

- Schoemaker, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 2335; D. Alonso, S. J. M. Nordin, P. Roth, T. Tarnai, P. G. Andersson, M. Thommen, U. Pittelkow, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3316; J. X. Gao, H. Zhang, X. D. Yi, P. P. Xu, C. L. Tang, H. L. Wan, K. R. Tsai, T. Ikariya, *Chirality* **2000**, 12, 383; P. Braunstein, F. Naud, C. Graiff, A. Tiripicchio, *Chem. Commun.* **2000**, 897.
- [5] CE Instruments GC8000 TOP, 30 m × 0.25 mm Supelco-beta-DEX-120-Säule, Injektortemperatur 200 °C, FID-Detektortemperatur 250 °C.
- [6] Bei einem angenommenen Reaktorvolumen von ca. 20 mL gilt beispielsweise, dass ein Abfall von 1.3 bar in 30 min einer TOF von 700 h⁻¹ entspricht.
- [7] T. H. Lowry, K. H. Richardson, *Mechanism and Theory in Organic Chemistry*, 2. Aufl., Harper & Row, New York, **1981**, S. 266.
- [8] G. Häfelinger, F. K. H. Kuske in *The Chemistry of Amidines and Imidates*, Vol. 2 (Hrsg.: S. Patai, Z. Rappoport), Wiley, New York, **1991**, Kap. 1.
- [9] A. S. C. Chan, J. J. Pluth, J. Halpern, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 5952; J. Halpern, *J. Organomet. Chem.* **1980**, 200, 133; J. Halpern, *Science* **1982**, 217, 401; B. Bosnich, N. K. Roberts, *Adv. Chem. Ser.* **1982**, 196, 337; J. M. Brown, P. A. Chaloner, D. Parker, *Adv. Chem. Ser.* **1982**, 196, 355; H. B. Kagan, *Asymmetric Synth.* **1985**, 5, 1; K. E. Koenig, *Asymmetric Synth.* **1985**, 5, 71; J. M. Brown, *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 25.
- [10] J. A. Kenny, K. Versluis, A. J. R. Heck, T. Walsgrove, M. Wills, *Chem. Commun.* **2000**, 99.
- [11] D. A. Alonso, P. Brandt, S. J. M. Nordin, P. G. Andersson, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9580.
- [12] M. Yamakawa, H. Ito, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 1466.
- [13] T. Okhuma, H. Ooka, S. Hashiguchi, T. Ikariya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2675.
- [14] P. G. Jessop, R. H. Morris, *Coord. Chem. Rev.* **1992**, 121, 155.
- [15] D. Evans, J. Osborn, J. A. Jardine, G. Wilkinson, *Nature* **1965**, 208, 1203; P. S. Hallman, B. R. McGarvey, G. Wilkinson, *J. Chem. Soc. A* **1968**, 3143.
- [16] E. Fache, C. Santini, F. Senocq, J. M. Basset, *J. Mol. Catal.* **1992**, 72, 337.
- [17] D. M. Heinekey, W. J. Oldham, Jr., *Chem. Rev.* **1993**, 93, 913.
- [18] Der pK_a-Wert von 17.6 in Acetonitril (M. S. Chinn, D. M. Heinekey, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5865) wurde für Wasser um -12.5 korrigiert.
- [19] G. Jia, A. J. Lough, R. H. Morris, *Organometallics* **1992**, 11, 161. Der pK_a-Wert wurde mithilfe von Gleichgewichtsmessungen in THF bestimmt und für Wasser korrigiert.
- [20] E. P. Capellani, P. A. Maltby, R. H. Morris, C. T. Schweitzer, M. R. Steele, *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 4437.
- [21] E. Rocchini, A. Mezzetti, H. Rüegger, U. Burkhardt, V. Gramlich, A. Del Zotto, P. Martinuzzi, P. Rigo, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 711; T. A. Luther, D. M. Heinekey, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 127.
- [22] R. T. Hembre, S. McQueen, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 2141.
- [23] E. M. Arnett, *Prog. Phys. Chem.* **1963**, 1, 223.
- [24] Eine Verstärkung des Säurecharakters von gebundenen Aminen wurde auch in Amminruthenium- und -osmium-Komplexen der Oxidationsstufe +II oder +III beobachtet: G. Navon, D. Waysbort, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 1410; J. D. Buhr, H. Taube, *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 2425; P. Bernhard, A. M. Sargeson, F. C. Anson, *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 2754; F. S. Nunes, H. Taube, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 3116; P. Bernhard, D. J. Bull, H. B. Bürgi, P. Osvath, A. Raselli, A. M. Sargeson, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2804.
- [25] Für den Fall sehr hoher S/C-Verhältnisse ist die Bedingung, dass das Rutheniumamid deprotoniert bleibt, vermutlich der Grund für den erforderlichen hohen molaren Überschuss an Base. Denn als Folge der Konzentrationsabhängigkeit des Protonentransfergleichgewichts sind bei einer Katalysatorkonzentration von 1 µM 10000 Äquiv. Base nötig.
- [26] In Lösungsmitteln, die nicht selbst als Hydridendonoren fungieren können, kann die H₂-Spaltung auch ohne Alkalimetallkationen beobachtet werden, da keine Konkurrenzreaktion möglich ist. So reduzieren Morris' Ru-Dihydride Ketone mit H₂ in Benzol. K. Abdur-Rashid, A. J. Lough, R. H. Morris, *Organometallics* **2000**, 19, 2655.
- [27] J. C. Ma, D. A. Dougherty, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 1303; G. W. Gokel, S. L. De Wall, E. S. Meadows, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2967.
- [28] G. P. Pez, R. A. Grey, J. Corsi, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7528; J. C. Huffman, M. A. Green, S. L. Kaiser, K. G. Caulton, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 5111.
- [29] J. Zavada, M. Pankova, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **1978**, 43, 1080.
- [30] A. A. Isse, A. Gennaro, E. Vianello, C. Floriani, *J. Mol. Catal.* **1991**, 70, 197; E. Gallo, E. Solari, C. Floriani, A. Chiesi-Villa, C. Rizzoli, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2178.
- [31] M. Döring, E. Uhlig, L. Dahlenburg, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1989**, 578, 58; M. Döring, H. Görls, E. Uhlig, K. Brodersen, L. Dahlenburg, A. Wolski, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1992**, 614, 65.
- [32] S. Inoue, *Prog. Polym. Sci.* **1988**, 13, 63; Y. Watanabe, T. Yasuda, T. Aida, S. Inoue, *Macromolecules* **1992**, 25, 1396.
- [33] E. J. Corey, C. L. Helal, *Angew. Chem.* **1998**, 110, 2092; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1986.
- [34] J. J. Brunet, L. Mordenti, P. Caubere, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 4804; Y. Fort, *Tetrahedron Lett.* **1995**, 36, 6051.

