50 % oder 100 %
- Schichtdicke/Länge der Polymerschale: 6 nm, 11 nm, 16 nm, 25 nm
- Position der leitfähigen Komponente im Partikelsystem: Kern, Schale oder zwischen Kern und Schale (himbeerartig)
- Architektur des Partikels: symmetrisch vollbeschichtete Partikel oder Janus-Partikel



**Abb. 10:** System 1 - Modellsystem SiO<sub>2</sub>-PDMAEMA Partikel ohne leitfähige Komponente (cryo-TEM-Aufnahme). System 2 - SiO<sub>2</sub>-PDMAEMA@Ag, leitfähige Ag-Nanopartikel in der Polymerschale abgetrennt (TEM-Aufnahme). System 3 - SiO<sub>2</sub>-raspb. Ag-PDMAEMA, die leitfähigen Ag-Nanopartikel zwischen Kern- und Schale als himbeerartige Struktur (TEM-Aufnahme). System 4 - Ag-PDMAEMA, die leitfähige Komponente im Kern (TEM-Aufnahme). System 5 - SiO<sub>2</sub>-Janus-PDMAEMA Janus-Kern-Schale Partikel ohne leitfähige Komponente im Kern (cryo-TEM-Aufnahme). System 6 – SiO<sub>2</sub>-Janus-PDMAEMA/Au Janus Kern-Schale Partikel, bei denen die eine Hemisphäre mit Au oder Pt beschichtet ist, die andere Hemisphäre ist mit PDMAEMA gepflropft (TEM-Aufnahme). System 7 - Ag-Janus-PDMAEMA Partikel mit der leitfähigen Komponente im Kern (REM-Aufnahme).

Weiterhin wurde die **Herstellung von Janus-Partikeln** (System 5-7, Abb. 10 & 11) untersucht. Bei der Partikelsynthese wurden durch das BPI grundsätzlich zwei Ansätze verfolgt: (A) Die klassische Janus-Partikel-Synthese mit dem Modellsystem SiO<sub>2</sub>-PDMAEMA (System 5), was den Nachteil hat, dass keine leitfähige Komponente an einer Seite des Partikels exponiert ist; diese Methode wurde daher entsprechend modifiziert (C; System 7) untersucht. In

einem zweiten Ansatz (B) wurden die mit Br-Initiator modifizierten SiO<sub>2</sub>-Partikel mittels Floating-Technik auf einem Trägersubstrat immobilisiert und anschließend mit einer leitfähigen Komponente versehen (entweder mit Au oder Pt besputtert). Anschließend wurden diese Partikel vom Substrat abgelöst und mit DMAEMA polymerisiert. Die besputterten Januspartikel wurden im Verlauf des Projekts nicht weiter verfolgt (System 6), da die leitfähige Schicht zu instabil war und ein Upscaling schwierig erschien. Auch wäre hier eine Enzymimmobilisierung mit vielen Waschschrritten nicht möglich gewesen. Der vielversprechendste Ansatz (C) nutzte die Methode A und unter Verwendung von Ag anstelle von SiO<sub>2</sub> im Kern, so dass hier potentiell leitfähige Ag-Janus-PDMAEMA-Partikel synthetisiert werden konnten (System 7).



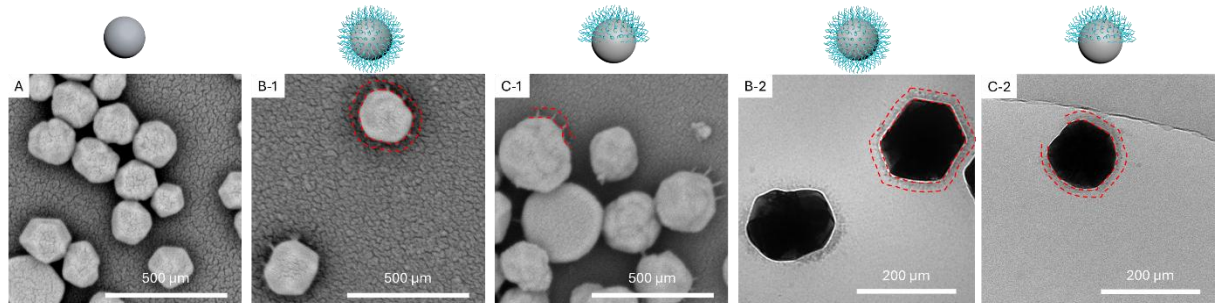
**Abb. 11:** Zwei unterschiedliche Ansätze zur Herstellung von Janus-Partikeln: A) Der erste Ansatz erfolgte mittels Maskierung eines Teils des Partikels mit Wachs. Die Modifikation mit dem Br-Initiator fand nur auf einer Hemisphäre des Partikels statt, danach wurde das Wachs entfernt und die Pflropfungspolymerisation mit DMAEMA durchgeführt. Da nur eine Hemisphäre mit dem Br-Initiator bedeckt war, wurde an der anderen Hemisphäre keine Polymerschale gebildet. B) Die mit dem Br-Initiator modifizierten SiO<sub>2</sub>-Partikel wurden auf ein Substrat immobilisiert und mit Au oder Pt besputtert. Danach wurden die Partikel wieder abgelöst und die nicht besputterte Oberfläche mittels Pflropfungspolymerisation mit DMAEMA modifiziert. System 7 folgte der gleichen Prozedur wie A) nur mit Ag im Kern (C).

#### AP2.2 Physikochemische Charakterisierung der synthetisierten Janus-Partikel (BPI; M4-30)

Im Projektverlauf wurde eine **umfangreiche Partikelbibliothek mit 7 verschiedenen partikulären Systemen etabliert**. Aufbauend auf diesen Ergebnissen (ZB 2022) wurden weitere Partikelsynthesen basierend auf den Systemen 4 (Ag-PDMAEMA) und 7 (Ag-Janus-PDMAEMA) durchgeführt, da die gewünschte Leitfähigkeit mit diesen erreichbar war. Die synthetisierten Partikel-Systeme wurden den Projektpartnern zur Enzymimmobilisierung (*MroUPO*, *rAaeUPO*, *AaeUPO*) zur Verfügung gestellt. Die synthetisierten Janus-Partikel mit

unterschiedlichen Morphologien und Eigenschaften wurden umfassend physikochemisch analysiert:

→ Elektronenmikroskopie: Mittels REM, TEM und Cryo-TEM wurden die synthetisierten Partikel detailliert untersucht und die Dicke der Polymerschale abgeschätzt. (Abb. 12)



**Abb. 12:** A, REM-Aufnahme der Ag-Ausgangspartikel; B-1 und B-2, REM- bzw. TEM-Aufnahmen von Ag-PDMAEMA; C-1 und C-2, REM- bzw. TEM-Aufnahmen von Ag-Janus-PDMAEMA.

→ Elektrokinetik: Die Partikel und Enzyme wurden mittels Elektrokinetik-Messungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die isoelektrischen Punkte der Enzyme AaeUPO, MroUPO und rAaeUPO bei pH 7,1, 5,6 bzw. 5,3 liegen. Für eine erfolgreiche Immobilisierung müssten folglich die Polymerbürsten positiv und die Enzyme negativ geladen vorliegen. Daraus ergab sich ein pH-Wert von mindestens 6,0 für die Immobilisierung von MroUPO und rAaeUPO.

→ Dynamische Lichtstreuung: Mittels DLS konnte gezeigt werden, dass die Partikelgröße und somit die Polymerkettenlänge durch Änderung der Monomermenge erfolgreich variiert werden kann.

→ Enzym-Immobilisierung (Laccase): Zur Immobilisierung wurde zunächst eine Laccase von *Trametes versicolor* (TvL) als Modellsystem eingesetzt und deren Aktivität nach Immobilisierung auf den Partikelsystemen photometrisch ermittelt. Das beste Ergebnis ergab sich für Partikel mit einer Polymerschichtdicke von 22,2 nm.

→ Leitfähigkeitsanalyse: Zur Leitfähigkeitsbestimmung wurden die Partikeltinten auf einer Elektrode getrocknet und im Anschluss deren Leitfähigkeit durch Ansetzen eines Multimeters gemessen. Die Leitfähigkeitsanalyse ergab sehr vielversprechende Resultate für Partikel mit einer Polymerschalendicke unter 5 nm. Um die Leitfähigkeit der Tintenformulierung für Systeme mit höherer Polymerschalendicke zu erhöhen, wurde eine neue Strategie durch zusätzlichen Einsatz von leitfähigen stäbchenförmigen Ag-Partikeln etabliert. Diese Methode generierte für alle Systeme eine ausreichende Leitfähigkeit.

#### AP2: Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten personellen Positionen des **BPI** betrafen eine Postdoc-Stelle (Synthese, physikochemische Charakterisierung und Enzymimmobilisierung). Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Labormaterialien, Reagenzien und Feinchemikalien.

## AP2: Verwertung der Ergebnisse und Veröffentlichungen

Die wissenschaftlichen Erkenntnisse, die im Rahmen von JaBaS generiert wurden, wurden/werden in einschlägigen Fachzeitschriften und in Beiträgen auf nationalen und internationalen Tagungen/Konferenzen veröffentlicht (*oral presentation*, Dr. A. Linhardt, LOPEC 03/2024 & *poster presentation*, A. Antony, LOPEC 03/2024). Des Weiteren wurden die Ergebnisse in einer Publikation zusammengefasst und eingereicht (Hongtao Cai, Anila Antony, Anne Linhardt, Petr Formánek, Leonid Ionov, Alla Synytska (2025): “*Interplay Between the Conductivity of Polymer-Brush Functionalized Core-Shell Particles and Their Enzyme Loading Capacity and Activity*”).

Nicht zuletzt tragen in AP2 neu etablierten, leitfähigen und Polymer-basierten Janus-Partikel zu einer verbesserten Lehre und Ausbildung der Studierenden bei den Projektpartnern bei. Die Advance Modul sowie Master-Studenten erlernten die in AP2 etablierten Methoden (maßgeschneiderte Synthesen, Enzymimmobilisierung und analytische Charakterisierung) und erhöhen damit ihre wissenschaftliche Qualifikation und Chancen auf dem nationalen und internationalen Arbeitsmarkt (z.B. durch Promotionen).

## Arbeitspaket 3 – Leitung TUD: Immobilisierung

### AP3.1 Immobilisierung ausgewählter UPOs (GOD) auf Janus-Partikeln (TUD, BPI; M7-33)

Die **Immobilisierungsstudien wurden mit zwei Laccasen** (*TveLac* & *PciLac*; **BPI**) und **drei UPO-Präparaten** (*AaeUPO*, *rAaeUPO* & *MroUPO*; **TUD**) durchgeführt. Sowohl für die Laccasen als auch für die getesteten UPOs konnte ein signifikanter Einfluss des pH-Wertes auf die Immobilisierungsausbeute festgestellt werden. Die effizienteste Immobilisierung an Janus-Partikeln gelang schließlich für die *MroUPO* (Tab. 4 & 5). Für die immobilisierte *MroUPO* auf Ag@PDMAEMA-JP ermittelten wir 9,4 U<sub>VA</sub>/mg Partikel (gemessen bei pH 6) und 2,3 U<sub>ABTS</sub>/mg Partikel (gemessen bei pH 4,5). Dies ergibt ein Verhältnis von 4,1:1 (U<sub>VA</sub>:U<sub>ABTS</sub>). Das Verhältnis für die reine *MroUPO* beträgt 4,4:1 (607 U<sub>VA</sub>/ml : 139 U<sub>ABTS</sub>/ml). Daraus schließen wir, dass das VA:ABTS-Verhältnis nach der Immobilisierung nicht oder nur geringfügig verschoben ist.

**Tab. 4:** Enzymatische Aktivität der drei UPO-Präparate nach der Immobilisierung an verschiedene Partikel-Systeme.

		Enzymatic Activity U/mg <sub>particle</sub>		
		Ag@PDMAEMA-4nm	Ag@PDMAEMA-23nm	Ag@PDMAEMA-JP
<i>AaeUPO</i>	pH 4	0,0*	0,4*	0,13
	pH 6	n.d.	n.d.	0,04
<i>rAaeUPO</i>	pH 4	0,0*	0,0	0,0
	pH 6	0,0*	0,0	0,0
<i>MroUPO</i>	pH 4	0,0*	0,0	0,6
	pH 6	0,1	4,9	9,7

Ausgehend von der Aktivität des Präparats und der spezifischen Aktivität des Ausgangsmaterials (54 U<sub>VA</sub>/mg Protein) ergab sich ein theoretischer Wert für das an die Partikel gebundene Protein von 0,174 mg Enzym/mg Partikel. Die „tatsächliche“ Proteinkonzentration des besten

Immobilisierungsprodukts (Ag@PDMAEMA-JP, *MroUPO*, pH 6) wurde mithilfe des Bradford-Tests bestimmt. Der entsprechende Wert des immobilisierten UPO-Präparats betrug 2,15 mg Protein/mL für 10 mg der Partikel (nach Abzug des Blindwertes). Dies ergab einen Endwert von 0,215 mg Protein pro mg Partikel und eine spezifische Aktivität von 44 U<sub>VA</sub>/mg Protein.

**Tab. 5:** Proteinbeladung auf Janus-Partikeln nach Bradford-Messung und die daraus resultierende spezifische Aktivität immobilisierter Enzyme auf den Janus-Partikeln (**TUD & BPI**)

Enzym	Partikel	Batch	µg Protein/mg Partikel	U/mg Partikel	Spezif. Aktivität auf den Partikeln (U/mg Protein)
<i>TveLac</i>	Ag@PDMAEMA-23nm	2	32	1,15	35,9
<i>TveLac</i>	Ag@PDMAEMA-JP	2	76	1,16	15,3
<i>TveLac</i>	Ag@PDMAEMA-JP	3	66	0,97	14,7
<i>PciLac</i>	Ag@PDMAEMA-23nm	2	16	2,63	164,4
<i>PciLac</i>	Ag@PDMAEMA-JP	3	64	3,03	47,3
<b><i>MroUPO</i></b>	<b>Ag@PDMAEMA-JP</b>	<b>2</b>	<b>215</b>	<b>9,70</b>	<b>45,2</b>
<b><i>MroUPO*</i></b>	<b>Ag@PDMAEMA-JP</b>	<b>2</b>	<b>167</b>	<b>7,00</b>	<b>41,9</b>

Die Abnahme der spezifischen Aktivität des immobilisierten Präparats um etwa 17 % im Vergleich zum ursprünglichen Präparat ist akzeptabel. Der geringfügige Aktivitätsverlust liegt innerhalb der erwarteten Fehlerspanne für immobilisierte Enzyme (bis zu 30 %), obwohl nicht klar ist, ob der Verlust durch eine verstärkte Koagulation zwischen den Partikeln oder durch die Immobilisierung selbst verursacht wurde. Es ist jedoch auch denkbar, dass ein Teil der Aktivität durch falsche Orientierung des Enzyms an den Polymerketten verloren gegangen ist.

