

Biosorptive Kompositmaterialien für die Rückgewinnung von Wertstoffen: Neue Konzepte und Anwendungspotenziale

Katrin Pollmann, Johannes Raff, Sabine Kutschke



hzdr

 **HELMHOLTZ
ZENTRUM DRESDEN
ROSSENDORF**

Biosorption - Einführung

- **Biosorption = Akkumulation von Metallen durch physikalische und chemische Prozesse (erweiterte Definition)**

- Extrazelluläre Akkumulation/Ausfällung
- Sorption an Zelloberflächen/Ausfällung
- Intrazelluläre Akkumulation

- **Organismen:** Bakterien, Pilze, Algen

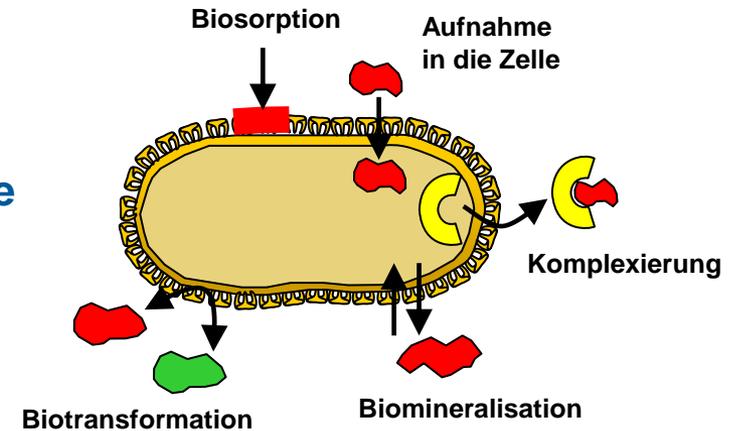
- **Mechanismen:** Ionenaustausch, Komplexierung, Präzipitation, van der Waals-Kräfte, Kapillarkräfte, Diffusion...

- **Wichtige Parameter:** Konzentrationsgradient, Komponenten der Zellwände, Metall, Zusammensetzung des Wassers (Konkurrenzen, pH)

- **Biomoleküle, Funktionelle Gruppen:** Polysaccharide, Proteine, Chitin, Teichonsäuren...; Amino-, Carboxyl-, Sulphydryl-, Phosphatgruppen, Hydroxylgruppen...

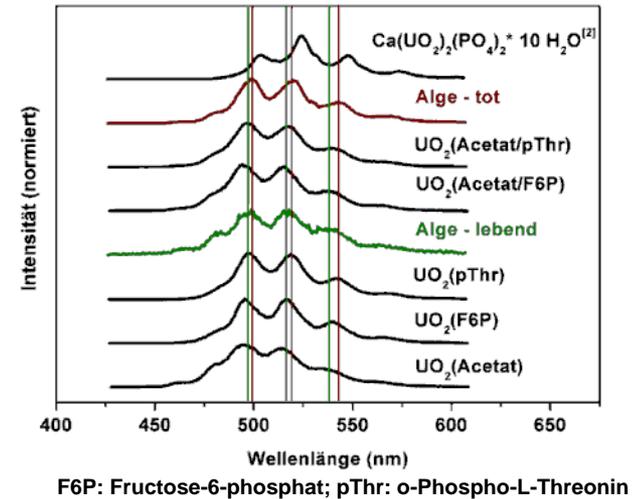
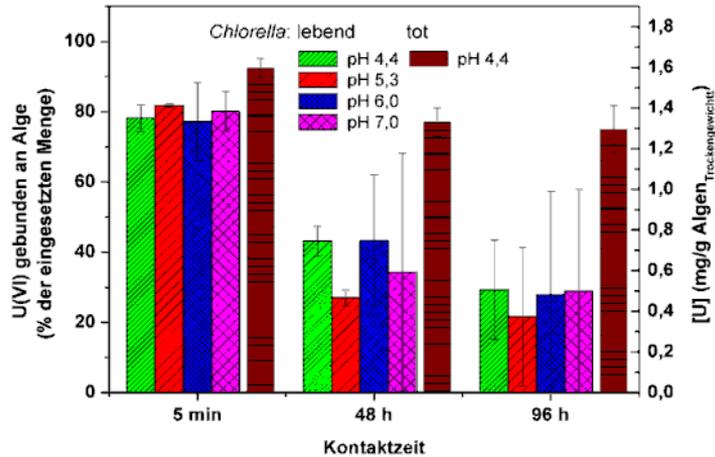
- **Vorteile** von biosorptiven Verfahren: kostengünstig, effizient, keine zusätzlichen Chemikalien erforderlich, regenerierbar

- **Technische Verwendung:** vor allem für die Entfernung von Schwermetallen; Abfallprodukte aus Fermentationen (Pilze), Abfall aus der Olivenölproduktion (Pagnanelli et al. 2002), aquatische Makrophyten (Keskinan et al. 2003), Klärschlamm (Norton et al. 2003)...

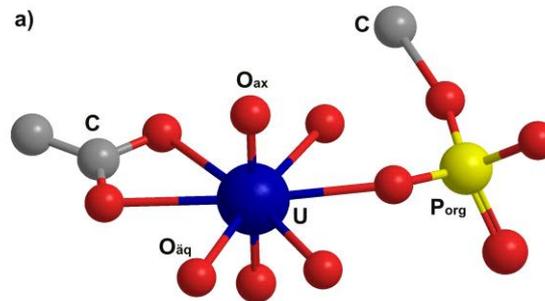
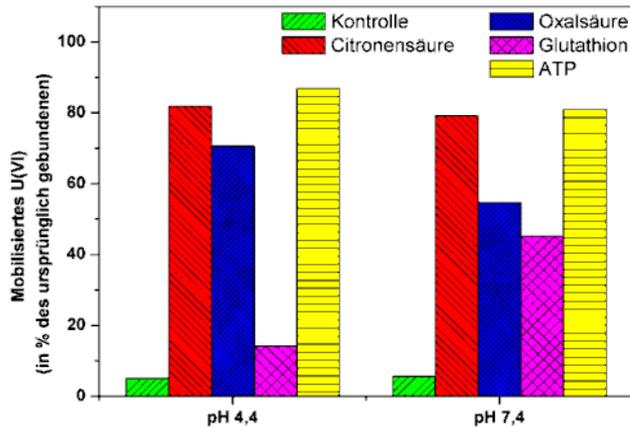


Beispiel: Wechselwirkung von Uran mit *Chlorella vulgaris*

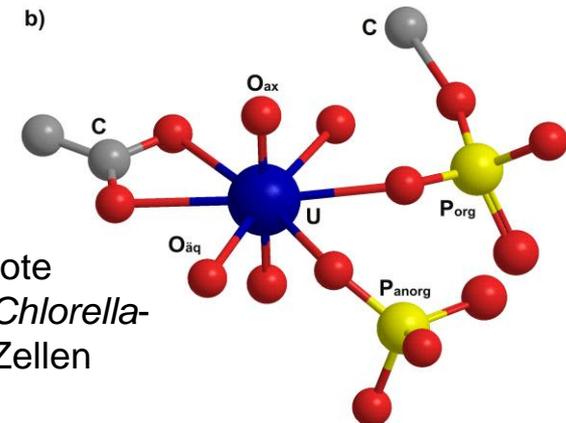
TRLF-, EXAFS- und FTIR spektroskopischer Nachweis der Wechselwirkung von Uran mit Carboxylgruppen sowie organischen (lebende Zellen) und zusätzlich anorganischem Phosphat (tote Zellen) von *Chlorella vulgaris* (M. Vogel et al. 2010, Science of the Total Environment 409, pp. 384-395)