Bioreduktion von AuCl₄⁻-Ionen zu Au-Nanopartikeln durch eine *Verticillium*-Pilzart*

Priyabrata Mukherjee, Absar Ahmad, Deendayal Mandal, Satyajyoti Senapati, Sudhakar R. Sainkar, Mohammad I. Khan, R. Ramani, Renu Parischa, P. V. Ajayakumar, Mansoor Alam, Murali Sastry* und Rajiv Kumar*

Die Nanotechnologie umfasst die Synthese von im Nanobereich strukturierten Stoffen, das Verständnis und die Anwendung ihrer ungewöhnlichen physikochemischen und

[*] Dr. M. Sastry, Dr. S. R. Sainkar, Dr. R. Parischa


Materials Chemistry Division
National Chemical Laboratory
Pune, 411 008 (Indien)
Fax: (+91)20-5893-952/5893-044
E-mail: sastry@ems.ncl.res.in

Dr. R. Kumar, Dr. P. Mukherjee, D. Mandal, S. Senapati
Catalysis Division
National Chemical Laboratory
Pune, 411 008 (Indien)
Fax: (+91)20-5893-761
E-mail: rajiv@cata.ncl.res.in

Dr. A. Ahmad, Dr. M. I. Khan
Biochemical Sciences Division
National Chemical Laboratory
Pune, 411 008 (Indien)

R. Ramani
Department of Pathology
Armed Forces Medical College
Pune, 411 001 (Indien)
P. V. Ajayakumar, Dr. M. Alam
Department of Microbiology and Plant Pathology
Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants, P.O. CIMAP
Lucknow, 226 015 (Indien)

[**] D.M. and S.S. danken dem Council of Scientific and Industrial Research (CSIR) der indischen Regierung für finanzielle Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.com> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

optoelektronischen Eigenschaften und die Art, wie sich die im Nanobereich strukturierten Stoffe in vorgegebene Überstrukturen einfügen; dieses Gebiet verspricht eine zunehmend wichtige Rolle in vielen Schlüsseltechnologien des neuen Jahrtausends zu spielen.^[1] Da ein stetig zunehmender Bedarf an der Entwicklung sauberer, nicht giftiger und umweltfreundlicher („grüne Chemie“) Synthesewege besteht, suchen die auf dem Gebiet der Synthese von Nanopartikeln und deren Anordnung tätigen Forscher in biologischen Systemen nach inspirierenden Gedanken. Dieses und die akademische Neugier führte zur Entwicklung biomimetischer Methoden zur Herstellung anspruchsvoller Materialien. Sowohl von Einzellern als auch von Mehrzellern ist bekannt, dass sie intra- oder extrazellulär anorganische Stoffe produzieren,^[2] z. B. magnetotaktische Bakterien (sie synthetisieren Magnetit-Nanopartikel),^[3] Diatomeen (Kieselalgen, sie synthetisieren kieselensäurehaltige Materialien)^[4] und S-Schichten-Bakterien (sie produzieren Gips- und Calciumcarbonat-Schichten).^[5]