In einem weiteren Ansatz untersuchte die **TUD die Re-Immobilisierung der UPO auf rezykliertem Ag@PDMAEMA-JP** sowie die **Immobilisierungseffizienz in Abhängigkeit von der Ausgangsaktivität**. Die Ausgangsaktivität für die Immobilisierung der *MroUPO* auf recyceltem Ag@PDMAEMA-JP schien keinen Einfluss auf die Immobilisierungseffizienz zu haben (Tab. 6). Die Ergebnisse für die drei verschiedenen Anfangsaktivitäten (50, 100 und 150 U/mL) lagen im gleichen Bereich, sowohl in Bezug auf das immobilisierte aktive Enzym (7,1, 6,6 und 7,3 U/mg Partikel) als auch in Bezug auf die Proteinmenge, die durch den Bradford-Test bestimmt wurde (183, 161 und 158 µg Protein/mg Partikel). Die auf den Partikeln erreichte Aktivität (6,6-7,3 U/mg) fiel geringfügig niedriger aus als die Aktivitäten bei der vorherigen Immobilisierung (9,7 U/mg). Dies deutet auf eine Verringerung der Kapazität aufgrund der Salzbehandlung während des Recyclings hin oder ist auf inaktive Enzymrückstände auf den Partikeln aus der früheren Verwendung zurückzuführen. Möglicherweise wurden einige Partikel während des Reinigungsprozesses beschädigt oder hatten sich nach der Reinigung nicht vollständig „erholt“, z.B. aufgrund von Proteinverunreinigungen oder inaktiven Enzyms. Enzymrohextrakte aus nativen Pilzstämmen enthalten in der Regel eine Reihe von Isoenzymen oder Isoformen sowie

Proteinverunreinigungen. Die Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie und Größenausschlusschromatographie führt nicht immer zu (hoch)reinen Isoenzympräparaten. Die in dieser Studie verwendete *Mro*UPO-Probe wurde nicht bis zum Isoenzym-Niveau gereinigt. Somit zeigt dieses Experiment auch, dass der Immobilisierungsprozess nicht zwischen diesen spezifischen Isoenzymfraktionen unterscheidet, wahrscheinlich aufgrund ihrer sehr ähnlichen oder identischen physikochemischen Eigenschaften (z.B. IEF).

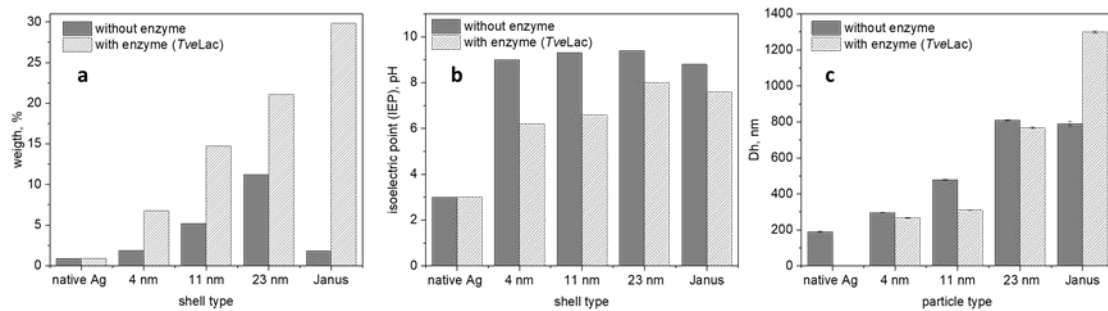
**Tab. 6:** *Mro*UPO-Aktivität nach Re-Immobilisierung von rezykliertem Ag@PDMAEMA-JP mit unterschiedlichen Ausgangsaktivitäten.

Ag@PDMAEMA-JP	Aktivität, U/mL in 500 $\mu$ L	mg Partikel in 1 mL (Näherung)	$\Sigma$ U nach dem Waschen (Stufen 1-4)	U/mg Partikel	$\mu$ g Protein/mg Partikel	Koagulation
<i>Mro</i> UPO pH 6	50	2	25	7,1	183	gering
<i>Mro</i> UPO pH 6	100	2	83	6,6	161	gering
<i>Mro</i> UPO pH 6	150	2	122	7,3	158	gering
<i>Mro</i> UPO pH 6*	300	10	212	9,7	215	gering

Auf einem ausgewählten Janus-Partikelsystem wurde die Immobilisierung einer kommerziell erhältlichen Glucose-Oxidase (GOD) von *Aspergillus niger* erfolgreich durchgeführt. Die Aktivität auf den Partikeln betrug  $0,5 \text{ U mg}^{-1}$  Partikel (gemessen mit ABTS). Ebenfalls wurde die Co-Immobilisierung dieser Oxidase mit *Aae*UPO erfolgreich durchgeführt. Die entsprechenden Aktivitäten auf den Partikeln waren  $0,44 \text{ U mg}^{-1}$  für die GOD (gemessen mit ABTS) und  $0,18 \text{ U mg}^{-1}$  für die UPO's (gemessen mit Veratrylalkohol).

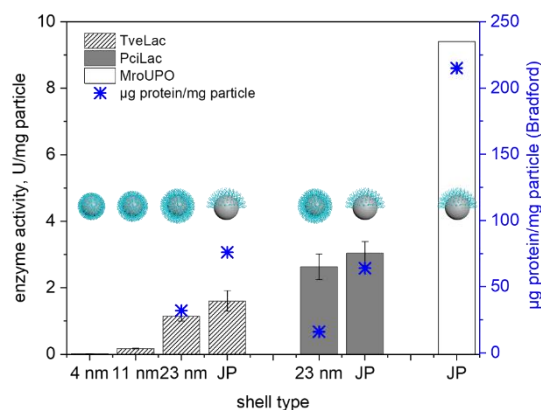
### AP3.2 Physikochemische Charakterisierung nach Enzymimmobilisierung (BPI; M7-33)

Die Laccasen von *T. versicolor* (*Tve*Lac) und *P. cinnabarinus* (*Pci*Lac) wurden beim **BPI** als Modellsysteme für die Enzymimmobilisierung auf Janus-Partikeln verwendet. Erfolgreich immobilisierte **UPO-Janus-Partikel für eingehende Charakterisierungen** erhielt das BPI von der TUD (AP3.1).



**Abb. 13:** a) Gewichtsverlust bestimmt durch TGA; b) isoelektrischer Punkt bestimmt durch elektrokinetische Studien; c) hydrodynamischer Durchmesser bestimmt mittels DLS-Messung vor und nach der TveLac-Immobilisierung mit.

Abbildung 13 zeigt die Veränderungen des Gewichts, des isoelektrischen Punkts (IEP) und des hydrodynamischen Durchmessers vor und nach der Immobilisierung der TveLac. Da eine erfolgreiche Immobilisierung den brennbaren Anteil des Partikelsystems erhöht, erhöhte sich der durch TGA-Analyse ermittelte Gewichtsverlust (Abbildung 13a). Das immobilisierte Enzym bedeckte teilweise den Polymeransatz, was den IEP wie in Abbildung 13b dargestellt, veränderte. Die Abnahme des hydrodynamischen Durchmessers kann durch das Kollabieren der Polymerbürste im Zuge der Enzymimmobilisierung und durch ein geringeres Quellvermögen erklärt werden. Die Beladungskapazität für Enzyme steigt generell mit der Länge der Polymerkette und damit mit der Dicke der Polymerhülle (Abbildung 13c).



**Abb. 14:** Finale Enzymaktivität der TveLac ( $\text{U mg}^{-1}$  Partikel) für alle untersuchten Ag@PDMAEMA-Partikeltypen und finale Enzymaktivität der PciLac auf Ag@PDMAEMA-23nm und Ag@PDMAEMA-JP, detektiert mittels ABTS; sowie MroUPO-Aktivität auf Ag@PDMAEMA-JP, detektiert mit Veratrylalkohol. Der pro Partikel immobilisierte Proteinanteil wurde durch den Bradford-Assay bestimmt. Die Immobilisierung der Laccasen erfolgte bei pH 4,0 und die der MroUPO bei pH 6,0.

Die Enzymaktivitäten und die Beladungskapazität der Janus-Partikel fielen deutlich höher aus als die der vollständig polymerbeschichteten Partikel. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass sich die Polymerketten in einigen Bereichen ausdehnen, nämlich dort, wo kein Polymer

aufgepfropft worden ist, wodurch sich sterische Barrieren verringern. Als Referenz für die Enzymimmobilisierung wurde die Immobilisierung auf den blanken Ag-Partikeln ohne Erfolg getestet. Es wird daher nicht davon ausgegangen, dass das Enzym ohne Polymerbürste auf den Ag@PDMAEMA-JP-Oberflächen immobilisiert werden kann.

Widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich für die Immobilisierung von *Pc*Lac auf Ag@PDMAEMA-23nm und Ag@PDMAEMA-JP (Abb. 14). Obwohl der IEP der *Pc*Lac bei einem pH von 5 liegt, wurde für diese Präparate eine deutlich höhere Enzymaktivität auf den Polymerbürsten festgestellt als für die *Tve*Lac. Möglicherweise sind die unterschiedlichen „Immobilisierungserfolge“ auch auf die Reinheit und Herkunft des jeweiligen Enzympräparats (Glykosylierungsgrad) zurückzuführen. Während es sich bei der *Tve*Lac um ein rekombinantes Protein mit relativ geringer spezifischer Aktivität (0,33 U/mg) handelt, ist die *Pc*Lac ein hochreines Präparat, das mit dem Wildtyp des Pilzes hergestellt wurde (295 U mg<sup>-1</sup>).

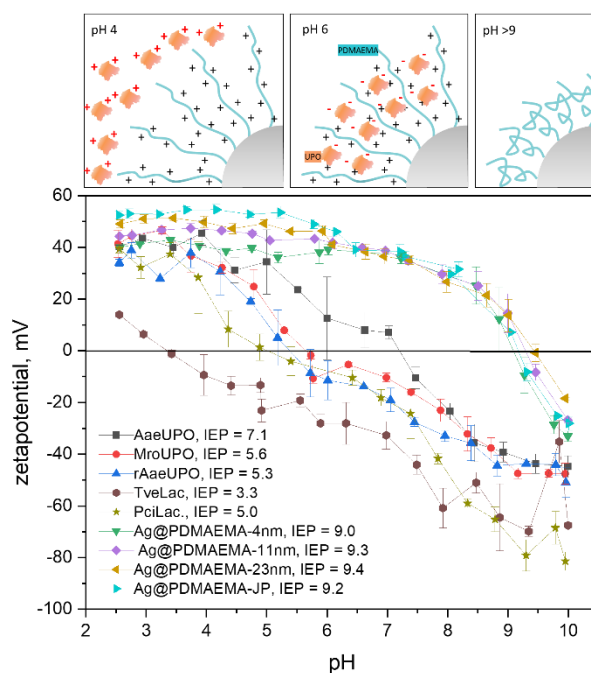
Die Tatsache, dass die *Pc*Lac mit einem um drei Größenordnungen höheren Reinigungsgrad verwendet wurde, führte im Vergleich zur *Tve*Lac zu einer besseren Enzym-Partikel-Beladung. Dies spiegelt sich auch in den spezifischen Enzymaktivitäten der beiden finalen Präparate wider, nämlich 35,9 U/mg im Vergleich zu 164,4 U/mg für *Tve*Lac bzw. *Pc*Lac. Ein interessanter Nebeneffekt wird hierbei deutlich, wenn man die spezifischen Enzymaktivitäten vor und nach der Immobilisierung vergleicht. Der Wert für die *Tve*Lac erhöht sich um den Faktor 100, während der für *Pc*Lac um etwa 50 % abnimmt. Dies bedeutet, dass die *Tve*Lac-Moleküle bei einem pH-Wert von 4,0 tendenziell spezifischer an die Partikel binden als andere proteinbasierte Verunreinigungen des Präparats. Im Gegensatz dazu bindet die hochreine *Pc*Lac zwar relativ gut, verliert jedoch spezifische Aktivität, möglicherweise aufgrund sterischer Interferenzen zwischen Enzym und Partikel (z.B. durch Wechselwirkung mit dem metallhaltigen aktiven Zentrum des Enzyms).

Bemerkenswert ist auch, dass die Proteinbeladung der Ag@PDMAEMA-JP mit *Mro*UPO etwa dreimal höher ausfiel als für die Laccase. Allerdings müssen die Daten mit Vorsicht betrachtet werden, da Laccasen und UPOs bei unterschiedlichen pH-Werten immobilisiert wurden, d. h. bei pH 4,0 bzw. pH 6,0. Der Unterschied in der Proteinbeladung pro Partikel muss mit der Proteinstruktur der entsprechenden Enzyme zusammenhängen. Es ist bekannt, dass die *Mro*UPO Dimere oder sogar Tetramere bildet (Linde et al. 2022). Dies könnte ein Faktor sein, der die Immobilisierung positiv beeinflusst. Allerdings haben Enzyme, die homolog von einem Wildstamm gebildet werden, eine ausgeprägte glykosylierte Hülle, die das Apoprotein umgibt und die Partikelbeladung negativ beeinflussen kann (Bonzom et al. 2019). Das tatsächliche Ausmaß der Glykosylierung ist jedoch nur schwer zu bestimmen (Goto 2007, Deshpande et al. 2008).

Abbildung 15 zeigt das Zeta-Potential aller untersuchten Enzyme und der Hybridpartikelsysteme in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Enzymproteine waren in verschiedenen pH-Bereichen negativ geladen. Die zugehörigen IEPs lagen bei pH 3,6, 5,0, 5,3, 5,6 und 7,1 für *Tve*Lac, *Pc*Lac, *rAae*UPO, *Mro*UPO bzw. *Aae*UPO (Abb. 16). Dies erklärt z.T. das unterschiedliche Verhalten dieser Enzyme während der Immobilisierung bei unterschiedlichen pH-Werten. Bei pH 4,0 waren sowohl die Polymerbürsten als auch die UPOs positiv geladen. Folglich behinderte die elektrostatische Abstoßung die Proteinimmobilisierung. So führte der hohe IEP der

*AaeUPO* (pH 7,1) zu einer geringen Immobilisierung dieses Enzyms bei pH 4,0 und 6,0, da es bei diesen pH-Werten positiv geladen war. Die IEPs der *MroUPO* und *rAaeUPO* um pH 5,0 erklären ebenfalls, wieso die Immobilisierung bei pH 4,0 insgesamt weniger erfolgreich war als bei pH 6,0, da bei pH-Werten unter 5,0 eine positive Oberflächenladung und über pH 5,0 eine negative Oberflächenladung vorlag (Tab. 4 und Abb. 15).

