



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 602 17 536 T2** 2007.10.25

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 448 840 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **602 17 536.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB02/04567**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 777 717.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/033813**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.10.2002**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **24.04.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.08.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **10.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **25.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **D06M 16/00** (2006.01)

D06M 101/06 (2006.01)

D06M 15/03 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C08B 37/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0103446 **16.10.2001** **SE**

0103447 **16.10.2001** **SE**

0202310 **23.07.2002** **SE**

(73) Patentinhaber:

Swetree Technologies AB, Umea, SE

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR**

(72) Erfinder:

**TEERI, T., Tuula, S-183 56 Täby, SE; BRUMER,
Harry, S-121 46 Johanneshov, SE**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM MODIFIZIEREN VON POLYMEREN KOHLENHYDRATMATERIALIEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

FACHGEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die Erfindung betrifft ein chemisch-enzymatisches Verfahren zur Modifizierung von polymeren Kohlenhydratmaterialien, insbesondere zur Verwendung einer aktivierten Polymergrenzfläche, um spezifische chemische Gruppen auf die Oberfläche eines polymeren Kohlenhydratmaterials anzuhängen, um die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Materials zu verändern, sowie Materialien, die durch dieses Verfahren hergestellt werden, und Produkte, die diese Materialien umfassen.

TECHNISCHER HINTERGRUND UND STAND DER TECHNIK

[0002] Fast alle Zellulosematerialien, die in den Papier-, Karton- und Textilindustrien verwendet werden, werden entweder vor (z.B. Holzstoff, Baumwollfasern, etc.) oder nach der Erzeugung des Produkts in seiner endgültigen dreidimensionalen Form (z.B. Papierblätter, gewölbter Karton, Gewebe, etc.) chemisch behandelt, um die Oberflächeneigenschaften dieser Materialien zu verändern. Die Behandlung der Zellulosematerialien mit chemischen Zusatzstoffen an verschiedenen Zeitpunkten des Herstellungsprozesses führt zu dramatischen Veränderungen in den Eigenschaften der Faseroberfläche. Zum Beispiel wird Carboxymethylzellulose, ein anionisches Zellosederivat, zu Holzstoff zugegeben, um die Retention von allgemein verwendeten kationischen Füllstoffen und Leimungsmitteln zu erhöhen.

[0003] Auf die gleiche Weise werden organische Leimungsmittel wie z.B. Alkylketendimer und Alkylbernsteinsäureanhydrid während der Erzeugung von Papierblättern zugegeben, um die Hydrophobizität und die Wirkung der Blattbedruckbarkeit zu erhöhen. Bei der Verwendung von Zellulosematerialien als Verpackungsmittel für Flüssigkeiten und Lebensmittel werden Papier und Karton häufig mit einem Thermoplastik wie z.B. Polyethylen laminiert, um eine undurchdringbare Grenzschrift für die wässrigen Lösungen zur Verfügung zu stellen. Sowohl Textilwaren als auch Papierblätter werden routinemäßig gefärbt oder bedruckt, was ein weiteres Beispiel einer Modifikation der Oberfläche ist. Viele der derzeitigen Technologien bei Wertpapieren und Verpackungen (Banknoten, verfolgbare Dokumente und Verpackungen) sind auf die Oberflächenbehandlungen mit spezifischen Chemikalien angewiesen, die später analysiert werden können, um die Authentizität zu bestimmen. Des weiteren besitzen zellulosehaltige Materialien ein großes Potential in der Polymerindustrie für einen weiten Anwendungsbereich wie z.B. als Füllstoffe, Lamine und Panelprodukte, holzpolymere Verbundstoffe, polymere Verbundstoffe, Legierungen und Mischungen und Zellosederivate (zellulosehaltige Stoffe).

