Alginat- und Alginat/Protein-Systeme als Modelle der EPS-Matrix von Biofilmen

NMR-Untersuchungen zur Wasserdiffusion

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Duisburg-Essen
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation
von

Christian Oliver Galle
aus
Mülheim an der Ruhr

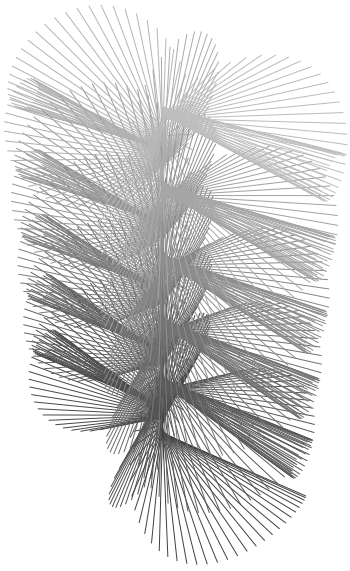
Referent: Prof. Dr. Wiebren S. Veeman
Korreferent: Prof. Dr. Christian Mayer

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis September 2005 im Fachgebiet der Physikalischen Chemie an der Universität Duisburg-Essen unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. S. Veeman angefertigt.

Der Wind weht, ein Sturm zieht vorüber,
die Uni ist kalt, doch wir stehen da drüber.

Der böse Franz



Meinen Eltern Christine und Bernd, sowie meiner Schwester Kerstin gewidmet, die mich das Laufen lehrten.

Danksagung

Herrn Prof. Wiebren S. Veeman danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgesprochen nette Betreuung und fortwährende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Christian Mayer danke ich für die Übernahme des Korreferates und die kurzweiligen Vorträge im Rahmen der Forschergruppe.

Manfred „Zorro" Zähres danke ich für die Einweihung in 1001 Geheimnisse der NMR-Spektroskopie.

Michael Vogt und seinen Vorarbeiten danke ich für den extralangen Genuss an dieser Arbeit :-).

Kirsten Schwark danke ich für die DSC-Messungen.

Natti Emmerichs fka Schürks danke ich für die Tips und Kniffe und das mühevoll isolierte Bakterienalginat.

Elena und **Daniel** danke ich für die schöne Zeit im Hilbertraum MG 170.

Martin und **Hermann** danke ich für die schöne Zeit in MG 169 und die Deeskalation meiner Nervenzusammenbrüche.

Allen Mitarbeitern der Physikalischen Chemie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Theorie und Grundlagen **5**

2.1 Biofilme 5

2.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS) 8

2.2.1 Polysaccharide 10

2.2.2 Proteine 12

2.3 Wasser im Biofilm 13

2.4 Diffusion 14

2.4.1 Transportdiffusion 15

2.4.2 Selbstdiffusion 19

2.5 NMR-Spektroskopie 26

2.5.1 Grundlagen der Impuls-NMR 27

2.5.2 PFG-NMR-Spektroskopie 30

2.5.3 Der Nuclear Overhauser Effekt 40

2.5.4 Der Einfluss des NOE auf das PFG-Experiment 46

3 Experimenteller Teil **49**

3.1 NMR-Messungen 49

3.1.1 PFG-Diffusionsmessungen 49

3.1.2 Festkörper-NMR 50

3.1.3 2D-NOESY-Spektroskopie 51

3.2 Sonstige Methoden 51

3.3 Verwendete Substanzen 52

4 Ergebnisse und Diskussion der Diffusionsmessungen an Alginaten 55

4.1 Vorbemerkungen 55

4.1.1 Vergleichsmessungen an reinem Wasser 55

4.1.2 Bipolare Gradienten 58

4.2 Vorarbeiten 60

4.3 Algenalginat 61

4.3.1 PFG-Messungen 62

4.3.2 Festkörper-NMR 73

4.3.3 Proteinanalytik 75

4.3.4 Partikelgrößenbestimmung mittels Laserdiffraktion 76

4.3.5 DSC-Untersuchungen an Alginatlösungen 79

4.3.6 Algenalginat aus Sterilfiltration 81

4.4 Bakterienalginat 83

4.4.1 PFG-NMR-Untersuchungen an Alginat von P. aeruginosa 83

4.5 Modelle zur Interpretation der PFG-Ergebnisse 88

4.5.1 Interpretation der Diffusionsexperimente an Algenalginat 91

4.5.2 Interpretation der Diffusionsexperimente an Bakterienalginat 103

5 2D-NOE-Spektroskopie an Alginat 109

5.1 Das 2D-NOESY Experiment mit Wasserfilter 109

5.2 Ergebnisse und Interpretation der 2D-NOESY-Experimente 111

5.2.1 Algenalginat 111

5.2.2 Bakterienalginat 113

6 Das Phasendiagramm von Wasser/Alginat 115

6.1 Interpretation des Phasendiagramms mittels NMR 115

7 Wasserdiffusion in festem Alginat 121

7.1 Gequollenes Alginat 121

7.2 Getrocknetes Alginat 124
7.2.1 Wasserbeweglichkeit in unbehandeltem Alginat 124
7.2.2 Wasserbeweglichkeit in sterilfiltriertem Alginat 127

8 Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Alginat 129
8.1 Wechselwirkungen zwischen ConA und Alginat 130
8.1.1 PFG-NMR-Messungen an Alginat/ConA 131
8.1.2 Deutung der Ergebnisse 141
8.1.3 Stabilität der Aggregate 143
8.2 Wechselwirkungen zwischen ConA und Dextran 144
8.3 Wechselwirkungen zwischen LecB und Alginat 147
8.4 Funktion der Bindung zwischen Proteinen und Sacchariden 148

9 Zusammenfassung 151

A Puls Programme 155
A.1 gs-NOESY mit Hahn-Echo Wasserfilter 155
A.2 Stimulated-Echo mit Gradienten Pulsen 158

Abbildungsverzeichnis 163

Tabellenverzeichnis 167

Literaturverzeichnis 169

Kapitel 1

Einleitung

Biofilme sind mikrobielle Ablagerungen an Grenzflächen, die aus Zellaggregationen bestehen, welche von einer Matrix aus Extrazellulären Polymeren Substanzen (EPS) stabilisiert werden. Der überwiegende Teil der Mikroorganismen auf der Erde tritt in dieser Form von Lebensgemeinschaften auf. Biofilme sind allgegenwärtig und ihr Auftreten kann sowohl negative, als auch positive Auswirkungen für den Menschen haben. So sind Biofilme nicht selten Ursache persistenter Infektionen (z.B. bei Mukoviszidose-Patienten), andererseits sorgen sie aber auch für ein biologisches Gleichgewicht auf der Haut und in der Darmflora. Das gleiche gilt für den industriellen Bereich, wo unerwünschte Biofilme z.B. in Wärmetauschern, Rohrleitungen und Membranfiltern für Leistungsverluste, Kontaminationen und hohe Kosten sorgen, während in Kläranlagen, Sandfiltern und Trinkwasseraufbereitungsanlagen erwünschte Biofilme notwendige Abbauprozesse ausführen. Gemeinsames Merkmal der meisten Biofilme ist, dass eine sehr geringe Menge Matrixpolymere (vornehmlich Polysaccharide) eine große Menge Wasser zu binden vermag. In der Regel besteht ein Biofilm zu mindestens 90% aus Wasser. Unter wirtschaftlichen Aspekten ist dies ein wichtiger Punkt, da die Entwässerung von mikrobiellen Klärschlämmen ein entscheidender Kostenfaktor für den Betrieb von Kläranlagen darstellt. Das Verständnis der Wasserrückhaltemechanismen in Biofilmen kann daher ggf. einen Beitrag zur Optimierung von Entwässerungstechniken liefern, was nicht zuletzt den hohen Forschungsaufwand erklärt, der

im relativ jungen Forschungszweig „Biofilme“ in den letzten Jahrzehnten betrieben wurde.

Vogt [1] untersuchte mittels Pulsed-Field-Gradient-NMR das Diffusionsverhalten von Wasser in Modellbiofilmen von Pseudomonas aeruginosa und fand, dass ein geringer Teil ($<$ 1%) des Wassers im Biofilm einen deutlich geringeren Diffusionskoeffizienten aufweist als freies Wasser, während der überwiegende Teil des Wassers das Diffusionsverhalten von freiem Wasser zeigt. Aufgrund der großen Heterogenität eines vollständigen Biofilms wurden diese Experimente zum besseren Verständnis auf einfache Modellsysteme, bestehend aus den beiden Hauptkomponenten der Biofilme, Polysaccharid und Wasser, übertragen. Das System Alginat/Wasser zeigte dabei ein ähnliches Verhalten, wie der vollständige Biofilm, nämlich eine kleine Fraktion „verlangsamten“ Wassers. Zur Erklärung dieses Phänomens wurden verschiedene Modelle herangezogen, eine vollständige Aufklärung der Herkunft des „verlangsamten“ Wassers gelang Vogt indes nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Herkunft des „verlangsamten“ Wassers in wässrigen Alginatsystemen zu ergründen und daraus ggf. Erkenntnisse über das Wasserrückhaltevermögen von Biopolymersystemen bzw. Biofilmen zu erlangen. Dabei wurden folgende Punkte bearbeitet:

- In **Kapitel 4** wird das Diffusionsverhalten von Wasser in Alginatlösungen mittels PFG-NMR untersucht. Zur Interpretation der Ergebnisse werden ergänzende Analysemethoden herangezogen. Die interpretierten PFG-Ergebnisse werden mit mathematischen Modellen auf Plausibilität geprüft.

- In **Kapitel 5** werden die Wechselwirkungen von Wasser und Alginat mit einer modifizierten Methode der 2D-NOE-Spektroskopie untersucht.

- **Kapitel 6** enthält die Interpretation des Phasendiagramms von Wasser/Alginat nach Borchard [2] mit Kernresonanzmethoden.

- In **Kapitel 7** wird das Diffusionsverhalten von Wasser in gequollenen und getrockneten Alginaten untersucht.

- In **Kapitel 8** schließlich wird der Einfluss von Proteinen auf die Wasserdiffusion im System Alginat/Wasser untersucht.

Kapitel 2

Theorie und Grundlagen

2.1 Biofilme

Bakterien werden traditionell als einzellige Organismen angesehen. Im Laufe der vergangenen Jahrzehnte fand man jedoch heraus, dass Multizellularität für die Majorität der Mikroorganismen die bevorzugte Erscheinungsform darstellt [3, 4]. Bakterien treten demzufolge vorwiegend in oberflächenassoziierten Zellansammlungen auf, die als Biofilme bezeichnet werden [5]. Man vermutet, dass diese Konsortien bereits vor 3,5 Milliarden Jahren die Erde besiedelten, so dass Biofilme heute als die älteste Form mehrzelligen Lebens gelten [6]. Unter dem Begriff Biofilm wird eine Vielzahl mikrobieller Aggregate, wie Schleime, Flocken, Aufwuchs sowie größere Ansammlungen von Biomasse in Form von Schlämmen, zusammengefasst. Das gemeinsame Merkmal dieser Aggregationsformen ist die Einbettung der Mikroorganismen in eine Matrix aus ***E****xtrazellulären* ***P****olymeren* ***S****ubstanzen (****EPS****)*, die den Zusammenhalt des Films gewährleistet und für die Anhaftung an Oberflächen sorgt [7, 8]. Stark verallgemeinert lassen sich für Biofilme folgende Hauptbestandteile anführen [9]:

- Wasser (meist mehr als 90%)
- EPS

- Zellen
- eingeschlossene Partikel
- sorbierte Ionen und polare sowie unpolare organische Moleküle

Für die Entstehung von Biofilmen sind neben den Mikroorganismen nur einige elementare Voraussetzungen notwendig: das Vorhandensein von Grenzflächen (Wasser/festes Medium, Wasser/Luft oder Luft/festes Medium), sowie Wasser und verwertbare Nährstoffe in ausreichender Menge. Biofilme sind daher nahezu allgegenwärtig und nehmen in vielen Bereichen, wie der Medizin oder in Industrieanlagen, eine nicht zu vernachlässigende Rolle ein [10]. Als Beispiele für unerwünschte Biofilme seien der bakterielle Zahnbelag [11], sowie mikrobielle Ablagerungen an Kathetern, Implantaten und Kontaktlinsen [12] genannt. Die Einbettung der Mikroorganismen in eine schützende Matrix kann zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber Desinfektionsmitteln führen, woraus ein erhöhtes Risiko lebensbedrohlicher, persistenter Infektionen resultiert [13]. Im industriellen Bereich sorgt Biofilmbewuchs ebenfalls für vielschichtige Probleme und die dadurch notwendige Vermeidung bzw. Entfernung der Filme verursacht häufig einen großen Zeit- und Kostenaufwand. In Wärmetauschern kann Biofilmaufwuchs als unerwünschter Isolator wirken und somit eine Reduzierung des Wärmetransfers verursachen [14]. Membranfilter (z.B. in Trinkwasseraufbereitungsanlagen) können durch Biofilmbewuchs irreversibel verblockt werden [15]. In Trinkwasserleitungssystemen können sich Wasserbakterien mit pathogenem Potenzial (opportunistische Krankheitserreger wie Legionellen oder atypische Mykobakterien) in Biofilmen ansiedeln, die durch eine übliche Trinkwasserchlorung nicht abzutöten sind [7]. Ebenfalls problematisch ist der Biofilmbewuchs von Schiffsrümpfen und anderen umströmten Objekten, da die heterogene, viskoelastische Oberflächenstruktur der Filme die Strömungseigenschaften ungünstig beeinflusst. Einen großen Bereich der Biofilmproblematik nimmt die sogenannte *Biokorrosion* ein. Unter diesem Begriff fasst man die Schädigung des durch Biofilme besiedelten Substrates zusammen. Biofilme sind nicht nur in der Lage, die Korrosion von Metalloberflächen zu beschleunigen, sondern vermögen ebenfalls, nichtmetallische Materialien, wie z.B. Mineralien oder Beton, in erheblichem Maße zu

schädigen [16, 17].

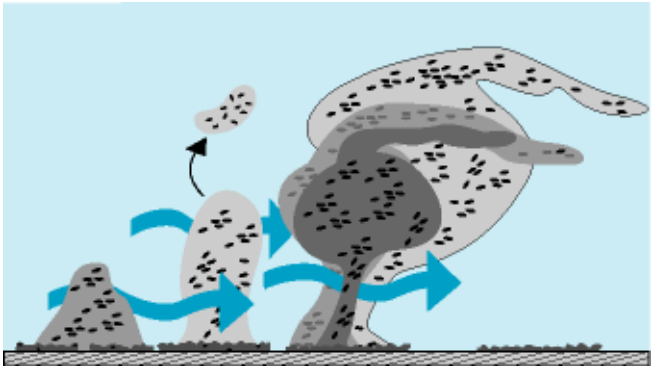


Abbildung 2.1: Struktur eines typischen Biofilms (z.B. in Fließgewässern). Die Mikroorganismen sind in die EPS-Matrix eingebettet, welche turm- bzw. pilzförmige Strukturen ausbildet. Diese Strukturen sind durchsetzt von offenen Wasserkanälen, in denen konvektive Flüsse auftreten, die eine Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff ermöglichen. Die Mikrokolonien in ihrer Matrix sind viskoelastisch und können somit von starker Strömung deformiert werden. Wenn die Scherkräfte zu groß werden, können sich Teile des Films ablösen und andernorts für neue Besiedlung und neuen Aufwuchs sorgen (nach Costerton [18, 8].

Neben der Vielzahl der unerwünschten Erscheinungsformen von Biofilmen gibt es jedoch auch technische Verfahren, die sich die Aggregierung von Mikroorganismen in matrixstabilisierten Kolonien zunutze machen. Vor allem in der Abwasseraufbereitung sind Biofilme maßgeblich für den Abbau organischer Substanzen verantwortlich. In Kläranlagen treten sie als Schlämme oder Flocken auf. Weitere Beispiele für erwünschten Biofilmbewuchs sind Sandfilter und Bioreaktoren. Die Vorteile immobilisierter Zellkolonien gegenüber Einzelorganismen sind eine erhöhte Rückhaltung der Zellen, höhere Zelldichten, Schutz vor toxischen Substanzen und eine verlängerte stoffwechselphysiologische Aktivität und somit eine effizientere Arbeitsweise der Anlagen [16].

Da natürlich vorkommende Biofilme sehr komplexe Systeme sind, die zudem meist mehrere mikrobielle Spezies enthalten und somit eine schier unüberschaubare Zahl an möglichen Interaktionen zwischen Organismen und Matrixsubstanzen hervorbringen können,

beschränkt man sich in der Biofilmforschung auf Modellsysteme. Einen häufig verwendeten Modellorganismus stellt dabei das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* dar. P. aeruginosa gehört zur Familie der *Pseudomonadaceae* und ist ein ubiquitäres, Gram-negatives, polar begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das keine Sporen bildet. Es handelt sich um ein anspruchsloses, chemoorganotrophes Bakterium mit aerobem Stoffwechsel, welches der γ-Gruppe der Proteobakterien zugeordnet wird [19]. P. aeruginosa ist ein opportunistischer Krankheitserreger, d.h. es stellt hauptsächlich für Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem eine Gefahr dar. So ist z.B. ein Großteil der Mukoviszidose-Erkrankten von chronischen Infektionen der Lunge mit P. aeruginosa betroffen [20]. Schleimbildende (mucoide) Stämme von P. aeruginosa lassen sich daher aus dem Sputum von Mukoviszidose-Patienten isolieren. Die Schleimbildung beruht auf einer Überproduktion des extrazellulären Polysaccharids Alginat [21] (s. **Abschnitt 2.2.1**). P. aeruginosa ist aber ebenso in der Lage, zahlreiche wässrige Systeme in der Natur und Technik zu besiedeln. So wurde der mucoide Stamm SG81, der als Hauptproduzent für Biofilme in der Forschergruppe „Physikalische Chemie von Biofilmen“ dient, aus einem industriellen Abwassersystem isoliert [22].

2.2 Extrazelluläre Polymere Substanzen (EPS)

Mikrobielle *Extrazelluläre Polymere Substanzen* sind Biopolymere, die von den Mikroorganismen synthetisiert werden und das „Baumaterial“ für Biofilme darstellen. Characklis und Wilderer [23] geben eine umfassende Definition des Begriffes *EPS*, wonach es sich um „*organische Polymere mikrobiellen Ursprungs, die in Biofilmsystemen häufig für die Bindung von Zellen und anderem partikulären Material untereinander (Kohäsion) und an das Substratum (Adhäsion) verantwortlich sind*“ handelt. Die EPS-Matrix ist ein sehr heterogenes, dynamisches Gebilde, das eine große Anzahl unterschiedlicher Substanzen enthalten kann. Sutherland [24] führt als Hauptkomponenten die Polysaccharide (neutrale und polyanionische Homo- und Heteropolymere) und Proteine (hauptsächlich Enzyme) an, die jeweils bis zu 1-2% der Gesamtbiofilmmasse einnehmen können. Weitere EPS-Bestandteile können Nucleinsäuren, (Phospho)lipide und Huminstoffe sein [25]. Die Bildung von EPS erfolgt durch aktive Sekretion von den lebenden Zellen durch die Zellmembranen an die

Zelloberfläche, Zelllysis oder die spontane Freisetzung von Bestandteilen (Lipopolysaccharide) der äußeren Zellmembranen von Gram-negativen Bakterien [26, 27, 28].

Tabelle 2.1: Funktionen der EPS in mikrobiellen Aggregaten (nach Wingender et al. [29])

Funktion	Bedeutung
Adhäsion an Oberflächen	Primärbesiedlung inerter und lebender Oberflächen, Akkumulation von Bakterien auf nährstoffreichen Oberflächen in oligotropher Umgebung
Aggregation von Zellen, Bildung von Flocken und Biofilmen	Brückenbildung zwischen Zellen, Immobilisierung von Mischpopulationen, Bildung von Mikrokonsortien, Ausbildung von hohen Zelldichten, Ermöglichung von interzellulärer Kommunikation
Strukturelement von Biofilmen	Vermittlung der mechanischen Stabilität (häufig zusammen mit di- oder trivalenten Kationen)
Schutzbarriere	Resistenz gegen Immunabwehrmechanismen, Resistenz gegen Biozide (Desinfektionsmittel und Antibiotika)
Wasserrückhaltung	Verhinderung der Austrocknung bei Wassermangel
Sorption von organischen Substanzen	Bereitstellung und Akkumulation von Nährstoffen aus der Umgebung
Sorption von anorganischen Ionen	Entgiftung durch Bindung toxischer Metallionen, Förderung der Polymer-Gelbildung
Enzymaktivitäten	Abbau exogener Makromoleküle zur Nährstoffgewinnung, Abbau von Strukturpolymeren der Matrix zur Zellfreisetzung
Interaktion von Polysacchariden und Enzymen	Akkumulation, Retention und Stabilisierung von extrazellulären Enzymen

Ebenso vielschichtig wie die Zusammensetzung der EPS sind die Aufgaben, die diese zu

erfüllen haben. Als wichtigste Funktion sei die Bildung einer Gelmatrix zur Fixierung der Mikroorganismen genannt [30, 31]. Eine Reihe weiterer Funktionen ist in **Tabelle 2.1** aufgeführt.

2.2.1 Polysaccharide

Polysaccharide sind der Hauptbestandteil der extrazellulären Komponenten der meisten Biofilme und der wichtigste Strukturbildner der Biofilmmatrix. Die Abkürzung *EPS* wird daher teilweise auch mit dem Begriff *Exopolysaccharide* gedeutet [32].
Polysaccharide sind hochpolymere Kohlenhydrate, die als Monomerbausteine zumeist Hexosen, wie D-Mannose, D-Glucose, D-Galaktose oder D-Fructose, bzw. Pentosen, wie L-Arabinose oder D-Xylose, enthalten. Die Monosaccharide in α- oder β-Konfiguration bilden durch glykosidische Bindungen in 1,3- bzw. 1,4-Position das Gerüst der Polysaccharide [33]. Extrazelluläre Polysaccharide zeigen eine große Diversität, da sie als Copolymere verschiedener Monomereinheiten auftreten können, im Gegensatz zu Proteinen Verzweigungen zwischen den Polymerketten ausbilden können und verschiedene Substituenten, wie O- bzw. N-Acetylgruppen, Pyruvat oder Succinat enthalten können. Zudem unterscheidet man neutrale Polysaccharide, wie Dextran, und polyanionische, wie das Alginat [34].
Polysaccharide sind die bisher am besten erforschten extrazelluläre Substanzen. Sie sind das entscheidende Strukturelement bei der Bildung der Biofilmmatrix und ermöglichen die mikrobielle Zelladhäsion an inerte Oberflächen, die dauerhafte Anhaftung an diese Oberflächen, sowie den engen Zusammenhalt der Zellen untereinander [35]. Die viskoelastischen Eigenschaften der Biofilme werden ebenfalls den Polysacchariden durch Bildung von Hydrogelen zugeschrieben. Dadurch lässt sich auch der hohe Grad der Hydratisierung der Biofilmmatrix erklären, der für ein Überleben der Zellen unter trockenen Bedingungen unerlässlich ist [36]. Viele mikrobielle Polysaccharide sind allerdings wasserlöslich, dadurch leicht zu entfernen und daher ineffektiv in Bezug auf die Anhaftung der bakteriellen Zellen an feste Substrate. Dies führt oft zur Ausbildung von Strukturen, wie z.B. Helices, die eine Aggregierung oder eine Netzwerkbildung der Polysaccharide bewirken können. Eben-

falls beobachtet man die Bildung fester Gele durch Verknüpfung von Polymerketten mit zweiwertigen Ionen, sowie Aggregierungen mit anderen Makromolekülen (z.B. Proteinen), wodurch die Biofilmmatrix stabilisiert wird [32].

Alginat

Alginate sind anionische, unverzweigte Copolymere aus den Uronsäureresten β-D-Mannuronat (M) und dessen C5-Epimer α-L-Guluronat (G) mit glykosidischer (1-4)-Verknüpfung (**Abbildung 2.2**). Alginat wird als Exopolymer von Braunalgen gebildet, wird aus diesen industriell isoliert und findet in der Lebensmittelindustrie eine weite Verbreitung als Verdickungsmittel. Einige Bakterien sind ebenfalls in der Lage, extrazelluläres Alginat zu produzieren. Bei mucoiden Stämmen von Pseudomonas aeruginosa stellt Alginat das vorwiegend produzierte Exopolysaccharid dar.

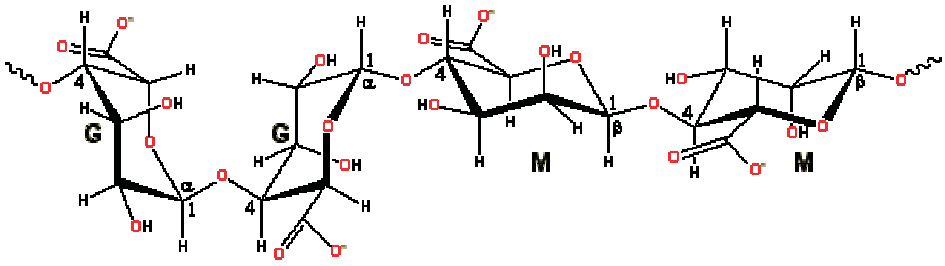


Abbildung 2.2: Ausschnitt aus einem Alginatmolekül mit den Monomereinheiten β-D-Mannuronat (M) und α-L-Guluronat (G).

Allen Alginaten ist gemein, dass sie hohe molare Massen haben (10^4 - 10^6 g/mol) und mit Wasser hochviskose Lösungen bilden. Algen- und Bakterienalginat weisen jedoch grundlegende Unterschiede auf. Im Algenalginat wurde eine statistische Verteilung der M- und G-Monomere gefunden, was zur Ausbildung gemischter Kettenbereiche (MGMG), wie auch homopolymerer Bereiche (MMM und GGG) führt. Homopolymere Guluronat-Bereiche sind in der Lage, mit zweiwertigen Ionen (vornehmlich Ca^{2+}) sog. *„Egg-Box-Strukturen“* auszubilden [33]. Dabei handelt es sich um sehr stabile Chelatkomplexe zwischen Calciumionen und Alginatketten, die zur Netzwerkbildung und somit zu einer sehr starken Gelierung führen. Schürks [37] zeigte anhand von Kernresonanzmessungen das Fehlen von

homopolymeren G-Bereichen im bakteriellen Alginat. Darüberhinaus zeichnet sich das Algenalginat durch das Fehlen von Substituenten am Zuckerring aus. Bakterienalginat weist dagegen eine teilweise O-Acetylierung der C2- bzw. C3-Atome der Mannuronateinheiten auf. Die Acetylgruppen sorgen für eine gewisse Abschirmung der Polymerketten und damit ebenfalls für eine eingeschränkte Gelbildung in Gegenwart von Calcium. Ionische Alginatgele sind in der Lage große Mengen Wasser zu binden [38]. Durch die Sequenzierung der Alginatkette und den Einbau von Substituenten sind die Mikroorganismen somit in der Lage, die Stabilität, die Viskoelastizität und das Wasserbindungsvermögen der Biofilmmatrix zu beeinflussen [39].

2.2.2 Proteine

Proteine sind ein weiterer Hauptbestandteile der EPS-Matrix. Ihre Funktion im Biofilm ist in weiten Teilen noch nicht aufgeklärt. Als Hauptfunktion der Proteine wird die Enzymaktivität angenommen. Extrazelluläre Enzyme, wie Polyssacharidasen, Lipasen, Esterasen, Peptidasen und Proteasen, wurden in vielen Biofilmen nachgewiesen [40]. Die extrazellulären Enzyme bewerkstelligen darin den Abbau exogener Makromoleküle, die in niedermolekularer Form von den Zellen als Nährstoffe aufgenommen und verstoffwechselt werden [41]. Lyasen und Polysaccharidasen werden als Regulatoren der Biosynthesen angenommen. Dabei regulieren sie die Kettenlängen der Biopolymere. Weiterhin können sie bei Nährstoffmangel durch Abbau der EPS-Matrix die Nährstoffversorgung der Mikroorganismen gewährleisten [42]. In jüngerer Zeit geht man davon aus, dass Proteine auch als Strukturbildner in der EPS-Matrix fungieren. Nach Higgins und Novak [43] können Proteine (Lektine) durch Verbrückung mit Polysaccharidketten dreidimensionale Netzwerkstrukturen ausbilden und so zur Stabilisierung der Matrix beitragen.

Lektine

Lektine sind Proteine, die an spezifische Kohlenhydratstrukturen zu binden vermögen und sowohl in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen vorkommen. Man nimmt an, dass Lektine eine zentrale Rolle bei Infektionen einnehmen und bestimmte Adhäsionsmecha-

nismen zwischen Bakterien und Wirtszellen vermitteln. Sie sind üblicherweise mit Zelloberflächenstrukturen, wie Pili und den äußeren Membranen Gram-negativer Bakterien assoziiert und besitzen keine enzymatische Funktion [44]. Der Lektin-Saccharid-Bindung liegen Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen zugrunde. Lektine werden hauptsächlich zum Nachweis spezifischer Polysaccharidstrukturen eingesetzt. Im Biofilm besteht eine mögliche Funktion der Lektine darin, Zellen an die EPS-Matrix bzw. an andere Zellen der Kolonie zu binden. Es wurde beobachtet, dass bestimmte Lektine die Aggregation suspendierter, planktonischer Bakterienzellen bewerkstelligen und somit ein Biofilmwachstum initiieren können [42].
In der EPS von *Pseudomonas aeruginosa* fand man zwei Lektine, *PA-IL (LecA)* und *PA-IIL (LecB)*, deren Strukturen mittlerweile aufgeklärt sind [45]. Die entscheidende Rolle, die diese Lektine bei Infektionen mit P. aeruginosa spielen, konnte nachgewiesen werden, da Patienten durch Gabe von LecA- und LecB-spezifischen Zuckerlösungen geheilt werden konnten [46].

2.3 Wasser im Biofilm

Die meisten Biofilme bestehen zu über 90% aus Wasser und werden daher als Hydrogele aufgefasst. Die Wasserbindung und -mobilität ist ein entscheidender Faktor für Transportprozesse innerhalb des Biofilms, wie auch für die Entwässerung von Schlämmen. Eine Vielzahl von Studien befasst sich daher mit der Beweglichkeit von Wasser in Biofilmen, Hydrogelen und, aufgrund der wirtschaftlichen Relevanz, im besonderen Maße in Klärschlämmen. In diesem Zusammenhang wird häufig zwischen *„freiem“* und *„gebundenem“* Wasser unterschieden, wobei der Begriff *„gebundenes Wasser“* meist nicht im physikalisch-chemischen Sinne zu verstehen ist, sondern vielmehr das Wasser bezeichnet, das nicht durch Druck, sondern nur durch thermische Behandlung zu entfernen ist [47].
Nach Colin und Gazbar [48] lässt sich das Wasser in Abwässerschlämmen in folgende Fraktionen unterteilen:

- *Freies Wasser*, welches den größten Teil des Klärschlammes darstellt. Es verhält sich

thermodynamisch wie reines Wasser und kann leicht durch Pressen entfernt werden.

- *Gebundenes Wasser*, welches nur einen kleinen Teil der Gesamtwassermenge repräsentiert, aber im Regelfall eine größere Masse einnimmt als die festen Bestandteile des Schlamms. Rolf und Halde [49] unterscheiden drei Typen gebundenen Wassers:

1. *Chemisch gebundenes Wasser*, welches über starke chemische Bindungen an die Matrixmoleküle gebunden ist. Es kann durch thermische Behandlung über 105°C entfernt werden.

2. *Physikalisch gebundenes Wasser*, welches an die Matrix adsorbiert, bzw. von dieser absorbiert ist. Es kann ebenfalls durch thermische Trocknung entfernt werden.

3. *Mechanisch gebundenes Wasser*, welches sich in Mikro- und Makrokapillaren poröser Festkörper befindet.

Gebundenes Wasser wird üblicherweise über das Einfrierverhalten in dilatometrischen oder kalorimetrischen Messungen bestimmt. Nach Smollen [50] kann das gebundene Wasser bis zu 7% des Gesamtwassergehaltes im Biofilm einnehmen. Colin und Gazbar [48] ermittelten in Schlämmen sogar einen Anteil von über 10%.
Schmitt und Flemming [47] konnten in FTIR-Untersuchungen einen verlangsamten H_2O/ D_2O-Austausch in intakten Biofilmen detektieren, was auf eine eingschränkte Wassermobilität im Biofilm hinweist.
Lens et al. [51, 52] ermittelten durch PFG-NMR-Messungen an Schlämmen große Wasserfraktionen mit nur leicht eingeschränkter Diffusivität ($\mathcal{D} = 1 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ gegenüber $\mathcal{D} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ in reinem Wasser).

2.4 Diffusion

Die Diffusion beschreibt die Bewegung von Materieteilchen aufgrund ihres Bestrebens zur Durchmischung. Die Triebkraft der Diffusion resultiert einerseits aus dem zufälligen Muster der Brown´schen Molekularbewegung (*Selbstdiffusion*) oder aus einem Gradienten

des chemischen Potentials μ, der durch einen Konzentrations-, Druck- oder Temperaturgradienten hervorgerufen werden kann (*Transportdiffusion*) [53].

2.4.1 Transportdiffusion

Den fundamentalen Zusammenhang zur Beschreibung der Transportdiffusion liefert das *1. Fick´sche Gesetz*:

$$J = -D\frac{\partial c}{\partial z} \tag{2.1}$$

Die Diffusionsstromdichte oder der Fluss J entspricht dabei der Stoffmenge, die in einem Zeitintervall durch eine Bezugsfläche senkrecht hindurchtritt. Dieser Fluss ist proportional zum Gradienten der Konzentration. Der Proportionalitätsfaktor D ist der Diffusionskoeffizient der betrachteten Substanz mit der Dimension [Länge^2 Zeit^{-1}].

Die Diffusionsgleichung

Die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten nach **Gleichung 2.1** ist im allgemeinen schwierig, da sowohl J als auch $\partial c/\partial z$ der Messung zugänglich sein müssen. In der Praxis ist es im Normalfall einfacher, die zeitliche Änderung der Konzentration als Resultat der Diffusion zu beobachten. Daher ist es sinnvoll, einen Zusammenhang zwischen D und $\partial c/\partial t$ zu ermitteln. Diese Diffusionsgleichung erhält man aus dem 1. Fick´schen Gesetz unter Berücksichtigung einer ausgeglichenen Stoffmengenbilanz [54].
Die Anzahl der Teilchen, die im Zeitintervall Δt die Fläche A durchdringen, ist:

$$A\Delta t J = -A\Delta t D\frac{\partial c}{\partial z} \tag{2.2}$$

Betrachtet man nun zwei gleich große Flächen A_1 und A_2, die die gegenüberliegenden Seiten eines Volumenelements $\Delta V = A\Delta z$ bilden, so ist die Differenz zwischen den Teilchenzahlen, die während Δt die Flächen A_1 und A_2 durchwandern:

$$A\Delta t D\left[\left(\frac{\partial c}{\partial z}\right)_2 - \left(\frac{\partial c}{\partial z}\right)_1\right] \tag{2.3}$$

Diese Differenz muss der Änderung der Teilchenzahl im betroffenen Volumenelement ΔV entsprechen. Δc sei die Konzentrationsänderung in ΔV. Dann entspricht $\Delta c A \Delta z$ der Änderung der Teilchenzahl und es gilt:

$$A\Delta t D \left[\left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_2 - \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_1 \right] = \Delta c A \Delta z \tag{2.4}$$

Durch Umstellen erhält man:

$$\frac{D \left[\left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_2 - \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_1 \right]}{\Delta z} = \frac{\Delta c}{\Delta t} \tag{2.5}$$

Der Übergang auf infinitesimale Größen liefert dann:

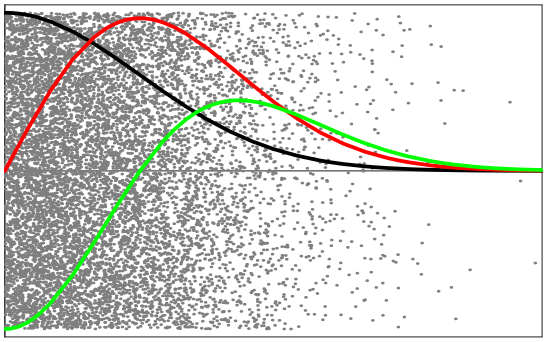
$$D \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} = \frac{\partial c}{\partial t} \tag{2.6}$$

Gleichung 2.6 ist die zeitabhängige Diffusionsgleichung für einen eindimensionalen Fluss (*2. Fick´sches Gesetz*). Zur Beschreibung der Diffusion in drei Dimensionen wird daraus:

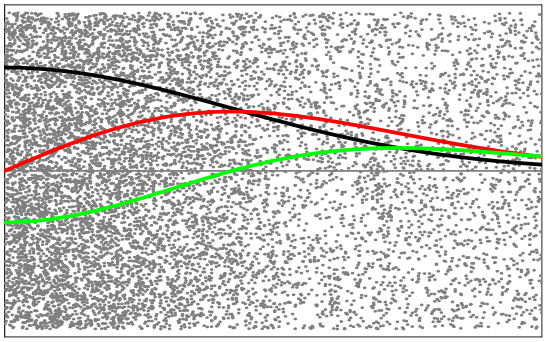
$$D \nabla^2 c = \frac{\partial c}{\partial t} \tag{2.7}$$

Der Laplace-Operator ∇^2 ist dabei definiert als:

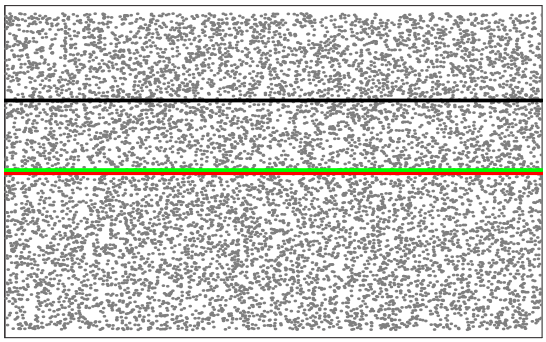
$$\nabla^2 = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \tag{2.8}$$



a) $\partial c/\partial z \neq 0$



b) $\partial c/\partial z \neq 0$



c) $\partial c/\partial z = 0$

Abbildung 2.3: 1. und 2. Fick´sches Gesetz der Diffusion: die Kurven repräsentieren die Konzentration c (schwarz), $-\partial c/\partial z$ (rot) und $\partial^2 c/\partial z^2$ (grün).

Abbildung 2.3 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Konzentration c, dem Fluss J und der daraus resultierenden zeitlichen Änderung der Konzentration gemäß den Fick´schen Gesetzen. Für drei verschiedene eindimensionale Konzentrationsprofile sind c, $-\partial c/\partial z$ (als Maß des Flusses), sowie $\partial^2 c/\partial z^2$ (als Maß der zeitlichen Konzentrationsänderung) dargestellt. Ein durchgängig positiver Verlauf von $-\partial c/\partial z$ bedeutet, dass an jeder z-Koordinate innerhalb des Kastens ein Fluss in z-Richtung (nach rechts) resultiert. Das Vorzeichen von $\partial^2 c/\partial z^2$ bestimmt die Zu- bzw. Abnahme der Konzentration an der entsprechenden Ortskoordinate. Ein verminderter Konzentrationsgradient (b) führt zu einem verringerten Fluss und damit zu einer geringeren zeitlichen Konzentrationsänderung. Im Falle einer gleichmäßig verteilten Konzentration (c) tritt keine Transportdiffusion

($-\partial c/\partial z = 0$; $\partial^2 c/\partial z^2 = 0$), sondern lediglich Selbstdiffusion aufgrund der Brown´schen Molekularbewegung auf.

Die Lösung der Diffusionsgleichung

Für zahlreiche einfache Geometrien wurden Lösungen der Diffusionsgleichung ermittelt [54, 55]. Im Falle einer eindimensionalen Diffusion entlang z mit der Startbedingung, dass sich alle Teilchen zum Zeitpunkt $t = 0$ am Ort $z = 0$ befinden, lässt sich für **Gleichung 2.6** die folgende Lösung angeben:

$$c(z,t) = \frac{N}{2\sqrt{\pi D t}}\, e^{-\frac{z^2}{4Dt}} \tag{2.9}$$

N repräsentiert dabei die Gesamtmenge der diffundierenden Teilchen. Die Lösung der Diffusionsgleichung für $t > 0$ stellt eine Gauss´sche Verteilung dar. Die Herleitung der Lösung der Diffusionsgleichung ist nicht trivial, ihre Gültigkeit lässt sich jedoch durch Integration veranschaulichen. Es gilt:

$$\int_{-\infty}^{\infty} e^{-\frac{z^2}{4Dt}}\, dz = 2\sqrt{\pi D t} \tag{2.10}$$

Somit ist die Gesamtmenge der diffundierenden Substanz:

$$\int_{-\infty}^{\infty} c(z,t)dz = N \tag{2.11}$$

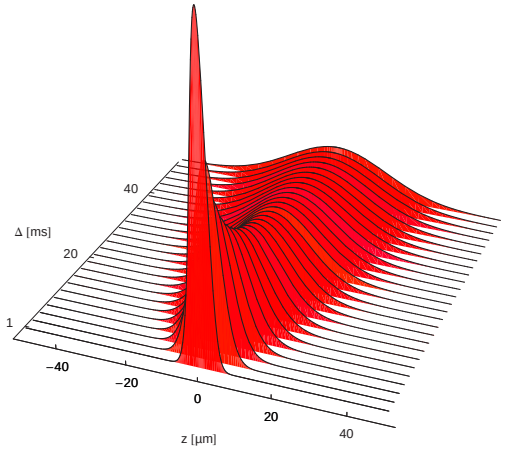


Abbildung 2.4: Gauss´sches Diffusionsprofil: Zeitliche Entwicklung der Konzentrationsverteilung.

Abbildung 2.4 illustriert das Gauss´sche Diffusionsprofil für verschiedene Diffusionszeiten. Die Konzentration bei $z = 0$ nimmt mit der Zeit ab und ist proportional zu $1/\sqrt{2Dt}$. Die Breite der Konzentrationsverteilung steigt mit der Zeit an und ist proportional zu $\sqrt{2Dt}$. Die Fläche unter den Kurven repräsentiert die Gesamtmenge der diffundierenden Substanz, welche im zeitlichen Verlauf konstant bleibt.

2.4.2 Selbstdiffusion

In Abwesenheit eines Konzentrationsgradienten unterliegen Materieteilchen aufgrund ihrer ungeordneten, thermischen Bewegung der Selbstdiffusion [56]. Selbstdiffusionskoeffizienten werden zur Unterscheidung von Transportdiffusionskoeffizienten D mit $\mathcal{D}$ gekennzeichnet. Selbstdiffusion tritt sowohl in Gasen ($\mathcal{D} \sim 10^{-4} - 10^{-5}\,\mathrm{m^2/s}$) und Flüssigkeiten ($\mathcal{D} \sim 10^{-9} - 10^{-10}\,\mathrm{m^2/s}$), als auch in Festkörpern ($\mathcal{D} \sim 10^{-14} - 10^{-15}\,\mathrm{m^2/s}$) auf [57]. Zum Verständnis der Selbstdiffusion eignet sich die Betrachtung der unkorrelierten Bewegung eines sog. *Random Walk* in einer Dimension [54, 58].

Der Random Walk

Ein diffundierendes Teilchen, der Random Walker, mache ein Anzahl Schritte der Länge l in willkürlicher, gleich wahrscheinlicher Richtung nach links oder rechts. Nach N Schritten beträgt die Verschiebung des Walkers von seiner ursprünglichen Position:

$$\langle z(N)\rangle = l_1 + l_2 + l_3 + l_4 + \ldots + l_N \tag{2.12}$$

Jeder Schritt l_i hat die gleiche Länge l, jedoch je nach Richtung ein entgegengesetztes Vorzeichen $+l$ und $-l$. Da beide Richtungen gleich wahrscheinlich sind, ist der Mittelwert der Entfernung des Walkers vom Ausgangspunkt Null:

$$\overline{\langle z(N)\rangle} = 0 \tag{2.13}$$

Bei Betrachtung einer großen Zahl Random Walker resultiert die gemittelte Endposition von Null aus einer Streuung der einzelnen Endpositionen um diesen Wert. Ein Maß für die Streuung um den Mittelwert ist das Verschiebungsquadrat:

$$\langle z^2(N)\rangle = \sum_{i=1}^{N}\langle l_i^2\rangle + \sum_{i\neq j}\langle l_i l_j\rangle \tag{2.14}$$

Der erste Term enthält die Quadrate der Summanden aus **Gleichung 2.12** und liefert daher ausschließlich positive Summanden. Der zweite Term enthält alle Produkte der einzelnen Summanden mit jedem anderen. Da hierbei mit gleicher Wahrscheinlichkeit positive und negative Glieder gleichen Betrags miteinander multipliziert werden, ist der Mittelwert der zweiten Summe Null, so dass sich das mittlere Verschiebungsquadrat ausdrücken lässt durch:

$$\overline{\langle z^2(N)\rangle} = N\, l^2 \tag{2.15}$$

Ersetzt man nun die Anzahl der Schritte N durch das Produkt aus der Schrittrate Γ und der Zeit t, die für die N Schritte benötigt wird, so lässt sich folgende Substitution vornehmen:

$$\frac{1}{2}\, l^2\, \Gamma = \mathcal{D} \tag{2.16}$$

Daraus lässt sich schließlich das mittlere Verschiebungsquadrat des Random Walkers mit folgender Gleichung beschreiben, die 1905 von Albert Einstein vorgestellt wurde [59, 60]:

$$\overline{\langle z^2(N)\rangle} = 2\,\mathcal{D}\,t \tag{2.17}$$

$\mathcal{D}$ ist dabei der Selbstdiffusionskoeffizient. Im dreidimensionalen Fall gilt analog:

$$\overline{\langle z^2(N)\rangle} = 6\,\mathcal{D}\,t \tag{2.18}$$

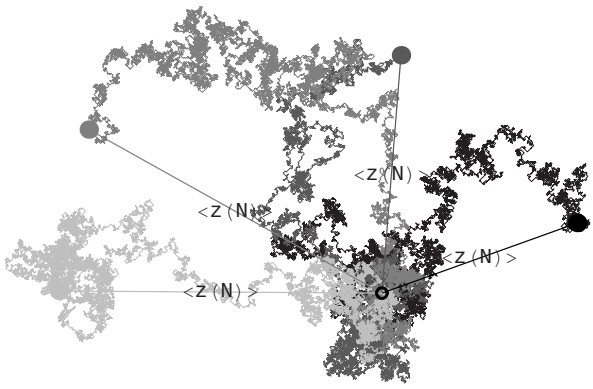


Abbildung 2.5: Zweidimensionaler Random Walk von vier Teilchen mit gleichem Startpunkt: wie im eindimensionalen Fall gilt auch hier für eine große Anzahl Walker $\overline{\langle z(N)\rangle} = 0$.

Die Wahrscheinlichkeit der Endposition eines Random Walkers kann für kleine N leicht ermittelt werden (**Tabelle 2.2**).

Tabelle 2.2: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Endposition beim 1-dimensionalen Random Walk

z	-5	-4	-3	-2	-1	0	$+1$	$+2$	$+3$	$+4$	$+5$
Start						1					
nach Schritt 1					$\frac{1}{2}$		$\frac{1}{2}$				
nach Schritt 2				$\frac{1}{4}$		$\frac{2}{4}$		$\frac{1}{4}$			
nach Schritt 3			$\frac{1}{8}$		$\frac{3}{8}$		$\frac{3}{8}$		$\frac{1}{8}$		
nach Schritt 4		$\frac{1}{16}$		$\frac{4}{16}$		$\frac{6}{16}$		$\frac{4}{16}$		$\frac{1}{16}$	
nach Schritt 5	$\frac{1}{32}$		$\frac{5}{32}$		$\frac{10}{32}$		$\frac{10}{32}$		$\frac{5}{32}$		$\frac{1}{32}$

Die Wahrscheinlichkeit für jede mögliche Endposition wird dabei durch eine Standardbinomialverteilung beschrieben, bei der jeder Ausdruck durch 2^N dividiert wird, um die Gesamtwahrscheinlichkeit auf 1 zu normieren. Die Wahrscheinlichkeit P, den Random Walker nach N Schritten am Ort z zu finden, ist somit gegeben durch:

$$P(N,z) = \frac{1}{2^N} \frac{N!}{\left(\frac{N+z}{2}\right)! \left(\frac{N-z}{2}\right)!} \tag{2.19}$$

Mit der Näherung $\ln(N!) \approx (N+1)\ln N - N + \ln(2\pi)/2$, die exakter als die übliche Stirling Approximation ist, sowie $\ln(1 \pm z/N) \approx \pm z/N - (z/N)^2/2$, wird **Gleichung 2.19** zu:

$$P(N,z) = \sqrt{\frac{1}{2\pi N}}\, e^{-\frac{z^2}{2N}} \tag{2.20}$$

Mit $l = 1$ und Substitution gemäß **Gleichung 2.16** wird die Wahrscheinlichkeit des Random Walk zu:

$$P(t,z) = \sqrt{\frac{1}{4\pi \mathcal{D} t}}\, e^{-\frac{z^2}{4\mathcal{D}t}} \tag{2.21}$$

Diese Wahrscheinlichkeitsverteilungsfunktion wird auch ***Propagator*** genannt. In Analogie zur Lösung der Transportdiffusionsgleichung (**Gleichung 2.9**) hat auch der Propagator der freien Selbstdiffusion die Gestalt einer Gaussverteilung.

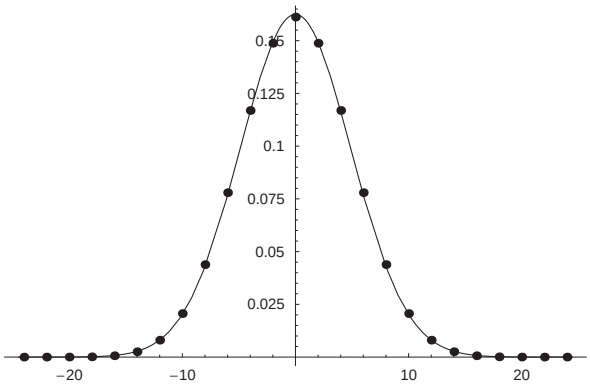


Abbildung 2.6: Vergleich der Binomialverteilung des Random Walks mit der Lösung der Diffusionsgleichung.

Gehinderte Diffusion

In den vorangegangen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Ausbreitung von Teilchen durch Selbst- oder Transportdiffusion mit einer Gaussverteilung beschrieben werden kann. Diese Beschreibung setzt allerdings voraus, dass die Teilchenbewegung in einem homogenen Medium beobachtet wird, welches, bezogen auf die Diffusionszeit, eine unendliche Ausdehnung hat. In vielen Fällen ist diese Bedingung jedoch nicht erfüllt, da die beobachtete Spezies innerhalb der Diffusionszeit auf Barrieren treffen kann, so dass die Diffusion gehindert ist und somit vom Gauss´schen Verhalten abweicht. Diese Hinderung kann je nach Geometrie eine unterschiedliche Dimensionalität haben, z.B. Hinderung in einer Dimension bei Diffusion entlang Grenzschichten oder in drei Dimensionen bei Diffusion innerhalb von Poren. **Abbildung 2.7** zeigt den zweidimensionalen Random Walk von zwei Teilchen, wovon sich das eine frei ausbreiten kann, während das zweite in einer Pore eingeschlossen ist.

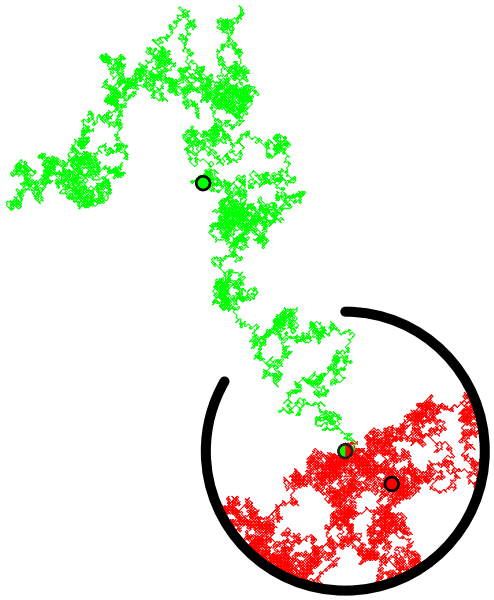


Abbildung 2.7: Zweidimensionaler Random Walk bei freier (grün) und gehinderter Diffusion (rot).

Das Verhältnis von mittlerem Verschiebungsquadrat zur Diffusionszeit ist im Falle freier Diffusion konstant und proportional zum (Selbst-)diffusionskoeffizienten. Anhand des Random Walks der gehinderten Diffusion lässt sich leicht nachvollziehen, dass dieses Verhältnis zeitabhängig wird, wenn eine Diffusionsbarriere existiert, da das Teilchen auch bei langen Diffusionszeiten nur eine begrenzte Verschiebung erfahren kann. Nach **Gleichung 2.17** gilt für freie Diffusion:

$$\frac{\overline{\langle z^2(N)\rangle}}{t} = 2\,\mathcal{D} = const \tag{2.22}$$

Im Falle gehinderter Diffusion gilt hingegen:

$$\frac{\overline{\langle z^2(N)\rangle}}{t} = F(t) \tag{2.23}$$

Diese Beziehung ist von entscheidender Bedeutung für die Diffusionsmessungen mittels PFG-NMR, da diese Methode Diffusionskoeffizienten über die mittlere Verschiebung der

Teilchen innerhalb eines Zeitintervalls bestimmt (**Abschnitt 2.5.2**).