Wenn man auch Mikroben mit beträchtlichem Erfolg bei biotechnologischen Anwendungen eingesetzt hat, z. B. bei der Abtrennung toxischer Metalle aus einem Medium,^[6] so ist wenig bekannt über ihren Einsatz zur Synthese von Nanomaterialien. Beveridge et al. konnten zeigen, dass man nanoskalare Goldpartikel im Innern von Bakterienzellen leicht ausfällen kann, wenn man Zellen mit Au^{3+} -Ionen inkubiert.^[7] Eine detaillierte Untersuchung zum Wachstum von Au-Nanopartikeln mit *Bacillus subtilis* 168 ergab, dass zuerst nichtkristalline Au-Partikel ausfallen, die sich anschließend in kristallines, oktaedrisches Gold umwandeln, in dem Schwefel und Phosphor eingebaut sind.^[7b] Kürzlich zeigten Klaus-Joerger et al., dass Bakterien aus dem Stamm *Pseudomonas stutzeri* AG259, die aus einer Silbermine isoliert wurden, in einer konzentrierten, wässrigen AgNO_3 -Lösung Ag^+ -Ionen reduzieren und dabei im Innern ihres periplasmatischen Raums Ag-Nanopartikel wohldefinierter Größe und ausgeprägter Morphologie bilden.^[8] Außerdem konnten sie zeigen, dass Gemische aus nanokristallinem Silber und den Bakterien bei einer thermischen Behandlung kohlenstoffhaltiges Material mit optischen Eigenschaften bilden, das hinsichtlich möglicher Anwendungen in funktionellen Dünnschicht-Beschichtungen interessant ist.^[9] In der vorliegenden Arbeit zeigen wir, dass wenn man den Pilz *Verticillium* sp. (AAT-TS-4) zu einer wässrigen Lösung von AuCl_4^- -Ionen gibt, die Metallionen reduziert werden und sich Au-Nanopartikel mit einem Durchmesser von ca. 20 nm bilden. Die Nanopartikel bilden sich sowohl an der Oberfläche als auch auf der cytoplasmatischen Membran im Innern der Zellen, die Reduktion der Metallionen ist vernachlässigbar. Nach unserer Kenntnis ist dies der erste Einsatz eines Eukaryonten zur biologischen Synthese von Nanopartikeln aus einem Edelmetall wie Gold.

Abbildung 1 A zeigt einen Erlenmeyer-Kolben mit *Verticillium*-Zellen, die man dem Kulturmedium entnommen hat, um sie dann anschließend in eine HAuCl_4 -Lösung einzubringen. Die blassgelbe Farbe der Zellen ist deutlich erkennbar. Abbildung 1 B zeigt die Pilzzellen, nachdem sie einer 10^{-4}M wässrigen HAuCl_4 -Lösung ausgesetzt waren, man sieht ein kräftiges Violett in den Zellen, das die Bildung von Au-

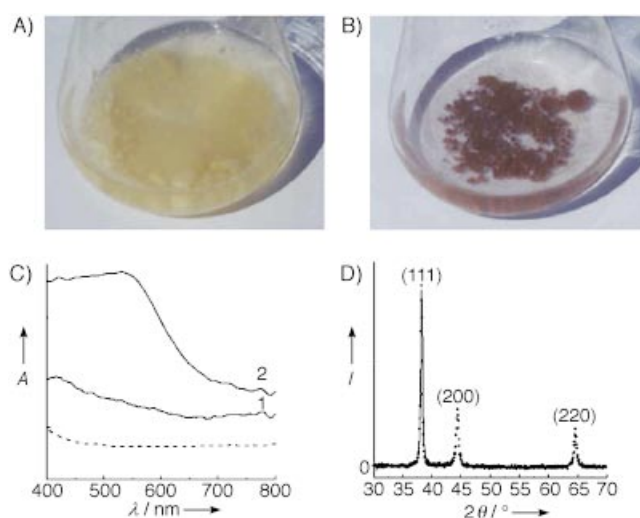


Abbildung 1. A) Aus dem Kulturmedium entnommene Zellen von *Verticillium* sp. B) Zellen, die 72 h lang einer 10^{-4}M wässrigen Lösung von HAuCl_4 ausgesetzt waren. C) UV/Vis-Spektren von Biofilmen der Zellen bevor (Kurve 1) und nachdem sie 72 h lang einer 10^{-4}M wässrigen HAuCl_4 -Lösung ausgesetzt waren (Kurve 2). Zum Vergleich ist auch ein Spektrum (gestrichelte Linie) einer HAuCl_4 -Lösung gezeigt, in der sich 72 h lang die Pilzzellen befanden. D) XRD-Muster eines Biofilms aus *Verticillium*-Zellen mit Au-Nanopartikeln, der sich auf einer Si(111)-Wafer gebildet hat. Die Bragg'schen Hauptreflexe sind gekennzeichnet.

Nanopartikeln anzeigt. Das wässrige Medium ist farblos und zeigt damit deutlich, dass keine extrazelluläre Reduktion von AuCl_4^- -Ionen stattgefunden hat. Au-Nanopartikel absorbieren aufgrund der Anregung von Schwingungen der Oberflächen-Plasmonen im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums (ca. 520 nm), dies ist verantwortlich für die auffallende Farbe der Au-Nanopartikel in den verschiedenen Medien.^[10] Die geernteten Zellen geben, so wie sie sind, im UV/Vis-Spektrum keinen Hinweis auf eine Absorption im Spektralbereich 400–800 nm. Sind diese Zellen jedoch AuCl_4^- -Ionen ausgesetzt gewesen, zeigen sie eine ausgeprägte Absorption bei ca. 540 nm (Abbildung 1 C). Dieser Wert liegt im Absorptionsbereich der für dünne Filme von Au-Nanopartikeln, die auf anderen Weisen hergestellt wurden, bekannt ist.^[10, 11] So wie bei den gerade geernteten Zellen zeigt das UV/Vis-Spektrum einer wässrigen HAuCl_4 -Lösung, in die man die Zellen eingebracht hatte, im Bereich von 540 nm keine erkennbare Absorption. Dieses Ergebnis unterstützt somit den auf dem in Abbildung 1 B gezeigten Photo sichtbaren Beweis, dass nämlich in der Lösung nur eine vernachlässigbare extrazelluläre Reduktion der AuCl_4^- -Ionen stattgefunden hat. Ein weiterer Beweis für die intrazelluläre Bildung von Au-Nanopartikeln liefert die Röntgenbeugungsanalyse (XRD) eines Biofilms aus Au-Nanopartikeln in *Verticillium*-Zellen, der auf ein Si-Substrat aufgebracht wurden (Abbildung 1 D). Die intensiven Peaks der (111)-, (200)- und (220)-Bragg-Reflexe von Gold im Beugungsmuster entsprechen den Literaturwerten für Nanokristalle aus Gold.^[12] Mit der Debye-Scherrer-Gleichung wurde die Breite der (111)-Bragg-Reflexe bestimmt und so eine mittlere Größe von 25 nm für die in den Zellen gebildeten Au-Nanopartikel ermittelt.^[13]

