

Genetisch modifizierte Biotemplate zur Erzeugung von Zr-basierten Nanomaterialien

Von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Rahel Eisele
aus Bietigheim-Bissingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Joachim Bill
Mitberichter: Prof. Dr. Bernhard Hauer
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Rainer Niewa

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2019

Institut für Materialwissenschaft der Universität Stuttgart

2019

Eigenständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Genetisch modifizierte Biotemplate zur Erzeugung von Zr-basierten Nanomaterialien

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe; aus fremden Quellen entnommene Passagen und Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.^[1]

Name: _____

Unterschrift: _____

Datum: _____

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden am Institut für Materialwissenschaft der Universität Stuttgart durchgeführt. Betreut wurde die Arbeit von Prof. Dr. Joachim Bill und Dr. Dirk Rothenstein.

Die vorliegende Dissertation ist in einem nicht-kumulativen Stil verfasst worden. Teile der Arbeit, die für eine wissenschaftliche Veröffentlichung vorgesehen sind, werden im Folgenden aufgeführt.

W. Halter, **R. Eisele**, D. Rothenstein, J. Bill, F. Allgöwer, „Moment dynamics of Zirconia particle formation for optimizing particle size distribution“, in Vorbereitung

(W. Halter und **R. Eisele**: geteilte Erstautorenschaft)

(Inhalt in den Kapiteln 6.1.3 und 6.1.5)

R. Eisele, P. Popella, D. Rothenstein, F. Götz, J. Bill, Arbeitstitel „Biocompatibility on inorganic and bioorganic surfaces“, in Vorbereitung

(Inhalt in Kapitel 6.5)

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	7
3	Einleitung	13
4	Theorie	17
4.1	Zirkoniumdioxid	17
4.2	Zetapotential	18
4.3	DLVO Theorie	21
4.4	Biomineralisation	25
4.4.1	Perlmutter	27
4.4.2	Biosilika	29
4.5	Bio-inspirierte Mineralisation	30
4.6	M13-Bakteriophagen	33
4.6.1	Genetische Modifikation durch inverse Polymerase-Kettenreaktion	37
4.6.2	Phagen-Display	39
4.7	Phagenschichten als organische Template zur Schichtmineralisation	41
4.8	Biofilme	42
4.9	Methoden	43
4.9.1	Dynamische Lichtstreuung	43
4.9.2	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	45
4.9.3	Rasterkraftmikroskopie	45
4.9.4	Rasterelektronenmikroskopie/Energiedispersive Röntgenspektroskopie	46
4.9.5	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	47
4.9.6	Thermische Analyse	48
4.9.7	Flüssigkeitspyknometrie	49
4.9.8	Zetapotentialmessung	50
4.9.9	Röntgenbeugung	51
4.9.10	Kontaktwinkelmessung	52
4.9.11	Fluoreszenzmikroskopie	53
5	Experimente	55

5.1	Materialien.....	55
5.1.1	Geräte.....	55
5.1.2	Chemikalien.....	56
5.1.3	Substrate und Partikel.....	58
5.1.4	Enzyme.....	58
5.1.5	Primer.....	59
5.1.6	Bakterienstamm.....	60
5.1.7	Plasmid.....	61
5.1.8	Kits.....	61
5.1.9	Puffer und Lösungen.....	62
5.1.10	Medien.....	64
5.2	Arbeiten mit Bakterien und M13-Bakteriophagen.....	64
5.2.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Bakterien.....	64
5.2.2	<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>) Bakterien.....	66
5.2.3	M13-Bakteriophagen.....	66
5.3	DNA-Techniken.....	68
5.3.1	Phagen-DNA-Isolierung.....	68
5.3.2	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	69
5.3.3	Inverse Polymerase-Kettenreaktion.....	69
5.3.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	73
5.3.5	DNA-Isolierung aus Agarosegel.....	73
5.3.6	Ligation.....	73
5.3.7	DNA-Sequenzierung.....	74
5.4	Phagen-Display.....	74
5.4.1	Stabilität der Phagen.....	75
5.4.2	Elution.....	75
5.4.3	Phagen-Display bei niedrigem pH-Wert.....	75
5.5	Bindungsassay.....	76
5.6	Reinigung und Oberflächenmodifikation von Substraten.....	76
5.6.1	Reinigung von Si-Substraten.....	77
5.6.2	Reinigung von ETFE-Substraten.....	77
5.6.3	Reinigung von PET-Substraten.....	77

5.6.4	Oberflächenmodifikation – HMDS	77
5.6.5	Oberflächenmodifikation – FDTS.....	78
5.7	Biotemplate	78
5.7.1	Einzelphagen.....	78
5.7.2	Ausgerichtete Phagenschichten.....	79
5.8	Mineralisation.....	79
5.8.1	Stabilität immobilisierte Phagen in Mineralisationslösungen.....	79
5.8.2	Einzelphagen-Mineralisation.....	79
5.8.3	Schichtmineralisation auf ausgerichteten Phagenschichten.....	79
5.9	Kalzinieren.....	80
5.10	Charakterisierungsmethoden.....	80
5.10.1	Dynamische Lichtstreuung.....	80
5.10.2	Zetapotentialmessung von Schichten und Substraten	80
5.10.3	Zetapotentialmessung von Partikeln und Phagen.....	81
5.10.4	Thermogravimetrie/Dynamische Differenzkalorimetrie.....	81
5.10.5	Flüssigkeitspyknometrie	82
5.10.6	Kontaktwinkelmessung	83
5.10.7	Röntgenbeugung.....	83
5.10.8	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma	83
5.10.9	Röntgenphotoelektronenspektroskopie	84
5.10.10	Energiedispersive Röntgenspektroskopie	84
5.10.11	Rasterkraftmikroskopie.....	84
5.10.12	Rasterelektronenmikroskopie	84
5.10.13	Fluoreszenzmikroskopie	85
6	Ergebnisse und Diskussion	86
6.1	Mineralisationssystem	86
6.1.1	Mineralisationslösung.....	87
6.1.2	Partikelagglomeration.....	107
6.1.3	Einflussgrößen auf Partikelwachstum und -agglomeration.....	112
6.1.4	Mineralisationsprodukt.....	116
6.1.5	Modellierung des Partikelbildungs- und Wachstumsprozesses.....	127
6.2	Biotemplat.....	136

6.2.1	Phagen-Display	137
6.2.2	Genetische Modifikation.....	149
6.3	Einfluss ZrO ₂ -Bindepeptide auf die Abscheiderate von ZrbM.....	152
6.3.1	Stabilität immobilisierter Phagen in der Mineralisationslösung.....	153
6.3.2	Substrat zur selektiven Mineralisation von Phagen	155
6.3.3	Templatgesteuerte Abscheiderate	159
6.4	Mineralisation von Schichten aus Zirkonium-basiertem Material auf Phagen als Templat.....	168
6.4.1	Phagentemplat zur Schichterzeugung	169
6.4.2	Schichtmineralisation auf Wildtyp-Phagentemplaten.....	171
6.5	Adhäsion von <i>Staphylococcus aureus</i> auf unterschiedlichen Materialoberflächen	175
6.5.1	Charakterisierung der unterschiedlichen Materialoberflächen	175
6.5.2	Bakterienadhäsion auf verschiedenen Materialoberflächen	183
7	Literaturverzeichnis.....	193
8	Danksagung.....	205

Abkürzungsverzeichnis

a	Partikelradius
A	Grenzfläche
A_{13}	Hamaker Konstante
AFM	Rasterkraftmikroskopie, engl.: Atomic Force Microscopy
aPhD	saures Phagen-Display, engl.: acidic Phage Display
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin, engl.: Bovine Serum Albumin
BSE	Rückstreuelektronen, engl.: Backscattered Electrons
c	Konzentration
c_i	Stoffmengenkonzentration des Ions i
Cl	Chlor
$c\text{-ZrO}_2$	kubisches Zirkoniumdioxid
d	Partikeldurchmesser
D	Diffusionskoeffizient
ddH ₂ O	Reinstwasser
d_{hkl}	Abstand der Netzebenen mit den Miller Indizes hkl
DLS	dynamische Lichtstreuung, engl.: Dynamic Light Scattering
DLVO	Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig, engl.: double stranded
DSC	Dynamischen Differenzkalorimetrie, engl.: Differential Scanning Calorimetry
DTA	Differenzthermoanalyse
e	Elementarladung
E	Feldstärke
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E_A	Aktivierungsenergie
E_b	Bindungsenergie der Elektronen

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	energiespersive Röntgenspektroskopie, engl.: Energy Dispersive X-Ray spectroscopy
E_{kin}	kinetische Energie
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer
FDTS	1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorodecyltriethoxysilan
FW	vorwärts, engl.: forward
G	freie Enthalpie
G	gasförmig
h	Plancksches Wirkungsquantum
H	Abstand zwischen zwei Partikeln
hkl	Miller Indizes
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HPC	Hydroxypropylcellulose
$h\nu$	Photonenenergie
I	Intensität
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma, engl.: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
ICSD	Anorganische Kristallstruktur Datenbank, engl.: Inorganic Crystal Structure Database
IEP	Isoelektrischer Punkt
iPCR	inverse Polymerase-Kettenreaktion, engl.: inverse polymerase chain reaction
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Keimbildungsrate
k_B	Boltzmannkonstante
L	flüssig
LB	Lysin produzierende Brühe, engl.: lysogeny broth
m	Masse
n	Brechungsindex
N_A	Avogadro Konstante
NEB	New England Biolabs

ori	Ursprung der Replikation, engl.: Origin of Replication
p	Druck
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl.: Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglycol
PET	Polyethylenterephthalat
Phagen	M13-Bakteriophagen
PS	Verpackungssignal, engl.: Packaging Signal
r	Ionenradius
R	absolute Gaskonstante
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RF-DNA	replikative Form der Desoxyribonukleinsäure
rms	quadratisches Mittel, engl.: root mean square
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: revolutions per minute
RT	room temperature
RV	rückwärts, engl.: reverse
S	Übersättigung
S	fest
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAM	selbstassemblierende Monoschichten, engl.: self-assembled monolayer
SE	Sekundärelektronen
SiO ₂	Siliziumdioxid
ss	einzelsträngig, engl.: single stranded
T	Temperatur
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TG	Thermogravimetrie
TMV	Tabakmosaikviren
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSB	Trypton Soja Brühe, engl.: Tryptic Soy Broth
t -ZrO ₂	tetragonales Zirkoniumdioxid
v_i	spezifisches Volumen der Spezies i
v	Geschwindigkeit

V_A	van der Waals Wechselwirkung
V_E	elektrostatische Wechselwirkung
V_m	Energiebarriere
V_R	Born Abstoßung
V_T	Gesamtwechselwirkung zwischen Partikeln
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie, engl.: X-Ray Photoelectron Spectroscopy
XRD	Röntgenbeugung, engl.: X-Ray Diffraction
z_i	Ladungszahl des Ions i
ZP	Zetapotential
ZrbM	Zirkonium-basiertes Material
ZrO ₂	Zirkoniumdioxid
ZrOCl ₂ ·8H ₂ O	Zirkonylchlorid Octahydrat
ZT	Zimmertemperatur
α	Wasser-Kontaktwinkel
γ	Grenzflächenspannung
ε	Dielektrizitätskonstante
ε_0	Permittivität des Vakuums
η	Viskosität
θ	Beugungswinkel
κ	Debye-Hückel Parameter
λ	Wellenlänge
μ	elektrophoretische Mobilität
μ°	chemisches Standardpotential
μ_i	chemisches Potential eines Stoffes in einer Phase i
ν_e	charakteristische elektronische Absorptionsfrequenz
ρ	Dichte
σ	Kollisionsdurchmesser
ψ_0	Oberflächenpotential
ψ_s	Stern-Potential

1 Zusammenfassung

In Biomineralisationsprozessen aus der belebten Natur scheiden sich anorganische Materialien auf organischen Templaten (Biomakromoleküle) ab. Funktionelle Gruppen der Makromoleküle steuern dabei die Abscheidung aus einer wässrigen Lösung sowie die Strukturierung des anorganischen Materials.^[2,3] Dabei sind spezifische Wechselwirkungen zwischen dem organischen Templat und dem anorganischen Material von Bedeutung.^[4-7] Die Materialbildung findet unter Umgebungsbedingungen in wässrigen Systemen statt.^[4,8] Für technisch interessante Materialien wie Zirkoniumdioxid (ZrO_2) stellt die energieeffiziente Herstellung präziser Nanostrukturen eine technische Herausforderung dar. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit die Prinzipien der Biomineralisation auf die Herstellung von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) übertragen. Hierzu gehörte die Materialbildung durch Mineralisation aus einer ZrOCl_2 -Lösung sowie eine gezielte Mineralisation auf bioorganischen M13-Bakteriophagentemplaten. Um die „biologische Spezifität“ in Biomineralisationsprozessen auf die Bildung von ZrbM zu übertragen, wurden Peptide mittels Phagen-Display identifiziert, die spezifisch an ZrO_2 binden. Mittels genetischer Modifikation wurden diese ZrO_2 -Bindepeptide auf der Phagenoberfläche präsentiert. Der Einfluss von genetisch modifizierten und wt-Phagen auf die Mineralisation von ZrbM wurde untersucht. Generell waren zwei Möglichkeiten der Mineralisation vorstellbar: (i) Mineralisation durch heterogene Keimbildung auf dem Phagentemplat und (ii) Mineralisation durch homogene Keimbildung in Lösung mit anschließender Abscheidung der gebildeten Partikel auf dem Templat.^[9] Für beide Materialbildungsmechanismen waren sowohl für die Untersuchung des Templateinflusses, als auch für die spätere Mineralisation von Schichten spezielle Anforderungen an die Mineralisationslösung gestellt. Um den Anforderungen einer großen Interaktionsfläche zwischen Templat und Partikeln (homogene Keimbildung) oder kleiner Zr-Spezies (heterogene Keimbildung) und der Templatstabilität gerecht zu werden, musste zunächst eine geeignete Mineralisationslösung etabliert werden. Neben einem relativ hohen pH-Wert (> 2) und einer niedrigen Temperatur < 80 °C war hierbei die Bildung von Nanopartikeln, die stabil gegen Partikelagglomeration sind, erforderlich. Als Mineralisationssystem wurde eine ZrOCl_2 -Lösung in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch verwendet. Zur Etablierung einer Mineralisationslösung, die den beschriebenen Anforder-

rungen entspricht, ist es wichtig, den Partikelbildungs- und Partikelwachstumsmechanismus bei verschiedenen Prozessparametern wie Salzkonzentration, Temperatur oder Ethanolgehalt zu kennen. Hierfür wurden umfangreiche Untersuchungen des Partikelwachstums in einer $ZrOCl_2$ -Lösung mit einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch vorgenommen. Dabei gaben DLS-Messungen (dynamische Lichtstreuung, engl.: Dynamic Light Scattering, DLS) der Mineralisationslösung Auskunft über die Größe der gebildeten Partikel und über das Partikelwachstum. In Kombination mit ICP-OES-Messungen (optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma, engl.: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) die den Verbrauch an Zr-Spezies durch die Partikelbildung zeigten, wurde der Partikelwachstumsmechanismus beschrieben. So konnten Parameter identifiziert werden, die ein schnelles Partikelwachstum durch Agglomeration verhindern und die Bildung einer stabilen Dispersion ermöglichen. Die umfassende Untersuchung des Mineralisationssystems zeigte, dass die Partikelagglomeration hauptsächlich durch den pH-Wert, die Temperatur und den Ethanolgehalt beeinflusst wird. Ein niedriger pH-Wert, eine niedrige Temperatur sowie ein niedriger Ethanolgehalt können die Agglomeration verhindern und eine stabile Dispersion gewährleisten. Als Mineralisationssystem, das den beschriebenen Anforderungen an die Mineralisation entspricht, wurde das System mit 20 mM $ZrOCl_2$, 80 Vol % Ethanol und einer Mineralisationstemperatur von 25 °C (Zimmertemperatur, ZT) etabliert. Hier bildeten sich bei pH 2,12 über einen Zeitraum von 90 min Partikel mit einer nahezu konstanten Partikelgröße von 12 nm bis 17 nm. Das Mineralisationsprodukt dieses Mineralisationssystems wurde umfangreich charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass im Mineralisationsprodukt kleine Mengen an Cl- und Ethanol-Spezies, wie zum Beispiel brückenbildende Ethoxygruppen zwischen zwei Zr-Ionen oder koordinierte Ethanol-Moleküle vorliegen. Für das Mineralisationsprodukt wurde eine Zusammensetzung von $Zr_5O_6(OC_2H_5)_2(OH)_2Cl_4$ vorgeschlagen. Die Mineralisationstemperatur hatte dabei keinen Einfluss auf die Zusammensetzung und die Dichte des ZrbMs. Somit ergab sich, dass sich die Mineralisationsprodukte, die während der Mineralisation bei ZT und bei 60 °C entstanden, nicht voneinander unterscheiden. Bei ZT wurde der Einfluss eines Biotemplats auf die Mineralisation von ZrbM untersucht. Zur Mineralisation von Schichten aus ZrbM wurde die Mineralisationstemperatur auf 60 °C erhöht.

Auf Grundlage der umfassenden Untersuchungen des Mineralisationssystems wurde die Partikelbildung und das Partikelwachstum in einer Kooperation mit Dipl.-Ing. W. Halter

(Prof. Dr.-Ing. F. Allgöwer, Universität Stuttgart) modelliert. Neben Wachstum durch molekulare Addition von kleinen Zr-Tetrameren/Oktameren wurde auch ein Wachstumsmechanismus durch Agglomeration von Primärpartikeln angenommen. Die Simulation des Partikelwachstums stimmte sehr gut mit den experimentellen Daten bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen überein. Es wurde gezeigt, dass das eingeführte Modell den Partikelbildungs- und Wachstumsprozess im Bereich der getesteten Prozessparameter realitätsnah abbildet. Das entwickelte Modell kann auch auf andere Mineralisationssysteme übertragen werden, bei denen Partikelwachstum durch molekulare Addition oder Partikelagglomeration stattfindet. Somit steht eine Möglichkeit zur Verfügung, um ohne umfangreiche experimentelle Untersuchungen Parameter wie Temperatur und Salzkonzentration von Mineralisationssystemen zu identifizieren, die zur Bildung stabiler Nanopartikel führt und dadurch die Mineralisation homogener Funktionsmaterialien ermöglicht.

Das etablierte Mineralisationssystem (20 mM $ZrOCl_2$, 80 Vol % Ethanol bei ZT) wurde eingesetzt, um den Einfluss von ZrO_2 -Bindepeptiden auf die Abscheidung von Zirkoniumbasiertem Material zu untersuchen. Hierfür wurden zunächst 7-mer Peptide mittels Phagen-Display identifiziert, die spezifisch an tetragonales (*t*-) und/oder kubisches (*c*-) ZrO_2 binden. Die Peptide sollten in der Mineralisationslösung, die einen pH-Wert von 2 aufweist, spezifisch an ZrO_2 binden. Bei einem Standard-Phagen-Display werden allerdings Peptide identifiziert, die bei pH 7,5 spezifisch an das Zielmaterial binden. Daher war zunächst eine Anpassung des Phagen-Displays an die Selektion von Peptiden aus einem sauren Medium erforderlich. Mit dem neu etablierten „sauren“ Phagen-Display („acidic“ Phage Display (aPhD)), das in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben wird, können Peptide identifiziert werden, die unter sauren Bedingungen spezifisch an *t*- und/oder *c*- ZrO_2 binden. Um den Einfluss der Peptideigenschaften auf das Bindungsverhalten zu untersuchen, wurde ein Bindungsassay durchgeführt. Mit diesem wurde die Bindungsstärke der mehrfach isolierten Peptide für die Bindung an *c*- ZrO_2 analysiert. Durch das Bindungsassay konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass hydrophobe und polare Wechselwirkungen die Hauptwechselwirkungen sind, die zur Bindung der Peptide an ZrO_2 führen. Es wurde gezeigt, dass die Bindungsstärke mit steigender Anzahl an polaren Aminosäuren und/oder mit zunehmender Hydrophobizität der Bindepeptide zunahm. Zudem wurde ein potentielles Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz SXS identifiziert. Auch hier spielten polare

Wechselwirkungen eine Rolle. Die Kombination der Flexibilität der Serineinheiten in der Peptidkette und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen des Suspensionsmittels führten zu einer Konformation der Bindepeptide, die die Bildung starker polarer Wechselwirkungen des Bindemotivs SXS mit ZrO_2 ermöglichten.

Um den Einfluss der Bindepeptide auf die Mineralisation von ZrbM zu untersuchen, wurden die mehrfach isolierten Peptide *ct5-1*, *c5-1* und *ct5-2* mittels genetischer Modifikation auf der Phagenoberfläche präsentiert, wo sie als Fusionsprotein mit dem Haupthüllprotein pVIII vorlagen. Die modifizierten Phagen wurden im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Phagen als Biotemplat zur Mineralisation verwendet. Zur Untersuchung der Abscheiderate wurden die Phagen auf einem Substrat immobilisiert. Um die Höhenzunahme der Phagen durch Mineralisation mittels AFM zu bestimmen, war eine selektive Mineralisation der Biotemplate nötig. Die Verwendung eines hydrophoben FDTS-modifizierten Si-Wafers mit einer geringen Oberflächenrauigkeit erwies sich hierfür als geeignet. Die modifizierten Phagen zeigten im Vergleich zu wt-Phagen eine höhere Abscheiderate. Es wurde beobachtet, dass eine größere Anzahl an Serinmolekülen in den ZrO_2 -Bindepeptiden zu einer erhöhten Abscheiderate führte. Hieraus folgte, dass die höhere Anzahl an Hydroxygruppen auf der Phagenoberfläche zu einem schnelleren Schichtwachstum durch Kondensationsreaktionen mit den hydroxylierten Zr-Tetrameren/Oktameren führte. Interessanterweise zeigten die Peptide, die zu einer schnelleren Abscheiderate führten gleichzeitig auch eine stärkere Bindung zu ZrO_2 . Diese Korrelation lag sowohl innerhalb der modifizierten Phagen, als auch im Vergleich zu wt-Phagen vor. Der Einfluss der ZrO_2 -Bindepeptide auf die Mineralisation von ZrbM lässt sich damit folgendermaßen beschreiben: ZrO_2 -Bindepeptide mit einer starken Affinität zu ZrO_2 führen zu einer stärkeren Anziehung von Zr-Tetrameren/Oktameren an das Biotemplat. Die Hydroxygruppen des Biotemplats führen durch Kondensationsreaktionen mit hydroxylierten Zr-Tetrameren/Oktameren zu einer heterogenen Keimbildung auf dem Biotemplat. Die Bindungsstärke und Kondensationsreaktionen sind dabei abhängig von der Anzahl an polaren Hydroxygruppen. Eine höhere Anzahl führt zu einer stärkeren Bindung und gleichzeitig zu einer schnelleren Keimbildung durch Kondensationsreaktionen. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit der Phagen zur Selbstassemblierung genutzt, um dichte Phagenschichten zur Mineralisation von ZrbM-Schichten herzustellen. Als Biotemplat ermöglichten die Phagenschichten die Mineralisation homogener Schichten aus ZrbM bei 60 °C. Die Schichtdicke konnte dabei über die Anzahl an Mi-

neralisationszyklen kontrolliert werden. Es lag eine Wachstumsrate von circa 1 nm pro Zyklus (5 min) vor.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich untersucht, ob bestimmte chemische Oberflächen, das heißt bestimmte Materialien oder auch bestimmte funktionelle Gruppen, eine Adhäsion von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) auf einer Materialoberfläche unterdrücken können. *S. aureus* ist ein pathogenes Bakterium, welches zur Bildung von Biofilmen, zum Beispiel auf Implantaten, und dadurch zu einem Implantatverlust bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann.^[10] Die Biofilmbildung kann effektiv unterbunden werden, indem die Bakterienadhäsion auf Oberflächen verhindert wird. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob bestimmte Oberflächen die Bakterienadhäsion unterdrücken können. Hierzu wurde die Bakterienadhäsion von *S. aureus* auf einer Phagenschicht, einer Schicht aus ZrbM und einer Siliziumdioxid (SiO₂) Schicht untersucht (Dr. P. Popella, Prof. Dr. F. Götz, Universität Tübingen). Auf der Phagenschicht wurde im Vergleich zu einer SiO₂-Schicht und einer Schicht aus ZrbM eine sehr geringe Bakterienadhäsion beobachtet. Die Untersuchungen verschiedener Einflussfaktoren auf die Bakterienadhäsion zeigten, dass die Bakterienadhäsion an der SiO₂-Schicht und der ZrbM-Schicht durch die Oberflächenrauigkeit (nanoskalige Rauigkeit), die Hydrophobizität und die Oberflächenladung beeinflusst werden kann. Bei der Phagenschicht korrelierten weder die Oberflächenladung, noch die Oberflächenrauigkeit und die Hydrophobizität im Vergleich zu den anorganischen Materialoberflächen mit der Bakterienadhäsion. Dies ließ darauf schließen, dass die geringe Bakterienadhäsion auf der Phagenschicht auf die biochemische Zusammensetzung der Hüllproteine, vor allem auf die Abwesenheit spezifischer Bindedomänen (Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen), zurückzuführen ist.

2 Summary

In biomineralisation processes in living nature, inorganic materials are deposited on organic templates (biomacromolecules). Thereby, functional groups of the macromolecules control the material deposition from an aqueous solution as well as the structuring of the inorganic material.^[2,3] Specific interactions between the organic template and the inorganic material are of importance.^[4-7] Biomineralisation takes place under ambient conditions.^[4,8] For technically interesting materials such as zirconium dioxide (ZrO_2), the energy-efficient production of precise nanostructures represents a technical challenge. Therefore, within the scope of this work the principles of biomineralisation were transferred to the production of zirconium-based material (ZrbM). This included material formation by mineralisation from a ZrOCl_2 solution and targeted mineralisation on bioorganic M13-bacteriophage templates. In order to transfer the "biological specificity" in biomineralisation processes to the formation of ZrbM, peptides were identified by phage display, which specifically bind to ZrO_2 . By genetic modification these ZrO_2 -binding peptides were presented on the phage surface. The influence of genetically modified and wildtype (wt) phages on the mineralisation of ZrbM was investigated. In general, two possibilities of mineralization were conceivable: (i) mineralisation by heterogeneous nucleation on the phage template, and (ii) mineralisation by homogeneous nucleation in solution with subsequent deposition of the formed particles on the template.^[9] For both material formation mechanisms, special requirements were placed on the mineralization solution. This applies both to the investigation of the template influence and to the mineralization of layers. In order to meet the requirement of a large interaction surface between template and particles (homogeneous nucleation) or template and Zr-containing molecules (heterogeneous nucleation) and the requirement of template stability, a suitable mineralization solution had to be established first. In addition to a relatively high pH value (> 2) and a low temperature < 80 °C, the formation of nanoparticles, which are stable against particle agglomeration, was necessary. A ZrOCl_2 solution with an ethanol/water-solvent mixture was used as mineralisation system. In order to establish a mineralisation solution that meets the described requirements, it is important to know the particle-formation and particle-growth mechanism at different process parameters such as salt concentration, temperature or ethanol content. For this purpose, extensive

investigations of particle growth in a ZrOCl_2 solution with an ethanol/water-solvent mixture were carried out. DLS (Dynamic Light Scattering, DLS) measurements of the mineralisation solution provided information on the size of the formed particles and on the particle growth. In combination with ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) measurements, which revealed the consumption of Zr species by particle formation, the particle-growth mechanism was described. Thus, parameters could be identified which prevented rapid particle growth by agglomeration and enabled the formation of a stable dispersion. The comprehensive investigation of the mineralisation system showed that particle agglomeration is mainly influenced by pH, temperature and ethanol content. Low pH, low temperature and low ethanol content can prevent particle agglomeration and ensure stable dispersions. A mineralisation system with 20 mM ZrOCl_2 , 80 Vol % ethanol and a mineralisation temperature of 25 °C (room temperature, RT) was established to meet the described mineralisation requirements. At pH 2.12, particles with an almost constant particle size of 12 nm to 17 nm were formed over a time period of 90 minutes. The mineralisation product of this mineralisation system was extensively characterized. It was shown that the mineralisation product contains small amounts of Cl and ethanol species such as bridging ethoxy groups between two Zr ions or coordinated ethanol molecules. For the mineralisation product a composition of $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$ was proposed. The mineralisation temperature had no influence on the composition and density of the ZrbM. Thus, it was found that the mineralization products formed during mineralization at RT or at 60 °C did not differ from each other. At RT the influence of a bio-template on the mineralisation of ZrbM was investigated. The mineralisation temperature was increased to 60 °C for the mineralisation of ZrbM layers.

Based on comprehensive investigations of the mineralisation system, particle formation and particle growth were modelled in cooperation with Dipl.-Ing. W. Halter (Prof. Dr.-Ing. F. Allgöwer, University of Stuttgart). In addition to growth by molecular addition of small Zr tetramers/octamers, a growth mechanism by agglomeration of primary particles was also considered. The simulation of particle growth corresponded very well with the experimental data at different mineralisation conditions. It was shown that the introduced model realistically reflects the particle formation and growth process in the range of the tested process parameters. The developed model can also be transferred to other mineralisation systems where particle growth takes place by molecular addition or particle agglomera-

tion. Thus, a general approach is now available to identify parameters, such as temperature and salt concentration of mineralisation systems, which lead to the formation of stable nanoparticles and thus enable the mineralisation of homogeneous functional materials without extensive experimental investigations.

The established mineralisation system (20 mM $ZrOCl_2$, 80 Vol % ethanol at RT) was used to investigate the influence of ZrO_2 -binding peptides on the deposition of ZrbM. To this end, 7-mer peptides were first identified by means of a phage display, which specifically bind to tetragonal (*t*-) and/or cubic (*c*-) ZrO_2 . The peptides should bind specifically to ZrO_2 in the mineralisation solution, which has a pH value of 2. In a standard phage display, however, peptides are identified that bind specifically to the target material at pH 7.5. Therefore, it was first necessary to adapt the phage display to the selection of peptides from an acid medium. With the newly established "acidic" phage display (aPhD), which is described for the first time in this work, it is possible to identify peptides that specifically bind to *t*- and/or *c*- ZrO_2 under acidic conditions. In order to investigate the influence of peptide properties on binding to ZrO_2 , a binding assay was performed. The binding strength of the peptides, which have been isolated several times, for binding to *c*- ZrO_2 was analyzed. The binding assay revealed that hydrophobic and polar interactions are the main interactions leading to the binding of peptides to ZrO_2 . It was shown that the binding strength increased with increasing number of polar amino acids and/or with increasing hydrophobicity of the binding peptides. In addition, a putative binding motif with the amino acid sequence SXS was identified. Polar interactions also played a role here. The combination of the flexibility of the serine residues in the peptide chain and the formation of hydrogen bonds with water molecules of the suspension agent led to a conformation of the binding peptides, which enabled the formation of strong polar interactions of the binding motif SXS with ZrO_2 .

In order to investigate the influence of binding peptides on the mineralisation of ZrbM, the multiple isolated peptides *ct5-1*, *c5-1* and *ct5-2* were expressed as fusion proteins with the major coat protein pVIII of M13 bacteriophage. This was achieved by genetic modification of the phages. The modified phages were used as biotemplate for mineralisation in comparison to wild type (wt)-phages. To investigate the deposition rate, the phages were immobilized on a substrate. Selective mineralisation of the biotemplate was necessary to determine the increase in height of the phage by mineralisation using AFM. The use of a hydro-

phobic FDTS-modified Si wafer with a low surface roughness proved to be effective. The modified phages showed a higher deposition rate compared to wt phage. It was observed that a larger number of serine molecules in the ZrO₂ binding peptides led to an increased deposition rate. Thus, it was concluded that the higher number of hydroxy groups on the phage surface led to faster layer growth due to condensation reactions with the hydroxylated Zr tetramers/octamers. Interestingly, the peptides that led to a faster deposition rate also showed a stronger binding to ZrO₂. This correlation was present within the modified phages and also in comparison to the wt phage. The influence of ZrO₂ binding peptides on the mineralisation of ZrbM can thus be described as follows: ZrO₂ binding peptides with a strong affinity to ZrO₂ lead to a stronger attraction of Zr tetramers/octamers to the biotemplate. The hydroxy groups of the biotemplate lead to a heterogeneous nucleation on the biotemplate by condensation reactions with hydroxylated Zr tetramers/octamers. The binding strength and condensation reactions depend on the number of polar hydroxy groups. A higher number leads to a stronger binding and at the same time to a faster nucleation by condensation reactions. Furthermore, the ability of phages to self-assemble was used within the scope of this work to produce dense phage layers for mineralisation of ZrbM layers. As a biotemplate, the phage layers enabled the mineralisation of homogeneous ZrbM layers at 60 °C. The layer thickness could be controlled by the number of mineralisation cycles. The growth rate was about 1 nm per cycle (5 min).

As a last part of this work further investigations were carried out to see whether certain chemical surfaces, i.e. certain materials or certain functional groups, can inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) to a material surface. *S. aureus* is a pathogenic bacterium which can lead to the formation of biofilms, for example on implants, and thus lead to implant loss or even life-threatening complications.^[10] Biofilm formation can be effectively prevented by preventing bacterial adhesion to surfaces. Therefore, investigations were done to see whether certain surfaces can suppress bacterial adhesion. For this purpose the bacterial adhesion of *S. aureus* on a phage layer, a layer of ZrbM and a silicon dioxide (SiO₂) layer was investigated (Dr. P. Popella, Prof. Dr. F. Götz, University of Tübingen). Compared to a SiO₂ and a ZrbM layer, very low bacterial adhesion was observed on the phage layer. The investigations of various factors influencing bacterial adhesion showed that bacterial adhesion to the SiO₂ layer and the ZrbM layer can be influenced by surface roughness (nanoscale roughness), hydrophobicity and surface charge. In the phage layer, neither the sur-

face charge nor the surface roughness and hydrophobicity correlated with bacterial adhesion in comparison to the inorganic material surfaces. This led to the conclusion that the low bacterial adhesion on the phage layer is due to the biochemical composition of the N-terminal part of the major coat proteins pVIII, in particular to the absence of specific binding domains (ligand-receptor interactions).

3 Einleitung

Durch Biomineralisationsprozesse von lebenden Organismen entstehen Biominerale mit herausragenden Eigenschaften.^[4,11] Ein Beispiel ist Perlmutter, das im Inneren von Molluskschalen vorkommt. Perlmutter überzeugt durch seine hohe Festigkeit und Bruchzähigkeit, die auf die Strukturierung des Hybridmaterials aus organischem und anorganischem Material auf verschiedenen Längenskalen zurückzuführen sind (s. 4.4.1).^[12,13] Bei Biomineralisationsprozessen wird die Mineralisation des anorganischen Materials häufig durch Biomakromoleküle induziert.^[2,14] Dabei sind spezifische Wechselwirkungen zwischen dem organischen Templat (Biomakromoleküle) und dem anorganischen Material von Bedeutung. Es entstehen Biominerale mit definierter Größe, Form und Orientierung, gesteuert durch den lebenden Organismus.^[4-7] Die Materialbildung findet unter Umgebungsbedingungen in wässrigen Systemen statt.^[4,8] Für technisch interessante Materialien wie Sulfide (Cadmiumsulfid), Oxide (Zirkoniumdioxid (ZrO_2), Titandioxid, Zinkoxid) oder Metalle (Silber) stellt die energieeffiziente Herstellung präziser Nanostrukturen eine technische Herausforderung dar. Daher besteht ein großer Forschungsbereich darin, die Prinzipien der Biomineralisation auf die Herstellung von Funktionsmaterialien zu übertragen (s. 4.5). Dies beinhaltet die Materialbildung durch Mineralisation aus einer Lösung sowie eine gezielte Mineralisation auf organischen Templates mit definierten Funktionalitäten. Auf diese Weise können die Materialbildung und auch die Materialeigenschaften gezielt beeinflusst werden. Zirkoniumdioxid (ZrO_2) ist ein sehr interessantes Oxidmaterial, das aufgrund seiner herausragenden, vielseitigen Eigenschaften ein breites Anwendungsgebiet (s. 4.1) umfasst.^[15-22] Für die Bildung von ZrO_2 wurden bereits verschiedene organische Templates zur Schichtbildung eingesetzt. Neben alternierenden Schichten aus Polykationen und -anionen, die ein geladenes organisches Templat bilden^[23], wurden selbstassemblierende Monoschichten (engl. Self-assembled monolayers, SAM) mit funktionellen Silanol- und Octadecylgruppen^[24] sowie Sulfonsäure- und Methylgruppen^[25,26] verwendet. Auch natürliche Biomakromoleküle dienen als Templat zur ZrO_2 Bildung. Es konnte gezeigt werden, dass Silikatein die Bildung von Zirkonium-basiertem Material induziert.^[27] Das Enzym Silikatein katalysiert bei der natürlichen Biosilikabildung in Schwammnadeln die Mineralbildung (s. 4.4.2). Auch Proteine wie Lysozym^[28], Rinderserumalbumin^[29] und Gelatine^[29]

wurden bereits als Templat für die Bildung von Zirkonium-basiertem Material verwendet. Bisher wurden allerdings hauptsächlich unspezifische Wechselwirkungen, wie van der Waals Wechselwirkungen und elektrostatische Wechselwirkungen betrachtet. Die Übertragung der „biologischen Spezifität“ in Biomineralisationsprozessen auf die Bildung von technisch interessanten Materialien ist ein vielversprechender Ansatz um sowohl die Materialbildung als auch die Funktionalität der Materialien zu kontrollieren.^[30] So konnte bereits mit Hilfe von Peptiden, die spezifisch an ZrO_2 binden, biomineralisiertes ZrO_2 mit Photolumineszenzeigenschaften mineralisiert werden.^[31] Die dabei entstandene Photolumineszenzeigenschaft wurde auf die Wechselwirkung zwischen spezifischen Bindepeptiden und ZrO_2 zurückgeführt. Eine spezifische Wechselwirkung, die zur Bindung an ZrO_2 führt (ZrO_2 -Bindepeptide), kann auch einen bedeutenden Einfluss auf die Mineralisation von ZrO_2 aus einer Zirkonium haltigen Salzlösung haben. Solche Einflüsse sind bekannt von Biomineralisationsprozessen in der belebten Natur. Für die Bildung von Biomineralien, die durch Biomakromoleküle induziert wird, ist sowohl die molekulare Erkennung als auch die Bindung an das anorganische Material ein wesentlicher Faktor.^[2,3,32] Der Einfluss spezifischer ZrO_2 -Bindepeptide, als organische Template, auf die Mineralisation von Schichten aus Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) wurde bisher noch nicht untersucht. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Dabei wurden ZrO_2 -Bindepeptide auf der Oberfläche von M13-Bakteriophagen (kurz: Phagen) präsentiert (s. 6.2.2). Phagen haben eine Länge von circa 1 μm und einen Durchmesser von 6,5 nm (s. 4.6).^[33] Auf der Phagenoberfläche befinden sich 2700 Kopien des Hüllproteins pVIII, an welches das ZrO_2 -Bindepeptid fusioniert wurde. So konnte ein nanostrukturiertes, organisches Templat mit einer hohen Funktionalität gebildet werden. Dieses ermöglichte die Untersuchung des Templateinflusses auf die Mineralisation von ZrbM (6.3.3). Bei den bisher isolierten ZrO_2 -Bindepeptiden^[31,34] handelt es sich um 12-mer^[31] und 58-mer^[34] Peptide. Für die Präsentation von Peptiden auf der Phagenoberfläche ist allerdings eine kürzere Aminosäuresequenz (< 8 Aminosäuren) erforderlich.^[35,36] Längere Peptide führen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Bildung nicht infektiöser Phagen (s. 4.6).^[36,37] Durch Infektion von *Escherichia coli* Bakterien findet die Vermehrung der Phagen statt. Um die Phagen als Biotemplat einsetzen zu können, muss die Infektiosität der Phagen auch nach der genetischen Modifikation gewährleistet sein. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit 7-mer Peptide mittels Phagen-Display selektiert (s. 6.2.1), die spezifisch an ZrO_2 binden. Die Peptide wurden anschließend mittels

genetischer Modifikation auf der Phagenoberfläche präsentiert (s. 6.2.2). Zur Untersuchung des Templateinflusses auf die Mineralisation, musste die Mineralisationslösung bestimmte Grundbedingungen erfüllen. Generell sind zwei Möglichkeiten der Mineralisation vorstellbar. Die Mineralisation könnte entweder durch heterogene Keimbildung auf dem Biotemplat oder durch homogene Keimbildung der anorganischen Partikeln in Lösung mit anschließender Abscheidung der gebildeten Partikel auf dem Templat stattfinden.^[9] Bei beiden Materialbildungsmechanismen sollte zum einen eine große Interaktionsfläche des anorganischen Materials mit dem nanostrukturierten Biotemplat gegeben sein. Im Falle der heterogenen Keimbildung bilden sich Keime durch Anlagern kleiner Ionen direkt auf dem Templat.^[38] Ist das Templat größer als die einzelnen Ionen, ist eine große Interaktionsfläche gewährleistet. Im Falle einer homogenen Keimbildung lässt sich eine große Interaktionsfläche im Besonderen durch Nanopartikel mit einem hohen Oberflächen/Volumenverhältnis erfüllen. Zum anderen muss die Stabilität des Phagentemplats gewährleistet sein. Je niedriger die Mineralisationstemperatur ($< 80\text{ °C}$ ^[39,40]) und je neutraler der pH-Wert (optimal 6-8^[40,41]) der Mineralisationslösung, umso stabiler ist das Biotemplat. Zur Mineralisation von ZrO_2 wird häufig ZrOCl_2 als Vorstufe verwendet ^[42–45]. Mit einem Alkohol-Wasser Lösungsmittelgemisch findet im Vergleich zu einer wässrigen Salzlösung bereits bei Zimmertemperatur Partikelbildung statt.^[42,46] Ein Vergleich verschiedener Alkohole, *n*-Propanol, *i*-Propanol, *t*-Butanol und Ethanol zeigte, dass ein Ethanol/Wasser-Gemisch zur Bildung sehr feiner Partikel im unteren Nanometerbereich führt.^[43] Auf Grundlage dieses Forschungsergebnisses wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mineralisationssystem mit einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch eingesetzt. Bisherige Mineralisationssysteme in reinem Ethanol^[24] oder einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch^[43,47] wurden bei Mineralisationstemperaturen von 50 °C bis 80 °C und pH-Werten $< 1,5$ verwendet. Zudem wurden Stabilisatoren wie Polyethylenglycol (PEG) zugegeben, die – adsorbiert auf der Partikeloberfläche – stabile Dispersionen durch sterische Hinderung erzielen.^[48] Die organischen Stabilisatoren könnten aber auch als Keim für die Partikelbildung dienen und so bezogen auf das Biotemplat einen konkurrierenden Einfluss auf die Mineralisation haben. Daher können die bisher beschriebenen Mineralisationssysteme nicht verwendet werden, um den Phageneinfluss auf die Mineralisation von ZrbM gezielt zu untersuchen. Um den beschriebenen Anforderungen an die Mineralisationslösung (heterogene und homogene Keimbildung), das heißt (*i*) Bildung einer stabilen Dispersion mit Par-

tikelgrößen im unteren Nanometerbereich, (ii) niedrige Mineralisationstemperatur, (iii) relativ hoher pH-Wert (>2, optimal 6-8), gerecht zu werden, wurden umfangreiche Untersuchungen des Partikelwachstums in einer $ZrOCl_2$ -Lösung mit einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch vorgenommen. Parallel dazu wurde die Partikelbildung und das Partikelwachstums durch Dipl.-Ing. W. Halter (Prof. Dr.-Ing. F. Allgöwer, Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik, Universität Stuttgart) modelliert. Neben der Untersuchung des Templateinflusses von Phagen auf die Mineralisation von ZrbM wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit der Phagen zur Selbstassemblierung genutzt, um dichte Phagenschichten herzustellen und deren Eignung als Biotemplat für die Mineralisation homogener Schichten aus ZrbM zu untersuchen (6.4.2).

Wie bereits erwähnt, können Biotemplate in der Natur gezielt zur Materialbildung führen oder diese unterdrücken.^[5] Im Fall von Perlmutter wird das anorganische Material (Calciumcarbonat, $CaCO_3$) durch die Bindung von Ca^{2+} Ionen an funktionelle Gruppen von Biomakromolekülen induziert. Es wird angenommen, dass funktionellen Gruppen auf dem Biomakromolekül in einer bestimmten Anordnung vorliegen müssen.^[3,49] Ist diese Anordnung nicht gegeben, wird die Mineralisation unterdrückt (s. 4.4.1). Dies ist ein interessanter Aspekt im Hinblick auf ein weiteres Forschungsgebiet – die Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen. Adhären Bakterien auf einer Oberfläche, können sich Biofilme bilden. Handelt es sich dabei um pathogene Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, die einen Biofilm auf Implantaten bilden, kann dies unter anderem zu einem Implantatverlust bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen (4.8). Ein Forschungsschwerpunkt liegt darin, die Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob bestimmte chemische Oberflächen, das heißt bestimmte Materialien oder auch bestimmte funktionelle Gruppen, die Bakterienadhäsion unterdrücken können. Hierfür wurde die Bakterienadhäsion auf einer Phagenschicht, einer Schicht aus ZrbM und einer Siliziumdioxid Schicht untersucht (Dr. P. Popella, Prof. Dr. F. Götz, Universität Tübingen) (6.5).

4 Theorie

4.1 Zirkoniumdioxid

Zirkoniumdioxid (ZrO_2) ist ein Oxidmaterial mit einem breiten Anwendungsspektrum. Neben dem Einsatz als thermische Schutzschicht^[15] und Korrosionsschutzschicht^[16] wird es als optische Schicht^[17] oder auch als Gate Dielektrikum zum Beispiel in Metall-Isolator-Halbleiter Bauelementen in der Mikroelektronik^[18] verwendet. Des Weiteren findet ZrO_2 als Sauerstoffleiter^[19,20] und Sauerstoffsensor^[21,22] Anwendung. Dieses breite Anwendungsspektrum ist durch die vielseitigen Eigenschaften von ZrO_2 möglich. Neben einer chemischen, thermischen und mechanischen Resistenz besitzt ZrO_2 einen hohen Brechungsindex. Die Oxidkeramik besitzt eine Bandlücke von 5,4 eV, 6,4 eV und 5,6 eV in der monoklinen, tetragonalen bzw. kubischen Modifikation.^[50] Reines ZrO_2 ist ein Isolator. Wird ZrO_2 mit Oxiden wie CaO, MgO oder Y_2O_3 dotiert, entstehen Sauerstoffleerstellen. Diese Anionenleerstellen führen zu einer erhöhten Sauerstoffdiffusion und dadurch zur Anionenleitung.^[51] ZrO_2 tritt in drei verschiedenen Modifikationen auf (Abbildung 1). Bei Raumtemperatur ist die monokline (*m*) Phase thermodynamisch stabil. Die Phasenumwandlung in die tetragonale (*t*) Phase findet bei 1170 °C statt. Bei Temperaturen über 2370 °C ist die kubische (*c*) Phase thermodynamisch stabil.^[52] Zur Herstellung dünner ZrO_2 Schichten werden häufig nasschemische Methoden eingesetzt.^[26,54,55] Gegenüber der chemischen^[56] und physikalischen Gasphasenabscheidung^[57,58] bieten nasschemische Methoden den Vorteil, homogene ZrO_2 Schichten bei niedrigeren Temperaturen herzustellen.^[24] Zudem können umweltfreundliche, kostengünstige anorganische Metallsalze als Ausgangsstoffe für die Mineralisation eingesetzt werden. Für die Abscheidung homogener, anorganischer Schichten aus einer Mineralisationslösung ist die Bildung stabiler Partikel erforderlich. Bilden sich große Agglomerate während der Schichtbildung und scheiden sich diese auf der Schicht ab, entstehen inhomogene Schichten. Dies kann durch das Vorliegen einer stabilen Dispersion, in der keine Agglomeration stattfindet, unterbunden werden. Stabile Dispersionen können entweder durch abstoßende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Partikeln oder durch den Einsatz von Stabilisatoren erzeugt werden.

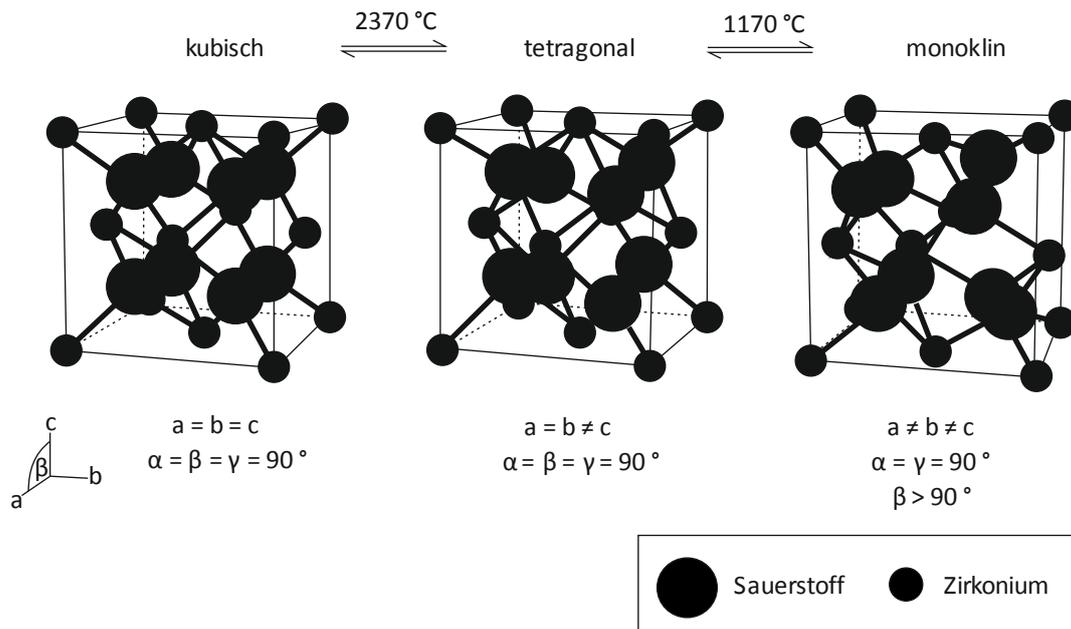


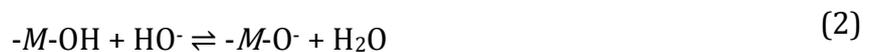
Abbildung 1: Modifikationen von Zirkoniumdioxid (ZrO_2). ZrO_2 tritt in drei verschiedenen Modifikationen auf. Oberhalb 2370 °C ist die kubische Phase thermodynamisch stabil. Durch Abkühlen tritt die Phasenumwandlung in die tetragonale Phase ein. Bei tiefen Temperaturen ($< 1170\text{ °C}$) ist die monokline Phase thermodynamisch stabil. (Nach Kisi und Howard^[53])

Als Stabilisatoren werden Makromoleküle wie Hydroxypropylcellulose (HPC)^[42] oder Polyethylenglycol (PEG)^[48] verwendet. Diese adsorbieren auf der Oberfläche gebildeter Partikel und stabilisieren diese durch sterische Hinderung. Um Partikel elektrostatisch zu stabilisieren, müssen die Partikeloberflächen geladen vorliegen. Die Oberflächenladung dispergierter Partikel wird durch das Zetapotential beschrieben, das im nächsten Kapitel näher erläutert wird.

4.2 Zetapotential

Die Oberfläche dispergierter Partikel kann je nach pH-Wert und vorhandener Oberflächengruppen geladen vorliegen.^[59] Die Ladung entsteht entweder durch Ionisation von dissoziierbaren Gruppen wie Carboxyl- oder Aminogruppen oder durch Adsorption von Ionen aus dem Dispersionsmedium.^[60] Metalloxidpartikel, bilden durch den Kontakt mit Wasser (durch Luftfeuchtigkeit oder im Dispersionsmedium) Hydroxygruppen auf ihrer Oberflä-

che. Durch Wechselwirkung mit H^+ oder OH^- Ionen im Dispersionsmedium resultiert eine geladene Partikeloberfläche:^[60,61]



Die Partikelladung ist vom pH-Wert abhängig. Der pH-Wert, bei dem eine (netto) ungeladene Oberfläche vorliegt, wird als Isoelektrischer Punkt (IEP) bezeichnet. Der IEP ist abhängig von der Polarisierung der Oberflächengruppen durch das Metallkation, der Kristallstruktur und Partikelmorphologie sowie der Wärmebehandlung und den Herstellungsbedingungen von Oxiden.^[62]

In einem elektrolythaltigen Dispersionsmedium bilden sich um geladene Partikel verschiedene Schichten aus Kationen und Anionen aus (Stern-Modell, 1924) (Abbildung 2). Wird ein negativ geladener Partikel mit dem Oberflächenpotential ψ_0 (Nernst-Potential) betrachtet, so bildet sich in der Regel zunächst eine Schicht aus negativen, dehydratisierten Ionen, die innere Helmholtz-Schicht aus.^[59] Negative Ionen besitzen im Vergleich zu positiven Ionen eine geringere Hydratationszahl. Durch die geringere Abschirmung aufgrund der schwächer ausgeprägten Hydrathülle können van der Waals Kräfte besser wirken. Bei kleinen Abständen überwiegen van der Waals Kräfte, verglichen mit elektrostatischen Kräften. Die negativen Ionen werden durch die starken van der Waals Kräfte von der gleichgeladenen Oberfläche angezogen und verlieren dabei ihre Hydrathülle. Im Vergleich dazu bilden sich bei positiven Ionen mit einer stärker ausgeprägten Hydrathülle schwächere van der Waals Wechselwirkungen aus. Zusätzliche elektrostatische Anziehungskräfte führen zur Ausbildung der äußeren Helmholtz-Schicht. Durch insgesamt schwächere Anziehungskräfte bleibt die Hydrathülle bestehen. Beide Ionenschichten bilden die sogenannte Sternschicht. Diese ist fixiert und kann nicht durch Partikelbewegung abgestreift werden. Die Bildung einer negativen inneren Helmholtzschicht an einer negativ geladenen Partikeloberfläche liegt sehr häufig vor.^[59] In selteneren Fällen können auch positive Ionen direkt an der negativen Oberfläche adsorbieren. Zum Beispiel in einer Cetylpyridiniumchloridlösung. Hier adsorbieren positiv geladene Cetylpyridinium-Ionen direkt an der negativen Partikeloberfläche. Die Kationen haben eine stärkere Affinität zur Oberfläche im Vergleich zu den Anionen (Chloridionen).^[59]

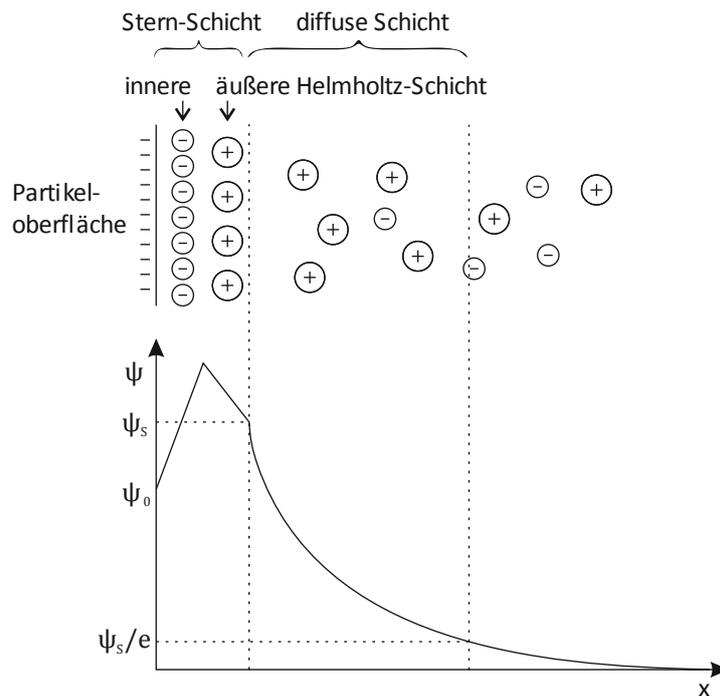


Abbildung 2: Potentialverlauf in Abhängigkeit des Abstands von der geladenen Partikeloberfläche in elektrolythaltigem Dispersionsmedium. Das Stern-Modell (1924) beschreibt das Vorliegen verschiedener Ionenschichten um ein geladenes Partikel (hier: negative Oberflächenladung mit Nernst-Potential ψ_0). Zunächst bildet sich eine Schicht aus dehydratisierten, fixierten Anionen aus - die innere Helmholtz-Schicht. Gemeinsam mit der äußeren Helmholtz-Schicht aus hydratisierten, fixierten Kationen bildet sie die sogenannte Stern-Schicht mit dem Stern-Potential ψ_s . In der diffusen Schicht sind die Ionen nicht mehr fest fixiert. Das Potential nimmt exponentiell mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche ab. Der Abfall auf ψ_s/e beschreibt die Dicke der diffusen Schicht. Das Teilchen wirkt nach außen hin neutral. (Nach Müller^[59])

Bei einer Dispersion mit positiv geladenen Partikeln, bildet sich meist eine negative innere Helmholtzschicht. Dies liegt an den starken van der Waals Wechselwirkungen, die durch die schwach ausgeprägte Hydrathülle weniger stark abgeschirmt sind als bei positiven Ionen. Zusätzlich wirken anziehende elektrostatische Wechselwirkungen.^[59] Die Stern-Schicht, die sich um geladene Partikel bildet, kompensiert die Oberflächenladung in den meisten Fällen nicht vollständig. Es resultiert eine geladene Sternschicht (Stern-Potential ψ_s).^[59] Im hier dargestellten Beispiel (Abbildung 2) ist diese negativ geladen. Weitere Ionen werden angezogen, welche die „diffuse Schicht“ um das Partikel ausbilden. Dabei handelt es sich um nicht fixierte, hydratisierte Ionen. Die Konzentration an positiven Ionen nimmt dabei mit steigendem Abstand zur Oberfläche ab. Die der negativen Ionen

entsprechend zu. Hieraus resultiert ein exponentieller Potentialabfall gegen Null (s. Abbildung 2). Das Partikel ist nach außen hin neutral. Die Dicke der diffusen Schicht entspricht dem reziproken Wert des Debye-Hückel Parameters κ . Sie ist durch die Distanz definiert, über die das Stern-Potential ψ_s auf den Wert ψ_s/e abfällt (s. Abbildung 2). Durch Diffusion der Partikel im Dispersionsmedium wird ein Teil der diffusen Schicht durch Reibungskräfte abgestreift. Das Partikel besitzt eine negative Nettoladung. Diese Nettoladung wird durch das Potential an der Scherebene, das Zetapotential (ZP), beschrieben.^[59] Wird ein elektrisches Feld angelegt, wird das geladene Partikel beschleunigt. Mit zunehmender Geschwindigkeit und gleichzeitig zunehmender Reibungskraft wird ein immer größerer Teil der diffusen Schicht abgestreift (Abbildung 3). Bis schließlich nur noch ein kleiner Teil erhalten ist, der durch die Hydrathülle der Sternschicht gehalten wird. Das Zetapotential wird immer größer bis es den Maximalwert ZP_s erreicht, der normalerweise als ZP angegeben wird. Das Zetapotential wird oft dem Sternpotential gleich gesetzt.^[59]

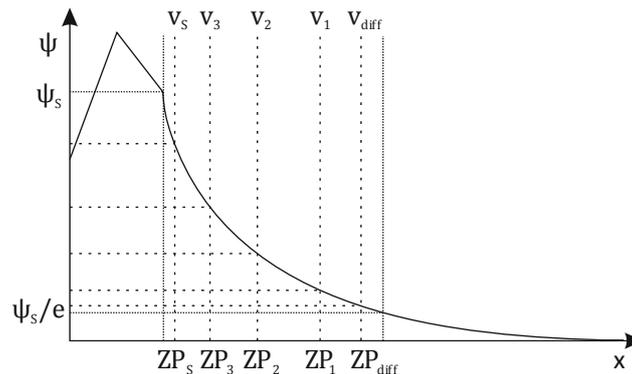


Abbildung 3: Zetapotential (ZP) geladener Partikel in elektrolythaltigem Dispersionsmedium in Abhängigkeit ihrer Geschwindigkeit v . Bewegen sich dispergierte Partikel mit einer geladenen Oberfläche durch Diffusion v_{diff} , so wird ein Teil ihrer diffusen Schicht durch Reibungskräfte abgestreift. Die Partikel besitzen das Zetapotential ZP_{diff} . Werden Partikel durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf die Geschwindigkeiten v_1 , v_2 , v_3 und v_s beschleunigt, so wird die diffuse Schicht immer weiter abgestreift, das Zetapotential nimmt zu. (Nach Müller^[59])

4.3 DLVO Theorie

Zur Erzeugung stabiler Partikeldispersionen, zum Beispiel für die Mineralisation homogener Schichten aus anorganischem Material, ist die Kenntnis zwischenpartikulärer Wechselwirkungen eine wichtige Voraussetzung. Eine Grundlage zur Berechnung von zwischenpartikulären Wechselwirkungen ist die DLVO Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau,

Verwey und Overbeek). Hierbei wird die Gesamtwechselwirkung $V_{T,1}$ zwischen zwei Partikeln als Funktion ihres Abstandes H beschrieben.^[59]

$$V_{T,1} = V_E + V_A \quad (3)$$

Die Gesamtwechselwirkung setzt sich aus der langreichweitenden elektrostatischen Wechselwirkung V_E und der kurzreichweitenden van der Waals Wechselwirkungen V_A zusammen. Nähern sich zwei geladene, dispergierte Partikel und überlappen ihre diffusen Schichten (s. 4.2), erfahren die Partikel in Folge der elektrostatischen Wechselwirkung eine Abstoßungskraft. Maßgeblich sind dabei die Größe des Oberflächenpotentials ψ_0 und die Dicke der diffusen Schicht ($1/\kappa$). Zusätzlich wirken, bevorzugt bei einer hohen Elektrolytkonzentration, anziehende van der Waals Kräfte V_A . Van der Waals Kräfte sind auf die Wechselwirkung von permanenten oder induzierten Dipolen zurückzuführen. Im Folgenden werden die mathematischen Beschreibungen der Wechselwirkungen zwischen zwei identischen Partikeln – gleiches Material und gleicher Partikelradius – betrachtet.

Basierend auf den Ansätzen von Derjaguin (1934), Verwey und Overbeek (1948) kann die elektrostatische Abstoßung V_E zweier identischer Partikel mit dem Radius a und dem Oberflächenpotential ψ_0 als Funktion des Partikelabstandes H nach

$$V_E = 2\pi\epsilon a\psi_0^2 \ln[1 + \exp(-\kappa H)] \quad (4)$$

berechnet werden.^[63] Die abstoßende Wechselwirkung ist abhängig von der Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums ϵ und dem Debye-Hückel Parameter κ . Letztgenannter wird über

$$\kappa^{-1} = \left(\frac{1000e^2 N_A \sum c_i z_i^2}{\epsilon k_B T} \right)^{-1/2} \quad (5)$$

mit der Elementarladung e , der Avogadro Konstante N_A , der Boltzmannkonstante k_B , der absoluten Temperatur T und der bulk-Stoffmengenkonzentration c_i des Ions i mit der Ladungszahl z_i berechnet.^[61]

Die van der Waals Anziehung V_A zwischen zwei identischen Partikeln mit Radius a wird durch

$$V_A = -\frac{A_{13}}{6} \left[\frac{2a^2}{R^2 - 4a^2} + \frac{2a^2}{R^2} + \ln \left(\frac{R^2 - 4a^2}{R^2} \right) \right], \quad (6)$$

mit dem Partikelmittenabstand $R = 2a + H$ und der Hamaker Konstanten A_{13} beschrieben.^[61] Für Partikel (makroskopische Phase 1), die über ein Dispersionsmedium 3 wechselwirken gilt:

$$A_{13} \cong \frac{3}{4} k_B T \left(\frac{\varepsilon_{0,1} - \varepsilon_{0,3}}{\varepsilon_{0,1} + \varepsilon_{0,3}} \right)^2 + \frac{3h\nu_e (n_{vis,0,1}^2 - n_{vis,0,3}^2)^2}{16\sqrt{2} (n_{vis,0,1}^2 + n_{vis,0,3}^2)^{\frac{3}{2}}} \quad (7)$$

Im ersten Term von Gleichung (7) werden die Wechselwirkungen zwischen zwei permanenten Dipolen sowie zwischen einem permanenten Dipol und einem induzierten Dipol berücksichtigt. Hier sind die statischen Dielektrizitätskonstanten ε_0 , das heißt, die Dielektrizitätskonstante bei $\nu = 0$ (frequenzunabhängig), der makroskopischen Phase 1 und des Dispersionsmediums 3 von Bedeutung. Im zweiten Term von Gleichung (7) werden die frequenzabhängigen Wechselwirkungen ($\nu \neq 0$) zwischen zwei induzierten Dipolen berücksichtigt. Diese Wechselwirkungen werden hauptsächlich durch die dielektrische Eigenschaft im sichtbaren UV-Bereich bestimmt.^[64] Sie werden auf stehende Wellen zurückgeführt, die bei bestimmten Frequenzen, den charakteristischen elektronischen Absorptionsfrequenzen ν_e , hier im UV-Bereich, auftreten.^[64] Die Beiträge $n_{vis,0}$ im zweiten Term sind die Niederfrequenzwerte der Brechungsindizes im sichtbaren Bereich der makroskopischen Phase 1 und des Dispersionsmediums 3 und h ist das Plancksche Wirkungsquantum.^[64] Für Gleichung (7) wurde angenommen, dass alle Medien (makroskopische Phase 1 und Dispersionsmedium 3) dieselbe charakteristische elektronische Absorptionsfrequenz ν_e besitzen. Diese beträgt typischerweise $3 \times 10^{15} \text{ s}^{-1}$.^[65] Die Annahme ist gültig für Materialien mit niedrigen Brechungsindizes zwischen 1,4 und 1,8.^[66] Für das in dieser Arbeit betrachtete amorphe Zirkonium-basierte Material wird entsprechend dem Zr-basierten Material ($\text{ZrO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$), das durch Hydrothermalsynthese aus einer wässrigen ZrOCl_2 -Lösung gebildet wurde, ein Brechungsindex von 1,55 angenommen.^[67] Auch das Lösungsmittel Wasser und die Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemische weisen Brechungsindizes zwischen 1,3325^[68] und 1,3625^[69] auf, die in dem beschriebenen Bereich zwischen 1,4 und 1,8 liegen.

Bei sehr kleinen Partikelabständen beginnen sich die Partikel zu berühren. Eine weitere abstoßende Wechselwirkung, die Born Abstoßung V_R , resultiert aus der Überlappung der Elektronenwolken.^[70,71]

Für die Born Abstoßung gilt:^[72]

$$V_R = \frac{A_{13}N}{r} \left[\frac{r^2 - 14r + 54}{(r-2)^7} + \frac{-2r^2 + 60}{r^7} + \frac{r^2 + 14r + 54}{(r+2)^7} \right] \quad (8)$$

mit

$$N = 4 \left(\frac{\sigma}{a} \right)^6 \left(\frac{4!}{10!} \right) \quad (9)$$

und

$$r = \frac{R}{a} = \frac{2a+H}{a}. \quad (10)$$

Hierbei entspricht r , dem Partikelmittenabstand $R = 2a+H$ (H = Partikelabstand, d.h. Abstand der Partikeloberflächen), der auf den Partikelradius a bezogen wurde. Die Born Abstoßung wurde über das Lennard Jones 6-12 Potential abgeleitet.^[72] Sie entspricht dem Term mit der Potenz zwölf.^[73] Der Term mit der Potenz sechs ist der anziehende van der Waals Term.^[65] Der Kollisionsdurchmesser σ in Gleichung (9) entspricht dem Partikelabstand, bei dem das Lennard Jones 6-12 Potential Null wird.^[72,74] Er beträgt typischerweise $\sigma = 0,5 \times 10^{-9}$ m.^[70,71]

Um kolloidale Systeme auch bei sehr kleinen Partikelabständen – bis zum Partikelkontakt – realistisch zu beschreiben, müssen sowohl die DLVO Wechselwirkungen V_E und V_A , als auch die Born Abstoßung V_R betrachtet werden:

$$V_{T,2} = V_E + V_A + V_R \quad (11)$$

Die Gesamtwechselwirkung $V_{T,2}$ hängt stark vom Oberflächenpotential ψ_0 der Partikel sowie der Ausdehnung der diffusen Schicht ($1/\kappa$) ab. Letztere wird durch die Art und Konzentration der Elektrolytlösung sowie ihrer Dielektrizitätskonstante und der Temperatur bestimmt.^[59] In Abbildung 4 sind die einzelnen Wechselwirkungsenergien V_E , V_A und V_R sowie die Gesamtwechselwirkungen $V_{T,1}$ und $V_{T,2}$ graphisch dargestellt. Je nach Größe der einzelnen Wechselwirkungen kann ein primäres Minimum bei sehr kleinen Partikelabständen und ein sekundäres Minimum bei größeren Partikelabständen auftreten, sowie eine Energiebarriere V_m . Bei einer hohen Energiebarriere liegen die Partikel als weiche Agglomerate im Abstand entsprechend des „sekundären Minimums“ vor. Durch einwirken einer äußeren Kraft zum Beispiel durch Rühren der Partikelsuspension können diese sogenannten Sekundärpartikel wieder deagglomeriert werden. Im primären Minimum dagegen,

liegen harte Agglomerate vor, die je nach Höhe der Wechselwirkungsenergie nicht mehr deagglomeriert werden können. Eine stärkere Abstoßung V_E kann zum Verschwinden des primären Minimums führen. Eine schwächere hingegen zum Verschwinden des sekundären Minimums sowie der Energiebarriere.^[59]

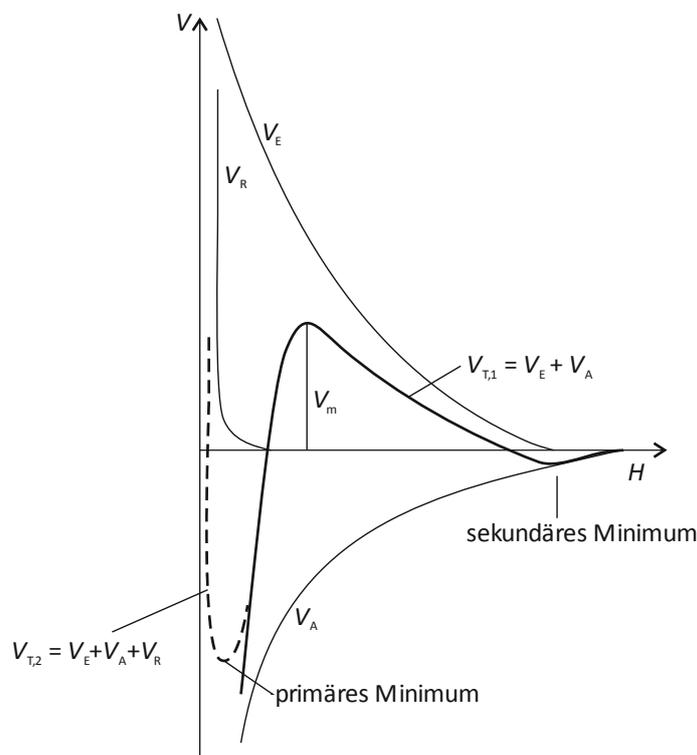


Abbildung 4: Wechselwirkungsenergie V zwischen zwei suspendierten Partikeln in Abhängigkeit ihres Partikelabstands H (Abstand der Partikeloberflächen). Dargestellt sind die einzelnen Wechselwirkungen, die elektrostatische Abstoßung V_E , die van der Waals Anziehung V_A und die Born Abstoßung V_R . In der DLVO-Theorie wird die Gesamtwechselwirkung $V_{T,1}$ mit V_E und V_A beschrieben (dicke, durchgezogene Linie). Wird die Born Abstoßung bei der Gesamtwechselwirkung $V_{T,2}$ mit berücksichtigt, so entsteht ein endlicher negativer Wert bei sehr kleinen Partikelabständen (gestrichelte Linie), das primäre Minimum. Neben dem primären Minimum kann, je nach Größe der einzelnen Wechselwirkungen, auch ein sekundäres Minimum sowie eine Energiebarriere V_m vorliegen. (Nach Feke *et al.*^[72] und Oliveira^[75])

4.4 Biomineralisation

In der Natur vorkommende Materialien wie Muschelschalen, Coccolithe, Knochen, Zähne und Schwammnadeln werden durch lebende Organismen unter Umgebungsbedingung gebildet.^[5,76] Die Bildung von anorganischem Material durch lebende Organismen wird als Biomineralisation bezeichnet. Es sind über 60 verschiedene Biomineralien bekannt.^[8,77]

Dabei handelt es sich um Hybridmaterialien aus einer organischen und anorganischen Phase. Die organische Phase besteht aus Biomakromolekülen wie Proteinen.^[78] Die anorganische Phase besteht zum Beispiel aus Siliziumdioxid, Calciumcarbonat und -phosphat sowie Magnetit.^[5,6,8,79] Die Biomineralisation lässt sich in zwei Arten untergliedern, die biologisch induzierten und biologisch kontrollierten Biomineralisation.^[80] Die biologisch induzierte Biomineralisation beruht auf Stoffwechselprozessen der Organismen. Diese Prozesse beeinflussen Parameter wie pH-Wert oder Kohlendioxidpartialdruck in der unmittelbaren Umgebung der Organismen. Dadurch bedingte Änderungen im chemischen Mikromillieu induzieren die Ausfällung der anorganischen Komponenten. Die chemische Zusammensetzung der anorganischen Festkörper variiert mit der ionischen Zusammensetzung des Umgebungsmediums.^[80] Bei der biologisch kontrollierten Biomineralisation wird die Materialbildung genetisch gesteuert. Es entstehen Hybridmaterialien aus organischen und anorganischen Materialien mit definierter Zusammensetzung, Kristallstruktur und Größe.^[4-7] Für die kontrollierte Materialbildung spielt die Mineralisation in einer isolierten Umgebung eine wichtige Rolle. Dies kann innerhalb einer Zelle, an der Zelloberfläche – eingeschlossen von mehreren Zellen – oder in einer Matrix aus Makromolekülen im extrazellulären Raum sein.^[80,81] Durch die Mineralisation in der isolierten Umgebung können einzelne Moleküle oder Ionen kontrolliert zugeführt werden. Dies beeinflusst die chemische Materialzusammensetzung und die Kristallwachstumskinetik. Zusätzlich kann die räumliche Struktur das Kristallwachstum beschränken und damit die Form des entstehenden Kristalls beeinflussen.^[82,83] Auch funktionelle Gruppen von Biomakromolekülen sind bei der kontrollierten Mineralisation von Bedeutung.^[2,76,84] Durch Wechselwirkung der Biomakromoleküle mit Ionen induzieren sie die Keimbildung der Kristallite an vorgegebenen Orten.^[2,14] Gleichzeitig können funktionelle Gruppen orientiertes Wachstum hervorrufen.^[14] Die Art der funktionellen Gruppen sowie ihre Anordnung und Ausrichtung auf dem organischen Templat hat einen entscheidenden Einfluss auf die Induktion von Keimbildung und Wachstum.^[5] Die kontrollierte Biomineralisation führt zu komplexen hierarchischen Strukturen der organischen und anorganischen Phase. Dieser komplexe Aufbau der Hybridmaterialien bedingt außergewöhnliche Eigenschaften wie eine hohe Härte, Bruchzähigkeit oder Steifigkeit.^[4] Die Eigenschaften sind für die Funktion der Biomineralien von Bedeutung. Während das Seeigelskelett eine Strukturfunktion hat, dient der Krustentierpanzer, die Mollusken-schalen und der Seeigelstachel zum Schutz des Organismus.^[5] Zwei bereits umfangreich

untersuchte Biomineralien, Perlmutter und Biosilika, werden im Folgenden näher beschrieben. In beiden Fällen spielt die molekulare Erkennung und eine starke Bindung zwischen dem organischen Templat und Ionen des anorganischen Materials eine wichtige Rolle.

