Schlussbericht
zum BMBF-Vorhaben
„Entwicklung und Erprobung neuer Instrumente zur Bildung von Verwertungs- und Transfernetzen“

NanoFoto - Neue Wege zur verwertungsorientierten Netzwerkbildung in der Nanobiotechnologie

Förderkennzeichen 01SF0717

Institut für Radiochemie
Forschungszentrum Dresden-Rossendorf
01.Oktober 2007-31.Dezember 2008

Dresden, 16. Juni 2009

I .Kurze Darstellung

1. Aufgabenstellung

Bis zu 95 % der Wirkstoffe von Arzneimittel der Humanmedizin werden unverändert ausgeschieden oder gelangen über die täglichen Hygiene in den Wasserkreislauf. Die meisten Substanzen werden sehr schnell und vollständig abgebaut oder liegen in Konzentrationen vor, in denen sie keine Gefährdung für die Umwelt und den Menschen darstellen. Im Gegensatz dazu gibt es aber auch Substanzen, die nur sehr schwer abgebaut werden können (persistent sind) und für die bereits negative Langzeiteffekte in umweltrelevanten Konzentrationen für Tiere nachgewiesen wurden. Ein Beispiel dafür ist der schmerzstillende Wirkstoff Diclofenac. Aus diesem Grund und wegen der guten Kenntnislage hinsichtlich Vorkommen, Abbauprodukte und Analytik wurde Diclofenac als Referenzverbindung für die Experimente im Rahmen dieses Projekts verwendet. Aufgrund der geringen Konzentration von Diclofenac in Wasser und der chemischen Stabilität von Diclofenac sowie einiger anderer Spurenstoffe sind herkömmliche Wasserbehandlungsverfahren, wie sie derzeit in Kläranlangen verwendet werden, ineffizient oder zu teuer. Deshalb gibt es zahlreiche Bemühungen, alternative und umweltschonende Behandlungsverfahren zur Entfernung von Arzneimittelrückständen aus Wasser zu entwickeln, die einen vollständigen Abbau der Rückstände ermöglichen. Idealerweise sollten technische Lösungen zur Verfügung stehen, die gegebenenfalls in jedem Land der Erde einsetzbar wären. Der in diesem Projekt verfolgte Ansatz zur Entwicklung fotokatalytischer Schichten, die idealerweise bereits bei Tageslicht eine ausreichend hohe Aktivität aufweisen, ist besonders interessant, da es nach Optimierung weder des zusätzlichen Einsatzes von Chemikalien noch des Einsatzes von Energie bedarf. So werden durch die Bestrahlung des Katalysators (z.B. ZnO, TiO_2) mit künstlichem UV-Licht, perspektifisch aber mit UV-A-Strahlung der Sonne sowohl Wasser als auch Luftsauerstoff zu reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt, die letztendlich die unspezifischen Spaltung organischer Verbindungen im Wasser bewirken. Voraussetzung für die Optimierung hinsichtlich katalytischer Aktivität und Empfindlichkeit gegenüber Tageslicht ist ein Herstellungsverfahren, das die Optimierung der fotokatalytischen Schichten bezüglich verschiedener Parameter (optimale Größe, enge Größenverteilung, Möglichkeit der einfachen Dotierung, Verhinderung der Agglomeration bei gleichzeitiger dauerhafter Immobilisierung) erlaubt. Diesbezüglich besonders aussichtsreich ist die Verwendung von hoch geordneten bakteriellen Hüllproteinen sogenannten „surface-layer“ (S-Layer)-Proteinen, die sowohl eine einfache Herstellung von fotokatalytisch aktiven Nanopartikeln aus verschiedenen Elementen erlauben, als auch zur Beschichtung verschiedener Materialien geeignet sind. Ein Ziel im Projekt ist die Herstellung von reinen und dotierten ZnO und TiO_2-Nanopartikeln zur Eliminierung von Diclofenac aus Wasser (siehe Abbildung 1). Dabei dienen S-Layer verschiedener Bakterien und damit Proteinschichten mit unterschiedlichen Symmetrien, Gitterabständen und Porengröße als Template für die Herstellung von Nanopartikeln verschiedener aber definierter Größe.

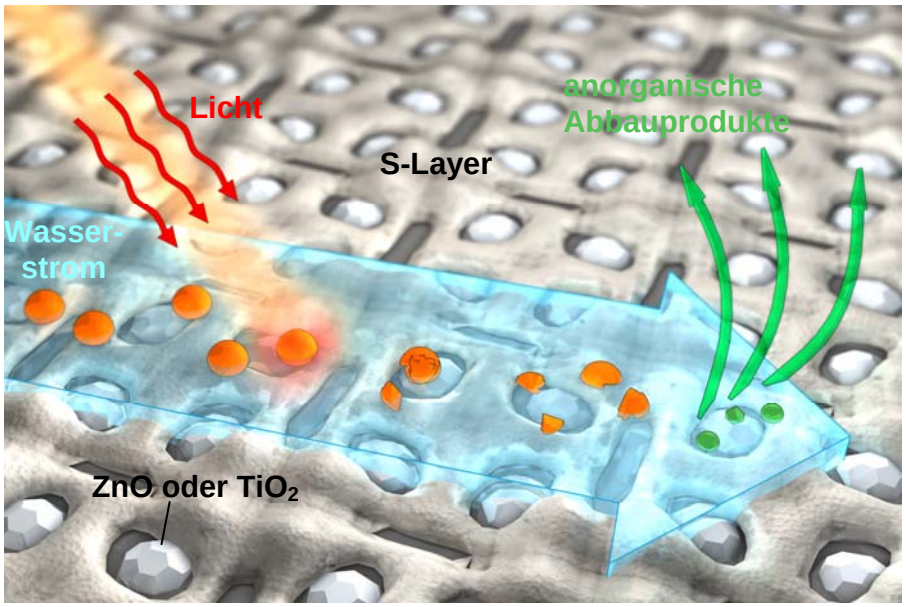


Abbildung 1: Photokatalytische Schichten zur Eliminierung von Wirkstoffen. Die Schichten bestehen aus S-Layer-Proteinen, die als Matrix für photokatalytisch aktive Nanopartikel verwendet werden und auf Trägern immobilisiert sind.

Darüber hinaus werden die S-Layer im Projekt als Trenn- und Immobilisierungsschicht für die erzeugten Nanopartikel genutzt. Letzteres vor allem zur Verhinderung einer Agglomeration und des Austrags der Nanopartikel, was beides einen Verlust der katalytischen Aktivität entsprechender Schichten bedeuten würde. Als Träger werden im Rahmen des Projekts verschiedene in technischen Anwendungen genutzte Materialien dahin gehend überprüft, in wie weit sich S-Layer darauf abscheiden lassen und stabile Schichten ausbilden und darauf aufbauend ein Trägermaterial für die Herstellung fotokatalytisch aktiver Beschichtungen ausgewählt. Gleichzeitig war es Ziel des Projektes, die Biomassegewinnung hinsichtlich eines Upscalings und hinsichtlich der Kosten zu optimieren.

Ausgehend von dieser konkreten wissenschaftlichen Fragestellung war es auch Ziel des Projektes, ein verwertungsorientiertes Netzwerk aufzubauen. Dies vor allem zur Sicherung der Fortentwicklung der neuen Materialien und der Weiterführung der begonnenen Arbeiten in dem konkreten Forschungsgebiet mit dem Ziel der Entwicklung eines marktreifen Produktes aber auch zur Etablierung einer dauerhaften Kooperation zwischen den verschiedenen Forschungs- und Industriepartnern. Diese Ziele sollten insbesondere über eine Vernetzung von Instituten innerhalb der Leibniz-Gemeinschaft, weiteren regionalen und überregionalen Forschungseinrichtungen sowie Industriepartnern erreicht werden. Die sehr gute gerätetechnische Ausstattung, die im vorliegenden Fall über die Projektmittel erreicht wurde, war nicht nur Voraussetzung zur Durchführung der geplanten Forschungs- und Entwicklungsarbeiten und zur Herstellung von Materialien im kleintechnischen Maßstab, sondern erhöhte auch die Attraktivität des Teams als Projektpartner weiter und nachhaltig. Erfahrungen aus dem Projekt und dem Prozess der Netzwerkbildung sollen insbesondere unter Einbeziehung der Geschäftsstelle der Leibniz-Gemeinschaft und von LeinbizX zur Entwicklung eines Prozessleitfadens für die Bildung von Verwertungs- und Transfernetzwerken innerhalb der Leibniz-Gemeinschaft genutzt werden.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Das Forschungsvorhaben wurde als Einzelvorhaben unter Einbeziehung zweier regionaler Industriepartner, namentlich die NAMOS GmbH und die UMEX GmbH, über Unteraufträge durchgeführt. Auf diese Weise war die gesamte notwendige Kompetenz und gerätetechnische Ausrüstung für die erfolgreiche Bearbeitung des sehr interdisziplinären Vorhabens verfügbar. Dies umfasst konkret die Beherrschung der S-Layer-Basistechnologie für die Herstellung von verschiedener fotokatalytisch aktiver Nanopartikel und Beschichtungen, (Institut für Radiochemie, IRC, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf), verschiedene Verfahren zur Herstellung funktioneller Schichten sowie Erfahrungen beim Upscaling der Biomasseproduktion (NAMOS GmbH) und die Kenntnis der notwendigen Eigenschaften von Materialien für technische Anwendungen, Bereitstellung geeigneter Lichtquellen und Versuchsanlagen für die experimentelle Testung hergestellter Materialien sowie langjährige Erfahrung im Anlagenbau (UMEX GmbH).

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Für die Bearbeitung des Vorhabens wurden folgende Teilaufgaben definiert und Arbeitspakete festgelegt.

AP 1 Synthese und Charakterisierung von S-Layer basierten ZnO-Partikeln
AP 1-1: Entwicklung und Optimierung von Syntheseverfahren für ZnO-Partikel
AP 1-2: Herstellung von dotierten S-Layer geträgerten ZnO-Partikeln
AP 1-3: Charaktersierung der Nanopartikel

AP 2: Beschichtung von Trägermaterialien mit S-Layer basierenden ZnO-Nanopartikeln
AP 2-1: Beschichtung verschiedener Trägermaterialien (Keramiken, Aluminiumoxid)
In Teilen als Unterauftrag an die NAMOS GmbH
AP 2-2: Synthese von ZnO-Partikeln auf S-Layer beschichteten Trägermaterialien

AP 3: Katalytische Tests
AP 3-1: Spaltung von Methylenblau als Schnelltest
AP 3-4: Abbau von organischen Verbindungen
AP 3-5: Fluoreszenzspektroskopie

AP 4: Vorbereitung einer Überführung der Nanokatalysatoren in eine technische Nutzung

AP5 : Prozessoptimierung
AP 5-1: Optimierung der Kultivierungsbedingungen
In Teilen als Unterauftrag an die NAMOS GmbH
AP 5-2: Prozessoptimierung für eine kontinuierliche Biomassegewinnung

Die wesentlichen vier Teilziele des Vorhabens waren die Synthese von fotokatalytisch aktiven Nanopartikeln, die Herstellung von fotokatalytisch aktiven Nanopartikeln auf S-Layer beschichteten Trägern, die Optimierung der Biomassegewinnung hinsichtlich der Produktionskosten für bakterielle S-Layer und der Aufbau eines Netzwerks aus F&E- und Industriepartnern zur Weiterführung der Arbeiten sowie zukünftige Kooperationen.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Dem Forschungsvorhaben lagen Arbeiten des Antragstellers zur Wechselwirkung verschiedener Metalle mit bakteriellen S-Layern, der Herstellung verschiedener Nanopartikel unter Verwendung von bakteriellen S-Layern und Immobilisierungsmethoden zur Herstellung von Biokomposit-materialien zu Grunde. Ein umfassender Überblick über die mit dem Vorhaben relevante Fach-literatur ist im Projektantrag vorgelegt worden. Über weitere während der Projektarbeit wesentliche Arbeiten wurde in mehreren Proceeding-Beiträgen von Konferenzen und Tagungen berichtet (1) Raff, J., Marquard, A., Günther, T., Pollmann, K. (2008) Multifunctional biocomposite layers for the elimination of pharmaceutical residues in water. Proceedings of the Bremer Colloquium 2008 on Product integrated Water and Waste Water Technology, 22. to 23. September 2008, Bremen; 2) Pollmann, K.; Raff, J.; Fahmy, K.; von Ny; Grenzer, J.; Herrmansdörfer, T. (2008) Bacterial surface layers (S-layers) as building blocks for nanocomposites. Proceeding of Nanofair 2008, 11.-12.03.2008, Dresden, Germany; 3) Pollmann, K., Raff, J., Günther, T. and Fahmy, K. (2009) Bacterial surface layers proteins: self-organizing biomolecules as building blocks for nanostructured materials. Proceedings of the Eleventh Vietnamese-German Seminar on Physics and Engineering, Nha Trang City, from March, 31, to April, 5, 2008)

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Die Arbeiten des Forschungsvorhabens wurden über zwei Unteraufträge an die NAMOS GmbH hinsichtlich des Arbeitspakets 2 „Beschichtung von Trägermaterialien mit S-Layer basierenden ZnO-Nanopartikeln“ und des Arbeitspakets AP 5-1 „Optimierung der Kultivierungsbedingungen“ sowie an die UMEX GmbH hinsichtlich des Arbeitspakets AP 4 „Vorbereitung einer Überführung der Nanokatalysatoren in eine technische Nutzung“ und durch die Anfertigung eines geeigneten Fotoreaktors zur Testung der fotokatalytischen Aktivität der hergestellten Materialien unter quasi Tageslicht (Tageslicht-ähnliche Strahlungsquelle) unterstützt.

II . Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und erzielte Ergebnisse in Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

AP 1: Synthese und Charakterisierung von S-Layer basierten ZnO-Partikeln

In den Arbeitspunkten AP 1-1 bis 1-3 wurden zur Optimierung der Nanopartikel Herstellung verschiedene Variationen der Ausfällung untersucht. Dabei wurden sowohl Nanopartikel als auch S-Layer geträgerte Nanopartikel verglichen. Deutlich tritt hierbei der Einfluss der S-Layer auf die Größe der gebildeten Nanopartikel hervor. Neben den ZnO-Partikeln wurden auch Untersuchungen mit TiO_2 durchgeführt, wobei hier wiederum der Durchmesser der S-Layer geträgerten Partikel etwas kleiner ausfiel als ohne Proteine. Im Folgenden werden Herstellungsmethoden bzw. Optimierungen beschrieben, die zu einer deutliche Steigerung der hergestellten Katalysatoren führten. Damit wurden die Aufgaben des AP 1 erfolgreich bearbeitet.

AP 1-1 bis 1-3: Entwicklung und Optimierung von dotierten und nicht dotierten Partikeln und deren Charakterisierung

<u>Versuche mit ZnO</u>

Herstellung von ZnO – Nanopartikeln durch Titration mit Ammoniak

Die ZnO – Nanopartikel wurden mittels Zugabe von Ammoniak aus einer $ZnCl_2$-Lösung ausgefällt. Die Menge des zugegebenen Ammoniaks wurde dabei variiert. Diese Versuche erfolgten sowohl mit als auch ohne S-Layer-Proteine. Um eine Dehydratisierung des ausgefällten $Zn(OH)_2$ zu erreichen, wurde das Präzipitat dialysiert oder thermisch behandelt.

Analyse der Partikel mit ICP-MS und XRD

Die Analyse der Zn-Phasen mittels XRD zeigt eine Bildung von ZnO ohne nennenswerte Nebenprodukte. Die Abbildungen 2 und 3 zeigen die XRD Spektren der erzeugten Nanopartikel ohne (Abbildung 2) und mit (Abbildung 3) S-Layer-Proteinen. Vergleichbare Ergebnisse zeigten Proben die zur Dehydratisierung thermisch behandelt wurden (verschiedene Temperaturen, 30 min).

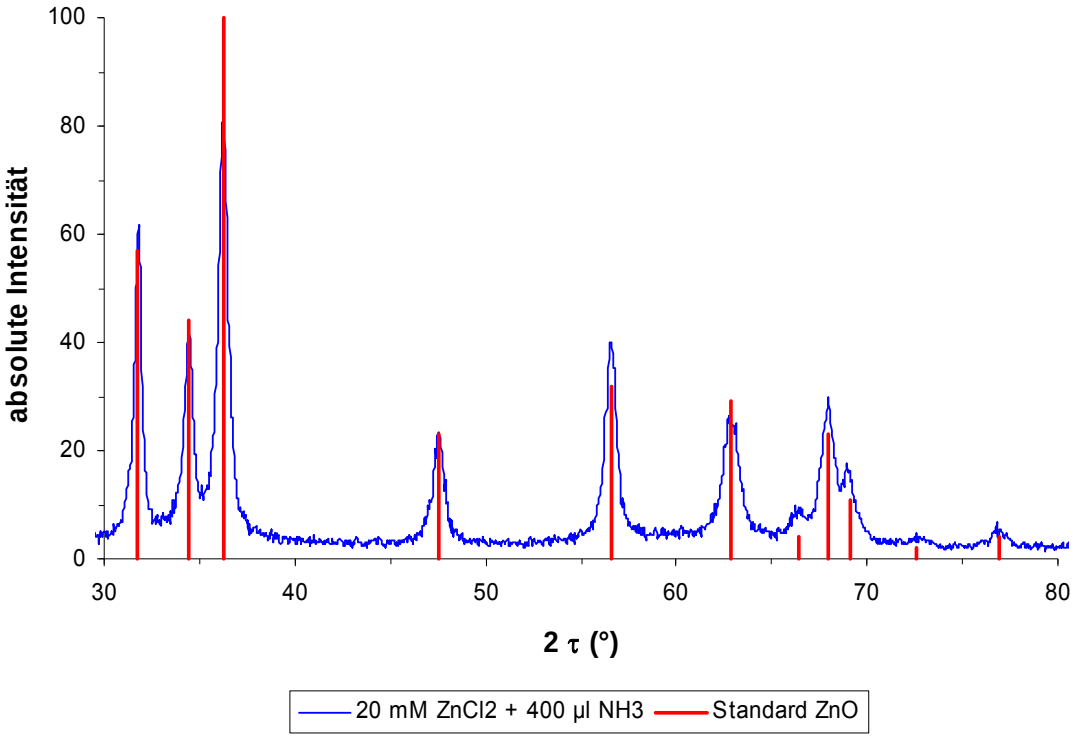


Abbildung 2: XRD – Pattern für ZnO, Ausfällung von 20 mM $ZnCl_2$ mit 400 µl 25 % NH_3

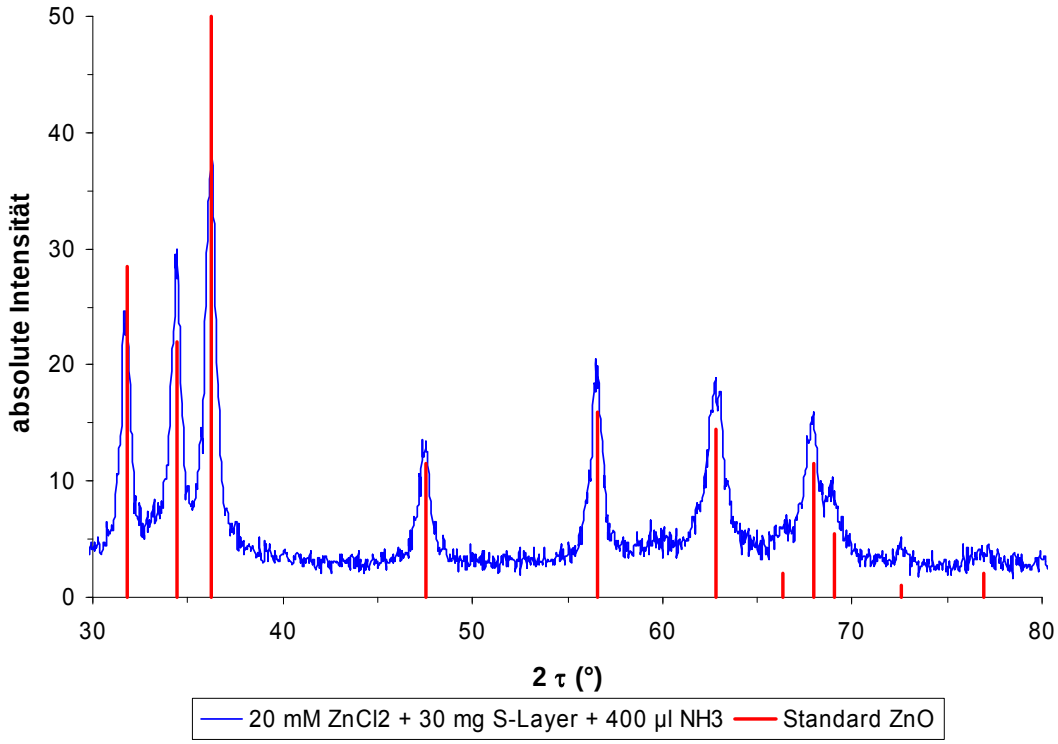


Abbildung 3: XRD – Pattern für ZnO, Ausfällung von 20 mM $ZnCl_2$ auf 30 mg S-Layer

Die durchschnittliche Größe der gebildeten Nanopartikel verringerte sich in allen Proben mit steigender Menge zugegebenen Ammoniaks. Die S-Layer geträgerten Partikel waren generell kleiner als die frei in Lösung gebildeten. Es stellte sich folgender Zusammenhang dar:

- Ohne Zugabe von S-Layer nahm die Partikelgröße der ZnO – Nanopartikel von 23,3 ± 4,6 nm für 150 µl Ammoniak auf 14,2 ± 1,1 nm für 400 µl Ammoniak ab. (Bei einer Menge von 20 mM $ZnCl_2$)
- Die Partikelgröße des ZnO gebunden an S-Layer lag für 150 µl NH_3 bei 14 ± 1,5 nm und für 400 µl NH_3 bei 12,5± 2 nm.(Bei einer Menge von 20 mM $ZnCl_2$)

Das für Vergleichsversuche verwendete ZnO Nanopulver (Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) beinhaltete 50 – 70 nm große Partikel.

Die Ausbeute des gebildeten ZnO wurde über ICP-MS ermittelt und nahm mit steigender Menge Ammoniak zu. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 4 dargestellt.

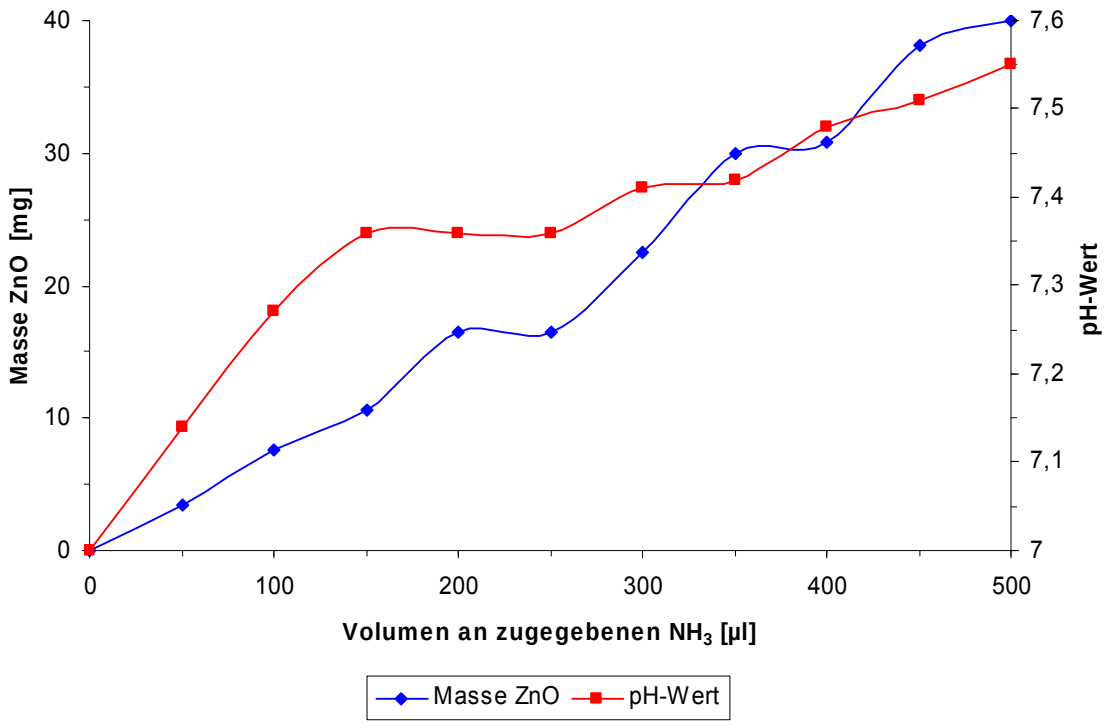


Abbildung 4: Einfluss des Volumens an Ammoniak auf pH-Wert sowie Masse an ausgefälltem Zinkoxid (aus 50 ml 20 mM $ZnCl_2$)

Die Analyse der erzeugten Partikel mittels ICP-MS erbrachte Aussagen zur Zusammensetzung der Partikel sowie zur Ausbeute der Reaktion. Diese Ergebnisse sind zusammen mit Angabe der Partikelgröße in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der relevanten ZnO Nanopartikelchargen mit und ohne S-Layer

50 ml, 20 mM $ZnCl_2$ --> Startmasse Zn 65,39 mg					
Volumen NH_3 [µl]	Masse S-Layer [mg]	Partikelgröße [nm]	Ausbeute Zn [mg]	Ausbeute Zn [%]	Ausbeute ZnO [mg]
150	0	23,3 ± 4,6	10,17	15,5	12,66
400	0	14,2 ± 1,1	24,75	37,8	30,8
150	30	14,3 ± 1,5	16,80	25,7	20,91
400	10	11,9 ± 2,1	14,16	21,7	17,62
400 (70 °C)	10	12,5	25,71	39,3	32,0

Versuche mit TiO_2

Titandioxid kommt in drei verschiedenen Modifikationen vor. Die photokatalytisch aktivste Form ist Anatas. Daher wurde bei der Herstellung von TiO_2 Versuchsreihen mit variablen pH-Werten durchgeführt, um einen möglichst hohen Gehalt an Anatas zu erhalten. Nach Abschluss dieser Versuchsreihe wurde die optimale Dauer der thermischen Behandlung ermittelt.

Herstellung von TiO_2 – Nanopartikeln durch Titration mit NaOH

Die Herstellung von TiO_2-Nanopartikeln erfolgt durch Ausfällung mit NaOH aus 0,5 M $TiCl_4$ in 3 M HCl. Es wurden jeweils Ansätze mit und ohne S-Layer-Proteine hergestellt, um den Einfluss der Proteine zu untersuchen. Die pH-Werte der verschiedenen Versuchsansätze wurden in der ersten Versuchsreihe für Proben ohne S-Layer-Proteine zwischen 4 und 7 eingestellt. Für S-Layer zwischen 5 und 7, wobei die Zugabe der S-Layer bei pH 4,5 erfolgte. Daran schloss sich die Temperierung der Proben an, die in der zweiten Versuchsreihe zwischen ein und sieben Tagen variiert wurde. Der Endpunkt der Titration für Proben ohne S-Layer wurde zwischen pH 6 und 6,5 ermittelt. Für Proben mit S-Layer-Proteinen lag dieser Endpunkt bereits bei pH 5.

Analyse der Partikel mit ICP-MS und XRD

Für die Analyse der TiO_2-Spezies mittels XRD wurden die Präparationen Ausfällung TiO_2 bei pH 5 (Abbildung 5) und 7 mit Zugabe von S-Layer von JG-A 12 und bei pH 4, 5,5 (Abbildung 6) und 7 ohne Zugabe von S-Layer ausgewählt. Die Analyse zeigte, dass bei allen untersuchten Proben nur TiO_2 gebildet wurde. Hauptsächlich bildete sich Anatas sowie im geringerem Maße Brookit.

Die Berechnung der Partikelgrößen anhand der XRD-Spektren zeigen eine unveränderte Partikelgröße bei den S-Layer geträgerten TiO_2-Partikeln von bei 7 ± 0,2 nm unabhängig vom pH Wert. Ohne S-Layer ein Anstieg der Partikelgröße von 7 nm auf 10 nm bei pH-Werten von pH 4 auf pH 7.

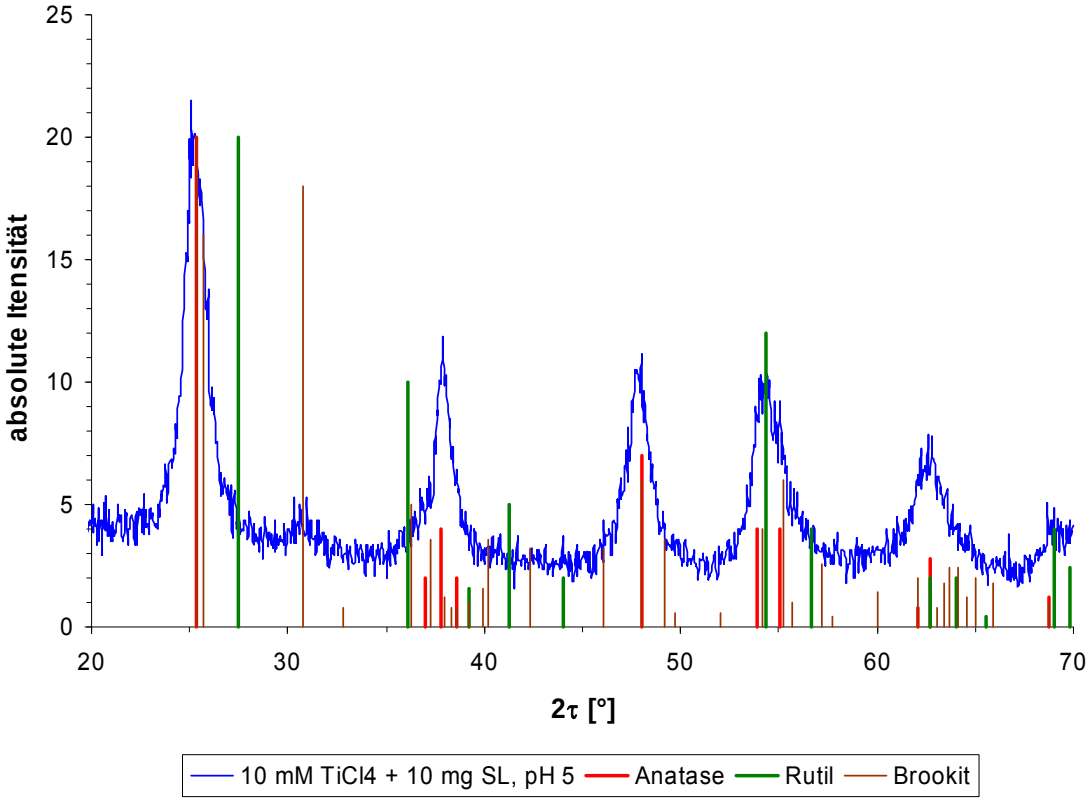


Abbildung 5: XRD-Spektrum für TiO_2 nach Ausfällung von 10 mM TiCl4 auf 10 mg S-Layer von JG-A 12 mit NaOH bei pH 5

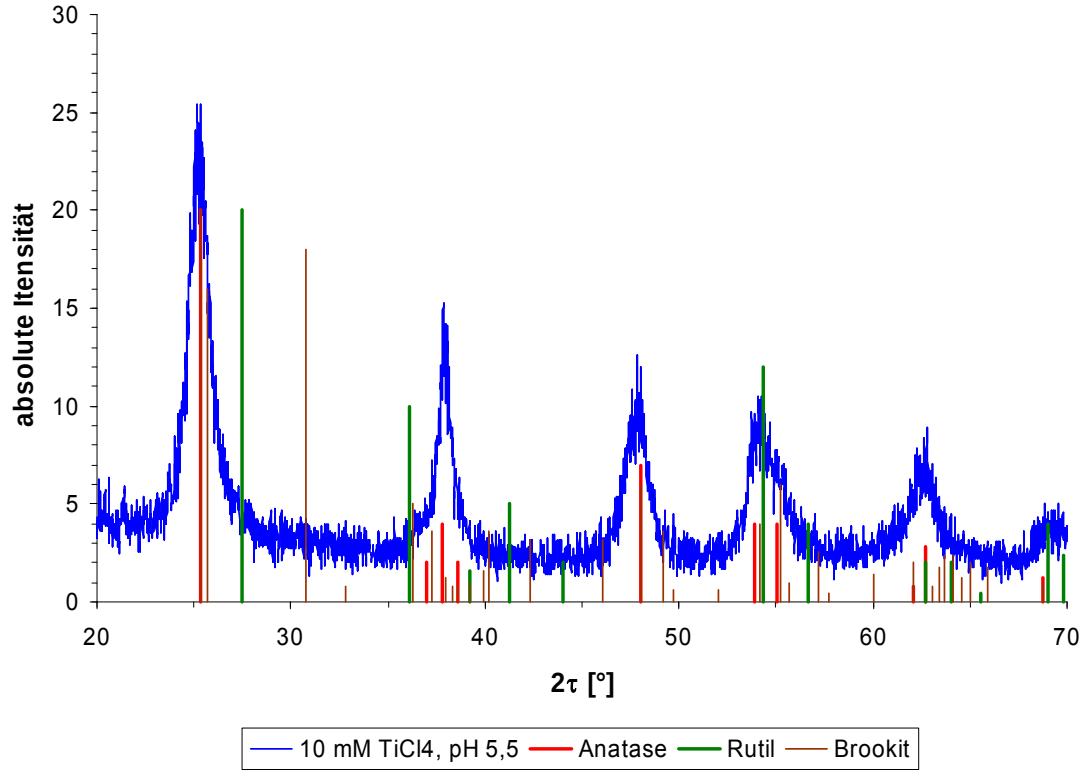


Abbildung 6: XRD-Spektrum für TiO_2 nach Ausfällung von 10 mM TiCl4 auf mit NaOH bei pH 5,5

Die Analyse der erzeugten Partikel mittels ICP-MS erbrachte Aussagen zur Zusammensetzung der Partikel sowie zur Ausbeute der Reaktion. Diese Ergebnisse sind zusammen mit Angabe der Partikelgröße in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Übersicht der hergestellten TiO_2 Nanopartikelchargen mit und ohne S-Layer

10 mM $TiCl_4$ gelöst in 3 M HCl in 50 ml, Startmasse Ti 23,94 mg						
pH-Wert Ausfällung	Masse S-Layer [mg]	Zeit therm. [d]	Partikelgröße [nm]	Ausbeute Ti [mg]	Ausbeute Ti [%]	Ausbeute TiO_2 [mg]
4	0	3	7,17 ± 0,04	5,34	37,2	8,91
4,5	0	3		5,59	39,0	9,33
5	0	3		7,43	51,8	12,39
5,5	0	3	9,10 ± 0,24	5,03	35,1	8,40
6	0	3		4,28	29,9	7,15
6,5	0	3		3,46	24,1	5,78
7	0	3	8,74 ± 1,01	7,64	53,3	12,75
5	10	3	7,19 ± 0,03	8,19	57,1	13,66
5,5	10	3		9,57	66,7	15,97
6	10	3		12,10	84,3	20,19
6,5	10	3		12,68	88,4	21,15
7	10	3	6,86 ± 0,04	(15,37)	(107,1)	(25,65)
5	10	1		10,01	41,8	16,71
5	10	3		15,69	65,5	26,17
5	10	7		18,91	79,0	31,55
6,25	0	1		21,12	88,2	35,24
6,25	0	3		22,16	92,6	36,97
6,25	0	7		21,10	88,1	35,20
7,35	0	1		21,85	91,3	36,45
7,35	0	3		19,94	83,3	33,27
7,35	0	7		12,63	52,3	21,07

Versuche mit dotierten, S-Layer geträgerten Nanopartikeln

TiZnO

Die Herstellung Zink dotierter Titandioxid Nanopartikel erfolgte bisher in drei Variationen. Dabei wurde in einem ersten Versuch eine Charge auf S-Layer ausgefällte ZnO-Partikel in eine $TiCl_4$-Lösung (pH 1,5) gegeben, mit NaOH bis pH 5 titriert und anschließend dialysiert und temperiert. In einem zweiten und dritten Ansatz wurden gleiche Mengen $ZnCl_2$ und $TiCl_4$ in 3 M HCl eingesetzt. Nach der Zugabe von NaOH bis pH 4 erfolgte die Zugabe von S-Layer-Proteinen und eine anschließende thermische Behandlung. Ein Ansatz wurde zusätzlich dialysiert.