Die rasterelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahme (Abbildung 2A) zeigt, dass die Mycelien mit gut dispergierten Au-Nanopartikeln bedeckt sind, wobei die Au-Nanopartikel auf der Oberfläche der Mycelien sind. Eine Analyse des

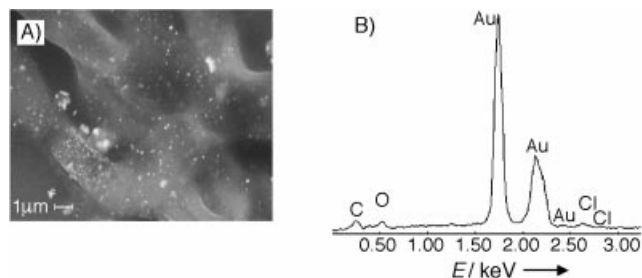


Abbildung 2. A) SEM-Aufnahme eines Biofilms aus *Verticillium*-Zellen, die nach dem Eintauchen der Zellen für 72 h in eine wässrige 10^{-4} M HAuCl_4 -Lösung auf ein Si(111)-Wafer aufgebracht wurden. B) Punkt-Profil des EDX-Spektrums eines in Abbildung 2A gezeigten Au-Nanopartikels.

Energieprofils eines Punktes der Röntgenbeugungsaufnahme (EDX) einer der Au-Nanopartikel zeigt starke Signale von den Au-Atomen sowie schwächere von den C-, O- und Cl-Atomen (Abbildung 2b). Die C- und O-Signale stammen von Röntgenstrahlemissionen aus Proteinen oder Enzymen, die entweder direkt an die Au-Nanopartikel gebunden sind oder sich in deren Nähe befinden. Das schwache Cl-Signal hingegen deutet auf die Gegenwart eines kleinen Bruchteils von AuCl_4^- -Ionen in dem untersuchten Bereich hin.

Um den Bildungsmechanismus von Au-Nanopartikeln in dem Biofilm wenigstens vorläufig zu verstehen, ist es wichtig zu wissen, wo sich die Au-Nanopartikel relativ zu den Pilzzellen befinden. Dies untersucht man üblicherweise mit der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) dünner Schnitte, im vorliegenden Fall von *Verticillium*-Zellen mit Au-Nanopartikeln (Abbildung 3). Bei geringer Vergrößerung kann man eine Anzahl von *Verticillium*-Zellen erkennen (Abbildung 3A). Eine sorgfältige Untersuchung des Bildes zeigt äußerst kleine Au-Partikel, die an den Wänden der Zellen angeordnet sind. Größere Au-Partikel erkennt man im Innern der Zellen in allerdings beträchtlich geringerer Anzahl. Abbildung 3B zeigt eine TEM-Aufnahme einer einzelnen Zelle mit Goldpartikeln sowohl an der Zellwand (Außen-seite der Zellmembran) als auch an der cytoplasmatischen Membran (Membraninnenseite). Die Anzahl der Au-Nanopartikel an der cytoplasmatischen Membran ist eindeutig größer als an der Zellwand. Wie aus Abbildung 3A hervorgeht, lässt sich ein geringer Prozentsatz größerer Goldpartikel im Cytoplasma beobachten. Eine Analyse der Röntgenbeugungsdaten ausgewählter Gebiete eines einzelnen Goldpartikels (Daten sind nicht aufgeführt) zeigt diffuse Ringe mit Gitterabständen, die sehr gut mit den für Gold zu erwartenden übereinstimmen. 20 ± 8 nm ist die durchschnittliche Größe eines an der Zellwand oder an der cytoplasmatischen Membran gebildeten Au-Nanopartikels, das konnte durch eine statistische Analyse von vielen TEM-Aufnahmen einzelner *Verticillium*-Zellen bestimmt werden. Anzumerken sei, dass bei dieser Analyse die größeren Goldpartikel (oft größer als 100 nm, Abbildung 3C und D) nicht berücksichtigt sind.