Betrachtet man den eindimensionalen Propagator eines Random Walkers mit einer vollständig reflektierenden Diffusionsbarriere an der Position z_1, ist die Wahrscheinlichkeit des Teilchens, sobald es z_1 erreicht, für den nächsten Sprung nicht mehr 0,5 für $-z$ und $+z$, sondern es muss zwangsläufig nach $-z$ springen. Für den Propagator gilt dann:

$$P(N, z < z_1) = P(N, z) + P(N, 2z_1 - z) \quad \text{und} \quad P(N, z > z_1) = 0 \tag{2.24}$$

Bzw. nach Substitution von N:

$$\begin{aligned} P(t, z < z_1) =& P(t, z) + P(t, 2z_1 - z) \\ & \sqrt{\frac{1}{4\pi\mathcal{D}t}} \left[e^{-\frac{z^2}{4\mathcal{D}t}} + e^{-\frac{(2z_1 - z)^2}{4\mathcal{D}t}} \right] \end{aligned} \tag{2.25}$$

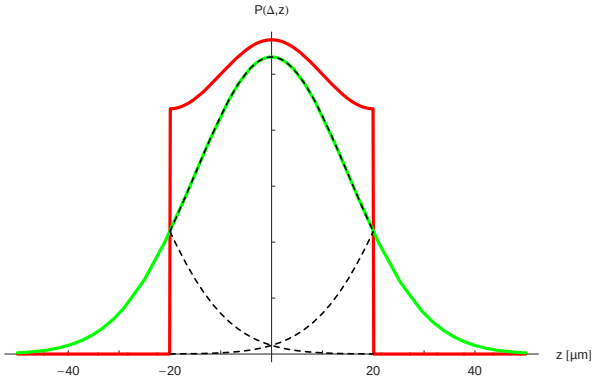


Abbildung 2.8: Propagator der *„Gauss´schen“* freien Diffusion (grün), sowie der *„nicht-Gauss´schen“* gehinderten Diffusion an einer undurchlässigen Barriere (rot).

Abbildung 2.9 zeigt die zeitliche Entwicklung des Propagators im Falle gehinderter Diffusion. Während im Bereich kurzer Diffusionszeiten eine ungehinderte Ausbreitung stattfinden kann und somit zu Gauss´schem Diffusionsverhalten führt, wird die Abweichung

vom Gauss´schen Verhalten mit zunehmender Diffusionszeit immer größer. Dieser Sachverhalt ermöglicht es, durch Diffusionsmessungen mit unterschiedlichen Diffusionszeiten, die Größenordnungen von Poren abzuschätzen (**Abschnitt 4.5.1**).

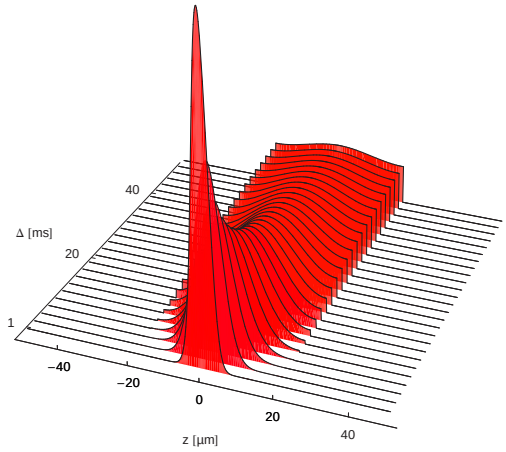


Abbildung 2.9: Propagator der gehinderten Diffusion in Abhängigkeit der Diffusionszeit

2.5 NMR-Spektroskopie

Den Arbeitsgruppen um Felix Bloch und Edward M. Purcell gelang es 1946 unabhängig voneinander, Kernresonanzsignale (***N****uclear* ***M****agnetic* ***R****esonance*) nachzuweisen. Seitdem hat sich die NMR-Spektroskopie zu einer der wichtigsten und vielseitigsten Analysemethoden in den Naturwissenschaften sowie der Medizin entwickelt. Zeigten die anfänglichen NMR-Methoden im ***c****ontinuous* ***w****ave*-Verfahren noch deutliche Parallelen zur klassischen Spektroskopie, so hat in den vergangenen 40 Jahren die *Impuls*-NMR zu einer Fülle verschiedener Experimente in einer, zwei und sogar drei und mehr Dimensionen geführt [61, 62, 63].

2.5.1 Grundlagen der Impuls-NMR

Eine Reihe von Isotopen besitzt einen von Null verschiedenen Kernspin I. Diese Kerne bezeichnet man als NMR-aktiv, da aus diesem Kernspin ein magnetisches Moment μ resultiert. Die wichtigsten NMR-aktiven Kerne ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{19}F und ^{31}P besitzen einen Kernspin $I = 1/2$, d.h. das magnetische Moment kann zwei unterschiedliche, energetisch entartete Orientierungen (α und β) annehmen. Werden nun die Kerne einem äußeren Magnetfeld B_0 ausgesetzt, so ist die energetische Entartung aufgehoben und es resultiert daraus die sog. Zeeman-Aufspaltung in zwei Energieniveaus.

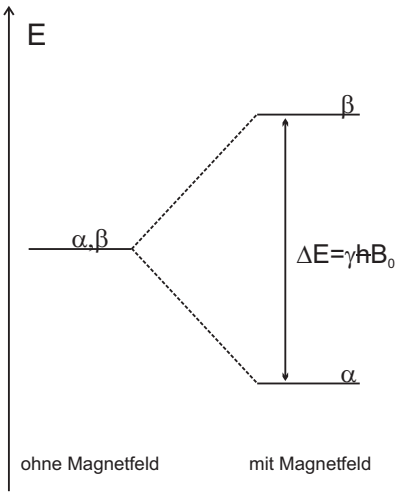


Abbildung 2.10: Zeeman-Aufspaltung eines Spin-1/2 Kerns mit $\gamma > 0$ (z.B. ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F)

Die Energiedifferenz zwischen den beiden Zeeman-Niveaus ist proportional zum angelegten Magnetfeld:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \tag{2.26}$$

Das gyromagnetische Verhältnis γ ist eine für jedes Isotop charakteristische Konstante. Die Besetzung der energetisch unterschiedlichen Zustände α und β läßt sich durch die

Boltzmannverteilung mit den Besetzungszahlen N_α und N_β ausdrücken.

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \mathrm{e}^{\frac{-\Delta E}{kT}} \tag{2.27}$$

Bei Raumtemperatur ist der Besetzungsunterschied ausgesprochen gering, aber dennoch allein verantwortlich für das NMR-Signal. Die Kernspins präzedieren mit der Larmorfrequenz ω_0 um die Achse des Magnetfeldes B_0 (üblicherweise die z-Achse), die ebenfalls proportional zum angelegten Magnetfeld ist:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \tag{2.28}$$

Das Magnetfeld B_0 kann je nach chemischer Umgebung des untersuchten Kerns verstärkt oder abgeschwächt werden, so dass die Larmorfrequenz jedes Kerns von seinem lokalen Magnetfeld B_{eff} abhängt:

$$\omega_{0,eff} = \gamma B_{eff} = \gamma(B_0 - \sigma B_0) = \gamma(1 - \sigma)B_0 \tag{2.29}$$

Dieser Tatsache ist es zu verdanken, dass man ein klassisches NMR-Frequenzspektrum erhält, da identische Kerne (z.B. ^{1}H) in unterschiedlichen chemischen Umgebungen unterschiedliche und damit charakteristische Resonanzlinien zeigen. Die chemische Verschiebung σ ist dabei unabhängig vom Magnetfeld B_0 und gibt die Abweichung der Resonanzfrequenz einer Spezies von einer Referenzsubstanz an.

Da der α-Zustand etwas stärker besetzt ist als der β-Zustand resultiert aus den Präzessionen der α- und β-Spins eine Gesamtmagnetisierung M parallel zur Magnetfeldrichtung. Im NMR-Experiment wird nun der Gesamtmagnetisierungsvektor M_z durch einen Radiofrequenzpuls aus einer Spule in der x, y-Ebene aus seiner Gleichgewichtslage herausgedreht. Der Drehwinkel ist dabei abhängig von der Pulsleistung B_1 und der Pulslänge τ_p. Wird der Puls so gewählt, dass der Magnetisierungsvektor in die x, y-Ebene gedreht wird, spricht

man von einem 90°($\pi/2$)-Puls, eine Umkehrung der Besetzungszahlen N_α und N_β entspricht einem 180°(π)-Puls. Nach dem Radiofrequenzpuls präzedieren die Kernspins in der x, y-Ebene mit ihrer Larmorfrequenz $\omega_{0,eff}$ und induzieren dadurch einen Strom in der Empfängerspule, die ebenfalls in der x, y-Ebene liegt. Die Kernspins relaxieren gemäß den Blochgleichungen zurück in den Gleichgewichtszustand:

$$\frac{\mathrm{d}M_z}{\mathrm{d}t} = -\frac{M_z - M_0}{T_1} \tag{2.30}$$

$$\frac{\mathrm{d}M_{x'}}{\mathrm{d}t} = -\frac{M_{x'}}{T_2} \quad \text{und} \quad \frac{\mathrm{d}M_{y'}}{\mathrm{d}t} = -\frac{M_{y'}}{T_2} \tag{2.31}$$

T_1 ist die *Spin-Gitter-* oder *longitudinale* Relaxationszeit und T_2 ist die *Spin-Spin-* oder *transversale* Relaxationszeit. Der durch Relaxation mit der Zeit abnehmende induzierte Strom erzeugt als Signal einen FID (***F**ree **I**nduction **D**ecay*). Dieser wird durch eine Fourier-Transformation (**Gleichung 2.32**) von der Zeitdomäne ($f(t)$) in die Frequenzdomäne ($g(\omega)$) überführt, welche dem klassischen NMR-Spektrum entspricht (**Abbildung 2.11**).

$$g(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \tag{2.32}$$

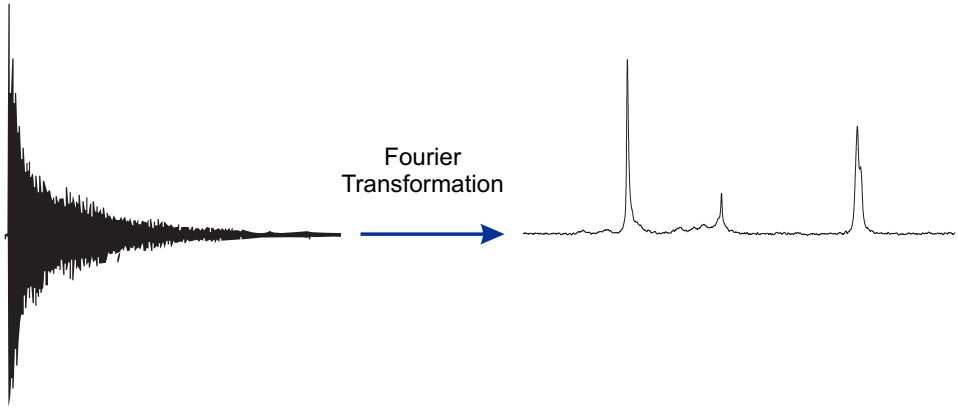


Abbildung 2.11: Überführung des FID in die Frequenzdomäne durch Fourier-Transformation

2.5.2 PFG-NMR-Spektroskopie

Die translatorische Bewegung von Molekülen in Flüssigkeiten und Systemen, die Flüssigkeiten enthalten, ist von großer Bedeutung für eine Vielzahl physikalischer, chemischer und biologischer Prozesse. Schon sehr früh wurde erkannt, dass die NMR-Spektroskopie ein vielseitiges, nichtinvasives Werkzeug zur Diffusionsmessung darstellt. Aus der Kombination von Spin-Echo Pulssequenzen (Hahn, 1950 [64]) mit Magnetfeldgradienten (Carr/Purcell, 1954 [65]) entstand die ***P**ulsed **F**ield **G**radient*-NMR-Spektroskopie, die es ermöglicht, Diffusionskoeffizienten in Flüssigkeiten, porösen Systemen, gequollenen Polymeren oder auch Zellen zu messen. Die durch die Feldgradienten gewonnene Ortskodierung der Spins bildet außerdem die Grundlage für medizinische Bildgebungsverfahren (MRI) [66, 67, 68, 69].

Magnetische Feldgradienten zur Ortskodierung von Spins

Zum Verständnis der Wirkung von magnetischen Feldgradienten auf ein Spinensemble bedient man sich der Larmorfrequenz [70, 71]:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \tag{2.33}$$

Das Magnetfeld B_0 sei homogen und wirke entlang der z-Achse. Die Larmorfrequenz ist dann in z-Richtung ebenfalls konstant. Wirkt nun zusätzlich zu B_0 ein ortsabhängiger Magnetfeldgradient g [T/m], wird ω abhängig von der Ortskoordinate:

$$\omega_{eff}(r) = \omega_0 + \gamma(g \cdot r) \tag{2.34}$$

Im allgemeinen Fall eines Gradienten in allen drei Raumrichtungen besteht g aus:

$$g = \nabla B_0 = \frac{\partial B_z}{\partial x} i + \frac{\partial B_z}{\partial y} j + \frac{\partial B_z}{\partial z} k \tag{2.35}$$

i, j und k sind darin Einheitsvektoren der drei Raumrichtungen des Laborkoordinatensystems. Während es bei Imaging-Verfahren, z.B. in der Medizin, durchaus üblich ist, Feldgradienten in allen drei Raumrichtungen zu verwenden, wird in der PFG-Spektroskopie

nahezu ausschließlich ein z-Gradient parallel zu B_0 verwendet, so dass sich die ortsabhängige Larmorfrequenz vereinfacht zu:

$$\omega_{eff}(z) = \gamma(B_0 + gz) \tag{2.36}$$

Die ortsabhängige Larmorfrequenz sorgt dafür, dass ein Spin in Abhängigkeit seiner z-Koordinate im rotierenden Koordinatensystem eine Phasenverschiebung gegenüber einem Spin erfährt, der keinem Feldgradienten ausgesetzt war. Nach einer Zeit t lässt sich der Phasenwinkel ϕ eines Spins ausdrücken durch den Beitrag des statischen B_0 Feldes und den Beitrag des Feldgradienten g:

$$\phi(t) = \underbrace{\gamma B_0 t}_{\text{statisches Feld}} + \underbrace{\gamma \int_0^t gz \, \mathrm{d}t}_{\text{Feldgradient}} \tag{2.37}$$

Nimmt man nun an, der Feldgradient g wirke auf das Spinsystem eine Zeit δ, so beträgt die Phasenverschiebung für jeden Spin i mit der Ortskoordinate z_i vor dem Feldgradientenpuls:

$$\phi_i(\tau) = \gamma B_0 \tau \tag{2.38}$$

sowie nach dem Gradientenpuls:

$$\phi_i(\tau + \delta) = \underbrace{\gamma B_0 \tau}_{\text{statisches Feld}} + \underbrace{\gamma \int_\tau^{\tau+\delta} gz_i \, \mathrm{d}t}_{\text{Feldgradient}} \tag{2.39}$$

Für einen Gradienten, der während δ eine konstante Amplitude besitzt, lässt sich das Integral auflösen:

$$\phi_i(\tau + \delta) = \omega_0(\tau + \delta) + \gamma g \delta z_i \tag{2.40}$$

Die Spins erhalten durch ihren individuellen Phasenwinkel eine Ortskodierung, die sich wieder auslesen lässt, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird. Die „Dephasierungsleistung“ eines Gradienten ist dabei gegeben durch das Produkt $\gamma\delta g$ und hängt damit vom untersuchten Kern, der Gradientenstärke sowie der Gradientpulsdauer ab.

Das PFG-NMR-Experiment

PFG-NMR-Experimente werden üblicherweise mit der Pulssequenz des ***Hahn-Echos*** (bzw. Spin-Echo **SE, Abbildung 2.12**) oder des ***Stimulated-Echos*** (**STE, Abbildung 2.13**) durchgeführt [72, 73].

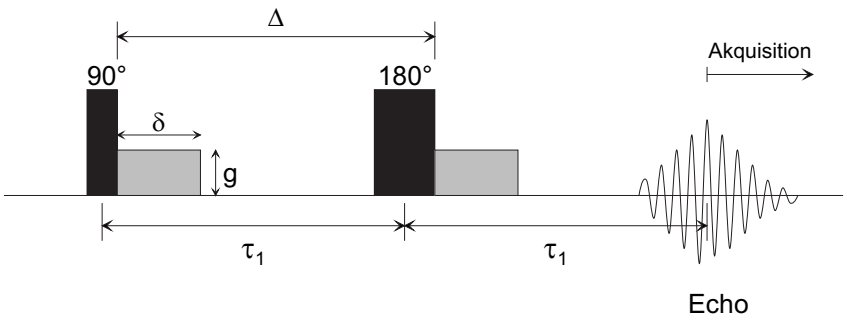


Abbildung 2.12: Pulssequenz eines PFG-Hahn-Echos oder auch Spin Echo (SE) [74, 75]

Das Hahn-Echo, bestehend aus einem 90°- und einem 180°-RF-Puls, liefert im idealisierten Fall (ohne Gradienten und Vernachlässigung der Relaxation) durch Refokussierung nach $2\tau_1$ (Echomaximum) die volle Signalintensität, verglichen mit dem FID nach einem einfachen 90°-Puls. Der Nachteil des Hahn-Echos besteht allerdings darin, das die Magnetisierung während der Diffusionszeit Δ in der x, y-Ebene gespeichert wird, wo sie T_2-Relaxation unterliegt. Da die T_2-Relaxationszeit in der Regel deutlich kürzer ist als T_1 (für Flüssigkeiten im Millisekundenbereich gegenüber T_1 im Sekundenbereich) ist das Hahn-Echo im Hinblick auf die Diffusionszeit stark limitiert. Im Stimulated-Echo wird die Magnetisierung nach zwei 90°-Pulsen auf der z-Achse gespeichert, wo sie nach T_1 in den Gleichgewichtszustand relaxiert. Somit ermöglicht dieses Experiment durch Variation des τ_2-Intervalls deutlich längere Diffusionszeiten.

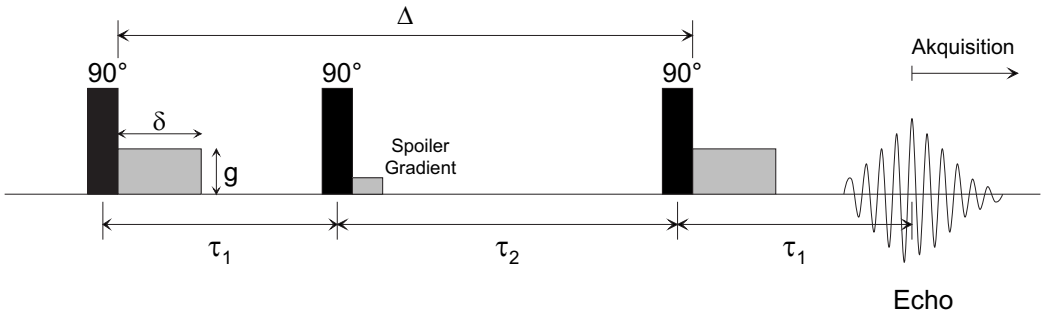


Abbildung 2.13: Pulssequenz eines PFG-Stimulated-Echos (STE)

Für das Stimulated-Echo zeigen die **Abbildungen 2.14**, **2.15** und **2.16** detailliert den Einfluss von RF-, Gradientpulsen und Wartezeiten auf das Spinsystem im Falle ortsfester Spins (linke Spalte), sowie bei Diffusion der Moleküle (rechte Spalte) im rotierenden Koordinatensystem. Die Abbildungen basieren auf einer Simulation, die unter Einbeziehung des Diffusionskoeffizienten $\mathcal{D}$ und der Relaxation T_2, sowie der experimentellen Parameter g, δ und Δ, die Gesamtmagnetisierung und damit die Signalintensität nach einem PFG-Experiment ermittelt.

Die Gesamtgleichgewichtsmagnetisierung M_z^e sei 1. Der Probenraum wird nun entlang der z-Achse in 1000 Volumenelemente unterteilt. Die Spins in jedem dieser Volumenelemente mit der Ortskoordinate z_i bewirken nun jeweils einen Magnetisierungsvektor, der ein Tausendstel der Gesamtmagnetisierung beträgt (farbige Linien). Der erste 90°-Puls der Stimulated-Echo Sequenz dreht nun die Magnetisierungsvektoren in die x, y-Ebene. Die Gesamtmagnetisierung liegt somit auf der $-y$-Achse (die resultierende Magnetisierung für alle drei Raumrichtungen ist in jedem Schritt angegeben). Die Magnetisierungsvektoren präzedieren nun mit gleicher Phase um die z-Achse. Der erste Feldgradientenpuls bewirkt nun eine Dephasierung der Magnetisierungen gemäß **Gleichung 2.40**. Je nach Gradientenstärke $g\delta$ ist diese Auffächerung stärker oder schwächer. Im gezeigten Fall erwirkt der Gradient eine Gesamtmagnetisierung von 0 in der x, y-Ebene. (Die RF- und Gradientenpulse sind sehr kurz im Vergleich zu τ_1 und τ_2, so dass die Diffusion und die Relaxation während der Pulse vernachlässigt wird.)

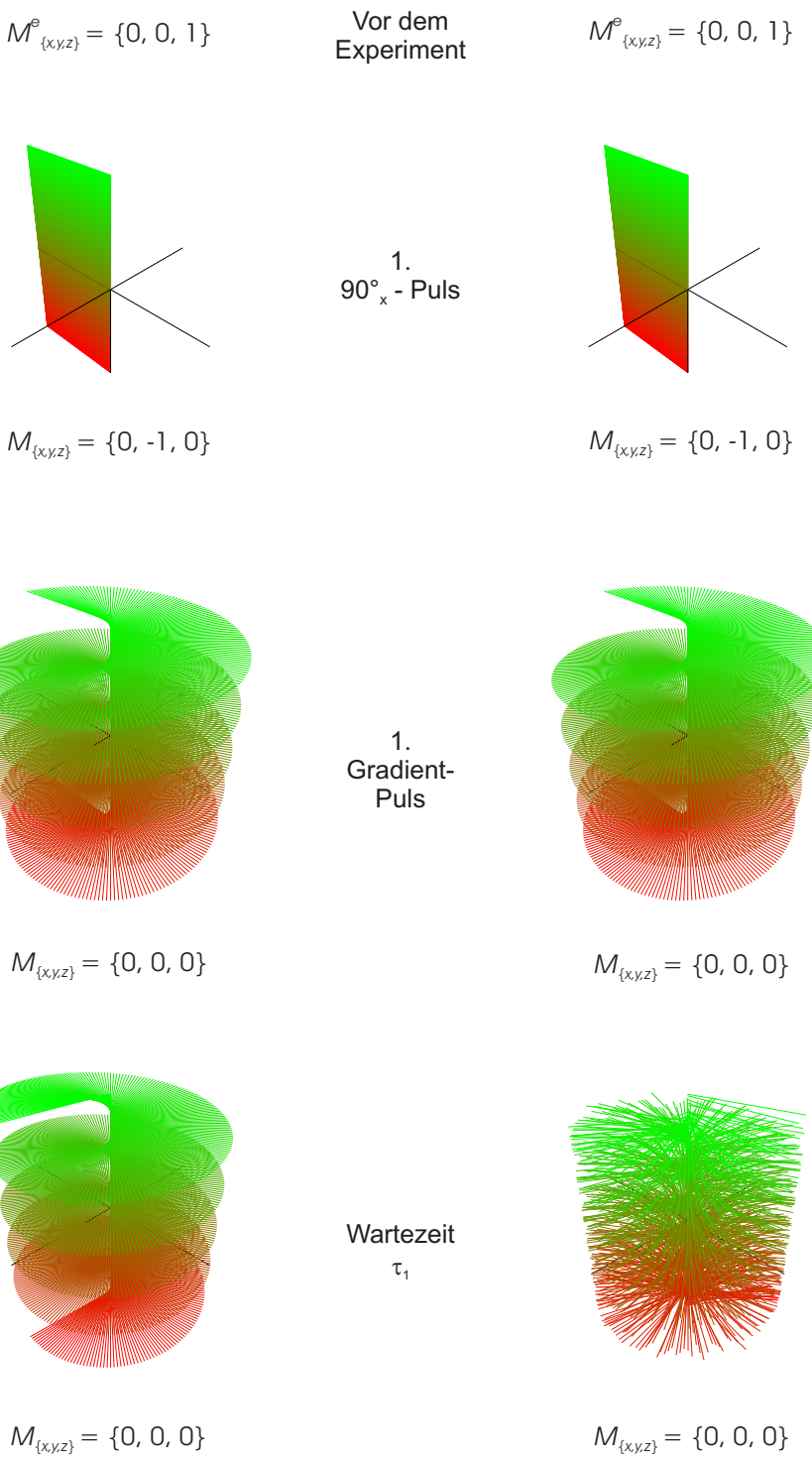


Abbildung 2.14: Simulation der Magnetisierung eines PFG-Experiments mit dem Stimulated-Echo. Die Richtung des Feldgradienten (z-Achse) ist in 1000 Δz unterteilt. Jedem Δz ist ein Magnetisierungsvektor zugeteilt, dessen Verhalten im Verlauf der Pulssequenz in Abhängigkeit seiner Ortskoordinate für jeden Schritt visualisiert wird. Die linke Spalte zeigt ein PFG-Experiment für ortsfeste Spins ($\mathcal{D} = 0$), während die rechte Spalte den Einfluss der Diffusion berücksichtigt. Die Gesamtgleichgewichtsmagnetisierung M_z^e sei 1. Die resultierenden Gesamtmagnetisierungen entlang der drei Achsen sind für jeden Schritt angegeben.

In der folgenden Wartezeit τ_1 tritt nun ein z-unabhängiger Phasenshift auf, da die Resonanzfrequenz der Spins γB_0 üblicherweise nicht genau mit der Einstrahlfrequenz γB_1 und damit der Rotationsfrequenz des Koordinatensystems übereinstimmt (Offset). Zudem sorgt die T_2-Relaxation für eine Dephasierung der Einzelspins, was in der Verkürzung der Einzelmagnetisierungsvektoren resultiert. Diese beiden Effekte gelten für beide Fälle, mit und ohne Diffusion. Während in der linken Abbildung jedoch die Moleküle ortsfest sind, erfahren sie im rechten Bild Selbstdiffusion, was zu einer Verschiebung der Magnetisierungsvektoren in z- oder $-z$-Richtung führt. Diese Verschiebung ist abhängig vom Selbstdiffusionskoeffizienten $\mathcal{D}$. Spins, die während τ_1 eine Verschiebung um ∂z erfahren haben, befinden sich somit am Ort $z_i + \partial z$, tragen aber nach wie vor die Ortskodierung von z_i über ihren Phasenwinkel $\phi_i(z_i)$.

Der zweite $90^\circ{}_x$-Puls rotiert nun sämtliche Magnetisierungskomponenten in die x, z-Ebene. Die gesamte Quermagnetisierung, die die Hälfte der Gesamtmagnetisierung ausmacht, wird durch einen Spoiler Gradientenpuls dephasiert und dadurch vernichtet. Dadurch reduziert sich die maximale Signalintensität des stimulierten Echos auf 1/2. Die Vernichtung der Quermagnetisierung ist jedoch notwendig, da anderfalls eine unerwünschte Modulation des Echosignals in Abhängigkeit von τ_2 aufträte. Nach dem Spoilergradienten ist die Magnetisierung auf der z-Achse gespeichert. Ihre Amplitude ist über $2\pi/(\gamma g \delta)$ moduliert. Während τ_2, was im Normalfall länger als τ_1 ist, erfahren die diffundierenden Moleküle eine weitere Verschiebung auf der z-Achse, während der Phasenwinkel immer noch der Ausgangsposition entspricht.

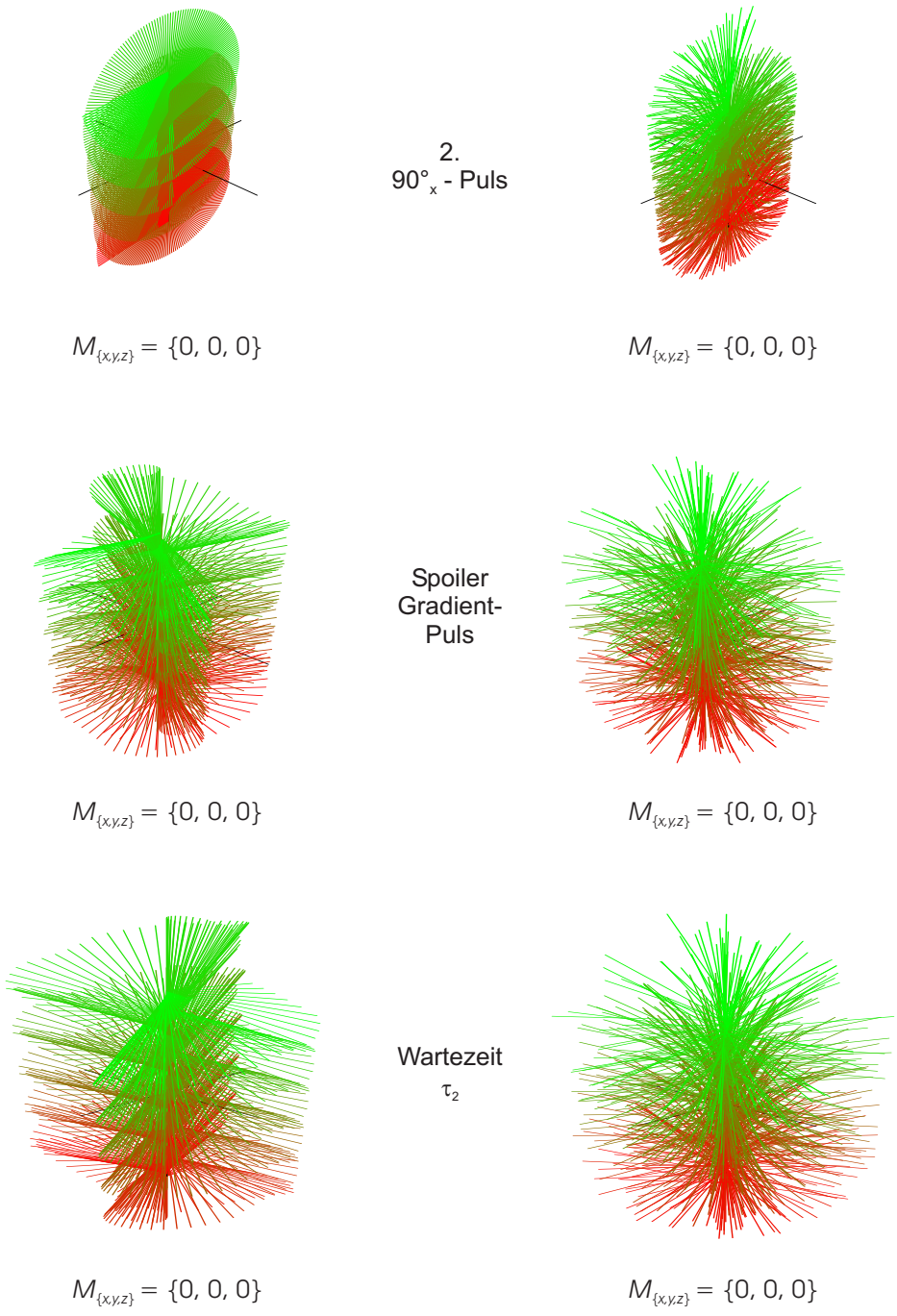


Abbildung 2.15: Simulation der Magnetisierung eines PFG-Experiments mit dem Stimulated-Echo (Fortsetzung). Während der Wartezeiten τ_1 und τ_2 tritt im rechten Beispiel Diffusion der Moleküle entlang der z-Achse auf, so dass in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten eine mehr oder weniger starke Verschiebung der Magnetisierungsvektoren in z- bzw. $-z$-Richtung resultiert.

Der dritte 90°-Puls dreht nun die Magnetisierungsvektoren zurück in die x, y-Ebene. Ein Vektor der nach dem ersten Gradientpuls gegenüber der Phase $\phi_i(z = 0)$ eine Phasenverschiebung von $\partial\phi$ besaß, trägt nun aufgrund der Spiegelung der Magnetisierung an der x, z-Ebene durch die beiden 90°-Pulse eine Phasenverschiebung von $-\partial\phi$. Der dem ersten Gradientpuls identische letzte Gradient sorgt nun für eine Refokussierung der Magnetisierung. Hat der Vektor im Verlauf des Experimentes keine örtliche Verschiebung erfahren, so besitzt er nach $\partial\phi$ und $-\partial\phi$ wieder seine Ausgangsphase $\phi_i(z = 0)$. Hat er dagegen eine örtliche Verschiebung erfahren, so ist der Drehwinkel des ersten Gradientpulses $\partial\phi(z_i)$ ein anderer als der des letzten $-\partial\phi(z_i + \partial z)$, so dass die Refokussierung auf $\phi_i(z = 0)$ unvollständig ist. Die letzte Wartezeit τ_1 sorgt nun für ein Anschwingen des Echosignals, welches über die y-Empfängerspule detektiert wird. Je vollständiger die Refokussierung der Magnetisierung auf $\phi_i(z = 0)$ erfolgt, desto höher ist die Intensität des Echosignals. Im Falle ortsfester Spins beträgt die Magnetisierung M_y maximal die Hälfte der Ausgangsmagnetisierung. Der geringere Wert in **Abbildung 2.16** links resultiert aus der T_2-Relaxation während der τ_1-Intervalle. Die rechte Spalte zeigt deutlich, wie unvollständig die Refokussierung der Magnetisierung aufgrund der örtlichen Verschiebung der Spins erfolgt ist und wie stark die Signalintensität dadurch eingeschränkt wird.
Je größer der Diffusionskoeffizient, d.h. je höher die Verschiebung der untersuchten Spezies während der Diffusionszeit ist, desto unvollständiger ist die Refokussierung und desto kleiner demnach das detektierte Echosignal.

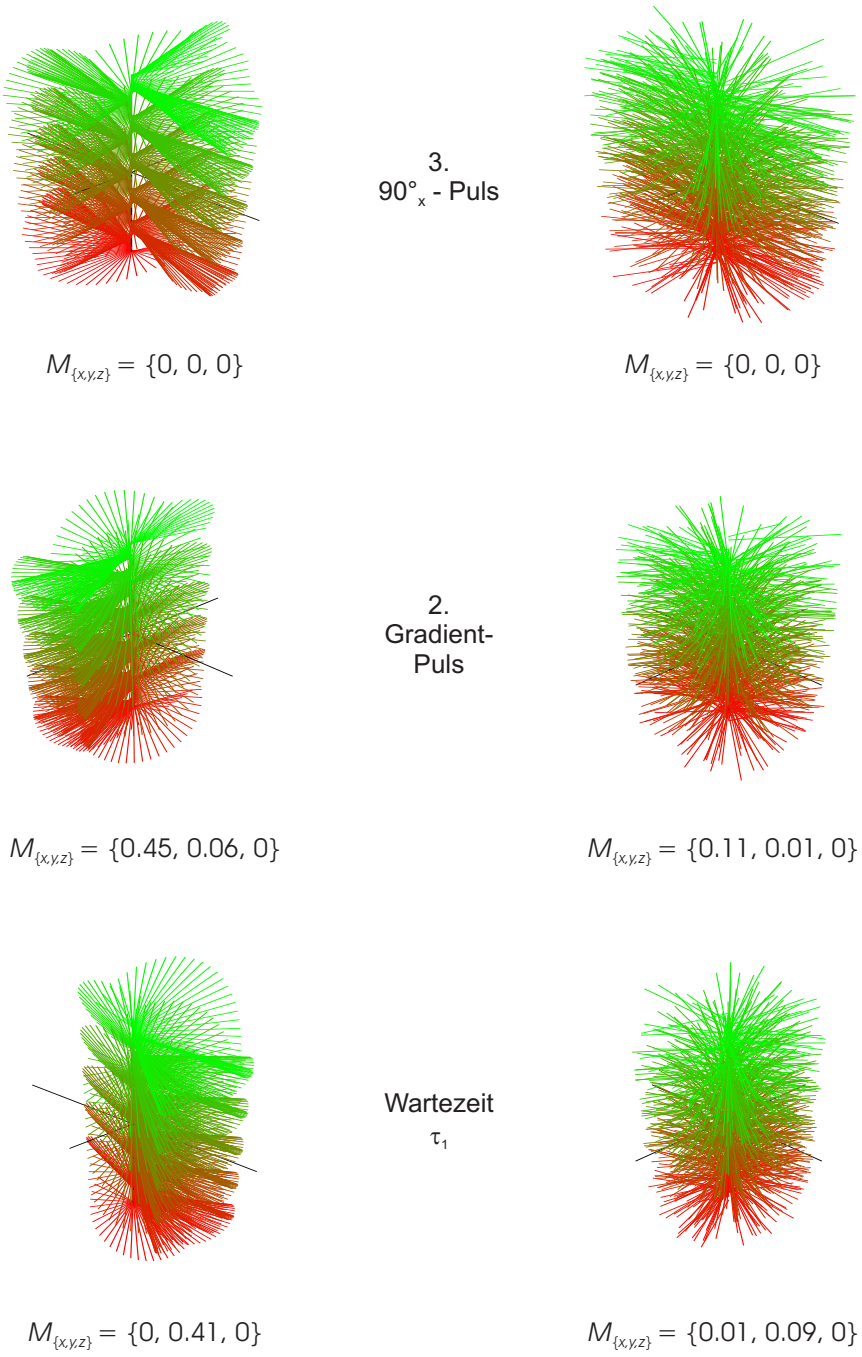


Abbildung 2.16: Simulation der Magnetisierung eines PFG-Experiments mit dem Stimulated-Echo (Fortsetzung). Der zweite Feldgradientenpuls refokussiert die Magnetisierung, so dass in die Empfängerspule (y-Achse) ein Echosignal induziert wird. Je höher der Diffusionskoeffizient der untersuchten Spezies ist, desto unvollständiger ist die Refokussierung und desto geringer das induzierte Echosignal.

Vom PFG-Experiment zum Diffusionskoeffizienten

Zur Bestimmung von Diffusionskoeffizienten führt man eine Reihe von PFG-Experimenten aus und variiert dabei die Gradientstärke g. Die Signalintensität der einzelnen Spektren lässt sich dann in Abhängigkeit der Gradientstärke auftragen, wobei ein exponentieller Abfall der Intensität zu verzeichnen ist (**Abbildung 2.17**).

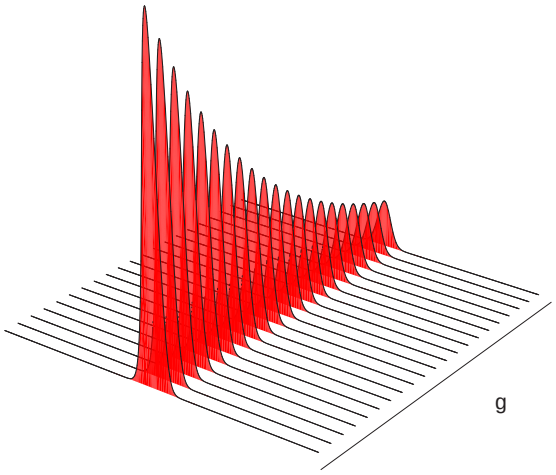


Abbildung 2.17: Exponentieller Echosignalabfall einer Spezies mit $\mathcal{D} \neq 0$ mit steigender Gradientstärke g.

Die Signalintensität I ist über die folgende Beziehung mit der Gradientstärke g korreliert, wobei I_0 die Intensität für $g = 0$ repräsentiert:

$$\frac{I}{I_0} = \mathrm{e}^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 \mathcal{D} \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} \tag{2.41}$$

Der Diffusionskoeffizient $\mathcal{D}$ lässt sich nun durch die Auftragung von $\ln \frac{I}{I_0}$ gegen das Produkt $\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$, welches ausschließlich bekannte Parameter enthält, aus der (negativen) Steigung der resultierenden Geraden bestimmen. Eine Abweichung des Signalabfalls vom monoexponentiellen Verhalten deutet darauf hin, dass die beobachtete Spezies mehrere (apparente) Diffusionskoeffizienten besitzt.

2.5.3 Der Nuclear Overhauser Effekt

Der *Nuclear Overhauser Effekt* (**NOE**) wurde 1953 von A. W. Overhauser zwischen Elektronen und Kernspins in Metallen beobachtet [76]. Solomon erarbeitete 1955 die Grundlagen und ersten Anwendungen des NOE für die NMR-Spektroskopie [77].
Das Prinzip des NOE besteht darin, dass die Störung einer Resonanz in einem NMR-Spektrum durch Sättigung oder Inversion eine Änderung der Intensität anderer Resonanzlinien bewirken kann. Der NOE resultiert aus Änderungen der Besetzungen von Spinzuständen, die durch eine spezielle Form der Relaxation, die *Dipol-Dipol Kreuzrelaxation*, hervorgerufen werden. Voraussetzung dafür ist eine dipolare Kopplung zwischen den Kernen, d.h. eine Wechselwirkung zwischen den magnetischen Kerndipolen, wobei das lokale Magnetfeld eines Kerns durch die Gegenwart eines anderen beeinflusst wird [78]. Die Stärke der dipolaren Kopplung hängt vom Abstand der Kerne ab. Für einen messbaren NOE wird ein maximaler internuklearer Abstand von 0,5 nm angegeben [79]. Der NOE η ist gegeben durch:

$$\eta_I\{S\} = \frac{I - I^0}{I^0} \tag{2.42}$$

I repräsentiert dabei die Intensität des beobachteten Signals, I_0 ist die Signalintensität im thermischen Gleichgewicht und S die gesättigte Resonanz. Betrachtet man nun ein homonukleares System zweier Spin-$\frac{1}{2}$ Kerne I und S mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen und ohne $\mathcal{J}$-Kopplung, so lassen sich die Energieniveaus der Zustände α und β wie in **Abbildung 2.18** darstellen. Die Niveaus $\alpha\beta$ und $\beta\alpha$ sind energetisch nicht entartet, jedoch sind chemische Verschiebungen im Vergleich zu Larmorfrequenzen so klein, dass die Niveaus annähernd die gleiche Energie besitzen. Die Übergänge W_{1I} und W_{1S} entsprechen den Ein-Quanten-Übergängen der isolierten Spins, die für das NMR-Signal verantwortlich sind. Im Falle dipolarer Kopplung sind jedoch auch Null- und Doppel-Quanten-Übergänge W_0 und W_2 möglich, die nicht direkt detektierbar sind, aber im Relaxationsprozess die W_1-Übergänge beeinflussen können.

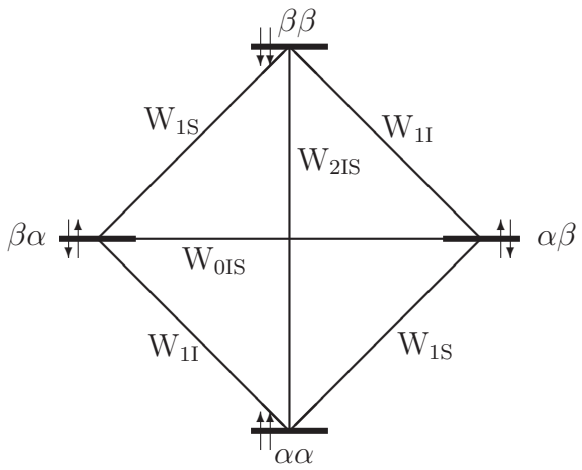


Abbildung 2.18: Energieniveaudiagramm eines Spinsystems aus den Spins I und S mit den Übergangswahrscheinlichkeiten W_1, W_0 und W_2.

Zum Verständnis der Wirkung des NOE werden nun die Besetzungszahlen der vier Energieniveaus betrachtet (**Abbildung 2.19**). Die Zahlen 0, $-\frac{1}{2}$ und $+\frac{1}{2}$ entsprechen dabei den Abweichungen von einer beliebigen Besetzungszahl N. Bild (a) zeigt das Spinsystem im Gleichgewicht. Nach Sättigung der S-Resonanz (b) sind die Niveaus $\beta\alpha$ und $\beta\beta$, sowie $\alpha\alpha$ und $\alpha\beta$ jeweils gleich besetzt. Der Besetzungsunterschied der W_{1I}-Übergänge ist davon unbeeinflusst. Das System strebt nun eine Rückkehr in den Gleichgewichtszustand an. Im Falle dipolarer Kopplung kann es dabei durch den W_0- bzw. W_2-Übergang relaxieren. Die Bilder (c) und (d), sowie **Tabelle 2.3** zeigen, dass die Relaxation nach W_0 bzw. W_2 den Besetzungsunterschied des W_{1I}-Übergangs beeinflusst. Relaxation nach W_2, welche Energieaustausch mit dem Gitter erfordert, erhöht den Besetzungsunterschied der Energieniveaus von W_{1I}, während der Spinflip nach W_0 den Besetzungsunterschied verringert. Dementsprechend spricht man von einem *positiven NOE*, wenn W_2 der vorherrschende Relaxationsweg ist. Dieser bewirkt eine Intensitätserhöhung des NMR-Signals von I. Ist W_0 der dominierende Relaxationsweg, nimmt die Intensität von I ab (*negativer NOE*).

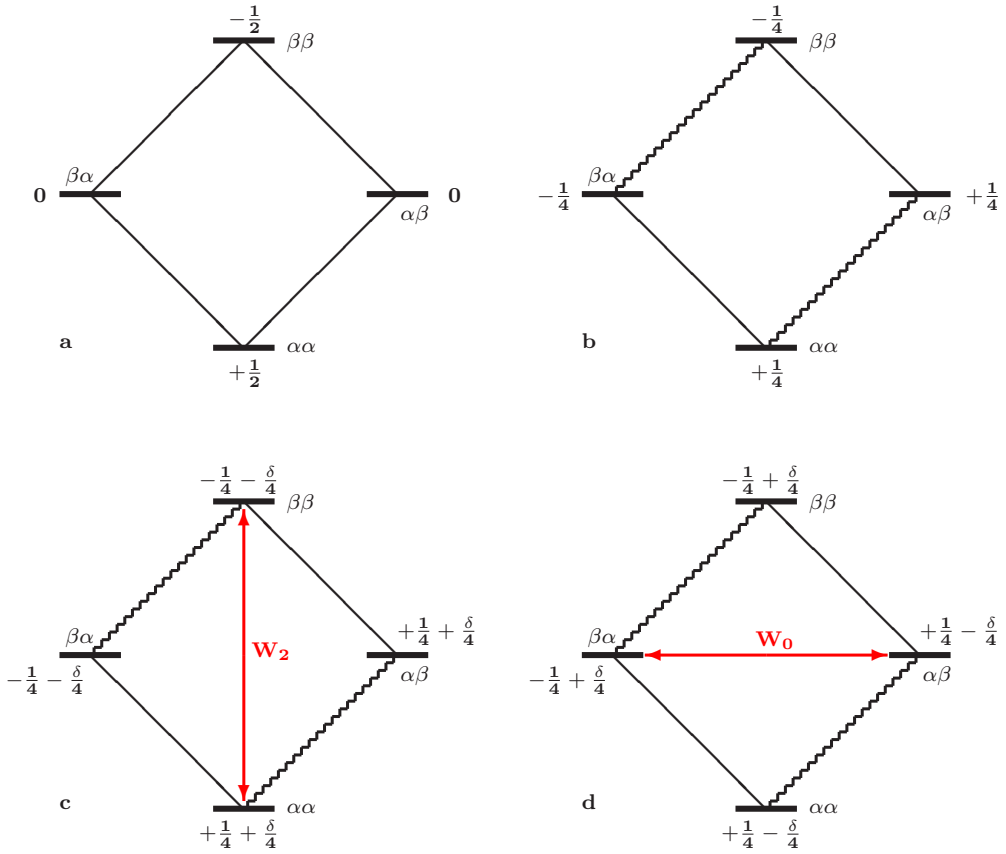


Abbildung 2.19: Besetzung der Energieniveaus eines Zwei-Spin-Systems. (a) im Gleichgewicht, (b) nach Sättigung der S-Resonanz, (c) nach W_2-Übergang und (d) nach W_0-Übergang.

Tabelle 2.3: Besetzungsunterschiede für Übergänge zwischen Energieniveaus im dipolar gekoppelten Zwei-Spin-System

Übergang	im Gleichgewicht	nach Sättigung von S	nach W_0	nach W_2
W_{1I} ($\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\alpha$, $\alpha\beta \leftrightarrow \beta\beta$)	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}-\frac{\delta}{2}$	$\frac{1}{2}+\frac{\delta}{2}$
W_{1S} ($\alpha\alpha \leftrightarrow \alpha\beta$, $\beta\alpha \leftrightarrow \beta\beta$)	$\frac{1}{2}$	0	0	0
W_0 ($\alpha\beta \leftrightarrow \beta\alpha$)	0	$\frac{1}{2}$		
W_2 ($\alpha\alpha \leftrightarrow \beta\beta$)	1	$\frac{1}{2}$		

Die NOE Verstärkung (bzw. Abschwächung) einer Resonanz I durch Sättigung von S wird durch eine Form der *Solomon-Gleichung* beschrieben [78]:

$$\eta_I\{S\} = \frac{\gamma_S}{\gamma_I}\frac{\mathrm{W}_2 - \mathrm{W}_0}{2\mathrm{W}_{1I} + \mathrm{W}_2 + \mathrm{W}_0} \tag{2.43}$$

Im homonuklearen Fall ist $\gamma_S = \gamma_I$. Im heteronuklearen Fall kann der Quotient der gyromagnetischen Konstanten den NOE verstärken oder abschwächen.

Der Einfluss der Molekularbeweglichkeit auf den NOE

Übergänge zwischen Energieniveaus werden begünstigt, wenn die Fluktuationsfrequenz der lokalen Magnetfelder von Kernen, die aus der molekularen Bewegung resultiert, in der Größenordnung der Übergangsfrequenz liegt. Abhängig von der Feldstärke des verwendeten Magneten liegen für Protonen W_1-Übergänge üblicherweise im Bereich von 500 MHz, W_2-Übergänge dementsprechend bei 1000 MHz, während W_0-Übergänge im Bereich weniger kHz liegen. Dementsprechend bevorzugen kleine Moleküle in niedrigviskosen Lösungen aufgrund ihrer hohen Beweglichkeit die Kreuzrelaxation nach W_2, was zu einem positiven NOE führt. Makromoleküle in hochviskosen Medien zeigen dagegen häufig einen negativen NOE [79].

Das 2D-NOESY Experiment

Die zweidimensionale NOE-Spektroskopie (*NOESY*) ist eines der wichtigsten Werkzeuge zur Strukturaufklärung von Biomolekülen, wie Proteinen und Peptiden, da sie eine Vielzahl von dipolaren Kopplungen als Kreuzsignale mit den zugehörigen Resonanzfrequenzen in einem Spektrum zu korrelieren vermag [80, 81]. Das Prinzip aller zweidimensionalen NMR-Methoden ist die Modulation eines 1D-Spektrum als Funktion eines variablen Zeitintervalls τ_1. **Abbildung 2.20** zeigt die grundlegende Pulssequenz eines NOESY-Experimentes.

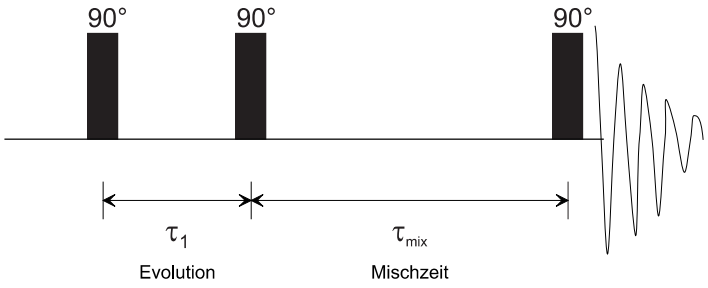


Abbildung 2.20: Pulsprogramm eines 2D-NOESY Experiments.

Der erste 90°-Puls erzeugt transversale xy-Magnetisierung, die während der Evolutionsphase τ_1 dephasiert. Der zweite 90°-Puls rotiert einen Teil der Magnetisierung auf die $-z$-Achse. Während der Mischzeit τ_{mix} können Komponenten der z-Magnetisierung unter dem Einfluss von Kreuzrelaxation austauschen. Die transversalen Magnetisierungsanteile werden nicht benötigt und müssen durch den Phasenzyklus oder Feldgradienten eliminiert werden. Die z-Magnetisierung wird durch den letzten 90°-Puls wieder in die xy-Ebene gedreht, wo sie als Signal detektiert wird. Durch die Aufnahme von einer Reihe von Spektren mit steigender Evolutionsdauer nimmt die Dephasierung der Magnetisierung während τ_1 zu, was zu einer Modulation der Signalintensität führt. Betrachtet man ein Zwei-Spinsystem mit den Resonanzfrequenzen ω_I und ω_S, die keine dipolare Kopplung aufweisen, so ist die Signalintensität der beiden Resonanzen lediglich mit der eigenen Resonanzfrequenz in τ_1 moduliert (**Abbildung 2.21**). Die zweite Fouriertransformation überführt dann die τ_1-Zeitdomäne in die F_1-Frequenzdomäne und liefert das zweidimensionale Spektrum, welches ausschließlich Diagonalsignale zeigt.