Die Analyse der erzeugten Materialien erfolgte mit ICP-MS. Die Ergebnisse der Analyse sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 3: Elementgehalte der TiZnO Nanopartikelchargen

Ansatz	Stoffmengengehalt Ti [%]	Stoffmengengehalt Zn [%]	Ausbeute Zn [%]
TiZnO A	95,5	4,5	73,8
TiZnO B	96,6	3,4	4,2
TiZnO C	96,0	4,0	5,2

ZnCeO

Die CeZnO – Nanopartikel wurden mittels Zugabe von Ammoniak aus einer $CeCl_3$-$ZnCl_2$-Lösung ausgefällt. Dabei wurden $CeCl_3$ und $ZnCl_2$ im molaren Verhältnis 1:4 eingesetzt. Um eine Dehydratisierung zu erreichen, wurde das Präzipitat dialysiert und thermisch behandelt. Das Präzipitat wurde mittels ICP-MS analysiert. Dabei ergaben sich Konzentrationen von 1,45 g/l Zn und 0,29 g/l Ce, was einem molaren Verhältnis von Zn / Ce von rund 5:1 entspricht. Die hergestellten Nanopartikel wurden in fotokatalytischen Versuchen eingesetzt. Ergebnisse und Auswertungen dazu finden sich unter AP 3-2.

AP 2: Beschichtung von Trägermaterialien mit S-Layer basierenden ZnO-Nanopartikeln

Untersuchungen zur Immobilisierung von S-Layer geträgerten Nanopartikel auf verschiedenen Trägermaterialien (z.B. Mineralien, Keramiken, Zeolithe, Aluminiumoxid) wurden in den AP 2-1 und AP 2-2 durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass das Trägermaterial die katalytische Aktivität der Nanopartikel beeinflusst und dass die Beschichtung von Trägermaterialien mit Polyelektrolyten zu einer Verbesserung der Immobilisierung von S-Layern beiträgt. Die Schwerpunkte des AP 2 wurden gemeinsam mit der NAMOS GmbH erfolgreich bearbeitet.

AP 2-1: Beschichtung verschiedener Trägermaterialien (Keramiken, Aluminiumoxid) mit S-Layer Proteinen

<u>2-1.1 Unterauftrag an die NAMOS GmbH: Herstellung von Beschichtung zur einfachen Immobilisierung von S-Layern</u>

In diesem Arbeitspaket wurden verschiedenartige Trägermaterialien mit Hydroxylapatit beschichtet. Die auf diese Weise erhaltenen Trägermaterialien wurden in ersten Versuchen hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität und Lichtdurchlässigkeit getestet.

Für einen effizienten photokatalytischen Prozess und eine gleich bleibend hohe Mineralisierungsrate ist die Verfügbarkeit bzw. das Vorhandensein der Nanopartikel im Prozess eine wichtige Voraussetzung. Zur Verhinderung des Austrags der Nanopartikel kann eine Immobilisierung der Nanopartikel beitragen. Insbesondere die kontinuierliche Nutzung der Photoreaktoren mit ZnO-Nanopartikeln als Katalysator kann ausschließlich auf diese Weise wirtschaftlich gestaltet werden. Für die Bindung von unterschiedlichsten Nanopartikeln an Oberflächen können verschiedene Verfahrenskonzepte genutzt werden, wie in der Abbildung 7 dargestellt ist.

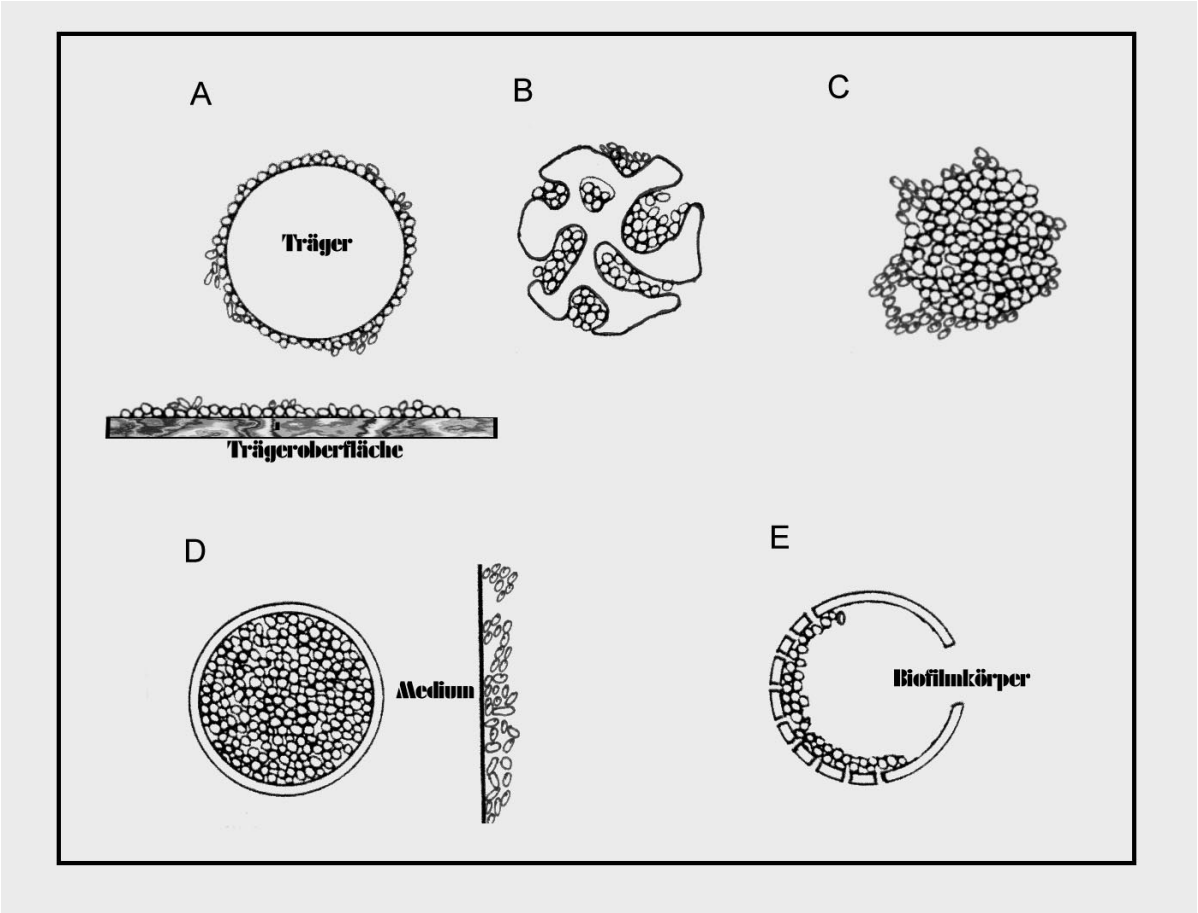


Abbildung 7: Prinzipien der Immobilisierung von Nanopartikeln
A - Oberflächenimmobilisierung
B - Immobilisierung in porösen Matrices
C - Aggregatbildung durch Vernetzung
D - Einschlussimmobilisierung durch Barrieren
E- Hydromechanische Rückhaltung

Für die vorgesehene Verwendung der Immobilisate erscheint eine Anbindung der Nanopartikel an die Trägeroberfläche vorteilhaft. Um die Anbindung auf den Trägeroberflächen zu beschleunigen, soll an der Oberfläche eine dünne Schicht aus biokompatiblen Substanzen abgeschieden werden. Dadurch wird die Benetzbarkeit der Oberflächen verändert und die Nanopartikel können sich besser anheften. Neben Calciumcarbonaten und Kieselsäure, die vorwiegend als Skelettsubstanz in Lebewesen (Schale, Panzer etc.) anzutreffen sind, gehören die Calciumphosphate zu den am häufigsten auftretenden Biomineralien auf der Erde. Die für die Anwendung bioaktiver Schichten wesentlichen Calciumphosphat-Phasen sind in Tabelle 3 dargestellt. Das Ca/P-Verhältnis ist ein wichtiges Kriterium bei der Unterscheidung der Calciumphosphate. Je kleiner es ist, desto saurer und besser wasserlöslich ist das entsprechende Calciumphosphat. Die Löslichkeit ist generell vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig.

Tabelle 3: Eigenschaften der biologisch relevanten Calciumphosphate (Epple, 2003).

Verbindung Formel	Molares Ca/PVerhälnis	Löslichkeit bei 25 °C, -log(Ksp)	Dicalciumphosphat-Anhydrat
(DCPA, Monetit)	$CaHPO_4$	1.0	6.90
Dicalciumphosphat-Dihydrat (DCPD, Bruschit)	$CaHPO_4 \cdot 2\ H_2O$	1.0	6.59
Octacalciumphosphat (OCP)	$Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5\ H_2O$	1.33	96.6
α -Tricalciumphosphat (α-TCP)	α $-Ca_3(PO_4)_2$	1.5	25.5
β-Tricalciumphosphat (β -TCP)	β $-Ca_3(PO_4)_2$	1.5	28.9
Amorphes Calciumphosphat (ACP)	$Ca_2(PO_4)_y \cdot_n H_2O$	1.2 - 2.5	ca. 25…33
Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (CDHA)	$Ca_{10-x}(HPO_4)x(PO_4)_{6-x}(OH)2-x$ (0<x<1)	1.5 - 1.67	ca. 85
Hydroxylapatit (HAP)	$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	1.67	116.8
Tetracalciumphosphat (TTCP)	$Ca_4(PO_4)_2$	O 2.0	38-44

In den Versuchen wurde Hydroxylapatit als bindungsvermittelnde Schicht eingesetzt. Stöchiometrisches Hydroxylapatit der Formel $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ist das stabilste und das am schlechtesten wasserlösliche Calciumphosphat. Es weist frei austauschbare Hydroxyl-Ionen auf. HAP neigt folglich zur Nichtstöchiometrie. Aufgrund der flexiblen Gitterstruktur der Ionenplätze (Calcium, Phosphat, Hydroxid) des Hydroxylapatits ist es möglich, dass andere Ionen (Na, K, Mg, Sr für Ca; Carbonat für Phosphat; Fluorid, Chlorid, Carbonat für Hydroxid) darin eingebaut werden. Zudem können Hydrogenphosphat-Ionen (HPO_4^{2-}) ins Gitter integriert werden.

Hydroxylapatit kristallisiert bevorzugt in Form von Nadeln bzw. kurzen bis langen Prismen aus (siehe Abbildung 8). Die HAP-Abscheidung aus wässriger Lösung wird durch erhöhte Temperaturen und einen erhöhten pH-Wert begünstigt. Dabei entsteht in erster Linie Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (CDHA). Dieser enthält vor allem Hydrogenphosphat-Ionen, wodurch das molare Ca/P-Verhältnis im Vergleich zum stöchiometrisch reinen Hydroxylapatit unter 1.67 gesenkt wird (Epple M. 2003. Biomaterialien und Biomineralisation - Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Stuttgart; Leipzig; Wiesbaden: Teubner-Verlag. 161 p.; Wintermantel E., Ha S.-W. 2002. Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren. Berlin: Springer-Verlag. 679 p.).

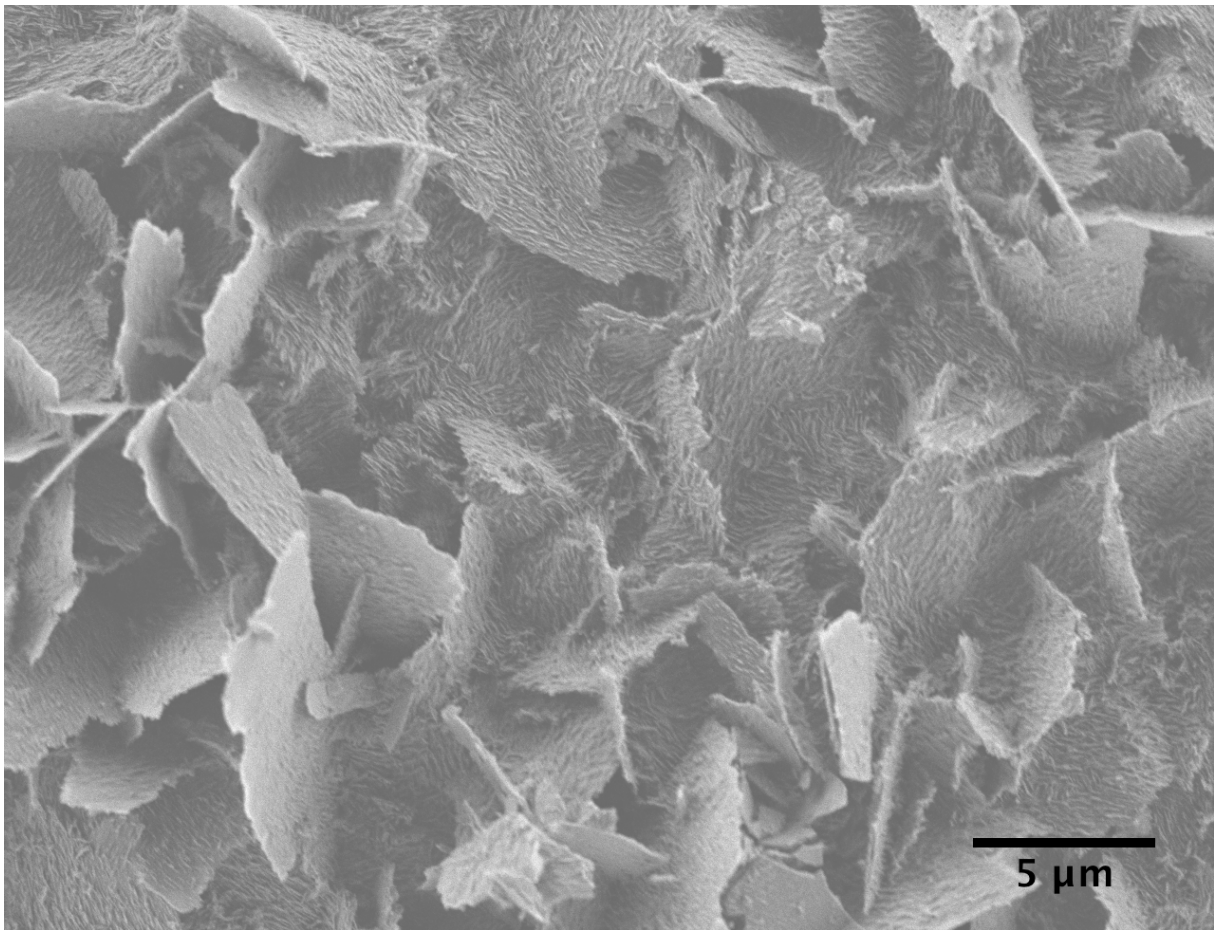


Abbildung 8: REM-Aufnahme Hydroxylapatit-Beschichtung, NAMOS *GmbH.*

Das HAP wurde an Oberflächen aus gesättigter bzw. übersättigter wässriger Lösung abgeschieden. Die zu beschichtende Oberfläche unterliegt dabei keinen gravierenden chemischen oder thermischen Umbauprozessen wie es beispielsweise beim Plasmaspray-Verfahren der Fall ist. Die zu beschichtende Probenoberfläche fungiert als Kristallisationszentrum, an der die heterogene Keimbildung der chemischen Kristallisation eingeleitet wird. Die Abscheidung erfolgte mit Hilfe der in Abbildung 9 dargestellten Beschichtungsanlage. Die bei NAMOS vorhandene Versuchsanlage arbeitet programmgesteuert und kann zur bioaktiven Beschichtung von Werkstücken verschiedener Geometrien eingesetzt werden.

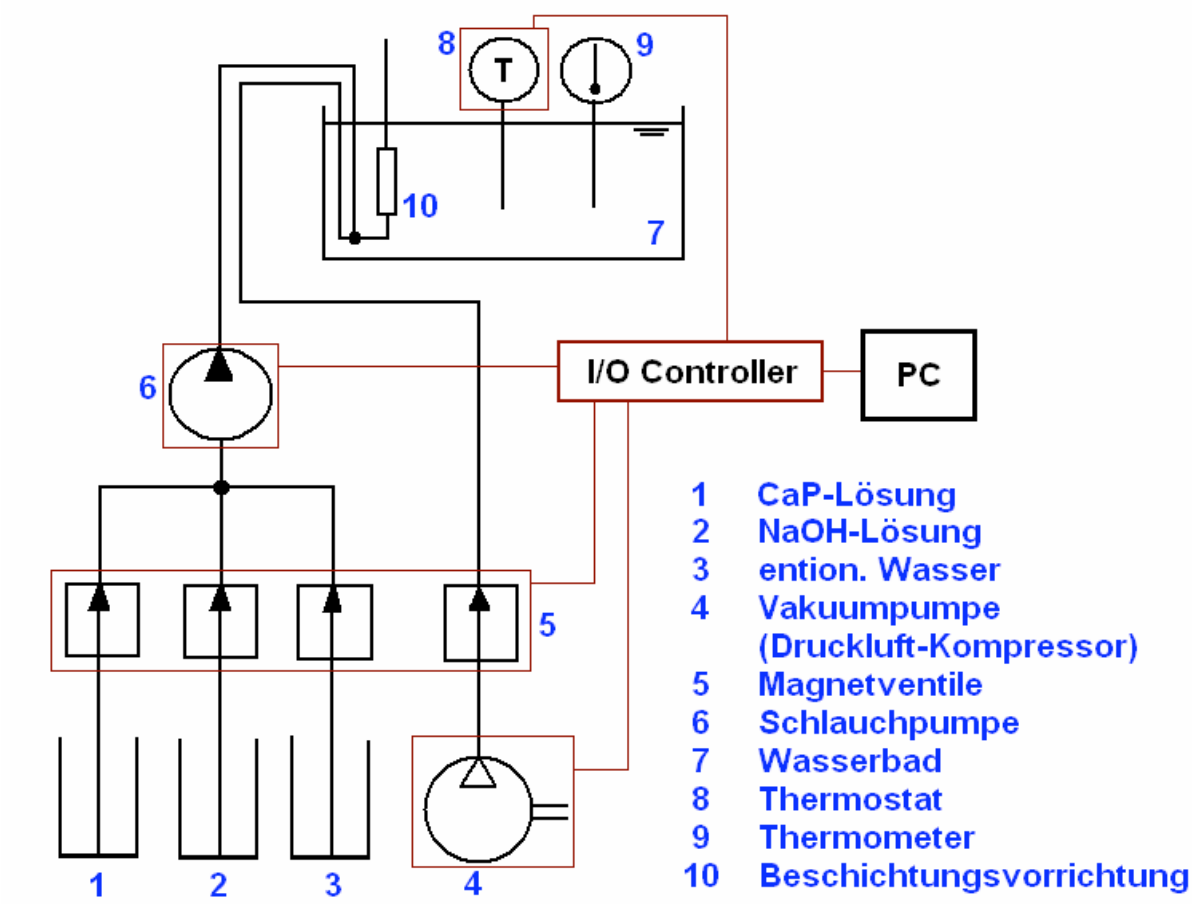


Abbildung 9: Aufbau Beschichtungsanlage

Der Versuchsstand gliedert sich in verschiedene Einzelkomponenten. Aus den drei Vorratsbehältern mit den verschiedenen Medien (CaP, NaOH, entionisiertes Wasser) und einer Vakuumpumpe verlaufen Schlauchverbindungen zu Magnetventilen. Gesteuert werden diese Ventile über einen I/O Controller, der über einen seriellen Anschluss mit einem PC verbunden ist. Der Controller wird über eine Terminal G-A-Software angesprochen. Mit dieser werden Quelltexte für die erforderlichen Programmabläufe erstellt und abgerufen. An einer Kopplungsstelle werden die Schlauchleitungen der einzelnen Medien (CaP, NaOH und entionisiertes Wasser) vereint und mit Hilfe der Schlauchpumpe über einen Hauptschlauch weiter befördert. Eine Vakuumpumpe dient der Zwischentrocknung der Probe und Medienverdrängung aus der Beschichtungsvorrichtung während des Beschichtungsprozesses.

Der Hauptschlauch mit Beschichtungsvorrichtung wurde in ein temperiertes Wasserbad geführt, um die zuströmenden Medien und den Luftstrom zu erwärmen. Erhöhte Temperaturen beeinflussen erfahrungsgemäß die Ausfällung von HAP-Kristallen positiv.

Die HAP-Abscheidung im NAMOS-Prozess erfolgt in einem alternierenden Beschichtungsregime. Einer Aktivierungs-Phase im basischen Milieu folgt jeweils eine Inkubation mit einer stabilen CaP-Lösung. Durch gezielte Einstellung der Umgebungsbedingungen wird erreicht, dass Hydroxylapatit lediglich auf Oberflächen abgeschieden wird, nicht aber homogen in Lösung ausfällt. Zusammen

mit diversen Spül- und Reinigungsschritten wird erreicht, dass nach und nach eine dichte und feste Schicht Hydroxylapatit entsteht.
Unterschiedliche Beschichtungsergebnisse werden durch die Variierung der folgenden Parameter erreicht:

- Erstaktivierungsdauer
- Zyklenanzahl
- Einwirkzeit des Mediums während des Beschichtungsvorganges
- Anzahl der Proben im Schlauch/Trichter
- Temperatur des Wasserbades

Im Verlauf des Projektes wurden sehr unterschiedliche Proben verarbeitet. Neben dem Material ist im Allgemeinen die Geometrie und Oberflächenbeschaffenheit des zu beschichtenden Werkstücks (Rundungen, Ecken und Kanten etc.) für die Beschichtungsqualität maßgebend. An Kanten wird die Dicke einer bioaktiven HAP-Beschichtung verringert und es kann leichter zu Abplatzungen kommen. Je nach Beschichtungs-Programm kann die Haftfestigkeit einer aufgebrachten Calcium-phosphatschicht darüber hinaus auch von der Rauheit des Trägermaterials abhängig sein, wobei die Festigkeitsunterschiede insbesondere durch homogen in Lösung ausgefälltes Hydroxylapatit entstehen.
Beschichtet wurden folgende Proben:

- Edelstahl-Sinterronden (FeCrAl) als Positivkontrolle
- Aluminiumoxid
- Tonkugeln
- Tongranulat
- Glasschaum
- Glasperlen
- Siliziumwafer
- Silikonschlauch

Die Bewertung der Beschichtungsqualität erfolgte aufgrund der Inhomogenität der Proben unter Mehrfachmessung mit einem FTIR der Firma Bruker und einer Analyse-Software „OPUS“.
Für den Nachweis von Hydroxylapatit wichtige Peaks finden sich im Fingerprintbereich um 562, 605 und 874 nm (Schwankungsbreite idR. ±5 nm). Der Nachweis dieser Peaks konnten bei allen untersuchten Proben erbracht werden. Eine weitere Auswertung der Spektren war nur begrenzt möglich. Es wurde jedoch getestet, ob ein quantitativer Vergleich der Beschichtungen möglich ist. Dafür werden die FTIR Spektren werden als Datenpunkttabelle gespeichert und einer externen Fitting-Software an einen vorbereiteten Satz Gauss-Glockenkurven angepasst.
Entsprechende Untersuchungen zur Abschätzung er Hydroxylapatit-Mengen mit den hier behandelten Proben-Materialien waren allerdings nicht erfolgreich. Die Kurvenauswertung war nur dann

anwendbar, wenn die HAP-Peaks sehr stark ausgeprägt sind, wie im Fall der als Positivkontrolle mitgeführten Edelstahl-Faserronden. Die entsprechenden Versuche dazu wurden eingestellt.
Bei den Versuchen zur Beschichtung der verschieden Materialien mit Hydroxylapatit wurde festgestellt, dass ein wichtiger Parameter für den Erfolg der Abscheidung von HAP die Erstaktivierung mit NaOH ist. Deswegen wurde untersucht, unter welchen Bedingungen (Molarität, Inkubationszeit) die Erstaktivierung der diversen Proben durchzuführen ist. Dabei wurde auf Änderungen der Oberflächenbeschaffenheit sowie der Masse geachtet. In der Tabelle 4 sind die prozentualen Änderungen der Masse der Trägermaterialien dargestellt. Aus den Daten wird ersichtlich, dass hauptsächlich Aluminiumoxid, Tongranulat, Silikonschlauch und Glasschaum einem besonders starken Einfluss unterliegen. Im weiteren Verlauf wurden für diese Materialien die Bedingungen zur Erstaktivierung abgeschwächt.

Tabelle 4: Massendifferenz der Trägermaterialien vor und nach der Erstbehandlung in %.

	2 M NaOH		**5 M NaOH**	
	1h	**24h**	**1h**	**24h**
Aluminiumoxid	-5,1%	-16,6%	-4,3%	-28,7%
Tongranulat	-0,2%	-1,7%	-0,3%	-2,7%
Tonkugeln	-0,2%	-0,1%	-0,2%	-1,0%
Glasperlen	-4,5%	-0,3%	0,1%	-0,1%
Silikonschlauch	-1,1%	-0,3%	-0,8%	-0,3%
Glasschaum	-0,2%	-0,8%	-0,9%	-1,3%

Die Ergebnisse des Beschichtungsvorgangs werden im Folgenden ausführlicher dargestellt. Einige Proben weisen eine bedeutend besser beschichtete Vorderseite (in Durchströmrichtung) als es bei der Rückseite der Fall ist. In diesen Fällen ist während der Beschichtung der CaP-Zulauf teilweise bereits vor der Probe ausgefallen. Der Niederschlag wurde dann zusammen mit den heterogenen Abscheidungen an der Probe abgelagert. Dieses Problem wurde in späteren Beschichtungen durch Umbau der Anlage (Einbau von Filtern, anderes Design der Medium-Zuführungen) weitestgehend behoben.
Prinzipiell konnten alle untersuchten Proben mit Hydroxylapatit beschichtet werden; sie weisen alle die entsprechenden Fingerprint-Peaks auf. Außer dem Aluminiumoxid und den Siliziumwafern wurden alle Proben mit einem High-Flowrate-Programm und 15 Zyklen beschichtet.
Die **Sinterronden** lassen sich aufgrund der offenporigen Struktur hervorragend mit HAP beschichten. Aus diesem Grund wurden entsprechende Proben als Referenzen mitgeführt. Sie weisen eine homogene weiße Beschichtung auf und lasen sich mittels FTIR sehr gut auswerten.

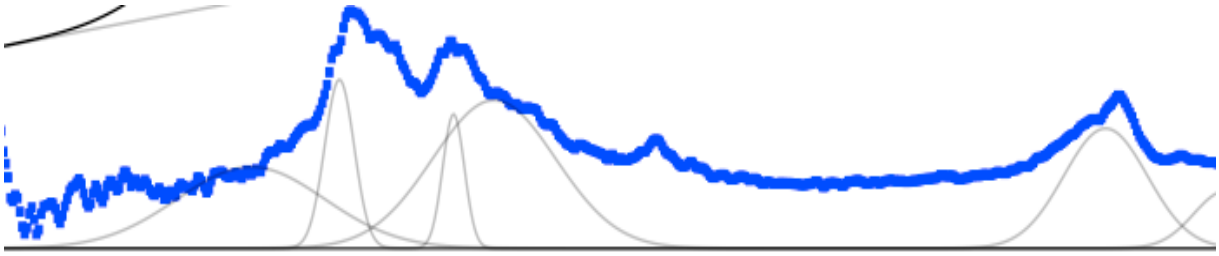


Abbildung 10: Sintermetall. Peaks im Fingerprintbereich um 562, 605 und 874 nm

Bei **Aluminiumoxid** kann angenommen werden, dass eine HAP-Beschichtung möglich ist. Jedoch ist eine Auswertung am FTIR sehr problematisch. Eine makroskopische Einschätzung der Schicht ist ebenfalls nicht möglich; die HAP-Schicht bietet keinerlei Materialkontrast zum ebenfalls weißen Grundmaterial. Die Beschichtung der Aluminiumoxid-Kugeln erfolgte mit einem frühen Low-Flowrate-Programm mit 15 Zyklen.

Auf **Tonkugeln** konnten die charakteristischen HAP-Peaks am FTIR eindeutig nachgewiesen werden. Jedoch war aufgrund der inhomogenen Oberflächenstruktur das Hintergrundrauschen sehr stark.

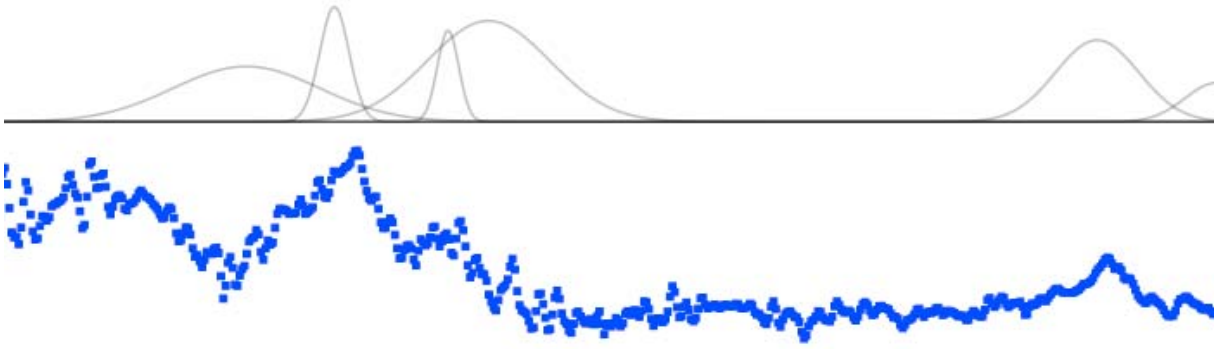


Abbildung 11: Tonkugeln. Peaks im Fingerprintbereich um 562, 605 und 874 nm

Aufgrund des sehr starken Hintergrundrauschens konnte auf **Tongranulat** im Gegensatz zu den Tonkugeln kein HAP-Nachweis durch FTIR-Analyse durchgeführt werden.

Glasperlen haben sich ebenfalls der Betrachtung unter dem FTIR entzogen. Makroskopisch ist deutlich ein milchiger Überzug erkennbar, welcher sich jedoch erst nach mehrfacher Beschichtung ausbildet. Da ausgeschlossen werden kann, dass es sich dabei um Siliziumhydroxid handelt, wird eine HAP-Beschichtung angenommen.

In der FTIR-Analyse sind auf den zugänglichen Stellen der Oberfläche des **Glasschaumes** teilweise die charakteristischen Peaks zu erkennen, Rauschen überwiegt aber. Wie bei den Glasperlen ist jedoch eine optische Einschätzung möglich. Es sind deutliche Spuren einer Beschichtung erkennbar.

Bei **Siliziumwafern** handelt es sich um ein sehr homogenes Material, welches am FTIR nur wenig Hintergrundrauschen aufweist. Die typischen Hydroxylapatit-Peaks wurden eindeutig nachgewiesen.

Makroskopisch wurde - wie bei den anderen Glasproben auch - ein trüber weißer Belag festgestellt. Aufgrund der guten Ergebnisse wurde besonders für die anfängliche Anlagenoptimierung mit Siliziumwafern gearbeitet. Die Beschichtung der Wafer erfolgte mit einem frühen Low-Flowrate-Programm mit 10 Zyklen.