4.4.1 Perlmutter

Perlmutter ist eines der am besten untersuchten Biominerale.^[32] Es liegt als innerste Schicht in Molluskschalen vor. Das Verbundmaterial Perlmutter besteht aus 95 Masse % Aragonit und 5 Masse % Biopolymer.^[32] Es besitzt einen sehr komplexen Aufbau aus dünnen Aragonitplättchen, die in eine Matrix aus Biopolymeren eingebettet sind (Abbildung 5).^[32] Der Mineralisationsprozess wird von der organischen Matrix induziert.^[14] Diese bildet ein organisches Matrixnetzwerk parallel zur Schalenoberfläche (Abbildung 5). Lösliche Proteine adsorbieren an der organischen Matrix. Die Proteine besitzen Asparaginsäureeinheiten mit Carboxylatgruppen.^[3] Es wird angenommen, dass eine bestimmte Anordnung dieser Carboxylatgruppen durch eine starre Konformation der Proteine die Keimbildung induziert.^[3,49] Bei der Keimbildung spielt sowohl die molekulare Erkennung als auch eine Bindeeigenschaft des Proteins an Calciumionen eine besondere Rolle.^[3,32] Nach der Bildung einer zweidimensionalen Calciumschicht wachsen die Kristallite orientiert weiter. Die Orientierung wird durch die Calciumschicht vorgegeben.^[3] Das Wachstum findet bevorzugt in *c*-Richtung statt, die senkrecht zur keimbildenden Schicht liegt. Das organische Matrixgerüst beschränkt das Kristallwachstum. Beim Erreichen der nächsten organischen Schicht wachsen die Kristallite in *a*- und *b*-Richtung weiter. Durch Poren in der organischen Schicht kann Kristallisation im darüber liegenden „freien Raum“ innerhalb des organischen Matrixnetzwerks induziert werden (Abbildung 5). Es entstehen sogenannte Mineralbrücken. Das nächste Aragonitplättchen wächst in derselben Orientierung. Die Kristallisation übereinanderliegender Aragonitplättchen (s. Abbildung 5 B) wird sowohl durch Poren in der organischen Matrix, und dadurch durch den darunterliegenden Kristallit, als auch durch neue Keimbildungsplätze in der organischen Schicht induziert.^[14]

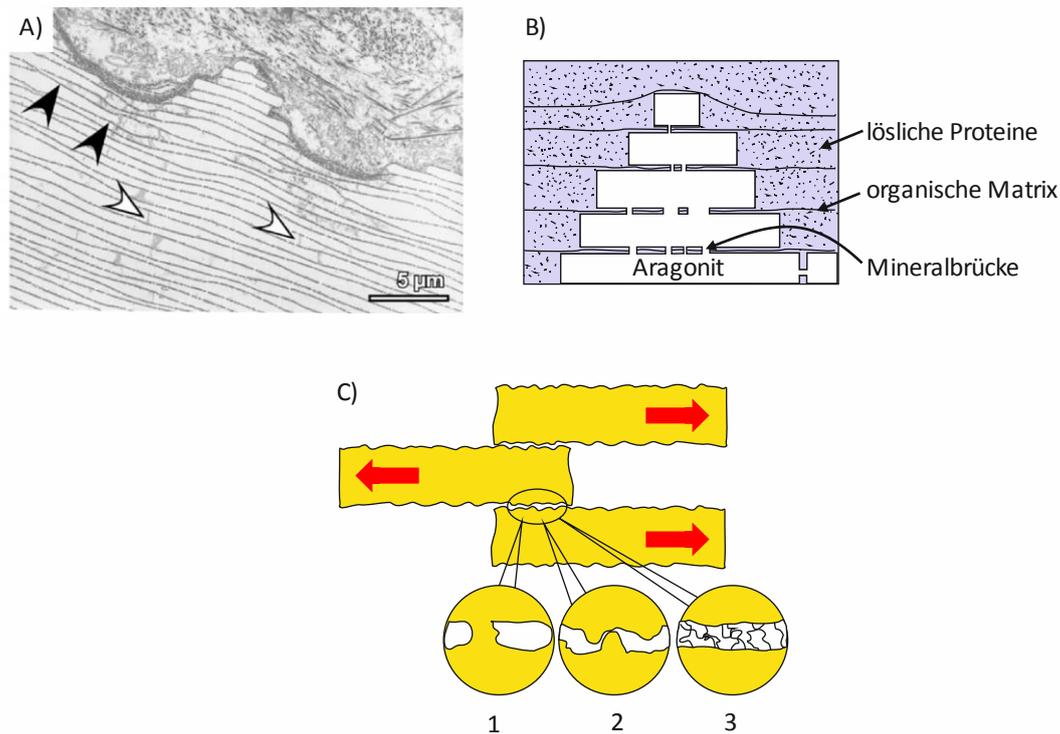


Abbildung 5: Aufbau, Bildung und Eigenschaften von Perlmutter. A) TEM-Aufnahme einer demineralisierten Perlmutter Wachstumsfront der Abalone-Muschel *Halotis tuberculata*. Die schwarzen und weißen Pfeile zeigen die organische Matrix, in die die Aragonitplättchen eingebettet sind. B) Schematische Darstellung des Perlmutterwachstums. C) Schematische Darstellung der Versagensmechanismen, die die Zugfestigkeit parallel zur Schichtstruktur erhöhen: (1) Scherbruch der Mineralbrücken, (2) Reibung durch „Nanoasperities“, (3) Dehnung der organischen Ketten (organische Matrix) zwischen den Plättchen. (A) aus Heinemann *et al.*^[32] mit Erlaubnis von Elsevier; B) nach Heinemann *et al.*^[32]; C) nach Lin und Meyers^[88])

So bildet sich eine „Ziegelstein und Mörtel“ Struktur, bei der Aragonitplättchen in die organische Matrix eingebettet sind (s. Abbildung 5). Auf der Oberfläche der Aragonitplättchen sind Oberflächenrauigkeiten, sogenannte „Nanoasperities“ zu finden, die gemeinsam mit den Mineralbrücken und dem hierarchischen Aufbau die mechanischen Eigenschaften des Hybridmaterials bestimmen. Im Vergleich zu reinem CaCO_3 besitzt Perlmutter eine sehr hohe Festigkeit^[12] und Bruchzähigkeit^[13]. Wirkt eine äußere Kraft senkrecht zur Schichtstruktur auf das Hybridmaterial mit alternierenden E-Modulen (organisches und anorganisches Material), so wird die Bruchzähigkeit durch Rissablenkung erhöht. Allein der alternierende E-Modul reicht aus, um Risse abzulenken.^[85] Zusätzlich führt ein Verhältnis der E-Module ($E_{\text{Aragonit}}/E_{\text{Protein}} \sim 8$)^[86,87] zu einem Rissstopp an den Proteinschichten, was einen weiteren

Beitrag zur hohen Bruchzähigkeit des Verbundmaterials darstellt^[85]. Eine erhöhte Zugfestigkeit parallel zur Schichtstruktur wird durch verschiedene Versagensmechanismen hervorgerufen (s. Abbildung 5 C). Um ein Gleiten der Aragonitplättchen zu ermöglichen, müssen zunächst Mineralbrücken durch Scherkräfte gebrochen werden. Zusätzlich muss die Reibungskraft, die durch die „Nanoasperities“ erhöht wird, überwunden werden. Weiterhin ist eine Dehnung der organischen Ketten, welche die Plättchen verbinden, erforderlich.^[88]

4.4.2 Biosilika

Das Biomineral Biosilika ist unter anderem in den Nadeln von Glasschwämmen aus der Tiefsee zu finden.^[89] Das Skelett aus kieselsäurehaltigen Nadeln stützt den Schwammkörper. Der Tiefseeschwamm *Monorhaphis chuni* bildet eine riesige Schwammnadel, die bis zu 3 m lang ist.^[90] Über diese sogenannte Basalnadel ist der Schwamm fest im Meeresboden verankert. Sie hat einen Durchmesser von circa 10 mm. *Monorhaphis chuni* ist der größte silikatische Schwamm weltweit.^[90,91] Glasschwämme sind einzigartige Biosilika bildende Organismen. Sie katalysieren die Bildung von Kieselsäure über ein spezifisches Enzym, das Silikatein.^[93]

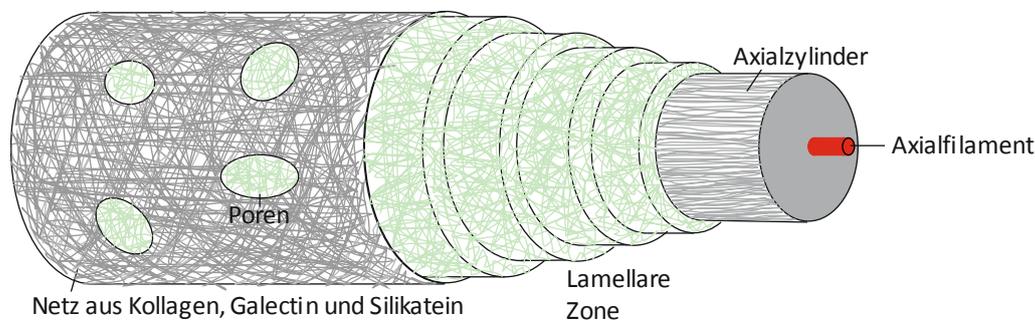


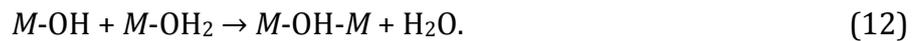
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Basalnadel (*Spiculum*) des Glasschwamms *Monorhaphis chuni*. Die Struktur der Nadel kann in drei Zonen eingeteilt werden. Mittig befindet sich das Axialfilament, das hauptsächlich aus Silikatein besteht. Der Axialzylinder aus $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ wird zunächst intrazellulär gebildet. Dieser Prozess ist enzymkatalysiert durch Silikatein. Anschließend wächst die Basalnadel extrazellulär durch Lamellenanlagerung und gleichzeitige Verlängerung. Diese Schritte sind ebenfalls durch das Enzym Silikatein katalysiert. Auf der Oberfläche der Lamellen befindet sich ein zylinderförmiges Netz aus Kollagen, Galectin und Silikatein, welches Poren aufweist, die die enzymkatalysierte Bildung einzelner Lamellen innerhalb des organischen Zylinders begünstigen. Die einzelnen Lamellen bestehen aus einer Silikamatrix mit inkorporiertem Protein. (Nach Müller *et al.*^[92] und Wang *et al.*^[91])

Die Bildung der Schwammnadel (*Spiculum*) kann in zwei Schritte unterteilt werden. Nach einem anfänglichen intrazellulären folgt ein extrazellulärer Formgebungsschritt.^[94] Zuerst wird das organische Axialfilament intrazellulär gebildet (Abbildung 6). Es besteht hauptsächlich aus Silikatein. Das Silikatein im Axialfilament katalysiert die Bildung des anorganischen Mantels aus amorphem $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, der Axialzylinder. Es wird angenommen, dass zwei räumlich getrennte Serin-Cluster für die enzymatische Abscheidung von $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ verantwortlich sind. Dabei spielen vermutlich stark stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den Hydroxygruppen in den Seitenketten von Serin und einzelnen Kieselsäuremolekülen (H_4SiO_4) eine Rolle.^[91] Nach der Bildung einer ersten Silika-Schicht wachsen die unreifen Spicula im extrazellulären Raum weiter. Durch lamellares Wachstum nehmen sie an Höhe und Durchmesser zu und erreichen schließlich ihre endgültige Form. Auch das lamellare Wachstum ist durch Silikateinmoleküle katalysiert. Auf der Oberfläche der Lamellen befindet sich ein zylinderförmiges Netz aus Kollagen, Galectin und Silikatein, welches Poren aufweist, die die enzymkatalysierte Bildung einzelner Lamellen innerhalb des organischen Zylinders begünstigen. Die einzelnen Lamellen bestehen aus einer Silikamatrix mit inkorporiertem Protein. Das Verbundmaterial aus Organik und amorphem $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ weist eine sehr hohe Biegefestigkeit auf. Diese ist bedingt durch den lamellaren Aufbau des Hybridmaterials.^[93,94]

4.5 Bio-inspirierte Mineralisation

Biominalisationsprozesse in der belebten Natur zeigen den Einfluss organischer Template mit bestimmten funktionellen Gruppen auf Keimbildung und Wachstum von Biomineralen (s. 4.4). Auch die Form, Größe und Orientierung entstehender Kristallite wird kontrolliert.^[3,5,80] Die Biominalisation findet dabei unter Umgebungsbedingungen statt. Für technisch interessante Materialien wie Sulfide (CdS), Oxide (ZrO_2 , TiO_2 , ZnO) oder Metalle (Ag) stellt die energieeffiziente Herstellung präziser Nanostrukturen eine technische Herausforderung dar. Daher besteht ein großes Interesse daran, die Prinzipien der Biominalisation auf die Herstellung von Funktionsmaterialien zu übertragen. Bei einer solchen bio-inspirierten Mineralisation werden die Hauptprinzipien der Biominalisation angewandt.^[76] Diese involvieren die Materialbildung aus einer wässrigen oder alkoholischen Lösung von Vorläuferverbindungen sowie den Einsatz eines funktionalisierten

Templats. Zur Bildung von Oxidmaterialien über ein nasschemisches Verfahren werden meist Metallsalze als Vorläufer eingesetzt. Die Materialbildung erfolgt dabei durch Hydrolyse der Vorläufer und eine anschließende Kondensationsreaktion von hydroxylierten Komplexen.^[62] Die Kondensationsreaktionen finden entweder durch Olation oder Oxolation statt.^[62,76] Die Olation führt zur Bildung einer Hydroxobrücke durch den nukleophilen Angriff eines OH-Liganden am Zentralkation und der Abspaltung eines Aqualiganden:^[62,76]



Bei der Oxolation führt die Reaktion zweier Hydroxygruppen zur Bildung einer Oxobrücke:^[76]



Die nasschemische Synthese von ZrO_2 findet häufig über $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ als Vorläufer statt. In wässriger Lösung liegt $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ als $[Zr_4(OH)_8(H_2O)_{16}]^{8+}$ Tetramer vor (Abbildung 7).^[62,95] Die vier Zr^{4+} Ionen des Tetramers sind dabei quadratisch angeordnet. Sie sind achtfach koordiniert.^[97]

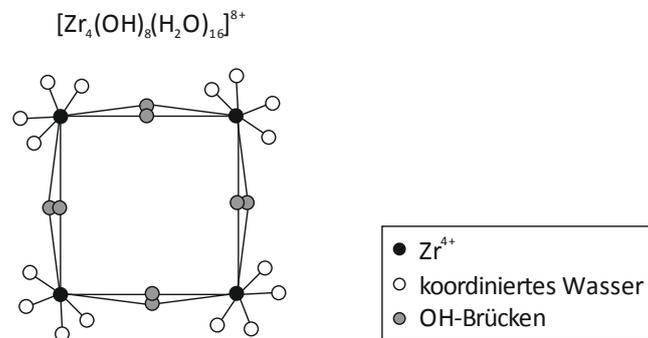
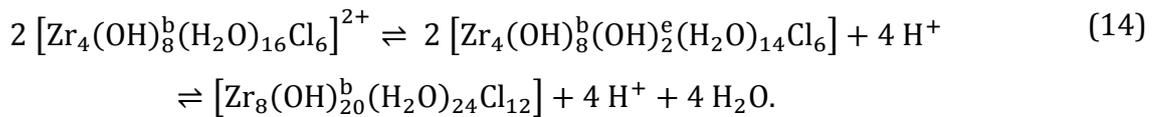


Abbildung 7: Struktur des $[Zr_4(OH)_8(H_2O)_{16}]^{8+}$ Tetramers. Vier Zr^{4+} Ionen bilden die Ecken eines Quadrates. Doppelte OH-Brücken verbinden die Kationen miteinander. Zusätzlich sind vier Wassermoleküle an jedes Kation koordiniert. (Nach Singhal *et al.*^[44] und Matsui und Ohgai^[96])

Doppelte OH-Brücken (OH-Brücken werden in den folgenden Summenformeln durch ein hochgestelltes „b“ gekennzeichnet) verbinden die Kationen miteinander. Zusätzlich sind vier Wassermoleküle an jedes Kation koordiniert.^[98] Die Tetramere sind 0,8 nm groß.^[44,99,100] In wässriger Lösung liegen sie hauptsächlich mit sechs Chlorid Ionen in der zweiten Koordinationssphäre der Metallkationen vor.^[44] Die Tetramere sind im Gleichgewicht mit Oktameren einer Größe von 1,2 nm:^[25,44]



Die Oktamere bilden sich durch Olationsreaktionen (s. Gl. (12)) von hydroxylierten Tetrameren $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8^b(\text{OH})_x^e(\text{H}_2\text{O})_{16-x}]^{(8-x)+}$ (Abbildung 8). Letztere entstehen durch Deprotonierung koordinierter Wassermoleküle.^[98] Durch die Deprotonierung entstehen freie, endständige OH-Gruppen (in der Summenformel durch ein hochgestelltes „e“ gekennzeichnet). Für die Kondensation von Tetrameren über eine Olationsreaktion (s. Gleichung (12)) wird mindestens eine endständige OH-Gruppe am Tetramer benötigt.^[62,101] Eine Temperaturerhöhung begünstigt die in Gleichung (14) beschriebene Deprotonierung koordinierter Wassermoleküle, die zur Bildung einer endständigen OH-Gruppe führt. Auch die Bildung der Oktamere durch Olationsreaktionen (s. Gleichung (14)) wird durch Temperaturerhöhung beschleunigt. Durch weitere irreversible Polymerisation entstehen größere polymere Cluster (Abbildung 8).^[25,95,98,102,103] Die Löslichkeit der polymeren Cluster nimmt mit der Clustergröße ab.^[99] Wird eine unlösliche Clustergröße erreicht, bilden sich durch Übersättigung dieser „unlöslichen Cluster“ kleine Keime. Es entstehen Primärpartikel (< 5 nm).^[98] Diese wachsen entweder durch Reaktion mit kleineren Tetrameren oder Oktameren oder durch Aggregation von Primärpartikeln. Die Aggregation von Primärpartikeln führt zur Bildung von Sekundärpartikeln.

Bei der bio-inspirierten Mineralisation dienen funktionalisierte Template zur gezielten und kontrollierten Mineralisation anorganischer Materialien.^[104,105] Oberflächen mit funktionellen Gruppen können durch Wechselwirkung mit Ionen des anorganischen Materials die Keimbildung, das Wachstum sowie die Kristallitgröße und -orientierung beeinflussen.^[5] Neben selbstassemblierenden Monolagen mit funktionellen Gruppen^[76] werden häufig Biomoleküle wie Peptide^[31] und DNA^[106] oder Viren^[107-109] eingesetzt, um Materialeigenschaften zu kontrollieren und die Mineralisation zu steuern. Viren, wie zum Beispiel M13-Bakteriophagen, sind geeignete Template zur Synthese von Nanomaterialien und Nanostrukturen.^[110] Dabei überzeugt ihre inhärente Nanostruktur sowie die Möglichkeit zur gezielten Modifikation der Hüllproteine.^[111] Die Fähigkeit zur Selbstassemblierung der Phagen ermöglicht zudem die Erzeugung dichter Phagenschichten zur Mineralisation anorganischer Schichten.^[112]

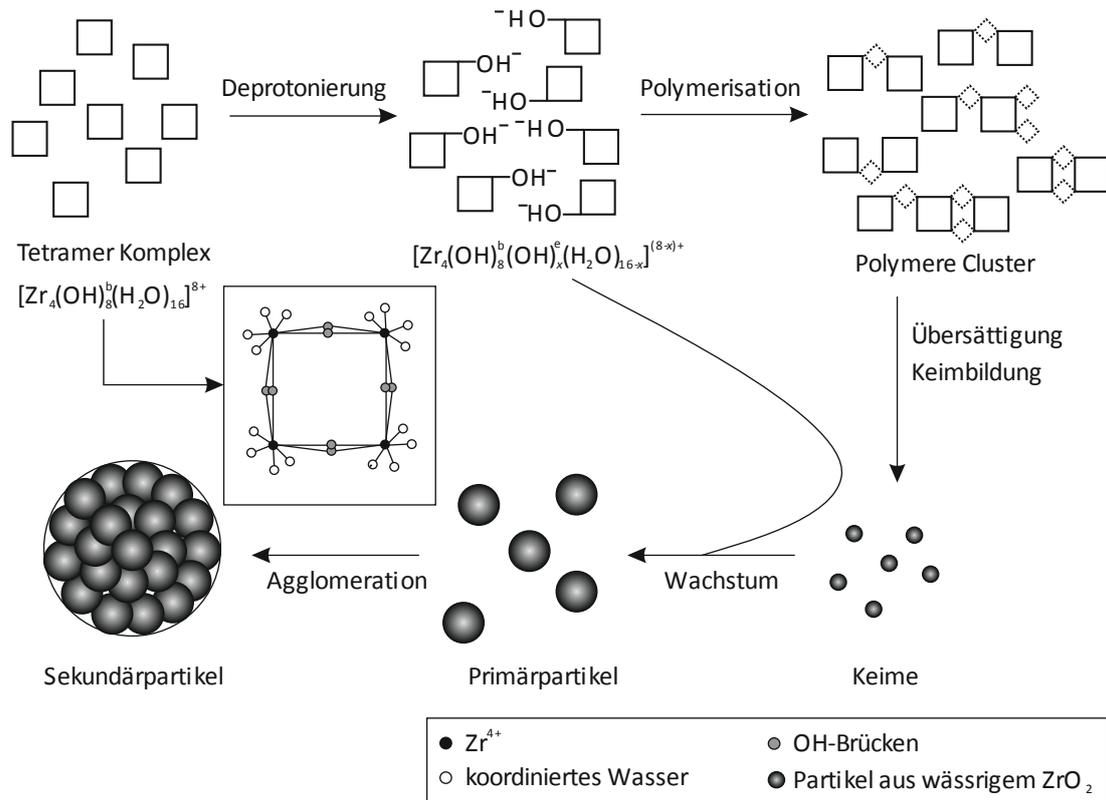


Abbildung 8: Schema der Partikelbildung in wässriger $ZrOCl_2$ -Lösung. In wässriger $ZrOCl_2$ -Lösung liegen zunächst tetramere Komplexe $[Zr_4(OH)_8^b(H_2O)_{16}]^{8+}$ vor. Eine Deprotonierung von koordinierten Wassermolekülen führt zur Bildung hydroxylierter Tetramere $[Zr_4(OH)_8^b(OH)_x^e(H_2O)_{16-x}]^{(8-x)+}$. Durch Olationsreaktionen der hydroxylierten Tetramere bilden sich Oktamere und höhere Oligomere (polymere Cluster). Die Löslichkeit der polymeren Cluster nimmt mit der Clustergröße ab. Entstehen unlösliche Cluster, kommt es durch Übersättigung an unlöslichen Clustern zur Keimbildung. Die Keime wachsen durch weitere Olationsreaktionen mit hydroxylierten Tetrameren. Es entstehen Primärpartikel, die weiter wachsen können oder zu Sekundärpartikeln aggregieren. (Nach Matsui und Ohgai^[96])

4.6 M13-Bakteriophagen

M13-Bakteriophagen (Phagen) gehören zur Familie der filamentösen Bakteriophagen, die gram-negative Bakterien, in diesem Fall *Escherichia coli* (*E. coli*), spezifisch über einen F-Pilus infizieren. Die infizierten Bakterien bilden neue Phagen und setzen diese frei ohne dabei lysiert zu werden. Die Bakterien können weiter wachsen und sich vermehren. Phagen bestehen aus einer zirkulären einzelsträngigen (single stranded, ss) DNA. Diese ist von circa 2700 helikal angeordneten Kopien des Haupthüllproteins pVIII umgeben (Abbildung 9).

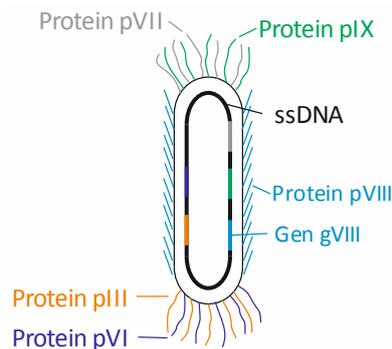


Abbildung 9: Schema einer M13 Bakteriophage. (Nach Tamerler und Sarikaya^[113])

An den Enden befinden sich je fünf Kopien der Hüllproteine pVII und pIX sowie pIII und pVI.^[33,114] Mit einer Länge von 930 nm und einem Durchmesser von 6,5 nm gehören sie zu den kleinsten bekanntesten Phagen.^[33] Das Phagengenom ist vollständig sequenziert. Es besitzt einen intergenischen Bereich und einen kodierenden Bereich, der sich weiter in drei Bereiche aufteilen lässt. Die Bereiche entsprechen der Funktion der Gene im Lebenszyklus der Phagen. Die Gene gII, gX und gV kodieren Proteine, die für die Replikation der DNA nötig sind. Die Gene gVII, gIX, gIII und gVI kodieren die Hüllproteine. Das Gen gVIII kodiert das Haupthüllprotein pVIII am Phagenkörper. Die durch gI, gXI und gIV kodierten Proteine sind für die Phagen Assemblierung verantwortlich. Im intergenischen Bereich liegt der Ursprung der Replikation (engl.: Origin of Replication, ori) für den viralen (+)- und den komplementären (-)-Strang^[33,115] sowie das Verpackungssignal (engl.: Packaging Signal, PS), von welchem aus die Verpackung der DNA erfolgt.^[33,114–116] In Abbildung 10 ist das Genom von M13KE Phagen (New England Biolabs), ein Derivat der natürlichen M13 Phagen dargestellt. M13KE Phagen wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt. Das Phagengenom besitzt ein zusätzliches *lacZα*-Gen im intergenischen Bereich. Dieses wurde inseriert, um infizierte *E. coli*-Zellen auf LB (Lysin produzierende Brühe, engl.: lysogeny broth)-Nährböden zu detektieren. Das *lacZ*-Gen kodiert das Enzym β -Galactosidase. Die Expression von β -Galactosidase wird durch das im Nährmedium enthaltene IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Im Nährmedium liegt zusätzlich X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) vor. Das Enzym β -Galactosidase spaltet X-Gal. Es entsteht ein blauer Farbstoff.^[117] Die Phagen bilden dadurch blaue Plaques auf einer Bakterienkultur.

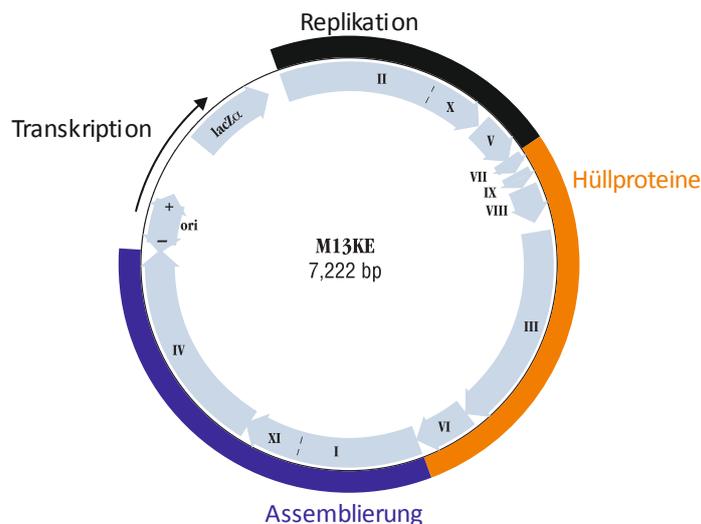


Abbildung 10: Genom der M13KE Bakteriophage, ein Derivat der natürlichen M13 Bakteriophage. Das Genom besitzt einen kodierenden Bereich, der insgesamt 11 Gene enthält (schwarz, orange und blau markierter Bereich). Dieser kodierende Bereich lässt sich in drei Bereiche unterteilen, je nach Funktion der durch die Gene kodierten Proteine. Dazu gehört die Replikation der DNA (gII, gX und gV, schwarz), die Synthese der Hüllproteine (gVII bis gVI, orange) und die Assemblierung der Phagen (gI bis gIV, blau). Im nicht-kodierenden, intergenischen Bereich befindet sich der Ursprung der Replikation (engl.: Origin of Replication, ori), das Verpackungssignal (engl.: Packaging-Signal, PS), das für die Verpackung der ssDNA beim Ausschleusen aus der Zelle verantwortlich ist (nicht dargestellt) und das *lacZα*-Gen für die Blau-Weiß-Selektion. ("Reprinted from www.neb.com (2018) with permission from New England Biolabs", modifiziert)

Der Lebenszyklus von M13-Bakteriophagen beginnt mit der Adsorption der Phagen an den F-Pilus von *E. coli*-Bakterien. Die Adsorption wird über das Hüllprotein pIII vermittelt. Mit Hilfe von Bakterienmembranproteinen wird die Phagen-DNA ins Zellinnere geschleust. Die Hüllproteine pVIII, pVII und pIX werden dabei in die cytoplasmatische Membran integriert.^[114,118,119] Der virale Einzelstrang wird in eine doppelsträngige (double stranded, ds) DNA überführt, die auch als replikative Form (RF-DNA) bezeichnet wird. Die RF-DNA wird mit Hilfe des Proteins pII und Bakterienenzymen mehrfach über einen rolling circle-Mechanismus repliziert. Gleichzeitig werden über Genexpression die Phagenproteine gebildet. Ist eine kritische Konzentration des Proteins pV erreicht, werden nur noch virale Einzelstränge für die Nachkommenphagen gebildet. Dimere des Proteins pV binden an die ssDNA und schützen diese vor erneuter Doppelstrangbildung. Aus 78 Nukleotiden wird das Verpackungssignal (engl.: Packaging Signal, PS) an einem Ende des viralen Einzelstrangs

gebildet. Von diesem aus erfolgt die Verpackung der Phagen-DNA mit den in der cytoplasmatischen Membran integrierten Hüllproteinen während die Phagen-DNA aus der Zelle ausgeschleust wird. Die Phage wird gebildet. Während des Ausschleusens verliert die Phagen-DNA die pV Proteine, die zum Schutz vor Doppelstrangbildung dienten. Zum Ausschleusen der DNA wird ein Komplex aus den Proteinen pI, pIV und pXI gebildet. Es entsteht ein Kanal, der sich über die innere und äußere Zellmembran erstreckt und das Ausschleusen ermöglicht. Die Zelle wird beim Ausschleusen nicht lysiert. Sie kann sich weiter teilen während sie Phagen-Nachkommen produziert.^[33,114-116]

Für den Einsatz von M13-Bakteriophagen als Biotemplat zur Erzeugung von Nanomaterialien werden Peptide, die spezifisch an bestimmte Materialien binden, mittels genetischer Modifikation am Haupthüllprotein pVIII präsentiert. Das Haupthüllprotein pVIII wird mit einem Signal-Peptid aus 23 Aminosäuren an der N-terminalen Seite gebildet (s. Abbildung 11). Das Signal-Peptid ist für die Integration in die innere Membran von *E. coli*-Zellen verantwortlich. Vor der Phagenassemblierung wird das Signal-Peptid durch die Leader-Peptidase abgetrennt. Zurück bleibt das gereifte Hüllprotein aus 50 Aminosäuren.



Abbildung 11: Aminosäuresequenz des ungeriffenen Haupthüllproteins pVIII. (Nach Shen *et al.*^[120])

Da das Phagengenom vollständig kartiert ist und die Funktionen der einzelnen Gene bekannt sind, kann eine zusätzliche peptidkodierende DNA gezielt inseriert werden. Die Insertion findet meist am N-terminalen Ende des Hüllprotein kodierenden Gens, gVIII, statt.^[35,36,120] Das Peptid wird meist zwischen der dritten und vierten Aminosäure eingebracht.^[121] Dies liegt daran, dass Mutationen der ersten N-terminalen Aminosäure, Alanin (s. Abbildung 11), das Abspalten des Signal-Peptids durch die Leader-Peptidase verhindern können. Das gilt vor allem für die Substitution von Alanin durch Prolin und Threonin.^[120] Peptide, die an pVIII als Fusionsprotein präsentiert werden, sind in Bezug auf ihre Länge limitiert. Es können nur kurze Peptide mit 6-8 Aminosäuren präsentiert werden.^[36,37] Je

länger die als Fusionsprotein mit pVIII exprimierten Peptide sind, umso geringer wird die Wahrscheinlichkeit der Bildung infektiöser Phagen. Bei acht Aminosäuren liegt diese bei 40 %, bei zehn Aminosäuren nur noch bei 20 % und bei 16 Aminosäuren bei 1 %.^[36] Eine schnelle und einfache Methode zur Insertion einer peptidkodierenden DNA-Sequenz in das Phagengenom ist die inverse Polymerase-Kettenreaktion. Diese wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.6.1 Genetische Modifikation durch inverse Polymerase-Kettenreaktion

Die inverse Polymerase-Kettenreaktion (engl.: inverse polymerase chain reaction, iPCR) ist eine einfache und schnelle Methode zur Insertion, Deletion und Substitution von DNA-Fragmenten.^[122] Sie basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR), die 1983 von Kary Mullis zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten entwickelt wurde.^[123] Bei einer PCR-Reaktion befinden sich die Reaktanten und die nötigen Hilfsstoffe in einem Reaktionsgefäß. Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten wird in einem mehrstufigen, zyklischen Prozess allein durch gezielte Temperaturänderung gesteuert. Neben der doppelsträngigen DNA werden Primer (Oligonukleotide) benötigt, die komplementär zur Ziel-DNA sind und den zu vervielfältigenden Bereich eingrenzen. Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf circa 95 °C erhitzt (Abbildung 12), um die DNA in Einzelstränge aufzutrennen (Denaturierung).^[124] Anschließend wird die Temperatur auf 50 °C - 60 °C reduziert, abhängig vom Schmelzpunkt der verwendeten Primer. In diesem Schritt lagern sich die Primer an die komplementäre DNA-Sequenz der zu vervielfältigenden DNA (Matrize) an (Annealing). Ausgehend von den Primern wird die doppelsträngige DNA durch die Verknüpfung von Nukleotiden gebildet. Dieser Elongationsschritt wird durch die DNA-Polymerase katalysiert und bei einer Temperatur von circa 70 °C aktiviert. Die neugebildete doppelsträngige DNA dient bei einem weiteren Zyklus, beginnend bei der Denaturierung, als Matrize zur Bildung einer weiteren DNA-Kopie. Durch Erhöhung der Zyklenanzahl (Denaturierung – DNA-Synthese) steigt die Anzahl an DNA-Kopien exponentiell an.^[124,125]

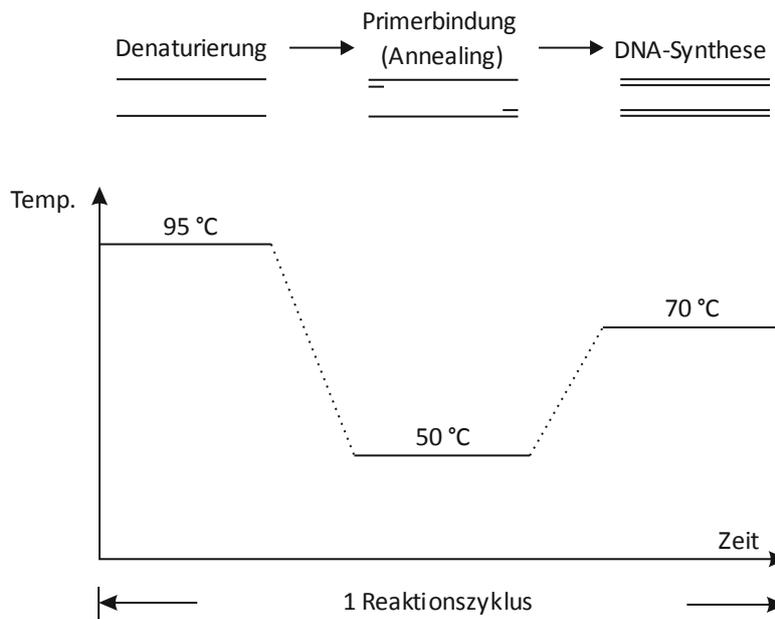


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Reaktionszyklus der Polymerase-Kettenreaktion. (Nach Klempnauer *et al.*^[124])

Im Vergleich zur PCR-Reaktion zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten ermöglicht die von Qi und Scholthof^[122] entwickelte inverse Polymerase-Kettenreaktion (iPCR) zusätzlich eine Insertion, Deletion oder Substitution von DNA-Fragmenten in einem DNA-Templat. Das Prinzip der iPCR wird im Folgenden am Beispiel einer Insertion beschrieben. Die Primer werden hierbei als zwei gegenläufige (inverse), teilweise überlappende Primer designed, den Vorwärtsprimer (engl.: forward, FW) und den Rückwärtsprimer (engl.: reverse, RV) (Abbildung 13 A). Der überlappende Bereich (grün und blau) entspricht der Insertsequenz, der jeweils andere Bereich (rot und schwarz) ist homolog zum DNA-Templat an der Insertionsstelle (Abbildung 13 A und B). Über den homologen Bereich binden die Primer an das DNA-Templat. Die iPCR-Reaktion findet analog der in Abbildung 12 dargestellten PCR-Reaktion statt. Als Produkt eines Reaktionszyklus liegt ein linearer Doppelstrang vor. An den Enden des Doppelstrangs befinden sich die beiden überlappenden Bereiche der Primer (Insertsequenz) als sticky Ends (Abbildung 13 C). Durch mehrmaliges Wiederholen des iPCR Zyklus wird die Konzentration an linearem Endprodukt erhöht. Nach der Isolation des linearen Endproduktes mittels Agarose-Gelelektrophorese werden in der sogenannten Ligation die beiden komplementären Enden enzymkatalysiert verbunden. Es liegt die re-zirkularisierte dsDNA mit dem inserierten DNA-Fragment vor (Abbildung 13).

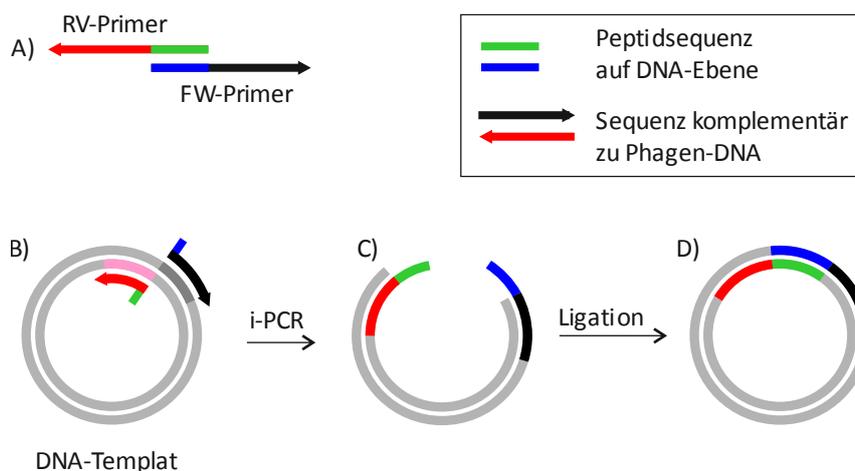


Abbildung 13: Insertion eines DNA-Fragments in ein DNA-Templat mittels inverser Polymerasekettenreaktion (iPCR). A) Vorwärts (FW)- und rückwärts (RV)-Primer werden als gegenläufige, teilweise überlappende Primer designt. Die teilweise überlappende Sequenz (grün und blau) entspricht der Insertsequenz. Der jeweils andere Teil (rot und schwarz) ist komplementär zur entsprechenden Insertionsposition des DNA-Templats. B) Mit dem komplementären Bereich (schwarz und rot) binden die Primer an das DNA-Templat. C) Das resultierende lineare iPCR-Produkt trägt die komplementäre Insert-DNA an beiden Enden in Form von sticky Ends, über die die Rezirkularisation während der Ligation stattfindet D). (Nach Qi und Scholthof^[122])

4.6.2 Phagen-Display

Die Phagen-Display Methode ist eine Selektionsmethode, unter anderem für Peptide, die spezifisch an ein Material binden. Sie wurde 1985 von George Smith entwickelt.^[126] Die Methode wurde üblicherweise benutzt, um Proteine und kleine Antikörper zu identifizieren^[127] oder Protein-Wechselwirkungen^[128] zu untersuchen.^[105] Heutzutage wird die Phagen-Display Methode häufig auch zur Identifikation von Peptiden verwendet, die spezifisch an ein Material binden. Spezifische Bindepeptide werden eingesetzt, um die Keimbildung und das Wachstum anorganischer Materialien zu beeinflussen (s. Kap. 4.5).^[107-112] Mittels Phagen-Display wurden bereits spezifische Bindepeptide für verschiedenste anorganische Materialien identifiziert. Diese Materialien reichen von Metallen wie Platin^[129], Palladium^[130], Gold^[130] und Silber^[131] über Metalloxide wie Zinkoxid^[132,133], Zinnoxid^[134], Titandioxid^[135] und Zirkoniumdioxid^[31,34] und Metallboride wie Nickelborid (Ni_3B)^[136] bis hin zu anderen Funktionsmaterialien wie Hydroxyapatit^[137] und Calcit^[138].

Bei der Identifikation von Bindepeptiden liegt eine Peptidbibliothek mit bis zu 10^{11} randomisierten Aminosäuresequenzen vor.^[105,139] Diese wird als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII exprimiert. Zur Identifikation des Peptids mit der besten Bindung an das Zielmaterial, wird der Selektionsprozess, der auch als Biopanning bezeichnet wird,^[140] mehrfach durchlaufen.^[105] Er ist in Abbildung 14 schematisch dargestellt.

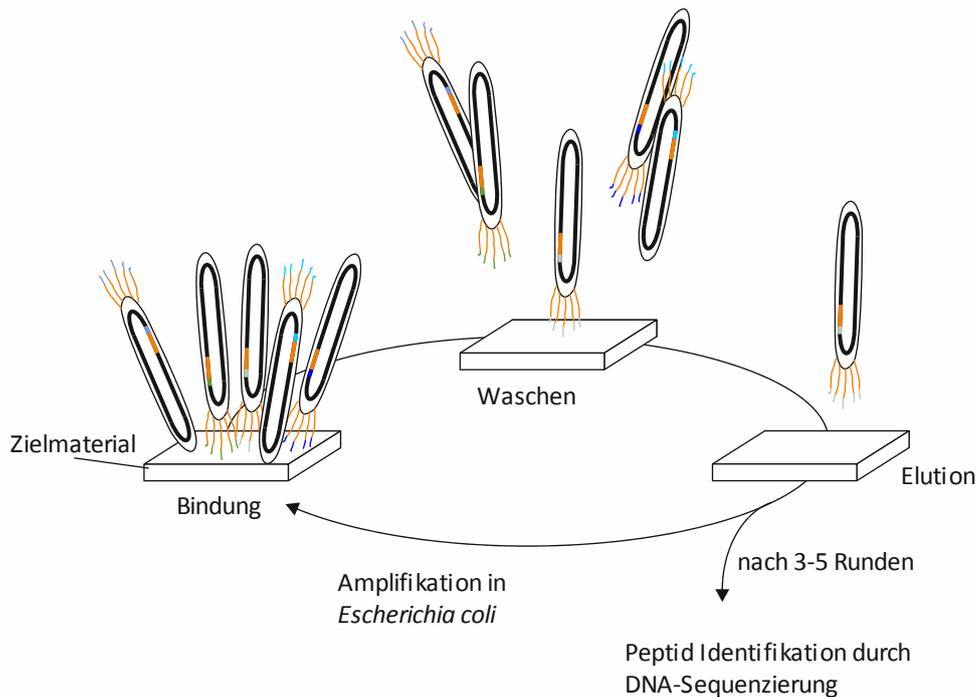


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Phagen-Display Methode. (Nach Lemloh *et al.*^[142])

Zunächst wird die generierte Phagenbibliothek in Kontakt mit dem Zielmaterial gebracht. In diesem Schritt binden einzelne Phagen spezifisch an das Zielmaterial. Nicht gebundene Phagen werden in einem darauffolgenden Waschschrift eliminiert. Im letzten Schritt werden die gebundenen Phagen, meist durch pH-Wert Änderung eluiert^[131,135,136,141] und durch Infektion von *Escherichia coli* Zellen für eine weitere Selektionsrunde amplifiziert. Dieses Biopanning wird mehrfach durchlaufen, um die bestbindende Aminosäuresequenz zu selektieren. Diese wird durch DNA-Sequenzierung identifiziert.^[105,139]

4.7 Phagenschichten als organische Template zur Schichtmineralisation

Phagenschichten werden als organische Template zur Mineralisation von Schichten aus anorganischen Materialien eingesetzt.^[112] Zur Generierung homogener, dichter Phagenschichten wurden verschiedene Methoden, wie die „Schicht für Schicht“-Assemblierung^[143], die Tauchbeschichtung^[144] und „Convective assembly“^[145] entwickelt. Diese Methoden beruhen auf der Selbstassemblierung von Phagen. „Convective Assembly“ überzeugt durch das sehr geringe Volumen an Phagensuspension, das zur Herstellung von Phagenschichten benötigt wird. Ein Volumen von wenigen Mikrolitern ist ausreichend für eine Phagenschicht im Größenbereich von Quadratzentimetern.^[145,146] Zur Erzeugung einer Phagenschicht auf einem Substrat wird die Phagensuspension zwischen dem Substrat und einer Glasplatte positioniert (Abbildung 15).

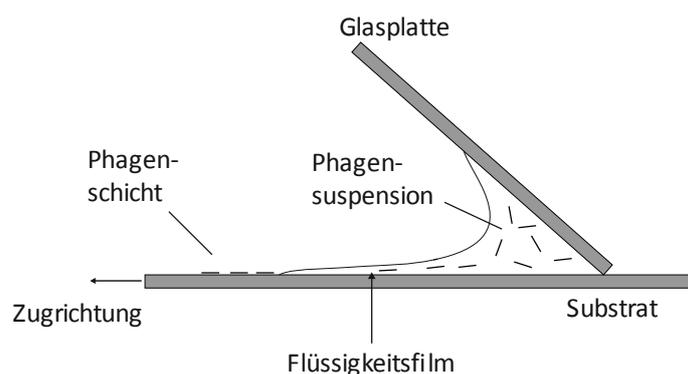


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Systems zur Erzeugung einer Phagenschicht. Mittels „Convective Assembly“ werden Phagenschichten durch Ausrichten der Phagen generiert. (Nach Eiben *et al.*^[147])

Durch die hydrophile Oberfläche des Substrats und der Glasplatte bildet sich ein Meniskus aus. Wird das Substrat mit konstanter Geschwindigkeit bewegt, bildet sich ein Flüssigkeitsfilm auf der Substratoberfläche. In der Phagensuspension entsteht ein Geschwindigkeitsgradienten zwischen Flüssigkeitsschichten nahe der Triplekontaktlinie (Substrat-Luft-Suspension).^[148] Es kommt zu einem scherinduziertes Ausrichten der Phagen parallel zur Zugrichtung.^[149] Das Verdampfen des Flüssigkeitsfilms auf der Substratoberfläche führt zur Assemblierung der Phagen. Die Homogenität und Dichte der Phagenschicht wird durch die scherinduzierte Ausrichtung und das Verdampfen der Flüssigkeit beeinflusst.^[145] Dabei

spielen Parameter wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Hydrophilität des Substrats, Zuggeschwindigkeit und die Phagenkonzentration eine entscheidende Rolle.

4.8 Biofilme

Biofilme sind strukturierte Lebensgemeinschaften von Bakterien, Pilze oder Algen auf lebenden oder abiotischen Oberflächen. Die Mikroorganismen sind dabei von einer extrazellulären Matrix aus polymeren Substanzen (EPS) umgeben.^[150] Diese EPS schützt die Mikroorganismen vor dem externen Umfeld.^[151] Beispielsweise vor der Immunabwehr im menschlichen Körper oder der Wirkung von Antibiotika.^[152,153] Zusätzlich dient die EPS dem Anreichern von Nährstoffen aus einer nährstoffarmen Umgebung.^[154] Biofilme können vor allem im Bereich der Medizin ein ernstzunehmendes Problem darstellen. Vor allem dann, wenn sich pathogene Bakterien auf Implantaten ansiedeln und Biofilme bilden. Solche Infektionen können für Patienten im schlimmsten Fall tödlich enden. Bereits gebildete Biofilme sind schwer zu bekämpfen. Daher liegt ein Forschungsschwerpunkt darauf, die Entstehung von Biofilmen zu verhindern.^[151,155,156] Die Biofilmbildung beginnt mit der Adhäsion der Bakterien auf der Oberfläche.^[157] Die Adhäsion kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der anfänglichen reversiblen Phase tragen elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen sowie van der Waals Kräfte zur Wechselwirkung mit der Oberfläche bei.^[158] Diese Wechselwirkungen werden durch das Umgebungsmedium beeinflusst. Dazu zählen Faktoren wie der pH-Wert oder die Ionenstärke. Auch die Oberflächentopographie des Substrats, mit dem die Bakterien wechselwirken, hat einen Einfluss auf die anfängliche Adhäsion.^[151,153] Eine darauffolgende zweite Phase führt zur irreversiblen Adhäsion. Hierbei vermitteln Adhäsine eine feste Bindung mit der Oberfläche sowie zwischen den Bakterien selbst.^[151,152] Vorhandene Proteine im Umgebungsmedium wie Fibronectin oder Albumin können die Adhäsion begünstigen oder verhindern.^[151,158] Der „reife Biofilm“ bildet sich durch Kolonisation der Bakterien. Die Bakterien vermehren sich und bilden Mikrokolonien. Sie produzieren eine Matrix aus EPS, in die sie eingebettet werden. Durch die Mikrokolonisation entsteht ein mehrschichtiger, dichter Biofilm. Einzelne Bakterien, die aus dem Biofilm abgelöst werden, können an einer anderen Stelle wieder adhären und einen neuen Biofilm bilden.^[159]

4.9 Methoden

4.9.1 Dynamische Lichtstreuung

Mittels dynamischer Lichtstreuung (engl.: Dynamic Light Scattering, DLS) können Partikelgrößen von 1 nm bis in den Submikronbereich ermittelt werden.^[160] Das Messprinzip beruht auf der Brownschen Molekularbewegung suspendierter Partikel. Die Partikel bewegen sich allein durch die Kollision mit Suspensionsmittelmolekülen. Die Partikelgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Partikelgröße, der Viskosität des Lösungsmittels und der Temperatur. Sedimentation und Stöße mit anderen Partikeln werden bei diesem Messprinzip nicht betrachtet. Partikel, die mit einem Laser bestrahlt werden, streuen das Licht in alle Richtungen. Es kommt zur Interferenz des an verschiedenen Streuzentren (Partikel) emittierten Lichts. Detektiert wird die Lichtintensität unter einem bestimmten Winkel in Bezug auf den einfallenden Laserstrahl. Durch die Partikelbewegung fluktuiert die gemessene Lichtintensität. Diese Fluktuation wird in elektrische Pulse umgewandelt. Mit einem digitalen Korrelator wird daraus eine Autokorrelationsfunktion erstellt, aus der der translationale Diffusionskoeffizient D der Partikel berechnet wird.^[160] Über die Stokes-Einstein Gleichung wird unter Kenntnis von Temperatur T und Viskosität des Lösungsmittels η die mittlere Partikelgröße d_H über

$$d_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D} \quad (15)$$

berechnet, wobei k_B die Boltzmann-Konstante darstellt.

Die Auswertung der Autokorrelationsfunktion über eine Exponentialfunktion (Kumulan-
tenanalyse^[161]), liefert die mittlere Partikelgröße.^[162] Bei der Auswertung wird von einer
monomodalen Partikelgrößenverteilung ausgegangen. Die Breite der Partikelgrößenverteilung
(Polydispersität) wird mit dem Polydispersitätsindex beschrieben.^[162] Die mittlere
Partikelgröße d wird direkt aus der Messgröße, der Intensität des gestreuten Lichts I be-
stimmt. Die Lichtintensität ist proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers
(Rayleigh-Näherung).^[163] Liegen neben kleineren Partikeln auch größere Partikel vor, so
werden größere Partikel aufgrund dieser Proportionalität ($I \sim d^6$) stärker gewichtet. Die
intensitätsgewichtete, mittlere Partikelgröße wird dementsprechend zu höheren Werten
verschoben. Wird die Autokorrelationsfunktion über mehrere Exponentialfunktionen aus-
gewertet, ergibt sich die intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung.^[162] Hierbei wird

die relative Intensität des gestreuten Lichts in Bezug auf die Partikelgröße dargestellt (s. Abbildung 16). Durch die Proportionalität ($I \sim d^6$) wird selbst ein geringer Anteil größerer Partikel erfasst. Mithilfe der Mie-Theorie und dem Brechungsindex der Partikel lässt sich aus der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung eine anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung berechnen.^[162] Diese zeigt die relative Anzahl der Partikel bei unterschiedlicher Partikelgröße (s. Abbildung 16).^[162,164] Detaillierte Informationen über die in einer Dispersion vorliegende Partikelgrößenverteilung ergeben sich aus dem Vergleich der intensitäts- und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung (s. Abbildung 16).

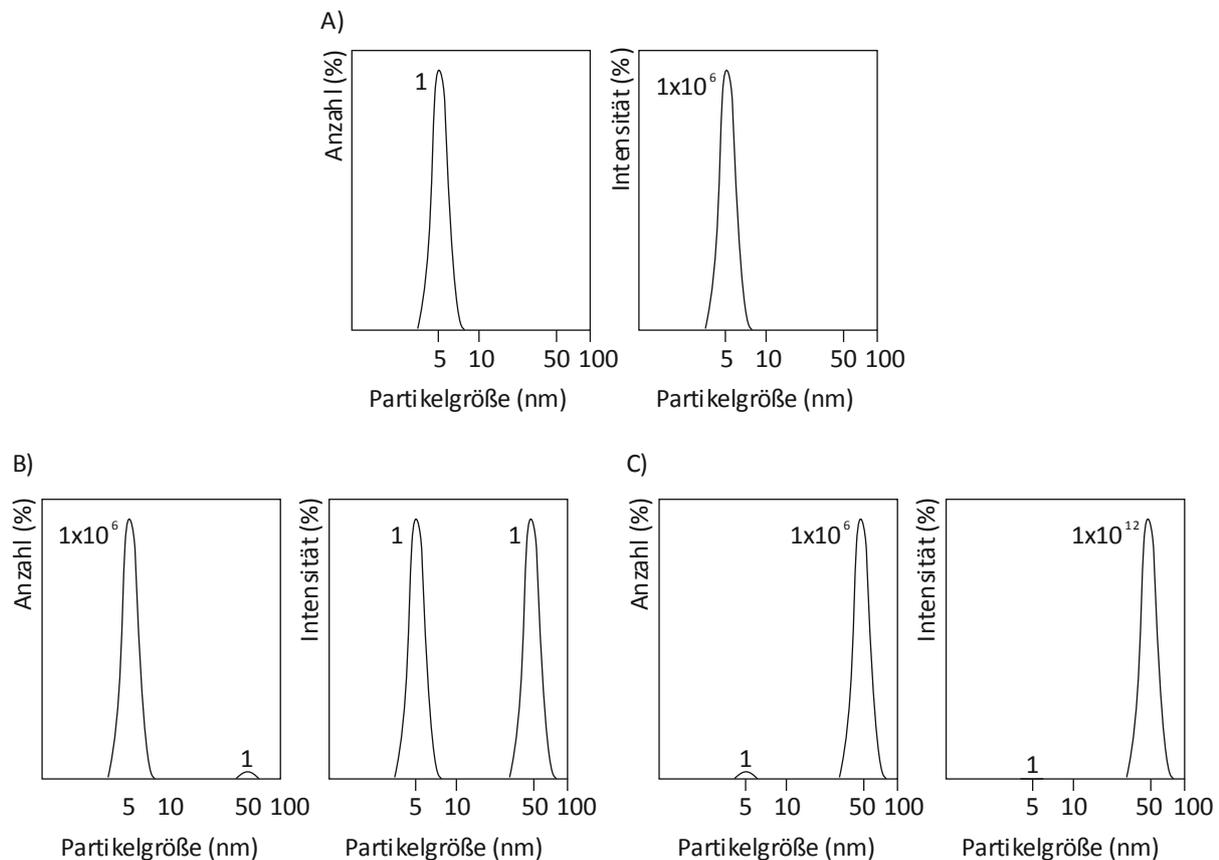


Abbildung 16: Vergleich anzahlgewichteter und intensitätsgewichteter Partikelgrößenverteilung am Beispiel drei verschiedener bimodaler Partikelgrößenverteilungen. (Nach „Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes“, Malvern Instruments^[162])

Stimmen beide überein, so liegt eine monomodale, monodisperse Partikelgrößenverteilung vor (Abbildung 16 A). Liegen dagegen wenig große Partikel neben vielen kleinen Partikeln vor, so werden diese hauptsächlich in der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung

erfasst (s. Abbildung 16 B). Im umgekehrten Fall, d.h. bei wenig kleinen Partikeln neben vielen großen Partikeln, werden die kleinen Partikel hauptsächlich in der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung erfasst (s. Abbildung 16 C).^[162] Die über DLS ermittelte Partikelgröße ist generell etwas größer als die real vorliegende Partikelgröße. Dies liegt daran, dass Faktoren, wie die Form der Partikel, die Oberflächenbeschaffenheit, die Ionenstärke im Medium, die Hydrathülle, die Viskosität, die Temperatur und die Partikelkonzentration die Geschwindigkeit der Partikelbewegung im Dispersionsmedium beeinflussen. Der ermittelte, hydrodynamische Durchmesser der Partikel entspricht dem Durchmesser einer Kugel, die denselben translationalen Diffusionskoeffizienten aufweist, wie der des analysierten Partikels.^[162,164]

4.9.2 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl.: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry, ICP-OES) ist eine Methode zur chemischen Elementaranalyse. Hierbei wird die Eigenschaft zunutze gemacht, dass jedes Element spezifische Emissionswellenlängen aussendet, über die es detektiert werden kann.

Die zu charakterisierenden Proben werden normalerweise als Proben aerosol vermessen. Festkörper werden zunächst mit geeigneten Säuren aufgeschlossen. Zu einem Aerosol zerstäubt, werden sie in ein induktiv gekoppeltes Argon-Plasma gespritzt. Zunächst wird im heißen Plasma das Lösungsmittel entfernt. Bei Temperaturen von bis zu 10.000 K^[165] werden die Valenzelektronen der Ionen thermisch angeregt. Durch Zurückspringen in den Grundzustand niedrigerer Energie wird ein für das jeweilige Element charakteristisches Linienspektrum emittiert. Zur quantitativen Analyse der Proben werden Standards der jeweils vorliegenden Elemente mit verschiedenen, genau definierten Konzentrationen vermessen. Über die optische Emission kann die Elementkonzentration ermittelt werden.^[166,167]

4.9.3 Rasterkraftmikroskopie

Die Rasterkraftmikroskopie (engl.: Atomic Force Microscopy, AFM) wird häufig zur Ermittlung der Topographie einer Probe eingesetzt. Die Auflösung liegt im unteren einstelligen Nanometerbereich. Eine sehr scharfe Messspitze (engl.: Tip), die an einem Federbalken

befestigt ist, wird zeilenweise über die Probenoberfläche geführt. Die Messung beruht auf atomaren Kräften zwischen Tip und Probenoberfläche. Es kann in zwei verschiedenen Betriebsmodi gemessen werden – dem Kontakt- und Nichtkontaktmodus. Im Kontaktmodus besteht ein direkter Kontakt zwischen Tip und Probenoberfläche. Höhenunterschiede bewirken eine Auslenkung des Federbalkens. Diese Auslenkung wird optisch oder kapazitiv erfasst.^[167] Im Nichtkontaktmodus schwingt der Federbalken vertikal in seiner Eigenfrequenz. Wechselwirkende Kräfte mit der Probenoberfläche verursachen eine Verschiebung der Eigenfrequenz, die zur Topographieabbildung erfasst wird.^[167,168]

4.9.4 Rasterelektronenmikroskopie/Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie (REM) können Oberflächen hochauflösend (nur wenige Nanometer) analysiert werden. Im Vergleich zur Rasterkraftmikroskopie ist die Bildgebung wesentlich schneller.

Ein sehr fein fokussierter Primärelektronenstrahl wird beim bildgebenden Verfahren über die Probenoberfläche gerastert. Im sogenannten Wechselwirkungsvolumen mit dem Probenmaterial entstehen dabei Sekundärprodukte wie Rückstreuelektronen (engl.: Backscattered Electrons, BSE), Sekundärelektronen (SE) und Röntgenstrahlen. Zur Bildgebung werden SE und BSE detektiert. SE entstehen durch inelastische Streuung der Primärelektronen an den Atomhüllen. Die SE-Ausbeute ist richtungsabhängig. Sie ist senkrecht zur Probenoberfläche am größten. Auftretende Kanteneffekte führen zu starken Topographiekontrasten. Kanten werden heller dargestellt, Vertiefungen dunkler. Die geringe Energie der SE von < 50 eV bedingt eine Austrittstiefe von ≤ 1 nm.^[167] Dies ermöglicht eine dreidimensionale hochaufgelöste Topographiedarstellung. BSE entstehen hingegen durch elastische Streuung von Primärelektronen. Sie besitzen eine höhere Energie und eine größere Austrittstiefe. Die Auflösung von Strukturen ist etwas geringer als mit SE. Ihre Ausbeute ist materialspezifisch. Sie nimmt mit höherer Kernladungszahl der Atome zu. Dies ermöglicht die Darstellung von Materialkontrasten. Für beide Bildgebungsverfahren gilt, je höher die Energie der Primärelektronen ist, umso größer ist das Wechselwirkungsvolumen. Die Oberflächensensitivität nimmt dabei ab.

Für die Materialcharakterisierung können Röntgenstrahlen, die auch als Sekundärprodukt entstehen, über ein energiedispersives Spektroskop (engl.: Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy, EDX) analysiert werden. Die Röntgenstrahlen sind elementspezifisch. Durch einen sehr fein fokussierten Primärelektronenstrahl, der zur Entstehung der Röntgenstrahlung führt, kann die elementare Materialzusammensetzung orts aufgelöst untersucht werden.^[167,169]

4.9.5 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl.: X-Ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) wird ebenfalls zur Oberflächenanalyse von Materialien eingesetzt. Neben der elementaren Zusammensetzung (außer H und He) können auch chemische Bindungszustände von Atomen und deren Oxidationszustand ermittelt werden.^[167]

Dabei wird der Festkörper mit einer monoenergetischen, ionisierenden Röntgenstrahlung (meist Mg- K_α oder Al- K_α) bestrahlt. Eine Wechselwirkung mit kernnahen Elektronen führt zur Ionisation von Atomen. Die kinetische Energie E_{kin} der emittierten Elektronen wird gemessen. Diese entspricht der Energiedifferenz zwischen der Energie der eingestrahlenen Photonen $h\nu$ und der Bindungsenergie der Elektronen E_b .^[169]

$$E_{\text{kin}} = h\nu - E_b \quad (16)$$

Da die Photoelektronen aus unterschiedlichen Schalen der Atome emittiert werden können, gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Ionisierungszuständen. Diese sind charakteristisch für jedes Element. So geben XPS-Analysen Auskunft über die elementare Zusammensetzung eines Materials. Über die Anzahl der emittierten Elektronen ist auch eine quantitative Analyse möglich.

Verschiedene chemische Bindungen einzelner Elemente bewirken einen Unterschied in den jeweiligen Bindungsenergien der Photoelektronen. Dies führt zu einer chemischen Verschiebung der jeweiligen Peaks und ermöglicht so auch die Identifikation der chemischen Umgebung einzelner Elemente.^[169-171]

4.9.6 Thermische Analyse

Um temperaturabhängige Phasenumwandlungen, Reaktionen oder Verdampfen und Zersetzen einer Probe analysieren zu können, werden thermische Analysemethoden angewandt. Hierbei werden physikalische und chemische Probeneigenschaften während einer kontrollierten Temperaturbehandlung gemessen. Änderungen dieser Eigenschaften zeigen Veränderungen der Probe an.^[172,173]

4.9.6.1 Thermogravimetrie

Mit Hilfe einer thermogravimetrischen Messung können sowohl Zersetzungsreaktionen und Reaktionen mit dem die Probe umströmenden Gas (z. B. Oxidation), als auch ein eintretendes Verdampfen der Probe oder einzelner Probenbestandteilen erfasst werden. Diese Reaktionen äußern sich in einer Massenabnahme (z. B. Zersetzung, Verdampfen) oder einer Massenzunahme (z. B. Oxidationsreaktionen von Metallen, Boriden, Carbiden oder Nitriden). Bei der Thermogravimetrie (TG) wird die Massenänderung der Probe in Abhängigkeit der Temperatur erfasst. Die Temperatur nimmt dabei typischerweise mit einer konstanten Heizrate zu. Allerdings können mit dieser Methode nur thermische Effekte detektiert werden, die eine Massenänderung haben. Für eine umfassende Materialcharakterisierung wird die TG daher häufig mit einer Differenzthermoanalyse (DTA) oder einer Dynamischen Differenzkalorimetrie (engl.: differential scanning calorimetry, DSC) in einem Gerät kombiniert (Simultane Thermische Analyse).^[169,173]

4.9.6.2 Differenzthermoanalyse

Bei einer Differenzthermoanalyse (DTA) wird die Temperaturdifferenz zwischen Probe und einer Referenz gemessen. Beide befinden sich dabei in einem Ofen und werden mit konstanter Heizrate erwärmt. Für die Temperaturmessung werden zwei gleiche Thermo-elemente für Probe und Referenz benutzt. Bei gleicher Temperatur ist die Spannung zwischen den Thermo-elementen Null. Tritt eine endotherme oder exotherme Umwandlung oder eine Reaktion in der Probe auf, so ist dies an einer messbaren Spannung am Thermo-elementpaar (Temperaturdifferenz) bemerkbar. Bei endothermen Effekten nimmt die Pro-bentemperatur im Vergleich zur Referenztemperatur langsamer zu, bei exothermen Effekten entsprechend umgekehrt.^[169,173]

4.9.6.3 Dynamische Differenzkalorimetrie

Mit der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) können Reaktionswärmern quantitativ erfasst werden. Es werden dabei zwei Arten von Kalorimetern unterschieden. Die Wärmestrom-DSC und die leistungskompensierte DSC. Bei ersterer wird die Differenz im Wärmestrom zwischen Ofen-Probe und Ofen-Referenz durch Messung der Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz erfasst. Sie ist proportional zum Reaktionswärmestrom. Eine Kalibrierung des Gerätes ermöglicht die Bestimmung der Proportionalitätskonstanten und damit auch die quantitative Bestimmung des Reaktionswärmestroms (Enthalpieänderung). Bei der leistungskompensierten DSC wird eine durch thermische Effekte auftretende Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz durch Änderung der Heizleistung (Ofen-Probe) kompensiert. Sie weisen somit stets die gleiche Temperatur auf. Die Änderung der Heizleistung entspricht der Enthalpieänderung.^[169,173]

Häufig werden an Anlagen zur thermischen Analyse auch Massenspektrometer installiert, um Abgangsprodukte identifizieren zu können. Dabei werden Moleküle oder Atome in der Gasphase ionisiert und in einem elektrischen Feld beschleunigt. Durch einen Analysator werden sie entsprechend ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt und detektiert.^[51]

4.9.7 Flüssigkeitspyknometrie

Durch Flüssigkeitspyknometrie können Dichten von Flüssigkeiten und Feststoffen ermittelt werden. Ein Flüssigkeitspyknometer ist ein Glaskolben mit genau bekanntem Volumen, der über einen Schliffstopfen mit einer Kapillare verschlossen wird. Dies ermöglicht die Dichtebestimmung allein durch Wiegen entsprechender Vergleichssubstanzen mit gleichem Volumen. Voraussetzung für diese Methode ist eine gleiche Temperatur von Flüssigkeit, Festkörper und Pyknometer.

Die Dichte einer Flüssigkeit ρ_{Fl} lässt sich durch

$$\rho_{Fl} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \cdot \rho_W \quad (17)$$

berechnen. Hierzu wird eine Vergleichsflüssigkeit, häufig Wasser der Dichte ρ_W , eingesetzt. Gemessen wird die Masse des leeren Pyknometers m_0 , die Masse des mit der Vergleichsflüssigkeit (Wasser) gefüllten Pyknometers m_1 und die Masse des mit der zu charakterisierenden Flüssigkeit gefüllten Pyknometers m_2 .

Bei der Dichtebestimmung von Feststoffen macht man sich die Verdrängung einer Flüssigkeit bei Zugabe eines Feststoffes zunutze. Die Dichte des Feststoffes ρ_F wird hier durch

$$\rho_F = \frac{(m_3 - m_0)}{(m_1 - m_0) - (m_4 - m_3)} \cdot \rho_W \quad (18)$$

berechnet. Als Flüssigkeit wird ebenfalls häufig Wasser der Dichte ρ_W verwendet. Gemessen wird neben der Masse des leeren Pyknometers m_0 und der Masse des mit Wasser gefüllten Pyknometers m_1 auch die Masse des Pyknometers mit dem zu charakterisierenden Feststoff m_3 sowie die Masse des Pyknometers mit Feststoff und Wasser m_4 .^[174,175]

4.9.8 Zetapotentialmessung

Das Zetapotential (ZP) von Partikeln kann über elektrophoretische Messungen bestimmt werden. Beim Anlegen eines elektrischen Feldes wird das Partikel mit einer Nettoladung q beschleunigt bis es eine konstante Partikelgeschwindigkeit v erreicht. Das Verhältnis der Partikelgeschwindigkeit zur angelegten Feldstärke E wird als elektrophoretische Mobilität μ beschrieben. Der Zusammenhang zwischen elektrophoretischer Mobilität und Zetapotential wird mit der Henry Gleichung beschrieben:^[176]

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{2\varepsilon \cdot ZP \cdot f(\kappa a)}{3\eta} \quad (19)$$

Hierbei ist η die Viskosität und ε die Dielektrizitätskonstante des Dispersionsmediums. Der Henry-Parameter $f(\kappa a)$ ist abhängig vom Debye-Hückel Parameter κ und dem Partikelradius a . Für $\kappa a \ll 1$ ist $f(\kappa a) = 1$. Für $\kappa a \gg 1$ gilt $f(\kappa a) = 1,5$. Die Partikelgeschwindigkeit v wird über Laser-Doppler-Geschwindigkeitsmessungen bestimmt.^[176]

Das ZP von Schichten wird über ein Strömungspotential berechnet. Hierbei befindet sich das zu charakterisierende Material an den Wänden einer Kapillaren, durch die eine Flüssigkeit mit einem bestimmten Druck gepumpt wird. Der Flüssigkeitsstrom zieht ein Teil der diffusen Schicht mit. Es kommt zu einer Ladungstrennung und einem elektrischen Stromfluss entgegen der Fließrichtung. Nach Gleichgewichtseinstellung kann ein Strömungspotential abgegriffen werden, über das das Zetapotential berechnet wird.^[59,60]

4.9.9 Röntgenbeugung

Die Röntgenbeugung (engl.: X-Ray Diffraction, XRD) wird zur Bestimmung von Kristallstrukturen, Vorzugsorientierungen und Eigenspannungen angewandt, wobei im Folgenden nur auf die Bestimmung der Kristallstruktur eingegangen wird. Hierbei wird die Probe mit Röntgenstrahlung bestrahlt, meist Cu- $K\alpha$ Strahlung.^[169] Eine Wechselwirkung der Röntgenstrahlen mit den Elektronen der Atome führt zur Streuung der Strahlung. In Kristallen liegen die Atome geordnet in Netzebenenscharen vor (Abbildung 17). Die Strahlung wird an den Atomen gestreut.

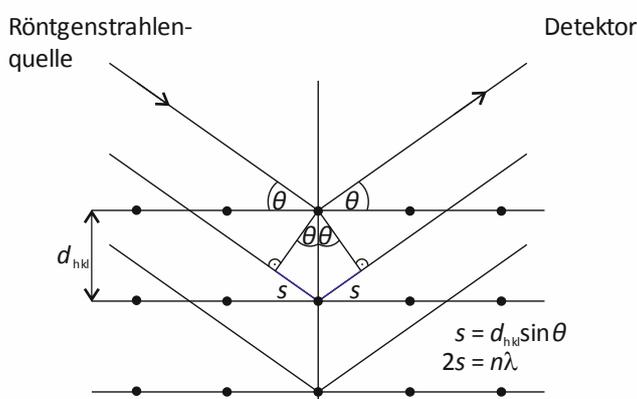


Abbildung 17: Röntgenbeugung an den Elektronen der Atome einer Netzebenenschar. Der Abstand zwischen den Netzebenen beträgt d_{hkl} . Beugung tritt auf, wenn die Bragg Gleichung $n\lambda = 2d_{hkl} \sin\theta$ erfüllt ist. In diesem Fall ist der Gangunterschied $2s$ zwischen zwei gebeugten Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ . (Nach Mittemeijer^[178])

Eine konstruktive Interferenz (Beugung) von gestreuter Röntgenstrahlung tritt ein, wenn der einfallende Strahl einen bestimmten Winkelbezug zur Netzebenenschar mit den Miller Indizes hkl hat. Diese Bedingung wird durch die Bragg-Gleichung beschrieben:^[177]

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta, \quad (20)$$

Wobei n eine ganze, positive Zahl ist, λ die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, d_{hkl} der Abstand zweier Netzebenen und θ der Beugungswinkel. Die Röntgenstrahlen werden gebeugt, wenn der Gangunterschied der gestreuten Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist. Je nach Netzebenenschar tritt Beugung unter einem anderen Winkel auf. Die gebeugten Röntgenstrahlen werden winkelbezogen detektiert. Ein Diffraktogramm zeigt die auftretende Beugung durch Reflexe in Abhängigkeit des Beugungswinkels. Hie-

raus kann schließlich die Kristallstruktur des zu untersuchenden Materials ermittelt werden.^[169,178]

4.9.10 Kontaktwinkelmessung

Kontaktwinkelmessungen mit Wasser werden durchgeführt, um die Hydrophilie von Oberflächen zu charakterisieren. Wird ein Wassertropfen auf eine Oberfläche aufgebracht, so bildet er eine Gleichgewichtsform aus. Diese ist abhängig von den Oberflächenspannungen des zu charakterisierenden Festkörpers (fest, S) γ_{SG} und des Wassertropfens (flüssig, L) γ_{LG} sowie der Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Wasser γ_{SL} (s. Abbildung 18).

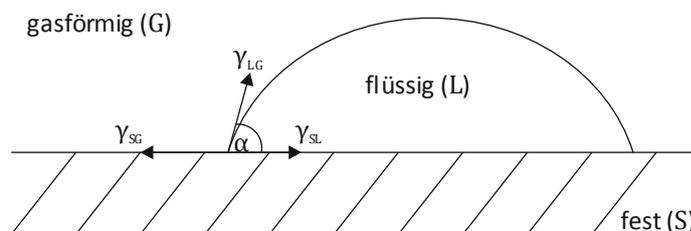


Abbildung 18: Gleichgewichtsform eines Wassertropfens auf einer Oberfläche. Das Gleichgewicht wird bestimmt von den Oberflächen- und Grenzflächenspannungen γ_{xy} an den jeweiligen Phasengrenzlinien fest-gasförmig (SG), flüssig-gasförmig (LG) und fest-flüssig (SL). Der Gleichgewichtszustand wird mit dem Kontaktwinkel α zwischen der Tropfenoberfläche und der zu charakterisierenden Oberfläche beschrieben.

