

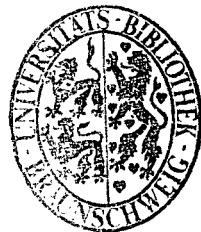
4543 - 945 8

**Biotechnologische Anwendung des Enzyms Phospholipase D aus Weißkohl
zur katalytischen Umwandlung von Lecithinen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von Martin Reuter aus Wilhelmshaven



Hamburg 1997

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2.	BESCHREIBUNG DER SUBSTRAT- UND ENZYMEIGENSCHAFTEN	4
	2.1 PHOSPHOLIPIDE	4
	2.1.1 EIGENSCHAFTEN DER PHOSPHOLIPIDE	4
	2.1.1.1 VORKOMMEN UND GEWINNUNG	4
	2.1.1.2 SYNTHESE	5
	2.1.2 BIOLOGISCHE FUNKTION DER PHOSPHOLIPIDE	5
	2.1.2.1 AUFBAU DER PHOSPHOLIPIDMEMBRANE	5
	2.1.2.2 HYDRATATION, IONEN- UND PROTEINBINDUNG	6
	2.1.2.3 ROLLE DER PHOSPHOLIPIDE FÜR DIE ZELLFUNKTION	7
	2.1.2.4 PHOSPHOLIPIDVESIKEL	7
	2.1.3 PHYSIKALISCH-CHEMISCHES VERHALTEN DER PHOSPHOLIPIDE IN LÖSUNG	8
	2.1.3.1 ANWENDUNG VON DETERGENZIEN	8
	2.1.3.2 DAS KONZEPT DER KRITISCHEN MICELL KONZENTRATION	8
2.2	PHOSPHOLIPASE D	10
	2.2.1 DIE PLD-KATALYSIERTEN REAKTIONEN	11
	2.2.2 PHYSIOLOGISCHE FUNKTION	11
	2.2.3 ANALYTIK DER PLD-KATALYSE	12
	2.2.4 VORKOMMEN UND GEWINNUNG	13
	2.2.5 REAKTIONSBEDINGUNGEN	13
	2.2.6 ZUR IMMOBILISIERUNG DER PLD	15
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	17
3.1	UNTERSUCHUNG DER EIGENSCHAFTEN NATIVER PHOSPHOLIPASE D	17
	3.1.1 DARSTELLUNG	17
	3.1.2 CHARAKTERISIERUNG	18
	3.1.3 AKTIVITÄT	19
	3.1.4 STABILITÄT	20
3.2	ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG DES KONDUKTOMETRISCHEN MEßVERFAHRENS	24
	3.2.1 GRUNDLAGEN DER KONDUKTOMETRISCHEN ANALYSE DER REAKTIONEN AN PHOSPHOLIPIDEN	24
	3.2.1.1 REAGENZIEN	24