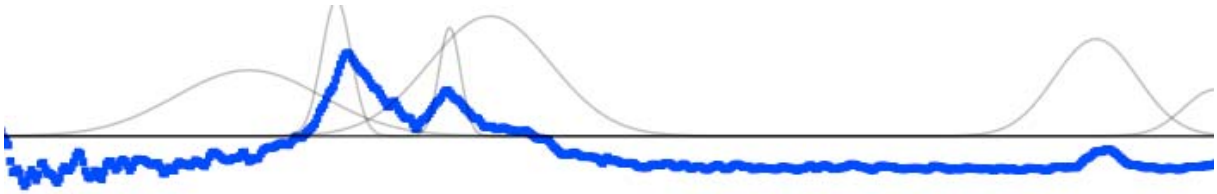
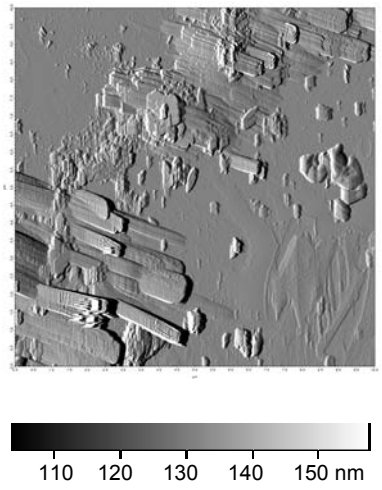


Abbildung 12: Silizium-Wafer. Peaks im Fingerprintbereich um 562, 605 und 874 nm

Von dem erhaltenen mit Hydroxylapatit beschichteten Silizium-Wafer wurde mit Hilfe des AFM die Oberfläche gescannt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 13 dargestellt. Diese Abbildungen zeigen, dass die Oberfläche eine hohe Rauhigkeit aufweist. Dadurch kann es zu Beschattungen von abgeschiedenen Nanopartikeln kommen, was wiederum die katalytische Aktivität der Nanopartikel verringert.

Höhenbild	Amplitudenbild	
		*Abbildung 13: AFM-Aufnahmen eines HAP beschichteten Si-Wafer, Übersichtsscan Höhenbild (links): Höhe der HAP-Strukturen von über 200 nm, Amplitudenbild (rechts): unregelmäßig Ablagerung von HAP auf Si-Wafer.*

Makroskopisch ist eine milchige Abscheidung auf dem **Silikonschlauch** zu erkennen. Eine Hydroxylapatit-Beschichtung ist anzunehmen, kann aber mit FTIR aufgrund des starken Rauschens nicht nachgewiesen werden.

Mit den erfolgreich mit HAP beschichteten Trägern wurden weitere Versuche zur Immobilisierung von S-Layer-Proteinen und Nanopartikeln durchgeführt. Die Stabilität der immobilisierten Nanopartikel wurde in Versuchsaufbauten mit mechanischer Durchmischung getestet. Mit den Tonkugeln und dem Tongranulat wurden Versuche im Schüttelkolben durchgeführt. Das nicht

lichtdurchlässige Ton-Material verringerte in Handversuchen den Lichteintrag deutlich. Für die photokatalytische Umsetzung von Diclofenac mit Hilfe von immobilisierten ZnO-Nanopartikel ist der Eintrag von Lichtenergie eine wesentliche Voraussetzung, da die Vorversuche eine Verringerung des Lichteintrags bei der Verwendung von tonigen Trägern zeigten, wurden keine weiteren Versuche mit den beschichteten Tonkugeln bzw. Tongranulaten durchgeführt. Bei weiteren Vorversuchen zeigte sich, dass die mechanische Stabilität von Aluminiumoxid und Glasschaum sehr gering ist. Bei Versuchen in Schüttelkolben zeigte sich innerhalb von 24 Stunden ein deutlicher Abrieb bei beiden Materialien. Dieser betrug bis zu 20% der eingesetzten Trägermasse. Aus diesem Grund wurden mit diesen Materialien keine weiteren Untersuchungen durchgeführt. Die mit HAP beschichteten Si-Wafer und Glaskugeln wurden in ersten Schüttelversuchen eingesetzt. In beiden Fällen wurden eine ausreichende mechanische Stabilität der beschichteten Trägermaterialen und ein guter Lichteintrag festgestellt. Weitere Versuche zur Abscheidung von S-Layern und Nanopartikeln auf den Trägermaterialen zeigten, dass die relative Oberfläche beider Materialen für die photokatalytische Anwendung zu gering ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die anfängliche Annahme, dass Hyroylapatit-beschichtete Träger sich besonders gut für die Aufbringung von S-Layer eignet und als gutes Ausgangsmaterial für die Herstellung von Photokatalysatoren geeignet sind, nicht bestätigt hat. Aus diesem Grund wurden im Verlauf des Projektvorhabens andere Materialien favorisiert (siehe dazu 2-1.2).

In Gesprächen, die im Rahmen der Präsentation des Vorhabens auf der Biotechnica 2008 in Hannover, geführt wurden, konnte der Kontakt zu dem Unternehmen nadicom GmbH hergestellt werden. Die nadicom GmbH stellte für Untersuchungen zur Immobilisierung von Nanopartikeln 100 ml nadi-Q®, poröse Sinterglaspellets, zur Verfügung. Mit diesem Material wurden erste Versuche zur mechanischen Stabilität und zur Lichtdurchlässigkeit durchgeführt.

2-1.2 Arbeiten am FZD: Herstellung von S-Layer Beschichtungen

Arbeitspunkt 2-1 wurde ausführlich und erfolgreich bearbeitet. Es wurden verschiedene Materialien mit S-Layer-Proteinen beschichtet. Die Analyse der Beschichtung mittels AFM zeigte eine generell gute Beschichtbarkeit mit einigen Einschränkungen. Bedeckungsgrade nahe 100% sind je nach gewähltem Untergrund möglich. Die mechanische Stabilität und die Langzeitstabilität der erzeugten Schichten sind ausbaufähig. Schutzschichten und Quervernetzung der Schichten sind nur zwei Optionen, mit deren Hilfe dieses Ziel kurzfristig erreicht werden kann. Im Folgenden sind die Ergebnisse aus AFM-Analysen verschiedener S-Layer beschichteter Träger aufgelistet.

Substratwahl

Für Rasterkraftmikroskopische Untersuchungen wurden die nachfolgend aufgeführten Substrate, mit glatter, möglichst polierter Oberfläche untersucht. Bereits untersuchte Substrate sind Silizium mit natürlich gebildeter Oxidschicht, Silizium mit technisch erzeugter Oxidschicht, Glas und verschiedene Aluminiumoxid-Träger. Bei Aluminiumoxid wurden verschiedene Ausführungen von

polierten Saphir-Oberflächen über Keramikplatten bis zu, auf Siliziumwafern aufgewachsenen, Aluminiumoxid-Schichten auf Eignung zum Aufbau von Schichtsystemen überprüft. In der Fachliteratur wurde die Rekristallisation von *Bacillus* S-Layer-Proteinen auf Siliziumsubstraten beschrieben. Der Prozess ist abhängig von bivalenten Kationen, welche zwischen der negativ geladenen Oberfläche und den negativ geladenen Proteinen eingelagert werden, und durch elektrostatische Wechselwirkungen das System stabilisieren.

Silizium

Silizium bildet an Luft eine dünne Siliziumdioxidschicht aus, die negativ geladen ist und viele Hydroxylgruppen bereitstellt. Die Oberflächen sind durch Silanisierung kovalent modifizierbar. Auf der negativ geladenen Oberfläche kann auch eine Anbindung durch ionische und elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen.

Glas

Glas ist ein amorpher Feststoff mit hohem SiO_2 Gehalt, wodurch an der Oberfläche wie bei Silizium(dioxid) viele OH^-- bzw. O^--Gruppen zur Verfügung stehen. Es ergeben sich ähnliche Eigenschaften und Möglichkeiten wie bei Siliziumdioxid. Der Vorteil von Glas bei fotokatalytischen Verfahren ist die Lichtdurchlässigkeit im UV-Bereich für Wellenlängen bis ca. 200nm (Silikatgläser).

Aluminiumoxid

Aluminiumsubstrate tragen wie die bereits erwähnten Materialien eine negative Oberflächenladungen. Eine von bivalenten Kationen koordinierte Anbindung ist ebenfalls möglich.

Für Beschichtungsversuche standen Saphir-Wafer, Platten aus Aluminiumkeramik und Al_2O_3 beschichtete SiO_2-Oberflächen zur Verfügung. Während der polierte Saphirwafer eine sehr glatte und für AFM gut geeignete Oberfläche darstellt, war auf den Al_2O_3 beschichten SiO_2-Substraten bereits eine deutliche Struktur erkennbar. Die Aluminiumkeramik wies ebenfalls eine recht raue Oberfläche auf.

Reinigung der Substrate

Für die Durchführung von Bindungsstudien müssen die Substrate von Kontaminationen befreit werden. Bei der Rasterkraftmikroskopischen Untersuchung von Schichten mit wenigen nm Stärke ist eine ähnlich gründliche Reinigung wie in der Halbleiterindustrie nötig.

Eine einfache Reinigung mit organischen Lösungsmitteln (Aceton, Methanol, Isopropanol) war nicht ausreichend. Daher wurden andere Reinigungsmethoden überprüft. Gute Ergebnisse zeigte eine Reinigung mit Peroxomonoschwefelsäure. Diese Reinigungsmethode entfernt insbesondere organische Verunreinigungen. Eine weitere Verbesserung zeigte die anschließende Bestrahlung

mit UV-Licht bei Wellenlängen von 185 nm und 255 nm. Der Abstand der Substratoberfläche zur UV-Lampe (11 W) betrug dabei ca. 2 mm. Die Bestrahlungsdauer wurde variiert, wobei sich mit Verlängerung der Bestrahlungsdauer die Oberflächenkontamination reduzierte. Des Weiteren wurde auch die in der Industrie häufig angewandte RCA Reinigungsmethode genutzt, welche ebenfalls gute Ergebnisse erzielte. Vorteilhaft für weitere Beschichtungsversuche erwies sich die UV-Bestrahlung, die zu einer deutlich gesteigerten Hydrophilität führte. Problematisch ist dagegen die dadurch erhöhte Anfälligkeit für erneute Kontamination der Oberflächen.

Beschichtung

Für die Anlagerung von S-Layer Proteinen an Oberflächen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Da S-Layer selbstorganisierende Eigenschaften aufweisen, werden in Monomer-lösungen durch Zugabe von Kalzium- oder Magnesiumionen zweidimensionale Kristalllagen gebildet. Diese Lagen weisen eine mehr und eine weniger polare Seite auf. Die Nettoladung der stärker polaren Oberfläche ist dabei negativ, wodurch es zur Anlagerung der zweiwertigen Kationen kommt. Die einfachste Anlagerung erfolgt auf negativ geladenen Substraten, wobei es durch elektrostatische Wechselwirkungen zur Anlagerung der Schichten kommt. Es wurden bereits S-Layer Monolagen auf Siliziumdioxid Wafern aus Monomerlösungen rekristallisiert (Abbildung 14). Die Ausbildung dieser Proteinbeschichtung ist bisher nicht gut reproduzierbar und als reine Proteinschicht von relativ geringer Haltbarkeit. Demgegenüber konnte bereits in früheren Experimenten nachgewiesen werden, dass die Proteinschichten nach der Herstellung von darauf immobilisierten Nanopartikel erheblich stabilisiert werden. So konnte in Experimenten bis pH 0,8 und Temperaturen von 80 °C keine Veränderung der Proteinstruktur mittels Infrarot-Spektroskopie festgestellt werden. Dennoch muss eine entsprechende Haftung der Proteinschichten auf dem Trägersubstrat ebenfalls sichergestellt werden. Eine Anlagerung durch Rekristallisation ist bisher nur auf reinem Siliziumdioxid gelungen. Eine Beschichtung von Glasoberflächen konnte mit dieser Methode nicht erreicht werden. Es wurden daher Modifikationen der Oberflächen vorgenommen. Die Beschichtung einer Saphiroberfläche (Al_2O_3) zeigte eine Anfangs gute Anbindung der Proteine, wobei keine Feinstruktur erkennbar war. Nach 10 Tagen war die Proteinschicht zum größten Teil wieder abgelöst, wie in Abbildung 15 erkennbar ist.

Höhe Amplitude Phase

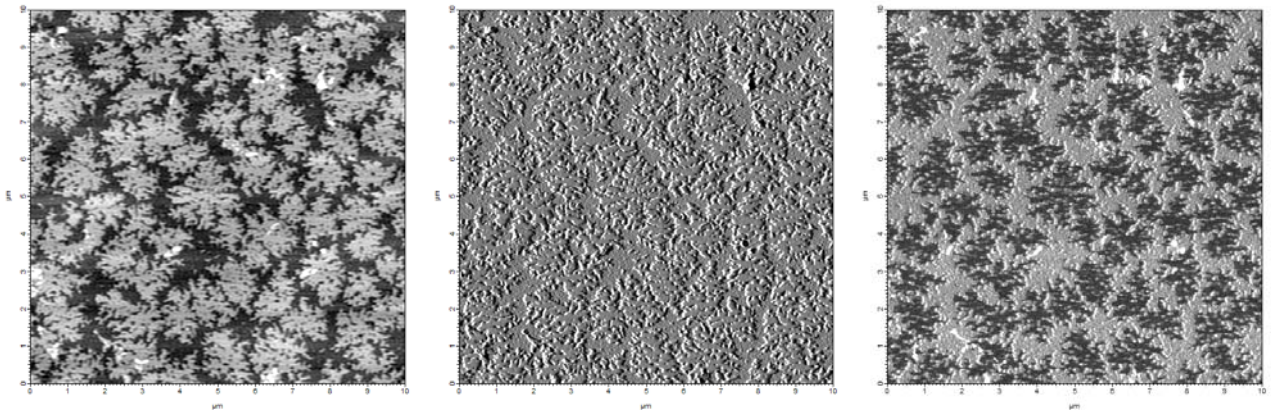
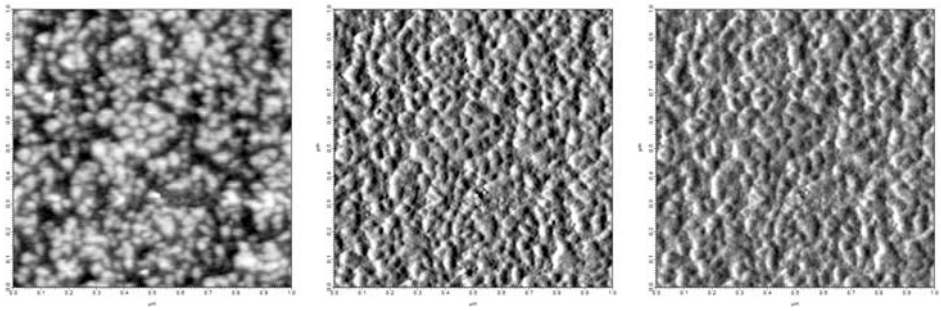
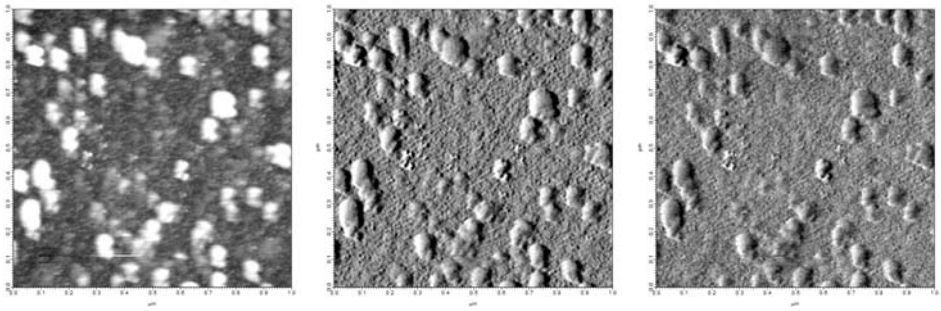


Abbildung 14: AFM-Aufnahmen einer S-Layer Rekristallisation auf Si-Wafer, 10 µm Übersichtsscan Höhenbild: Die rekristallisierten Flächen haben eine Höhe von 8-9 nm, die komplette Grauskala entspricht 20 nm; Amplitudenbild: geschlossene S-Layer Schichten weißen geringe Rauhigkeit auf. Die Rekristallisation erfolgt in Form stark zerklüfteter Inseln. Phasenbild: deutlich erkennbarer Materialkontrast zwischen Waferoberfläche und S-Layer.



1 µm Scan der Saphiroberfläche, unmittelbar nach der Anlagerung der S-Layer (gesamte Grauskala entspricht im Höhenbild 10 nm)

Höhe (10nm) Amplitude Phase



1 µm Scan der beschichteten Oberfläche nach 10 Tagen in Proteinlösung (gesamte Grauskala entspricht im Höhenbild 10 nm)

Abbildung 15: AFM-Aufnahmen einer S-Layer beschichteten Saphiroberfläche unmittelbar nach der Beschichtung und nach 10 Tagen Lagerung in der Proteinlösung.

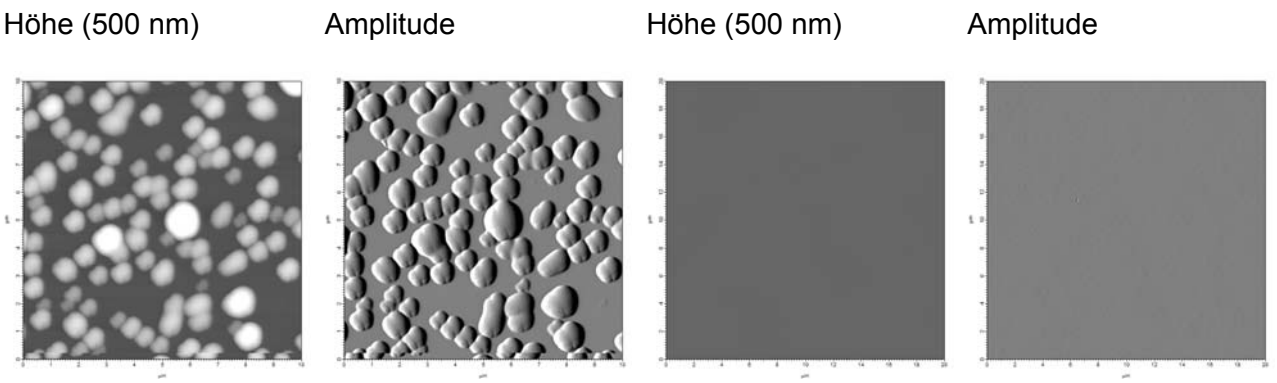
Substratmodifikationen

Als Möglichkeiten zur Verbesserung der Anlagerung wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen. Zur Anbindung der Proteine an der Oberfläche werden funktionelle Gruppen benötigt, die durch „crosslinking“ mit den Proteinen verbunden werden können. Reaktive Gruppen sind

dabei ungeeignet, da der Auskristallisiervorgang durch schnelle ungeordnete Anlagerung von Proteinen behindert oder möglicherweise ganz gestoppt würde. Daher sind geeignete funktionelle Gruppen alle, die sich mit Proteinen durch homo- oder hetero-bifunktionalen Crosslinker-reagenzien verbinden lassen. Die Anbindung der Modifikationen kann über kovalente Anbindung oder polare bzw. ionische Wechselwirkungen erfolgen.

APTES

Geeignete Verbindungen für die kovalente Anbindung von funktionellen Gruppen sind Silane. Es wurden bisher Versuche mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) durchgeführt. Problematisch bei Silanen ist die Bildung von Polysiloxan Netzwerken Abbildung 16 (li). Die Beschichtung wurde dahin gehend modifiziert, dass nach der Beschichtung auf der Substratoberfläche (Si-Wafer) keine Polysiloxane vorhanden sind Abbildung 16 (re).



Ausbildung von Polysiloxankomplexen auf einer APTES beschichteten SiO_2 Oberfläche

Keine Abscheidung von Polysiloxanen auf der SiO_2 Oberfläche durch zusätzliche Reinigungs-schritte

Abbildung 16: AFM-Aufnahmen von silanisierten Oberflächen (mit APTES), links mit starker Polysiloxan Bildung, rechts sehr homogene Beschichtung.

APTES stellt nach der kovalenten Anbindung an die Sauerstoffatome der SiO_2 Schicht eine Aminogruppe bereit, welche mit Glutardialdehyd zur Anbindung der Proteine genutzt werden kann. Wahlweise kann eine „klebrige“ Oberfläche geschaffen werden, indem die Oberfläche mit hohen GDA-Konzentrationen inkubiert wird, oder die Quervernetzung erfolgt nach Anlagerung der Proteine. Diese Variante eignet sich wie bereits erwähnt nicht für die Rekristallisation, möglicherweise jedoch für die Anbindung bereits rekristallisierter Proteine aus einer Suspension. Eine weitere Möglichkeit ist die nachträgliche Quervernetzung der Proteinschicht im Anschluss an den Beschichtungsvorgang. Vorteilhaft ist dabei, dass der

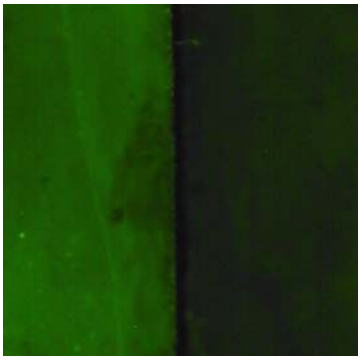


Abbildung 17: Fluoreszenzaufnahme einer APTES beschichteten (li) und einer unbeschichteten (re) SiO_2-Oberfläche

Anlagerungsprozess der Proteine nicht durch Crosslinkeraktivität gestört wird.
Die Modifizierung einer SiO_2-Oberfläche wurde mit EDC-aktiviertem Alexa488 Farbstoff nachgewiesen. Es wurden dabei eine mit APTES aktivierte und eine nicht aktivierte Oberfläche mit dem aktivierten Farbstoff inkubiert. Im Ergebnis (Abbildung 17) zeigte sich auf der aktivierten Fläche eine stärkere Fluoreszenz als auf der nicht aktivierten.

Polyelektrolyte

Eine weitere Möglichkeit der Substratmodifikation ist die Beschichtung mit Polyelektrolyten. Diese Polymere mit multiplen Ladungen pro Molekül eignen sich gut für flächendeckende Beschichtung von polaren Substraten. Die negativ geladene Oberflächen von Glas oder Siliziumdioxid lassen sich durch einfache Tauchbeschichtungen mit Polykationen wie Polyethylenimin (PEI) oder Polyallylaminhydrochlorid (PAH) beschichten, wobei im Falle der beiden genannten Verbindungen ein hoher Bedeckungsgrad mit aktivierbaren Aminogruppen erreicht wird. Ein Vergleich der Bedeckung erfolgte wie bei APTES mit EDC-aktiviertem Alexa488, wobei die Ergebnisse mit APTES vergleichbar waren. Auf den Polykationschichten können mit ebenfalls im Tauchverfahren Polyanionschichten aufgebracht werden. Es kamen in den durchgeführten Versuchen Polystyrensulfonat (PSS) und Polyacrylsäure (PAA) zum Einsatz. Die erzeugten aktivierten Oberflächen sind sehr eben und somit für rasterkraftmikroskopische Analysen sehr gut geeignet, wie in Abbildung 18 zu erkennen ist. Die negativ geladenen, mit Polyanionen beschichteten Oberflächen eignen sich besser für Rekristallisation von S-Layern als gereinigte SiO_2-Oberflächen.

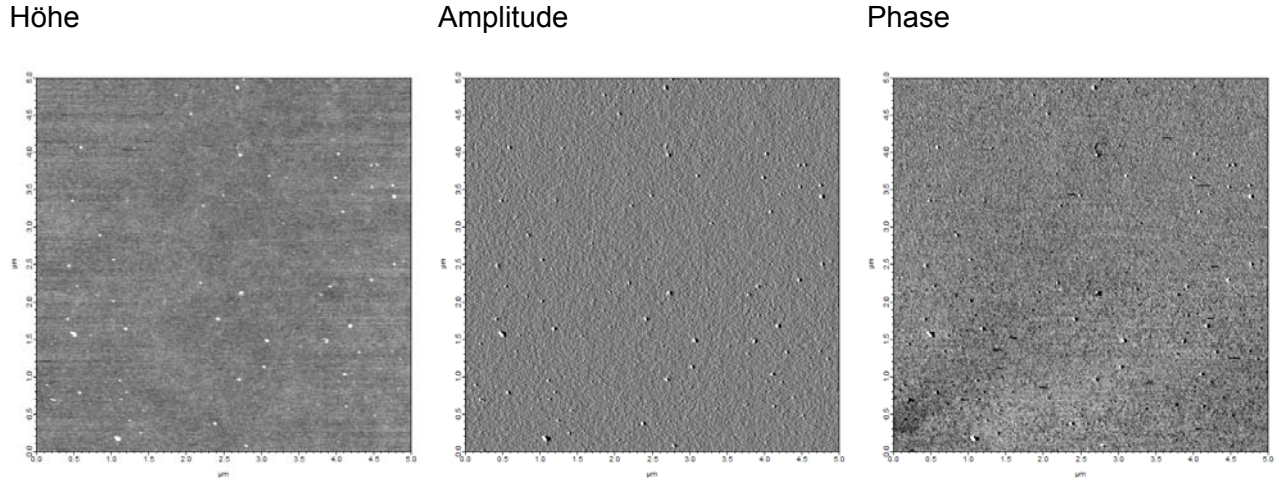


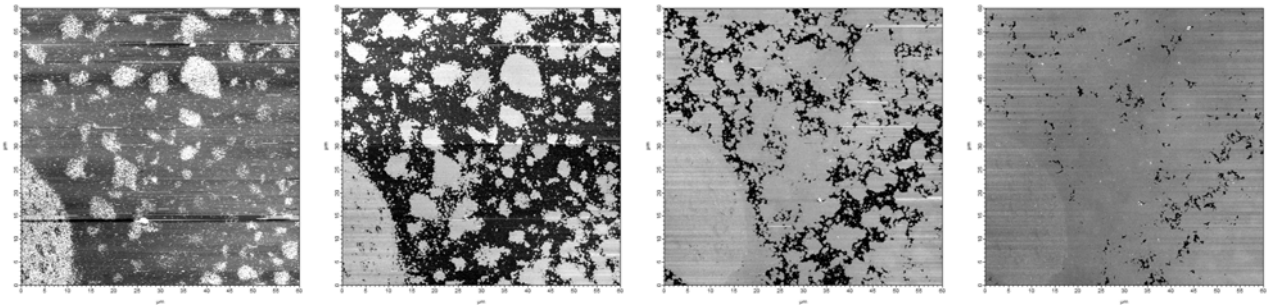
Abbildung 18: AFM-Aufnahme einer Polyelektrolytbeschichteten Oberfläche

S-Layer Rekristallisation

Die Anlagerung und Rekristallisierung der S-Layer war bisher nur auf negativ geladenen Oberflächen erfolgreich. Eine Rekristallisation auf positiv geladenen Oberflächen war nicht möglich. Da Aminogruppen auf dem Substrat nicht verfügbar sind, wurde auch ein Crosslinking mit der

Substratoberfläche derzeit noch nicht durchgeführt. Nach einer Beschichtung gereinigter SiO_2-Oberflächen, die mit den eingesetzten Proteinen nicht gut reproduzierbar war, wurden Rekristallisationen auf Polyanionen durchgeführt, die ebenfalls eine negativ geladene Oberfläche bereitstellen. Die Rekristallisation der S-Layer erfolgte bei gleichen Bedingungen. Die erfolgreiche Bindung zeigt, dass bei der Anlagerung und Rekristallisierung vermutlich der gleiche Mechanismus wie auf unbeschichteten Siliziumdioxid zugrunde liegt. Bisher ist die Anlagerung von S-Layern auf Polyelektrolyten in der Literatur für Polystyrensulfonat auf Siliziumdioxid oder Phospholipiden beschrieben. Da für Fotokatalyse transparente Substrate zu bevorzugen sind, wurden Polyelektrolyt beschichtete Glassubstrate auf ihre Eignung untersucht. Wie die rasterkraftmikroskopischen Bilder zeigen, erfolgt ebenfalls eine Rekristallisierung der S-Layer auf den beschichteten Substraten. Die Größe der Flächen mit einheitlicher Kristallorientierung und die Zeit bis zur Ausbildung einer geschlossenen Schicht sind stark von der S-Layer Monomerkonzentration abhängig. Ungünstig ist die Anlagerung an Sulfonsäurereste, da hier eine Quervernetzung schwierig ist. Daher wurden Versuche durchgeführt, Polystyrensulfonat, ein starkes Polyelektrolyt gegen PAA, einem schwachen Polyelektrolyt, zu ersetzen. Unter gleichen Bedingungen erfolgt eine Rekristallisierung von S-Layern auf dem Substrat. Die Carboxylreste der Acrylsäure können mit EDC zur Vernetzung der Aminogruppen des Proteins genutzt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse einiger Rekristallisationsversuche exemplarisch dargestellt. Erste Versuche erfolgten auf Siliziumdioxid mit einer (PAH oder PEI)/PSS Beschichtung. Die Rekristallisation erfolgte bei pH 9 und 10 mM $CaCl_2$. Die Monomerkonzentration wurde zwischen 0,2 und 1 mg/ml variiert, wobei die Rekristallisationsgeschwindigkeit und der Bedeckungsgrad stark von der Monomerkonzentration abhängen. Eine Temperaturabhängigkeit wird vermutet, konnte aber mangels einer Einrichtung zum Kühlen nicht durchgeführt werden. Eine Rekristallisation auf einer Polyelektrolytoberfläche mit 1 mg/ml S-Layer Monomerkonzentration ist in Abbildung 19 als Übersichtsscan dargestellt. Nach etwa 12 h ist eine nahezu flächendeckende Beschichtung erreicht. Im Detailscan in Abbildung 20 ist deutlich die Strukturierung der S-Layer-Patches zu erkennen.



t=1h t=2h t=3h t=12h

Abbildung 19: AFM-Aufnahmen einer fortschreitenden S-Layer Rekristallisation auf einer Polyelektrolyt beschichteten Siliziumwafer-Oberfläche (PEI/PSS), S-Layerkonzentration 1 mg/ml. Ende der Rekristallisation nach ca. 12 h mit nahezu vollständiger Bedeckung.

Höhe Amplitude Phase

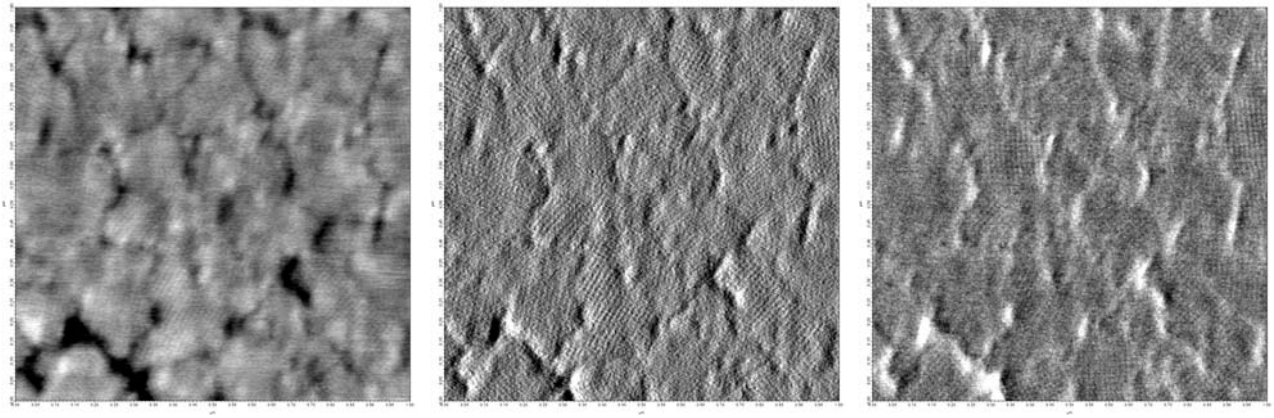
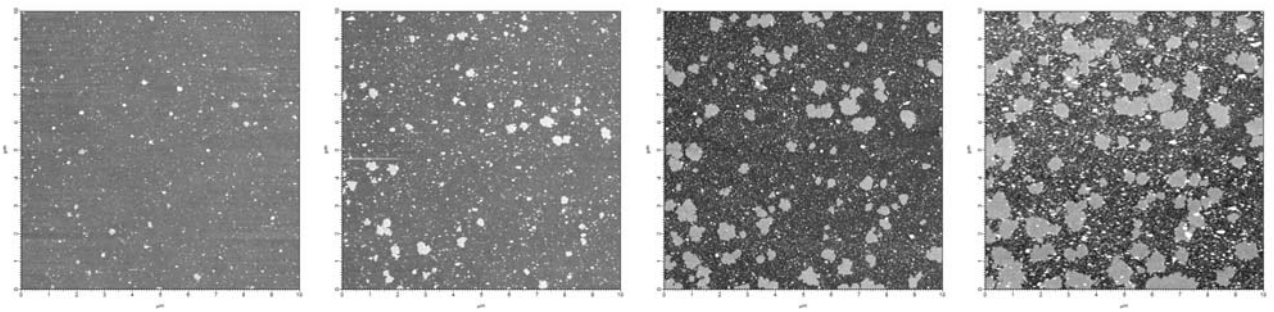


Abbildung 20: 1 µm Scan der Proteinschicht, kleinere Kristallflächen mit deutlicher p4-Symmetrie

Weitere Versuche wurden auf (PEI/PSS) beschichteten Glassubstraten durchgeführt. Es wurde eine Monomerlösung mit ca 0,5 mg/ml eingesetzt. Die Rekristallisierung erfolgte sehr verzögert wie in Abbildung 21 ersichtlich ist und endete nach etwa 24 h. Der Bedeckungsgrad war vergleichsweise gering, was die Abhängigkeit des Bedeckungsgrades von der S-Layer Konzentration verdeutlicht. Da PSS-Schichten für Quervernetzung ungünstig sind, wurden Versuche mit PAA-Beschichtungen durchgeführt. Die Versuche mit diesem Polyelektrolyt waren ebenfalls erfolgreich. Um eine schnelle Beschichtung mit hohem Bedeckungsgrad zu erreichen, wurde eine S-Layer-Monomerkonzentration von 4 mg/ml eingesetzt. Die Bedeckung erfolgte so schnell, dass sie nicht mit dem AFM verfolgt werden konnte und bereits nach ca. 10 min beendet war. Ein Übersichtsscan der nahezu vollständig belegten Oberfläche ist in Abbildung 22 zu sehen. Ein Detailscan mit deutlichen S-Layer Strukturen ist in Abbildung 23 abgebildet. Im Vergleich zu Abbildung 20 sind hier die S-Layer Patches wesentlich kleiner, was die Abhängigkeit der Patch-Größe von der Rekristallisationsgeschwindigkeit und somit von der S-Layer Konzentration verdeutlicht.



t=1h t=3h t=16h t=24h

Abbildung 21: AFM-Aufnahme einer S-Layer Rekristallisation auf einer Polyelektrolyt beschichteten Glas-Oberfläche (PEI/PSS), S-Layer-Konzentration 0,5 mg/ml. Ende der Rekristallisation nach ca. 24h trotz

geringem Bedekungsgrad.