Der Gleichgewichtszustand des Tropfens wird mit dem Kontaktwinkel α zwischen der Tropfenoberfläche und der zu charakterisierenden Oberfläche beschrieben (Abbildung 18). Die Young-Gleichung beschreibt den Zusammenhang zwischen den Oberflächen- und Grenzflächenspannungen γ_{xy} und dem Kontaktwinkel α :

$$\gamma_{SG} = \gamma_{SL} + \gamma_{LG} \cos \alpha. \quad (21)$$

Hierbei steht G für gasförmig. Hydrophile Oberflächen bevorzugen die Bildung einer Grenzfläche zu Wasser. Der Kontaktwinkel α ist klein. Auf hydrophoben, wasserabweisenden Oberflächen bilden sich dagegen große Wasser-Kontaktwinkel um 90° aus.^[179,180]

4.9.11 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wird vor allem in der Biologie und Medizin eingesetzt zur Quantifizierung von Zellen, zum Betrachten von Zellbestandteilen oder zur Untersuchung der Zellviabilität angewandt. Die Auflösung eines Fluoreszenzmikroskops liegt bei 200 - 300 nm. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Form der Lichtmikroskopie. Zur Bildgebung trägt das Fluoreszenzlicht des abzubildenden Präparats bei. Somit können nur Objekte betrachtet werden, die entweder selbst fluoreszieren oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) behandelt wurden. In Zellen können fluoreszierende Proteine durch ein Expressionsplasmid gebildet werden. Wird das Fluorochrom mit kurzwelligem Licht bestrahlt werden Elektronen angeregt. Vor dem strahlenden Übergang zurück in den Grundzustand treten nichtstrahlende Übergänge auf. Dadurch wird die Energie des emittierten Fluoreszenzlichts reduziert. Im Vergleich zum Absorptionslicht weist das Fluoreszenzlicht somit eine höhere Wellenlänge auf. Diese Verschiebung der Wellenlänge wird als Stokes-Verschiebung bezeichnet. Sie ermöglicht das Herausfiltern des kurzwelligen Anregungslicht, sodass nur das Fluoreszenzlicht zur Bildgebung beiträgt.^[181,182]

5 Experimente

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Fluoreszenzmikroskop	DM5500 B, Leica mit monochromer DCF360 FX Digitalkamera, Leica
Gelelektrophorese	Modell 40-0708, PeqLab Biotechnologie
Kontaktwinkelmesssystem	G10, Krüss
Nanodrop	NanoDrop
optisches Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma	Spectro Ciros, Spectro Analytical Instruments
Partikelgrößenanalyse	Zetasizer 3000 HSA, Malvern Instruments mit 1,5 mL UV-Einmalküvette halbmikro, BRAND
Plasmareiniger	Gala Instrumente, Plasma Prep 2
Rasterelektronenmikroskop	Merlin Gemini II, Zeiss Ultra 55, Zeiss mit Stickstoff gekühltem EDAX System
Rasterkraftmikroskop	MultiMode™ 8, Bruker mit PPP-NCHR-W Tips, Nanosensors
Röntgendiffraktometer	SmartLab, Rigaku corporation
Röntgen-induziertes Photoelektronenspektroskop	Thermo VG Thetaprobe 300, Thermo Fisher Scientific
Rotationsmischer	Intelli-Mixer RM-2, ELMI

Fortsetzung Tabelle 1

Schüttelinkubator	Infors AG
Thermische Analyse	STA 449C Jupiter F3, Netzsch mit InProcess GAM 200 Massenspektrometer
Thermocycler	Mastercycler gradient, Eppendorf
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
UV-Vis-Spektralphotometer	Cary UV-Vis-NIR Spectrophotometer 5000, Varian
Vortex	Vortex Genie 2, SI Scientific Industries
Muffelofen	Nabertherm Logotherm L5 S17
Zentrifuge	5810 R (F45-30-11 und A-4-81), Eppendorf
Zetapotentialbestimmung, Oberflächen	SurPASS, Anton Paar
Zetapotentialbestimmung, Partikel	Zetasizer Nano, Malvern mit gefalteten Kapillarzellen DTS1070

5.1.2 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien mit Lieferant und Reinheit.

Aceton	99,9 %, Roth
Agar-Agar Kobe I	Roth
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	Merck
Reinstwasser (ddH ₂ O)	18,1 MΩcm
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth

Fortsetzung Tabelle 2

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Fluka
Ethanol	≥ 99,8 %, p.a., Roth
Glycin	> 99 % Roth
Hefeextrakt	Roth
1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	≥ 98 %, für die GC, Roth
Isopropanol	99,9 %, VWR
Isopropyl β-D-thiogalactoside	Peqlab
Natriumchlorid	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Peggreen	VWR
Polyethylenglykol 6000	Merck
1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorodecyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich
Salzsäure	rauchend 37 %, Roth
Tetracyclin	Sigma/Fluka
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich
Trypton	Fluka
Tryptic Soy Broth	Sigma-Aldrich
Tween 20	Fluka
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	Roth
ZrOCl ₂ ·8H ₂ O	98 %, Sigma-Aldrich

5.1.3 Substrate und Partikel

- Si-Substrat, (100) orientiert, B-dotiert, Siltronic AG
- Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer (ETFE)-Substrat, Dicke 0,125 mm, Goodfellow
- Polyethylenterephthalat (PET)-Substrat, biaxial orientiert, Dicke: 0,175 mm, Goodfellow
- ZrO₂-Substrate:

Phagen-Display

- *c*-ZrO₂, einkristallin (100) orientiert, 9,5 mol% Y₂O₃, Charge: 0385/0265/14, 5 x 5 x 0,5 mm³, beidseitig poliert, root mean square (rms)-Rauigkeiten (1 x 1 μm²): 0,1 ± 0,0 nm, CrysTec
- *t*-ZrO₂, polykristallin, 2,8 mol% Y₂O₃, Z-700, BCE-Nr.: 900-520-024-37, 5 x 5 x 0,3 mm³, root mean square (rms)-Rauigkeiten (1 x 1 μm²): 6,7 ± 1,1 nm, BCE Special Ceramics

Bindungsassay

- *c*-ZrO₂, einkristallin (100) orientiert, 9,5 mol% Y₂O₃, Charge: 0385/1016/14, 5 x 5 x 0,5 mm³, beidseitig poliert, root mean square (rms)-Rauigkeiten (1 x 1 μm²): 0,1 ± 0,0 nm, CrysTec

Zetapotentialmessung

- *c*-ZrO₂, einkristallin (100) orientiert, 9,5 mol% Y₂O₃, Charge: 0385/1016/14, 10 x 10 x 0,5 mm³, beidseitig poliert, root mean square (rms)-Rauigkeiten (1 x 1 μm²): 0,1 ± 0,0 nm, CrysTec
- ZrO₂-Partikel
 - *c*-ZrO₂, 6 mol% Y₂O₃, PlasmaChem
 - *t*-ZrO₂, 5,4 wt% Y₂O₃, PlasmaChem

5.1.4 Enzyme

PfuUltra II Fusion HS DNA-Polymerase	Agilent Technologies
T4-DNA-Ligase, 5 U/μL	Thermo Scientific

5.1.5 Primer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Peptide durch genetische Modifikation auf der Oberfläche von M13 Phagen präsentiert. Hierfür wurde die Peptid-DNA mittels inverser Polymerase-Kettenreaktion (iPCR) an der entsprechenden Stelle in die Phagen-DNA (s. Abbildung 19 A) inseriert. Für die iPCR wurden zwei gegenläufige Primer, ein Vorwärts- (engl.: forward, FW) und ein Rückwärtsprimer (engl.: reverse, RV) designt. Diese bestehen aus zwei Teilen (Abbildung 19).

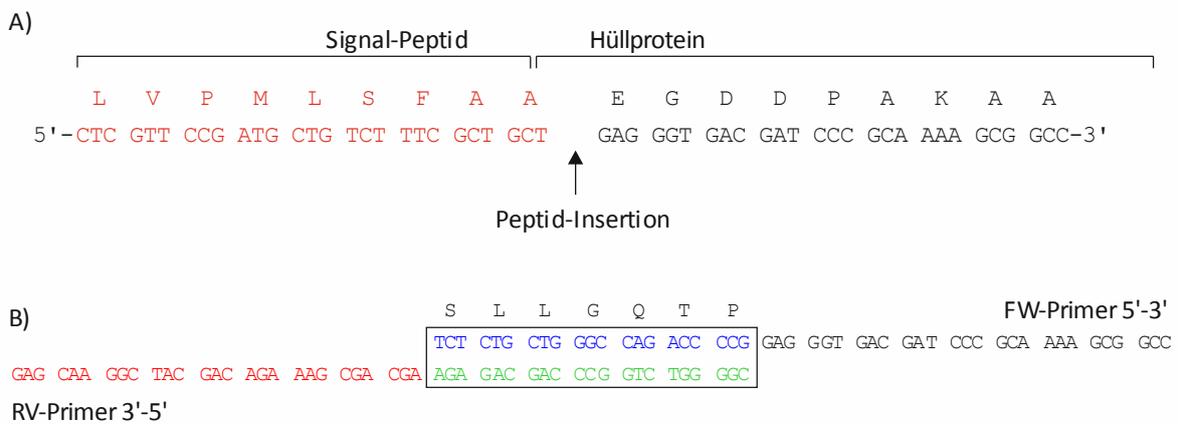


Abbildung 19: Primer-Design zur genetischen Modifikation von M13 Phagen. A) Ausschnitt aus Gen gVIII, welches das ungereifte Haupthüllprotein pVIII kodiert. Das ungereifte Haupthüllprotein besitzt ein Signal-Peptid am N-terminalen Ende des Hüllproteins pVIII. Die ZrO₂-Bindepeptide wurden am N-terminalen Ende des Haupthüllproteins pVIII nach der ersten Aminosäure (Alanin) inseriert. Die Insertionsposition liegt zwischen Thymin (Basennummer (Bnr) 1373) und Guanin (Basennummer 1374). B) Primer-Design am Beispiel des Peptids *ct5-1* (SLLGQTP). Die Primer werden als zwei gegenläufige, teilweise überlappende Primer designt – den Vorwärtsprimer (FW) und den Rückwärtsprimer (RV). Die teilweise überlappende Sequenz mit 21 Nukleotiden (blau und grün) entspricht der Peptidsequenz auf DNA-Ebene. Der jeweils andere Teil mit 27 Nukleotiden (schwarz und rot) ist komplementär zur Phagen-DNA an der entsprechenden Insertionsposition.

Ein Teil ist komplementär zum Phagen-Templat an der entsprechenden Insertionsposition (Abbildung 19 A). Dieser Teil besteht aus 27 Nukleotiden. Beim Vorwärtsprimer entspricht der komplementäre Bereich der Basensequenz 1374-1400 des M13KE-Templats, beim Rückwärtsprimer der Basensequenz 1347-1373 (Abbildung 19 B). Mit diesem Teil lagern sich die Primer an die Phagen-DNA an. Der andere Teil der Primer kodiert das Bindepeptid. Er besteht aus 21 Nukleotiden. Die Oligonukleotide, die als Primer zur Insertion der Peptid-

DNA von *ct5-1* (SLLGQTP), *c5-1* (GSLSRFI) und *ct5-2* (GQSEKHL) eingesetzt wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet. Der zum Phagen-Templat komplementäre Teil ist unterstrichen. Die Oligonukleotid-Synthese wurden kommerziell durchgeführt (Metabion GmbH, Deutschland).

Tabelle 3: Oligonukleotide zur genetischen Modifikation von Phagen. Die DNA-Sequenz der Bindepeptide wurde mittels iPCR an die entsprechende Position im Phagen-Templat inseriert. Die als Primer eingesetzten Oligonukleotidsequenzen sind aufgelistet. Der zum Phagen-Templat komplementäre Teil ist unterstrichen dargestellt. Der Vorwärtsprimer ist komplementär zur Basensequenz 1374-1400 des M13KE-Templats, der Rückwärtsprimer ist komplementär zur Basensequenz 1347-1373. Der jeweils andere Teil der Primer entspricht der DNA-Sequenz der Peptide *ct5-1* (SLLGQTP) (a51), *c5-1* (GSLSRFI) (b51) und *ct5-2* (GQSEKHL) (c52). Es ist jeweils der Vorwärts- (engl.: forward, FW) und Rückwärtsprimer (engl.: reverse, RV) dargestellt.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz
SFA_a51_FW	5' -TCT CTG CTG GGC CAG ACC CCG <u>GAG GGT GAC GAT CCC</u> <u>GCA AAA GCG GCC-3'</u>
SFA_a51_RV	5' -CGG GGT CTG GCC CAG CAG AGA <u>AGC AGC GAA AGA CAG</u> <u>CAT CGG AAC GAG-3'</u>
SFA_b51_FW	5' -GGC TCT CTG TCT CGT TTT ATT <u>GAG GGT GAC GAT CCC</u> <u>GCA AAA GCG GCC-3'</u>
SFA_b51_RV	5' -AAT AAA ACG AGA CAG AGA GCC <u>AGC AGC GAA AGA CAG</u> <u>CAT CGG AAC GAG-3'</u>
SFA_c52_FW	5' -GGC CAG TCT GAA AAA CAT CTG <u>GAG GGT GAC GAT CCC</u> <u>GCA AAA GCG GCC-3'</u>
SFA_c52_RV	5' -CAG ATG TTT TTC AGA CTG GCC <u>AGC AGC GAA AGA CAG</u> <u>CAT CGG AAC GAG-3'</u>
-96 gIII	5' -CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'

5.1.6 Bakterienstamm

Escherichia coli (*E. coli*) K12 ER2738-Bakterien (New England Biolabs, Inc.) wurden zur Amplifikation von M13-Bakteriophagen (kurz: Phagen) eingesetzt.

Genotyp: F' *proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ (*lacZ*)M15 *zzf::Tn10*(Tet^R)/ *fhuA2 glnV* Δ (*lac-proAB*) *thi-1* Δ (*hds-mcrB*)5.

5.1.7 Plasmid

Das Phagen-Plasmid M13KE von New England Biolabs diente als Klonierungs-Plasmid (Abbildung 20).

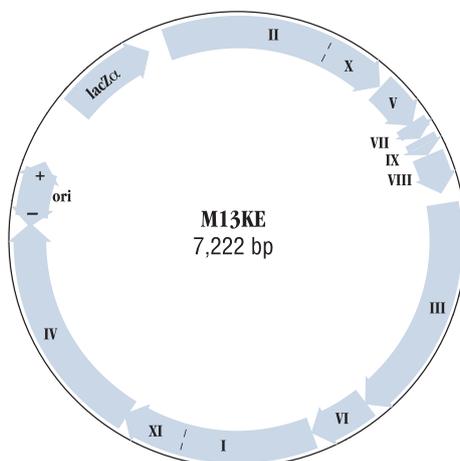


Abbildung 20: Plasmidkarte M13KE. Das M13KE Bakteriophagentemplat besteht aus 7222 Basenpaaren (bp). Ori: Replikationsursprung. *lacZα*: *lacZα*-Gen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. I-XI: Phagengene. ("Reprinted from www.neb.com (2018) with permission from New England Biolabs", modifiziert)

Neben den elf Genen (I-XI) zur Amplifikation der Phagen in *E. coli* und dem Replikationsursprung (ori) zur Replikation der Phagen-DNA trägt das Phagen-Plasmid ein *lacZα*-Gen, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Dieses ermöglicht den Abbau von X-Gal auf einem LB-IPTG-X-Gal-Medium, was zu einem blauen Farbstoff führt. Somit können Plaques leichter identifiziert werden (s. 5.2.3.2).

5.1.8 Kits

DNA-Isolierung

- Zippy Plasmid Miniprep Kit, Zymo Research
- peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (C-Line), PeqLab

DNA-Aufreinigung

- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Zymo Research

5.1.9 Puffer und Lösungen

PBS-Puffer

NaCl	0,8 g L ⁻¹
KCl	0,2 g L ⁻¹
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,78 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,27 g L ⁻¹

TBS-Puffer

TRIS	50 mM
NaCl	150 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl (aq) auf 7,3 bzw. 8,8 eingestellt.

Glycin-HCl-Puffer

Glycin	0,2 M
--------	-------

Der pH-Wert wurde mit HCl (aq) auf pH 2 eingestellt.

Blocking-Puffer

Zur Herstellung des Blocking-Puffers für das Phagen-Display und den Bindungsassay wurde zu einem Glycin-HCl-Puffer eine 50 mg mL⁻¹ Rinderserumalbumin-Lösung (engl.: Bovine Serum Albumin, BSA) im Volumenverhältnis 1:10 gegeben.

Bindungspuffer

Zur Herstellung des Bindungspuffers für das Phagen-Display und den Bindungsassay wurde zu einem Glycin-HCl-Puffer 0,1 % Tween 20 gegeben.

Waschpuffer

Zur Herstellung des Waschpuffers für das Phagen-Display und den Bindungsassay wurde zu einem Glycin-HCl-Puffer 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % oder 0,5 % Tween 20 gegeben.

Elutionspuffer

Glycin-NaOH 0,2 M

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH auf pH 10 eingestellt.

PEG-NaCl

PEG-6000 20 %

NaCl 2,5 M

Die Präzipitationslösung wurde sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße).

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)

IPTG 20 mg mL⁻¹

IPTG wurde in ddH₂O gelöst.

5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)

X-Gal 200 mg mL⁻¹

X-Gal wurde in DMSO gelöst.

Tetracyclin

Tetracyclin 20 mg mL⁻¹

Tetracyclin wurde in Ethanol gelöst.

Mineralisationslösung

ZrOCl ₂ ·8H ₂ O	2 - 500 mM
Ethanol	80 Vol % oder 90 Vol %
ddH ₂ O	20 Vol % oder 10 Vol %

Zirkonylchlorid Octahydrat (ZrOCl₂·8H₂O) wurde bei Zimmertemperatur (ZT) in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch mit 80 Vol % bzw. 90 Vol % Ethanol gelöst.

5.1.10 Medien

LB-Nährmedium

Trypton	10 g L ⁻¹
Hefeextrakt	5 g L ⁻¹
Natriumchlorid	5 g L ⁻¹

Die Substanzen wurden in ddH₂O gelöst, autoklaviert und bei Zimmertemperatur (ZT) gelagert.

Agar-Nährboden

Agar-Agar Kobe I	16 g L ⁻¹
------------------	----------------------

Agar-Agar Kobe I wurde in LB-Medium gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde das Medium entweder mit Tetracyclin (20 µg mL⁻¹) oder mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, 20 mg L⁻¹) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, 200 mg L⁻¹) versetzt und in Petrischalen gegossen.

5.2 Arbeiten mit Bakterien und M13-Bakteriophagen

5.2.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien

Escherichia coli (*E. coli*) ER2738-Bakterien wurden zur Amplifikation von M13-Bakteriophagen (kurz: Phagen) eingesetzt.

5.2.1.1 Vereinzelausstrich

Um *E. coli*-Einzelkolonien zu gewinnen, wurde ein Vereinzelausstrich der Bakterien auf einem LB-Tetracyclin-Agar-Nährboden vorgenommen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Monatlich wurde eine Einzelkolonie auf einem neuen Nährboden ausgestrichen.

5.2.1.2 Übernachtskultur

Zum Ansetzen einer Übernachtskultur wurde eine Einzelkolonie *E. coli* ER2738 in 20 mL LB-Medium gegeben und bei 37 °C mit 250 „revolutions per minute“ (rpm) circa 16 h inkubiert.

5.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen für die DNA-Transformation wurden mit der Calcium-Chlorid Methode hergestellt. LB-Medium wurde mit einer Übernachtskultur (1:100) angeimpft und 2,5 h bei 37 °C mit 170 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Durch Zentrifugation (5 min, 1811 x g, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und in 20 mL frisch aufgetauter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen nochmals pelletiert und in 5 mL 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert.

5.2.1.4 Transformation

Die Hitzeschocktransformation dient dem Einbringen einer Plasmid-DNA in eine Bakterienzelle. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die genetisch modifizierte Phagen-DNA in *E. coli*-Zellen eingeschleust. Zur Hitzeschocktransformation wurden 60 µL chemisch kompetente Zellen mit 5 µL Ligationsansatz (s. 5.3.6) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 s bei 42 °C inkubiert und direkt danach für 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL vorgewärmtem LB-Medium (37 °C) wurde der Ansatz 60 min bei 37 °C mit 60 rpm im Thermomixer inkubiert. Die Zellen wurden in verschiedenen Verdünnungen mit einer 200 µL *E. coli*-Suspension in der mid-log-Phase vermischt und auf LB-X-Gal-IPTG-Agarplatten ausplattiert.

5.2.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Bakterien

5.2.2.1 Adhäsion von *S. aureus* auf verschiedenen Oberflächen

Die Adhäsion von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) SA113 wurde von Peter Popella (Institut für Mikrobielle Genetik, Universität Tübingen) nach dem in Schuster *et al.*^[183] beschriebenen Verfahren auf verschiedenen Oberflächen untersucht. Dieses wird im Folgenden kurz beschrieben. Es wurden *S. aureus* Bakterien eingesetzt, die das rot-fluoreszierende Protein mCherry vom Plasmid pC-tuf-ppmCh exprimieren.^[184] Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C mit 140 rpm in Trypton-Soja-Bouillon (engl.: Tryptic Soy Broth, TSB) kultiviert. Frisches Medium wurde mit der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte $OD_{578} = 1,0$ inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Bakterien mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: Phosphate buffered saline, PBS) wurden die Bakterien in PBS (pH 7,4) suspendiert. Die Bakterienkultur wurde auf eine OD_{578} von 1,0 eingestellt.

Die zu untersuchenden Oberflächen, Schichten aus ZrBM, Phagentemplate und SiO₂-Schichten wurden in sterilen 12 Well CELLSTAR Zellkultur Multiwell Platten (Greiner bio-one, Frickenhausen) mit 4 mL Bakteriensuspension inkubiert. Während der Inkubation von 1 h bei 37 °C mit 140 rpm konnten die Bakterien an den Probenoberflächen adhärieren. Anschließend wurden die Proben dreimal mit ddH₂O gewaschen, an Luft getrocknet und durch Fluoreszenzmikroskopie (s. 5.10.13) charakterisiert.

5.2.3 M13-Bakteriophagen

5.2.3.1 Phagen Amplifikation

Zur Amplifikation von M13KE Phagen wurde eine *E. coli* ER2738-Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium verdünnt und mit Phagen aus einem Plaque oder aus einer Phagensuspension infiziert. Die Kultur wurde bei 37 °C mit 250 rpm für 4,5 h oder über Nacht inkubiert. Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation entfernt (9790 x g; 4 °C; 15 min). 80 % des Überstandes wurden mit 1/6 des Volumens mit PEG-NaCl Lösung gemischt und für eine Stunde bei 4 °C inkubiert, um die Phagen zu präzipitieren. Anschließend wurden die Phagen pelletiert (9790 x g; 4°C; 15 min) und in TBS-Puffer (pH 7,3) resuspendiert. Für eine höhere Reinheit der Phagen wurde eine zweite Präzipitation angeschlossen. Für den Einsatz als Biotemplat (s. 5.7) wurden die Phagen nach der zweiten Präzipitation in ddH₂O resuspen-

diert. Bei der Amplifikation im Phagen-Display (s. 5.4.3) und für die Anwendung beim Bindungsassay (s. 5.5) wurden die Phagen in TBS-Puffer (pH 7,3) resuspendiert.

5.2.3.2 Phagen Titerbestimmung

a) Spotttest

Ein Spotttest wird durchgeführt, um eine geeignete Verdünnungsstufe für den Plaque-Test (siehe b) zu ermitteln. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Phagensuspension in LB-Medium erstellt. Vorgewärmtes Top-Agar (47 °C) wurde mit 1:100 Volumen *E. coli* ER2738-Kultur in der mid-log-Phase vermischt und auf einem LB-X-Gal-IPTG-Agar-Nährboden ausplattiert. Nach dem Trocknen der Platten mit den ausplattierten Bakterien wurden 10 µL jeder Verdünnungsstufe der Phagensuspension auf den Nährboden pipetiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch die Anwesenheit von X-Gal und IPTG bilden Phagen blaue Plaques auf einer Bakterienkultur. Grund hierfür ist das *lacZα*-Gen im M13KE Phagen genom, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert. IPTG induziert die Expression der β -Galactosidase. Dieses Enzym setzt X-Gal in einen blauen Farbstoff um. Eine Verdünnungsstufe, bei der einzelne Plaques zu sehen sind, eignet sich für die Bestimmung des genauen Phagentiters mittels Plaque-Test.

b) Plaque-Test

Der Plaque-Test ist die Methode zur genauen Bestimmung des Phagentiters. Mit der Phagensuspension wurde eine Verdünnungsreihe in LB-Medium erstellt. 10 µL einer Verdünnungsstufe, bei der zwischen 20 und 200 Plaques gebildet werden (kann über Spotttest ermittelt werden), wurde mit vorgewärmtem Top-Agar (47 °C) und 1:100 Volumen *E. coli* ER2738-Kultur in der mid-log-Phase vermischt und auf LB-X-Gal-IPTG-Agarplatten ausplattiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden die gebildeten Plaques ausgezählt und der Phagentiter unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe über

$$\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} = \frac{\text{Anzahl gebildeter Plaques (pfu)}}{0,01 \text{ mL-Verdünnungsstufe}} \quad (22)$$

berechnet. Zur Titerbestimmung wurden jeweils drei Platten ausgewertet. Dabei wurden zwei verschiedene Verdünnungsstufen mit mindestens 20 – 200 Plaques ausgewertet. Die stärker verdünnte Phagensuspension wurde doppelt ausplattiert.

c) UV-Vis-Spektralphotometrie

UV-Vis-Spektralphotometrie ist eine schnelle Methode zur Ermittlung des Phagentiters. Die Methode basiert auf der Adsorption von Licht durch Proteine und DNA. Phagen bestehen zu 88 % aus Proteinen und zu 12 % aus DNA.^[185] Proteine haben ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, die DNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm.^[186] Das Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 269 nm (A_{269}) aufgrund der Absorption durch Proteine und DNA. Der Einfluss durch Lichtstreuung an Phagen oder Verunreinigungen wird durch die Absorption bei 320 nm (A_{320}) berücksichtigt. Bei dieser Wellenlänge absorbieren Phagen nicht. Die Phagenkonzentration kann nach Day und Wiseman^[187] über

$$\frac{\text{Phagen}}{\text{mL}} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \cdot 10^{16}}{\text{Anzahl Basen des Phagen-genoms}} \quad (23)$$

berechnet werden.

5.3 DNA-Techniken

5.3.1 Phagen-DNA-Isolierung

Zur Phagen-DNA-Isolierung wurden Phagensuspensionen ausplattiert. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe in LB-Medium erstellt. 10 μL einer Verdünnungsstufe, bei der zwischen 20 und 200 Plaques gebildet werden (kann über Spotttest ermittelt werden), wurden mit vorgewärmtem Top-Agar (47 °C) und 1:100 Volumen *E. coli* ER2738-Kultur in der mid-log-Phase vermischt, auf LB-X-Gal-IPTG-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone wurden gepickt und in LB-Medium mit *E. coli* ER2738-Übernachtskultur (Verhältnis 1:100) bei 37 °C mit 250 rpm für 4,5 h oder über Nacht amplifiziert. Nach der Amplifikation wurde die Phagen-DNA mit dem Zyppy Plasmid Miniprep Kit oder dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (C-Line) nach Herstellerangaben isoliert. Die wesentlichen Schritte für die DNA-Isolierung werden im Folgenden kurz beschrieben. Sie gelten für die Isolierung mit beiden Kits. Zunächst wurden die Bakterien durch Zentrifugation (1 min, 20817 x g) pelletiert und der Überstand entfernt. Nach Resuspension in Lösung I/RNase A (peqGOLD) oder in Wasser (Zyppy) wurden die Bakterien durch alkalische Lyse aufgeschlossen und anschließend neutralisiert. Durch Zentrifugation wurden Zellrückstände entfernt. Der Überstand wurde in eine Säule mit Silikamembran überführt. Bei

einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte das Lysat die Silikamembran passieren, die DNA band an die Membran. In gebundenem Zustand wurde die DNA in zwei bis drei Waschschritten mit verschiedenen Waschpuffern gereinigt. Zellrückstände und Kontaminationen wurden entfernt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation getrocknet und mit 40 bzw. 50 μL ddH₂O eluiert.

5.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde mittels UV-Vis-Spektralphotometer (NanoDrop) bestimmt. Dabei wurde die DNA-Absorption bei 260 nm gemessen. Das Probenvolumen betrug 1 μL . Das Absorptionsverhältnis 260 nm/280 nm gab zusätzlich Auskunft über die Reinheit der DNA-Lösung. Bei einem Verhältnis von 1,8 gilt die Lösung als rein. Kleinere Werte zeigen eine Verunreinigung durch Proteine an. Die Analyse der DNA-Konzentration wurde in Zweifachbestimmung durchgeführt.

5.3.3 Inverse Polymerase-Kettenreaktion

Um die ZrO₂-Bindepeptide *ct5-1* (SLLGQTP), *c5-1* (GSLSRFI) und *ct5-2* (GQSEKHL) als pVIII-Fusionsprotein auf der Oberfläche von M13 Phagen zu präsentieren, wurden die Phagen genetisch modifiziert. Mittels inverser Polymerase-Kettenreaktion (iPCR) wurde die DNA-Sequenz der Bindepeptide an das N-terminale Ende des Haupthüllprotein kodierenden Gens *gVIII* inseriert (s. Abbildung 19). Der Reaktionsansatz für die Insertion der Peptid-DNA von *ct5-1*, *c5-1* und *ct5-2* mittels iPCR ist in den Tabellen 4-6 dargestellt. Neben dem Phagen-Templat und den Primern, die die Insertsequenz tragen (s. 5.1.5), wurden Nukleotide (Desoxynukleosidtriphosphat, dNTP), eine DNA-Polymerase zur Verknüpfung der Nukleotide sowie ein geeigneter Reaktionspuffer benötigt. Die Insertion und gleichzeitige Vervielfältigung der DNA fand durch ein gezieltes Temperaturprogramm in einem Mastercycler gradient statt. Die einzelnen Temperaturschritte sind in Tabelle 7 aufgelistet. Im ersten Schritt wurde das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt, um die DNA in Einzelstränge aufzutrennen (Denaturierung). Anschließend fand bei 55 °C die Primeranlagerung an die komplementäre DNA-Sequenz der Phagen-DNA statt (Annealing) (Abbildung 13 in 4.6.1). Ausgehend von den Primern wurde die doppelsträngige DNA durch die Verknüpfung von Nukleotiden gebildet. Dieser Elongationsschritt wurde bei 72 °C durch die DNA-

Polymerase katalysiert. Die neugebildete doppelsträngige DNA mit Insertsequenz diente bei einem weiteren Zyklus, beginnend bei der Denaturierung, als Matrize zur Bildung einer weiteren DNA-Kopie. Das Temperaturprogramm wurde mit 20 aufeinanderfolgenden Zyklen durchlaufen, um eine hohe Anzahl an DNA-Kopien zu erzielen. Um insgesamt einen höheren Anteil an modifiziertem Templat mit Insertsequenz im Vergleich zum eingesetzten Templat (M13KE) zu erhalten wurde eine zweite iPCR mit dem Reaktionsprodukt aus der ersten iPCR durchgeführt. Zuvor wurde das iPCR-Produkt über ein Agarosegel (s. 5.3.4) aufgetrennt und durch Gelextraktion (s. 5.3.5) aufgereinigt.

Tabelle 4: iPCR-Reaktionsansatz zur Insertion der DNA-Sequenz, die das Peptid *ct5-1* (SLLGQTP) kodiert.

Komponente	eingesetzte Konzentration	zugeführtes Volumen (μL)
ddH ₂ O	-	33,5
DNA-Templat (M13KE)	50 ng μL^{-1}	2
dNTP Mix	10 mM	2,5
FW- und RV-Primer	0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	je 3
10X PfuUltra II Reaktionspuffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	5
PfuUltra II Fusion HS DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	1

Tabelle 5: iPCR-Reaktionsansatz zur Insertion der DNA-Sequenz, die das Peptid *c5-1* (GSLSRFI) kodiert.

Komponente	eingesetzte Konzentration	zugeführtes Volumen (μL)
ddH ₂ O	-	35,5
DNA-Templat (M13KE)	30 ng μL^{-1}	2
dNTP Mix	10 mM	2,5
FW- und RV-Primer	0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	je 2
10X PfuUltra II Reaktionspuffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	5
PfuUltra II Fusion HS DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	1

Tabelle 6: iPCR-Reaktionsansatz zur Insertion der DNA-Sequenz, die das Peptid *ct5-2* (GQSEKHL) kodiert.

Komponente	eingesetzte Konzentration	zugeführtes Volumen (μL)
ddH ₂ O	-	35,5
DNA-Templat (M13KE)	30 ng μL^{-1}	2
dNTP Mix	10 mM	2,5
FW- und RV-Primer	0,1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	je 2
10X PfuUltra II Reaktionspuffer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	5
PfuUltra II Fusion HS DNA-Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)	-	1

Tabelle 7: Protokoll zur Durchführung der iPCR mittels Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg)

Schritt	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	45 s
3	Annealing	55 °C	30 s
4	Elongation	72 °C	3 min 40 s
5	19 Zyklen (beginnend bei Schritt 2)		
6	Finale Elongation	72 °C	7 min
7	Kühlung	8 °C	∞

5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die iPCR-Produkte wurden über ein 0,7 % Agarosegel aufgetrennt. Es wurde eine Spannung von 90 V angelegt, die Laufzeit variierte zwischen 100 min und 120 min. Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde das Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Peqgreen (VRW) angefärbt. Vor dem Beladen des Gels wurde das iPCR-Produkt mit 6X DNA-Loading Dye vermischt, um die Lauffront verfolgen zu können (Thermo Scientific). Ein DNA-Größenstandard Gene Ruler 1 kb Plus (Thermo Scientific) diente der Zuordnung der DNA-Fragmente.

5.3.5 DNA-Isolierung aus Agarosegel

Zur Isolierung der Phagen-DNA aus dem Agarosegel, wurde die Bande bei circa 7200 bp unter UV-Licht ausgeschnitten. Die DNA von M13KE-Phagen besteht aus 7222 Basenpaaren (ohne Insertsequenz)(s. 5.1.7). Mit einem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit wurde die DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dazu wurde die ausgeschnittene Bande mit dem zweifachen Volumen an Gelauflösungspuffer versetzt, um die Agarose bei 55 °C aufzulösen. Die erhaltene DNA-Lösung wurde in eine Zymo-Spin-Säule überführt. Zur Bindung der DNA an die Säulenmembran folgte ein Zentrifugationsschritt. Anschließend wurde die DNA zweimal mit DNA-Waschpuffer gereinigt. Nach dem Trocknen durch Zentrifugation wurde die DNA mit 10 – 25 µL ddH₂O eluiert und die Konzentration mit einem UV-Vis-Spektralphotometer bestimmt.

5.3.6 Ligation

Durch Ligation wurde das lineare iPCR-Produkt enzymkatalysiert zu einer zirkulären doppelsträngigen (engl.: double stranded, ds) DNA verknüpft. Vor der Ligation wurden die aufgereinigten iPCR-Produkte für 10 min bei 65 °C inkubiert, um vorhandene Multimere aufzuschmelzen. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde 10X T4-DNA-Ligase-Puffer (Thermo Scientific) und 1 µL T4-DNA-Ligase zugegeben. Der Ligationsansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes und die eingesetzte Menge an linearem iPCR-Produkt sind in Tabelle 8 für die einzelnen modifizierten Template aufgelistet. Die unterschiedlichen Mengen an linearem iPCR-Produkt resultierten aus unterschiedli-

chen Konzentration der iPCR-Produkte und den eingesetzten Volumen (17 μL bzw. 8 μL) im Ligationsansatz.

Tabelle 8: Reaktionsansätze zur Ligation der linearen iPCR-Produkte. Die linearen iPCR-Produkte stellen modifizierte Phagen-Template dar, die die DNA-Sequenz der Peptide *ct5-1*, *c5-1* und *ct5-2* am N-terminalen Ende des Gens *gVIII* tragen. Die jeweils eingesetzte Menge an linearem iPCR-Produkt sowie das Volumen des Ligationsansatzes sind dargestellt. Die unterschiedlichen Mengen an linearem iPCR-Produkt resultierten aus unterschiedlichen Konzentration der iPCR-Produkte und den eingesetzten Volumen (17 μL bzw. 8 μL) im Ligationsansatz.

Peptid	Menge lineares iPCR-Produkt (ng)	Volumen Ligationsansatz (μL)
<i>ct5-1</i> SLLGQTP	216	20
<i>c5-1</i> GSLSRFI	264	10
<i>ct5-2</i> GQSEKHL	448	20

5.3.7 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung der Phagen-DNA wurden Konzentrationen von 50 - 80 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ verwendet. Die Konzentrationen wurden mit einem UV-Vis-Spektralphotometer bestimmt. Die Sequenzierung der DNA erfolgte mit einem Standardprimer -96 *gIII* (10 $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$) (5.1.5) durch GATC Biotech AG, Konstanz.

5.4 Phagen-Display

Mittels Phagen-Display wurden Peptide isoliert, die eine spezifische Bindung mit ZrO_2 eingehen. Das Phagen-Display wurde auf die Selektion der Bindepeptide bei pH 2 angepasst. Für dieses neu eingeführte saure Phagen-Display (engl.: acidic Phage-Display, aPhD) musste die Stabilität der Phagen bei niedrigem pH getestet sowie optimale Elutionsbedingungen etabliert werden.

5.4.1 Stabilität der Phagen

Die Phagen-Stabilität wurde bei niedrigem pH im Bindungspuffer und vergleichend dazu im Elutionspuffer des Phagen-Displays (5.4.3) untersucht. Hierfür wurden die Phagen ($1,4 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹) im Bindungs- bzw. Elutionspuffer für 1 h bzw. 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Phagentiter über einen Plaque-Test ausgewertet. Als Kontrolle diente die Inkubation in TBS-Puffer bei pH 7,3.

5.4.2 Elution

Bei der Elution werden Phagen, die bei pH 2 an ein Substrat binden, durch pH-Wert-Änderung vom Substrat gelöst. Um einen geeigneten pH-Wert zu identifizieren, bei dem die gebundenen Phagen vollständig gelöst werden, wurde der pH-Wert im Elutionsschritt sowie die Elutionszeit systematisch variiert und das Eluat auf vorhandene Phagen untersucht. Hierfür wurden Phagen an ein Substrat gebunden. Ein gereinigtes *t*-ZrO₂-Substrat wurde mit $2 \cdot 10^{11}$ Phagen im Bindungspuffer eine Stunde bei 25 °C inkubiert. Nicht gebundene Phagen wurden durch zehnmaliges Waschen der Substrate mit Waschpuffer (0,1 % Tween 20) entfernt. Zur Elution der gebundenen Phagen wurden unterschiedliche Puffer im pH-Bereich von 7,3 bis 10,0 getestet. Neben einem TBS-Puffer mit pH 7,3 und 8,8 wurde ein Glycin-NaOH-Puffer mit pH 10,0 verwendet. Die Substrate wurden für 30 min oder 1 h im Elutionspuffer mit 30 rpm im Rotationsmischer inkubiert. Der approximative Phagentiter im Eluat wurde über einen Spotttest ermittelt.

5.4.3 Phagen-Display bei niedrigem pH-Wert

Zur Selektion von ZrO₂-Bindepeptiden wurde eine 7-mer Peptidbibliothek (Ph.D.-7, New England Biolabs) mit $1,28 \cdot 10^9$ Peptidvarianten eingesetzt. Die Peptide waren am Hüllprotein pIII von M13-Bakteriophagen präsentiert. Als Substrate wurden *t*-ZrO₂ und *c*-ZrO₂ in zwei separaten Selektionsexperimenten verwendet. Die Substrate wurden nach Raubung *et al.*^[188] mit aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten in ddH₂O, Aceton über Nacht, Ethanol für zwei Stunden und nochmals mit ddH₂O gereinigt. Anschließend wurden die Substrate eine Stunde bei 4 °C in Blocking-Puffer mit 10 rpm im Rotationsmischer inkubiert und zehnmal mit Waschpuffer (0,1 % Tween 20) gewaschen. Im Bindungsschritt wurden die Substrate mit $2 \cdot 10^{11}$ Phagen im Bindungspuffer eine Stunde bei 25 °C inkubiert.

Nicht gebundene Phagen wurden durch zehnmaliges Waschen der Substrate mit Waschpuffer entfernt. Spezifisch gebundene Phagen wurden durch Inkubation im Elutionspuffer (pH 10) für 2 h bei 25 °C eluiert. Die eluierten Phagen wurden in *E. coli* ER2738 amplifiziert und anschließend gereinigt. In der nachfolgenden Biopanning-Runde wurden ebenfalls $2 \cdot 10^{11}$ Phagen eingesetzt. Insgesamt wurden fünf Biopanning-Runden durchgeführt. In den nachfolgenden Biopanning-Runden wurde der Tween-Gehalt im Waschpuffer kontinuierlich von 0,1 % auf 0,5 % erhöht. In der ersten, zweiten und dritten Runde waren es 0,1 %, 0,2 % und 0,3 %, in der vierten und fünften Runde 0,5 %. Nach der vierten und fünften Selektionsrunde wurden 20 und 30 Klone isoliert (s. 5.3.1) und sequenziert (s. 5.3.7). Mit beiden Substraten wurden je zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

5.5 Bindungsassay

Mit Hilfe eines Bindungsassays wurde die Bindungsstärke der beim Phagen-Display am häufigsten isolierten Phagenklone an *c*-ZrO₂ untersucht. Die Phagenklone wurden in *E. coli* amplifiziert, gereinigt und in TBS-Puffer (pH 7,3) resuspendiert (5.2.3.1). Anschließend wurde die Phagenkonzentration über einen Plaque-Test bestimmt. Pro Phagenklon wurde ein ZrO₂-Substrat mit $2 \cdot 10^{11}$ Phagen im Bindungspuffer bei 25 °C für eine Stunde inkubiert. Als Referenz wurde die Bindung mit nicht modifizierten Wildtyp-Phagen durchgeführt. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer (0,5 % Tween 20) wurden die gebundenen Phagen im Elutionspuffer 2 h eluiert. Der Phagentiter im Eluat wurde mittels Plaque-Test ermittelt. Er korrelierte direkt mit der Bindungsstärke. Die Bindungsstärke wurde auf die M13 wt-Referenz normiert. Pro Phagenklon und Referenz wurden zwei unabhängige Bindungsassays durchgeführt.

5.6 Reinigung und Oberflächenmodifikation von Substraten

Zur Herstellung dünner Schichten aus Zr-basiertem Material wurden hydrophile, B-dotierte Si(100)-Substrate eingesetzt. Für die Ermittlung der Abscheiderate von Zr-basiertem Material auf Einzelphagen waren hydrophobe Substrate erforderlich. Hierfür wurden sowohl rein organische Substrate wie Ethylen-Tetrafluorethylen-Copolymer (ETFE) und Polyethylenterephthalat (PET), als auch hydrophobe, oberflächenmodifizierte Si-Wafer verwendet. Für die Oberflächenmodifikation wurden Schichten aus 1,1,1,3,3,3-

Hexamethyldisilazan (HMDS) sowie selbstorganisierende Monoschichten (engl.: self-assembled monolayer, SAM) aus 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorodecyltriethoxysilan (FDTS) aufgebracht. Im Folgenden werden die Reinigungsprozeduren und Oberflächenmodifikationen der verschiedenen Substrate beschrieben.

5.6.1 Reinigung von Si-Substraten

Die Si-Substrate wurden jeweils 10 min in ddH₂O und Aceton:Ethanol (1:1) im Ultraschallbad gereinigt. Zur Hydrophilisierung der Substratoberflächen wurde eine Sauerstoffplasma-Behandlung für 10 min bei 30 W durchgeführt. Es folgte eine letzte Reinigung in ddH₂O für 10 min im Ultraschallbad. Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Substrate mit dem bereits bei der Reinigung eingesetzten Lösungsmittel gespült und mit einem Stickstoffstrom getrocknet.

5.6.2 Reinigung von ETFE-Substraten

ETFE-Substrate wurden 10 min in Aceton:Ethanol (1:1) im Ultraschallbad gereinigt.^[189] Nach dem Spülen mit Aceton:Ethanol (1:1) folgte das Trocknen der Substrate mit einem Stickstoffstrom.

5.6.3 Reinigung von PET-Substraten

PET-Substrate wurden jeweils 10 min in Isopropanol und ddH₂O im Ultraschallbad gereinigt.^[190] Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Substrate mit dem jeweils eingesetzten Lösungsmittel, Isopropanol oder Wasser, gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

5.6.4 Oberflächenmodifikation – HMDS

Die Oberflächenmodifikation von Si-Wafern mit HMDS wurde nach Roos *et al.*^[191] durchgeführt. Dazu wurden Si-Wafer wie in 5.6.1 beschrieben gereinigt. Anschließend wurde je 1 mL HMDS in ein Glasgefäß gefüllt und die gereinigten Si-Wafer an den Glasrändern befestigt, so dass kein direkter Kontakt zwischen Si-Wafer und Flüssigkeit möglich war. Das Glasgefäß wurde verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Nach 15 h Inkubationszeit wurde der modifizierte Si-Wafer umgedreht in ein Gefäß mit ddH₂O gelegt und für 10 min bei 75 °C mit Ultraschall behandelt. Dabei wurden physisorbierte HMDS-Moleküle

gelöst.^[192] Nachfolgend wurden die Wafer mit ddH₂O gespült und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

5.6.5 Oberflächenmodifikation – FDTS

In Anlehnung an Ma *et al.*^[193] wurden SAMs aus FDTS mittels Gasphasenabscheidung auf Si-Wafer aufgebracht. Gereinigte Si-Wafer (4 x 4 mm²) wurden am Deckel eines Exsikkators befestigt. Nachdem 15 µL FDTS auf den Boden des Exsikkators getropft wurden, wurde ein Vakuum von 50 mbar erzeugt. Das Verdampfen von FDTS unter Vakuum ermöglichte die SAM-Bildung auf der Si-Oberfläche. Nach der Gasphasenabscheidung über Nacht wurden die modifizierten Si-Wafer umgedreht in ein Gefäß mit Ethanol gelegt und für 10 min bei 75 °C im Ultraschallbad behandelt. Dabei wurden physisorbierte FDTS Moleküle gelöst.^[192,194] Nachfolgend wurden die Wafer mit Ethanol gespült und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

5.7 Biotemplate

Modifizierte und nicht modifizierte Phagen wurden als Biotemplat zur Mineralisation von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) eingesetzt. Zur Bestimmung der Abscheiderate wurden Einzelphagen mineralisiert. Schichten aus ZrbM wurden auf einer ausgerichteten Phagenschicht abgeschieden. In den nächsten zwei Abschnitten werden die Immobilisierung von Einzelphagen auf einem Substrat und die Generierung ausgerichteter Phagenschichten beschrieben.

5.7.1 Einzelphagen

Zur Immobilisierung von Einzelphagen wurden 1,5 µL einer wässrigen Phagensuspension auf einen gereinigten Si-Wafer (4 x 4 mm²) oder einen FDTS modifizierten Si-Wafer (4 x 4 mm²) getropft und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Die Phagenkonzentration betrug 1,0·10¹⁰ pfu mL⁻¹. Anschließend wurden die Proben in 70 % Ethanol getaucht, um Salzkrückstände zu entfernen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet.

5.7.2 Ausgerichtete Phagenschichten

Ausgerichtete Phagenschichten wurden durch „Convective Assembly“ wie in Atanasova *et al.*^[195] beschrieben generiert. Suspendierte Wildtyp (wt)-Phagen wurden mit einer Zuggeschwindigkeit von $0,6 \text{ mm min}^{-1}$ auf einem gereinigten Si-Wafer ($10 \times 10 \text{ mm}^2$) ausgerichtet. Die Temperatur betrug $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit $36 \pm 1 \%$. Pro Substrat wurden $3 \mu\text{L}$ Phagensuspension eingesetzt. Für Biotemplate aus wt-Phagen auf der polierten Seite des Si-Wafers wurde eine Phagenkonzentration von $2,0 \cdot 10^{13} \text{ pfu mL}^{-1}$ gewählt, für die unpolierte Seite eine Konzentration von $9,8 \cdot 10^{13} \text{ pfu mL}^{-1}$.

5.8 Mineralisation

Für die Mineralisation von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) wurde eine Zirkonylchlorid Octahydrat-Lösung ($\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch mit 80 Vol % Ethanol verwendet.

5.8.1 Stabilität immobilisierte Phagen in Mineralisationslösungen

Vor der Mineralisation immobilisierter Phagen wurden die Phagen auf ihre Stabilität in der Mineralisationslösung und im Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch untersucht. Hierzu wurden immobilisierte Phagen für 1 min im Lösungsmittelgemisch oder für 5 min in der Mineralisationslösung inkubiert. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurden die Proben mittels AFM untersucht.

5.8.2 Einzelphagen-Mineralisation

Zur Mineralisation immobilisierter Phagen wurden die Proben in 1 mL Mineralisationslösung für 5 min oder 90 min bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit Ethanol/Wasser-Mischung (80 Vol % Ethanol) wurden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet.

5.8.3 Schichtmineralisation auf ausgerichteten Phagenschichten

Zur Mineralisation von Schichten aus ZrbM wurden ausgerichtete Phagenschichten auf einem Si-Wafer in 1 mL Mineralisationslösung für 5 min bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach gründli-

chem Spülen mit Ethanol/Wasser-Mischung (80 Vol % Ethanol) wurden die Proben im Stickstoffstrom getrocknet. Diese Schritte beschreiben einen Mineralisationszyklus. Zur Herstellung homogener Schichten mit unterschiedlichen Schichtdicken wurden 20 und 41 Mineralisationszyklen durchgeführt.

5.9 Kalzinieren

Die mineralisierten Schichten aus ZrbM wurden bei 550 °C und 900 °C für 4 h in einem Muffelofen (Nabertherm Logotherm L5 S17) an Luft kalziniert. Die Heizrate betrug 3,5 K min⁻¹.

5.10 Charakterisierungsmethoden

5.10.1 Dynamische Lichtstreuung

Partikelgrößen in der Mineralisationslösung wurden mittels dynamischer Lichtstreuung an einem ZETASIZER 3000 HSA mit einem He-Ne Laser ($\lambda = 633$ nm) gemessen. Das gestreute Licht wurde unter einem Winkel von 90° detektiert. Die Mineralisationslösungen wurden in einer 1,5 mL UV-Küvette analysiert. Die Temperatur wurde über einen temperierten Küvettenhalter konstant gehalten. Insgesamt wurden 30 Messpunkte in Abständen von 128 s bzw. 256 s (alternierend) aufgenommen. Jeder Messpunkt stellte den Mittelwert aus 10 Einzelmessungen dar. Die mittlere Partikelgröße sowie die intensitäts- und anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung wurden mit der Software PCS v1.52 (Malvern Instruments) berechnet. Hierfür waren der Brechungsindex der Partikel und des Lösungsmittels sowie die Viskosität des Lösungsmittels erforderlich. Für das Lösungsmittel, Wasser-Ethanol (80 Vol % Ethanol), wurden die Werte von reinem Ethanol verwendet. Bei 25 °C weist Ethanol einen Brechungsindex von 1,36^[196] und eine Viskosität von 1,1 mPa·s^[196] auf. Für die Partikel wurde der Brechungsindex von ZrO₂ eingesetzt mit einem Realteil von 2,16^[196] und einem Imaginärteil von 0,1^[196].

5.10.2 Zetapotentialmessung von Schichten und Substraten

Das Zetapotential von mineralisierten Schichten, Si-Substraten sowie *c*- und *t*-ZrO₂-Substraten wurde mit einem elektrokinetischen Messgerät zur Oberflächenanalyse (Sur-

PASS, Anton Paar) ermittelt. Für die Messung wurden zwei Proben der Größe $10 \times 10 \text{ mm}^2$ an der einstellbaren Spaltmesszelle fixiert. Der Spaltabstand betrug $100 \text{ }\mu\text{m}$. Gemessen wurde in 10 mM NaCl über einen pH-Bereich von 2 bis 9. Der pH-Wert wurde durch automatische Titration einer $0,1 \text{ M HCl}$ -Lösung eingestellt. Vor und während der Messung wurde die Elektrolytlösung mit N_2 gespült, um das Lösen von CO_2 aus der Atmosphäre zu verhindern. Für jeden pH-Schritt wurde das Zetapotential aus vier Einzelmessungen ermittelt. Dabei wurde die Fairbrother-Mastin-Berechnung^[197] verwendet. Der maximale Strömungsdruck betrug 400 mbar . Pro Schicht bzw. Substrat wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt.

5.10.3 Zetapotentialmessung von Partikeln und Phagen

Das Zetapotential von Phagen, mineralisierten Partikeln aus ZrbM und kommerziell erhältlichen *c*- ZrO_2 und *t*- ZrO_2 Partikeln wurde mit einem Zetasizer Nano (Malvern) in gefalteten Kapillarzellen (DTS1070) bestimmt. Gemessen wurde jeweils in 10 mM NaCl . Die Phagen wurden in Elektrolytlösung mit variierendem pH-Wert von 2,5 bis 6,1 suspendiert. Die Phagenkonzentration betrug $10^{11} \text{ pfu mL}^{-1}$. Mineralisierte Partikel aus ZrbM wurden aus der Mineralisationslösung abzentrifugiert (10 min , $20817 \times g$). Nach dem Resuspendieren in einer Ethanol/Wasser-Mischung ($80 \text{ Vol } \% \text{ Ethanol}$) folgte ein weiterer Zentrifugationschritt (10 min , $20817 \times g$). Für die Zetapotentialmessung wurden die Partikel in Elektrolytlösung mit pH-Werten im Bereich von 2,4 bis 9,8 resuspendiert. Kubische und tetragonale ZrO_2 -Partikel wurden ebenfalls in Elektrolytlösung mit variierendem pH-Wert zwischen 2,5 und 7,5 suspendiert. Eine Ultraschallbehandlung von 10 min wurde durchgeführt, um vorhandene Agglomerate zu lösen. Der pH-Wert wurde anschließend nochmals überprüft und gegebenenfalls durch Zugabe einer HCl- oder NaOH-Lösung korrigiert.

Für die Zetapotentialmessungen wurden mindestens 12 Einzelmessungen bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Pro pH-Wert wurden zwei unabhängige Proben charakterisiert. Zur Auswertung wurde der Smoluchowsky-Ansatz^[198] verwendet.

5.10.4 Thermogravimetrie/Dynamische Differenzkalorimetrie

Mittels simultaner Thermogravimetrie (TG) und Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) wurde das Mineralisationsprodukt in einem STA 449C Jupiter von Netzsch thermisch un-

tersucht. Die Messungen wurden von Dr. Marc Widenmeyer (Institut für Materialwissenschaft, Universität Stuttgart) durchgeführt. Die Probe wurde in einem Al_2O_3 -Tiegel von $30\text{ }^\circ\text{C}$ auf $1200\text{ }^\circ\text{C}$ in reiner O_2 -Atmosphäre erhitzt. Die Heizrate betrug 5 K min^{-1} bei der bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ mineralisierten Probe und 10 K min^{-1} bei den bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ mineralisierten Proben. Als Referenz diente ein leerer Al_2O_3 -Tiegel. In Kombination mit einem Massenspektrometer wurden ionisierte Abgangsprodukte analysiert. Für die Probenpräparation wurde eine 20 mM ZrOCl_2 -Ethanol/Wasser-Lösung (80 Vol % Ethanol) in 1 mL Aliquoten für 10 min bei $60\text{ }^\circ\text{C}$ im Ölbad erhitzt. Eine weitere Mineralisationslösung derselben Zusammensetzung wurde fünf Tage bei $30\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Das gebildete Mineralisationsprodukt wurde abzentrifugiert (20817 x g , 10 min) und in einer Ethanol/Wasser-Mischung (80 Vol % Ethanol) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (20817 x g , 10 min) wurde der Überstand entfernt, nochmals zentrifugiert (20817 x g , 2 min) und das Mineralisationsprodukt 4 h bei $100\text{ }^\circ\text{C}$ unter Luftatmosphäre bzw. 3 Tage bei ZT getrocknet. Pro Probe wurden circa 33 mg eingesetzt.

5.10.5 Flüssigkeitspyknometrie

Durch Flüssigkeitspyknometrie wurde die Dichte von Mineralisationsprodukten (ZrbM) ermittelt. ZrbM wurde $1,5\text{ h}$ bei $40\text{ }^\circ\text{C}$ oder 4 Monaten bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ mineralisiert. Anschließend wurde es abzentrifugiert (10 min , 20817 x g) und über Nacht bei ZT getrocknet.

Zur Dichtebestimmung wurde ein Glaspyknometer mit einem Volumen von $24,944\text{ mL}$ verwendet. Als Flüssigkeit wurde eine Ethanol/Wasser-Mischung (80 Vol % Ethanol) benutzt, das dem Lösungsmittel in der Mineralisationslösung entspricht. Die Dichte von ZrbM wurde über das verdrängte Volumen von Ethanol/Wasser nach Gleichung (18) bestimmt. Es wurde die Masse des leeren Pyknometers (m_0) sowie die Massen des Pyknometers gefüllt mit der Ethanol/Wasser-Mischung (m_1), gefüllt mit ZrbM (m_3) sowie gefüllt mit ZrbM und der Ethanol/Wasser-Mischung (m_4) eingesetzt. Die jeweiligen Massen wurden bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ bestimmt. Die Dichte von Ethanol/Wasser $\rho_{\text{Eth/W}}$ bei $25\text{ }^\circ\text{C}$ wurde ebenfalls über Pyknometrie bestimmt durch:

$$\rho_{\text{Eth/W}} = \frac{m_1 - m_0}{V_P}, \quad (24)$$

wobei V_P das Volumen des Pyknometers darstellt.

5.10.6 Kontaktwinkelmessung

Die statischen Wasser-Kontaktwinkel wurden mit der „sessile drop“-Methode an einem Kontaktwinkelmesssystem (G10, Krüss) gemessen. Es wurde ddH₂O bei 25 °C verwendet. Für jede Oberfläche wurden mindestens sechs Messungen durchgeführt.

5.10.7 Röntgenbeugung

Die Charakterisierung der Kristallinität mineralisierter ZrbM-Schichten und die Bestimmung der Kristallstruktur wurden mit einem Röntgendiffraktometer (SmartLab, Rigaku corporation) durchgeführt. Die Schichten wurden mit 95 Mineralisationszyklen entsprechend dem in 5.8.3 beschriebenen Verfahren hergestellt. Gemessen wurde mit Cu-K_{α1}- ($\lambda = 1,5405929 \text{ \AA}$) und Cu-K_{α2}-Strahlung ($\lambda = 1,544324 \text{ \AA}$) in Parallelstrahlgeometrie und Kreuzstrahloptik. In-plane-Messungen wurden von Mirjam Stein (Institut für Materialwissenschaft, Universität Stuttgart) im Scanbereich von $2\theta_{\chi} = 20^{\circ}$ bis 70° in $0,04^{\circ}$ -Schritten mit einem Einfallswinkel von $\Omega = 0,3^{\circ}$ durchgeführt. Der Punktdetektor befand sich bei $2\theta = 0,3^{\circ}$. Die Kristallstruktur wurde durch Abgleich der erhaltenen Beugungsmuster mit der Datenbank für anorganische Kristallstrukturen (Inorganic Crystal Structure Database (ICSD, Version 2015-1) ermittelt.

5.10.8 Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) wurde der Zirkoniumverbrauch während der Mineralisation bei ZT, 40 °C und 60 °C von Samir Hammoud (MPI für Intelligente Systeme, Stuttgart) untersucht. Dazu wurde die Mineralisationslösung in 1 mL Aliquoten aufgeteilt. Für die Mineralisation bei 40 °C oder 60 °C wurden die Lösungen im Ölbad erhitzt. Die Temperatur wurde mit einem beheizbaren Magnetprüher über einen Thermostat kontrolliert. Nach 0, 10, 50 und 90 min wurde die Mineralisation durch Abschrecken in Eis unterbrochen und das Mineralisationsprodukt durch Zentrifugation (10 min, 20817 x g) entfernt. Der Überstand wurde mit einem ICP-OES-Spektrometer (Spectro Ciros, Spectro Analytical Instruments) auf den Zr-Gehalt untersucht. Dabei wurde das Probenaerosol in ein Argon-Plasma mit einer Temperatur von 8000-10000 K gespritzt. Pro Probe wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Als Referenz diente eine wässrige ZrOCl_2 -Lösung, die bei Zimmertemperatur kein Präzipitat bildet (Nachgewiesen durch DLS-Messungen und ICP-OES-Messungen).

5.10.9 Röntgenphotoelektronenspektroskopie

XPS-Messungen (X-Ray Photoelectron Spectroscopy, Röntgenphotoelektronenspektroskopie) wurden von Michaela Wieland (MPI für Intelligente Systeme, Stuttgart) an einem Thermo VG Thetaprobe 300 durchgeführt. Gemessen wurden mit Al K_α -Strahlung ($h\nu = 1486,68 \text{ eV}$). Nach einem Übersichtsscan von 0 eV bis 1200 eV in 0,2 eV-Schritten wurden detaillierte Scans für Kohlenstoff (C1s), Sauerstoff (O1s) und Zirkonium (Zr3d) in 0,1 eV-Schritten aufgenommen. Die Passenergien betragen 200 eV für den Übersichtsscan und 100 eV für die Detailscans. Die C1s Bindungsenergie von 284,8 eV wurde als Referenz gewählt.

5.10.10 Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Zur Charakterisierung der elementaren Zusammensetzung einer mineralisierten Schicht wurden EDX-Messungen von Timotheus Jahnke (Institut für Materialwissenschaft, Universität Stuttgart) an einem Zeiss Ultra 55 mit Stickstoff gekühltem EDAX System durchgeführt.

5.10.11 Rasterkraftmikroskopie

Oberflächentopographien wurden mit einem Rasterkraftmikroskop (MultiMode™ 8, Bruker) abgebildet. Gemessen wurde im Tastmodus (engl.: tapping mode) mit einer PPP-NCHR-W Tip (Nanosensors). Die root mean square (rms)-Rauigkeit sowie die Höhe von Phagen, vor und nach der Mineralisation mit ZrbM, wurden mittels NanoScope Analysis ausgewertet. Zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit wurde das arithmetische Mittel aus der rms-Rauigkeit an mindestens drei verschiedene Probenstellen gebildet. Für die Höhenbestimmung wurden mindestens 25 verschiedene Phagen ausgewertet.

5.10.12 Rasterelektronenmikroskopie

Probenquerschnitte und -oberflächen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) (Merlin Gemini II, Zeiss) untersucht. Um eine leitfähige Oberfläche zu garantieren, wurden

die Proben mit 0,2 nm Iridium beschichtet (Leica EM ACE600). Phagentemplate wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 1 kV untersucht, anorganische Proben (Si-Substrate und Schichten aus Zirkonium-basiertem Material) mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV. Der Arbeitsabstand betrug 2-3 mm. Für die Untersuchung von Probenquerschnitten wurden die Proben auf einem 90° Probenhalter fixiert und um 8° gekippt.

5.10.13 Fluoreszenzmikroskopie

Die Adhäsion von *S. aureus* wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop (DM5500 B, Leica) mit angebrachter monochromer Digitalkamera (DCF360 FX, Leica) von Peter Popella (Institut für Mikrobielle Genetik, Universität Tübingen) evaluiert. Pro Probe wurden zehn gleichmäßig über die Probe verteilte Aufnahmen ausgewertet. Adhärirte Bakterien wurden mit der Software ImageJ quantifiziert.

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Mineralisationssystem

Um den Einfluss von ZrO₂-Bindepeptiden, präsentiert auf der Oberfläche von M13-Bakteriophagen (kurz Phagen), auf die Mineralisation von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) zu untersuchen, musste zunächst eine geeignete Mineralisationslösung etabliert werden. Diese wurde später auch zur Mineralisation von Schichten eingesetzt. Generell sind zwei Möglichkeiten der Mineralisation vorstellbar. Die Mineralisation könnte entweder durch heterogene Keimbildung auf dem Biotemplat oder durch homogene Keimbildung der anorganischen Partikeln in Lösung mit anschließender Abscheidung der gebildeten Partikel auf dem Templat stattfinden.^[9] Für beide Materialbildungsmechanismen sind sowohl für die Untersuchung des Templateinflusses, als auch für die Mineralisation von Schichten spezielle Anforderungen an die Mineralisationslösung gestellt. Zum einen sollte zur Untersuchung des Templateinflusses eine große Interaktionsfläche des anorganischen Materials mit dem nanostrukturierten Biotemplat gegeben sein. Phagen haben eine Länge von circa 1 µm und einen Durchmesser von circa 6-7 nm (s. Abbildung 9).^[33] Im Falle der heterogenen Keimbildung bilden sich Keime durch Anlagern von Ionen direkt auf dem Templat.^[38] Ist das Templat größer als die einzelnen Ionen, ist eine große Interaktionsfläche gegeben. Das in dieser Arbeit eingesetzte ZrOCl₂-Salz bildet in einer wässrigen Lösung Zr-Tetramere einer Größe von 0,8 nm (s. 4.5). Eine große Interaktionsfläche mit dem Phagentemplat (1 µm x 6-7 nm) ist hierfür gewährleistet. Im Falle einer homogenen Keimbildung lässt sich eine große Interaktionsfläche zwischen organischen und anorganischen Bereichen im Besonderen durch Partikelgrößen im unteren Nanometerbereich erreichen, da diese ein hohes Oberflächen/Volumenverhältnis aufweisen. Für die Herstellung homogener Schichten durch die Abscheidung von Nanopartikeln (homogene Keimbildung) ist zudem die Bildung von stabilen, dispergierten Partikeln erforderlich. Eine Bildung von großen Agglomeraten in der Mineralisationslösung während der Schichtbildung und ein Abscheiden dieser Agglomerate auf der Schicht würde zu inhomogenen Schichten führen. Ein Einsatz von organischen Additiven, wie Hydroxypropylcellulose (HPC)^[42] oder Polyethylenglycol (PEG)^[48], die eine höhere Stabilität der Dispersion ermöglichen, sollte ver-

mieden werden. Diese können den Einfluss von ZrO_2 -Bindepeptiden auf das Abscheideverhalten von ZrbM beeinflussen. Die organischen Moleküle könnten als Keim für die Partikelbildung dienen und so bezogen auf das Biotemplat einen konkurrierenden Einfluss auf die Mineralisation haben.^[2,14] Zusätzlich ist für die Mineralisation auf einem Phagentemplat sowohl durch heterogene als auch durch homogene Keimbildung ein pH-Wert $> \text{pH } 2$ (optimal $6-8$ ^[40,41]) und eine Mineralisationstemperatur $< 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[39,40] notwendig, um eine Degradation der Phagentemplate während der Mineralisation zu vermeiden.

Um die beschriebenen Anforderungen an die Mineralisationslösung für beide möglichen Mineralisationsmechanismen (über heterogene und homogene Keimbildung) zu erfüllen, wurden umfangreiche Untersuchungen des Partikelwachstums in einer $ZrOCl_2$ -Salzlösung mit einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch vorgenommen (6.1.1). Das Mineralisationsprodukt des etablierten Mineralisationssystems wurde umfangreich charakterisiert (6.1.4). Zudem wurde auf Grundlage dieser Untersuchungen die Partikelbildung und das Partikelwachstum durch Dipl.-Ing. W. Halter (Prof. Dr.-Ing. F. Allgöwer, Universität Stuttgart) modelliert (6.1.5). Das entwickelte Modell kann auf andere Mineralisationssysteme übertragen werden, bei denen Partikelwachstum durch molekulare Addition oder Partikelagglomeration stattfindet. Somit steht eine Möglichkeit zur Verfügung, ohne umfangreiche experimentelle Untersuchungen Parameter, wie Temperatur und Salzkonzentration von Mineralisationssystemen zu identifizieren, die zur Bildung stabiler Nanopartikel führt und dadurch die Mineralisation homogener Funktionsmaterialien ermöglicht.

6.1.1 Mineralisationslösung

Als Mineralisationssystem wurde eine $ZrOCl_2$ -Salzlösung in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch verwendet. Um eine Mineralisationslösung mit relativ hohem pH-Wert (>2 , optimal $6-8$) zu generieren, bei der sich stabile Partikel mit Größen im unteren Nanometerbereich bei einer niedrigen Mineralisationstemperatur ($< 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ^[39,40]) bilden, wurden die Lösungsparameter Salzkonzentration, Temperatur und Ethanolgehalt systematisch variiert und die Lösung umfassend charakterisiert. Dabei gaben Messungen an der Mineralisationslösung mittel Dynamischer Lichtstreuung (DLS) Auskunft über die Größe gebildeter Partikel und das Partikelwachstum. In Kombination mit ICP-OES-Messungen, die den Verbrauch an Zr-Spezies durch die Partikelbildung zeigten, wurde der Partikelwachstumsmechanismus beschrieben. So konnten Parameter identifiziert werden, die ein schnell-

les Partikelwachstum durch Agglomeration verhindern und die Bildung einer stabilen Dispersion ermöglichen.

Zur Etablierung einer Mineralisationslösung, die den beschriebenen Anforderungen entspricht, ist es wichtig, den Partikelbildungs- und Partikelwachstumsmechanismus bei verschiedenen Prozessparametern, wie Salzkonzentration, Temperatur oder Ethanolgehalt zu kennen. Um das Mineralisationssystem in Bezug auf den Partikelbildungs- und Partikelwachstumsmechanismus zu untersuchen, wurden zunächst Partikelgrößen über einen Zeitraum von 1,5 h bei verschiedenen Mineralisationsbedingungen bezüglich Salzkonzentration, Temperatur und Ethanolgehalt mittels DLS bestimmt. In Abbildung 21 sind die mittleren Partikelgrößen in Abhängigkeit der Zeit für unterschiedliche Mineralisationsbedingungen dargestellt. Bei allen Mineralisationsbedingungen (Abbildung 21 A-D) wurde eine lineare Zunahme der mittleren Partikelgröße mit der Mineralisationszeit beobachtet. Bei einer konstanten Temperatur von 40 °C und einem Ethanolgehalt von 80 Vol % (Abbildung 21 A) wachsen die Partikel bei Salzkonzentrationen zwischen 20 mM und 50 mM unterschiedlich schnell. Zu Beginn der Messung ($t = 0$ min) liegen unabhängig von der Salzkonzentration Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von circa 10 nm vor. Während die Partikel nach 90 min und einer Konzentration von 20 mM auf eine Größe von 85 nm gewachsen sind, weisen die Lösungen mit einer Konzentration von 30 mM bzw. 50 mM Partikel mit nur 50 nm bzw. 15 nm auf. Dies zeigt, dass das Partikelwachstum mit abnehmender Salzkonzentration schneller abläuft (Abbildung 21 A). Bei einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung und einem Ethanolgehalt von 80 Vol % zeigt eine Erhöhung der Mineralisationstemperatur von 25 °C auf 60 °C ein schnelleres Partikelwachstum (Abbildung 21 B und C). Während bei 25 °C innerhalb 90 Minuten Mineralisationszeit die Partikelgröße von 12 nm auf 17 nm anstieg, ist bei 40 °C eine lineare Partikelgrößenzunahme von 12 nm auf 85 nm zu beobachten. Bei 60 °C liegt ein sehr schnelles Partikelwachstum vor (Abbildung 21 C). Nach 9 min bildeten sich bereits Partikel einer Größe von 1014 nm. Das sehr schnelle Partikelwachstum führte nach zehn Minuten zu einer trüben Mineralisationslösung, die mittels DLS aufgrund von Mehrfachstreuungen nicht mehr korrekt vermessen werden konnte.

Die Untersuchung des Ethanol-Einflusses auf die Partikelgröße und das Partikelwachstum (Abbildung 21 D) wurde mit einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung bei 25 °C durchgeführt.

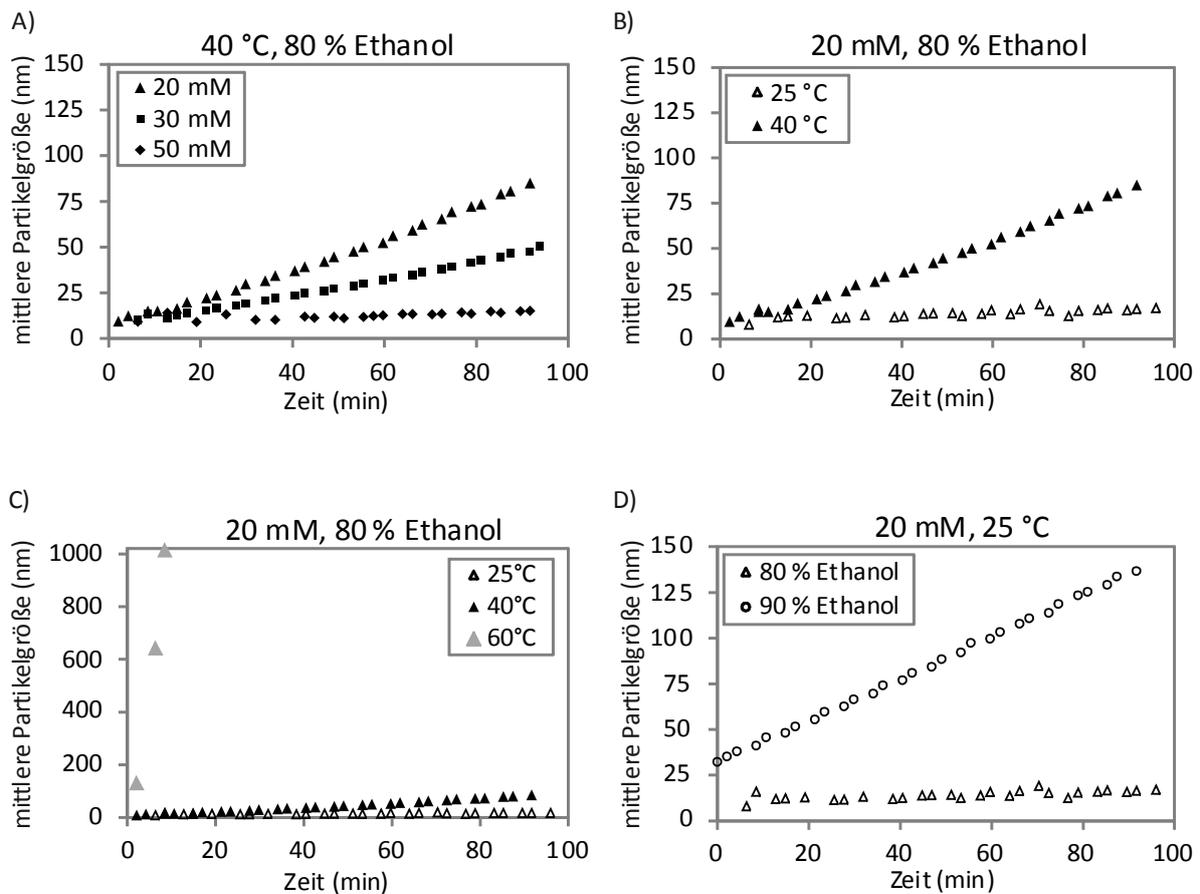


Abbildung 21: Partikelwachstum von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen. Zur Mineralisation von ZrbM wurde eine $ZrOCl_2$ -Salzlösung in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch eingesetzt. Die Partikelgröße und das Partikelwachstum wurden bei A) unterschiedlicher Salzkonzentration, bei B) und C) unterschiedlicher Temperatur und bei D) unterschiedlichem Ethanolgehalt untersucht.

Bei einer Erhöhung des Ethanolgehalts von 80 Vol % auf 90 Vol % lagen bereits zu Beginn der Messung ($t = 0$ min) Partikel mit einer Größe von 32 nm vor, während in der Lösung mit 80 Vol % eine anfängliche Partikelgröße von 12 nm beobachtet wurde. Des Weiteren zeigte ein höherer Ethanolgehalt eine schnellere Zunahme der Partikelgröße. Während bei 80 Vol % die Partikelgröße von 12 nm auf 17 nm anstieg, zeigten die Partikel in der Lösung mit 90 Vol % Ethanol einen Größenzuwachs von 32 nm auf 137 nm bei einer Mineralisationszeit von 90 min.

Diese Betrachtungen der mittleren Partikelgröße zeigten ein zunehmendes Partikelwachstum mit abnehmender Salzkonzentration, zunehmender Temperatur und zunehmendem

Ethanolgehalt. Es ist jedoch zu beachten, dass die hier betrachtete mittlere Partikelgröße ein intensitätsgewichteter Mittelwert über alle vorliegenden Partikelgrößen darstellt (s. 4.9.1). Um neben der mittleren Partikelgröße detaillierte Informationen über die Partikelgrößenverteilung zu erhalten, und dadurch Aussagen über den Wachstumsmechanismus treffen zu können, wurden zusätzlich die intensitätsgewichteten und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen betrachtet (s. 4.9.1). Bei der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung werden vor allem größere Partikel erfasst. Dies liegt daran, dass die Intensität I des gestreuten Lichtes proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers d ($I \sim d^6$) ist (Rayleigh-Näherung) (s. 4.9.1).^[163] Die anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung zeigt die relative Anzahl der Partikel mit unterschiedlicher Partikelgröße.^[162,164]

Ein Betrachten der Verteilungskurven in Abbildung 22 zeigt bei einer Konzentration von 50 mM (40 °C) keinen Unterschied zwischen der intensitätsgewichteten und der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung.