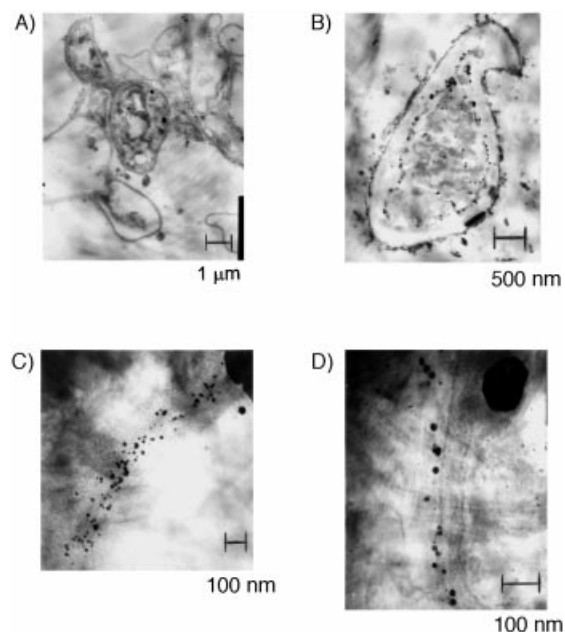


Abbildung 3. TEM-Aufnahmen von Dünnschnitten gefärbter *Verticillium*-Zellen nach einer 72-stündigen Reaktion mit AuCl_4^- -Ionen bei verschiedenen Vergrößerungen (A–D).

Hochaufgelöste TEM-Aufnahmen einer einzelnen Zelle zeigen die hochorganisierte Anordnung der Au-Nanopartikel an der Membran (Abbildung 3C und D). Auffällig ist die große Zahl von Nanopartikeln an der Membranoberfläche – hier liegt eine ausgeprägte Abweichung gegenüber bakteriellen Zellen vor, wo man bei einer Zelle oft nicht mehr als 10–15 Nanopartikel beobachtet.^[8] Bemerkenswert ist außerdem, dass die Größenverteilung der Au-Nanopartikel, die mit Hilfe von *Verticillium* sp. hergestellt wurden, viel enger ist als die von Ag-Partikeln, die sich in Bakterien bilden.^[8] Die hochaufgelöste TEM-Dünnschnittaufnahme (Abbildung 3D) zeigt überwiegend kugelförmige Au-Nanopartikel und nur wenige dreieckige und sechseckige Partikel, außerdem ist die cytoplasmatische Membran gut zu erkennen sowie im Cytoplasma ein großer quasi-hexagonaler Goldpartikel.

Das ganze Potential bei der Verwendung von Mikroorganismen zur Synthese nanoskalierter Stoffe kann erst dann genutzt werden, wenn die Fähigkeit der Zellen, sich zu vermehren, (und damit große Oberflächen mit Nanomaterialien zu bedecken) durch die Gegenwart von Metallionen nicht gefährdet wird. Deshalb wurde eine kleine Anzahl von *Verticillium*-Zellen mit Au-Nanopartikeln aus dem Biofilm entfernt und in ein Kulturmedium auf eine Agarplatte aufgebracht. Innerhalb einer Woche hatten die Pilzzellen sich soweit vermehrt, dass sie die Oberfläche der Agarplatte (Durchmesser 8 cm) bedeckten (siehe Bild in den Hintergrundinformationen), dies zeigt deutlich, dass die AuCl_4^- -Ionen und die Au-Nanopartikel nicht zum Zelltod führen.

Der genaue Mechanismus der Bildung von Au-Nanopartikeln durch die Reaktion mit den Pilzzellen versteht man zwar noch nicht, doch auf der Grundlage unserer und anderer Ergebnisse nehmen wir folgendes an: Esumi et al. zeigten, dass am Zucker vollständig substituierte (Amidoamin)-Dendrimere AuCl_4^- -Ionen spontan reduzieren, dabei bilden sich

an Dendrimere gebundene Au-Nanopartikel.^[14] Wir konnten zeigen, dass AuCl_4^- -Ionen durch Silanolgruppen reduziert werden und das Au-Nanopartikel in den Poren mesoporöser MCM-41-Silicat-Matrizen eingefangen werden.^[15] Um die Reduktion von AuCl_4^- -Ionen durch Zucker in der Zellwand auszuschließen, reduzierten wir Metallionen mit verschiedenen Pilzarten, z.B. *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* und *Curvularia lunata*, auf die gleiche Weise wie mit *Verticillium* sp. In diesen Fällen konnte man keine intrazelluläre Reduktion der AuCl_4^- -Ionen beobachten, so dass ein unspezifischer Mechanismus für das Wachstum der Nanopartikel ausgeschlossen wird. Auch dass der größte Teil der Nanopartikel sich an der cytoplasmatischen Membran der *Verticillium*-Zellen (Abbildung 3) bildet, lässt die Rolle von Zellwand-Zuckern bei der Reduktion von AuCl_4^- -Ionen unwahrscheinlich erscheinen. Da sich die Nanopartikel auf der Oberfläche der Pilzzellen bilden und nicht in der Lösung, gehen wir davon aus, dass im ersten Schritt die AuCl_4^- -Ionen auf der Zelloberfläche eingefangen werden. Dies könnte durch elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Gruppen (z.B. Lysinseitenketten) von Enzymen geschehen, die sich in der Zellwand der Mycelien befinden. Danach werden die Au-Ionen durch Enzyme in der Zellwand reduziert, was zur Aggregation der Metallatome und zur Bildung der Nanopartikel führt. Die TEM-Analysen von Dünnschnitten haben gezeigt, dass sich einige Nanopartikel auch auf der cytoplasmatischen Membran befinden (Abbildung 3B, D); dies deutet daraufhin, dass einige der AuCl_4^- -Ionen/kleinen Au-Partikel durch die Zellwand diffundieren und sich dann auf der cytoplasmatischen Membran befinden. Möglicherweise sind auch Enzyme der cytoplasmatischen Membran an der Reduktion von Au-Ionen beteiligt. Zurzeit untersuchen wir die Struktur einzelner *Verticillium*-Zellen im Detail und hoffen so, den Mechanismus der Bildung von Au-Partikeln durch Reduktion von AuCl_4^- -Ionen näher zu beleuchten.