In wässrigen Lösungen bei pH-Werten unter 9,0 sind die Polymerketten positiv geladen und bilden aufgrund elektrostatischer Abstoßung ihre büstenartige Struktur aus. Bei höheren pH-Werten (> pH 9,0) kollabiert die Bürste und die PDMAEMA-Ketten „wickeln sich auf“ (verknäulen). Für eine erfolgreiche Immobilisierung von Enzymen sollte deshalb ein pH-Wert gewählt werden, bei dem das Polymer eine positive und das Enzym eine negative Oberflächenladung aufweist.



**Abb. 15:** Zeta-Potential von Janus-Partikeln bei unterschiedlichen pH-Werten und der synthetisierten Partikelsysteme mit und ohne immobilisierten Enzymen (*TveLac*, *PciLac*, *rAaeUPO*, *AaeUPO*, *MroUPO*).

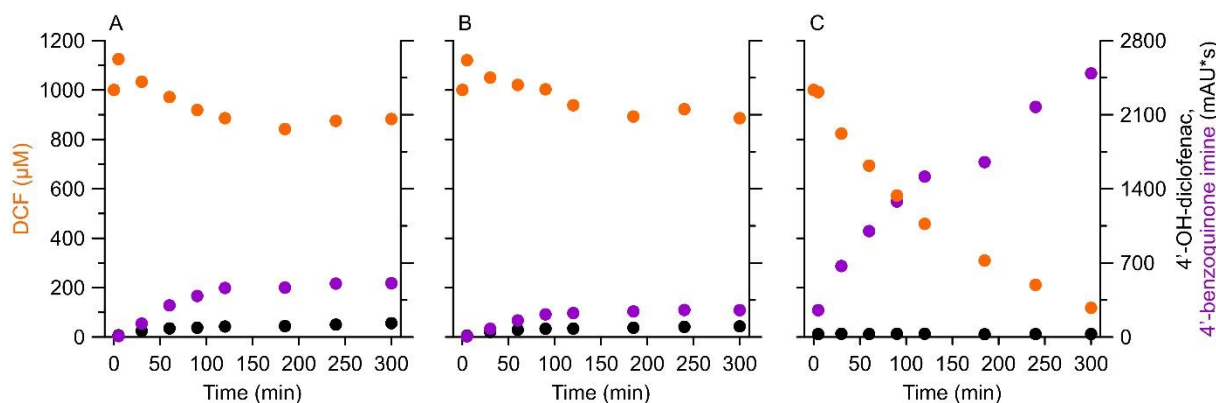
### AP3.3 Schadstoffumsetzung mit immobilisiertem Enzym (BTU, TUD; M10-33)

Die **Umsetzung des Modellsubstrates** Dicofenac (DCF) konnte an der **TUD mit den drei untersuchten UPO-Immobilisaten** erfolgreich durchgeführt werden. Enzymkinetische Parameter, pH-Optimum und *total turnover numbers* (TTN), wurden durch die Immobilisierung an Janus-Partikeln kaum negativ beeinflusst (Tab. 7).

**Tab. 7:** Total turnover numbers (TTN) freier (nativer) und an Janus-Partikel immobilisierter UPO-Präparate.

Enzyme preparation	TTN
<i>Mro</i> UPO (nativ)	9.839
<i>Mro</i> UPO-AgJaP	7.900
<i>Aae</i> UPO (nativ)	13.739
<i>Aae</i> UPO-AgJaP	12.120

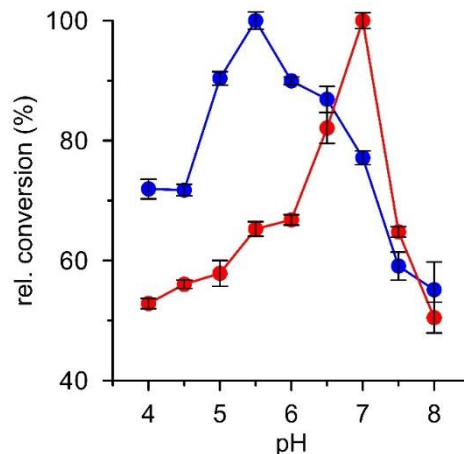
DCF wurde auch mit zweifach dotierten Janus-Partikeln, auf denen UPO und Glucose-Oxidase (GOD) koimmobilisiert waren, erfolgreich umgesetzt. Die Umsetzung war abhängig vom Sauerstoffeintrag in das Reaktionsgemisch und UPO-limitiert (Abb. 16C).



**Abb. 16:** Umsetzung von Diclofenac (DCF) durch koimmobilisierte UPO und GOD sowie Bildung der korrespondierenden Reaktionsprodukte (4'-OH-DCF & 4'-Benzochinonimin). Die Reaktionsansätze enthielten 500 µL 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,0; 100 µL 10 mM DCF (in 100 % Aceton); 260 µL H<sub>2</sub>O; 40 µL Koimmobilisat; 100 µL 100 mM Glucose (zum Starten der Reaktion). A) geschüttelt, B) gerührt und C) gerührt und mit Zugabe von gelöster (nativer) UPO.

Die Immobilisierung der *Mro*UPO auf Ag@PDMAEMA-JP hatte einen erheblichen Einfluss auf das pH-Optimum von *Mro*UPO-basierten Oxygenierungsreaktionen. So verschoben sich die Optima von pH 5,5 auf pH 7,0 (Abb. 17), sowohl für Oxygenierungen als auch für Ein-Elektronen-Oxidationen. Der optimale pH-Wert des freien Enzyms für die Umsetzung der UPO-Modellspezies Veratrylalkohol liegt um pH 5,5. Bei niedrigeren pH-Werten (4,0-4,5) betrug sie in unseren Versuchen noch ca. 75 %, bei pH-Werten zwischen 5,0 und 6,5 ca. 90 %; pH-Werte über 7,0 bewirkten einen Rückgang des Umsatzes auf unter 60 %. Diese Daten stimmen gut mit den ursprünglich von Gröbe et al. (2011) veröffentlichten Daten überein. Das Optimum für die immobilisierte *Mro*UPO lag jedoch bei einem höheren pH-Wert. Bei pH-Werten < 5,5 wurde ein Umsatz von weniger als 60 % erreicht und bei pH 6,5 ca. 80 %. Um pH 7,0 bildete das immobilisierte Enzym ein ausgeprägtes pH-Optimum aus. Oberhalb von pH 7,5 fiel die Aktivität wieder ab, zunächst auf 65 % und dann auf etwa 50 % bei pH 8,0.

Ein Reaktionsansatz mit der *MroUPO* auf Ag@PDMAEMA-JP-Partikeln, die zuvor in verschiedenen Puffern bei pH 5,5 und pH 7,0 gewaschen worden waren, veränderten die Aktivitäten kaum, und im Überstand wurde keine freie UPO nachgewiesen. Die Verschiebung des pH-Optimums muss daher auf eine Interferenz der Partikel mit dem Enzym zurückzuführen sein und nicht auf einen pH-Effekt, der zu einer Ablösung des Enzyms von den Partikeln geführt hätte.

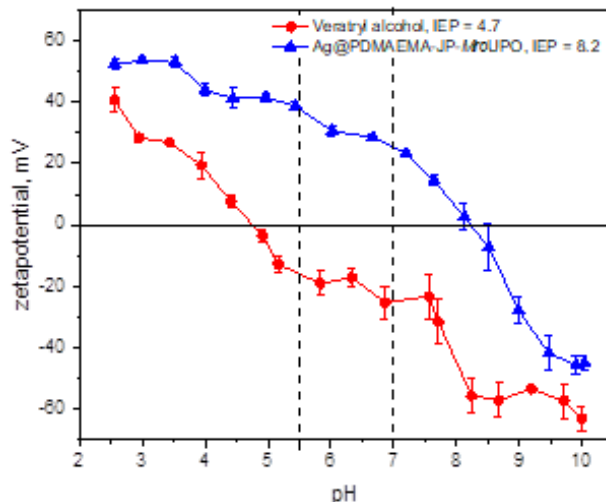


**Abb. 17:** Relative Umsetzung (%) von Veratrylalkohol durch freie *MroUPO* (blaue Kreise) und durch auf Ag@PDMAEMA-JP immobilisierte *MroUPO* (rote Kreise).

Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften immobilisierter Pilzenzyme im Vergleich zu freien Proteinen wurden von anderen Autoren mehrfach beschrieben (Norouzian 2003, Keerti et al. 2014), u.a. auch bzgl. der Änderung der pH-Abhängigkeit der katalysierten Reaktion. Keerti et al. 2014 vermuteten, dass dies auf sekundäre Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der polymeren Matrix des immobilisierenden Trägers zurückzuführen ist. In ähnlicher Weise gehen wir davon aus, dass die Verschiebung des pH-Optimums der UPO auf den geladenen Oberflächen der Polymerbürsten und des Enzyms beruht, was eine geladene Nanoumgebung entstehen lässt, die die Beschaffenheit des aktiven Enzyms (z. B. durch Konformationsänderung) beeinflusst und den pH-Wert des Reaktionsraums im gebundenen Enzym verändert (Goldstein 1972).

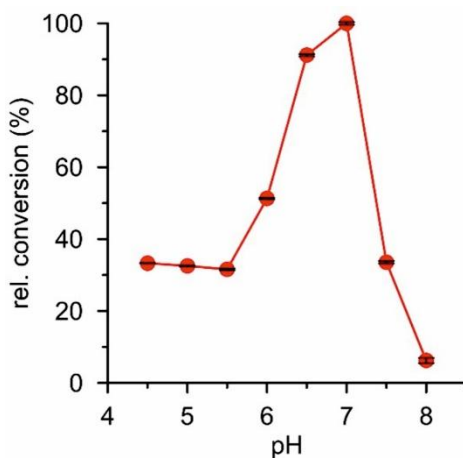
Eine weitere Erklärung könnte in der elektrostatischen Abstoßung von Substrat und Enzymträger bestehen. Elektrokinetische Messungen zeigten eine klare pH-Abhängigkeit der Oberflächenladung sowohl des Substrats als auch des Enzymträgers. Unterhalb von pH 4,7 wiesen sowohl das Partikelsystem als auch Veratrylalkohol eine positive Oberflächenladung auf, und oberhalb von pH 8,2 besaßen die getesteten Substrate und die Partikelhüllen eine negative Oberflächenladung. Es wird daher vermutet, dass die elektrostatische Abstoßung bei diesen pH-Werten die Diffusion des Substrats durch die Polymerbürste hindurch zum Enzym und seinem aktiven Zentrum verhindert hat. Die Messungen des Zeta-Potentials lieferten jedoch keine ausreichende Erklärung für die pH-Verschiebung der Veratrylalkohol-Oxidation von pH

5,5 zu pH 7, da Veratrylalkohol ab pH 4,7 negativ geladen ist, während der Ag@PDMAEMA-JP bis pH 8,2 eine positive Gesamtladung aufweist (Abb. 18). Daher sollte es in diesem pH-Bereich keine elektrostatische Abstoßung geben.



**Abb. 18:** Zeta- Potential von Veratrylalkohol und Ag@PDMAEMA-JPs mit immobilisierter *MroUPO* bei verschiedenen pH-Werten.

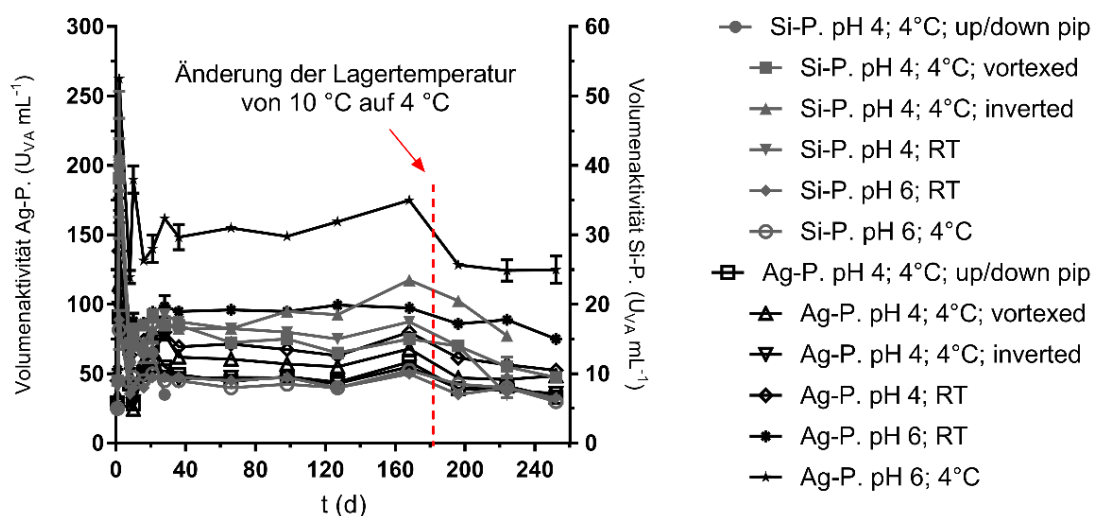
Die Prüfung der Wirksamkeit des auf Ag@PDMAEMA-JPs immobilisierten *MroUPO*-Präparats auf Diclofenac (DCF, das in Abschnitt 1.3 ausgewählte Modells substrat) war ebenfalls erfolgreich. Die aus DCF als Ergebnis der UPO-Reaktion gebildeten Produkte unterscheiden sich nicht von den Produkten, die durch das freie Enzym gebildet werden. Wie im Fall von Veratrylalkohol kam es jedoch zu einer Verschiebung des pH-Optimums im Vergleich zu nicht immobilisierter (freier) UPO (Abb. 19).



**Abb. 19:** Relative Umwandlung von Diclofenac durch auf Ag@PDMAEMA-JP immobilisierte *MroUPO*.

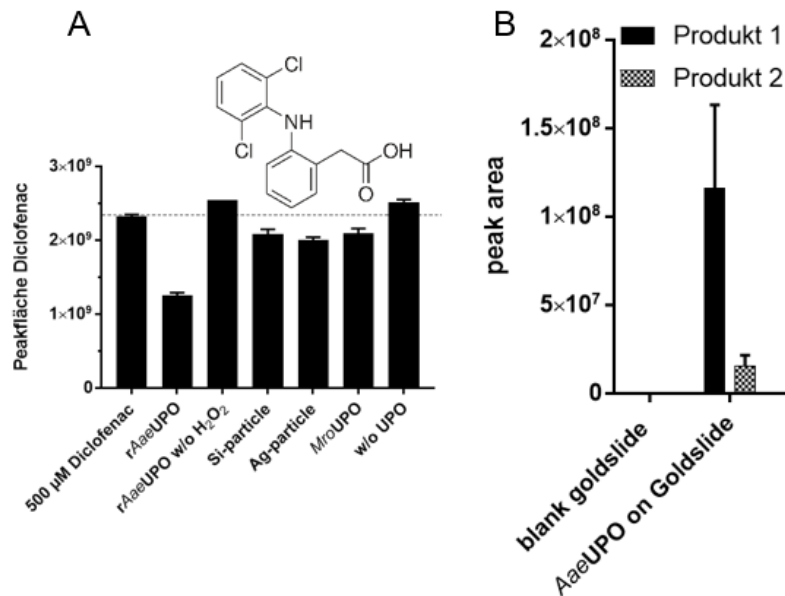
Wie für die freie *MroUPO* nachgewiesen (ZB 2022) konnten auch für die in AP2.2 synthetisierten *MroUPO*-Janus-Partikel eine Umsetzung von 2-Phenylphenol und Ethinylestradiol durch die **TUD** gezeigt werden.