[U] = 5 μM



lebende *Chlorella*-Zellen

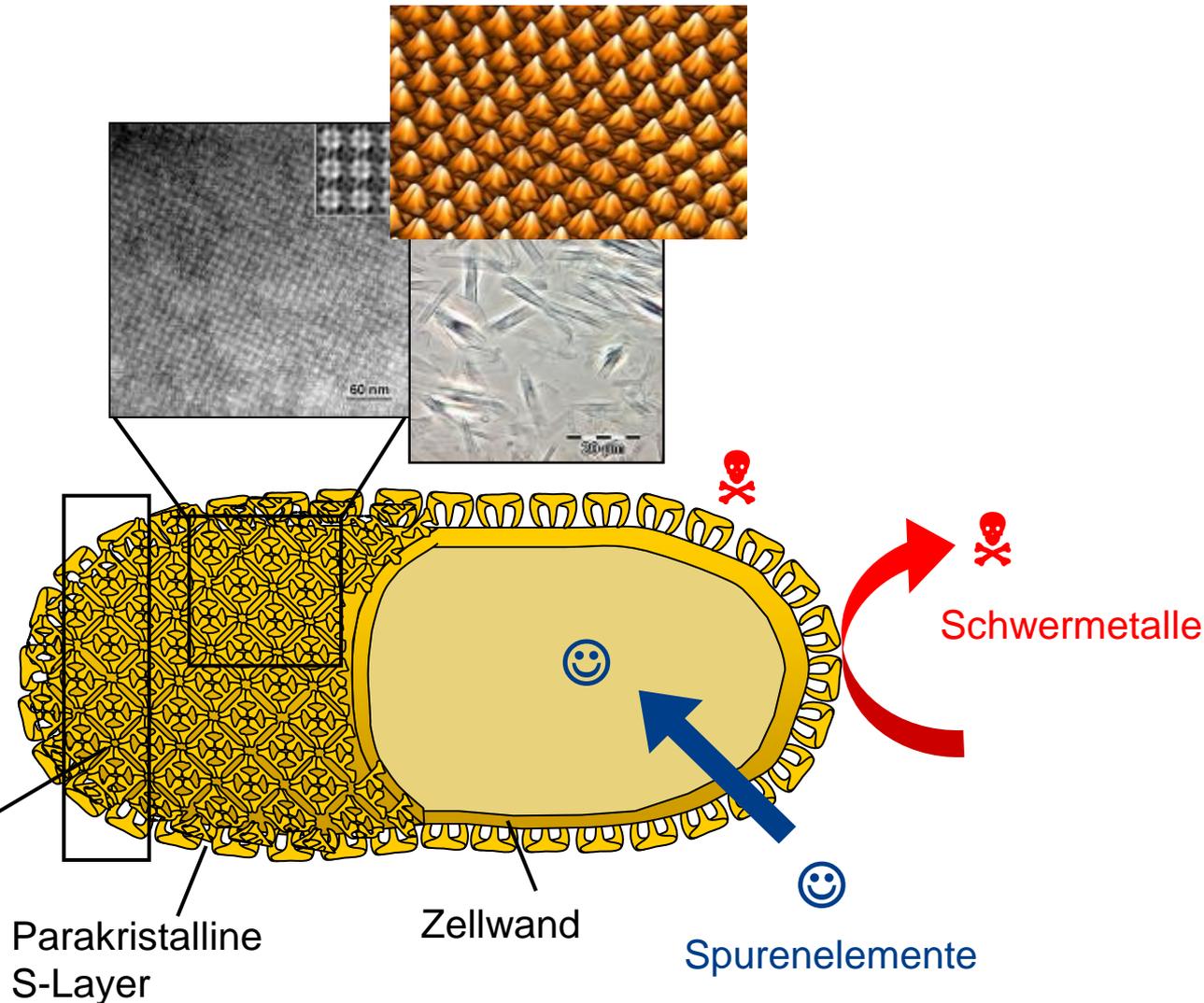
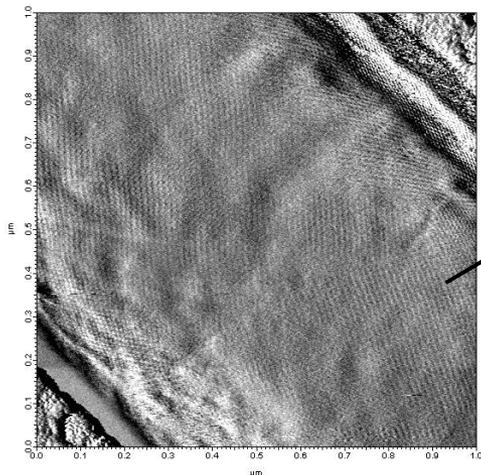


tote *Chlorella*-Zellen

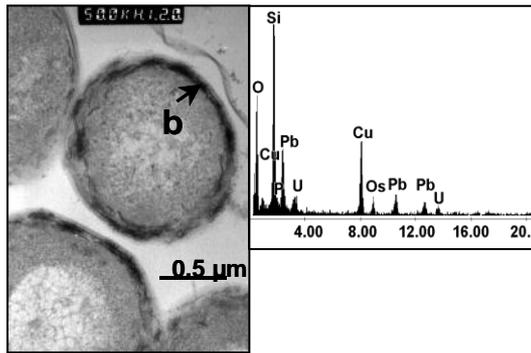
Bakterielle Oberflächenproteine (S-Layer): biosorptive Moleküle

Eigenschaften:

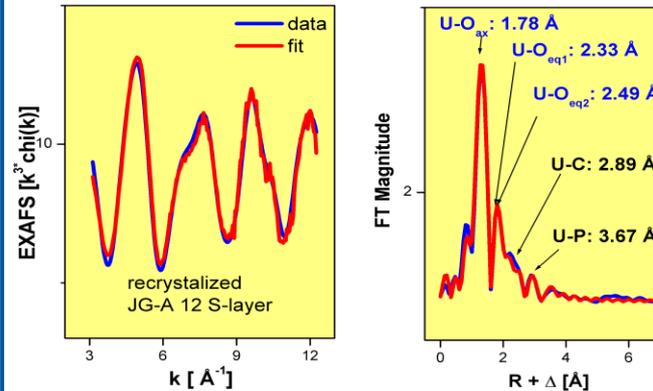
- Selbstorganisierend
- Nanoskalige zweidimensionale Gitterstrukturen
- Multifunktional
- Grenzfläche zur Umwelt
- Metallbindung