Höhe Amplitude Phase

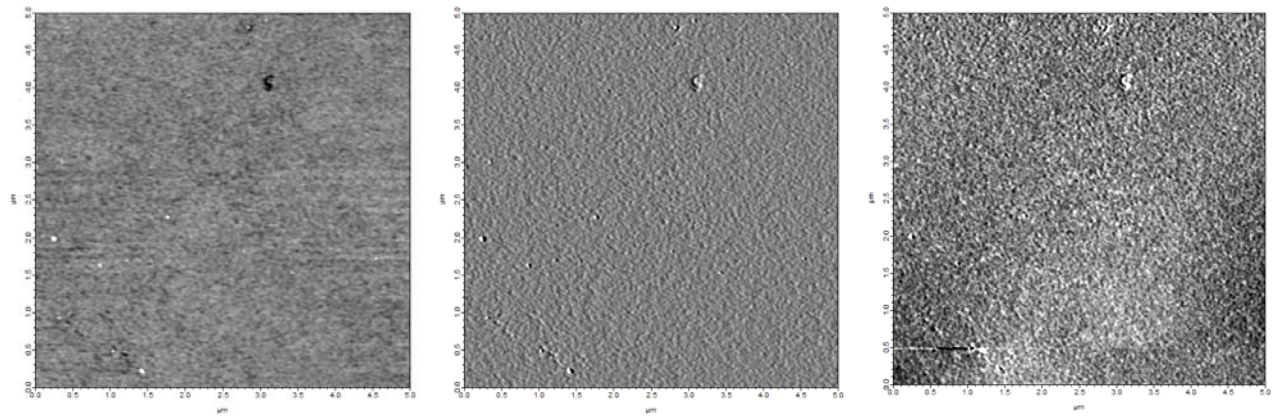


Abbildung 22: 5 µm Übersichtsscan einer PEI/PAA beschichteten Glasoberfläche mit rekristallisierten S-Layern. Die Rekristallisation erfolgte mit einer Monomerkonzentration von 4 mg/ml in ca. 10 min.

Höhe Amplitude Phase

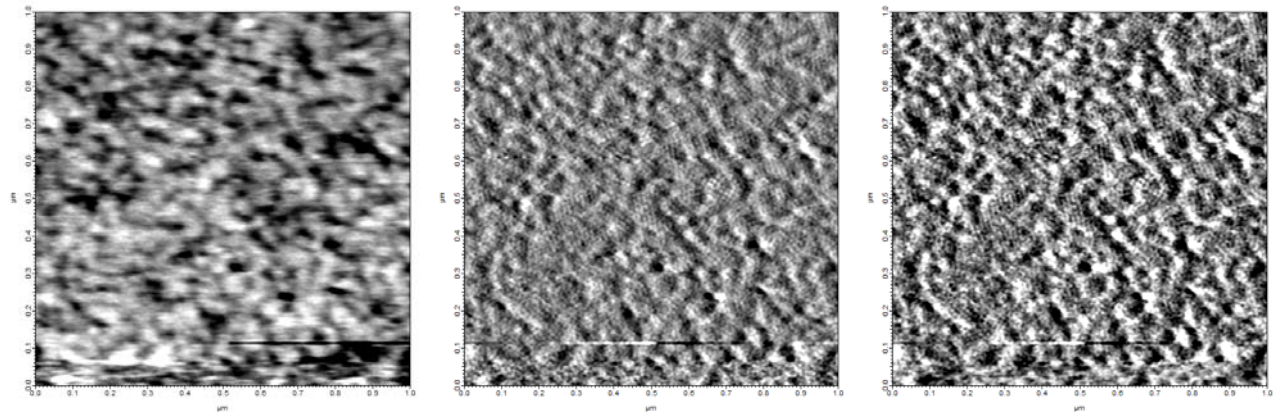


Abbildung 23: AFM-Aufnahme der S-Layer-Schicht, kleinere Kristallflächen mit deutlicher p4-Symmetrie

Modell

Aus den Arbeiten zu S-Layer Rekristallisation auf Oberflächen wurde ein einfaches Modell erstellt, welches in Abbildung 25 dargestellt ist. Auffällig ist die Ablagerung von kleineren Aggregaten neben der Bildung von größeren Patches. Möglicherweise handelt es sich hier um Monomere, was im Modell angenommen wird. Aus diesen Ablagerungen entstehen keine S-Layer Patches, weswegen der Ausbildung jener ein anderer Mechanismus zu Grunde liegen muss. Die Kristallisationskeime, die zur Bildung von Patches hinreichend sind, bestehen daher vermutlich aus kleinen Oligomeren oder gar S-Layer Dimeren, an denen, nach Anlagerung auf der Oberfläche, eine weitere Rekristallisierung möglich ist. Auffällig ist auch, dass wachsende Patches die kleineren Ablagerungen verdrängen können. Der experimentelle Hinweis darauf ergab sich aus der Beobachtung der Rekristallisationen, die mittels AFM live verfolgt wurden. Die Verdrängung zweier kleinerer Ablagerungen ist in Abbildung 24 anhand zweier Bilder dargestellt, die im Abstand von 10,5 h aufgenommen wurden. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass die Affinität der S-Layer-Monomere zum Substrat geringer ist, als die Affinität der Monomere zum Kristallverbund.

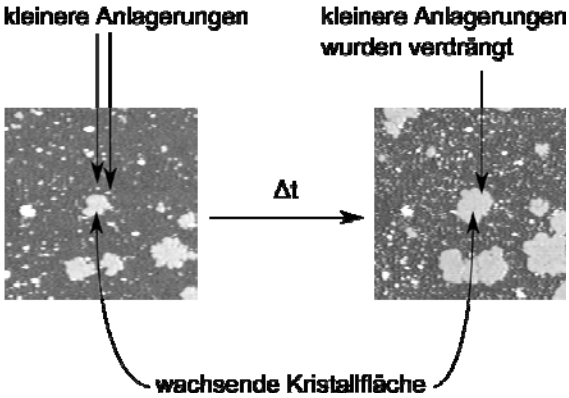
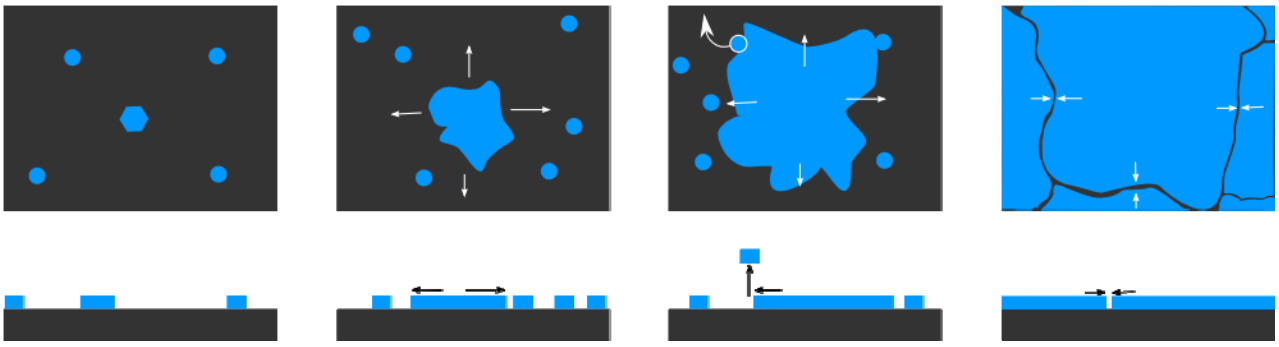


Abbildung 24: Aufnahmen einer Rekristallisation, bei der kleinere Ablagerung durch wachsende Kristallflächen verdrängt werden.



(I) Anlagerung

(II) Anlagerung Polymerisation

(III) Anlagerung Polymerisation Verdrängung

(IV) Ende der Polymerisation

Abbildung 25: einfaches Modell der Rekristallisation von S-Layern an Oberflächen; (I) Anlagerung von Monomeren und kleineren Oligomeren, (II) Zusätzliche Anlagerung von Monomeren an die Kristallisationskeime und somit Wachstum von Kristallflächen, (III) Wachsende Kristallflächen verdrängen gebundene Monomere, (IV). Das Wachstum der Kristallflächen endet durch aneinanderstoßen der verschiedener Flächen.

Mikroskopische Analysen poröser Substrate

Poröse Substrate, die auf Grund ihrer groben Struktur nicht mittels AFM visualisiert werden konnten, wurden durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei wurden diese Materialien mit fluoreszenzmarkierten S-Layern beschichtet. Nach Abwaschen aller nicht gebundenen Proteine wurden die Materialien auf Intensität der Fluoreszenz und damit auf Bedeckung mit Protein untersucht. Abbildung 26 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme eines mesoporösen Al_2O_3 Materials (Puralox), dessen Partikel komplett mit fluoreszenzmarkierten S-Layern bedeckt sind. Eine Übersicht der Menge gebundenen Proteins an verschiedenen Materialien gibt Tabelle 4 wieder.

Material	mg S-Layer pro g Material
Blähton-Partikel (< 0.63 mm)	62
Blähton-Partikel (0.63-2 mm)	39
Blähton-Partikel (2-4 mm)	34
Glasschaum (< 0.63 mm)	56
Glasschaum (0.63-2 mm)	34
Glasschaum (2-4 mm)	26
Industriekeramik (< 0.63 mm)	56
Industriekeramik (0.63-2 mm)	32
Industriekeramik (2-4 mm)	16
Industriekeramik (kugelförmig Ø 3 mm)	10
Silicagel G 62	68
Puralox (Al_2O_3)	55
MCM 41 (meso-poröses SiO_2)	116
SBA 15 (nano-poröses SiO_2)	53

Tabelle 4: Übersicht über Proteinbindekapazitäten

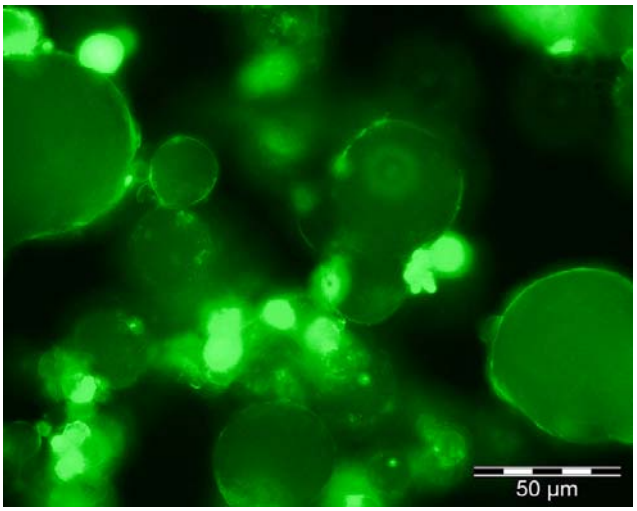


Abbildung 26: Fluoreszenzaufnahme von mesoporösem Al_3O_3 (Puralox), beschichtet mit fluorszenzmarkierten S-Layer-Proteinen

Ausblicke

Die hergestellten Schichten sollen in weiteren Untersuchungen auf Stabilität vor und nach verschiedenen Quervernetzungen getestet werden. Stabilität bezieht sich hierbei nicht nur auf mechanische Stabilität sondern auch auf chemische Stabilität in Bezug auf pH-Wert und Ionenstärke des umgebenden Mediums.

Die rasterkraftmikroskopische Darstellung der abgeschiedenen Metall- und Metalloxid-Nanopartikel ist der nächste Schritt auf dem Weg zu Charakterisierung der fotokatalytischen Schich-

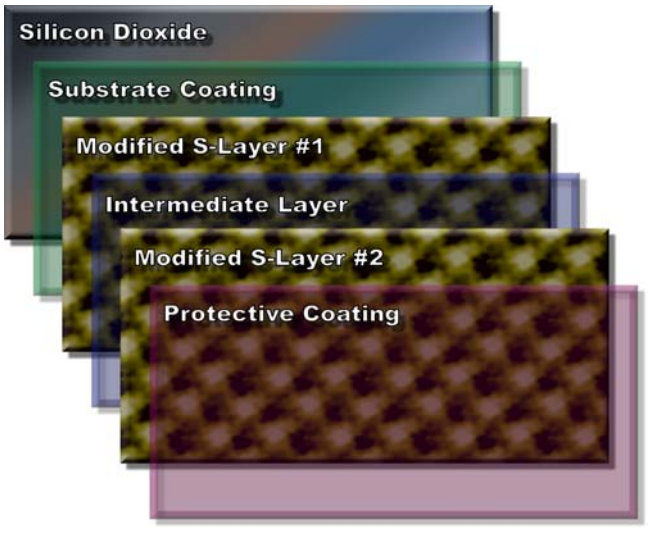


Abbildung 27: Schematische Darstellung eines mehrschichtigen Systems mit funktionellen und Zwischenschichten

ten. Des Weiteren sind der Aufbau und die Charakterisierung von Mehrschichtsystemen sowie genauere Untersuchungen zu Kinetik und damit Optimierung der Rekristallisation geplant. Langzeituntersuchungen der erzeugten Schichten sollen eine Abschätzung von Standzeiten der erzeugten Materialien erlauben und sollen nach den Stabilitätstests eingegliedert werden. Erweiterte Untersuchungen der Schichten werden mit XPS zur Elementanalyse und mittels Ellipsometrie zur Schichtdickenbestimmung erfolgen.

AP 2-2: Synthese von ZnO-Partikeln auf S-Layer beschichteten Trägermaterialien.

Auf Grundlage der Versuche in AP 2-1 wurden Verbundmaterialien hergestellt. Um den Katalysator auf einer möglichst großen Fläche pro Raumeinheit abzuscheiden, wurden poröse Materialien ausgewählt. Diese wurden mit S-Layer-Proteinen beschichtet und in AP3-2 für photokatalytische Versuche eingesetzt.

Die erste Charge Kompositmaterialien entstand durch Zugabe von rekristallisierten S-Layern zu suspendierten Trägermaterialien. In diesen Suspensionen erfolgte die Ausfällung von ZnO aus $ZnCl_2$ mit NH_3. Als Referenzen bei der Beurteilung der fotokatalytischen Aktivität wurden ebenfalls Materialien nach gleichem Schema jedoch ohne Träger bzw. ohne S-Layer hergestellt. Im Sinne besserer Vergleichsmöglichkeit sind die Ergebnisse der fotokatalytischen Versuche unter AP3-2 dargestellt.

Es wurden auf Grundlage der Arbeiten zu AP 2-1 weiterentwickelte Kompositmaterialien hergestellt. Durch Bereitstellen einer definierten Zwischenschicht aus Polyelektrolyten, wurde in rasterkraftmikroskopischen Versuchen eine nahezu 100%ige Bedeckung der Oberfläche mit S-Layern ermöglicht. Diese Technik wurde an festen, porösen Aluminiumoxid-Trägern durchgeführt. Dazu wurden die Träger nach der RCA-Reinigungsmethode von organischen Kontaminationen befreit. Im Anschluss wurde die Oberfläche mit deiner Doppelschicht aus Polyelektrolyten beschichtet. Derartig vorbereitete Träger wurden in S-Layer Monomerlösung inkubiert. Die Proteine bilden auf der Oberfläche Aggregate und kristallisieren aus bis zu einer geschlossenen Schicht. Auf den beschichteten Trägern wurden ZnO-Partikel aus einer $ZnCl_2$ Lösung abgeschieden. Diese Materialien wurden wiederum in fotokatalytischen Versuchsreihen auf ihre fotokatalytische Wirkung untersucht, deren Ergebnisse ebenfalls unter AP 3-2 dargestellt sind.

AP 3: Katalytische Tests

In den drei Arbeitspunkten des AP 3 wurden verschiedene Tests zum photokatalytischen Abbau von Modellsusbstanzen (Methylenblau) und Diclofenac mit Nanopartikel durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass S-Layer geträgerte Nanopartikel unter bestimmten Bedingungen Diclofenac schneller abbaut als technische Nanopartikel. Insgesamt kann festgestellt werden, dass das AP 3 erfolgreich bearbeitet wurde.

AP 3-1: Spaltung von Methylenblau als Schnelltest

Im Projekt wurde der Methylenblautest als Schnelltest für ein Screening der hergestellten fotokatalytisch aktiven Nanopartikeln verwendet. Mittels des Tests konnten Unterschiede zwischen Ansätzen ohne ZnO, mit chemisch hergestelltem ZnO und ZnO hergestellt auf bakteriellen S-Layern nachgewiesen werden (siehe dazu Abbildung 28). So weisen S-Layer geträgerte ZnO-Nanopartikel die höchste fotokatalytische Aktivität auf gefolgt von chemisch hergestellten ZnO-Nanopartikeln im Vergleich zu dem Ansatz ohne ZnO.

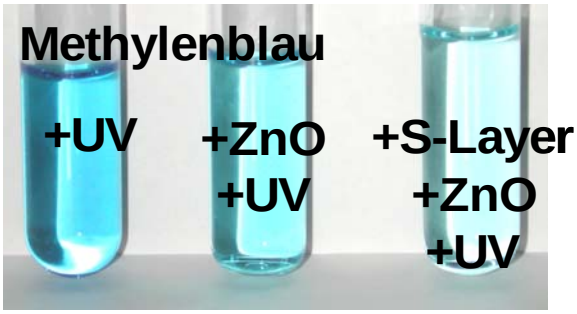


Abbildung 28: Methylenblau Schnelltest mit (li) ohne Katalysator, (mi) kommerzielles ZnO und UV-Licht und (re) S-Layer geträgerte ZnO Partikel

Als Resultat mehrerer Versuchsreihen musste aber festgestellt werden, dass die Ergebnisse des Methylenblautests wenig reproduzierbar und nur sehr schwer zu vergleichen sind. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente direkt mit Diclofenac durchgeführt. In Diskussionen mit der UMEX GmbH und der Hochschule Anhalt, die sich beide bereits sehr lange und intensiv mit photokatalytischen Materialien beschäftigen, wurde bestätigt, dass der Methylenblautest zwar häufig verwendet und in der Literatur benannt wird, dieser aber auf Grund von unspezifischen Reaktionen, die zur Entfärbung des Farbstoffs führen, für derartige Tests und Vergleiche ungeeignet ist. Derzeit laufen Versuchsreihen mit Methylorange als Farbstoff für die Etablierung eines neuen Schnelltests.

AP 3-2: Abbau von organischen Verbindungen

Photokatalyse von Diclofenac mit verschiedenen Nanopartikeln als Katalysator im UV-A Bereichs des Lichtes konnte für ZnO- und TiO_2- Nanopartikel nachgewiesen werden.

Die Vorversuche zum photokatalytischen Abbau von Diclofenac zeigten, dass das Diclofenac bei einer UV-Bestrahlung mit den Wellenlängen von 254 nm und 302 nm ohne Zusatz von Nanopartikeln durch Hydroxid- und Peroxidradikale vollständig abgebaut wird. Die mit der UV-Strahlung eingetragene Energie reicht in diesen beiden Fällen für eine Radikalbildung aus. Bei der Verwendung von Licht im sichtbaren bzw. UV-A Bereich werden Nanopartikel zur Katalyse der

Radikalbildung benötigt. Im Rahmen des Vorhabens wurden verschiedene Nanopartikel auf ihre Eignung als Katalysator für diesen Prozess getestet.

Die Versuche zum photokatalytischen Abbau von Diclofenac wurden in einer mit Aluminiumfolie ausgekleideten Dunkelbox durchgeführt. In der Dunkelbox befand sich ein Horizontalschüttler zur Durchmischung der Versuchslösungen. Die Bestrahlung mittels UV-Licht zum photokatalytischen Abbau von Diclofenac mit verschiedenen Nanopartikeln erfolgte mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm. Als Versuchsgefäße wurden 25 ml Quarzglaserlenmeyerkolben verwendet. Die Versuchsansätze bestanden aus 1 ml 1 mM Diclofenac und je 1 mg im Rahmen des Vorhabens hergestellten Nanopartikel in einem Gesamtvolumen von 10 ml. Als Vergleich wurden Versuche mit 1 mg kommerziell erhältlichen Nanopartikeln durchgeführt.

Der Abbau des Diclofenac in den Versuchsansätzen wurde mit dem HPLC-System Agilent 1200 unter Verwendung einer RP Säule Zorbax Eclipse XDB-C 18 und eines DAD-Detektor 1200 verfolgt. Als mobile Phase diente eine Mischung aus 85 % Methanol und 15 % 20 mM KH_2PO_4 (pH 2,5). Die aufgetrennten Substanzen wurden bei 280 nm detektiert. Zusätzlich wurde ein Spektrum im Bereich 190 – 400 nm aufgenommen. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm ChemStation der Firma Agilent Technologies ausgewertet.

AP 3-4.1 Photokatalyse von Diclofenac mit ZnO als Photokatalysator

Im folgenden werden Ergebnisse zur Verwendung von ZnO-Nanopartikeln als Photokatalysator dargestellt. In der Abbildung 29 ist der photokatalytische Abbau des Diclofenac durch kommerziell erhältliches ZnO – Nanopulver dargestellt. Dabei ist festzustellen, dass mit zunehmender Masse an eingesetzten ZnO – Nanopulver auch der Reaktionsumsatz an abgebautem Diclofenac zunimmt. Mit 3 und 6 mg ZnO – Nanopulver sind nach 2 h Bestrahlung mit UV-Licht bereits ca. 95 % des Diclofenac abgebaut. Dahingegen sind mit 1 mg ZnO – Nanopulver nach 6 h Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm erst ca. 68 % des Diclofenac abgebaut und eine vollständige Mineralisation des Diclofenac erst nach 24 h erreicht. Die Berechnung der Abbauraten zeigte, dass mit zunehmender Masse an eingesetztem ZnO die Reaktionsgeschwindigkeit von 21 µM/h für 1 mg auf 47 µM/h für 3 mg zunahm und sich für 6 mg ZnO nicht weiter erhöhte.

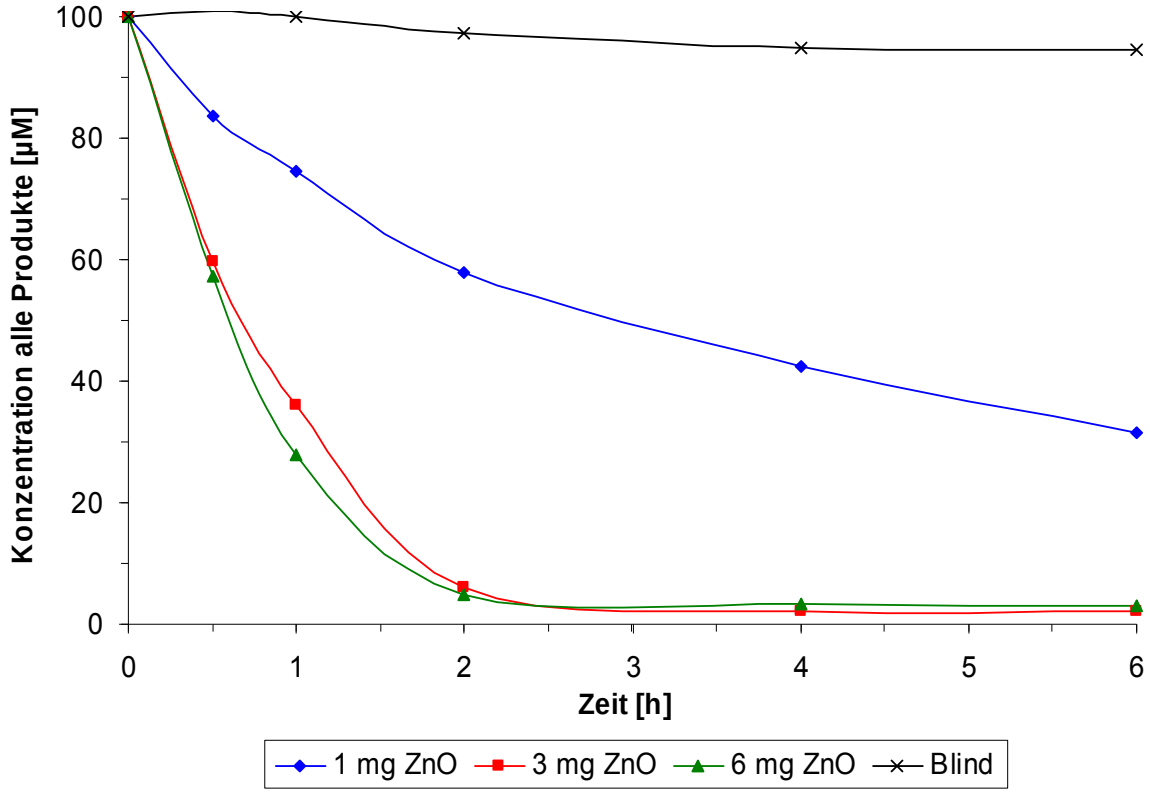


Abbildung 29: Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit kommerziell erhältlichen ZnO – Nanopulver

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss bakterieller S-Layer auf die Aktivität hergestellter ZnO-Nanopartikel untersucht. Dazu wurden ZnO-Nanopartikel durch Ausfällung aus einer 20 mM $ZnCl_2$-Lösung mit 400 µl 25 % Ammoniaklösung in Gegenwart oder Abwesenheit von 30 mg S-Layer-Protein des Uranabfallhaldenisolats *Lysinibacillus sphaericus* JG A-12 hergestellt. Das erhaltene Pellet wurde zweimal gewaschen und zur Bildung von ZnO für 24 h gegen Tri-Di-H_2O dialysiert. Der Abbau von Diclofeanc wurde nachfolgend in einem 10 ml Ansatz mit 1 mg chemisch hergestellten oder 1 mg auf S-Layern hergestellten ZnO-Nanopartikel mit einer Diclofenac-Konzentration von 100 µM unter Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 365 nm für 48 h verfolgt. Als Referenz diente ein Ansatz, der in identischer Weise behandelt wurde, aber kein ZnO enthielt. Wie aus Abbildung 30 ersichtlich, zeigen die freien ZnO-Nanopartikel zwar anfänglich eine höhere katalytische Aktivität als die auf S-Layer-Protein hergestellte Partikel, weisen aber bei einer Betrachtung über einen längeren Zeitraum die geringere Aktivität auf. So weisen die S-Layer gebundenen Nanopartikel nach 10 h eine gleiche und nach über 10 h eine höhere katalytische Aktivität auf. Eine Interpretationsmöglichkeit ist eine durch die S-Layer vermittelte Stabilisierung der ansonsten instabilen ZnO-Nanopartikel. Aus Arbeiten mit anderen Pd-Nanopartikel ist bekannt dass sowohl die Partikel die S-Layer strukturell stabilisieren (getestet bis pH 0,8 und 80° C ohne eine Veränderung der Proteinstruktur) und umgekehrt die Proteine ebenfalls die Nanopartikel stabilisieren und eine Agglomeration verhindern.

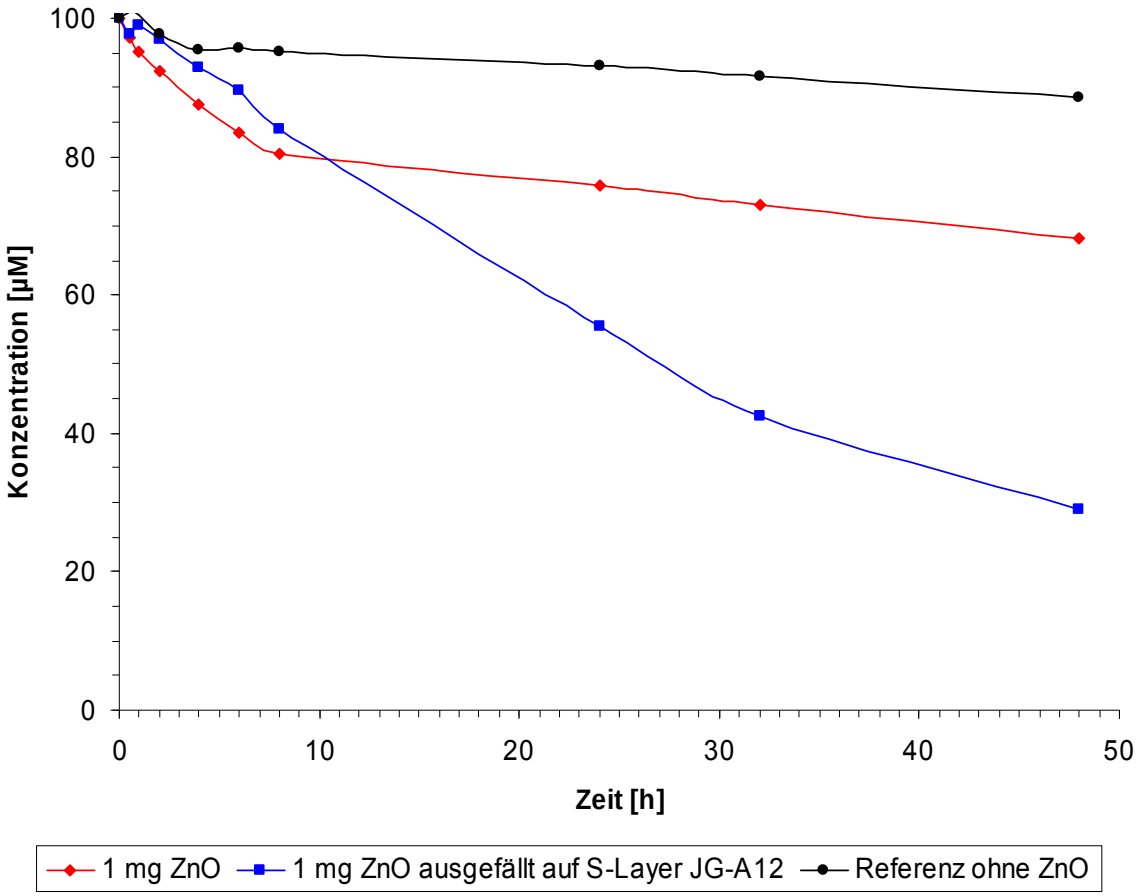


Abbildung 30: Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit 1 mg chemisch hergestelltem ZnO und mit 1 mg auf 30 mg JG-A12 S-Layern hergestelltem ZnO

Zusätzliche Experimente, die in gleicher Weise aber unter Variation der eingesetzten Proteinmenge (10 und 30 mg) durchgeführt werden, zeigen eine dass über die Reduktion der eingesetzten Proteinmenge Nanopartikel gewonnen werden können, die zu jedem Zeitpunkt gegenüber den chemisch hergestellten Nanopartikel eine höhere katalytische Aktivität aufweisen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

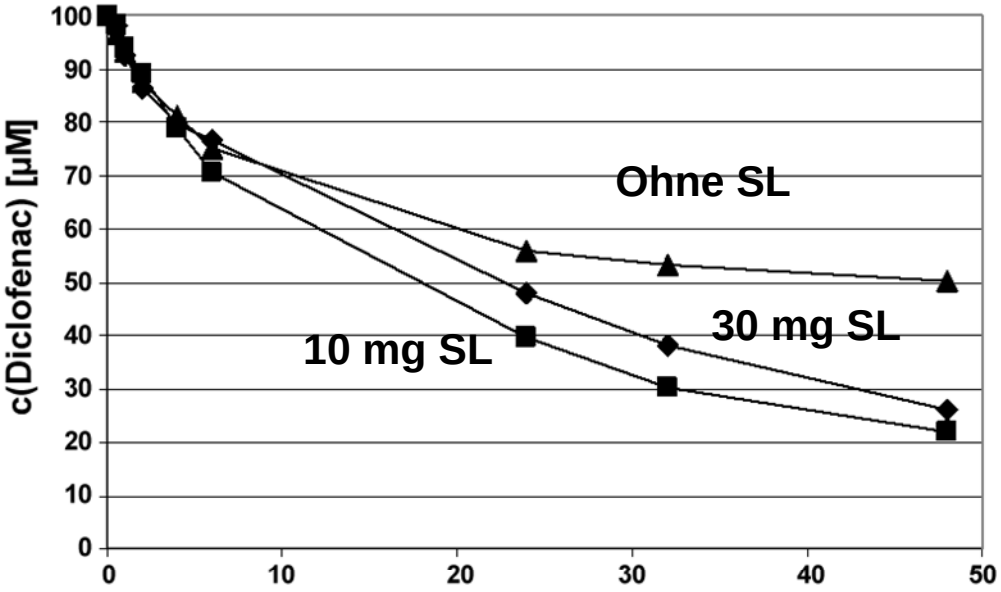


Abbildung 31: Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit 1 mg chemisch hergestelltem ZnO und mit 1 mg auf 10 oder 30 mg JG-A12 S-Layern hergestelltem ZnO

Nachfolgend wurden alle ZnO-Nanopartikel-Synthesen zur Untersuchungen zum photokatlytischen Abbau von Diclofenac mit diesem ermittelten S-Layer zu $ZnCl_2$-Verhältnis hergestellt.

Unter Verwendung von 3,2 mg auf S-Layer von *Lysinibacillus sphaericus* JG A-12 ausgefällten ZnO – Nanokristalliten als Photokatalysator wurden ca. 50 % vom Diclofenac (Abbildung 32) mit einer Ausgangskonzentration von 100 µM abgebaut. Gleichzeitig stellte sich dar, dass mit zunehmender Anfangskonzentration von Diclofenac die Abbaureaktion mit gleicher Masse dieser auf S-Layer gebundenen ZnO – Nanokristallite schneller ablief. Der Umsatz nach 24 h Bestrahlung für die Ausgangskonzentration von 5 µM Diclofenac betrug 4,5 µM und für 100 µM Diclofenac 60,5 µM. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Anfangkonzentration an Diclofenac die Reaktions-geschwindigkeit von 0,4 µM/h für 5 µM DCF auf 5,2 µM/h für 100 µM stieg.