Tritt zwischen den beiden Spezies Kreuzrelaxation, also Magnetisierungsaustausch während τ_{mix} auf (**Abbildung 2.22**), so wird die Modulation der Signale mit der eigenen Resonanzfrequenz von der Modulation mit der Resonanzfrequenz des Austauschpartners überlagert.

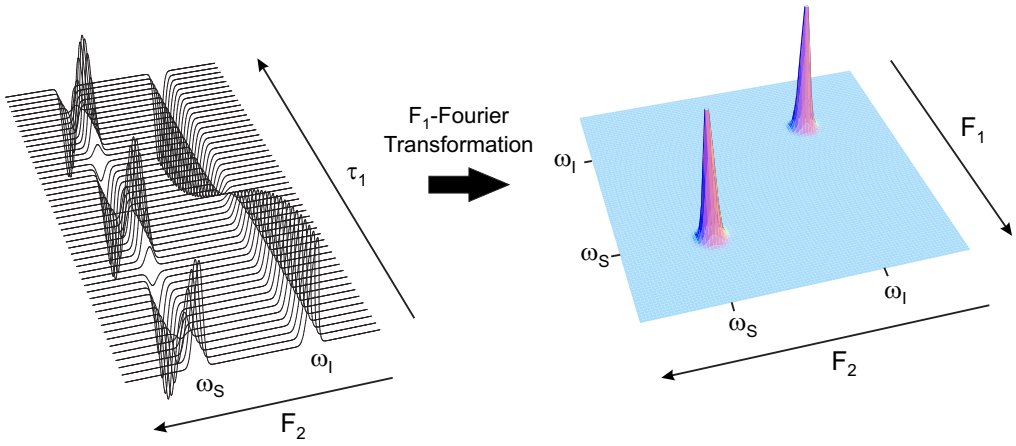


Abbildung 2.21: Prinzip des 2D-NOESY-Experiments für zwei Spins I und S, die keinen NOE untereinander zeigen. Links ist das Interferogramm der 1D-Spektren nach der ersten Fourier-Transformation in F_2-Richtung dargestellt. Die zweite Fourier-Transformation in F_1-Richtung erzeugt das zweidimensionale Spektrum, welches ausschließlich Diagonalsignale aufweist (rechts).

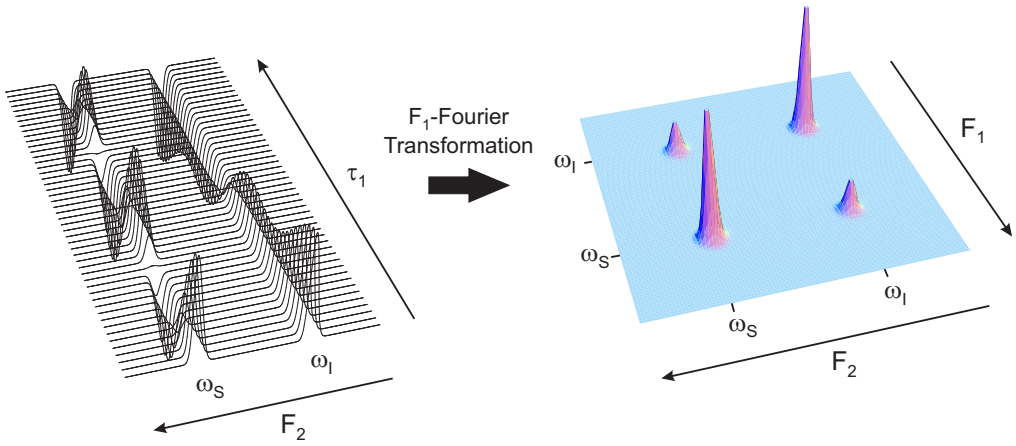


Abbildung 2.22: Prinzip des 2D-NOESY-Experiments für zwei Spins I und S, die einen NOE untereinander zeigen. Das Interferogramm zeigt neben der Modulation der beiden Resonanzlinien mit der jeweils eigenen Frequenz überlagerte Modulationen mit der jeweils anderen Resonanzfrequenz. Nach der F_1-Fourier-Transformation führt dies zu Kreuzsignalen im 2D-Spektrum.

Die zweite Fouriertransformation liefert dann Diagonalsignale, welche dem Anteil der Magnetisierung entsprechen, der nicht ausgetauscht wurde, und Kreuzsignale, die in F_2-Richtung die eigene chemische Verschiebung und in F_1-Richtung die Verschiebung des

Tauschpartners besitzen.

Im 2D-NOESY Experiment erzeugt ein negativer NOE Kreuzsignale, die das gleiche Vorzeichen wie die Diagonalsignale besitzen, während ein positiver NOE Kreuzsignale mit entgegengesetztem Vorzeichen erzeugt.

2.5.4 Der Einfluss des NOE auf das PFG-Experiment

Die Kreuzrelaxation zwischen zwei Arten von Spins kann einen deutlichen Einfluss auf PFG-Diffusionsexperimente ausüben. Es seien A und B zwei Molekülarten, die einem Stimulated-Echo Experiment unterzogen werden, wobei sich die Diffusionskoeffzienten deutlich unterscheiden ($\mathcal{D}_A >> \mathcal{D}_B$, z.B. Wasser und Polymer). Durch den ersten Gradienten g_1 der STE-Pulssequenz erhält ein Spin A, der sich an Position z_A befindet, die Ortskodierung $\phi_A = \gamma\delta(gz_A)$ und ein Spin B an Position z_B analog die Ortskodierung $\phi_B = \gamma\delta(gz_B)$. Tritt zwischen den beiden Spins keine Kreuzrelaxation auf, so behalten sie bis zur Refokussierung durch den zweiten Gradientpuls g_2 ihre Ortskodierung. Die Signalabschwächung der Resonanzlinien von A und B resultiert dann ausschließlich aus der Verschiebung Δz, die die Moleküle während der Diffusionszeit Δ aufgrund ihres Selbstdiffusionskoeffizienten $\mathcal{D}$ erfahren haben. Da im Stimulated-Echo die Magnetisierung während der Diffusionszeit auf der z-Achse gespeichert wird, kann, sofern eine dipolare Kopplung zwischen A und B besteht, Kreuzrelaxation zwischen den beiden Spins auftreten, d.h. zum Zeitpunkt t_{CR} tauschen A und B ihre Magnetisierungen und dadurch auch ihre, durch g_1 festgelegten, Ortskodierungen aus. Dadurch ändert sich scheinbar die Verschiebung der Moleküle, die durch g_2 ausgelesen wird. Spin A hat also im Intervall $g_1 \rightarrow t_{CR}$ eine Verschiebung gemäß $\mathcal{D}_B$ und im Intervall $t_{CR} \rightarrow g_2$ gemäß $\mathcal{D}_A$ erfahren. Aufgrund von $\mathcal{D}_A >> \mathcal{D}_B$ ist die detektierte Gesamtverschiebung von Spin A daher kleiner als im Fall ohne NOE. Die resultierende Signalabschwächung der Resonanzlinie A ist somit geringer als ohne NOE. Spin B erfährt den umgekehrten Effekt, wodurch die Signalabschwächung größer wird [82].

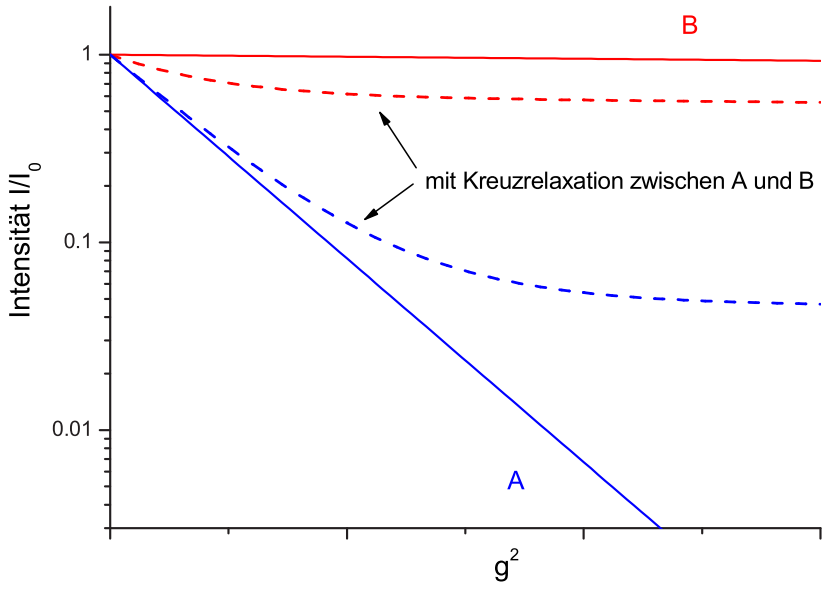


Abbildung 2.23: Einfluss des NOE auf den Signalabfall zweier Arten Spins A und B mit $\mathcal{D}_A >> \mathcal{D}_B$ im STE-Experiment.

Abbildung 2.23 zeigt den Einfluss der Kreuzrelaxation auf den Signalabfall zweier Komponenten mit deutlich unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten in einem STE-Experiment. Ohne NOE zwischen den Spins zeigen die Zerfallskurven monoexponentielles Verhalten, wobei die Steigungen der Geraden (bei logarithmischer Darstellung) proportional zu den Selbstdiffusionskoeffizienten sind. Durch Magnetisierungsaustausch während der Diffusionszeit erhalten die Zerfallskurven Anteile des Diffusionsverhaltens der jeweils anderen Substanz und zeigen einen biexponentiellen Abfall. Je länger die Diffusionszeit ist, desto größer wird die Wahrscheinlichkeit für Magnetisierungsaustausch. Dementsprechend nimmt der Anteil der anderen Komponente an der Zerfallskurve mit steigender Diffusionszeit zu. Der Verlauf der Zerfallskurven ist somit eine Funktion der Diffusionszeit. Dies kann soweit führen, dass für $\Delta \rightarrow \infty$ beide Komponenten identische Kurven aufweisen.

Vergleich zwischen chemischem und Magnetisierungsaustausch

Der chemische Austausch zwischen zwei Protonenarten mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten kann im PFG-Experiment zu einem völlig analogen Verhalten führen, wie es in **Abbildung 2.23** dargestellt ist. Allerdings ist das Auftreten von chemischem Austausch unabhängig davon, wie die Magnetisierung im PFG-Experiment während der Diffusionszeit gespeichert wird. Das Hahn-Echo – die Magnetisierung liegt während Δ in der xy-Ebene – detektiert somit chemischen Austausch im gleichen Maße wie das Stimulated-Echo. Kreuzrelaxation tritt dagegen nur auf, wenn die Magnetisierung, wie im Stimulated-Echo, auf der z-Achse gespeichert ist. Das Hahn-Echo ist somit unempfindlich für Kreuzrelaxationseffekte [83].

Detektiert man daher für ein System einen monoexponentiellen Signalabfall mit dem Hahn-Echo und einen bi- oder multiexponentiellen Signalabfall mit dem Stimulated-Echo, ist dies ein deutliches Indiz für dipolare Kopplungen zwischen zwei oder mehr Komponenten.

Kapitel 3

Experimenteller Teil

3.1 NMR-Messungen

3.1.1 PFG-Diffusionsmessungen

Die PFG-Diffusionsmessungen wurden mit einem 500 MHz *DRX* Spektrometer der Firma Bruker-BioSpin GmbH durchgeführt. Ein Teil der Ergebnisse wurde mit einem 400 MHz *Avance* Spektrometer verifiziert. In beiden Spektrometern wurde ein *DIFF30* Probenkopf zusammen mit einer *B-AFPA-40* Gradientverstärkereinheit eingesetzt. Dieses Gradientsystem erzeugt einen maximalen Magnetfeldgradienten von 12 T/m bei einem Strom von 40 A [84]. Die Proben, sowohl die wässrigen Lösungen, als auch die Pulverproben, wurden in NMR-Probenröhrchen mit einem Durchmesser von 5 mm gemessen. Die Diffusionsmessungen mit dem Hahn- und dem Stimulated-Echo erfolgten mit Bruker Pulsprogrammen (s. **Abschnitt 2.5.2**). Die Standardparameter für die Messungen von Wasser- bzw. Polymerdiffusion sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

Die ^{1}H-NMR-Spektren mit PFG-Wasserunterdrückung zur Visualisierung des verlangsamten Wassers wurden mit einer Hahn-Echo Pulssequenz mit einer Diffusionszeit Δ von 10 ms, einer Gradientpulslänge δ von 1 ms und einer Gradientstärke g von 3,5 T/m aufgezeichnet. Diese Parameter gewährleisten eine vollständige Auslöschung des Signals von

freiem Wasser.

Tabelle 3.1: Parameter der PFG-Diffusionsmessungen

Parameter	Wasserdiffusion	Polymerdiffusion
90° RF-Puls	ca. 10 μs	ca. 8 μs
Recycle Delay d0	10 s	8 s
Diffusionszeit Δ	2,5 - 500 ms	10 - 500 ms
Gradientenpuls δ	1 ms	2 ms
g_{min} (bei $\Delta = 10$ ms)	0,5 T/m	1,5 T/m
g_{max} (bei $\Delta = 10$ ms)	8 T/m	11 T/m
Gradientschritte	32	32
Anzahl Scans NS	4x16	4x16
Gradientenstabilisierung	3 ms	3 ms
Gradienten Rampe	ein	ein
Stimulated-Echo		
Wartezeit τ_1	4,5 ms	5,5 ms
Spoilergradient g	0,5 T/m	0,5 T/m
Spoilergradient δ	1 ms	1 ms

3.1.2 Festkörper-NMR

Die Festkörpermessungen an Alginatpulvern und Zentrifugationsrückständen wurden als ^{13}C-CP-MAS Experimente am 400 MHz *Avance* Spektrometer mit 4 mm-Probenkopf ausgeführt. Die Rotationsfrequenz betrug dabei 5000 Hz. Dasselbe Setup wurde für die statischen ^{1}H-Messungen an der Konzentrationsreihe von Alginat/Wasser in **Kapitel 6** verwendet.

3.1.3 2D-NOESY-Spektroskopie

Die 2D-NOESY-Experimente wurden am 500 MHz *DRX* Spektrometer mit dem oben angegebenen Gradientsystem durchgeführt. Zum Einsatz kam ein Standardpulsprogramm für ein NOESY mit Feldgradienten (*gs-NOESY* [85]). Dieses Programm wurde zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Wasser und Polymer durch einen nachgeschalteten PFG-Wasserfilter erweitert. Die NOESY-Sequenz arbeitet mit gaussförmigen Gradienten, während die Sequenz des Wasserfilters einem Hahn-Echo mit Rechteckgradienten und den Parametern aus **Abschnitt 3.1.1** entspricht.

Tabelle 3.2: Parameter der 2D-NOESY-Experimente mit *noesygpph_se_cg* Pulssequenz

Parameter	Wert
90° RF-Puls	8,1 μs
180° RF-Puls	16,2 μs
Recycle Delay d0	12 s
Anzahl Scans NS	4
Gradient g_1	1,2 T/m
Gradient g_2	-1,2 T/m
Anzahl Datenpunkte F_2	2048
Anzahl Datenpunkte F_1	512

3.2 Sonstige Methoden

Proteinanalytik

Der Gesamtproteingehalt in den Algenalginatproben wurde mit einer nach Frølund [86] modifizierten Lowry-Methode [87] in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Protein-Test-Kit der Fa. Sigma eingesetzt.

Laserdiffraktometrie

Zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilungen in Alginatlösungen wurde ein Laserdiffraktometer *LS 230 - Small Volume Module* der Fa. Coulter Corp. (Miami, USA) eingesetzt. Das Messsystem nutzt Laserlicht der Wellenlänge 750 nm zur Beugungsanalyse von Partikeln im Größenbereich zwischen 0,4 und 3500 μm. In drei verschiedenen Winkeln angeordnete Fotodiodendetektoren erfassen die Intensitäten für große, mittlere und kleine Beugungswinkel. Gemäß der *Mie-Theorie* wird dann der Partikelradius r über folgende Beziehung mit der Wellenlänge des Lichts λ und dem Beugungswinkel α korreliert [88,89]:

$$\alpha = \frac{2\pi r}{\lambda} \tag{3.1}$$

Durch den Einsatz der *PIDS*-Technologie (Polarisation Intensity Differential Scattering) ist es zudem möglich, den Messbereich für Partikelgrößen bis unter 0,1 μm auszuweiten. Für einen störungsfreien Messbetrieb verlangt das Gerät, dass die Trübung der Probe in einem bestimmten Bereich liegt. Aus diesem Grunde mussten die Alginatlösungen auf eine Massenkonzentration von 0,2% verdünnt werden.

Differentialkalorimetrie

Die kalorimetrischen Messungen zum Schmelzverhalten von Wasser in Alginatlösungen wurden mit einem Differential-Scanning-Kalorimeter vom Typ *DSC 7 PC* der Firma Perkin-Elmer durchgeführt [90].

3.3 Verwendete Substanzen

Algenalginate

Es wurden drei verschiedene kommerziell erhältliche Algenalginate, Manugel DJX, Manucol LB und Manucol DM, eingesetzt. Die Alginate liegen als Natriumsalze vor und

stammen von der Fa. Kelco/Nutra Sweet Company. Sie unterscheiden sich durch ihre molaren Massen und die Mannuronat- und Guluronatanteile (s. **Tabelle 4.1**). Die Alginate wurden in drei verschiedenen Reinheitsgraden eingesetzt:

1. Ungereinigt
2. Gereinigt nach Standardmethode [39]
3. Sterilfiltriert

Die Standardreinigungsmethode umfasst eine Aufnahme in deionisiertes Wasser, Zentrifugation der Lösung bei 4000 U/min, Dialyse des Überstandes mit einer Ausschlussgrenze von 12.000 g/mol gegen Natriumchlorid und deionisiertes Wasser und anschließender Gefriertrocknung. Für das sterilfiltrierte Alginat wurde zwischen Dialyse und Trocknung eine Filtration der Lösung durch eine Porengröße von 0,2 μm durchgeführt.
Für die wässrigen Alginatlösungen wurden die Alginate ohne Rühren in die entsprechende Menge Wasser aufgenommen, wobei je nach Molmasse und Konzentration (1-4 Gewichtsprozent) nach zwei bis 24 Stunden eine Homogenisierung der Proben eintrat.
Die gequollenen Alginatpulver wurden hergestellt, indem die Alginate zunächst vakuumgetrocknet und daraufhin einer wassergesättigten Atmosphäre ausgesetzt wurden. Die Bestimmung des Feuchtigkeitsgehaltes erfolgte durch Differenzwägung.
Die Heruntertrocknung von Alginatlösungen auf definierte Feuchtigkeitsgehalte erfolgte durch Vakuumtrocknung von 1%iger Lösung bei 50°C.

Bakterienalginat von *P. aeruginosa* SG81

Das verwendete Bakterienalginat wurde aus Biofilmen des mucoiden Pseudomonas aeruginosa Stammes SG81 isoliert [91]. Dazu wurden Einzelkolonien von Übernachtkulturen auf PIA mit einer Zelldichte von 2x10^8 Zellen/ml in 0,14 molarer NaCl-Lösung suspendiert. Diese Suspension wurde auf PIA-Platten ausgebracht und bei 36°C für 24 Stunden bebrütet. Der konfluente Bakterienbewuchs wurde abgenommen, in 100 ml steriler 0,14 molarer NaCl-Lösung suspendiert und unter Rühren bei Raumtemperatur 30 min homogenisiert.

Zur Abtrennung der Bakterien wurde die Suspension bei 40.000 g zwei Stunden zentrifugiert (10°C) und der Überstand durch Celluloseacetat-Membranfilter (0,2μm Porengröße, pyrogenfrei, Minisart, Sartorius) filtriert. Die erhaltene EPS-Lösung wurde unter Rühren mit der dreifachen Menge eiskaltem Ethanol versetzt und 30 min im Eisbad gerührt. Der Niederschlag wurde abgenutscht, mit kaltem Ethanol gewaschen und über P_2O_5 getrocknet. Das getrocknete Rohalginat wurde in sterilen Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,5, 2 mM $MgCl_2$) aufgenommen und nach Zugabe von 5 U/ml Benzonase (Merck, Reinheitsgrad 1, 25 U/μl) bei 36°C 4 Stunden inkubiert. Nach Zugabe von sterilfiltrierter Proteinase K-Lösung (Sigma, aus Tritirachium album, 11,6 U/mg; gelöst in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 7,5) wurde weitere 24 h bei 36°C inkubiert und anschließend bei 20.000 g für 30 min bei 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal für 24 Stunden gegen 5 l destilliertes Wasser dialysiert (Visking Dialyseschlauch; Molmassenauschlussgrenze 12.000-14.000 g/mol) und anschließend lyophilisiert.

Concanavalin A

Das Lektin Concanavalin A (ConA, isoliert von Canavalia ensiformis) stammte von der Fa. Sigma und wurde unbehandelt eingesetzt.

Kapitel 4

Ergebnisse und Diskussion der Diffusionsmessungen an Alginaten

4.1 Vorbemerkungen

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse von PFG-NMR-Messungen an verschiedenen wässrigen Systemen vorgestellt. Um die Verlässlichkeit der Messergebnisse zu gewährleisten sowie die einwandfreie Funktionsweise der verwendeten NMR-Spektrometer sicherzustellen, wird zunächst auf einige grundlegende Testmessungen eingegangen.

4.1.1 Vergleichsmessungen an reinem Wasser

Zur Kalibration der verwendeten NMR-Spektrometer und zur Kontrolle der Verlässlichkeit der im folgenden vorgestellten Ergebnisse, wurden begleitend zu den PFG-Experimenten in regelmäßigen Abständen Testmessungen an reinem Wasser vorgenommen. Diese dienten zum einen zum Vergleich des gemessenen Diffusionskoeffizienten von Wasser mit dem Literaturwert, so dass bei Übereinstimmung mit diesem eine einwandfreie Funktionsweise des Gradientensystems angenommen werden konnte, bzw. bei Abweichungen eine entsprechende Fehlfunktion erkannt werden konnte. Desweiteren dienten die Messungen an reinem Wasser zur Überprüfung, dass beobachtete Effekte aus Alginat/Wasser-Systemen

auch wirklich ausschließlich diesen Systemen zuzuschreiben sind.

Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch eine Diffusionsmessung an reinem Wasser mittels der Stimulated-Echo Pulssequenz (**Abbildung 2.13**). Die Diffusionszeit Δ betrug 10ms, die Gradientpulslänge δ 1,0ms und die Gradientstärke wurde von 0,5 bis 3,0 T/m variiert. Da reines Wasser bei konstanter Temperatur einen einzigen Selbstdiffusionskoeffizienten besitzt, ist das entscheidende Kriterium für die Verlässlichkeit einer PFG-Diffusionsmessung, dass die Auftragung der logarithmierten Signalintensität gegen das Quadrat der Gradientstärke eine Gerade ergibt, so dass die Auswertegleichung (**4.1**) erfüllt ist.

$$\frac{I}{I_0} = \mathrm{e}^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 \mathcal{D}\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} \tag{4.1}$$

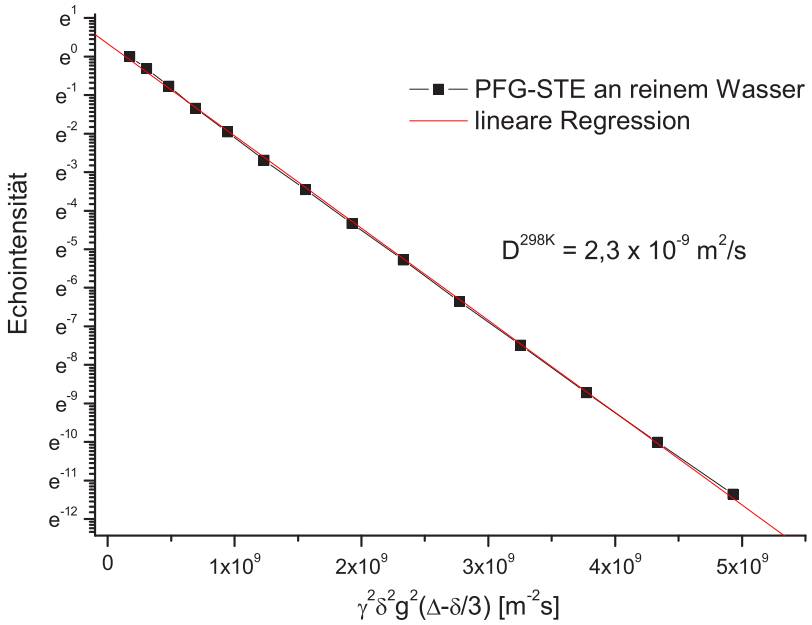


Abbildung 4.1: Echosignalintensitäten von reinem Wasser aus PFG-STE-Diffusionsmessung

Durch Auftragung von $ln\frac{I}{I_0}$ gegen den Term $\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})$, der neben der quadrierten Gradientstärke ausschließlich konstante Parameter enthält, lässt sich aus der negativen

Steigung der resultierenden Geraden direkt der Selbstdiffusionskoeffizient $\mathcal{D}$ ablesen. Dieser steht mit $\mathcal{D}^{298K} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ in guter Übereinstimmung mit dem Literaturwert von $\mathcal{D}^{298K} = 2,299 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ [92]. Die Funktionsweise des Gradientsystems ist somit als zuverlässig anzusehen.

In den folgenden Kapiteln werden ^{1}H-Spektren gezeigt, die mittels einer Wasserunterdrückung durch eine PFG-SE-Sequenz (**Abbildung 2.12**) aufgenommen wurden. Mit dieser Technik wird das Wassersignal aufgrund der hohen Mobilität von Wasser gegenüber gelösten Polymeren so weit unterdrückt, dass ein Spektrum der Polymerbestandteile mit ursprünglich sehr geringer Signalintensität erhalten wird. Im folgenden wird anhand dieser Spektren das Phänomen des *„verlangsamten“* Wassers diskutiert. Um sicherzustellen, dass Wassersignale in Spektren mit Wasserunterdrückung tatsächlich von Wasserfraktionen mit reduziertem (apparenten) Diffusionskoeffizienten stammen, wurde ebenfalls begleitend zu den Messungen regelmäßig ein Spektrum von reinem Wasser aufgenommen.

(**Abbildung 4.2**) zeigt ^{1}H-Spektren von reinem Wasser und einer Alginatlösung, die mit einem PFG-SE-Wasserfilter aufgenommen wurden. Die Experimentbedingungen entsprechen den im folgenden verwendeten Standardparametern. Die Messung an der Wasserprobe verdeutlicht die vollständige Eliminierung des Wassersignals, während die Alginatlösung ein Spektrum liefert, in dem neben den Polymerresonanzen auch eine ausgeprägte Wasserlinie bei 4,8ppm auftritt. Der Vergleich der beiden Spektren stellt somit sicher, dass Wassersignale, die unter diesen experimentellen Bedingungen beobacht werden, eindeutig Wasserfraktionen zuzuordnen sind, die einen (apparenten) Diffusionskoeffizienten besitzen, der signifikant kleiner ist, als der von freiem Wasser.

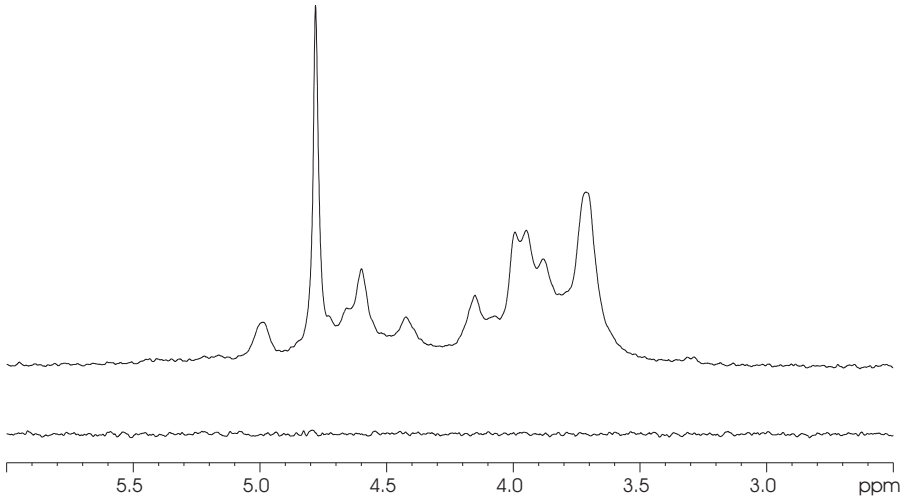


Abbildung 4.2: PFG-SE-Protonenspektren von Wasser und Alginatlösung unter identischen Experimentbedingungen. Die Standardparameter zur vollständigen Eliminierung des freien Wassersignals sind: Diffusionszeit $\Delta = 10ms$, Gradientpulslänge $\delta = 1ms$, Gradientstärke $g = 3,5T/m$. Bei diesen Experimentbedingungen wird in reinem Wasser die Wasserresonanzlinie aufgrund des hohen Diffusionskoeffizienten vollständig ausgelöscht (unteres Spektrum), während das Spektrum langsamer diffundierender Bestandteile (oben) nahezu unbeeinflusst bleibt.

4.1.2 Bipolare Gradienten

Zahlreiche Publikationen empfehlen bei PFG-Experimenten die Verwendung von bipolaren Gradienten [93, 94, 95]. Bei dieser Methode wird der Gradientpuls von einem 180°-rf-Puls unterbrochen, wobei zunächst ein positiver Gradient geschaltet wird und nach dem 180°-Puls der betragsmäßig gleiche negative Gradient (**Abbildung 4.3**). Mit Hilfe der bipolaren Gradienten wurden Pulsprogramme entwickelt, die den störenden Einfluss sog. *„eddy currents“* minimieren sollen [94]. Diese Wirbelströme werden im PFG-Experiment durch das, aufgrund der schnell geschalteten Gradienten, fluktuierende Magnetfeld in das Spulensystem induziert. Diese Ströme ihrerseits erzeugen zusätzliche Magnetfelder, die das Profil der Feldgradienten stören und bis zu mehreren Millisekunden bestehen können [72].

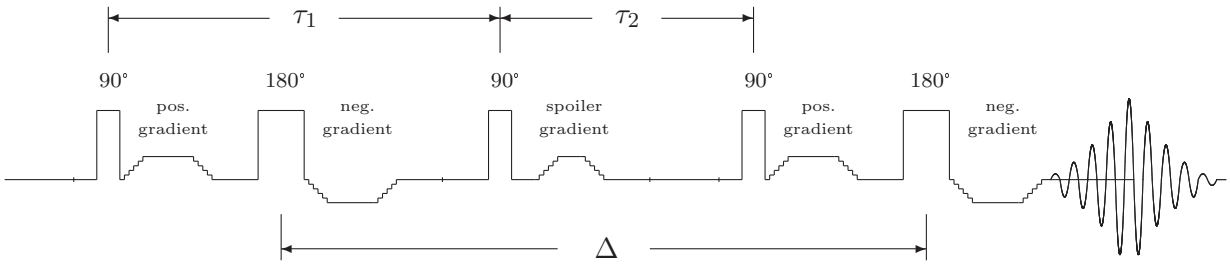


Abbildung 4.3: Pulssequenz eines PFG-Stimulated-Echos mit Bipolaren Gradienten

Neben der Minimierung von *„eddy currents“* beschreibt Avram [95], dass durch die Verwendung bipolarer PFG-Sequenzen Austauscheffekte detektiert werden können, die den monopolaren Hahn- bzw. Stimulated-Echo Sequenzen verborgen bleiben. Im System Resorcin[4]aren/Wasser ermittelte er einen monoexponentiellen Signalabfall bei Benutzung der konventionellen Pulstechniken und einen biexponentiellen Signalabfall unter Verwendung bipolarer Pulstechniken. Die daraus erhaltenen Zerfallskurven sind den Kurven in **Abbildung 4.4** verblüffend ähnlich.

Die hier gezeigten Zerfallskurven stammen allerdings von reinem Wasser, welches nur einen Selbstdiffusionskoeffizienten besitzt und keine Austauschphänomene aufweisen kann. Das konventionelle Diffusionsexperiment mit Stimulated-Echo gibt diesen Sachverhalt korrekt wieder, indem es einen monoexponentiellen Signalabfall detektiert. Das bipolare Experiment dagegen zeigt einen biexponentiellen Signalabfall, der für reines Wasser physikalisch nicht sinnvoll ist. Dieses Verhalten wurde an zwei verschiedenen Spektrometern (Avance 400 und DRX 500) unabhängig voneinander festgestellt. Aufgrund der zweifelhaften Ergebnisse, die mit bipolaren PFG-Pulssequenzen erlangt wurden, wurden daher in der vorliegenden Arbeit ausschließlich monopolare PFG-Experimente mit dem Hahn- bzw. Stimulated-Echo durchgeführt. Die Beeinträchtigungen durch Wirbelströme zeigten dabei keinen störenden Effekt.

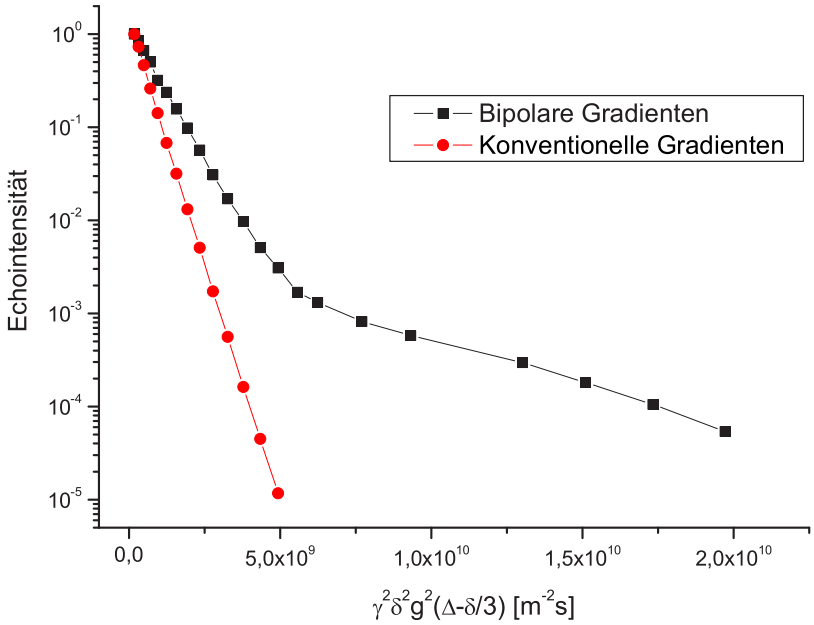


Abbildung 4.4: Echosignalintensitäten von reinem Wasser aus PFG-STE-Diffusionsmessungen mit konventionellen (monopolaren) und bipolaren Gradienten. Während das monopolare Pulsprogramm einen einzigen Diffusionskoeffizienten von $\mathcal{D}^{298K} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ liefert, ist das Ergebnis des bipolaren Experiments nicht sinnvoll.

4.2 Vorarbeiten

Vogt untersuchte mittels PFG-NMR das Diffusionsverhalten von Wasser in Biofilmen von Pseudomonas aeruginosa [96, 1, 97, 98]. Der überwiegende Anteil des Wassers (mehr als 99%) zeigte dabei einen gegenüber reinem Wasser ($\mathcal{D}^{298K} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$) nur leicht erniedrigten Diffusionskoeffizienten ($\mathcal{D}^{298K} = 1,7 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$), welcher der hohen Viskosität des Biofilms zuzuschreiben ist. Neben diesem *„freien“* oder auch *„Bulk“*- Wasser wurde eine kleine Wasserfraktion von wenigen Promille gefunden, die einen deutlich verringerten Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung von $10^{-12}\ m^2/s$ aufweist. **Abbildung 4.5** zeigt das Ergebnis des Stimulated-Echo Experiments an einem P. aeruginosa Biofilm. Die zwei deutlich unterschiedlichen Steigungen der Echozerfallskurve in der logarithmischen

Darstellung repräsentieren (mindestens) zwei Diffusionskoeffizienten. Zum Vergleich ist die Echozerfallskurve von reinem Wasser mit nur einem Diffusionskoeffizienten aufgetragen.

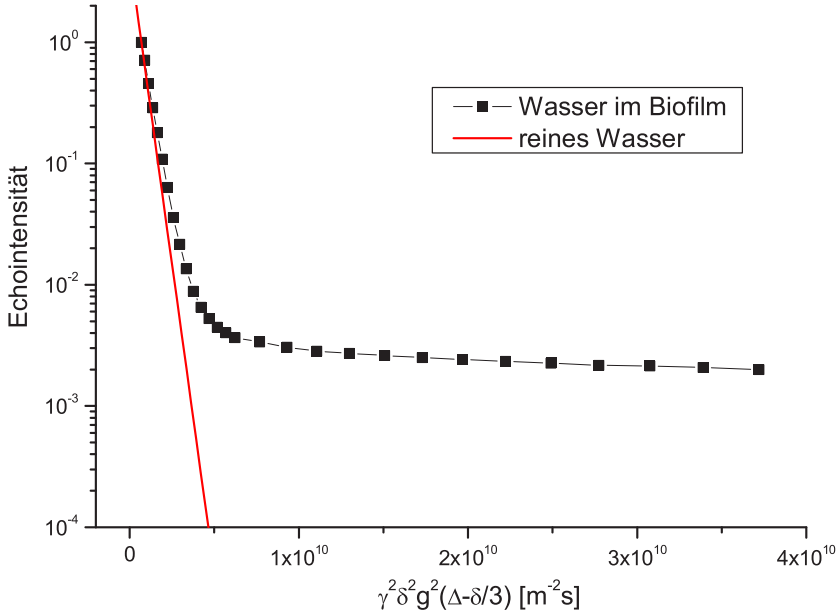


Abbildung 4.5: Echosignalintensitäten von Wasser im Biofilm von P. aeruginosa aus PFG-Diffusionsmessung zur Visualisierung des langsamen Wassers

Aufgrund der Vielzahl der Bestandteile von Biofilmen (Mikroorganismen, Polysaccharide, Proteine, Glycoproteine, Lipide), der hohen Heterogenität und der daraus resultierenden Vielschichtigkeit der möglichen Effekte, die für das Auftreten des langsamen Wassers verantwortlich sein können (z.B. intrazelluläres Wasser oder Wechselwirkungen zwischen Wasser und EPS-Bestandteilen) wurde versucht, vereinfachte Systeme zu finden, an denen diese Effekte auftreten, wodurch diese besser zu untersuchen, reproduzierbarer und leichter interpretierbar werden.

4.3 Algenalginat

In der Forschergruppe *„Physikalische Chemie der Biofilme“*, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit entstand, wurde vornehmlich an Biofilmen des Bakteriums Pseudomonas

aeruginosa geforscht. Biofilme dieser Spezies enthalten neben dem Hauptbestandteil aller Biofilme, Wasser, als hauptsächliche extrazelluläre Substanz das Polysaccharid Alginat. Als Basissystem zur Untersuchung der Eigenschaften von Wasser im Biofilm wurden daher zunächst Alginat/Wasser-Systeme gewählt, um das in **Abschnitt 4.2** gezeigte Verhalten zu verstehen. Ein entscheidendes Merkmal für die Eigenschaften von Alginaten ist, neben der molaren Masse, das Verhältnis der Monomereinheiten (M/G) zueinander [39]. Im Folgenden wurden daher verschiedene kommerziell erhältliche Algenalginate mit verschiedenen M/G-Verhältnissen und Molmassen, sowie das Bakterienalginat des Pseudomonas aeruginosa Stammes SG81 untersucht.

4.3.1 PFG-Messungen

Mittels der PFG-NMR-Spektroskopie wurden Diffusionsmessungen an Alginat/Wasser-Systemen durchgeführt, deren Zusammensetzung dem Alginatgehalt in Biofilmen entsprach (1-4 Gewichts-%). Die verwendeten Algenalginate waren das guluronatreiche Manugel und das mannuronatreiche Manucol **Tabelle 4.1**

Tabelle 4.1: Zusammensetzung und molare Masse der verwendeten Algenalginate

	Manugel DJX	Manucol DM	Manucol LB
molare Masse [g/mol]	120.000 - 130.000	147.000	18.000
Anzahl Monomere	605 - 655	742	91
Anteil M	30 - 35 %	65 - 70 %	65 - 70 %
Anteil G	65 - 70 %	30 - 35 %	30 - 35 %
Länge (gestreckt)	$\sim 0,3\mu m$	$\sim 0,4\mu m$	$\sim 0,05\mu m$

Die Diffusionsmessungen an dem Biofilmmodellsystem Manugel DJX/Wasser mit der Stimulated-Echo Pulssequenz ergaben ähnlich Ergebnisse wie die entsprechenden Messungen an vollständigen Biofilmen. **Abbildung 4.6** zeigt einen Spektrensatz, der mittels eines PFG-STE-Experiments an einer 4%igen Manugel DJX Lösung aufgenommen wur-

de. Neben den Polymerlinien, die sich aufgrund der geringen Mobilität des Polysaccharids mit steigender Gradientstärke kaum verändern, ist ein Wassersignal zu erkennen, was mit steigendem Gradienten rasch abnimmt. Der hier dargestellte Bereich entspricht allerdings so hohen Gradientstärken, bei denen reines Wasser bereits kein Signal mehr zeigt. Wie im Biofilm lässt sich also auch in diesem einfachen Modellsystem *„verlangsamtes“* Wasser nachweisen.

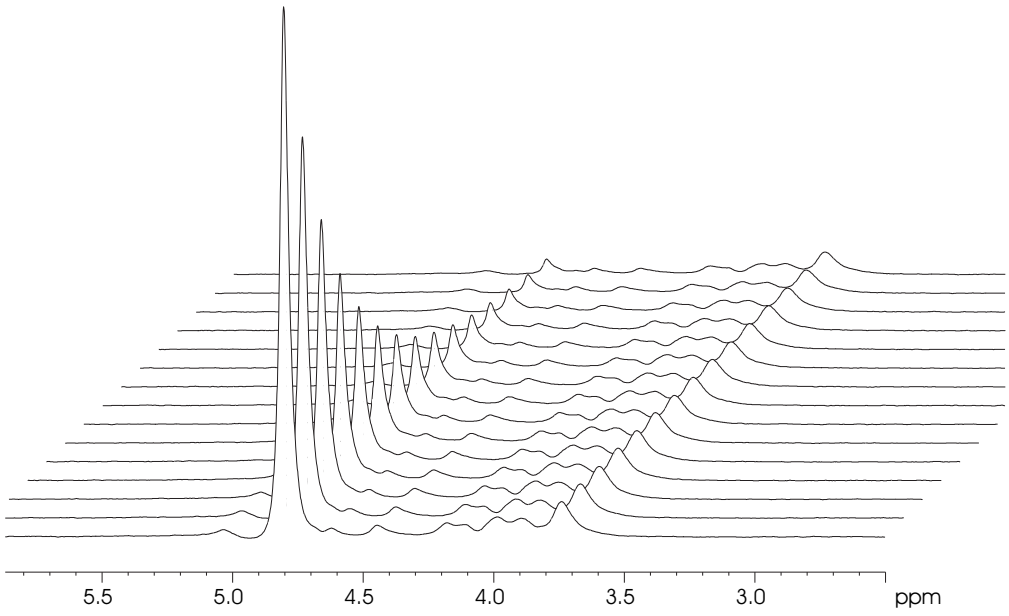


Abbildung 4.6: PFG-STE-Experiment an einer wässrigen Alginat-Lösung: Signalabfall des Wassersignals mit steigendem Feldgradienten. Die Abbildung zeigt die Spektren, die mit sehr hohen Gradienten aufgenommen wurden, bei denen die Resonanzlinie von reinem Wasser bereits vollständig eliminiert wird.

Abbildung 4.7 zeigt die aus Stimulated-Echo Experimenten ermittelten Wassersignalintensitäten aus Manugel-Lösung bei verschiedenen Diffusionszeiten. Während der überwiegende Teil des Wassers einen, dem reinen Wasser sehr ähnlichen, Diffusionskoeffizienten besitzt ($\mathcal{D}^{296K} = 2,2 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$), zeigt eine kleine Wasserfraktion (unter 1%) einen deutlich verringerten Diffusionskoeffizienten in der Größenordnung von ($10^{-10}\ m^2/s$). Auffällig an den Signalzerfallskurven ist die Auffächerung der Kurven im hohen Gradientbereich. Dieser Effekt resultiert aus einer Diffusionszeitabhängigkeit des (apparenten) Diffusionskoeffizienten. Da der Betrag der Steigung der Kurven mit steigender Diffusionszeit immer

kleiner wird, nimmt der (apparente) Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Wasserfraktion mit steigender Diffusionszeit ab (**Abbildung 4.8**).

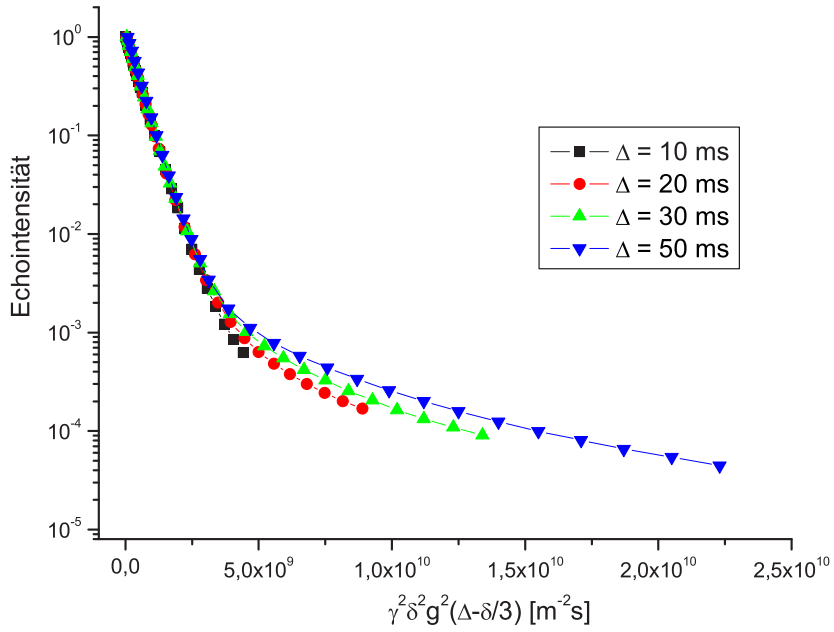


Abbildung 4.7: Manugel DJX Lösung (4%): Echozerfallskurve des Wassersignals aus Stimulated-Echo Experiment

Da ein Diffusionskoeffizient von der Methode seiner Bestimmung unabhängig sein muss und somit auch von der Diffusionszeit, bei der die Messung stattfindet, müssen bestimmte Effekte dafür verantwortlich sein, dass der Diffusionskoeffizient kleiner erscheint. Aus diesem Grunde wurde auch bereits vom „apparenten“ Diffusionskoeffizienten gesprochen. Typische Ursachen für eine Diffusionszeitabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten können sein:

1. **Gehinderte Diffusion**: eine Wasserfraktion ist in Poren eingeschlossen. Da das PFG-Experiment das mittlere Verschiebungsquadrat der Wassermoleküle mit der Diffusionszeit korreliert, wird der apparente Diffusionskoeffizient mit zunehmender Diffusionszeit immer kleiner, weil sich die Wassermoleküle nicht frei ausbreiten können (s. auch **Abschnitt 4.5**).

2. **Chemischer Austausch**: Protonen des Wassers können mit Polymerprotonen (OH-Gruppen) während des Diffusionsexperiments austauschen. Da sie dadurch nur einen Teil der Diffusionszeit frei diffundieren, erscheinen sie mit zunehmender Diffusionszeit immer langsamer.

3. **Kreuzrelaxation**: Protonen des Wassers können mit nichtaustauschenden Polymerprotonen (CH-Gruppen) bei genügend langer Kontaktzeit die Magnetisierung austauschen. Der Effekt für das PFG-Experiment ist der gleiche wie beim chemischen Austausch (s. auch **Abschnitt 4.5**).

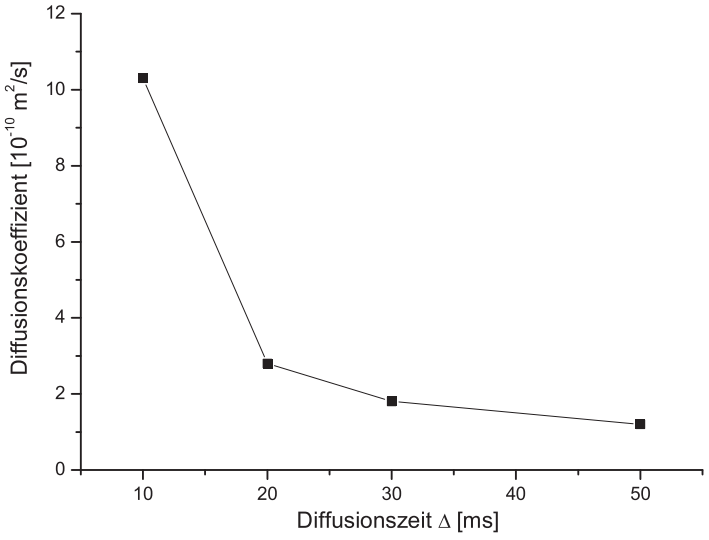


Abbildung 4.8: PFG-STE Experiment an Manugel DJX Lösung (4%): Diffusionszeitabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der „verlangsamten“ Wasserfraktion

Anhand der Diffusionsmessungen mit der Stimulated-Echo Technik wurde zunächst angenommen, dass es sich bei der hier auftretenden Zeitabhängingkeit des Wasserdiffusionskoeffizienten um ein Kreuzrelaxationsphänomen handeln muss, da dieses für Polymer/Wasser-Systeme bereits gut dokumentiert wurde. [99, 83]. Zur Verifizierung dieser Annahme wurden an demselben Manugel/Wasser-System Diffusionsmessungen mit Hilfe des Hahn-Echos durchgeführt. Im Gegensatz zum Stimulated-Echo, wo die Magnetisierung während

der Diffusionszeit parallel zum Magnetfeld (z-Richtung) gespeichert wird, liegt die Magnetisierung beim Hahn-Echo während der Diffusionszeit in der xy-Ebene. Daraus resultiert, dass das Hahn-Echo auf Kreuzrelaxationseffekte unempfindlich reagiert [82, 83]. Ein Vergleich der beiden Methoden kann daher Aufschluss darüber geben, ob es sich tatsächlich um Kreuzrelaxationseffekte handelt.

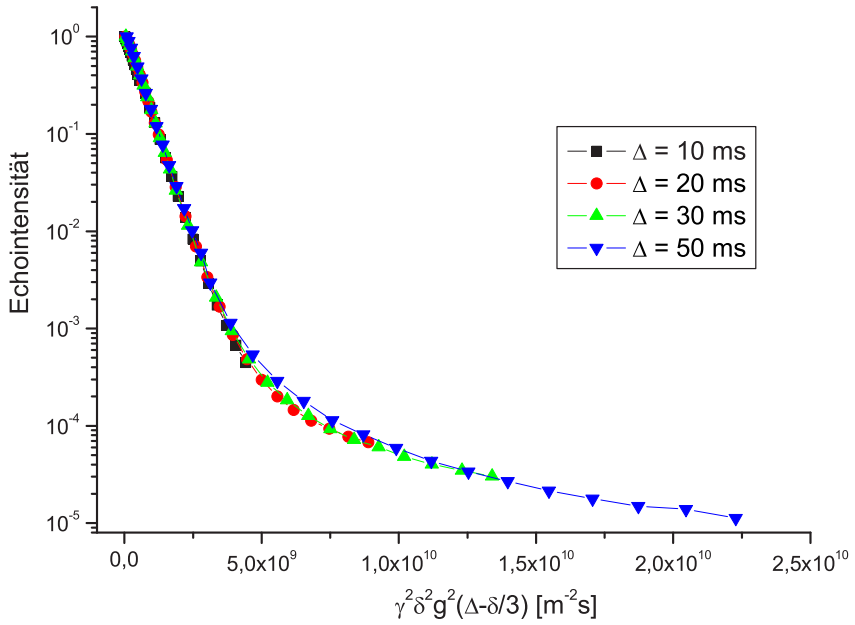


Abbildung 4.9: Manugel DJX Lösung (4%): Echozerfallskurve des Wassersignals aus Hahn-Echo Experiment

Abbildung 4.9 zeigt das identische Diffusionsexperiment aufgenommen mit der Hahn-Echo Pulsfolge. Es fällt auf, dass ebenfalls eine „verlangsamte“ Wasserfraktion detektiert wird. Die beim Stimulated-Echo auftretende Auffächerung der Signalzerfallskurven ist dagegen nicht zu verzeichnen. Der (apparente) Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Wasserfraktion ist somit nicht diffusionszeitabhängig. Die Signalintensitäten der „verlangsamten“ Wasserfraktion liegen im Hahn-Echo deutlich unter denen des Stimulated-Echos. Der Intensitätsgewinn dieser Fraktion im Stimulated-Echo gegenüber dem Hahn-Echo kann somit als Beitrag des Magnetisierungsaustausches gedeutet werden. Der zeitunab-

hängige Anteil aus dem Hahn-Echo muss dagegen einer Wasserfraktion zugeschrieben werden, die scheinbar eine echte eingeschränkte Mobilität innerhalb der Polymermatrix haben muss. Die Ergebnisse, die die PFG-SE- und PFG-STE-Experimente an Systemen von guluronatreichem Manugel DJX in Wasser lieferten sind deckungsgleich mit den entsprechenden Experimenten an mannuronatreichem Manucol DM in Wasser, so dass auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet wird.