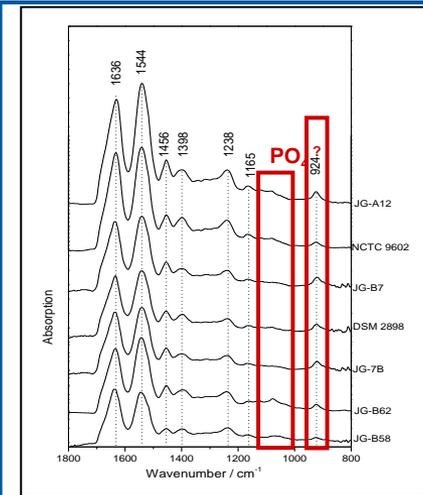
Biosorption von Uran



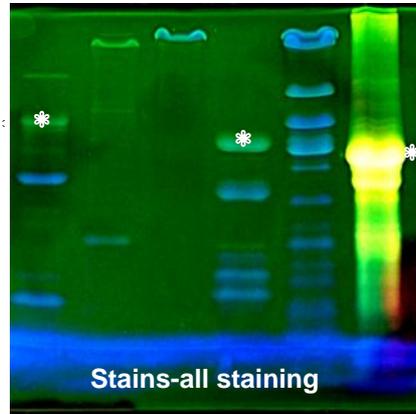
TEM-Aufnahme: Uranbindung an Zellen von *L. sph. JG-A12*



EXAFS-Analysen: Sorption von Uran an S-Layer von *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12



ATR-FT-IR-Spektroskopie: Sorption von Uran an S-Layer; Detektion von Phosphatgruppen



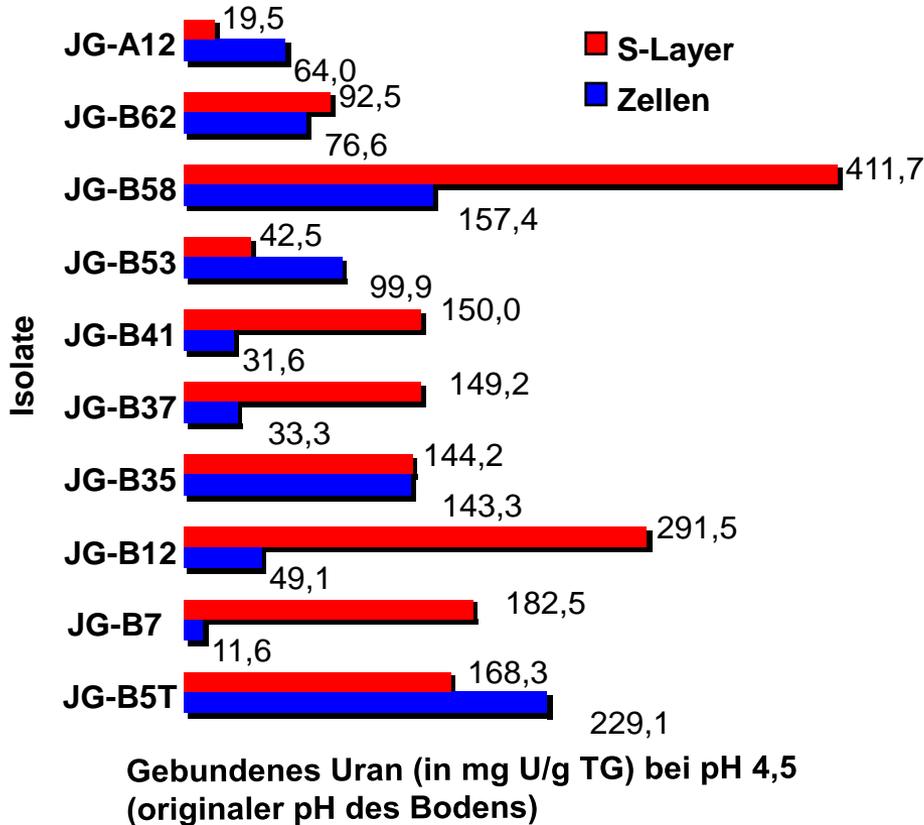
Nachweis einer Phosphorylierung der S-Layer; Lokalisation der Phosphatgruppen: Fragmentierung des Proteins mit GluC

- S-Layer Proteine sind phosphoryliert
- Uranbindung durch Carboxyl- und Phosphatgruppen des Proteins
- Potenzielle Phosphorylierungsstellen: Threonin und Serin

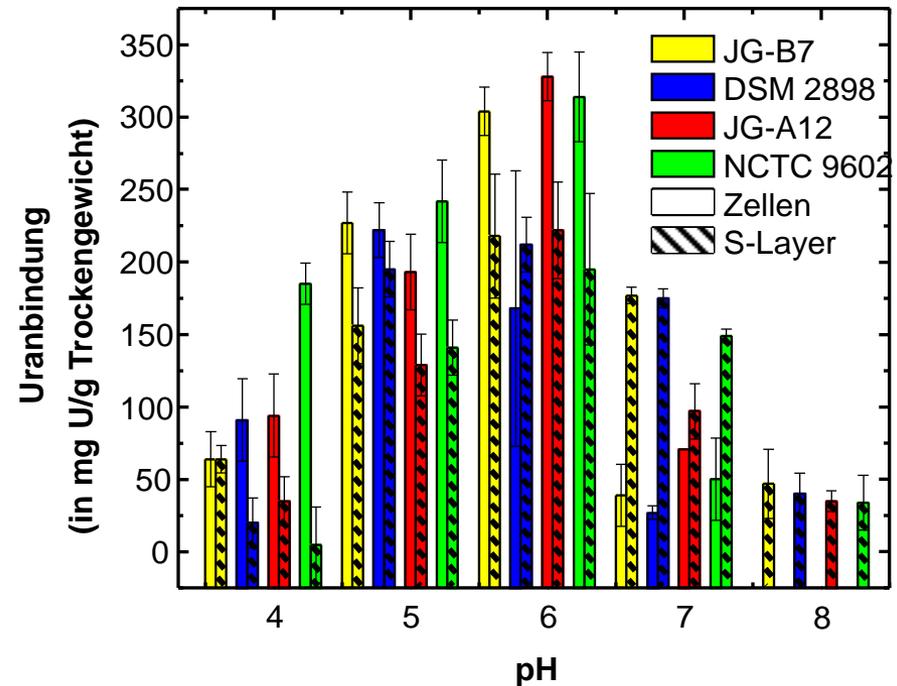
Merroun, M. et al. 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71, 5532-5543