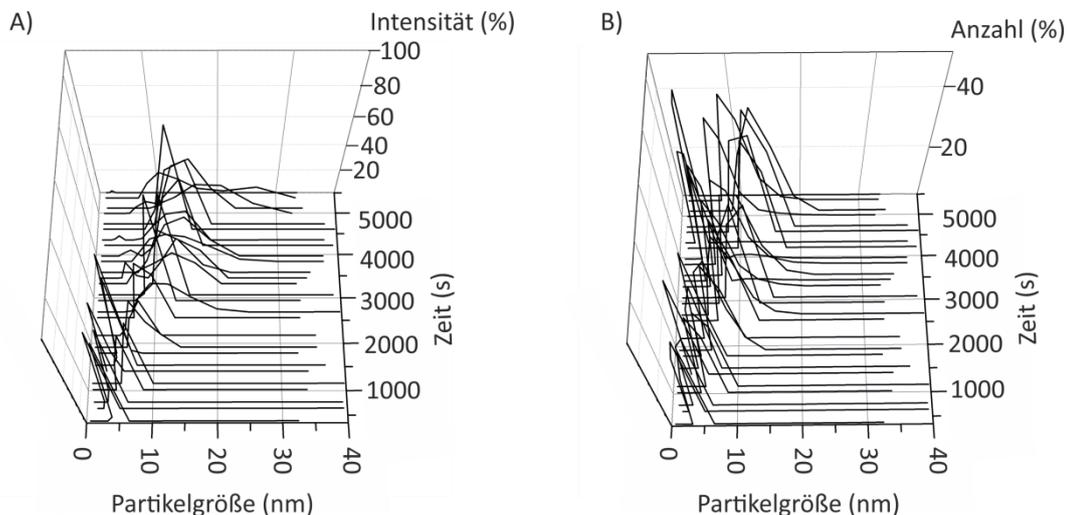


Abbildung 22: Partikelgrößenverteilung einer 50 mM $ZrOCl_2$ -Lösung mit 80 % Ethanol bei 40 °C. A) Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung. B) Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung.

Es liegt eine monomodale, monodisperse Partikelgrößenverteilung vor (Polydispersitätsindex: $\sim 0,2$) (s. 4.9.1). Wären nur wenige größere Partikel in der Lösung vorhanden, würden diese in der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung aufgrund der Beziehung $I \sim d^6$, angezeigt werden (s. 4.9.1). Daher kann hier von einer monomodalen Partikelgrößenverteilung ausgegangen werden. Mit zunehmender Zeit verschieben sich die Verteilun-

gen leicht zu größeren Partikelgrößen. Außerdem wird die Polydispersität (s. 4.9.1) etwas größer (Polydispersitätsindex: $\sim 0,3$ nach 5400 s (1,5 h)). Das bedeutet, dass alle Partikel, die in der Lösung vorliegen, gleichzeitig wachsen und der Größenbereich, in dem die Partikel zu finden sind, breiter wird. Mögliche Gründe für ein solches Wachstum können sowohl eine molekulare Addition von Zr-Tetrameren oder größeren Oligomeren^[99] (s. Gleichung (14)) an bestehende Partikel, als auch ein Agglomerieren von kleinen Partikeln sein (s. 4.5). Beide Wachstumsmechanismen sind bereits für Hydrothermalsynthesen von ZrO_2 in wässrigen $ZrOCl_2$ -Lösungen bekannt (s. 4.5).^[25,95,98,102,103]

Beim Betrachten der zeitabhängigen Partikelgrößenverteilungen für eine $ZrOCl_2$ -Salzkonzentration von 30 mM in Abbildung 23 C) und D) fällt auf, dass ab einer Reaktionszeit von 1400 s (23 min) auch größere Partikel neben kleineren Partikeln vorliegen. Dies zeigt ein Vergleich der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 23 C) mit der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 23 D). Große Partikel zwischen 30 nm und 75 nm (s. Abbildung 23 C) werden durch die stärkere Intensität des gestreuten Lichts bei der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung Übergewichtet dargestellt. In der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung sind diese Partikel nicht dargestellt. Ihre Anzahl ist im Vergleich zu den kleineren Partikeln gering. Das Auftreten einer bimodalen Partikelgrößenverteilung ab 1400 s (23 min) (Abbildung 23 C) gibt einen Hinweis auf Agglomeration der kleineren Partikel.^[199] Bilden sich größere Partikel durch Agglomeration kleinerer Partikel und sind gleichzeitig noch nicht alle kleinen Partikel durch die Agglomeration verbraucht, so liegen sowohl kleine als auch große Partikel nebeneinander vor. Es ist eine bimodale Partikelgrößenverteilung zu beobachten. Neben der Entstehung großer Partikel wachsen die kleinen Partikel einer Größe von circa 10 nm (0 s) bis zu einer Größe von circa 25 nm (5400 s = 90 min) (Abbildung 23 D). Die Partikelgrößenverteilung wird zu größeren Partikelgrößen hin verschoben. Die Polydispersität nimmt dabei zu. Im Vergleich zur 50 mM Lösung (Abbildung 23 A und B), bei der die Partikelgröße von 5 nm (0 s) auf circa 15 nm (5400 s = 90 min) zunimmt (Abbildung 23 B), wachsen die kleineren Partikel der 30 mM Lösung schneller, obwohl die Salzkonzentration erniedrigt wurde. Wird der pH-Wert beider Lösungen betrachtet, fällt auf, dass der pH-Wert durch eine Konzentrationserniedrigung von 50 mM auf 30 mM entsprechend von 1,52 auf 2,01 zunimmt.

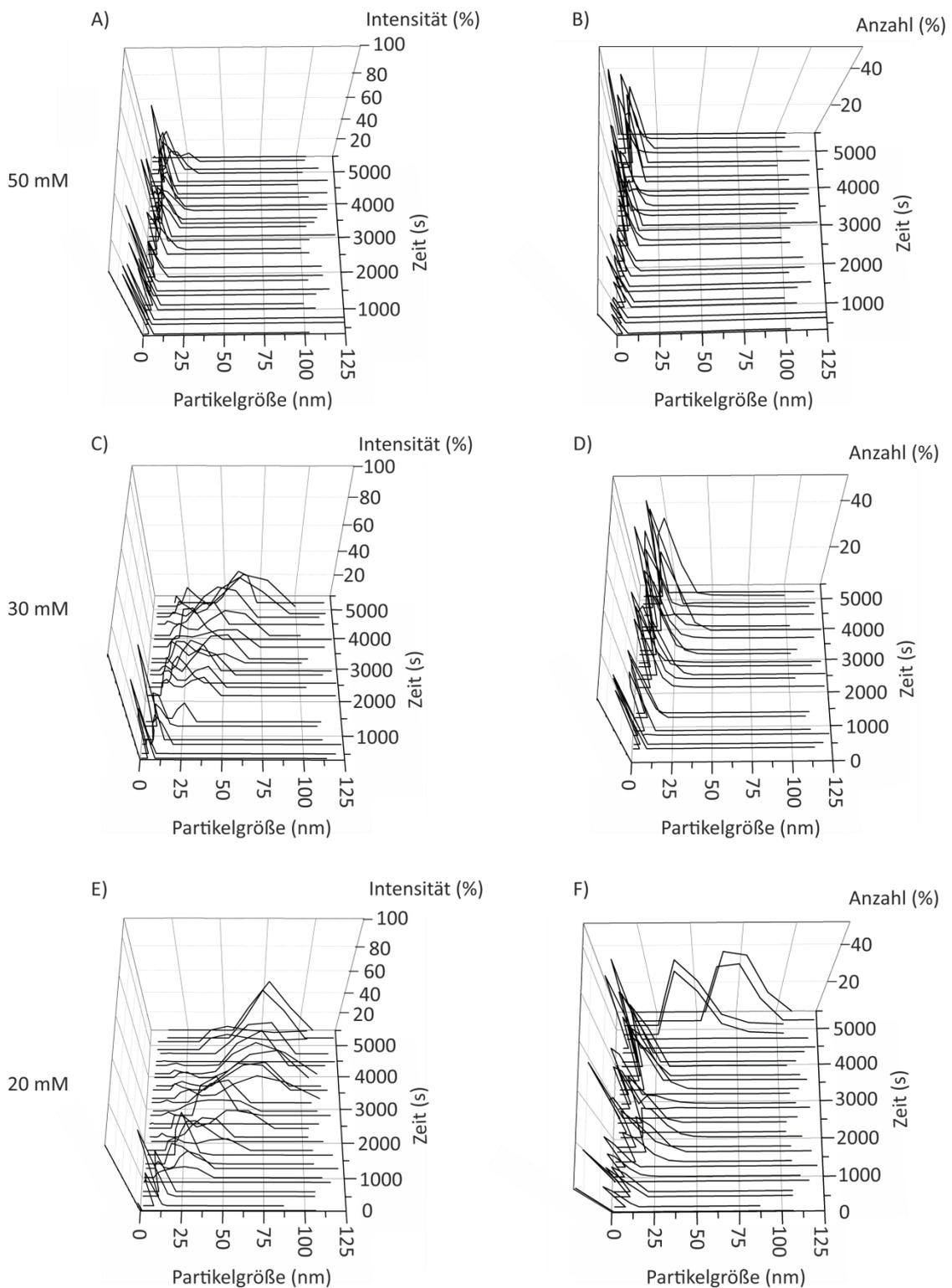


Abbildung 23: Partikelgrößenverteilung – Einfluss Salzkonzentration. Es sind jeweils die zeitlichen Verläufe der intensitätsgewichteten (A, C und E) und anzahlsgewichteten Partikelgrößenverteilungen (B, D und F) dargestellt. A) und B) Mineralisationssystem 50 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C. C) und D) Mineralisationssystem 30 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C. E) und F) Mineralisationssystem 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C.

Nach Gleichung (14) werden sowohl die Hydroxylierung, als auch die Kondensationsreaktion durch eine pH-Erhöhung begünstigt,^[44,98] was zu einem schnelleren Partikelwachstum durch Kondensationsreaktionen mit Zr-Tetrameren/Oligomeren führt. Ein entsprechendes Verhalten wurde in der Literatur für wässrige $ZrOCl_2$ Mineralisationssysteme beschrieben (s. 4.5).^[46,98,99] Auch hier wurde mit zunehmender Salzkonzentration ein langsames Partikelwachstum beobachtet, das auf die zunehmende Acidität zurückgeführt wurde. Bei weiterer Konzentrationserniedrigung auf 20 mM tritt ab 1280 s (21 min) ebenfalls eine bimodale Partikelgrößenverteilung auf (Abbildung 23 E). Ein Vergleich der intensitätsgewichteten (Abbildung 23 E) mit der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 23 F) zeigt, dass die kleinen Partikel gegenüber den großen Partikeln in Überzahl vorliegen. Dies wird daran deutlich, dass die großen Partikel der bimodalen Verteilung nur in der intensitätsgewichteten Verteilung auftauchen ($I \sim d^6$) und in der anzahlgewichteten Verteilung nicht dargestellt werden (s. 4.9.1). In der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 23 E) sind ab einer Zeit von circa 3000 s (50 min) überwiegend Partikel einer Größe von ungefähr 75 nm zu sehen. Die Intensität der Partikel im Größenbereich von ungefähr 25 nm nimmt ab. Das heißt, im Vergleich zur 30 mM Lösung liegen insgesamt mehr größere Partikel vor. Die anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen der 20 mM Lösung in Abbildung 23 F) zeigen, dass die kleineren Partikel mit einer Größe von unter 25 nm, die in Überzahl vorliegen, mit zunehmender Reaktionszeit bis 4000 s (67 min) von einer Anfangsgröße von circa 10 nm auf eine Größe von circa 20 nm wachsen. Dieses Wachstumsverhalten der in Überzahl vorliegenden kleinen Partikel ist vergleichbar mit dem Wachstum der kleinen Partikel in der 30 mM Lösung. Das vergleichbare Wachstumsverhalten wird dem ähnlichen pH-Wert der Lösungen zugeschrieben. Der pH-Wert nimmt nur leicht von 2,01 bei 30 mM auf 2,12 bei 20 mM zu.

Beim Betrachten der zeitabhängigen Partikelgrößenverteilungen in Abbildung 24 A)-F), die das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen beschreiben, fällt ein ähnliches Verhalten wie bei der Erniedrigung der Konzentration auf. Bei 25 °C (Abbildung 25) wachsen die Partikel in der 20 mM Lösung sehr langsam von ungefähr 9 nm (0 s) auf circa 16 nm (5400 s = 90 min).

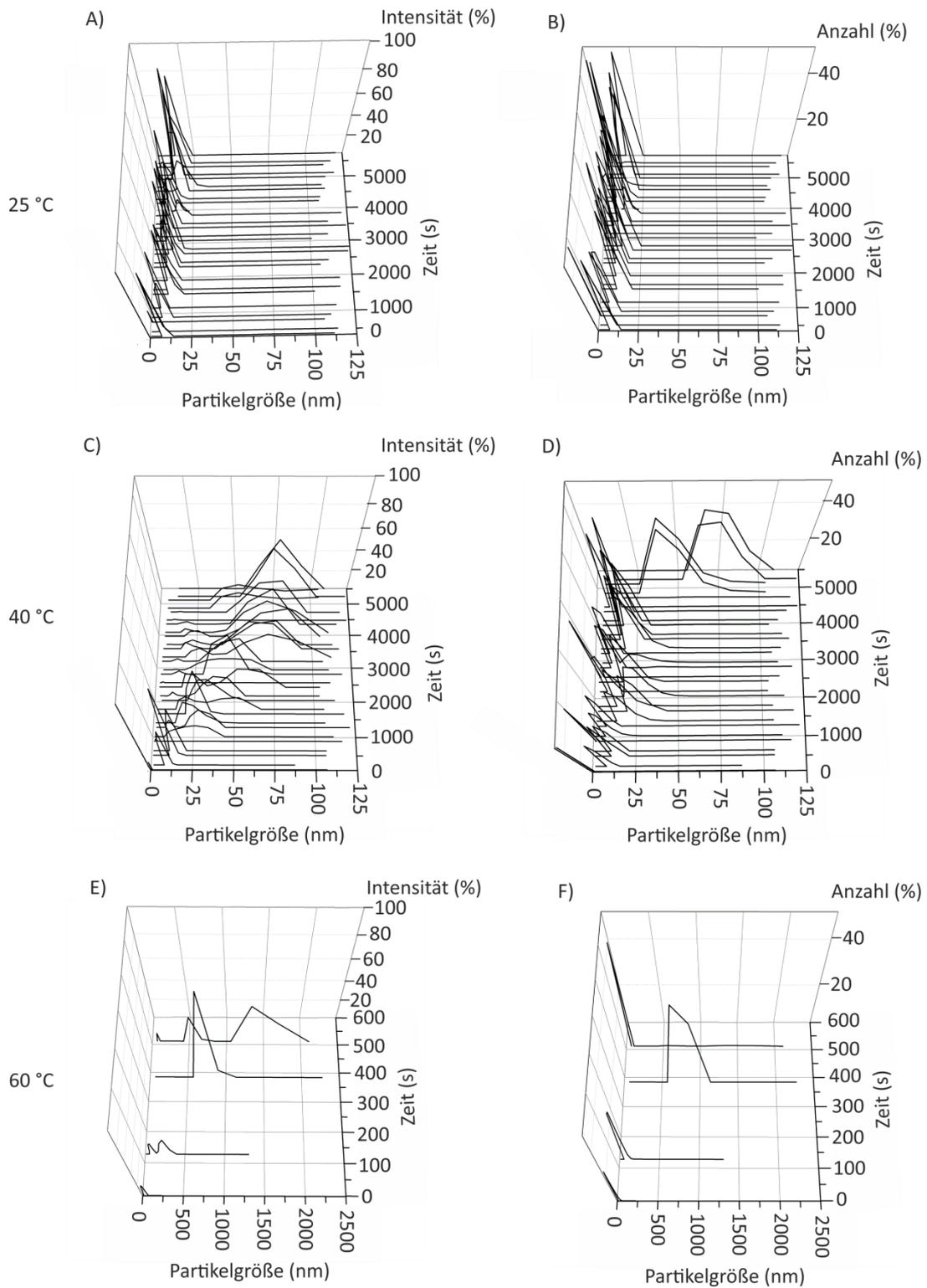


Abbildung 24: Partikelgrößenverteilung – Einfluss Temperatur. Es sind jeweils die zeitlichen Verläufe der intensitätsgewichteten (A, C und E) und anzahlsgewichteten Partikelgrößenverteilungen (B, D und F) dargestellt. A) und B) Mineralisationssystem 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 25 °C. C) und D) Mineralisationssystem 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C. E) und F) Mineralisationssystem 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 60 °C.

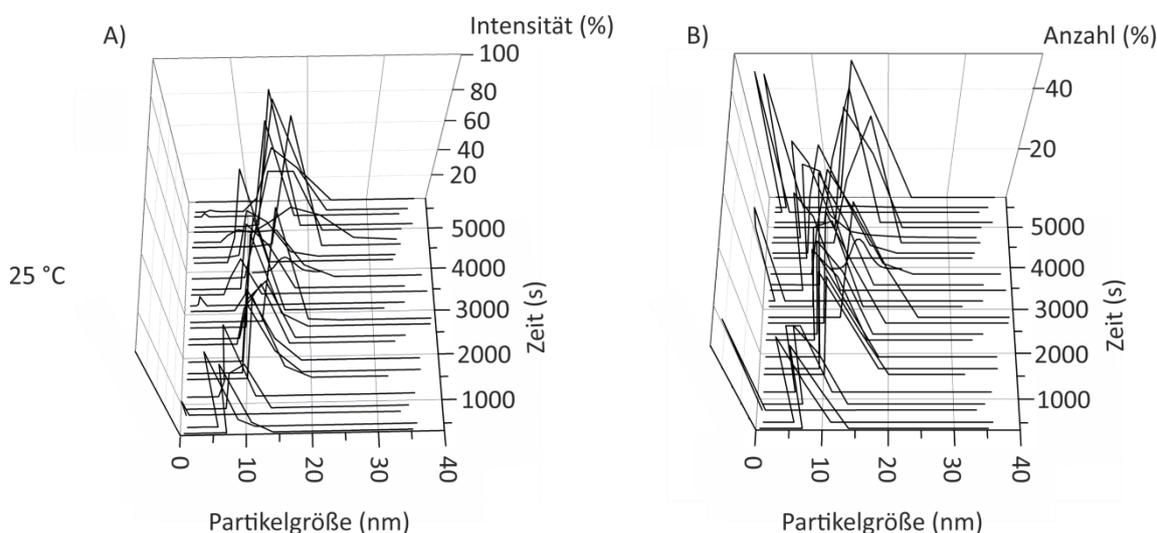


Abbildung 25: Partikelgrößenverteilung einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung mit 80 % Ethanol bei 25 °C. A) Intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung. B) Anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung.

Dieses Verhalten wird sowohl in der anzahlgewichteten (Abbildung 25 A), als auch in der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 25 B) beschrieben, was einer sehr engen, monomodalen Partikelgrößenverteilung (Polydispersitätsindex $\sim 0,25$) in der Lösung entspricht (s. 4.9.1). Durch Erhöhen der Temperatur auf 40 °C (Abbildung 24 C, D) bilden sich nach circa 1000 s (17 min) wenige größere Partikel von circa 30 nm, die nach ungefähr 5000 s (83 min) auf eine Größe von circa 75 nm wachsen. Diese Partikel sind ausschließlich in der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung zu sehen (Abbildung 24 C), was zeigt, dass nur wenige Partikel in der Lösung stärker wachsen. Die Partikel, die ihrer Anzahl nach hauptsächlich in der Lösung vorliegen, sind in der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung in Abbildung 24 D) zu sehen. Diese kleineren Partikel wachsen bei 40 °C von 10 nm (0 s) auf circa 45 nm (5000 s = 83 min), also deutlich schneller als die Partikel bei 25 °C (Abbildung 24 A und B). Das schnellere Partikelwachstum kann einer durch Temperaturerhöhung beschleunigten Hydroxylierung und Kondensationsreaktion zugeschrieben werden,^[42] die zu einer schnelleren molekularen Addition von Zr-Tetrameren/Oligomeren führt. Eine weitere Temperaturerhöhung auf 60 °C führt insgesamt zu einem deutlich schnelleren Partikelwachstum. Die entsprechenden zeitabhängigen intensitäts- und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen sind in Abbildung 24 E) und F) dargestellt. Bei 60 °C war die Mineralisationslösung nach zehn Minuten (600 s) aufgrund des sehr schnellen Partikelwachstums (s. Abbildung 21) zu trübe, um die

Partikelgröße mittels DLS korrekt zu vermessen. Mehrfachstreuungen führen bei solchen Lösungen zu einem inkorrekten Ergebnis.^[160] Daher werden bei der Mineralisationstemperatur von 60 °C nur die Messungen bis zu einer Mineralisationszeit von zehn Minuten (600 s) betrachtet. Ein Vergleich der intensitätsgewichteten Abbildung 24 E) und anzahl-gewichteten Verteilungen Abbildung 24 F) zeigt zunächst bei $t = 0$ s eine identische Verteilungskurve bei einer Partikelgröße von 25 nm, was für eine monomodale Partikelgrößenverteilung spricht (s. 4.9.1). Nach circa 120 s (2 min) liegt bei der intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung Abbildung 24 E) eine bimodale Verteilung der Partikelgrößen vor. Neben kleinen Partikeln einer Größe von circa 75 nm liegen größere Partikel einer Größe von 200 nm vor. Die anzahlgewichtete Verteilungskurve Abbildung 24 F) zeigt nur die kleineren Partikel einer Größe von circa 75 nm. Demnach liegen nur sehr wenige große Partikel neben vielen kleinen Partikeln vor. Nach circa 360 s (6 min) entsprechen sich die beiden Verteilungen wieder. Dieser zeitliche Verlauf der Partikelgrößenverteilung mit auftretender bimodaler Partikelgrößenverteilung lässt ein Wachstumsprozess durch Agglomeration vermuten. Das Auftreten der bimodalen Partikelgrößenverteilung lässt wie oben beschrieben vermuten, dass sich größere Partikel durch Agglomeration kleinerer Partikel bilden und gleichzeitig noch kleine Partikel vorliegen, die noch nicht zu großen Partikeln agglomeriert sind. Nach circa 360 s liegt wieder eine monomodale Partikelgrößenverteilung vor. Dies deutet darauf hin, dass alle kleineren Partikel zu größeren Partikeln agglomeriert sind.

Die hohe Temperatur von 60 °C führt neben der beschleunigten Hydroxylierung und Kondensationsreaktion auch zu einer Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels von 33,0 bei 25 °C bzw. 30,0 bei 40 °C auf 26,7 bei 60 °C.^[43] Die Dielektrizitätskonstante beeinflusst die Löslichkeit der Zr-Spezies sowie die Keimbildungsrate. Eine Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante führt zu einer Reduktion der Löslichkeit von Zr-Spezies und damit zu einer schnelleren Keimbildung durch eine stärkere Übersättigung an Zr-Spezies.^[42,43] Die genauen Zusammenhänge werden in den folgenden Abschnitten beschrieben. Eine höhere Anzahl an Primärpartikeln infolge der beschleunigten Keimbildung führt zu einer erhöhten Kollisionswahrscheinlichkeit der Partikel, die dadurch schneller agglomerieren können. Somit trägt die Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante bei 60 °C neben der beschleunigten Hydroxylierung und Kondensationsreaktion zu einem insgesamt schnelleren Partikelwachstum bei.

Die Keimbildung einer festen Phase aus einer Lösung geladener Zr-Spezies (s. 4.5) findet durch Bildung eines neutralen Komplexes durch Addition von Cl-Gegenionen statt.^[101] Die Bildung neutraler Komplexe verhindert die elektrostatische Abstoßung der reaktiven Spezies.^[101] Bilden sich Keime aus einer übersättigten idealen Lösung, entspricht im Gleichgewichtszustand das chemische Potential gelöster Zr-Spezies in der flüssigen (L) Phase μ_L dem chemischen Potential der Spezies in der gebildeten festen (S) Phase μ_S :^[98,200,201]

$$\mu_L = \mu_S \quad (25)$$

$$\mu_L^\circ + k_B T \ln(C_L) = \mu_S^\circ + k_B T \ln(C_S). \quad (26)$$

Hierbei entspricht μ° dem chemischen Standardpotential, k_B der Boltzmannkonstanten, T der absoluten Temperatur und C der Konzentration der Zr-Spezies. Das chemische Standardpotential beinhaltet die Wechselwirkungsenergie.^[65] Der Beitrag $k_B T \ln(C_X)$ beschreibt den Beitrag durch die thermische Energie.^[65] Die Konzentration an Zr-Spezies im Festkörper C_S , einer reinen Phase, besitzt den Wert eins ($C_S = 1$).^[65,200]

Um Ionen vom Festkörper zu lösen, muss Energie aufgebracht werden, die der Differenz im chemischen Standardpotential der festen und flüssigen Phase entspricht. Diese Energie ist hauptsächlich auf die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Kationen und Anionen des gelösten Stoffes zurückzuführen.^[65] Somit gilt näherungsweise:

$$\Delta\mu^\circ = \mu_L^\circ - \mu_S^\circ \approx \frac{z_+ z_- e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon(r_+ + r_-)}. \quad (27)$$

Damit ist die aufzubringende Energie abhängig von der Ionenladung z_+ und z_- , sowie den Ionenradien r_+ und r_- . Zusätzlich wird die Elementarladung e , die Permittivität des Vakuums ϵ_0 , die Dielektrizitätskonstante ϵ des Lösungsmittels, die Boltzmannkonstante k_B sowie die absolute Temperatur T berücksichtigt. Für die Gleichgewichtskonzentration gelöster Zr-Spezies in einer gesättigten Lösung $C_L = C_{\text{Sat}}$, und damit für die Löslichkeit dieser Spezies, ergibt sich durch Kombination von Gleichung (26) und (27) mit $C_S = 1$ und damit $\ln(C_S) = 0$:

$$C_{\text{Sat}} = C_L \approx \exp\left[-\frac{z_+ z_- e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon k_B T (r_+ + r_-)}\right]. \quad (28)$$

Diese Beziehung in Gleichung (28) verdeutlicht, dass die Löslichkeit gelöster Zr-Spezies C_{Sat} mit Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten ϵ abnimmt.

Werden Keime aus einer übersättigten Lösung gebildet, gilt für die Änderung der freien Enthalpie G :^[202]

$$\Delta G = n(\mu_S - \mu_L) + A\gamma. \quad (29)$$

Hierbei steht n für die Anzahl der Mole im gebildeten Keim, A für die gebildete Grenzfläche zwischen Keim und Lösung und γ entsprechend für die Grenzflächenenergie zwischen dem gebildeten Feststoff und der Lösung.^[202] Die Triebkraft zur Keimbildung entspricht der Differenz im chemischen Potential der Zr-Spezies in Lösung μ_L und im Feststoff μ_S ($\mu_S - \mu_L$). Es bilden sich solange Keime, bis die chemische Potentialdifferenz ausgeglichen ist. Der Term $\mu_S - \mu_L$ in Gleichung (29) und damit die Triebkraft zur Keimbildung, wird mit der klassischen Keimbildungstheorie beschrieben. In der klassischen Keimbildungstheorie^[203,204] wird die Keimbildung einer flüssigen Phase (L) aus einer übersättigten Gasphase (Gas) beschrieben. Der Term $\mu_L - \mu_{Gas}$ wird in diesem Fall unter isothermen Bedingungen durch

$$d(\mu_L - \mu_{Gas}) = (v_L - v_{Gas})dp \quad (30)$$

berechnet.^[205] Hierbei steht v_L und v_{Gas} für das spezifische Volumen eines Moleküls in der flüssigen Phase und in der Gasphase. Unter der Annahme eines idealen Gases und der Inkompressibilität der flüssigen Phase folgt durch Integration von Gleichung (30):

$$\mu_L - \mu_{Gas} = kT \ln\left(\frac{p_0}{p_V}\right) = -kT \ln(S) \quad (31)$$

Der Parameter S beschreibt die Übersättigung, die das Verhältnis zwischen dem vorliegenden Dampfdruck p_V und dem Gleichgewichtsdampfdruck p_0 über einer ebenen Grenzfläche bei konstanter Temperatur darstellt:^[205,206]

$$S = \frac{p_0}{p_V}. \quad (32)$$

Für den Term $\mu_S - \mu_L$ in Gleichung (29) gilt somit entsprechend der klassischen Keimbildungstheorie unter isothermen Bedingungen folgende Beziehung:^[62,202,206]

$$\mu_S - \mu_L = kT \ln\left(\frac{C_{Sat}}{C_L}\right) = -kT \ln(S). \quad (33)$$

Hierbei wird eine ideale Lösung angenommen. Die Übersättigung S , entspricht in diesem Fall dem Verhältnis zwischen der Konzentration an gelösten Zr-Spezies C_L und der Sättigungskonzentration C_{Sat} , das heißt der Gleichgewichtskonzentration gelöster Zr-Spezies in einer gesättigten Lösung:

$$S = \frac{c_L}{c_{\text{Sat}}}. \quad (34)$$

Während der Keimbildung in einer übersättigten Lösung nimmt die Konzentration an gelösten Zr-Spezies c_L ab, bis schließlich die Sättigungskonzentration c_{Sat} erreicht ist. In diesem Fall stimmen c_{Sat} und c_L überein. Es gilt $\ln(c_{\text{Sat}}/c_L) = \ln(1) = 0$. Somit ist die Triebkraft zur Keimbildung ($\mu_S - \mu_L$) nach Gleichung (33) ebenfalls Null. Das chemische Potential von Zr-Spezies im gebildeten Festkörper entspricht dem chemischen Potential der Spezies in der gesättigten Lösung.

Bei der Keimbildung entsteht eine neue Grenzfläche A zwischen dem Feststoff und der Lösung, deren Grenzflächenenergie γ aufgebracht werden muss. Für den Radius r des Keimes, der aus n Molen mit dem molaren Volumen V_m besteht, gilt:^[62]

$$r = \left(\frac{3nV_m}{4\pi} \right)^{1/3}, \quad (35)$$

und für die Oberfläche des Keimes A :

$$A = n^{2/3} (36\pi V_m^2)^{1/3}. \quad (36)$$

Somit folgt für die Änderung der freien Enthalpie ΔG mit den Gleichungen (33) und (36):

$$\Delta G = -nkT \ln(S) + n^{2/3} (36\pi V_m^2)^{1/3} \gamma. \quad (37)$$

Die Änderung der freien Enthalpie ΔG als Funktion der Anzahl an Molen n durchläuft ein Maximum. Stabile Keime werden ab dem Maximum bei $\partial(\Delta G)/\partial n = 0$ oder ab

$$n^* = \frac{32\pi v^2 \gamma^3}{3(k_B T \ln(S))^3} \quad (38)$$

gebildet.

Für diesen kritischen Wert entspricht die Änderung der freien Enthalpie:

$$\Delta G^* = \frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3(k_B T)^2 (\ln(S))^2}. \quad (39)$$

Diese Änderung der freien Enthalpie wird als Aktivierungsenergie für die Keimbildung betrachtet. Für die Keimbildungsrate J gilt mit Gleichung (39) und dem Präexponentialfaktor J_0 :

$$J = J_0 \exp\left(\frac{\Delta G^*}{k_B T}\right) = J_0 \exp\left[-\frac{16\pi v^2 \gamma^3}{3(k_B T)^3 (\ln S)^2}\right]. \quad (40)$$

Die Partikelbildung (abhängig von ΔG^*) und die Keimbildungsrate J sind demnach stark von der Übersättigung des gelösten Stoffes abhängig (Gleichung (39) und (40)) und somit auch von der Dielektrizitätskonstanten des Lösungsmittels (Gleichung (28)).^[62] Letztere beeinflusst nach Gleichung (28) die Sättigungskonzentration C_{Sat} und damit nach Gleichung (34) die Übersättigung S des gelösten Stoffes.

Die Verteilungskurven der Partikelgrößen für verschiedene Volumenanteile an Ethanol in der Lösung sind in Abbildung 26 dargestellt.

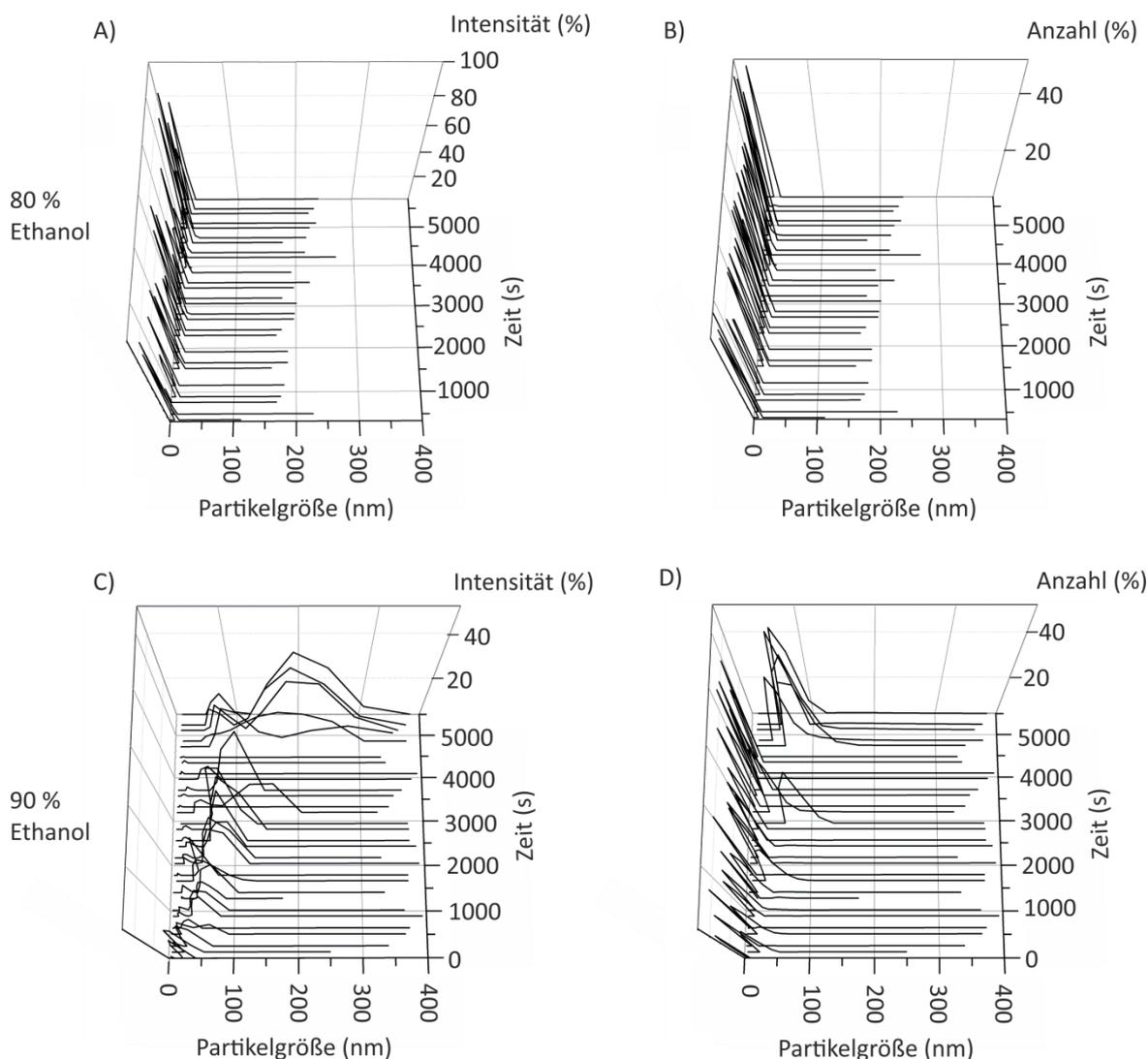


Abbildung 26: Partikelgrößenverteilung – Einfluss Ethanolgehalt. Es sind jeweils die zeitlichen Verläufe der intensitätsgewichteten (A und C) und anzahlsgewichteten Partikelgrößenverteilungen (B und D) dargestellt. A) und B) Mineralisationssystem 20 mM ZrOCl_2 , 80 Vol % Ethanol, 25 °C. C) und D) Mineralisationssystem 20 mM ZrOCl_2 , 90 Vol % Ethanol, 25 °C.

Eine Erhöhung des Ethanolgehalts von 80 % auf 90 % führt zu einer sehr starken Zunahme des Partikelwachstums (Abbildung 26). Bereits ab $t = 0$ s liegt eine bimodale Partikelgrößenverteilung vor. In der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 26 C) werden Partikel einer Größe von 7 nm (sehr schwacher Peak in Abbildung 26 C) neben Partikeln einer Größe von 35 nm dargestellt, während in der anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung (Abbildung 26 D) nur Partikel einer Größe von 7 nm zu beobachten sind. Letztgenannte, in Überzahl vorliegende kleinere Partikel (anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung; Abbildung 26 D) wachsen sehr schnell von 7 nm (0 s) bzw. 32 nm (128 s \approx 2 min) auf circa 60 nm (5400 s = 90 min). Im Vergleich hierzu wurde bei der Mineralisationslösung mit 80 % Ethanol eine anfängliche Partikelgröße von 9 nm ($t = 0$ s) beobachtet, die innerhalb einer Mineralisationszeit von 5400 s (90 min) auf eine Partikelgröße von 16 nm ansteigt (Abbildung 26 A und B bzw. Abbildung 25). Die bei einem höheren Ethanolgehalt bereits von Anfang an vorliegenden größeren Partikeln und das schnellere Partikelwachstum kann der Reduktion der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels von 33 bei 80 % auf 29 bei 90 % zugeschrieben werden. Dies führt zu einer Reduktion der Löslichkeit von Zr-Spezies (Gleichung (28)) und damit zu einer schnelleren Keimbildung durch eine stärkere Übersättigung (Gleichung (34) und (40)),^[42,43] was zu einer höheren Anzahl an Primärpartikeln führt. Eine höhere Anzahl an Primärpartikeln führt schließlich zu einer erhöhten Kollisionswahrscheinlichkeit zwischen den Partikeln und dadurch zu einer schnelleren Partikelagglomeration. Die Partikelagglomeration ist am Auftreten einer bimodalen Partikelgrößenverteilung erkennbar (Abbildung 26 C). Wie oben beschrieben, tritt die bimodale Partikelgrößenverteilung auf, sobald kleine Partikel zu großen Partikeln agglomerieren und sowohl die kleinen, noch nicht agglomerierten, als auch die großen Partikeln nebeneinander vorliegen. Auch der zeitliche Verlauf der anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung in Abbildung 26 D) deutet auf die Agglomeration der kleineren Partikeln hin. Hier werden mit zunehmender Agglomerationszeit nahezu abwechselnd kleinere und größere Partikel detektiert. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die kleineren Partikel zu größeren agglomerieren.

Die in diesem Abschnitt betrachteten Partikelgrößenverteilungen zeigen, dass die mittleren Partikelgrößen, die in Abbildung 21 dargestellt sind, hauptsächlich durch die Bildung der größeren Partikel bestimmt werden. Dies verdeutlicht noch einmal Abbildung 27.

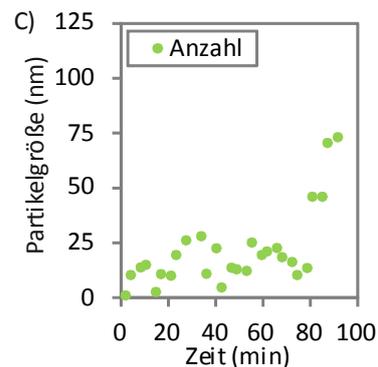
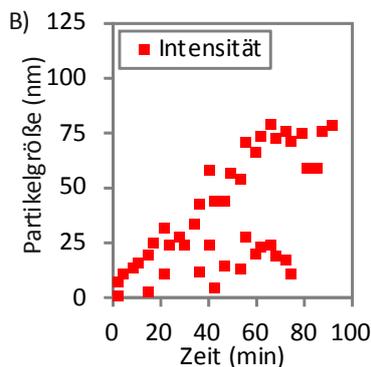
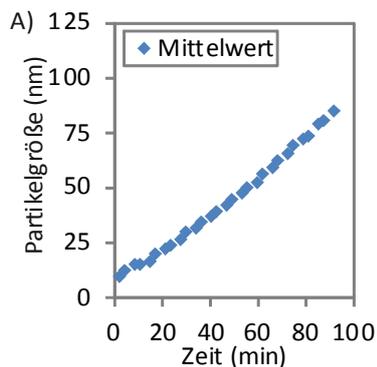
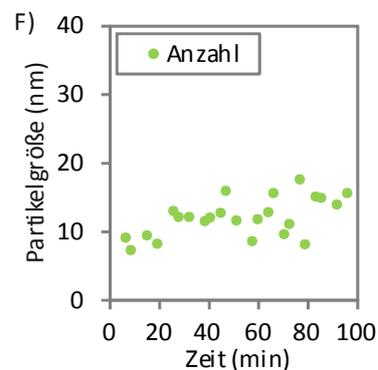
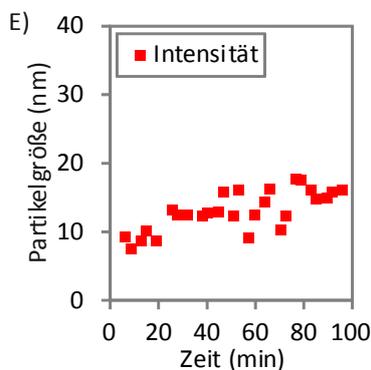
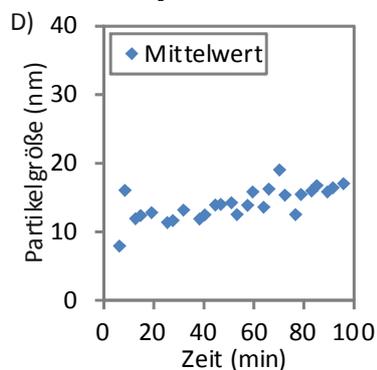
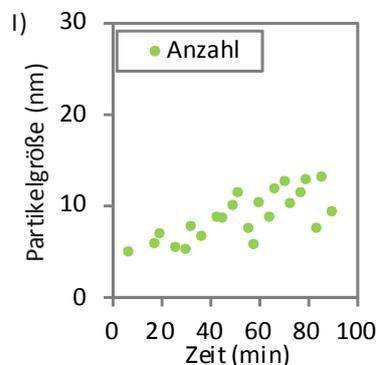
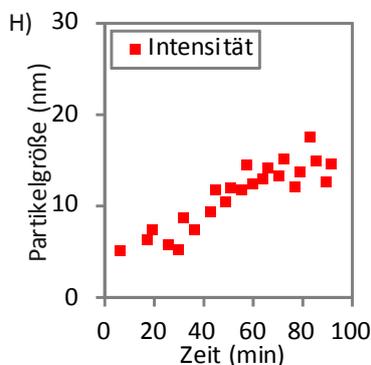
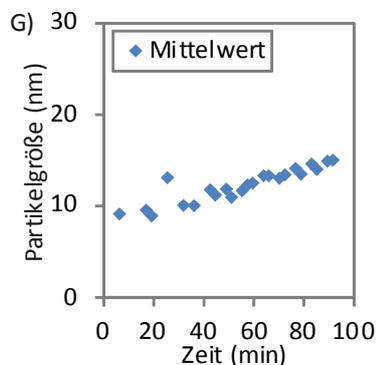
20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 25 °C50 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C

Abbildung 27: Vergleich unterschiedlicher Partikelgrößendarstellung für drei verschiedene Mineralisationssysteme. A), D), G) Mittlere Partikelgröße. B), E), H) Maximum der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung. C), F), I) Maximum der anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung.

Vergleichend sind hier sowohl die mittleren Partikelgrößen (Abbildung 27 A, D, G) als auch die Maxima der intensitätsgewichteten (Abbildung 27 B, E, H) und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilungen (Abbildung 27 C, F, I) für drei verschiedene Mineralisationssysteme dargestellt. Die mittleren Partikelgrößen und die intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilungen resultieren aus dem direkten Messwert, der Intensität des gestreuten

Lichts (s. 4.9.1). Die beiden Partikelgrößen unterschieden sich lediglich in der Auswertung der Partikelgröße. Während bei der mittleren Partikelgröße von einer monomodalen, monodispersen Partikelgrößenverteilung, das heißt, von einer einzigen vorliegenden Partikelgröße ausgegangen wird, werden bei der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung mehrere verschiedene Partikelgrößen in Betracht gezogen (s. 4.9.1). Die Intensität des gestreuten Lichts I ist proportional zur sechsten Potenz des Partikeldurchmessers d . Daher werden große Partikel, die neben kleineren Partikeln vorliegen, bei der mittleren Partikelgröße und der intensitätsgewichteten Partikelgrößendarstellungen Übergewicht berücksichtigt (s. 4.9.1, Abbildung 16). Die anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung wird aus der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung berechnet (s. 4.9.1). Sie beschreibt die relative Häufigkeit der Partikel mit unterschiedlichen Partikelgrößen. Liegt eine bimodale Partikelgrößenverteilung vor, wie beispielsweise im Mineralisationssystem 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol, 40 °C, (Abbildung 23 E, F) nach 1280 s (12 min) Mineralisationszeit (Abbildung 23 E), so wird, wie bereits beschrieben, die mittlere Partikelgröße, hauptsächlich durch die großen Partikel in der Mineralisationslösung bestimmt. Die anzahlgewichtete Partikelgrößenverteilung in Abbildung 27 C) zeigt, dass in diesem Mineralisationssystem (20 mM $ZrOCl_2$, 40 °C, 80 % Ethanol) hauptsächlich kleine Partikel (10 nm – 20 nm) vorliegen. Da die mittlere Partikelgröße in Abbildung 27 A), sowie die intensitätsgewichtete Partikelgrößen in Abbildung 27 B) im Vergleich zur anzahlgewichteten Partikelgröße größere Werte zeigen, müssen zusätzlich zu den kleinen Partikeln auch größere Partikel vorliegen. Diese anzahlmäßig unterlegenen großen Partikel werden durch die Proportionalität $I \sim d^6$ deutlich stärker gewichtet als die häufiger vorliegenden kleinen Partikel. Die in Abbildung 27 A) dargestellte mittlere Partikelgröße entspricht dem Verlauf der großen Partikel der intensitätsgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 27 B). Dies verdeutlicht, dass die Partikelgrößenzunahme in Abbildung 21 hauptsächlich das Wachstum der größeren Partikel beschreibt. Alle Mineralisationssysteme, ausgenommen 50 mM $ZrOCl_2$, 40 °C, 80 % Ethanol und 20 mM, 25 °C, 80 % Ethanol, zeigen mit zunehmender Mineralisationszeit eine bimodale Partikelgrößenverteilung (s. intensitätsgewichtete Partikelgrößenverteilung Abbildung 23 C, E, Abbildung 24 C, E, Abbildung 26 C) vergleichbar mit dem hier beschriebenen Mineralisationssystem (20 mM $ZrOCl_2$, 40 °C, 80 % Ethanol). Bei den Mineralisationssystemen 50 mM $ZrOCl_2$, 40 °C, 80 % Ethanol (Abbildung 22) und 20 mM, 25 °C, 80 % Ethanol (Abbildung 25) liegen über die gesamte Mineralisationszeit

von 90 min monomodale Partikelgrößenverteilungen vor. Die mittlere Partikelgröße (Abbildung 27 D, G) stimmt mit der intensitätsgewichteten (Abbildung 27 E, H) und anzahlgewichteten Partikelgrößenverteilung (Abbildung 27 F, I) überein. Es liegt nur eine Partikelgröße mit geringer Streuung vor, die von der mittleren Partikelgröße exakt wiedergegeben wird. Sie wird nicht durch zusätzlich vorliegende, größere Partikel zu höheren Werten hin verschoben. Beim Mineralisationssystem 50 mM ZrOCl_2 , 40 °C, 80 % Ethanol verhindert der geringe pH Wert von 1,52 eine schnelle Hydroxylierung und Kondensationsreaktion (Gleichung (14)) und damit ein schnelles Partikelwachstum. Beim Mineralisationssystem 20 mM, 25 °C, 80 % Ethanol ist es die geringe Temperatur von 25 °C, die ein schnelles Partikelwachstum durch langsamere Hydroxylierung und Kondensationsreaktion (Gleichung (14)) verhindert. Weiterhin liegt im Vergleich zur Mineralisationstemperatur von 60 °C in beiden Fällen eine höhere Dielektrizitätskonstante vor ($\epsilon = 33,0$ (25 °C); 30,0 (40 °C); 26,7 (60 °C))^[43]. Eine höhere Dielektrizitätskonstante führt zu einer höheren Löslichkeit von Zr-Spezies, die die Übersättigung dieser Spezies und damit die Keimbildungsrate reduziert. Eine folglich geringere Anzahl an Partikeln reduziert die Wahrscheinlichkeit der Partikelagglomeration durch Partikelkollision.

Zusätzlich zu den DLS-Messungen wurden ICP-OES-Messungen durchgeführt, um den Verbrauch an Zr-Spezies während der Mineralisation bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen zu untersuchen und damit eine genauere Beschreibung des Wachstumsmechanismus zu ermöglichen. Um den Verbrauch an Zr-Spezies in Lösung bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen zu beschreiben, wurde das Mineralisationsprodukt nach verschiedenen Mineralisationszeiten abzentrifugiert und der Überstand auf den Zr-Gehalt untersucht (Abbildung 28). Im Überstand waren keine Partikel mehr mittels Dynamischer Lichtstreuung detektierbar.

Bei einer Mineralisationstemperatur von 40 °C nimmt die Konzentration löslicher Zr-Spezies während der Mineralisation nur relativ langsam ab (Abbildung 28 A). Die verbrauchten Zr-Spezies können entweder neue Partikel bilden oder sich an bereits bestehende anlagern, die dadurch wachsen. Für die Mineralisationssysteme mit unterschiedlicher Salzkonzentration (50 mM, 30 mM und 20 mM) wurde eine ähnliche Konzentrationsabnahme an löslichen Zr-Spezies beobachtet.

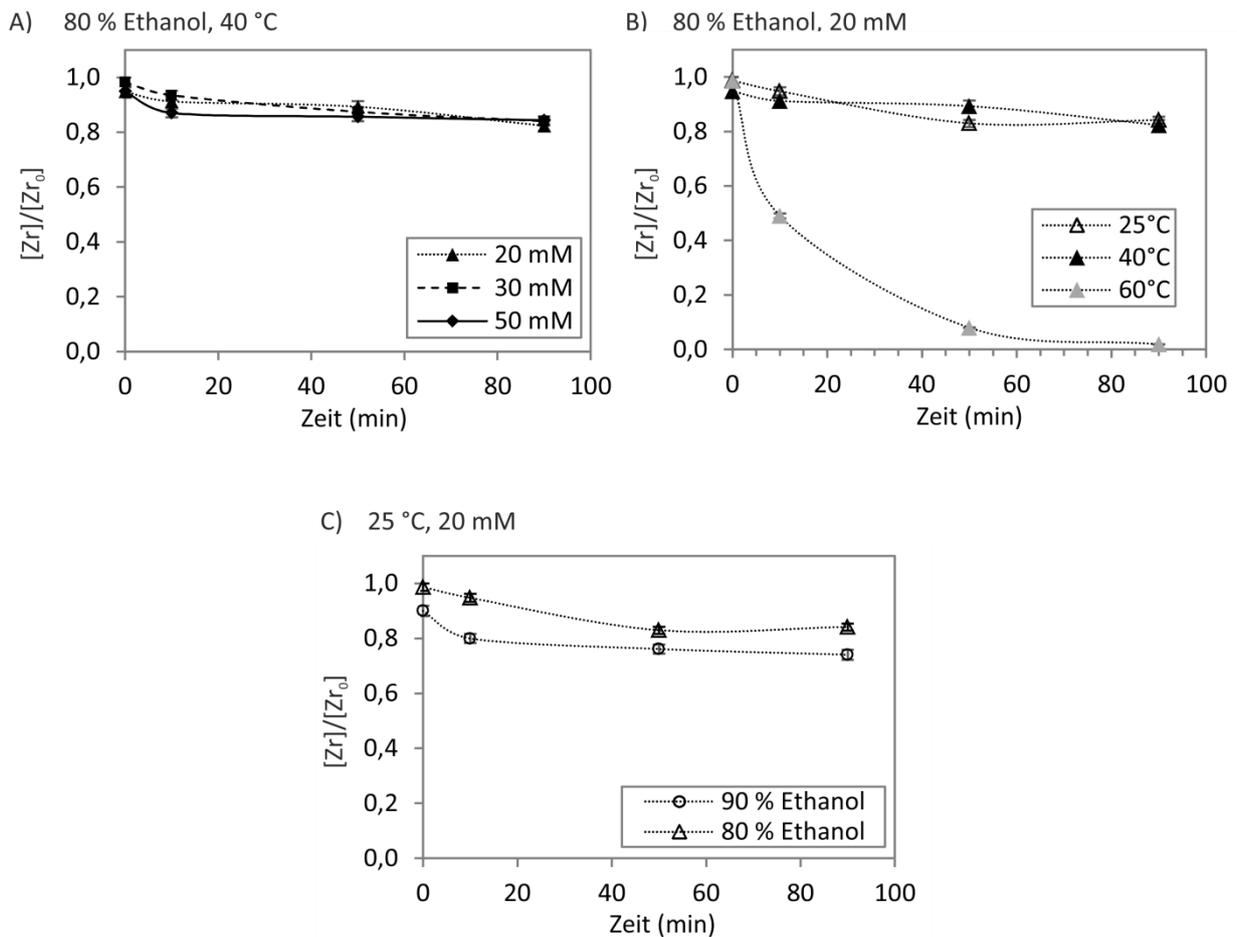


Abbildung 28: Verbrauch an löslichen Zr-Spezies in der Mineralisationslösung bei unterschiedlichen Bedingungen. Der Verbrauch ist jeweils bezogen auf die Anfangssalzkonzentration $[Zr]_0 = 20, 30$ und 50 mM. A) Variation der Salzkonzentration. B) Variation der Temperatur C) Variation des Ethanolgehalts.

Gleichzeitig zeigten die DLS-Messungen der Mineralisationslösungen mit 30 mM und 20 mM $ZrOCl_2$ die Bildung größerer Partikel, die mit abnehmender Salzkonzentration schneller wachsen. Die größeren Partikel liegen neben kleineren Partikeln in der Mineralisationslösung vor. Da sich der Verbrauch an löslichen Zr-Spezies mit der Konzentration nicht ändert, kann die Bildung der großen Partikel in der 20 mM und 30 mM Lösung hauptsächlich der Agglomeration von bereits bestehenden, kleineren Partikeln zugeschrieben werden. Dies ist vergleichbar mit dem Partikelwachstum, das in der Literatur für eine wässrige $ZrOCl_2$ -Lösung beschrieben wird.^[98,99] Auch hier wurde die Agglomeration als Hauptwachstumsmechanismus beschrieben.^[98] Die 50 mM Lösung zeigt dagegen keine Bil-

dung größerer Agglomerate. Über die gesamte Mineralisationszeit (90 min) liegt eine monomodale Partikelgrößenverteilung vor. Die Partikel wachsen langsam von 5 nm auf 15 nm (s. Abbildung 22). Die Abwesenheit größerer Agglomerate neben kleineren Partikeln lässt darauf schließen, dass das Wachstum der vorliegenden Partikel durch Anlagerung der löslichen Zr-Spezies stattfindet.

Die Erhöhung der Mineralisationstemperatur von 25 °C auf 40 °C zeigt ebenfalls einen gleichbleibenden Verbrauch der Zr-Spezies in Lösung (Abbildung 28 B). Mit steigender Temperatur von 25 °C auf 40 °C wurde die Bildung großer Partikel beobachtet, die neben kleineren Partikeln in der Mineralisationslösung vorlagen (s. Abbildung 24 A-D). Ab einer Mineralisationszeit von 4900 s (82 min) waren keine kleinen Partikel einer Größe von circa 20 nm mehr zu beobachten. Bei 25 °C lagen nur kleine Partikel vor, die langsam von 10 nm auf 17 nm wuchsen (s. Abbildung 25). Aus der Bildung der großen Partikel bei 40 °C und gleichbleibendem Verbrauch an löslichen Zr-Spezies im Vergleich zu 25 °C kann geschlossen werden, dass sich diese großen Partikel hauptsächlich durch Agglomeration bereits vorliegender kleiner Partikel bilden. Nach circa 82 min sind diese kleinen Partikel durch Agglomeration zu großen Partikel aufgebraucht. Bei 25 °C wurden keine großen Agglomerate gebildet. Hieraus lässt sich schließen, dass lösliche Zr-Spezies an bereits gebildete Partikel angelagert werden, die dadurch wachsen. Bei einer Mineralisationstemperatur von 60 °C ist im Vergleich zu 25 °C und 40 °C ein sehr schneller Verbrauch an Zr-Spezies zu beobachten (Abbildung 28 B). Gleichzeitig zeigten die DLS-Messungen ein sehr schnelles Partikelwachstum (Abbildung 24 E, F). Der schnelle Verbrauch an Zr-Spezies kann zum einen einer schnelleren Partikelbildung (Gleichung (39)) und einer höheren Keimbildungsrate (Gleichung (40)) zugeschrieben werden. Diese sind auf eine stärkere Übersättigung an gelösten Zr-Spezies (Gleichung (34)) aufgrund der Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten (Gleichung (28)) durch die höhere Mineralisationstemperatur zurückzuführen.^[42,43] Zum anderen führt auch ein schnelleres Partikelwachstum durch thermisch aktivierte Kondensationsreaktionen der löslichen Zr-Spezies zu einem schnelleren Verbrauch an Zr-Spezies.^[43] Eine erhöhte Keimbildungsrate führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der Partikelagglomeration durch Partikelstöße. Die DLS-Messungen der Mineralisationslösung bei 60 °C (Abbildung 24 E) zeigten nach 120 s (2 min) das Vorliegen großer Partikel neben kleinen Partikeln. In Kombination mit dem erhöhten Verbrauch an Zr-Spezies, lässt diese

Beobachtung neben dem Partikelwachstum durch Anlagern löslicher Zr-Spezies auch auf ein Partikelwachstum durch Agglomeration schließen.

Bei höherem Ethanolgehalt (Abbildung 28 C) ist anfänglich (Zeitpunkt $t = 0$ min; erste Messung direkt nach der Herstellung der Mineralisationslösung) ein stärkerer Verbrauch an Zr-Spezies zu verzeichnen, da hier die Dielektrizitätskonstante mit höherem Ethanolgehalt sinkt. Dies weist auf eine schnellere Primärpartikelbildung hin (Gleichung (28), (34) und (40)). Im weiteren Verlauf der Mineralisation verhalten sich die beiden Lösungen ähnlich in Bezug auf den Zr-Verbrauch. Da allerdings trotz ähnlichem Zr-Verbrauch bei 90 % Ethanolgehalt sowohl die kleinen Partikel von 30 nm auf 60 nm im Vergleich zu 10 nm auf 17 nm bei 80 % Ethanolgehalt schneller wachsen (Abbildung 26), als auch die großen Partikel weiterwachsen (Abbildung 26 C), ist auch dies ein Hinweis auf Partikelwachstum durch Agglomeration.

Die ICP-Messungen der unterschiedlichen Mineralisationssysteme zeigen durch einen Vergleich mit den DLS-Messungen ein Auftreten von Partikelagglomeration mit abnehmender Salzkonzentration, zunehmender Temperatur und zunehmendem Ethanolgehalt. Um die Partikelagglomeration verhindern zu können, sind Kenntnisse über den Agglomerationsprozess und die Einflussfaktoren auf die Agglomeration erforderlich, die im Folgenden genauer betrachtet werden.

6.1.2 Partikelagglomeration

Wie bisher gezeigt wurde, findet die Bildung größerer Partikel in der Mineralisationslösung hauptsächlich durch Agglomeration der kleineren Partikel statt. Die temperaturabhängigen DLS-Messungen des Partikelwachstums erlauben die Bestimmung einer Aktivierungsenergie für den Agglomerationsprozess. Entsprechend der 20 mM Mineralisationslösung mit 80 Vol % Ethanol (s. Abbildung 21 C) wurden auch für 30 mM und 50 mM Mineralisationslösungen mit 80 Vol % Ethanol zeitabhängige DLS-Messungen der Partikelgrößen bei 25 °C, 40 °C, 50 °C und 60 °C durchgeführt. Für die Bestimmung der Aktivierungsenergie wurde eine temperaturabhängige Geschwindigkeitskonstante k ermittelt. Diese entspricht der Steigung des linearen Bereichs der DLS Kurven (vgl. Abbildung 21 C), bei denen die mittlere Partikelgröße gegen die Zeit aufgetragen ist. Für die Temperaturabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante gilt folgender Zusammenhang:^[207]

$$k \sim \exp(-E_A/RT), \quad (41)$$

wobei E_A die Aktivierungsenergie des Wachstumsprozesses darstellt, R die absolute Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Durch Auftragen von $\ln(k)$ gegen $1/RT$ (s. Gleichung (41)) konnte die Aktivierungsenergie für die Agglomeration aus der Steigung bestimmt werden.^[207] Für die Mineralisationssysteme mit 80 Vol % Ethanol und Salzkonzentrationen von 20 mM, 30 mM und 50 mM ergaben sich Aktivierungsenergien von $180 \pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$, $190 \pm 10 \text{ kJ mol}^{-1}$ und $210 \pm 40 \text{ kJ mol}^{-1}$. Dabei nehmen die Aktivierungsenergien mit zunehmender Salzkonzentration leicht zu. Dies zeigt, dass die Salzkonzentration einen Einfluss auf die Partikelagglomeration hat. Um diesen Einfluss genauer zu beschreiben wurde zunächst untersucht, ob die Partikelagglomeration von der Diffusion der Partikel in der Dispersion beeinflusst wird. Es wurde angenommen, dass die Partikel in Lösung allein aufgrund der Brownschen Molekularbewegung diffundieren (s. 4.9.1). Hierbei wird durch Stöße von Lösungsmittelmolekülen der Impuls zur Bewegung der Partikel übertragen. Da sich die Partikel einzig durch diese Impulsübertragung der Lösungsmittelmoleküle bewegen (Brownsche Molekularbewegung), ist die Partikelbewegung von der Bewegung der Lösungsmittelmoleküle abhängig. Zur Aktivierung der Partikeldiffusion muss somit die Bewegung der Lösungsmittelmoleküle aktiviert werden. Dies bedeutet, dass die Aktivierungsenergie für die Diffusion suspendierter Partikel der Aktivierungsenergie für die Diffusion der Lösungsmittelmoleküle entspricht. Letztere kann durch die Arrhenius-Andrade-Beziehung berechnet werden. Diese Beziehung beschreibt die Temperaturabhängigkeit der Viskosität η :^[208,209]

$$\eta = \eta_0 \cdot \exp\left(\frac{E_A}{RT}\right) \quad (42)$$

mit der präexponentiellen Viskosität η_0 , der Aktivierungsenergie E_A für den Platzwechsel der Lösungsmittelmoleküle und der idealen Gaskonstanten R . Hieraus kann bei bekanntem η_0 und bekannter Viskosität η des Lösungsmittels bei einer bestimmten Temperatur T die Aktivierungsenergie für den Platzwechsel der Lösungsmittelmoleküle berechnet werden. Wie oben beschrieben entspricht diese Aktivierungsenergie der Aktivierungsenergie für die Partikeldiffusion $E_{A,D}$ allein durch Brownsche Molekularbewegung. Für die Partikeldiffusion in der Mineralisationslösung (80 Vol % Ethanol) wurde mit $\eta_0 = 8,72 \cdot 10^{-7} \text{ kg (ms)}^{-1}$ ^[210] und $\eta(25 \text{ °C}) = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ kg (ms)}^{-1}$ ^[196] eine Aktivierungsenergie von 18 kJ mol^{-1} berechnet. Die Aktivierungsenergie für die Partikeldiffusion ist wesentlich

geringer als die Aktivierungsenergie für die Agglomeration. Daraus ergibt sich, dass die Geschwindigkeit der Partikelagglomeration nicht von der Diffusion der Partikel, sondern von der Partikelagglomeration, das heißt der Haftung der Partikel aneinander, bestimmt wird. Diese Haftung der Partikel kann durch zwischenpartikuläre Wechselwirkungen beeinflusst werden. Um den Einfluss der Lösungsparameter Salzkonzentration, Temperatur und Ethanolgehalt auf die Agglomeration der Partikel zu untersuchen, wurden anziehende und abstoßende Wechselwirkungen zwischen den Partikeln bei unterschiedlichen Lösungsparametern berechnet. Eine Grundlage für die Berechnung der zwischenpartikulären Wechselwirkungen ist die DLVO Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek), die in 4.3 eingeführt wurde. Hier wird sowohl die abstoßende elektrostatischen Wechselwirkung V_E als auch die anziehende van der Waals Wechselwirkung V_A , betrachtet. Um kolloidale Systeme auch bei sehr kleinen Partikelabständen – bis zum Partikelkontakt – realistisch zu beschreiben, muss zusätzlich noch die Born Abstoßung V_R betrachtet werden. Zur Berechnung der Gesamtwechselwirkungsenergie V_T zwischen Partikeln im vorliegenden Mineralisationssystem mit einem $ZrOCl_2$ -Salz und einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch wurden die in 4.3 eingeführten Gleichungen (Gl. (4)-(11)) verwendet. Die zur Berechnung der Gesamtwechselwirkungsenergie V_T benötigten Parameter sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Materialkonstanten für die Berechnung der Wechselwirkungsenergie V_T zwischen zwei Partikel in einem Suspensionsmittel. Eth/W = Ethanol/Wasser Lösungsmittelgemisch, ZrbM = Zirkonium-basiertes Material.

Parameter	Substanz	Wert des Parameters	Temperatur	Quelle
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Wasser	80,4	20 °C	[43]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Eth/W (80 % Eth)	33,0	25 °C	[43]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Eth/W (80 % Eth)	30,0	40 °C	[43]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Eth/W (80 % Eth)	28,4	50 °C	[43]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Eth/W (80 % Eth)	26,7	60 °C	[43]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Eth/W (90 % Eth)	29,0	20 °C	[211]
relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	Ethanol	25,0	20 °C	[43]

Fortsetzung Tabelle 9

relative Dielektrizitätskonstante ϵ_r	ZrbM	18,0	-	[212]
Brechungsindex n	Wasser	1,3325	25 °C	[68]
Brechungsindex n	Eth/W (80 % Eth)	1,3625	25 °C	[69]
Brechungsindex n	Eth/W (80 % Eth)	1,357	40 °C	[69]
Brechungsindex n	Eth/W (80 % Eth)	1,353	50 °C	[69]
Brechungsindex n	Eth/W (80 % Eth)	1,348	60 °C	[69]
Brechungsindex n	Eth/W (90 % Eth)	1,3604	25 °C	[213]
Brechungsindex n	Ethanol	1,359	25 °C	[214]
Brechungsindex n	ZrO ₂ ·xH ₂ O	1,55	-	[67]
Kollisionsdurchmesser σ	Oxide	0,5 x 10 ⁻⁹ m	-	[70,71]
elektronische Absorptionsfrequenz ν_e	-	3 x 10 ¹⁵ s ⁻¹	-	[65]

Als Zetapotential der mineralisierten Partikel wurde ein Wert von 40 mV eingesetzt, der in einer wässrigen 10 mM NaCl-Lösung bei pH 2,4 mittels elektrophoretischer Messung (s. 5.10.3) bestimmt wurde. Als Elektrolytkonzentration wurde die Konzentration des Salzes ZrOCl₂·8H₂O verwendet. In Wasser gelöst, liegt das Salz in Form von Zr-Tetrameren [Zr₄(OH)₈(H₂O)₁₆]⁸⁺ vor. Zur Berechnung der Elektrolytkonzentration wurde das Zr-Tetramer als Kation und Chlorid (Cl⁻) als Anionen berücksichtigt. Als Partikelgröße wurde die anfängliche mittlere Partikelgröße ($t = 0$ min) von $d \sim 10$ nm ($r = 5$ nm) aus den DLS-Messungen (Abbildung 21) eingesetzt.

In Abbildung 29 ist die berechnete Gesamtwechselwirkungsenergie V_T als Funktion des Partikelabstands H für unterschiedliche Lösungsparameter dargestellt. Die Gesamtwechselwirkungsenergie berechnet sich aus den Beiträgen der elektrostatischen Abstoßung, der anziehenden van der Waals Wechselwirkung und der Born Abstoßung, die bei kleinen Partikelabständen wirkt.

Zunächst wird der Einfluss der Konzentration auf die Wechselwirkungen bei einem Partikelradius von 5 nm, einem Zetapotential von 40 mV, einem Ethanolgehalt von 80 % sowie einer Temperatur von 40 °C betrachtet.

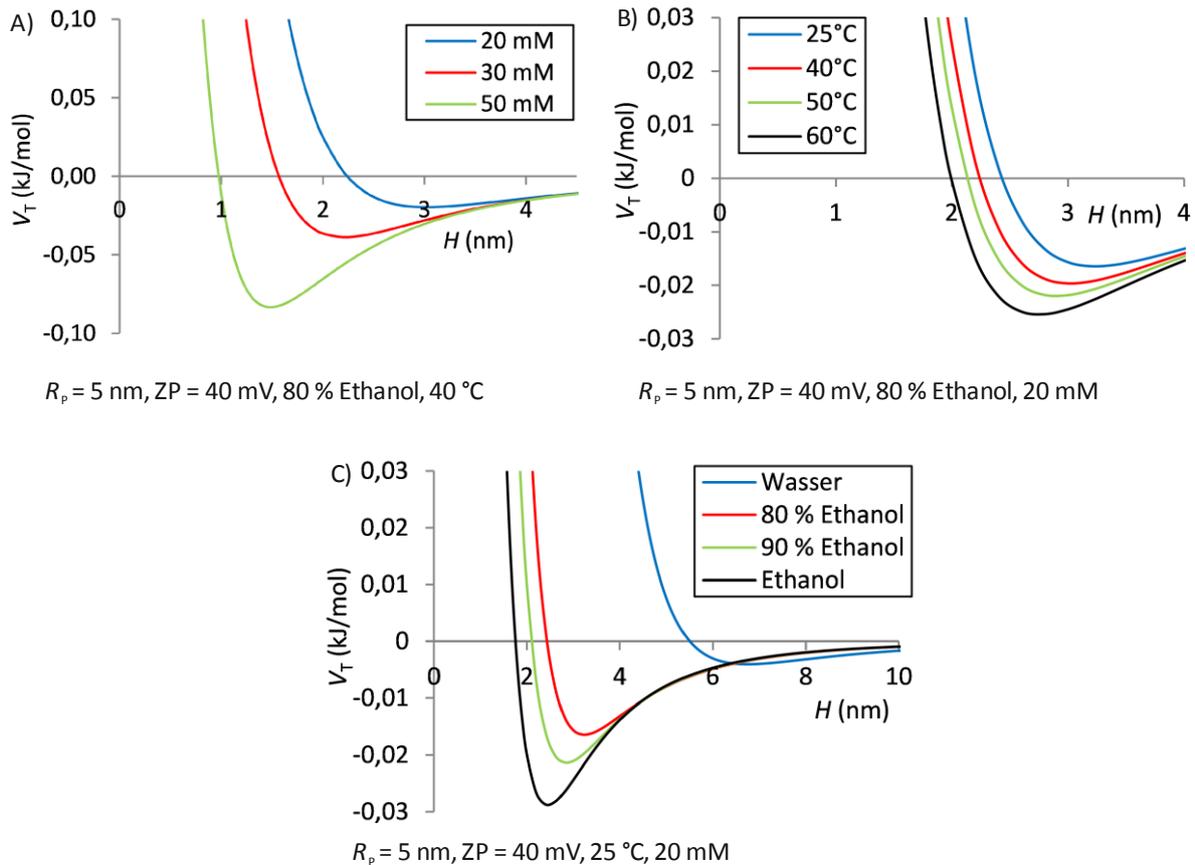


Abbildung 29: Gesamtwechselwirkung V_T zwischen zwei gleich großen Partikeln in Abhängigkeit des Partikelabstandes H bei unterschiedlichen Systemparametern. Es werden Partikelradien (R_p) von 5 nm angenommen. Für das Zetapotential (ZP) werden 40 mV eingesetzt.

Die entsprechenden Kurven unterschiedlicher Salzkonzentration (Abbildung 29 A) zeigen ein Minimum bei Partikelabständen zwischen 1,5 und 3,0 nm. Dieser Partikelabstand entspricht dem Gleichgewichtsabstand der Partikel. Mit zunehmender Salzkonzentration verschiebt sich das Minimum zu negativeren Werten von V_T . Gleichzeitig nimmt der Partikelabstand H ab. Eine Erhöhung der Salzkonzentration und damit der Anzahl an potentiellen Gegenionen in Lösung, würde demnach zu einer stärkeren Anziehung zwischen Partikeln und einem kleineren Partikelabstand führen. Allerdings ist die anziehende Wechselwirkungsenergie mit $-0,02 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 20 mM, $-0,04 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 30 mM und $-0,08 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 50 mM sehr klein in Bezug auf die thermische Energie $RT = 2,6 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 40 °C. Hieraus lässt sich schließen, dass die Agglomeration der Partikel nicht allein auf der anziehenden Wechselwirkungen beruht, denn dieser Wechselwirkung wirkt die thermisch aktivierte Partikelbewegung entgegen. Letztere kann die Partikelagglomeration wieder lösen.^[70] Eine

Erhöhung der Mineralisationstemperatur von 25 °C auf 60 °C zeigt ebenfalls eine stärkere Anziehung der Partikel bei kürzerem Partikelabstand (Abbildung 29 B). Allerdings ist auch hier Wechselwirkungsenergie sehr gering. Sie liegt zwischen $-0,02 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 25 °C und $-0,03 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 60 °C und sind deutlich geringer als die thermische Energie von $2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 25 °C und $2,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ bei 60 °C. Der Einfluss des Lösungsmittels zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen reinem Wasser und Ethanol-haltigem Lösungsmittel (Abbildung 29 C). Die Zugabe von Ethanol führt im Vergleich zu den anderen Einflussgrößen, zu einer starken Verschiebung des Minimums zu kleineren Partikelabständen und größerer negativer Wechselwirkungsenergie. In reinem Wasser beträgt der Partikelabstand 6,8 nm in reinem Ethanol 2,4 nm. Während in wässriger Lösung kaum Anziehung zwischen den Partikeln wirkt (circa 0 kJ mol^{-1}), führt eine Wechselwirkungsenergie von $-0,03 \text{ kJ mol}^{-1}$ zu einer anziehenden Wechselwirkung in Ethanol. Allerdings ist auch hier die Wechselwirkungsenergie sehr gering im Vergleich zur thermischen Energie bei 25 °C von $2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$.

Die Berechnungen der Wechselwirkungsenergien zwischen dispergierten Partikeln bei unterschiedlichen Lösungsparametern zeigen, dass der Einfluss einer anziehenden Partikelwechselwirkung auf die Agglomeration sehr gering ist. Die Wechselwirkungsenergien sind mindestens um den Faktor 32 kleiner als die thermische Energie (Mineralisationssystem 50 mM, 40 °C: $-0,08 \text{ kJ mol}^{-1}$; $RT = 2,6 \text{ kJ mol}^{-1}$). Daher werden Partikel, die allein aufgrund einer anziehenden Wechselwirkung agglomerieren durch die thermisch aktivierte Partikelbewegung wieder gelöst. Daraus ergibt sich, dass weitere Faktoren zur Partikelagglomeration beitragen müssen. Ein möglicher Faktor sind Kondensationsreaktionen durch Olation entsprechend Gleichung (12) und (14), die zu einer festen Bindung zwischen Partikel untereinander und daher zur Agglomeration führen. Die koordinativ gebundenen OH-Liganden gehen dabei in überbrückende Liganden über.^[62] Diese Reaktionen (Gleichung (12) und (14)) laufen bei erhöhter Temperatur und höherem pH-Wert schneller ab.^[98,215]

6.1.3 Einflussgrößen auf Partikelwachstum und -agglomeration

Die Untersuchungen der Mineralisationslösung mittels DLS- und ICP-OES-Messungen sowie die berechnete Aktivierungsenergie und interpartikuläre Wechselwirkungsenergie ermöglichten, den Einfluss der Salzkonzentration, der Temperatur und des Ethanolgehalts

auf das Partikelwachstum und die Partikelagglomeration zu identifizieren. In diesem Abschnitt werden die bisher beschriebenen Einflüsse zusammengefasst, um so das Partikelwachstum und die Partikelagglomeration bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen umfassend zu beschreiben.