Wir konnten also zeigen, dass AuCl_4^- -Ionen durch eine *Verticillium*-Pilzart in wässriger Lösung bioreduziert werden. Die Reduktion der Edelmetallionen geschieht an der Oberfläche der Mycelien sowie an der cytoplasmatischen Membran und führt zur Bildung von Partikeln aus monodispersen Gold mit wohldefinierter Abmessung. Die Nanopartikel sind an die Oberfläche der Pilzzellen gebunden und könnten für verschiedene Anwendungen, z.B. bei der Katalyse oder als Vorstufen zur Synthese von Beschichtungen für elektronische Anwendungen, verwendet werden. Der Einsatz von Pilzzellen zur Synthese von Au-Nanopartikeln – eine „Grüne-Chemie-Methode“ – hat zahlreiche Vorteile, z.B. kann die Methode leicht im größeren Maßstab durchgeführt werden, der Prozess ist ökonomisch und man kann große Oberflächen überziehen, indem man die Mycelien auf ihnen in geeigneter Weise wachsen lässt. Der Übergang von Bakterien zu Pilzen als ein Werkzeug zum Aufbau natürlicher „Nano-Fabriken“ bringt den zusätzlichen Vorteil, dass Verarbeitung und Umgang mit der Biomasse sich viel einfacher gestalten würde. Außerdem weiß man, dass Pilze im Vergleich zu Bakterien viel mehr Proteine ausscheiden und somit die Produktivität dieses Biosyntheseansatzes beträchtlich steigern. Gegenwärtig wird die Anwendung solcher „Bio-Nano-Gemische“ in der Katalyse und in der Elektronik untersucht.

Experimentelles

Der acidophile Pilz *Verticillium* sp. wurde aus Taxus-Pflanzen isoliert und auf Kartoffelstärke/Agar-Kultursubstraten bei 25 °C gehalten. Die Pilze wurden in 500 mL Erlenmeyer-Kolben gefüllt mit 100 mL MGY-P-Medium (Malz-Extrakt (0.3 %), Glucose (1.0 %), Hefe-Extrakt (0.3 %), Pepton (0.5 %)) gezogen und bei 25–28 °C 96 h lang (200 U/min) geschüttelt. Dann wurden die Mycelien von der Kulturbrohe durch Zentrifugieren (5000 U/min) bei 10 °C innerhalb von 20 min abgetrennt und anschließend dreimal mit sterilem, destilliertem Wasser gewaschen. Ein Teil der Mycelien-Masse (10 g) wurde in sterilem, destilliertem Wasser (100 mL) in konischen 500 mL-Kolben bei pH = 5.5–6.0 resuspendiert und dann mit 100 mL einer wässrigen 10^{-4} M HAuCl_4 -Lösung versetzt. Die Mischung wurde in einer Schüttelapparatur (200 U/min) bei 28 °C für 72 h gehalten. Der Verlauf der Biotransformation wurde sowohl optisch als auch durch Messung von UV/Vis-Spektren der Pilzzellen verfolgt. Die Filme der Pilzzellen (vor und nach der 72-stündigen Behandlung mit AuCl_4^- -Ionen) für die Aufnahme der UV/Vis-Spektren, Röntgenbeugungsspektren und SEM-Aufnahmen wurden durch Casting der Pilzzellen auf Quarz erzeugt, anschließend wurden die Si(111)-Substrate und die Filme in einem N_2 -Strom vollständig getrocknet. Die UV/Vis-Messungen der Filme auf Quarz wurden mit einem Doppelstrahl-Spektrophotometer von Shimadzu (Modell UV-1601PC) in Reflexion bei einer Auflösung von 2 nm aufgenommen. Da die Filme mit dem Bio-Nano-Gemisch uneben waren, sind die Ergebnisse nicht quantitativ und dienen lediglich zum Nachweis von Au-Nanopartikeln in dem Biomaterial. Mit dem gleichen Instrument wurden auch UV/Vis-Spektren wässriger HAuCl_4 -Lösungen nach der 72-stündigen Reaktion mit den *Verticillium*-Zellen in Transmission aufgenommen. SEM- und EDX-Messungen der Zellen nach der Bildung der Au-Nanopartikel wurden an einem Stereoscan-440-Rasterelektronenmikroskop von Leica ausgeführt, das mit einer Phoenix-EDX-Zusatzausrüstung versehen war. Die Biofilme konnten so eingesetzt werden wie sie präpariert waren, und es erübrigte sich ein Zerstäuben von Gold oder Kohlenstoff. EDX-Spektren wurden im Punkt-Profil-Modus aufgenommen, indem man den Elektronenstrahl auf einen der Au-Nanopartikel auf der Oberfläche der Mycelien-Zellen fokussierte. XRD-Aufnahmen der Biofilme auf Si(111)-Substraten wurden im Transmissionmodus mit einem PW 1830-Instrument von Philips bei einer Betriebsspannung von 40 kV und einem Strom von 30 mA mit $\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$ -Strahlung gemessen.