Da das Stimulated-Echo Experiment eine Kombination verschiedener, überlagerter Effekte zeigt, wird die nachfolgende nähere Untersuchung der „verlangsamten“ Wasserfraktion anhand von Hahn-Echo Experimenten durchgeführt. Weitere Informationen wurden davon erwartet, die Diffusionszeit gegen Null konvergieren zu lassen, um etwaige Änderungen des Diffusionsverhalten im Kurzzeitbereich festzustellen. **Abbildung 4.10** zeigt ein Hahn-Echo Experiment am System Manucol DM/Wasser, wobei die Diffusionszeit bis zum technisch kleinstmöglichen Wert von 2,5 ms variiert wird. Für Diffusionszeiten über 10 ms sind die Intensitätskurven wiederum deckungsgleich. Im Bereich unter 10 ms ist dagegen eine sehr starke Auffächerung der Kurven zu erkennen, und somit wiederum eine Diffusionszeitabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten zu verzeichnen.

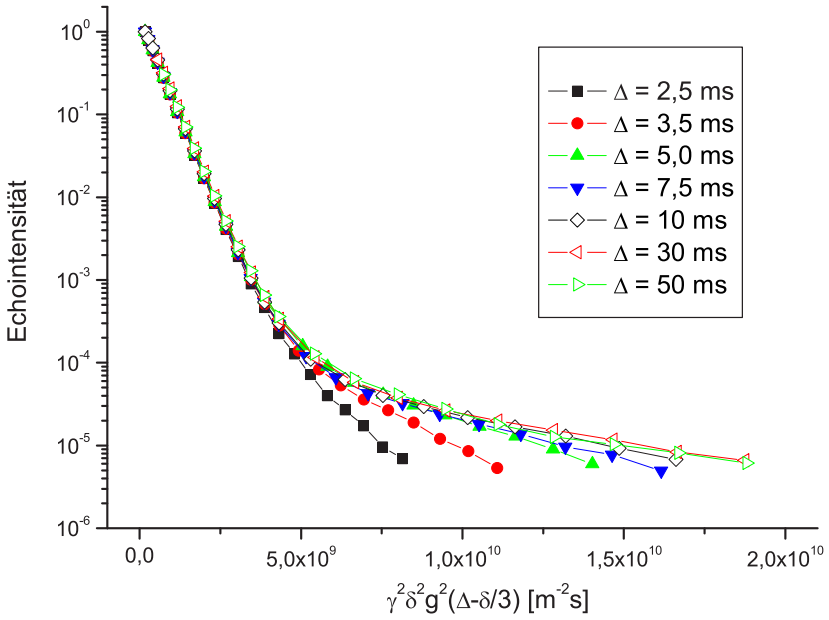


Abbildung 4.10: Manucol DM (1,0%): Wassersignalintensitäten aus Hahn-Echo Experiment. Für Diffusionszeiten unter 10 *ms* zeigt der Diffusionskoeffizient der langsamen Wasserfraktion eine Abhängigkeit von der Diffusionszeit.

Der apparente Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Wasserfraktion scheint für $\Delta \rightarrow 0$ gegen den Diffusionskoeffizienten des freien Wassers zu konvergieren. Dieses Verhalten ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass es sich um gehinderte Diffusion handeln könnte, d.h., dass ein kleiner Anteil Wasser dergestalt in einer Polymermatrix eingekapselt ist, so dass die Wassermoleküle zwar die Beweglichkeit von freiem Wasser besitzen, aber aufgrund der geringen Porendimensionen in der freien Ausbreitung gehindert sind. **Abbildung 4.11** zeigt die Diffusionszeitabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der „verlangsamten“ Wasserfraktion.

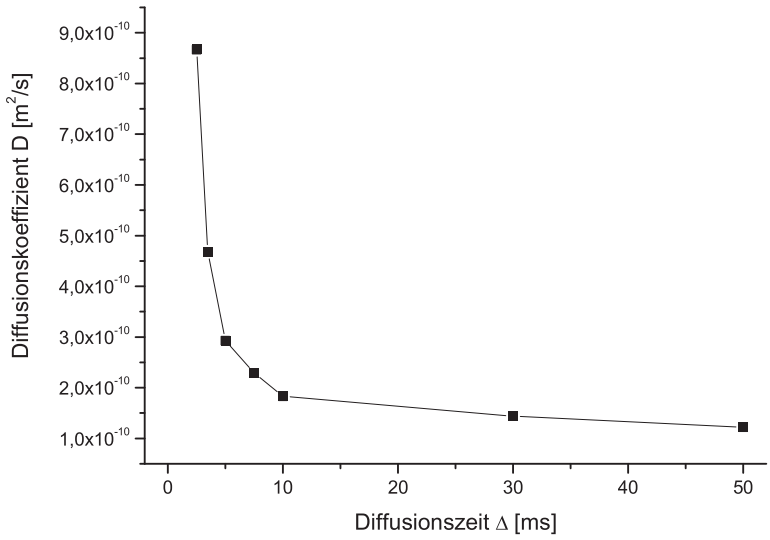


Abbildung 4.11: Manucol DM (1,0%): Diffusionszeitabhängigkeit des apparenten Diffusionskoeffizienten der langsamen Wasserfraktion aus Hahn-Echo Experiment. Für lange Diffusionszeiten konvergiert der Diffusionskoeffizient gegen $1,2 \cdot 10^{-10}\ m^2/s$.

Das ausschließliche Auftreten von gehinderter Diffusion würde für lange Diffusionszeiten eine Konvergenz des apparenten Diffusionskoeffizienten gegen 0, bzw. gegen den Diffusionskoeffizienten der Matrix bewirken. Das vorliegende Experiment zeigt jedoch eine Konvergenz gegen einen Wert von etwa $1,2 \cdot 10^{-10}\ m^2/s$. Dieser Diffusionskoeffizient ist für Polymerbestandteile, in denen Wasser eingeschlossen ist, viel zu hoch. Diffusionskoeffizienten von Alginat in Wasser wurden in der Größenordnung von $10^{-12}\ m^2/s$ bestimmt. Neben der gehinderten Diffusion muss es daher einen zusätzlichen langsamen Austausch zwischen dem eingekapselten und dem Bulk-Wasser geben, der für eine Ausmittelung der beiden (apparenten) Diffusionskoeffizienten sorgt. In **Abschnitt 4.5** werden Modelle zur Erklärung dieser Phänomene vorgestellt.

Das Auftreten von gehinderter Diffusion setzt voraus, dass ein Teil des Wassers in den Alginatproben von einer Polymermatrix eingekapselt wird. Zum Beweis der Existenz dieser

Kapseln und zur Abschätzung deren Größe wurde die Alginatlösung einer Mikrofiltration durch einen Sterilfilter mit $0,2\mu m$ Porendurchmesser unterzogen. Die so behandelte Lösung wurde dann mittels PFG-Wasserfilter auf langsames Wasser untersucht (**Abbildung 4.12**).

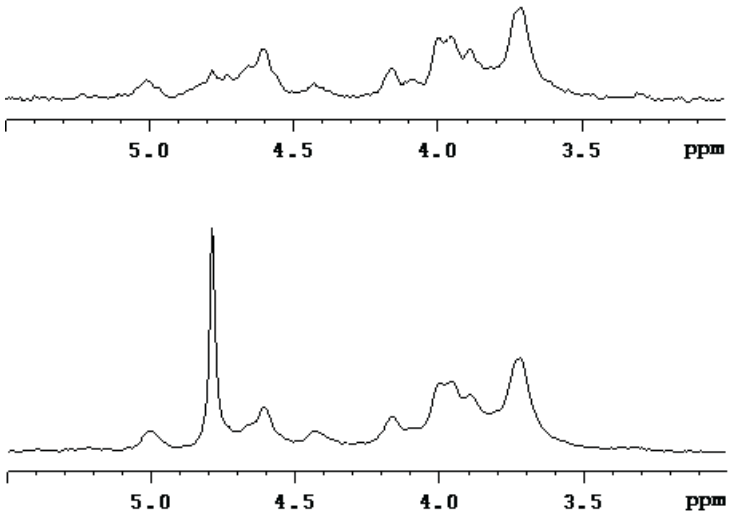


Abbildung 4.12: PFG-SE-Wassergefiltertes ^{1}H-Spektrum einer Manucol DM Lösung (1,0%) (unten) und derselben Lösung nach Filtration durch einen Sterilfilter mit $0,2\mu m$ Porengröße (oben).

Filtration der Alginatlösung durch einen Mikrofilter bewirkt die nahezu völlige Auslöschung des „verlangsamten“ Wassersignals. Damit ist eindeutig gezeigt, dass das „verlangsamte“ Wasser in größeren Aggregationen des Polymers eingekapselt ist. Da die Porengröße des Filters in der Größenordnung einer komplett gestreckten Alginatkette liegt (**Tabelle 4.1**), können die Aggregate nicht auf einzelne, verknäulte Polymerketten zurückgeführt werden. Ferner zeigen die Spektren, dass die Alginatsignale von der Mikrofiltration in keiner Weise beeinflusst werden. Das in Lösung befindliche und damit für das Flüssig-NMR-Experiment sichtbare Alginat passiert den Filter somit ungehindert. Die Protonen in den aggregierten Polymerpartikeln sind dagegen offensichtlich derart immobilisiert, dass sie im Flüssigspektrum keinerlei Signal zeigen. Die Aggregierung kann daher ausschließlich über die gehinderte Diffusion des eingeschlossenen Wassers beobachtet werden.

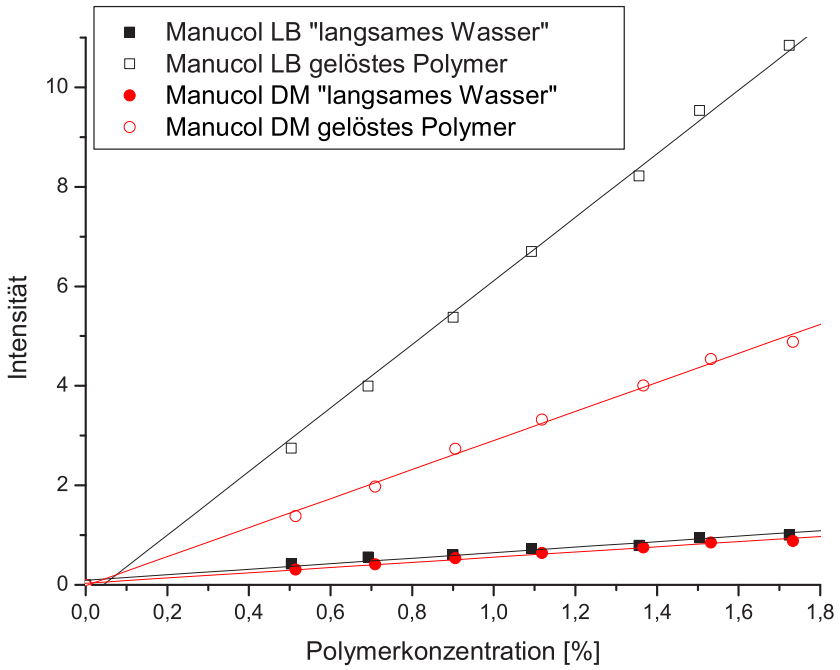


Abbildung 4.13: Konzentrationsabhängigkeit der Signalintensitäten des langsamen Wassers und des Polysaccharides in Lösungen von Alginaten verschiedener Molmassen.

Die nächste Frage, die sich anschließt, zielt auf den Verlauf der Aggregierung bezogen auf die Alginatkonzentration ab. **Abbildung 4.13** korreliert die Signalintensitäten des „verlangsamten“ Wassers und des gelösten Polymers mit der Konzentration zweier Alginate unterschiedlicher Molmasse. Das „verlangsamte“ Wasser dient hierbei als Sonde für den Grad der Aggregierung des Polymers. Die zugrundeliegenden Spektren wurden mit der Standardwasserunterdrückungsmethode aufgenommen. Die Signalintensitäten des „verlangsamten“ Wassers wurden bei einem Gradienten von 3,5T/m (vollständige Auslöschung des freien Wassers) aufgenommen, während die Intensitäten des gelösten Polymers durch Integration über den gesamten Bereich von Spektren, die bei einem Gradienten von 8T/m (vollständige Auslöschung jeglichen Wassers) aufgenommen wurden, erhalten wurden. Zunächst fällt auf, dass das kürzerkettige Manucol LB ein deutlich intensiveres Polymersignal aufweist, da es eine viel höhere Mobilität besitzt als das langkettige Pendant,

was sich auch in der deutlich geringeren Viskosität der Lösung niederschlägt. Ansonsten zeigen beide Alginate ein identisches Verhalten. Der Anteil des eingekapselten Wassers ist bei beiden Polymeren annähernd gleich groß. Ferner steigen sowohl die Intensität des gelösten Polymers als auch die des eingekapselten Wassers über den gesamten Konzentrationsbereich linear mit der Konzentration an. Es ist somit keine kritische Konzentration zu erkennen, bei der die Aggregierung einsetzt (wie z.B. bei der Mizellbildung).

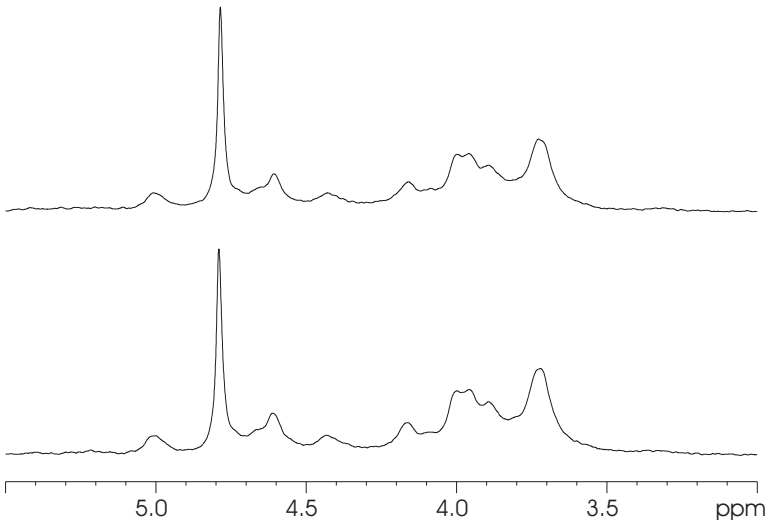


Abbildung 4.14: Wassergefiltertes Protonenspektrum von Lösungen von gereinigtem (oben) und unbehandeltem (unten) Manucol DM

Der in **Abbildung 4.13** dargestellte Verlauf der Aggregierung wirft Zweifel daran auf, ob die Aggregate wirklich ausschließlich aus Alginat bestehen. Vergleichsmessungen (**Abbildung 4.14**) an Lösungen aus unbehandeltem Manucol und Manucol, das nach der Standardvorschrift [39] gereinigt wurde, zeigten keinerlei Unterschiede, weshalb zunächst von einer ausreichenden Reinheit der Alginate ausgegangen werden konnte. Zur vollständigen Aufklärung des Phänomens der Aggregierung wurde eine nähere Untersuchung der Alginate und der darin enthaltenen Aggregate mittels ^{13}C-Festkörper-NMR durchgeführt.

4.3.2 Festkörper-NMR

Von dem in den PFG-Experimenten eingesetzten Algenalginat Manucol DM wurden zur Überprüfung auf mögliche Verunreinigungen, die im Flüssigspektrum nicht sichtbar sind, mit der CP-MAS Technik ^{13}C-Festkörperspektren aufgenommen (**Abbildung 4.15**).

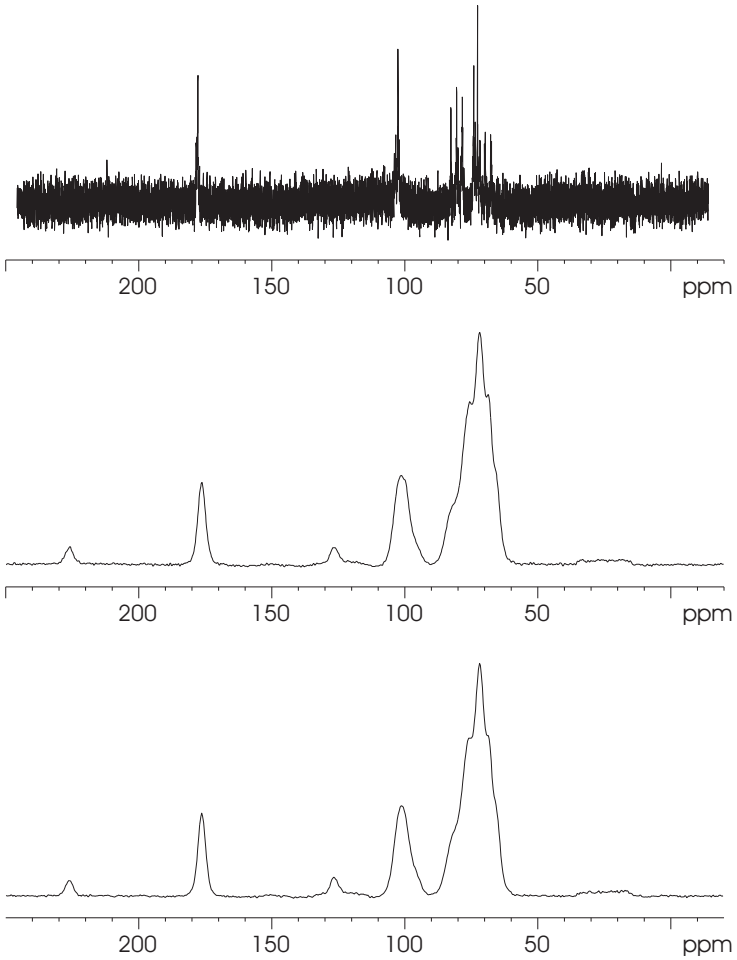


Abbildung 4.15: ^{13}C-Spektren von Manucol DM. Oben: Flüssigspektrum einer 1%igen Lösung. Mitte: Festkörperspektrum von unbehandeltem Manucol DM. Unten: Festkörperspektrum von standardmäßig gereinigtem Manucol DM. Im Bereich zwischen 15 und 40 ppm sind in beiden Festkörperspektren im gleichen Maße Verunreinigungen zu erkennen.

Der Vergleich mit dem ^{13}C-Flüssigspektrum zeigt, dass im Festkörperspektrum im Bereich von 15 bis 40 ppm Resonanzen erscheinen, die eine sehr geringe Intensität besitzen

und nicht dem Alginat zuzuordnen sind [1]. Diese Linien treten im Spektrum von gereinigtem Alginat im gleichen Maße auf, wie im unbehandelten Manucol. Um festzustellen, ob diese geringfügigen Verunreinigungen mit der Aggregierung in den Alginatlösungen zusammenhängen, wurden von den isolierten Aggregaten ebenfalls ^{13}C-Festkörperspektren aufgenommen (**Abbildung 4.16**).

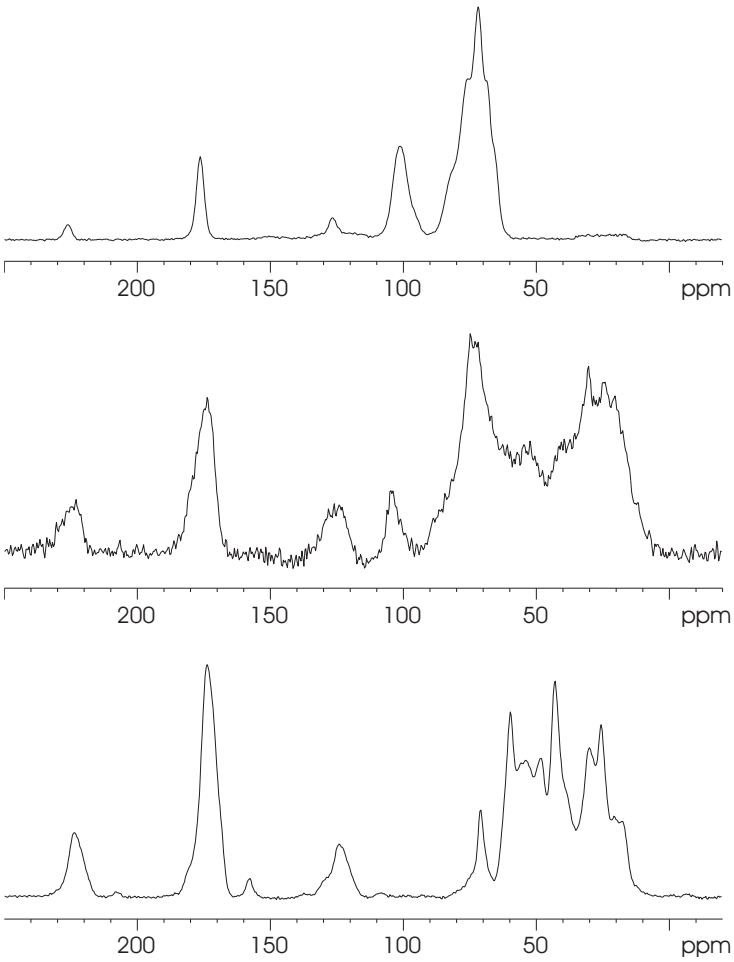


Abbildung 4.16: ^{13}C-Festkörper-Spektren von Manucol DM (oben), Zentrifugationsrückstand aus Manucol DM-Lösung (Mitte) und Gelatine als Vergleichsprotein (unten). Das mittlere Spektrum zeigt deutlich die Charakteristika von Polysaccharid und Protein.

[1] Die zusätzlichen Linien im Festkörperspektrum bei 125 und 225 ppm sind Rotationsseitenbanden der C6-Resonanz bei 175 ppm.

Zur Isolierung der aggregierten Partikel wurde eine Manucol DM-Lösung bei 4000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des gelösten Alginats wurde der Zentrifugationsrückstand dreimal in destilliertes Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert. Der Rückstand wurde nach Vakuumtrocknung der CPMAS-Messung unterworfen. Der Vergleich der Festkörperspektren von Manucol DM und dem Zentrifugationsrückstand zeigt deutlich, dass die Verunreinigung im Rückstand stark angereichert ist. Der Resonanzbereich der Verunreinigung lässt vermuten, dass es sich um Proteine handeln könnte. Zum Vergleich wurde ein Spektrum von Gelatine, als Musterprotein, aufgenommen, welches ebenfalls einen breiten Resonanzbereich zwischen 10 und 50 ppm besitzt. Die Alginatresonanzen sind im Rückstand ebenfalls noch vertreten, so dass aus den Festkörpermessungen geschlossen werden kann, dass die wassereinschließenden Partikel durch Aggregation von Alginat mit Proteinen entstehen.

4.3.3 Proteinanalytik

Aufgrund der Vermutung, dass die wassereinschließenden Aggregate in Lösungen von Algenalginaten aus Alginat/Protein-Clustern bestehen, wurden die Alginate Standardtests unterzogen, um den Proteingehalt in den Proben zu bestimmen (**Tabelle 4.2**) [100].

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Proteinanalytik an Algenalginat

Alginat	Proteingehalt in $\mu g/mg$
Manucol DM unbehandelt	6,8
Manucol DM gereinigt nach Standardmethode	3,9
Manucol DM sterilfiltriert	3,6

Das Rohalginat enthält demnach eine sehr große Menge an Verunreinigungen durch Prote-

ine. Durch die Standardreinigung wird bereits ein großer Teil der Proteine entfernt. Hierbei muss es sich um niedermolekulare Proteine handeln (< 12.000 g/mol), die bei der Dialyse dem Alginat entzogen werden. Die Aggregate vermag diese Methode freilich nur unzureichend zu entfernen, da keine signifikante Verringerung des „verlangsamten“ Wasseranteils im gereinigten Alginat zu verzeichnen ist. Auffällig ist ferner, dass im sterilfiltrierten Alginat, welches keinerlei wassereinschließende Partikel mehr enthält, der Proteingehalt nur geringfügig geringer ist, als im standardgereinigten. Für die Aggregierung mit Alginat ist daher nur ein sehr geringer Anteil des Proteins verantwortlich.
Nähere Betrachtungen über die Beschaffenheit der Proteine, die mit Alginat wassereinschließende Cluster bilden, werden in **Kapitel 8** getroffen.

4.3.4 Partikelgrößenbestimmung mittels Laserdiffraktion

Um die Parameter der Modelle in **Abschnitt 4.5.1** experimentell zu untermauern, wurde die Partikelgrößenverteilung in Algenalginatlösung mit Hilfe der Laserdiffraktion bestimmt.

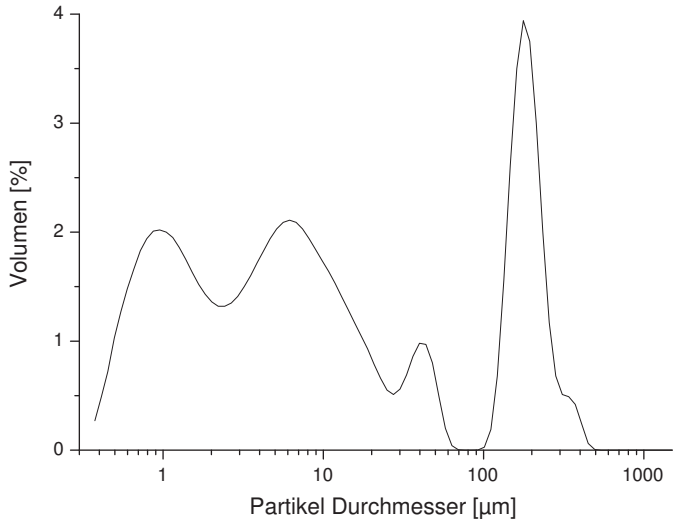


Abbildung 4.17: Laserdiffraktionsexperiment an einer Lösung von unbehandeltem Manucol DM (0,2%). Die Abbildung zeigt den Anteil der einzelnen Partikelgrößen am Gesamtpartikelvolumen.

Zu diesem Zweck mussten hochverdünnte Lösungen eingesetzt werden, um die, für die Methode notwendige, Trübung der Lösung zu gewährleisten. **Abbildung 4.17** zeigt den Anteil am Gesamtpartikelvolumen, den die einzelnen Partikelgrößen in unbehandelter Manucollösung einnehmen [2]. Es resultiert ein breites Spektrum an Partikelgrößen zwischen 0,3 und 500 μm. Da die Volumenverteilung, die das exakte Ergebnis der Laserdiffraktionsmessung widerspiegelt, möglicherweise ein verzerrtes Bild der numerischen Verteilung der Partikelgrößen vorgibt, ist es sinnvoll, diese aus den Messergebnissen abzuschätzen. Unter der Voraussetzung kugelförmiger Sphären kann die numerische Verteilung aus der Volumenverteilung berechnet werden (**Abbildung 4.18**). Demnach liegt das Maximum der Verteilung der Partikelgrößen bei etwa 0,5 μm. Über 90% der Aggregate haben einen Durchmesser von unter 1 μm.

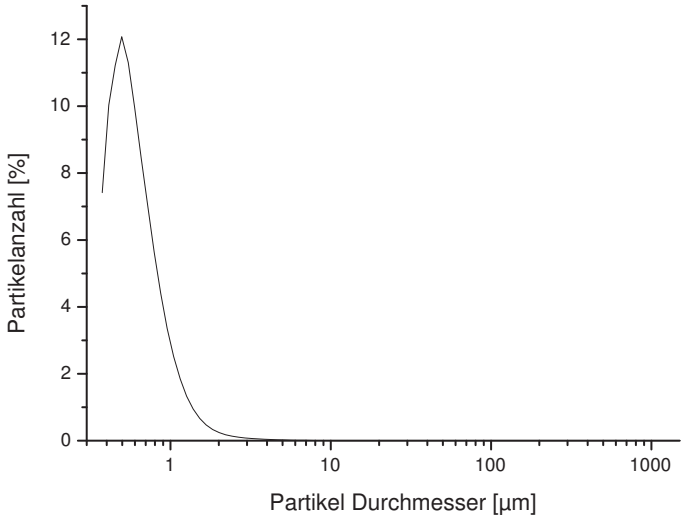


Abbildung 4.18: Partikelgrößenverteilung in Manucol DM-Lösung. Die Verteilung wurde berechnet aus der Messung in **Abbildung 4.17** unter der Voraussetzung kugelförmiger Partikel.

Die deutlich größeren Partikel haben zwar einen großen Anteil am Partikelgesamtvolu-

[2]Die identische Messung an sterilfiltrierter Alginatlösung lässt sich nicht darstellen, da das Gerät eine zu geringe Trübung signalisierte. Dieser Umstand belegt jedoch den Unterschied zwischen den beiden Proben.

men, ihr numerischer Anteil ist dagegen zu vernachlässigen. Zur Korrelation der PFG-Messungen mit den Ergebnissen der Laserdiffraktion wurden wassergefilterte Spektren von Alginatlösungen, die durch verschiedene Porengrößen filtriert wurden, mit der Volumenverteilung verglichen (**Abbildung 4.19**).

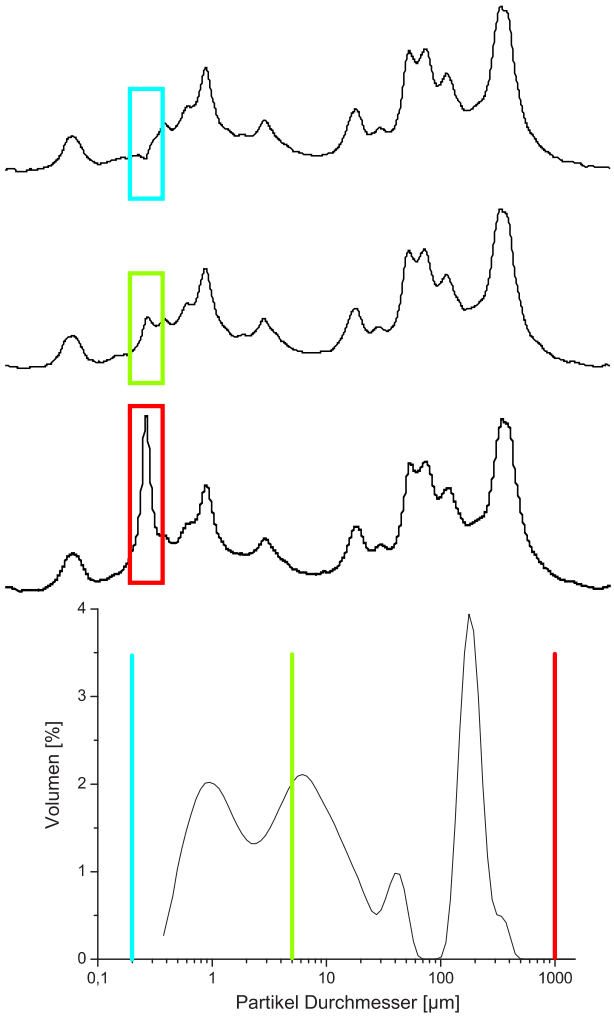


Abbildung 4.19: Korrelation der Partikelgrößenverteilung mit PFG-Ergebnissen. Die Spektren stammen von unbehandelter Alginatlösung (rot), sowie Alginatlösung, die durch 5,0 μm (grün) bzw. 0,2 μm (blau) filtriert wurde.

Die drei verschiedenen Manucol DM-Lösungen, deren Spektren gezeigt werden, sind eine Lösung aus unbehandeltem Alginat (rot), eine Lösung, die durch einen Filter mit einer Porengröße von 5,0 μm filtriert wurde (grün), sowie das Filtrat durch einen Sterilfilter mit 0,2 μm Porengröße. Der Vergleich mit der Partikelgrößenverteilung aus der Laserdif-

fraktion zeigt eine gute Übereinstimmung des Anteils des verlangsamten Wassers in den verschieden Proben mit den Flächenanteilen unter der Diffraktionskurve. Die Ergebnisse der PFG-NMR Messungen lassen sich somit durch die Laserbeugungsexperimente gut bestätigen.

4.3.5 DSC-Untersuchungen an Alginatlösungen

Die neu erworbenen Kenntnisse über die Aggregierung von Polysaccharid mit Protein in Algenalginat aus den vorangegangenen Abschnitten lassen Zweifel aufkommen an den Ergebnissen, die von anderen Arbeitsgruppen innerhalb der Forschergruppe *„Physikalische Chemie der Biofilme“* an dem System Algenalginat/Wasser erlangt wurden. Borchard [2] zeigte in Experimenten mit der Differential Scanning Calorimetrie (**DSC**), dass in Systemen von Manucol DM in Wasser das Wasser ein eigentümliches Schmelzverhalten zeigt. Seine Messungen wiesen in der Schmelzkurve des Wassers einen Doppelpeak auf, was er ebenfalls auf eine Aggregierung zurückführte, so dass zwei Wasserfraktionen mit unterschiedlichen Schmelzpunkten im System vorliegen. In der Annahme des Einsatzes unkontaminierten Alginats schrieb er diesen Effekt jedoch einzig dem Polysaccharid zu. In Kenntnis der Partikelbildung aus Polysaccharid und Protein wurden die DSC Experimente mit unbehandeltem und sterilfiltrierten Alginat wiederholt (**Abbildung 4.20**). Als Referenz dient die Schmelzkurve von reinem Wasser (oben). Wie zu erwarten war, zeigt die Schmelzkurve der Lösung aus sterilfiltriertem Alginat nur einen Schmelzpeak, da in dieser Lösung keine Aggregate vorliegen. Der Schmelzpunkt ist lediglich geringfügig erniedrigt, wie es für eine hochverdünnte Polymerlösung mit sehr niedriger molarer Konzentration zu erwarten ist. Die Lösung aus unbehandeltem Manucol DM zeigt dagegen den von Borchard ebenfalls beobachteten Doppelpeak. Der linke Peak entspricht dabei dem Schmelzverhalten der gereinigten Lösung und ist somit dem Bulk-Wasser zuzuschreiben, welches gelöstes Polysaccharid enthält. Der rechte Peak gleicht vom Schmelzpunkt her dem des reinen Wassers.

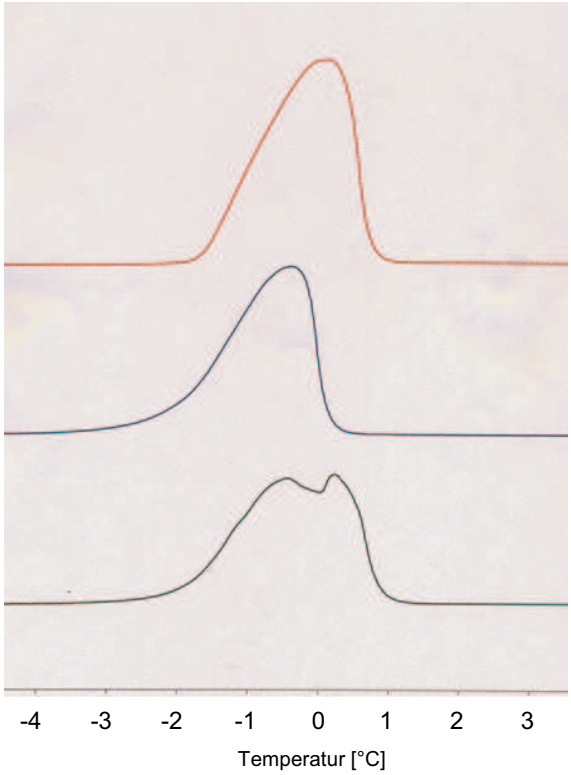


Abbildung 4.20: DSC-Messungen an reinem Wasser (oben), sterilfiltrierter Manucol DM Lösung (Mitte) und unbehandelter Manucol DM Lösung (unten). Gegenüber reinem Wasser zeigt die Lösung aus gereinigtem Alginat einen erniedrigten Schmelzpunkt. Der Doppelpeak der Lösung aus unbehandeltem Alginat resultiert aus der Schmelzpunkterniedrigung durch gelöstes Alginat, sowie aus Wasser in Alginat/Proteinaggregaten, welches ein Schmelzverhalten wie reines Wasser zeigt.

Dieses Verhalten lässt zwei mögliche Folgerungen zu: entweder verhält sich das Wasser innnerhalb der Aggregate wie reines Wasser und zeigt deshalb den gleichen Schmelzpunkt wie dieses, oder aber die Partikel sorgen für eine thermische Abschirmung des eingekapselten Wassers. Durch den erschwerten Wärmetransport in die Partikel hinein resultiert in diesem Falle ein Schmelzen des eingekapselten Wassers bei einer höheren Temperatur. Sehr auffällig ist bei Betrachtung der DSC-Kurven der enorm große Effekt, den die Partikel auf das Schmelzverhalten des Wassers ausüben. Daraus lässt sich schließen, dass die Aggregate sehr große Mengen Wasser einzuschließen vermögen, bzw. dass sehr große Mengen Wasser zumindest mit ihnen assoziiert sind.

4.3.6 Algenalginat aus Sterilfiltration

Die in den vorangegangen Abschnitten erarbeiteten Ergebnisse über die Aggregierung von Alginat mit Protein führen nun zu der Frage, wie sich die Wasserdiffusion in reinem Alginat verhält. Um die letzten Zweifel daran auszuräumen, dass das verlangsamte Wasser aus Aggregaten stammt, werden diese von der Alginatlösung durch Zentrifugation getrennt (s. **Abschnitt 4.3.2**) und im Vergleich mit der Alginatlösung dem PFG-Experiment unterzogen (**Abbildung 4.21**).

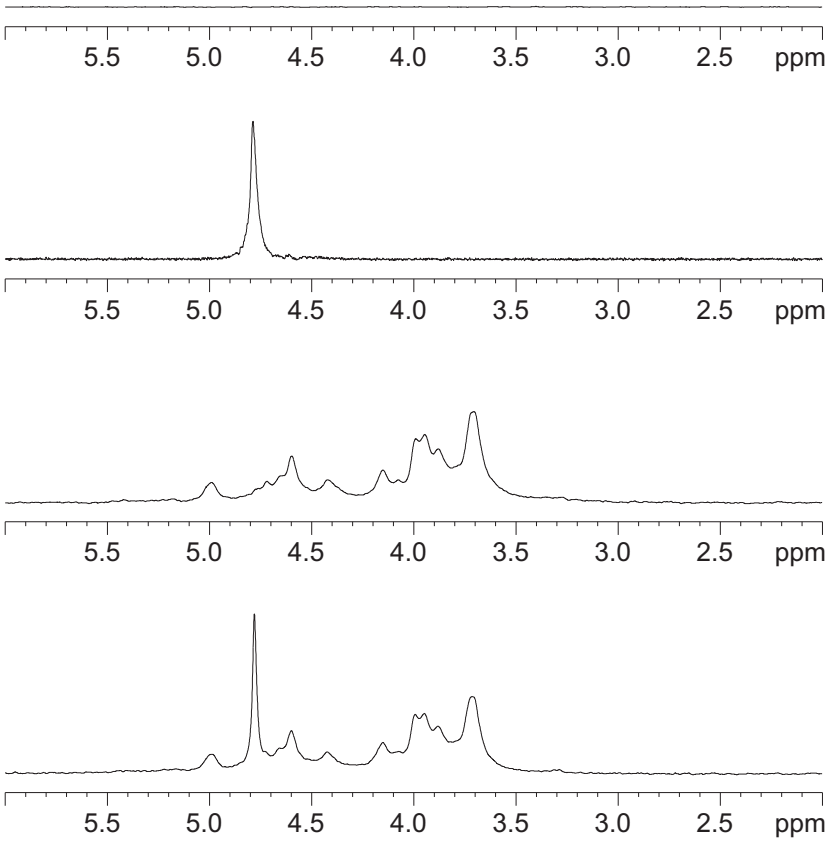


Abbildung 4.21: ^{1}H-Spektren mit Standardwasserunterdrückung von unbehandelter Alginatlösung (unten), Lösung aus sterilfiltriertem Alginat (2. v.u.), abzentrifugierten Partikeln (2. v.o.) und reinem Wasser (oben).

Die beiden unteren Spektren mit Standardwasserunterdrückung von jeweils 1%iger Manucol DM-Lösung zeigen wiederum das Signal des verlangsamten Wassers bei der unbehandelten Lösung, bzw. das Fehlen dieses Signals bei einer Lösung aus sterilfiltriertem

Alginat. Im Vergleich dazu weist das Spektrum der abgetrennten und aufbereiteten Aggregate ausschließlich das Signal des verlangsamten Wassers auf. Wie erwartet sind die Partikel derart immobilisiert, dass sie keinerlei NMR-Signal des Polysaccharids oder des Proteins im Flüssigspektrum zeigen. Somit ist eindeutig gezeigt, dass das verlangsamte Wasser den Alginat/Protein-Clustern zuzuschreiben ist und reines Alginat keinerlei Wasser aufweist, dass einen verringerten Diffusionskoeffizienten besitzt.

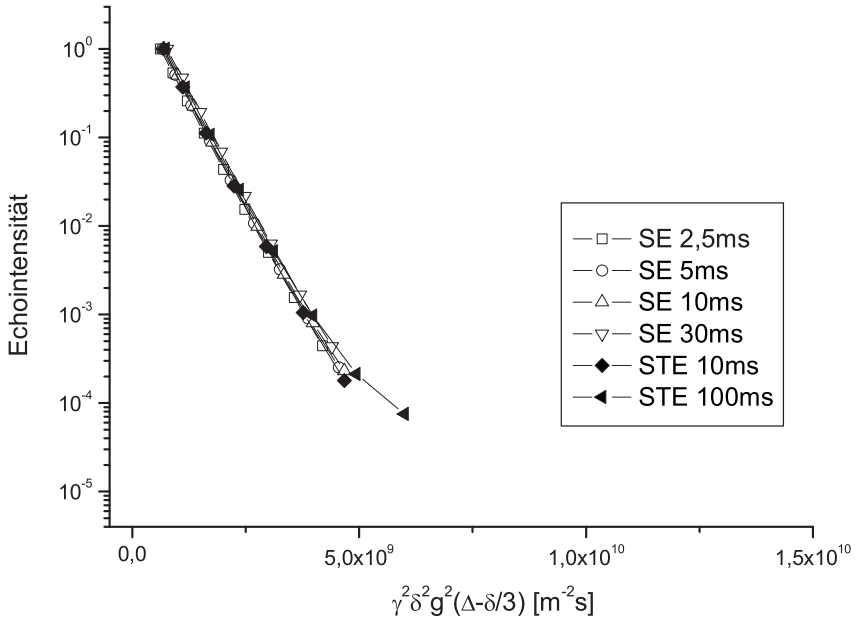


Abbildung 4.22: Diffusionsmessung mit Hahn- und Stimulated-Echo an einer Lösung aus sterilfiltriertem Manucol DM (1%). Es ist kein verlangsamtes Wasser zu erkennen. Lediglich im Stimulated-Echo bei der längsten Diffusionszeit deutet sich scheinbar verlangsamtes Wasser an, was auf Kreuzrelaxationseffekte zurückzuführen ist (**s. Abschnitt 4.4**).

Abbildung 4.22 zeigt Diffusionsexperimente mit dem Hahn- und dem Stimulated-Echo an einer Lösung aus sterilfiltriertem Manucol DM. Auch hier ist aufgrund des monoexponentiellen Abfalls der Signalkurven zu erkennen, dass Lösungen des sterilfiltrierten Alginats keinerlei verlangsamtes Wasser zeigen. Die zunächst aufgestellte Vermutung, dass die im Stimulated-Echo ermittelten Kreuzrelaxationseffekte (**Abbildung 4.7**) zwischen

Wasser und dem gelösten Polysaccharid auftreten, können anhand der Diffusionsmessung weitestgehend ausgeschlossen werden. Der überwiegende Anteil des Intensitätsgewinns im Stimulated-Echo ist somit auf Kreuzrelaxationseffekte zwischen Wasser und den Aggregaten zurückzuführen. In der Lösung des gereinigten Alginats ist lediglich bei der STE-Messung mit langer Diffusionszeit (100ms) ein biexponentieller Signalabfall zu erahnen, der auf ein geringes Maß an Magnetisierungsaustausch zwischen Wasser und gelöstem Polymer hindeutet. Der Vergleich mit dem Bakterienalginat (**Abschnitt 4.4**) wird zeigen, dass das Algenalginat womöglich eine zu geringe Molmasse, und damit eine zu hohe Mobilität besitzt, um in gelöster Form ausgeprägte Kreuzrelaxationseffekte zu zeigen.

4.4 Bakterienalginat

Neben den Algenalginaten wurden Lösungen des Bakterienalginats, das aus Biofilmen des Pseudomonas aeruginosa Stammes SG81 isoliert wurde, mittels PFG-NMR untersucht. Das SG81-Alginat besteht wie das Algenalginat aus β-D-Mannuronat (M) und α-L-Guluronat (G)-Monomereinheiten. Der entscheidende Unterschied des SG81-Alginats gegenüber dem Algenalginat ist die deutlich höhere molare Masse des Bakterienalginats von bis zu 2.400.000 g/mol [22] (Algenalginat: 20.000-150.000). Zudem ist statistisch jede zweite Mannuronat-Einheit acetyliert.

4.4.1 PFG-NMR-Untersuchungen an Alginat von P. aeruginosa

Die **Abbildungen 4.23** und **4.24** zeigen Hahn- bzw. Stimulated-Echo Experimente (identisch mit den Messungen in **Abschnitt 4.3.6**) an einer 1%igen Lösung des SG81 Bakterienalginats. Wie auch in der Lösung des sterilfiltrierten Algenalginats zeigt das Wasser im Hahn-Echo einen monoexponentiellen Signalabfall und somit keine verlangsamte Komponente.

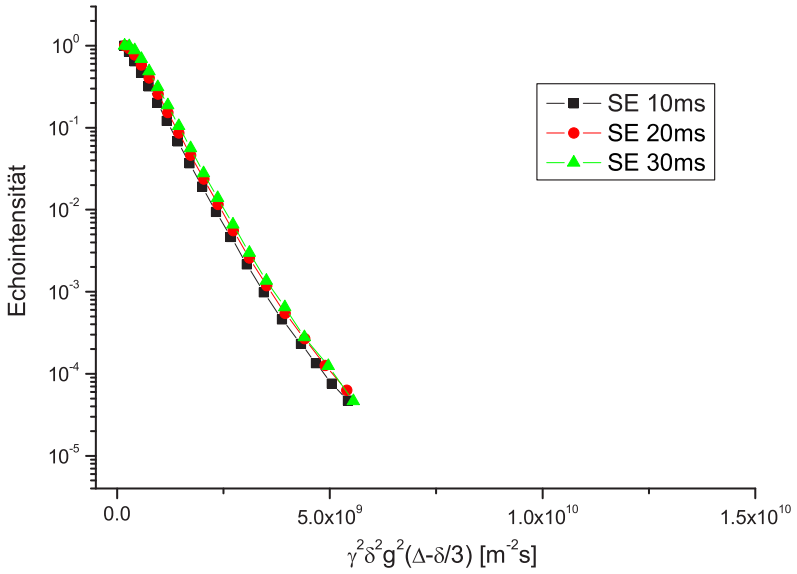


Abbildung 4.23: Alginat von SG81 (1,0%): Wassersignalintensitäten aus Hahn-Echo Experiment.

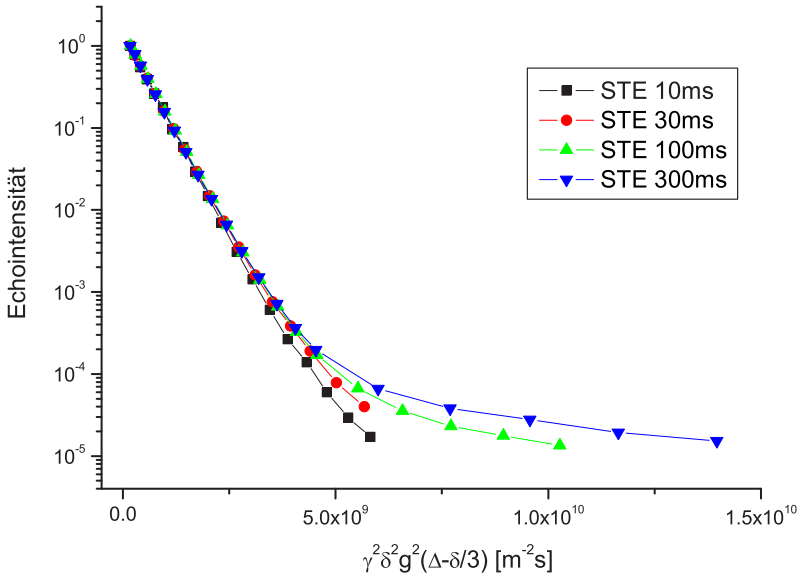


Abbildung 4.24: Alginat von SG81 (1,0%): Wassersignalintensitäten aus Stimulated-Echo Experiment.

Das Vorhandensein von Aggregaten aus Alginat und extrazellulären Proteinen, die im Biofilm eventuell entstanden sein können und für den Einschluss von Wasser hätten sorgen können, kann ausgeschlossen werden, da das SG81-Alginat im Reinigungsprozess sterilfiltriert wurde, so dass eine Übereinstimmung des Wasserdiffusionsverhalten mit dem sterilfiltrierten Algenalginat die logische Konsequenz ist. Im Stimulated-Echo dagegen ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Wasserdiffusion in der Lösung aus sterilfiltriertem Algenalginat (**Abbildung 4.22**) und der Lösung aus SG81-Alginat zu erkennen. War in den Echozerfallskurven der Algenalginatprobe nur bei langer Diffusionszeit (100 ms) andeutungsweise eine verlangsamte Wasserfraktion zu erkennen, so ist dieser Effekt beim SG81-Alginat viel ausgeprägter. Mit zunehmender Diffusionszeit tritt im Stimulated-Echo eine immer größer werdende Fraktion verlangsamten Wassers auf. Der apparente Diffusionskoeffizient nimmt dabei mit steigendem Δ ab. Da dieser verlangsamte Wasseranteil im Hahn-Echo nicht detektiert wird, muss es sich hierbei um Kreuzrelaxationsphänomene zwischen Wasser und Polysaccharid handeln, auf die nur das Stimulated-Echo anspricht.

Ein möglicher Grund für den enormen Unterschied, den die Stimulated-Echo Ergebnisse von gereinigtem Algenalginat (sehr wenig „langsames“ Wasser aufgrund von Kreuzrelaxation) und Bakterienalginat (großer Anteil „langsamen“ Wassers aufgrund von Kreuzrelaxation) aufweisen, ist der große Unterschied der Molekülgrößen. Die Molmasse des SG81-Alginats ist etwa um den Faktor 20 höher als die des Algenalginats. Ein wichtiger Parameter für das Auftreten und die Dimension von NOE ist die Korrelationszeit τ_c, die ein Maß für die isotrope Molekülbeweglichkeit darstellt. Nach Debye [101] kann die Korrelationszeit von Molekülen in Lösung abgeschätzt werden gemäß:

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta a^3}{3kT} \tag{4.2}$$

Dabei entspricht η der Viskosität der Lösung und a dem Molekülradius. Für Makromole-

küle in Wasser kann daraus sehr grob τ_c mit der molaren Masse M korreliert werden [79]:

$$\frac{\tau_c}{\mathrm{s}} \approx 0,4 \cdot 10^{-12}\ M\ \frac{\mathrm{mol}}{\mathrm{g}} \tag{4.3}$$

Aus **Gleichung 4.3** ergeben sich Korrelationszeiten von etwa 0,96 μs für Bakterienalginat und 0,06 μs für das Algenalginat Manucol DM. **Abbildung 4.25** zeigt den Zusammenhang zwischen dem Vorzeichen und der maximalen Verstärkung des NOE und der Korrelationszeit τ_c. Bei einer Protonenresonanz von 500 MHz beträgt $\omega\tau_c$ ca. 3000 (Bakterienalginat) bzw. ca. 190 (Algenalginat). Für beide Substanzen ist somit ein ausgeprägter negativer NOE denkbar. Die Schwierigkeit bei der Entstehung eines deutlich messbaren NOE besteht in der hohen Beweglichkeit des Wassers.

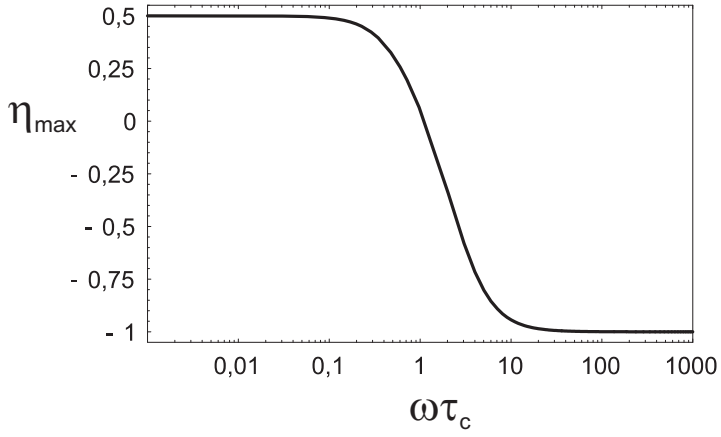


Abbildung 4.25: Maximal möglicher NOE eines homonuklearen Zwei-Spinsystem als Funktion der Korrelationszeit τ_c und der Resonanzfrequenz ω.