Mit zunehmender Salzkonzentration wurde bei 40 °C eine langsamere Partikelagglomeration beobachtet (s. 6.1.1). Bei der höchsten Salzkonzentration von 50 mM fand nur sehr geringes Partikelwachstum statt. Hier lag eine monomodale, monodisperse Partikelgrößenverteilung vor. Die berechneten anziehenden interpartikulären Wechselwirkungsenergien waren für die unterschiedlichen Salzkonzentrationen sehr gering – sie waren mindestens um den Faktor 32 kleiner als die thermische Energie. Dies würde bedeuten, dass gebildete Agglomerate durch eine thermisch aktivierte Partikelbewegung wieder gelöst werden.^[70] Daher müssen andere Faktoren zum Partikelwachstum durch Agglomeration beitragen. Ein möglicher Faktor sind Kondensationsreaktionen durch Olation entsprechend Gleichung (12) und (14), die zu einer festen Bindung zwischen Partikeln führen. Die koordinativ gebundenen OH-Liganden gehen dabei in überbrückende Liganden über.^[62] Die pH-Wert abhängige Kondensationsreaktion wird bei einem höheren pH-Wert begünstigt. Eine Voraussetzung für Kondensationsreaktionen sind hydroxylierte Vorstufen, die sich durch Deprotonierung von koordinativ gebundenem Wasser bilden. Die Hydroxylierung ist nach Gleichung (14) pH-Wert abhängig. Sie wird durch einen höheren pH-Wert begünstigt. Eine abnehmende Salzkonzentration von 50 mM auf 20 mM führt zu einer Zunahme des pH-Werts der Mineralisationslösung von 1,52 auf 2,12. Dies kann die Hydroxylierung und Kondensation beschleunigen und somit zu einer stärker ausgeprägten Partikelagglomeration führen. Auch das Wachstum der kleinen Partikel durch Addition von kleinen Zr-Spezies wird durch diese Reaktionen beschleunigt (s. 6.1.1). Zusätzlich können nicht koordinierte Cl-Ionen die Partikelagglomeration beeinflussen.^[96] Mineralisierte Partikel bilden in sauren Bedingungen durch Adsorption von H⁺ Ionen an Oberflächenhydroxygruppen positiv geladene Partikeloberflächen (IEP ~ pH 7, s. 6.1.4). An diese adsorbieren Cl-Ionen aus der Lösung. Die adsorbierten Cl-Ionen können die Kondensationsreaktion (Oberflächenreaktionen), die zum Wachstum der Partikel und zur Partikelagglomeration führt, behindern.^[96] Die Adsorption von Cl-Ionen ist abhängig von der Oberflächenladung. Bei einer 50 mM ZrOCl₂-Lösung mit einem geringeren pH-Wert, liegt eine leicht höhere positive

Oberflächenladung vor (Abbildung 33). Diese führt zu einer verstärkten Adsorption von Cl⁻-Ionen und somit zu einer stärkeren Hinderung der Kondensationsreaktion.^[96]

Für die Temperaturabhängigkeit des Partikelwachstums zeigten die DLS-Untersuchungen ein schnelleres Partikelwachstum und eine schnellere Agglomeration mit steigender Temperatur (6.1.1). Auch hier haben die sehr geringen anziehenden Wechselwirkungsenergien zwischen Partikeln nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Agglomeration (s. Abbildung 29 B in 6.1.2). Da nicht nur der pH-Wert, sondern auch die Temperatur die Hydroxylierung und Kondensationsreaktion (Gleichung (14)) beschleunigt,^[42] kann auch hier das schnellere Partikelwachstum und die verstärkte Agglomeration mit erhöhter Temperatur durch eine beschleunigte Hydroxylierung und Kondensationsreaktion erklärt werden. Einen zusätzlichen Einfluss auf die Partikelbildung kann der Temperaturabhängigkeit der Dielektrizitätskonstante zugeschrieben werden.^[42,43] Mit steigender Temperatur nimmt die Dielektrizitätskonstante ab (s. Tabelle 9). Dies führt zu einer abnehmenden Löslichkeit vorhandener Zr-Spezies (Gleichung (28)), die die Keimbildung durch stärkere Übersättigung beschleunigt (Gleichung (34) und (40)).^[42,43] Allerdings zeigen ICP-Messungen bei 25 °C und 40 °C (Abbildung 28 B) keinen Unterschied im Verbrauch an löslichen Zr-Spezies. Erst eine Temperaturerhöhung auf 60 °C führt zu einem stärkeren Verbrauch an solchen Spezies. Dieser stärkere Verbrauch kann zum einen auf eine erhöhte Keimbildungsrate durch eine deutliche Erniedrigung der Dielektrizitätskonstanten von 33,0 bei 25 °C^[43] auf 26,7 bei 60 °C^[43] zurückgeführt werden (Gleichungen (28), (34) und (40)). Eine beschleunigte Keimbildung führt zur Bildung einer höheren Anzahl an Primärpartikeln, die durch eine erhöhte Kollisionswahrscheinlichkeit schneller durch Kondensationsreaktionen agglomerieren können. Zum anderen kann der stärkere Verbrauch an löslichen Zr-Spezies auch auf ein schnelleres Partikelwachstum durch Kondensationsreaktionen dieser Zr-Spezies mit bereits bestehenden Partikeln zurückgeführt werden. Dieses Partikelwachstum wird durch beschleunigte Hydroxylierung und Kondensationsreaktion bei 60 °C begünstigt. Der unterschiedliche Verbrauch an löslichen Zr-Spezies (Abbildung 28 B) lässt somit darauf schließen, dass das Partikelwachstum und die Partikelagglomeration bei Temperaturen bis mindestens 40 °C vor allem durch aktivierte Hydroxylierung und Kondensationsreaktion beschleunigt werden, während bei höheren Temperaturen (60 °C) zusätzlich die Präzipitation von löslichen Zr-Spezies durch

eine stärkere Übersättigung (Gleichungen (28) und (34)) und damit die Keimbildungsrate (Gleichung (40)) beeinflusst wird.

Die Erhöhung des Ethanolgehalts im Lösungsmittel führte ebenfalls zu schnellerem Partikelwachstum und schnellerer Partikelagglomeration (6.1.1). Ein höherer Ethanolgehalt resultiert in einer Abnahme der Dielektrizitätskonstanten (s. Tabelle 9). Die Dielektrizitätskonstante nimmt von 33 bei 80 % Ethanol auf 29 bei 90 % ab. Somit wird durch die Zunahme des Ethanolgehalts die Keimbildung durch stärkere Übersättigung beschleunigt (Gleichungen (28), (34) und (40)). Dies wird daran deutlich, dass bei 90 % Ethanol bereits direkt nach der Herstellung der Mineralisationslösung ein stärkerer Verbrauch an Zr-Spezies im Vergleich zu 80 % Ethanol beobachtet wurde (s. Abbildung 28). Auch die anfängliche mittlere Partikelgröße ($t = 0$ min) bei 90 % Ethanol ist mit 30 nm mehr als doppelt so groß als bei 80 % Ethanol (12 nm) (Abbildung 21). Eine beschleunigte Präzipitation kann zur Bildung einer höheren Anzahl an Primärpartikeln führen (Gleichungen (40)), die durch eine erhöhte Kollisionswahrscheinlichkeit schneller durch Kondensationsreaktionen agglomerieren können. Interpartikuläre Wechselwirkungsenergien sind auch hier so gering (s. Abbildung 29 C), dass sie einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Partikelagglomeration haben.

Die umfassende Untersuchung des Mineralisationssystems aus $ZrOCl_2$ in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch zeigten, dass die Partikelagglomeration hauptsächlich durch den pH-Wert, die Temperatur und den Ethanolgehalt beeinflusst werden. Ein niedriger pH-Wert, eine niedrige Temperatur sowie ein niedriger Ethanolgehalt können die Agglomeration verhindern und somit eine stabile Dispersion gewährleisten. Ein Mineralisationssystem, das den anfangs beschriebenen Anforderungen an die Mineralisation (*i*) Bildung einer stabilen Dispersion mit Partikelgrößen im unteren Nanometerbereich, (*ii*) niedrige Mineralisationstemperatur, (*iii*) und relativ hoher pH-Wert (>2 , optimal 6-8) entspricht, ist das System mit 20 mM $ZrOCl_2$, 80 % Ethanol und einer Mineralisationstemperatur von 25 °C. Hier bilden sich bei pH 2,12 über einen Zeitraum von 90 min Partikel mit einer nahezu konstanten Partikelgröße von 12 nm bis 17 nm. Dieses System wurde eingesetzt, um den Templateinfluss auf das Mineralisationsverhalten zu untersuchen (s. 6.3.3).

6.1.4 Mineralisationsprodukt

Die Untersuchung des Templateinflusses auf das Mineralisationsverhalten wurde bei Zimmertemperatur (ZT) durchgeführt. Zur schnelleren Mineralisation von Schichten wurde die Mineralisationstemperatur später auf 60 °C erhöht (6.4.2), die Mineralisationszeit entsprechend reduziert. Daher wird im Folgenden auf die Charakterisierung des Mineralisationsproduktes bei ZT (~ 25 °C) und bei 60 °C eingegangen.

Zur Charakterisierung der elementaren Zusammensetzung des Mineralisationsprodukts wurde eine EDX-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde eine bei 60 °C mineralisierte Schicht analysiert. Die Messungen zeigten, dass neben Zr und O auch kleine Mengen an C und Cl im Mineralisationsprodukt enthalten sind. Der Kohlenstoff C kann in Form von Oberflächenverunreinigungen vorliegen oder ein Hinweis auf vorhandenes Ethanol im Mineralisationsprodukt sein.^[24] Um genauere Aussagen über die Zusammensetzung des Mineralisationsprodukts treffen zu können, wurden thermische Analysen sowie XPS-Messungen durchgeführt.

Mittels simultaner TG- und DSC-Messung wurden die bei 30 °C und 60 °C hergestellten Mineralisationsprodukte thermisch analysiert (Abbildung 30). Da bei Zimmertemperatur nur nach sehr langer Inkubationszeit (vier Monate) ein Mineralisationsprodukt abzentrifugiert werden konnte, wurde die Mineralisationstemperatur bei der Probenherstellung auf 30 °C erhöht. Hier konnte nach fünf Tagen ein Mineralisationsprodukt abzentrifugiert werden. Die TG-Kurve einer bei 60 °C mineralisierten und bei 100 °C für 4 h getrockneten Probe ist in Abbildung 30 A) gezeigt. Zwischen 30 °C und 300 °C ist eine erste Massenabnahme von 10 % zu beobachten. Diese ist verbunden mit einem endothermen Peak bei 160 °C. Durch eine massenspektrometrische Untersuchung der Abgangsprodukte wurde bei dieser Temperatur OH⁺ und H₂O⁺ (Masse (*m*)-zu-Ladungs (*z*)-Verhältnis $m/z = 17$ (OH⁺), 18 (H₂O⁺)) sowie die Chlorisotope ³⁵Cl⁺ und ³⁷Cl⁺ ($m/z = 35$ (³⁵Cl⁺), 37 (³⁷Cl⁺)) detektiert. Das freigesetzte Wasser wird physikalisch adsorbiertem Wasser zugeschrieben. Zwischen 300 °C und 430 °C tritt ein weiterer Massenverlust von 11 % auf, ebenfalls verbunden mit einem endothermen Peak (330 °C). Hier wurden CO₂ ($m/z = 44$ (CO₂⁺)) sowie H₂O als entweichende gasförmige Spezies beobachtet. Dies weist auf eine beginnende oxidative Zersetzung von Ethoxygruppen hin.^[216,217]

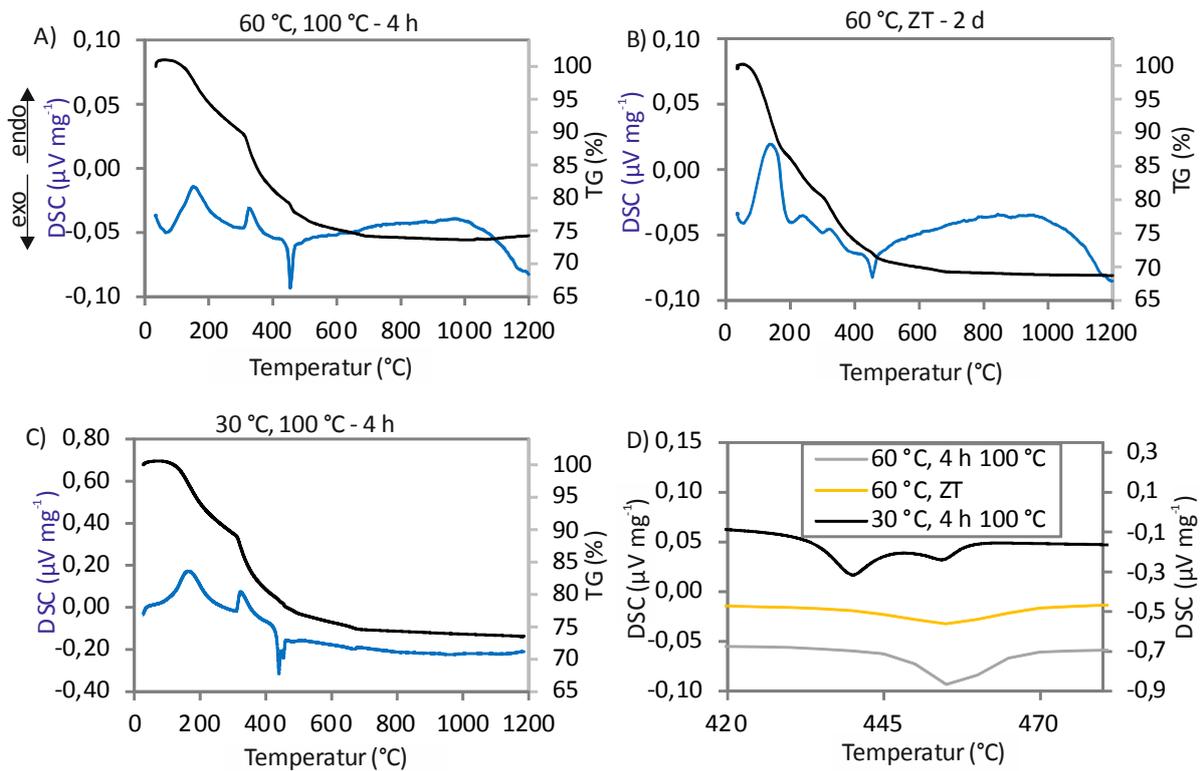
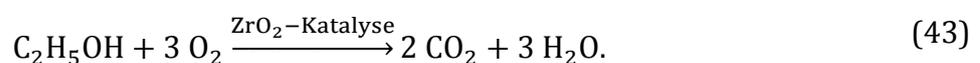


Abbildung 30: Thermische Analysen der bei 30 °C und 60 °C mineralisierten Zr-basierten Materialien. Dargestellt sind sowohl die Ergebnisse der Thermogravimetrischen Analyse (TG), als auch die der Dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC). A) und B) Die bei 60 °C und 10 min mineralisierten Proben unterscheiden sich lediglich im Trocknungsprozess. A) Trocknung im Ofen unter Luftatmosphäre bei 100 °C für vier Stunden, B) Trocknung an Luft bei Zimmertemperatur (ZT) für zwei Tage (2 d). C) Die Probe wurde bei 30 °C fünf Tage mineralisiert und bei 100 °C unter Luftatmosphäre für vier Stunden getrocknet. D) Ausschnitt aus den DSC-Kurven von A)-C).

Diese gasförmigen Spezies (CO_2 und H_2O) wurden auch bei TG und DSC Untersuchungen von amorphen Zr-basierten Partikeln, die aus einer ZrCl_4 -Lösung durch NH_4OH gefällt wurden, beobachtet.^[218] Das gefällte Mineralisationsprodukt wurde in Ethanol gewaschen. Durch diesen Waschschrift wurden Hydroxygruppen auf den Partikeloberflächen durch Ethoxygruppen ausgetauscht. Während der thermischen Analyse an Luft wurden ab einer Temperatur von circa 300 °C neben CO^+ (wurde in dieser Arbeit nicht detektiert) ebenfalls CO_2^+ und H_2O^+ als gasförmige Spezies detektiert. Die Entstehung dieser Spezies wurde auf die ZrO_2 katalysierte Verbrennung von Ethanol zurückgeführt:^[218,219]



Im Vergleich dazu entstanden bei der thermischen Analyse desselben Mineralisationsprodukts in einer reinen N₂-Atmosphäre lediglich Ethylen-Spezies. Auch in dieser Arbeit wurden die thermischen Analysen in einer O₂-Atmosphäre durchgeführt, die die ZrO₂ katalysierte Verbrennung von Ethanol zu CO₂ und H₂O ermöglicht. Der starke endotherme Peak bei 330 °C wird der Abspaltung von chemisorbiertem Wasser zugeschrieben. Mehrere, in der Literatur beschriebene TG/DSC-Untersuchungen in Kombination mit Massenspektrometrie von Zirkonium-basierten Materialien, welche aus einer wässrigen Lösung entstanden sind, zeigen zwei endotherme Peaks, die beide auf die Abspaltung von Wasser zurückgeführt werden.^[217,220-224] Der Peak bei niedrigen Temperaturen, die von 69 °C^[222] bis 230 °C^[217] variieren, wird jeweils physisorbiertem Wasser zugeschrieben. Bei einer höheren Temperatur werden endotherme Peaks zwischen 115 °C^[221] und 423 °C^[220] beobachtet. Diese werden der Abspaltung von chemisorbiertem Wasser zugeschrieben. Die Wasserabspaltung in dieser Arbeit tritt durchgängig von 30 °C bis circa 460 °C auf. Dies kann sowohl auf physikalisch oder chemisch gebundene Wassermoleküle, als auch auf Wassermoleküle, die durch Olation (Gleichung (12)) oder Oxolation (Gleichung (13)) innerhalb des Mineralisationsproduktes entstehen, zurückgeführt werden. Auch geringe Mengen möglicher brückenbildender Ethoxygruppen oder koordinierter Ethanol-Moleküle können über Olation (Gleichung (12)) oder Oxolation (Gleichung (13)) Ethanol freisetzen (Detektion von CO₂⁺). Zusätzlich werden ab 330 °C auch Cl-Spezies freigesetzt. Um 460 °C tritt schließlich Kristallisation des amorphen ZrbM auf. Dies wird durch den exothermen Peak deutlich und durch XRD-Untersuchungen bestätigt (s. unten). Die Kristallisation ist verbunden mit einem spontanen Freisetzen von OH-Gruppen, H₂O und CO₂ sowie einer sprunghaften Massenabnahme von 2 %. Auch ³⁵Cl⁺ und ³⁷Cl⁺ wurden detektiert. Die Detektion von CO₂⁺ deutet auf eine zusätzliche exotherme oxidative Zersetzung chemisorbierter Ethoxygruppen unter CO₂-Bildung hin (s. Gleichung (43)). Nach der Kristallisation zeigt die TG-Kurve bis zu einer Temperatur von 1000 °C eine weitere Massenabnahme von circa 3 %. Diese ist auf weitere Abspaltung hauptsächlich von Cl-Spezies und CO₂ zurückzuführen. Insgesamt weist die Probe einen Masseverlust von 26 % auf. In Abbildung 30 B) ist die thermische Analyse der bei ZT für zwei Tage getrockneten Probe zu sehen. Bei dieser Probe tritt im Vergleich zur bei 100 °C für vier Stunden getrockneten Probe zusätzlich ein endothermer Peak bei 240 °C auf. Dieser ist verbunden mit dem verstärkten Freisetzen von CO₂ und C₂H₅[•] bei circa 220 °C sowie von H₂O und OH[•] bei 240 °C (Detektion der einzelnen

Spezies über Massenspektrometrie). Die Detektion von CO_2^+ kann physikalisch adsorbiertem CO_2 während des Trocknungsprozesses an Luft für zwei Tage zugeschrieben werden. Auch die amorphen Zr-basierten Partikel, die durch einen Waschschrift in Ethanol Ethoxygruppen auf der Oberfläche besitzen (s. o.) wurden nach dem Waschschrift für 40 h bei 73 °C an Luft getrocknet.^[218] Unterhalb 300 °C zeigten TG, DSC und FTIR Messungen neben der Desorption von physikalisch adsorbiertem Ethanol auch die Desorption von physikalisch adsorbiertem CO_2 und H_2O .^[218] Bei dem in dieser Arbeit vorliegenden Mineralisationsprodukt (Abbildung 30 B) sind alle drei endothermen Peaks, bei circa 150 °C, 240 °C und 330 °C, mit dem Freisetzen von Wasser verbunden (s. Detektion von H_2O^+ und OH^+ in Abbildung 31 A). Auch ein amorphes Mineralisationsprodukt, das aus einer wässrigen $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung nach Zugabe einer Base abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen wurde, zeigte drei Bereiche in denen Wasser freigesetzt wurde.^[225,226] Dies ergaben TG und DSC-Messungen in Kombination mit XRD-Messungen.^[225,226] Im Temperaturbereich von 200 °C bis 250 °C wurde physikalisch adsorbiertes Wasser freigesetzt während zwischen 250 °C und 300 °C chemisorbiertes Wasser freigesetzt wurde. Bei Temperaturen zwischen 300 °C und 350 °C entstand Wasser durch Oxolationsreaktionen, d.h. durch die Reaktion zweier Hydroxygruppen, die zur Bildung einer Sauerstoffbrücke Zr-O-Zr führt.^[225,226] Erste Untersuchungen zeigten dabei, dass sich ZrbM, welches aus der wässrigen $\text{ZrO}(\text{NO}_3)_2$ entsteht, von dem einer wässrigen ZrOCl_2 -Lösung lediglich in der Anzahl der vorliegenden Sauerstoffbrücken Zr-O-Zr, Hydroxybrücken Zr-(OH)₂-Zr und koordinativ gebundener Wassermoleküle unterscheidet.^[225,226] Basierend auf diesen Ergebnissen wird dem in dieser Arbeit bei 240 °C beobachteten endothermen Peak der DSC-Kurve (Abbildung 30 B und Abbildung 31 B) hauptsächlich die Desorption von CO_2 und chemisorbiertem Wasser sowie die Desorption von physikalisch adsorbiertem Ethanol zugeschrieben (Detektion von C_2H_5^+). Dem endothermen Peak bei circa 330 °C (Abbildung 30 B und Abbildung 31 B) wird die Abspaltung von Wasser durch Oxolationsreaktionen zugeschrieben, die zur Bildung von Sauerstoffbrücken (Zr-O-Zr) führt. Ein Vergleich der bei 100 °C für vier Stunden getrockneten Probe (Abbildung 30 A) mit der bei ZT für zwei Tage getrockneten Probe (Abbildung 30 B) lässt somit auch den endothermen Peak bei 330 °C bei der bei 100 °C getrockneten Probe (Abbildung 30 A) auf die Wasserabspaltung durch Oxolationsreaktionen zurückführen. Bisher wurde angenommen, dass bei dieser Temperatur chemisorbiertes Wasser freigesetzt wird. Die Auswertung der bei ZT getrockneten Probe (Abbildung 31)

ergab jedoch, dass chemisorbiertes Wasser bei circa 240 °C freigesetzt wird. Bei der bei 100 °C getrockneten Probe ist bei 240 °C eine leichte Schulter des bei circa 160 °C auftretenden endothermen Peaks zu erkennen (Abbildung 31 B).

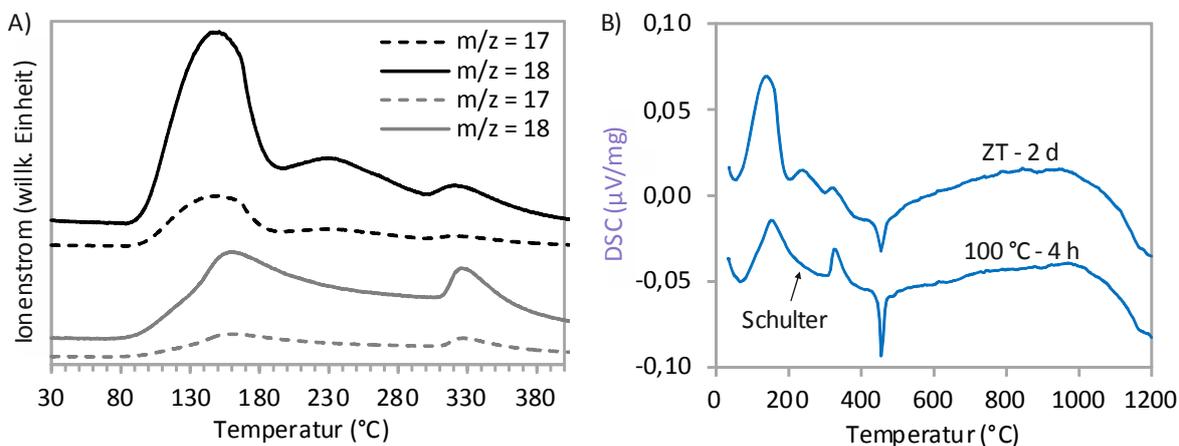


Abbildung 31: A) Massenspektrum (OH⁺ ($m/z = 17$) und H₂O⁺ ($m/z = 18$)) von bei 60 °C mineralisiertem ZrbM im Temperaturbereich zwischen 30 °C und 400 °C. Grau: Massenspektrum der bei 100 °C für vier Stunden getrockneten Probe (vgl. Abbildung 30 A). Schwarz: Massenspektrum der bei ZT für zwei Tage getrockneten Probe (vgl. Abbildung 30 B). B) Vergleich DSC-Kurven der bei 60 °C mineralisierten Proben aus ZrbM. Die beiden Proben unterscheiden sich in der Trocknung nach Abzentrifugieren und Waschen des Präzipitats. Das ZrbM wurde entweder bei Zimmertemperatur (ZT) für zwei Tage oder bei 100 °C für vier Stunden jeweils an Luft getrocknet.

Die deutlich stärker ausgeprägten Peaks der bei ZT getrockneten Probe bei circa 150 °C und 240 °C in Abbildung 31 A) und B) im Vergleich zu der bei 100 °C getrockneten Probe zeigen, dass bei der bei ZT getrockneten Probe deutlich mehr physisorbiertes (Peak bei circa 150 °C) und chemisorbiertes Wasser (Peak bei circa 240 °C) entweicht im Vergleich zur Wasserabspaltung durch Oxolationsreaktionen (Peak bei circa 330 °C). Zusätzlich zur Abspaltung von chemisorbiertem Wasser entweicht bei der bei ZT getrockneten Probe bei 240 °C auch physikalisch adsorbiertes CO₂ sowie Ethanol (Detektion von CO₂⁺ und C₂H₅⁺). Bei der „100 °C-Probe“ sind die physisorbierten Ethanol-Moleküle sowie chemisorbierten Wassermoleküle vermutlich schon während des Trocknungsschrittes desorbiert oder abgespalten worden. Die Trocknungszeit der „100 °C-Probe“ im Ofen unter Luftatmosphäre war mit 4 h deutlich geringer als die Trocknungszeit der bei ZT für zwei Tage getrockneten Probe. Somit konnte an die bei ZT getrocknete Probe wesentlich mehr CO₂ adsorbieren. Bis circa 300 °C ist bei der bei ZT getrockneten Probe ein Masseverlust von etwa 20 % zu ver-

zeichnen (Abbildung 30 B, TG-Achse). Dieser ist doppelt so hoch wie bei der bei 100 °C getrockneten Probe, die bei 300 °C ein Masseverlust von etwa 10 % aufweist (Abbildung 30 A, TG-Achse), und kann zusätzlich zur verstärkten Desorption physisorbierter Wasser-Moleküle und der Abspaltung chemisorbierter Wasser-Moleküle auch der Desorption physisorbierter Ethanol- und CO₂-Moleküle zugeschrieben werden. Bis zur Kristallisation (460 °C) ist bei der bei ZT getrockneten Probe ein größerer Masseverlust von 29 % (einschließlich Kristallisation) zu beobachten (Abbildung 30 B). Die bei 100 °C getrocknete Probe wies bis zur Kristallisation bei 460 °C einen Masseverlust von 23 % auf (Abbildung 30 A). Nach der Kristallisation verhalten sich die beiden Proben ähnlich (s. Abbildung 30 A und B). Bei der bei ZT getrockneten Probe wird insgesamt ein Masseverlust von 31 % gemessen (Abbildung 30 B). Die TG-Kurve der bei 30 °C mineralisierten und bei 100 °C für 4 h vorgetrockneten Probe (Abbildung 30 C) ist sehr ähnlich zur TG-Kurve der bei 60 °C mineralisierten Probe (Abbildung 30 A). Einzig die DSC-Kurven zeigen bei der Kristallisation bei 450 °C einen kleinen Unterschied. Hier ist zu berücksichtigen, dass die 30 °C-Probe mit einer langsameren Heizrate von 5 K/min (60 °C; 10 K/min) aufgeheizt wurde. Die DSC-Kurve zeigt für diese Probe zwei etwas überlappende Peaks, einen bei 440 °C (exo) und einen bei 455 °C (exo). Auch bei amorphen Zr-basierten Partikeln, die durch Präzipitation aus einer ZrOCl₂-[222] bzw. einer ZrCl₄-Lösung^[218] durch NH₄OH gefällt wurden, wurden zwei exotherme Peaks im Bereich der Kristallisation beobachtet. Das gefällte Mineralisationsprodukt wurde in Ethanol gewaschen. Dieser Waschschrift führte zu einem Austausch der Hydroxygruppen auf den Partikeloberflächen durch Ethoxygruppen. Der Peak bei niedrigerer Temperatur wurde auf die oxidative Zersetzung der chemisorbierten Ethanolspezies zurückgeführt. Der zweite Peak auf die Kristallisation des amorphen Mineralisationsprodukts zu tetragonalem ZrO₂. In Anlehnung daran wird auch in dieser Arbeit der Peak bei 440 °C auf eine weitere oxidative Zersetzung von chemisorbierten Ethanolspezies zurückgeführt und der zweite Peak bei 455 °C auf die Kristallisation. Diese oxidative Zersetzung tritt auch bei den 60 °C-Proben auf. Das Massenspektrum (nicht gezeigt) zeigt bei 460 °C ein Freisetzen von CO₂ und H₂O. Durch die etwas schnellere Heizrate bei den 60 °C-Proben sind die beiden Peaks allerdings zu einem verschmolzen. Der einzelne, etwas breitere Peak ist leicht zu höheren Temperaturen hin verschoben (Abbildung 30 D). Die nahezu identischen TG-Kurven der bei 30 °C und 60 °C mineralisierten und bei 100 °C getrockneten Proben (schwarze Kurve in Abbildung 30 A und C) und die

nur leicht durch die unterschiedliche Heizrate verschobenen DSC-Kurven (schwarze und graue Kurve in Abbildung 30 D) deuten darauf hin, dass ein Temperaturunterschied von 30 °C keinen wesentlichen Einfluss auf die Probenzusammensetzung und das thermische Verhalten hat. Die beiden bei 100 °C für 4 h getrockneten Proben (Abbildung 30 A und C) zeigten in der TG-Messung einen Gesamtmasseverlust von 26 %. Für das Mineralisationsprodukt von $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ in reinem Ethanol^[24] wurde eine Zusammensetzung von $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$ vorgeschlagen, die durch Hydrolyse und Alkoholyse von $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ entsteht. Eine vollständige Reaktion zu ZrO_2 durch Temperaturerhöhung wies einen Massenverlust von 25 % auf (berechnet). Dieser Masseverlust (aus Gao *et al.*^[24]) ist nahezu identisch mit dem in dieser Arbeit vorliegenden Masseverlust von 26 %. Die zusätzliche Detektion von CO_2 während der Temperaturbehandlung lässt somit ebenfalls auf eine Zusammensetzung von $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$ schließen.

Ergänzend zur TG Analyse wurde eine XPS-Charakterisierung durchgeführt, um neben der elementaren Zusammensetzung des Mineralisationsproduktes auch Aussagen über die vorliegenden chemischen Bindungen treffen zu können.

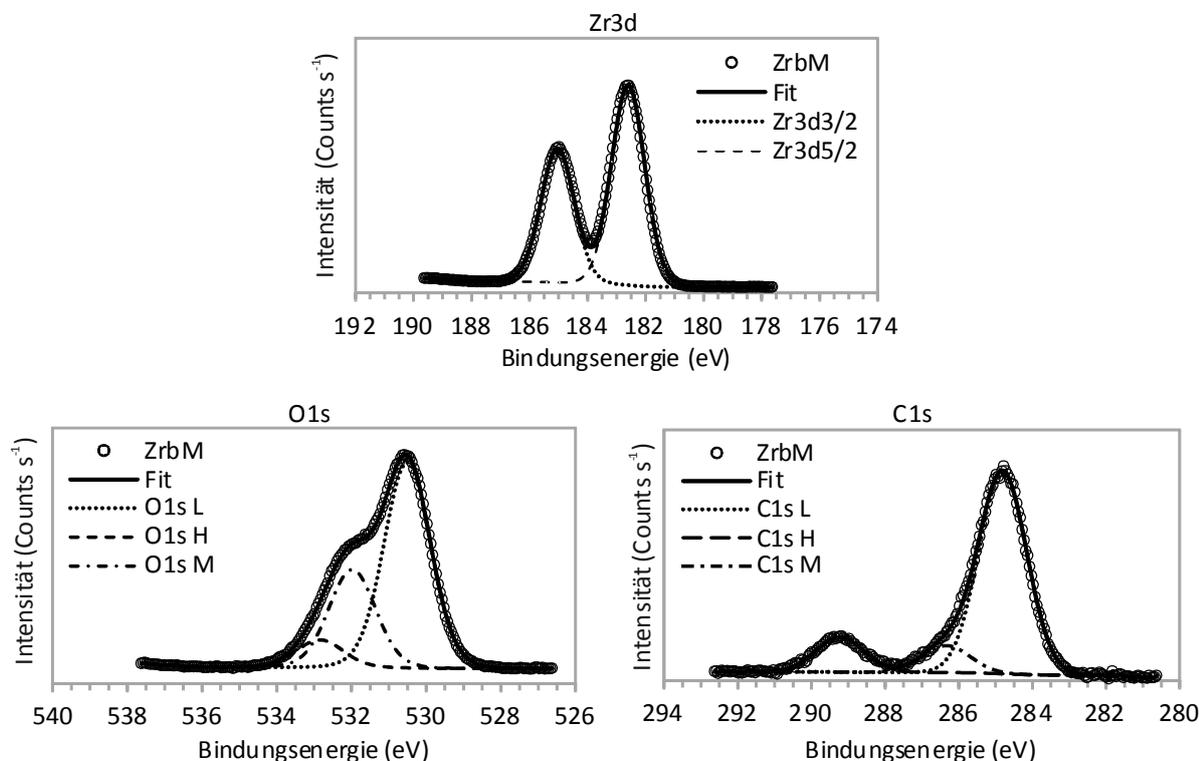


Abbildung 32: XPS-Spektren für Zr3d, O1s und C1s der bei 60 °C mineralisierten Schicht aus Zr-basiertem Material (ZrbM). Die durchgezogene Linie zeigt den Gesamtfit, die gepunkteten bzw. gestrichelten Linien die Einzelfits.

Der Zr3d Peak (Abbildung 32) setzt sich aus zwei einzelnen Peaks bei 182,6 eV (Zr3d_{5/2}) und 185,03 eV (Zr3d_{3/2}) zusammen. Diese sind vergleichbar mit den Bindungsenergien für das Mineralisationsprodukt Zr₅O₆(OC₂H₅)₂(OH)₂Cl₄,^[24] das durch Mineralisation in einer Ethanol haltigen ZrOCl₂-Lösung gebildet wurde. Der Peak bei 182,6 eV liegt sehr nahe am Wert von Zr(IV) in ZrO₂ mit 182,9 eV,^[227] was auf eine strukturelle und chemische Ähnlichkeit schließen lässt. Der O1s-Peak im Spektrum (Abbildung 32) lässt sich mit drei einzelnen Peaks bei 530,5 eV, 532,0 eV und 532,8 eV fiten. Die Bindungsenergie von 530,5 eV kann der Bindungsenergie von Sauerstoff in ZrO₂ zugeschrieben werden.^[228,229] Seine Energiedifferenz zu Zr3d_{5/2} ist mit 347,9 eV nahezu identisch mit dem Wert für die Energiedifferenz in Zr(IV)O₂ (348,4 eV)^[230]. Der Peak bei 532,0 eV kann adsorbiertem Wasser oder OH-Gruppen zugeschrieben werden.^[229,231,232] Schließlich kann der bei der höchsten Bindungsenergie, bei 532,8 eV, auftretende Peak aus ≡Zr-O-C≡ Bindungen resultieren.^[233] Diese ≡Zr-O-C≡ Bindungen weisen auf das Vorliegen von Ethoxygruppen oder Oberflächenverunreinigungen hin. Auch die entsprechenden Bindungsenergien im C1s-Spektrum deuten darauf hin. Diese liegen bei 284,8 eV, 286,3 eV und 289,2 eV. Der niederenergetische Peak kann sowohl von Verunreinigungen während des nasschemischen Herstellungsverfahrens^[231] als auch von C-C oder C-H Bindungen in Ethoxygruppen^[234] resultieren. Er wurde als Referenzpeak für die einzelnen Scans gewählt. Die beiden höherenergetischen Peaks können ebenfalls von physisorbiertem oder chemisorbiertem Ethanol herrühren.^[234-236]

Über Pyknometrie wurde die Dichte des Mineralisationsproduktes bestimmt. Neben einer bei ZT mineralisierten Probe wurde eine bei 40 °C mineralisierte Probe analysiert. Beide Proben wurden nach dem Abzentrifugieren aus der Mineralisationslösung über Nacht bei ZT getrocknet. Unabhängig von der Mineralisationstemperatur wurde eine Dichte von $1,2 \pm 0,2 \text{ g cm}^{-3}$ ermittelt. Dieser Wert liegt zwischen der Dichte von amorphem ZrO(OH)₂·(85-90 %)H₂O mit $1,10 \text{ g cm}^{-3}$ ^[225] und amorphem ZrO(OH)₂·(1,75-1,94 %)H₂O mit $2,66 \text{ g cm}^{-3}$ ^[225]. Beim amorphen ZrO(OH)₂·(85-90 %)H₂O handelt es sich um das Mineralisationsprodukt, das aus einer wässrigen ZrOCl₂-Lösung nach Zugabe einer Base abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen wurde.^[225] Nach einem Trocknungsschritt bei 20 °C – 30 °C entstand das amorphe ZrO(OH)₂·(1,75-1,94 %)H₂O.^[225] Die Dichte des in dieser Arbeit mineralisierten Produkts ist zudem geringer als die Dichte von Zr(OH)₄ bzw. ZrO₂·xH₂O ($3,25 \text{ g cm}^{-3}$) und die Dichte von ZrO₂ (HfO₂ < 2 %) ($5,6 \text{ g cm}^{-3}$).^[214] Die amor-

phen Mineralisationsprodukte $\text{ZrO}(\text{OH})_2 \cdot (85-90 \%) \text{H}_2\text{O}$ und $\text{ZrO}(\text{OH})_2 \cdot (1,75-1,94 \%) \text{H}_2\text{O}$ enthalten neben Sauerstoffbrücken (Zr-O-Zr) auch OH-Brücken (Zr-(OH)₂-Zr) und koordinierte Wassermoleküle (Zr-OH₂).^[225] Die Dichte dieser Mineralisationsprodukte ist im Vergleich zu ZrO_2 wesentlich geringer. Eine Dehydration des Mineralisationsprodukts ($\text{ZrO}(\text{OH})_2 \cdot (85-90 \%) \text{H}_2\text{O}$ bzw. $\text{ZrO}(\text{OH})_2 \cdot (1,75-1,94 \%) \text{H}_2\text{O}$) durch Erhitzen führt zu einer Erhöhung der Dichte.^[225] Bei 400 °C wurde bereits eine Dichte von 4,60 – 4,68 g cm⁻³ erzielt.^[225] Diese Dichte liegt sehr nahe an der Dichte von ZrO_2 ($\text{HfO}_2 < 2 \%$) mit 5,6 g cm⁻³.^[214] Das Mineralisationsprodukt enthält bei 400 °C noch circa 0,8 – 1,8 % Wasser ($\text{ZrO}_{1,82-1,92}(\text{OH})_{0,17-0,35}$).^[225] Auch das in dieser Arbeit aus einer ZrOCl_2 -Lösung entstandene Mineralisationsprodukt enthält H₂O bzw. OH-Gruppen (s. Abschnitt TG-DSC Messungen in 6.1.4 und Abbildung 31 A). Zudem wurde in den TG-DSC Messungen in dieser Arbeit neben H₂O und OH auch CO₂ und C₂H₅• detektiert, was auf das Vorliegen von Ethanolpezies im Mineralisationsprodukt hinweist (s. o.). Durch TG-DSC Messungen wurde ein Mineralisationsprodukt mit der Zusammensetzung $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$ vorgeschlagen (s. Abschnitt TG-DSC Messungen in 6.1.4). Der nahezu identische Dichtewert von $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$ mit $1,2 \pm 0,2 \text{ g cm}^{-3}$ und $\text{ZrO}(\text{OH})_2 \cdot (85-90 \%) \text{H}_2\text{O}$ mit $1,10 \text{ g cm}^{-3}$ ^[225] lässt in Verbindung mit den weiteren erzielten experimentellen Resultaten auf eine ähnliche Struktur der Mineralisationsprodukte schließen. Da das letztgenannte Mineralisationsprodukt ebenfalls Sauerstoffbrücken (Zr-O-Zr), OH-Brücken (Zr-(OH)₂-Zr) und koordinierte Wassermoleküle (Zr-OH₂) enthält,^[225] bestätigt der ähnliche Dichtewert die Annahme der Zusammensetzung des Mineralisationsproduktes von $\text{Zr}_5\text{O}_6(\text{OC}_2\text{H}_5)_2(\text{OH})_2\text{Cl}_4$. Die Dichtemessungen zeigen außerdem, dass die Mineralisationstemperatur scheinbar keinen Einfluss auf die Dichte des Mineralisationsproduktes hat.

Das Zetapotential der mineralisierten Partikel wurde durch elektrophoretische Messungen ermittelt. Hierfür wurden Partikel bei 60 °C für fünf Minuten und bei ZT für drei Monate mineralisiert. Nach dem Abzentrifugieren und Reinigen in 80 % Ethanol wurden die Partikel in 10 mM NaCl-Lösung mit unterschiedlichen pH-Werten resuspendiert und das Zetapotential bestimmt. Abbildung 33 zeigt den Verlauf des Zetapotentials in Abhängigkeit des pH-Werts. Hieraus kann ein Isoelektrischer Punkt von pH 7 interpoliert werden. Die pH-Abhängigkeiten der Zetapotentiale von den bei 60 °C und ZT mineralisierten Partikeln zeigen einen ähnlichen Verlauf. Die geringen Unterschiede liegen im Rahmen der Messun-

genauigkeit (Abbildung 33). Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass die Mineralisationstemperatur die Zusammensetzung des Mineralisationsprodukts nicht beeinflusst.

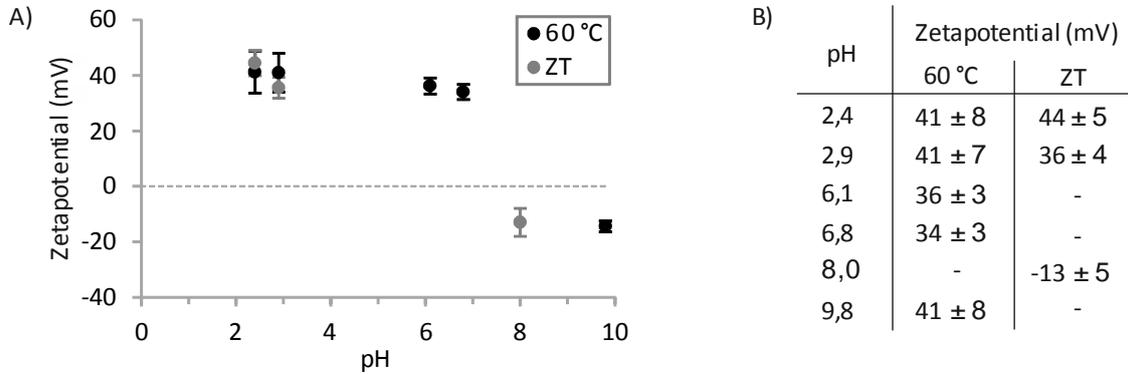


Abbildung 33: pH-Abhängigkeit der Zetapotentiale mineralisierter Partikel. Die Zetapotentiale der bei 60 °C für fünf Minuten und bei Zimmertemperatur für drei Monate mineralisierten Partikel wurden in einer 10 mM NaCl-Lösung bestimmt.

Zur röntgenographischen Untersuchung des Mineralisationsproduktes wurden Schichten mit einer Dicke von circa 100 nm hergestellt (s. 5.10.7). Die Schichtmineralisation wurde bei 60 °C durchgeführt. Direkt nach der Herstellung liegt das ZrbM amorph vor (Abbildung 34). Ein Kalzinierungsschritt bei 550 °C führt zunächst zur Kristallisation von metastabilem, tetragonalem Zirkoniumdioxid (ZrO_2). Durch ein weiteres Kalzinieren bei 900 °C beginnt die Phasenumwandlung zur thermodynamisch stabilen, monoklinen Phase. Die Bildung der metastabilen, tetragonalen Phase, die erst ab 1100 °C thermodynamisch stabil ist,^[51] wird der Kristallitgröße und damit dem Oberflächen-zu-Volumen Verhältnis zugeschrieben.^[239-242] Kristallite unter einer kritischen Größe von circa 30 nm liegen in der tetragonalen Phase vor, die im Vergleich zur monoklinen Phase eine geringere Oberflächenenergie aufweist.^[239-242] Beim Überschreiten der kritischen Kristallitgröße tritt eine teilweise Phasenumwandlung in die thermodynamisch stabile, monokline Phase auf.

Die Oberflächen mineralisierter Schichten direkt nach der Herstellung sowie nach der Kalzinierung bei 550 °C und 900 °C sind in Abbildung 35 abgebildet. Zwischen der Schicht direkt nach der Herstellung und der Schicht nach der Kalzinierung bei 550 °C ist kein Unterschied in Bezug auf die Partikelgrößen zu beobachten. Es liegen Partikelgrößen unterhalb 30 nm vor. Die kristallisierten tetragonalen Partikel (550 °C) können sowohl einkristallin als auch polykristallin vorliegen. Ihre Kristallitgröße liegt, bedingt durch die Partikelgröße, unterhalb des kritischen Wertes von 30 nm.

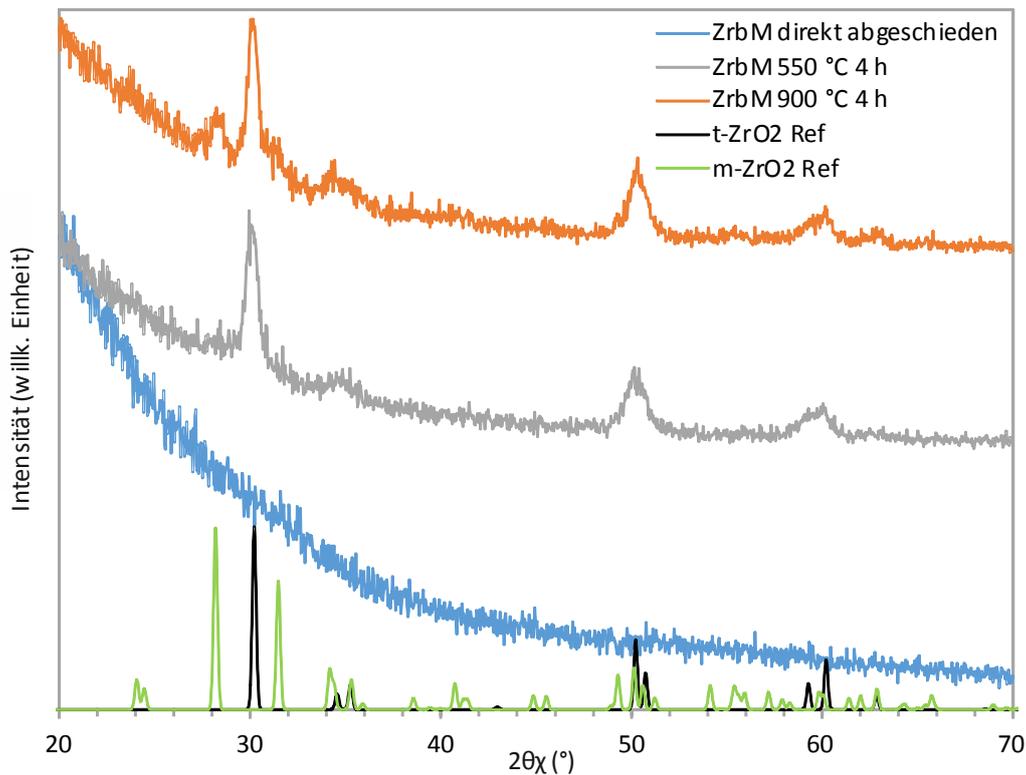


Abbildung 34: Diffraktogramm von mineralisierten Dünnschichten aus Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) – direkt nach der Herstellung und nach zwei Kalzinierungsschritten. Kalziniert wurde bei 550 °C und 900 °C jeweils für 4 h (s. 5.9). Die Schichten wurden durch Mineralisation aus einer 20 mM ZrOCl_2 -Lösung mit 80 % Ethanol bei 60 °C hergestellt. Zusätzlich sind die simulierten Diffraktogramme von tetragonalem ($t\text{-ZrO}_2$)^[237] und monoklinem ZrO_2 ($m\text{-ZrO}_2$)^[238] dargestellt.

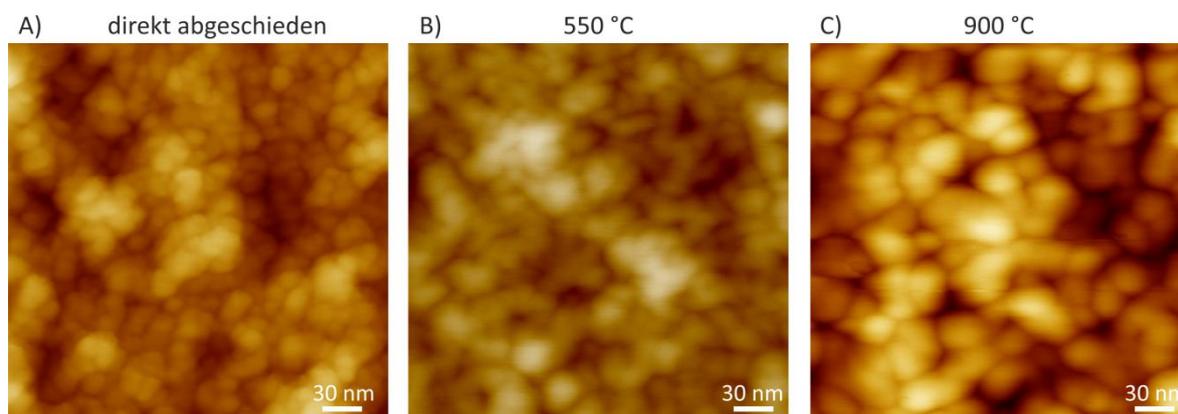


Abbildung 35: AFM-Aufnahmen einer mineralisierten Schicht aus ZrbM vor und nach einer Temperaturbehandlung. A) Mineralisierte Schicht direkt nach der Herstellung. B) Mineralisierte Schicht nach dem Kalzinieren bei 550 °C. C) Mineralisierte Schicht nach dem Kalzinieren bei 900 °C.

Nach der Wärmebehandlung bei 900 °C sind die Partikel merklich gewachsen. Es sind auch Partikelgrößen > 30 nm zu beobachten. Somit können auch Kristallitgrößen > 30 nm vorliegen, die die Koexistenz der monoklinen und tetragonalen Phase erklären können.

Ein weiterer Grund für das Kristallisieren der Partikel in der metastabilen, tetragonalen Modifikation ist die strukturelle Ähnlichkeit zwischen amorphem ZrbM und *t*-ZrO₂. Das amorphe ZrbM entsteht durch Hydrolyse und Kondensationsreaktion von tetrameren, oktameren oder höheren oligomeren Ausgangsstrukturen, die nach dem Lösen von ZrOCl₂·8H₂O vorliegen (s. 4.5). In diesen Zr-Tetrameren liegt das Zr-Atom 8-fach koordiniert vor. Ein Zustand, der auch im tetragonalen ZrO₂ zu finden ist.^[51] Monoklines ZrO₂ ist dagegen 6-fach koordiniert.^[51] Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem amorphen ZrbM und der tetragonalen Phase kann somit zu einer schnelleren Bildung der tetragonalen Phase führen.

Die umfangreiche Charakterisierung des Mineralisationsprodukts zeigte, dass im Mineralisationsprodukt auch kleine Mengen an Cl⁻ und Ethanol sowie brückenbildende Ethoxygruppen zwischen zwei Zr-Ionen vorliegen. Für das Mineralisationsprodukt wird eine Zusammensetzung von Zr₅O₆(OC₂H₅)₂(OH)₂Cl₄ vorgeschlagen (s. Abschnitt TG-DSC Messungen in 6.1.4). Die Mineralisationstemperatur hat dabei keinen Einfluss auf die Zusammensetzung, das ZP und die Dichte des ZrbMs. Somit kann angenommen werden, dass sich die Mineralisationsprodukte bei ZT und bei 60 °C nicht unterscheiden. Bei ZT wurde der Einfluss eines Biotemplats auf die Mineralisation von ZrbM untersucht (s. 6.3.3). Zur schnelleren Mineralisation von Schichten aus ZrbM wurde die Mineralisationstemperatur auf 60 °C erhöht (s. 6.4.2).

6.1.5 Modellierung des Partikelbildungs- und Wachstumsprozesses

Die umfassenden Untersuchungen des Mineralisationssystems ZrOCl₂ in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch (s. 6.1.1) wurden als Grundlage zur Erstellung eines Modells genutzt, das den Partikelbildungs- und Partikelwachstumsprozess mathematisch beschreibt. Mit einem solchen Modell kann der Hauptwachstumsmechanismus bei verschiedenen Lösungsparametern identifiziert werden. Zudem können verbesserte Prozessparameter bestimmt werden, die ein geeignetes Mineralisationssystem zur Bildung einer hohen Anzahl an Nanopartikeln darstellen, ohne Einschränkung bezüglich Tempera-

tur und pH-Wert, wie es im Rahmen dieser Arbeit der Fall war. Eine hohe Anzahl an gebildeten Partikeln ist vorteilhaft um eine schnelle effiziente Schichtbildung zu ermöglichen. Dieses Modell kann auf andere Mineralisationssysteme übertragen werden, bei denen Partikelwachstum durch molekulare Addition oder Partikelagglomeration stattfindet. Somit steht eine Möglichkeit zur Verfügung, um ohne umfangreiche experimentelle Untersuchungen Parameter, wie Temperatur und Salzkonzentration von Mineralisationssystemen zu identifizieren, die zur Bildung einer hohen Anzahl an Nanopartikeln führt, die stabil gegen Agglomeration sind, und dadurch die Mineralisation homogener Funktionsmaterialien ermöglicht.

Bei der Modellierung durch Wolfgang Halter (Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik, Universität Stuttgart) wurde die Partikelbildung durch Keimbildung und Wachstum beschrieben. Neben Wachstum durch molekulare Addition von kleinen Zr-Tetrameren/Oligomeren wurde auch ein Wachstumsmechanismus durch Agglomeration von Primärpartikeln angenommen. Die Wahl der Modellparameter beruhte auf den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten DLS- und ICP-Messungen von Mineralisationslösungen (ZrOCl₂, 80 % Ethanol), die das mittlere Partikelwachstum und den Verbrauch an löslichen Zr-Spezies (Tetramere/Oligomere) widerspiegelten. Dabei wurde die Mineralisationstemperatur und Salzkonzentration systematisch variiert. Die Simulation des Partikelwachstums stimmte sehr gut mit den experimentellen Daten bei unterschiedlichen Mineralisationsbedingungen überein. Es kann deshalb angenommen werden, dass das eingeführte Modell den Partikelbildungs- und Wachstumsprozess im Bereich der getesteten Prozessparameter realitätsnah abbildet. In den nächsten Abschnitten wird das entwickelte Modell näher beschrieben.

6.1.5.1 Allgemeines Populationsbilanz-Modell

Zunächst wurde ein allgemeines Populationsbilanz-Modell eingeführt, das den Partikelbildungs- und Wachstumsprozess über eine partielle Differentialgleichung mathematisch beschreibt. Für ein System mit konstantem Reaktionsvolumen und konstanter Temperatur gilt:^[243]

$$\frac{\partial n(t,V)}{\partial t} + G \frac{\partial(n(t,V))}{\partial V} = B(V) - D(V), \quad (44)$$

wobei $n(t, V)$ die Anzahldichte der Partikel in Abhängigkeit der Zeit t und dem charakteristischen Partikelvolumen V darstellt, G die Wachstumsrate und $B(V)$ und $D(V)$ die Geburts- und Sterberaten der Partikel. Primärpartikel entstehen durch Keimbildung. Ein Partikel mit dem Volumen V entsteht entweder durch kontinuierliches Wachstum oder durch Agglomeration zweier Partikel mit kleinerem Volumen. Dementsprechend geht ein Partikel mit dem Volumen V verloren, wenn dieses selbst zu einem größeren Partikel agglomeriert. Die Wachstumsrate G wird als partikelgrößenunabhängig angenommen. Sie ist proportional zur Übersättigung der Lösung.^[244] Für den zu beschreibenden Partikelbildungsprozess wird von einem übersättigten System ausgegangen. Für die Wachstumsrate gilt

$$G = a \cdot \Delta c \quad (45)$$

mit $\Delta c = c - c_s > 0$ und dem zu bestimmenden Parameter a . Die Sättigungskonzentration c_s ist abhängig von der Mineralisationstemperatur und dem pH-Wert.

Die Geburtsrate $B(V)$ neuer Partikel mit dem Volumen V kann durch:

$$B(V) = \begin{cases} B_0 & V = 0 \\ \frac{1}{2} \int_0^V \beta(V - \epsilon, \epsilon) \cdot n(V - \epsilon) \cdot n(\epsilon) d\epsilon & V > 0 \end{cases} \quad (46)$$

beschrieben werden.^[244,245] Mit der Keimbildungsrate

$$B_0 = d \cdot \Delta c \quad (47)$$

wird dabei die Entstehung neuer Partikel durch Keimbildung berücksichtigt. Der Agglomerations-Kernel $\beta(V - \epsilon, \epsilon)$ gibt die Wahrscheinlichkeit für die Bildung eines Partikels mit dem Volumen V durch einen erfolgreichen Zusammenstoß zweier Partikel mit dem Volumen $V - \epsilon$ und ϵ an.

Die Sterberate $D(V)$ wird entsprechend beschrieben durch

$$D(V) = n(V) \cdot \int_0^\infty \beta(V, \epsilon) \cdot n(\epsilon) d\epsilon. \quad (48)$$

Für den Agglomerations-Kernel $\beta(V, \epsilon)$ wird ein zweistufiger Agglomerations-Kernel gewählt^[246]

$$\beta(V, \epsilon) = \beta_1 + \beta_2 V \epsilon, \quad (49)$$

um sowohl eine größenunabhängige (β_1) als auch größenabhängige (β_2) Agglomeration zu berücksichtigen.

6.1.5.2 Momentendynamik

Zur Vereinfachung des allgemeinen Populationsbilanz-Modells (partielle Differentialgleichung) wurde die Momentendynamik des Systems abgeleitet, welche mit einer gewöhnlichen Differentialgleichung beschrieben werden kann.

Das i -te Moment ist dabei definiert als

$$m_i = \int_0^\infty V^i n(V) dV. \quad (50)$$

Hiermit ergibt das nullte Moment m_0 die Gesamtanzahl der Partikel pro Einheitsvolumen N_T und das erste Moment m_1 das Gesamtvolumen der Partikel pro Einheitsvolumen V_T . Diese Größen können aus den experimentellen Daten berechnet werden. Über ICP-Messungen wurde der Verbrauch an löslichen Zr-Spezies anhand der Abnahme von Zirkonium-Ionen durch die Partikelbildung ermittelt. Für das vorliegende, geschlossene System gilt damit:

$$c = c_0 - \frac{\rho}{M} m_1. \quad (51)$$

Auch die Wachstumsrate G und die Keimbildungsrate B_0 stellen über den Bezug in Gleichung (51) eine Funktion von m_1 dar.

Ein Ableiten von Gleichung (50) nach der Zeit führt nach Vereinfachung (s. Halter *et al.* S. VII) zu folgenden Beziehungen für die geschlossene Momentendynamik des nullten und ersten Moments:

$$\dot{m}_0 = B_0 - \frac{1}{2} (\beta_1 m_0^2 + \beta_2 m_1^2) \quad (52)$$

$$\dot{m}_1 = G m_0 \quad (53)$$

Die Lösung dieser gewöhnlichen Differentialgleichung ist nun abhängig von den unbekannt Parametern a , d , c_s , β_1 und β_2 . Fixiert man Werte dieser Parameter, so lässt sich der Zeitverlauf der Momente ($m_0(t)$ und $m_1(t)$) mittels Standard-Lösern wie dem ODE15s in Matlab ermitteln.

6.1.5.3 Datenmaterial aus Experimenten

Die relevanten Daten $m_0(t)$ und $m_1(t)$, welche die Gesamtzahl der Partikel in Lösung $N_T(t)$ und das Gesamtvolumen der gebildeten Partikel in Lösung $V_T(t)$ pro Einheitsvolumen beschreiben, konnten aus den experimentellen Daten berechnet werden. Da zum Zeitpunkt

der mathematischen Beschreibung des Partikelbildungs- und Wachstumsprozesses das in dieser Arbeit entstehende Mineralisationsprodukt noch nicht in Bezug auf die chemische Zusammensetzung analysiert wurde, wurde für die molare Masse des Mineralisationsproduktes der Wert von $\text{ZrO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ gewählt. Dieses Mineralisationsprodukt wurde für die Mineralisation aus einer 0,2 M ZrOCl_2 -Lösung in einem Wasser/Isopropanol-Lösungsmittelgemisch (80 Vol. % Isopropanol) angenommen.^[43] Da diese Arbeit von Moon *et al.*^[43] als Ausgangspunkt für das Mineralisationssystem in dieser Arbeit gewählt wurde, wurde beim Erstellen des mathematischen Modells auf diese Zusammensetzung zurückgegriffen. Für das Mineralisationsprodukt $\text{ZrO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ^[43] wurde allerdings keine Dichte angegeben. Daher wurde als Dichte die durch Pyknometrie ermittelte Dichte des Mineralisationsproduktes, das in einer 20 mM ZrOCl_2 -Lösung mit 80 Vol. % Ethanol bei 25 °C gebildet wurde, von $1,2 \text{ g cm}^{-3}$ eingesetzt (s. 6.1.4).

Mit bekannter Konzentration an Zirkonium-Ionen zur Zeit t , die zur Bildung der Partikel gebraucht wurde (ICP-Messung, s. 5.10.8 und Abbildung 36 C, Abbildung 37 C sowie Abbildung 38 C), wurde das Gesamtvolumen an Partikeln V_T zur Zeit t berechnet:

$$m_1(t) = V_T(t) = (c(0) - c(t)) \frac{M}{\rho}, \quad (V_T) = \text{mm}^3 \text{mL}^{-1} \quad (54)$$

Die Gesamtzahl der Partikel pro Einheitsvolumen N_T zur Zeit t wurde aus den mittleren Partikelgrößen Z der DLS-Messungen (s. 5.10.1 und Ergebnisse entsprechend Abbildung 21) ermittelt. Hierfür wurde der Gesamtdurchmesser D_T zur Zeit t pro Einheitsvolumen eingeführt. Mit dem mittleren Volumen eines Partikels V_p

$$V_p(t) = \frac{\pi}{6} Z^3 = \frac{\pi}{6} \left(\frac{D_T(t)}{N_T(t)} \right)^3 = \frac{V_T(t)}{N_T(t)^3} \quad (55)$$

folgte die Beziehung:

$$m_0(t) = N_T(t) = \left(\frac{V_T(t)}{\frac{\pi}{6} Z^3} \right)^{1/3}, \quad (N_T) = \text{mL}^{-1}. \quad (56)$$

6.1.5.4 Simulation

Für die Simulation der experimentellen Ergebnisse $m_0(t)$ und $m_1(t)$ wurden die zu bestimmenden Parameter a (Wachstumsrate), d (Keimbildungsrate), c_s (Sättigungskonzentration), β_1 (größenunabhängige Agglomeration) und β_2 (größenabhängige Agglomeration) zunächst für jedes System (Salzkonzentration, Temperatur) einzeln optimiert. Hieraus wurde

schließlich eine Abhängigkeit der einzelnen Parameter (a , d , c_s , β_1 , β_2) von der Temperatur und Salzkonzentration aufgestellt. Dabei wurde ein Polynom zweiter Ordnung angenommen (s. Halter *et al.* S. VII). Um die Parameter des Polynoms genau zu bestimmen, wurden diese solange angepasst, bis die Simulation möglichst gut mit den aus den experimentellen Werten berechneten Zeitverläufen der Momente ($m_0(t)$ und $m_1(t)$) übereinstimmte. Die Ergebnisse von Simulation und Experiment sind in Abbildung 36 bis Abbildung 38 dargestellt.

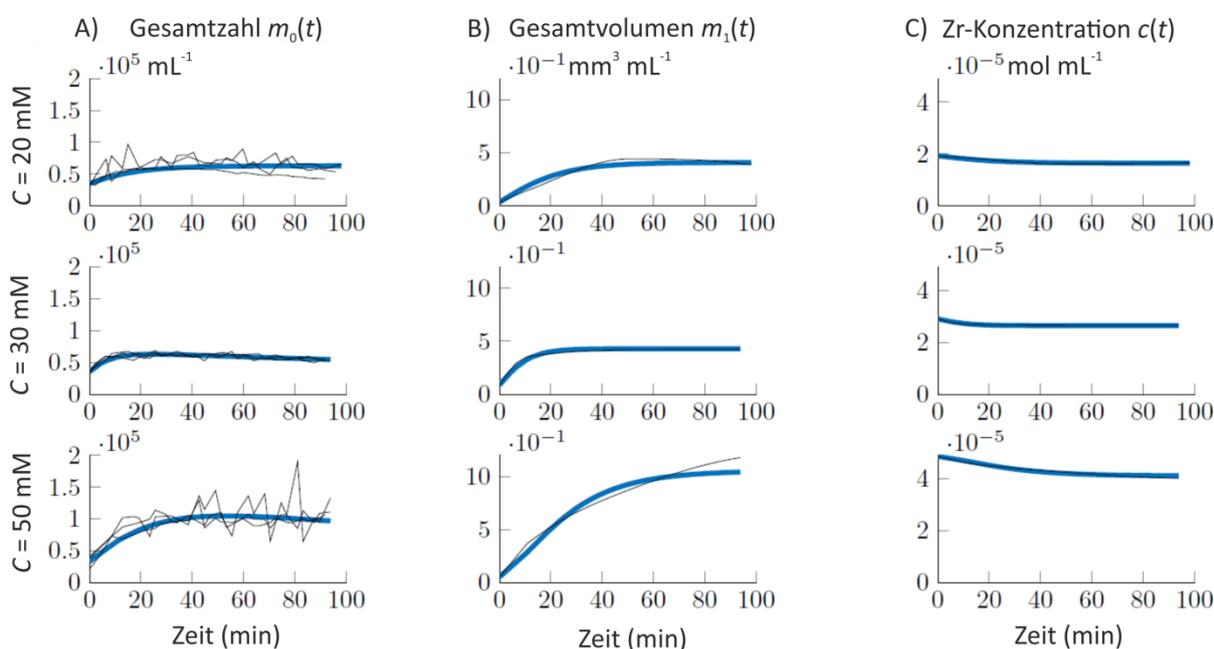


Abbildung 36: Vergleich Simulation – Experiment für eine Mineralisationstemperatur von 25 °C. Dargestellt ist A) die Gesamtzahl (m_0) sowie B) das Gesamtvolumen (m_1) an mineralisierten Partikeln und C) die Abnahme der Zr-Konzentration c während der Mineralisation bei 25 °C mit verschiedenen Salzkonzentrationen C . Neben den aus experimentellen Daten berechneten Kurven (schwarze dünne Linie) sind die simulierten Ergebnisse (blaue dicke Linie) aufgetragen (aus Halter *et al.* S. VII). Schwarze dünne Linie: drei Kurven (A) entsprechen den Berechnungen aus den DLS-Messungen (mittlere Partikelgröße, vergleiche Abbildung 21), eine Kurve zeigt die Ergebnisse (C) beziehungsweise die Berechnungen (B) aus den ICP-OES-Messung (s. 5.10.8).

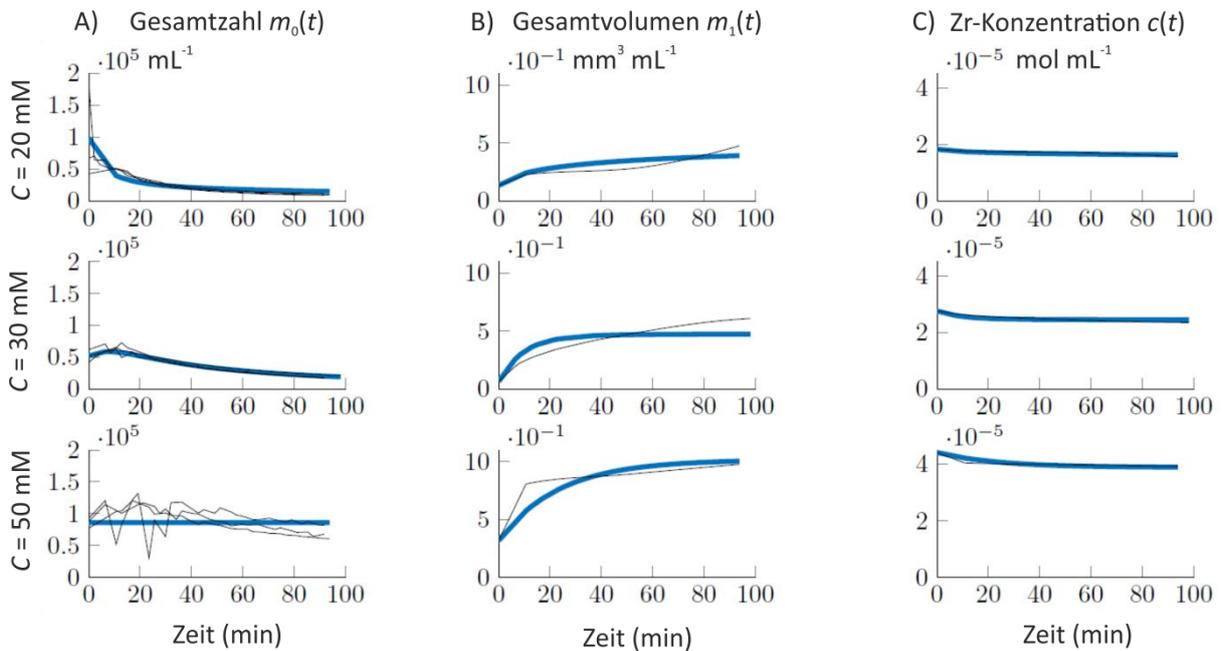


Abbildung 37: Vergleich Simulation – Experiment für eine Mineralisationstemperatur von 40 °C. Dargestellt ist A) die Gesamtzahl (m_0) sowie B) das Gesamtvolumen (m_i) an mineralisierten Partikeln und C) die Abnahme der Zr-Konzentration c während der Mineralisation bei 40 °C mit verschiedenen Salzkonzentrationen C . Neben den aus experimentellen Daten berechneten Kurven (schwarze dünne Linie) sind die simulierten Ergebnisse (blaue dicke Linie) aufgetragen (aus Halter *et al.* S. VII). Schwarze dünne Linie: drei Kurven (A) entsprechen den Berechnungen aus den DLS-Messungen (mittlere Partikelgröße, vergleiche Abbildung 21), eine Kurve zeigt die Ergebnisse (C) beziehungsweise die Berechnungen (B) aus den ICP-OES-Messung (s. 5.10.8).

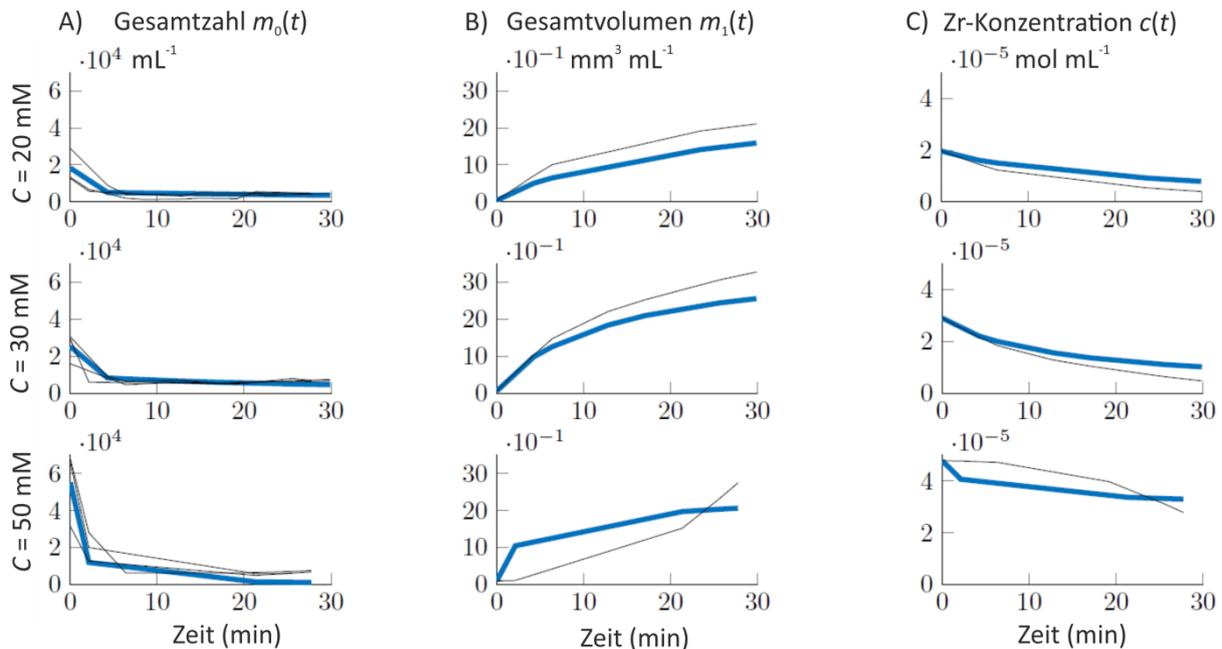


Abbildung 38: Vergleich Simulation – Experiment für eine Mineralisationstemperatur von 60 °C. Dargestellt ist A) die Gesamtzahl (m_0) sowie B) das Gesamtvolumen (m_1) an mineralisierten Partikeln und C) die Abnahme der Zr-Konzentration c während der Mineralisation bei 60 °C mit verschiedenen Salzkonzentrationen C . Neben den aus experimentellen Daten berechneten Kurven (schwarze dünne Linie) sind die simulierten Ergebnisse (blaue dicke Linie) aufgetragen (aus Halter *et al.* S. VII). Schwarze dünne Linie: drei Kurven (A) entsprechen den Berechnungen aus den DLS-Messungen (mittlere Partikelgröße, vergleiche Abbildung 21), eine Kurve zeigt die Ergebnisse (C) beziehungsweise die Berechnungen (B) aus den ICP-OES-Messung (s. 5.10.8).