[0004] Aufgrund einiger Engpässe bei ihrer Herstellung oder Leistung ist die Verwendung von solchen Verbundstoffen jedoch immer noch begrenzt. In den vergangenen Jahren stieg der Bedarf für oberflächenmodifizierte Füllstoffe, welche die Eigenschaften des ursprünglichen Polymers verbessern und die Kosten oder das Gewicht des fertigen Produkts vermindern. Die Optimierung der Bindung zwischen den beiden Flächen der Faser und der Polymergrundsubstanz ist ein wichtiger Aspekt in Bezug auf die optimale mechanische Leistung und Beständigkeit der faserverstärkten Verbundstoffe. Die Qualität der Faser-Grundsubstanz-Grenzfläche ist für die Anwendbarkeit von natürlichen Fasern als Verstärkung für Kunststoffe von Bedeutung. Weil die Fasern und die Grundsubstanzen chemisch unterschiedlich sind, wird eine starke Haftung an ihren Grenzflächen für einen wirksamen Transfer von Belastungs- und Bindungsverteilung überall an der Grenzfläche benötigt. Neue Verfahren zur Derivatisierung von Zellulose werden daher benötigt, um die Adhäsion der Faser-Grundsubstanz für die Polymerverarbeitung, für Klebstoffe und für neue Verbundmaterialien zu verbessern.

[0005] Der derzeit erhältlichen Technologie zur Modifikation der Oberfläche einer Zellulosefaser durch physikalische oder chemische Behandlungen fehlt ein hohes Maß an Kontrolle in der Art, durch welche die Wirkstoffe auf die Faseroberfläche eingearbeitet werden. Eine besonders ernste Schwäche der direkten chemischen Modifizierung von Zellulose ist, dass die meisten chemischen Substanzen in die Faserstruktur eindringen und dass die chemischen Modifizierungen innerhalb der Faser stattfinden, was zu dem Verlust der Struktur und der Eigenschaften der Faser führt. Als Katalysatoren sind Enzyme hochspezifisch in ihrer Wirkungsweise und bieten daher eine attraktive Alternative zu den herkömmlichen Verfahren. Zusätzlich bedeutet die proteinöse Natur dieser Katalysatoren, dass sie leicht biologisch abbaubar und umweltfreundlich sind. Des weiteren sind Enzyme naturgemäß oberflächenaktiv und überwinden daher das Problem des Eindringens in die Faserstruktur.

[0006] Abbauenden Enzymen, die den Zusammenbruch ihrer Substrate durch die Spaltung von chemischen Bindungen katalysieren, wurde über die letzten 15 Jahre für die Behandlung von Zellulosematerialien eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt, insbesondere in der Faserstoff- und Papierindustrie. Ligninasen werden

zum Beispiel verwendet, um die Bleichfähigkeit und den Weißgehalt von Faserstoffen durch das Entfernen von Lignin zu verbessern, während eine Behandlung mit Xylanase das Entfernen von erneut gefällttem Lignin während des Siedeverfahrens erleichtert. Gleichmaßen werden Cellulasen in der Textilindustrie im großen Maße verwendet, um die Fertigstellung von Bekleidung zu bewirken. Die Behandlung von Jeansstoff mit Cellulose ersetzt zum Beispiel weitgehend das mechanische Rotieren mit Bimssteinen, um so genannte „Stone-washed“-Effekte zu verursachen. Cellulasen sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil bei einer Anzahl von Waschdetergenzien, in denen sie als Mittel zur Verhinderung der Fusselbildung durch das enzymatische Abschneiden von ausgefransten Baumwollfasern wirken.

[0007] Trotz der weltverbreiteten Verwendung von abbauenden Enzymen bei der Modifikation von Zellulosefasern, ist die Verwendung von Enzymen, die in die entgegengesetzte Richtung wirken, das heißt in Richtung der Synthese, wenig entwickelt. Dies liegt hauptsächlich daran, dass nur wenig über die Enzyme bekannt ist, die für die Synthese von Polysacchariden wie z.B. Zellulose und Hemizellulose verantwortlich sind. Die Mehrzahl dieser Enzyme, die als Nucleotid-Zucker-abhängige Transferasen bekannt sind, sind zellmembrangebunden, wodurch ihre Isolation und Charakterisierung schwierig ist. Des weiteren ist die Herstellung der aktivierten Zuckermoleküle teuer. Die Verwendung von Nucleotid-Zucker-abhängigen Transferasen bei der Modifikation von Zellulosefasern ist des weiteren durch die Tatsachen begrenzt, dass die chemische Modifikation des Zuckerrings der natürlichen Substrate, die letztendlich in die wachsende Polysaccharidkette eingebaut werden, nicht toleriert wird. Neben Transferasen können Glycosylhydrolasen wie z.B. bestimmte β -Glycosidasen oder Cellulasen ebenfalls zur Synthese von Kohlenhydrat verwendet werden, wobei ein beibehaltender Reaktionsmechanismus verwendet wird, wenn Wasser von dem Reaktionsgemisch ausgeschlossen wird. Wenn die Reaktion in organischen Lösungsmitteln durchgeführt wird, katalysieren diese Enzyme Transglycosylierungsreaktionen, die zu einer Erzeugung anstelle eines Abbaus von glykosidischen Bindungen führt.