Weiterhin wurde die **Lagerstabilität *MroUPO*-beladener Partikel durch die BTU untersucht**. Bei den Stabilitätsmessungen stellte sich heraus, dass die Partikel über Monate in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 5,5) gelagert werden können (Abb. 20). Beim Transfer der Proben von einer 10°C- in eine 4°C-Umgebung war ein leichter Einbruch der Aktivität zu verzeichnen, jedoch blieb dann die Aktivität die nächsten Monate stabil (Abb. 20).



**Abb. 20:** Zeitlicher Verlauf der Volumenaktivität auf Ag- und Si-PDMAEMA-Partikeln immobilisierter UPO während der Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen.

Neben der Immobilisierung von Enzymen an den Polymerbürsten der Partikel, wurden weiterhin Experimente zur Enzymimmobilisierung direkt auf dem Elektrodenmaterial an der **BTU** durchgeführt worden. Dabei wurde zwischen zwei Methoden unterschieden: (A) Immobilisierung durch Adsorption nach Eintrocknen der Probe und (B) kovalente Immobilisierung über Linker wie Dithio-*bis*(succinimidylpropionat) (DSP) auf der Elektrodenoberfläche. Es wurden sowohl *Screen Printed Electrodes* (SPEs) als auch Gold-Slides (1 cm<sup>2</sup>, können auch als Arbeitselektroden fungieren) verwendet. Auf den SPEs wurde die Probe adsorptiv gebunden. Dabei stellte sich heraus, dass die Bindung der Enzyme nicht stark genug war, da beim anschließenden Waschvorgang zur Regenerierung der Elektrode auch das Enzym entfernt wurde. Auf den Gold-Slides war ebenfalls zu beobachten, dass die Enzyme keine ausreichend feste Bindung an der Sensoroberfläche eingingen. Deshalb wurde versucht, die UPOs über einen Linker kovalent an die Oberfläche zu binden. Die Goldoberfläche wurde dabei mittels DSP mit *N*-Hydroxysuccinimid-Gruppen aktiviert und anschließend das Protein über funktionelle Gruppen der Aminosäuren kovalent an diese gekoppelt. Die mit UPOs dotierten Gold-Slides wurden zur Umsetzung von Modells substraten wie DCF und Propranolol verwendet, wobei die für die Sensorik notwendige Bildung hydroxylierter Produkte durch das immobilisierte Enzym nachweisbar war (Abb. 21B).



**Abb. 21:** (A) Umsetzung von Diclofenac (DCF) durch *MroUPO*, die auf Si- und Ag-Partikeln immobilisiert war, sowie durch Positivkontrollen mit freier *rAaeUPO* oder *MroUPO*. Als zugehörige Negativkontrollen fungierten Ansätze, die kein Wasserstoffperoxid oder kein Enzym enthielten. (B) Produktbildung nach Umsetzung von Propranolol durch die *AaeUPO* (immobilisiert auf einem Gold-Slide). Als Negativkontrolle diente ein Gold-Slide ohne Enzym.

### AP3: Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten personellen Positionen der **TUD** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (Immobilisierungsstudien, enzymatische Biokatalyse) und einen Laboringenieur (Enzymproduktion in Bioreaktoren, chemische Analytik der Reaktionsprodukte). Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Labormaterialien wie Filter (z.B. Glasfaser- und Membranfilter), Ultrafiltrationskassetten, Mikrotiterplatten, Feinchemikalien und Reagenzien zur Enzymproduktion und -reinigung sowie für HPLC-Säulen, die zur Analyse der enzymatischen Reaktionsprodukte notwendig waren.

Die wichtigsten personellen Positionen der **BTU** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (Immobilisierungsstudien an alternativem Elektrodenmaterial, Analyse von Reaktionsprodukten) und einen technischen Mitarbeiter (Durchführung von vorbereitenden Immobilisierungsstudien). Im Bereich Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Verbrauchsmaterialien wie Gold-Slides, Golddrähte zur direkten Enzymimmobilisierung, Elektrodenmaterial, Chemikalien zur Proteinimmobilisierung und Analyse von Reaktionsprodukten unter Anwendung der Immobilisate.

Die wichtigsten personellen Positionen des **BPI** betrafen einen Postdoc-Stelle (Enzymimmobilisierung und Elektrodenbeschichtung). Im Bereich der Verbrauchsmittel wurden die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Labormaterialien und Reagenzien für die Polymersynthese und Charakterisierung der gewonnenen Hybrid-Partikel getätigt.

### AP3: Verwertung der Ergebnisse und Veröffentlichungen

Die erzielten Ergebnisse zur erfolgreichen und effizienten Immobilisierung von UPOs an Janus-Partikel-Systeme besitzen einen echten Neuheitswert und wurden deshalb im Rahmen einer gemeinsamen Veröffentlichung zur Publikation in einer *Peer-review*-Zeitschrift eingereicht. Darüber hinaus werden sowohl das Verfahren zur Immobilisierung der Enzyme am Janus-Partikel-System als auch die chromatographischen Methoden zur Schadstoffumsetzung mit den Enzym-basierten Systemen in die Lehre und Forschung bei allen drei Projektpartnern integriert und so weiter wissenschaftlich und akademisch genutzt.

### Arbeitspaket 4 – Leitung TUD: Biosensorentwicklung

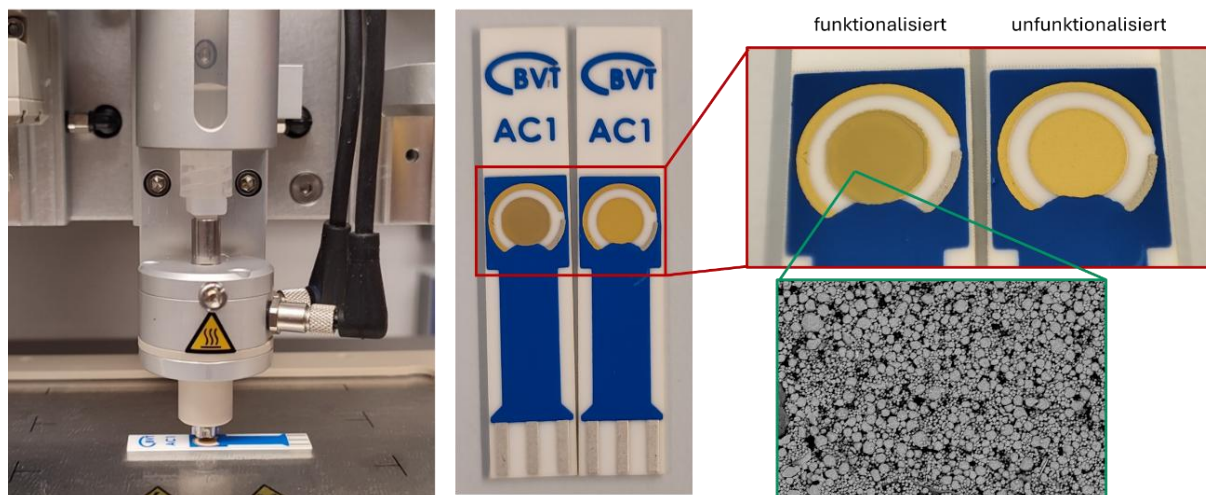
Im AP 4 liegt das Hauptaugenmerk auf der Herstellung und Evaluierung des Janus-UPO(OD)-Biosensors.

#### AP4.1 Fabrikation des Biosensors (BPI; M13-36)

Zur **Fabrikation des Biosensors wurden beim BPI zwei unterschiedliche Siebdruck-Elektroden eines kommerziellen Anbieters zur Weiterfunktionalisierung** genutzt. Als Basismaterial der Arbeitselektrode sowie der Gegenelektrode wurde einmal Kohlenstoff (Carbon) und einmal Gold gewählt. Als Referenzelektrode diente Ag/AgCl. Für die Beschichtung der Siebdruckelektrode wurde das 3D-Discovery-System der Firma RegenHU mit einem zellfreundlichen Druckkopf CF-300H und einem Ventil mit 0,15 mm Innendurchmesser (MICROVALVE "CF300 ID=0.15/ S=0.1 JETTING") eingesetzt. Diese Druckmethode zeichnet sich durch besonders niedrige Scherkräfte aus, was die Enzyme vor einer Denaturierung bewahren sollte. Folgende Partikel-, Tinten- und Druckparameter wurden untersucht und ggf. variiert:

- ➔ Tropfenabstand: 0,5-0,05 mm
- ➔ Ventil-Öffnungs- und -Verschlusszeit: 150 µs -1.000 µs
- ➔ Vorschubgeschwindigkeit: 0,2 mm/s
- ➔ Angelegter Druck: 0-0,02 bar
- ➔ Additive: Diethylenglykol, Triton-X-100, Pluronic F-127, Aquivion® D79-25BS
- ➔ Partikelkonzentration: 1, 3, 5 und 10 mg/ml
- ➔ Mechanische Stabilität der Beschichtung (ohne und mit Bindermittel)
- ➔ Einsatz eines adhäsiven Substratmaterials

Durch Variation aller Druckparameter konnte unter Einsatz von Pluronic F-127 schließlich ein homogenes Druckergebnis erreicht werden (Abb. 22). Dieses weist nur einen leichten „Coffee-Ring-Effekt“ auf. Nach der Trocknung der Elektrode über mehrere Tage zeigte sich ein sehr stabiles Druckergebnis, das nicht von der Elektrode abgewaschen werden konnte. Das gewonnene Material wurde für entsprechende Testmessungen verwendet. Das mehrfach wiederholte Prozedere ergab zudem, dass mindestens vier bis fünf Beschichtungen erforderlich sind, um die für den Elektronentransfer notwendigen Grenzflächenkontakte in den Partikelnetzwerken zu gewährleisten.



**Abb. 22:** RegenHu Druckkopf CF-300h mit Microvalve CF300 (ID=0.15 mm) und BTV-Siebdruckelektroden mit Funktionalisierung (drei Schichten) sowie die entsprechende Kontrolle.

Variation des Tropfenabstandes



Variation des Linienabstandes.



**Abb. 23:** Anpassung des Druckmusters mittels Variation des Tropfenabstandes und des Linienabstandes (a: 0,5, b: 0,3, c: 0,2, d: 0,1 mm). Das beste Ergebnis (e: auf Aluminiumfolie, f: auf Carbon-Arbeits-elektrode einer Siebdruckelektrode) wurde für einen Tropfenabstand von 0,5 mm und einer Kombination unterschiedlicher Linienabstände erreicht. Es wurden insgesamt 14 Kreise übereinander gedruckt die mit Linien in unterschiedlichen Abständen gefüllt waren (zweimal 0,35 cm+ 0,3 cm+ 0,25 cm + 0,2 cm + 0,15 cm+ 0,1 cm+ 0,05 cm Linienabstand).

Nach Testung weiterer Varianten der Druckparameter konnte schließlich ein zufriedenstellendes Druckergebnis bzgl. der Partikelsysteme in Puffer und ohne Zugabe weiterer Additive erzielt werden (Abb. 23).

Jedoch verfügten die erhaltenen Sensoren im Anschluss über keine Aktivität, was darauf schließen ließ, dass die Enzymaktivität durch den Druckprozess beeinträchtigt worden war. Um dies zu verifizieren, wurde die Enzymaktivität einer Lösung vor und nach der Passage durch den Druckkopf bestimmt und dabei ein erheblicher Aktivitätsverlust festgestellt (Tab. 8). Aufgrund dieser Ergebnisse und der fehlenden Möglichkeit auf eine andere Durchtechnik zurückgreifen zu können, wurden die Sensoren im Rahmen dieses Projektes durch Auftropfen

mit einer Pipette funktionalisiert (*Drop-Casting-Methode*). Daneben wurden unbeladene Janus-Partikel auf Siebdruckelektroden aufgedruckt und anschließend dem Projektpartner **BTU** zur nachträglichen Immobilisierung von UPOs zur Verfügung gestellt.

**Tab. 8:** Enzymaktivität einer Enzymlösung (*MroUPO*) vor und nach Passage durch den Druckkopf.

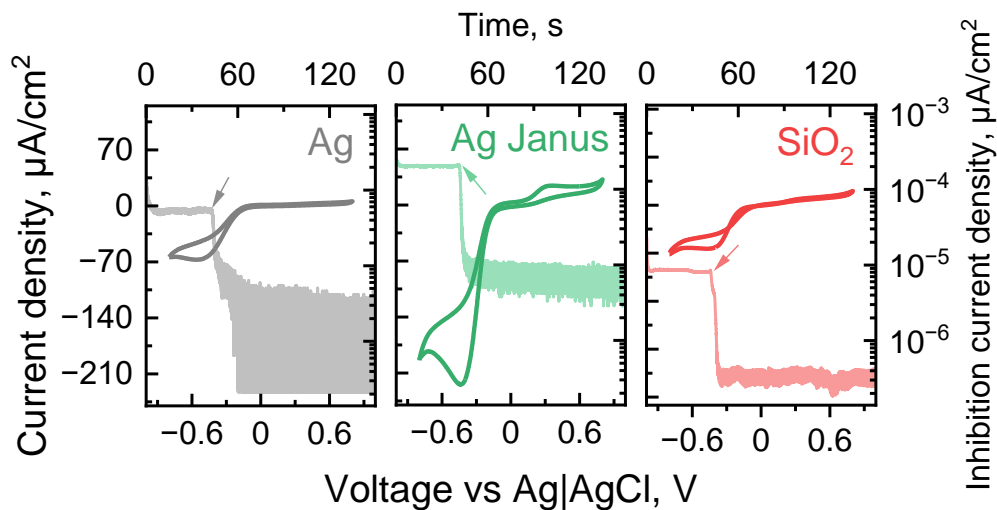
<b>Probe</b>	<b>Aktivität (U/ml)</b>	<b>Absorption bei 420 nm in der Verdünnung</b>
Preprint	36,9	0,73
Postprint	2,8	0,57

#### AP4.2 Testung des Biosensors unter Laborbedingungen (BTU, TUD, BPI; M19-36)

Beim **BPI** erfolgte die **Testung der geeignetsten Partikel für ihre Anwendung als enzymbeladene Biosensoren**. Dazu wurden Untersuchungen der elektrochemischen Eigenschaften wie Ladungstransfer mittels Cyclovoltammetrie (CVA), Chronoamperometrie und Impedanzspektroskopie (EIS) unter Verwendung des Modellsystems *TveLac* (kommerzielle Laccase von *Trametes versicolor*) durchgeführt.