Biosorption von Uran

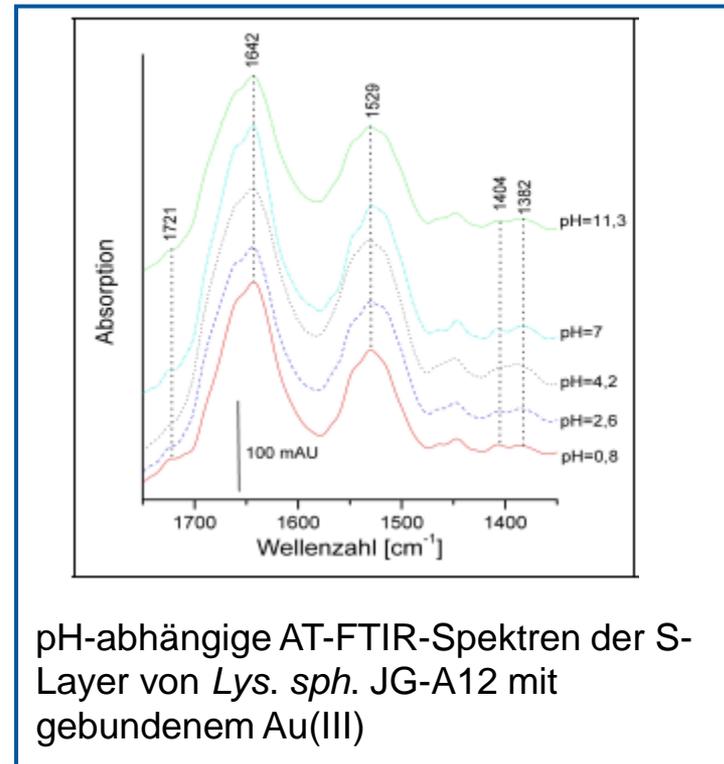
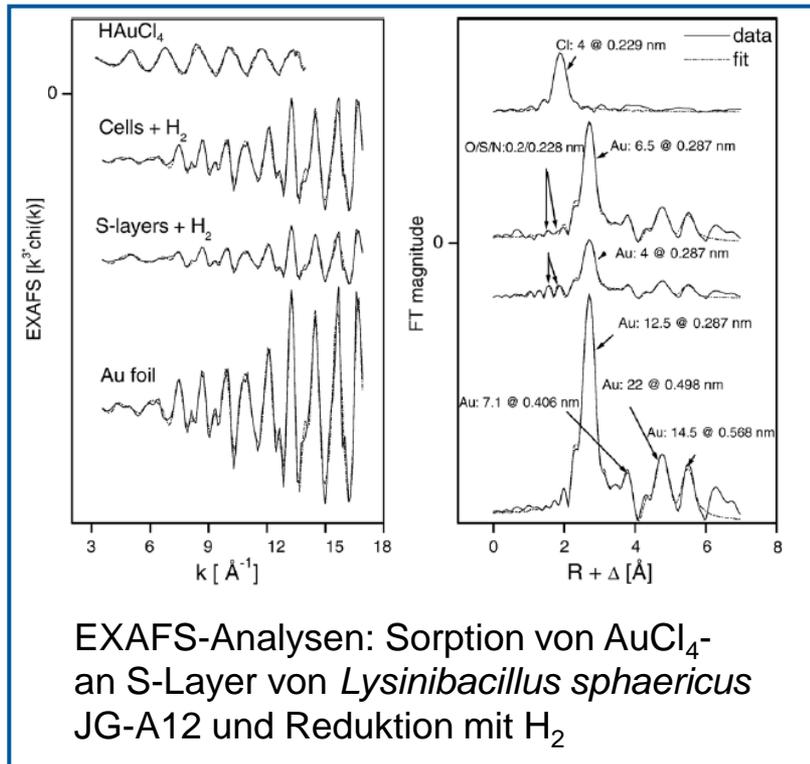
$8,4 \times 10^{-4}$ M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ in 0,9% NaClO_4



10^{-5} M $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ in 0,9% NaClO_4

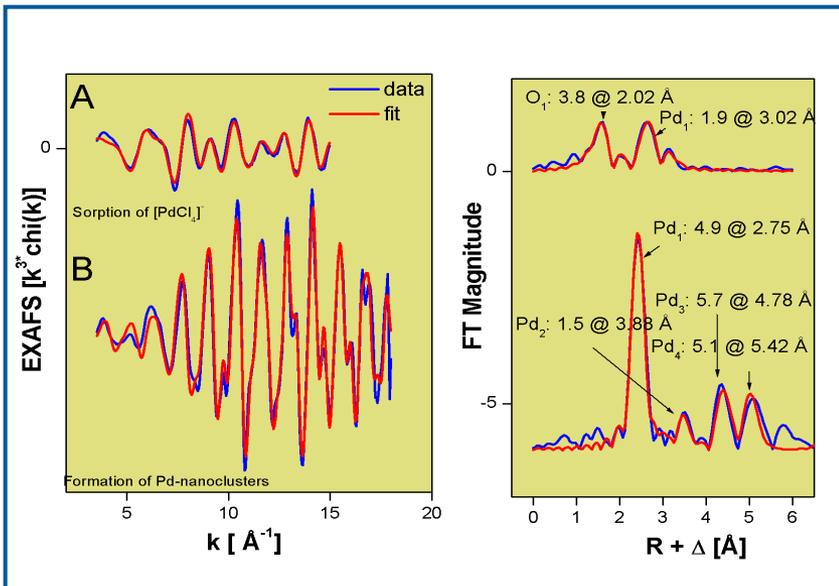


Biosorption von Gold

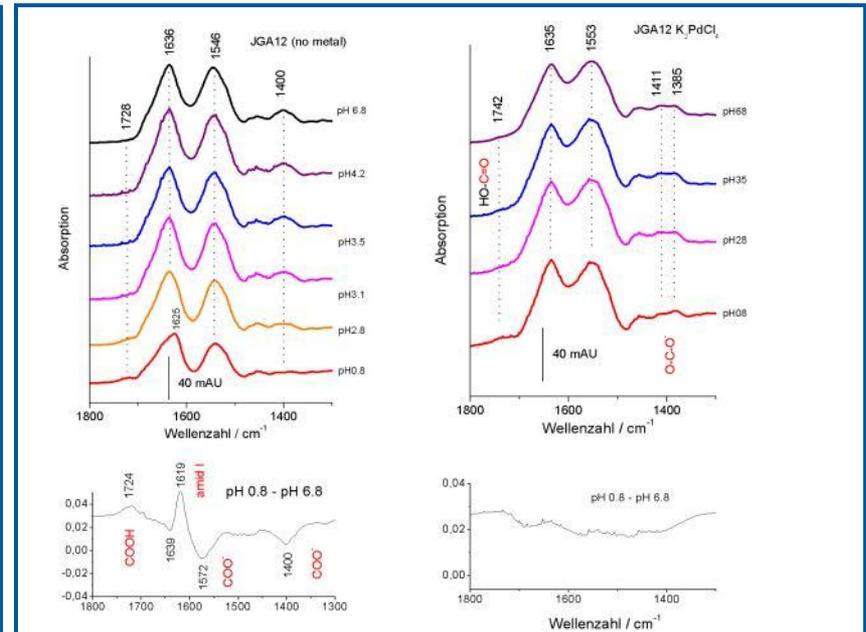


- S-Layer-Proteine enthalten kein Cystein
- Dennoch: Sorption von Au(III); S-Layer scheint reduzierend zu wirken (Bildung von Au-NP ohne Zugabe eines Reduktionsmittels)
- Komplexierung von Au(III) vermutlich an Amingruppen)
- Au-Nanopartikel stabilisieren S-Layer