[0008] Die Notwendigkeit, organische Lösungsmittel zu verwenden, ist jedoch ein deutlicher Nachteil dieses Verfahrens. Des weiteren können beibehaltende Glycosydasen gentechnisch hergestellt werden, um ihre katalytischen Nucleophile zu entfernen. Ein solches Enzym kann kein kovalentes Enzym-Substrat-Zwischenprodukt erzeugen, das für die Hydrolyse benötigt wird, aber es kann stattdessen die Kondensierung von geeigneten Empfänger- und Spenderzuckern katalysieren, wenn der Spenderzucker fluoridiert ist, um den Übergangszustand der Reaktion nachzuahmen. Wie mit den Nucleotid abhängigen Glycosyltransferasen ist der Nachteil die Notwendigkeit von aktivierten Substraten, welche die Verwendung dieser Technologie in Anwendungen mit einem großen Maßstab begrenzen.

[0009] Daher besteht ein Bedarf, Verfahren für das Einbringen einer großen Auswahl von chemischen Gruppen mit verschiedenen Funktionalitäten auf polymere Kohlenhydratmaterialien zu entwickeln und insbesondere auf Zellulosefasern, ohne die Unversehrtheit der Faserstruktur zu gefährden. Idealerweise sollte das Verfahren ein oder mehrere Enzyme umfassen, die ohne eine hydrolytische oder eine andere abbauende Aktivität sind, da diese gegen die Versuche wirken würde, chemische Gruppen auf den Fasern anzuhängen.

[0010] EP 562 832 offenbart ein Gen, das eine Endoxyloglucan-Transferase codiert, und schlägt dieses Gen für die Verwendung bei der Regulierung der Morphologie einer Pflanze vor. Die Offenbarung erwähnt ebenfalls ein Verfahren zum Umlagern von Xyloglucan-Molekülen, das die Spaltung einer D-Glycosylbindung in einem Xyloglucan-Molekül durch die Verwendung einer Endoglucan-Transferase und die Bindung des so erhaltenen reduzierenden Endes des Xyloglucan-Molekül-Segments an die D-Glucose des nicht reduzierenden Endes eines anderen Xyloglucan-Moleküls umfasst. Durch die mehrfache Wiederholung können Xyloglucan-Moleküle mit einer willkürlichen Struktur aufgebaut werden, von denen behauptet wird, dass sie für die Synthese von chimären Polysacchariden anwendbar sind.

[0011] U.S. 5,968,813 (eine Weiterführung von PCT/DK96/00538, veröffentlicht als WO 97/23683) offenbart ein Verfahren zur Verbesserung der Stärkeigenschaften von Zellulosematerialien, gemäß der ein Zellulosematerial mit einer Xyloglucan-Endotransglycosylase (XET) in einem wässrigen Medium in Kontakt gebracht wird. Die Behandlung mit XET soll die Vernetzung zwischen den Zellulosefasern erhöhen, wodurch die Stärke und/oder Beibehaltung der Form des Zellulosematerials verbessert wird.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung eines polymeren Kohlenhydratmaterials (PCM), wobei das Verfahren einen Bindungsschritt umfasst, in dem eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität an das Kohlenhydratmaterial mit Hilfe eines Kohlenhydrat-Bindemoleküls gebunden wird, welches die chemische Gruppe trägt und ein lösliches Kohlenhydratpolymer (SCP) umfasst, das eine He-

mizellulose umfasst, wobei das Bindemolekül an das PCM binden kann.

[0013] In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren die Schritte, ein Kohlenhydratpolymerfragment (CPF) zur Verfügung zu stellen, das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität umfasst, die typischerweise hydrophob, geladen, reaktiv sein kann. Das CPF wird mit einem löslichen Kohlenhydratpolymer (SCP) unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die zu der Erzeugung eines Komplexes zwischen dem CPF und mindestens einem Teil des SCP führt. Das PCM wird schließlich modifiziert, indem man das SCP an das PCM binden lässt.