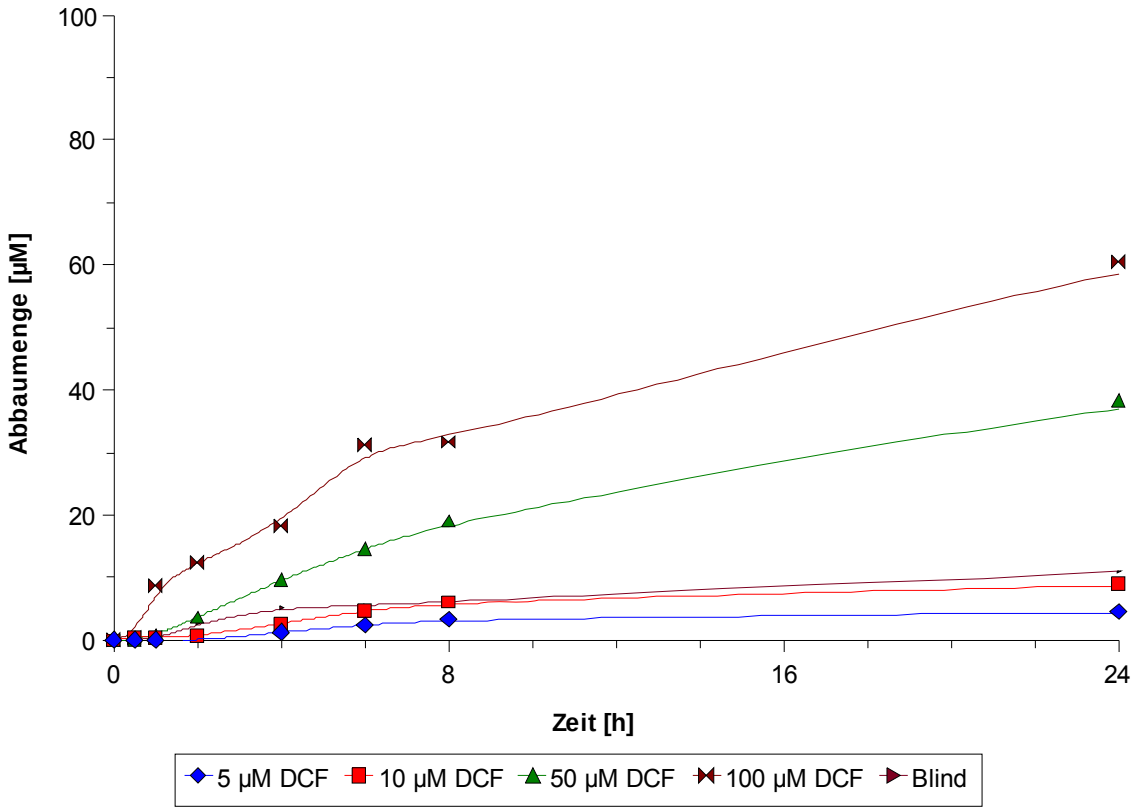


Abbildung 32: Abbaumenge von Diclofenac bei 365 nm mit ZnO - Nanokristalliten, gebunden auf S-Layer von L. sphaericus JG A-12

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine zusätzliche Temperierung der Präparationen bei 70 °C nach der Dialyse bzw. der Einsatz getrockneter Präparationen, d. h. in Pulverform, einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Abbaus von Diclofenac besitzen. Dabei wurden auf je 1 mg ZnO normierte Probenansätze verwendet. Es zeigt sich, dass der photokatalytische Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit dem kommerziellen ZnO – Nanopulver schneller verläuft als mit den auf S-Layer von *L. sphaericus* JG A-12 ausgefällten ZnO – Nanokristalliten (Abbildung 33). Während mit dem kommerziellen ZnO – Nanopulver als Photokatalysator nach 24 h Bestrahlung mit UV-Licht Diclofenac komplett abgebaut wurde, konnten mit dem auf dem S-Layer gebundenen ZnO – Nanokristalliten als Photokatalysator nach 24 h nur ca. 40 % der Anfangskonzentration Diclofenac abgebaut werden. Nach 48 h Bestrahlung mit UV-Licht lag der Umsatz dann bei 60 – 65 %. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den auf S-Layer gebundenen ZnO – Nanokristalliten mit einer Temperierung bei 70 °C für 30 min nach der Dialyse und ohne eine Temperierung.

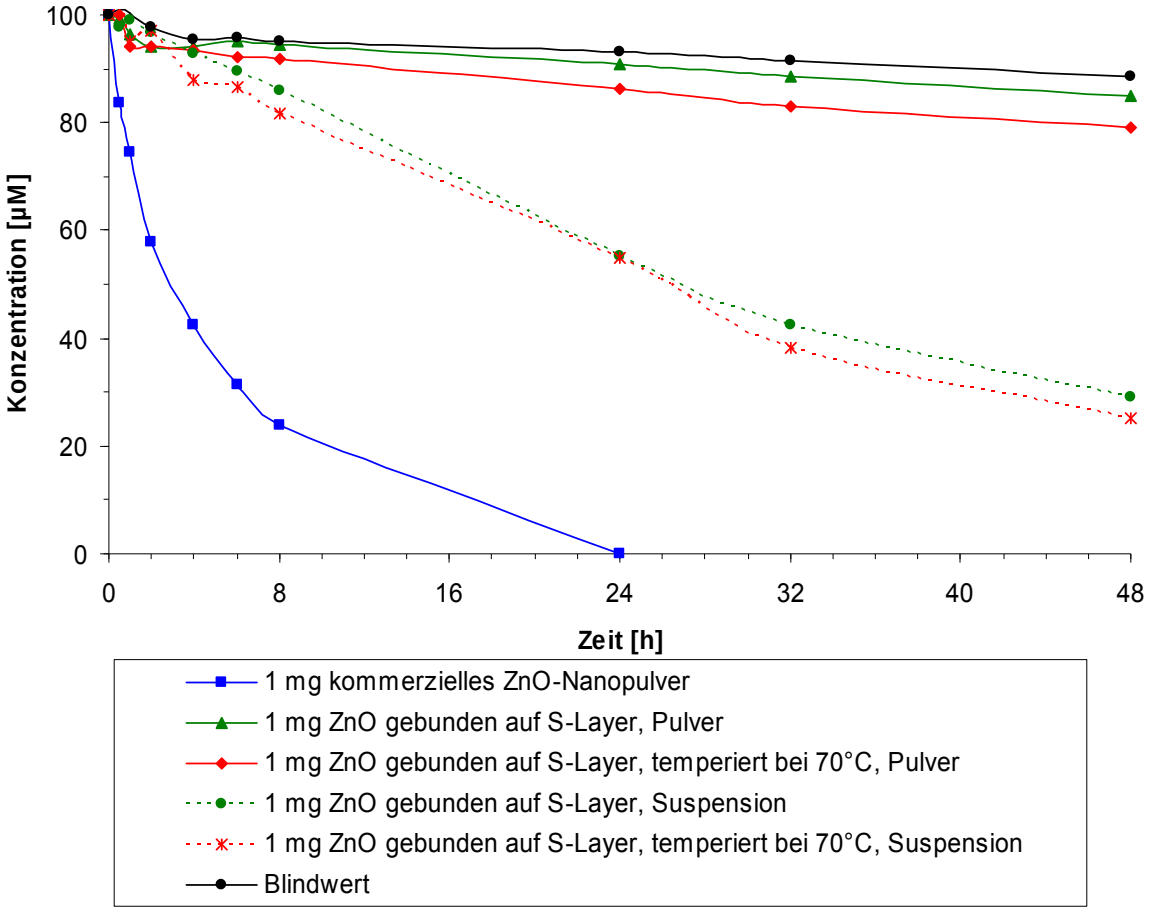


Abbildung 33: Vergleich Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit verschiedenen ZnO – Nanopartikeln

Dahin gegen war festzustellen, dass sich bei der Verwendung der getrockneten pulverförmigen ZnO – S-Layer – Präparationen die photokatalytische Aktivität der ZnO – Nanokristallite stark abnahm. Es kam nach 48 h Bestrahlung nur zu einem Abbau von 10 % des Diclofenac.

Ein weiterer Arbeitspunkt war die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Trägermaterialen als Fixierung des S-Layer auf die photokatalytische Aktivität des gebundenen ZnO gegenüber dem Abbau von Diclofenac. Zunächst wurden Suspensionen mit reinem SBA 15 (SiO_x) sowie SBA 15 beschichtet mit S-Layer von *L. sphaericus*. JG A-12 und mit reinem Puralox (Al_2O_3) sowie Puralox beschichtet mit S-Layer hergestellt. In allen Suspensionen erfolgte anschließend die ammoniakalische Ausfällung von ZnO mittels Zugabe von $ZnCl_2$ und NH_3. Parallel wurden als Referenz Suspensionen nach dem gleichen Schema ohne Trägermaterialien bzw. ohne Beschichtung mit ZnO vorbereitet.

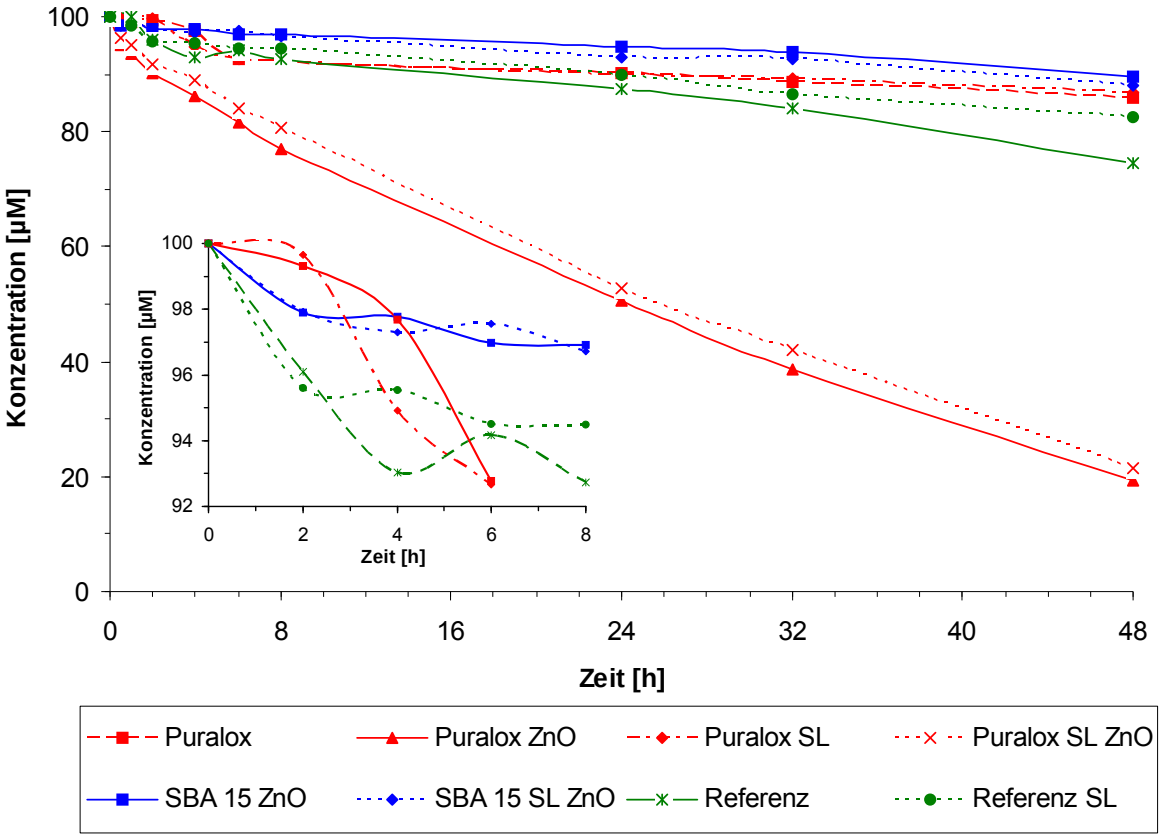


Abbildung 34: Abbau von Diclofenac bei 365 nm mit je 1 mg ZnO, mit und ohne S-Layer von L. sphaericus JG A-12 auf SBA 15 (SiO_x) und auf Puralox (Al_2O_3) gebunden, sowie ohne Trägermaterial

In Abbildung 34 sind die dazugehörigen Ergebnisse dargestellt. Es zeigte sich, dass Puralox als Trägermaterial die photokatalytische Aktivität von ZnO verbesserte. So wurde sowohl mit als auch ohne Beschichtung von Puralox mit S-Layer ein Abbau von 80 % des eingesetzten Diclofenac nach 48 h Bestrahlung mit 365 nm UV-Licht erzielt. Dahingegen war für die Referenzproben und die Proben mit SBA 15 als Trägermaterial bzw. Puralox ohne Beschichtung mit ZnO nur eine geringe bzw. keine photokatalytische Aktivität des ZnO in Bezug auf den Abbau von Diclofenac nachweisbar.

Neben diesen pulverförmigen Materialien wurden auch Aluminiumzylinder (Höhe 10 mm, Durchmesser 10 mm, Wandstärke 3 mm) für die Untersuchungen eingesetzt. Die Versuche mit den kompletten Aluminiumzylindern beschichtet mit ZnO zeigten die höchste Abbauleistung von Diclofenac nach 48 h Bestrahlung mit 365 nm UV-Licht für die mit PEI/PSS + S-Layer A12 + ZnO beschichteten Aluminiumoxidzylinder von ca. 30 %. Mit den mit S-Layer A12 + ZnO beschichteten Aluminiumoxidzylinder wurde noch eine Abbauleistung von ca. 20 % nach 48 h erzielt. Für die anderen Präparationsansätze, unbeschichtetes Al_2O_3, nur mit ZnO beschichtetes Al_2O_3 und nach RCA gewaschenes und mit S-Layer A12 + ZnO beschichtetes Al_2O_3, (Abbildung 35) lagen die Abbauleistungen im Bereich des Blindansatzes, bestehend aus 100 µM Diclofenac in dreifachdestilliertem Wasser. Zur Bewertung dieser Beobachtungen wurde das an die Träger gebundene ZnO erneut bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die gebundene Menge an ZnO deutlich

geringer war als berechnet. Daraus ergibt sich auch eine Ursache für die vergleichsweise geringe photokatalytische Aktivität der präparierten Trägersysteme im Vergleich mit kommerziell hergestellten ZnO – Nanopartikeln und in Suspension auf S-Layer ausgefällten ZnO – Nanopartikeln.

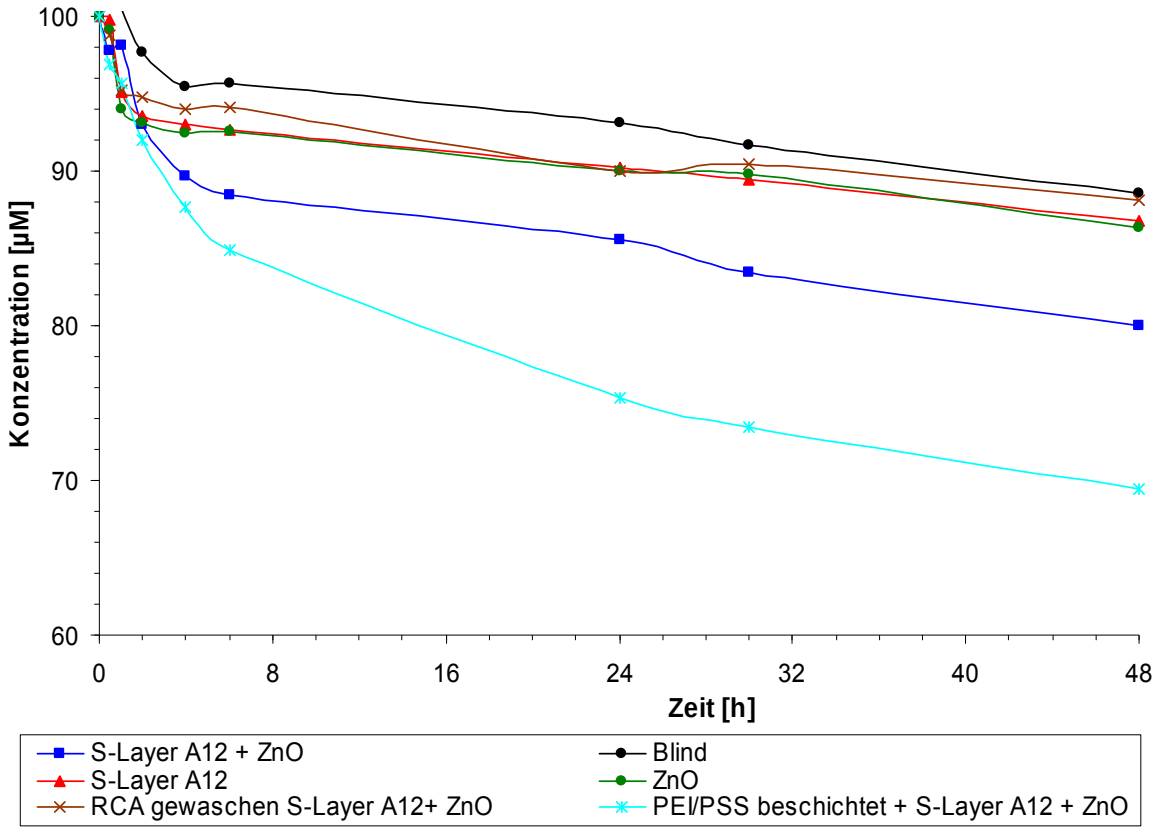


Abbildung 35: photokatalytischer Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm mit ZnO beschichteten Aluminiumoxidträgern

Für weitere Versuche wurden verschiedene Größenfraktionen von zerkleinerten Aluminiumoxid-zylindern eingesetzt. Im Vergleich mit den unzerkleinerten Aluminiumoxidzylindern zeigte sich für die Verwendung der zerkleinerten Aluminiumoxidzylinder als Trägermaterial für das ZnO, welches auf den darauf beschichteten S-Layer ausgefällt wurde, eine verbesserte photokatalytische Aktivität im Bezug auf dem Abbau von Diclofenac. So erbrachte die Charge von 1 – 2 mm Aluminiumoxidpartikeln, beschichtet mit S-Layer und ZnO, eine Abbauleistung von 87 % nach 48 h Bestrahlung mit UV-Licht von 365 nm Wellenlänge (Abbildung 36). Die Bestimmung des gebundenen ZnO mittels ICP-MS zeigte eine Bindung von ca. 50 % des eingesetzten Zinks, d. h. insgesamt 39 mg ZnO wurden auf dem Aluminiumoxid ausgefällt und 13 mg ZnO pro Ansatz eingesetzt. Nach Reinigung mit dreifachdestilliertem Wasser erzielte die gleiche Charge nach 2 Wochen noch eine Abbaurate von 40 % für den photokatalytischen Abbau von Diclofenac bei 365 nm. Die Abnahme der Abbauleistung ist wahrscheinlich im Abwaschen von ZnO von der

Oberfläche des Aluminiumsoxids während des Waschens mit dreifachdestilliertem Wasser zu begründen.

Mit dem mesoporösen Al_2O_3 Puralox als Trägermaterial wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. So wurden ca. 45 % des eingesetzten Zn als ZnO auf der Oberfläche des mit S-Layer A-12 beschichteten Puralox ausgefällt. Mit je auf 1 mg ZnO normierten Ansätzen wurden ca. 78 % des Diclofenac nach 48 h UV-Bestrahlung bei 365 nm abgebaut. Vergleichsversuche mit der gleichen Charge nach 6 Monaten wiesen eine Abnahme der photokatalytischen Aktivität für 1 mg ZnO auf 47 % nach 48 h Versuchsdauer nach.

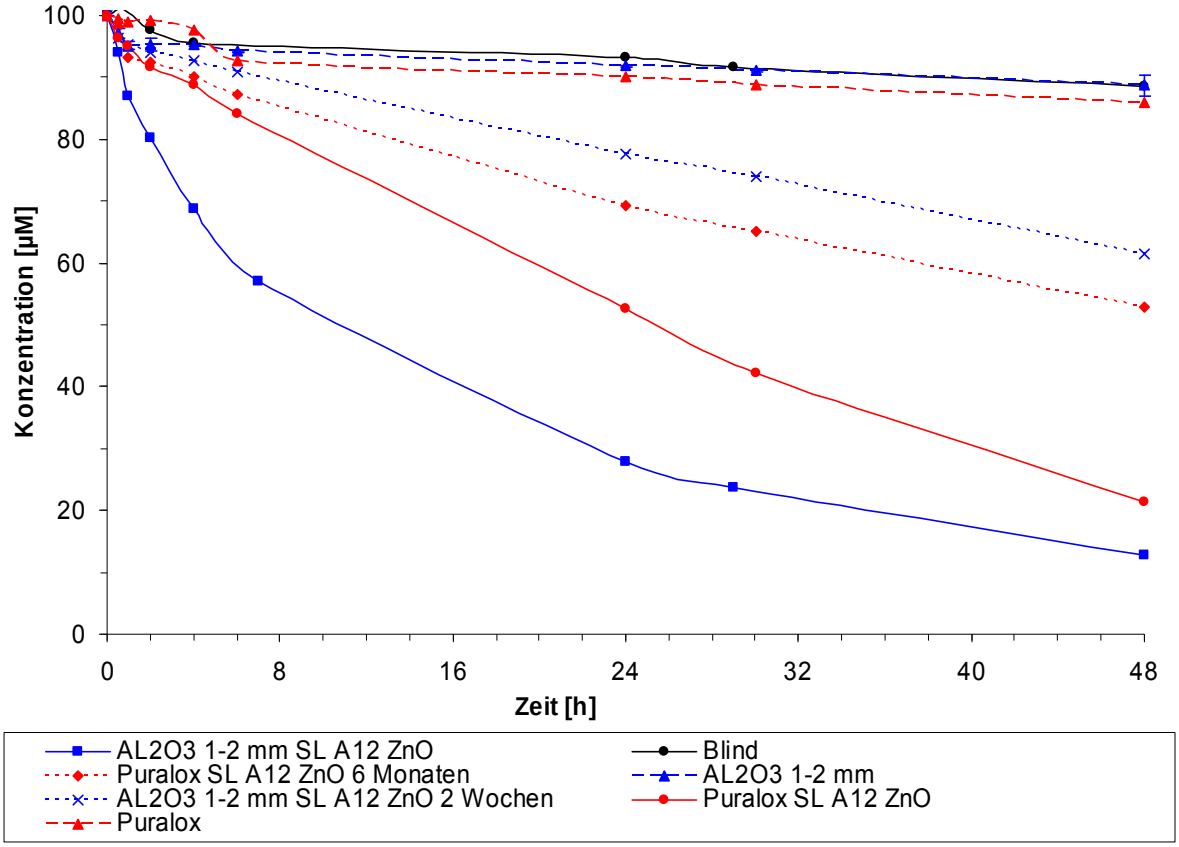


Abbildung 36: photokatalytischer Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm im Vergleich mit ZnO beschichteten Puralox und nach Größe klassierten Aluminiumoxidträgern

Eine Zusammenstellung der an verschiedene Trägermaterialien gebundenen Menge an ZnO und die in den Versuchsansätzen erreichten Abbauraten für Diclofenac sind in der Tabelle 5 und 6 dargestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden Geschwindigkeiten, diese auf die Menge an eingesetzten Zink normiert.

Tabelle 5: Zusammenfassung Bindung S-Layer und ZnO und Abbau Diclofenac

Präparation	Gebundenes ZnO [mg / g Träger]	Gebundener S-Layer [mg / g Träger]
Al_2O_3 Zylinder + ZnO (Gegenprobe)	1,45 (0,12)	0
Al_2O_3 Zylinder + SL A12	0	0,013
Al_2O_3 Zylinder + SL A12 + ZnO (Gegenprobe)	1,36 (0,09)	0,013
Al_2O_3 Zylinder; RCA gew. + SL A12 + ZnO	8,29	0,325
Al_2O_3 Zylinder; RCA gew., PEI/PSS + SL A12 + ZnO	10,95	0,58
Puralox (Al2O3) + SL A12 + ZnO (6 Monate)	21,2	50
Al_2O_3 (1 – 2 mm) + SL A12 + ZnO (2 Wochen)	23,53	0,6

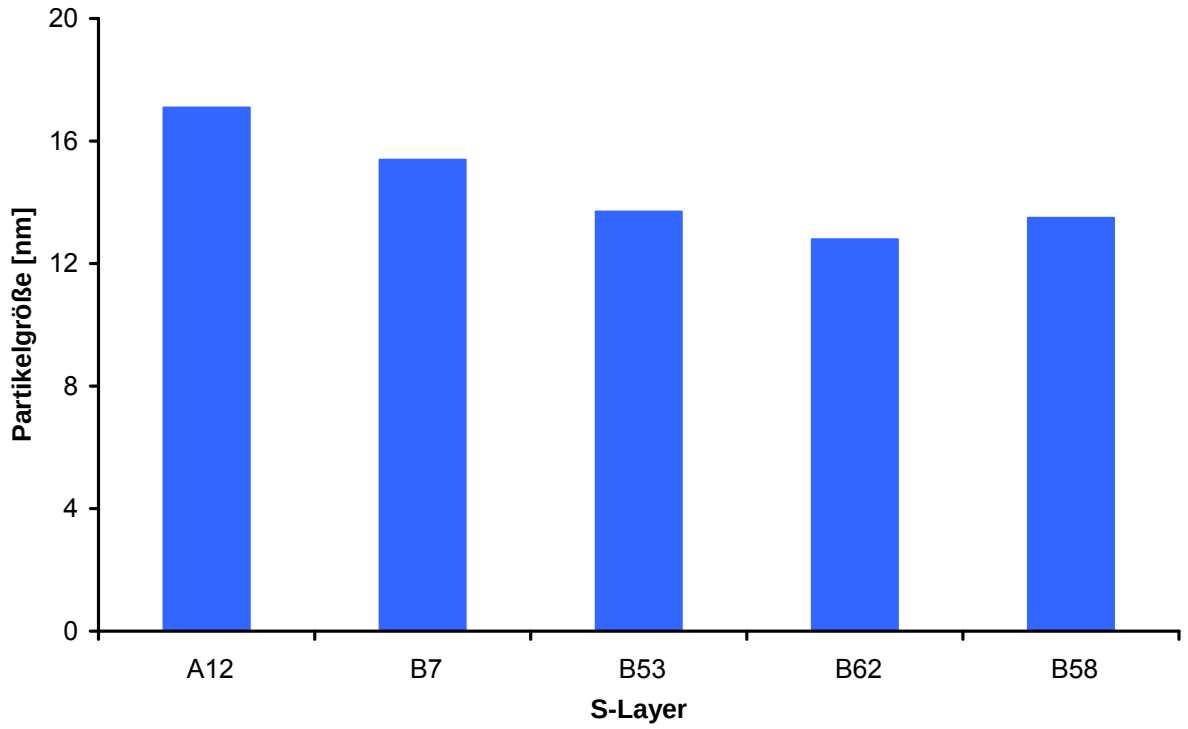
Tab. 6: Diclofenac-Abbaugeschwindigkeiten mit verschiedenen ZnO-Nanopartikel

Material	Behandlung	Abbaurate [µM/h]
ZnO (technisch)		20,8
ZnO (chemisch)		2,9
S-Layer	Abscheidung von ZnO, Trocknung	0,8
	Abscheidung von ZnO, temperiert bei 70, Trocknung°	1,3
	Abscheidung von ZnO	1,7
	Abscheidung von ZnO, temperiert bei 70	2,2
	Abscheidung von ZnO, optimierte S-Layer-Präparation	3,7
SBA 15	Blindwert (ohne ZnO)	0,5
	Immobilisierung von S-Layern	0,4
	Immobilisierung von S-Layern und Abscheidung von ZnO	2,8
Puralox	Blindwert (ohne ZnO)	3,0
	Immobilisierung von S-Layern	2,7
	Immobilisierung von S-Layern und Abscheidung von ZnO	2,6

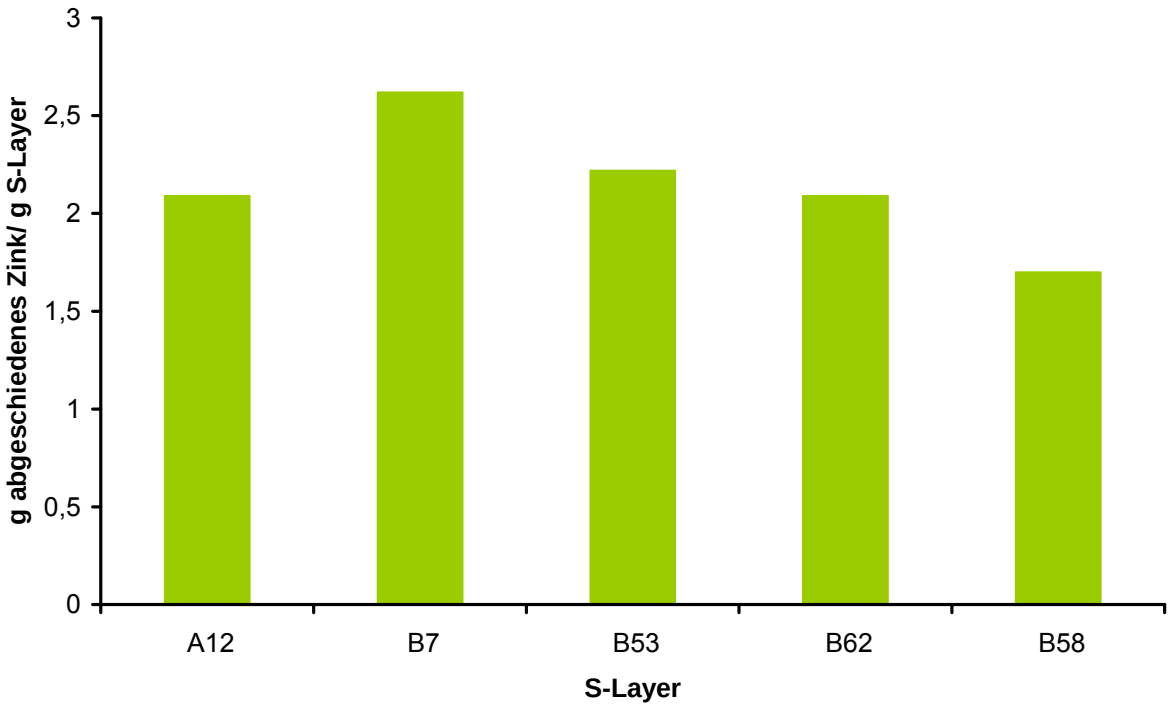
Die erhaltenen Werte zeigen, dass die Art und Weise der Abscheidung der ZnO-Nanopartikel ebenso einen Einfluss auf deren katalytische Aktivität besitzt wie auch das Trägermaterial selbst und die Art der S-Layer-Präparation. Werden die Ansätze zur Abscheidung von ZnO-Partikeln auf S-Layern während des Prozesses temperiert steigt die Abbaugeschwindigkeit des Diclofenac deutlich an. S-Layer geträgerte ZnO-Partikel zeigen ohne eine weitere Trocknung eine doppelt so große Abbaugeschwindigkeit als getrocknete. An Hand der beiden eingesetzten Trägermaterialien SBA 15 (SiO_2) und Puralox (Al_2O_3) wird auch der Einfluss des Trägermaterials auf die photokatalytische Aktivität der hergestellten ZnO-Nanopartikel deutlich. Während Puralox zu einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führt, wird bei der Verwendung von SBA 15 eine Steigerung der Geschwindigkeit im Vergleich zu auf S-Layern abgeschiedenen ZnO von ca. 33% beobachtet.

Weiterhin wurde der Einfluss von verschiedenen S-Layern auf die Bildung von ZnO-Nanopartikel untersucht. Dazu wurden S-Layer der Isolate B 7, B 53, B 58 und B 62 verwendet. Die Isolate wurden aus Bodenproben der Uranabfallhalde „Haberland“ in der Nähe von Johanngeorgenstadt in Sachsen gewonnen. Mit den Stämmen JG-B7, JG-B53 und JG-B62 wurden phylogenetisch eng verwandte Stämme zum Isolat *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12. Des Weiteren wurde der Stamm *Bacillus* sp. JG-B58 untersucht, welcher mit den zuvor genannten Stämmen nur gering verwandt ist.

Bei ersten Untersuchungen wurde die Größe der auf den jeweiligen S-Layern abgeschiedenen ZnO-Nanopartikel und die Menge an abgeschiedenem Zink bestimmt. In den folgenden Abbildungen 36 und 37 sind die dazugehörigen Ergebnisse dargestellt.



Abbildungen 36: Größe, der abgeschiedenen ZnO-Nanopartikel



Abbildungen 37: Menge an abgeschiedenem Zink je S-Layer

Die Größe der abgeschiedenen Nanopartikel variiert im Bereich von 12,8 bis 17,1 nm. Die Menge an gebundenen Zinkes variiert im Bereich von 1,7 und 2,6 g Zink je g S-Layer. Die so erhaltenen ZnO-Nanopartikel wurden für die Versuche zum photokatalytischen Abbau von Diclofenac eingesetzt.