Am **BPI** wurden zunächst **elektrochemische Messungen anhand eines Modellsystems** durchgeführt, das aus dem Modellenzym Laccase (*TveLac*) bestand und für die Umsetzung von Hydrochinon verwendet wurde. Die Elektroden wurden durch *Drop-Casting* mit einer Dispersion enzymbeladener Partikel beschichtet, anschließend getrocknet und in 0,01 M Acetatpuffer (pH 4,0) bei 4 °C gelagert. Vor den elektrochemischen Messungen wurden die Elektroden 50 Reinigungs-Zyklen im Zuge von CV-Messungen im Bereich von -0,8 bis +0,8 V bei 100 mV/s in reinem Acetatpuffer unterzogen, um sicherzustellen, dass keine kontaminierenden Signale präsent waren. Um die Sensoren miteinander zu vergleichen, wurde der Strom auf die aktive Oberfläche normiert. Die aktive Oberfläche wurde auf der Grundlage der CVA-Ergebnisse bei verschiedenen Scan-Raten in 0,1 mM Hydrochinonlösung in 0,1 M Acetatpuffer (pH 4,0) unter Verwendung der *Randles-Sevcik*-Gleichung berechnet. Die lineare Abhängigkeit des kathodischen Peaks vom Quadrat der Abtastrate zeigte, dass der Analyt frei diffundieren konnte. Es wurde eine Peakverschiebung bei Erhöhung der Scan-Rate beobachtet, was die elektrochemische Quasi-Reversibilität des Prozesses bedeutete.

Da für das Janus-Partikel-basierte System die besten Ergebnisse erzielt wurden, sind diese hier exemplarisch im Detail gezeigt (Abb. 24 und 25). Das System Ag@PDMAEMA-23 nm sowie ein vergleichbares System auf SiO<sub>2</sub>-Basis wurden auf dieselbe Art detailliert elektrochemisch untersucht (Abb. 24).



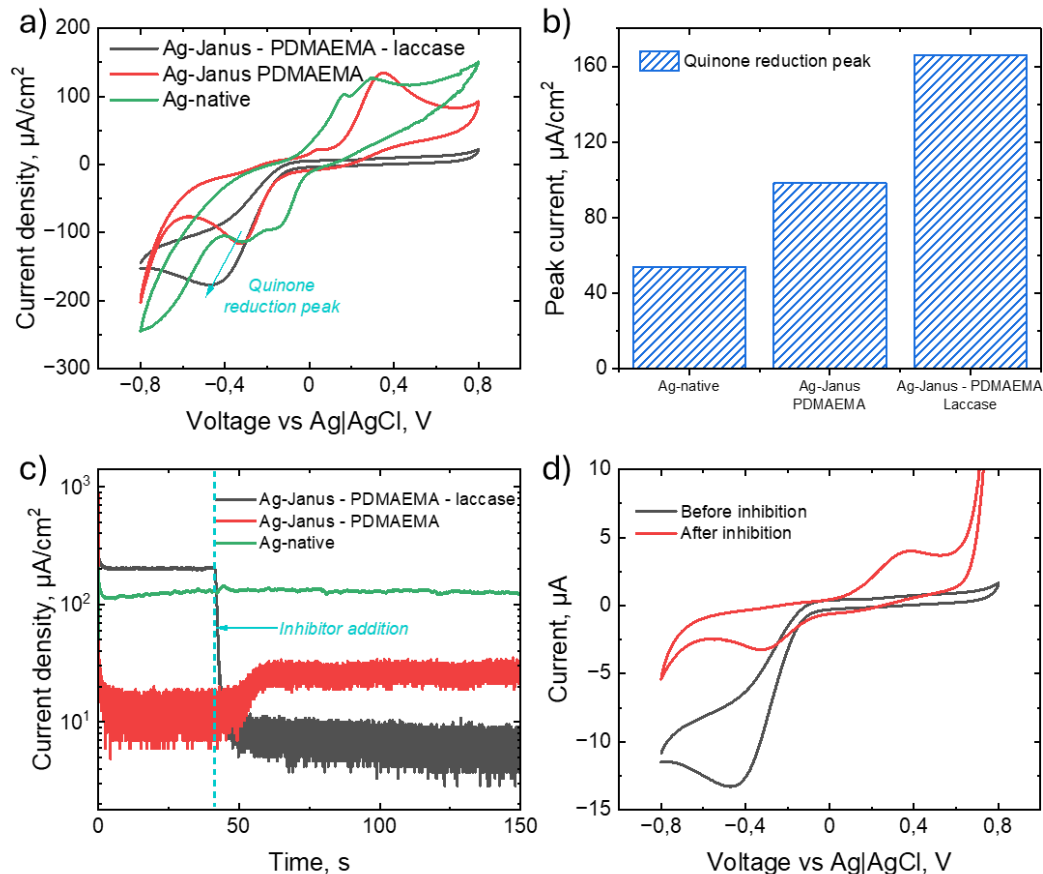
**Abb. 24:** Linke y-Achse: Cyclische Voltammetrie (CVA) einer Laccase, die auf Ag-, Ag-Janus- und SiO<sub>2</sub>-Trägern immobilisiert worden war und deren PDMAEMA-Bürsten gepfropft waren [0,1 mM Hydrochinon(HQ)-Lösung in 0,1 M Acetatpuffer (pH 4,0)]. Rechte y-Achse: Inhibitionstest mittels Chronoamperometrie unter konstantem Rühren in derselben Lösung unter Zugabe des Laccase-Inhibitors Natriumazid (NaN<sub>3</sub>, 0,1 M; durch einen Pfeil hervorgehoben).

Das Cyclovoltogramm (CV) der mit reinen Ag-Partikeln modifizierte Elektrode zeigte eine symmetrische Form mit zwei anodischen Spitzen bei +0,16 V und +0,3 V sowie zwei kathodischen Spitzen bei -0,16 V und -0,31 V. Das CV der mit PDMAEMA-Bürsten modifizierten Janus-Ag-Partikel wiesen eine symmetrische Form mit einem anodischen Peak bei +0,35 V und einem kathodischen Peak bei -0,33 V auf. Der Strom des Reduktionspeaks betrug 98 μA/cm<sup>2</sup>. Die Immobilisierung des Enzyms an/in der Bürste führte zu einem sehr ausgeprägten, einzelnen Reduktionspeak bei -0,47 V und einer Verringerung des Oxidationsprozesses an der Elektrode. Der Wert des Reduktionspeaks war deutlich erhöht und betrug 166 μA/cm<sup>2</sup>.

Um den Einfluss des Enzyms auf die Signalverstärkung nachzuweisen, wurde ein Enzyminhibitionstest durchgeführt. Die Chronoamperometrie wurde bei -0,6 V gegen die Referenzelektrode unter konstantem Rühren und Zugabe von 100 μL 0,1 M NaN<sub>3</sub>-Lösung als Inhibitor durchgeführt. Ein signifikanter Abfall des Reduktionsstroms wurde für das Ag@PDMAEMA-JP-TveLac-System aufgrund der Hemmung der Enzymaktivität beobachtet. Beim System ohne Laccase kam es zu einem leichten Anstieg des Stroms aufgrund einer leichten Erhöhung der Ionenstärke der Lösung.

Bei der mit Ag@PDMAEMA-JP-TveLac-modifizierten Elektrode wurde eine Besonderheit beobachtet: Der Oxidationspeak fiel deutlich geringer aus. Der Grund dafür könnte in der raschen und effizienten enzymatischen Oxidation des Hydrochinons liegen. Das vollständig reduzierte Diphenol Hydrochinon wurde von der Laccase sehr schnell oxidiert, sogar in der Nähe der Elektrodenoberfläche und bevor das eigentliche Oxidationspotential erreicht war. Darüber hinaus kann die Anzahl der in der Bürste eingebetteten Enzym-Moleküle so groß

gewesen sein, dass das Hydrochinon auch in der gesamten Lösung sehr schnell oxidiert wurde. Die CV-Kurve, die nach der Inhibierung in derselben Lösung aufgezeichnet wurde, hatte eine symmetrische Form, was indirekt auf das Fehlen eines anodischen Peaks aufgrund der hohen Enzymaktivität hinweist. Somit bietet die PDMAEMA-Bürste unter diesen Bedingungen ein geeignetes Milieu für hohe enzymatische Aktivitäten.

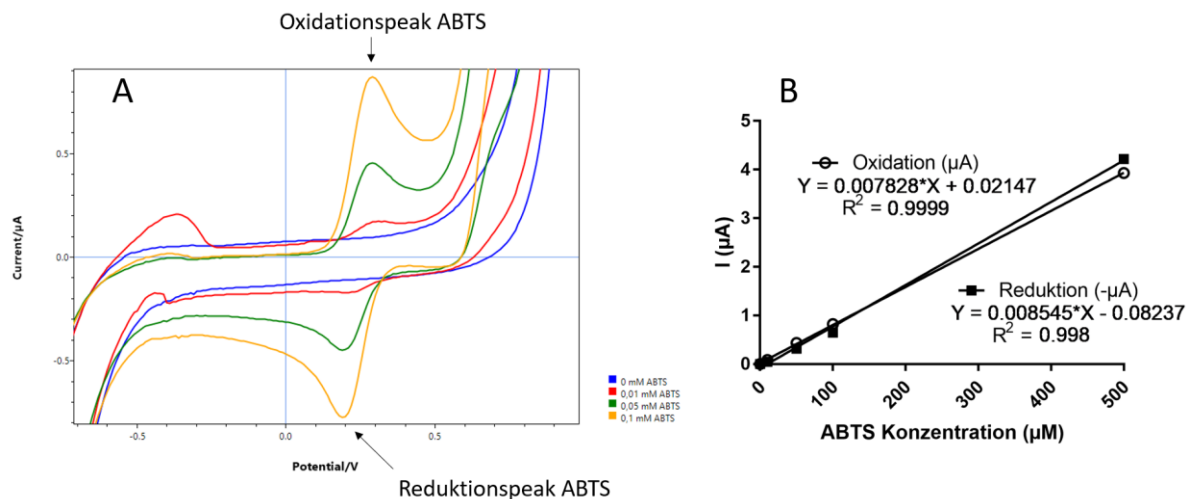


**Abb. 25:** a) CVA unterschiedlich modifizierter Elektroden, gemessen in 0,1 mM Hydrochinon-Lösung in 0,1 M Acetatpuffer (pH 4,0) bei 100 mV/s; b) Spitzenwerte für die Chinon-Reduktion, wie sie aus den CVA-Ergebnissen abgeleitet werden konnten; c) Chronoamperometrie-Messungen unter konstantem Rühren und Zugabe von  $\text{NaN}_3$ -Lösung als Inhibitor; d) CVA der Ag@PDMAEMA-JP-*TveLac*-Elektrode vor und nach der Inhibierung (gemessen bei 100 mV/s).

Der Modellsensor aus Hybridpartikeln mit immobilisiertem *Trametes versicolor* (*TveLac*) zeigte eine hervorragende analytische Leistung mit einer Empfindlichkeit von  $0,14 \text{ A}\cdot\text{M}^{-1}$ , einer Nachweisgrenze von  $0,1 \mu\text{M}$  und einem breiten linearen Bereich von  $0,3\text{-}750 \mu\text{M}$ , der die meisten vergleichbaren Systeme auch ohne Optimierung übertrifft.

Beim **Projektpartner BTU** wurde ein ähnliches ***Horseradish-Peroxidase/Ferrocyanid-System*** getestet. Hierfür wurden zunächst Vorversuche anhand der **Umsetzung von ABTS in Anwesenheit der Laccase aus *Trametes versicolor* (*TveLac*)** durchgeführt. Die entsprechende CVA (Abb. 26) zeigte bei einem Potential von  $+0,289 \text{ V}$  und  $+0,189 \text{ V}$  für die Oxidation bzw. Reduktion die entsprechenden Peaks, welche für die Berechnung der

vorhandenen ABTS-Konzentration verwendet wurden. Aufgrund der akuraten Kalibriergeraden konnten in weiteren Experimenten auch unbekannte ABTS-Konzentrationen zuverlässig ermittelt werden. Dazu wurden verschiedene ABTS-Konzentrationen angesetzt und sowohl mit Carbon-SPEs als auch mit Gold-SPEs anhand der Oxidations- und Reduktionspeaks die Konzentration bestimmt (Tab. 9). Die Konzentrationsbestimmung anhand der Oxidationspeaks erwies sich als genauer.

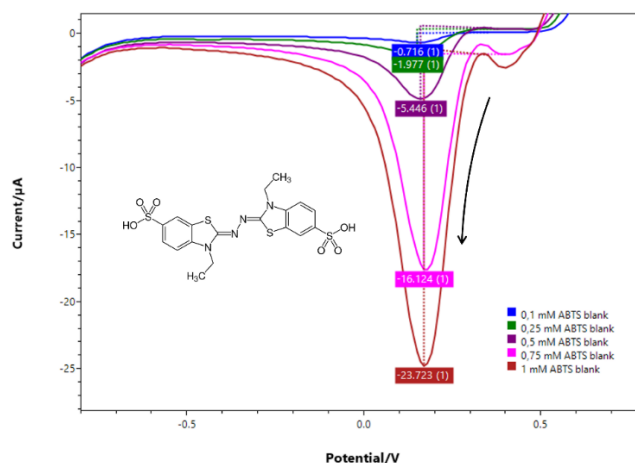


**Abb. 26:** (A) CVA verschiedener ABTS-Konzentrationen zur Kalibrierung. Mit steigender ABTS-Konzentration war eine höhere Stromstärke bei den entsprechenden Potentialen messbar. (B) Kalibriergerade der Messwerte für die Oxidations- (weiße Kreise) und Reduktionspeaks (schwarze Vierecke).