Beide stimmen sehr gut überein. Eine Ausnahme stellen die Mineralisationslösungen $C = 20 \text{ mM}$; $T = 40 \text{ °C}$ und $C = 50 \text{ mM}$; $T = 60 \text{ °C}$ dar. Hier zeigen die ICP-Messungen (schwarze Linie in Abbildung 37 B (20 mM) und Abbildung 38 B (50 mM)) einen leicht konkaven Verlauf, der qualitativ von den ICP-Messungen der anderen Mineralisationsbedingungen, die einen konvexen Verlauf zeigen (siehe jeweils schwarze Linie in Abbildung 36 B, Abbildung 37 B und Abbildung 38 B), abweicht. Durch die insgesamt sehr gute Übereinstimmung von Experiment und Simulation kann angenommen werden, dass das hier eingeführte mathematische Modell den Partikelbildungs- und Wachstumsprozess im Bereich der getesteten Prozessparameter realitätsnah abbildet.

Die größenabhängige Agglomeration β_2 ergab für alle Systeme den Wert Null. Somit kann ein Einfluss der Partikelgröße auf die Agglomeration bei dem hier vorliegendem Mineralisationslösungssystem ausgeschlossen werden.

Die Abhängigkeiten der einzelnen Parameter a , d , c_s und β_1 von der Salzkonzentration und der Mineralisationstemperatur sind graphisch in Abbildung 39 dargestellt.

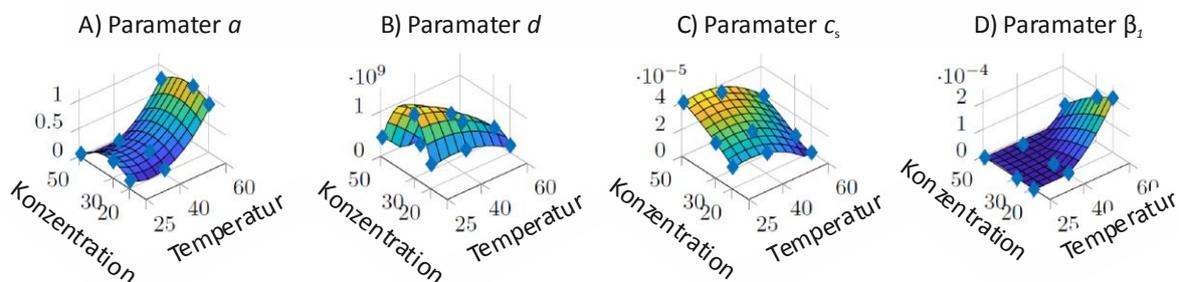


Abbildung 39: Polynomische Abhängigkeit der Parameter a (Wachstumsrate), d (Keimbildungsrate), c_s (Sättigungskonzentration) und β_1 (größenunabhängige Agglomeration) von der Salzkonzentration und Temperatur. Die blauen Punkte sind die Parameterwerte der Temperatur T und der Salzkonzentration C bei den experimentellen Bedingungen. Die Konzentrations- und Temperaturabhängigkeit der Wachstumsrate a und Keimbildungsrate d sind hauptsächlich durch die Parameterwerte der Sättigungskonzentration c_s und der größenunabhängigen Agglomeration β_1 bestimmt (aus Halter *et al.* S. VII).

Das Modell zeigt für die größenunabhängige Agglomeration β_1 (Abbildung 39 D) einen relativ großen Bereich an Parameterpaaren (Salzkonzentration C , Mineralisationstemperatur T), in dem noch keine Agglomeration stattfindet. Hier findet Wachstum hauptsächlich durch molekulare Addition von kleinen Zr-Tetrameren/Oligomeren statt. Bei hohen Temperaturen und niedriger Salzkonzentration findet Wachstum dagegen hauptsächlich durch Agglomeration statt. Dieses Wachstumsverhalten stimmt sehr gut mit dem in 6.1.1 beschriebenen Partikelwachstum durch molekulare Addition und Partikelagglomeration überein. Somit beschreibt das Modell das vorliegende Mineralisationssystem sehr gut. Zur Mineralisation homogener Funktionsmaterialien sind zum einen stabile Nanopartikel erforderlich, die nicht agglomerieren und dadurch Inhomogenitäten verursachen können. Zum anderen ist eine hohe Anzahl an gebildeten Partikeln vorteilhaft um eine schnelle effiziente Schichtbildung zu ermöglichen. Die Anzahl der gebildeten Partikel hängt ebenfalls von der Mineralisationstemperatur und der Salzkonzentration ab (Halter *et al.* S. VII). Somit wurden Prozessparameter identifiziert, die zum einen stabile Nanopartikel bilden und zum anderen zur Bildung einer hohen Anzahl an Partikeln führt (s. Halter *et al.* S. VII). Bei der Parameteridentifizierung wurden die Prozessparameter auf den Bereich beschränkt, in

dem keine Partikelagglomeration stattfindet (s. Abbildung 39 D, $\beta_1 = 0$). Des Weiteren wurde berücksichtigt, dass die Partikelgröße minimiert wird (Bildung von Nanopartikeln), während gleichzeitig der Verbrauch an Zr-Spezies in Lösung maximiert wird (hohe Anzahl an Partikeln). Somit ist die Bildung einer hohen Anzahl an Nanopartikeln gewährleistet. Für ein Mineralisationssystem aus ZrOCl_2 in 80 Vol. % Ethanol, 20 Vol. % H_2O , bei dem keine Einschränkungen bezüglich des pH-Werts vorliegen, ergab das Modell für eine Temperatur von $45,8^\circ\text{C}$ und eine Salzkonzentration von 40 mM die Bildung einer hohen Anzahl an stabilen Nanopartikeln (s. Halter *et al.* S. VII). Die Partikel einer Größe von 24 nm waren stabil gegen Agglomeration.

Das entwickelte Modell kann es als Grundlage genutzt werden, um für andere Mineralisationssysteme Parameter wie Temperatur und Salzkonzentration zu identifizieren, die zur Bildung einer hohen Anzahl stabiler Nanopartikel führt und dadurch die Mineralisation homogener Funktionsmaterialien ermöglicht.

6.2 Biotemplat

In Biomineralisationsprozessen aus der belebten Natur scheiden sich anorganische Materialien auf organischen Templaten (Biomakromoleküle) ab. Funktionelle Gruppen der Makromoleküle steuern dabei die Abscheidung aus einer wässrigen Lösung sowie die Strukturierung des jeweiligen anorganischen Materials (s. 4.4).^[2,3] Dabei sind spezifische Wechselwirkungen zwischen dem organischen Templat und dem anorganischen Material von Bedeutung.^[4-7] Allerdings existieren in der Natur keine Organismen, die Zirkoniumdioxid (ZrO_2) herstellen. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Prinzipien der Biomineralisation auf die Herstellung von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) zu übertragen. Dies beinhaltete die Materialbildung durch Mineralisation aus einer ZrOCl_2 -Lösung sowie eine gezielte Mineralisation auf organischen Templaten mit definierten Funktionalitäten. Auf diese Weise konnte die Materialbildung beeinflusst werden (s. 6.3.3). Als Biotemplat wurden M13-Bakteriophagen (kurz Phagen) eingesetzt. Um die „biologische Spezifität“ in Biomineralisationsprozessen auf die Bildung von ZrbM zu übertragen wurden Peptide mittels Phagen-Display identifiziert, die spezifisch an ZrO_2 binden (6.2.1). Diese Bindepeptide wurden auf der Phagenoberfläche präsentiert, wo sie als Fusionsprotein mit dem Haupthüllprotein pVIII vorlagen (6.2.2). Die Phagenoberfläche besteht hauptsächlich aus 2700 Kopien des

Haupthüllproteins pVIII. Somit ermöglichte die Bildung eines Fusionsproteins mit pVIII eine hohe Bindepeptiddichte und damit viele Interaktionspunkte mit dem anorganischen Material. Eine spezifische Wechselwirkung, die zur Bindung an ZrO_2 führt (ZrO_2 -Bindepeptide), kann auch einen bedeutenden Einfluss auf die Mineralisation von ZrO_2 aus einer Salzlösung haben. Solche Einflüsse sind bekannt von Biomineralisationsprozessen in der belebten Natur. Für die Bildung von Biomineralien, die durch Biomakromoleküle induziert wird, ist sowohl die molekulare Erkennung, als auch die Bindung an das anorganische Material ein wesentlicher Faktor.^[2,3,32] Ein Einfluss spezifischer ZrO_2 -Bindepeptide, als organisches Templat, auf die Abscheidung von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) wurde untersucht (6.3). Dabei wurden modifizierten Phagen im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Phagen als Biotemplat verwendet. Die modifizierten Phagen zeigten die höchste Abscheiderate und gleichzeitig die stärkste Bindung zu ZrO_2 .

6.2.1 Phagen-Display

Mittels Phagen-Display wurden 7-mer Peptide identifiziert, die spezifisch an *t*- und/oder *c*- ZrO_2 binden. Mit diesen ZrO_2 -Bindepeptiden sollte der Peptideinfluss auf die Abscheidung von ZrbM aus einer Mineralisationslösung mit pH 2 untersucht werden (6.3). Im Standard-Phagen-Display werden Peptide identifiziert, die bei pH 7,5 spezifisch an das Zielmaterial binden. Im Gegensatz dazu sollten in dieser Arbeit Peptide identifiziert werden, die bei pH 2 spezifisch an ZrO_2 binden. Dafür war eine Anpassung des Phagen-Displays an die Selektion von Peptiden in einem sauren Medium erforderlich. Ein „saures“ Phagen-Display („acidic“ Phage Display (aPhD)) wird in dieser Arbeit das erste Mal beschrieben. Bisher wurden nur Selektionsexperimente in neutralen^[31,34,129,132,135,136] bzw. alkalischen^[141] Puffern durchgeführt. Bei einem Phagen-Display wird eine Peptidbibliothek mit bis zu 10^{11} randomisierten Aminosäuresequenzen in Kontakt mit einem Zielmaterial gebracht (4.6.2). Die Peptidbibliothek liegt als Fusionsprotein mit dem Phagenhüllprotein pIII vor. Nach dem Bindungsschritt, bei dem Phagen spezifisch an das Zielmaterial binden, werden nicht gebundene Phagen durch waschen des Zielmaterials entfernt. Die gebundenen Phagen werden meist durch pH-Wert-Erniedrigung auf pH 2,2 eluiert und in *Escherichia coli* (*E. coli*) amplifiziert. Die Schritte, von der Bindung bis zur Amplifikation, werden als eine Biopanning-Runde bezeichnet. Diese wird mehrfach durchlaufen, um die bestbindende Aminosäuresequenz zu selektieren.^[105,139] Für das neu eingeführte aPhD

mussten zunächst Elutionsbedingungen etabliert werden, die ein vollständiges Lösen gebundener Phagen gewährleisten. Bei einem Standard-Phagen-Display findet, wie bereits beschrieben, die Elution durch eine pH-Wert-Erniedrigung von 7,5 auf 2,2 statt. In Anlehnung daran wurde die Elution beim aPhD durch eine pH-Wert-Erhöhung von pH 2,0 auf pH 7,3 untersucht. Für diesen Elutionsschritt wurde ein TBS-Puffer (pH 7,3) eingesetzt und eine Elutionszeit von 30 min gewählt. Diese Zeit entspricht der Elutionszeit im Standard-Phagen-Display (NEB). Zur Untersuchung auf vollständige Elution wurde bei höherem pH-Wert oder längerer Elutionszeit erneut eluiert und das Eluat durch Ausplattieren auf LB-IPTG-X-Gal-Agarplatten auf vorhandene Phagen getestet. Diese Schritte wurden so lange wiederholt, bis keine weiteren Phagen mehr eluiert werden konnten. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Elutionszeit von zwei Stunden sowie ein pH-Wert von 10 zu einer vollständigen Elution führt. Da der Nutzbereich von TBS-Puffer zwischen 7,0 und 9,1 liegt,^[247] wurde für die höheren pH-Werte (pH 10) ein Glycin-NaOH-Puffer eingesetzt. Glycin-NaOH hat einen Nutzbereich von 8,6 – 10,6.^[248] Zur Validierung der neuen Bindungs- und Elutionsbedingungen wurde die Stabilität der Phagen im jeweiligen Puffer untersucht (Tabelle 10).

Tabelle 10: Phagenstabilität im Bindungs- und Elutionspuffer des Phagen-Displays. Zur Validierung des "sauren" Phagen-Displays wurde die Phagenstabilität bei Bindungs- und Elutionsbedingungen untersucht. Eine definierte Menge an Phagen wurde im Bindungspuffer (Glycin-HCl, pH 2,0) und im Elutionspuffer (Glycin-NaOH, pH 10,0) für 1 h bzw. 2 h inkubiert. Zur Kontrolle wurde eine Inkubation in neutralem TBS-Puffer (pH 7,3) durchgeführt. Die eingesetzte Phagenkonzentration betrug $1,4 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹.

Puffersystem		Phagentiter (10^{11} pfu mL ⁻¹)	
Puffer	pH	Inkubationszeit	
		1 h	2 h
Glycin-HCl	2,0	1,1 ± 0,1	-
Glycin-NaOH	10,0	-	1,9 ± 0,5
TBS	7,3	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2

Hierfür wurden Phagen einer Konzentration von $1,4 \cdot 10^{11}$ pfu mL⁻¹ im Bindungspuffer (Glycin-HCl, pH 2) bzw. im Elutionspuffer für 1 h bzw. 2 h inkubiert. Nach der Inkubation

wurde die Phagenkonzentration über eine Titerbestimmung ausgewertet. Als Kontrolle diente die Inkubation in TBS bei pH 7,3. Die Ergebnisse in Tabelle 10 zeigen keine Abnahme an infizierenden Phagen sowohl unter Bindungs- als auch unter Elutionsbedingungen. Das neu etablierte aPhD ist demnach für die Identifikation von Bindepeptiden in saurem Milieu geeignet.

Für die Selektion von ZrO_2 -Bindepeptiden mittels aPhD wurden zwei verschiedene ZrO_2 -Modifikationen als Zielmaterial gewählt. Es wurde ein einkristallines *c*- ZrO_2 -Substrat oder ein polykristallines *t*- ZrO_2 -Substrat eingesetzt. Für die Selektion der Bindepeptide aus einer Peptidbibliothek mit $1,28 \cdot 10^9$ Peptidvarianten (NEB) wurden fünf Biopanning-Runden in je zwei unabhängigen Experimenten pro Substrat durchgeführt. Nach der vierten und fünften Runde wurden insgesamt 85 Peptide, die an *c*- ZrO_2 und 93 Peptide, die an *t*- ZrO_2 binden, durch DNA-Sequenzierung identifiziert. Mit dem kubischen Substrat gingen 45 verschiedene Peptide eine spezifische Wechselwirkung ein. Mit dem tetragonalen Substrat 41. Eine Bindung der isolierten Peptide an die ZrO_2 -Substrate wird über die Seitenketten der Aminosäuren vermittelt.^[31,34] Dabei können einzelne Aminosäuren oder die Eigenschaft des Gesamtpeptids von Bedeutung sein. Die Anreicherung bzw. Verarmung an einzelnen Aminosäuren kann ein Hinweis auf vorliegende Wechselwirkungen zwischen Peptid und Substrat geben. Daher wurde der isolierte Peptidpool auf die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren untersucht. Diese wurde in Bezug zur Häufigkeit in der Ursprungsbibliothek (NEB) gesetzt (Tabelle 11), indem der Quotient aus der Häufigkeit im isolierten Peptidpool zur Häufigkeit in der Ursprungsbibliothek gebildet wurde. Ab einer Zunahme der Aminosäuren von 25 % im Vergleich zur Ursprungsbibliothek (Quotient > 1,25) wurden die Aminosäuren als angereichert definiert, ab einer Abnahme von 25 % (Quotient > 0,75) entsprechend als verarmt.^[31,132] Die 20 natürlichen α -Aminosäuren unterscheiden sich in Bezug auf ihre Seitenkette.^[249] In Tabelle 11 wurden die Aminosäuren nach ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaft^[249] in hydrophobe, nukleophile, geladene, kleine und aromatische Aminosäuren sowie Aminosäuren mit einer Amidgruppe eingeteilt. Hydrophobe Aminosäuren bilden hydrophobe Wechselwirkungen aus, nukleophile Aminosäuren besitzen eine polarisierbare S-H oder O-H Gruppe, geladene Aminosäuren sind je nach pH-Wert positiv bzw. negativ geladen und kleine Aminosäuren besitzen keine Seitenkette bzw. lediglich eine Methylgruppe. Die in den aromatische Aminosäuren eingruppierten Aminosäuren besitzen jeweils einen Benzolring in ihrer Struktur. Histidin, das einen Imidazolring mit

aromatischem Charakter aufweist, wurde in den geladenen (basischen) Aminosäuren eingruppiert.^[249] Diese Klassifizierung wurde in Anlehnung an Rothenstein *et al.*^[31] gewählt, um Einflüsse dieser einzelnen Gruppen auf das Bindungsverhalten untersuchen zu können. Die Aminosäure Cystein (C) wurde im isolierten Peptidpool nicht identifiziert. Cystein beeinträchtigt die pIII vermittelte Infektiosität der Phagen.^[250,251] Es wird vermutet, dass sich zwischen Cystein-Einheiten im „insetierten“ Peptid und Cystein-Einheiten im pIII Hüllprotein eine Disulfidbindung bildet. Diese Quervernetzung kann die Struktur des Hüllproteins oder die Phagenstruktur beeinträchtigen und dadurch auch die Infektion der Bakterien, die über das Hüllprotein pIII vermittelt wird.^[250] Die Abwesenheit im isolierten Peptidpool wird daher nicht auf das Bindungsverhalten zurückgeführt.

Tabelle 11: Aminosäurehäufigkeit im isolierten Peptidpool. ZrO₂-Bindepeptide wurden nach der 4. und 5. Biopanning-Runde für das *c*- und *t*-ZrO₂-Substrat identifiziert. Beide Biopanning-Runden wurden zusammen betrachtet. Gezeigt ist die Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren im isolierten Peptidpool bezogen auf die Häufigkeit in der eingesetzten Peptidbibliothek (Quotientenbildung). Als Anreicherung wird ein Quotient > 1,25 definiert, als Verarmung ein Quotient < 0,75.^[31] Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

Substrat	hydrophob					nukleophil			basisch			sauer		klein		aromatisch			Amid	
	V	L	I	P	M	S	T	C ^a	H	K	R	D	E	G	A	Y	F	W	N	Q
<i>c</i> -ZrO ₂	0,89	1,02	0,93	0,98	0,60	1,12	1,05	0,00	1,24	0,29	0,97	0,66	0,93	1,49	1,11	1,11	1,65	1,73	0,60	1,04
<i>t</i> -ZrO ₂	0,73	0,87	0,51	1,08	0,85	1,23	0,91	0,00	1,44	0,95	0,85	0,72	0,51	1,48	0,88	0,89	2,06	1,90	0,84	1,14

Anreicherung: Verhältnis > 1,25

Verarmung: Verhältnis < 0,75

^aCystein wurde im isolierten Peptidpool nicht identifiziert. Die Aminosäure beeinträchtigt die pIII vermittelte Infektiosität der Phagen.^[250,251] Es wird vermutet, dass sich eine Disulfidbindung zwischen Cystein im Peptid und Cystein im pIII Hüllprotein bildet, die die Infektion der Bakterien stört.^[250] Daher wird die Abwesenheit im isolierten Peptidpool nicht auf das Bindungsverhalten zurückgeführt.

Die geladenen (basisch, sauer), kleinen und aromatischen Aminosäuregruppen zeigen eine wesentliche Änderung in ihrer Häufigkeit im Vergleich zur Ursprungsbibliothek. Hydrophobe und nukleophile Aminosäuren sowie die Aminosäuren mit einer Amidgruppe weisen dagegen kaum eine Änderung im Vergleich zur Ursprungsbibliothek auf. Die aromatischen

Aminosäuren Phenylalanin (F) und Tryptophan (W) sowie die Aminosäure Glycin (G) wurden mit über 25 % angereichert. Für Asparaginsäure (D) wurde eine Verarmung beobachtet. Die basischen Aminosäuren verhielten sich insgesamt uneinheitlich. Histidin (H) wurde beim *t*-ZrO₂ mit 44 % stark angereichert. Auch beim kubischen Substrat hat sich die Häufigkeit in Bezug zur Ursprungsbibliothek um 24 % erhöht. Der Anteil an Lysin (K) ist dagegen beim *c*-ZrO₂ reduziert.

Um Aussagen über elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Peptid und ZrO₂-Substrat treffen zu können, wurde das Zetapotential der ZrO₂-Substrate über Strömungspotentialmessungen bestimmt. Die Zetapotentialmessungen wurden im pH-Bereich von 2 bis 9 in einer 10 mM NaCl-Lösung durchgeführt (Abbildung 40).

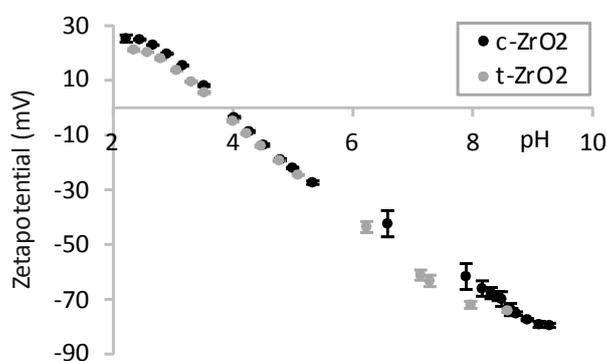


Abbildung 40: Zetapotential von ZrO₂. Das Zetapotential von *c*-ZrO₂- und *t*-ZrO₂-Substrat wurde in einer 10 mM NaCl-Lösung gemessen. Die Isoelektrischen Punkte liegen bei 3,8 (*t*-ZrO₂) und 3,9 (*c*-ZrO₂).

Das tetragonale Substrat zeigte einen Isoelektrischen Punkt (IEP) von 3,8, das kubische einen IEP von 3,9. Unter Bindungsbedingungen bei pH 2 sind beide charakterisierten Substratoberflächen somit positiv geladen. Das *t*-ZrO₂-Substrat zeigt mit 21 ± 2 mV ein etwas geringeres Zetapotential als das *c*-ZrO₂-Substrat mit 26 ± 1 mV. Aminosäuren, die eine anziehende elektrostatische Wechselwirkung zu den Substraten eingehen könnten, sind Asparaginsäure (D) und Glutaminsäure (E). Allerdings liegen beide bei pH 2 ungeladen vor. Eine Wechselwirkung durch elektrostatische Anziehung zwischen negativ geladenen Carboxylatgruppen und positiv geladenen Zr-OH₂⁺-Gruppen auf der Substratoberfläche kann daher ausgeschlossen werden. Hierauf deutet auch die Verarmung der sauren Aminosäuren im isolierten Peptidpool hin. Die basischen Aminosäuren Histidin ($pK_s = 6,0^{[252]}$), Lysin ($pK_s = 10,5^{[252]}$) und Arginin ($pK_s = 12,5^{[252]}$) sind bei pH 2 positiv geladen. Dies führt zu

einer abstoßenden Wechselwirkung mit dem Substrat. Diese Abstoßung kann ein Grund für die Verarmung von Lysin im Peptidpool des stärker positiv geladenen *c*-ZrO₂-Substrats sein. Trotz der abstoßenden Wechselwirkung wurde Histidin im Peptidpool des *t*-ZrO₂-Substrats angereichert und im Peptidpool des *c*-ZrO₂-Substrats um 24 % gehäuft identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass neben elektrostatischen Kräften zusätzliche Kräfte wirken müssen, die eine spezifische Bindung zum Substrat vermitteln. Histidin ist eine Aminosäure, die eine Vielseitigkeit in Bezug auf molekulare Wechselwirkungen aufweist.^[253] In protonierter Form reduzieren sich die Wechselwirkungen auf Wasserstoffbrückenbindungen und anziehende elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Motiv der Imidazolgruppe und Zr-OH₂⁺-Gruppen auf der Substratoberfläche. Diese bindungsbildenden Kräfte können gegenüber der elektrostatisch abstoßenden Kraft zwischen der protonierten Imidazolgruppe und dem positiv geladenen Substrat überwiegen. Die Anreicherung der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan kann auf eine Wechselwirkung der aromatischen Ringstruktur mit den ZrO₂-Substraten hindeuten. Die negativ geladene Elektronenwolke des π -Systems in der aromatischen Ringstruktur kann elektrostatische Wechselwirkungen mit Zr-Kationen eingehen.^[254,255] Solche Kation- π -Wechselwirkungen spielen bei der Struktur und Funktion von Proteinen, Peptide und komplexen biologischen Molekülen eine wichtige Rolle.^[256] Auch zwischen Zr-OH₂⁺ auf der Oberfläche der ZrO₂-Substrate und den aromatischen Ringstrukturen in den Seitenketten der aromatischen Aminosäuren sind Kation- π -Wechselwirkungen möglich.

Da nicht nur einzelne Aminosäuren, sondern auch die Aminosäuresequenz einen Einfluss auf die Bindung zu ZrO₂ haben kann, werden im Folgenden die isolierten 7-mer Peptide betrachtet. Bei pH 2 sind alle Peptide positiv geladen (Abbildung 41). Insgesamt 98 % der Peptide weisen eine Nettoladung zwischen 0,9 und 2,9 auf. Dies führt zu einer elektrostatisch abstoßenden Kraft, die der Bindung entgegen wirkt.

Durch ein Sequenzalignment wurde der isolierte Peptidpool auf ein potentiell Bindemotiv untersucht. Dies kann einen Hinweis auf eine bestimmte Aminosäuresequenz geben, die einen Einfluss auf die Bindung an ZrO₂ ausübt. Beim Vergleich der Peptidsequenzen wurden relative Positionen der Aminosäuren zueinander verglichen. So konnte ein potentiell Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz „SXS“ identifiziert werden (Tabelle 12).

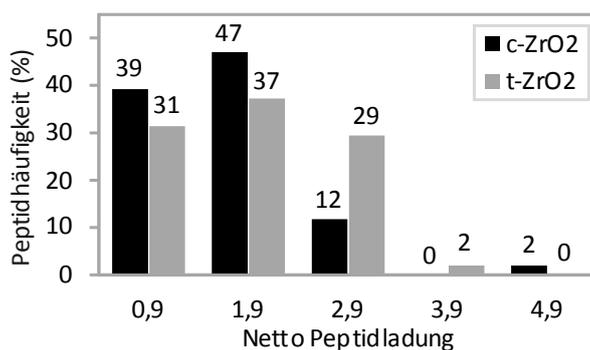


Abbildung 41: Nettoladung der isolierten Peptide. Die isolierten ZrO_2 -Bindepeptide wurden entsprechend ihrer Nettoladung unter Bindungsbedingung bei pH 2 gruppiert. Die Peptidladung wurde mit Protein calculator berechnet (Version 3.4; online unter <http://protpcalc.sourceforge.net/>)

Tabelle 12: Potentielles Bindemotiv identifiziert durch Sequenzalignment. Insgesamt 9,0 % der am kubischen und am tetragonalen Substrat isolierten Peptide zeigten ein potentielles Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz „SXS“. Die Peptide wurden durch spezifische Wechselwirkung mit dem $c-ZrO_2$ - und $t-ZrO_2$ -Substrat isoliert. Ihre Aminosäuresequenz und Häufigkeit im jeweils isolierten Peptidpool – am kubischen oder tetragonalen Substrat – sowie im gesamten isolierten Peptidpool – am kubischen und tetragonalen Substrat (Werte in Klammer) – sind aufgelistet. *Das Bindemotiv „SXS“ wurde um eine Serin-Einheit erweitert „SXSYS“.

Aminosäuresequenz	Substrat	Peptidhäufigkeit (%)
GSLSRFI	$c-ZrO_2$	8,2 (3,9)
GSISNGR	$c-ZrO_2$	1,2 (0,6)
QSHSVFR	$t-ZrO_2$	1,1 (0,6)
AMSHSKQ	$t-ZrO_2$	2,2 (1,1)
DPRSIS*	$t-ZrO_2$	1,1 (0,6)
WGMNSNS	$t-ZrO_2$	1,1 (0,6)
WLSSELH	$c-ZrO_2$	1,2 (0,6)
GASESYL	$c-ZrO_2$	2,4 (1,1)

Bezogen auf den gesamten isolierten Peptidpool (am kubischen und tetragonalen Substrat) trat dieses Motiv in insgesamt 9,1 % aller Peptide auf (s. Tabelle 12, Summe der Peptidhäufigkeiten in Klammer). Die Aminosäuresequenz „SXS“ lässt einen Einfluss von Serin auf die Bindung an ZrO_2 vermuten. Auch im isolierten Peptidpool zeigt sich eine leichte Zunahme an Serin im Vergleich zur Ursprungsbibliothek mit 12 % beim *c*- ZrO_2 - und 23 % beim *t*- ZrO_2 -Substrat. Das Auftreten von Serin in bereits identifizierten Bindepeptidsequenzen wie dem 12-mer Bindepeptid **SWNNMGWLPTFG** (*c*- ZrO_2 (Y-dotiert)-(100) Oberfläche)^[31] oder dem 58-mer Bindepeptid **WMPSDVDINDPQGGGSRPNLHQPAAEAASKKSEN-RKVPFYSHSWYSSMSSEDKRGW** (Y-dotierte ZrO_2 -Partikel)^[34], bei dem zusätzlich das Motiv SHS vorliegt, ist ein Hinweis auf eine mögliche Schlüsselrolle dieser Aminosäure bei der Bindung. Beide ZrO_2 -Bindepeptide wurden bei pH 7,5 selektiert. Es wurde angenommen, dass auch elektrostatische Wechselwirkungen zur Bindung an ZrO_2 beitragen.^[31,34] Die polare Hydroxygruppen in der Seitenkette von Serin kann über Wasserstoffbrücken eine Bindung zu ZrO_2 eingehen.^[257] Zusätzlich kann zwischen dem partiell negativ geladenen Sauerstoff der Hydroxygruppe und dem positiv geladenen *c*- und *t*- ZrO_2 -Substrat eine elektrostatische Anziehung vermittelt werden. Der Einfluss eines ähnlichen Bindemotivs TST wurde für die Bindung cyclischer 9mer Peptide an Platin untersucht.^[258] Threonin besitzt im Vergleich zu Serin eine zusätzliche Methylgruppe in der Seitenkette. Beide Aminosäuren enthalten eine Hydroxygruppe in der Seitenkette. Molekulardynamische Simulationen ergaben, dass die Seitenketten des Bindemotivs TST in Abwesenheit von Platin Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen eingehen und dadurch dem Lösungsmittel zugewandt sind.^[258] Eine solche Peptidkonformation wird durch die hohe Flexibilität der Aminosäureeinheiten TST in der Peptidkette begünstigt.^[258] Das polare Bindemotiv TST band im Vergleich zur restlichen nichtpolaren Peptidsequenz besonders stark an Platin.^[258] Auch im Bindemotiv SXS sind zwei Serineinheiten mit Hydroxygruppen enthalten. Wasserstoffbrückenbindungen mit Wassermolekülen des Suspensionsmittels können auch hier dazu führen, dass die Seitenketten von Serin dem Suspensionsmittel zugewandt sind. Diese Peptidkonformation ermöglicht somit, dass die Hydroxygruppen von Serin starke polare Wechselwirkungen mit dem ZrO_2 -Substrat eingehen können.

Es wurden sechs Peptide genauer analysiert, die später für die Mineralisation von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) eingesetzt wurden. Diese sechs Peptide (Tabelle 13) wurden im aPhD mehrfach isoliert. Dies lässt vermuten, dass sie eine stärkere Bindung zu ZrO_2

eingehen. Die Peptide wurden durch „ct5-3“ bezeichnet. Diese Bezeichnung gibt an, ob die Peptide nur an einem Substrat „c“ oder „t“ oder an beiden Substraten „ct“ isoliert wurden. Hierbei steht „c“ für das *c*-ZrO₂- und „t“ für das *t*-ZrO₂-Substrat. Die erste Zahl, hier „5“, beschreibt die Biopanning-Runde, in der der Klon identifiziert wurde. Die letzte Zahl „3“ gibt die Nummer des isolierten Klons an. Tabelle 13 fasst die Aminosäuresequenzen der mehrfach isolierten Peptide sowie ihre Peptideigenschaften zusammen und zeigt die Häufigkeit, mit der die Peptide am *c*-ZrO₂- oder *t*-ZrO₂-Substrat isoliert wurden.

Tabelle 13: Mehrfach isolierte ZrO₂-Bindepeptide. Insgesamt sechs Peptide, die eine spezifische Wechselwirkung mit dem *c*-ZrO₂- und *t*-ZrO₂-Substrat eingingen wurden vermehrt isoliert. Die vier Peptide *ct5-3*, *ct5-1*, *ct5-8* und *ct5-2* banden sowohl an *c*-ZrO₂ als auch an *t*-ZrO₂, wohingegen *c5-1* und *t5-3* nur an eines der beiden Substrate banden. Die Aminosäuresequenzen der mehrfach isolierten Peptide, sowie die Peptidhäufigkeiten und -eigenschaften sind zusammengefasst. Zudem ist die Anzahl an Aminosäuren mit polaren Seitengruppen aufgelistet.

Peptid	Aminosäuresequenz	Peptidhäufigkeit (%)		Netto-Peptidladung ^a pH 2	Hydrophobizität ^b	Anzahl polarer Aminosäuren
		<i>c</i> -ZrO ₂	<i>t</i> -ZrO ₂			
<i>ct5-3</i>	QLAVAPS	9,4	3,2	0,9	0,8	2
<i>ct5-1</i>	SLLGQTP	15,3	3,2	0,9	0,1	3
<i>ct5-8</i>	HGGVRLY	5,9	7,5	2,9	-0,3	2
<i>ct5-2</i>	GQSEKHL	1,2	17,2	2,9	-1,6	5
<i>c5-1</i>	GSLSRFI	8,2	0,0	1,9	0,7	3
<i>t5-3</i>	TVNFKLY	0,0	11,8	1,9	0,2	4

^aBerechnet mit Protein calculator (Version 3.4; online unter <http://protpcalc.sourceforge.net/>)

^bHydrophobizitätsskala nach Kyte ^[259]; berechnet mit ProtParam (online unter <https://web.expasy.org/protparam/>)

Die vier Peptide, *ct5-3* (QLAVAPS), *ct5-1* (SLLGQTP), *ct5-8* (HGGVRLY) und *ct5-2* (GQSEKHL) gingen eine spezifische Bindung mit beiden Substraten ein. Das Peptid *c5-1* (GSLSRFI) band nur am *c*-ZrO₂-Substrat, *t5-3* (TVNFKLY) nur am *t*-ZrO₂-Substrat. Fast alle Peptide enthalten mindestens eine Aminosäure, die in Bezug auf die Ursprungsbibliothek angereicherten war, ausgenommen *ct5-3*. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Gly-

cin, Phenylalanin oder Histidin. Die potentielle Nettoladung der Peptide bei pH 2 liegt zwischen 0,9 für *ct5-3* und *ct5-1* und 2,9 für *ct5-8* und *ct5-2*. Die Peptide *c5-1* und *t5-3* weisen potentiell eine Nettoladung von 1,9 auf. Die Hydrophobizität der Peptide wurde nach der Hydrophobizitätsskala nach Kyte^[259] berechnet (ProtParam; online unter <https://web.expasy.org/protparam/>). In dieser Skala zeigen hohe positive Werte einen hydrophoben Charakter und hohe negative Werte einen hydrophilen Charakter.^[259] Die Hydrophobizität der Peptide variiert von einem leicht hydrophoben Charakter bei *ct5-3* mit einer Hydrophobizität von 0,8 bis zu einem hydrophilen Charakter bei *ct5-2* mit einem Wert von -1,6. Alle gehäuft isolierten Peptide besitzen mindestens zwei polare Aminosäuren. Hierzu gehören Serin, Threonin, Tyrosin, Asparagin, Glutamin, Glutaminsäure, Lysin, Arginin und Histidin. Um den Einfluss der Peptideigenschaften auf das Bindungsverhalten zu untersuchen, wurde ein Bindungsassay durchgeführt. Mit diesem wurde die Bindungsstärke der mehrfach isolierten Peptide für die Bindung an *c*-ZrO₂ analysiert (Abbildung 42). Die Bindepeptide lagen dabei als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein pIII von M13 Phagen vor. Diese Phagen-Peptid-Komplexe werden als „M13III_*ct*-53“ bezeichnet. Hierbei steht M13III für das Hüllprotein pIII, an dessen N-terminalen Ende das Peptid mit der Bezeichnung „*ct*-53“ (s. Tabelle 13 und Einführung Peptidbezeichnung oben) präsentiert wurde. Die Bindungsstärke der Phagenklone wurde auf die M13wt-Referenz normiert.

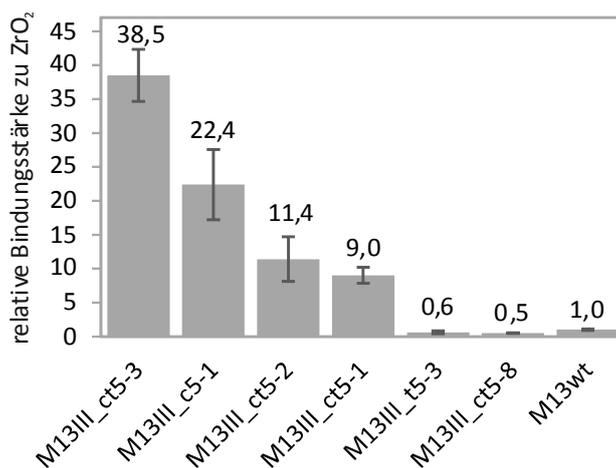


Abbildung 42: Relative Bindungsstärke von modifizierten und Wildtyp (wt) M13-Bakteriophagen zum *c*-ZrO₂-Substrat. Die am häufigsten isolierten Bindepeptide wurden als Fusionsprotein mit dem Hüllprotein pIII exprimiert. Die Bindungsstärke wurde auf die M13wt-Referenz normiert.

Fast alle Klone zeigten eine stärkere Bindung als der Wildtyp (wt), ausgenommen M13III_t5-3 und M13III_ct-58. Am stärksten band M13III_ct5-3 mit einer relativen Bindungsstärke von $38,5 \pm 3,8$, gefolgt von M13III_c5-1 mit einer um den Faktor $22,4 \pm 5,2$ stärkeren Bindung als die M13wt-Referenz. Die Phagenklone M13III_ct5-2 und M13III_ct5-1 zeigten eine nahezu gleiche Bindungsstärke, die im Vergleich zur M13wt-Referenz um das $11,4 \pm 3,3$ bzw. $9,0 \pm 1,2$ fache stärker ist. Die schwächste Bindung zeigten M13III_ct-58 mit einer relativen Bindungsstärke von $0,5 \pm 0,1$ und M13III_t5-3 mit einer relativen Bindungsstärke $0,6 \pm 0,2$. Um eine Aussage über den Einfluss der Peptideigenschaften auf das Bindungsverhalten treffen zu können, werden im Folgenden die Peptideigenschaften in Bezug auf die Bindungsstärke betrachtet. Die positive Nettoladung der Peptide (Tabelle 13) und die positive Ladung des *c*-ZrO₂-Substrats (s. Abbildung 40) führen zu einer abstoßenden Kraft zwischen Peptid und Substrat. Wie bereits beschrieben, haben jeweils zwei Peptide, *ct*5-3 und *ct*5-1, *c*5-1 und *t*5-3 sowie *ct*5-8 und *ct*5-2 dieselbe Nettoladung. Somit wirkt auf die Peptidpaare dieselbe Abstoßungskraft. Eine abstoßende Kraft wirkt der Bindung mit ZrO₂ entgegen. Eine große Nettoladung kann somit eine schwächere und eine niedrige Nettoladung eine stärkere Bindung bedeuten. Allerdings ist eine solche Korrelation zwischen abstoßender Kraft und Bindungsstärke nur bei einzelnen Peptiden zu beobachten. Zum Beispiel weist das Peptid mit der stärksten Bindung *ct*5-3 die geringste Nettoladung (0,9) auf und damit die schwächste abstoßende Kraft. Das Peptid mit der schwächsten Bindung *ct*5-8 weist die stärkste Nettoladung auf (2,9) und damit die stärkste Abstoßungskraft. Jedoch liegt innerhalb der Peptidpaare, die dieselbe Nettoladung haben, bei keinem der drei Paare eine Korrelation zur Bindungsstärke vor. Bindungsbildende Kräfte können unter anderem hydrophobe Wechselwirkungen der Peptide mit der Substratoberfläche darstellen.^[260] Diese sind umso stärker, je hydrophober das Peptid ist.^[260] Um die Korrelation zwischen Hydrophobizität und Bindungsstärke zu diskutieren, werden im Folgenden jeweils Peptidpaare betrachtet, die dieselbe Nettoladung haben. Das Peptidpaar *ct*5-3 und *ct*5-1 unterscheidet sich in der Hydrophobizität der Peptide. Während *ct*5-3 mit 0,8 die stärkste Hydrophobizität aufweist, zeigt *ct*5-1 mit 0,1 nur einen sehr schwachen hydrophoben Charakter. Gleichzeitig bindet *ct*5-3 um das 4,2fache stärker als *ct*5-1. Dies lässt vermuten, dass hydrophobe Wechselwirkungen einen starken Einfluss auf die Bindung haben. Auch das Peptidpaar *c*5-1 und *t*5-3 zeigt eine Korrelation zwischen Hydrophobizität und Bindungsstärke. Während *c*5-1 mit 0,7 eine stärkere Hydrophobizität zeigt,

liegt bei *t5-3* mit 0,2 nur ein schwacher hydrophober Charakter vor. Gleichzeitig ist die Bindungsstärke von *c5-1* um den Faktor 37 höher als die Bindungsstärke von *t5-3*. Beim Peptidpaar *ct5-8* und *ct5-2* werden hydrophobe Wechselwirkungen dagegen ausgeschlossen. Beide Peptide besitzen einen hydrophilen Charakter, der bei *ct5-2* mit -1,6 stärker ausgeprägt ist als bei *ct5-8* mit -0,3. Dieser hydrophile Charakter schließt eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Substrat aus.^[260] Trotzdem binden die mehrfach isolierten Peptide an ZrO_2 . Hier müssen demnach weitere bindungsbildende Kräfte wirken. Auch Wechselwirkungen zwischen polaren Aminosäuren und ZrO_2 können eine Bindung zu ZrO_2 vermitteln.^[257] Durch die polare Eigenschaft der Aminosäuren kann eine elektrostatische Anziehung zwischen partiell negativ geladenem Sauerstoff oder Stickstoff und dem positiv geladenen ZrO_2 -Substrat vermittelt werden. Zusätzlich können polare Gruppen als H-Bindungsdonor oder -akzeptor wirken und über H-Brücken eine Bindung zum Substrat eingehen.^[257] Das Peptide *ct5-8* besitzt zwei polare Aminosäuren. Insgesamt fünf polare Aminosäuren sind es beim Peptid *ct5-2*. Letzteres zeigte eine um den Faktor 22,8 stärkere Bindung mit ZrO_2 im Vergleich zum Peptid *ct5-8*. Diese Korrelation zwischen der Anzahl an polaren Aminosäuren und der Bindungsstärke deutet darauf hin, dass auch polare Wechselwirkungen einen starken Einfluss auf die Bindung haben. Auch die anderen Peptidpaare *ct5-3* und *ct5-1* sowie *c5-1* und *t5-3* besitzen polare Aminosäuren, wobei in diesen Fällen keine sinnvolle Korrelation zur Bindungsstärke gefunden wurde und somit vermutlich die hydrophoben Wechselwirkungen das Bindeverhalten dominieren. Zusätzlich zu den polaren Aminosäuren besitzen fünf der sechs am häufigsten isolierten Peptide mindestens eine der angereicherten Aminosäuren Glycin, Phenylalanin und Histidin. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass auch die angereicherten Aminosäuren einen Einfluss auf die Bindung haben. Allerdings ist keine Korrelation zur relativen Bindungsstärke zu beobachten. Während das Peptid *ct5-3*, das am stärksten bindet, keine angereicherte Aminosäure besitzt, besitzt das Peptid *ct5-8*, das am schwächsten bindet, mit drei angereicherten Aminosäuren die meisten angereicherten Aminosäuren. Daher ist zu vermuten, dass diese Aminosäuren nur einen untergeordneten Einfluss auf die Bindung haben.

Mittels Phagen-Display konnten Peptide identifiziert werden, die spezifisch an ZrO_2 binden. Die Bindung an das anorganische Material wird hauptsächlich durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen vermittelt. Zudem wurde ein potentiell Bindemotiv mit der Aminosäuresequenz SXS identifiziert. Auch hier spielen polare Wechselwirkungen eine Rolle.

Die Kombination der Flexibilität der Serineinheiten in der Peptidkette und der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindung mit Wassermolekülen des Suspensionsmittels führen zu einer Konformation der Bindepeptide, die die Bildung starker polarer Wechselwirkungen des Bindemotivs SXS mit ZrO_2 ermöglicht.

6.2.2 Genetische Modifikation

Bei Biomineralisationsprozessen sind spezifische Wechselwirkungen zwischen einem organischen Templat (Biomakromoleküle) und dem anorganischen Material von Bedeutung, die zur Bildung von Biomineralien mit definierter Größe, Form und Orientierung führen.^[4-7] Um diese „biologischen Spezifität“ in Biomineralisationsprozessen auf die Bildung von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) zu übertragen, wurden Peptide mittels Phagen-Display identifiziert, die spezifisch an Zirkoniumdioxid (ZrO_2) binden. Die Wechselwirkung, die zur Bindung an ZrO_2 führt (ZrO_2 -Bindepeptide), kann auch einen bedeutenden Einfluss auf die Mineralisation von ZrbM aus einer Salzlösung haben.^[261-263] Um den Einfluss der Bindepeptide auf die Mineralisation von ZrbM zu untersuchen, wurden die Peptide *ct5-1*, *c5-1* und *ct5-2* (s. Tabelle 13 und Einführung Peptidbezeichnung in 6.2.1) auf der Phagenoberfläche präsentiert, wo sie als Fusionsprotein mit dem Haupthüllprotein pVIII vorliegen. Da die Phagenoberfläche hauptsächlich aus 2700 Kopien des Haupthüllproteins pVIII besteht, ermöglichte das Fusionsprotein eine hohe Bindepeptiddichte und damit viele Interaktionspunkte mit dem anorganischen Material. Zur Präsentation der Peptide auf der Phagenoberfläche wurden die Phagen genetisch modifiziert. Hierbei wurde die Technik der inversen Polymerase-Kettenreaktion (iPCR) angewandt (s. 4.6.1). Mittels iPCR-Reaktion wurden die Peptidsequenzen auf DNA-Ebene zwischen den ersten beiden N-terminalen Aminosäuren Alanin (A) und Glutaminsäure (E) des Haupthüllproteins inseriert. Die Primer für die iPCR bestanden aus zwei Teilen. Der eine Teil kodierte das Peptid und der Andere war komplementär zur Phagen-DNA an der entsprechenden Insertionsposition (s. Abbildung 13 in 4.6.1). Über diesen komplementären Teil fand die Primeranlage an die Phagen-DNA statt. Das lineare iPCR-Produkt hatte zueinander komplementäre DNA-Sequenzen an beiden Enden. Das iPCR-Produkt wurde über ein Agarosegel (s. Abbildung 43) aufgetrennt. Die Bande bei 7243 Basenpaaren (bp) entspricht dem modifizierten M13-Templat. Durch erfolgreiche Insertion der Peptid-DNA, die sieben Aminosäuren kodiert, wurden 21 Basen hinzugefügt.

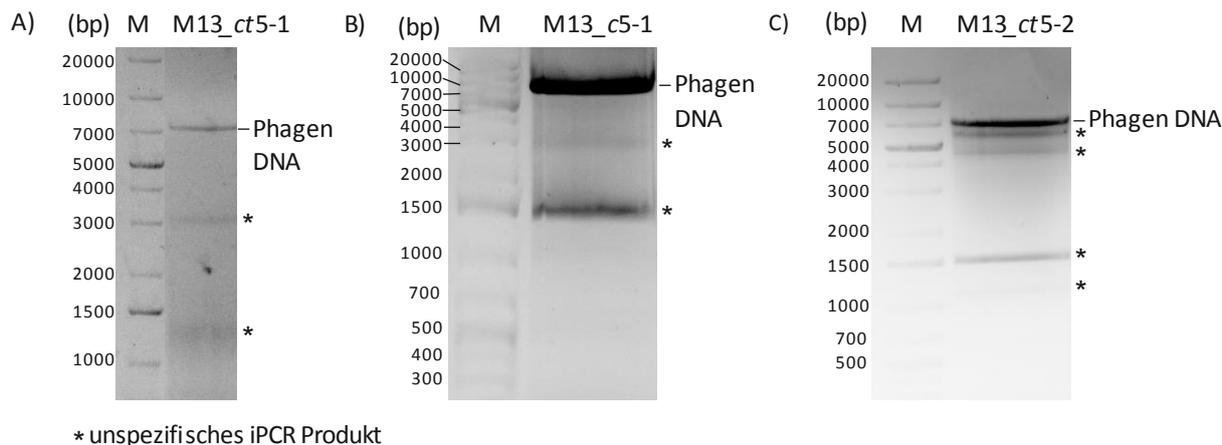


Abbildung 43: Agarosegel zur Kontrolle der iPCR-Reaktion. Mittels dieser Reaktion wurde die Peptidsequenz der Peptide M13_ct5-1, M13_c5-1 und M13_ct5-2 auf DNA-Ebene ins M13KE-Bakteriophagentemplat (7222 Basenpaare (bp)) inseriert. Die Bande bei 7243 bp (siehe Marker M) entsprach der modifizierten Phagen-DNA. Die anderen Banden entsprachen unspezifischen PCR Produkten.

In einer darauffolgenden DNA-Ligation wurde die lineare Phagen-DNA enzymkatalysiert zu einer zirkulären doppelsträngigen DNA verknüpft. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* ER2738-Zellen mit der modifizierten Phagen-DNA transformiert. Nach dem Ausplattieren wurden ein bis mehrere Phagen-Plaques amplifiziert, die Phagen-DNA isoliert und anschließend die genetische Modifikation durch Sequenzierung überprüft. Insgesamt konnten drei ZrO₂-Bindepeptide erfolgreich als Fusionsprotein mit dem Haupthüllprotein pVIII exprimiert werden (Tabelle 14). Diese Phagen-Peptid-Komplexe werden im Folgenden als „M13_ct5-1“ beschrieben, wobei mit „ct5-1“ das jeweilige Peptid angegeben ist. Bei M13_ct5-1 wurde die erste N-terminale Aminosäure des Haupthüllproteins, Alanin, auf DNA-Ebene deletiert. Dies zeigte ein Sequenzalignment mit der modifizierten Phagen-DNA und der wt-Phagen-DNA (s. Abbildung 44 A). Die DNA-Sequenz des Bindepeptids wurde vollständig im Klon inseriert. Bei M13_c5-1 wurde ein 9-mer-Peptid exprimiert, bei welchem die ersten beiden Aminosäuren Glycin (G) und Serin (S) dupliziert wurden (s. Abbildung 44 B). Bei M13_ct5-2 wurden dagegen Glutaminsäure (E) und Lysin (K) auf der DNA-Ebene deletiert (s. Abbildung 44 C). Diese erfolgreich modifizierten Phagen wurden als Biotemplat eingesetzt (6.3), um den Einfluss der ZrO₂-Bindepeptide auf die Abscheiderate von ZrbM zu untersuchen.

Tabelle 14: Klonierung von pVIII-Fusionsproteinen. Die drei ZrO₂-Bindepeptide *ct5-1*, *c5-1* und *ct5-2* wurden als Fusionsprotein mit dem Haupthüllprotein pVIII exprimiert. Die Peptide wurden zwischen den ersten beiden N-terminalen Aminosäuren Alanin (A) und Glutaminsäure (E) des pVIII inseriert. Es sind die N-terminalen Enden der Fusionsproteine bis zur Glutaminsäure (zweite N-terminale Aminosäure des Haupthüllproteins) dargestellt. Die Aminosäuresequenz der ZrO₂-Bindepeptide ist unterstrichen.

ZrO ₂ -Bindepeptid	Peptid exprimiert als Fusionsprotein mit pVIII (unterstrichen)
<i>ct5-1</i> SLLGQTP	<u>SLLGQTPE</u>
<i>c5-1</i> GSLSRFI	<u>AGSGLSRFIE</u>
<i>ct5-2</i> GQSEKHL	<u>AGQSHLE</u>

A) Basennummer
1306
|
M13KE AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTT
M13_ct5-1 AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTT

A
M13KE TCGCTGC-----TGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTAACT
M13_ct5-1 TCGCTTCTCTGCTGGGCCAGACCCCGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTAACT
***** *
S L L G Q T P

B) Basennummer
1306
|
M13KE AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTT
M13_c5-1 AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTT

M13KE TCGCTG-----CTGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGG
M13_c5-1 TCGCTGCTGGCTCTGGCTCTCTGTCTCGTTTTATTGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGG

G S G S L S R F I

C) Basennummer Basennummer
1306 1348
| |
M13KE AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTT
M13_ct5-2 AAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTTGTTCGATGCTGTCTT

M13KE TCGCTGCT-----GAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTAACTCCC
M13_ct5-2 TCGCTGCTGGCCAGTCACATCTGGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTAACTCCC

G Q S H L

Abbildung 44: Sequenzalignment. Ein Sequenzalignment mit der wt-Phagen-DNA (M13KE) und der modifizierten Phagen-DNA A) M13_ct5-1, B) M13_c5-1 und C) M13_ct5-2 zeigte die Insertion der Peptid-DNA. Die am Hüllprotein pVIII fusionierten Bindepeptide sind im Einbuchstabencode beschrieben. Sie werden durch die unterstrichenen Basentriplets kodiert.

6.3 Einfluss ZrO₂-Bindepeptide auf die Abscheiderate von ZrbM

Um den Einfluss der ZrO₂-Bindepeptide auf die Abscheidung von Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) (s. 6.1.1) zu untersuchen, wurden modifizierte und wt-Phagen mineralisiert. Die modifizierten Phagen präsentierten die Bindepeptide an den 2700 Kopien des Haupt-hüllproteins pVIII (6.2.2). Dadurch wurde eine hohe Bindepeptiddichte und somit viele Interaktionspunkte mit dem anorganischen Material erzielt. Zur Untersuchung der Ab-

scheiderate wurden die Phagen auf einem Substrat immobilisiert. Die Höhenzunahme der Phagen durch Mineralisation wurde mittels AFM untersucht. Voraussetzung hierfür war die Stabilität der Phagen in der Ethanol-haltigen Mineralisationslösung sowie eine selektive Mineralisation der immobilisierten Phagen. Daher wurde zunächst die Stabilität der Phagen untersucht (6.3.1). Anschließend wurden verschiedene Substrate auf ihre Eignung zur selektiven Mineralisation von Phagen getestet (6.3.2). Die Substrate durften dabei selbst nicht mineralisiert werden.

6.3.1 Stabilität immobilisierter Phagen in der Mineralisationslösung

Eine Voraussetzung für den Einsatz von Phagen als Biotemplat zur Mineralisation von ZrbM war die Stabilität der Phagen in der Mineralisationslösung, die 80 Vol % Ethanol enthielt. Dabei müssen die Phagen während der Mineralisation stabil bleiben, bis sich eine Schicht aus ZrbM auf der Phagenoberfläche gebildet hat und die Phagen keinen Kontakt mehr zum Lösungsmittel haben. Um die Zeit abzuschätzen, die benötigt wird, um eine Schicht aus ZrbM zu bilden, wurden Vorversuche durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde ein hydrophiler Si-Wafer mit einer Mineralisationszeit von einer Minute und fünf Minuten mineralisiert und anschließend mittels AFM analysiert. Zur Mineralisation wurde eine 20 mM ZrOCl_2 -Lösung in 80 Vol % Ethanol bei ZT eingesetzt (s. 6.1). Ein Vergleich der mineralisierten Wafer mit dem reinen Si-Wafer zeigte eine Beschichtung des Wafers bereits nach einer Minuten Mineralisationszeit (s. Abbildung 45). Das Höhenprofil, das in Abbildung 45 unterhalb der AFM-Aufnahmen gezeigt ist, bestätigt die Beschichtung des Wafers. Es schieden sich globulare Partikel auf dem Substrat ab. Während der Si-Wafer eine Rauigkeit von 0,1 nm aufweist, wurde für die mineralisierten Wafer nach einer und fünf Minuten Mineralisation eine Rauigkeit von 0,4 nm bestimmt. Zwischen einer Minute und fünf Minuten Mineralisation ist kein Unterschied in der Rauigkeit und der Beschichtung des Wafers zu beobachten. Dies bestätigt die sehr schnelle Mineralisation des Wafers.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Vorversuche wurde die Stabilität von Phagen während einer Inkubationszeit von einer Minute in 80 Vol % Ethanol untersucht. Für diese Untersuchung wurden Phagen zunächst auf einem Si-Wafer immobilisiert. Hierfür wurde die Phagensuspension ($1,5 \mu\text{L}$, $1,0 \cdot 10^{10}$ pfu mL^{-1}) auf einen Si-Wafer aufgebracht und über

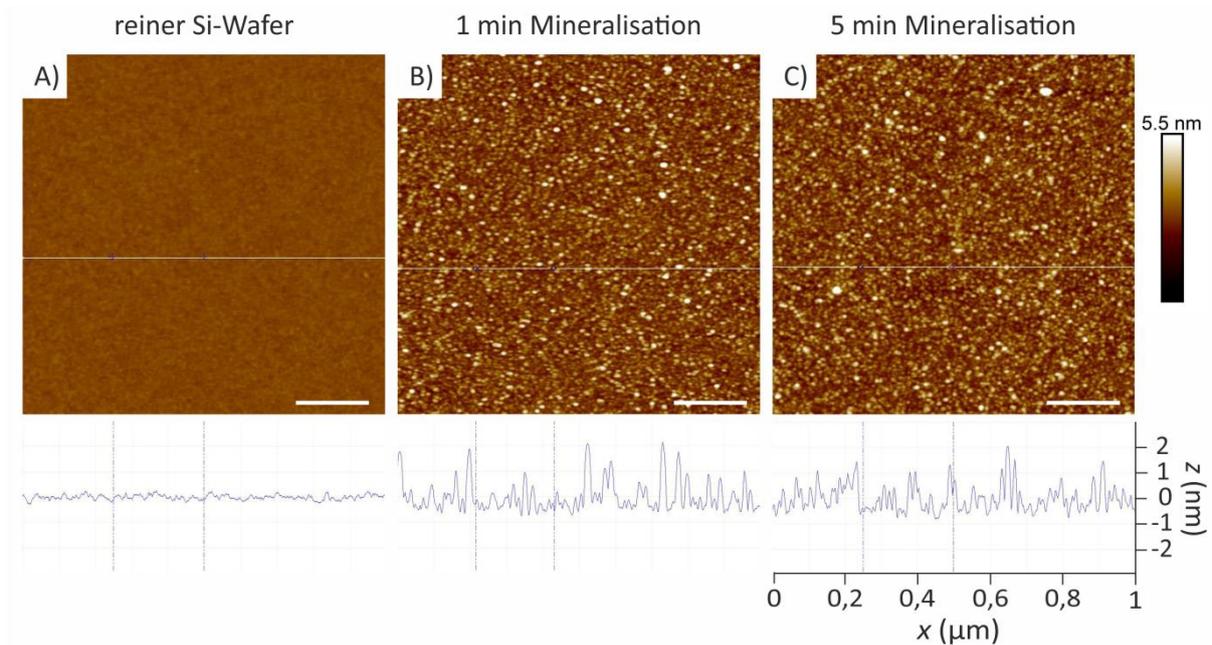


Abbildung 45: Mineralisation eines Si-Wafers. Die AFM-Aufnahmen zeigen die Oberfläche eines Si-Wafers A) vor und nach der Mineralisation von B) 1 min bzw. C) 5 min. Unterhalb der AFM-Aufnahmen ist das jeweilige Höhenprofil des eingezeichneten Linienscans dargestellt. Maßstab: 200 nm

Nacht bei 37 °C getrocknet. Nach dem Immobilisieren wurden die Phagen in 80 Vol % Ethanol für eine Minute inkubiert. In Abbildung 46 A) und B) sind AFM-Aufnahmen der immobilisierten Phagen vor und nach der Inkubation gezeigt. Während der Inkubation blieb sowohl die Form als auch die Länge der Phagen erhalten. Einzig die Phagenhöhe nahm von $2,2 \pm 0,2$ nm auf $0,5 \pm 0,1$ nm ab. Phagen, die durch das Trocknen einer wässrigen Phagensuspension immobilisiert wurden (Abbildung 46 A), sind vermutlich noch von einer Hydrathülle umgeben, die zur Phagenhöhe von 2 nm beiträgt.^[264] Durch die Immobilisierung findet bereits eine Reduktion des Phagendurchmessers von circa 6 nm^[33] auf 2 nm statt. Grund hierfür können starke Wechselwirkungen, wie Wasserstoffbrückenbindungen mit dem hydrophilen oxidierten Si-Wafer sein.^[265–267] Werden immobilisierte Phagen in einer 80 Vol %igen Ethanol-Lösung inkubiert, so kann die Hydrathülle durch Ethanol verdrängt werden. Beim darauffolgenden Trocknungsschritt verdampft Ethanol wesentlich schneller als Wasser. Dies liegt am geringeren Siedepunkt von Ethanol mit 78 °C^[214] im Vergleich zu Wasser mit 100 °C^[214]. Somit kann der Höhenunterschied zwischen immobilisierten Phagen vor und nach der Inkubation in 80 Vol % Ethanol auf das Verdrängen der

Hydrathülle zurückgeführt werden. Auch nach der Inkubation immobilisierter Phagen in der Mineralisationslösung für fünf Minuten bei ZT (Abbildung 46 C) blieb die Phagenlänge und -form intakt. Die Phagenhöhe nahm durch die Mineralisation auf $3,9 \pm 0,4$ nm zu. Das Erhalten der Phagenstruktur zeigt, dass die Phagen während der Mineralisation von ZrbM in einer Mineralisationslösung mit 80 Vol % Ethanol stabil bleiben und als Templat zur Mineralisation von ZrbM eingesetzt werden können.

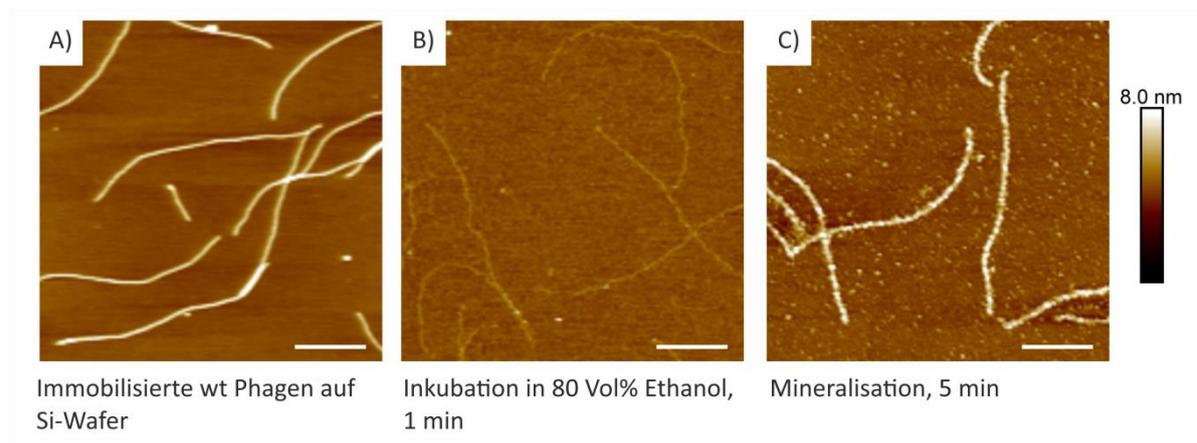
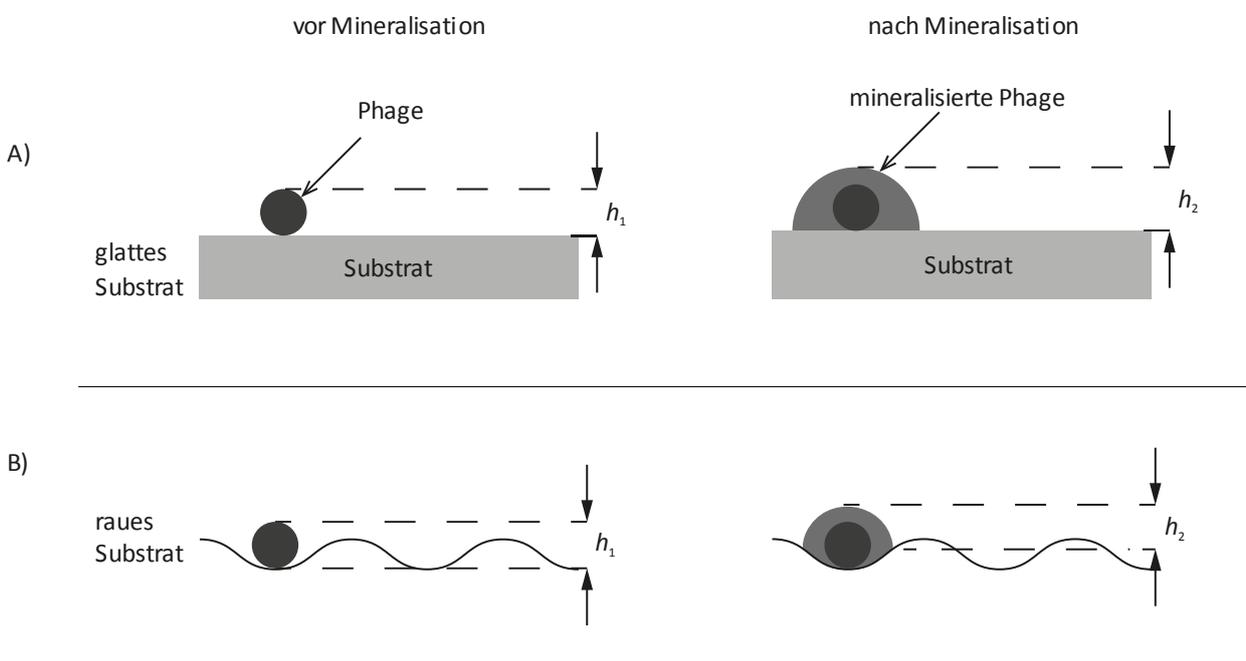


Abbildung 46: Stabilität immobilisierter wt-Phagen im Mineralisationsmedium. A) AFM-Aufnahme immobilisierter wt-Phagen auf hydrophilem Si-Wafer ($1,5 \mu\text{L}$ wässrige Phagensuspension $1,0 \cdot 10^{10}$ pfu mL^{-1} über Nacht bei 37°C getrocknet). Phagenhöhe beträgt $2,2 \pm 0,2$ nm. B) Immobilisierte Phagen nach der Inkubation im Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch (80 Vol % Ethanol) für 1 min. Phagenhöhe beträgt $0,5 \pm 0,1$ nm. C) Immobilisierte Phagen nach der Mineralisation bei ZT für 5 min. Die Höhe der mineralisierten Phagen betrug $3,9 \pm 0,4$ nm. Maßstab: 300 nm

6.3.2 Substrat zur selektiven Mineralisation von Phagen

Die selektive Mineralisation der Phagen ermöglicht die Höhenbestimmung mineralisierter Phagen mittels AFM. Bei dieser Höhenbestimmung war zusätzlich ein Substrat mit einer sehr geringen Oberflächenrauigkeit ($< 0,5$ nm) erforderlich. Eine geringe Oberflächenrauigkeit ist erforderlich, da Phagen (wt) auf einem hydrophilen Si-Wafer eine Höhe von circa 2 nm aufwies (s. Abbildung 46 A in 6.3.1). Ist das Substrat im Vergleich zur Phagenhöhe zu rau, kann die Phagenhöhe nicht mehr eindeutig bestimmt werden. Abbildung 47 verdeutlicht diesen Zusammenhang zwischen der Substratrauigkeit und der Ermittlung der Phagenhöhe. Mittels AFM wird die Höhenzunahme der Phagen über einen Linienscan bestimmt. In Abbildung 47 ist der Querschnitt einer immobilisierten Phage auf einem glatten

(Abbildung 47 A) und rauhen Substrat (Abbildung 47 B) dargestellt. Ein Linienscan bildet das Höhenprofil eines solchen Querschnitts ab. Die Höhe der Phagen h_1 kann somit durch den Abstand zwischen Phagenoberfläche und Substratoberfläche ermittelt werden (s. Abbildung 47). Ebenso kann nach der Mineralisation die Höhe der mineralisierten Phagen h_2 bestimmt werden. Durch die Subtraktion $h_2 - h_1$ wird die Höhenzunahme Δh durch die Mineralisation berechnet. Ist das Substrat zu rau, kann die Höhe mineralisierter Phagen nicht eindeutig bestimmt werden, da die Substratoberfläche nicht eindeutig zugeordnet werden kann (s. Abbildung 47 B).



$$\text{Schichtdicke: } \Delta h = h_2 - h_1$$

Abbildung 47: Bestimmung der Schichtdicke einer mineralisierten Schicht aus ZrbM. Zur Bestimmung der Schichtdicke Δh wurde die Phagenhöhe vor der Mineralisation (h_1) und nach der Mineralisation (h_2) bestimmt. Die Phagenhöhe – mit und ohne mineralisierte Schicht – entsprach dabei der Differenz zwischen der Oberfläche der Phagen und der Substratoberfläche. A) Bei einem glatten Substrat kann die Höhe der Phagen vor und nach der Mineralisation eindeutig bestimmt werden. B) Bei einem rauhen Substrat kann die Höhe der Phagen vor und nach der Mineralisation nicht eindeutig bestimmt werden, da die Substratoberfläche nicht eindeutig zugeordnet werden kann.

Die Anforderung an die Substratrauigkeit können demnach durch den Einsatz eines einkristallinen, hydrophilen Si-Wafers als Substrat erfüllt werden. Ein Si-Wafer weist eine sehr geringe Oberflächenrauigkeit von $0,1 \pm 0,0$ nm (rms-Rauigkeit) auf. Allerdings zeigte

sich, dass bei der Mineralisation immobilisierter Phagen auf einem hydrophilen Si-Wafer sowohl die Phagen, als auch das Substrat mineralisiert wurden (s. Abbildung 48 B). Somit konnte ein hydrophiler Si-Wafer nicht als Substrat zur selektiven Mineralisation von Phagen eingesetzt werden.

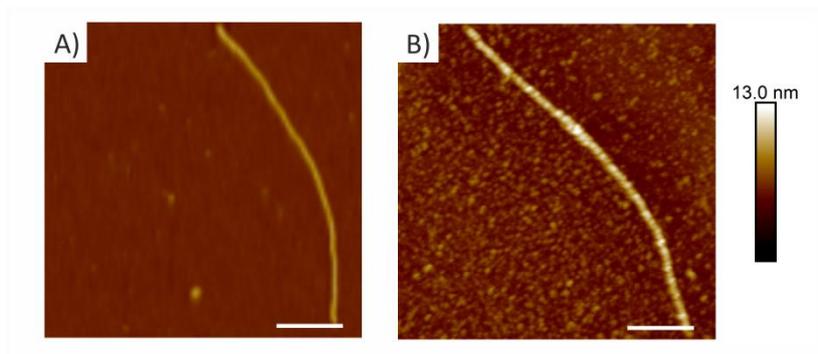
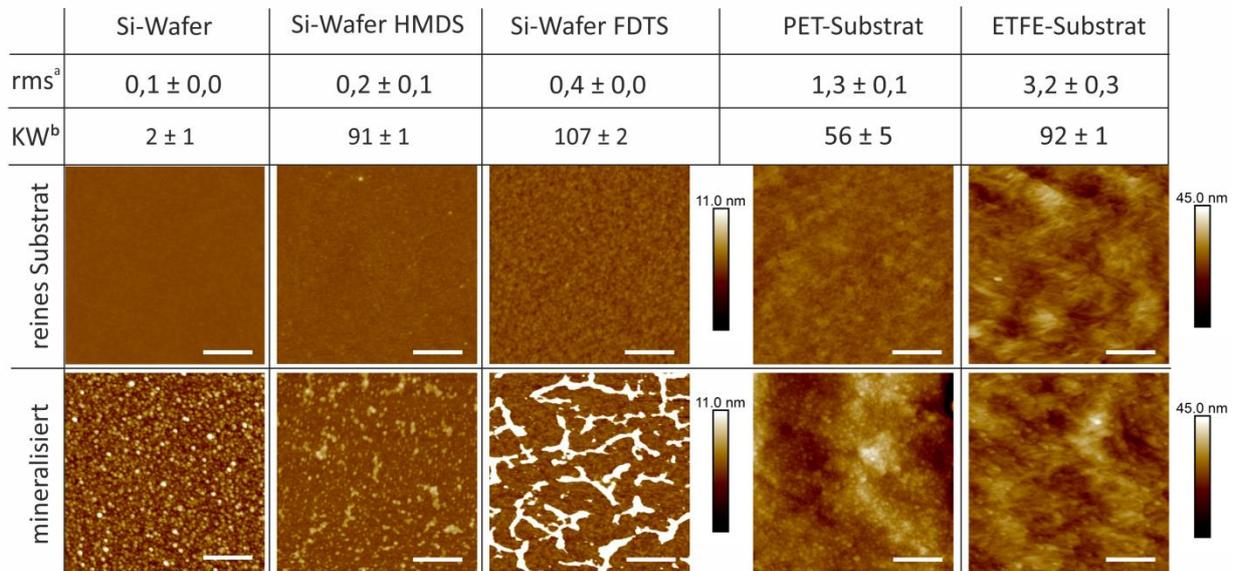


Abbildung 48: Immobilisierte Phagen A) vor und B) nach der Mineralisation. Mineralisiert wurde für 1,5 h bei ZT in einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung mit 80 Vol % Ethanol. Maßstab: 200 nm

Um ein geeignetes Substrat zur selektiven Mineralisation zu finden, wurden verschiedene Substrate, die sich in ihrer Hydrophilie unterschieden, auf das Mineralisationsverhalten untersucht. Zur Erzielung einer möglichst glatten Oberfläche wurde zunächst die Oberfläche eines Si-Wafers chemisch modifiziert. Dadurch sollte die geringe Rauigkeit des Wafers beibehalten werden bzw. nur leicht durch eine Beschichtung erhöht werden und gleichzeitig eine Oberfläche mit geringerer Hydrophilität erzielt werden. Für die Oberflächenmodifikation wurde eine Schicht aus 1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan (HMDS) sowie eine selbstorganisierende Monoschicht (engl.: self-assembled monolayer, SAM) aus 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluorodecyltriethoxysilan (FDTS) aufgebracht. Da Oberflächenbeschichtungen Inhomogenitäten in Bezug auf den Bedeckungsgrad aufweisen können, wurden zusätzlich Substrate mit einer geringeren Hydrophilie im Vergleich zum Si-Wafer getestet. Hierfür wurden Polymersubstrate aus Polyethylenterephthalat (PET) und Ethylen-Tetrafluorethylen (ETFE) verwendet. Sowohl die oberflächenmodifizierten Si-Wafer als auch die PET- und ETFE-Substrate wurden in Bezug auf die Rauigkeit und die Hydrophilie untersucht. Mittels AFM-Messungen wurde die rms (root mean square)-Rauigkeit ermittelt. Die Hydrophilie wurde über Wasser-Kontaktwinkelmessungen bestimmt. Beide Werte sind in Abbildung 49 dargestellt.