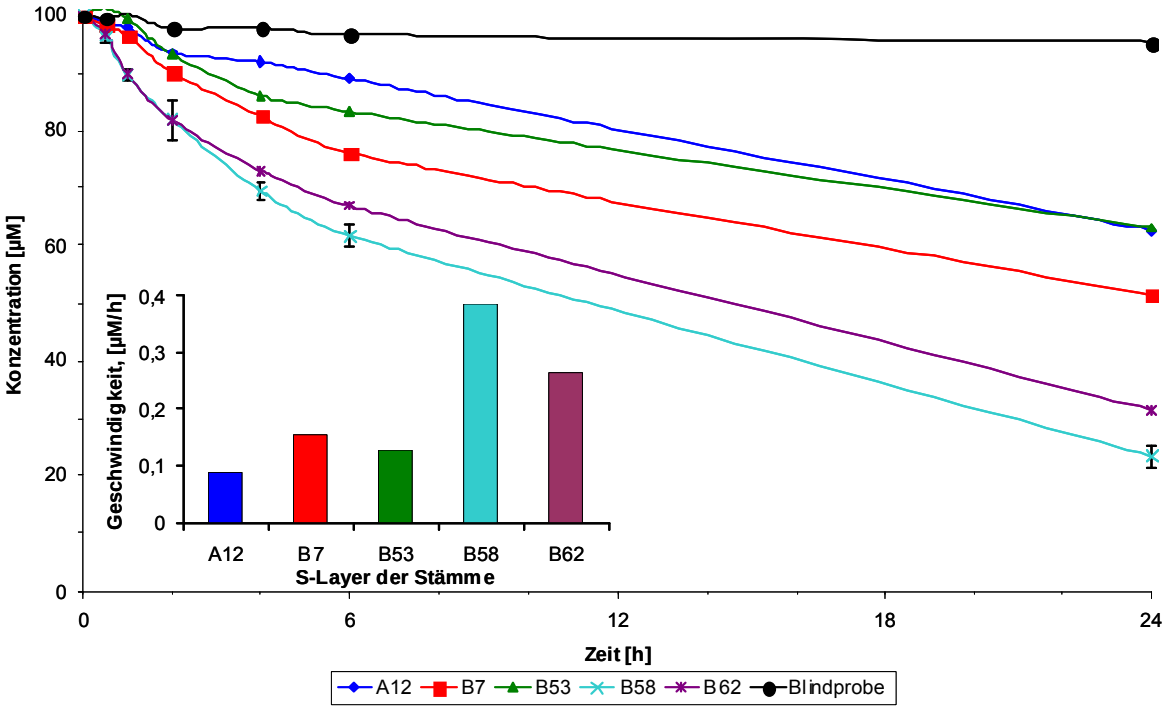


Abbildung 38: Photokatalytischer Abbau von Diclofenac und Reaktionsgeschwindigkeiten

In der Abbildung 38 wird der Abbau von 100 µM Diclofenac durch verschieden geträgerte ZnO-Nanopartikel sowie die dabei erreichten Reaktionsgeschwindigkeiten bezogen auf 1 mg ZnO dargestellt. Es zeigt sich, dass die auf den S-Layern von B58 abgeschiedenen ZnO-Nanopartikel die höchste Geschwindigkeit bei dem Abbau von Diclofenac erreicht. Weitere Optimierungen zur photokatalytischen Mineralisierung von Diclofenac sollten mit ZnO-Partikeln, abgeschieden auf B58-S-Layern durchgeführt werden.

AP 3-4.2 Photokatalyse von Diclofenac mit TiO_2 als Photokatalysator

Als weiterer Photokatalysator wurde TiO_2 verwendet. Die erhaltenen Resultate für den Abbau von Diclofenac sind im folgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

Für das auf S-Layer bei pH 5 ausgefällte TiO_2 zeigte sich, dass mit zunehmender Zeitdauer der thermischen Behandlung des TiO_2 ein Anstieg der photokatalytischen Aktivität (Abbildung 39). Das bei pH 6,25 und pH 7,35 ohne S-Layer ausgefällte TiO_2 zeigte eine geringere photokatalytische Aktivität als das bei pH 5 auf S-Layer ausgefällte TiO_2. Der Einfluss der Zeitdauer der thermischen Behandlung des TiO_2 auf dessen photokatalytische Aktivität ist auch in diesen beiden Fällen zu beobachten. In allen drei betrachteten Fällen wird mit einer Verlängerung der thermischen Behandlung eine höhere photokatalytische Aktivität erreicht.

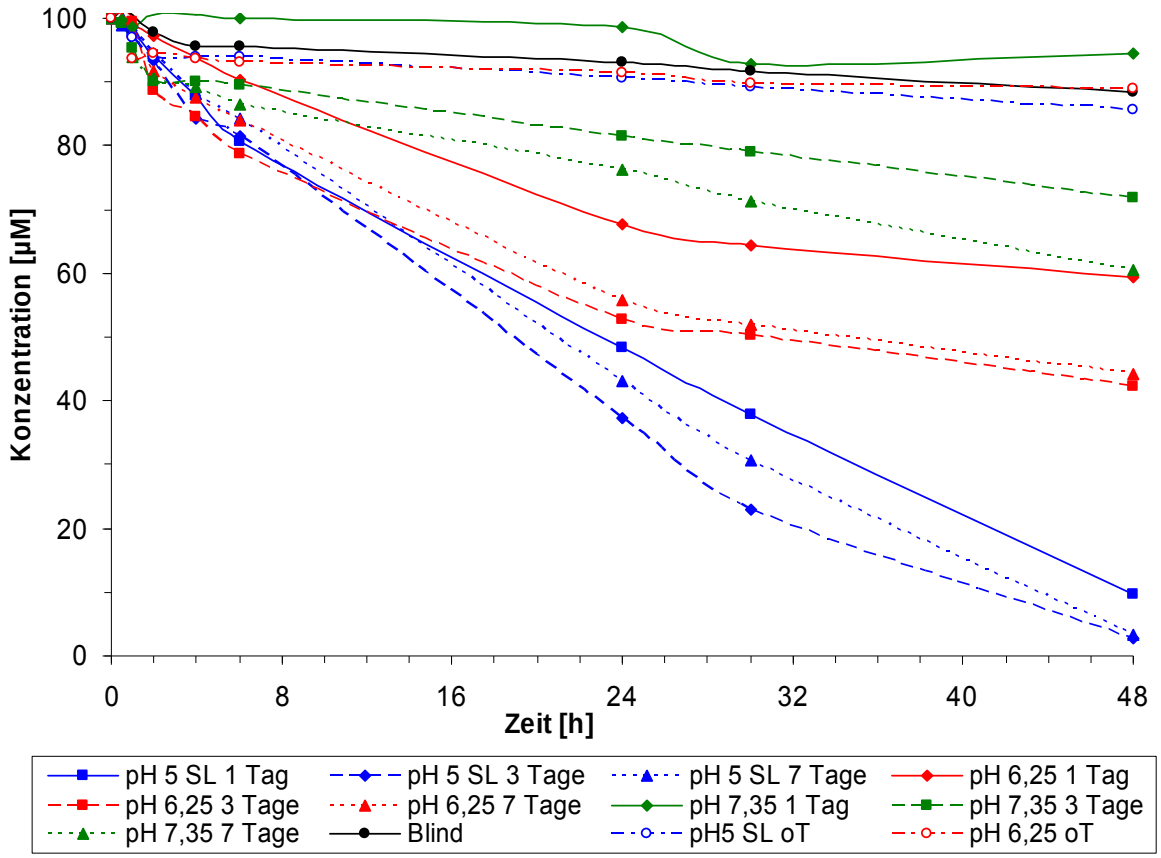


Abbildung 39: Einfluss der Zeitdauer der thermischen Behandlung von TiO_2 bei 70 °C auf die photokatalytische Aktivität von 1 mg TiO_2 beim Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm

Im Abbildung 40 sind die Reaktionsgeschwindigkeiten v_{24h} innerhalb der ersten 24 h beim Abbau von 100 µM Diclofenac für die vorangegangen TiO_2 Präparationen dargestellt. Die Berechnung folgte nach der Gleichung (1).

$$v_{24h} = \frac{c_O - c_{24h}}{24h} \qquad [\mu M/h] \qquad (1)$$

Für das bei pH 5 auf S-Layer ausgefällte TiO_2 stieg die Reaktionsgeschwindigkeit v_{24h} nach einem Tag thermischer Behandlung bei 70 °C von 2,2 µM/h auf 2,6 µM/h nach drei Tagen an und fiel auf 2,37 µM/h nach sieben Tagen ab (Abbildung 40). Bei den Präparationen ohne Zugabe von S-Layer zeigte sich ein ähnlicher Zusammenhang nur das die Reaktionsgeschwindigkeiten kleiner waren. Zusammenfassend bedeutet dies, dass das für drei Tage thermisch behandelte bei pH 5 auf S-Layer ausgefällte TiO_2 im Vergleich zu den anderen Präparationen die höchste photokatalytische Aktivität besaß und die höchste Reaktionsgeschwindigkeit nach 24 h erzielt wurde.

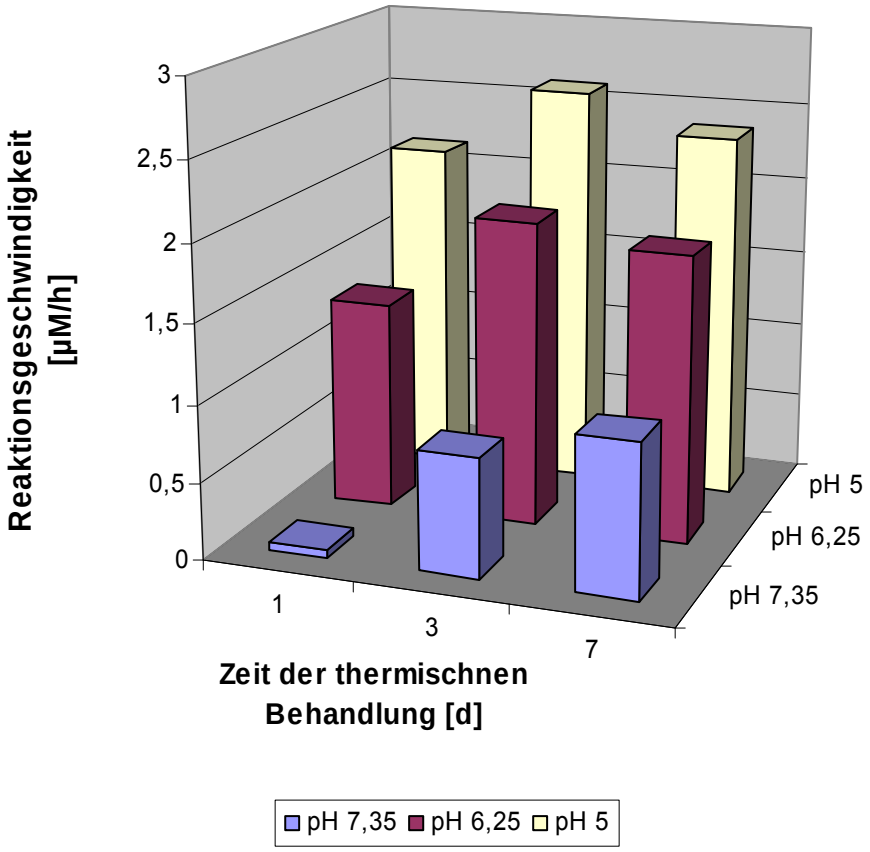


Abbildung 40: Reaktionsgeschwindigkeiten nach 24 h für den photokatalytischen Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm in Bezug auf Zeitdauer der thermischen Behandlung bei der Herstellung des Katalysators TiO_2

Neben der thermischen Behandlung kann auch der pH-Wert bei der Ausfällung einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der erhaltenen TiO_2 -Nanopartikel haben. In der Abbildung 41 sind die bei der Untersuchung dieses Zusammenhangs erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Die besten

Abbauleistungen wurden mit den bei pH 6 ausgefällten TiO_2 –Nanopartikel erzielt. Innerhalb von 24 h wurden mehr als 95 % des Diclofenac vollständig abgebaut. Nach 30 h wurde der vollständige Abbau des Diclofenac erreicht. Mit den bei pH 6,5 ausgefällten TiO_2 –Nanopartikeln lag die Abbaurate für Diclofenac bei 90 % nach 24 h und bei 99,5 % nach 30 h. Mit Ausnahme von pH 7 wurden 60 – 80 % des Diclofenac photokatalytisch mit den TiO_2 – Nanopartikeln nach 24 h abgebaut.

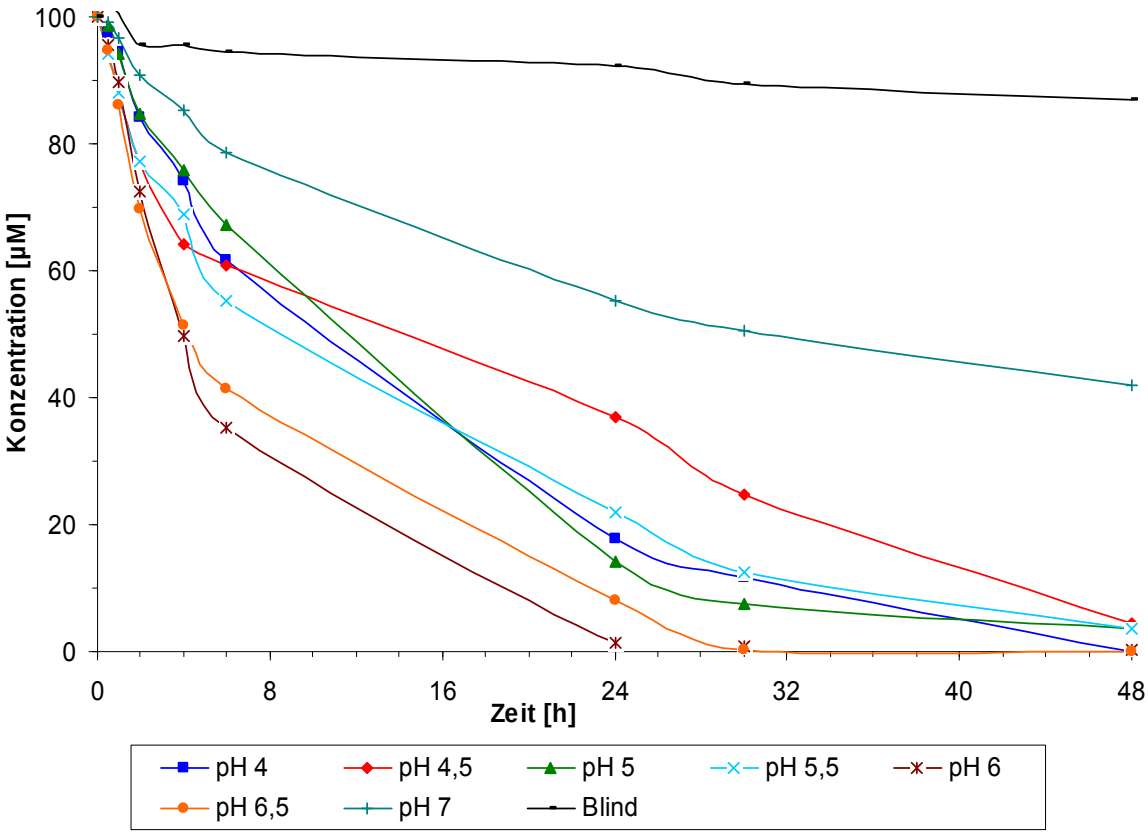


Abbildung 41: photokatalytischer Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm mit 1 mg bei pH 4 – 7 ausgefälltem TiO_2

Weitere Versuche wurde mit 1 mg auf S-Layer von *L. sphaericus* JG-A12 bei pH 5 – 7 ausgefälltem TiO_2 durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war es den Einfluss der S-Layer auf die katalytische Aktivität der erhaltenen Nanopartikel festzustellen. Für den photokatalytischen Abbau des Diclofenac mit den am S-Layer von JG-A12 gebundenen TiO_2 – Nanopartikeln zeigt sich ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert bei der Ausfällung der Nanopartikel und ihrer photokatalytischen Aktivität (Abbildung 42). So nimmt die Abbaurate von > 80 % nach 24 h für die bei pH 5 ausgefällten Nanopartikel auf < 5 % bei pH 7 ab. Nach 48 h ist bei pH 5 das Diclofenac fast vollständig mineralisiert wurden wohingegen die bei pH 7 hergestellten Nanopartikel nur einen Umsatz von ca. 15 % des Diclofenac katalysierten. Im Gegensatz dazu war nach 24 h mit 1 mg technischem Anatas als Photokatalysator das Diclofenac vollständig mineralisiert wurden. Das

technische Rutil zeigte fast keine photokatalytische Aktivität. So wurden nur 10 % des Diclofenac nach 48 h abgebaut.

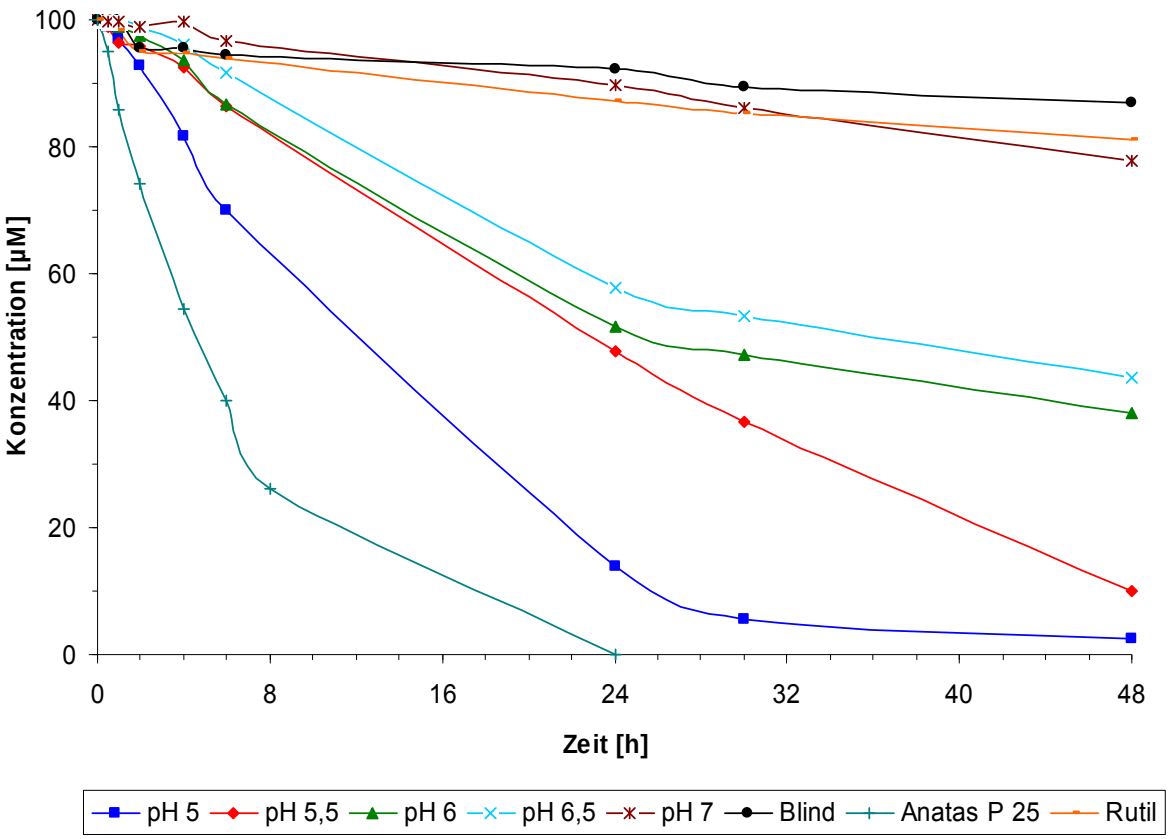


Abbildung 42: photokatalytischer Abbau von 100 µM Diclofenac bei 365 nm mit 1 mg auf S-Layer von L. sph. JG-A12 bei pH 5 – 7 ausgefälltem TiO_2

Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den Reaktionsgeschwindigkeiten des Diclofenac- Abbaus wider. Mit ansteigendem pH-Wert bei der Ausfällung des TiO_2 von pH 5 auf 7 nahm die Reaktionsgeschwindigkeit v_{6h} von 5 µM/h auf 0,6 µM/h ab. Für Anatas P 25 wurde ein höherer Wert von 10 µM/h berechnet, während v_{6h} für Rutil und den Ansatz ohne TiO_2 (Blind) nur Bereich von 1 µM/h lag. D. h. bei der Ausfällung von TiO_2 auf dem S-Layer verschiebt sich im Vergleich zur Ausfällung des TiO_2 ohne S-Layer die höchste photokatalytische Aktivität von pH 6 auf pH 5 bei der Herstellung des TiO_2.

In der Abbildung 43 sind zum Vergleich die Reaktionsgeschwindigkeiten der TiO_2-Nanopartikel dargestellt. Ein Teil der Partikel ist durch chemische Abscheidung in Suspension hergestellt und ein zweiter Teil Partikel wurde chemisch auf S-Layern abgeschieden.

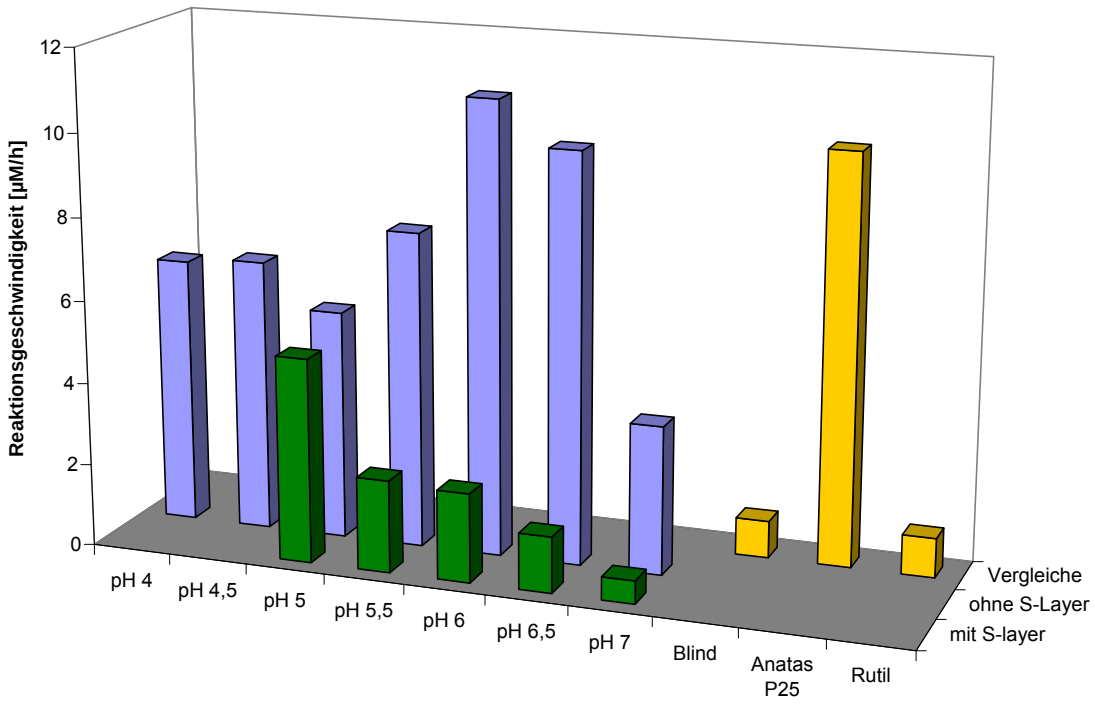


Abbildung 43 Reaktionsgeschwindigkeiten von verschieden hergestellten TiO_2-Nanopartikeln

Die erhaltenen Werte zeigen, dass die chemisch abgeschiedenen TiO_2-Nanopartikel eine höhere katalytische Aktivität als die S-Layer geträgerten aufweisen. In weiteren Untersuchungen ist zu testen, ob eine Temperierung der Ansätze während der Abscheidung einen ähnlichen Einfluss auf die Aktivität der S-Layer geträgerten Partikel besitzen wie auch für die ZnO-Partikel. Ebenso sollte der Effekt von anderen Trägermaterialien, z.B. SBA 15 (siehe auch Ergebnisse von ZnO-Nanopartikeln) auf die TiO_2-Nanopartikel getestet werden.

AP 3-4.3 Photokatalytischer Abbau von Diclofenac mit dotierten TiO_2- und ZnO-Nanopartikeln

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz von Nanopartikeln eine Mineralisierung von Diclofenac im UV-A Bereich des Lichtes möglich ist. Es soll untersucht werden, ob durch das gezielte Einbringen von Dotierungen in die Nanopartikel eine Verschiebung des für die photokatalytische Reaktion notwendigen Lichtes in den sichtbaren möglich ist. Es konnte für Zn dotierte TiO_2-Nanopartikel ein Abbau von Diclofenac nachgewiesen werden.

Für die Versuche wurden TiO_2-Nanopartikel dotiert mit Zn/ZnO sowie ZnO dotiert mit Ce eingesetzt. Im Rahmen des Vorhabens wurden erste Versuche zur Wirksamkeit dieser Nanopartikel bei photokatalytischen Mineralisierung von Diclofenac durchgeführt. Für einen Vergleich der erzielten Abbauleistung mit den vorangegangen Untersuchungen an nicht dotierten Nanopartikeln wurden diese Versuche ebenfalls mit Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt.

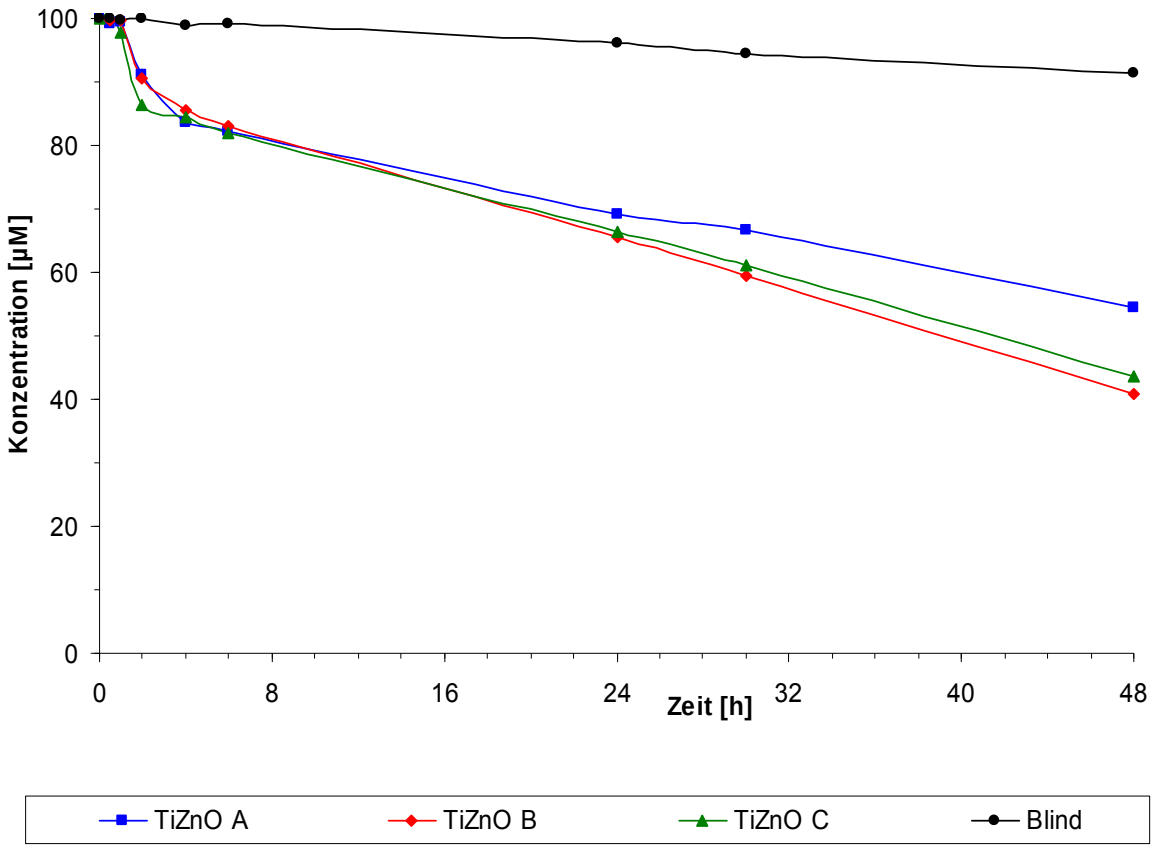


Abbildung 44: Abbau von 100 µM DCF mit TiO_2 Dotierungen mit Zn bei 365 nm

Die in der Abbildung 44 dargestellten Daten zum Abbau von 100 µM Diclofenac mit Zink dotierten TiO_2-Nanopartikeln zeigen dass ein Abbau stattfindet. Die dabei erreichte Geschwindigkeit beträgt ca. 2,8 µM/h. Damit liegt sie in der gleichen Größenordnung wie die Abbaugeschwindigkeiten der S-Layer geträgerten TiO_2-Nanopartikel. Test zum photokatalytischen Abbau von Diclofenac im sichtbaren Bereich des Lichtes stehen noch aus.

In Abbildung 45 sind die Werte aus den Versuchen mit Ce dotierten Nanopartikeln dargestellt.

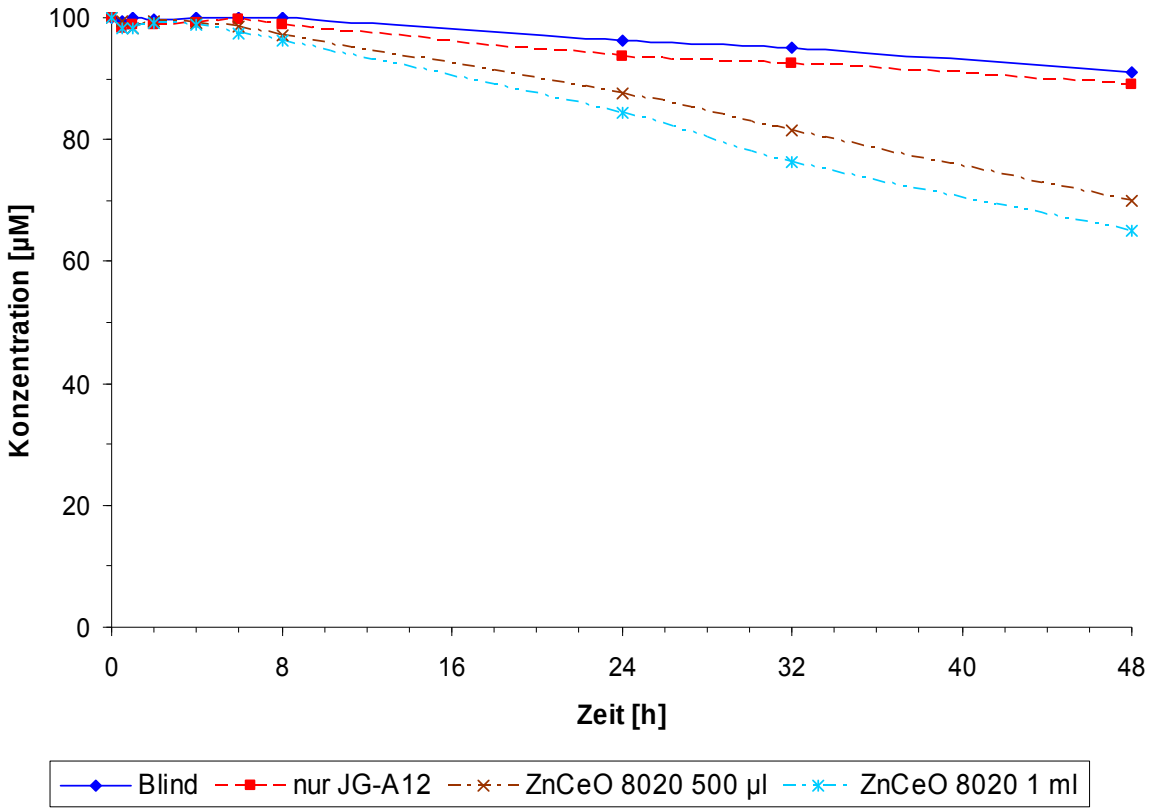


Abbildung 45: photokatalytischer Abbau von 100 µM DCF bei 365 nm mit ZnO dotiert mit Ce

In diesen Versuchen konnte innerhalb der ersten 6 Stunden kein wesentlicher Abbau von Diclofenac festgestellt werden.
Die Ergebnisse zur Verwendung von dotierten Nanopartikeln für den photokatalytischen Abbau von Diclofenac werden weiter untersucht und Experimente mit entsprechenden Tageslichtstrahlern durchgeführt.

AP 3-3: Fluoreszenzspektroskopie

Die im Rahmen des Projektes hergestellten photokatalytischen Nanopartikel zeigen zwar eine deutliche Aktivität, die einen Abbau von Arzneimitteln wie z.B. das im Projekt verwendete Diclofenac ermöglicht, aber für eine genaue Untersuchung der Abbaukinetik fluoreszierender Arzneimittel sind die erreichten Reaktionskinetiken noch zu langsam. Durchgeführte Experimente mit Fluoreszenzfarbstoffen zeigten keinen Abbau und keine Veränderung im mikroskopischen Bild innerhalb einer Stunde. Aus diesem Grund beschäftigen sich aktuelle Arbeiten intensiv mit der Erhöhung der photokatalytischen Aktivität der Nanopartikel. Beim Erreichen eines vollständigen Abbaus von Diclofenac und entsprechender Farbstoffe innerhalb weniger Stunden, ist der Versuchsaufbau geeignet, um entsprechende Aktivitäten, den Einfluss des Trägers, der verwendeten S-Layer sowie einer entsprechenden organischen Hintergrundmatrix auf die Eliminierung des Arzneimittels wie geplant zu untersuchen. Im Rahmen verschiedener Gespräche mit dem Institut für Wasserchemie der TU-Dresden wurde auch als wichtiger Aspekt die

Untersuchung der Lebenszeit der Sauerstoff- und Hydroxylradikale (im µs-Bereich) in Abhängigkeit der zuvor genannten Parameter zur Abschätzung der Wirksamkeit eines Materials identifiziert. Untersuchungen dazu können ebenfalls mit dem etablierten Kamerasystem durchgeführt werden. Aktuell werden diesbezüglich verschiedene Farbstoffe auf ihre Eignung hin untersucht. Ergänzt werden diese Untersuchungen dann durch entsprechende zeitaufgelöste Laser-induzierte fluoreszenzspektroskopische Analysen.

AP 4: Vorbereitung einer Überführung der Nanokatalysatoren in eine technische Nutzung

In diesem Arbeitspunkt wurden die im AP 1 hergestellten Nanopartikel in Laborphotobioreaktoren der UMEX GmbH getestet. Gemeinsam mit den Partnern der UMEX GmbH konnten aus diesen Untersuchungen weitere Anforderungen an die Nanopartikel und die Photoreaktoren abgeleitet werden. Damit sind die Fragestellungen dieses Arbeitspaketes im ausreichenden Maße beantwortet und bilden eine hervorragende Grundlage für die bereits begonnene weitere Zusammenarbeit.