Das Auftreten von Magnetisierungsaustauch ist an eine genügend große Verweilzeit des Wassers in unmittelbarer Nähe eines (C-H-) Protons gekoppelt. Geht man davon aus, dass das gesamte Wasser in einer Polymerlösung frei beweglich ist, so liegen nach Otting [102] die Verweilzeiten von Wassermolekülen in der unmittelbaren Nähe von Polymerprotonen, d.h. innerhalb der für den NOE notwendigen 0,5 nm, im Bereich unter 100 ps. Die Wahrscheinlichkeit für Magnetisierungsaustausch zwischen Polymer und freiem Wasser ist daher sehr klein und die Detektierbarkeit des NOE entsprechend gering. Die NOE Intensität steigt mit der Verweildauer des Wassers solange an, bis diese die Korrelationszeit des

Polymers erreicht. Für Proteine beschreibt Otting Verweilzeiten des Hydratwassers im Bereich von 0,1 bis 1 ns. Dies wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Wasser und Polymer erreicht. Der so kurzzeitig gebundene Wasser/Polymer-Komplex besitzt im angegebenen Zeitfenster eine gemeinsame Korrelationszeit, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Magnetisierungsaustausches drastisch erhöht wird. Bezogen auf die NMR-Zeitskala vollführen die so gebundenen Hydratmoleküle einen schnellen Austausch mit dem Bulk-Wasser, so dass nur eine Wasserresonanzlinie detektiert wird.

Überträgt man diese Überlegungen auf die Alginatlösungen, so ist der Unterschied der Acetylierung zwischen den Alginaten zu beachten. Das Bakterienalginat trägt Acetylgruppen an den Mannuronat-Einheiten, beim Algenalginat fehlen diese. Es ist daher denkbar, das Wassermoleküle durch Wasserstoffbrücken kurzzeitig an den Acetyl-Sauerstoff assoziiert sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Magnetisierungsaustausches mit den CH_3-Protonen der Acetylgruppe erhöht wird.

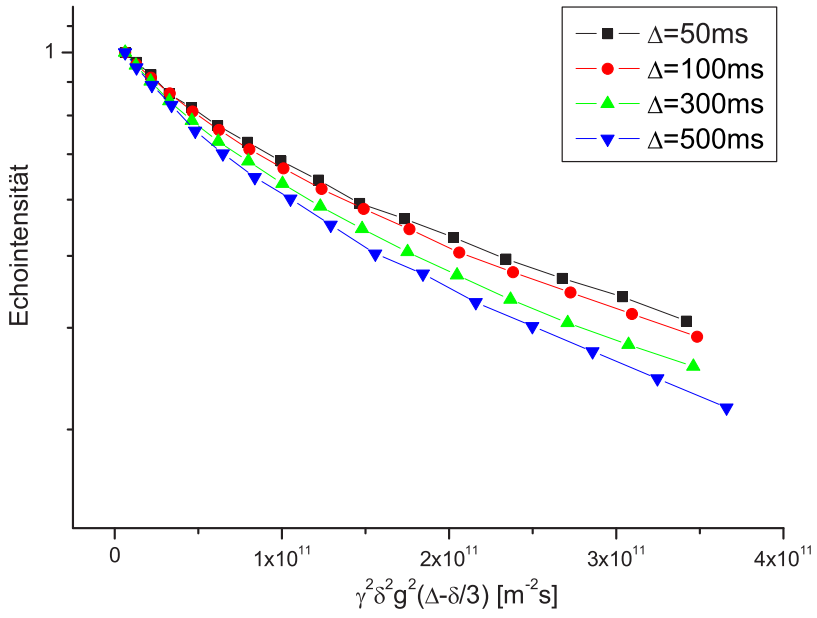


Abbildung 4.26: Echozerfallskurven des Acetylsignals von Bakterienalginat (SG81) aus Stimulated-Echo Experiment.

Zur Überprüfung, ob die Kreuzrelaxation in Bakterienalginatlösung tatsächlich zwischen Wasser und Acetylprotonen auftritt, wird die Diffusion der Acetylgruppe mittels Stimulated-Echo auf Diffusionszeitabhängigkeit überprüft (**Abbildung 4.26**). Wie für die weniger bewegliche Komponente eines Systems zweier dipolar gekoppelter Spins zu erwarten ist, zeigen die Echozerfallskurven des Stimulated-Echo Experiments mit zunehmender Diffusionszeit eine immer stärker ausgeprägte Biexponentialität und damit verbunden einen rascheren Signalabfall. Der apparente Diffusionskoeffizient der Acetyl-CH_3-Protonen nimmt also mit der Diffusionszeit zu, während der des Wassers abnimmt. Damit ist die Kreuzrelaxation des Wassers eindeutig der Interaktion mit der Acetylgruppe zuzuschreiben.
Da beim Bakterienalginat die Kreuzrelaxation isoliert von anderen Effekten, wie gehinderter Diffusion bzw. Austausch, auftritt, wird dieser Effekt in **Abschnitt 4.5.2** einer genaueren theoretischen Betrachtung unterzogen.
Der deutlich ausgeprägte NOE beim Algenalginat, welches Alginat/Protein-Cluster enthält, lässt sich damit erklären, dass das eingeschlossene Wasser innerhalb der Cluster oder beim Austritt aus diesen, aufgrund der gehinderten Diffusion eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt, mit den Polymerprotonen zu interagieren.

4.5 Modelle zur Interpretation der PFG-Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse der PFG-Messungen an Alginatlösungen aus den vorangegangenen Abschnitten, sowie die dafür verantwortlichen Phänomene zusammengefasst und die zur Interpretation herangezogenen Modelle vorgestellt.

Hahn-Echo an unbehandelter Algenalginatlösung:

- Es existiert eine „verlangsamte“ Wasserfraktion (ca. 0,03%) mit einem, gegenüber freiem Wasser ($\mathcal{D} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$), deutlich verringerten (apparenten) Diffusionskoeffizienten ($\mathcal{D}_{app} \sim 10^{-10}\ m^2/s$).

- Im Bereich $\Delta < 10$ms nimmt der Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Fraktion mit der Diffusionszeit ab.

- Der Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Fraktion konvergiert für $\Delta \rightarrow 0$ gegen den Diffusionskoeffizienten des Bulk-Wassers.

- Der Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Fraktion konvergiert für $\Delta > 10$ms gegen $\mathcal{D} = 1,0 \cdot 10^{-10}\ m^2/s$.

Deutung der Hahn-Echo Ergebnisse:

- Die Diffusionszeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten, sowie die Existenz von größeren Agglomeraten deutet auf das Auftreten von gehinderter Diffusion in Poren hin.

- Die gehinderte Diffusion in vollständig abgeschlossenen Poren würde für lange Diffusionszeiten eine Konvergenz des Diffusionskoeffizienten gegen 0 bedeuten. Die Konvergenz gegen einen Wert größer 0 erfordert die Möglichkeit des Austausches zwischen Bulk-Phase und dem Wasser innerhalb der Agglomerate.

Modelle zur Interpretation der Hahn-Echo Ergebnisse:

- **Balinov/Veeman**: das Balinov/Veeman-Modell beschreibt den Einfluss der Diffusion von Teilchen in einer geschlossenen Pore (*„diffusion in a closed sphere“*) auf das PFG-NMR Experiment [103, 104, 105, 106, 107].

- **Kärger**: das Kärger-Modell beschreibt die PFG-Diffusionsmessungen an einem System aus zwei Fraktionen mit unterschiedlichen Selbstdiffusionskoeffizienten, die miteinander austauschen können [108, 109, 110, 111].

- **Kombination aus Balinov/Veeman und Kärger**: in dieser Arbeit wird das von Pfeuffer beschriebene Modell (*„restricted diffusion at permeable boundaries “* [112, 113]), bestehend aus einem kombinierten Tanner [75]/Kärger-Formalismus, durch die präzisere Kombination des Kärger- und des Balinov/Veeman-Modells erweitert, um die teilweise gehinderte Diffusion in den Alginat/Protein-Clustern zu beschreiben (**Abschnitt 4.5.1**).

Stimulated-Echo an unbehandelter Algenalginatlösung:

- Der Anteil der „verlangsamten“ Wasserfraktion ist gegenüber dem Hahn-Echo Experiment deutlich erhöht (ca. 0,1%).
- Die Diffusionszeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten der „verlangsamten“ Fraktion tritt auch im Bereich $\Delta > 10$ms auf.

Deutung der Stimulated-Echo Ergebnisse:

- Im Stimulated-Echo Experiment treten alle Phänomene zu Tage, die auch im Hahn-Echo detektiert werden.
- Darüberhinaus wird ein Signalintensitätsgewinn der „verlangsamten“ Fraktion gegenüber dem Hahn-Echo verzeichnet. Dieser ist auf Kreuzrelaxationseffekte zwischen dem eingeschlossenen Wasser und den Polymeragglomeraten zurückzuführen. Kreuzrelaxation wird lediglich vom Stimulated-Echo und nicht vom Hahn-Echo detektiert.
- Der Einfluss der Kreuzrelaxation wird am Beispiel des Bakterienalginats isoliert betrachtet.

Hahn- und Stimulated-Echo an gereinigter Algenalginatlösung:

- Im Hahn-Echo wird keinerlei „verlangsamtes“ Wasser detektiert.
- Im Stimulated-Echo ist bei langen Diffusionszeiten ein sehr geringer Anteil „verlangsamten“ Wassers zu erkennen, welcher auf Kreuzrelaxation zwischen Wasser und gelöstem Polymer hinweist.

Hahn- und Stimulated-Echo an Bakterienalginatlösung:

- Im Hahn-Echo wird keinerlei „verlangsamtes“ Wasser detektiert.

- Im Stimulated-Echo ist mit steigenden Diffusionszeiten ein zunehmender Anteil „verlangsamten“ Wassers zu erkennen, welcher auf Kreuzrelaxation zwischen Wasser und gelöstem Polymer hinweist. Dieser Anteil ist erheblich größer als beim Algenalginat, was auf die Existenz von Acetylgruppen zurückzuführen ist. Die Wechselwirkung zwischen Wasser und Acetyl-CH_3-Protonen konnte über die Acetyl-Diffusion belegt werden.

- Da in der Bakterienalginatlösung das Phänomen der Kreuzrelaxation isoliert auftritt, ist ein eingehender Vergleich der Messergebnisse mit dem Modell von Peschier sinnvoll.

Modell zur Interpretation der Stimulated-Echo Ergebnisse:

- **Peschier**: dieses Modell beschreibt den Einfluss des Magnetisierungsaustauschs durch Kreuzrelaxation zwischen Wasser und Polymer auf ein Stimulated-Echo Experiment [83, 114, 115, 116, 117, 82, 118].

4.5.1 Interpretation der Diffusionsexperimente an Algenalginat (Balinov/ Veeman/Kärger-Modell)

Der verringerte apparente Diffusionskoeffizient, der in Lösungen von unbehandeltem Algenalginat einen Teil des Wassers auszeichnete, wurde bereits dem Wasser zugeschrieben, welches in Agglomeraten aus Alginat und Protein eingeschlossen ist. Dadurch ist die Diffusion gehindert. Das Messprinzip der PFG-NMR ermittelt die mittlere Verschiebung von Teilchen innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls. Aus dieser Verschiebung wird über die Einsteinbeziehung $\overline{\langle z^2(N)\rangle} = 2\,\mathcal{D}\,\Delta$ (vgl. **Gleichung 2.17**) der Selbstdiffusionskoeffizient bestimmt. Für Gauss´sche freie Diffusion ist diese Beziehung uneingeschränkt gültig, für gehinderte Diffusion, also Diffusion in Anwesenheit einer Diffusionsbarriere, dagegen kann die Verschiebung nicht mehr proportional zur Observationszeit Δ ansteigen, sobald die Verschiebung die Größenordnung der Hinderungsgeometrie erreicht. In diesem Falle wird dann mit zunehmender Diffusionszeit ein immer kleiner werdender (apparenter) Diffusionskoeffizient gefunden. Das Prinzip der gehinderten Diffusion lässt sich mit Einführung

der dimensionslosen Größe $\xi = \mathcal{D}\Delta/R^2$ anhand der **Abbildungen 4.27**, **4.28** und **4.29** verdeutlichen. R entspricht dabei dem Radius einer abgeschlossenen Sphäre, die die Diffusionsbarriere darstellt. Für $\xi < 1$ (**Abbildung 4.27**) ist die Diffusionszeit so kurz, dass die resultierende Verschiebung eines Teilchens im Mittelpunkt der Sphäre kleiner ist als der Radius der Diffusionsbarriere. Das Teilchen erfährt somit keinen Kontakt mit der Diffusionsbarriere, so dass die Diffusion innerhalb dieses Zeitintervalls freier, Gauss´scher Diffusion entspricht.

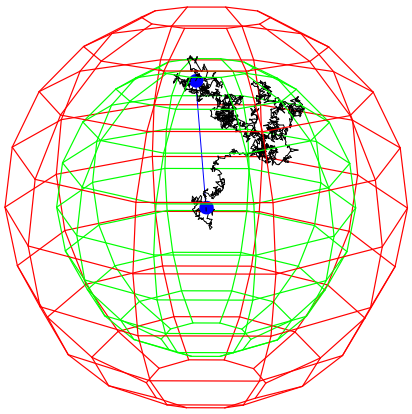


Abbildung 4.27: Random Walk eines Wassermoleküls ($\mathcal{D} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$) innerhalb einer abgeschlossenen Sphäre mit 10 μm Durchmesser (roter Käfig). Die Diffusionszeit beträgt 1 ms. Der grüne Käfig beschreibt den bei dieser Diffusionszeit für freie Diffusion notwendigen Raum. Aufgrund der kurzen Diffusionszeit ist die Diffusion annähernd ungehindert. Der resultierende (apparente) Diffusionskoeffizient im PFG-Experiment beträgt $\mathcal{D} \sim 2 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$.

$\xi \approx 1$ (**Abbildung 4.28**) beschreibt den Grenzbereich der gehinderten Diffusion. Die Entfernung der Diffusionsbarriere vom Startpunkt des Teilchens entspricht dem Mittel der Verschiebung. Da von einer Teilchenmenge N ein Teil eine größere Verschiebung erfahren würde, als die Barriere erlaubt, ist in diesem Bereich bereits eine Senkung von $\mathcal{D}_{app}$ zu verzeichnen. Für $\xi > 1$ (Langzeitlimit, **Abbildung 4.29**) schließlich, erfahren alle Teilchen den Effekt der Hinderung. $\mathcal{D}_{app}$ ist stark vermindert, die mittlere Verschiebung wird unabhängig von der Observationszeit und hängt nur noch von R ab.

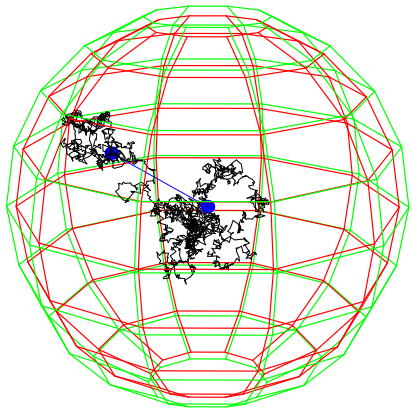


Abbildung 4.28: Random Walk eines Wassermoleküls ($\mathcal{D} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$) innerhalb einer abgeschlossenen Sphäre mit 10 μm Durchmesser (roter Käfig). Die Diffusionszeit beträgt 2 ms. Im Grenzbereich der gehinderten Diffusion ist der vom PFG-Experiment ermittelte (apparente) Diffusionskoeffizient bereits verringert ($\mathcal{D} \sim 1 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$).

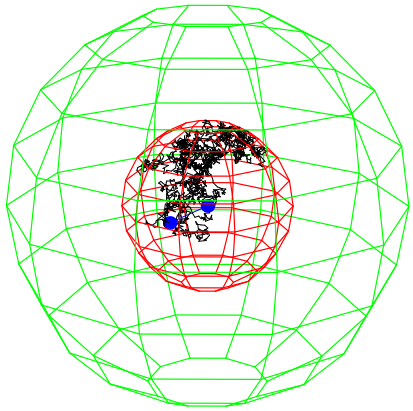


Abbildung 4.29: Random Walk eines Wassermoleküls ($\mathcal{D} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$) innerhalb einer abgeschlossenen Sphäre mit 10 μm Durchmesser (roter Käfig). Die Diffusionszeit beträgt 10 ms. Die Diffusion ist stark gehindert. Es resultiert ein (apparenter) Diffusionskoeffizient von $\mathcal{D} \sim 2 \cdot 10^{-10}\ m^2/s$.

Für $\xi >>> 1$ konvergiert $\mathcal{D}_{app}$ im Falle einer vollständig abgeschlossenen Sphäre gegen 0. Die gehinderte Diffusion spielt in der PFG-NMR-Spektroskopie eine sehr große Rolle, da die Verminderung des apparenten Diffusionskoeffizienten nicht zwangsläufig als störend angesehen werden muss, sondern vielmehr die Möglichkeit erschließt, die gehinderte Diffusion von Flüssigkeiten als Sonde zur Bestimmung der Matrixgeometrie bzw. -dimensionen zu benutzen. Exemplarisch seien hierzu die Arbeiten von Kärger an Zeoliten [58, 119] und von Leibfritz an Zellen [113, 120] genannt. Es wurden daher für zahlreiche Geometrien theoretische Modelle entwickelt, die die Ergebnisse der PFG-Diffusionsexperimente mit den Matrixdimensionen korrelieren. Den einfachsten Fall beschreibt dabei das Modell von Tanner/Stejskal, nämlich die gehinderte Diffusion in einem eindimensionalen Kasten [75]. Im vorliegenden Fall der aggregierten Polysaccharid/Protein-Cluster wird die Gestalt der Partikel durch ein Kugelmodell angenähert (*„Diffusion in a Closed Sphere“*). Dieser Formalismus ist nicht trivial, da die Diffusion aller Teilchen innerhalb der Sphäre beschrieben werden muss, die je nach Position eine andere Hinderung erfahren. Komplexe Modelle wurden von Mitra [121], Balinov [103] und Callaghan [122] vorgestellt, die die Spin-Echo Intensität als Funktion der Gradientstärke beschreiben. Veeman [104] ermittelte durch den numerischen Vergleich der drei Theorien das Modell, was die gehinderte Diffusion in einer Kugel am besten beschreibt. Demnach lässt sich die Echointensität in Abhängigkeit von Gradient g und Diffusionszeit Δ ausdrücken durch:

$$\begin{aligned} E_{gehindert}(g,\Delta) =& \frac{9[\gamma g\delta a\cos(\gamma g\delta a)-\sin(\gamma g\delta a)]^2}{(\gamma g\delta a)^6} \\ &+ 6\sum_{n=0}^{\infty}\sum_{k}\frac{(2n+1)\alpha_{nk}^2}{\alpha_{nk}^2-n^2-n}\ \exp\left(-\frac{\alpha_{nk}^2\mathcal{D}\Delta}{a^2}\right)\left[\frac{\gamma g\delta a j_n'(\gamma g\delta a)}{\alpha_{nk}^2-(\gamma g\delta a)^2}\right]^2 \end{aligned} \tag{4.4}$$

Dabei entspricht a dem Radius der Sphäre, $\mathcal{D}$ dem „echten“ Selbstdiffusionskoeffizienten des eingeschlossenen Mediums und $j_n'(\gamma g\delta a)$ der sphärischen Besselfunktion:

$$j_n'(\gamma g\delta a) = \sqrt{\frac{\pi}{2a}}J_{n+\frac{1}{2}}(\gamma g\delta a) \tag{4.5}$$

α_{nk} repräsentiert die k-te Wurzel der Gleichung:

$$j'_n(\alpha) = 0 \tag{4.6}$$

Im vorliegenden Fall liefert die gehinderte Diffusion innerhalb der Agglomerate lediglich einen kleinen Teil der Gesamtsignalintensität. Den weitaus größten Beitrag leistet das frei diffundierende Bulk-Wasser. Dessen Diffusion lässt sich mit der Standardauswertegleichung (**4.1**) beschreiben, so dass sich unter der Annahme vollständig abgeschlossener Sphären, die Gesamtechointensität ausdrücken lässt durch:

$$\frac{E}{E_0} = f\,\mathrm{e}^{-\gamma^2 g^2 \delta^2 \mathcal{D}\left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)} + (1-f)\,E_{gehindert}(g,\Delta) \tag{4.7}$$

Für verschiedene Kugelradien a und Verhältnisse f zwischen gehinderter Phase und Bulk-Phase wurde mit dem aus der Anfangssteigung der Kurven ermittelten Diffusionskoeffizienten $\mathcal{D} = 2,26 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$ versucht, das Modell mit den Hahn-Echo Ergebnissen in Übereinstimmung zu bringen (**Abbildung 4.30**). Den Kurven liegt ein Gewichtungsfaktor f von 0,99992 zugrunde. Für einen Sphärenradius von 5 μm zeigt Wasser nach dem Modell ein nahezu ungehindertes Diffusionsverhalten. Ein Radius von 1 μm bedeutet dagegen, dass für die Diffusionszeiten 7,5 und 10 ms bereits das Langzeitlimit $\xi >> 1$ erreicht ist, da die Intensitätskurven für hohe Gradienten eine horizontale Linie bilden, was einem apparenten Diffusionskoeffizienten von Null entspricht. Hieraus lässt sich erkennen, dass das vorgestellte Modell nicht imstande ist, die Messergebnisse hinreichend exakt wiederzugeben. $\mathcal{D}_{app}$ der experimentellen Daten konvergiert für $\Delta > 7,5$ ms gegen $1 \cdot 10^{-10}\ m^2/s$. Wie bereits in **Abschnitt 4.3.1** vermutet wurde, muss daher das eingekapselte Wasser die Möglichkeit des Austausches mit dem Bulk-Wasser besitzen. Die Protein/Alginat-Cluster stellen also eine halbdurchlässige Diffusionsbarriere dar. Zur vollständigen Beschreibung der Hahn-Echo Messungen muss daher das Modell der gehinderten Diffusion durch ein Austauschmodell erweitert werden.

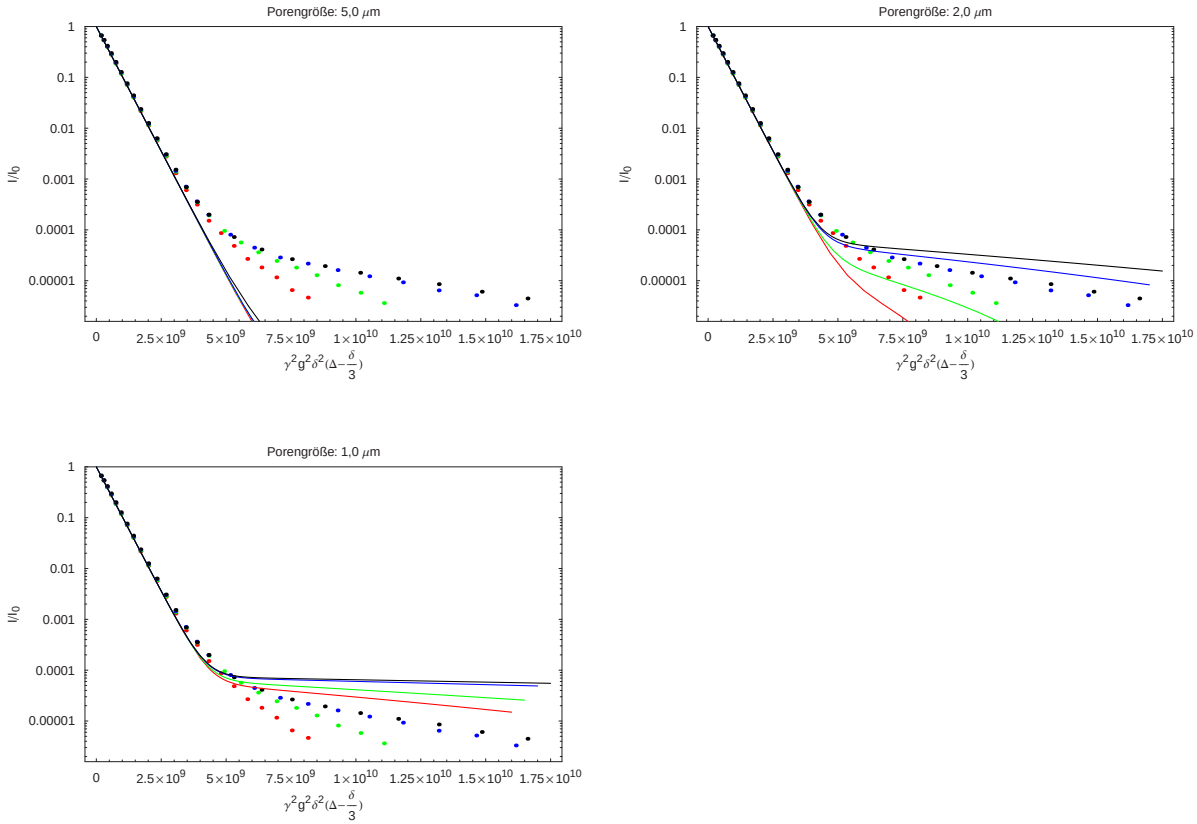


Abbildung 4.30: Gehinderte Diffusion nach Balinov/Veeman im Vergleich mit dem Hahn-Echo Experiment an Manucol DM Lösung bei verschiedenen Diffusionszeiten (rot: 2,5 ms; grün: 3,5 ms; blau: 7,5 ms; schwarz: 10 ms)

Zur Beschreibung von PFG-NMR Experimenten an Zweibereichsystemen unter Berücksichtigung von Austauschprozessen zwischen den Domänen wurden von Kärger bereits sehr früh Modelle entwickelt [108, 109, 112]. Dabei wird die Diffusionsgleichung durch Austauschraten erweitert, wodurch die mittlere Verweildauer der Wassermoleküle in den Domänen beschrieben wird. Für ein Zweibereichsystem mit den relativen Volumenanteilen p_1 und p_2, den Selbstdiffusionskoeffizienten $\mathcal{D}_1$ und $\mathcal{D}_2$ und den zugehörigen Verweilzeiten τ_1 und τ_2 gilt dann:

$$p_1 + p_2 = 1 \quad \text{und} \quad p_j = \frac{\tau_j}{\tau_1 + \tau_2}, \; j = 1, 2 \tag{4.8}$$

p_1, p_2, τ_1 und τ_2 sind somit nicht unabhängig und lassen sich auf zwei Parameter reduzieren (p_2 und τ_2). Mit $q = g\gamma\delta$ und $n = \frac{p_2}{p_1} = \frac{p_2}{1-p_2}$ lassen sich die durch Austausch beeinflussten

apparenten Diffusionskoeffizienten $\mathcal{D}'_1$ und $\mathcal{D}'_2$ ausdrücken durch:

$$\mathcal{D}'_{1,2} = \frac{1}{2}\left[\mathcal{D}_2 + \mathcal{D}_1 + \frac{1+n}{q^2\tau_2} \mp \sqrt{\left(\mathcal{D}_2 - \mathcal{D}_1 + \frac{1-n}{q^2\tau_2}\right)^2 + \frac{4n}{(q^2\tau_2)^2}}\right] \tag{4.9}$$

Zur Gewichtung des Signalbeitrags der beiden Wasserfraktionen in der Diffusionsgleichung wird der Parameter p'_2 eingeführt:

$$p'_2 = \frac{1}{\mathcal{D}'_2 - \mathcal{D}'_1}\left[(1-p_2)\mathcal{D}_1 + p_2\mathcal{D}_2 - \mathcal{D}'_1\right] \tag{4.10}$$

Das Echosignal E eines PFG-Experiments an einem Zweibereichsystem mit Austausch lässt sich somit beschreiben durch:

$$\frac{E(q^2)}{E(0)} = (1-p'_2)\, e^{-q^2\Delta\mathcal{D}'_1} + p'_2\, e^{-q^2\Delta\mathcal{D}'_2} \tag{4.11}$$

Bei langen Diffusionszeiten bzw. schnellen Austauschbedingungen ($q^2\tau_j D_j \ll 1\,,\ j = 1,2$) beschreibt **Gleichung 4.11** einen mono-exponentiellen Signalabfall, wobei die Diffusionskoeffizienten der beiden Domänen gemäß $\overline{\mathcal{D}} = p_1\mathcal{D}_1 + p_2\mathcal{D}_2$ ausgemittelt werden (**Abbildung 4.31**).

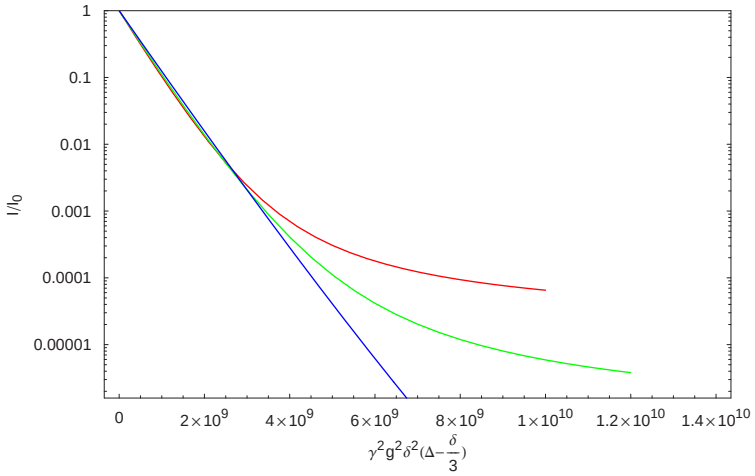


Abbildung 4.31: Diffusion im Zweibereichsystem mit Austausch nach Kärger. $\mathcal{D}_1 = 2,26 \cdot 10^{-9}\mathrm{m}^2/\mathrm{s}\,,\ \mathcal{D}_2 = 1 \cdot 10^{-11}\mathrm{m}^2/\mathrm{s}\,,\ p_2 = 0.1\,,\ \tau_2 = 0,3\mathrm{ms}; \Delta = 2{,}5$ ms (rot), 3,5 ms (grün), 10 ms (blau).

Das Kärger-Modell beschreibt die Diffusion in einem Zweibereichsystem mit zwei verschiedenen Diffusionskoeffizienten. Dabei ist in den beiden Domänen, die dem Austausch unterliegen, die Diffusion ungehindert. Eine direkte Anwendung dieses Modells auf das Diffusionsverhalten von Wasser in Alginatlösung mit wassereinschließenden Aggregaten ist daher nicht möglich. Im vorliegenden Fall handelt es sich um ein Zweibereichsystem mit freier Diffusion in der Bulk-Phase und gehinderter Diffusion innerhalb der Aggregate mit der Möglichkeit des Austauschs zwischen den beiden Domänen. Die tatsächlichen Diffusionskoeffizienten des Wassers in beiden Phasen sind annähernd gleich, jedoch ist der apparente Diffusionskoeffizient des eingekapselten Wassers geringer (**Abbildung 4.30**). Um diesem Umstand Rechnung zu tragen, muss das Kärger-Modell erweitert werden. Der konstante Diffusionskoeffizient $\mathcal{D}_2$ aus den **Gleichungen 4.9** und **4.10** wird durch einen apparenten Diffusionskoeffizienten $\mathcal{D}_{app,intra}$ ersetzt, der unter Verwendung des Balinov/Veeman-Modells die Hinderung der Wasserdiffusion innerhalb der Aggregate berücksichtigt. $\mathcal{D}_{app,intra}$ ist dabei abhängig von der Diffusionszeit Δ, sowie der Größe der Aggregate, vertreten durch den mittleren Innenradius a und lässt sich beschreiben gemäß:

$$\mathcal{D}_{app,intra}(\Delta, a) = -\frac{\partial \ln E_{Balinov}}{\partial x} \tag{4.12}$$

Dabei entspricht $E_{Balinov}$ der Signalintensität $E(\Delta, a, x, \mathcal{D}_2 = \mathcal{D}_1)$ nach **Gleichung 4.4**. Die Größe x setzt sich zusammen aus:

$$x = (\gamma g \delta)^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) = q^2 \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right) \tag{4.13}$$

Die Einführung der Größe x hat den Vorteil, dass bei Auftragung der logarithmierten Signalintensität gegen x, die negative Steigung des Graphen direkt dem Diffusionskoeffizienten entspricht. Dadurch lassen sich z.B. auch mehrere Graphen, die verschiedene Diffusionszeiten repräsentieren, direkt miteinander vergleichen, während die optische Aussagekraft der Auftragung gegen q bzw. q^2 viel geringer ist, da identische Diffusionskoeffizienten bei unterschiedlichen Diffusionszeiten unterschiedliche Steigungen liefern. Daher ist die Substitution von q durch x gemäß $q = \sqrt{\frac{x}{\Delta - \frac{\delta}{3}}}$ im Kärger-Modell ebenfalls sinnvoll.

Für das kombinierte Modell Kärger/Balinov/Veeman werden die **Gleichungen 4.9**, **4.10** und **4.11** zu:

$$\mathcal{D}'_{1,2} = \frac{1}{2}\left[\mathcal{D}_{app,intra}(\Delta,a) + \mathcal{D}_1 + \frac{1+n}{\frac{x}{\Delta-\frac{\delta}{3}}\tau_2} \mp \sqrt{\left(\mathcal{D}_{app,intra}(\Delta,a) - \mathcal{D}_1 + \frac{1-n}{\frac{x}{\Delta-\frac{\delta}{3}}\tau_2}\right)^2 + \frac{4n}{\left(\frac{x}{\Delta-\frac{\delta}{3}}\tau_2\right)^2}}\right] \tag{4.14}$$

$$p'_2 = \frac{1}{\mathcal{D}'_2 - \mathcal{D}'_1}\left[(1-p_2)\mathcal{D}_1 + p_2\mathcal{D}_{app,intra}(\Delta,a) - \mathcal{D}'_1\right] \tag{4.15}$$

$$\frac{E(x)}{E(0)} = (1-p'_2)\, e^{-\frac{x}{\Delta-\frac{\delta}{3}}\Delta\mathcal{D}'_1} + p'_2\, e^{-\frac{x}{\Delta-\frac{\delta}{3}}\Delta\mathcal{D}'_2} \tag{4.16}$$

Der Index 1 repräsentiert dabei die Bulk-Phase, während der Index 2 das Wasser innerhalb der Aggregate beschreibt. Aus der Balinov/Veeman-Gleichung können nun für verschiedene Diffusionszeiten Δ und verschiedene Porengrößen a anhand der Steigung der Signalintensitätskurven die zugehörigen apparenten Diffusionskoeffizienten bestimmt werden (Beispiele in **Abbildung 4.32** und **Tabelle 4.3**).

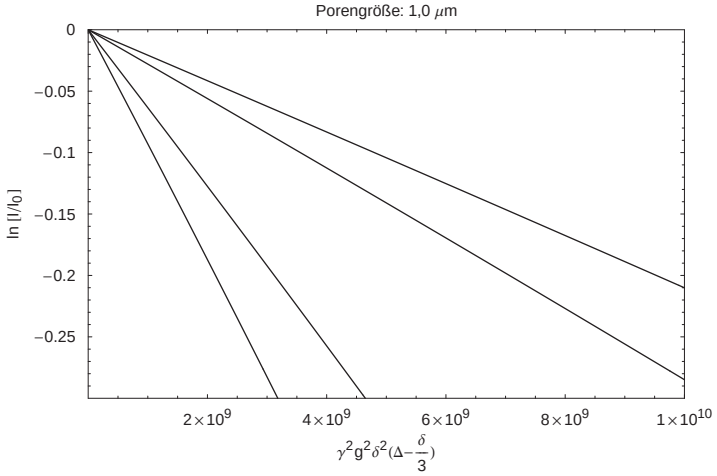


Abbildung 4.32: Bestimmung der apparenten Diffusionskoeffizienten von Wasser in geschlossenen Poren für verschiedene Diffusionszeiten aus den Steigungen der Graphen des Balinov/Veeman Modells. Im hier gezeigten Beispiel beträgt die Porengröße 1 μm.

Tabelle 4.3: Apparente Diffusionskoeffizienten von Wasser ($\mathcal{D} = 2,26 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$) in geschlossenen Sphären verschiedener Größe in Abhängigkeit der Diffusionszeit nach Balinov/Veeman

$\Delta[ms]$	$r = 0,1\mu m$	$r = 1\mu m$	$r = 2\mu m$	$r = 3\mu m$	$r = 4\mu m$	$r = 5\mu m$
2,5	$9,23 \cdot 10^{-13}$	$9,24 \cdot 10^{-11}$	$3,70 \cdot 10^{-10}$	$7,84 \cdot 10^{-10}$	$1,17 \cdot 10^{-9}$	$1,45 \cdot 10^{-9}$
3,5	$6,32 \cdot 10^{-13}$	$6,32 \cdot 10^{-11}$	$2,54 \cdot 10^{-10}$	$5,60 \cdot 10^{-10}$	$9,02 \cdot 10^{-10}$	$1,19 \cdot 10^{-9}$
7,5	$2,79 \cdot 10^{-13}$	$2,79 \cdot 10^{-11}$	$1,12 \cdot 10^{-10}$	$2,52 \cdot 10^{-10}$	$4,45 \cdot 10^{-10}$	$6,67 \cdot 10^{-10}$
10	$2,07 \cdot 10^{-13}$	$2,07 \cdot 10^{-11}$	$8,29 \cdot 10^{-11}$	$1,87 \cdot 10^{-10}$	$3,32 \cdot 10^{-10}$	$5,11 \cdot 10^{-10}$

Mit **Gleichung 4.16** wird nun mittels der *NonlinearRegress* Funktion von Mathematica die beste Anpassung an die Hahn-Echo Diffusionsergebnisse gesucht. Vorgegeben wird dabei $\mathcal{D}_1 = 2,26 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$, sowie ein Sphärenradius a, aus dem gemäß **Tabelle 4.3** ein Satz apparenter Diffusionskoeffizienten $\mathcal{D}_{app,intra}(\Delta, a)$ für die verwendeten Diffusionszeiten bestimmt wird. Die unabhängigen Parameter der Anpassung sind dabei die mittlere Verweildauer des Wassers in den Aggregaten τ_{intra}, sowie der Volumenanteil des eingekapselten Wassers p_2. **Abbildung 4.33** zeigt die beste Anpassung, die für einen Sphärenradius von 3,0 μm erreicht wird. Da τ_{intra} und p_2 von der Observationszeit Δ unabhängig sind, ist die Anpassung nur dann physikalisch sinnvoll, wenn die beiden Parameter für alle Diffusionszeiten übereinstimmen. In **Tabelle 4.4** ist der Parametersatz der Anpassung wiedergegeben. Verweilzeit und Volumenanteil zeigen für alle Diffusionszeiten eine zufriedenstellende Übereinstimmung. Eine Evaluation der Parameter erfolgt durch den Vergleich mit den Analyseergebnissen aus den **Abschnitten 4.3.4** und **4.3.5**.

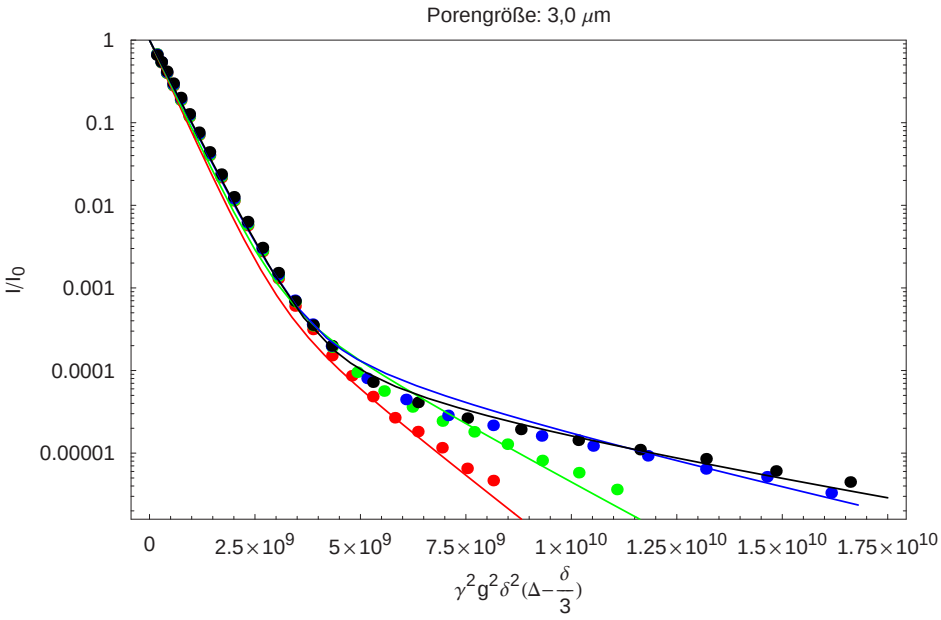


Abbildung 4.33: Gehinderte Diffusion an durchlässigen Grenzen unter Berücksichtigung des Austauschs mit der Bulk-Phase: Hahn-Echo Experiment an ungereinigter Manucol DM Lösung bei verschiedenen Diffusionszeiten (rot: 2,5 ms; grün: 3,5 ms; blau: 7,5 ms; schwarz: 10 ms). Die durchgezogenen Kurven sind das Ergebnis der Anpassung mit einem kombinierten Balinov/Kärger-Modell, welchem ein mittlerer Porenradius von 3,0 μm zugrundeliegt.

Tabelle 4.4: Parameter des Balinov/Kärger Fit aus **Abbildung 4.33**

Δ [ms]	r [μm]	$\mathcal{D}_1$ [m^2/s]	$\mathcal{D}_{2,app}$ [m^2/s]	τ_{intra} [ms]	p_2
$2,5$	$3,0$	$2,26 \cdot 10^{-9}$	$7,84 \cdot 10^{-10}$	$1,95$	$0,014$
$3,5$	$3,0$	$2,26 \cdot 10^{-9}$	$5,60 \cdot 10^{-10}$	$1,81$	$0,012$
$7,5$	$3,0$	$2,26 \cdot 10^{-9}$	$2,52 \cdot 10^{-10}$	$1,68$	$0,013$
10	$3,0$	$2,26 \cdot 10^{-9}$	$1,87 \cdot 10^{-10}$	$1,87$	$0,013$

- **Sphärenradius im Vergleich zur Partikelgrößenmessung (Abschnitt 4.3.4)**

Das Diffusionsmodell liefert einen mittleren Sphärenradius von 3 μm. Verglichen mit der Partikelgrößenverteilung in **Abbildung 4.17** erscheint dieser Radius zu klein. Nimmt man

jedoch an, dass die sehr geringe Anzahl sehr großer Partikel, die aufgrund ihrer Größe einen großen Anteil am Partikelgesamtvolumen einnehmen, keinen Beitrag zur verlangsamten Wasserfraktion leisten, da in ihnen die Diffusion nicht gehindert ist (vgl. **Abbildung 4.30**), so steht der Sphärenradius von 3 μm durchaus im Einklang mit der Partikelgrößenmessung.

- **Volumenanteil im Vergleich zur DSC-Messung (Abschnitt 4.3.5)**

Eine grobe Abschätzung der Volumenanteile eines Zweikomponentensystems mit zwei unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten nimmt man anhand der Echozerfallskurven üblicherweise vor, indem man die beiden Schenkel, deren unterschiedliche Steigungen die Diffusionskoeffizienten repräsentieren, auf $g = 0$ extrapoliert und die so erhaltenen Intensitäten I_0 mit den Volumenanteilen korreliert. Mit dieser Methode erhält man für die Hahn-Echo Messungen an unbehandelter Alginatlösung einen Anteil verlangsamten Wassers von 0,03%. Betrachtet man dann, welchen enormen Einfluss das Wasser innerhalb der Aggregate auf das Schmelzverhalten einer Alginatlösung hat (**Abbildung 4.20**), so wird deutlich, dass dies nicht auf eine derart kleine Wassermenge zurückzuführen sein kann. Die DSC-Messungen bestärken daher das Ergebnis des Diffusionsmodells, dass der Wasseranteil innerhalb der Agglomerate deutlich höher sein muss. Das Diffusionsmodell liefert einen Anteil p_2 von 1,3%.

- **Verweilzeit des Wassers innerhalb der Aggregate**

Zur Einschätzung der mittleren Verweilzeit des Wassers innerhalb der Alginat/Protein-Cluster sei ein Vergleichsystem angeführt. Pfeuffer [112] ermittelte für die teilweise gehinderte Diffusion an Zellmembranen eine mittlere intrazelluläre Verweilzeit von etwa 50 ms. Im hier untersuchten System liegt die mittlere Verweilzeit in den Aggregaten bei etwa 2 ms. Die Permeabilität ist somit deutlich höher, was für stark poröse Partikel spricht, die einen schnellen Austausch mit dem Bulk-Wasser ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das kombinierte Modell *„restricted diffusion at permeable boundaries "* nach Balinov/Veeman/Kärger eine gute Anpassung an die experimentellen Daten der Hahn-Echo Messungen liefert und die daraus gewonnenen Parameter in Verbindung mit den begleitend durchgeführten Analysenmethoden sinnvolle physikalische Größen darstellen.

4.5.2 Interpretation der Diffusionsexperimente an Bakterienalginat (Peschier-Modell)

Ein hydratisiertes Bakterienalginatsystem kann als Zweikomponensystem aufgefasst werden, in dem Kreuzrelaxation zwischen der Wasser- und der Polymerphase auftritt. Für ein derartiges System wurden von Edzes und Samulski [123] Gleichungen aufgestellt, die die longitudinale Relaxation in Gegenwart von Kreuzrelaxation beschreiben. Diese Gleichungen erhält man durch Erweiterung der Bloch-Gleichungen durch Austausch-Terme für die z-Magnetisierung beider Phasen [83]. Dabei seien $m_w(t)$ und $m_p(t)$ die zeitabhängigen z-Magnetisierung von Wasser und Polymer, m_w^e und m_p^e die zugehörigen Gleichgewichtsmagnetisierungen, R_{1w} und R_{1p} die longitudinalen Relaxationsraten und k_w und k_p die (Magnetisierungs)austauschraten. Die zeitliche Änderung der z-Magnetisierung lässt sich dann durch ein Paar Differentialgleichungen ausdrücken:

$$\frac{\partial m_w(t)}{\partial t} = -R_{1w}\left[m_w(t) - m_w^e\right] - k_w\left[m_w(t) - m_w^e\right] + k_p\left[m_p(t) - m_p^e\right] \tag{4.17}$$

$$\frac{\partial m_p(t)}{\partial t} = -R_{1p}\left[m_p(t) - m_p^e\right] - k_p\left[m_p(t) - m_p^e\right] + k_w\left[m_w(t) - m_w^e\right] \tag{4.18}$$

Damit die Gleichungen zur Beschreibung eines Stimulated-Echo Experimentes geeignet ist, müssen sie durch einen Term erweitert werden, der die Signalabschwächung durch Diffusion berücksichtigt. Zur Vereinfachung wird angenommen, dass die Magnetisierung während der gesamten Diffusionszeit Δ auf der z-Achse gespeichert ist. Dafür muss für die Wartezeiten τ_1 und τ_2 der Stimulated-Echo Sequenz $\tau_2 >> \tau_1$ gelten, so dass $\Delta \approx$

τ_2 angenommen werden kann. Die Modulation entlang z, die die Quermagnetisierung durch den ersten Gradientpuls erlangt, wird durch den zweiten 90°-Puls auf die daraus resultierende z-Magnetisierung übertragen (**Abbildung 2.14**). Für den Zeitpunkt $t = 0$ als Beginn der Diffusionszeit mit dem zweiten 90°-Puls gilt dann die Startbedingung:

$$m_w(z, t = 0) = m_w^e \cos(\gamma \delta g z) = m_w^e \cos(qz) \tag{4.19}$$

$$m_p(z, t = 0) = m_p^e \cos(\gamma \delta g z) = m_p^e \cos(qz) \tag{4.20}$$

Unter Einbeziehung der Signalabschwächung durch Diffusion lauten die Differentialgleichungen:

$$\frac{\partial m_w(z,t)}{\partial t} = -R_{1w}\left[m_w(z,t) - m_w^e\right] - k_w m_w(z,t) + k_p m_p(z,t) + \mathcal{D}_w \frac{\partial^2 m_w(z,t)}{\partial z^2} \tag{4.21}$$

$$\frac{\partial m_p(z,t)}{\partial t} = -R_{1p}\left[m_p(z,t) - m_p^e\right] - k_p m_p(z,t) + k_w m_w(z,t) \tag{4.22}$$

Das Polymer wird dabei gegenüber dem Wasser als ortsfest angesehen, so dass der Term für die Polymerdiffusion vernachlässigt werden kann. Die Lösung des Gleichungssystems mittels Laplace-Transformation gelingt mit der Software Mathematica:

$$\frac{m_w(z,\Delta)}{m_w(z,0)} = \frac{a^+ - k_p - R_{1p}}{a^+ - a^-}\, e^{-a^+\Delta} - \frac{a^- - k_p - R_{1p}}{a^+ - a^-}\, e^{-a^-\Delta} \tag{4.23}$$

a^+ und a^- sind gegeben durch:

$$a^{\pm} = \frac{1}{2}\left[\mathcal{D}_w q^2 + k_w + R_{1w} + k_p + R_{1p} \pm \sqrt{(\mathcal{D}_w q^2 + k_w + R_{1w} - k_p - R_{1p})^2 + 4 k_w k_p}\right] \tag{4.24}$$

mit:

$$q = \gamma \delta g \tag{4.25}$$

Es wird angenommen, dass die z-Magnetisierung zum Zeitpunkt $t = 0$ proportional zur Signalintensität ohne Gradient (I_0) ist, während die z-Magnetisierung nach der Diffusionszeit proportional zur Signalintensität des Gradientenexperimentes ist ($I(g)$). **Gleichung 4.23** beschreibt somit den Verlauf der Echointensität in Abhängigkeit der Gradientstärke, da nun gilt:

$$\frac{I(g)}{I_0} = \frac{m_w(z, \Delta)}{m_w(z, 0)} \tag{4.26}$$

Mit dem hergeleiteten Modell wird nun versucht, die experimentellen Daten der Stimulated-Echo Messungen der Bakterienalginatlösungen anzupassen. Neben den experimentellen Parametern g, δ und Δ werden auch die Relaxationsraten R_{1p} und R_{1w} vorgeben (**Tabelle 4.5**), die den reziproken T_1-Zeiten entsprechen, welche aus Inversion-Recovery Experimenten ermittelt wurden. Der Wasserdiffusionskoeffizient $\mathcal{D}_w$ wurde aus der Anfangssteigung der Diffusionskurven bestimmt. Mit **Gleichung 4.23** kann nun mittels der *Nonlinear-Regress* Funktion von Mathematica die beste Anpassung an die Stimulated-Echo Diffusionsergebnisse gefunden werden, wobei die Parameter k_w und k_p zu bestimmen sind. **Abbildung 4.34** zeigt, dass die Anpassung des Modells an die experimentellen Daten gut gelingt. Die zugrundeliegenden Parameter sind in **Tabelle 4.5** zusammengefasst.

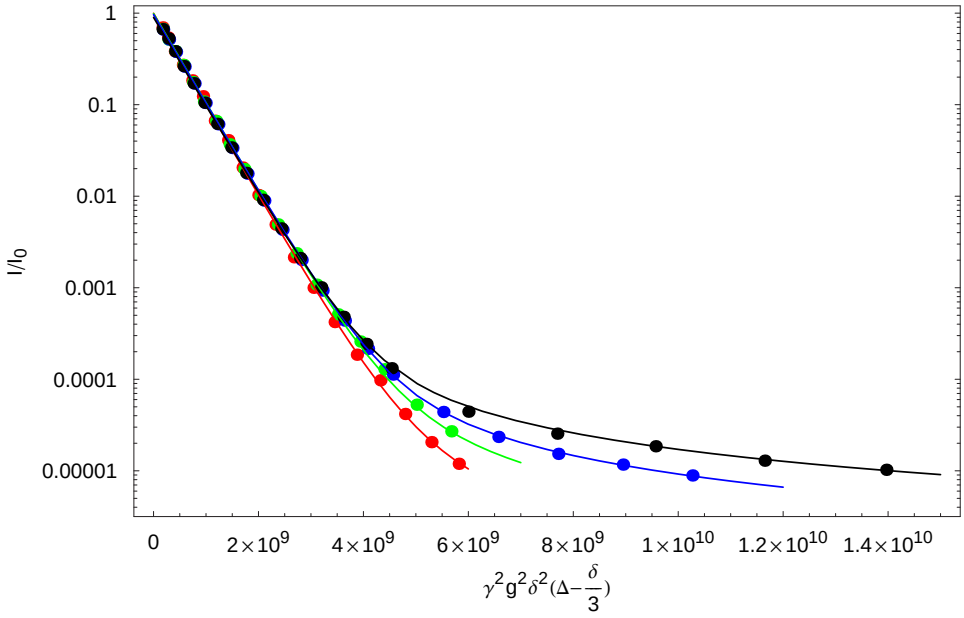


Abbildung 4.34: Peschier Fit des Stimulated-Echo Experiment an SG81-Alginat (1%).