Dünnschnitte von *Verticillium*-Zellen nach der Reaktion mit AuCl_4^- -Ionen in der oben beschriebenen Art wurden für TEM-Aufnahmen wie folgt vorbereitet: ungefähr 1 mm³ eines Aliquots der Biomasse wurde entnommen und in einer 2.5-proz. Lösung von Glutaraldehyd in destilliertem Wasser 2 h bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen sedimentiert (1500 U/min, 10 min) und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Ohne nochmalige Fixierung wurde das Pellet mit 30-, 50-, 70- und 90-proz. Ethanol jeweils 15 min dehydratisiert und danach zweimal in absoluten Ethanol aufgenommen. Da sich Ethanol kaum mit Epoxharzen mischt, wurde Propylenoxid als Vernetzungsmittel verwendet. Das dehydratisierte Pellet wurde 15 min mit Propylenoxid behandelt. Damit das Propylenoxid in das Harz eindringen kann, wurde dann bei Raumtemperatur über Nacht dieses Pellet in eine 1:1-Mischung aus Propylenoxid und Epon 812 gebracht. Mit einer Mischung aus dem Harz (Epon 812) und den Härtungsmitteln (DDSA: Dodecylbernsteinsäureanhydrid und MNA: „Nadic methyl anhydride“ im Verhältnis 1:1.5 wurde das Pellet in das Harz eingebettet. Hierzu gab man zwei Tropfen Tridimethylaminomethylphenol (DMP30), um den Polymerisationsprozess (bei 60 °C 3 Tage) zu beschleunigen. Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Leica Ultracut UCT) präpariert und auf Kupfer-TEM-Gitter aufgebracht (40 µm × 40 µm Maschengröße). Die Schnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat vor der TEM-Aufnahme leicht angefärbt. TEM-Messungen wurden mit einem JEOL-Modell 1200EX bei einer Beschleunigungsspannung von 60 kV ausgeführt. Eine niedrige Betriebsspannung wurde angelegt, um den Schaden an den Dünnschnitten, der durch Aufheizen durch den Elektronenstrahl entsteht, möglichst gering zu halten.

Eingegangen am 6. März 2001,
veränderte Fassung am 5. Juli 2001 [Z16723]

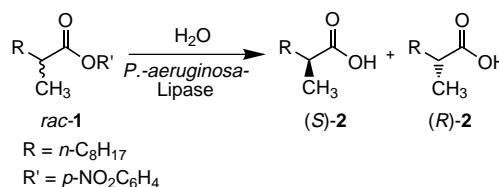
- [1] a) G. Schmid, *Clusters and Colloids. From Theory to Applications*, Wiley-VCH, New York, **1994**; b) *Nanomaterials: synthesis, properties and applications* (Hrsg.: A. S. Edelstein, R. C. Cammarata), IOP, Bristol, **1996**.
- [2] a) K. Simkiss, K. M. Wilbur, *Biomineralization*, Academic Press, New York, **1989**; b) *Biomimetic Materials Chemistry* (Hrsg.: S. Mann), VCH, New York, **1996**.
- [3] a) H. Spring, K. H. Schleifer, *System. Appl. Microbiol.* **1995**, *18*, 147; b) D. P. E. Dickson, *J. Magn. Magn. Mater.* **1999**, *203*, 46.
- [4] a) S. Mann, *Nature* **1993**, *365*, 499; b) S. Oliver, A. Kupermann, N. Coombs, A. Lough, G. A. Ozin, *Nature* **1995**, *378*, 47.
- [5] a) D. Pum, U. B. Sleytr, *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 8; b) U. B. Sleytr, P. Messner, D. Pum, M. Sara, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1099; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1034.
- [6] a) J. R. Duncan, D. Brady, B. Wilhelmi, *Methods Biotechnol.* **1997**, *2*, 91; b) J. R. Stephen, S. J. Macnaughton, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1999**, *10*, 230.
- [7] a) T. J. Beveridge, R. J. Doyle, *Metal Ions and Bacteria*, Wiley, New York, **1989**; b) T. J. Beveridge, R. G. E. Murray, *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 876; c) G. Southam, T. J. Beveridge, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1996**, *60*, 4369; d) D. Fortin, T. J. Beveridge in *Biomineralization. From Biology to Biotechnology and Medical Applications* (Hrsg.: E. Baeuerlein), Wiley-VCH, Weinheim, **2000**, S. 7.
- [8] a) T. Klaus, R. Joerger, E. Olsson, C.-G. Granqvist, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13611; b) T. Klaus-Joerger, R. Joerger, E. Olsson, C.-G. Granqvist, *Trends Biotechnol.* **2001**, *19*, 15.
- [9] R. Joerger, T. Klaus, C.-G. Granqvist, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 407.
- [10] S. Underwood, P. Mulvaney, *Langmuir* **1994**, *10*, 3427.
- [11] a) V. Patil, R. B. Malvankar, M. Sastry, *Langmuir* **1999**, *15*, 8197; b) K. S. Mayya, V. Patil, M. Sastry, *Langmuir* **1997**, *13*, 2575; c) J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 1849; d) M. D. Musick, C. D. Keating, L. A. Lyon, S. L. Botsko, D. J. Pena, W. D. Holliway, T. M. McEvoy, J. N. Richardson, M. J. Natan, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 2869.
- [12] D. V. Leff, L. Brandt, J. R. Heath, *Langmuir* **1996**, *12*, 4723.
- [13] J. W. Jeffrey, *Methods in Crystallography*, Academic Press, New York, **1971**.
- [14] K. Esumi, T. Hosoya, A. Suzuki, K. Torigoe, *Langmuir* **2000**, *16*, 2978.
- [15] P. Mukherjee, C. R. Patra, R. Kumar, M. Sastry, *PhysChemComm* **2001**, *5* (online journal), <http://www.rsc.org/physcc>.