Biosorption von Palladium



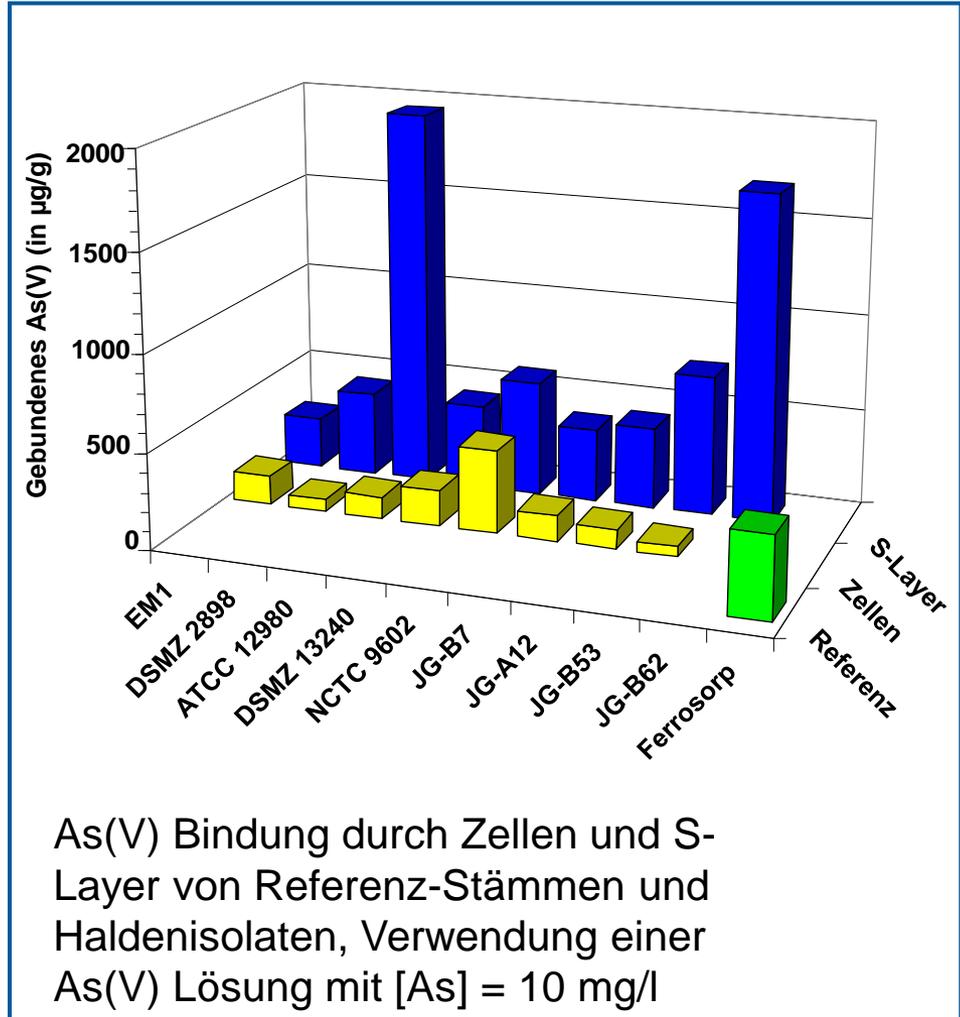
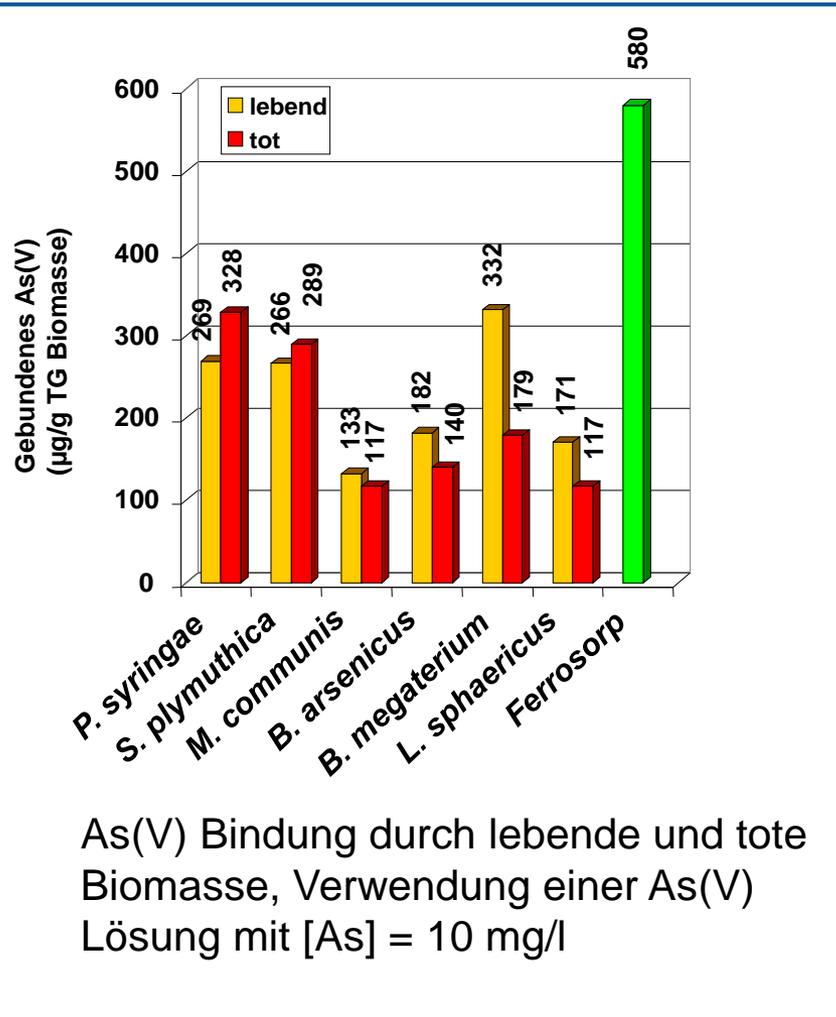
EXAFS-Analysen; **A**: Sorption von $\text{PdCl}_4^{2-}(\text{aq})$ durch *B. sphaericus* JG-A12; **B**: Bildung von Pd-Nanoclustern auf der S-layer von *B. sph.* JG-A12 nach Zugabe von H_2



pH abhängige AT-FTIR-Absorptions-Spektren von nativen (**A**) und Pd-metallisierten (**B**) S-Layern von *B. sphaericus* JG-A12