3.2.1.2 LADUNGSBILANZ	25	3.7.3 KOVALENTE PLD-IMMOBILISIERUNG UND DEREN OPTIMIERUNG	80
3.2.2 OPTIMIERUNG DER ANALYTIK	28	3.7.3.1 VORVERSUCHE ZUR KOVALENTEN PLD-IMMOBILISIERUNG AN POLYMERTRÄGERN	81
3.2.2.1 MEßANORDNUNG	28	3.7.3.2 VORVERSUCHE ZUR ADSORPTIVEN PLD-IMMOBILISIERUNG AN CAB-O-SIL™-TRÄGERMATERIALIEN	83
3.2.2.2 MEßGENAUIGKEIT	28	3.7.3.3 VORVERSUCHE ZUR KOVALENTEN PLD-IMMOBILISIERUNG AN CAB-O-SIL™-TRÄGERMATERIALIEN	83
3.2.3 LEITFÄHIGKEIT UND UMSATZ	29	3.7.3.4 VERGLEICH DER TRÄGERMATERIALIEN FÜR DIE KOVALENTE PLD- IMMOBILISIERUNG	84
3.3 REAKTIONSBEDINGUNGEN NATIVER PHOSPHOLIPASE D	32	3.7.4 STABILITÄT UND LAGERUNG IMMOBILISierter PLD	85
3.3.1 SUBSTRATLÖSUNG	32	3.7.5 REAKTIONSBEDINGUNGEN IMMOBILISierter PLD	88
3.3.1.1 ORGANISCHE LÖSUNGSMITTEL	32	3.7.5.1 AN CAB-O-SIL ADSORPTIV GEBUNDENE PLD	88
3.3.1.2 DETERGENZIEN	33	3.7.5.2 AN CAB-O-SIL KOVALENT GEBUNDENE PLD	91
3.3.1.3 DAS SUBSTRAT-DETERGENS-VERHÄLTNIS	34	3.7.6 KINETIK IMMOBILISierter PLD	94
3.3.1.4 REAKTIONEN MIT ROHLECITHIN	36	3.7.7 KOVALENTE PLD-IMMOBILISIERUNG UNTER VARIATION DES SPACERS	96
3.3.1.5 CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATLÖSUNG	37	3.7.7.1 BINDUNG OHNE SPACER	96
3.3.2 REAKTIONSLÖSUNG	40	3.7.7.2 VERGLEICH DER IMMOBILISATE	97
3.3.2.1 PLD-KONZENTRATION	40	3.7.7.3 VERGLEICH DER REAKTIONSBEDINGUNGEN	99
3.3.2.2 COFAKTOR	40	3.7.8 PLD-KATALYSATORPERLEN	103
3.3.2.3 PH-WERT	42	3.7.9 PLD-IMMOBILISIERUNG AUF DELOXAN™-TRÄGERMATERIALIEN	104
3.3.2.4 PUFFERMEDIEN	43	3.7.10 TRANSPHOSPHATIDYLIERUNG MIT IMMOBILISierter PLD	105
3.3.2.5 REAKTIONSTEMPERATUR	45	3.7.11 FLIEß-INJEKTIONS-ANALYSE	106
3.4 INKUBATION DER PHOSPHOLIPASE D	47	3.7.11.1 DAS KONZEPT DER FLIEß-INJEKTIONS-ANALYSE	106
3.5 KINETIK	52	3.7.11.2 CHARAKTERISIERUNG UND OPTIMIERUNG DES SYSTEMS	107
3.5.1 DIE ANGEWANDTEN ENZYMKINETISCHEN MODELLE	53	3.7.11.3 AUSWERTUNG DER DATEN	109
3.5.2 KINETIK NATIVER PLD	55	3.7.11.4 VERGLEICH DER PLD-IMMOBILISATE	112
3.5.3 KINETIK INKUBierter PLD	61	4. EXPERIMENTELLER TEIL	119
3.6 TRANSPHOSPHATIDYLIERUNG	63	5. ZUSAMMENFASSUNG	130
3.6.1 REAKTIONSBEDINGUNGEN DER TRANSPHOSPHATIDYLIERUNG	64	6. LITERATUR	134
3.6.2 KINETIK DER TRANSPHOSPHATIDYLIERUNG	65	7. ANHANG	145
3.7 IMMOBILISIERUNG DER PHOSPHOLIPASE D	66	VERZEICHNIS IM TEXT NICHT AUFGEFÜHRTER DATEN	
3.7.1 DAS KONZEPT DER ENZYMMOBILISIERUNG	66	ENTSORGUNG DER CHEMIKALIEN	
3.7.2 ENZYM-TRÄGERMATERIALIEN	68	LEBENS LAUF	
3.7.2.1 GRUNDMATERIALIEN	69		
3.7.2.2 MODIFIZIERUNG DES CAB-O-SIL™-TRÄGERMATERIALS	70		
3.7.2.3 CHARAKTERISIERUNG DES MODIFIZIERTEN CAB-O-SIL™-TRÄGERS	73		
3.7.2.4 MATRIXEINHÜLLUNG DER PLD	77		
3.7.2.5 DER DELOXAN™-TRÄGER	79		