Gerichtete Evolution eines enantioselektiven Enzyms durch kombinatorische multiple Kassetten-Mutagenese

Manfred T. Reetz,* Stephanie Wilensek, Dongxing Zha und Karl-Erich Jaeger

Erstmals 1997 gelang uns der Nachweis, dass die Methoden der gerichteten Evolution funktionaler Proteine^[1–4] auch zur Erzeugung von enantioselektiven Enzymen angewandt werden können.^[5] Die Kombination geeigneter Mutagenese- und

Genexpressionsmethoden sowie Hochdurchsatzassays zur Bestimmung der Enantioselektivität tausender Enzymmutanten bildet die Basis eines grundsätzlich neuen Konzepts auf dem Gebiet der asymmetrischen Katalyse. In nur vier Zyklen von Zufallsmutagenese auf der Basis der fehlerhaften Polymerasekettenreaktion (epPCR) und Screening von etwa 8000 Enzymvarianten konnte der Selektivitätsfaktor $E^{[6]}$ der lipasekatalysierten hydrolytischen kinetischen Racematspaltung des Esters **1** zugunsten der (*S*)-Säure **2** von 1.1 auf 11



gesteigert werden (Schema 1, links). Die epPCR-Versuche wurden mit dem Gen der bakteriellen Lipase aus *Pseudomonas aeruginosa* bei niedriger Mutationsrate entsprechend einer durchschnittlichen Zahl von einer Aminosäuresubstitution pro Enzymmolekül durchgeführt. Diese Lipase besteht aus 285 Aminosäuren, einer Anzahl, die bei der Berücksichtigung des theoretischen Proteinsequenzraumes von Bedeutung ist.^[7] Da weitere epPCR-Zyklen nur kleine Steigerungen der Enantioselektivität zur Folge hatte, wurde eine Sättigungsmutagenese an den durch Aminosäuresequenzierung identifizierten empfindlichen Stellen („hot spots“) der verbesserten Enzymvarianten durchgeführt, was zur Bildung der Variante B mit deutlich erhöhter Enantioselektivität ($E = 20$) führte (Schema 1, links).^[8] Im Zuge eines weiteren epPCR-Zyklus wurde Variante C ($E = 25$) mit fünf Mutationen (V47G, V55G, S149G, S155F und S164G) erhalten (Schema 1, links). Jedoch hat die Strategie der alternierenden epPCR und Sättigungsmutagenese Grenzen, denn weitere Versuche dieser Art führten zu keinen merklichen Verbesserungen. Wir zeigen nun erstmals, dass die Anwendung rekombinanter Methoden ein ausgezeichnetes Instrumentarium zur Erhöhung der Enantioselektivität von Enzymen ist.

Da die bislang beste Enzymvariante C durch sequentielle Anreicherung kleiner struktureller Änderungen (jeweils nur ein Aminosäureaustausch) entwickelt wurde, könnte eine Rückzüchtung („back-crossing“) unter Verwendung von DNA-Shuffling^[3] die funktionellen Eigenschaften des Enzyms verbessern, weil dadurch die Möglichkeit der Eliminierung negativer Mutationen besteht. Wurde jedoch das Wildtyp-Gen und das Gen, welches die Enzymvariante C kodiert, im DNA-Shuffling verwendet, so ließen sich keine signifikanten Verbesserungen nachweisen. Mit dem Ziel, einen neuen Ausgangspool an Mutationen zu erstellen und zu nutzen, die nicht ausschließlich aufeinander aufbauen, wurde zunächst das Wildtyp-Gen einer epPCR mit höherer Fehlerrate entsprechend drei Aminosäuresubstitutionen pro Enzymmolekül unterworfen.^[7]

Im Screening wurden 15000 Varianten untersucht, von denen mehrere eine erhöhte (*S*)-Selektivität relativ zum Wildtyp aufwiesen, z.B. Variante D (mit den Mutationen S53P, C180T und G272A; $E = 3$) und Variante E (D20N,

[*] Prof. Dr. M. T. Reetz, S. Wilensek, Dr. D. Zha
Max-Planck-Institut für Kohlenforschung
Kaiser-Wilhelm-Platz 1, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
Fax: (+49) 208-306-2985
E-mail: reetz@mpi-muelheim.mpg.de
Priv.-Doz. Dr. K.-E. Jaeger
Lehrstuhl für Biologie der Mikroorganismen
Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)