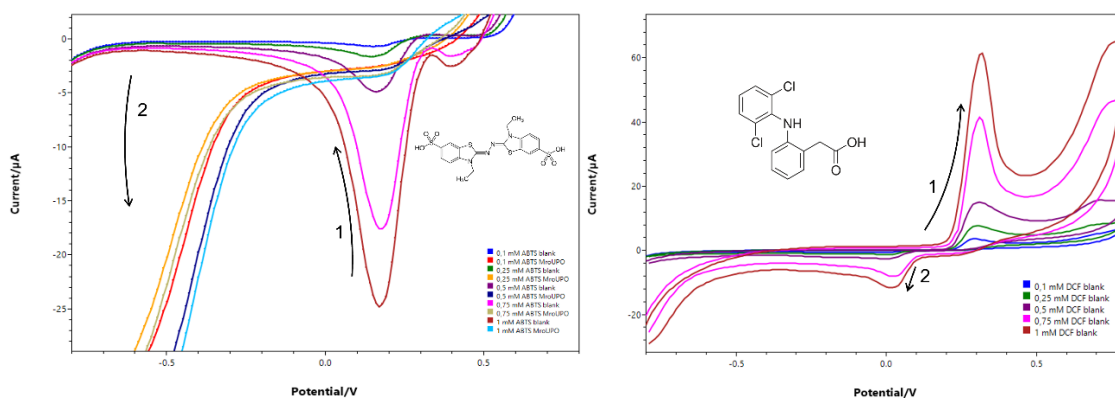
In der Cyclovoltammetrie erfolgen sowohl die Oxidation als auch die Reduktion des Substrats an der Elektrode. Die Oxidation des Schadstoffs sollte jedoch bevorzugt enzymatisch katalysiert werden. Um die Selektivität des Systems zu erhöhen, wurde daher anstelle der Cyclovoltammetrie die *Linear-Sweep-Voltammetrie* eingesetzt (Abb. 27). Dadurch konnte gezielt die Reduktion der entstehenden Reaktionsprodukte an der Elektrode analysiert werden. Eine höhere Substratkonzentration führte dazu, dass mit zunehmender Anzahl verfügbarer ABTS-Moleküle mehr Reduktionsprozesse ablaufen konnten. Infolgedessen nahm das gemessene Signal mit steigender Konzentration zu, bevor es aufgrund von Diffusionsprozessen wieder abnahm. Die Variation der ABTS-Konzentration resultierte in einem deutlich erkennbaren Peak bei etwa +0,16 V. Die Stromstärke am Scheitelpunkt dieses Peaks war konzentrationsabhängig und konnte – analog zur CVA – zur Kalibrierung sowie zur Bestimmung unbekannter Konzentrationen herangezogen werden.

Wurde die Elektrode mit Enzympartikeln beladen, so fiel das gemessene Signal bei +0,16 V ab und erreichte eine Intensität, die nur noch geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Konzentrationen aufwies. Die Differenz der beiden Messungen ergab eine Stromstärke, die zur Berechnung unbekannter Konzentrationen über Kalibrierungen verwendet werden konnte. Dabei wurde nicht nur auf die bei einem definierten Potential gemessenen Stromstärken Bezug genommen, sondern auch die Peakhöhe (in µA) für die Messung mit und ohne Enzym bestimmt. Dies ermöglichte Messungen in niedrigeren Konzentrationsbereichen, bei denen

das Grundsignal bei dem jeweiligen Potential (mit enzymbeladener Elektrode) den eigentlichen Substratpeak (mit unbeladener Elektrode) überlagerte (Abb. 28).



**Abb. 27:** *Linear-Sweep-Voltammogramme* unterschiedlicher ABTS-Konzentrationen im Citrat-Phosphat-Puffer (pH 4,5) ergaben einen maximalen Peak bei etwa 0,16 V. Der schwarze Pfeil markiert die Zunahme der Signalintensität mit steigender Substratkonzentration. Die Messungen wurden mit einer nicht-modifizierten *Screen-Printed-Elektrode* ohne Zugabe von Enzympartikeln durchgeführt.



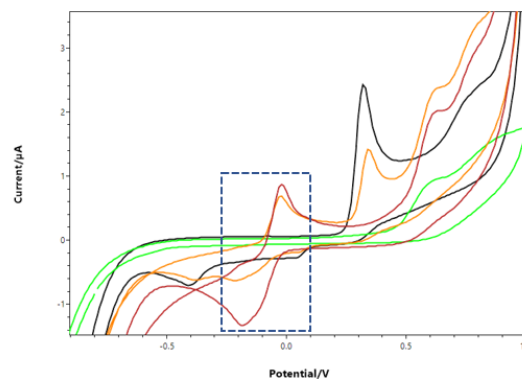
**Abb. 28:** (Links): Gegenüberstellung von *Linear-Sweep-Voltammogrammen*, aufgenommen mit Carbon-SPEs sowohl mit als auch ohne enzymatische Modifikation. In Anwesenheit des Enzyms sowie des erforderlichen Koubstrates Wasserstoffperoxid, war das ursprüngliche Substratsignal nicht mehr oder nur noch in stark abgeschwächter Form nachweisbar. Gleichzeitig verstärkte sich das gemessene Signal bei negativeren Potentialen (Pfeil 2), was vermutlich auf die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes zurückzuführen war. (Rechts): CVAs anhand unterschiedlichen DCF-Konzentrationen zeigten eine deutliche Zunahme der Stromstärke sowohl am Oxidationspeak (bei etwa +0,3 V) als auch am Reduktionspeak (bei etwa +0,02 V) bei steigender Substratkonzentration.

Diclofenac (DCF) wurde als Modells substrat für die Sensoranwendung ausgewählt. In früheren Substratumsatz-Studien mit Peroxygenasen konnte bereits gezeigt werden, dass DCF mit hoher katalytischer Effizienz umgesetzt wird. Die Cyclovoltammogramme der DCF-Lösungen zeigten ein ähnliches Verhalten wie die der ABTS-Messungen. Sowohl der Oxidations- als

auch der Reduktionspeak nahmen mit steigender Konzentration in ihrer Signalstärke zu, was eine gute Voraussetzung für weiterführende Experimente darstellte.

**Tab. 9:** Bestimmung unbekannter ABTS-Konzentrationen mittels Carbon- und Gold-SPEs. Mit einem Stern\* markierte Werte weichen mehr als 13 % vom Erwartungswert ab.

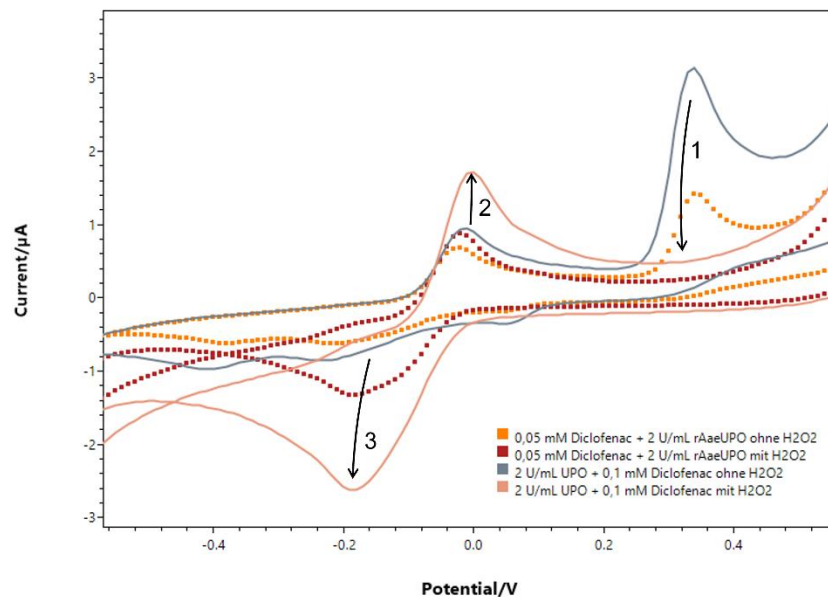
Probe	zu erwartende ABTS-Konzentration ( $\mu\text{M}$ )	Carbon- / Gold-Oxidationspeak ( $\mu\text{M}$ )	Carbon- / Gold-Reduktionspeak ( $\mu\text{M}$ )
1	72	78 / 68	57* / 69
2	444	488 / 468	490 / 588
3	198	218 / 195	172 / 152*
4	30	32 / 60*	29 / 57*
5	282	308 / 298	248 / 229*



**Abb. 29:** Cyclische Voltammetrie zur Umsetzung von Diclofenac (DCF) durch rAaeUPO. Dargestellt sind die cyclischen Voltammogramme für 50  $\mu\text{M}$  DCF bei pH 7,0 (schwarz), 2 U  $\text{ml}^{-1}$  rAaeUPO (grün), 50  $\mu\text{M}$  DCF, 2  $\text{ml}^{-1}$  rAaeUPO ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  (orange) und 50  $\mu\text{M}$  DCF, 2 U  $\text{ml}^{-1}$  rAaeUPO mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (rot). In dem gestrichelten blauen Rechteck ist der neu entstandene Redox-Peak hervorgehoben, welcher sich erst in Gegenwart von DCF und UPO einstellte.

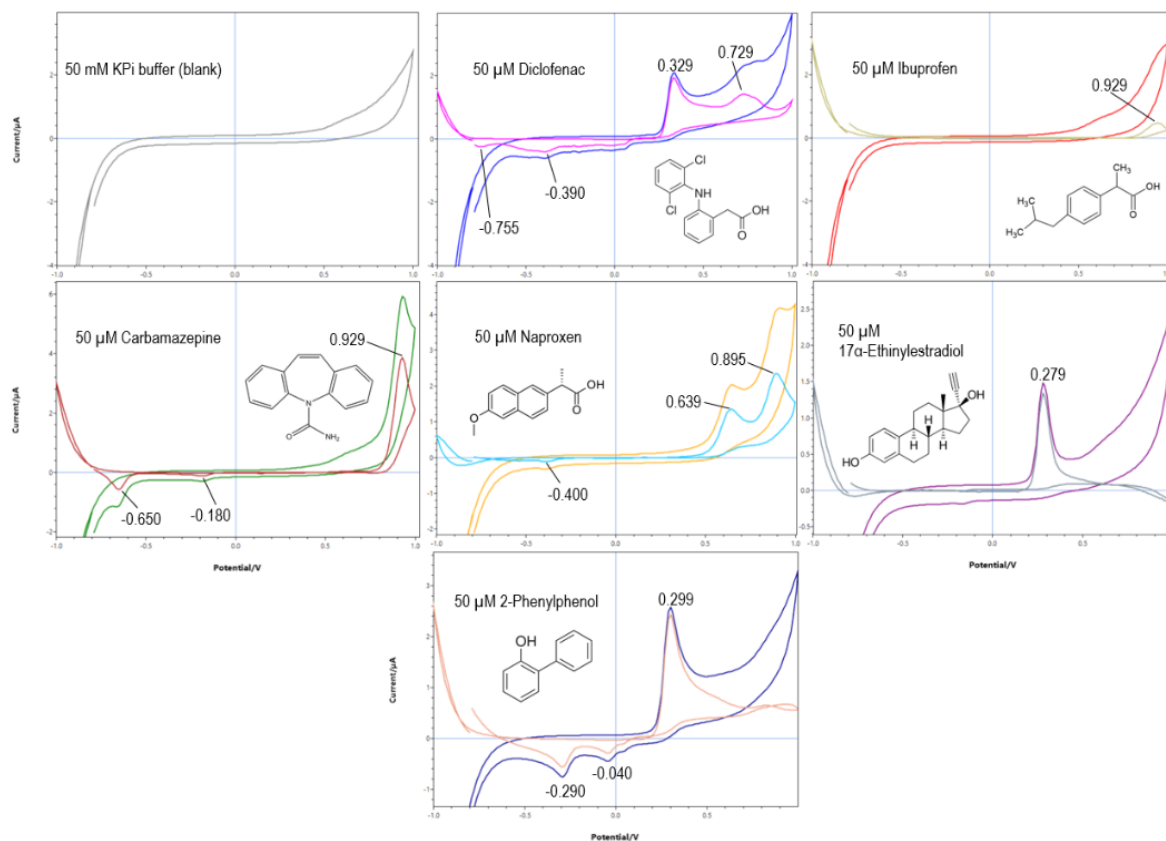
Die in Abbildung 30 dargestellten Messungen zur Umsetzung von Diclofenac durch die rAaeUPO wurden mit frei in Lösung vorliegendem Enzym durchgeführt. Aufgrund unterschiedlicher Proteineigenschaften zeigte die *MroUPO* im Vergleich zur rAaeUPO eine deutlich höhere Immobilisierungseffizienz. Um eine verbesserte Leitfähigkeit am Sensor zu gewährleisten, wurde die Immobilisierung des aktiven Enzyms an leitfähigen Janus-Partikeln angestrebt. Daher kamen in den nachfolgenden Experimenten Janus-*MroUPO*-Partikel (hergestellt im Rahmen von Arbeitspaket 3) zum Einsatz, während auf die Verwendung freier Enzyme verzichtet wurde. Die *MroUPO* katalysierte die Oxidation von DCF hauptsächlich über eine Ein-Elektronen-Oxidation am Stickstoffatom. Die dabei gebildeten reaktiven Radikale führten durch Kopplungsreaktionen zur Bildung von Di- und Oligomeren. Im Gegensatz dazu griff die rAaeUPO bevorzugt das aromatische Ringsystem des DCF an. Das bei dieser Reaktion entstehende Produkt könnte die Ursache für den in Abbildung 29 (markiertes Rechteck) sichtbaren Reduktionspeak bei etwa  $-0,18\text{ V}$  sein. Mit zunehmender DCF-Konzentration verstärkte sich dieser Redoxpeak deutlich (Abb. 30, Pfeile 2 und 3). Bei der

Umsetzung von DCF durch die *MroUPO*, sowohl in immobilisierter als auch in freier Form, konnte hingegen kein vergleichbarer Redoxpeak beobachtet werden.

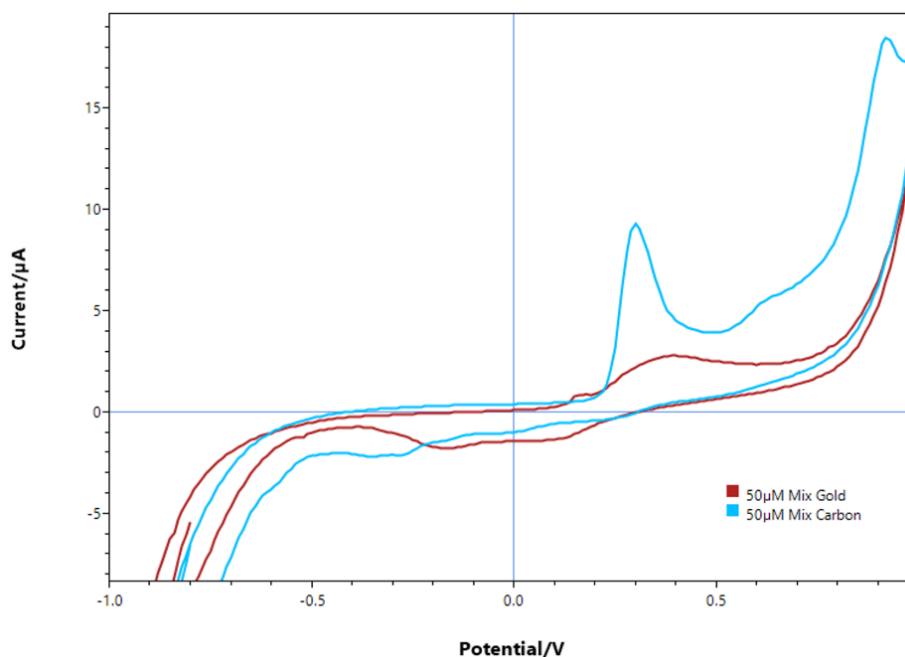


**Abb. 30:** Mit steigender Ausgangskonzentration an Diclofenac (DCF) nahm die Signalstärke sowohl des Substrats als auch des gebildeten Produkts zu. Pfeil 1 markiert die Abnahme des DCF-Signals (von grau zu orange), was darauf zurückgeführt wurde, dass das Enzym in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid nicht in der Lage war, das vorliegende Substrat zu oxidieren. Erst bei Zugabe von Wasserstoffperoxid konnte die enzymatische Reaktion starten. Freies DCF wurde daraufhin nicht mehr direkt an der Elektrode oxidiert, und das ursprüngliche Substratsignal war nicht mehr nachweisbar. In Anwesenheit von rAaeUPO und DCF bildeten sich zusätzliche Peaks aus (Pfeile 2 und 3). Unter den gewählten Versuchsbedingungen war anzunehmen, dass der gebildete Enzym-Substrat-Komplex an der Elektrode oxidiert wurde und als Signal bei negativem Potential (Pfeil 2) im CVA erschien. Ein weiterer Peak bei ca. -0,18 V (Pfeil 3) weist darauf hin, dass entweder das gebildete Produkt oder der Enzym-Substrat-Komplex erneut reduziert wurde.