Tabelle 4.5: Parameter der Peschier Anpassung aus **Abbildung 4.34**

Δ [ms]	R_w [1/s]	R_p [1/s]	$\mathcal{D}_w$ [m^2/s]	$\mathcal{D}_p$ [m^2/s]	k_p/k_w
10	0,348	0,816	$2,26 \cdot 10^{-9}$	0	64,6
30	0,348	0,816	$2,26 \cdot 10^{-9}$	0	62,4
100	0,348	0,816	$2,26 \cdot 10^{-9}$	0	64,7
300	0,348	0,816	$2,26 \cdot 10^{-9}$	0	66,6

Zur Abschätzung, ob die Anpassung der experimentellen Daten mit dem Peschier-Modell physikalisch sinnvoll ist, sei das Verhältnis der Parameter k_w und k_p zueinander betrachtet. Diese sind über die folgende Beziehung miteinander verknüpft:

$$m_w^e k_w = m_p^e k_p \tag{4.27}$$

Der Quotient k_p/k_w beschreibt somit das Verhältnis der Anteile der Gleichgewichtsma-

gnetisierung von Wasser und Polymer m_w^e/m_p^e, die für das Auftreten der Kreuzrelaxation verantwortlich sind. Da das Verhältnis der Gleichgewichtsmagnetisierungen nicht von der Diffusionszeit abhängig sein kann, muss demnach der Quotient k_p/k_w für alle betrachteten Diffusionszeiten konstant sein. Diese Bedingung ist gemäß **Tabelle 4.5** gut erfüllt. Dadurch kann das Modell als plausible Beschreibung der Stimulated-Echo Experimente angesehen werden. Das beobachtete Diffusionsverhalten im System Bakterienalginat/Wasser, welches mit dem Stimulated-Echo bestimmt wurde, kann somit eindeutig auf Kreuzrelaxation zurückgeführt werden.

Kapitel 5

2D-NOE-Spektroskopie an Alginat

5.1 Das 2D-NOESY Experiment mit Wasserfilter

Zur Untermauerung der PFG-Diffusionsexperimente ist es sinnvoll, die Wechselwirkungen zwischen Wasser und Polysaccharid genauer zu untersuchen. Da die Diffusionsmessungen Hinweise auf Kreuzrelaxation gaben (**s. Abschnitt 4.3.6** und **4.4.1**), wäre es von großem Nutzen, wenn diese vermuteten Kreuzrelaxationseffekte direkt nachgewiesen werden könnten. Dazu kommt die 2D-NOESY-Spektroskopie zum Einsatz. Der Nachweis von Wechselwirkungen zwischen Wasser und Polysaccharid wird allerdings durch die starken Intensitätsunterschiede zwischen den beiden Komponenten erschwert. Daher ist es notwendig, eine Wasserunterdrückung durchzuführen. Herkömmliche Verfahren zur Wasserunterdrückung, wie die selektive Vorsättigung der Wasserresonanz sind in diesem Falle nicht geeignet, da das Wassersignal, und damit auch die damit zusammenhängenden Kreuzsignale bereits während des NOESY-Experiments eliminiert würden. Um diese Probleme zu umgehen, wurde eine modifizierte Technik entwickelt, bei der dem gs-NOESY-Experiment eine Wasserunterdrückung mittels eines PFG-Hahn-Echos nachgeschaltet wird (**Abbildung 5.1**). Der Vorteil dieser Technik liegt darin, dass sich der NOE während der NOESY-Sequenz ungestört aufbauen kann, und erst im Anschluss daran das Wassersignal aufgrund der höheren Beweglichkeit soweit reduziert wird, dass ein

2D-Spektrum aufgenommen werden kann, in dem Wasser-, Polysaccharid- und eventuelle Kreuzsignale dazwischen in vergleichbaren Intensitätsverhältnissen vorliegen.

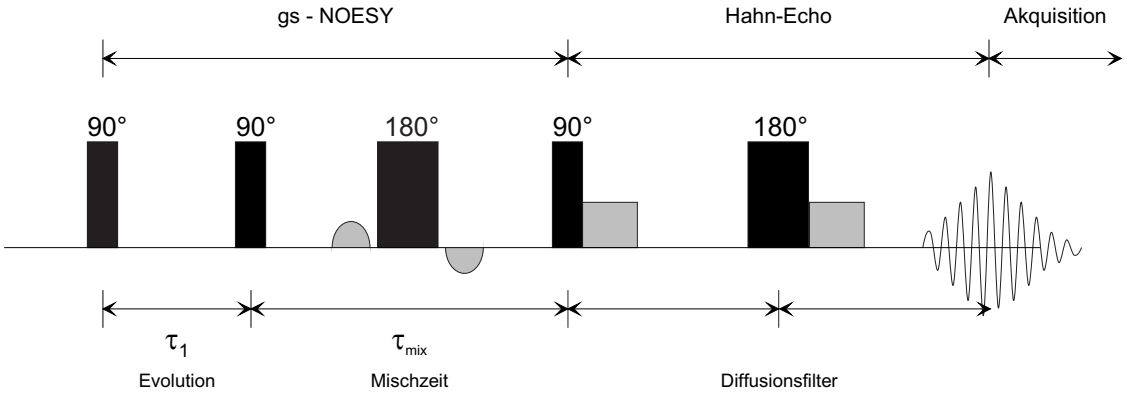


Abbildung 5.1: Pulssequenz eines gs-NOESY-Experiments mit nachgeschaltetem Hahn-Echo als Wasserfilter (noesygpph-se-cg)

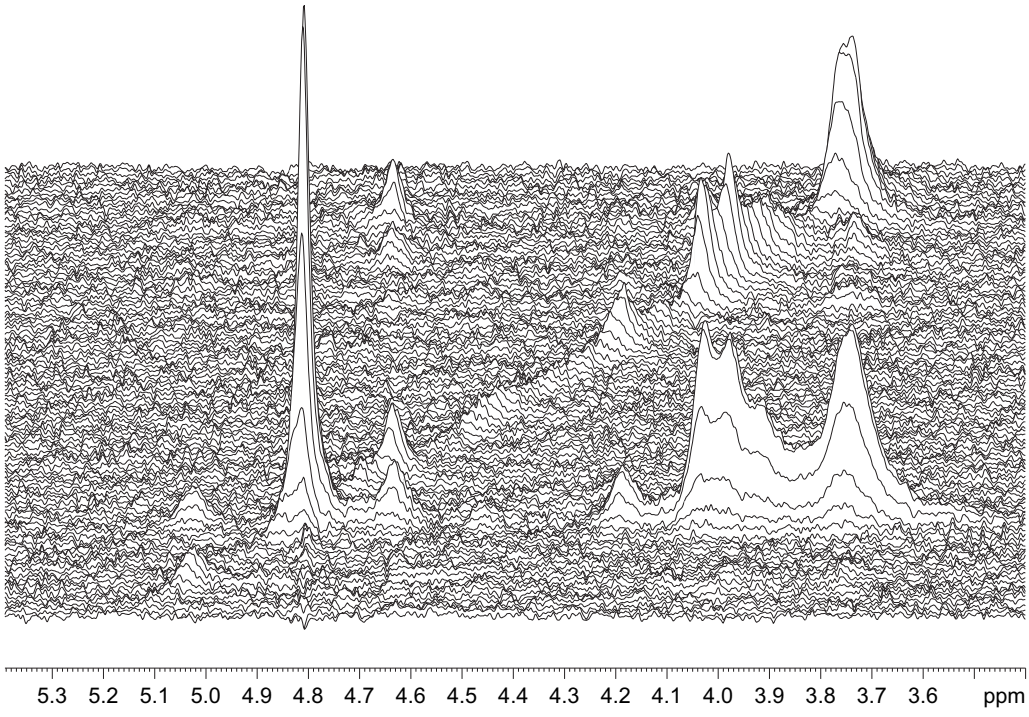


Abbildung 5.2: Stackplot eines 2D-NOESY-GPPH Spektrums einer 4%igen Lösung von Manucol DM mit nachgeschaltetem Hahn-Echo Wasserfilter

5.2 Ergebnisse und Interpretation der 2D-NOESY-Experimente

5.2.1 Algenalginat

Mittels der noesygpph-se-cg Technik wurden verschiedene Alginat/Wasser-Systeme gemessen. Zunächst wurde untersucht, ob der drastische Unterschied, der zwischen sterilfiltriertem und herkömmlich gereinigtem bzw. unbehandeltem Alginat in den PFG-Experimenten festgestellt wurde (**Abschnitt 4.3.1**), auch mit den NOESY-Messungen verifiziert werden kann. Die **Abbildungen 5.3** und **5.4** zeigen 2D-NOESY-Spektren von jeweils 1%igen Lösungen von unbehandeltem und sterilfiltriertem Manucol DM.

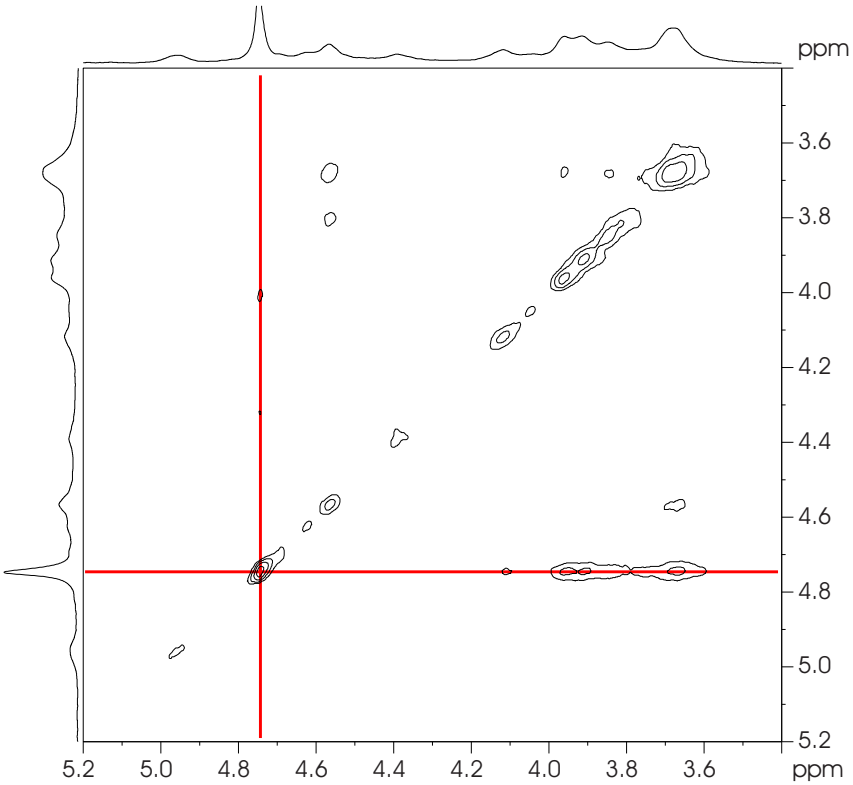


Abbildung 5.3: 2D-NOESY-GPPH Spektrum einer 1%igen Lösung ungehandelten Manucol DMs mit nachgeschaltetem Hahn-Echo Wasserfilter ($\tau_{mix} = 250$ ms).

Die Wasserunterdrückung ist dabei so gewählt, dass freies Wasser im Spektrum komplett

ausgelöscht wird ($\Delta = 10$ ms, $\delta = 1$ ms, $g = 4$ T/m). Der größte Unterschied zwischen den Spektren besteht darin, dass im Spektrum des ungereinigten Alginats ein deutliches Wasser-Diagonalsignal zu erkennen ist, während dieses im zweiten Spektrum vollständig fehlt. Dieses Ergebnis stimmt mit den PFG-Messungen überein. Was zunächst im Widerspruch zu den PFG-Ergebnissen zu stehen scheint, ist die Tatsache, dass in beiden Spektren deutliche Kreuzsignale zwischen Wasser und Polymer zu erkennen sind. Die PFG-Experimente zeigten hier einen großen Unterschied zwischen beiden Alginaten.

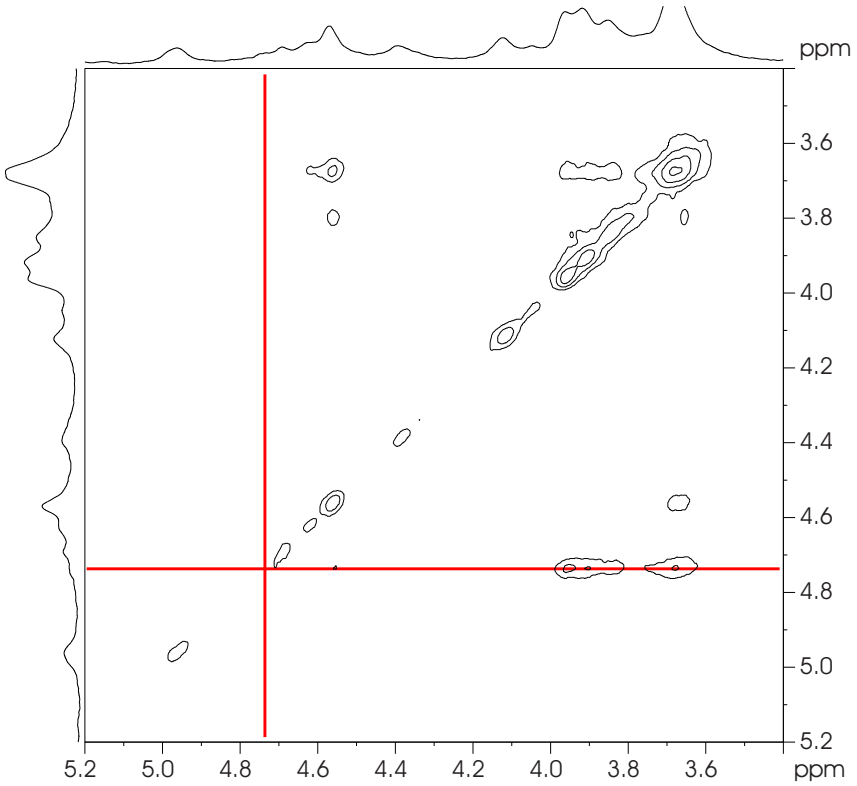


Abbildung 5.4: 2D-NOESY-GPPH Spektrum einer 1%igen Lösung sterilfiltrierten Manucol DMs mit nachgeschaltetem Hahn-Echo Wasserfilter ($\tau_{mix} = 250$ ms).

Während das gereinigte Manucol im Stimulated-Echo nur einen geringen Intensitätsgewinn des Wassersignals bewirkte, zeigte das unbehandelte Manucol einen deutlichen Intensitätsgewinn des Wassers gegenüber dem Hahn-Echo Experiment. Dieser Unterschied deutete darauf hin, dass die gemessenen Kreuzrelaxationseffekte hauptsächlich zwischen dem Wasser und den Alginat/Protein-Aggregaten stattfinden und nur in geringem Maße

zwischen Wasser und gelöstem Alginat, da in aggregatfreien Proben lediglich eine schwache Kreuzrelaxation beobachtet wird. Die NOESY-Spektren dagegen zeigen für Proben mit und ohne Aggregate in gleichem Maße nicht-symmetrische Kreuzsignale zwischen Wasser und Polymer. Diese Signale sind eindeutig auf Wechselwirkungen zwischen „schnellem“ Wasser und gelöstem Polymer zurückzuführen, da in der sterilfiltrierten Probe weder Cluster noch „langsames“ Wasser vorhanden sind. Im PFG-Experiment konnte dieser Anteil des Magnetisierungsaustauschs lediglich andeutungsweise bei langer Diffusionszeit beobachtet werden (**Abbildung 4.22**).

Der Kreuzrelaxationseffekt zwischen Wasser und den Aggregaten wurde im PFG-Experiment aufgrund des Intensitätsgewinns der Wasserresonanz im Stimulated-Echo festgestellt. Über die NMR-Resonanzen der Cluster kann dagegen keine Aussage gemacht werden, da diese Partikel aufgrund ihrer Immobilität im Flüssigspektrum keinerlei sichtbare Signale zeigen. Die Resonanzlinien der Partikel liegen vielmehr als breiter Bereich unter den Linien des gelösten Polymers und des Wassers. Dies gilt sowohl für die eindimensionalen PFG-Spektren, als auch für die zweidimensionalen NOESY-Spektren. In **Abbildung 5.3** hat man sich die Resonanz der Aggregate als breites Hintergrundsignal entlang der Diagonale vorzustellen. Verständlicherweise müssen Kreuzsignale von breiten, nicht sichtbaren Diagonalsignalen ebenso breit und ebenso unsichtbar sein. Die Kreuzrelaxationseffekte zwischen Wasser und den Aggregaten, die das PFG-Experiment zu detektieren vermag, sind somit mit der 2D-NOESY-Technik nicht darzustellen. Im Gegensatz dazu besitzt das 2D-NOESY Experiment offensichtlich eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Kreuzrelaxation zwischen Wasser und gelöstem Polysaccharid.

5.2.2 Bakterienalginat

In der Lösung des Bakterienalginats wurde aufgrund der Stimulated-Echo Ergebnisse ein Magnetisierungsaustausch zwischen Wasser und Acetylprotonen angenommen. **Abbildung 5.5** zeigt das NOESY-Spektrum von Bakterienalginatlösung.

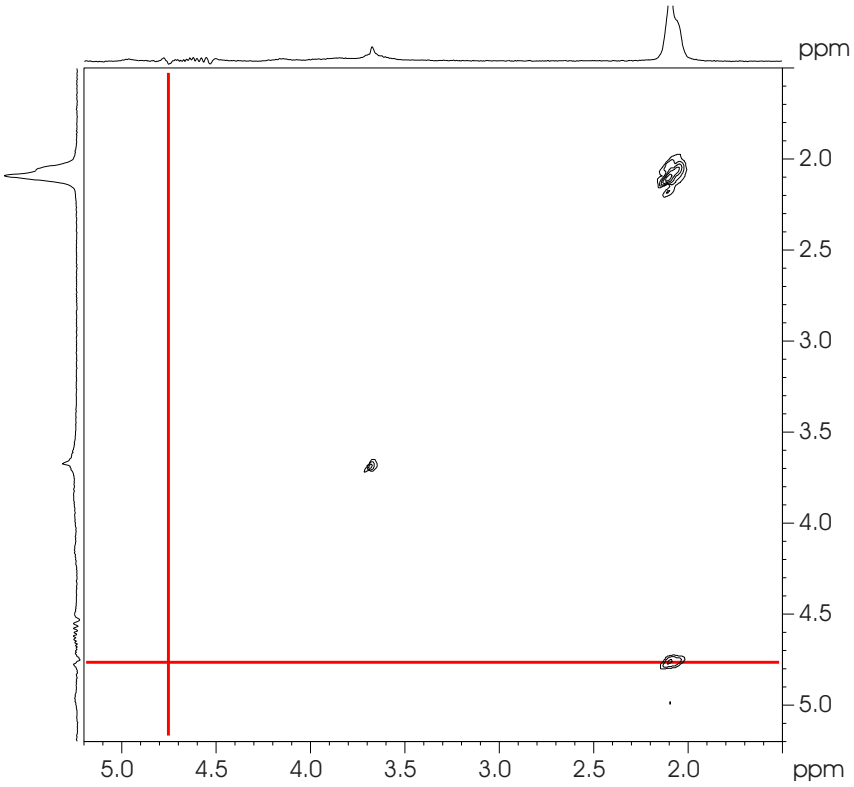


Abbildung 5.5: 2D-NOESY-GPPH Spektrum einer 1%igen Lösung von Bakterienalginat (SG81) mit nachgeschaltetem Hahn-Echo Wasserfilter ($\tau_{mix} = 250$ ms).

Das Spektrum weist ein intensives Kreuzsignal zwischen Acetylprotonen und Wasser auf, wobei die Wasserresonanz auf der Diagonalen aufgrund des Diffusionsfilters wiederum vollständig ausgelöscht wurde. Die Interpretation der Diffusionsexperimente an Bakterienalginat (**Abschnitt 4.4**) kann damit durch das NOESY-Experiment bestätigt werden.

Kapitel 6

Das Phasendiagramm von Wasser/Alginat

Borchard et al. [124, 2, 125] zeigten durch kalorimetrische Messungen, dass Alginate wie Manucol und Manugel mit Wasser nur bei sehr kleinen und großen Massenbrüchen mischbar sind (**Abbildung 6.1**). Bei Raumtemperatur zeigt das System eine sehr große Mischungslücke. In der einphasigen Domäne, welche bei einem Massenbruch von Alginat von etwa 0,7 beginnt, zeigt das Alginatgel einen Übergang in den Glaszustand bei χ=0,9.

6.1 Interpretation des Phasendiagramms mittels NMR

Beim Übergang des Massenbruchs von Alginat von 0 bis 1, d.h. von hochverdünnter Lösung zum festen Pulver, ändert sich die Beweglichkeit der Wassermoleküle. Diese Änderung kann durch NMR-Messungen verfolgt werden, da die Mobilität des Wassers einen Einfluss auf die Linienbreite des NMR-Signals hat. Die NMR-Untersuchungen zum Phasendiagramm basieren auf der Beziehung zwischen der Beweglichkeit von Atomen, Molekülen oder Molekülketten und deren transversaler (Spin-Spin) Relaxationszeit T_2. Ein

Anstieg von T_2 ist ein direkter Indikator für eine Abnahme der Korrelationszeit τ_c, was eine erhöhte molekulare Beweglichkeit bedeutet. Die transversale Relaxationszeit ist mit der Linienbreite des zugehörigen NMR-Signals korreliert gemäß:

$$b_{1/2} = \frac{1}{\pi T_2^*} \tag{6.1}$$

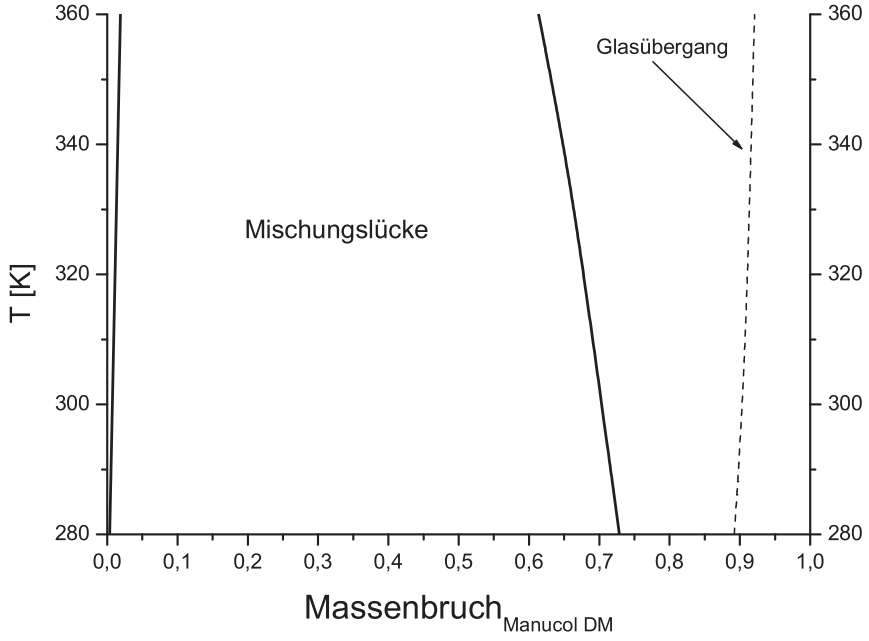


Abbildung 6.1: Phasendiagramm von Manucol DM/Wasser

Die Linienverbreiterung wird nicht nur durch die T_2 Relaxation bewirkt, sondern durch Inhomogenitäten des Magnetfeldes noch verstärkt, was zu einem reduzierten Wert T_2^* führt. Der Beitrag der Feldinhomogenitäten zur Linienbreite ist unabhängig von der Probenzusammensetzung, beeinflusst jedoch schmale Signale von Flüssigkeiten stärker als breite Signale fester Proben. Dennoch kann die Linienbreite als direktes Maß für die molekulare Beweglichkeit herangezogen werden.

^{1}H-Spektren von Alginatproben mit unterschiedlichem Wassergehalt wurden aufgenom-

men (**Abbildung 6.2**). Vollständig getrocknete Alginatpulver zeigen keine aufgelösten Signale, sondern lediglich eine breite Linie bei 3,6 ppm. Wenn das Alginatpulver geringe Mengen Wasser aufgenommen hat, tritt im Spektrum eine Wasserlinie bei 4,8 ppm auf, deren Intensität mit zunehmender Wassermenge zunimmt, während die Linienbreite abnimmt.

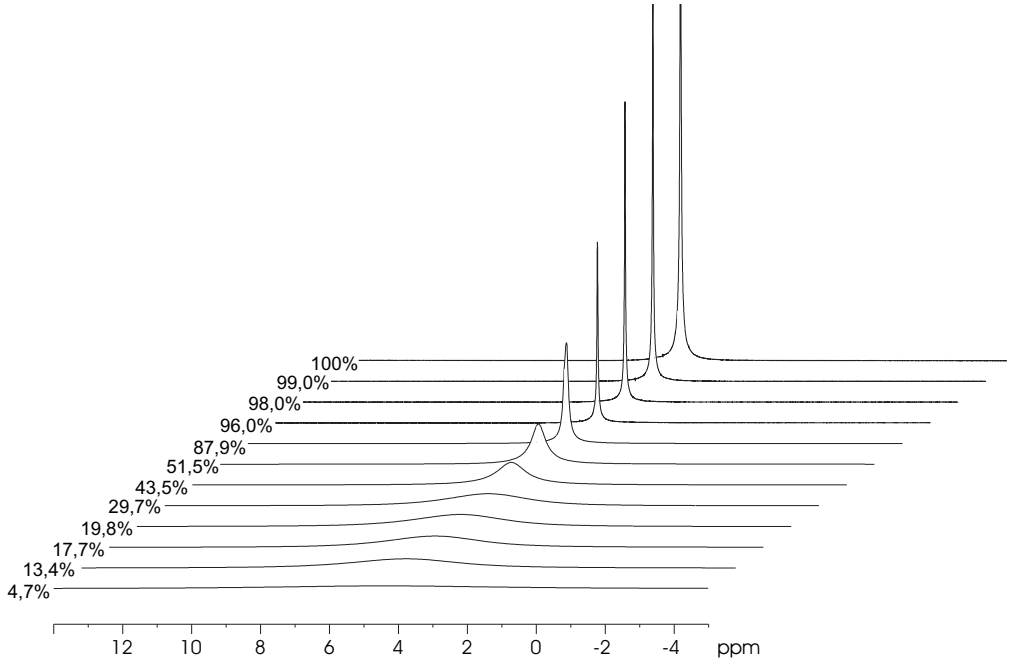


Abbildung 6.2: ^{1}H-Spektren von Manucol DM/Wasser mit variiertem Wassergehalt

Die Linienbreiten der Wassersignale aus obigen Messungen werden mit dem Phasendiagramm in **Abbildung 6.3** kombiniert. Die Linienbreite zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf für beide Alginate mit einem charakteristischen starken Anstieg bei einem Polymergehalt größer 90%. Für Manucol DM kann die Existenz von zwei Phasenübergängen auf der rechten Seite des Phasendiagramms durch die drei verschiedenen Steigungen der Linienbreite bestätigt werden. Der Übergang in den Glaszustand zeichnet sich durch eine starke Einschränkung der molekularen Beweglichkeit aus, was zum sprunghaften Anstieg der Wasserlinienbreite oberhalb von 90% Polymergehalt führt. Im Bereich zwischen 10 und 30% Wasser existiert eine Gelphase, worin die Linienbreite mit fortschreitender Verdünnung nur leicht abnimmt.

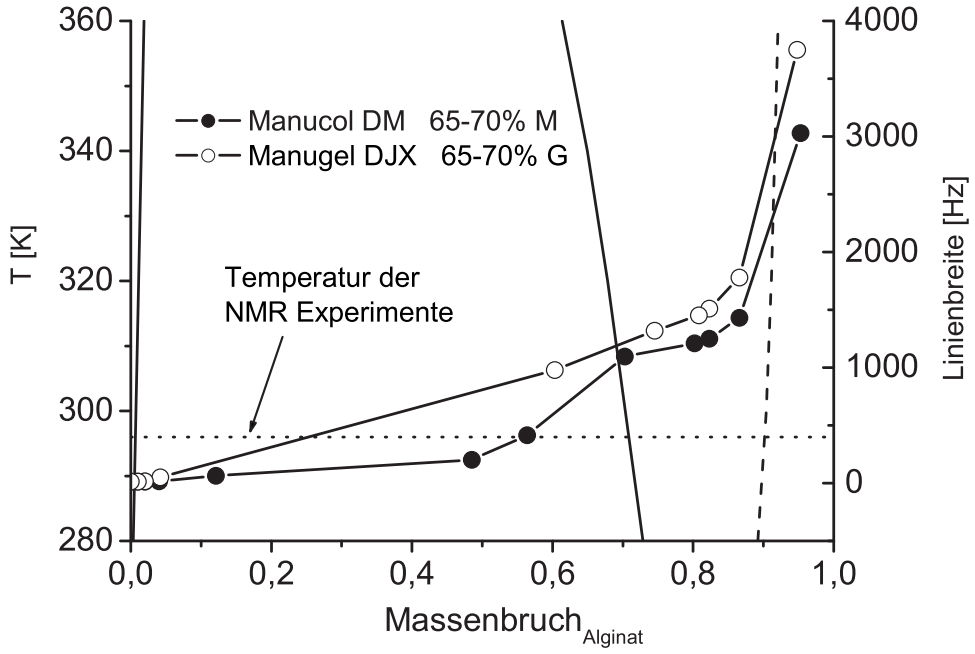


Abbildung 6.3: Kombination des Phasendiagramms mit den NMR-Ergebnissen

Nach dem Übergang in das zweiphasige System nimmt die Linienbreite stärker ab, da eine hochmobile Phase hinzukommt, die aus hochverdünnter Alginatlösung besteht. Ein bemerkenswertes Ergebnis der NMR-Experimente ist die Existenz von nur einer Wasserresonanzlinie über den gesamten Bereich der Zusammensetzung, also auch im zweiphasigen Bereich. Eine makroskopische Phasentrennung in der Mischungslücke bewirkt normalerweise ein kombiniertes Signal aus einer breiten Linie der Gelphase und einer schmalen Linie der hochverdünnten Phase. Am linken Rand der Mischungslücke wäre dieses kombinierte Signal definitiv nicht zu erkennen, da hier die mobile Phase sehr dominiert. Die Simulation in **Abbildung 6.4** zeigt jedoch, dass ein solches Signalmuster am rechten Rand der Mischungslücke zu erkennen wäre.

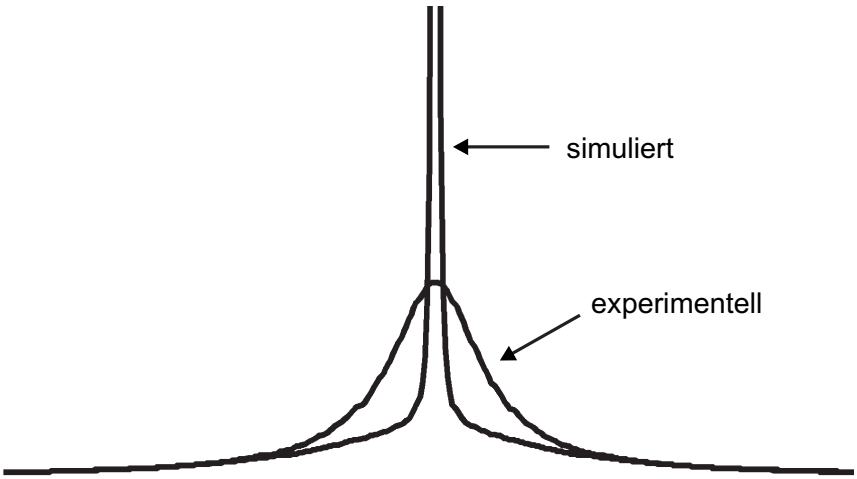


Abbildung 6.4: Simuliertes und experimentelles Spektrum von Manucol DM mit 43,5% Wassergehalt

Die Simulation basiert auf einer angenommenen makroskopischen Trennung der Gelphase von der hochverdünnten Phase. Die eingesetzten Linienbreiten sind den Messungen an den beiden Rändern der Mischungslücke entnommen (1090 und 13 Hz). Die Tatsache, dass nur eine Linie (415 Hz) in der Mischungslücke beobachtet wird, führt zu der Annahme, dass die Wassermoleküle einem schnellen Austausch zwischen den Phasen unterliegen. Während des Zeitrahmens eines NMR-Experiments kann jedes Wassermolekül der verdünnten Phase nur dann die Grenze zur Gelphase erreichen, wenn auf der rechten Seite der Mischungslücke die verdünnte Phase in Form von Mikrodomänen innerhalb der Gelphase existiert. Dieses Phänomen, die Entmischung von Systemen, die Makromoleküle enthalten, wird Koazervation genannt und wurde von Bungenberg de Jong beschrieben [126]. Im Gegensatz zu kleinen Molekülen können makromolekulare Systeme zu einer Emulsion entmischen, wobei eine Phase kolloidal in der anderen dispergiert ist. Die maximale Domänengröße der verdünnten Phase am rechten Rand der Mischungslücke kann abgeschätzt werden gemäß:

$$< r^2 >= 6\mathcal{D}\tau \tag{6.2}$$

wobei r den Domänenradius darstellt, $\mathcal{D}$ den Selbstdiffusionskoeffizienten von Wasser in

der verdünnten Phase und τ die Dauer des NMR-Experiments (etwa 2,5 ms). Aufgrund der hohen Verdünnung der mobilen Phase (ca. 99,5% Wasser) wird $\mathcal{D}$ als identisch mit dem Diffusionskoeffizienten von reinem Wasser angenommen ($\mathcal{D}^{298K} = 2,3 \cdot 10^{-9}\ m^2/s$). Daraus ergibt sich eine maximale Domänengröße von $2,3\mu m$. Wären die Domänen größer, könnten nicht alle Wassermoleküle die Gelphase erreichen und anstelle eines Wassersignals würden zwei Signale wie im simulierten Spektrum in **Abbildung 6.4** auftreten.

Die vorangegangenen Betrachtungen zum Phasendiagramm von Alginat und Wasser wurden unter der Annahme getätigt, bei dem eingesetzten Manucol DM handele es sich um reines Alginat. Sowohl den Messungen von Borchard, wie auch den vorgestellten NMR-Messungen lag jedoch das Alginat zugrunde, welches Alginat/Protein-Aggregate enthält (**Abschnitt 4.3.1**). In Kenntnis der Existenz dieser Aggregate liegt die Folgerung nahe, dass es sich bei den von Borchard postulierten Mikrodomänen, welche durch die Messung der NMR-Linienbreiten indirekt abgeschätzt wurden, um eben diese Alginat/Protein-Cluster handeln könnte. Die über **Gleichung 6.2** abgeschätzte Domänengröße steht in guter Übereinstimmung mit den Partikelgrößenmessungen (**Abschnitt 4.3.4**) und dem Modell zur gehinderten Diffusion mit Austausch (**Abschnitt 4.5.1**). Auch sind die dort ermittelteten Verweilzeiten von etwa 2 ms eine mögliche Erklärung, dass das Wasser in den Mikrodomänen der „Mischungslücke“ kein schmales Signal zeigt. Es muss daher angenommen werden, dass die festgestellte Koexistenz zweier Phasen im Phasendiagramm Alginat/Wasser, in der Existenz der Alginat/Protein-Cluster begründet liegt.

Kapitel 7

Wasserdiffusion in festem Alginat

Eine wichtige Funktion der EPS-Matrix in Biofilmen ist der Schutz der Mikroorganismen vor Austrocknung durch ein erhöhtes Wasserrückhaltevermögen [29,127]. Um Erkenntnisse über die Wasserbeweglichkeit in der EPS-Matrix unter Wassermangelbedingungen zu erlangen, wurden PFG-Diffusionsexperimente an Alginatsystemen mit reduziertem Feuchtigkeitsgehalt durchgeführt. Dazu kamen zwei unterschiedliche Methoden zum Einsatz, zunächst die Quellung von getrocknetem Alginat in wassergesättigter Atmosphäre und schließlich die Trocknung von Alginatlösungen bis zu definierten Wassergehalten.

7.1 Gequollenes Alginat

Aufgrund der benötigten großen Menge an Alginat in Pulverform konnte für die Quellungsmessungen ausschließlich unbehandeltes Alginat eingesetzt werden. Manucol DM wurde im Vakuum getrocknet und anschließend über mehrere Tage 100%-iger Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Der Wassergehalt wurde durch Differenzwiegung bestimmt, wobei die Quellung abgebrochen wurde, sobald der gewünschte Feuchtigkeitsgehalt erreicht wurde. Die Konsistenz der Proben entsprach bei Wassergehalten von bis über 50% immer noch der eines Pulvers. Die Proben wurden per Flüssig-NMR untersucht, wobei Standard ^{1}H-, sowie PFG-Experimente durchgeführt wurden. **Abbildung 7.1** zeigt die Protonenspektren zweier gequollener Alginate im Vergleich zu einer Alginatlösung mit 99% Wasser.

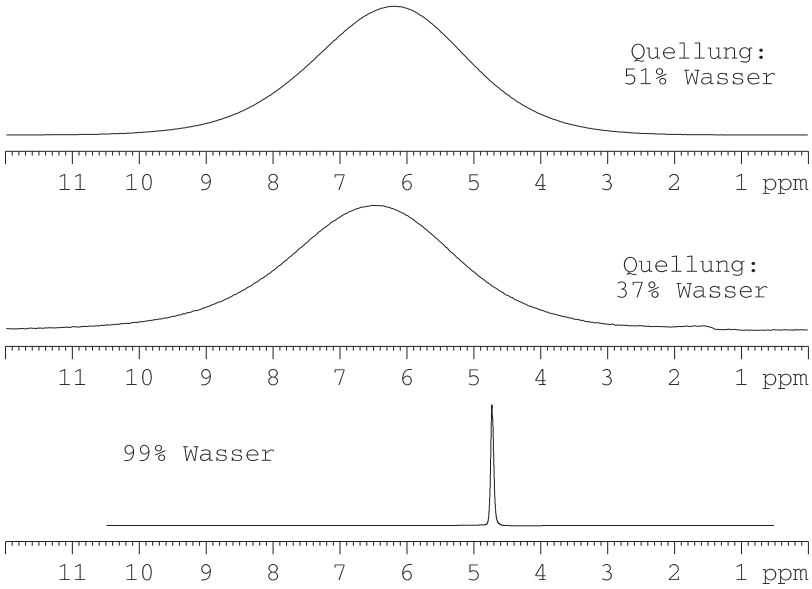
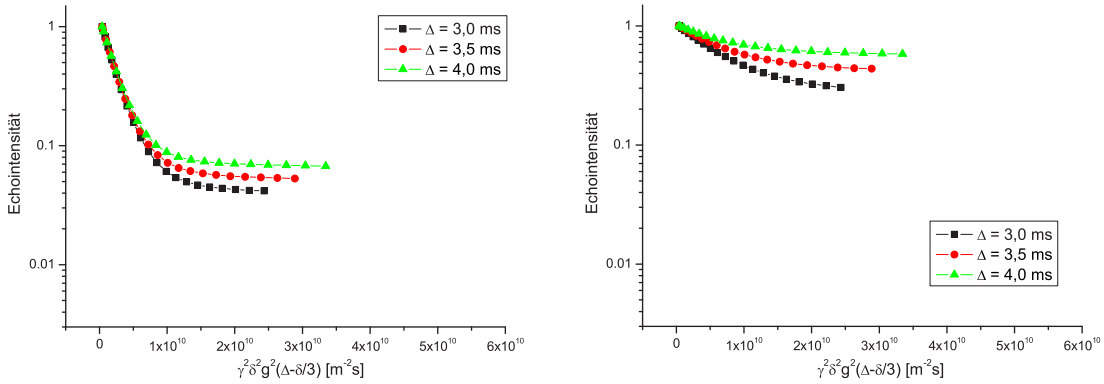


Abbildung 7.1: ^{1}H-Spektren von zwei gequollenen Alginatpulvern im Vergleich zur Wasserresonanz einer verdünnten Lösung.

Die gequollenen Alginate zeigen lediglich eine stark verbreiterte Wasserresonanz bei 6-6,5 ppm. Das Signal von freiem Wasser bei 4,8 ppm fehlt völlig. Das bedeutet, dass sich die Struktur des Wassers im gequollenen Alginat von der des freien Wassers unterscheidet und das keine größeren Domänen, die freies Wasser enthalten, in der Alginatmatrix vorkommen. Die Existenz von nur einer Resonanzlinie mit einer derart starken Tieffeldverschiebung bedeutet, dass das Wasser nahezu vollständig an die Ethergruppen und die Carboxylatgruppen des Polymers assoziiert ist. Die Wasserprotonen weisen einen Austausch mit den OH-Protonen des Alginats auf. Da dieser im Vergleich zur NMR-Zeitskala sehr schnell vollführt wird, entspricht das beobachtete Signal dem gewichteten Mittel der verschiedenen chemischen Umgebungen des Wassers und der OH-Protonen des Polymers [128, 129]. Bei dem Polymersystem mit dem höheren Wassergehalt (51%) ist gegenüber dem System mit 37% eine leichte Verschiebung in Richtung des freien Wassers zu erkennen, da der Wasseranteil hier im Vergleich zu den Polymerprotonen einen größeren Anteil einnimmt. Die sehr breiten Resonanzlinien lassen bereits auf eine stark eingeschränkte Beweglichkeit des sorbierten Wassers schließen. In **Abbildung 7.2** sind die Hahn-Echo Diffusionsmessungen an den gequollenen Alginaten dargestellt.



Gequollenes Alginat mit 51% Wasseranteil Gequollenes Alginat mit 37% Wasseranteil

Abbildung 7.2: Wasserdiffusion in gequollenem Alginat aus Hahn-Echo Experimenten

Die Signalzerfallskurven des PFG-Experiments lassen bei einem Wassergehalt von 37% eine starke Einschränkung der Wasserbeweglichkeit erkennen. Der Selbstdiffusionskoeffizient liegt im Bereich von etwa $5 \cdot 10^{-11}$ m^2/s. Ferner tritt eine Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten und eine Diffusionszeitabhängigkeit des Signalabfalls auf. Neben eventuell auftretender gehinderter Diffusion ist hierfür hauptsächlich der chemische Austausch zwischen Wasser und OH-Protonen des Polymers als Ursache anzusehen. Im Bereich der hohen Gradienten ist eine Konvergenz des apparenten Diffusionskoeffizienten gegen 0 abzulesen, was als Indiz für einen chemischen Austausch mit der Polymermatrix zu deuten ist, da diese als Feststoff vorliegt. Im Alginat mit dem höheren Wassergehalt ist die Wassermobilität deutlich größer. Im Bereich der hohen Gradienten zeigt sich das gleiche Auffächern der Kurven mit der Konvergenz gegen 0 wie beim trockeneren Alginat, jedoch ist hier ein deutlicher Anteil schneller diffundierenden Wassers zu verzeichnen. Im Bereich der Anfangssteigung ergibt sich ein Diffusionskoeffizient von $4 \cdot 10^{-10}$ m^2/s. Gegenüber freiem Wasser ist dieser Wert aber immer noch um ca. eine Zehnerpotenz verringert. Durch die Quellung des Polymers von 37% bis 51% ist die Wasserbeweglichkeit zwar deutlich erhöht, dennoch muss, aufgrund des Fehlens einer Wasserresonanz bei 4,8 ppm, das gesamte Wasser derart mit der Matrix assoziiert sein, dass auf der Zeitskala des NMR-

Experimentes alle Wassermoleküle mit den Polymerprotonen austauschen können. Die Ergebnisse der Quellungsmessungen werden im Folgenden mit den Trocknungsmessungen verglichen, die als Modell für das Verhalten von Biofilmen in Wassermangelsituationen herangezogen werden.

7.2 Getrocknetes Alginat

7.2.1 Wasserbeweglichkeit in unbehandeltem Alginat

Lösungen von unbehandeltem Manucol DM (1%) wurden durch Trocknung auf definierte Feuchtigkeiten gebracht, die im vergleichbaren Bereich der Quellungsexperimente liegen sollten. Zur Verhinderung einer thermischen Schädigung der Alginate wurde die Trocknung bei 50°C in einem Vakuum von etwa 200 mbar vollzogen. Die Konsistenz der so gewonnenen Proben lässt sich, je nach Wassergehalt, am besten mit der von mehr oder minder sprödem Plastik beschreiben. Die getrockneten Alginate wurden in Streifen geschnitten und zur Messung in 5mm-NMR-Röhrchen überführt. **Abbildung 7.3** zeigt die ^{1}H-Messungen an den getrockneten Proben im Vergleich zum gequollenen Alginat. Trotz in etwa übereinstimmender Feuchtigkeiten zeigen beide Methoden ein völlig anderes Verhalten des Wassers. Bei 34% Wassergehalt weist das Spektrum eine einzelne Wasserlinie bei etwa 4,6 ppm auf. Diese Linie ist deutlich schmaler als die tieffeldverschobene Linie der Quellungsexperimente. Daraus, dass die Resonanz ungefähr der des reinen Wassers entspricht, lässt sich folgern, dass sich das Wasser im getrockneten Alginat in größeren Domänen befindet, worin es sich nahezu unbeeinflusst vom Polymer bewegen kann. Die gegenüber freiem Wasser deutlich verbreiterte Linie deutet allerdings auf teilweise Assoziierung des Wassers an den Porenrändern hin. Ein bemerkenswertes Ergebnis liefert die Probe mit 49% Wassergehalt. Neben der relativ schmalen Linie bei etwa 5 ppm, die den gleichen Ursprung hat, wie die der 34%-Probe, tritt außerdem eine breitere tieffeldverschobene Resonanz bei etwa 6 ppm auf. Diese gleicht der Linie des Quellungsexperimentes und scheint daher ebenfalls durch assoziiertes Wasser außerhalb der Domänen hervorgerufen zu werden. Im Alginat mit dem höheren Wassergehalt koexistieren somit zwei Wasser-

phasen, die mobile Wasserphase in den größeren Domänen, sowie die immobilisierte, die in der Alginatmatrix assoziiert ist.

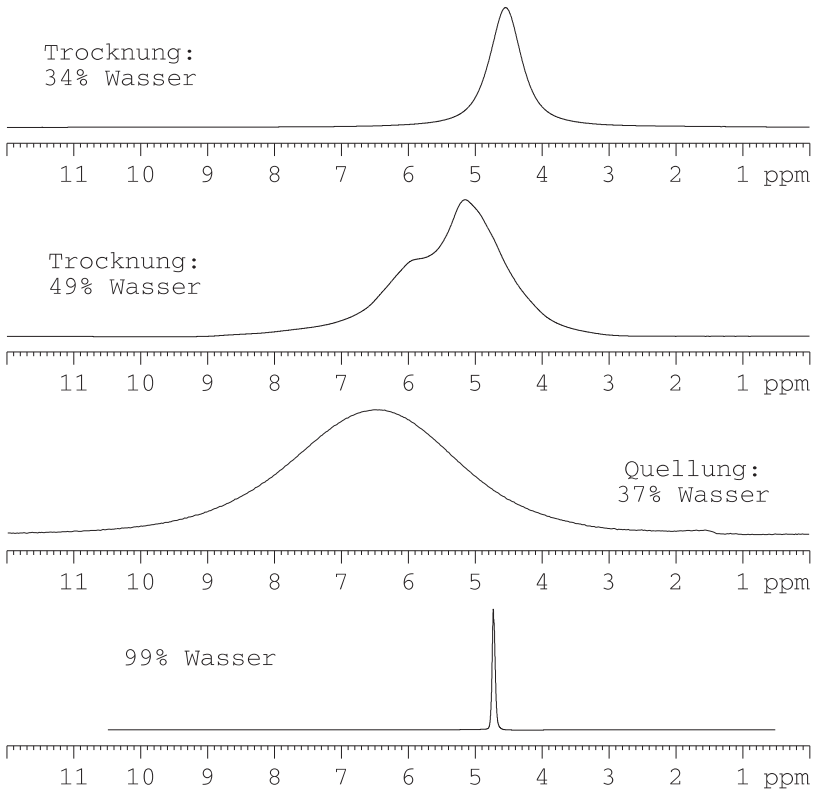
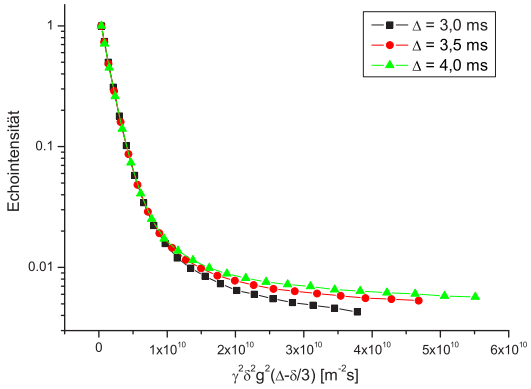


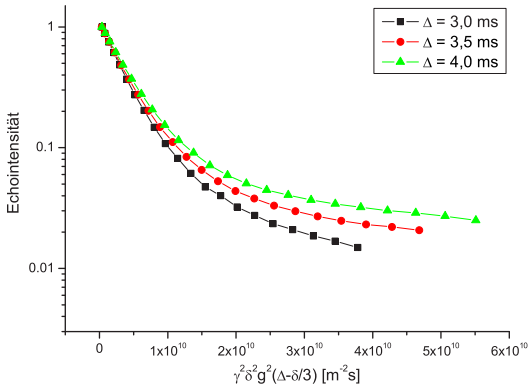
Abbildung 7.3: Vergleich der Wasserresonanzlinien von getrocknetem Alginat mit gequollenem Alginat und Alginatlösung.

Stellt man sich nun den Trocknungsprozess einer Alginatlösung über den Zustand von 49% Wassergehalt bis hin zu 34% Wassergehalt vor, so lässt sich folgern, dass erst das immobilisierte Wasser aus der Polymermatrix aus dem System entfernt wird, während das freie Wasser durch Einkapselung in Wasserreservoirs vor der Austrocknung zunächst geschützt ist. Zum Vergleich mit den vorangegangenen Ergebnissen werden die Diffusionsmessungen an getrocknetem Alginat herangezogen (**Abbildung 7.4**). Die Alginatprobe mit 34% Wasser zeigt eine deutliche Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten mit einer ausgeprägten Zeitabhängigkeit des Signalabfalls. Aus der Anfangssteigung lässt sich ein Diffusionskoeffizient von etwa $2 \cdot 10^{-10}$ m^2/s ermitteln. Dieser Wert scheint zunächst sehr gering, es muss jedoch in die Betrachtung mit eingezogen werden, dass das Wasser

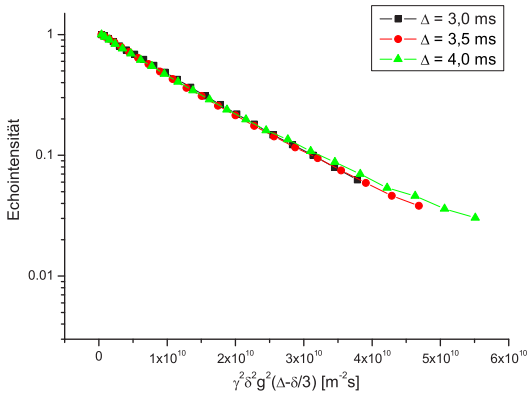
in den Domänen gehinderte Diffusion erfährt und an den Porenrändern teilweise an das Polymer assoziiert sein kann. Die Probe mit 51% Wasser weist einen deutlich höheren Anteil freien Wassers auf, der zudem noch einen höheren Diffusionskoeffizienten besitzt (ca. $6 \cdot 10^{-10}$ m^2/s). Es scheint daher im Trocknungsprozess beim Übergang von 49% bis 34% Wassergehalt auch schon ein Teil des eingekapselten freien Wassers aus dem Alginat entfernt zu werden. Nach Entfernung allen assoziierten Wassers scheint eine Schrumpfung der Poren mit kontinuierlichem Verlust des freien Wassers einzutreten.



Ungereinigtes Alginat mit 49% Wasseranteil



Ungereinigtes Alginat mit 34% Wasseranteil



Gereinigtes Alginat mit 48% Wasseranteil

Abbildung 7.4: Wasserdiffusion in getrocknetem Alginat aus Hahn-Echo Experimenten

Das assoziierte Wasser, das bei 49% Wassergehalt noch teilweise vorhanden ist, lässt sich in

der Diffusionsmessung dem hohen Gradientbereich der Kurven zuschreiben. Die Kurven werden in diesem Bereich deutlich flacher als bei der Probe mit 34% Wasser, was auf die Existenz der immobilisierten Fraktion hindeutet. Zusammengefasst lässt sich sagen, dass bei der Trocknung von unbehandelter Alginatlösung Domänen verbleiben, die freies Wasser ($\delta = 4,8$ ppm) mit hoher Mobilität enthalten, und die einen gewissen Schutz vor Austrocknung gewährleisten.