Den Partnern UMEX GmbH und FZD gelang es ausgehend von den Ergebnissen der photokatalytischen Mineralisierung von Diclofenac und dem ingenieurtechnischen Know How Anforderungen an die Immobilisierung der katalytisch aktiven Nanopartikel und den Energieeintrag in den Photoreaktor zu formulieren. Darüber hinaus wurde ein Photoreaktor für Untersuchungen im Labormaßstab entwickelt und gebaut. Die dazu notwendigen Überlegungen und Arbeiten werden im folgenden Abschnitt ausführlich dargestellt.
Katalytische Reaktionen sind von großer kommerzieller Bedeutung und aus der Chemietechnik nicht mehr wegzudenken, daher besteht ein stetiger Bedarf an der Entwicklung effizienterer Katalysatoren. Für den Abbau von organischen Schadstoffen in Wasser wie z.B. von Arzneimittel-Reststoffen, ist insbesondere die Verwendung von fotokatalytisch aktiven Nanopartikel verheißungsvoll. Hierbei kommen insbesondere halbleitende (ZnO, SnO_2, TiO_2, auch mit metallischen und metalloxidischen Dotierungen wie z. B. CeO, Al_2O_3) zum Einsatz. Durch die Bestrahlung der katalytisch aktiven Nanopartikel mit künstlichem UV-Licht, aber auch durch die UV-A-Strahlung der Sonne werden sowohl Wasser als auch Luftsauerstoff zu reaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt. Während der Projektlaufzeit wurden katalytisch aktive Nanopartikel aus Titandioxid und Zinkoxid für die zukünftige technische Nutzung in Photoreaktoren hergestellt. Für eine technische Umsetzung der photokatalytischen Mineralisierung kommen prinzipiell drei verschiedene Verfahren zum Einsatz:

- offene Teiche,
- geschlossene Photorektoren mit natürlichem Sonnenlicht,
- geschlossene Photorektoren mit künstlicher Bestrahlung.

Die offenen Teiche werden bis zu Wassertiefen von 15 bis 20 cm betrieben. In ihnen wird eine relativ geringe Effizienz bedingt durch die begrenzte Lichtzufuhr erreicht. Darüber hinaus besteht

die permanente Gefahr einer Verunreinigungen und ein sehr hoher Wartungsaufwand. Aus diesen und anderen Gründen wurde für die angestrebte Anwendung ein geschlossenes Reaktorsystem entwickelt. Dabei wurden industrielle Photobioreaktoren als Ausgangspunkt der Entwicklung gewählt. Industriell eingesetzte Photoreaktoren sind charakterisiert durch sehr umfassende Möglichkeiten der Kontrolle und Regulierung nahezu aller Prozessparameter. Sie ermöglichen einen Betrieb unter reproduzierbaren Bedingungen. Neben den hauptsächlich verwendeten rohrförmigen Reaktoren, werden auch flache plattenförmige Systeme gebaut. Wie bereits ausgeführt und durch umfangreiche Untersuchungen sowie theoretische Berechnungen belegt, kann eine signifikante Steigerung des Abbaus der organischen Schadstoffe jedoch nur durch eine Erhöhung des Lichteintrages erzielt werden / JABLONKA, H.-J et al Reaktionsfunktionen für die Dimensionierung biologischer Photoreaktoren unter besonderer Berücksichtigung des Verhaltens der Mikroorganismen bei Änderung der stationären Zustände. TU München, Lehrstuhl für Thermodynamik Chemie Ingenieur Technik, Vol. 54, Issue 1, Pages 64-65, 2004./.

Für die praktische Anwendung photokatalytische Prozesse kommen in der Regel Quecksilberdampf-Entladungsstrahler als Lichtquellen zum Einsatz, wobei eine Unterscheidung nach dem Quecksilberdampfdruck im Innern der Entladungsröhre getroffen werden kann. Während Quecksilber-Niederdruckstrahler Strahlungsausbeuten um 40 % im UVC-Bereich aufweisen, ist die Ausbeute für Mitteldruckstrahler deutlich geringer und liegt bei ca. 8 %. Hier ist jedoch eine bis zu 100-fach höhere Absolutleistungsaufnahme möglich.

Die Transformation der erzeugten Strahlung vom UVC in den aktinischen Spektralbereich erfolgt nahezu ausschließlich durch sogenannte Leuchtstoffe, die im Innern des Entladungsraumes auf den Lampenkörper aufgebracht werden. Hierbei handelt es sich im Allgemeinen um feste Stoffe, die durch Anregung mit kurzwelliger Strahlung sichtbares Licht erzeugen.

Neben dem Lichteintrag ist die Art der Immobilisierung der Nanopartikel der zweite Faktor der die Qualität, die Ausbeute in Bezug auf die Mineralisierung und damit die Effizienz des photokatalytischen Prozesses bestimmt. Nur über eine Immobilisierung der Nanopartikel kann verhindert werden, dass das katalytisch aktive Material aus dem Reaktionsraum ausgetragen wird.

Das Prinzip der Oberflächenimmobilisierung ist in der Umwelttechnik weit verbreitet und bildet die Grundlage für eine Reihe von Katalysatorsystemen. Diese Technologie kann auch für die Abscheidung von Nanopartikeln an natürliche oder synthetische Oberflächen genutzt werden. Diese oberflächenimmobilisierten Nanopartikel stehen in unmittelbarem Kontakt mit ihrer Umgebung, was einen hohen Stoffaustausch zwischen den Nanopartikeln und dem sie umgebenden Medium bedingt, aber auch eine ständige mechanische Belastung der immobilisierten Nanopartikeln bewirkt. Für eine Nutzung solcher Biofilme für die Fotokatalyse müssen deshalb eine ganze Reihe von Bedingungen beachtet werden:

- Auswahl geeigneter Nanopartikel
- Realisierung optimaler Prozessbedingungen
- Optimierung von Immobilisierungstechnologien

Photoreaktoren basieren auf der Kombination zweier Grundprozesse. Zum einen wird in den Reaktionsraum aktinisches Licht eingestrahlt und zum anderen befindet sich dort katalytisch aktive Nanopartikel. Um in technischen Systemen hohe Abbauraten zu erzielen, sollte weder der eine noch der andere Prozess die Reaktionsgeschwindigkeit des gewünschten Stoffumsatzes wesentlich limitieren.

Die wird zunächst dadurch erreicht, dass hohe Konzentrationen an Nanopartikeln auf möglichst großen Oberflächen immobilisiert werden. Des Weiteren wird der Reaktor so ausgelegt, dass der gesamte Reaktionsraum einer möglichst hohen und homogenen Beleuchtung unterzogen wird.

Weitere Forderungen an das Gesamtsystem bestehen in einer möglichst großen mechanischen Stabilität der Nanopartikel in den beschichteten Oberflächen und in einer weitgehenden optischen Transparenz der Schichten. Ein Beispiel für eine Umsetzung des Konzeptes in Form eines Laborphotoreaktors ist in der Abbildung 46 gezeigt. Der dargestellte Bioreaktor bildete auch die Basis für den im Projekt entwickelten Reaktor. Mittels der konzentrischen Anordnung der Lampen wird eine positive Bestrahlungsgeometrie und damit eine sehr hohe Beleuchtungsstärke im Innern des Reaktionsraumes erreicht. Die Nanopartikel können entweder in Form von beschichteten Wirbelkörpern oder über ein beschichtetes zylindrisches Glasrohr in den Reaktor eingebracht werden.

Abbildung 46: Universeller Labor-Reaktor für die Photobiotechnologie

Eigenschaften:

Reaktor:

- Der Doppelmantelreaktor besteht aus Borosilikatglas und ist autoklavierbar.
- Der Fotoreaktor ist für eine positive oder negative Bestrahlungsgeometrie anwendbar.
- Das nutzbare Volumen des Doppelmantelgefäßes beträgt 1l. (negative Geometrie).
- Der komplette Reaktor wird auf einen Magnetrührer betrieben, dadurch ist eine Homogenisierung des Inhaltes möglich.

Strahler:

- Die im Spektrum variablen Strahler werden über ein gemeinsames dimmbares EVG betrieben. Es erfolgt eine online - Überwachung der Intensität mittels eines Sensors. (Automatische Regelung der Bestrahlungsstärke optional.)

An einen zu konzipierenden technisch einsetzbaren Photoreaktor werden die Forderungen gestellt, dass er kontinuierlich betreibbar ist und dass er mit immobilisierten hoch aktiven Nanopartikeln betrieben werden kann. Dies erfordert große aktive Oberflächen bei maximaler räumlicher Ausleuchtung im aktinischen Spektralbereich.

Der vorliegende Vorschlag für ein innovatives Reaktordesign berücksichtigt zum einen die Lichtlimitierung der Geschwindigkeit von photobiologischen Prozessen und trägt zum anderen der Tatsache Rechnung, dass das Oberflächen-Volumen-Verhältnis heterogen geführte Reaktionen entscheidend beeinflusst. Für die anlagentechnische Umsetzung wurde ein Konzept zunächst in Form eines Laboraufbaus und später als Pilotanlage näher untersucht, bei dem eine hohe Bestrahlungsleistung mit einer besonders homogenen Verteilung des Lichtes im Reaktor bei maximal möglicher katalytisch aktiver Oberfläche realisiert werden kann. Dieser Vorschlag sieht die Anordnung sowohl der Strahlungsquellen als auch des auf Füllkörpern aufgebrachten katalytisch aktiven Materials in Form von rohrförmigen Einbauten mit exakt definierten Abständen zueinander in zylindrischen Reaktionsgefäßen vor, die von den entsprechenden Substraten kontinuierlich durchströmt werden. Die Abbildung 47 zeigt schematisch den Aufbau der Photoreaktoren.

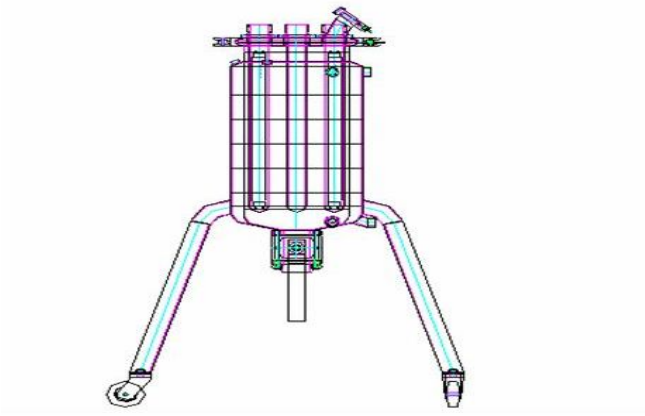


Abbildung 47: Grundaufbau von Reaktoren zur photobiologischen Stoffsynthese

Die Ergebnisse der Modellierung und Optimierung der dreidimensionalen Bestrahlungsstärkeverteilung in einem solchen Multistrahlersystem sind in der Abbildung 48 dargestellt. Wie aus

dem Modell zu ersehen ist, kann in Abhängigkeit von der Wellenlängenverteilung der Strahlung und der optischen Transmission des jeweiligen Mediums durch die Wahl unterschiedlicher Abstände der Strahler zueinander eine optimale und homogene Ausleuchtung des Reaktionsraumes erreicht werden.

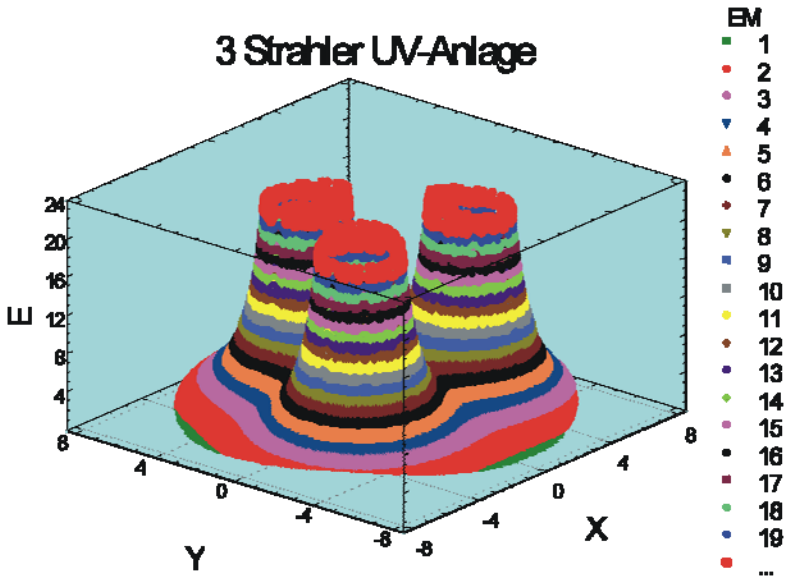


Abbildung 48: Dreidimensionale Verteilung der Bestrahlungsstärke in einem Drei-Strahler-System

Werden weitere Strahler hinzugefügt kann die Bestrahlungsstärke- und –homogenität, wie erwartet, noch weiter verbessert werden, wie aus der Abbildung 49 zu ersehen ist. Eine Ausführungsform der Reaktorgestaltung mit drei Durchführungen ist in der Abbildung 50 gezeigt.

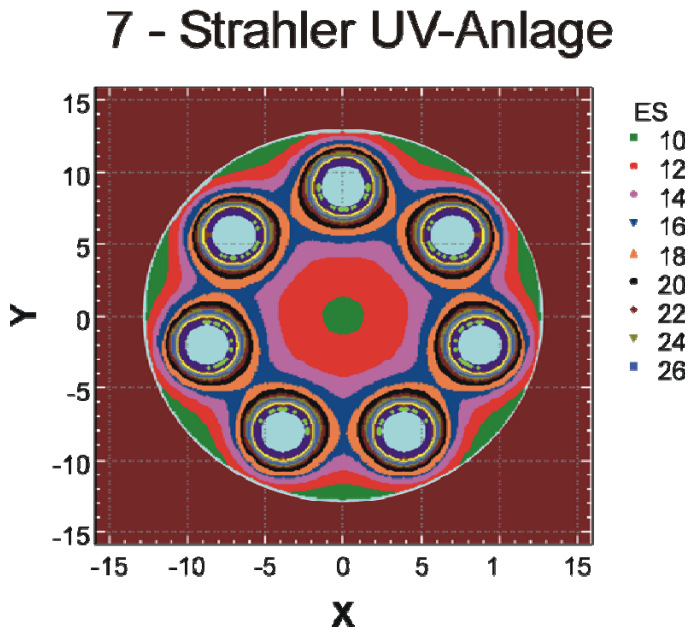


Abbildung 49: Verteilung der Bestrahlungsstärke quer zur Strömungsrichtung in einem 7-Strahler-System

Abbildung 50: Umsetzung der Modellierungsergebnisse für die Auslegung eines Photobioreaktors

Wie aus den Ausführungen ersichtlich kann ein entsprechendes Upsacling der Anlage für eine technische Anwendung bei größeren Volumenströmen mit entsprechenden Anlagen realisiert werden. Über die Dauer des Projektes wurde die Fortführung einer entsprechenden Zusammenarbeit vereinbart.

In ersten Versuchen wurden fotokatalytische Materialien der Einfachheit halber als fein verteilte Partikel in dem Reaktor getestet. Die Partikel wurden durch ein hydraulisches Umwälzregime in Schwebe gehalten. Der Einsatz von geträgerten Partikeln erlaubt die Untersuchung der Materialien bereits in einen sehr frühen Stadium, was im Hinblick auf die Auswahl optimale S-Layer und für die Eignung der verwendeten Biokompositträger besonders vorteilhaft war. Problem dieses Vorgehens ist, dass es für eine spätere technische Nutzung auf Grund der Schwierigkeit, diese Materialien zurückzuhalten, ungeeignet ist. Experimente mit S-Layer geträgerten ZnO-Nanopartikeln mit und ohne Träger zeigten, dass bei den von uns verwendeten Materialien nur eine unzureichende Durchmischung erreicht werden konnte. Abhilfe kann hier eine entsprechende Modifikation des Reaktors bringen die aktuell von der UMEX GmbH in einem iterativen Verfahren mit dem FZD zusammen vorgenommen wird. Schwerpunkt dieser Umgestaltung ist die Optimierung der Umwälzung der Katalysatoren innerhalb des Reaktors durch Einsatz von hydraulischen und pneumatischen Systemen. Bei der Optimierung der Umwälzung ist neben einem ausreichenden Stoffaustausch auch die mechanische Stabilität der ZnO-Nanopartikel zu berücksichtigen.

AP 5 : Prozessoptimierung

Ziel des Arbeitspaketes AP 5 war es die Ausbeute an S-Layern zu erhöhen. Dazu wurden erstens die Kultivierungsbedingungen (pH-Wert, Temperatur, Nährstoffangebot) variiert, zweitens wurden alternative Nährmedien getestet, drittens wurde versucht die Gewinnung der S-Layer zu vereinfachen und viertens Möglichkeit einer Ausbeutesteigerung durch heterologe Expression untersucht. Nach Abschluss der Untersuchungen führten die ermittelten Kultivierungsbedingungen und die Veränderungen bei der S-Layer Gewinnung zu einem geringeren Kostenaufwand als vor Beginn der Arbeiten. Es kann festgestellt werden, dass das AP 5 erfolgreich bearbeitet wurde.

AP 5-1: Optimierung der Kultivierungsbedingungen

Die Anpassung der Kultivierungsbedingungen stellte den ersten Abschnitt der Arbeiten dar. Untersuchungen zu dieser Fragestellung wurden von der NAMOS GmbH durchgeführt. In mehren Experimenten zur Bestimmung der optimalen Wachstumsgeschwindigkeit wurden der Abbildung 46 dargestellten Werte von 30°C und ein pH-Wert von 7 erhalten.

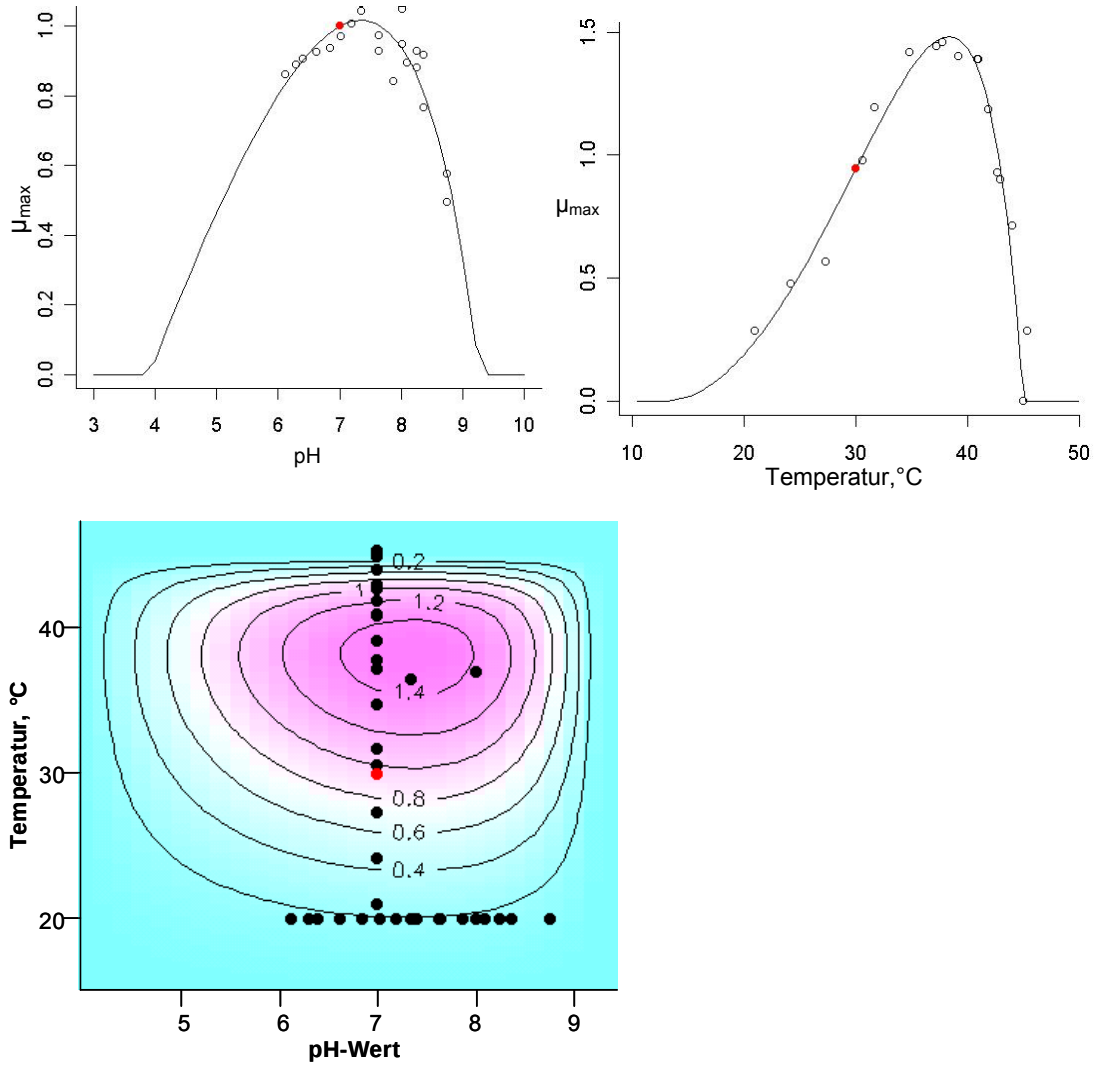


Abbildung 46: Bestimmung der optimalen Wachstumsbedingungen

Bei diesen Wachstumsbedingungen wurde für verschiedene *Lysinibacillus sphaericus* Stämme das Nährmedium angepasst. Die Auswahl der zu untersuchenden Stämme erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse zum Einfluss verschiedener S-Layer auf die photokatalytische Aktivität der auf ihnen hergestellten Nanopartikel (AP 3-2). Die höchsten Aktivitäten zeigen dabei auf B58 hergestellte ZnO-Nanopartikel. Weitere Bakterien mit besonders stabilen S-Layer-Varianten und Vergleichs-Stämme wurden ebenfalls mit in die Betrachtungen einbezogen, um möglichst optimale aber ebenfalls möglichst universelle Kultivierungsbedingungen für verschiedene interessante Organismen zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ein Vollmedium NB bestehend aus Fleischextrakt und Pepton verwendet. Für die Untersuchungen wurde dieses Medium in verschieden Konzentrationen eingesetzt. In Tabelle 7 ist die Zusammensetzung der jeweiligen Verdünnung angegeben.

Tabelle 7: Zusammensetzung des verwendeten NB-Mediums

Bezeichnung	Fleischextrakt, g/l	Pepton, g/l
NB 1	3	5
NB 0,5	1,5	2,5
NB 0,2	0,3	0,5
NB 0,1	0,15	0,25

Mit diesen Nährmedien wurden Schüttelkulturen verschiedener Haldenisolate angesetzt. Die Inkubation der 30 ml-Kulturen erfolgte in 50 ml Erlenmeyerkolben unter sterilen Bedingungen bei 30°C. Das Wachstum der Kulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm über einen Zeitraum von 27 h verfolgt. Die erhaltenen Werte wurden normiert und sind für den Stamm B58 in der Abbildung 46 dargestellt.

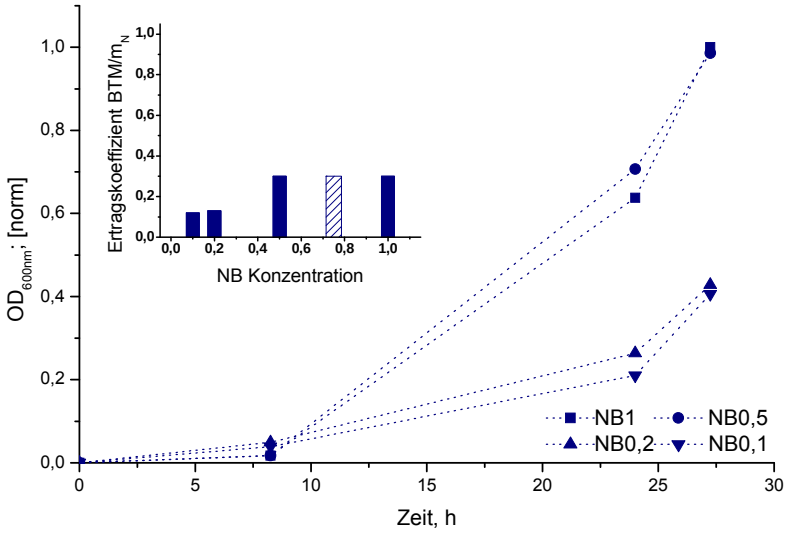


Abbildung 46: Entwicklung der optischen Dichte (normiert) und Ertragskoeffizienten für B58

Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass für den Stamm B58 der Einsatz von NB 0,5 zu einer Ausbeute von 98 % der Biomasse, die bei Verwendung von NB 1 entsteht, führt. Darüber hinaus ist festzustellen, dass bei der Verwendung von NB 1 ein Ertragskoeffizient von 0,3 für die entstandene Biotrockenmasse (BTM) je eingesetzter Masse Stickstoff (m_N) erhalten wird. Dieser Wert zeigt an, dass die eingesetzte Stickstoffmenge nur zu etwa einem Drittel in Biomasse umgewandelt wurde. Eine weitere Umwandlung des angebotenen Stickstoffs fand nicht statt. Gründe dafür könnte eine unzureichende Versorgung mit anderen Nährstoffen, eine Hemmung durch gebildete Stoffwechselprodukte oder eine Kultivierung bei nicht optimalen physikochemischen Parametern sein.

Zur Bestätigung der gewählten physikochemischen Parameter wurden Versuche bei verschiedenen Temperaturen und pH-Werten in Bioreaktoren durchgeführt. Für den Vergleich der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen wurden jeweils die Wachstumsgeschwindigkeiten bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in der Abbildung 47 grafisch dargestellt.

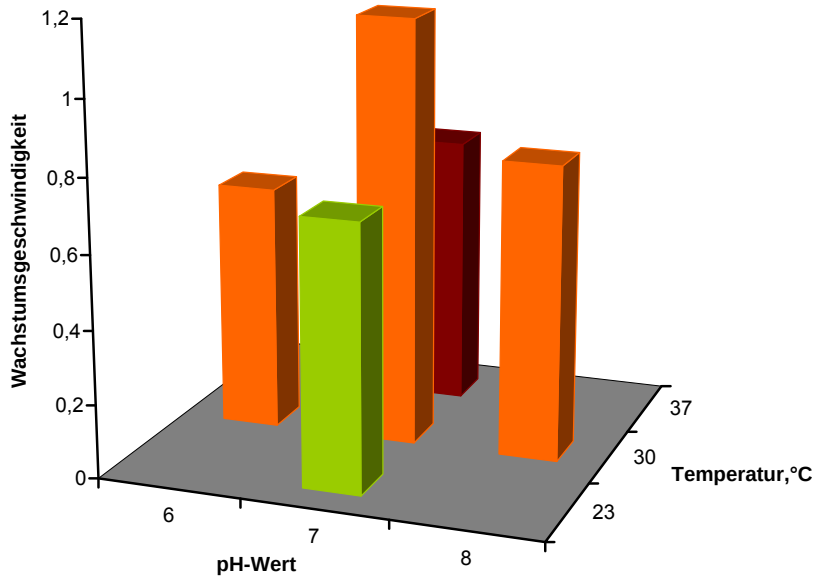


Abbildung 47: Wachstumsgeschwindigkeit bei verschiedenen Prozessbedingungen für B58

Aus der Abbildung 47 wird deutlich, dass die gewählten Parameter, mit einer Temperatur von 30°C und einem pH-Wert von 7, zu der höchsten Wachstumsgeschwindigkeit führen. Damit kann davon ausgegangen, dass die physikochemischen Parameter während der Kultivierung nicht zu einer Hemmung des Wachstums führten. Aus diesem Grund sind wahrscheinlich Substrat bzw. Produkt bedingte Hemmungen der Biomassebildung für die geringen Ertragskoeffizienten (siehe Abbildung 46) verantwortlich.

Weitere Untersuchungen zur optimalen Konzentration des NB-Mediums bezüglich der Biomassebildungen wurden mit dem Stamm B12 (sehr stabile S-Layer) durchgeführt. Die Inkubation der 30 ml-Kulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 30°C. Durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm wurde das Wachstum der Kulturen über einen Zeitraum von 27 h verfolgt. Die

erhaltenen Werte wurden normiert und sind für den Stamm B12 in der Abbildung 48 dargestellt. Weiterhin wurden die Ertragskoeffizienten für die gebildete Biotrockenmasse je Menge eingesetztes Medium bestimmt. Diese sind ebenfalls in der Abbildung 48 dargestellt.

Für den Stamm B12 entstand beim Einsatz von NB 0,5 ein Viertel weniger Biomasse als bei der Kultivierung des Stammes mit NB 1. Bei der Kultivierung erreichte der Stamm B12 eine Wachstumsgeschwindigkeit von 0,62 h^{-1}. Der erwartete Ertragskoeffizient für den Stamm B12 bei der Verwendung von NB 0,75 ist in der Abbildung 48 staffiert dargestellt. Ähnliche Werte wurden auch mit weiteren drei untersuchten Stämmen erzielt. Aus den Ergebnissen aller untersuchten konnte der Einsatz von NB 0,75 für Routineanwendungen abgeleitet werden.

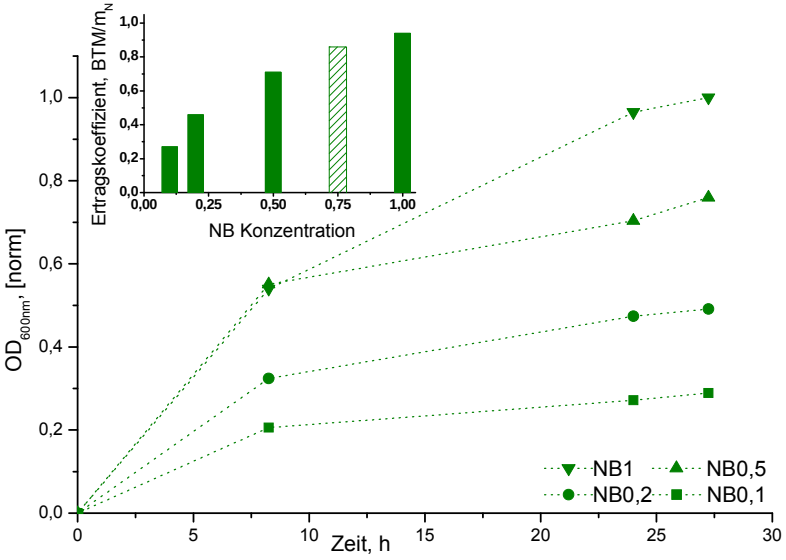


Abbildung 48: Entwicklung der optischen Dichte (normiert) und Ertragskoeffizienten für B12

Die NAMOS GmbH untersuchte das Wachstumsverhalten auf synthetischem Medium nach White /P. J. White, H. K. LOTAY.: Minimal Nutritional Requirements of *Bacillus sphaericus* NCTC9602 and 26 other Strains of this Species: the Majority Grow and Sporulate with Acetate as Sole Major Source of Carbon. Microbiology, May 1980; 118: 13 - 19./. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist in der Tabelle 8 dargestellt. Als Kohlenstoffquellen wurden Natriumacetat mit 5 g/l sowie Natriumglutamat mit 1 g/l und als Stickstoffquelle wurde Ammoniumsulfat mit 2 g/l genutzt.

Tabelle 8: Zusammensetzung des synthetischen Mediums

Substanz	Einwaage je Liter	Substanz	Einwaage je Liter
Kohlenstoff	5,0 g	$FeSO_4*7H_2O$	10,0 mg
Stickstoff	0,5 g	$MnSO_4*4H_2O$	10,0 mg
KH_2PO_4	0,5 g	$Zn\ SO_4*7H_2O$	13,0 mg
K_2HPO_4	0,5 g	$CaCl_2$	25,0 mg
$MgSO_4*7H_2O$	0,2 g	Thiamin	0,5 mg
		Biotin	1,0 µg

In der folgenden Abbildung 49 werden die normierten Wachstumsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Nährmedienkonzentrationen dargestellt. Als Vergleich wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von NCTC 9602 in NB-Medium verwendet.

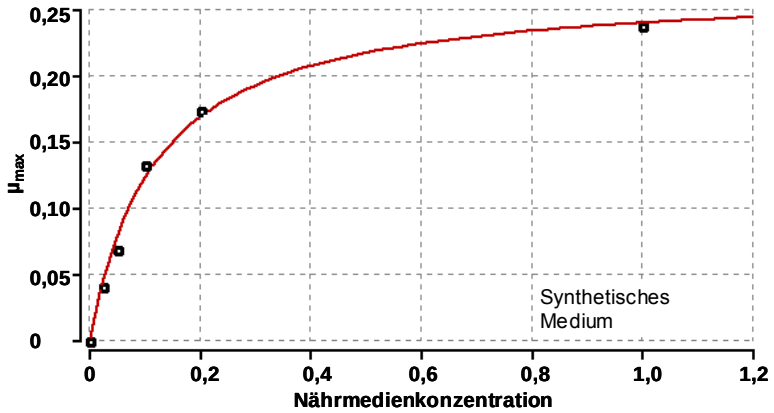


Abbildung 49: normierte Wachstumsgeschwindigkeit von NCTC 9602 im synthetischen Medium.

Neben diesem synthetischen Medium wurden durch die NAMOS GmbH verschiedene technische Medien hinsichtlich ihrer Eignung zur Biomasseproduktion. Als technische Medien wurden Dünnschlempe und Molke eingesetzt. Dünnschlempe ist ein Abfallprodukt aus der Brennerei-Industrie. Sie enthält nur wenig leicht verwertbare Kohlehydrate, hat einen CSB von ca. 18000 mg/l und enthält ca. 29,5 % Protein. Molke ist ein Beiprodukt, das bei der Eindickung von Milch entsteht. Molke enthält Laktose als verwertbare Kohlenstoffquelle, hat einen CSB von ca. 47000 mg/l und enthält ca. 0,7 % Protein. Diese beiden technischen Medien wurden dem synthetischen Medium nach White zugesetzt.