Um die in AP 1 zur Detektion mittels eines UPO-basierten Janus-Partikel-Biosensors als geeignet eingestuft Schadstoffe gemeinsam zu analysieren, wurden zunächst die sechs vielversprechendsten Substanzen einzeln untersucht. Somit war es möglich einzuschätzen, ob der Sensor tatsächlich in der Lage ist, Schadstoffe, die als Gemische vorliegen, voneinander zu unterscheiden (um sie später zu quantifizieren). Die einzelnen CVAs wurden aufgezeichnet und das Hintergrundsignal des Puffers abgezogen. Detektierte Oxidations- und Reduktionspeaks wurden für die jeweiligen Potentiale ermittelt (Abb. 31). Wurden diese Substanzen in gleicher Konzentration in einem Master-Mix vorgelegt und gemessen, ließen sich die Signale nicht mehr voneinander unterscheiden, da beispielsweise die Oxidationspeaks nicht ausreichend separiert waren (Abb. 32). Untersucht wurde das Schadstoffgemisch in Form eines Modellabwassers mit Hilfe von Carbon- und Gold-SPEs. Die Messungen ergaben deutliche Unterschiede in den Peak-Intensitäten. Die Gold-SPEs waren nicht sensitiv genug, um die Peaks z.B. für das Paar Naproxen / Carbamazepin aufzulösen.



**Abb. 31:** CVAs der für die elektrochemische Schadstoffdetektion besonders geeigneten Substanzen (d.h. mit guten bis sehr guten enzymatischen Umsatzraten). Die jeweiligen Peaks zur Oxidation oder Reduktion sind an den entsprechenden Messsignalen gekennzeichnet.



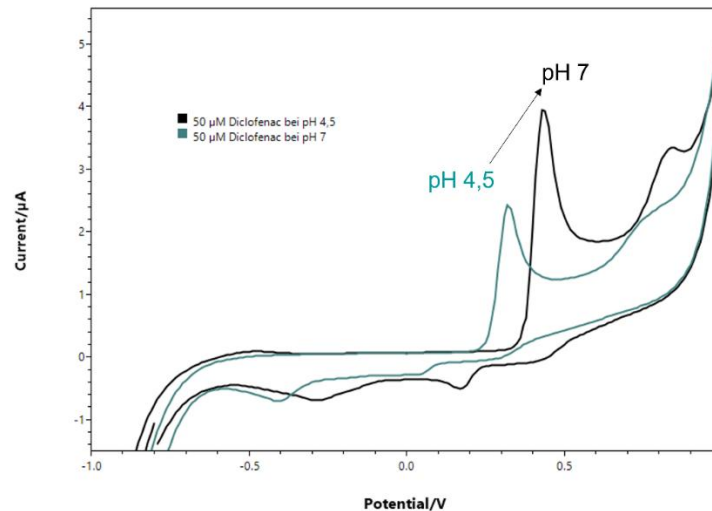
**Abb. 32:** CVAs eines Modellabwassers, das mit einem Schadstoffgemisch (wässrige Lösung mit 50 µM aller sechs Schadstoffe) dotiert wurde. Die Messungen fanden sowohl mit Gold- als auch mit Carbon-SPEs bei pH 7,0 statt.

### **MS10: (Monat 36):** Evaluierung eines Janus-UPO-(OD)-Modell Biosensors

Im Rahmen der Modell-Sensor-Untersuchungen wurden verschiedene Partikelsysteme getestet, wobei sich die effizienteste Enzymimmobilisierung unter Verwendung der *MroUPO* auf Ag-Janus-Partikeln (HC76) ergab. Das Auftragen dieser enzymbeladenen Partikel auf der Arbeitselektrode mittels Druckkopfverfahren erwies sich jedoch als ungeeignet, da die Enzyme diesen Prozess nicht unbeschadet überstanden und anschließend keine oder nur sehr geringe Aktivitäten detektierbar waren. Auch der Versuch, Partikel ohne Enzym per Druckverfahren aufzubringen, führte nicht zu katalytisch aktiven Enzymimmobilisaten. Eine mögliche Ursache hierfür war, dass die empfindlichen Polymerbürsten beim Druckvorgang beschädigt wurden oder sich nach dem Auftragen auf der Seite der Elektrode befanden, die anschließend für das Enzym kaum zugänglich war. Die *Drop-Casting*-Methode hingegen stellte sich als die schonendste und geeignetste Möglichkeit heraus, um enzymbeladene Partikel in die Nähe der Arbeitselektrode zu bringen und so die Reduktion gebildeter Oxidationsprodukte von Schadstoffen zu ermöglichen. Der Biosensor erlaubte im Fall des Modellschadstoffs Diclofenac, selbst bei Konzentrationen von etwa 10  $\mu\text{M}$  (entsprechend ca. 3  $\text{mg L}^{-1}$ ), noch gut messbare Signale zu erhalten. Auch wenn diese Konzentration höher war als die typischen Werte in realem Abwasser, konnte damit die prinzipielle Funktionsfähigkeit des Sensors nachgewiesen werden. Eine Herausforderung blieb jedoch die Signalüberlagerung durch verschiedene Substrate, die die Quantifizierung einzelner Schadstoffe in Gemischen erschwerte. Dennoch bestand die Möglichkeit, Gesamtparameter für oxidierbare und reduzierbare Schadstoff-Moleküle zu erfassen.

#### AP4.3 Evaluierung des Biosensors unter Realbedingungen (TUD, BPI, BTU; M19-36)

Die **BTU konnte mittels Cyclovoltammetrie zeigen, dass die einzelnen Substanzen gut messbar waren.** Eine zentrale Herausforderung, die insbesondere in AP4.2 identifiziert wurde, bestand darin, aus einem Gesamt-Cyclovoltammogramm die einzelnen Substanzen eindeutig zuzuordnen. Ein wesentliches Problem stellte dabei die pH-Wert-abhängige Verschiebung der elektrochemischen Signale dar, wodurch eine standardisierte und allgemein gültige Messmethode erschwert wurde (Abb. 33). Trotz dieser Einschränkungen war es möglich, Summenparameter von oxidierbaren und reduzierbaren Substanzklassen zuverlässig zu bestimmen. Mögliche pH-Wert-Schwankungen haben zudem Einfluss auf die Protonierung bzw. Deprotonierung von Aminosäureseitenketten innerhalb der verwendeten Enzyme. Diese Veränderungen können sowohl die katalytische Aktivität der Enzyme als auch ihre Stabilität beeinflussen/beeinträchtigen. Besonders kritisch war dabei die Verminderung ionischer Wechselwirkungen zwischen den Enzymen und den eingesetzten Polymerbürsten, was zu einer verringerten Funktionalität oder gar Auswaschung der Katalysatoren führte. Somit wurde deutlich, dass eine gezielte pH-Stabilisierung sowie die Entwicklung robusterer Enzym-Polymer-Systeme, beispielsweise über kovalente Bindungen zwischen Enzym und Trägermaterial, zentrale Ansatzpunkte für weiterführende Optimierungen darstellen müssen.



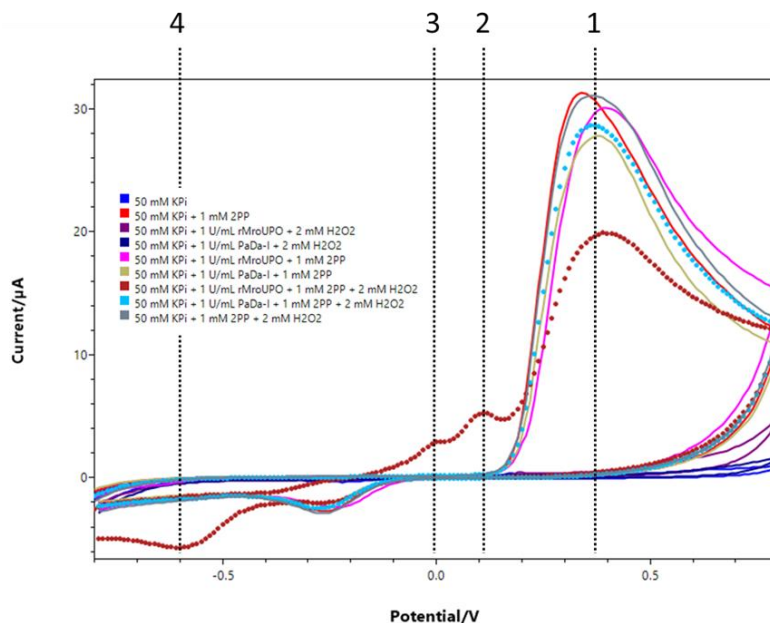
**Abb. 33:** CVAs einer 50 µM DCF-Lösung bei pH 4,5 und pH 7,0. Beide Messungen wurden mit Carbon-SPEs durchgeführt. Mit der Änderung des pH-Wertes wurde ein höheres Potential zur Oxidation des DCF benötigt. Gleichzeitig führte die Messung jedoch auch zu einer höheren Stromstärke.

Am **BPI** wurden **Siebdruckelektroden mit den von der TUD hergestellten *MroUPO*-Janus-Partikeln beschichtet und für Messungen an der BTU** zur Verfügung gestellt. Es wurden, wie oben beschrieben, Elektroden die mittels *Drop-Casting* (Auftropfen) sowie mittels Drucktechnik („*Inject printing*“) beschichtet wurden, zur Verfügung gestellt. Zudem wurden auch Elektroden, die mit Januspartikeln ohne Enzym beschichtet waren, bereitgestellt. Die elektrochemischen Messungen (CV, CVA) am BPI unter Verwendung von *TveLac*-Partikeln zeigten, den erfolgreichen Einsatz der mittels *Drop-Casting* beschichteten Elektroden für die Detektion von Hydrochinon. Dies diente als Basis für die Messungen an der BTU.

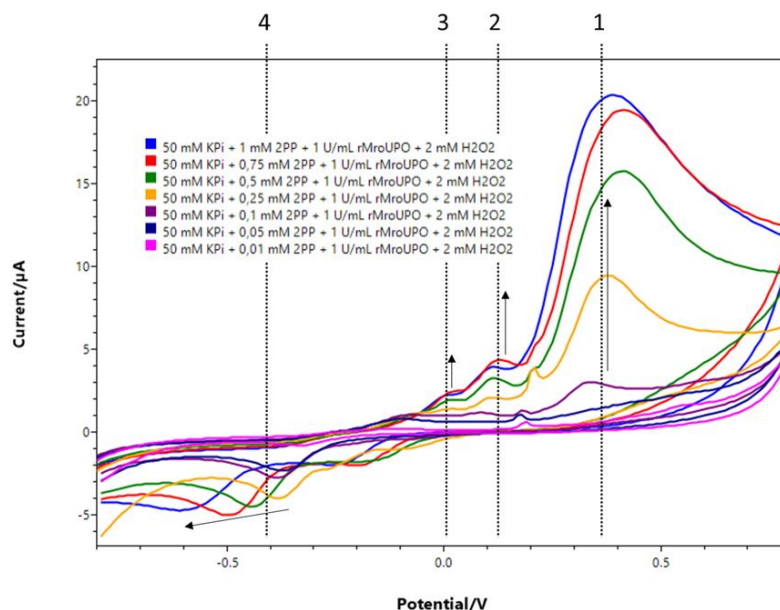
#### **Laufzeitverlängerung – TUD (IHI Zittau):**

Die **TUD** hat das **Detektionslimit des enzymatischen Abbaus von Abwasserschadstoffen am Cyclovoltogramm (CVA) am Beispiel von 2-Phenylphenol (2PP) und 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (EE)** untersucht.

Der enzymatische Umsatz von 2-Phenylphenol durch die *rMroUPO* führte zu einer signifikanten Verschiebung der Signalstärke des Substrates (1) im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 34). Diese Beobachtung lässt auf eine effiziente Umsetzung des Abwasserschadstoffs unter Versuchsbedingungen schließen. Die Hypothese wurde durch das Auftreten zusätzlicher Peaks gestützt. Die Analyse ergab einen Oxidationspeak mit zwei Maxima (Abb. 34; Peak 2 & 3) sowie einen separat auftretenden Reduktionspeak (Abb. 34; Peak 4). Für die rekombinante PaDa-I (*rAaeUPO*) konnte keine Umsetzung von 2-Phenylphenol mittels des CVAs nachgewiesen werden (Abb. 34).



**Abb. 34:** CVAs der enzymatischen Umsetzung von 2-Phenylethanol (1 mM in 50 % MeCN) bei pH 7,0 durch zwei UPOs (*rMroUPO* & *PaDa-I* (*rAaeUPO*)) (1 U mL<sup>-1</sup>) in Gegenwart von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Messungen wurden an einer Carbon-SPEs durchgeführt.



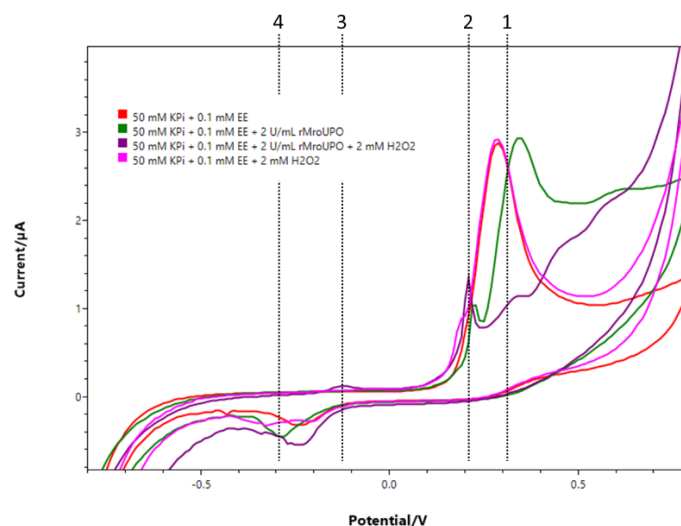
**Abb. 35:** CVAs der enzymatischen Umsetzung unterschiedlicher Konzentrationen von 2-Phenylethanol (in 50 % MeCN) bei pH 7,0 mittels *rMroUPO* (1 U mL<sup>-1</sup>) in Gegenwart von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Messungen wurden an einer Carbon-SPEs durchgeführt.