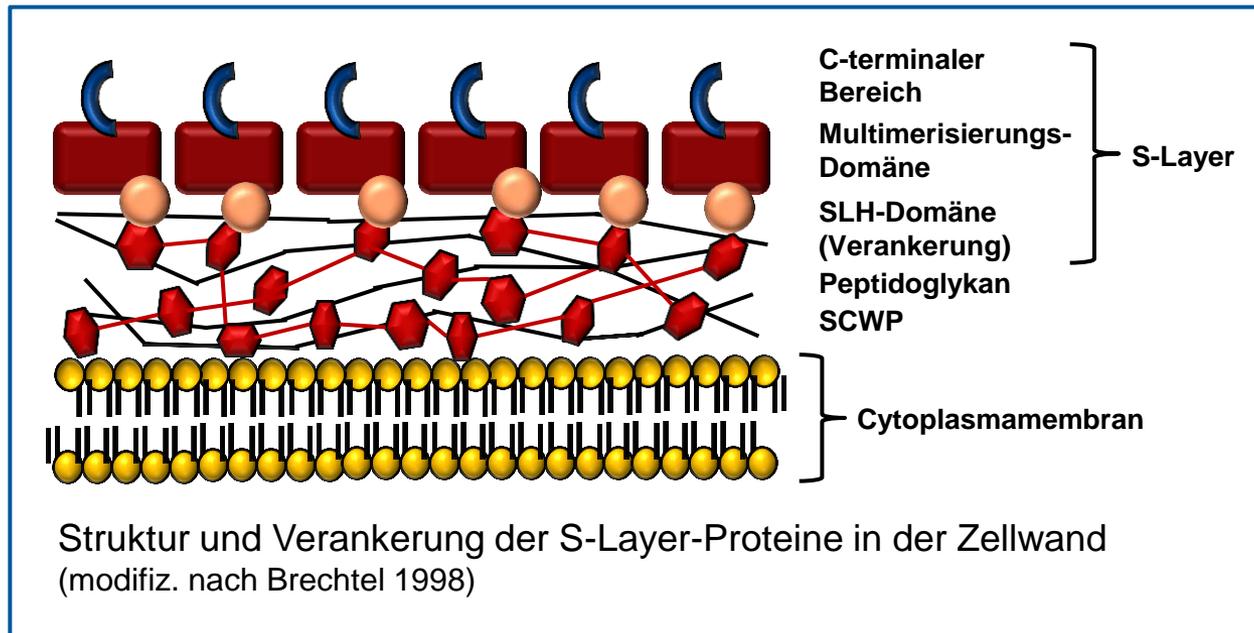
- Verschiedene spektroskopische Analyse weisen eine Komplexierung mit COOH-Gruppen nach
- Bindung an Carboxylgruppen stabilisiert die Proteinstruktur (pH < 0,8)
- Nanopartikelbildung nach Zugabe eines Reduktionsmittels

Biosorption von Arsen



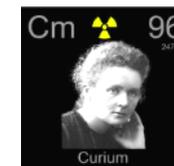
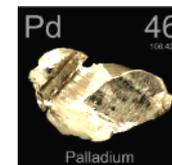
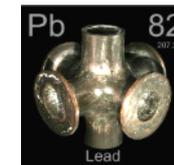
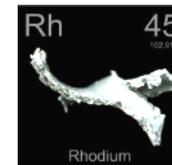
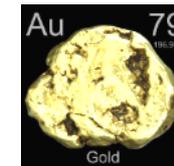
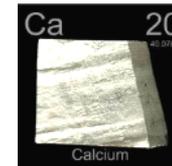
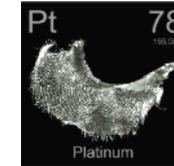
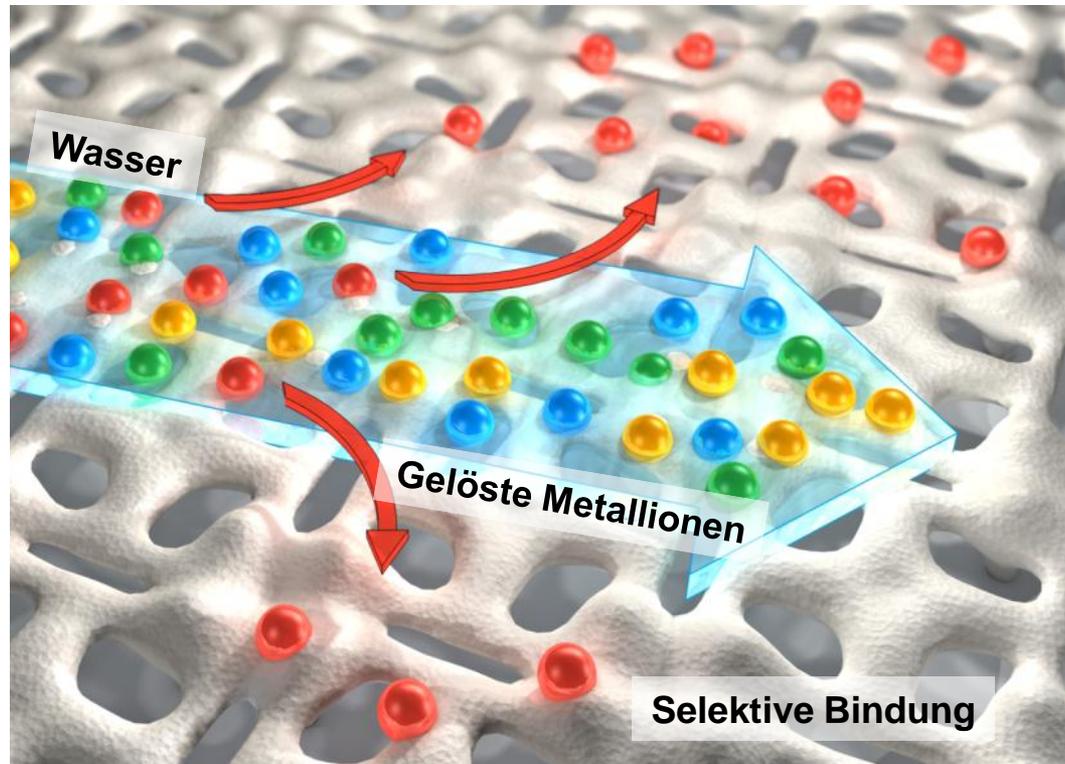
Referenz-Material: Ferrosorp (granuliertes Eisenhydroxid)

Molekularbiologie der S-Layer-Proteine

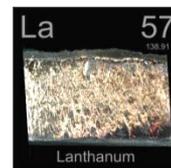


- Größe: 126 kDa, 1238 Aminosäuren (*L. sph.* JG-A12)
 - Reich an Aminosäuren mit Carboxyl-Gruppen und potenziellen Phosphorylierungsstellen:
 - Threonin und Serin (-OH) (19 %)
 - Aspartat und Glutamat (COOH) (10 %)
 - 3 SLH-Bindungsdomänen, in sekundäre Zellwandpolymere verankert
 - Konservierter N-terminaler und zentraler Bereich
 - Kein Cystein

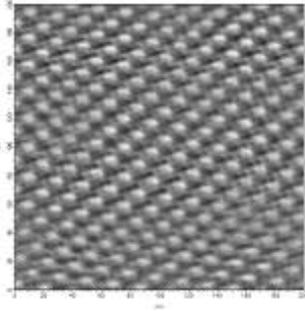
Biosorptive Materialien: Metallbindung durch S-Layer



bisheriger Stand; weitere Elemente??