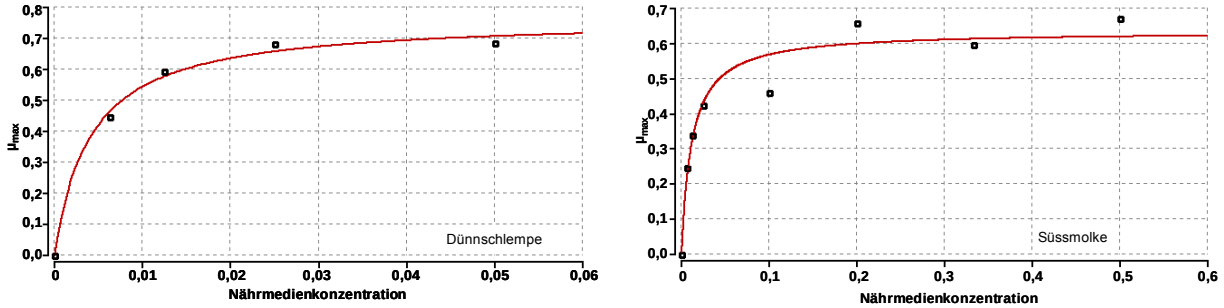


Abbildung 50: normierte Wachstumsgeschwindigkeit von NCTC 9602 in technischen Medien

In der Abbildung 50 werden die normierten Wachstumsgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Nährmedienkonzentrationen dargestellt. Als Vergleich wurde die Wachstumsgeschwindigkeit von NCTC 9602 in NB-Medium verwendet. Die technischen Medien wurden als Zusatz in ein synthetisches Nährmedium gegeben. Aus den Grafiken der Abbildung 50 wird deutlich, dass Dünnschlempe nur in einem geringen Anteil zugegeben wurde. Sie dient in diesem Fall hauptsächlich als Lieferant für Spurenelemente, Vitamine und Salze. Als Kohlenstoffquelle diente in diesem Fall Natriumacetat, als Stickstoffquelle wurde Ammoniumsulfat verwendet.
Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten und der Biomasseausbeuten auf diesen drei Medien im Vergleich zum NB Medium sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten und der Biomasseausbeuten auf verschiedenen Medien

Medium	μ_{max} (normiert)	Ausbeute g Biomasse/l
NB	1,00	1,80
Synthetisches Medium (SM)	0,27	0,22
SM mit Dünnschlempe	0,76	3,78
SM mit Süssmolke	0,64	0,45

Die Daten in der Tabelle 9 zeigen, dass durch die Verwendung von Dünnschlempe als Quelle von Spurenelementen, Salzen und Mineralstoffen eine hohe Biomasseausbeute erreicht werden kann. Bei weiterführenden Arbeiten mit technischen Medien ist die jeweilige Zusammensetzung chargenweise zu prüfen und auf Änderungen im Nährstoffangebot durch entsprechende Veränderungen der Rezepturen zu reagieren.
In weiteren Untersuchungen zur Verwertung von synthetischem Medium wurden verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen getestet. Ziel dieser Untersuchungen ist es weitere technische Medien zu identifizieren. Die Versuche wurden in Multi-Well-Platten mit Kavitäten von 3 ml durchgeführt. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in der Tabelle 8 und Tabelle 10 aufgeführt. Als Kohlenstoffquellen wurden Glucose, Saccharose, Pyruvat, Maltose, Glycerin, Kaliumacetat und Lactat genutzt. Als Stickstoffquellen dienten NH_2CONH_2, $(NH_4)_2SO_4$, KNO_3 und $(NH_4)_2NO_3$.

Auf diesen Medien wurden die Stämme A12, B7, B12, B53, B58 kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Das Wachstum wurde während der Versuchsdauer durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Für ausgewählte Kombinationen von Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sind die dabei erhaltenen Wachstumskurven für die Stämme B58, B53 und B12 in Abbildung 51, Abbildung 52 und Abbildung 53 dargestellt.

Für alle drei Stämme ist eine ausgeprägte lag-Phase in den folgenden Abbildungen zu erkennen. Für den Stamm B58 wird das Ende des Wachstums (siehe Abbildung 51) nach etwa 12 h erreicht. Von den angebotenen Nährstoffkombinationen wird die größte Wachstumsgeschwindigkeit für die Kohlenstoffquelle Glycerin erreicht.

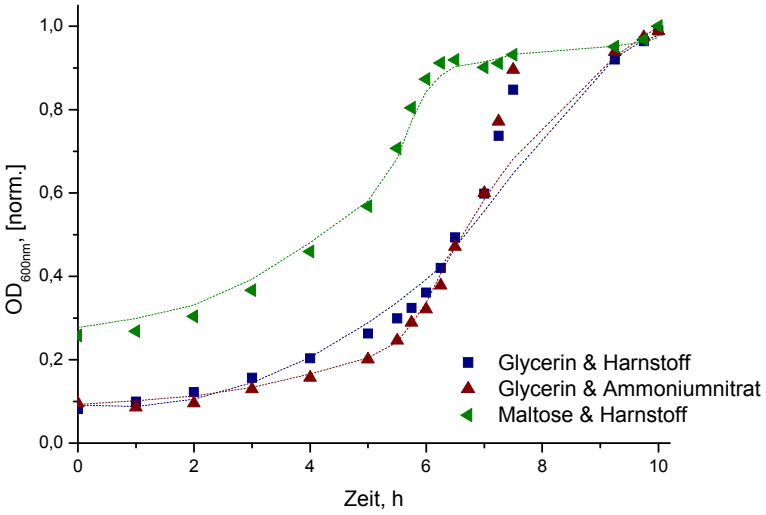


Abbildung 51: Entwicklung der optischen Dichte (OD) während des Wachstums von B58 auf synthetischem Medium

In der Abbildung 52 ist das Wachstumsverhalten von B53 in verschiedenen synthetischen Medien dargestellt. Dabei wird deutlich, dass der Stamm sowohl Harnstoff als auch Ammoniumsalze als Stickstoffquelle nutzen kann. Von den 7 angebotenen Kohlenstoffquellen wurden Glycerin und Tween 80 genutzt.

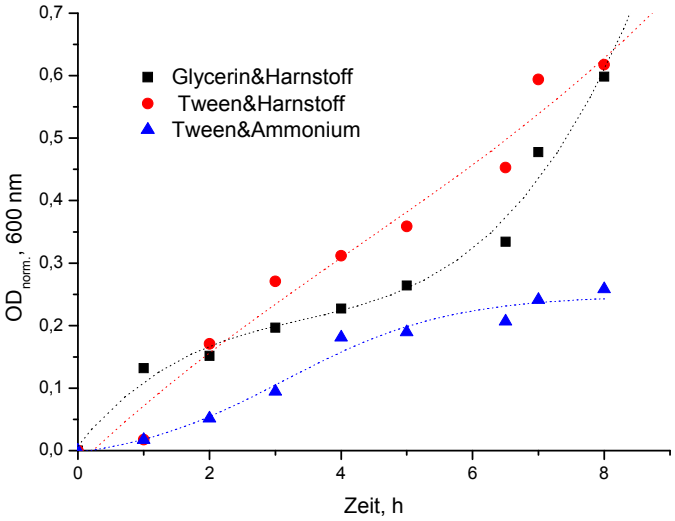


Abbildung 521: Entwicklung der optischen Dichte (OD) während des Wachstums von B53 auf synthetischem Medium

Der Stamm B12 zeigt bei den angebotenen Nährstoffquellen ein etwas anderes Wachstumsverhalten (Abbildung 53). Mit den Stoffen Maltose und Harnstoff ist das Wachstum in etwa 12 Stunden beendet. Für die Kombinationen mit der Kohlenstoffquelle Glycerin ist ein verzögertes Wachstum festzustellen. Für die Kombination Glycerin mit Ammoniumacetat wird das in einer deutlich verlängernden lag-Phase und für Glycerin und Kaliumnitrat in einer geringeren Wachstumsgeschwindigkeit deutlich.

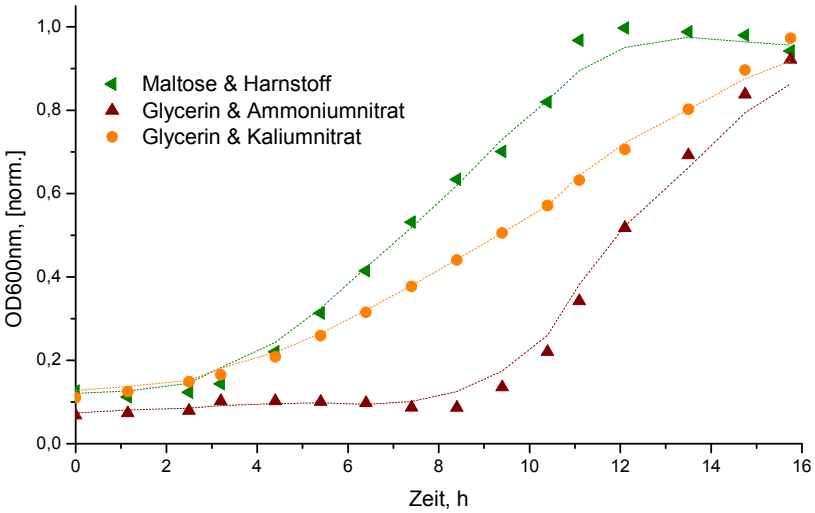


Abbildung 532: Entwicklung der optischen Dichte (OD) während des Wachstums von B12 auf synthetischem Medium

Die Tabelle 10 enthält eine Auflistung der Stämme, die bei der entsprechenden Nährstoffkombination gewachsen sind. Diese Aufstellung zeigt, dass sich der Stamm B12 an ein breites

Nährstoffspektrum anpassen kann. Auf 7 von den 28 angebotenen Nährstoffkombinationen findet ein Wachstum des Stamms B12 statt. Die Stämme B7 und B58 wachsen auf 3 und der Stamm A12 auf 4 der getesteten Nährstoffkombinationen.

Tabelle 10: Wachstum bei verschiedenen C-, N-Quellen

Stickstoffquelle / Kohlenstoffquelle	**Harnstoff**	**$(NH_4)_2SO_4$**	**KNO_3**	**$(NH_4)_2NO_3$**
Glucose	-	B12	-	-
Saccharose	-	B12	-	-
Pyruvat	B12	B12, A12	-	B7, A12
Maltose	B58, B12	-	-	-
Glycerin	B58, B53, B7	-	B12, B7	B58, B12
Kaliumacetat	-	A12	-	-
Lactat	-	-	-	A12
Tween 80	B53	B53		

Interessant ist das Wachstum verschiedener Stämme auf Glycerin und Tween 80 als Kohlenstoffquelle. In weiteren Untersuchungen ist zu prüfen in wie weit auf diesen Substraten S-Layer gebildet bzw. ob durch Zugabe dieser Kohlenstoffquellen eine Erhöhung der Biomasseausbeute im Vollmedium erreicht werden kann.

Als weiterer Punkt der Untersuchungen wurde das Vorgehen bei der Isolierung der S-Layer verändert. In verschiedenen Testreihen wurde festgestellt, dass der Erntezeitpunkt und die Vorbehandlung der Biomasse eine wesentliche Rolle bei der Gewinnung der Biomasse spielt. Als optimaler Erntezeitpunkt hat sich die späte stationäre Wachstumsphase heraus gestellt. Als Vorbehandlung zur Beschleunigung der Isolierung eignet sich eine Inkubation der Biomasse in einem TRIS-Puffer (pH 7,5 mit 3 mM NaN_3) bei 8°C. In der Tabelle 11 ist der Zeitbedarf für die Isolierung von S-Layer-Proteinen des Stamme B53 nach der herkömmlichen und der neuen Methode gegenübergestellt. Mit der neuen Methode werden etwa zwei Drittel der Präparationszeit nach der alten Methode benötigt.

Tabelle 11 Zeitbedarf für die S-Layer-Protein Gewinnung

Tätigkeit	Zeit, h	
	Alte Methode	Neue Methode
Aufschluss der Biomasse	2,25	1,12
waschen und resuspendieren	0,6	0,6
Ablösen der Plasmamembran	0,9	
Verdau des Peptidoglycans	2,7	
Reinigung der S-LayerProteine	0,6	0,6
Reassemblierung der S-Layer-Proteine	0,6	0,6
Zeitbedarf (gesamt)	**7,65**	**2,92**

AP 5-2: Prozessoptimierung für eine kontinuierliche Biomassegewinnung

Zur Vorbereitung auf eine kontinuierliche Biomassegewinnung wurde erfolgreich die heterologe Expression von S-Layer-Proteinen in *E. coli* initiiert. Eine Möglichkeit zum Upscaling der Gewinnung von S-Layer-Proteinen und zum Erzielen einer Reproduzierbarkeit der Proteinqualität ist die heterologe Expression der S-Layer-Proteine in geeigneten Wirtsstämmen. Dieses Vorgehen soll die S-Layer-Protein Gewinnung weitgehend vereinfachen. Im Projekt wurde das bereits sequenzierte S-Layer-Gen *sll*b des Stammes *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 sowie – zur vereinfachten Klonierung – von Genfragmenten in den Stamm *E. coli* Bl21(DE)3 kloniert. Als Expressionsvektor wurde der Vector pET-30 Ek/Lic gewählt. Das S-Layer-Gen für B12 konnte zwischenzeitlich ebenfalls entschlüsselt werden und laufende Arbeiten beschäftigen sich mit der Entschlüsselung weiteren im Rahmen des Projektes als interessant identifizierten S-Layer-Genen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine sehr gute Expression von *sll*B durch *E. coli* möglich ist (Abbildung 54). Bei einer optimalen Expressionstemperatur von 21°C wurden durch die Zellen ca. 25 mg rekombinantes Protein/100ml Kulturvolumen (LB-Medium) hergestellt. Zum Vergleich: Aus dem natürlichen Isolat können aus 100 ml Kulturvolumen etwa 4 mg S-Layer-Protein gewonnen werden.

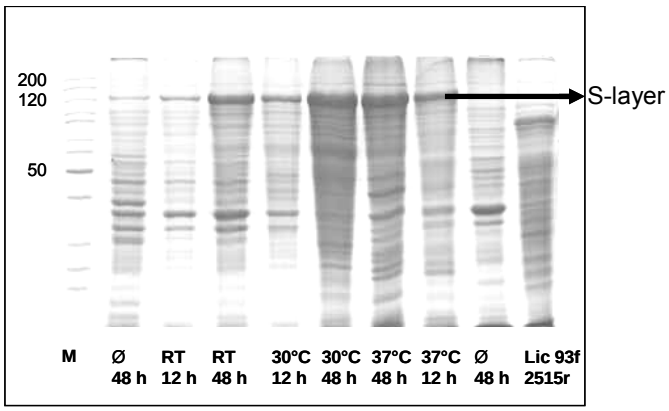


Abbildung 54: Heterologe Expression von sllB in E. coli BL21(DE3) unter der Verwendung des Expressionsvectors pET-30 Ek/Lic. Die Expression erfolgte nach Zugabe von IPTG bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die rekombinanten Proteine konnten über Ni-Chromatographie erfolgreich aufgereinigt werden. Allerdings zeigten Untersuchungen der Struktur der S-Layer, dass eine typische Gitterstruktur durch die rekombinanten Proteine nicht ausgebildet wird. IR-Analysen des Proteins nach der Aufreinigung zeigen, dass die Struktur des Proteins verändert wird. Im Gegensatz dazu zeigen IR-Analysen aber auch, dass die Proteinstruktur direkt nach der Expression noch intakt ist. Diese Daten lassen vermuten, dass eine Strukturveränderung der Proteine, die die Selbstorganisation der Proteine zu zweidimensionalen Schichten verhindern, allein während die Aufreinigung erfolgt, entweder durch den Einfluss durch Ni-Ionen oder durch die erforderliche Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid. Alternative Reinigungsmethoden können diese Probleme lösen und sollen in Zukunft entwickelt werden. Des Weiteren ist für zukünftige Arbeiten die Expression in anderen Wirtsorganismen als *E. coli* wie z.B. Hefen oder *Bacillus megaterium* geplant. Bei der Verwendung dieser Organismen kann idealerweise eine Sekretion der rekombinanten Proteine in das Kulturmedium erfolgen, was eine anschließende Aufreinigung erheblich vereinfachen würde. Im Rahmen des Projektes wurden erste Kontakte zur Arbeitsgruppe von Prof. Barth/TU Dresden geknüpft, die über geeignete Vectorsysteme verfügen. Eine Zusammenarbeit in gemeinsamen Projekten wird angestrebt.

In einem parallelen Schritt wurden aufbauend auf die Erkenntnisse zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen für verschiedene *Lysinibacillus* und *Bacillus*-Stämme in modifizierten Laborgefäßen auf die Kultivierung in Bioreaktoren übertragen. Dabei wurde in erster Linie eine Verringerung der benötigten Arbeitszeit erreicht. Durch den Einsatz der Reaktoren wurde die Arbeitszeit auf ein Viertel der vorher benötigten reduziert. Weiterhin wurde eine hohe Reproduzierbarkeit der Kultivierung erreicht. Dieses wird durch die Nutzung von Regelkreisen mit Stamm spezifischen Sollwerten für Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffgehalt in der Kulturlösung. Die Veränderung der entsprechenden Stellgrößen wird während der Kultivierung registriert. Aus den daraus gewonnen Daten wurden erste fed-batch-Strategien entwickelt. Diese wurden erfolgreich erprobt.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Positionen	Gesamt-finanzierungsplan	verausgabt kummuliert	Differenz
PK Wissenschaftler	131.724,00	143.607,42	-11.883,42
PK E1-E11	36.672,00	34.724,29	1.947,71
Aufträge	80.000,00	60.843,82	19.156,18
NAMOS	30.000,000	29.595,00	405,00
UMEX	20.000,00	19.118,82	881,18
Marktrecherche	20.000,00	4.200,00	15.800,00
Patente	10.000,00	6.790,00	3.210,00
Sonstige Aufträge	0	1140	-1.140,00
Verbrauchsmittel	45.000,000	52.764,69	-7.764,69
Resisekosten	9.500,00	8.633,40	866,60
Investitionen	765.000,000	767.191,71	-2.191,71
Bioreaktor	115.000,00	114.393,72	606,28
Zentrifuge	150.000,00	146.990,20	3.009,80
AFM	200.000,00	200.000,00	0,00
HPLC-Anlage	50.000,00	57.284,81	-7.284,81
CCD-Kamera	300.000,00	244.951,00	55.049,00
Keramikkammer	0	3.571,98	-3.571,98
SUMME	**1.067.896,00**	**1.067.765,33**	**130,67**

Die ursprünglich nicht vorgesehenen „Sonstige Aufträge“ umfassen die Anfertigung professioneller Grafiken zur Veranschaulichung der wissenschaftlichen Sachverhalte für Präsentationen und Poster (Konferenzen, Seminare, Öffentliche Veranstaltungen wie Tag des offenen Labor, Industriepräsentationen) und den Messeauftritt (siehe dazu Kapitel 1, Abbildung 1) und der Anfertigung eines S-Layer-Modells aus Kunstharz insbesondere für die Öffentlichkeitsarbeit und den Messeauftritt. Die zusätzliche Investition über eine Keramikkammer für einen Hochdruck-homogenisator (Mikrofluidizer Processor M-110L) zum Aufbrechen bakterieller Biomasse wurde aufgrund des Verschleißes der alten Kammer notwendig. Der im Rahmen des Projektes getätigte Kauf eines Bioreaktors versetzte uns in die Lage, große Mengen an Biomasse zur Protein-gewinnung herzustellen. Sowohl die guten Ergebnisse im Projekt als auch die gute Kooperation mit der NAMOS GmbH haben dazu geführt, dass wir zunehmende Mengen an Protein präpariert haben. Nicht absehbar war der stattfindende Verschleiß der zentralen Einheit des Hochdruck-homogenisators, der Keramikkammer. Zur Sicherung der weiteren Arbeiten wurde deshalb die Keramikkammer gegen eine neue ausgetauscht.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

FuE-Ziel des Projektes war die Entwicklung photokatalytischer Schichten auf der Basis von S-Layer-Proteinen für den Abbau von Arzneimittelreststoffen. Notwendige Geräte-Investitionen zur Erfüllung der gesetzten Forschungsziele waren eine Fermenter-Anlage, um ein Upscaling der Biomasse-Produktion und damit kostengünstige Protein-Herstellung zu ermöglichen, ein AFM zur Analyse hergestellter Schichten im Rahmen der Entwicklung von Beschichtungverfahren und

Charakterisierung der proteinbeschichteten Oberflächen, eine HPLC-Anlage zur Analyse der photokatalytischen Degradation von Diclofenac sowie eine ultraschnelle CCD-Kamera zur Verfolgung des Abbaus von Diclofenac mittels Fluoreszenzspektroskopie. Alle Geräte konnten während der Projektlaufzeit in Betrieb genommen werden und für die Forschungsarbeiten genutzt werden. Trotz auftretender Verzögerungen durch z.T. lange Lieferzeiten (CCD-Kamera), zu erfüllende technische und räumliche Anforderungen (Fermentor-Anlage, AFM) konnten alle Arbeitspakete bearbeitet werden und Ergebnisse erzielt werden. Es bestätigte sich damit die Notwendigkeit der getätigten Investitionen, der Personalbedarf und die eingesetzten Verbrauchsmittel. Alle Geräte werden zukünftig nicht nur für die speziell im Projekt bearbeitete Thematik, sondern auch in anderen Forschungsarbeiten Verwendung finden. Für die weitere Etablierung der Nachwuchsforschergruppe NanoBio am FZD und ihre geplanten Forschungsarbeiten stehen durch die getätigten Investitionen modernste Geräte, aber auch qualifizierte Mitarbeiter zur Verfügung, so dass eine nachhaltige Verwendung der Investitionen sowie eine Verstetigung der Forschungsvorhaben gewährleistet ist.

4. Verwertbarkeit der Ergebnisse

Über die im Projekt erfolgten Netzwerkaktivitäten konnte ein Interessenverbund (Abbildung 55), gebildet werden, der darin übereinstimmt, dass die im Rahmen der „NanoPharm“-Projektskizze entwickelte Strategie zur Entwicklung Tageslicht-effizienter Photokatalysatoren erfolgversprechend ist und der gebildete Verbund geeignet ist, die Fragestellung umfassend und erfolgreich zu bearbeiten. Letztendlich erscheint so die Entwicklung eines marktreifen Produkts im Rahmen eines Anschlussprojekts realistisch. Aufgrund der Kürze der Projektlaufzeit konnten die Arbeiten aber nicht bis Projektabschluss durchgeführt werden. Entscheidend für eine erfolgreichen Einsatz werden eine weitere Senkung der Produktionskosten für das Material, das Erreichen von ausreichend langen Standzeiten auch unter Feldbedingungen und eine Steigerung der Effizienz zur Behandlung größere Volumenströme und der Gewährleistung kürzere Kontaktzeiten sein. Teile dieser Arbeiten werden bereits jetzt projektunabhängig weiter verfolgt. Dies betrifft gemeinsamen Arbeiten zur Immobilisierung von Nanopartikeln mittels (S-Layer-) Proteinen allgemein (NAMOS GmbH), der Optimierung von fotokatalytisch aktiven Nanopartikeln hinsichtlich einer effizienten Tageslicht-Nutzung (HS Anhalt, UMEX GmbH), der Charakterisierung der Struktur freier und immobilisierter Nanopartikeln und der Auswirkung auf ihre katalytische Aktivität (Leibniz-Institut für Katalyse, LIKAT).

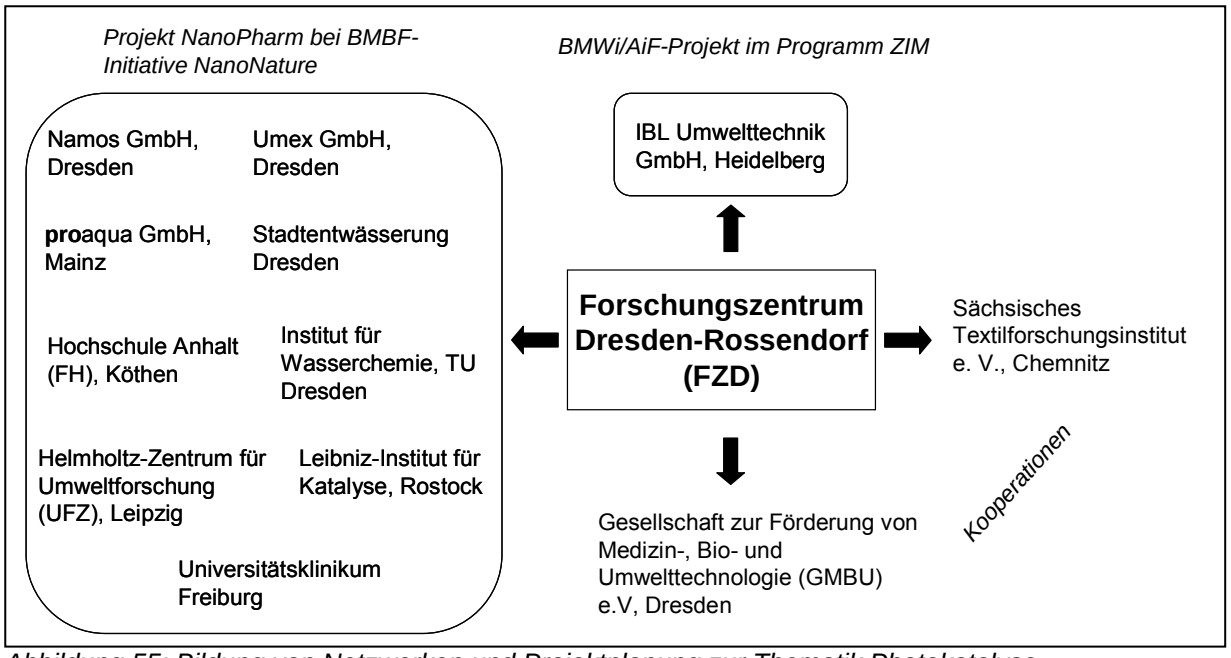


Abbildung 55: Bildung von Netzwerken und Projektplanung zur Thematik Photokatalyse

Umfassende Arbeiten können allerdings nur im Rahmen von FuE-Verbundprojekten geleistet werden. Es wurde diesbezüglich mit Beteiligung von 10 Partnern ein Projektantrag in der Fördermaßnahme NanoNature des BMBF gestellt, der bereits zur Förderung empfohlen wurde und sich nun in der Hauptantragsphase befindet (Abbildung 55). Ein weiterer Projektantrag, der einen Teilaspekt der Thematik vertieft, die Verwendung magnetischer und mikroskaliger Trägermaterialien vorsieht und den Abbau anderer organischer Schadstoffe zum Ziel hat, wird derzeit zusammen mit der Firma IBL Umwelttechnik GmbH beim BMWi gestellt (Abbildung 55). Darüber hinaus bestehen Kooperationen mit zwei weiteren Einrichtungen, die Interesse an der Thematik gezeigt haben. Gemeinsame Projekte mit diesen Partnern werden angestrebt.

Die Arbeiten zur Beschichtung verschiedener Trägermaterialien mit S-Layer-Proteinen und der S-Layer-basierten Nanopartikel-Synthese haben außerdem wichtige Impulse zur Weiterentwicklung der S-Layer-Technologie-Plattform geliefert. So konnten vor allem geeignete Trägermaterialien für technische Anwendungen identifiziert und Methoden zur Herstellung von Single- und Multi-Layer-Systemen entwickelt werden, was eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung von S-Layer basierten Sensorsystemen ist. Diese Thematik wird im vom BMBF finanzierten Projekt AptaSens bearbeitet, das im April gestartet ist. Daraus entstandene neue Ideen gehen bereits in die Richtung einer Herstellung von mehrdimensionalen optisch aktiven Schichten zur Nutzung in der Fotovoltaik.

5. Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Eine Verwendung der S-Layer-Proteine durch andere Forschergruppen zur Herstellung von photokatalytischen Schichten ist nicht bekannt. Durch Literaturrecherchen, Teilnahme an Konferenzen und Gespräche mit Firmen ist bekannt, dass in diversen Projekten die Entwicklung

photokatalytischer Materialien und ihr Einsatz zur Wasseraufbereitung vorangetrieben wird. Bislang gibt es jedoch keine zufriedenstellende Verfahren, die bereits eine breite Anwendung in der Praxis finden. Nachteile bei der Verwendung von Nanopartikeln ist das Erfordernis einer dauerhaften Immobilisierung bei gleich bleibend hoher photokatalytischer Aktivität, um eine Freisetzung der möglicherweise toxischen Partikel und eine dadurch erforderliche aufwendige Abscheidung im Anschluss an die Reaktion. Ein Verfahren, das auf der Verwendung von Biomolekülen als Matrix zur Herstellung und Immobilisierung von Photokatalysatoren beruht, ist uns nicht bekannt.

6. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden in folgender Schutzrechtsanmeldung verwertet:

DE 10 2008 014 298.0 „Hochgeordnete Nanostrukturen und Sensoren und deren Verwendung“; zwei weitere Patentanmeldungen sind geplant.

Veröffentlichungen (erfolgt):

Pollmann, K., Raff, J., Günther, T. and Fahmy, K. (2009)
Bacterial surface layers proteins: self-organizing biomolecules as building blocks for nanostructured materials.
Proceedings of the Eleventh Vietnamese-German Seminar on Physics and Engineering, Nha Trang City, from March, 31, to April, 5, 2008

Raff, J., Marquard, A., Günther, T., Pollmann, K. (2008)
Multifunctional biocomposite layers for the elimination of pharmaceutical residues in water. Proceedings of the Bremer Colloquium 2008 on Product integrated Water and Waste Water Technology, 22. to 23. September 2008, Bremen;

Pollmann, K.; Raff, J.; Fahmy, K.; von Boranny; Grenzer, J.; Herrmannsdörfer, T. (2008)
Bacterial surface layers (S-layers) as building blocks for nanocomposites. Proceediongs zur Nanofair, 11.-12.03.2008, Dresden

Präsentationen auf Tagungen:

Raff, J. (2009) Beitrag angenommen
Advanced Bio-composite Materials for Water Treatment
Vortrag beim 60. Berg- und Hüttenmännischer Tag, 17.-19.06.2009, Freiberg

Raff, J.
Bioinspired Materials for Nanotechnology
Eingeladener Vortrag zum 7th International Nanotechnology Symposium Nanofair 2009, 26.-29.05.2009, Dresden, Deutschland

Pollmann, K.; Marquard, A.; Günther, T.; Lehmann, F.; Richter, L.; Raff, J. (2009)
Neue Materialien zur Eliminierung von Arzneimittelreststoffen durch Nano-Biotechnologie
Poster zum 4. Dresdner Symposium "Endokrin aktive Stoffe in Abwasser, Klärschlamm und Abfällen, 25.03.2009, Dresden, Deutschland

Raff, J.; Marquard, A.; Pollmann, K. (2008)
Multifunktionale Biokompositschichten zur Eliminierung von Arzneimittelrückständen aus Wasser.
Vortrag beim Bremer Colloquium Produktionsintegrierte Wasser-/Abwassertechnik, 22.-23.09.2008, Bremen

Pollmann, K.; Raff, J. (2008)
Nano-Biotechnologie für den Umweltschutz: Entwicklung neuer fotokatalytisch aktiver Verbundmaterialien.
Vortrag und Poster beim DECHEMA-Workshop zur Fördermaßnahme NanoNature des BMBF, 26.08.2008, Frankfurt

Pollmann, K.; Raff, J.; Fahmy, K.; von Borany; Grenzer, J.; Herrmannsdörfer, T. (2008)
Bacterial surface layers (S-layers) as building blocks for nanocomposites. Poster zur Nanofair, 11.-12.03.2008, Dresden

Pollmann, K.; Raff, J.; Marquard, A.; Scholz, A. (2008)
Bacterial surface layers (S-layers) as building blocks for photocatalytic nanocomposites. Posterbeitrag zur Konferenz NanoBioEurope2008, 09.-13.06.2008, Barcelona, Spanien

Öffentliche Vorträge:

Raff, J. (2009) Beitrag angenommen
Radioökologische Forschungsarbeiten als Ausgangspunkt für die Entwicklung innovativer Materialien für die Umwelttechnik
Vortrag im Rahmen des Umweltkolloquiums, Studiengang Chemieingenieurwesen, Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden (FH), 02.07.2009, Dresden, Deutschland

Raff, J. (2009)
Bakterielle S-Layer als Strukturelemente für die Nanobiotechnologie
Eingeladener Vortrag zum Forschungsseminar, Professur für Physikalische Chemie, TU Dresden, 19.05.2009, Dresden, Deutschland.

Raff, J. (2009)
Uranabfallhalden als Fundgrube für Technologie-Innovationen.
Tag des offenen Labors 2009, Forschungszentrum Dresden-Rossendorf, 09.05.2009, Dresden

Präsentation auf Messen:

Biotechnica 2008, 07.-09.10.2008, Hannover, Deutschland
Nanoskalige Biokompositmaterialien zur Eliminierung von Arzneimittelrückständen

Veröffentlichungen im Rahmen der Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses:

Martin Krause (2008)
Untersuchungen zur technischen Anwendbarkeit von selbstorganisierenden bakteriellen Hüllproteinen in der Nanotechnologie
Praxissemesterarbeit, Studiengang Chemie, Hochschule Zittau/Görlitz (FH) 14.03.2008

Julia Rossmann (2008)
Medienoptimierung für verschiedene Haldenisolate zur Steigerung der Biomasse- und Hüllproteinausbeute
Bericht zum Praxissemester, Chemieingenieurwesen, Fachbereich Maschinenbau/ Verfahrenstechnik Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, 25.09.2008

Frank Behrendt (2008)
Herstellung und Optimierung fotokatalytisch aktiver Schichten auf der Basis bakterieller Hüllproteine.
Diplomarbeit, Chemieingenieurwesen, Fachbereich Maschinenbau/ Verfahrenstechnik Hochschule für Technik und Wirtschaft Dresden, 25.09.2008

Tobias Günther (laufende Promotionsarbeit)
Erzeugung und Charakterisierung nanofunktionaler Ein- und Mehrschichtsysteme mit bakteriellen Surface-Layer-Proteinen für photochemische und katalytische Anwendungen

Promotionsarbeit,
Professur für Physikalische Chemie / Elektrochemie, Technische Universität Dresden

Zwei Veröffentlichung der Ergebnisse in einer internationalen Fachzeitschrift sind in Vorbereitung („New S-layer based photocatalytic materials“, „Heterologous expression of the S-layer-like protein SllB induces the formation of long filaments of *E. coli* consisting of membrane structures“)