Im Rahmen der Untersuchung wurde die Umsetzung von 2-Phenylphenol in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um zu ermitteln, ob sich bei geringeren Konzentrationen Unterschiede feststellen lassen (Abb. 35). Die Oxidationspeaks (Peaks 1-3) wiesen demnach nur

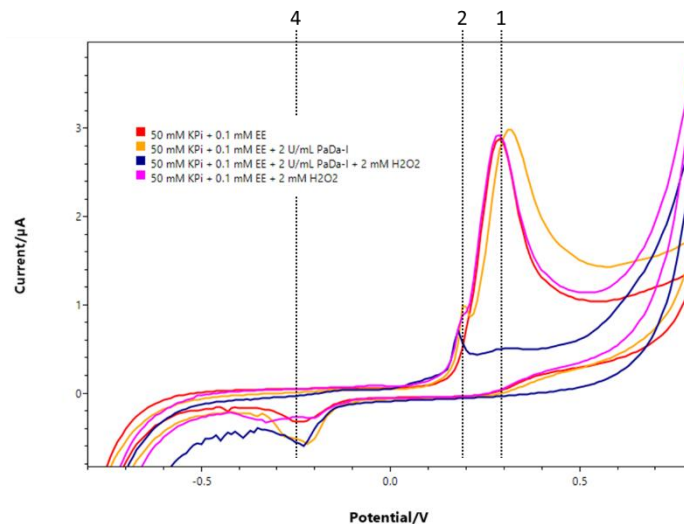
marginale Verschiebungen beim jeweiligen Potential auf. Es ist jedoch auffällig, dass mit zunehmender Substratkonzentration das Reduktionssignal (Peak 4) eine Potenzialverschiebung von etwa 0,2 V in Richtung niedrigerer Werte aufwies, während die Signalintensität nahezu konstant blieb.

Die Umsetzung von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol erfolgte aufgrund von Löslichkeitsproblemen mit einer Konzentration von 0,1 mM. Für beide Enzyme (*rMroUPO* & PaDa-I (*rAaeUPO*)) konnte ein deutlicher Rückgang des Oxidationssignals beobachtet werden (Abb. 36 & 37). Im Kontrollansatz mit inaktivem Enzym (Abb. 36; grünes Signal) zeigte sich der Substratpeak leicht verschoben, was vermutlich auf eine pH-Verschiebung durch die Enzymzugabe zurückzuführen war. Auffällig waren zudem sehr unruhige Signale bei der Reduktion (Abb. 36; Peak 3 & 4), was möglicherweise daran lag, dass das Enzym im Reaktionsansatz nicht konstant an der Sensoroberfläche immobilisiert, sondern z.T. gelöst im Reaktionsansatz vorlag. Der Ursprung des Reduktions-Peaks bei -0,12 V (Abb. 36, Peak 3, violetteres Signal), der ausschließlich im vollständigen Reaktionsansatz beobachtet werden konnte, ist nicht sicher bestimm- bzw. erklärbar. Es könnte sich um ein in sehr geringen Konzentrationen gebildetes Produkt handeln, welches bei diesem Potential an der Elektrode oxidiert werden konnte. Das Signal war sehr schwach und ausschließlich bei der Umsetzung mit *rMroUPO* nachweisbar, nicht aber bei der Umsetzung mit PaDa-I (*rAaeUPO*).

Ein weiterer Oxidationspeak bei 0,2 V (Abb. 36 & 37; Peak 2) schien aus der Wechselwirkung von Enzym und Substrat zu resultieren und verstärkte sich, wenn zusätzlich  $H_2O_2$  als Co-Substrat vorlag. Vergleich man die Umsetzung von Ethinylestradiol durch PaDa-I mit der durch *rMroUPO*, zeigten sich grundsätzlich die gleichen Signale, jedoch in unterschiedlichen Intensitäten. Da der Substratpeak bei PaDa-I noch schwächer ausfiel, als bei *rMroUPO*, ließ sich schlussfolgern, dass PaDa-I das Substrat noch effektiver umsetzen konnte, als *rMroUPO*.



**Abb. 36:** CVAs der enzymatischen Umsetzung von 0,1 mM  $17\alpha$ -Ethinylestradiol (in 50 % MeCN) bei pH 7,0 mittels *rMroUPO* ( $2 \text{ U mL}^{-1}$ ) in Gegenwart von 2 mM  $H_2O_2$ . Die Messungen wurden an einer Carbon-SPEs durchgeführt.



**Abb. 37:** CVAs der enzymatischen Umsetzung von 0,1 mM 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol (in 50 % MeCN) bei pH 7,0 mittels PaDa-I (2 U mL<sup>-1</sup>) in Gegenwart von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Messungen wurden an einer Carbon-SPEs durchgeführt.

#### AP4: Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die wichtigsten personellen Positionen der **TUD** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (u.a. für die Protein/Enzym-Immobilisierungen) und einen Laboringenieur (Enzymproduktion). Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Verbrauch- und Labormaterialien (Lösungsmittel, Feinchemikalien, Reagenzien und kommerziell verfügbare Arbeitselektroden).

Die wichtigsten personellen Positionen der **BTU** betrafen einen wissenschaftlichen Mitarbeiter (amperometrische und potentiometrische Messungen) und einen technischen Mitarbeiter (Unterstützung der amperometrischen und potentiometrischen Messungen). Im Bereich Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für die Beschaffung eines Potentiostaten inkl. Zubehör und Verbrauchsmaterialien wie Einzelelektrodenmaterial in Form von Arbeitselektroden (Golddraht, Gold-Slides, *Glassy Carbon Elektrode*), *Counter*- und Referenzelektroden, aber auch *Screen-Printed*-Elektroden („*Ready-to-use*“-Lösung) als eine reproduzierbarere und handhabungsfreundlichere Variante der Elektroden-Konfiguration.

Die wichtigsten personellen Positionen des **BPI** (AP2, AP3 und Teile des AP4) betrafen eine Postdoc-Stelle [Synthese von hybriden Janus-Partikeln, Partikel-Charakterisierung, Elektrodenbeschichtung mittels *Drop-Casting* und Drucktechnik sowie Chronoamperometrie- und Chronoamperometrie-Untersuchungen des Modellsystems]. Im Bereich der Verbrauchsmittel erfolgten die größten Ausgaben entsprechend der Planung für Labormaterialien und Reagenzien sowie der Anschaffungen des Druckkopfes und der Siebdruckelektroden.

#### AP4: Verwertung der Ergebnisse und Veröffentlichungen

Neben der Herstellung reiner Janus-UPO-Partikel wurden auch Kombinationen mit Cosubstrat erzeugenden Oxidasen (Janus-Oxidase-UPO-Partikel) getestet (z.B. GOD/Glucose-Oxidase, AAO/Arylalkohol-Oxidase). Die Verwendung von Oxidase-beladenen Partikeln ist für den Einsatz in biosensorischen Anwendungen weniger geeignet, da diese Enzyme weitere organische Moleküle im Reaktionsansatz benötigen, um Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) *in situ* zu generieren. Das auf diese Weise schonend erzeugte  $H_2O_2$  steht somit nicht sofort jeder UPO zur Verfügung, was zu einer schlechteren Detektion insbesondere geringer Schadstoffkonzentrationen führt. In anderen potentiellen Anwendungsbereichen (wie z.B. der Wirkstoffsynthese mit UPOs) besitzen diese Janus-Oxidase-UPO-Partikel jedoch ein interessantes Anwendungspotential. Durch die stabile Einbettung der Enzyme in die Polymerbürsten der Partikel können diese über mehrere Reaktionszyklen wiederverwendet werden. Bei solchen Anwendungen wird der pH-Wert konstant gehalten, wodurch ein Auswaschen der Enzyme aus den Polymerbürsten verhindert wird. Dies ist besonders vorteilhaft in Reaktionen, bei denen mehrere Enzyme nacheinander eingesetzt werden müssen (Enzym-Kaskaden). In solchen Systemen erleichtert die Trennung von Enzym und Reaktionsprodukt die Prozessführung erheblich. Diese Eigenschaften machen Janus-Oxidase-UPO-Partikel zu einer attraktiven Lösung für komplexe biokatalytische Prozesse. Sie tragen zur Effizienzsteigerung und Kostenreduktion in der biotechnologischen Produktion bei. Trotz der schwierigen Anwendung in der Sensorik bieten sie, im Sinne eines *Spin-offs*, vielversprechende Ansätze in anderen industriellen Kontexten (u.a. in der Synthese-Chemie).

Die gewonnenen Erkenntnisse flossen bereits während der Projektphase in die Lehre der drei Projektpartner ein, u.a. in Form von Vorlesungen und Praktika (z.B. zur Herstellung von Modellsensoren auf der Basis von adaptiven Partikeln mit immobilisierten Enzymen (TveLac; BPI), zum enzymatischen Abbau niedrig konzentrierter Abwasserschadstoffe mit UPOs & Laccasen (TUD), heterologe Enzymproduktion & cyclovoltametrische Messungen enzymatischer Umsetzungen verschiedenster Substrate (BTU & TUD)).

Die im Projekt erzielten Ergebnisse und Erkenntnisse wurden bei einschlägigen referierten Fachzeitschriften zur Publikation vorbereitet (zwei Manuskripte wurden eingereicht, ein weiteres Manuskript befindet sich in Vorbereitung, s.u.). Darüber hinaus wurden die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentiert (unten aufgelistet). Durch die Technologieentwicklung wird zukünftig der Auf- und Ausbau von Netzwerken mit weiteren Forschungsgruppen und Industriepartnern in verschiedenen Forschungsfeldern angestrebt, u.a. in den Bereichen (Bio-)Sensorentwicklung, medizinische Diagnostik und Materialwissenschaften (z.B. im Rahmen der Entwicklung der Gesundheitsregion Bayern und der Strukturstärkung und -entwicklung im Lausitzer Braunkohlerevier).

#### **Bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen:**

Während der Projektlaufzeit sind nach unserem Kenntnisstand nur sehr wenige wissenschaftliche Publikationen zu ähnlichen Themenfeldern erschienen, wie sie in diesem Projekt bearbeitet wurden. Diese beschäftigen sich zwar mit dem Abbau von Abwasserschadstoffen mit

oxidativen Enzymen inkl. UPOs, nicht aber mit deren Immobilisierung und schon gar nicht mit Janus-Partikel-Systemen und deren Anwendung in Biosensoren. Insofern sind während der Projektlaufzeit keine Fortschritte von dritter Seite auf diesem Themengebiet bekannt geworden.

### Veröffentlichungen aus dem JaBaS-Forschungsvorhaben:

#### Wissenschaftliche Publikationen in peer-reviewed Zeitschriften (TUD, BTU & BPI):

**Karich, A., Hongtao, C., Linhardt, A., Antony, A., Liers, C.,** Ullrich, R., Schwaderer, F., **Kalmbach, J., Scheibner, K., Hofrichter, M., Synytska, A.** (2025): "Conductive hairy particles with homogeneous and Janus design as carrier materials for the efficient immobilization of unspecific peroxygenases" *Biotechnology Journal*; <https://doi.org/10.1002/biot.70078>

**Hongtao Cai,** Anila Antony, **Anne Linhardt,** Petr Formánek, Leonid Ionov and **Alla Synytska** (2025): "Interplay Between the Conductivity of Polymer-Brush Functionalized Core-Shell Particles and Their Enzyme Loading Efficiency and Activity", *Journal of Polymer Science*; under revision.

**Pavel Milkin,** Anila Antony, Hongtao Cai, Antonia Debevc, Ceyda Topal, **Anne Linhardt, Alla Synytska,** Leonid Ionov: "Electrochemical Biosensors based on conductive homogeneous and Janus Polymer Brush – Laccase Decorated Particles"; *Advanced Functional Materials Journal*, manuscript will be submitted soon.

#### Tagungsbeiträge (BPI):

Conductive Janus and patchy particles with immobilized enzymes as next-generation ink for electrochemical biosensors, **Anne Linhardt,** Hongtao Cai, Anila Antony, and Alla Synytska, Oral Presentation, LOPEC 2024, March 2024, Munich, Germany.

Enzyme-immobilized hybrid nanoparticle inks for electrochemical biosensors, **Anila Antony,** Anne Linhardt, Hongtao Cai, and Alla Synytska, Poster Presentation, LOPEC 2024, March 2024, Munich, Germany.

Polymer brush modified conductive core-shell particles for enzyme loading and sensor design, **Hongtao Cai,** Anila Antony, Anne Linhardt, Petr Formánek, Leonid Ionov and Alla Synytska, Poster Presentation, 8th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, March 2025, Montpellier, France.

Polymer-brush hybrid nanoparticle system for enzyme-based biosensor: design and electrochemical properties, **Anila Antony,** Pavel Milkin, Anne Linhardt, Hongtao Cai, and Alla Synytska, Poster Presentation, 35th Anniversary World Congress on Biosensors, May 2025, Lisbon, Portugal.

#### Literatur:

Bonzom, C., S. Hüttner, E. Mirgorodskaya, S.-L. Chong, S. Uthoff, A. Steinbüchel, R. M. D. Verhaert and L. Olsson (2019). "Glycosylation influences activity, stability and immobilization of the feruloyl esterase 1a from *Myceliophthora thermophila*." *AMB Express* **9**(1): 126.

Deshpande, N., M. R. Wilkins, N. Packer and H. Nevalainen (2008). "Protein glycosylation pathways in filamentous fungi." Glycobiology **18**(8): 626-637.

Goldstein, L. (1972). "Microenvironmental effects on enzyme catalysis. Kinetic study of polyanionic and polycationic derivatives of chymotrypsin." Biochemistry **11**(22): 4072-4084.

Gröbe, G., R. Ullrich, M. J. Pecyna, D. Kapturska, S. Friedrich, M. Hofrichter and K. Scheibner (2011). "High-yield production of aromatic peroxygenase by the agaric fungus *Marasmius rotula*." AMB Express **1**(1): 31.

Goto, M. (2007). "Protein O-Glycosylation in Fungi: Diverse Structures and Multiple Functions." Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry **71**(6): 1415-1427.

Keerti, A. Gupta, V. Kumar, A. Dubey and A. K. Verma (2014). "Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable  $\beta$ -Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice." International Scholarly Research Notices **2014**(1): 178498.

Linde, D., E. Santillana, E. Fernández-Fueyo, A. González-Benjumea, J. Carro, A. Gutiérrez, A. T. Martínez and A. Romero (2022). "Structural Characterization of Two Short Unspecific Peroxygenases: Two Different Dimeric Arrangements." Antioxidants (Basel) **11**(5).

Norouzian, D. (2003). "Enzyme Immobilization: The State of Art in Biotechnology." Iranian Journal of Biotechnology **1**(4): 197-206.