7.2.2 Wasserbeweglichkeit in sterilfiltriertem Alginat

Die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnitts legen wiederum die Vermutung nahe, dass die beobachteten Wasserdomänen an die Existenz der Alginat/Protein-Cluster geknüpft sind. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde das Trocknungsexperiment mit sterilfiltriertem Manucol DM wiederholt (**Abbildung 7.4**). Trotz übereinstimmendem Feuchtigkeitsgehalt ist hierbei ein völlig anderes Diffusionsverhalten zu erkennen als beim unbehandelten Alginat. Es ist keine Fraktion zu erkennen, die auf eine freie Beweglichkeit des Wassers hindeutet. Es tritt ein monoexponentieller Signalabfall auf, der eine deutlich verminderte Wassermobilität als in den oben beschriebenen Poren darstellt. Die Beweglichkeit ist aber deutlich größer als in der assoziierten Wasserfraktion des unbehandelten Alginats. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sämtliches Wasser mit der Polymermatrix assoziiert ist, während bei gleichem Wassergehalt im ungereinigten Alginat nur ein kleiner Teil mit der Matrix assoziiert ist. Das gereinigte Alginat weist daher einen höheren Quellungsgrad auf, was zu einer höheren Beweglichkeit des Wassers führt. **Abbildung 7.5** zeigt die (apparenten) Diffusionskoeffizienten, die sich aus dem monoexponentiellen Signalabfall des gereinigten, bzw. dem biexponentiellen Abfall des ungereinigten Alginats ergeben. Das Fehlen der eingekapselten Domänen führt zur einer Ausmittelung der Diffusionskoeffizienten, die beim unbehandelten Alginat gefunden wurden.

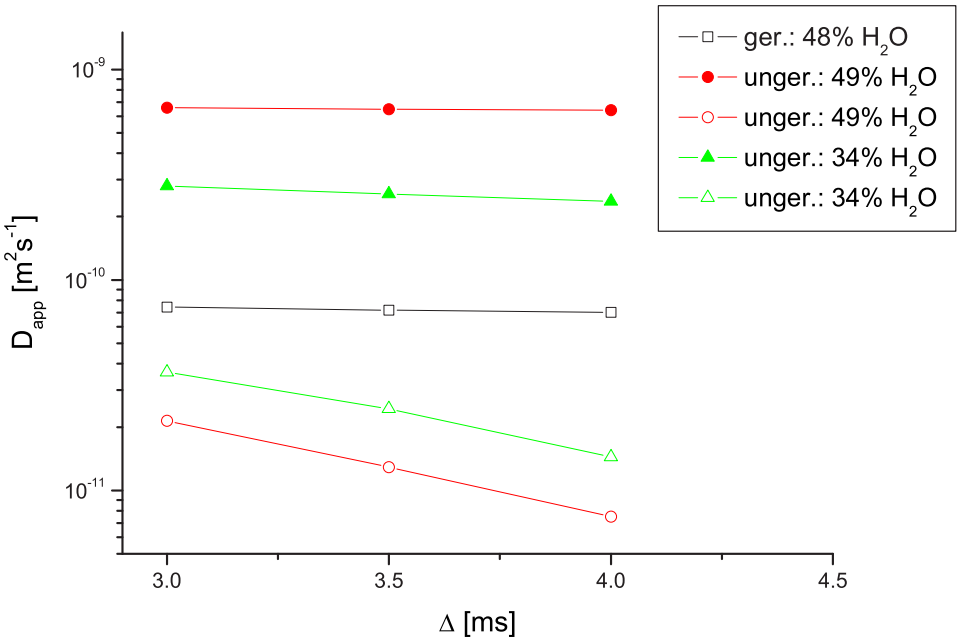


Abbildung 7.5: Wasserdiffusionskoeffizienten in getrocknetem Alginat

Die vorangegangenen Ergebnisse und Überlegungen deuten darauf hin, dass die Aggregierung von Alginat mit Proteinen einen möglichen Schutzmechanismus vor Austrocknung darstellt. Überträgt man die Ergebnisse vom Alginat auf einen vollständigen Biofilm, so ist es denkbar, dass Mikroorganismen (Bakterien bzw. Algen), die Alginat und daran bindende Proteine produzieren, sich mit diesen Polysaccharid/Protein-Clustern umgeben und sich so unter Wassermangelbedingungen ein Reservoir schaffen, in welchem sie Wasser mit hoher Mobilität umgibt.

Kapitel 8

Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Alginat

Die biologische Funktion von Proteinen hängt von ihrer dreidimensionalen Struktur ab. Wassermangel kann zum Verlust der nativen Struktur und damit zum Verlust der biologischen Funktion im Austrocknungsprozess führen. Einige Mikroorganismen bewahren die biologische Aktivität ihrer Proteine durch Anlagerung von Zuckern während der Austrocknung. Diese Strategie wurde auch auf die Stabilisierung von isolierten Proteinen übertragen, da diese, durch Saccharide stabilisiert, ihre dreidimensionale Struktur im Prozess der Gefriertrocknung nicht verloren [130, 131].

Eine Reihe von Zuckern ist dafür bekannt, die Stabilität von Biomaterial zu erhöhen. Sie sind in der Lage Biostrukturen, wie Membranen und Proteine vor der Zerstörung durch Austrocknung, Hitze oder Kälte zu schützen [132].
Zum Verständnis dieses Schutzmechanismus werden hauptsächlich drei Theorien herangezogen:

1. Durch direkte Wechselwirkung zwischen Zuckermolekülen und der zu schützenden Biostruktur aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen übernimmt der Zucker die Funktion des Wassers (*„water-replacement hypothesis“*) [133, 134].

2. Die Zuckermoleküle bewirken einen Einschluss von Wasser an der Oberfläche des Proteins (*„water-layer hypothesis“*) [135].

3. Eine bestimmte biomolekulare Konformation wird bei der Austrocknung in einem hochviskosen „Zuckerglas“ eingeschlossen und dadurch fixiert (*„mechanical-entrapment hypothesis“*) [136, 137].

Aufgrund der Tatsache, dass im Algenalginat eine Aggregierung von Alginat mit Proteinen auftritt, woraus der Einschluss einer Wasserfraktion resultiert (**Kapitel 4**), liegt es nahe, der *„water-layer hypothesis“* besondere Beachtung zu schenken. Da eine Charakterisierung der Proteine, die im Algenalginat die Aggregierung bewirken, außerhalb der Möglichkeiten dieser Arbeit liegt, wurde versucht, ein Alginat/Protein-System zu finden, dessen Zusammensetzung bekannt ist, und das ein analoges Verhalten, also den Einschluss von Wasser, der zu einem verlangsamten Wassersignal im PFG-NMR-Experiment führt, zeigt. Die Substanzklasse der Lektine ist hierbei die erste Wahl, da diese zuckerbindende Eigenschaften besitzen und ihnen strukturbildende Eigenschaften in der EPS-Matrix von Biofilmen zugeschrieben werden (**Abschnitt 2.2.2**). Im folgenden werden die NMR-Ergebnisse an zwei Alginat/Lektin-Systemen vorgestellt. Alle gezeigten Flüssigspektren wurden mit der Hahn-Echo Pulssequenz als Wasserfilter aufgenommen, wobei die Parameter wiederum so gewählt wurden, dass freies Wasser vollständig eliminiert wird, während eventuell auftretendes „verlangsamtes“ Wasser sichtbar bleibt.

8.1 Wechselwirkungen zwischen ConA und Alginat

Eines der am besten erforschten Lektine ist Concanavalin A (ConA), das aus der Jackbohne *Canavalia ensiformis* isoliert werden kann. Die Polypeptidkette besteht aus 237 Aminosäureresten. In neutraler Lösung liegt ConA als Tetramer mit einer Molmasse von 106.000 g/mol vor. Die zuckerbindenden Eigenschaften von ConA konnten bereits in den 1970er Jahren einer sogenannten Bindungstasche zuschrieben werden, die eine spezifische Bindung zu den Zielzuckern α-D-Glucose und α-D-Mannose eingeht [138]. Die Bindung an

Polysaccharide, wie Dextran, Glykogen, Mannan und Amylopektin, die diese Zielzucker enthalten, wurde ebenfalls festgestellt [139].

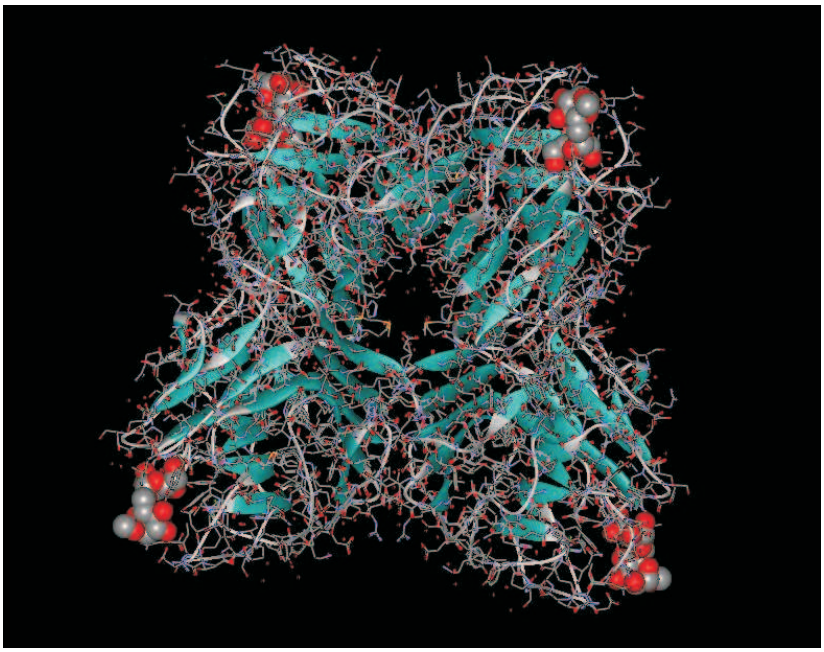


Abbildung 8.1: Struktur eines ConA-Tetramers mit vier Disacchariden in den Bindungstaschen

Alginat enthält keine Zielzucker von ConA, jedoch konnte Strathmann [100] in mikroskopischen Betrachtungen eine starke Bindung zwischen EPS-Bestandteilen von P. aeruginosa Biofilmen und fluoreszenzmarkiertem ConA feststellen. Die bindenden EPS-Bestandteile konnten als Alginat gedeutet werden, da diese Bindung nach Behandlung mit Alginat-Lyase nicht mehr auftrat. Aufgrund der offensichtlichen Affinität von ConA zu Alginat erschien es daher sinnvoll, dieses System mittels NMR auf eine mögliche Aggregierung zu untersuchen.

8.1.1 PFG-NMR-Messungen an Alginat/ConA

Bei dem Alginat, das für sämtliche Messungen in diesem Kapitel eingesetzt wurde, handelte es sich ausnahmslos um Manucol DM und Manucol LB, die beide durch Sterilfiltration gereinigt wurden. Die eingesetzten Alginate enthielten somit keine wassereinschließenden

Cluster. **Abbildung 8.2** zeigt Protonenspektren mit PFG-Wasserfilter an Alginat- und ConA-Lösung, sowie einer Mischung beider Lösungen. Die Lösungen der Einzelkomponenten zeigen, wie erwartet, im Bereich um 4,8 ppm keine schmale Resonanzlinie, die auf ein Vorhandensein von verlangsamtem Wasser hindeuten könnte.

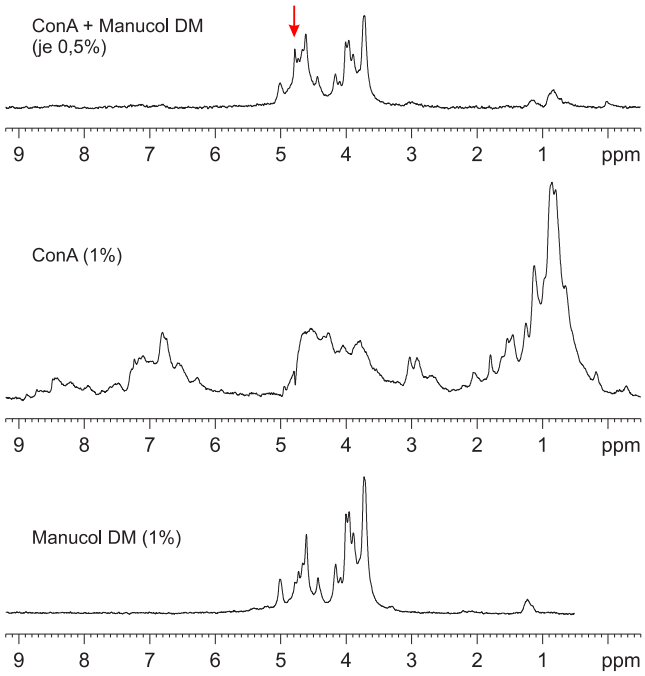


Abbildung 8.2: Wassergefilterte ^{1}H-NMR-Messung an wässriger ConA-Lösung, Manucol DM-Lösung und der Mischung beider Lösungen.

Das Spektrum der Mischung beider Lösungen liefert ein bemerkenswertes Ergebnis. Sämtliche Signale des Lektins sind nahezu vollständig ausgelöscht, während die Resonanzlinien des Alginats praktisch unbeeinflusst sind. Dieser Umstand deutet bereits daraufhin, dass eine Komplexierung des ConA durch das Alginat bewirkt wird. Daraus resultiert, dass eine isotrope Beweglichkeit des Lektins nicht mehr gegeben ist. Die Mobilität des ConA muss derart eingeschränkt sein, dass die damit einhergehende Linienverbreiterung im Flüssigspektrum ein vollständiges Verschwinden der Resonanzen bewirken kann. Lediglich ein geringer Anteil der Methylprotonen bei etwa 0,9 ppm besitzt noch eine entsprechende Mobilität, um ein schwaches Restsignal zu erzeugen. Die Existenz nahezu unbeeinflusster Alginatlinien deutet darauf hin, dass lediglich ein sehr geringer Teil der Alginatmoleküle

für die Komplexierung des Lektins verantwortlich ist. Der überwiegende Teil der Alginatketten weist offenbar keine Interaktion mit dem ConA auf und zeigt daher das gleiche Verhalten wie im Spektrum der Alginatlösung ohne ConA. Desweiteren ist im Spektrum der Mischung eine schmale Resonanz bei 4,8 ppm mit geringer Intensität zu erkennen, die in den Einzelspektren nicht vorhanden ist. Hierbei muss es sich um Wasser handeln, das in den Alginat/ConA-Komplexen eingeschlossen ist. Der Beweis, dass es sich bei der Linie um Wasser handelt, gelang dadurch, dass eine Erhöhung des Gradienten von 3,5 auf 6 T/m bei der Aufnahme des Spektrums zu einer Auslöschung des Signals bei 4,8 ppm führte, während die Alginatresonanzlinien nur eine sehr geringe Abschwächung erfuhren. Der (apparente) Diffussionskoeffizient der Substanz bei 4,8 ppm ist demnach signifikant größer als der des Polymers, so dass diese Linie dem Wasser zugeschrieben werden muss.

Trocknung der Alginat/ConA-Lösung

In **Kapitel 7** wurde gezeigt, dass die Alginat/Protein-Cluster im Algenalginat eine große Rolle für die Wasserbeweglichkeit im Trocknungsprozess spielen, da sie wassereinschließende Domänen bilden. Es wurde nun angenommen, dass die ConA/Alginat-Komplexe ein ähnliches Verhalten zeigen und bei der Trocknung ebenfalls die Bildung solcher Bereiche begünstigen. Da aufgrund der erforderlichen großen Probenmengen die Messung der Diffusion in ConA/Alginat-Feststoffen nicht möglich war, wurde ein indirekter Weg gewählt. Die Alginat/ConA-Lösung wurde getrocknet und anschließend wieder in die gleiche Menge Wasser aufgenommen. Diese Lösung wurde der gleichen Messung wie die Ausgangslösung unterzogen. **Abbildung 8.3** zeigt den Vergleich der beiden Spektren. Die Spektren sind weitestgehend identisch, lediglich der Anteil des verlangsamten Wassers ist bei der getrockneten Probe deutlich erhöht. Die Trocknung scheint somit die Ausbildung von wassereinschließenden Domänen zu begünstigen, so dass sogar nach Wiederauflösung eine größere Menge eingeschlossenes Wasser detektiert wird. Es ist daher von einem gewissen Grad von irreversibler Bindung zwischen Alginat und ConA im Trocknungsprozess auszugehen.

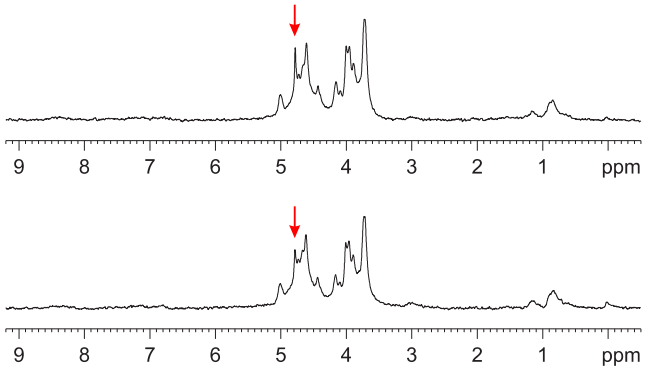


Abbildung 8.3: Wassergefilterte ^{1}H-NMR-Messung an wässriger ConA/Manucol DM-Lösung (unten) und derselben Probe, nachdem diese im Vakuum vollständig getrocknet und anschließend wieder in gleicher Konzentration gelöst wurde (oben). Deutlich zu erkennen ist der größere Anteil „langsamen“ Wassers nach der Trocknung.

Um sicherzugehen, dass auch im Trocknungsprozess die Bildung von Wasserkapseln auf die Interaktion zwischen Lektin und Polysaccharid zurückzuführen ist, wurden auch die Lösungen der Einzelkomponenten der Trocknung unterzogen und nach Wiederauflösen untersucht (**Abbildung 8.4**).

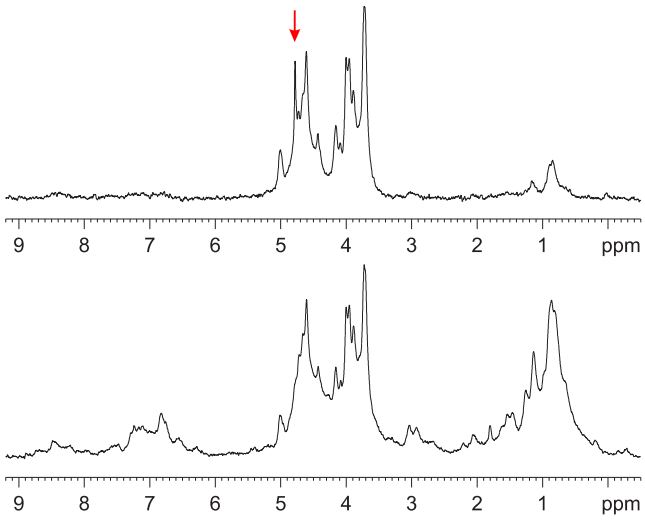


Abbildung 8.4: Summe der ^{1}H-Spektren von ConA- und Manucol DM-Lösung (unten) im Vergleich zum Spektrum der Mischung der beiden Lösungen (oben). Die Unterschiede der Mischung zur Summe der Einzelkomponenten sind das langsame Wasser, sowie die nahezu vollständige Auslöschung des Proteinsignals.

Die Summe der Einzelspektren im Vergleich zum Spektrum der Mischung verdeutlicht noch einmal die bisher festgestellten Ergebnisse. Während die Addition der Spektren der getrockneten Einzelkomponenten die Resonanzlinien von Protein und Polysaccharid aufweist und keine Wasserresonanz enthält, ist die Linie des langsamen Wassers bei der Mischung deutlich ausgeprägt und das ConA-Spektrum nahezu vollständig ausgelöscht.

PFG-Diffusionsmessung an ConA/Alginat

Zur Betrachtung des Diffusionsverhaltens von Wasser im System ConA/Alginat wurde die Lösung der getrockneten Mischung herangezogen, da diese einen höheren Anteil langsamen Wassers aufwies. In **Abbildung 8.5** sind die Ergebnisse der Hahn-Echo Diffusionsmessungen dargestellt, wobei zum Vergleich die Diffusionskurven aus dem identischen Experiment an unbehandelter Manucol DM-Lösung aus **Abschnitt 4.3.1** abgebildet sind.

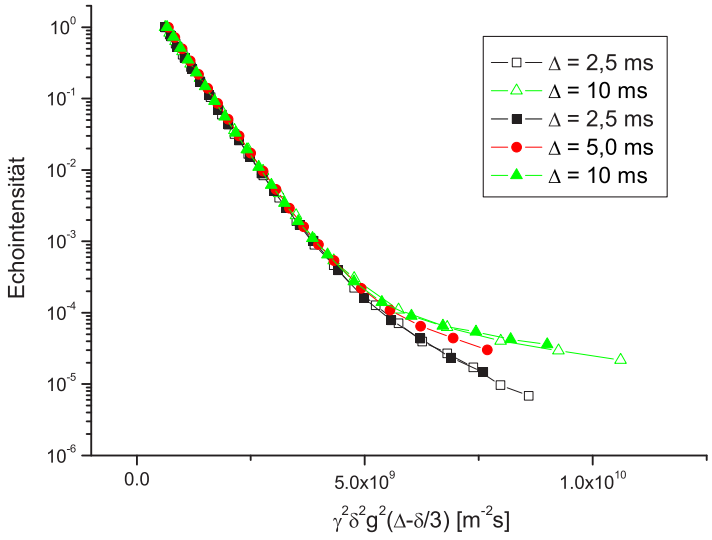


Abbildung 8.5: Manucol DM/ConA-Lösung (je 0,5%) nach Trocknung: Echozerfallskurven des Wassersignals aus Hahn-Echo Experiment. Zum Vergleich sind die Diffusionskurven des unbehandelten Manucol DM dargestellt (nicht ausgefüllte Symbole).

Die Zerfallskurven zeigen eine ausgeprägte Abweichung vom monoexponentiellen Verhalten, was wiederum zu Anteilen mit signifikant niedrigeren apparenten Diffusionskoeffizi-

enten führt. Diese zeichnen sich durch eine deutliche Abhängigkeit von der Diffusionszeit ab. Die Übereinstimmung mit den Experimenten an unbehandeltem Alginat, welches ebenfalls Protein/Alginat-Aggregate enthält, ist ausgesprochen gut. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass der Anteil des langsamen Wassers in unbehandelter Alginatlösung deutlich höher liegt, als in Alginat/ConA-Lösung. Die Vergleichskurven wurden daher vertikal verschoben, um die Deckungsgleichheit zu zeigen. Abgesehen von der Quantität des eingeschlossenen Wassers lässt das ansonsten identische Diffusionsverhalten in den Alginat/ConA-Lösungen darauf schließen, dass es sich bei den hier vorliegenden Aggregaten um ähnlich dimensionierte Cluster wie beim unbehandelten Alginat handelt. Es ist anzunehmen, dass diese ebenfalls im Maßstab von einigen Mikrometern und die Verweilzeiten des Wassers in den Clustern im Bereich weniger Millisekunden anzusiedeln sind (vgl. **Abschnitt 4.5.1**).

Konzentrationsreihe ConA/Alginat

Es wurde bereits vermutet, dass lediglich ein sehr geringer Teil des Alginats für die Komplexierung des Lektins verantwortlich ist. Um Erkenntnisse über die stöchiometrischen Verhältnisse zwischen ConA und Alginat zu erlangen, wurde eine Konzentrationsreihe des Systems ConA/Alginat NMR-spektroskopisch untersucht, wobei bei vorgegebener ConA-Konzentration (0,5 Gewichts-%) die Alginatkonzentration variiert wurde. Zunächst wurde festgestellt, dass mit steigender Alginatkonzentration eine zunehmende Trübung der Lösung einsetzt. Diese erreicht bei 0,025% Alginatgehalt ihr Maximum. Es wird daher angenommen, dass bei dieser Zusammensetzung der höchste Grad der Aggregierung erreicht wird. Wird die Alginatkonzentration weiter erhöht, nimmt die Trübung wieder ab, bis bei 0,5% Alginatgehalt wieder eine klare Lösung vorliegt. Die Proben wurden dann der Protonen-NMR-Messung mit Wasserfilter unterzogen (**Abbildung 8.6**). Der Spektrensatz zeigt eine kontinuierliche Abnahme der ConA-Resonanzlinien mit steigender Alginatkonzentration. Bei 0,025% Alginatgehalt (maximale Trübung) ist das Lektinspektrum völlig ausgelöscht, während das Polysaccharid ebenfalls kein Signal aufweist. Das einzige Protonensignal, das bei dieser Zusammensetzung auftritt, liegt bei 4,8 ppm und ist

wiederum dem eingekapselten Wasser zuzuschreiben.

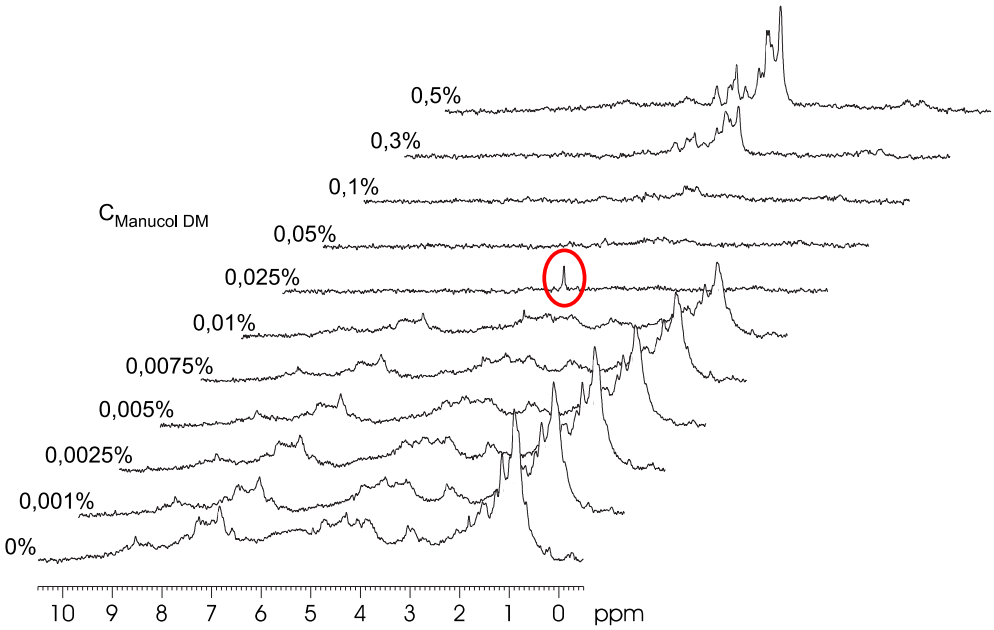


Abbildung 8.6: Wassergefilterte ^{1}H-NMR-Messung an wässriger ConA-Lösung (0,5 Gewichts-%) mit steigender Konzentration an Manucol DM. Die Alginatzugabe bewirkt eine Abnahme des Proteinsignals bis zur völligen Auslöschung bei 0,025%. Bei dieser Konzentration wird auch das Maximum an langsamem Wasser detektiert.

Mit weiter zunehmender Alginatkonzentration ist aufgrund der Abnahme der Trübung zu erwarten, dass die Aggregierung z.T. wieder aufgehoben wird. Dies kann durch die Abnahme der Wasserintensität im Spektrum bestätigt werden. Mit weiter steigender Polysaccharidkonzentration ist nur noch das Alginatspektrum, sowie ein sehr geringer Anteil verlangsamten Wassers vertreten. Das identische Verhalten zeigt die Konzentrationsreihe von ConA mit dem kürzerkettigen Manucol LB (**Abbildung 8.7**).

Die Signalintensität des ConA kann nun als Maß für die Aggregierung des Lektins mit dem Alginat angenommen werden. Dazu wird der Resonanzbereich von 6,2-9,9 ppm integriert, da in diesem Bereich keinerlei Polysaccharidlinien das Proteinspektrum überlagen können. Ob die Protonen in diesem Bereich an der Wechselwirkung mit dem Alginat selbst beteiligt sind, ist unerheblich, da die Abnahme der Signalintensität lediglich die eingeschränkte Beweglichkeit des Proteins anzeigt.

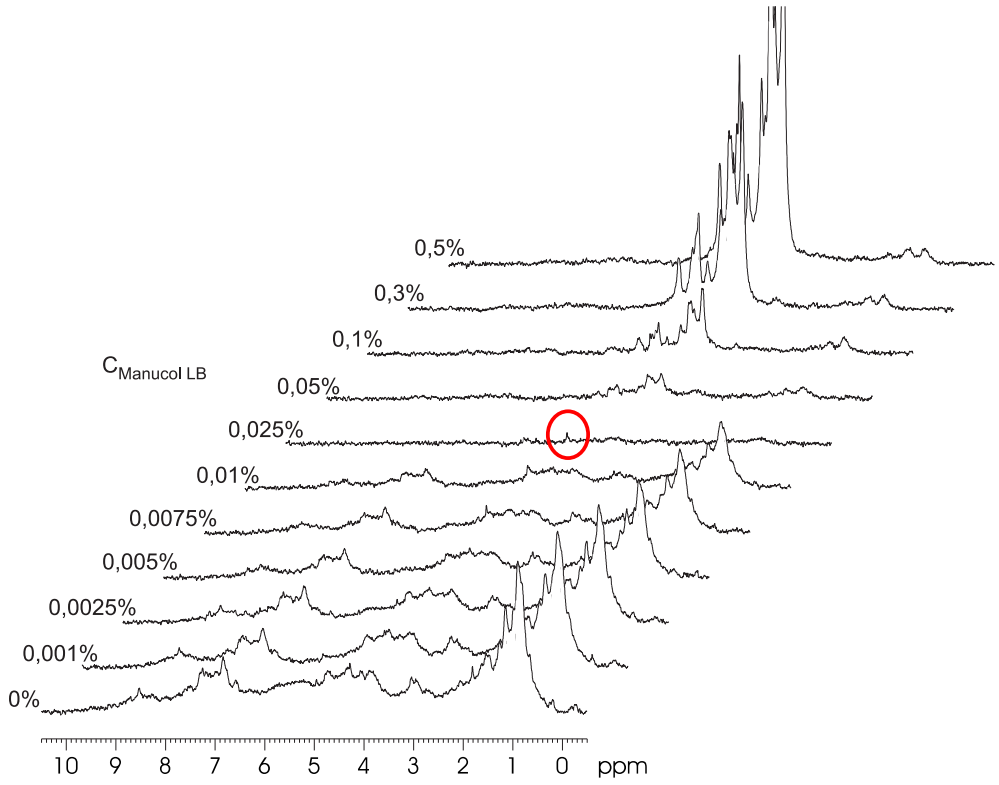


Abbildung 8.7: Wassergefilterte ^{1}H-NMR-Messung an wässriger ConA-Lösung (0,5 Gewichts-%) mit steigender Konzentration an Manucol LB. Das kürzerkettige Manucol LB zeigt einen identischen Einfluss auf das Proteinspektrum.

Der Vergleich des Einflusses der beiden Alginate bezogen auf die Polysaccharidstoffmenge (**Abbildung 8.8**) zeigt, dass bei gleicher Stoffmenge eine unterschiedliche Abschwächung des Proteinsignals auftritt. Bezogen auf die Monomerkonzentration (**Abbildung 8.9**) ist der Einfluss der beiden identisch aufgebauten, jedoch unterschiedlich langen Polysaccharide auf die ConA-Intensität identisch. Der Effekt der Aggregierung ist somit ausschließlich auf die Monomerkonzentration des Alginats zurückzuführen. Aus **Abbildung 8.8** lässt sich zudem ablesen, dass die Intensität der ConA-Linien, von der maximalen Trübung ausgehend, mit steigender Alginatkonzentration wieder leicht ansteigt. Daraus lässt sich folgern, dass sich, aufgrund der partiellen Auflösung der Aggregate, die Mobilität des Proteins erhöht, so dass es im Spektrum wieder sichtbar wird.

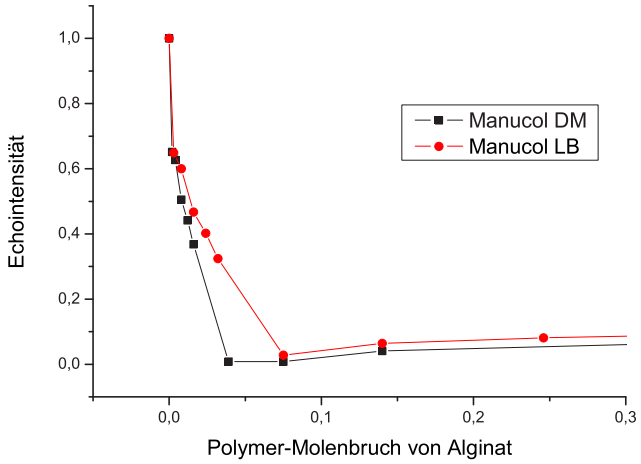


Abbildung 8.8: Signalintensität (6,2-9,9ppm) von ConA in Abhängigkeit der Alginatkonzentration. Gleiche Stoffmengen der beiden Alginate mit unterschiedlicher Molmasse haben einen unterschiedlichen Einfluss auf das Proteinspektrum.

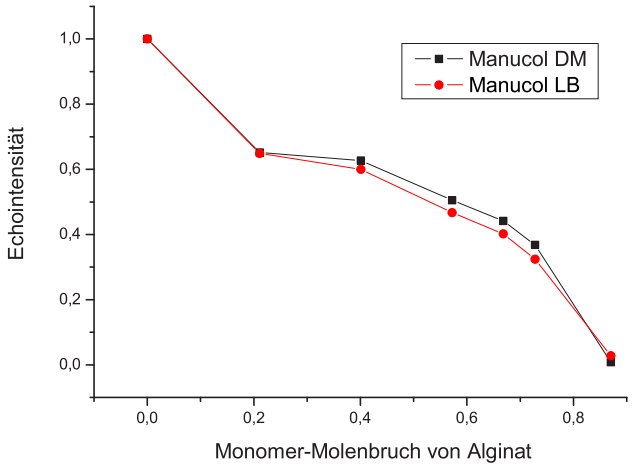


Abbildung 8.9: Signalintensität (6,2-9,9ppm) von ConA in Abhängigkeit der Monomerkonzentration des Alginats. Der Einfluss der beiden Alginate mit unterschiedlicher Molmasse auf das Proteinspektrum ist identisch.

Aus der Zusammensetzung der Probe, die die maximale Trübung, den höchsten Anteil eingekapselten Wassers und die vollständige Auslöschung des Proteinspektrums aufweist,

lässt sich nun die Stöchiometrie zwischen ConA und Alginat ermitteln, die für eine vollständige Aggregierung des Lektins notwendig ist. Aus den molaren Massen der Monomere von 26.500 g/mol (ConA) und 198 g/mol (Alginat als Natriumsalz), sowie den Massenkonzentrationen von 0,5 bzw. 0,025 %, ergibt sich ein Verhältnis von 6-7 Monomeren Alginat pro einem Monomer ConA.

PFG-Diffusionsmessung

Das ConA/Alginat-System, das den höchsten Anteil verlangsamten Wassers zeigte, wurde ebenfalls einer PFG-Diffusionsmessung unterzogen (**Abbildung 8.10**).

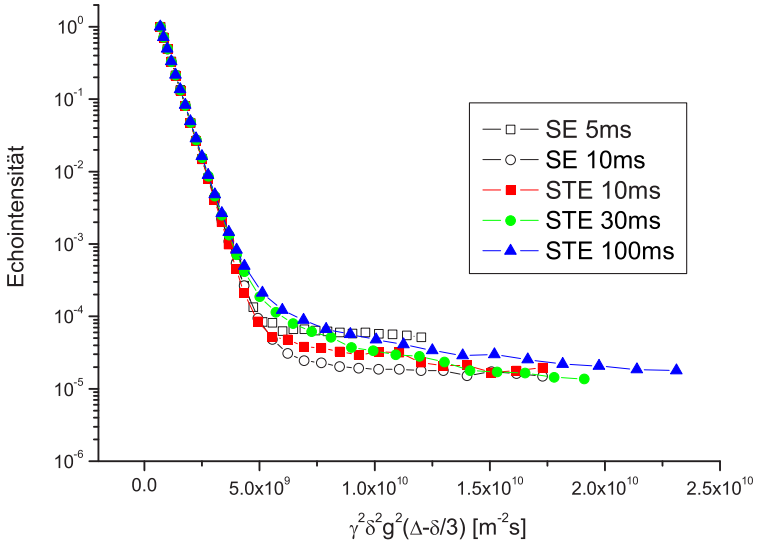


Abbildung 8.10: Manucol DM/ConA-Lösung im Verhältnis 0,025% / 0,5% : Echozerfallskurven des Wassersignals aus Hahn- und Stimulated-Echo Experimenten

Die Aggregate, welche sich als deutliche Trübung äußerten, sedimentierten dabei während der Messung im unteren Bereich des Probenröhrchens, so dass ein schwindender Anteil verlangsamten Wassers im Verlauf der Messreihe detektiert wurde. Sowohl im Hahn- wie auch im Stimulated-Echo Experiment ist jedoch ein deutliches Abweichen vom monoexponentiellen Abfall des Wassersignals zu erkennen, so dass eine ähnliche Dimension der Aggregate, wie oben angegeben, angenommen werden kann.

8.1.2 Deutung der Ergebnisse

Anhand von Docking Simulationen mittels Kraftfeldrechnungen untersuchte Kuhn [140] die Bindungsverhältnisse zwischen Alginatfragmenten in Form von M-G-Disacchariden und ConA. Dabei ermittelte er Bindungen zwischen den Sacchariden und den positiv geladenen Aminosäuren Lysin ($R\text{-}NH_3^+$) und Arginin ($R{=}NH_2^+$) auf der Oberfläche der ConA-Moleküle. Die vorherrschende Wechselwirkung besteht dabei in der ionischen Bindung zwischen der Carboxylatgruppe des Zuckers und den NH_2^+- bzw. NH_3^+-Gruppen des Proteins. Vorausgehende Simulationen zwischen Lipase, welche ebenfalls zahlreiche Lysin- und Arginin-Gruppen auf der Oberfläche besitzt, und längeren Alginatketten zeigten die gleichen Wechselwirkungen [141]. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Alginatketten an die Oberfläche des Proteins „anschmiegen“ und dabei mehrere Zuckermonomere Bindungen zu verschiedenen Lysin- und Arginin-Gruppen ausbilden können. Übertragen auf die Bindungsverhältnisse zwischen längerkettigen Alginaten und ConA lässt sich daraus die in **Abbildung 8.11** dargestellte Struktur ableiten.

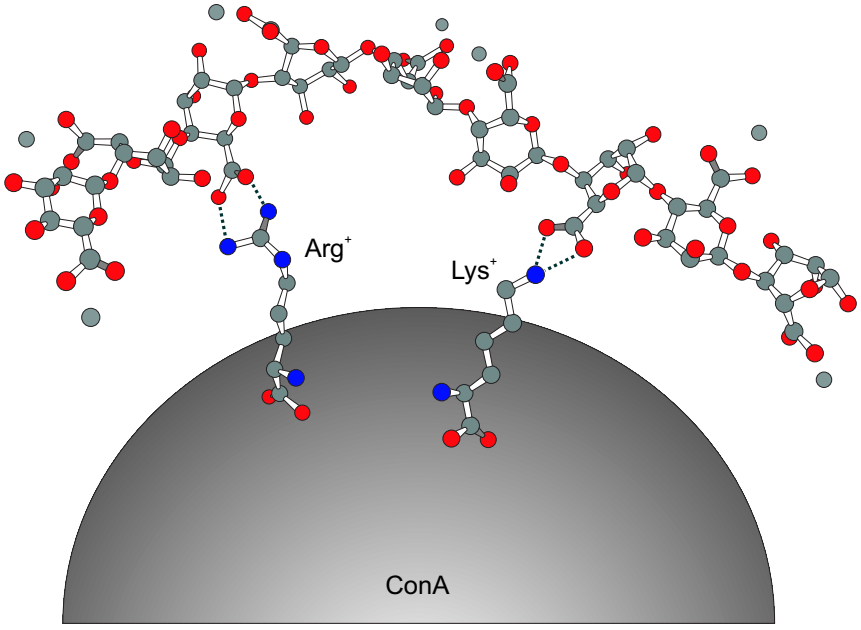


Abbildung 8.11: Bindung von Alginat an ConA: Die Carboxylatgruppen des Alginats wechselwirken mit den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin auf der ConA Oberfläche [140].

Die Alginatketten richten sich dabei entlang der ConA-Oberfläche aus, wobei sie an mehrere Bindungsstellen binden können. Durch die symmetrische Struktur der ConA-Tetramere ist das Alginat in der Lage, über die gesamte Oberfläche des Lektins Bindungen einzugehen. Die beobachtete Aggregierung des ConA bei niedrigen Alginatkonzentrationen resultiert aus einer unvollständigen Besetzung der Proteinoberflächen. Die Alginatketten sind dadurch in der Lage, an mehrere Lektinmoleküle zu binden und dadurch eine Verbrückung zwischen diesen herzustellen. Das Ergebnis ist die Entstehung von großen Clustern im Mikrometermaßstab, die Wasser einschließen, welches z.T. gehinderte Diffusion erfährt und die Möglichkeit des Austausches mit dem Bulk-Wasser besitzt (**Abbildung 8.12**, links).

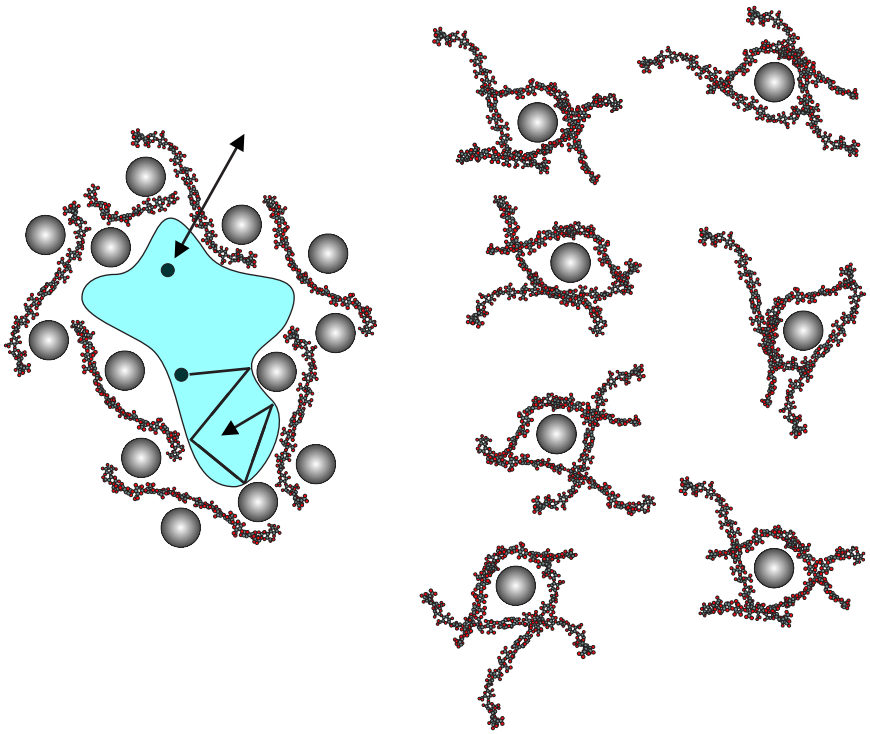


Abbildung 8.12: Aggregierung und Wassereinschluss von ConA mit Alginat: bei geringen Alginatkonzentrationen sind die Alginatketten in der Lage, an mehrere ConA Moleküle zu binden und dadurch wassereinschließende Cluster zu bilden. Bei steigender Alginatkonzentration sind die ConA Moleküle komplett von Alginat umgeben, was zur Auflösung der Cluster führt.

Wird nun die Konzentration des Alginats erhöht (**Abbildung 8.12**, rechts), konkurriert ein Alginatüberschuss um die Bindungsstellen des Alginats. Die Wahrscheinlichkeit der

Verknüpfung mehrerer ConA-Moleküle durch eine Alginatkette wird dadurch immer geringer was zum Abbau der Aggregate führt. Dies wird durch das Verschwinden der Trübung und der Abnahme der Intensität des verlangsamten Wassers beobachtet. Ein ähnliches konzentrationsabhängiges Verhalten von ConA/Saccharid-Wechselwirkungen wurde von Chern et al. [142] beobachtet. Die Auflösung der Aggregate mit steigender Polysaccharidkonzentration erklärt ebenso den leichten Anstieg der Signalintensität des Proteins. Durch den Abbau der Cluster erlangen die ConA-Tetramere eine höhere Mobilität, die jedoch durch die Bedeckung der kompletten Oberfläche durch Alginat immer noch sehr stark eingeschränkt ist.

8.1.3 Stabilität der Aggregate

Es wurde bereits festgestellt, dass die Aggregierung von ConA mit Alginat ein reversibler Vorgang ist, der durch weitere Zugabe von Alginat leicht rückgängig gemacht werden kann. Durch die Alginatzugabe entstehen allerdings kleinere Komplexe, die wahrscheinlich nur einzelne ConA-Tetramere enthalten, welche an Alginatketten assoziiert sind. Diese sind, wie eingangs gezeigt, immer noch in der Lage, geringe Mengen Wasser einzuschließen, was auf die Gültigkeit der oben erwähnten *„water-layer hypothesis“* für dieses System schließen lässt. Da die Wechselwirkungen zwischen Lektin und Polysaccharid auf ionischen Bindungen beruhen, ist es wahrscheinlich, dass die Bindungen durch Fremdionen beeinflusst werden können. **Abbildung 8.13** zeigt den Einfluss von Salzen auf die Komplexierung von ConA und Alginat. Dazu wurden zu der trüben Lösung, die eine vollständige Aggregation aufweist, NaCl- und $CaCl_2$-Lösungen gegeben. Die Salzzugabe führte zu einer sofortigen Auflösung der Trübung. Die Spektren zeigen, dass die Zugabe von Ionen eine nahezu vollständige Wiederherstellung des Proteinspektrums bewirkt. Die daraus zu folgernde Remobilisierung des Lektins bedeutet, dass nahezu alle Bindungen zwischen Alginat und ConA aufgelöst wurden, da der Überschuss an Kationen die Carboxylatgruppen des Alginats abschirmt. Das gleiche Verhalten in Gegenwart von Ionen zeigen die eingangs beschriebenen Lösungen aus getrocknetem Lektin/Alginat. Die vermeintlich stabilisierten Aggregate lösten sich durch Salzzugabe ebenfalls wieder auf.

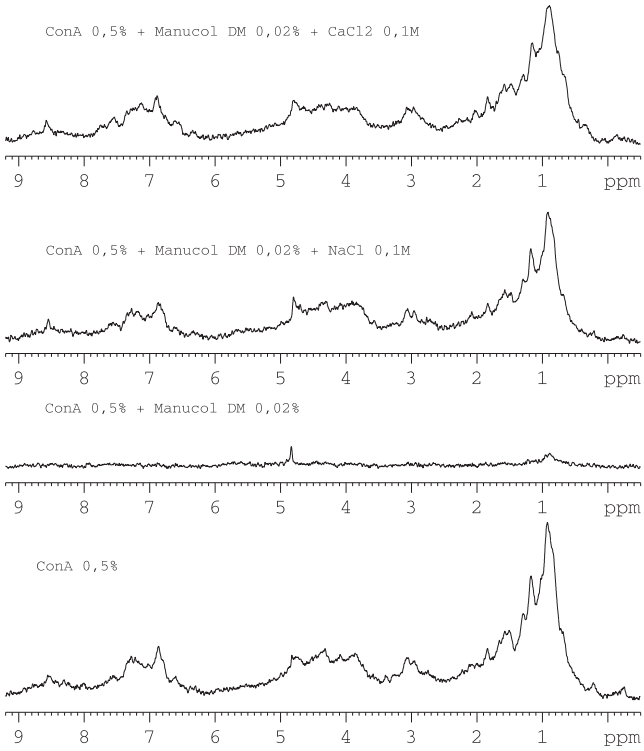


Abbildung 8.13: Einfluss von Ionen auf die Aggregierung von ConA mit Alginat: durch Salzzugabe werden die Alginatbindungen zum ConA gelöst, wodurch das ConA wieder eine höhere Mobilität zeigt.

In der Stabilität liegt der entscheidende Unterschied zwischen den ConA/Alginat-Clustern zu den Protein/Alginat-Aggregaten, die im Algenalginat auftreten. Letztere sind gegenüber Salz- und weiterer Alginatzugabe resistent, was sich in der konstant bleibenden Menge eingekapselten Wassers ablesen lässt. Die Komplexe sind derart stabil, dass selbst mehrstündiges Sieden einer unbehandelten Algenalginatlösung keinerlei Verringerung der Signalintensität des verlangsamten Wassers bewirkt. Eine Erklärung der hohen Stabilität der Aggregate kann im Rahmen dieser Arbeit nicht angeführt werden.

8.2 Wechselwirkungen zwischen ConA und Dextran

Zum Vergleich mit den Auswirkungen der unspezifischen, ionischen Bindungen zwischen ConA und Alginat wurde das System ConA/Dextran gewählt. Dextran ist ein verzweigtes Glucosepolymer, das ebenfalls bakteriellen Ursprungs sein kann. Es stellt einen Zielzucker

für die spezifische Bindung an die Bindungstasche des ConA dar [143]. Die molare Masse des eingesetzten Dextrans wird mit etwa 10^6 g/mol angegeben. **Abbildung 8.14** zeigt die wassergefilterten Protonenspektren von Dextran- und ConA-Lösung, sowie deren Mischungen.

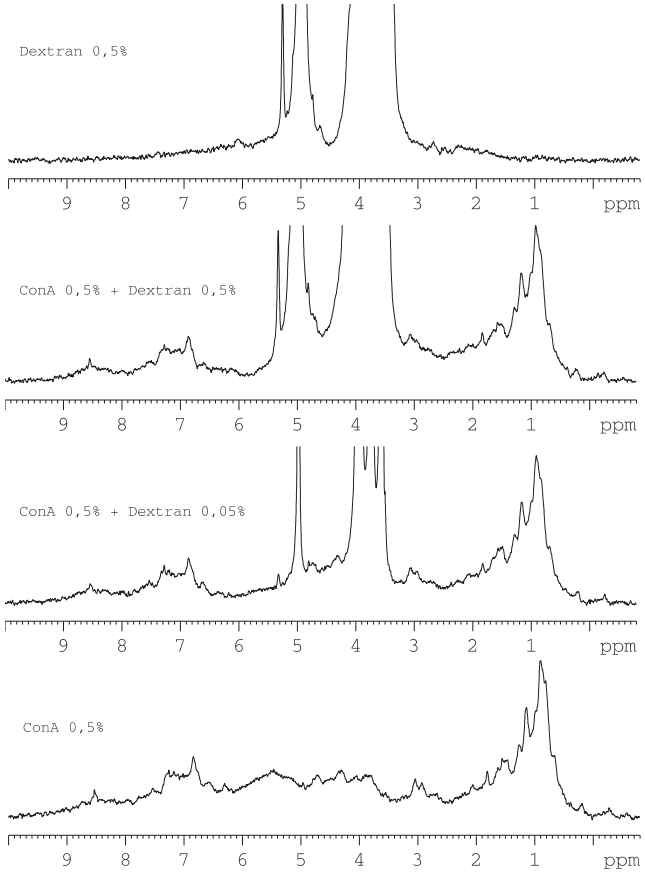


Abbildung 8.14: Wassergefilterte ^{1}H-NMR-Messung an wässriger ConA/Dextran-Lösung.

Das Spektrum der Lösung, die Protein und Dextran enthält, weist beide Substanzen in unveränderter Intensität aus und entspricht damit der Summe der Einzelspektren. Anhand der NMR-Messungen kann keine Aussage über die Bindung zwischen Lektin und Zucker getroffen werden. Die ConA-Resonanzen sind unabhängig von der Dextrankonzentration in vollem Umfang sichtbar. Eine Aggregierung zu größeren Clustern kann damit ausgeschlossen werden. Aufgrund der Neutralität des Polysaccharids ist ein Bindungsverhalten analog zum Alginat auch nicht zu erwarten. Aussagen über das Auftreten von langsamem

Wasser können nicht getroffen, da der Bereich um 4,8 ppm von einer intensiven Dextranbande überlagert wird. Das Fehlen von Clustern ist aber ein Indiz dafür, dass kein Wasser eingeschlossen werden kann. Unter der Voraussetzung einer Bindung zwischen Protein und Zucker, die als gesichert gilt [100], kann zur Deutung der NMR-Spektren das folgende Modell herangezogen werden, das ebenfalls auf Docking Simulationen von Kuhn [144] beruht (**Abbildung 8.15**).