^arms = root mean square Rauigkeit (nm), reines Substrat (nicht mineralisiert)

^bKW = Wasser-Kontaktwinkel (°), reines Substrat (nicht mineralisiert)

Abbildung 49: Substrate zur selektiven Mineralisation von Phagen. Um Phagen selektiv zu mineralisieren, wurde ein geeignetes Substrat benötigt, das selbst nicht mineralisiert wird. Es wurden sowohl chemisch modifizierte Si-Wafer, als auch Polymersubstrate mit unterschiedlichem Kontaktwinkel getestet. Dargestellt sind die entsprechenden Substrate vor der Mineralisation (reines Substrat) und nach der Mineralisation (1,5 h bei ZT; 20 mM $ZrOCl_2$ in 80 Vol % Ethanol). Maßstab: 200 nm

Durch die Oberflächenmodifikation nahm die rms-Rauigkeit nur geringfügig zu. Die Rauigkeit des reinen Si-Wafers von $0,1 \pm 0,0$ nm wurde durch die HMDS-Schicht auf $0,2 \pm 0,1$ nm erhöht, durch die FDTS-SAM auf $0,4 \pm 0,0$ nm. Die reinen Polymersubstrate wiesen Rauigkeiten von $1,3 \pm 0,1$ nm für PET und $3,2 \pm 0,3$ nm für ETFE auf. Sowohl für die modifizierten Si-Wafer als auch die Polymersubstrate wurden im Vergleich zum reinen Si-Wafer höhere Kontaktwinkel gemessen. Der niedrigste Kontaktwinkel wurde für das PET-Substrat gemessen. Er betrug $56 \pm 5^\circ$. Den höchsten Kontaktwinkel zeigte ein FDTS modifizierter Si-Wafer mit $107 \pm 2^\circ$. Dazwischen lagen die Kontaktwinkel des HMDS-modifizierten Wafers mit $91 \pm 1^\circ$ und des ETFE-Substrats mit $92 \pm 1^\circ$. Zur Untersuchung des Mineralisationsverhaltens wurden die verschiedenen Substrate für 1,5 h bei ZT in die Mineralisationslösung aus 20 mM $ZrOCl_2$ in 80 Vol % Ethanol gelegt und anschließend mittels AFM untersucht (s. Abbildung 49). Sowohl die Oberfläche des hydrophilen Si-Wafers und des HMDS-

modifizierten Si-Wafers, als auch die Oberfläche des hydrophoberen PET-Substrats wurden zwischen 80 % und 100 % mineralisiert. Auf dem ETFE-Substrat und dem FDTS-modifizierten Si-Wafer fand keine flächendeckende Abscheidung von ZrbM statt. Beide Oberflächen wiesen Kontaktwinkel $\geq 92^\circ$ auf. Auf dem ETFE-Substrat sind nach der Mineralisation vereinzelt kleine Partikel zu sehen. Auf dem FDTS-modifizierten Si-Wafer hat sich während der Mineralisation feinstrukturiertes Mineralisationsprodukt abgeschieden (weiße Bereiche in Abbildung 49). Da allerdings die Oberflächenrauigkeit möglichst gering sein sollte, ist lediglich der FDTS-modifizierte Si-Wafer zur selektiven Mineralisation von Phagen geeignet. Dieser wurde im Weiteren zur Bestimmung der Abscheiderate mittels AFM eingesetzt (6.3.3). Da lediglich feinstrukturiertes Mineralisationsprodukt auf dem FDTS-Substrat abgeschieden wurde (Abbildung 49 und Abbildung 50 C), konnten mineralisierte Phagen anhand ihrer Struktur erkannt werden (vgl. Abbildung 50 A und B) und die Höhe der mineralisierten Phagen mittels AFM bestimmt werden.

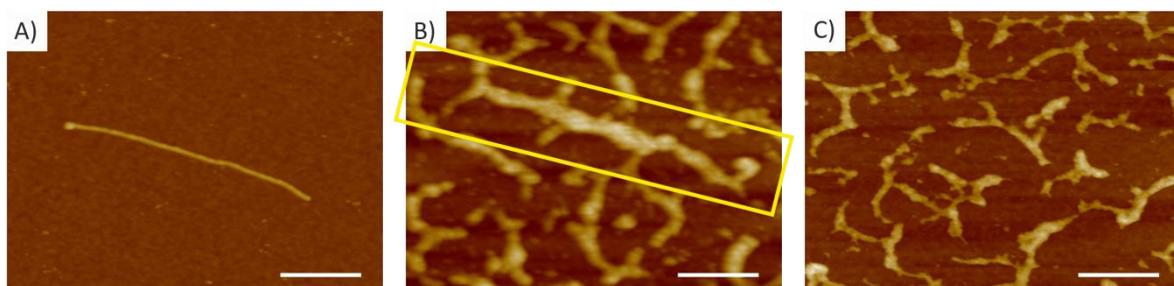


Abbildung 50: Selektive Mineralisation von Phagen auf FDTS-modifiziertem Si-Wafer. A) Phage B) Mineralisierte Phage – erkennbar an der linearen Phagenstruktur (gelbe Markierung) (s. 4.6). C) Mineralisierter FDTS-modifizierter Si-Wafer (ohne Phage). Mineralisiert wurde für 1,5 h bei ZT in einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung mit 80 Vol % Ethanol. Maßstab: 200 nm

6.3.3 Templatgesteuerte Abscheiderate

Um den Einfluss der ZrO_2 -Bindepeptide auf die Abscheidung von ZrbM (s. 6.1.1) zu untersuchen, wurden modifizierte Phagen und wt-Phagen mineralisiert. Die Mineralisation fand in einer 20 mM $ZrOCl_2$ -Lösung in einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittel (80 Vol % Ethanol) bei ZT statt.

Zur Bestimmung der Abscheiderate auf modifizierten und nicht modifizierten wt-Phagen wurden diese auf einem hydrophoben FDTS-Substrat immobilisiert und bei ZT für 5 min bzw. 90 min mineralisiert. Ein zweiter Mineralisationszyklus von 90 min wurde für

M13_c5-1, M13_ct5-1 und M13_wt (s. Tabelle 14 in Kap. 6.2.2) angeschlossen. Als Referenz wurde ein reines FDTS-Substrat mineralisiert (s. Abbildung 51).

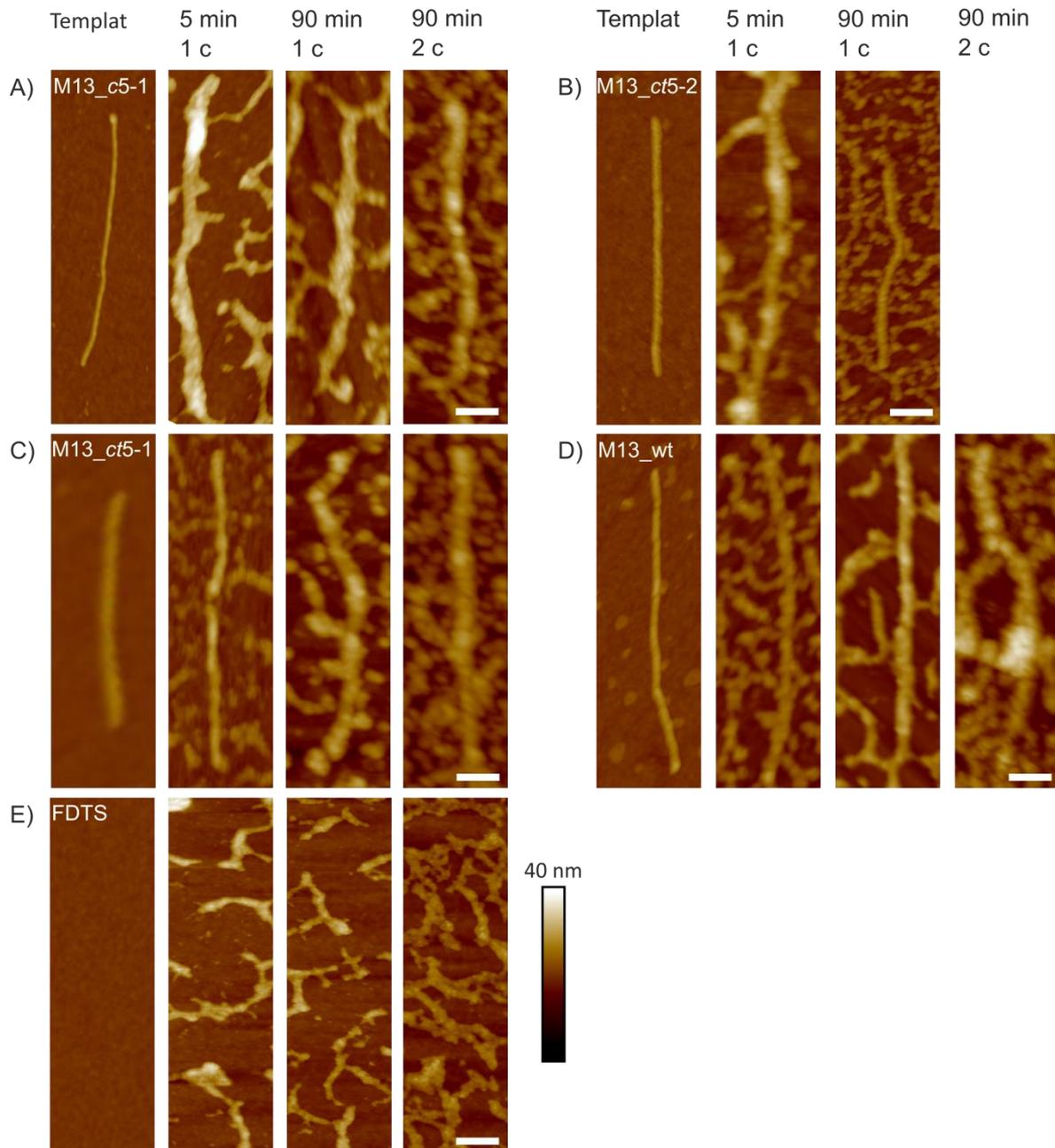


Abbildung 51: Bestimmung der Abscheiderate. A)-D) Modifizierte Phagen und wt-Phagen wurden auf einem hydrophoben FDTS-Substrat immobilisiert und mit einem Mineralisationszyklus (1 c) von 5 min bzw. 90 min mineralisiert. Ein zweiter Mineralisationszyklus (2 c) von 90 min wurde bei ZT für M13_c5-1, M13ct_5-1 und M13_wt durchgeführt. E) Als Referenz wurde ein reines FDTS-Substrat mineralisiert. Maßstab: 100 nm

Da das FDTS-Substrat (Abbildung 51 E) lediglich vereinzelt und fein strukturiert mineralisiert wurde, konnten die Phagen anhand ihrer Struktur erkannt werden und die Phagenhöhe mittels AFM bestimmt werden. Vor der Mineralisation sowie nach jedem Mineralisationsschritt wurde die Höhe einzelner Phagen, wie in (6.3.2) beschrieben, mittels AFM bestimmt. Die Höhe der mineralisierten Schicht entsprach der Höhendifferenz zwischen den mineralisierten Phagen und den Phagentemplaten. Die jeweiligen Höhen der immobilisierten, unbeschichteten Phagen sowie die Schichtdicken sind in Tabelle 15 aufgelistet. Für jedes Biotemplat wurden mindestens 25 Phagen ausgewertet. Bei der Auswertung der Schichtdicke wurde angenommen, dass alle Phagentemplate während der Mineralisation die gleiche Abflachung durch ein mögliches Verdrängen der Hydrathülle erfahren. Somit sind die Werte relativ zueinander vergleichbar.

Tabelle 15: ZrbM-Schichtdicke auf Phagentemplaten. Um die Schichtdicke mineralisierter ZrbM-Schichten auf modifizierten und wt-Phagen zu berechnen, wurde die Phagenhöhe vor und nach der Mineralisation bestimmt. Die Differenz der beiden Höhen entsprach der Schichtdicke, die in der Tabelle neben der Höhe der einzelnen Phagentemplate (unbeschichtet) aufgelistet ist. Die Phagen wurden mit einem Mineralisationszyklus von 5 min und 90 min mineralisiert. Für M13_c5-1, M13_ct5-1 und M13_wt wurde ein zweiter Mineralisationszyklus von 90 min durchgeführt und analysiert.

Phagen	Höhe Phagentemplat	Schichtdicke 1. Zyklus		Schichtdicke 2. Zyklus
		5 min	90 min	90 min
M13_c5-1	$7,2 \pm 0,6$ nm	$3,7 \pm 0,5$ nm	$3,8 \pm 0,6$ nm	$5,0 \pm 0,8$ nm
M13_ct5-2	$6,4 \pm 0,8$ nm	$2,8 \pm 0,6$ nm	$3,9 \pm 0,8$ nm	-
M13_ct5-1	$6,7 \pm 0,8$ nm	$2,6 \pm 0,8$ nm	$3,9 \pm 0,6$ nm	$5,4 \pm 0,7$ nm
M13_wt	$5,5 \pm 0,7$ nm	$1,7 \pm 0,7$ nm	$3,7 \pm 0,6$ nm	$5,1 \pm 0,5$ nm

Die Höhe immobilisierter wt-Phagen auf dem hydrophoben FDTS-modifizierten Si-Wafer ist mit $5,5 \pm 0,1$ nm größer als die Höhe immobilisierter wt-Phagen auf einem hydrophilen, oxidierten Si-Wafer mit $2,2 \pm 0,2$ nm. Nicht immobilisierte Phagen haben einen Durchmesser von circa 6 nm (s. 4.6).^[33] Die starke Kontraktion der Phagen durch die Immobilisation

auf einem hydrophilen, oxidierten Si-Wafer wird starken Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen zugeschrieben (s. 6.3.1).^[265-267] Hieraus lässt sich schließen, dass zwischen Phagen und der Oberfläche des FDTS-modifizierten Si-Wafer wesentlich schwächere Wechselwirkungskräfte wie van der Waals Wechselwirkungen wirken, die eine starke Kontraktion der Phagen verhindern. Dieses Verhalten wurde auch bei Tabakmosaikviren (TMV) beobachtet.^[265] Auf einer hydrophoben Oberfläche behielten die Viren nahezu ihren zylindrischen Querschnitt bei. Dagegen führte eine hydrophile Oberfläche zu einer Kontraktion der TMV bei Aufrechterhaltung der TMV-Struktur. Das unterschiedliche Verhalten wurde auf verschiedene Wechselwirkung zwischen TMV und Substratoberfläche zurückgeführt. Während starke Wasserstoffbrückenbindungen zur Abflachung der TMV führten, blieb der zylindrische Virenquerschnitt bei schwachen van der Waals Wechselwirkungen erhalten.

Im Vergleich zu den wt-Phagen sind die genetisch modifizierten Phagen auf dem FDTS-modifizierten Si-Wafer höher. Dies ist durch die zusätzlichen ZrO₂-Bindepeptide erklärbar, die am Hüllprotein pVIII exprimiert sind (s. 6.2.2). Die Phagenhöhe korreliert dabei mit der Länge der Bindepeptide. Je länger die exprimierten Bindepeptide sind (*ct5-2*: GQSHL, *ct5-1*: SLLGQTP, *c5-1*: GSGLSRFI), desto höher ist das Phagentemplat (s. Tabelle 15).

Nach einem ersten Mineralisationszyklus von fünf Minuten ist ein deutlicher Unterschied in der Höhe der mineralisierten Schichten zwischen den modifizierten und nicht modifizierten Phagen zu erkennen. Während auf den wt-Phagen eine Schicht von $1,7 \pm 0,7$ nm abgeschieden wurde, bildete sich auf den modifizierten Phagen M13_c5-1 eine nahezu doppelt so hohe Schicht mit einer Dicke von $3,7 \pm 0,5$ nm. Die modifizierten Phagen M13_ct5-2 und M13_ct5-1 zeigten mit $2,8 \pm 0,6$ nm und $2,6 \pm 0,8$ nm ebenfalls eine höhere Schichtdicke im Vergleich zu den wt-Phagen. Nach einem ersten Mineralisationszyklus von insgesamt 90 min ist dagegen kein Unterschied mehr zwischen den modifizierten Phagen und den wt-Phagen zu erkennen. Es wurden Schichten mit einer Höhe von circa 4 nm abgeschieden. Auch zwei aufeinanderfolgende Mineralisationszyklen von jeweils 90 min zeigen keinen Unterschied in der Schichtdicke auf den verschiedenen Biotemplaten. Die Schichtdicke betrug circa 5 nm. Die Untersuchungen der Schichtdicken auf den verschiedenen Biotemplaten zeigten einen deutlichen Einfluss der Bindepeptide auf die Abscheiderate innerhalb der ersten fünf Minuten. Der Unterschied in der Abscheiderate war allerdings nur beim ersten Mineralisationszyklus nach einer Mineralisationszeit von fünf Minuten zu se-

hen. Nach insgesamt 90 Minuten Mineralisation wurde der Schichtdickenunterschied wieder ausgeglichen. Hierbei ist zu nennen, dass es sich jeweils um den ersten Mineralisationszyklus handelt und die Abscheidung somit auf dem Biotemplat stattfand. Das Ausgleichen des Schichtdickenunterschieds deutet darauf hin, dass innerhalb eines Mineralisationszyklus eine Sättigung im Schichtwachstum vorliegt. Bei einer konstanten Mineralisationstemperatur und der Annahme, dass sich das abgeschiedene Mineralisationsprodukt bezüglich der Zusammensetzung während eines Zyklus nicht ändert, weist dies darauf hin, dass die Sättigung auf eine durch die Mineralisation bedingte Verarmung an Zr-Spezies im Abscheidungsmedium zurückzuführen ist. In einem zweiten Mineralisationszyklus fand im Vergleich zum ersten Mineralisationszyklus nur ein sehr langsames Schichtwachstum statt. Es war kein Unterschied zwischen den modifizierten Phagen und den wt-Phagen zu beobachten. Da im zweiten Mineralisationszyklus bereits eine mineralisierte Schicht vorlag, hatte das Templat keinen Einfluss mehr auf die Mineralisation. Das sehr langsame Schichtwachstum zeigt, dass die Abscheidung auf einer bereits bestehenden Schicht mit circa 1 nm/90 min im Vergleich zur Abscheidung auf den einzelnen Biotemplaten mit circa 4 nm/90 min wesentlich langsamer war. Dies deutet auf schwächere Wechselwirkungen zwischen der bereits mineralisierten Schicht und Zr-Spezies in der Lösung oder auf einen langsameren Abscheidemechanismus hin. Um genauere Aussagen über den Abscheidemechanismus und die vorliegenden Wechselwirkungen treffen zu können, wurde zunächst das Zetapotential (ZP) von modifizierten und wt-Phagen im pH-Bereich von 2,5 bis 6,1 ermittelt. Das Zetapotential der Phagen wurde anhand einer Phagensuspension über Laser-Doppler-Elektrophorese in 10 mM NaCl ermittelt. In Abbildung 52 A) ist das Zetapotential von suspendierten modifizierten Phagen und wt-Phagen dargestellt. Durch Interpolation wurde der Isoelektrische Punkt (IEP) der einzelnen Phagen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 52 B) aufgelistet. Die modifizierten Phagen und wt-Phagen unterscheiden sich in Bezug auf den Isoelektrischen Punkt (IEP). Den geringsten IEP zeigt M13_c5-1 mit 3,2 gefolgt von M13_ct5-1 mit 3,5, M13_wt mit 4,3 und M13_ct5-2 mit 4,8. Während der Mineralisation des Biotemplats liegt ein pH-Wert von 2,12 vor. Bei diesem pH-Wert sind alle Phagen positiv geladen (Abbildung 52). Die geringste Oberflächenladung liegt bei M13_c5-1 vor. Auf diesen Phagen wurde gleichzeitig die höchste Abscheiderate beobachtet. Mit steigendem Zetapotential von M13_c5-1 über M13_ct5-1 auf M13_wt wurde eine Abnahme in der Abscheiderate beobachtet (s. Tabelle 15).

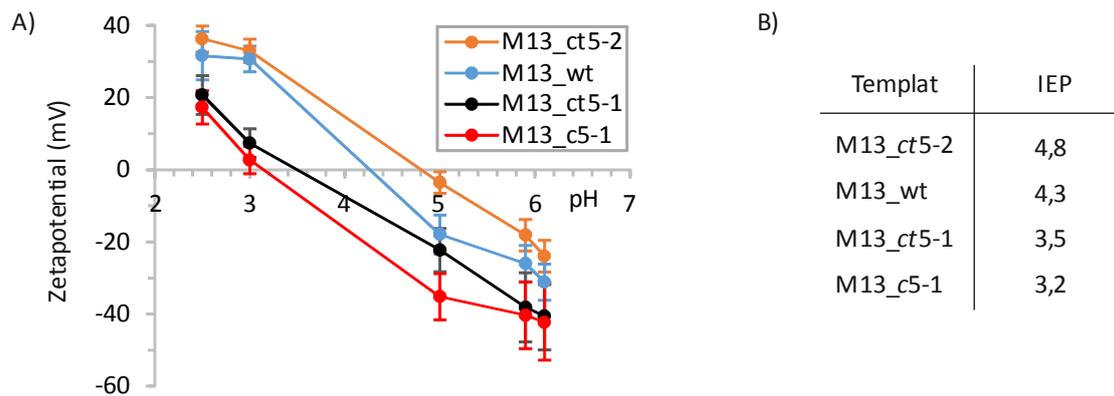


Abbildung 52: Zetapotential und Isoelektrischer Punkt (IEP) modifizierter und nicht modifizierter Phagen. Die modifizierten Phagen präsentieren die ZrO_2 -Bindepeptide *ct5-2*, *ct5-1* oder *c5-1* am Haupthüllprotein pVIII. A) Zur Bestimmung des Zetapotentials wurden die Phagen in 10 mM NaCl-Lösung suspendiert. Das Zetapotential wurde über einen pH-Bereich von 2,5 bis 6,1 ermittelt. B) Auflistung der IEPs. Die IEPs wurden durch Interpolation aus A) ermittelt.

Das höchste Zetapotential wurde für M13_ct5-2 ermittelt. Die Abscheiderate ist allerdings vergleichbar mit der auf M13_ct5-1 Phagen. Die beschriebene Korrelation zwischen hohem Zetapotential und geringer Abscheiderate liegt bei allen Biotemplaten vor, außer bei M13_ct5-2. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Oberflächenladung der Biotemplate einen Einfluss auf die Abscheidung von ZrbM hat. Zusätzlich müssen weitere Faktoren die Abscheidung beeinflussen, da bei M13_ct5-2 keine Korrelation zwischen Zetapotential und Abscheiderate vorliegt. Um diese Einflussfaktoren genauer zu beschreiben, wird im Folgenden zunächst der Abscheidungsmechanismus betrachtet.

Eine Schichtbildung von ZrbM auf den positiv geladenen Phagen kann über zwei verschiedene Mechanismen stattfinden.^[9] Zum einen können Partikel durch homogene Keimbildung in Lösung gebildet werden und sich anschließend auf dem Substrat abscheiden. Zum anderen kann aber auch eine heterogene Keimbildung von ZrbM auf dem Substrat stattfinden. Ein Vergleich der Schichtdicke von mineralisierten ZrbM-Schichten mit den in Lösung vorliegenden Partikelgrößen kann einen Hinweis auf den Abscheidungsmechanismus geben. DLS-Untersuchungen zeigten, dass ohne Biotemplat direkt nach der Lösungsherstellung Partikel mit einem hydrodynamischen Durchmesser von 10 nm vorliegen (s. Abbildung 25). Diese Partikel sind deutlich größer als die Schichtdicke auf den Templaten durch die Mineralisation (zwischen 1 nm und 4 nm). Daher kann davon ausgegangen werden, dass in der Lösung durch homogene Keimbildung entstandene Partikel nicht für

die Schichtabscheidung verantwortlich sind. Hieraus ergibt sich, dass für die Schichtbildung auf den Biotemplaten die heterogene Keimbildung beiträgt. Parallel dazu findet in der Lösung homogene Keimbildung statt (s. DLS-Messungen in 6.1.1). ICP-OES-Messungen einer Mineralisationslösung (20 mM $\text{ZrOCl}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, 80 Vol % Ethanol, ZT), bei der die homogen gebildeten Partikel abzentrifugiert wurden, zeigten, dass durch die homogene Partikelbildung nach 1,5 h Mineralisationszeit nur circa 10 % der löslichen Zr-Spezies verbraucht wurden (s. Abbildung 28 B). Somit liegen noch circa 90 % lösliche Zr-Spezies einer Größe unterhalb der DLS Nachweisgrenze von $\leq 1 \text{ nm}$ ^[160] vor. In einer wässrigen ZrOCl_2 -Lösung liegen nach dem Lösen des Salzes Zr-Tetramere $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{H}_2\text{O})_{16}\text{Cl}_6]^{2+}$ einer Größe von 0,8 nm vor.^[62] Diese sind im Gleichgewicht mit Oktameren einer Größe von 1,2 nm (s. 4.5). Bereits bei Zimmertemperatur können Tetramere in ihrer hydroxylierten Form $[\text{Zr}_4(\text{OH})_8(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_{16-x}]^{(8-x)+}$ zu höheren Oligomeren kondensieren.^[25,44,98] Auch in der Mineralisationslösung mit einem Ethanol/Wasser-Lösungsmittelgemisch (80 Vol % Ethanol) liegen Zr-Tetramere, Oktamere oder höhere Oligomere vor.^[24,42] Die Mineralisation von ZrbM auf den Biotemplaten (1. Zyklus) und auf bereits gebildeten ZrbM-Schichten (2. Zyklus) zeigten innerhalb eines Mineralisationszyklus eine Schichtdickenzunahme von circa 1 nm bis circa 4 nm. Diese Schichtdickenzunahmen kann durch eine molekulare Addition von Zr-Tetrameren einer Größe von 0,8 nm oder Oktameren einer Größe von 1,2 nm erklärt werden. Somit wird als Schichtwachstumsmechanismus eine molekulare Addition von Zr-Tetrameren oder Oktameren vorgeschlagen. Ein Schichtwachstum durch die molekulare Addition von Zr-haltigen Ionen und/oder Molekülen wurde auch in der Literatur für ein Mineralisationssystem beschrieben, bei dem ZrbM bei 50 °C aus einer ethanolischen ZrOCl_2 -Lösung auf hydrophilen Silanolgruppen mineralisiert wurde.^[24] Die Abscheidung von Zr-basiertem Material wurde dabei durch Kondensationsreaktionen von hydroxylierten Zr-Tetrameren mit der Hydroxygruppe der Silanole erklärt. Ein Schichtwachstum fand schließlich durch weitere Hydrolyse/Alkoholyse- und Kondensationsreaktionen statt. Auch für die Mineralisation von ZrO_2 und TiO_2 in Anwesenheit von Silikatein wurde ein Einfluss von aneinandergrenzenden Hydroxygruppen in den Seitenketten des Silikateinproteins auf die Keimbildung beschrieben.^[27] Die Keimbildung fand ebenfalls durch Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen von Zr- und Ti-Komplexen statt. Das Enzym Silikatein ist von Biomineralisationsprozessen in Schwämmen bekannt, wo es neben organischen Bestandteilen die Bildung von Schwammnadeln aus Biosilika vermittelt.^[94] Diese in der Literatur

beschriebenen Ergebnisse zeigen einen Einfluss von Hydroxygruppen auf die Abscheidung von Zr-Spezies durch Kondensationsreaktionen. Auch in den ZrO₂-Bindepeptiden, die in dieser Arbeit zur Mineralisation von ZrbM eingesetzt wurden, liegen mineralisationsvermittelnde Hydroxygruppen vor (s. Tabelle 14). Sie kommen in den Aminosäuren Serin (S) und Threonin (T) vor. Allerdings besitzt die Seitenkette von Threonin zusätzlich eine endständige Methylgruppe, die die Kondensationsreaktion der Hydroxygruppe mit hydroxylierten Zr-Tetrameren sterisch beeinträchtigen kann. Ein sterischer Einfluss der Methylgruppe von Threonin im Vergleich zu Serin, welches keine Methylgruppe enthält, ist bei der α -O-Glykosylierung von Serin und Threonin bekannt.^[268] Die Methylgruppe von Threonin beeinflusst hierbei die Konformation der Glukoseeinheit durch eine sterische Abstoßung der freien Elektronenpaare des Sauerstoffs von Glykose. Im Peptid *c5-1* (GSGSLSRFI) liegen drei Serin-Einheiten vor. Das Peptid *ct5-1* (SLLGQTP) weist neben Serin auch Threonin auf. Die Aminosäuresequenz des Peptids *ct5-2* (GQSHL) besitzt eine Serin-Einheit. Durch das Präsentieren der Bindepeptide am Haupthüllprotein von wt-Phagen liegen diese Hydroxygruppen bei den modifizierten Phagen im Vergleich zu den wt-Phagen zusätzlich vor. Die Häufigkeit der „zusätzlichen“ Hydroxygruppen von Serin korreliert auch mit der Abscheiderate. Das Peptid *c5-1* zeigte mit drei Serin-Einheiten die höchste Abscheiderate. Die beiden anderen Peptide *ct5-2* und *ct5-1* mit jeweils einer Serin-Einheit zeigten eine geringere Abscheiderate im Vergleich zum Peptid *c5-1* und gleichzeitig eine höhere Abscheiderate im Vergleich zu wt-Phagen. Das Peptid *ct5-1* besitzt in der Seitengruppe von Threonin eine weitere Hydroxygruppe. Da beide Peptide, *ct5-2* und *ct5-1* eine nahezu gleiche Abscheiderate zeigten, ist dies ein Hinweis darauf, dass die Methylgruppe von Threonin die Kondensationsreaktion während der Mineralisation sterisch hindert. Die Beobachtung, dass eine größere Anzahl an Serinmolekülen die Abscheiderate erhöht, weist darauf hin, dass die höhere Anzahl an Hydroxygruppen auf der Phagenoberfläche zu einem schnelleren Schichtwachstum durch Kondensationsreaktionen mit den hydroxylierten Zr-Tetrameren/Oktameren führt.

Allerdings muss zusätzlich noch berücksichtigt werden, dass die Zr-Tetramere positiv geladen vorliegen (s. Gleichung (14)).^[62] Das Schichtwachstum durch molekulare Addition von Zr-Tetrameren findet auf positiv geladenen Phagenoberflächen statt (s. Abbildung 52). Dies bedeutet, dass eine elektrostatische Abstoßung zwischen der Phagenoberfläche und den Zr-Tetrameren wirkt. Ein höheres Zetapotential der Phagen führt somit zu einer stär-

keren Abstoßung zwischen Phagen und Zr-Tetrameren und kann damit ebenfalls zu einer niedrigeren Abscheiderate führen. Wie zuvor erwähnt, liegt eine solche Korrelation zwischen hohem Zetapotential und geringer Abscheiderate bei allen Biotemplaten vor, außer bei M13_ct5-2. Daher kann auch eine geringere elektrostatische Abstoßung eine schnellere Abscheiderate begünstigen. Aufgrund der abstoßenden elektrostatischen Wechselwirkungen müssen gleichzeitig aber auch anziehende Wechselwirkungen zwischen den Zr-Tetrameren und den positiv geladenen Phagenoberflächen wirken, die die abstoßenden Kräfte überwiegen und eine molekulare Addition von Zr-Tetrameren auf der Phagenoberfläche ermöglichen. Auch beim Bindungsassay, bei dem die Bindungsstärke von Phagen-Bindepeptid-Komplexen für die Bindung an *c*-ZrO₂ analysiert wurde (s. 6.2.1), wurde beobachtet, dass Phagen-Peptid-Komplexe stark an ZrO₂ binden, obwohl sowohl die Peptide als auch das ZrO₂-Substrat positiv geladen waren. Hier wurde die Bindung vor allem auf polare Wechselwirkungen zurückgeführt. Es wurde gezeigt, dass die Bindungsstärke mit steigender Anzahl an polaren Aminosäuren zunimmt. Somit kann angenommen werden, dass polare Wechselwirkungen zwischen den Phagenoberflächen und Zr-Tetrameren/Oktameren nicht nur eine starke Bindung zwischen beiden bewirken, sondern gleichzeitig auch für eine schnellere Kondensationsreaktion mit Zr-Tetrameren/Oktameren verantwortlich sein können und damit eine schnellere Schichtmineralisation auf den Phagenoberflächen bewirken können. Um diese Aussage zu bestätigen, wurde die Bindungsstärke der ZrO₂-Bindepeptide zusammen mit der Abscheiderate betrachtet (s. Abbildung 53). Ein Vergleich der Abscheiderate mit der Bindungsstärke der einzelnen modifizierten Phagen zu *c*-ZrO₂ zeigt eine eindeutige Korrelation zwischen Abscheiderate und Bindungsstärke. Die modifizierten Phagen banden im Vergleich zu wt-Phagen stärker an *c*-ZrO₂ und zeigten gleichzeitig eine schnellere Schichtbildung auf der Phagenoberfläche. Die schwächste Bindung die für wt-Phagen beobachtet wurde, führte zur geringsten Abscheiderate. Durch diese Korrelation zwischen Bindungsstärke und Abscheiderate wird der Einfluss der ZrO₂-Bindepeptide auf die Mineralisation von ZrbM folgendermaßen beschrieben: ZrO₂-Bindepeptide mit einer starken Affinität zu ZrO₂ führen zu einer stärkeren Anziehung von Zr-Tetrameren an das Biotemplat. Die Hydroxygruppen des Biotemplats führen durch Kondensationsreaktionen mit hydroxylierten Zr-Tetrameren/Oktameren zu einer heterogenen Keimbildung auf dem Biotemplat. Die Bindungsstärke und Kondensationsreaktionen sind dabei abhängig von der Anzahl an polaren Hydroxygruppen. Eine höhere Anzahl führt

zu einer stärkeren Bindung und gleichzeitig zu einer schnelleren Keimbildung durch Kondensationsreaktion.

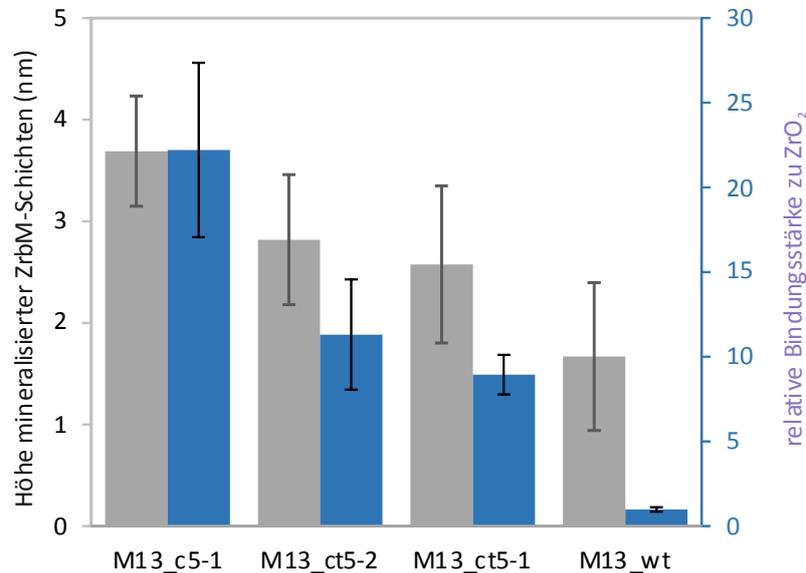


Abbildung 53: Korrelation Abscheiderate und Bindungsstärke. Vergleichend ist die Höhe der mineralisierten ZrbM-Schicht auf modifizierten Phagen und wt-Phagen mit der relativen Bindungsstärke der Bindepeptide zu $c\text{-ZrO}_2$ dargestellt. Die Höhe der mineralisierten Schicht wurde nach einer Mineralisationszeit von 5 min ermittelt. Die Bindungsstärke der Phagen-Bindepeptid-Komplexe zu $c\text{-ZrO}_2$ wurde auf die wt-Referenz normiert.

6.4 Mineralisation von Schichten aus Zirkonium-basiertem Material auf Phagen als Templat

Um reproduzierbar dichte, homogene Schichten aus Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) auf verschiedenen Substraten zu mineralisieren (6.4.2), wurde ein M13-Bakteriophagentemplat für die Mineralisation eingesetzt (6.4.1). Somit ist jeweils unabhängig vom Substrat das M13-Bakteriophagentemplat die Basis für die Schichtbildung von ZrbM. Für spätere Untersuchungen der Bakterienadhäsion auf den Phagenschichten und den mineralisierten Schichten (Kap. 1.6), waren sowohl glatte als auch raue Schichtoberflächen erforderlich. Daher wurde als Substrat zur Bildung einer Phagenschicht und der darauffolgenden Mineralisation sowohl ein glatter (polierter) Si-Wafer als auch ein rauher (unpolierter) Si-Wafer verwendet.

6.4.1 Phagentemplat zur Schichterzeugung

Mittels „Convective Assembly“ wurden homogene Phagenschichten auf hydrophilen Si-Substraten ausgerichtet (s. Abbildung 15 in 4.7). Dabei wurde eine definierte Menge einer wässrigen wt-Phagensuspension zwischen dem Si-Substrat und einer Glasplatte positioniert. Durch die hydrophile Oberfläche des Si-Substrats und der Glasplatte bildete sich ein Meniskus aus. Das Bewegen des Substrats mit konstanter Geschwindigkeit in eine definierte Richtung führte zur Bildung eines Flüssigkeitsfilms auf der Si-Substratoberfläche. Durch Verdampfen der Flüssigkeit wurden die Phagen assembliert (s. 4.7).^[145,146,148,149] Die Homogenität und Dichte der Phagenschicht wurde durch die Zuggeschwindigkeit und das Verdampfen der Flüssigkeit beeinflusst.^[145] Dabei spielten Parameter wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur, Hydrophilie des Substrats, Zuggeschwindigkeit und Phagenkonzentration eine entscheidende Rolle. Die Phagenschichten wurden in einer geschlossenen Apparatur bei $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $36 \pm 1 \text{ } \%$ ausgerichtet. Die Temperatur wurde mittels Ventilation kontrolliert. Die Luftfeuchtigkeit konnte über eine gesättigte Lithiumchlorid-Lösung eingestellt werden. Eine konstante Hydrophilie der Substrate wurde durch die Verwendung O_2 -plasmabehandelter Si-Substrate erreicht. Es ist bekannt, dass zur Generierung eines homogenen Biotemplats aus wt-Phagen auf einem $10 \times 10 \text{ mm}^2$ Si-Substrat eine Phagenkonzentration von $2 \cdot 10^{13} \text{ pfu mL}^{-1}$ ($2,5 \text{ } \mu\text{L}$) benötigt wird.^[112] Daher wurde diese Phagenkonzentration auch im Rahmen dieser Arbeit zur Identifikation einer geeigneten Zuggeschwindigkeit gewählt. In Abbildung 54 sind AFM-Aufnahmen von Biotemplaten zu sehen, die über verschiedene Zuggeschwindigkeiten hergestellt wurden. Eine Zuggeschwindigkeit von $2,4 \text{ mm min}^{-1}$ (Abbildung 54 A) führte zu einer inhomogenen Bedeckung des Si-Substrats. Es wurden circa 50 % des Substrats bedeckt. Die Reduktion der Zuggeschwindigkeit auf $2,0 \text{ mm min}^{-1}$ (Abbildung 54 B) führte zu einer Substratbedeckung von circa 80 %. Der Bedeckungsgrad konnte durch eine weitere Reduktion der Zuggeschwindigkeit auf $1,8 \text{ mm min}^{-1}$ (Abbildung 54 B) weiter erhöht werden, bis bei einer Zuggeschwindigkeit von $0,6 \text{ mm min}^{-1}$ eine dichte, homogene Phagenschicht erzielt werden konnte (s. Abbildung 54 A-D).

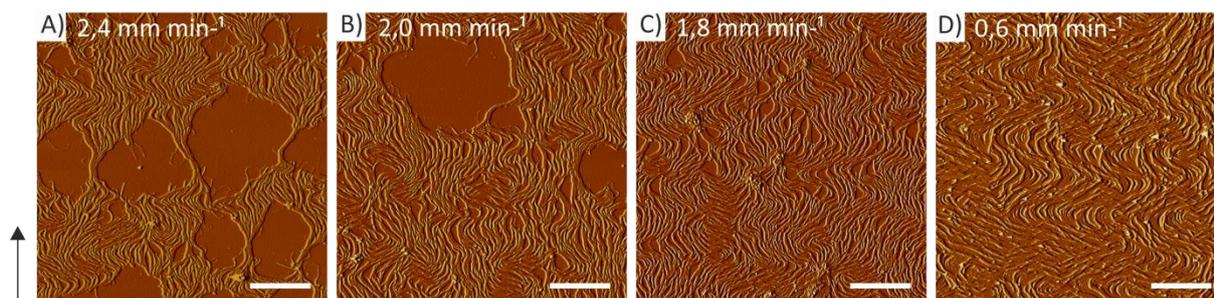


Abbildung 54: M13 Biotemplat aus wt-Phagen. Die Phagen wurden mittels „Convective Assembly“ auf einem Si-Substrat ausgerichtet (Pfeilrichtung = Zugrichtung). Die Phagenkonzentration betrug jeweils $2,0 \cdot 10^{13}$ pfu mL⁻¹. Die Zuggeschwindigkeit wurde von A) nach D) reduziert. Maßstab: 2 μ m

Neben den homogenen Phagenschichten auf einem glatten Si-Wafer wurden auch Phagenschichten auf einem rauen (unpolierten) Si-Wafer ausgerichtet. Für dieses raue Substrat mussten Zuggeschwindigkeit und Phagenkonzentration neu optimiert werden. Mit einer Zuggeschwindigkeit von $0,6 \text{ mm min}^{-1}$ und einer Phagenkonzentration von $9,8 \cdot 10^{13}$ pfu mL⁻¹ konnten homogene, dichte Phagenschichten erzeugt werden (Abbildung 55). Im Vergleich zu glatten Si-Wafern war für raue Si-Wafer eine höhere Phagenkonzentration erforderlich, da sich in den Vertiefungen vermehrt Phagen ansammelten.

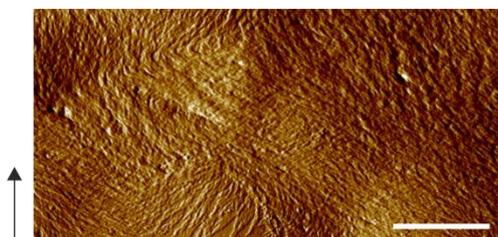


Abbildung 55: Phagenschicht (wt) ausgerichtet mittels „Convective Assembly“. Die AFM-Aufnahme zeigt eine Phagenschicht auf einem rauen Si-Substrat. Die Zuggeschwindigkeit betrug $0,6 \text{ mm min}^{-1}$ und die Phagenkonzentration $9,8 \cdot 10^{13}$ pfu mL⁻¹. Pfeilrichtung = Zugrichtung. Maßstab: 2 μ m

Mittels „Convective Assembly“ konnten erfolgreich dichte, homogene Phagenschichten auf einem glatten und rauen Si-Substrat generiert werden. Dafür wurden Phagenkonzentrationen von $2 \cdot 10^{13}$ pfu mL⁻¹ für das glatte Si-Substrat und $9,8 \cdot 10^{13}$ pfu mL⁻¹ für das raue Si-Substrat eingesetzt. Die Zuggeschwindigkeit betrug für beide Substrate $0,6 \text{ mm min}^{-1}$. Diese Template wurden für die Schichtmineralisation (6.4.2) und zur Untersuchung der Bakterienadhäsion (6.5) verwendet.

6.4.2 Schichtmineralisation auf Wildtyp-Phagentemplaten

Zur Mineralisation von Schichten aus ZrbM wurde eine 20 mM ZrOCl_2 -Lösung in 80 Vol % Ethanol bei ZT (circa 25 °C) eingesetzt (s. 6.1.1). Dabei wurde ein mit einem Phagentemplat modifiziertes Si-Substrat (glatt und rau) in 1 mL Mineralisationslösung für 90 min inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit 80 Vol % Ethanol wurde die Probe unter einem Stickstoffstrom getrocknet. Die beschriebenen Arbeitsabläufe stellen einen Mineralisationszyklus dar.

Um dickere Schichten herzustellen, wurden 39 Mineralisationszyklen bei ZT durchgeführt. Überraschenderweise konnte trotz der 39 Zyklen keine dicke Schicht erzielt werden. Die Schichtdicke war mittels REM nicht erfassbar. In Kapitel 6.3.3 wurde auf dem wt-Phagentemplat ein Schichtwachstum von 4 nm pro Zyklus für den ersten Mineralisationszyklus beschrieben und ein Wachstum von 1 nm pro Zyklus für den zweiten Mineralisationszyklus. Der starke Schichtzuwachs im ersten Mineralisationszyklus wurde auf eine starke Anziehung von hydroxylierten Zr-Tetrameren/Oktameren an die Phagenoberfläche und eine anschließende Kondensationsreaktion mit Hydroxygruppen auf dem Biotemplat zurückgeführt. Beim zweiten Mineralisationszyklus lag bereits eine mineralisierte Schicht vor. Das Templat hatte keinen Einfluss mehr auf die Mineralisation. Dies war ein Hinweis darauf, dass das sehr langsame Schichtwachstum im zweiten Mineralisationszyklus auf schwächere Wechselwirkungen zwischen der bereits mineralisierten Schicht und Zr-Tetrameren/Oktameren in der Lösung zurückgeführt werden kann. Auch aus der geringen Schichtdicke nach 39 Mineralisationszyklen ergibt sich, dass entweder ein sehr langsames Schichtwachstum stattfindet oder schwächere Wechselwirkungen zwischen der bereits mineralisierten Schicht und Zr-Spezies in der Lösung zu einer Desorption der schon adsorbierten Zr-Spezies im nächsten Mineralisationsschritt führen.

Eine Möglichkeit, eine Desorption von adsorbierten Zr-Spezies auf der Oberfläche zu verhindern, liegt darin, starke Wechselwirkungen zwischen Zr-Spezies und Substrat zu realisieren. Über eine Kondensationsreaktion können zum Beispiel chemische Bindungen gebildet werden. Da Kondensationsreaktionen thermisch aktiviert werden können, kann eine Erhöhung der Mineralisationstemperatur die Bildung stabiler Schichten durch Chemisorption von Zr-Spezies ermöglichen. In dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass schon eine Erhöhung der Mineralisationstemperatur auf 60 °C Kondensationsreaktionen beschleunigt

(Kap. 6.1.1). Allerdings fand bei 60 °C auch verstärkt homogene Keimbildung und Partikelagglomeration statt. Um zu verhindern, dass sich große Agglomerate auf der Schicht abscheiden, wurde die Mineralisationszeit von 90 min (bei ZT) auf fünf Minuten reduziert. Diese Mineralisationszeit basiert auf den Beobachtungen, dass die Mineralisationslösung nach fünf Minuten leicht trüb wurde, was auf das Vorhandensein großer Agglomerate zurückgeführt werden kann^[269,270].

Daher wurden bei einer erhöhten Temperatur von 60 °C ZrbM-Schichten mit 20 bzw. 41 Mineralisationszyklen von je 5 min mineralisiert. Abbildung 56 zeigt die entsprechenden Schichten in Abhängigkeit der Mineralisationszyklen auf einem glatten (A, B) und einem rauen Substrat (C, D). Mit 20 Zyklen konnten auf dem glatten und rauen Substrat Schichten einer Dicke von 23 ± 5 nm (Abbildung 56 A) und 23 ± 3 nm (Abbildung 56 C) mineralisiert werden. Nach 40 Zyklen wurden Schichtdicke von 39 ± 9 nm (Abbildung 56 B) bzw. 36 ± 9 nm (Abbildung 56 D) auf dem glatten bzw. rauen Substrat erreicht (Abbildung 57). Dies indiziert eine Wachstumsrate von ~ 1 nm pro Zyklus.

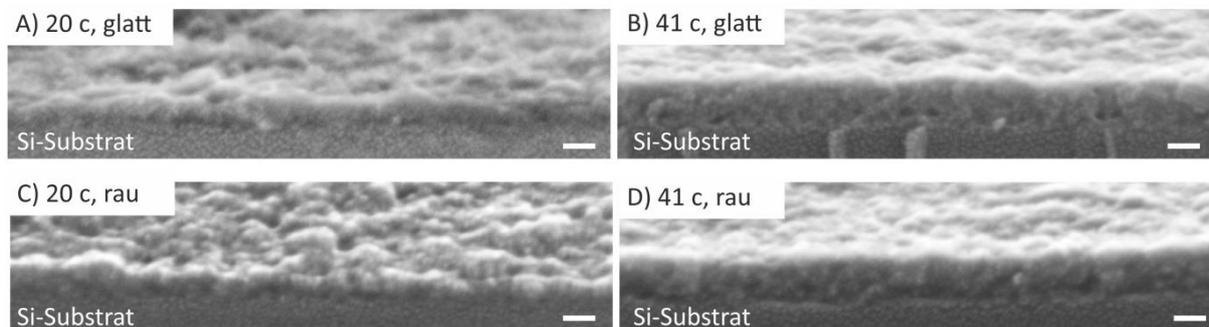


Abbildung 56: Schichtdicke von mineralisierten Schichten aus Zirkonium-basiertem Material. Auf dem glatten A), B) und rauen C), D) Substrat wurden Schichten mit A), C) 20 Zyklen und B), D) 41 Zyklen bei 60 °C mineralisiert. Nach 20 Zyklen wurden Schichtdicken von A) 23 ± 5 nm auf dem glatten Substrat und von C) 23 ± 3 nm auf dem rauen Substrat erzielt. Eine Mineralisation mit 41 Zyklen führte zu Schichtdicken von B) 39 ± 9 nm auf dem glatten Substrat und D) 36 ± 9 nm auf dem rauen Substrat. Die Proben wurden um 8° gekippt. Maßstab: 20 nm

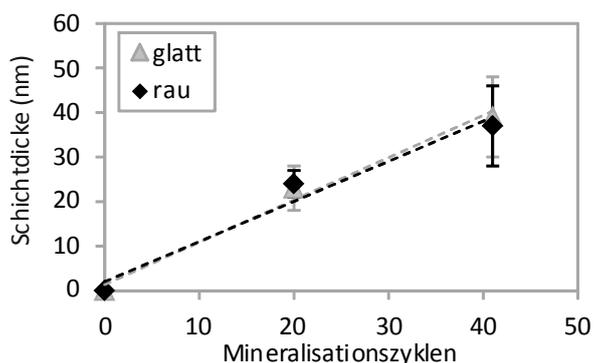


Abbildung 57: Schichtdicke von mineralisierten ZrbM-Schichten. Schichten aus ZrbM wurden mit 20 bzw. 41 Mineralisationszyklen auf einer Phagenschicht mineralisiert. Dabei wurde sowohl ein glatter (polierte Seite) Si-Wafer, als auch ein rauher (unpolierte Seite) Si-Wafer als Substrat eingesetzt.

Die Oberfläche einer bei ZT (Abbildung 58 A) mineralisierten Schicht (1 Zyklus, 90 min) und die Oberfläche der bei 60 °C (Abbildung 58 B) mineralisierten Schicht zeigen eine vergleichbare feinpartikuläre Struktur, was auf einen gleichen Wachstumsmechanismus durch molekulare Addition von Zr-Tetrameren/Oktameren hindeuten kann.

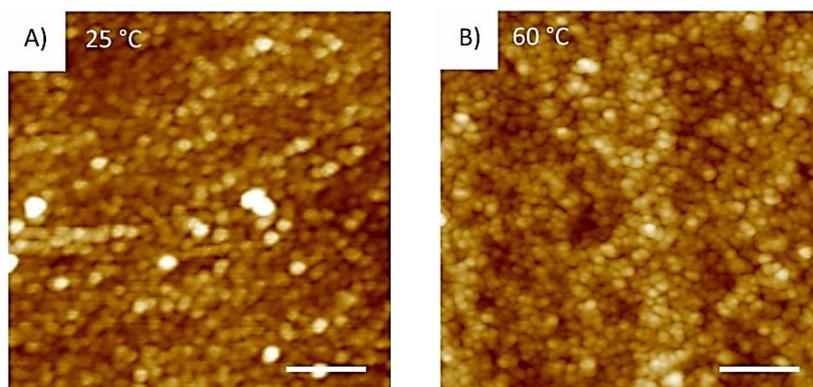


Abbildung 58: Mineralisierte Schichten aus Zirkonium-basiertem Material auf einem wt-Phagentemplat. A) Mineralisation bei 25 °C mit 1 Zyklus von 1,5 h; B) Mineralisation bei 60 °C mit 41 Zyklen von 5 min. Maßstab: 200 nm

Dieser Wachstumsmechanismus wurde bei der Mineralisation von einzelnen Phagen bei ZT beschrieben (s. 6.3.3). Eine Abscheidung homogen gebildeter Partikel wurde ausgeschlossen, da diese mit einer Größe von circa 10 nm (0 min, Mineralisationszeit) bis 17 nm (90 min) (s. Abbildung 24 A, B in 6.1.1) deutlich größer sind als die Schichtzunahme während eines Mineralisationszyklus (90 min) von circa 1 nm. Auch bei der Mineralisation ei-

nes Phagentemplats bei 60 °C sind die homogen gebildeten Partikel mit circa 25 nm (0 min) bis circa 700 nm (6 min) (s. Abbildung 24 E, F in 6.1.1) deutlich größer als die Schichtzunahme von ~1 nm pro Zyklus (90 min).

Sowohl für die Mineralisation auf Einzelphagen bei ZT (2. Mineralisationszyklus) (6.3.3), als auch für die Mineralisation bei 60 °C auf einem Phagentemplat wurde eine Wachstumsrate von circa 1 nm pro Zyklus beobachtet. Unter der Annahme, dass auch bei ZT ein lineares Schichtwachstum mit zunehmender Zyklusanzahl vorliegen würde, müsste bei gleicher Zyklusanzahl bei beiden Mineralisationstemperaturen eine gleich dicke Schicht erzielt werden. Da allerdings nach 39 Zyklen bei ZT lediglich eine Schichtdicke unter 10 nm beobachtet wurde, und bei 60 °C nach 20 Mineralisationszyklen bereits Schichtdicken von circa 23 nm vorlagen, kann davon ausgegangen werden, dass die bei ZT mineralisierten Schichten, bei einem weiteren Mineralisationsschritt wieder abgewaschen wurden. Dies weist darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen Zr-Tetrameren/Oktameren und der mineralisierten Schicht bei ZT sehr gering sind und dass Zr-Tetramere/Oktamere nur über physikalische Wechselwirkungen (wie polare Wechselwirkungen) an die bereits gebildete Schicht adhäreren, so dass diese in einem nächsten Mineralisationszyklus wieder desorbieren können. Während des Waschschruttes in einem Ethanol/Wasser-Gemisch bei ZT (s. 5.8.2) bleibt die Schicht noch erhalten. Dies zeigt das Wachstumsverhalten auf einzelnen wt-Phagen (s. 6.3.3). Nach dem zweiten Mineralisationsschritt (90 min) auf den einzelnen Phagen wird eine Schichtzunahme von circa 1 nm beobachtet (s. Tabelle 15 in 6.3.3). Bei einer erhöhten Temperatur von 60 °C werden Kondensationsreaktionen thermisch aktiviert.^[62] So ist die Chemisorption von Zr-Tetrameren/Oktameren an die mineralisierte ZrbM-Schicht bei 60 °C gegenüber der Mineralisation bei ZT begünstigt. Durch diese kovalente Bindungen der Tetramere/Oktamere mit der bereits gebildeten Schicht können stabile Schichten gebildet werden, die im nächsten Mineralisationsschritt nicht wieder desorbiert werden. Dies ermöglicht ein lineares Schichtwachstum mit zunehmender Zyklusanzahl, wie es für die Mineralisation bei 60 °C beobachtet wurde.

Bei 60 °C konnten homogene Schichten aus ZrbM auf einem Phagentemplat mineralisiert werden. Die Schichtdicke wurde dabei über die Zyklusanzahl kontrolliert. Es liegt eine Wachstumsrate von ~1 nm pro Zyklus vor.

6.5 Adhäsion von *Staphylococcus aureus* auf unterschiedlichen Materialoberflächen

Bei Biomineralisationsprozessen in der belebten Natur können Biotemplate gezielt zur Bildung von anorganischem Material führen oder die Materialbildung unterdrücken (s. 1).^[5] Dies wird vor allem durch die Art und Anordnung von funktionellen Gruppen auf dem Biomakromolekül beeinflusst.^[3,49] Zum Beispiel wird bei der Bildung von Perlmutter angenommen, dass nur eine bestimmte Anordnung von funktionellen Gruppen auf einem Biotemplat zur Bildung von CaCO_3 führt (s. 4.4.1).^[3,49] Dies ist ein interessanter Aspekt im Hinblick auf die Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen. Adhärenz Bakterien auf einer Oberfläche, können sich Biofilme bilden. Handelt es sich dabei um pathogene Bakterien, wie *Staphylococcus aureus*, die einen Biofilm zum Beispiel auf Implantaten bilden, kann dies unter anderem zu einem Implantatverlust bis hin zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen.^[10] Daher wird intensiv daran geforscht, Möglichkeiten zu finden, um eine Adhäsion von Bakterien auf Oberflächen zu verhindern.^[151,156,158,271–273] Um zu untersuchen, ob bestimmte chemische Oberflächen, das heißt bestimmte Materialien oder auch bestimmte funktionelle Gruppen, die Bakterienadhäsion unterdrücken können, wurde in dieser Arbeit die Bakterienadhäsion von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) auf einer Phagenschicht, einer Schicht aus Zirkonium-basiertem Material (ZrBM) und einer Siliziumdioxid (SiO_2)-Schicht untersucht. Dr. P. Popella (Prof. Dr. F. Götz, Universität Tübingen) führte hierfür die Untersuchung der Bakterienadhäsion und die Quantifizierung adhärenzter Bakterien mittels Fluoreszenzmikroskopie durch. Alle weiteren Untersuchungen der Probenoberflächen sowie die REM-Aufnahmen wurden selbst durchgeführt.

6.5.1 Charakterisierung der unterschiedlichen Materialoberflächen

Die Adhäsion von *S. aureus* wurde auf einer Phagenschicht (s. 6.4.1), einer Schicht aus ZrBM (s. 6.4.2) und einer SiO_2 -Schicht untersucht. Die SiO_2 -Schicht auf der Oberfläche eines Si-Wafers wurde durch eine O_2 -Plasmabehandlung beim Reinigungsverfahren erzeugt (s. 5.6.1). Neben der Untersuchung der Bakterienadhäsion auf den unterschiedlichen Materialien (SiO_2 , ZrBM, Proteinhülle der Phagen) wurde auch der Einfluss verschiedener Oberflächenrauigkeiten desselben Materials auf die Adhäsion von *S. aureus* untersucht. Um ver-

schiedene Oberflächenrauigkeiten zu erzielen, wurde zur Probenpräparation sowohl ein polierter (glatter) als auch ein unpolierter (rauer) Si-Wafer als Substrat eingesetzt.

Es ist bekannt, dass die Bakterienadhäsion durch Materialeigenschaften wie die Oberflächenrauigkeit, die Hydrophobizität und die Oberflächenladung beeinflusst wird.^[157] Daher wurden die genannten Größen zunächst für die verschiedenen Substrate untersucht. Die Topographie der verschiedenen Materialoberflächen auf dem glatten und rauhen Substrat wurde mittels AFM charakterisiert. Die Oberflächenrauigkeit (rms (root mean square)-Rauigkeit) kann dabei stark mit unterschiedlicher Scangröße variieren, was in Abbildung 59 verdeutlicht wird.

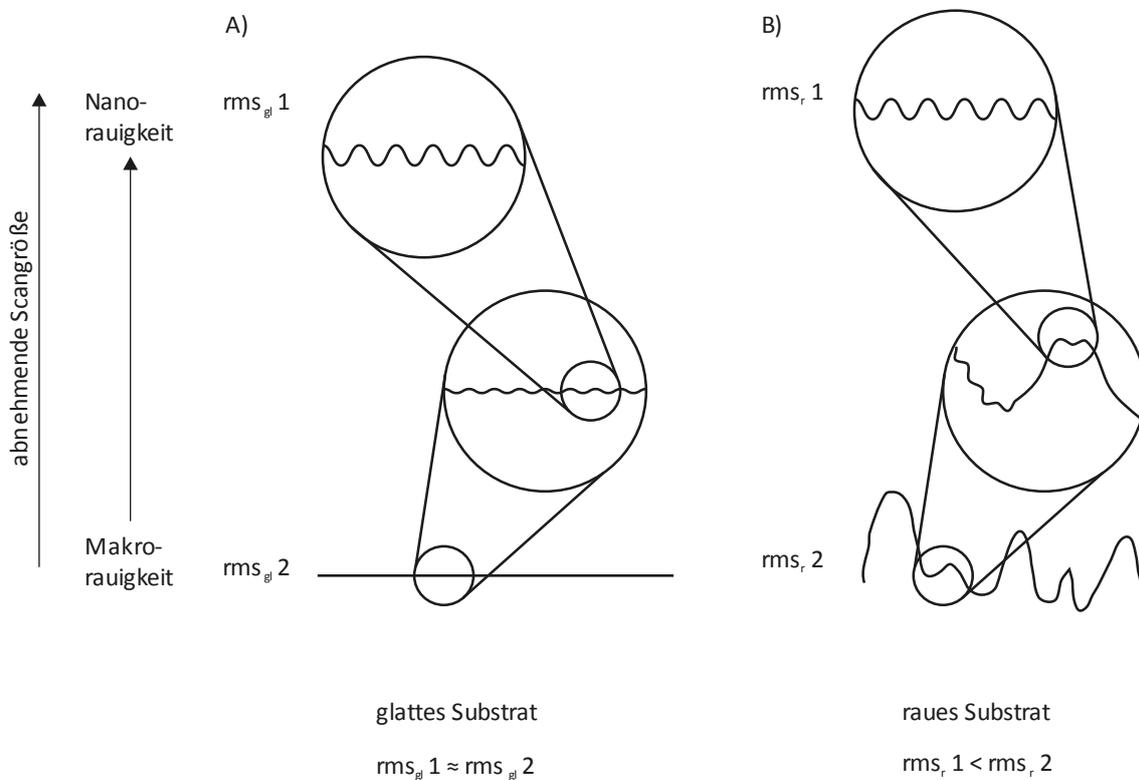


Abbildung 59: Scangrößenabhängige Oberflächenrauigkeit. Bei der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit (rms (root mean square)-Rauigkeit) einer Probe mittels AFM kann die Oberflächenrauigkeit stark mit der Scangröße variieren. Dargestellt ist der Einfluss der Scangröße auf die Oberflächenrauigkeit eines A) glatten Substrats und eines B) rauhen Substrats. Als makroskalige Rauigkeit wird dabei die Rauigkeit beschrieben, die bei einer großen Scangröße ermittelt wird. Als nanoskalige Rauigkeit wird die Rauigkeit beschrieben, die bei einer kleinen Scangröße ermittelt wird. (Nach Preedy *et al.*^[155])

Mit einer Scangröße von $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ wird die makroskalige Rauigkeit einer Oberfläche beschrieben (vgl. Abbildung 59: rms 2), während die Oberflächenrauigkeit bei einer kleinen Scangröße von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ als nanoskalige Rauigkeit (vgl. Abbildung 59: rms 1) bezeichnet wird. Bei einem glatten Substrat (Abbildung 59 A) unterscheiden sich die Oberflächenrauigkeiten kaum mit abnehmender Scangröße. Das heißt, die makroskalige Rauigkeit ist vergleichbar mit der nanoskaligen Rauigkeit. Bei einem rauen Substrat (Abbildung 59 B) ist dagegen ein deutlich stärkerer Scangrößeneinfluss auf die Oberflächenrauigkeit zu verzeichnen. Während die makroskalige Rauigkeit groß ist, ist die nanoskalige Rauigkeit niedrig, da sie die Rauigkeit einer sehr kleinen Oberfläche beschreibt. Aufgrund dieses Scangrößeneinflusses auf die ermittelte Oberflächenrauigkeit wurde in dieser Arbeit sowohl die makroskalige als auch die nanoskalige root mean square (rms)-Rauigkeit der verschiedenen Materialoberflächen (Phagenschicht, SiO_2 -Schicht und ZrbM-Schicht) bestimmt (Tabelle 16). Somit konnte der Einfluss der Oberflächenrauigkeit auf die Bakterienadhäsion umfassend untersucht werden. Für das glatte Substrat (Tabelle 16 A) und das raue Substrat (Tabelle 16 B) war der Einfluss der Scangröße unterschiedlich stark ausgeprägt. Beim glatten Substrat (Tabelle 16 A) wurde für die verschiedenen Schichten eine geringe Abhängigkeit zwischen der Scangröße und der Oberflächenrauigkeit beobachtet. Die SiO_2 -Schicht zeigte von allen Schichten die glatteste Oberfläche. Mit zunehmender Scangröße von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ auf $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ nahm die rms-Rauigkeit von 0,1 nm bis 0,6 nm zu. Die Phagenschicht wies eine etwas rauere Oberfläche im Vergleich zur SiO_2 -Schicht auf. Die rms-Rauigkeiten lagen bei 1,8 nm und 3,0 nm. Während die mineralisierten ZrbM-Schichten die größte rms-Rauigkeit von 2,7 nm und 4,0 nm zeigten. Im Gegensatz zum glatten Substrat war beim rauen Substrat (Tabelle 16 B) eine stärkere Zunahme der Rauigkeit mit steigender Scangröße von $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ auf $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ erkennbar. Im Fall der ZrbM-Schichten wurde der größte Einfluss der Scangröße auf die Rauigkeit beobachtet. Hier wurde eine nanoskalige Rauigkeit ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) von 3,4 nm ermittelt, während die makroskalige Rauigkeit ($30 \times 30 \mu\text{m}^2$) 140,5 nm betrug. Die SiO_2 -Schichten zeigten eine Zunahme von 0,3 nm auf 118,3 nm mit steigender Scangröße und die Phagenschichten eine Zunahme von 1,7 nm auf 101,0 nm. Ein Vergleich der Oberflächenrauigkeiten zwischen dem glatten (Tabelle 16 A) und rauen Substrat (Tabelle 16 B) zeigt bei der kleinsten Scangröße ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$) kaum einen Unterschied (s. auch Abbildung 60). Dies galt für alle Materialoberflächen. Somit hat

das Substrat selbst (glatt oder rau) keinen Einfluss auf die nanoskalige Rauigkeit ($1 \times 1 \mu\text{m}^2$).

Tabelle 16: Oberflächenrauigkeit der SiO_2 -Schicht, Phagenschicht (Phagen) und einer Schicht aus Zirkonium-basiertem Material (ZrbM). Die rms-Rauigkeit wurde sowohl für das A) glatte, als auch das B) raue Substrat bei zwei unterschiedlichen Scangrößen im nanoskaligen und makroskaligen Bereich bestimmt.

A)		rms-Rauigkeit glattes Substrat (nm)		
Scangröße	Phagen	SiO_2	ZrbM	
$1 \times 1 \mu\text{m}^2$	$1,8 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,0$	$2,7 \pm 0,1$	
$30 \times 30 \mu\text{m}^2$	$3,0 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$4,0 \pm 1,0$	

B)		rms-Rauigkeit raues Substrat (nm)		
Scangröße	Phagen	SiO_2	ZrbM	
$1 \times 1 \mu\text{m}^2$	$1,7 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,0$	$3,4 \pm 1,3$	
$30 \times 30 \mu\text{m}^2$	$101,0 \pm 42,0$	$118,3 \pm 12,0$	$140,5 \pm 27,7$	

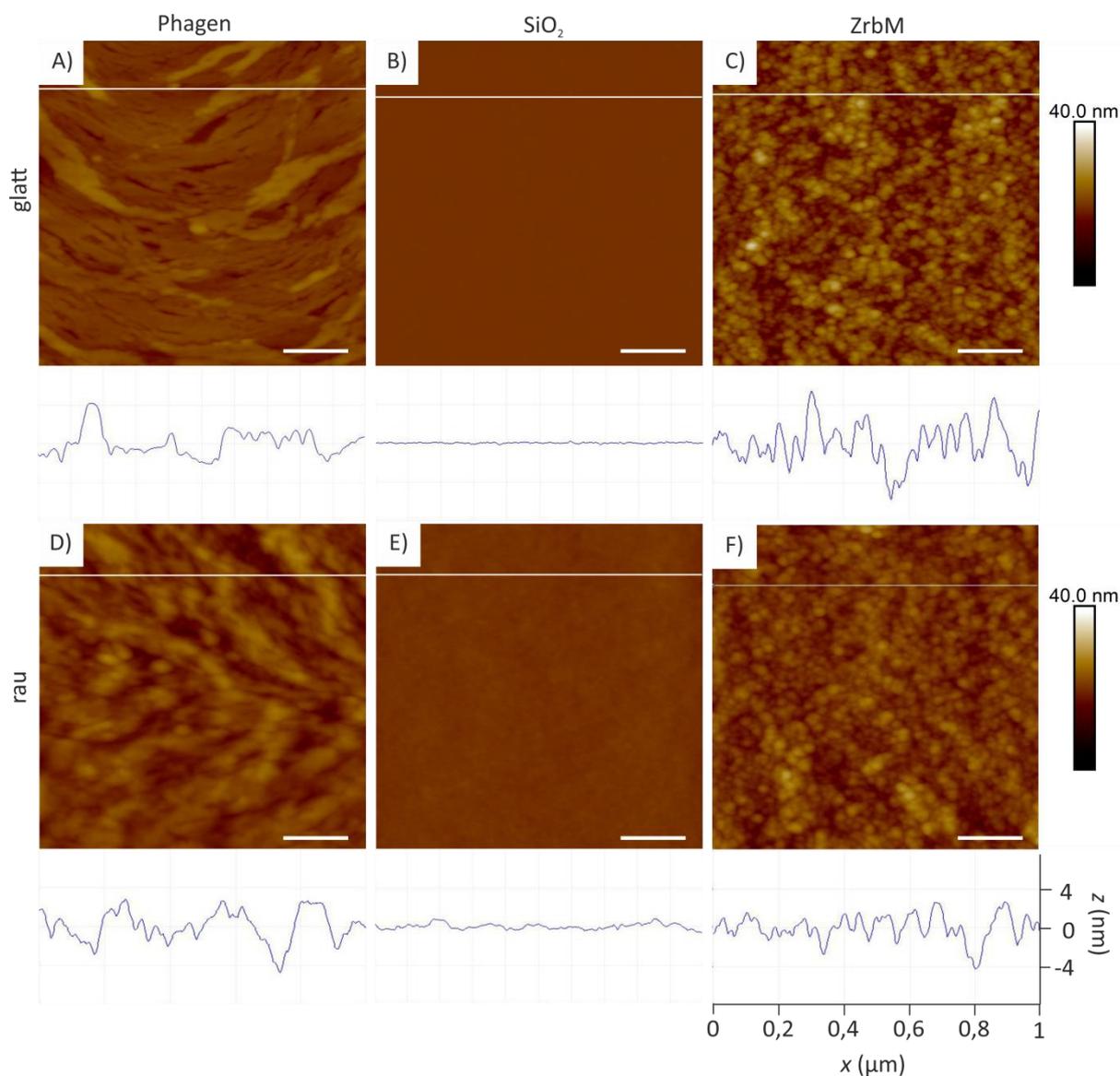


Abbildung 60: Rauigkeit der Probenoberflächen. Die AFM-Aufnahmen A),D) einer Phagenschicht, B),E) einer SiO₂-Schicht sowie C),F) von Schichten aus ZrbM sind für das A)-C) glatte und das D)-F) raue Substrat gezeigt. Das Linienprofil (angezeigt in den AFM-Aufnahmen) verdeutlicht die Rauigkeitsunterschiede der verschiedenen Materialoberflächen. Scangröße 1 x 1 μm²; Maßstab: 200 nm

Die Hydrophobizität der verschiedenen Materialoberflächen wurde durch den Wasser-Kontaktwinkel sowohl für das glatte, als auch für das raue Substrat bestimmt (Tabelle 17). Dabei wurde die „sessile drop“-Methode angewandt. Die SiO₂-Schicht auf dem glatten und rauhen Substrat wies mit einem Kontaktwinkel von 29° die geringste Hydrophobizität auf. Mit einem Kontaktwinkel von 62° besitzt die glatte und raue Oberfläche des ZrbM die höchste Hydrophobizität. Dazwischen liegt das glatte und raue Phagentemplat mit einem

annähernd gleichen Kontaktwinkel von 41° und 36° . Obwohl die Hydrophobizität sowohl von der chemischen Zusammensetzung der Materialien als auch von der Rauigkeit abhängen kann,^[274] wird hier kein signifikanter Unterschied der Hydrophobizität zwischen den glatten und rauen Substraten beobachtet. Demnach wird die Hydrophobizität der in dieser Arbeit vorliegenden Schichten vor allem durch die chemische Zusammensetzung bestimmt.

Tabelle 17: Oberflächeneigenschaften der verschiedenen Materialien und *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Der Wasser-Kontaktwinkel wurde nach der „sessile drop“ Methode bestimmt. Phagentemplat (Phagen), SiO₂ und Zirkonium-basiertes Material (ZrbM) wurden auf dem glatten und rauen Substrat analysiert. Das Zetapotential bei pH 7,4 (Adhäsionsbedingungen) sowie der Isoelektrische Punkt (IEP) sind für die einzelnen Materialien zusammengefasst. Zetapotentialmessungen wurden in 10 mM NaCl-Lösung durchgeführt. Dabei lagen die Phagen als Suspension vor. SiO₂-Schichten und die Schichten aus ZrbM wurden auf dem glatten Substrat vermessen.

	Wasser-Kontaktwinkel (°)		Zetapotential (mV)	IEP
	glatt	rau	pH 7,4; glatt	
Phagen	41 ± 3	36 ± 4	-29 ± 4 ^a	4,3
SiO ₂	29 ± 2	29 ± 1	-114 ± 6	2,0
ZrbM	62 ± 3	62 ± 3	-74 ± 4	2,8
<i>S. aureus</i>	72,2 ^[275]		-10 (pH 7,4) ^[276]	

^aZetapotential von suspendierten Phagen bei pH 7,0.

Um den Einfluss der Oberflächenladung auf die Bakterienadhäsion zu untersuchen, wurde das Zetapotential der verschiedenen Materialien bestimmt. Das Zetapotential der ZrbM- sowie der SiO₂-Schichten wurde im Bereich von pH 2 bis 9 mit einem elektrokinetischen Messgerät zur Oberflächenanalyse (SurPASS, Anton Paar) ermittelt (Abbildung 61). Über Laser-Doppler-Elektrophorese wurde das Zetapotential suspendierter Phagen im pH-Bereich von 2,5 bis 7,0 bestimmt. Die Ergebnisse der Zetapotentialmessungen sind in Abbildung 61 dargestellt. Aus den Messungen wurde für die Phagen ein IEP von 4,3 für die ZrbM-Schichten ein IEP von 2,8 und für die SiO₂-Schichten ein IEP von 2,0 ermittelt (Tabelle 17). Bei der Untersuchung der Bakterienadhäsion bei pH 7,4 lagen alle Oberflächen mit einer negativ geladenen Oberfläche vor. Die Phagenoberfläche zeigte mit -29 ± 4 mV (pH 7,0) das kleinste Zetapotential gefolgt von der ZrbM-Oberfläche mit einem Zetapoten-

tial von -74 ± 4 mV (pH 7,4) und der SiO₂-Oberfläche mit dem höchsten Zetapotential von -114 ± 6 mV (pH 7,4).

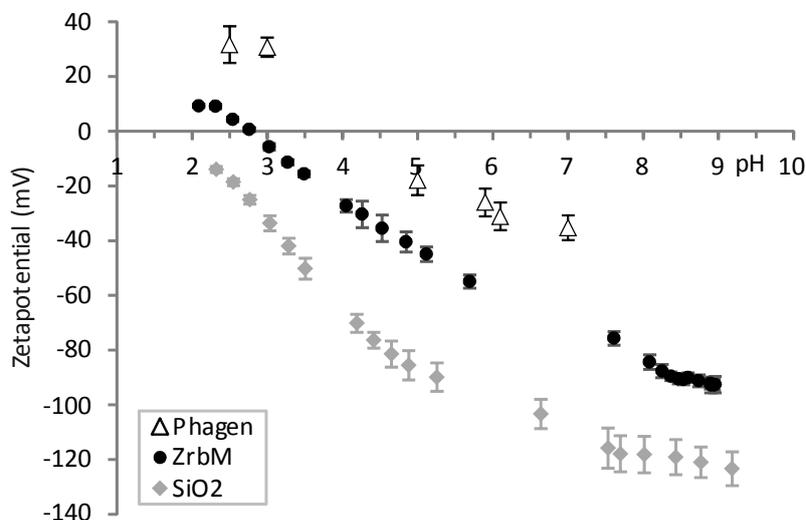


Abbildung 61: Zetapotential verschiedener Materialoberflächen. Das Zetapotential der SiO₂-Schichten und der ZrbM-Schichten wurden mit einem elektrokinetischen Messgerät zur Oberflächenanalyse (SurPASS, Anton Paar) ermittelt. Über Laser-Doppler-Elektrophorese wurde das Zetapotential suspendierter Phagen bestimmt. Das Zetapotential wurde für alle drei Materialoberflächen in 10 mM NaCl-Lösung gemessen.