[0014] Die vorliegende Erfindung betrifft des weiteren Materialien und Zusammensetzungen, die durch das Verfahren hergestellt werden, und Materialien und Zusammensetzungen, die den Komplex aus dem PCM und einem SCP umfassen, das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität umfasst.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Modifizierung eines polymeren Kohlenhydratmaterials (PCM), wobei das Verfahren einen Bindungsschritt umfasst, in dem eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität an das Kohlenhydratmaterial mit Hilfe eines Kohlenhydrat-Bindemoleküls gebunden wird, welches die chemische Gruppe trägt und ein lösliches Kohlenhydratpolymer (SCP) umfasst, das eine Hemizellulose umfasst, wobei das Kohlenhydrat-Bindemolekül an das PCM binden kann.

[0016] Eine Ausführungsform dieses Verfahrens wird in [Fig. 1](#) dargestellt, wobei das nicht modifizierte PCM (1) und das Kohlenhydrat-Bindemolekül (CLM) (2) gezeigt werden, wobei das CLM (2) mindestens einen Teil eines SCP (3) und eine chemische Gruppe (5) umfasst und gegebenenfalls mit einem Kohlenhydratpolymerfragment (CPF) (4), das die chemische Gruppe umfasst, als Komplex vorliegt. Weil das Kohlenhydrat-Bindemolekül an das PCM binden kann, wird die Bindung stattfinden, wenn es mit dem PCM in Kontakt gebracht wird.

[0017] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung umfasst das Verfahren die Schritte:

- (i) Bereitstellen eines Kohlenhydratpolymerfragments (CPF), das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität umfasst,
- (ii) Inkontaktbringen des CPF, das die chemische Gruppe umfasst, mit einem löslichen polymeren Kohlenhydrat (SCP) unter Bedingungen, die zu der Erzeugung eines Komplexes führen, der aus dem CPF, das die chemische Gruppe umfasst, und dem SCP besteht, wobei CPF und SCP zusammen das Kohlenhydrat-Bindemolekül (CLM) erzeugen, und
- (iii) Inkontaktbringen des CLM mit dem PCM, um unter Bedingungen modifiziert zu werden, in denen das CLM an das PCM bindet, um das modifizierte polymere Kohlenhydratmaterial zu erhalten.

[0018] Der Ausdruck "polymere Kohlenhydratmaterialien", der mit "PCM" abgekürzt wird, betrifft ein Material, das ein wasserunlösliches, polymeres Kohlenhydratmaterial und/oder ein wasserlösliches polymeres Kohlenhydratmaterial umfasst. Das PCM kann jedes Material sein, das vollständig oder teilweise aus sich wiederholenden Einheiten von einem oder von mehreren Monosacchariden aufgebaut ist. Solche PCMs sind häufig Verbundstoffe mit zwei oder mit mehreren unterschiedlichen Arten von polymeren Kohlenhydraten oder ein Kohlenhydratpolymer und ein anderes Polymer wie z.B. ein Protein. Das PCM kann ein Chitin umfassen, das ein Polymer von N-Acetylglycosamin ist, welches häufig Komplexe mit Proteinen oder anderen Polysacchariden wie z.B. Mannan erzeugt.

[0019] Das PCM kann ebenfalls Zellulose umfassen. Zellulose kann ein Homopolymer aus β -1,4-gebundenen Glucoseeinheiten sein. Die langen Homopolymere der Glucose (z.B. 8–15000 Glucoseeinheiten) sind aufeinander durch Wasserstoffbindungen aufgestapelt, wodurch sie ein unlösliches Material bilden. Solche Zellulosematerialien können vollständig kristallin sein oder sie können in einer ungeordneten, amorphen Form vorliegen oder sie können ein Gemisch aus den beiden Formen sein. Sie können ebenfalls durch ein erstes Löslichmachen des unlöslichen Zellulosematerials und der anschließenden Regeneration hergestellt werden, um ein unlösliches Zellulosematerial mit einer unterschiedlichen Kettenorganisation (Zellulose II) zu erzeugen.

[0020] In den Zellwänden von Pflanzen erzeugt die Zellulose Komplexe mit anderen löslichen Polysacchariden der Zellwand wie z.B. mit der Hemizellulose und dem Pektin. Beispiele von PCMs, die Zellulose- und/oder Zellulose/Hemizellulose-Verbundstoffe umfassen, sind Zellulosefasern, Zellulosemikrofibrillen (Pflanzenhaare), Papier- und Zellstoffprodukte und zellulosehaltige Textilwaren.