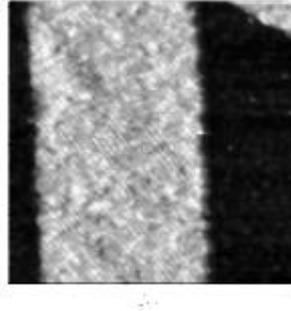


Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Selektion und Aufreinigung von Proteinen



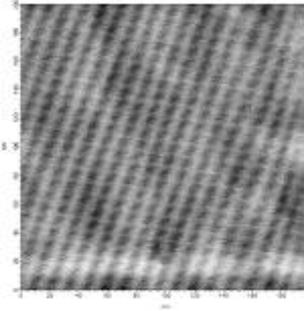
Stamm JG-A12

- Sehr gut untersucht
- Isolierungsmethode etabliert
- P4-Symmetrie
- Primärstruktur bekannt



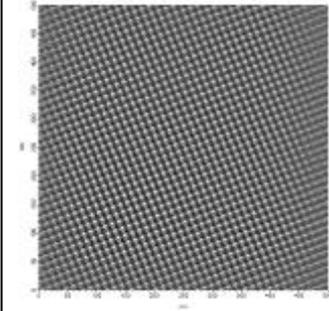
Stamm B12

- P2-Symmetrie
- Primärstruktur bekannt
- Heterologe Expression möglich



Stamm B7

- P2-Symmetrie
- Bildung stabiler Dimere
- Hohe Ausbeute an S-Layern



Stamm B53

- P4-Symmetrie
- Hohe Stabilität gegenüber Reagenzien wie SDS
- Einfache Kultivierung

- 47 Haldenisolate mit 32 Stämmen verschiedenen S-Layern
- Kriterien für die Auswahl von geeigneten S-Layern:
 - Gewünschte Eigenschaften (z.B. Metall-Sorption), Gittersymmetrie, gute Kultivierbarkeit, gute Isolierbarkeit, verfügbare Information (Primärsequenzen), gute Rekristallisierbarkeit, Stabilität
 - Insbesondere die Stämme JG-A12, B12, B53, B7 von Interesse

Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Proteinproduktion



Herausforderungen:

- Kostengünstiges Verfahren zur Herstellung großer Mengen hochreinen Proteins
- Reproduzierbare Proteineigenschaften

Lösungsansatz:

Optimierung der Kultivierungsbedingungen:

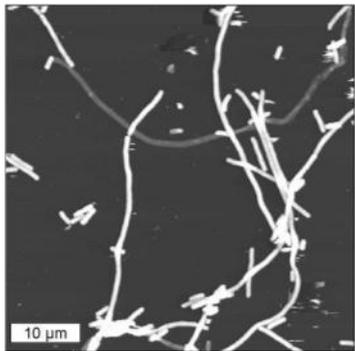
- Bessere Verwertung des Nährmediums
- Steigerung der Biomasseausbeute
- Verringerung des Personalaufwandes

Prozess	Ausbeute in g/l (z.B. JG A12)		Personal- aufwand in h	€/g S-Layer
	Biomasse	S-Layer		
Konventionell	3	0,03	6,9	19000
Technikum	6	0,16	1,4	730
derzeit	8	0,22	1,4	??
Optimierung	12	0,85	1,4	140

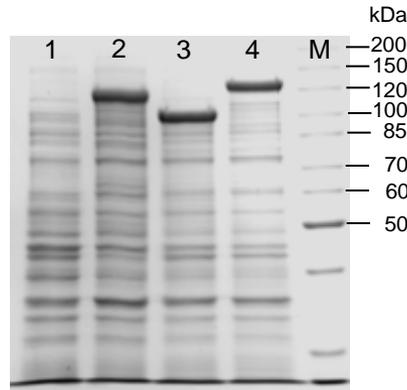
➔ Aus 50 l Kultur im Bioreaktor werden derzeit 11 g Protein gewonnen, damit kann man theoretisch 2200 m² beschichten!

Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Proteinproduktion

Expression des S-Layer Proteins von
L. sphaericus JG-A12 in *E. coli*
(Lederer et al. 2010, Microbiology)

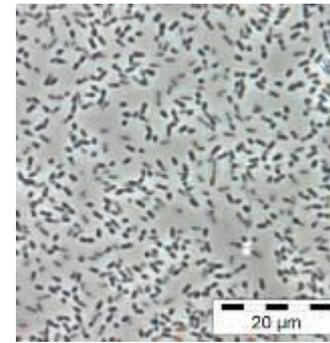


AFM-Aufnahme von S-Layer exprimierenden *E. coli* Zellen, auffällig sind ungewöhnliche Röhrenstrukturen



SDS-PAGE; 1: Kontrolle; 2-4: Expression von verschiedenen S-Layer-Konstrukten; M: Marker

Expression des S-Layer Proteins von *Bacillus* spec. B12 in
Lactococcus lactis



Lichtmikroskopische Aufnahme von S-Layer exprimierenden *L. lactis* Zellen

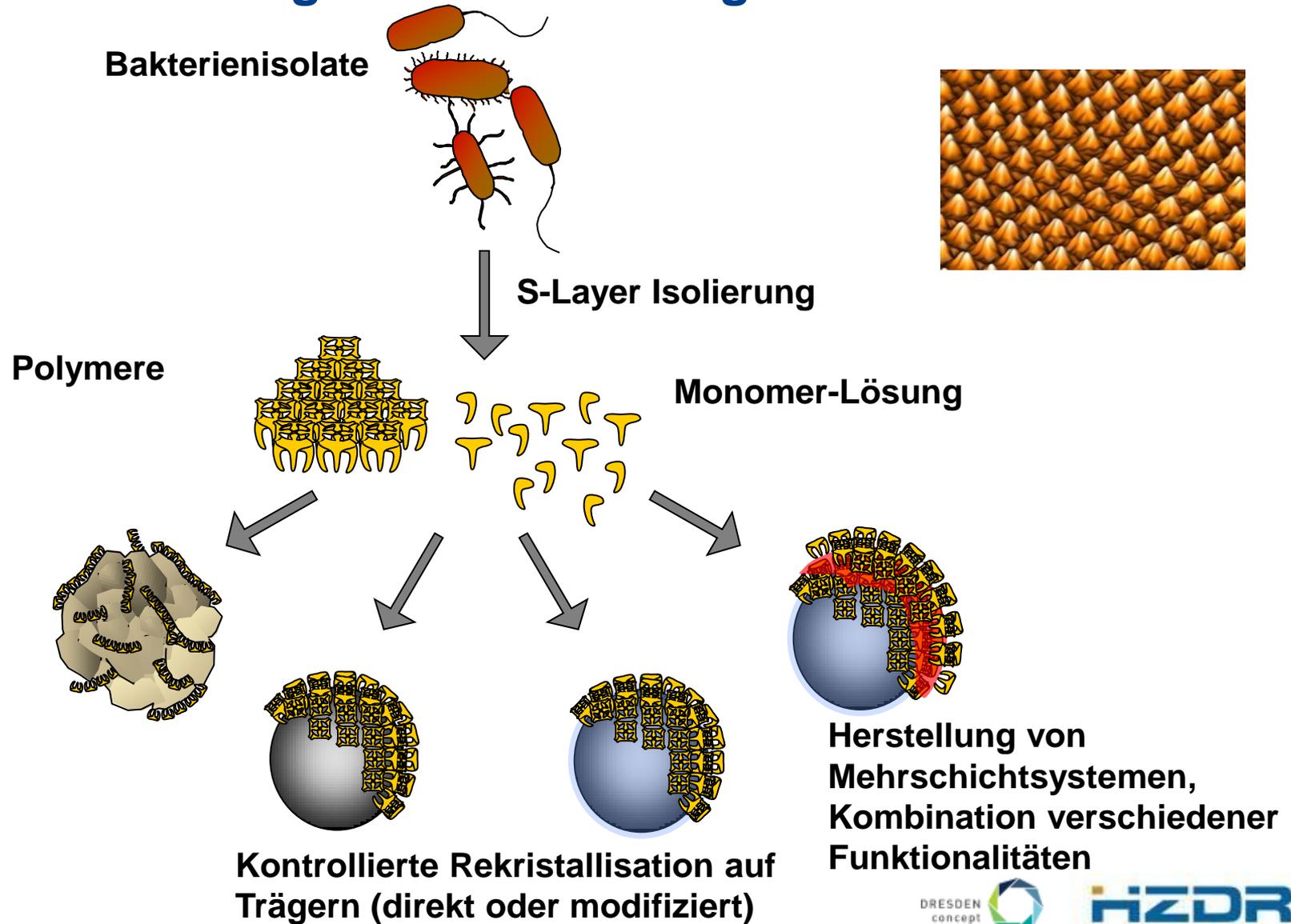


SDS-PAGE; M: Marker; 1-3: Kulturüberstand; das Protein liegt vermutlich in Dimeren vor