Das Zetapotential der mineralisierten ZrbM-Schichten unterscheidet sich vom Zetapotential der mineralisierten Partikel aus ZrbM (s. 6.1.4). Während die Schichten einen IEP von 2,8 aufweisen (Abbildung 61), liegt der IEP der mineralisierten ZrbM-Partikel bei circa pH 7 (s. Abbildung 33 in 6.1.4). Ein Unterschied im Zetapotential zwischen Partikel und einem Substrat desselben Materials ist bekannt für kristallines ZnO^[132], ZrO₂^[31] und Al₂O₃^[277]. Dies ist bedingt durch zusätzliche Ladungsmechanismen an der Substratoberfläche, die den Isoelektrischen Punkt (IEP) des Substrats im Vergleich zum IEP von Partikeln zu einem niedrigeren pH-Wert hin verschieben.^[31,132,277] Dieser Einfluss wird im Folgenden etwas näher beschrieben. Der IEP von Oxiden wird von der Protonierung bzw. Deprotonierung von Hydroxygruppen, die sich auf der Oberfläche befinden, bestimmt (s. Gleichung (1) und (2) in 4.2). Die Protonierung/Deprotonierung wird von der Koordination der Hydroxygruppen beeinflusst. Hydroxygruppen können einfach koordiniert (ZrOH) oder zweifach koordiniert (Zr₂OH) vorliegen (vgl. Rössler *et al.*^[278]). Der Einfluss der Koordination auf die Protonierung wird im Folgenden am Beispiel von TiO₂ gezeigt. Während für einfach koor-

dinierte Hydroxygruppen ein pK_s -Wert von $pK_s = 12,7$ veröffentlicht ist, haben zweifach koordinierte Hydroxygruppe einen pK_s -Wert von $pK_s = 2,9$.^[278] Demzufolge beeinflusst die Reaktivität und die Menge an Hydroxygruppen auf der Oxidoberfläche den IEP der Oxide. Auch verschiedene Einkristallebenen von Al_2O_3 (Saphir) unterscheiden sich in der Reaktivität und der Quantität ihrer Hydroxygruppen und damit in ihrer Oberflächenladung.^[277] Allerdings zeigen die verschiedenen Einkristallebenen trotz unterschiedlicher Oberflächenladung einen sehr ähnlichen IEP.^[277] Dies zeigt, dass zusätzliche Ladungsmechanismen den IEP dieser Ebenen beeinflussen müssen. Als zusätzlicher Ladungsmechanismus wird die Autoprotolyse von Grenzflächenwasser beschrieben. Dabei handelt es sich um sogenanntes „ice-like“-Wasser, welches eine stabile Wasserstruktur aufweist.^[277] Die Wasserstruktur wird zum einen von der Oberflächenladung der Festkörper beeinflusst. Die Oberflächenladung führt zur Orientierung der Wassermoleküle aufgrund ihres Dipolmoments. Zum anderen werden die Wasserstoffmoleküle so orientiert, dass die Anzahl an Wasserstoffbindungen optimiert wird.^[277] Ob der Einfluss der Wasserdipolorientierung oder die Optimierung des Wasserstoffbindungsnetzwerks die Struktur des Grenzflächenwassers dominiert, hängt vom jeweils vorliegenden System ab. Eine starke Strukturierung des Grenzflächenwassers führt zu einer verstärkten Autoprotolyse der Wassermoleküle, die einen zusätzlichen Einfluss auf die Oberflächenladung und somit auf den IEP der vorliegenden Festkörper hat.^[277] Im Falle der verschiedenen Einkristallebenen von Al_2O_3 hat die Optimierung des Wasserstoffbindungsnetzwerks einen stärkeren Einfluss auf die Struktur des Grenzflächenwassers als die Orientierung der Wasserdipole durch die Oberflächenladung der Oxidoberfläche. Sie bestimmt maßgeblich den IEP der verschiedenen Einkristallebenen. Beobachtete Unterschiede im IEP zwischen Einkristallen und Partikeln aus Al_2O_3 werden hauptsächlich auf den zusätzlichen Ladungsmechanismus durch die Autoprotolyse von strukturiertem Grenzflächenwasser zurückgeführt.^[277] Die Ausbildung von strukturiertem Grenzflächenwasser findet verstärkt auf ebenen Oberflächen statt^[277] und führt somit bei den Al_2O_3 Einkristallen zu einem verstärkten zusätzlichen Ladungsmechanismus im Vergleich zu Partikeln. Auch bei amorphen Oxiden, wie SiO_2 , wird die Ausbildung von strukturiertem Grenzflächenwasser („ice-like“-Wasser) beschrieben.^[279] Daher wird der in dieser Arbeit beobachtete Unterschied im IEP zwischen Schichten und Partikel aus amorphem ZrBM auf eine verstärkte Ausbildung von strukturiertem Grenzflächenwasser an den Schichten zurückgeführt. Dieses strukturierte Grenzflächenwasser führt zu einem zusätzli-

chen Ladungsmechanismus durch Autoprotolyse des Grenzflächenwassers und dadurch zur Verschiebung des IEP der Schichten zu niedrigeren Werten im Vergleich zum IEP der Partikel.

6.5.2 Bakterienadhäsion auf verschiedenen Materialoberflächen

Die Adhäsion von *S. aureus* auf den verschiedenen Materialoberflächen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (FM) untersucht. Die ermittelte durchschnittliche Anzahl adhärierter Zellen ist in Abbildung 62 dargestellt.

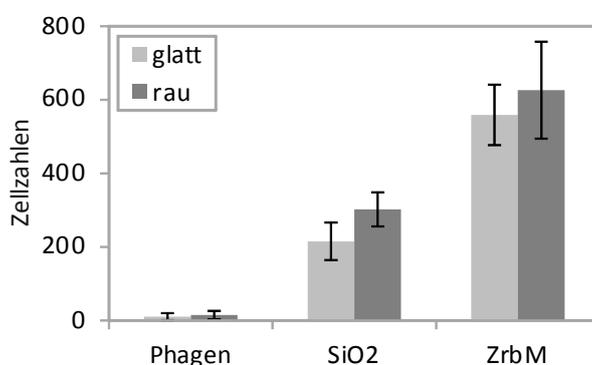


Abbildung 62: Adhäsion von *Staphylococcus aureus* auf den verschiedenen Materialoberflächen. Die Anzahl adhärierter Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie evaluiert.

Der Durchschnittswert an adhärerten Zellen wurde aus der Bakterienanzahl an zehn willkürlich gewählten Stellen auf der Probenoberfläche gebildet. Die Schichten aus ZrbM zeigten die stärkste Bakterienadhäsion, während auf der Phagenschicht kaum Bakterien adhärten. Die Anzahl adhärterter Zellen auf den SiO₂-Schichten lag zwischen der Anzahl auf den Phagen- und auf den ZrbM-Schichten. Für die drei verschiedenen Schichten (Phagen, SiO₂ und ZrbM) war zwischen den jeweiligen glatten und rauen Substraten kaum ein Unterschied der Bakterienadhäsion festzustellen.

Um auszuschließen, dass Phagen während der Inkubation in der Bakteriensuspension vom Substrat gelöst wurden, wurden sowohl die glatten als auch die rauen Phagenschichten vor und nach der Inkubation mittels REM untersucht (Abbildung 63). Die Aufnahmen der glatten Phagenschichten in Abbildung 63 zeigen A) vor und B) nach der Inkubation keinen Unterschied in der Struktur der Phagenschichten, was auf die Beständigkeit der Phagen-

schichten hinweist. Dasselbe wurde für die rauen Phagenschichten in Abbildung 63 B) und D) festgestellt.

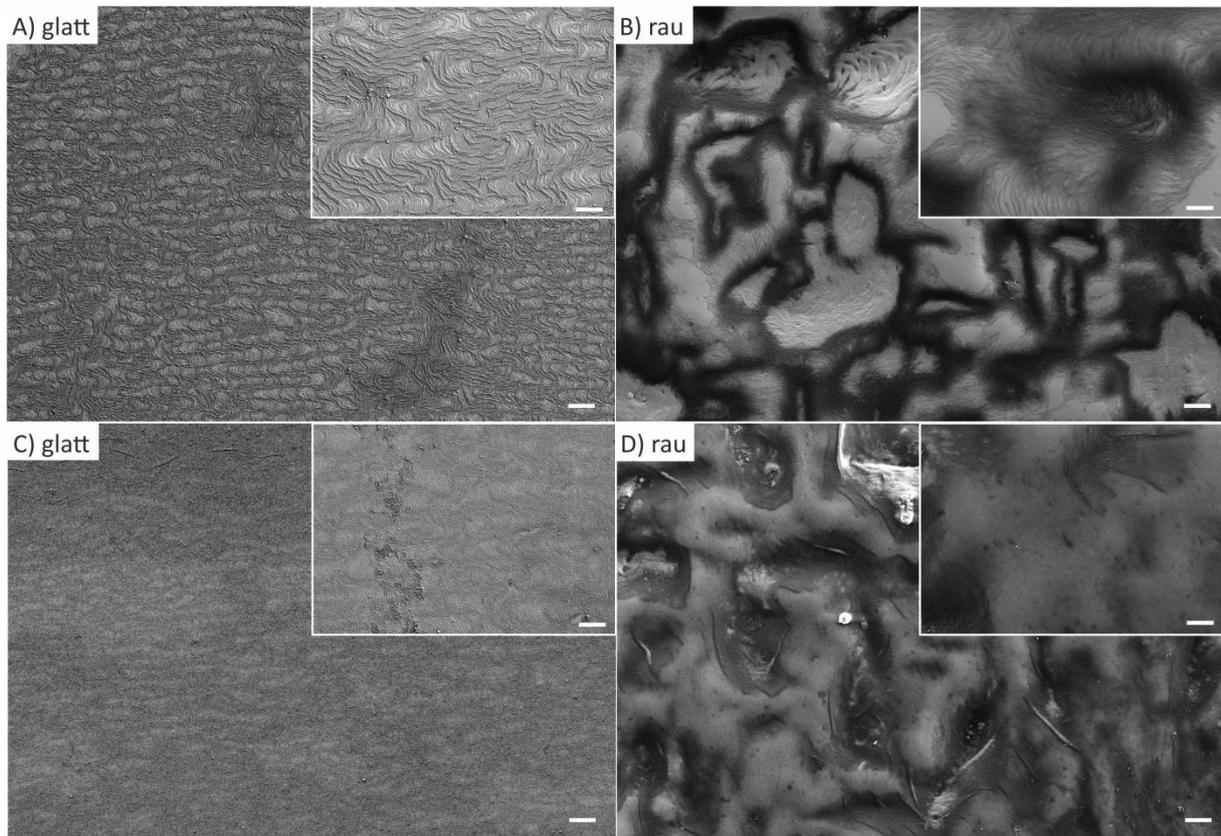


Abbildung 63: Beständigkeit der Phagenschichten auf dem Si-Substrat während der Inkubation in der Bakterienadhäsion. Die REM-Aufnahmen zeigen die Phagenschicht vor der Inkubation auf dem A) glatten und B) rauen Substrat sowie nach der Inkubation auf dem C) glatten und D) rauen Substrat. Maßstab: 2 μm

Um zu sehen, ob die Bakterien bevorzugt an speziellen Oberflächenstrukturen wie zum Beispiel Vertiefungen adhärten, wurden die Proben mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht. Neben den REM-Aufnahmen sind in Abbildung 64 Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen gezeigt, die zur Auswertung der Bakterienanzahl mittels FM genutzt wurden. Auf den Phagenschichten in Abbildung 64 A), D), G), J) sind kaum Bakterien zu beobachten. Beim Betrachten der SiO_2 -Schichten in Abbildung 64 B), E), H), K) ist zu sehen, dass die Bakterien hauptsächlich als kleine Bakterien-Cluster, die homogen auf der Oberfläche verteilt sind, adhärten.

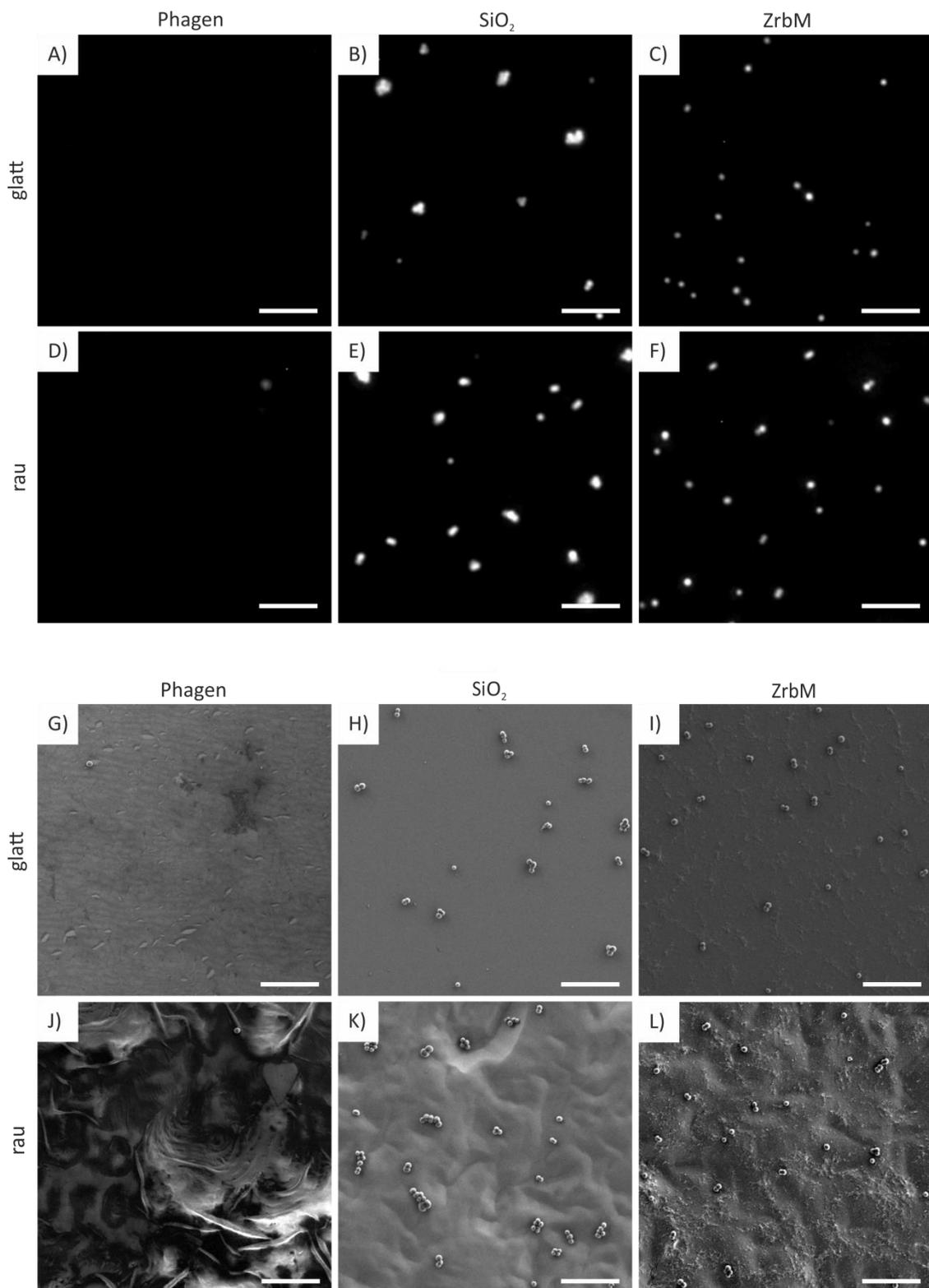


Abbildung 64: Oberflächen nach der Inkubation mit *Staphylococcus aureus*. A)-F) Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen und G)-L) REM-Aufnahmen der Phagenschicht, einer SiO_2 -Schicht und einer Schicht aus Zirkonium-basiertem Material (ZrbM) auf dem glatten und rauhen Substrat. Maßstab: 10 μm

Die Schichten aus ZrbM in Abbildung 64 C), F), I), L) zeigen ebenfalls eine homogen verteilte Bakterienadhäsion, wobei hier die Clusterbildung weniger stark ausgeprägt ist. Weder auf der Phagenschicht noch auf den SiO₂-Schichten und den ZrbM-Schichten ist ein Unterschied in der Bakterienadhäsion zwischen den Schichten auf dem glatten und dem rauen Substrat zu sehen. Bei keiner Materialoberfläche wurde eine bevorzugte Adhäsion der Bakterien in den Vertiefungen des rauen Substrats beobachtet. Hieraus lässt sich schließen, dass die hohe makroskalige Rauigkeit der Schichten auf den rauen Substraten keinen Einfluss auf die Bakterienadhäsion hat. Daher wird angenommen dass lediglich die nanoskaligen Rauigkeiten, die mit einer Scangröße von 1 x 1 µm² gemessen wurden, einen Einfluss auf die Bakterienadhäsion haben. Die nanoskaligen Rauigkeit war zwischen dem glatten und dem rauen Substrat annähernd gleich (Tabelle 16).

Ein Vergleich der Anzahl an adhärirten Zellen mit der nanoskaligen Rauigkeit der SiO₂-Schichten und der Schichten aus ZrbM von ungefähr 0,2 nm und 3,1 nm (Mittelwert aus glatten und rauen Substraten in Tabelle 16) zeigt, dass die erhöhte nanoskalige Rauigkeit zu einer Adhäsion von nahezu doppelt so vielen Zellen auf ZrbM im Vergleich zu den SiO₂-Schichten führt. Die Scangröße von 1 x 1 µm² liegt in der Größenordnung der Bakterienzellen. *S. aureus* Zellen sind 0,7 - 1 µm groß.^[280] Eine höhere nanoskalige Rauigkeit (1 x 1 µm²) kann somit zu mehr Kontaktmöglichkeiten zwischen der Schicht und den Bakterien führen. Eine erhöhte Anzahl an Kontaktstellen zwischen Schicht und Bakterien führt zu insgesamt stärkeren Adhäsionskräften, indem die Adhäsionskräfte an den einzelnen Kontaktstellen aufaddiert werden.^[155] Die stärkeren Adhäsionskräfte können somit zu einer verstärkten Bakterienadhäsion auf den raueren Schichten aus ZrbM im Vergleich zu den SiO₂-Schichten führen. Ein Ähnliches Verhalten wurde für die Bakterienadhäsion auf Borosilikatgläsern mit unterschiedlichen Rauigkeiten beobachtet.^[155] Dabei wurde eine vermehrte Adhäsion von Gram-positiven Bakterien auf Borosilikatgläsern mit höherer nanoskaliger Rauigkeit festgestellt.

Auch die Hydrophobizität der Oberflächen kann die Bakterienadhäsion beeinflussen.^[151,153,281] Generell gilt, dass Bakterien stärker an hydrophoben als an hydrophilen Oberflächen adhärirten.^[151,153,281] Auch in dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass auf den hydrophoberen ZrbM-Oberflächen, für die ein Kontaktwinkel von 62° (Tabelle 17)

bestimmt wurde, mehr Bakterien adhärten als auf den weniger hydrophoben SiO₂-Schichten mit einem Kontaktwinkel von 29° (Tabelle 17).

Neben der Oberflächenrauigkeit und der Hydrophobizität der Oberfläche, kann die Bakterienadhäsion auch von der Oberflächenladung beeinflusst werden.^[151,158] Die Adhäsion der Bakterien wurde bei einem pH-Wert von 7,4 untersucht. Bei diesen pH Bedingungen wiesen die verschiedenen Materialoberflächen jeweils eine negative Oberflächenladung auf (s. Tabelle 17). Unter den anorganischen Materialien zeigten die SiO₂-Schichten eine stärkere negative Oberflächenladung (-114 ± 6 mV) als die ZrbM-Schichten (-74 ± 4 mV). Für *S. aureus* Zellen wurde bei pH 7,0 ein Zetapotential von -10 mV bestimmt.^[276] Bei den Adhäsionsbedingungen (pH 7,4) liegen *S. aureus* demnach ebenfalls negativ geladen vor. Da sowohl die anorganischen Schichten als auch die Bakterienoberfläche negativ geladen sind, führt eine höhere Oberflächenladung zu einer stärkeren elektrostatischen Abstoßung und damit zu einer schwächeren Bakterienadhäsion. Dieses Verhalten wurde bei den ZrbM- und den SiO₂-Schichten beobachtet. Die größere negative Oberflächenladung von SiO₂ führte zu einer geringeren Anzahl an adhärten Bakterien als bei den ZrbM-Schichten mit einer niedrigeren Oberflächenladung. Im Vergleich zu den beiden anorganischen Schichten zeigten suspendierte Phagen die geringste Oberflächenladung mit -29 ± 4 mV. Dies indiziert die geringste abstoßende Kraft zwischen Phagenschicht und Bakterien. Allerdings adhärten auf der Phagenschicht die wenigsten Bakterien. Bei der Phagenschicht korrelierten weder die Oberflächenladung, noch die Oberflächenrauigkeit und die Hydrophobizität mit der Bakterienadhäsion, während bei den anorganischen Materialoberflächen eine entsprechende Korrelation beobachtet wurde. Hieraus lässt sich schließen, dass weitere Oberflächeneigenschaften die geringe Bakterienadhäsion auf der Phagenschicht kontrollieren müssen. Auch die biochemische Zusammensetzung des N-terminalen Endes der Haupt-hüllproteine pVIII kann die Bakterienadhäsion beeinflussen. Das Haupthüllprotein besteht aus fünfzig Aminosäuren ¹AEGDDPAKAAFDSLQASATEYIGYAWAMVVVIVGATIGIKLFKKFT-SKAS⁵⁰ (s. 4.6).^[282] Der Hauptteil dieses Proteins bildet eine ununterbrochene α -Helix. Hydrophobe Wechselwirkungen benachbarter α -Helices halten das Phagenfilament zusammen. Die letzten fünf nach außen zeigenden N-terminalen Aminosäuren AEGDD sind nicht an der α -Helix beteiligt, sie sind flexibel.^[36] Bei der Adhäsion der Bakterien können neben unspezifischen Wechselwirkungen auch spezifische Wechselwirkungen zwischen Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche und bestimmten Liganden zur Adhäsion führen. Solche spezifi-

schen Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sind zum Beispiel von dem Protein Fibronectin bekannt. Ein Fibronectin-Rezeptor-Protein befindet sich dabei auf der Bakterienzelloberfläche. Es bindet spezifisch an bestimmte Bereiche des Fibronectinmoleküls – die Liganden. Fibronectin besteht aus zwei Polypeptidketten (Monomere), die am C-terminalen Ende über ein Paar aus Disulfidbindungen kovalent verbunden sind.^[283] Die einzelnen Monomere sind aus drei verschiedenen Wiederholungseinheiten aufgebaut, Typ I, II und III (Abbildung 65). Die einzelnen Wiederholungseinheiten bestehen aus circa 45-90 Aminosäuren.^[283]

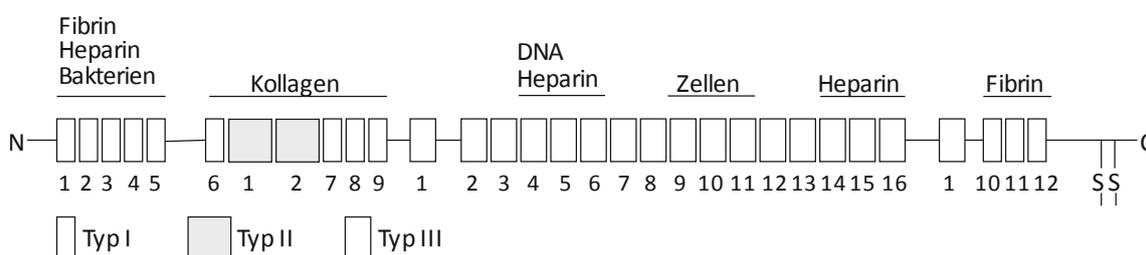


Abbildung 65: Struktur eines Fibronectinmonomers. Das Fibronectinmonomer ist aus den Wiederholungseinheiten des Typs I, II und III zusammengesetzt. Eingezeichnet sind die verschiedenen Bindungsregionen an unterschiedliche Bindungspartner. Über das Paar aus Disulfidbindungen am C-terminalen Ende sind zwei Fibronectinmonomere miteinander verbunden. (Nach Petersen^[284])

Die Fibronectinmonomere enthalten einzelne Bindungsdomänen für Fibrin, Kollagen, Heparin und für Zellen (s. Abbildung 65). Für die Bindung an Zellen ist die RGD Sequenz verantwortlich, die sich in der zehnten Wiederholungseinheit des Typs III (wird als Typ III₁₀ bezeichnet) befindet.^[283] RGD-Domänen wechselwirken mit Glykoproteinen auf der Zelloberfläche. Nur kleine Änderungen der funktionellen Gruppen in der Aminosäuresequenz verhindern bereits eine Bindung zwischen Fibronectin und den Zellen. Ein Austausch von Glycin (G) durch Alanin (A), der das Wasserstoffatom in Glycin durch eine Methylgruppe (Alanin) ersetzt, reicht für das Unterbinden der Zelladhäsion. Genauso führt ein Austausch der Asparaginsäure (D) durch Glutaminsäure (E) oder ein Austausch von Arginin (R) durch Lysin (K) zu einer Hinderung der Zelladhäsion.^[285] Auch in der Sequenz der letzten fünf N-terminalen Aminosäuren AEGDD des Haupthüllproteins pVIII von Phagen ist eine RGD-ähnliche Sequenz EGD zu finden. Das Vorliegen der Glutaminsäure (E) anstelle von Arginin (R) kann auch hier ein möglicher Grund für die geringe Bakterienadhäsion sein. Zudem kann auch bereits ein Unterschied in der Konformation zum Verhindern der Bakterienad-

häsion führen. Dies zeigten kleinere Fibronectin-Fragmente und synthetische Peptide, die die RGD-Sequenz enthielten. Bakterien adhärten nur an die Fragmente/Peptide mit der RGD-Sequenz sofern diese an einer Oberfläche immobilisiert vorlagen. Im gelösten Zustand fand keine Bakterienadhäsion statt.^[285]

Zwei weitere Domänen im Fibronectinmonomer, die spezifisch an *S. aureus* binden, sind die N-terminale Domäne und die interne Heparin Domäne (s. Abbildung 65). Diese Bindungsdomänen binden an einen Fibronectin-Rezeptor, genauer an eine Domäne, die aus 38 Aminosäuren besteht. Diese Domäne wiederholt sich dreimal und teilweise noch ein viertes Mal. Ihre Übereinstimmung in den Wiederholungen liegt zwischen 42 % und 87 %.^[286] Untersuchungen der *S. aureus* Adhäsion an einzelnen Fragmenten des Fibronectinmonomers ergaben, dass die Hauptwechselwirkung des Fibronectinmonomers mit *S. aureus* Zellen durch die Wiederholungseinheit Typ III₁₄ in der internen Heparin Domäne (Abbildung 65) stattfindet. Die Typ III₁₅ und Typ III₁₆ Wiederholungseinheiten wirken stabilisierend oder stärkend bei der Adhäsion der Bakterien.^[287] Die N-terminale Bindungsdomäne besteht aus den ersten fünf Typ I Wiederholungseinheiten (Abbildung 65). Bei dieser Bindungsdomäne wurde beobachtet, dass alle fünf einzelnen Wiederholungseinheiten des Typs I als eine Einheit für die Adhäsion der Bakterien verantwortlich sind. Schon das Verändern einer einzigen Wiederholungseinheit führt zur Verhinderung der Bakterienadhäsion. Zusätzlich zu diesen beiden Bindungsdomänen zeigte die DNA-Heparin Bindungsregion, die die Typ III Wiederholungseinheiten III₄, III₅ und III₆ umfasst (Abbildung 65), eine beschleunigte Wirkung auf die Bakterienadhäsion.^[287] Die anderen Fragmente des Fibronectinmonomers zeigten nur eine sehr geringe Bindung an *S. aureus*. Hieraus folgt, dass die Bindung des Fibronectinmonomers nur durch bestimmte Bindungsdomänen möglich ist.

Um mögliche Gründe für die geringe *S. aureus* Adhäsion an der M13-Bakteriophagenoberfläche zu finden, wird die N-terminale Aminosäuresequenz AEGDD des Haupthüllproteins pVIII der Phagen mit den Aminosäuresequenzen der einzelnen Bindungsdomänen im Fibronectinmonomer durch ein Sequenzalignment verglichen. Die N-terminale Aminosäuresequenz AEGDD des Hüllproteins pVIII zeigt zu keiner der drei oben beschriebenen Bindungsdomänen eine vollständige Übereinstimmung (Abbildung 66 - Abbildung 68).

TypIII14	AIPAPTDLKFTQVTPTSLSAQWTFPNVGLTGYRVRVTPKEKTGPMKEINLAPDSSSVVVS	60
N-terminal	-----	0
TypIII14	GLMVATKYEVSVYALKDTLTSRPAQGVTTLTLE	92
N-terminal	-----AEGDD-----	5
	:	

Abbildung 66: Sequenzalignment mit der Wiederholungseinheit Typ III₁₄ des Fibronectinmonomers (Mensch)^[284] und den letzten fünf N-terminalen Aminosäuren AEGDD des Haupthüllproteins pVIII von M13 Bakteriophagen.

TypI1-5	EAQQMVQPQSPVAVSQSKPGCYDNGKHYQINQQWERTYLGNVLVCTCYGGSRGFNCEKSP	60
N-terminal	-----	0
TypI1-5	EAEETCFDKYTGNTYRVGDTYERPKDSMIWDCTCIGAGRGRISCTIANRCEGGQSYKIG	120
N-terminal	-----	0
TypI1-5	DTWRRPHETGGYMLECVCLGNGKGEWTCKPIAEKCFDHAAGTSYVVGETWEKPYQGMMV	180
N-terminal	-----	0
TypI1-5	DCTCLGEGSGRITCTSRNRCNDQDTRTSYRIGDTWSKKDNRGNLLQICTGNGRGEWK CER	240
N-terminal	-----AEGDD-----	5
	. * * . .	
TypI1-5	HTSVQTTSSGSGPFTDVR	258
N-terminal	-----	5

Abbildung 67: Sequenzalignment mit den Wiederholungseinheiten Typ I₁₋₅ des Fibronectinmonomers (Mensch)^[284] und den letzten fünf N-terminalen Aminosäuren AEGDD des Haupthüllproteins pVIII von M13 Bakteriophagen.

TypIII4-6 N-terminal	TVPSPRDLQFVEVTDVKVTIMWTPPESAVTGYRVDVIPVNLPGHEHGQRLPISRNTFAEVT -----	60 0
TypIII4-6 N-terminal	GLSPGVTTYFKVFAVSHGRESKPLTAQQTTKLDAPTNLQFVNETDSTVLVRWTPPRAQIT -----	120 0
TypIII4-6 N-terminal	GYRLTVGLTRRGQPRQYNVGPSVSKYPLRNLQPASEYTVSLVAIKGNQESPKATGVFTTL -----	180 0
TypIII4-6 N-terminal	QPGSSIPPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTP -----	240 0
TypIII4-6 N-terminal	GVEYVYTIQVLRDQGQERDAPIVNKVVTP -----AEGDD----- : * : :	268 5

Abbildung 68: Sequenzalignment mit den Wiederholungseinheiten Typ III₄₋₆ des Fibronectinmonomers (Mensch)^[284] und den letzten fünf N-terminalen Aminosäuren AEGDD des Haupthüllproteins pVIII von M13 Bakteriophagen.

Die Untersuchungen am Fibronectinmonomer zeigten, dass für spezifische Wechselwirkungen sowohl eine bestimmte Aminosäuresequenz in kleinen (drei Aminosäuren) und größeren Bereichen (circa 260 Aminosäuren) als auch eine bestimmte Konformation der vorliegenden Makromolekülen gewährleistet sein muss. Bereits kleine Änderungen in der Aminosäuresequenz oder Änderungen der Konformation können die Bakterienadhäsion verhindern. Da bei den Phagenschichten weder die Oberflächenladung, noch die Oberflächenrauigkeit und die Hydrophobizität mit der Bakterienadhäsion korrelierten, wurde darauf geschlossen, dass weitere Oberflächeneigenschaften die geringe Bakterienadhäsion auf der Phagenschicht kontrollieren müssen. Dies kann die biochemische Zusammensetzung des N-terminalen Endes der Haupthüllproteine pVIII sein. Die Abwesenheit spezifischer Bindungsdomänen (Abbildung 66 - Abbildung 68) sowie eine bestimmte Konformation des Proteins reichen aus, um die Bakterienadhäsion zu verhindern.

Die Untersuchungen der Bakterienadhäsion auf einer Phagenschicht, einer SiO₂-Schicht und einer Schicht aus ZrbM zeigten, dass auf der Phagenschicht kaum Bakterien adhärrieren, auf den beiden anorganischen Schichten dagegen deutlich mehr. Die Bakterienadhäsion auf der SiO₂- und der ZrbM-Schicht kann durch die Oberflächenrauigkeit (nanoskalige Rauigkeit), die Hydrophobizität und die Oberflächenladung beeinflusst werden. Es wird

vermutet, dass die geringe Bakterienadhäsion auf der Phagenschicht auf die biochemische Zusammensetzung der Haupthüllproteine pVIII zurückzuführen ist. Vor allem auf die Abwesenheit spezifischer Bindungsdomänen (Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen). Bisher wurden nur lytische^[150,288-290] oder genetisch modifizierte Phagen^[291] als antibakterielles oder Antibiofilmmittel beschrieben. Lytische Phagen, die kovalent an die zu schützende Materialoberfläche gebunden sind, verhindern die Bildung von Biofilmen, indem Bakterien lysiert werden, bevor sie an der Materialoberfläche adhären können.^[289] Nicht-lytische M13-Bakteriophagen wurden bisher lediglich als Transportmittel von antibakteriellen Mitteln eingesetzt. Eine genetische Modifikation von M13-Bakteriophagen ermöglichte hierbei die Bereitstellung von Ag⁺-Ionen, die *E. coli*- und *S. epidermidis*-Bakterien töten.^[291] Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch nicht-lytische wt-Bakteriophagen als Antiadhäsionsmittel in Bezug auf die Adhäsion von *S. aureus* eingesetzt werden können. Dabei wird die Bakterienadhäsion nicht durch Lyse der Bakterien verhindert, sondern durch einen Antiadhäsionsmechanismus, welcher auf der biochemischen Zusammensetzung der Haupthüllproteine pVIII basiert.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Universität Stuttgart, "Eigenständigkeitserklärung"
- [2] S. Mann, *Nature* **1988**, 332, 119–124.
- [3] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chemie* **1992**, 104, 159–176.
- [4] E. Bäuerlein, *Handbook of Biomineralization*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2007**.
- [5] F. Nudelman, N. A. J. M. Sommerdijk, *Angew. Chemie* **2012**, 124, 6686–6700.
- [6] A. Navrotsky, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 12096–12101.
- [7] N. A. J. M. Sommerdijk, H. Cölfen, *MRS Bull.* **2010**, 35, 116–121.
- [8] S. Mann, *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press On Demand, **2001**.
- [9] B. C. Bunker, P. C. Rieke, B. J. Tarasevich, A. A. Campbell, G. E. Fryxell, G. L. Graff, L. Song, J. Liu, J. W. Virden, G. L. Mcvay, *Science* **1994**, 264, 48–55.
- [10] J. R. Fitzgerald, *Infect. Dis. Clin. North Am.* **1989**, 3, 329–338.
- [11] S. Mann, J. M. Webb, R. J. P. Williams, *Biomineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*, John Wiley & Sons, **1989**.
- [12] M. Sarikaya, *Microsc. Res. Tech.* **1994**, 27, 360–375.
- [13] G. Mayer, *Science* **2005**, 310, 1144–1147.
- [14] F. Nudelman, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2015**, 46, 2–10.
- [15] X. Q. Cao, R. Vassen, D. Stoeber, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2004**, 24, 1–10.
- [16] H. Li, K. Liang, L. Mei, S. Gu, S. Wang, *J. Mater. Sci. Lett.* **2001**, 20, 1081–1083.
- [17] I. M. Thomas, *Proc. SPIE, Sol-Gel Opt. III* **1994**, 2288, 50–55.
- [18] C. M. Perkins, B. B. Triplett, P. C. McIntyre, K. C. Saraswat, S. Haukka, M. Tuominen, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 78, 2357–2359.
- [19] F. Shimojo, T. Okabe, F. Tachibana, M. Kobayashi, H. Okazaki, *J. Phys. Soc. Japan* **1992**, 61, 2848–2857.
- [20] G. Cao, H. W. Brinkman, J. Meijerink, K. J. de Vries, A. J. Burggraaf, *J. Am. Ceram. Soc.* **1993**, 76, 2201–2208.
- [21] A. D. Brailsford, M. Yussouff, E. M. Logothetis, *Sensors Actuators B Chem.* **1997**, 44, 321–326.
- [22] A. Bastianini, G. Battiston, R. Gerbasi, M. Porchia, S. Daolio, *J. Phys. IV Colloq.* **1995**, 05, C5-525-C5-531.
- [23] I. Zlotnikov, I. Gotman, E. Y. Gutmanas, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, 255, 3447–3453.
- [24] Y. Gao, Y. Masuda, T. Yonezawa, K. Koumoto, *J. Ceram. Soc. Japan* **2002**, 110, 379–385.

- [25] H. Cölfen, H. Schnablegger, A. Fischer, F. C. Jentoft, G. Weinberg, R. Schlögl, *Langmuir* **2002**, *18*, 3500–3509.
- [26] M. Agarwal, M. R. De Guire, H. A. H., *J. Am. Ceram. Soc.* **1997**, *80*, 2967–2981.
- [27] M. N. Tahir, P. Théato, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, A. Borejko, S. Faiß, A. Janshoff, J. Huth, W. Tremel, *Chem. Commun.* **2005**, 5533–5535.
- [28] Y. Jiang, D. Yang, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Zhang, J. Li, Z. Jiang, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**, *47*, 1876–1882.
- [29] H. Ji, X. Liu, X. Wang, X. Wu, X. Yang, L. Lu, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *346*, 1–4.
- [30] B. D. Briggs, M. R. Knecht, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 405–418.
- [31] D. Rothenstein, D. Shopova-Gospodinova, G. Bakradze, L. P. H. Jeurgens, J. Bill, *CrystEngComm* **2015**, *17*, 1783–1790.
- [32] F. Heinemann, M. Launspach, K. Gries, M. Fritz, *Biophys. Chem.* **2011**, *153*, 126–153.
- [33] C. F. Barbas, D. R. Burton, J. K. Scott, G. J. Silverman, *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **2001**.
- [34] K. Hashimoto, M. Yoshinari, K. Matsuzaka, K. Shiba, T. Inoue, *Dent. Mater. J.* **2011**, *30*, 935–940.
- [35] J. Greenwood, A. E. Willis, R. N. Perham, *J. Mol. Biol.* **1991**, *220*, 821–827.
- [36] G. Iannolo, O. Minenkova, R. Petruzzelli, G. Cesareni, *J. Mol. Biol.* **1995**, *248*, 835–844.
- [37] J. Greenwood, G. J. Hunter, R. N. Perham, *J. Mol. Biol.* **1991**, *217*, 223–227.
- [38] M. R. De Guire, L. P. Bauermann, H. Parikh, J. Bill, in *Chem. Solut. Depos. Funct. Oxide Thin Film*. (Eds.: T. Schneller, R. Waser, M. Kosec, D. Payne), Wien, **2013**, pp. 319–339.
- [39] S. D. Branston, E. C. Stanley, J. M. Ward, E. Keshavarz-Moore, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18*, 560–566.
- [40] E. Jończyk, M. Kłak, R. Międzybrodzki, A. Górski, *Folia Microbiol. (Praha)*. **2011**, *56*, 191–200.
- [41] B. T. Tey, S. T. Ooi, K. C. Yong, M. Yeen, T. Ng, T. C. Ling, W. Siang Tan, *African J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 268–273.
- [42] M. Z.-C. Hu, E. A. Payzant, C. H. Byers, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, *222*, 20–36.
- [43] Y. T. Moon, H. K. Park, D. K. Kim, C. H. Kim, *J. Am. Ceram. Soc.* **1995**, *78*, 2690–94.
- [44] A. Singhal, L. M. Toth, J. S. Lin, K. Affholter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11529–11534.
- [45] K. Matsui, M. Ohgai, *J. Am. Ceram. Soc.* **2000**, *83*, 1386–92.
- [46] M. Z.-C. Hu, R. D. Hunt, E. A. Payzant, C. R. Hubbard, *J. Am. Ceram. Soc.* **1999**, *82*, 2313–2320.
- [47] W. Li, L. Gao, J. K. Guo, *Nanostructured Mater.* **1998**, *10*, 1043–1049.
- [48] W. Li, L. Gao, *Ceram. Int.* **2001**, *27*, 543–546.
- [49] L. Addadi, J. Moradian, E. Shay, N. G. Maroudas, S. Weiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

- 1987**, 84, 2732–2736.
- [50] B. Kralik, E. K. Chang, S. G. Louie, *Phys. Rev. B* **1998**, 57, 7027.
- [51] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, Walter De Gruyter GmbH & Co.KG, Berlin, New York, **2007**.
- [52] H. Salmang, H. Scholze, *Keramik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [53] E. H. Kisi, C. J. Howard, *Key Eng. Mater.* **1998**, 153–154, 1–36.
- [54] J. J. Yu, J.-Y. Zhang, I. W. Boyd, *Appl. Surf. Sci.* **2002**, 186, 190–194.
- [55] D. Ganguli, D. Kundu, *J. Mater. Sci. Lett.* **1984**, 3, 503–504.
- [56] J. P. Chang, Y.-S. Lin, *J. Appl. Phys.* **2001**, 90, 2964–2969.
- [57] Y. Miyahara, *J. Appl. Phys.* **1992**, 71, 2309–2314.
- [58] S. Ramanathan, G. D. Wilk, D. A. Muller, C. M. Park, P. C. McIntyre, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, 79, 2621–2623.
- [59] R. H. Müller, *Zetapotential Und Partikelladung in Der Laborpraxis*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft MbH Stuttgart, **1996**.
- [60] D. J. Shaw, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford [u.A.], **1992**.
- [61] R. J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- [62] J.-P. Jolivet, M. Henry, J. Livage, E. Bescher, *Metal Oxide Chemistry and Synthesis - From Solution to Solid State*, John Wiley & Sons Ltd, New York, **2000**.
- [63] N. Kallay, E. Barouch, E. Matijevic, *Adv. Colloid Interface* **1987**, 27, 1–42.
- [64] L. Bergström, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1997**, 70, 125–169.
- [65] J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press Limited, London, **1992**.
- [66] R. H. French, R. M. Cannon, L. K. DeNoyer, Y. M. Chiang, *Solid State Ionics* **1995**, 75, 13–33.
- [67] Q. Zhang, J. Shen, J. Wang, G. Wu, L. Chen, *Int. J. Inorg. Mater.* **2000**, 2, 319–323.
- [68] J. Scott, Troy A., *J. Phys. Chem.* **1946**, 50, 406–412.
- [69] R. Belda, J. V. Herraiez, O. Diez, *Phys. Chem. Liq.* **2005**, 43, 91–101.
- [70] H. Shin, M. Agarwal, M. R. De Guire, A. H. Heuer, *Acta Mater.* **1998**, 46, 801.
- [71] P. Raveendran, A. Amirtharajah, *J. Environ. Eng.* **1995**, 121, 860–868.
- [72] D. L. Feke, N. D. Prabhu, J. A. J. Mann, J. A. Mann, *J. Phys. Chem.* **1984**, 88, 5735–5739.
- [73] E. Ruckenstein, D. C. Prieve, *AIChE J.* **1976**, 22, 267–283.
- [74] D. D. Fitts, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **1966**, 17, 59–82.
- [75] R. Oliveira, *Exp. Therm. Fluid Sci.* **1997**, 14, 316–322.
- [76] Y. Gao, K. Koumoto, *Growth (Lakeland)* **2005**, 5, 1983–2017.
- [77] J. S. Evans, *CrystEngComm* **2013**, 15, 8388–8394.

- [78] E. Degtyar, M. J. Harrington, Y. Politi, P. Fratzl, *Angew. Chemie* **2014**, *126*, 12220–12240.
- [79] M. Epple, “Die Wichtigsten Biomineralien” in “Biomaterialien Und Biomineralisation: Eine Einführung Für Naturwissenschaftler, Mediziner Und Ingenieure,” Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [80] S. Weiner, P. M. Dove, *Rev. Mineral. Geochemistry* **2003**, *54*, 1–29.
- [81] S. Mann, *Chemie unserer Zeit* **1986**, *20*, 69–76.
- [82] E. Beniash, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **1999**, *125*, 50–62.
- [83] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press On Demand, **1989**.
- [84] F. Nudelman, B. A. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner, *J. Struct. Biol.* **2006**, *153*, 176–187.
- [85] P. Fratzl, H. S. Gupta, F. D. Fischer, O. Kolednik, *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 2657–2661.
- [86] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, Y. Seki, *Prog. Mater. Sci.* **2008**, *53*, 1–206.
- [87] Z. Burghard, L. Zini, V. Srot, P. Bellina, P. A. van Aken, J. Bill, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 4103–4108.
- [88] A. Y.-M. Lin, M. A. Meyers, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2009**, *2*, 607–612.
- [89] K. P. Jochum, X. Wang, T. W. Vennemann, B. Sinha, W. E. G. Müller, *Chem. Geol.* **2012**, *300–301*, 143–151.
- [90] X. Wang, L. Gan, K. P. Jochum, H. C. Schröder, W. E. G. Müller, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* **2011**, *2011*, 1–14.
- [91] X. Wang, H. C. Schröder, W. E. G. Müller, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **2009**, *273*, 69–115.
- [92] W. E. G. Müller, X. Wang, K. Kropf, H. Ushijima, W. Geurtsen, C. Eckert, M. N. Tahir, W. Tremel, A. Boreiko, U. Schloßmacher, J. Li, H. C. Schröder, *J. Struct. Biol.* **2008**, *161*, 188–203.
- [93] X. Wang, H. C. Schröder, M. Wiens, U. Schloßmacher, W. E. G. Müller, *Adv. Mar. Biol.* **2012**, *62*, 231–271.
- [94] W. E. G. Müller, X. Wang, F.-Z. Cui, K. P. Jochum, W. Tremel, J. Bill, H. C. Schröder, F. Natalio, U. Schloßmacher, M. Wiens, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *83*, 397–413.
- [95] A. Clearfield, P. A. Vaughan, *Acta Crystallogr.* **1956**, *9*, 555–558.
- [96] K. Matsui, M. Ohgai, *J. Am. Ceram. Soc.* **2001**, *84*, 2303–2312.
- [97] N. Rao, M. N. Holerca, M. L. Klein, V. Pophristic, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 11395–11399.
- [98] M. Z.-C. Hu, M. T. Harris, C. H. Byers, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *198*, 87–99.
- [99] M. Z.-C. Hu, J. T. Zielke, J.-S. Lin, C. H. Byers, *J. Mater. Res.* **1999**, *14*, 103–113.
- [100] L. M. Toth, J. S. Lin, L. K. Felker, *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 3106–3108.
- [101] J. Livage, *Catal. Today* **1998**, *41*, 3–19.
- [102] B. A. J. Lister, L. A. McDonald, *J. Chem. Soc.* **1952**, 4315–4330.

- [103] D. H. Devia, A. G. Sykes, *Inorg. Chem.* **1981**, *20*, 910–913.
- [104] E. Dujardin, S. Mann, *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 1–14.
- [105] A. Merzlyak, S.-W. Lee, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 246–252.
- [106] H. Yan, S. H. Park, G. Finkelstein, J. H. Reif, T. H. LaBean, *Science* **2003**, *301*, 1882–1884.
- [107] C. Mao, D. J. Solis, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y. Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Iverson, A. M. Belcher, *Science* **2004**, *303*, 213–217.
- [108] S.-W. Lee, C. Mao, C. E. Flynn, A. M. Belcher, *Science* **2002**, *296*, 892–895.
- [109] C. K. Jeong, I. Kim, K.-I. Park, M. H. Oh, H. Paik, G.-T. Hwang, K. No, Y. S. Nam, K. J. Lee, *ACS Nano* **2013**, *7*, 11016–11025.
- [110] Y. J. Lee, H. Yi, W.-J. Kim, K. Kang, D. S. Yun, M. S. Strano, G. Ceder, A. M. Belcher, *Science* **2009**, *324*, 1051–1055.
- [111] T.-X. Fan, S.-K. Chow, D. Zhang, *Prog. Mater. Sci.* **2009**, *54*, 542–659.
- [112] S. Kilper, S. J. Facey, Z. Burghard, B. Hauer, D. Rothenstein, J. Bill, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *1705842*, 1–8.
- [113] C. Tamerler, M. Sarikaya, *Acta Biomater.* **2007**, *3*, 289–299.
- [114] M. Russel, H. B. Lowman, T. Clackson, “Introduction to Phage Biology and Phage Display” in “Phage Display,” Oxford University Press Inc, New York, **2004**.
- [115] A. Nordheim, R. Knippers, *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, **2015**.
- [116] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2007**.
- [117] J. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1972**.
- [118] M. Russel, H. Whirlow, T.-P. Sun, R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 5312–5316.
- [119] E. M. Click, R. E. Webster, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 1723–1728.
- [120] L. M. Shen, J.-I. Lee, S. Cheng, H. Jutte, A. Kuhn, R. E. Dalbey, *Biochemistry* **1991**, *30*, 11775–11781.
- [121] P. Malik, T. D. Terry, R. N. Perham, in *Phage Disp. Pept. Proteins*, Academic Press, **1996**, pp. 127–139.
- [122] D. Qi, K.-B. G. Scholthof, *J. Virol. Methods* **2008**, *149*, 85–90.
- [123] K. B. Mullis, *Sci. Am.* **1990**, *262*, 56–65.
- [124] K.-H. Klempnauer, L. Fischer, M. K. Otto, “Einführung in Die Biochemie” in “Bioprozesstechnik,” Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.
- [125] H. A. Erlich, *J. Clin. Immunol.* **1989**, *9*, 437–447.
- [126] G. P. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315–1317.
- [127] L. G. Presta, *J. Allergy Clin. Immunol.* **2005**, *116*, 731–736.
- [128] B. P. Mullaney, M. G. Pallavicini, *Exp. Hematol.* **2001**, *29*, 1136–1146.

- [129] C.-Y. Chiu, Y. Li, L. Ruan, X. Ye, C. B. Murray, Y. Huang, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 393–399.
- [130] H. Heinz, B. L. Farmer, R. B. Pandey, J. M. Slocik, S. S. Patnaik, R. Pachter, R. R. Naik, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9704–9714.
- [131] R. R. Naik, S. J. Stringer, G. Agarwal, S. E. Jones, M. O. Stone, *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 169–172.
- [132] D. Rothenstein, B. Claasen, B. Omiecienski, P. Lammel, J. Bill, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12547–12556.
- [133] M. Umetsu, M. Mizuta, K. Tsumoto, S. Ohara, S. Takami, H. Watanabe, I. Kumagai, T. Adschiri, *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2571–2575.
- [134] R. R. Naik, L. L. Brott, S. J. Clarson, M. O. Stone, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2002**, *2*, 95–100.
- [135] M. B. Dickerson, S. E. Jones, Y. Cai, G. Ahmad, R. R. Naik, N. Kröger, K. H. Sandhage, *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1578–1584.
- [136] M. Ploss, S. J. Facey, C. Bruhn, L. Zemel, K. Hofmann, R. W. Stark, B. Albert, B. Hauer, *BMC Biotechnol.* **2014**, *14*, 1–11.
- [137] M. D. Roy, S. K. Stanley, E. J. Amis, M. L. Becker, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1830–1836.
- [138] D. J. H. Gaskin, K. Starck, E. N. Vulfson, *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1211–1216.
- [139] G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391–410.
- [140] J. Pande, M. M. Szewczyk, A. K. Grover, *Biotechnol. Adv.* **2010**, *28*, 849–858.
- [141] A. Picker, L. Nicoleau, A. Nonat, C. Labbez, H. Cölfen, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 1135–1140.
- [142] M. L. Lemloh, K. Altintoprak, C. Wege, I. M. Weiss, D. Rothenstein, *Materials (Basel)*. **2017**, *10*, 119.
- [143] K. T. Nam, D.-W. Kim, P. J. Yoo, C.-Y. Chiang, N. Meethong, P. T. Hammond, Y.-M. Chiang, A. M. Belcher, *Science* **2006**, *312*, 885–888.
- [144] W.-J. Chung, J.-W. Oh, K. Kwak, B. Y. Lee, J. Meyer, E. Wang, A. Hexemer, S.-W. Lee, *Nature* **2011**, *478*, 364–368.
- [145] D. M. Kuncicky, R. R. Naik, O. D. Velez, *Small* **2006**, *2*, 1462–1466.
- [146] S. P. Wargacki, B. Pate, R. A. Vaia, *Langmuir* **2008**, *24*, 5439–5444.
- [147] S. Eiben, N. Stitz, F. Eber, J. Wagner, P. Atanasova, J. Bill, C. Wege, H. Jeske, *Virus Res.* **2014**, *180*, 92–96.
- [148] Z. Lin, *Evaporative Self-Assembly of Ordered Complex Structures*, World Scientific, **2012**.
- [149] J. Rong, L. A. Lee, K. Li, B. Harp, C. M. Mello, Z. Niu, Q. Wang, *Chem. Commun.* **2008**, 5185–5187.
- [150] J. Azeredo, I. W. Sutherland, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2008**, *9*, 261–266.
- [151] C. Desrousseaux, V. Sautou, S. Descamps, O. Traoré, *J. Hosp. Infect.* **2013**, *85*, 87–93.
- [152] F. Götz, *Mol. Microbiol.* **2002**, *43*, 1367–1378.

- [153] T. Zmantar, F. Bettaieb, K. Chaieb, B. Ezzili, L. Mora-Ponsonnet, A. Othmane, N. Jaffr ezic, A. Bakhrouf, *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 887–896.
- [154] H. C. Flemming, J. Wingender, *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633.
- [155] E. Preedy, S. Perni, D. Nipic, K. Bohinc, P. Prokopovich, *Langmuir* **2014**, *30*, 9466–9476.
- [156] A. L. Hook, C.-Y. Chang, J. Yang, J. Luckett, A. Cockayne, S. Atkinson, Y. Mei, R. Bayston, D. J. Irvine, R. Langer, D. G. Anderson, P. Williams, M.C. Davies, M. R. Alexander, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 868–875.
- [157] Y. H. An, R. J. Friedman, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **1998**, *43*, 338–348.
- [158] M. Katsikogianni, Y. F. Missirlis, *Eur. Cells Mater.* **2004**, *8*, 37–57.
- [159] J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg, *Science* **1999**, *284*, 1318–1322.
- [160] *A Basic Guide to Particle Characterization*, Malvern Instruments Worldwide, **2012**.
- [161] ISO13321, *Methods for Determination of Particle Size Distribution Part 8: Photon Correlation Spectroscopy*, International Organisation For Standardization, **1996**.
- [162] *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*, Malvern Instruments
- [163] R. Shaw, *Dynamic Light Scattering Training: Achieving Reliable Nano Particle Sizing*, Malvern, **2014**.
- [164] R. Borsali, R. Pecora, Eds. , *Soft-Matter Characterization*, Springer, New York, **2008**.
- [165] V. A. Fassel, R. N. Kniseley, *Anal. Chem.* **1974**, *46*, 1155A–1164A.
- [166] C. B. Boss, K. J. Fredeen, *Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin Elmer, **1997**.
- [167] H. Czichos, T. Saito, L. Smith, Eds. , *Springer Handbook of Materials Measurement Methods*, Springer, **2006**.
- [168] G. Kaupp, *Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching: Application to Rough and Natural Surfaces*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2006**.
- [169] A. R. West, *Grundlagen Der Festk rperchemie*, VHC Verlagsgesellschaft MbH, Weinheim, **1992**.
- [170] J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bomben, *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*, Physical Electronics, Inc., Eden Prairie, **1995**.
- [171] S. Hofmann, *Auger- and X-Ray Photoelectron Spectroscopy in Materials Science*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [172] *DIN 51 005 Thermische Analyse (TA), Begriffe*, Beuth Verlag, Berlin, **1983**.
- [173] W. F. Hemminger, H. K. Cammenga, *Methoden Der Thermischen Analyse*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **1989**.
- [174] O.-A. Neum ller, *R mpps Chemie-Lexikon*, Franckh’sche Verlagshandlung, Stuttgart, **1983**.

- [175] C.-M. Eulitz, S. Scheuermann, H.-J. Thier, *Brockhaus ABC Chemie*, F. A. Brockhaus, Leipzig, **1965**.
- [176] *Zetasizer Nano Series - User Manual*, Malvern Instruments Limited, **2013**.
- [177] W. H. Bragg, W. L. Bragg, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1913**, *88*, 428–438.
- [178] E. J. Mittemeijer, *Fundamentals of Materials Science; The Microstructure - Property Relationship Using Metals as Model Systems*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2010**.
- [179] T. Young, *Philos. Trans. R. Soc. London* **1805**, *95*, 65–87.
- [180] G. Gottstein, *Physikalische Grundlagen Der Materialkunde*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, **2007**.
- [181] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science+Business Media, New York, **2006**.
- [182] J. W. Lichtman, J.-A. Conchello, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 910–919.
- [183] S. Schuster, W. Yu, M. Nega, Y.-Y. Chu, S. Zorn, F. Zhang, F. Götz, F. Schreiber, *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 949–957.
- [184] M. Mauthe, W. Yu, O. Krut, M. Krönke, F. Götz, H. Robenek, T. Proikas-Cezanne, *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*, 1–13.
- [185] M. Murugesan, G. Abbineni, S. L. Nimmo, B. Cao, C. Mao, *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1820.
- [186] X. Li, Y. Wu, L. Zhang, Y. Cao, Y. Li, J. Li, L. Zhu, G. Wu, *Anal. Biochem.* **2014**, *451*, 18–24.
- [187] L. A. Day, R. L. Wiseman, "A Comparison of DNA Packaging in the Virions of Fd, Xf, and Pf1" in "The Single-Stranded DNA Phages," **1978**.
- [188] T. Rabung, D. Schild, H. Geckeis, R. Klenze, T. Fanghänel, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 17160–17165.
- [189] S. Neuhaus, C. Padeste, N. D. Spencer, *Plasma Process. Polym.* **2011**, *8*, 512–522.
- [190] L. Hao, X. Diao, H. Xu, B. Gu, T. Wang, *Appl. Surf. Sci.* **2008**, *254*, 3504–3508.
- [191] W. H. Roos, "How to Perform a Nanoindentation Experiment on a Virus" in "Single Molecule Analysis: Methods and Protocols," Humana Press, **2011**.
- [192] T. Wu, K. Efimenko, J. Genzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9394–9395.
- [193] J. Ma, J. Liu, Y. Mo, M. Bai, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *301*, 481–489.
- [194] J. Choi, T. Kato, *J. Appl. Phys.* **2003**, *93*, 8722–8724.
- [195] P. Atanasova, N. Stitz, S. Sanctis, J. H. M. Maurer, R. C. Hoffmann, S. Eiben, H. Jeske, J. J. Schneider, J. Bill, *Langmuir* **2015**, *31*, 3897–3903.
- [196] *Zetasizer 1000/3000: Size Measurements - Manual*, Malvern Instruments Ltd., **1997**.
- [197] F. Fairbrother, H. Mastin, *J. Chem. Soc. Trans.* **1924**, *125*, 2319–2330.
- [198] M. Smoluchowski, *Anzeiger Der Akademie Der Wissenschaften in Krakau, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse*, **1903**.

- [199] D. Drescher, G. Orts-Gil, G. Laube, K. Natte, R. W. Veh, W. Österle, J. Kneipp, *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1367–1373.
- [200] H.-I. Chen, H.-Y. Chang, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2004**, *242*, 61–69.
- [201] P. W. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2006**.
- [202] G. Oskam, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2006**, *37*, 161–164.
- [203] J. W. Mullin, *Crystallization*, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, **1993**.
- [204] J. Schmelzer, *Nucleation Theory and Applications*, Dubna:JINR, **1999**.
- [205] M. P. Anisimov, *Russ. Chem. Rev.* **2003**, *72*, 591–628.
- [206] M. I. Vesselinov, *Crystal Growth For Beginners: Fundamentals of Nucleation, Crystal Growth and Epitaxy*, World Scientific, New Jersey, **2017**.
- [207] J. Baier, R. Strumberger, F. Berger, P. Atanasova, U. Welzel, J. Bill, *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2012**, *2*, 339–349.
- [208] E. N. da C. Andrade, *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1934**, *17*, 497–511.
- [209] A. T. Dinsdale, P. N. Quested, *J. Mater. Sci.* **2004**, *39*, 7221–7228.
- [210] W. Weber, *Rheol. Acta* **1975**, *14*, 1012–1025.
- [211] G. Akerlöf, *J. Am. Chem. Soc.* **1932**, *54*, 4125–4139.
- [212] J. P. Chang, Y. Lin, *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 3666–3668.
- [213] J. V. Herráez, R. Belda, *J. Solution Chem.* **2006**, *35*, 1315–1328.
- [214] R. C. Weast, *Handbook of Chemistry and Physics*, The Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio, **1985**.
- [215] S. Hannane, F. Bertin, J. Bouix, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1990**, *1*, 43–49.
- [216] K. P. Biju, M. K. Jain, *Sensors Actuators B* **2008**, *128*, 407–413.
- [217] G. Pang, S. Chen, Y. Zhu, O. Palchik, Y. Kolytyn, A. Zaban, A. Gedanken, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4647–4652.
- [218] M. S. Kaliszewski, A. H. Heuer, *J. Am. Ceram. Soc.* **1990**, *73*, 1504–1509.
- [219] M. E. Winfield, *Catalysis* **1960**, *7*, 93–182.
- [220] M. Biswas, S. Bandyopadhyay, *Mater. Res. Bull.* **2013**, *48*, 2409–2413.
- [221] P. Schacht, L. Díaz-García, J. Aguilar, S. Ramírez, P. Pérez-Romo, M. Espinosa, *Adv. Chem. Eng. Sci.* **2014**, *4*, 250–257.
- [222] P. D. L. Mercera, J. G. Van Ommen, E. B. M. Doesburg, A. J. Burggraaf, J. R. H. Ross, *J. Mater. Sci.* **1992**, *27*, 4890–4898.
- [223] F. Zane, S. Melada, M. Signoretto, F. Pinna, *Appl. Catal. A Gen.* **2006**, *299*, 137–144.
- [224] V. G. Deshmane, Y. G. Adewuyi, *Appl. Catal. A Gen.* **2013**, *462–463*, 196–206.
- [225] V. F. Petrunin, V. V. Popov, Z. Hongzhi, A. A. Timofeev, *Inorg. Mater.* **2004**, *40*, 251–258.

- [226] V. F. Petrunin, V. V Popov, Z. Hongzhi, S. A. Korovin, *Glas. Phys. Chem.* **2005**, *31*, 459–464.
- [227] Y. M. Wang, Y. S. Li, P. C. Wong, K. A. R. Mitchell, *Appl. Surf. Sci.* **1993**, *72*, 237–244.
- [228] K. Kuratani, *J. Am. Ceram. Soc.* **2005**, *88*, 2923–2927.
- [229] R. Brenier, J. Mugnier, E. Mirica, *Appl. Surf. Sci.* **1999**, 85–91.
- [230] C. Morant, J. M. Sanz, L. Galán, L. Soriano, F. Rueda, *Surf. Sci.* **1989**, *218*, 331–345.
- [231] Y. Gao, Y. Masuda, H. Ohta, K. Koumoto, *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2615–2622.
- [232] S. Ardizzzone, M. G. Cattania, P. Lugo, *Electrochim. Acta* **1994**, *39*, 1509–1517.
- [233] Y. S. Tang, N. K. Huang, *Solid State Commun.* **1991**, *77*, 341–343.
- [234] G. Tan, L. Zhang, C. Ning, X. Liu, J. Liao, *Thin Solid Films* **2011**, *519*, 4997–5001.
- [235] C. J. Weststrate, W. Ludwig, J. W. Bakker, A. C. Gluhoi, B. E. Nieuwenhuys, *ChemPhysChem* **2007**, *8*, 932–937.
- [236] A. S. Maria Chong, X. S. Zhao, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 12650–12657.
- [237] B. Bondars, G. Heidemane, J. Grabis, K. Laschke, H. Boysen, J. Schneider, F. Frey, *J. Mater. Sci.* **1995**, *30*, 1621–1625.
- [238] D. K. Smith, W. Newkirk, *Acta Crystallogr.* **1965**, *18*, 983–991.
- [239] R. C. Garvie, *J. Phys. Chem.* **1978**, *82*, 218–224.
- [240] Y. Murase, E. Kato, *J. Am. Ceram. Soc.* **1983**, *66*, 196–200.
- [241] R. Srinivasan, B. H. Davis, O. B. Cavin, C. R. Hubbard, *J. Am. Ceram. Soc.* **1992**, *75*, 1217–1222.
- [242] E. Tani, M. Yoshimura, S. Somiya, *J. Am. Ceram. Soc.* **1983**, *66*, 13–14.
- [243] A. D. Randolph, M. A. Larson, *Theory of Particulate Processes: Analysis and Techniques of Continuous Crystallization*, Academic Press, **1988**.
- [244] J. Worlitschek, M. Mazzotti, *Cryst. Growth Des.* **2004**, *4*, 891–903.
- [245] M. J. Hounslow, R. L. Ryall, V. R. Marshall, *AIChEJ.* **1988**, *34*, 1821–1832.
- [246] P. Roy, M. Vashishtha, R. Khanna, D. Subbarao, *Particuology* **2009**, *7*, 445–450.
- [247] J. Sambrook, E. F. Fritsch, M. Tom, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1989**.
- [248] S. E. Ruzin, *Plant Microtechnique and Microscopy*, Oxford University Press, **1999**.
- [249] W. R. Taylor, *J. Theor. Biol.* **1986**, *119*, 205–218.
- [250] B. K. Kay, N. B. Adey, Y.-S. Heb, J. P. Manfredi, A. H. Mataragnon, D. M. Fowlkes, *Gene* **1993**, *128*, 59–65.
- [251] E. A. Peters, P. J. Schatz, S. S. Johnson, W. J. Dower, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 4296–4305.
- [252] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Freeman, W H, New York, **2007**.
- [253] S.-M. Liao, Q.-S. Du, J.-Z. Meng, Z.-W. Pang, R.-B. Huang, *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 1–12.
- [254] M. A. Gebbie, W. Wei, A. M. Schrader, T. R. Cristiani, H. A. Dobbs, M. Idso, B. F.

- Chmelka, J. H. Waite, J. N. Israelachvili, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 473–479.
- [255] A. S. Mahadevi, G. N. Sastry, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2100–2138.
- [256] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.
- [257] T. Micksch, N. Liebelt, D. Scharnweber, B. Schwenzer, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 7408–7416.
- [258] N. Kantarci, C. Tamerler, M. Sarikaya, T. Haliloglu, P. Doruker, *Polymer (Guildf.)* **2005**, *46*, 4307–4313.
- [259] J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* **1982**, *157*, 105–132.
- [260] V. Puddu, C. C. Perry, *ACS Nano* **2012**, *6*, 6356–6363.
- [261] S. V. Patwardhan, G. Patwardhan, C. C. Perry, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2875.
- [262] M.-K. Liang, O. Deschaume, S. V. Patwardhan, C. C. Perry, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 80–89.
- [263] M. Gungormus, H. Fong, I. W. Kim, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 966–973.
- [264] N. Steinsultz, P. Sharma, in *NSTI-Nanotech*, **2011**, pp. 123–126.
- [265] M. Knez, M. P. Sumser, A. M. Bittner, C. Wege, H. Jeske, D. M. P. Hoffmann, K. Kuhnke, K. Kern, *Langmuir* **2004**, *20*, 441–447.
- [266] B. Lee, C. T. Lo, P. Thiyagarajan, R. E. Winans, X. Li, Z. Niu, Q. Wang, *Langmuir* **2007**, *23*, 11157–11163.
- [267] N. Stitz, S. Eiben, P. Atanasova, N. Domingo, A. Leineweber, Z. Burghard, J. Bill, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–7.
- [268] F. Corzana, J. H. Busto, G. Jiménez-Osés, M. G. De Luis, J. L. Asensio, J. Jiménez-Barbero, J. M. Peregrina, A. Avenoza, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 9458–9467.
- [269] K.-L. Lin, H.-C. Wang, *J. Mater. Sci. Lett.* **1989**, *8*, 49–51.
- [270] M. Pavlin, V. B. Bregar, *Dig. J. Nanomater. Biostructures* **2012**, *7*, 1389–1400.
- [271] B. Li, B. E. Logan, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2004**, *36*, 81–90.
- [272] G. Cheng, Z. Zhang, S. Chen, J. D. Bryers, S. Jiang, *Biomaterials* **2007**, *28*, 4192–4199.
- [273] Y. Sakagami, H. Yokoyama, H. Nishimura, Y. Ose, T. Tashima, *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2036–2040.
- [274] R. N. Wenzel, *Ind. Eng. Chem.* **1936**, *28*, 988–994.
- [275] V. K. Truong, S. Rundell, R. Lapovok, Y. Estrin, J. Y. Wang, C. C. Berndt, D. G. Barnes, C. J. Fluke, R. J. Crawford, E. P. Ivanova, *Appl. Microb. Cell Physiol.* **2009**, *83*, 925–937.
- [276] B. Gottenbos, D. W. Grijpma, H. C. van der Mei, J. Feijen, H. J. Busscher, *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *48*, 7–13.
- [277] J. Lützenkirchen, R. Zimmermann, T. Preocanin, A. Filby, T. Kupcik, D. Küttner, A. Abdelmonem, D. Schild, T. Rabung, M. Plaschke, F. Brandenstein, C. Werner, H. Geckeis, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *157*, 61–74.
- [278] S. Roessler, R. Zimmermann, D. Scharnweber, C. Werner, H. Worch, *Colloids Surfaces*

- B Biointerfaces* **2002**, *26*, 387–395.
- [279] P. Leroy, N. Devau, A. Revil, M. Bizi, *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *410*, 81–93.
- [280] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, R. G. Richards, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4135–4148.
- [281] M. Geoghegan, J. S. Andrews, C. A. Biggs, K. E. Eboigbodin, D. R. Elliott, S. Rolfe, J. Scholes, J. J. Ojeda, M. E. Romero-González, R. G. J. Edyvean, L. Swanson, R. Rutkaite, R. Fernando, Y. Pen, Z. Zhang, S. A. Banwart, *Faraday Discuss.* **2008**, *139*, 85.
- [282] S. A. Overman, G. J. J. Thomas, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5440–5451.
- [283] R. Pankov, K. M. Yamada, *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3861–3863.
- [284] T. E. Petersen, K. Skorstengaard, K. Vibe-Pedersen, “Primary Structure of Fibronectin” in “Fibronectin,” Academic Press Inc., London, **1989**.
- [285] E. Ruoslahti, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, *57*, 375–413.
- [286] C. Signäs, G. Raucci, K. Jönsson, P.-E. Lindgren, G. M. Anantharamaiah, M. Höök, M. Lindberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 699–703.
- [287] S. Bozzini, L. Visai, P. Pignatti, T. E. Petersen, P. Speziale, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *207*, 327–333.
- [288] R. M. Donlan, *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 66–72.
- [289] H. A. Pearson, G. S. Sahukhal, M. O. Elasri, M. W. Urban, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1257–1261.
- [290] J. R. Clark, J. B. March, *TRENDS Biotechnol.* **2006**, *24*, 212–218.
- [291] J. Y. Mao, A. M. Belcher, K. J. Van Vliet, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 209–214.

8 Danksagung

Jetzt bleibt mir nur noch mich bei allen ganz herzlich zu bedanken, ohne die diese Dissertation nicht das geworden wäre, was sie heute ist.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Joachim Bill für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben. Danke auch für die vielen hilfreichen Diskussionen, Denkanstöße und Ideen.

Ein weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernhard Hauer für die Übernahme des Mitberichts sowie Herrn Prof. Dr. Rainer Niewa für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Weis (Max Planck Institut für Festkörperforschung, Stuttgart) und Herrn Prof. Dr. Joachim Spatz (Max Planck Institut für Intelligente Systeme, Stuttgart) sowie bei Herrn Hon.-Prof. Dr. Christian Oehr (Abteilung „Grenzflächentechnologie und Materialwissenschaft“ des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik“) für die Bereitstellung von Messgeräten.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Dirk Rothenstein für die Betreuung meiner Arbeit. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle für die ständige Bereitschaft, mir bei Fragen weiterzuhelfen sowie für die vielen hilfreichen Diskussionen, Ideen und Denkanstöße bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch besonders bei meinen beiden Kooperationspartnern Dr. Peter Popella (Prof. Dr. Friedrich Götz, Institut für Mikrobielle Genetik, Universität Tübingen) für die Untersuchung der Bakterienadhäsion und Wolfgang Halter (Prof. Dr. Frank Allgöwer, Institut für Systemtheorie und Regelungstechnik, Universität Stuttgart) für die Modellierung des Mineralisationssystems.

Außerdem möchte ich mich bei vielen weiteren Personen für die Durchführung bestimmter Messungen bedanken. Dieser Dank gilt Dr. Marc Widenmeyer für die TGA/DSC-Messungen, Michaela Wieland für die XPS-Messungen, Mirjam Stein für die XRD-Messungen, Samir Hammoud für die Durchführung und Unterstützung bei den ICP-OES-Messungen, Timotheus Jahnke für die EDX-Messungen, Stefan Kilper sowie Dr. Nina Blumenstein für

die Hilfe am AFM und ebenfalls Stefan Kilper für die Hilfe beim Ausrichten der Phagentemplate mittels „Convective Assembly“.

Besonders möchte ich mich im Einzelnen noch bei Dr. Marc Widenmeyer für die große Unterstützung in jeglicher Hinsicht bedanken. Sei es bei chemischen Fragestellungen, Auswertungen oder sonstigen Diskussionen oder auch das Korrekturlesen meiner Arbeit. Auch Cora Bubeck, Stefan Kilper, Susanne Ott und Mirjam Stein möchte ich für das Korrekturlesen und die Motivation Danke sagen.

Über die Arbeit hinaus gilt ein weiterer Dank Marc Widenmeyer, Cora Bubeck, Stefan Kilper, Joseba Moreno, Susanne und Markus Ott, Nina Blumenstein und Matthias Kindl sowie Mirjam und Andreas Stein für die vielen gemeinsamen Unternehmungen, die mich immer wieder aufgebaut haben. Hierzu zählen neben den zahlreichen Boulderabenden auch die Weinprobe und die tollen Fahrradtouren, um nur einige Beispiele zu nennen.

Die Arbeitstage wären ohne die unvergesslichen Mittagspausen nur halb so schön gewesen. Vielen Dank an alle Arbeitskollegen/innen, die diese Pausen mit mir verbracht haben.

Auch bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Chemische Materialsynthese möchte ich mich für die tolle Arbeitsatmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken. An dieser Stelle möchte ich Juliane Kränzl und Martin Schweizer sowie Ivan Kozmon besonders hervorheben, die mir bei administrativen Dingen und für technische Unterstützung stets zur Seite standen. Vielen Dank dafür.

Nicht zu vergessen und besonders hervorzuheben ist meine Familie, die mich über die gesamte Zeit unterstützt, mich aufgemuntert und mir Kraft gegeben hat. Dasselbe gilt für die vielen Unterstützer aus dem CVJM und Hauskreis in Gärtringen sowie aus meiner alten Heimat Hessigheim und den damit verbundenen Freundschaften. Vielen Dank für all eure Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle bei meiner Zwillingsschwester Mirjam Stein bedanken, die mit mir zusammen durch ziemlich alle Höhen und Tiefen gegangen ist. Vielen Dank für all die Unterstützung. Und auch meinem Schwager Andreas Stein vielen Dank, dass er mich vor allem in der Schlusszeit in vielerlei Hinsicht so tatkräftig unterstützt hat.

Zuletzt gilt mein Dank der finanziellen Unterstützung durch das „Baden-Württemberg Biosynthesis netWork“ (BW²) des Ministeriums für Wissenschaft, Forschung und Kunst Baden-Württemberg.