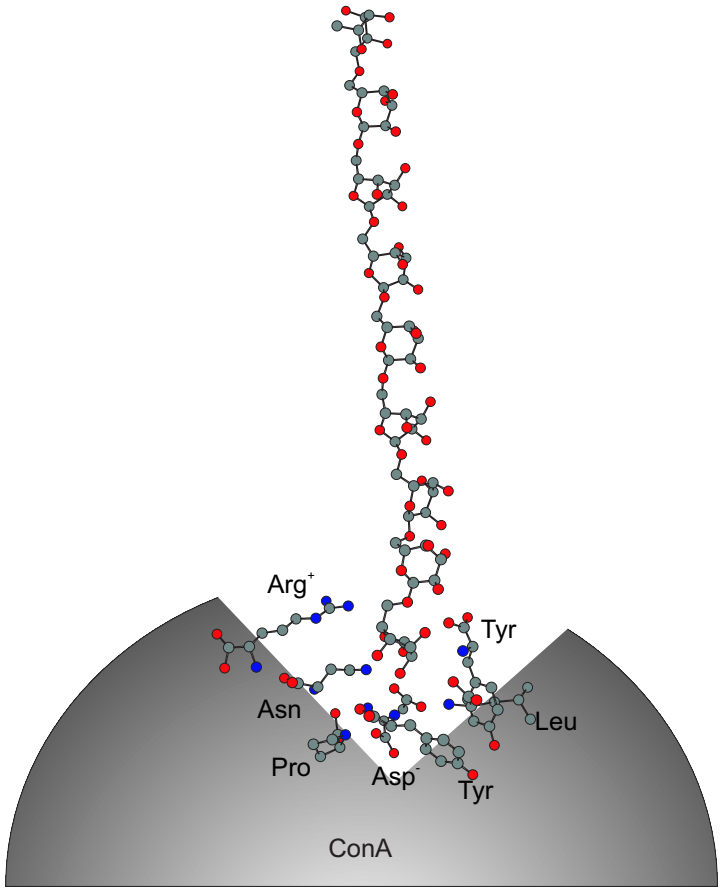


Abbildung 8.15: Dextran bindet an die Bindungstasche von ConA [138, 144].

Die Bindung zwischen Dextran und der Bindungstasche des ConA beruht hauptsächlich auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken zwischen dem Glucosering und den dargestellten Aminosäureresten. Durch diese Bindung wird offensichtlich weder die Beweglichkeit des Zuckers noch die des Proteins entscheidend eingeschränkt, da beide Substanzen keinen nennenswerten Signalverlust im NMR-Spektrum zeigen. Die Bildung

wassereinschließender Aggregate mit ConA lässt sich somit ausschließlich polyanionischen Sacchariden zuschreiben.

8.3 Wechselwirkungen zwischen LecB und Alginat

LecB ist neben LecA eines der beiden Lektine, das von Pseudomonas aeruginosa gebildet wird. Seine Hauptaufgabe besteht in der Adhäsion von Bakterienzellen an Wirtszellen. Der Zielzucker, an den LecB selektiv bindet, ist Fucose. LecB wurde, analog dem ConA, auf eine Aggregierung mit Alginat untersucht (**Abbildung 8.16**).

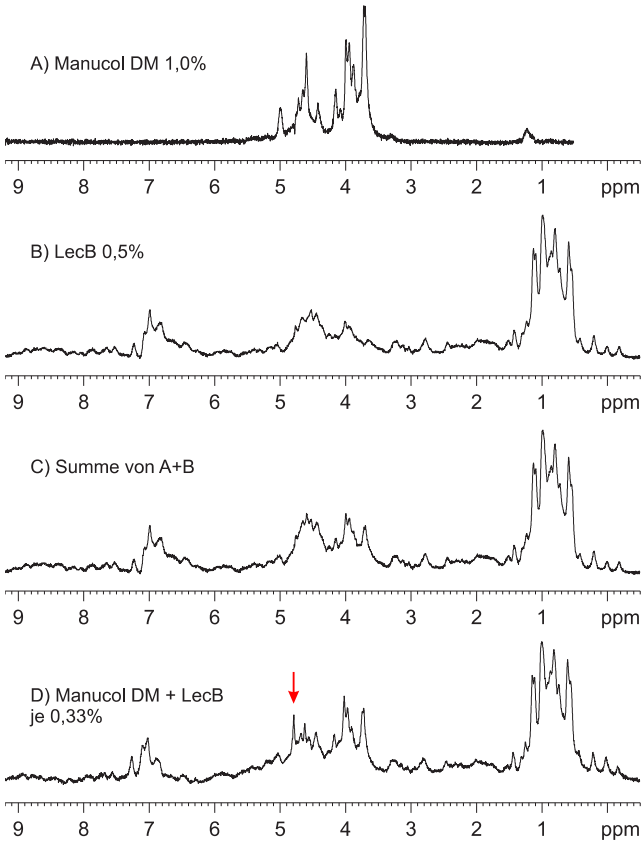


Abbildung 8.16: ^{1}H-Spektren von LecB- und Manucol DM-Lösung. Das Spektrum der Mischung der beiden Lösungen zeigt wie beim System ConA/Alginat langsames Wasser, jedoch ohne die Auslöschung des Proteinspektrums.

Der Vergleich der Spektrensumme der Einzelkomponenten mit dem Spektrum der Mischung liefert ein bemerkenswertes Resultat. Obwohl praktisch keine Abschwächung des

Proteinsignals zu verzeichnen ist, tritt dennoch ein deutliches Signal verlangsamten Wassers auf. Es wird scheinbar eine Bindung zwischen Protein und Polysaccharid eingegangen, die einen Einschluss von Wasser ermöglicht, wobei die Mobilität der ungebundenen Spezies weitestgehend erhalten bleibt. Mangels Verfügbarkeit größerer Mengen LecB konnten keine weiterführenden Untersuchungen, wie z.B. die Variation der Konzentrationen, an diesem System durchgeführt werden, daher können keine weiteren Aussagen über die Natur der Bindung getroffen werden. Es ist lediglich festzustellen, dass in Biofilmen von P. aeruginosa, die sowohl Alginat als auch LecB enthalten, zumindest die Möglichkeit besteht, dass diese beiden Komponenten in Wechselwirkung treten und dabei Wasser einkapseln.

8.4 Funktion der Bindung zwischen Proteinen und Sacchariden

Es konnte gezeigt werden, dass Lektine unter bestimmten Bedingungen mit Alginat Aggregate bilden, die einen Einschluss von Wasser ermöglichen. Mit anderen Proteinen (Gelatine, Albumin) konnte eine derartige Komplexierung des Alginats nicht beobachtet werden. Die Aggregierung beruht im Falle des ConA auf ionischen Bindungen zwischen den Carboxylat-Gruppen des Zuckers und den positiven Aminosäureresten auf der Proteinoberfläche. Die Aggregate lassen sich durch Erhöhung der Polysaccharidkonzentration in kleinere ConA/Alginat-Komplexe zerlegen, wobei der eingeschlossene Wasseranteil verkleinert wird. Ionenüberschuss erwirkt eine vollständige Aufhebung der Bindungen zwischen Protein und Polysaccharid, wodurch die Fähigkeit, Wasser einzuschließen völlig verlorengeht.

Die Funktion von Sacchariden als Schutzgruppen von Proteinen und anderen Biostrukturen vor Austrocknung und extremen Temperaturen ist unumstritten. Ob die beobachtete Art der Wassereinlagerung allerdings eine entscheidende Rolle beim Schutz von Biostrukturen vor Austrocknung spielt wird kontrovers diskutiert. Allison et al. [130] stellten fest,

dass die Gegenwart von Zuckern einen Verlust der räumlichen Struktur von Proteinen im Trocknungsprozess verhindern kann. Dieser Effekt wurde jedoch nicht der Rückhaltung von Wasser zugeschrieben, sondern der Substitution von Wasserstoffbrücken zwischen Protein und Wasser durch Saccharid-Protein-Wasserstoffbrücken (*„water-replacement hypothesis“*). Belton und Gil [135] dagegen erklären den schützenden Einfluss von Zucker auf die Struktur von Proteinen durch den Einschluss einer Wasserschicht an der Proteinoberfläche (*„water-layer hypothesis“*). Lins et al. [132] beschreiben, analog zu der in dieser Arbeit beschriebenen unspezifischen Bindung zwischen Alginat und ConA, Trehalose als ein multifunktionelles Schutzsaccharid, dass in der Lage ist, zahlreiche Biostrukturen (Proteine, lebende Zellen) im dehydratisierten Zustand zu konservieren. Diese Fähigkeit wird ebenfalls dem Einschluss von Wasser an der Proteinoberfläche zugeschrieben.

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen an Alginat/Lektin-Systemen zeigen, dass die Bildung wassereinschließender Polysaccharid/Protein-Cluster auch für bakterielle Biofilme eine mögliche Methode darstellt, Wassermangelbedingungen zu überstehen, da die dafür notwendigen Substanzen in bakterieller EPS nachgewiesen werden konnten [46, 45]. Im Falle von Braunalgen wird diese Strategie offensichtlich erfolgreich praktiziert, da das Algenalginat bereits sehr beständige Alginat/Protein-Aggregate enthält, deren ausgesprochen gute Eigenschaften zur Wasserrückhaltung gezeigt werden konnten (**Kapitel 7**).

Kapitel 9

Zusammenfassung

Der Einfluss von Alginat und Alginat/Protein in wässrigen Systemen auf die Mobilität von Wasser wurde mit verschiedenen NMR-Methoden untersucht. Dabei wurden folgende Ergebnisse erlangt:

PFG-NMR-Messungen zeigten, dass Lösungen von Algenalginat eine Wasserfraktion enthalten, die einen signifikant niedrigeren Diffusionskoeffizienten im Vergleich zum Bulk-Wasser aufweist. Dieses Verhalten konnte der gehinderten Diffusion von Wasser, das in Alginat/Protein-Aggregaten eingekapselt ist, zugeschrieben werden. Mit Hilfe eines mathematischen Modells konnte die mittlere Partikelgröße der Aggregate aus den PFG-Daten ermittelt werden (etwa 3 μm). Diese steht in guter Übereinstimmung mit der Partikelgrößenbestimmung durch Laserdiffraktion. Die Aggregate weisen eine hohe Stabilität auf und besitzen einen großen Einfluss auf das Schmelzverhalten von Wasser, was durch DSC-Experimente festgestellt wurde.

Bakterienalginat von Pseudomonas aeruginosa zeigte in Stimulated-Echo- und 2D-NOESY-Experimenten ausgeprägte Kreuzrelaxationseffekte zwischen seinen Acetylprotonen und Wasser. Daraus konnte gefolgert werden, dass ein Pool von Hydratationswasser an den Acetylgruppen existiert, der durch kurzzeitige Assoziation durch Wasserstoffbrückenbin-

dungen eine Erhöhung der Verweilzeiten des Wassers am Polymer ermöglicht, so dass die Wahrscheinlichkeit für Magnetisierungsaustausch steigt.

Das Phasendiagramm von Wasser/Alginat konnte durch Messungen der Linienbreiten von Protonenspektren verifiziert werden. Die von Borchard [2] beschriebene Mischungslücke des Systems muss allerdings auf die Protein/Alginat-Cluster zurückgeführt werden.

Diffusionsmessungen an getrockneten Algenalginatproben zeigten einen großen Einfluss der Alginat/Protein-Aggregate auf die Wasserbeweglichkeit. In Anwesenheit der Cluster konnte in festem Alginat mit einem Wassergehalt von unter 50% eine Wasserfraktion mit hoher Mobilität detektiert werden, die auf den Einschluss in Poren zurückzuführen ist. Bei identischem Wassergehalt und Abwesenheit der Aggregate wurde eine drastisch eingeschränkte Wassermobilität festgestellt, was auf der Assoziation des Wassers an die Polymermatrix beruht.

Die Aggregierung von Alginat mit Lektinen konnte nachgewiesen werden. Die Aggregate sind in der Lage, Wasser einzuschließen, wobei das eingekapselte Wasser ein nahezu identisches Diffusionsverhalten zeigt, wie in den o.g. Alginat/Protein-Clustern. Im Falle des Systems ConA/Alginat beruht die Aggregierung auf ionischen Wechselwirkungen zwischen Carboxylatgruppen des Polysaccharids und positiven Aminosäureresten des Lektins. Die Stabilität der Cluster ist als gering zu bezeichnen, da die Bildung von der Alginatkonzentration abhängig ist, und die Aggregate durch Kationenüberschuss aufgelöst werden können.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse führen zu der Schlussfolgerung, dass die Bindung von Sacchariden an Proteine einen entscheidenden Einfluss auf das Wasserrückhaltevermögen von biologischen Systemen ausüben kann. Im Falle der Braunalgen, die der Ursprung des untersuchten Algenalginats sind, wird dies besonders deutlich. Ein Teil des von den Algen produzierten extrazellulären Alginats wird durch ein Protein, das

wahrscheinlich ebenfalls ein extrazelluläres Produkt ist, welches nicht näher charakterisiert werden kann, aggregiert, wodurch Cluster entstehen, die unter Wassermangelbedingungen, bis zu einem gewissen Grad, die Wasserversorgung der Organismen aufrechterhalten können. Die beobachtete Aggregierung von Alginat mit Lektinen lässt vermuten, dass diese Strategie auch für Bakterien, wie z.B. Pseudomonas aeruginosa, möglich ist, da in der EPS dieser Mikroorganismen sowohl Alginat als auch Lektine zu finden sind.

Anhang A

Puls Programme

A.1 gs-NOESY mit Hahn-Echo Wasserfilter

```
;noesygpph_se_cg
;avance-version (00/02/07)
;2D homonuclear correlation via dipolar coupling
;dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange.
;phase sensitive
;with gradient pulses in mixing time
;J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann & R.R. Ernst, J. Chem. Phys. 71,
;   4546-4553 (1979)
;R. Wagner & S. Berger, J. Magn. Reson. 123 A, 119-121 (1996)
;with Hahn Echo water supression
;modified by Christian Galle (2003)

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
```

```
"d0=3u"


"d20=d8*0.5-p16-d16"


1 ze
2 d1
3 p1 ph1
  d0
  p1 ph2
  d20 UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16
  3u
  (p2 ph4):f1
  3u
  p16:gp2
  d16
  d20
  p1 ph3
  p17:gp5*diff_ramp
  p18:gp6*diff_ramp
  p17:gp7*diff_ramp
  d2
  d9 BLKGRAD
  d11 UNBLKGRAD
  p2 ph5
```

```
  p17:gp5*diff_ramp
  p18:gp6*diff_ramp
  p17:gp7*diff_ramp
  d2
  d10 BLKGRAD
  go=2 ph31
  d1 mc #0 to 2 F1PH(ip1, id0)
exit


ph1=0 2
ph2=0 0
ph3=0 0
ph4=0
ph5=0 2
ph31=2 0


;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel -  90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse                      [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D)                        [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d8 : mixing time
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: d8*0.5 - p16 - d16
;in0: 1/(1 * SW) = 2 * DW
;nd0: 1
```

```
;NS: 2 * n
;DS: 16
;td1: number of experiments
;FnMODE: States-TPPI, TPPI, States or QSEC



;use gradient ratio:    gp 1 : gp 2
;                         40 :  -40

;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: -40%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100




;$Id: noesygpph,v 1.3 2000/05/08 11:40:49 eng Exp $
```

A.2 Stimulated-Echo mit Gradienten Pulsen

```
;diff_ste.gp
;2D stimulated echo sequence
;new version using gp syntax 14.12.99 KLZ
;now standard include files and lock commands only on l12 03.08.00 KLZ
;dummy gradient pulses included l13 05.10.00 KLZ
;timing for rf commend changed 25.02.02 KLZ
```

```
#include <Grad.incl>
#include <Avance.incl>
ze
10u
5m pl1:f1       ;set rf power level

if (l12) {
    start,  d1 LOCKH_OFF
            d11 UNBLKGRAMP LOCKH_ON ;unblank gradient amplifier
} else {
    start,  d1
            d11 UNBLKGRAMP
}
if (l3) {
            dummy,  p17:gp1*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
                p18:gp2*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
                p17:gp3*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
                d2              ;gradient stabilisation time
                d9 BLKGRAMP         ;tau
    if (l11) {  d11 UNBLKGRAMP              ;unblank gradient amplifier
                p17:gp4             ;trapezoidal gradient pulse
                p19:gp5             ;trapezoidal gradient pulse
                p17:gp6             ;trapezoidal gradient pulse
                d2
    }
    if (l12) {
                d5 BLKGRAMP LOCKH_OFF       ;long tau
                d11 UNBLKGRAMP LOCKH_ON     ;unblank gradient amplifier
```

```
    } else {
                d5 BLKGRAMP         ;long tau
                d11 UNBLKGRAMP          ;unblank gradient amplifier
    }
            lo to dummy times l13
}
            p1:f1 ph1           ;90 degree pulse
            p17:gp1*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
            p18:gp2*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
            p17:gp3*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
            d2              ;gradient stabilisation time
            d9 BLKGRAMP         ;tau
            p1:f1 ph2           ;90 degree pulse
if (l11) {  d11 UNBLKGRAMP              ;unblank gradient amplifier
            p17:gp4             ;trapezoidal gradient pulse
            p19:gp5             ;trapezoidal gradient pulse
            p17:gp6             ;trapezoidal gradient pulse
            d2
}
if (l12) {
            d5 BLKGRAMP LOCKH_OFF       ;long tau
            d11 UNBLKGRAMP LOCKH_ON     ;unblank gradient amplifier
} else {
            d5 BLKGRAMP         ;long tau
            d11 UNBLKGRAMP          ;unblank gradient amplifier
}
            p1:f1 ph3           ;90 degree pulse
            p17:gp1*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
            p18:gp2*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
```

```
            p17:gp3*diff_ramp       ;trapezoidal gradient pulse
            d2              ;gradient stabilisation time
            d10 ph0 BLKGRAMP        ;tau
        go=start ph31
        100u wr #0 if #0 zd igrad diff_ramp
        lo to start times td1           ;td1 = number of gradientsteps
        20m
if (l12) {
        20m rf #0 LOCKH_OFF             ;reset file pointer
} else {
        20m rf #0                       ;reset file pointer
}
    lo to start times l1                ;l1 = Number of repetitions
exit

ph0=0
ph1=0 0 2 2 1 1 3 3 2 2 0 0 3 3 1 1
ph2=0 2 0 2 1 3 1 3 2 0 2 0 3 1 3 1
ph3=0 0 0 0 1 1 1 1 2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1 2 0 0 2 3 1 1 3
```

Abbildungsverzeichnis

2.1 Biofilmstruktur 7
2.2 Ausschnitt eines Alginatmoleküls 11
2.3 Fick´sche Gesetze 17
2.4 Gauss´sches Diffusionsprofil 19
2.5 Zweidimensionaler Random Walk 21
2.6 Binomialverteilung des Random Walks 23
2.7 Zweidimensionaler Random Walk bei gehinderter Diffusion 24
2.8 Propagator 25
2.9 Propagator der gehinderten Diffusion 26
2.10 Zeeman-Aufspaltung 27
2.11 Fourier-Transformation 29
2.12 Pulssequenz eines PFG-Hahn-Echos 32
2.13 Pulssequenz eines PFG-Stimulated-Echos 33
2.14 Stimulated-Echo Teil 1 34
2.15 Stimulated-Echo Teil 2 36
2.16 Stimulated-Echo Teil 3 38
2.17 PFG-Experiment 39
2.18 Energieniveaudiagramm eines Zwei-Spinsystem 41
2.19 Besetzung der Energieniveaus 42
2.20 NOESY-Pulsprogramm 44
2.21 2D-NOESY-Experiment ohne NOE 45
2.22 2D-NOESY-Experiment mit NOE 45

2.23 Einfluss des NOE auf das PFG-Signal 47

4.1 PFG-STE-Diffusionsmessung an reinem Wasser 56
4.2 Gradientenspektren von Wasser und Alginatlösung 58
4.3 Pulssequenz eines PFG-Stimulated-Echos mit Bipolaren Gradienten 59
4.4 Vergleich von Bipolaren mit konventionellen Gradienten 60
4.5 Wasserdiffusion im Biofilm von P. aeruginosa 61
4.6 Signalabfall eines PFG-STE-Experiments 63
4.7 Echozerfallskurven aus STE-Experiment an Manugellösung 64
4.8 Apparenter Diffusionskoeffizient der „verlangsamten“ Wasserfraktion 65
4.9 Echozerfallskurven aus SE-Experiment an Manugellösung 66
4.10 Hahn-Echo Experiment an Manucol DM 68
4.11 Zeitabhängigkeit des Diffusionskoeffizienten 69
4.12 Wassergefiltertes Spektrum einer filtrierten Manucol DM Lösung 70
4.13 Langsames Wasser in Alginatlösungen 71
4.14 Vergleich von gereinigtem mit unbehandeltem Alginat 72
4.15 Festkörperspektren von Algenalginat 73
4.16 Festkörper-NMR: Vergleich Alginat/Protein 74
4.17 Partikelgrößenverteilung in Manucol DM-Lösung 76
4.18 Partikelgrößenverteilung in Manucol DM-Lösung II 77
4.19 Korrelation der Partikelgrößenverteilung mit PFG-Ergebnissen 78
4.20 DSC-Messungen an Alginatlösungen 80
4.21 Vergleich des verlangsamten Wassers in Alginatlösung und Partikeln 81
4.22 Diffusionsmessung an filtriertem Alginat 82
4.23 Hahn-Echo Experiment an SG81-Alginat 84
4.24 Stimulated-Echo Experiment an SG81-Alginat 84
4.25 NOE in Abhängigkeit von τ_c 86
4.26 Zerfallskurve des Acetylsignals 87
4.27 Gehinderte Diffusion bei kurzer Diffusionszeit 92
4.28 Gehinderte Diffusion bei mittlerer Diffusionszeit 93

4.29 Gehinderte Diffusion bei langer Diffusionszeit 93
4.30 Gehinderte Diffusion nach Balinov/Veeman 96
4.31 Kärger-Modell: Diffusion im Zweibereichsystem mit Austausch 97
4.32 Bestimmung der apparenten Diffusionskoeffizienten 99
4.33 Gehinderte Diffusion mit Austausch 101
4.34 Peschier Fit 106

5.1 gs-NOESY mit Wasserfilter 110
5.2 Stackplot eines 2D-NOESY-Spektrums von Manucol DM 110
5.3 2D-NOESY-GPPH-SE von unbehandeltem Alginat 111
5.4 2D-NOESY-GPPH-SE von sterilfiltriertem Alginat 112
5.5 2D-NOESY-GPPH-SE von Bakterienalginat 114

6.1 Phasendiagramm von Manucol DM/Wasser 116
6.2 Protonenspektren von Manucol DM/Wasser 117
6.3 Kombination des Phasendiagramms mit den NMR-Ergebnissen 118
6.4 Simuliertes und experimentelles Spektrum von Manucol DM 119

7.1 ^{1}H-Spektren von gequollenem Alginat 122
7.2 Wasserdiffusion in gequollenem Alginat 123
7.3 Vergleich der Quellung mit Trocknung 125
7.4 Wasserdiffusion in getrocknetem Alginat 126
7.5 Wasserdiffusionskoeffizienten in getrocknetem Alginat 128

8.1 Struktur von ConA 131
8.2 Spektren von ConA und Manucol DM 132
8.3 Spektren von ConA und Manucol DM nach Trocknung 134
8.4 Spektren von ConA und Manucol DM nach Trocknung II 134
8.5 Wasserdiffusion in ConA/Alginat-Lösung 135
8.6 Einfluss von Manucol DM auf das ConA-Spektrum 137
8.7 Einfluss von Manucol LB auf das ConA-Spektrum 138
8.8 Einfluss der Kettenlänge des Alginats 139

8.9 Einfluss der Monomerkonzentration des Alginats 139
8.10 Wasserdiffusion in ConA/Alginat 140
8.11 Bindung von Alginat an ConA 141
8.12 Agglomerate aus ConA und Alginat 142
8.13 Einfluss von Ionen 144
8.14 Spektren von ConA und Dextran 145
8.15 Bindungstasche von ConA 146
8.16 Spektren von LecB und Manucol DM 147

Tabellenverzeichnis

2.1 Funktionen der EPS 9
2.2 Wahrscheinlichkeitsverteilung beim 1-dimensionalen Random Walk 22
2.3 Besetzungsunterschiede 42

3.1 Parameter der PFG-Diffusionsmessungen 50
3.2 Parameter der 2D-NOESY-Experimente 51

4.1 Zusammensetzung der verwendeten Algenalginate 62
4.2 Ergebnisse der Proteinanalytik an Algenalginat 75
4.3 Apparente Diffusionskoeffizienten nach Balinov/Veeman 100
4.4 Parameter des Balinov/Kärger Fit 101
4.5 Parameter des Peschier Fit 106

Literaturverzeichnis

[1] **M. Vogt**, "Wasserdiffusion in Biofilmen von Pseudomonas aeruginosa und Polysaccharid/Wasser-Systemen: Eine PFG-NMR Untersuchung," Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg (2001).

[2] **W. Borchard**, **A. Kenning**, **A. Kapp**, **C. Mayer**, "Phase Diagram of the System Sodium Alginate/Water: A Model for Biofilms," *International Journal of Biological Macromolecules*, **35**, (2005), 247–256.

[3] **J. A. Shapiro**, **M. Dworkin**, *Bacteria as Multicellular Organisms* (Oxford University Press, New York, 1997).

[4] **S. S. Branda**, **R. Kolter**, "Multicellularity and Biofilms," in: "Microbial Biofilms," (**M. Ghannoum**, **G. A. O´Toole**, Herausgeber), Kapitel 2, Seiten 20–29 (ASM Press, Washington, DC, 2004).

[5] **J. W. Costerton**, **Z. Lewandowski**, **D. E. Caldwell**, **D. R. Korber**, **H. M. Lappin-Scott**, "Microbial Biofilms," *Annual Review of Microbiology*, **49**, (1995), 711–745.

[6] **J. W. Schopf**, **J. M. Hayes**, **M. R. Walter**, "Evolution on Earth´s Earliest Ecosystems: Recent Progress and Unsolved Problems," in: "Earth´s Earliest Biosphere," (**J. W. Schopf**, Herausgeber) (Princeton Univ. Press, New Jersey, 1983).

[7] **H. C. Flemming**, **J. Wingender**, "Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien," *Biologie in unserer Zeit*, **31**(3), (2001), 169–180.

[8] **J. W. Costerton**, "A Short History of the Development of the Biofilm Concept," in: "Microbial Biofilms," (**M. Ghannoum**, **G. A. O´Toole**, Herausgeber), Kapitel 1, Seiten 4–19 (ASM Press, Washington, DC, 2004).

[9] **G. Schaule**, **T. Griebe**, **H. C. Flemming**, "Steps in Biofilm Sampling and Characterization in Biofouling Cases," in: "Biofilms: Investigative Methods and Applications," (**H. C. Flemming**, **U. Szewzyk**, **T. Griebe**, Herausgeber), Kapitel 1, Seiten 1–21 (Technomic Publishing Company, Lancaster, 2000).

[10] **H. C. Flemming**, "Biofouling and Microbially Influenced Corrosion (MIC) - an Economical and Technical Overview," in: "Microbially Influenced Corrosion of Materials - Scientific and Technological Aspects," (**E. Heitz**, **W. Sand**, **H. C. Flemming**, Herausgeber), Seiten 5–14 (Springer-Verlag Heidelberg, 1996).

[11] **P. D. Marsh**, **D. J. Bradshaw**, "Dental Plaque as a Biofilm," *Journal of Industrial Microbiology*, **15**, (1995), 169–175.

[12] **G. Phillips**, **S. Hudson**, **W. K. Stewart**, "Persistence of Microflora in Biofilm within Fluid Pathways of Contemporary Halmodialysis Monitors," *J. Hosp. Infec.*, **27**, (1994), 117–125.

[13] **J. W. Costerton**, **P. S. Stewart**, **E. P. Greenberg**, "Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections," *Science*, **284**, (1999), 1318–1322.

[14] **T. R. Bott**, "Industrial Monitoring - Cooling Water Systems," in: "Biofilms - Science and Technology," (**L. F. Meto**, **T. R. Bott**, **B. Capdeville**, **M. Fletcher**, Herausgeber), Seiten 661–669 (Kluwer Academic Publ., Dordrecht, 1992).

[15] **H. C. Flemming**, *Biofouling bei Membranprozessen* (Springer Verlag, Berlin, 1995).

[16] **H. C. Flemming**, "Biofilme, Biofouling und mikrobielle Materialschädigung," in: "Stuttgarter Siedlungswasserwirtschaftliche Berichte," Band 129 (Oldenbourg Verlag, München, 1994).

[17] **S. Herb**, **G. Merkl**, **H. C. Flemming**, "Schäden an mineralischen Innenbeschichtungen von Trinkwasserbehältern," in: "Wasser, Abwasser," Band 138, Seiten 157–164 (GWF, 1997).

[18] **J. W. Costerton**, **Z. Lewandowski**, **D. DeBeer**, **D. E. Caldwell**, **D. R. Korber**, **G. James**, "Biofilms, the Customized Microniche," *Journal of Bacteriology*, **176**, (1994), 2137–2142.

[19] **H. G. Schlegel**, *Allgemeine Mikrobiologie* (Thieme Verlag, Stuttgart, 1992).

[20] **J. R. W. Govan**, **V. Deretic**, "Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: mucoid Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia," *Microbiol. Rev.*, **60**, (1996), 539–574.

[21] **J. R. W. Govan**, "Characteristics of Mucoid Pseudomonas aeruginosa in vitro and in vivo," in: "Pseudomonas Infection and Alginates," (**P. Gacesa**, **N. J. Russell**, Herausgeber), Seiten 50–75 (Chapman and Hall, London, 1990).

[22] **S. Grobe**, **J. Wingender**, **H. G. Trüper**, "Characterization of Mucoid Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Technical Water Systems," *Journal of Applied Bacteriology*, **79**, (1995), 94–102.

[23] **W. G. Characklis**, **P. A. Wilderer**, "Glossary," in: "Structure and Function of Biofilms," (**W. G. Characklis**, **P. A. Wilderer**, Herausgeber), Seiten 369–371 (Wiley, Chichester, 1989).

[24] **I. W. Sutherland**, "The Biofilm Matrix - an Immobilized but Dynamic Microbial Environment," *Trends in Microbiology*, **9**(5), (2001), 222–227.

[25] **H. C. Flemming**, **J. Wingender**, "Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) - der Baustoff für Biofilme," *Vom Wasser*, **94**, (2000), 000–000, sonderdruck.

[26] **I. W. Sutherland**, *Biotechnology of Microbial Exopolysaccharides* (Cambridge University Press, 1990).

[27] **R. Binet**, **S. Letoffe**, **J. M. Ghigo**, **P. Delepelaire**, **C. Wandersman**, "Protein Secretion by Gram-negative Bacterial ABC Exporters - A Review," *Gene*, **192**, (1997), 7–11.

[28] **J. E. Cadieux**, **J. Kuzio**, **F. H. Milazzo**, **A. M. Kropinski**, "Spontaneous Release of Lipopolysaccharide by Pseudomonas aeruginosa," *Journal of Bacteriology*, **155**, (1983), 817–825.

[29] **J. Wingender**, **T. R. Neu**, **H. C. Flemming**, "What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?" in: "Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function," (**J. Wingender**, **T. R. Neu**, **H. C. Flemming**, Herausgeber), Kapitel 1, Seiten 1–19 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).

[30] **I. W. Sutherland**, "Microbial Polysaccharides - their Role in Microbial Adhesion in Aqueous Systems," *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, **10**, (1984), 173–201.

[31] **K. Becker**, "Exopolysaccharide Production and Attachment Strength of Bacteria and Diatoms on Substrates with Different Surface Tensions," *Microb. Ecol.*, **32**, (1996), 23–33.

[32] **I. W. Sutherland**, "Biofilm Exopolysaccharides," in: "Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterization, Structure and Function," Kapitel 4, Seiten 73–92 (Springer-Verlag, Berlin, 1999).

[33] **D. A. Rees**, *Polysaccharide Shapes* (Chapman and Hall, London, 1977).

[34] **W. Burchard**, *Polysaccharide* (Springer-Verlag, Berlin, 1985).

[35] **D. G. Allison**, **I. W. Sutherland**, "Role of Exopolysaccharides in Adhesion of Freshwater Bacteria," *J. Gen. Microbiol.*, **133**, (1987), 1319–1327.

[36] **K. A. Hughes**, **I. W. Sutherland**, **M. V. Jones**, "The Function of Biofilm Exopolysaccharides: Increased Exopolysaccharide Production following Exposure to Antimicrobial Agents and enhanced Desiccation Resistance," *Microbiology*, **144**, (1998), 3039–3047.

[37] **N. Schürks**, **J. Wingender**, **H. C. Flemming**, **C. Mayer**, "Monomer Composition and Sequence of Alginates from Pseudomonas aeruginosa," *International Journal of Biological Macromolecules*, **30**, (2002), 105–111.

[38] **O. Smidsrod**, "Molecular Basis for some Physical Properties of Alginates in the Gel State," *Farad. Disc. Chem. Soc.*, **57**, (1974), 263–274.

[39] **N. Emmerichs**, "Untersuchung der Wechselwirkungen von Mangan- und Calciumionen mit Alginat von Algen und von verschiedenen mucoiden Stämmen des Bakteriums Pseudomonas aeruginosa," Dissertation, Universität Duisburg-Essen (2004).

[40] **J. Wingender**, **K. E. Jaeger**, "Extracellular Enzymes in Biofilms," in: "Encyclopedia of Environmental Microbiology," (**G. Bitton**, Herausgeber), Band 3, Seiten 1207–1223 (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2002).

[41] **F. Azam**, **B. C. Cho**, "Bacterial Utilization of Organic Matter in the Sea," in: "Ecology of Microbial Communities," (**M. Fletcher**, **T. R. G. Gray**, **J. G. Jones**, Herausgeber), Seiten 261–281 (Cambridge University Press, 1987).

[42] **M. Starkey**, **K. A. Gray**, **S. I. Chang**, **M. R. Parsek**, "A Sticky Business: The Extracellular Polymeric Substance Matrix of Bacterial Biofilms," in: "Microbial Biofilms," (**M. Ghannoum**, **G. A. O´Toole**, Herausgeber), Kapitel 10, Seiten 174–191 (ASM Press, Washington, DC, 2004).

[43] **M. J. Higgins**, **J. T. Novak**, "Characterization of Extracellular Protein and its Role in Bioflocculation," *J. Environ. Eng.*, **123**, (1997), 479–485.

[44] **I. Ofek**, **D. L. Hasty**, *Bacterial Adhesion to Animal Cells and Tissues* (ASM Press, Washington, 2003).

[45] **G. Cioci**, **E. P. Mitchell**, **C. Gautier**, **M. Wimmerova**, **D. Sudakevitz**, **S. Perez**, **N. Gilboa-Garber**, **A. Imberty**, "Structural Basis of Calcium and Galactose Recognition by the Lectin PA-IL of Pseudomonas aeruginosa," *FEBS Letters*, **555**, (2003), 297–301.

[46] **R. Loris**, **D. Tielker**, **K. E. Jaeger**, **L. Wyns**, "Structural Basis of Carbohydrate Recognition by the Lectin LecB from Pseudomonas aeruginosa," *J. Mol. Biol.*, **331**, (2003), 861–870.

[47] **J. Schmitt**, **H. C. Flemming**, "Water Binding in Biofilms," *Water Science Technology*, **39**(7), (1999), 77–82.

[48] **F. Colin**, **S. Gazbar**, "Distribution of Water in Sludges in Relation to their Mechanical Dewatering," *Water Research*, **29**, (1995), 2000–2005.

[49] **E. Rolf**, **Halde**, "Sewage Sludge Characterization by Vacuum Drying," *Filtration and Seperation*, **May/June**, (1979), 238–242.

[50] **M. Smollen**, "Evaluation of Municipal Sludge Drying and Dewaterability with Respect to Sludge Reduction," *Water Science Technology*, **22**, (1990), 153–161.

[51] **P. Lens**, **L. H. Pol**, **G. Lettinga**, **H. Van As**, "Use of 1H NMR to Study Transport Processes in Sulfidogenic Granular Sludge," *Water Science Technology*, **36**, (1997), 157–163.

[52] **P. Lens**, **F. Vergeldt**, **G. Lettinga**, **H. Van As**, "1H NMR Characterisation of the Diffusional Properties of Methanogenic Granular Sludge," *Water Science Technology*, **39**(7), (1999), 187–194.

[53] **W. Jost**, **K. Hauffe**, *Diffusion: Methoden der Messung und Auswertung* (Steinkopff Verlag, Darmstadt, 1972).

[54] **K. A. Jackson**, *Kinetic Processes* (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2004).

[55] **H. S. Carslaw**, **J. C. Jaeger**, *Conduction of Heat in Solids* (Clarendon Press, Oxford, 1959).

[56] **N. Y. Chen**, **T. F. Degnan**, **C. M. Smith**, *Molecular Transport and Reaction in Zeolites* (VCH Publishers, New York, 1994).

[57] **H. Römpp**, **J. Falbe**, *Römpp-Lexikon Chemie A - Z*, Seite Diffusion (Georg Thieme Verlag, 1999), 10. Auflage.

[58] **J. Kärger**, **D. M. Ruthven**, *Diffusion in Zeolites and Other Microporous Solids* (John Wiley and Sons Inc., 1992).

[59] **A. Einstein**, "Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen," *Annalen der Physik*, **17**, (1905), 549–560.

[60] **A. Einstein**, "Zur Theorie der Brownschen Bewegung," *Annalen der Physik*, **19**, (1906), 371–381.

[61] **H. Friebolin**, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie* (Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 1999), dritte Auflage.

[62] **A. Abragam**, *The Principles of Nuclear Magnetism* (Oxford University Press, 1961).

[63] **R. R. Ernst**, **G. Bodenhausen**, **A. Wokaun**, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, The International series of monographs on Chemistry; 14 (Oxford University Press, 1987).

[64] **E. L. Hahn**, "Spin-Echoes," *Physical Review*, **80**, (1950), 580–595.

[65] **H. Y. Carr**, **E. M. Purcell**, "Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance," *Physical Review*, **94**, (1954), 630–638.

[66] **K. J. Packer**, "Diffusion and Flow in Fluids," in: "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance," (**D. M. Grant**, Herausgeber), 3, Seiten 1615–1626 (Chichester: Wiley, 1996).

[67] **J. Kärger**, "Diffusion in Porous Media," in: "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance," (**D. M. Grant**, Herausgeber), Band 3, Seiten 1656–1663 (Chichester: Wiley, 1996).

[68] **R. Kimmich**, *NMR : Tomography, Diffusiometry, Relaxometry* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997).

[69] **W. S. Price**, **P. Stilbs**, **B. Jönsson**, **O. Söderman**, "Macroscopic Background Gradient and Radiation Damping Effects on High-Field PGSE NMR Diffusion Measurements," *Journal of Magnetic Resonance*, **150**, (2001), 49–56.

[70] **W. S. Price**, "Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part I. Basic Theory," *Concepts in Magnetic Resonance*, **9**(5), (1997), 299–336.

[71] **W. S. Price**, "Pulsed-Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance as a Tool for Studying Translational Diffusion: Part II. Experimental Aspects," *Concepts in Magnetic Resonance*, **10**(4), (1998), 197–237.

[72] **P. T. Callaghan**, *Principles of Nuclear Magnetic Resonance Microscopy* (Oxford University Press, 1993).

[73] **C. S. Johnson**, "Diffusion Measurements by Magnetic Field Gradient Methods," in: "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance," (**D. M. Grant**, Herausgeber), 3, Seiten 1626–1644 (Chichester: Wiley, 1996).

[74] **E. O. Stejskal**, **J. E. Tanner**, "Spin Diffusion Measurements : Spin Echoes in the Presence of Time-Dependent Field Gradient," *Journal of Chemical Physics*, **42**, (1965), 288–292.

[75] **J. E. Tanner**, **E. O. Stejskal**, "Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method," *Journal of Chemical Physics*, **49**(4), (1968), 1768–1777.

[76] **A. W. Overhauser**, *Physical Review*, **89**, (1953), 689.

[77] **I. Solomon**, *Physical Review*, **99**, (1955), 559.

[78] **J. N. S. Evans**, *Biomolecular NMR Spectroscopy* (Oxford University Press, 1995).

[79] **D. Neuhaus**, **M. P. Williamson**, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis* (John Wiley and Sons, Inc., 2000), zweite Auflage.

[80] **K. Wüthrich**, *NMR of Proteins and Nucleic Acids* (John Wiley and Sons, New York, 1986).

[81] **D. Neuhaus**, "Nuclear Overhauser Effect," in: "Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance," Seiten 3290–3301 (John Wiley and Sons, Inc, 1996).

[82] **A. Chen**, **M. Shapiro**, "Nuclear Overhauser Effect on Diffusion Measurements," *Journal of the American Chemical Society*, **121**, (1999), 5338–5339.

[83] **L. J. C. Peschier**, **J. A. Bouwstra**, **J. de Bleyser**, **H. E. Junginger**, **J. C. Leyte**, "Cross-Relaxation Effects in Pulsed-Field-Gradient Stimulated-Echo Measurements on Water in a Macromolecular Matrix," *Journal of Magnetic Resonance, Series B*, **110**, (1996), 150–157.

[84] **K. Zick**, *Diffusion*, Bruker Analytik GmbH, Rheinstetten, zweite Auflage (2000).

[85] **S. Braun**, **H. O. Kalinowski**, **S. Berger**, *150 and More Basic NMR Experiments* (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1998).

[86] **B. Frølund**, **R. Palmgren**, **K. Keiding**, **P. H. Nielsen**, "Extraction of Extracellular Polymers from Activated Sludge using a Cation Exchange Resin," *Water Research*, **30**, (1996), 1749–1758.

[87] **O. H. Lowry**, **N. J. Rosebrough**, **A. L. Farr**, **R. J. Randall**, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, **193**, (1951), 265–275.

[88] **H. Wiese**, "Lichtstreuung und Teilchengrößenmessung," *GIT*, **4**, (1992), 385–390.

[89] **R. H. Müller**, **R. Schuhmann**, *Teilchengrößenmessung in der Laborpraxis* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1996).

[90] **E. Dobnik**, "Kalorimetrische Untersuchungen des Phasenverhaltens von kristallisierenden Polymeren und Oligomeren in verschiedenen Lösemitteln," Dissertation, Universität-GH-Duisburg (1991).

[91] **J. Wingender**, **M. Strathmann**, **A. Rode**, **A. Leis**, **H. C. Flemming**, "Isolation and Biochemical Characterization of Extracellular Polymeric Substances from Pseudomonas aeruginosa," *Methods Enzymol*, **336**, (2001), 302–314.

[92] *Bruker Almanac 2001*, *Technischer Bericht*, Bruker Analytik GmbH (2001).

[93] **S. V. Dvinskikh**, **I. Furo**, "Cross-Relaxation Effects in Stimulated-Echo-Type PGSE NMR Experiments by Bipolar and Monopolar Gradient Pulses," *Journal of Magnetic Resonance*, **146**, (2000), 283–289.

[94] **I. Broekmann**, "PFG-NMR-Untersuchungen an Monoglycerid-Gelen und Wasser-in-Öl-Emulsionen," Dissertation, Gerhard-Mercator-Universität Duisburg (2002).

[95] **L. Avram**, **Y. Cohen**, "Diffusion Measurements for Molecular Capsules: Pulse Sequences Effect on Water Signal Decay," *Journal of the American Chemical Society*, **127**, (2005), 5714–5719.

[96] **M. Vogt**, **H. C. Flemming**, **W. S. Veeman**, "Diffusion in Pseudomonas aeruginosa Biofilms: a Pulsed Field Gradient NMR Study," *Journal of Biotechnology*, **77**, (2000), 137–146.

[97] **H. Beyenal**, **A. Tanyolac**, **Z. Lewandowski**, "Measurement of Local Effective Diffusivity in Heterogeneous Biofilms," *Water Science Technology*, **38**(8-9), (1998), 171–178.

[98] **N. Nestle**, **P. Galvosas**, **O. Geier**, **S. Vasenkow**, **J. Kärger**, "PFG-NMR Diffusion Studies in Polysaccharide Gels with and without Inner Magnetic Field Gradients," *Proceedings of the 15th European Experimental NMR Conference (EENC 2000)*, Seiten 1–5.

[99] **M. Horstmann**, "Untersuchungen zur Wechselwirkung von Wasser und Blockcopolyetherestern mit Methoden der Kernresonanzspektroskopie (NMR)," Dissertation, Universität Duisburg-Essen (2003).

[100] **M. Strathmann**, "Visualisierung und Charakterisierung von extrazellulären polymeren Substanzen in Biofilmen," Dissertation, Universität Duisburg-Essen (2003).

[101] **P. Debye**, *Polar Molecules* (Chemical Catalog Co., New York, 1929).

[102] **G. Otting**, "NMR Studies of Water Bound to Biological Molecules," *Journal of Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, **31**, (1997), 259–285.

[103] **B. Balinov**, **B. Jönsson**, **P. Linse**, **O. Söderman**, "The NMR self-diffusion method applied to restricted diffusion. Simulation of echo attenuation from molecules in spheres and between planes," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **104**, (1993), 17–25.

[104] **W. S. Veeman**, "Diffusion in a Closed Sphere," *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, **50**, (2003), 201–216.

[105] **M. H. Blees**, "The Effect of Finite Duration of Gradient Pulses on the Pulsed-Field-Gradient NMR Method for Studying Restricted Diffusion," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **109**, (1994), 203–209.

[106] **P. P. Mitra**, **L. L. Latour**, **R. L. Kleinberg**, **C. H. Sotak**, "Pulsed-Field-Gradient NMR Measurements of Restricted Diffusion and the Return-to-the-Origin Probability," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **114**, (1995), 47–58.

[107] **P. Linse**, **O. Söderman**, "The Validity of the Short-Gradient-Pulse Approximation in NMR Studies of Restricted Diffusion," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **116**, (1995), 77–86.

[108] **J. Kärger**, "Zur Bestimmung der Diffusion in einem Zweibereichsystem mit Hilfe von gepulsten Feldgradienten." *Annalen der Physik*, **24**, (1969), 1–4.

[109] **J. Kärger**, "Der Einfluß der Zweibereichdiffusion auf die Spinechodämpfung unter Berücksichtigung der Relaxation bei Messungen mit der Methode der gepulsten Feldgradienten." *Annalen der Physik*, **27**, (1971), 107–109.

[110] **E. von Meerwall**, **R. D. Ferguson**, "Interpreting Pulsed-Gradient Spin-Echo Diffusion Experiments with Permeable Membranes," *Journal of Chemical Physics*, **74**(12), (1981), 6956–6959.

[111] **M. Andrec**, **J. H. Prestegard**, "Quantitation of chemical exchange rates using pulsed-field-gradient diffusion measurements," *Journal of Biomolecular NMR*, **9**, (1997), 136–150.

[112] **J. Pfeuffer**, **U. Flögel**, **W. Dreher**, **D. Leibfritz**, "Restricted Diffusion and Exchange of Intracellular Water: Theoretical Modelling and Diffusion Time Dependence of 1H NMR Measurements on Perfused Glial Cells," *NMR in Biomedicine*, **11**, (1998), 19–31.

[113] **J. Pfeuffer**, **W. Dreher**, **E. Sykova**, **D. Leibfritz**, "Water Signal Attenuation in Diffusion-weighted 1H NMR Experiments during Cerebral Ischemia: Influence of Intracellular Restrictions, Extracellular Tortuosity, and Exchange," *Magnetic Resonance Imaging*, **16**, (1998), 1023–1032.

[114] **H. T. Edzes**, **E. T. Samulski**, "Cross Relaxation and Spin Diffusion in the Proton NMR of Hydrated Collagen," *Nature*, **265**, (1977), 521–523.

[115] **K. Overloop**, **L. van Gerven**, "Exchange and Cross-Relaxation in Adsorbed Water," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **101**, (1993), 147–156.

[116] **R. Brüschweiler**, **P. E. Wright**, "Water Self-Diffusion Model for Protein-Water NMR Cross Relaxation," *Chemical Physics Letters*, **229**, (1994), 75–81.

[117] **A. Chen**, **C. S. Johnson Jr**, **M. Lin**, **M. J. Shapiro**, "Chemical Exchange in Diffusion NMR Experiments," *Journal of the American Chemical Society*, **120**, (1998), 9094–9095.

[118] **T. Ceckler**, **J. Maneval**, **B. Melkowits**, "Modeling Magnetization Transfer Using a Three-Pool Model and Physically Meaningful Constraints on the Fitting Parameters," *Journal of Magnetic Resonance*, **151**, (2001), 9–27.

[119] **J. Kärger**, **G. Fleischer**, **U. Roland**, "PFG NMR Studies of Anomalous Diffusion," in: "Diffusion in Condensed Matter," (**J. Kärger**, **P. Heitjans**, **R. Haberlandt**, Herausgeber) (Friedr. Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig, 1998).

[120] **J. Pfeuffer**, **U. Flögel**, **D. Leibfritz**, "Monitoring of Cell Volume and Water Exchange Time in Perfused Cells by Diffusion-weighted 1H NMR Spectroscopy," *NMR in Biomedicine*, **11**, (1998), 11–18.

[121] **P. P. Mitra**, **P. N. Sen**, **L. M. Schwartz**, "Short-Time Behavior of the Diffusion Coefficient as a Geometrical Probe of Porous Media," *Physical Review B*, **47**(14), (1993), 8565–8574.

[122] **P. T. Callaghan**, "Pulsed Gradient Spin Echo NMR for Planar, Cylindrical and Spherical Pores under Conditions of Wall Relaxation," *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, **113**, (1995), 53.

[123] **H. T. Edzes**, **E. T. Samulski**, *Journal of Magnetic Resonance*, **31**, (1987), 207.

[124] **W. Borchard**, "Das Phasendiagramm von Alginat/Wasser," Persönliche Mitteilung (2002).

[125] **A. Straatmann**, **W. Borchard**, "Phase Separation in Calcium Alginate Gels," *European Biophysics Journal*, **32**, (2003), 412–417.

[126] **H. G. Bungenberg de Jong**, *Colloid Science, Vol. II* (Amsterdam, 1949).

[127] **T. Ophir**, **D. L. Gutnick**, "A Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation," *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, (1994), 740–745.

[128] **S. Hietala**, **S. L. Maunu**, **F. Sundholm**, **T. Lehtinen**, **G. Sundholm**, "Water Sorption and Diffusion Coefficients of Protons and Water in PVDF-g-PSSA Polymer Electrolyte Membranes," *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, **37**, (1999), 2893–2900.

[129] **M. Horstmann**, **M. Urbani**, **W. S. Veeman**, "Self-Diffusion of Water in Block Copoly(ether–ester) Polymers: An NMR Study," *Macromolecules*, **36**(18), (2003), 6797–6806.

[130] **S. D. Allison**, **B. Chang**, **T. W. Randolph**, **J. F. Carpenter**, "Hydrogen Bonding between Sugar and Protein is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Unfolding," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **365**(2), (1999), 289–298.

[131] **J. H. Crowe**, **J. F. Carpenter**, **L. M. Crowe**, "The Role of Vitrification in Anhydrobiosis," *Annual Review of Physiology*, **60**, (1998), 73–103.

[132] **R. D. Lins**, **C. S. Pereira**, **P. H. Hünenberger**, "Trehalose-Protein Interaction in Aqueous Solution," *Proteins*, **55**, (2004), 177–186.

[133] **S. Prestrelski**, **N. Tedeschi**, **T. Arakawa**, **J. F. Carpenter**, "Dehydration-induced Conformational Transitions in Proteins and their Inhibition by Stabilizers," *Biophysical Journal*, **65**, (1993), 661–671.

[134] **J. F. Carpenter**, **J. H. Crowe**, "An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins," *Biochemistry*, **28**, (1989), 3916–3922.

[135] **P. S. Belton**, **A. M. Gil**, "IR and Raman-Spectroscopic Studies of the Interaction of Trehalose with Hen Egg-White Lysozyme," *Biopolymers*, **34**, (1994), 957–961.

[136] **A. Ansari**, **C. M. Jones**, **E. R. Henry**, **J. Hofrichter**, **W. A. Eaton**, "The Role of Solvent Viscosity in the Dynamics of Protein Conformational Changes," *Science*, **256**, (1992), 1796–1798.

[137] **S. J. Hagen**, **J. Hofrichter**, **W. A. Eaton**, "Protein Reaction-Kinetics in a Room-Temperature Glass," *Science*, **269**, (1995), 959–962.

[138] **R. D. Poretz**, **I. J. Goldstein**, "An Examination of the Topography of the Saccharide Binding Sites of Concanavalin A and of the Forces Involved in Complexation," *Biochemistry*, **9**(14), (1970), 2890–2896.

[139] **I. J. Goldstein**, **C. E. Hollerman**, **J. M. Merrick**, "Protein-Carbohydrate Interaction: I. The Interaction of Polysaccharides with Concanavalin A," *Biochim. Biophys. Acta*, **97**, (1965), 68–76.

[140] **H. Kuhn**, "Docking Simulation of ConA-GG,GM,MM-Complexes," Persönliche Mitteilung (2004).

[141] **H. Kuhn**, "Molecular Docking-Simulations of Lipase and Alginate," Vortrag (2002).

[142] **C. S. Chern**, **C. K. Lee**, **Y. J. Tsai**, "Interactions between Dextran-Modified Poly(methyl methacrylate) Latex Particles and Concanavalin A," *Colloid and Polymer Science*, **279**, (2001), 420–426.

[143] **J. Zhang**, **D. Roll**, **C. D. Geddes**, **J. R. Lakowicz**, "Aggregation of Silver Nanoparticle-Dextran Adducts with Concanavalin A and Competitive Complexation with Glucose," *Journal of Physical Chemistry B*, **108**, (2004), 12210–12214.

[144] **H. Kuhn**, "Molecular Docking-Simulations of Concanavalin A (ConA) and Disaccharides," Vortrag (2004).