Vorteile:

- Kultivierung der Wirtsbakterien gut beschrieben
- Einfaches Upscaling der Proteinproduktion
- Reproduzierbare Proteinqualität durch Fehlen von posttranslationalen Modifikationen
- Genetisches Design möglich

Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Immobilisierung

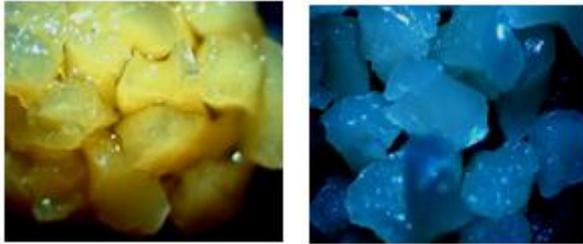


Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Immobilisierung

Anforderungen für die technische Nutzung:

- Reproduzierbare Rekristallisation der Proteine
- Vollständige Bedeckung
- Hohe mechanische und chemische Stabilität
- Schnelle Beschichtung
- Universelles Verfahren

Technische Nutzung der S-Layer-Proteine zur Metallentfernung: Implementierung in technische Prozesse

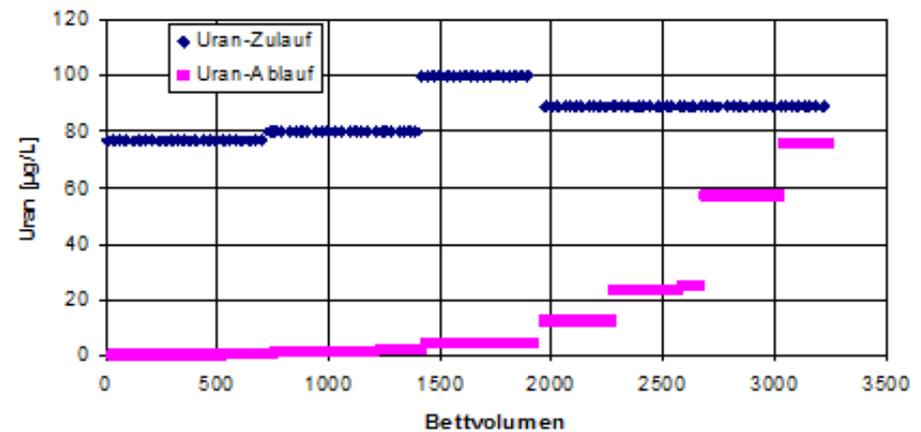


Einbettung von Biomasse in
Keramiken über Sol-Gel-Verfahren:
Herstellung von Bioceren



Biocer/ biocomponent	Operating time [d]	Treated volume [l]	Bed volume	Initial uranium concentration [µg/l]	Uranium concentration in effluent [µg/l]
<i>Pseudomonas syringae</i> , cells 20 % biomass	38	7,94	777	77	0,97
<i>P. syringae</i> , cell debris 10 % biomass	31	7,28	707	77	6,6
<i>Bacillus</i> spec. B58, cells, 10 % biomass	38	7,9	875	77	1,1
<i>Bacillus</i> spec B5T, cells, 10 % biomass	38	7,92	916	77	0,5

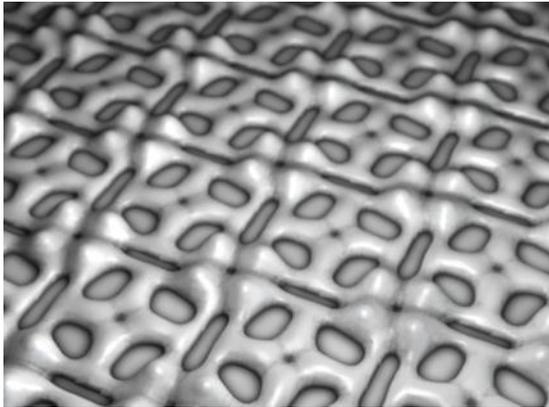
AR 066d (B5T, 10%)



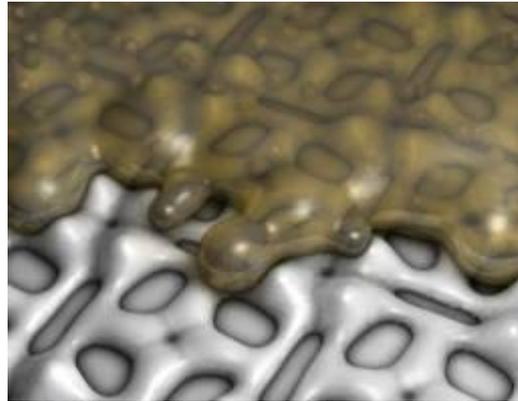
Feldversuch: Uranabtrennung aus Brunnen-
wasser mit Bioceren

Weitere Anwendungen

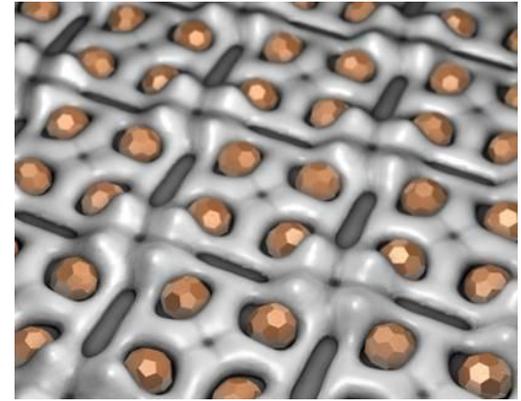
Herstellung von Nanopartikel-Arrays



Beschichten von SiO_2 mit Proteinen



Inkubation mit einer Metallsalz-Lösung (z.B. Na_2PdCl_4)



Synthese von Nanopartikeln durch Reduktion (3-5 nm)

Danke....

Gruppe Biotechnologie

Dr. Johannes Raff
Dr. Sabine Kutschke
Dr. Manja Vogel
Tobias Günther
Ulrike Weinert
Franziska Lederer
Matthias Suhr
Ulrike Kummer
Falk Lehmann
Caroline Bobeth



Abteilung Biogeochemie

Katrin Flemming
Monika Dudek

Ehemalige

André Marquard
Tobias Hauptmann

Funding