[0021] Wie aus der Beschreibung und den Beispielen ersichtlich sein wird, betrifft der Ausdruck PCM alle Strukturen in kleinen Polymeren (z.B. in Dimensionen, die kleiner als ein nm sind), großen Polymeren (z.B. in Dimensionen von 0,1-1000 nm), Aggregaten von Polymeren (z.B. in Dimensionen von 1-10.000 nm), Fasern (z.B. in Dimensionen von 0,1-100.000 µm), Aggregaten von Fasern (z.B. in Dimensionen von 0,00001-1000 m).

[0022] Der Ausdruck "Zellulosefaser" betrifft eine Pflanzenzelle, die aus einer äußeren primären Zellwand besteht, die in einer dickeren und komplexeren sekundären Zellwand eingekapselt ist. Die wesentliche Faserkomponente ist Zellulose, welche die tragende Komponente der Zellwände der Pflanze ist. In Abhängigkeit von verschiedenen Aufschlussequenzen können die Zellstofffasern das Material der primären Zellwand enthalten oder nicht. Der Ausdruck "Zellulosemikrofibrillen" betrifft die elementaren Einheiten des Zellulosekristalls, die durch Pflanzen oder durch andere Organismen hergestellt werden. Zellulosemikrofibrillen können aus zellulosehaltigen Pflanzenfasern hergestellt werden oder einfacher aus Kulturen von Bakterien, die Zellulose synthetisieren, wie z.B. *Acetobacter xylinum* spp.

[0023] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können die Zellulosefasern aus einer einjährigen Pflanze wie zum Beispiel Flachs, Hanf oder Getreide oder aus einer mehrjährigen Pflanze wie z.B. Baumwolle, Pappel, Birke, Weide, Eukalyptus, Lärche, Kiefer oder Fichte extrahiert werden. Zellulosemikrofibrillen können von Bakterienkulturen wie z.B. *Acetobacter xylinum* spp. erhalten werden. Ein Papier- oder Zellstoffprodukt kann aus jedem zellulosehaltigen Material, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, bestehen. Dieses schließt Materialien wie z.B. Holz- oder Faserstofffasern, verschiedene chemische Faserstoffe, mechanische oder thermomechanische Faserstoffe, Flusenfasern, Filterpapiere, Feinpapiere, Zeitungspapier, regenerierte Zellulosematerialien, Deckenkartons, Taschentücher und andere Hygieneprodukte, Sack- und Packpapiere, andere Verpackungsmaterialien, Pressspan und Hartpappe sowie die Oberflächen von festen Holzprodukten oder Holz- und Faserverbundstoffe ein, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0024] Weitere Beispiele von PCM umfassen polymere Kohlenhydratmaterialien, die in medizinischen Anwendungen verwendet werden, wie z.B. als Membrane, Gele, Kügelchen, die in der Diagnostik oder in der Separationstechnologie verwendet werden, und Membrane, die in elektronischen Anwendungen verwendet werden. Das Faserprodukt kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung auch eine neue Art von Verbundstoff mit anderen natürlichen oder synthetischen Polymeren oder Materialien sowie elektronischen Verbindungen sein.

[0025] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist ein Zellulosestoff jeder zellulosehaltige Stoff, der auf dem Fachgebiet bekannt ist, wie z.B. Baumwolle, Viskose, Kupfer-, Acetat- und Triacetatfasern, Modal, Kunstseide, Leinen, Tencel®, etc., oder Gemische davon oder Gemische von jedem dieser Fasern oder Gemische von jedem dieser Fasern zusammen mit synthetischen Fasern oder Wolle wie z.B. als Gemische von Baumwolle und Elasthan (Stretchjeansstoff), Tencel® und Wolle, Viskose und Polyester, Baumwolle und Polyester und Baumwolle und Wolle.

[0026] Der Ausdruck "lösliche Kohlenhydratpolymere", der mit (SCP) abgekürzt wird, betrifft Polymere, die ein oder mehrere verschiedene Monosaccharide oder deren Derivate betreffen, die in wässrigen oder organischen Lösungsmitteln gelöst werden können. Beispiele schließen Polysaccharide ein, die als Hemizellulose klassifiziert werden (solche Kohlenhydratpolymere, die nicht nur aus $\beta(1-4)$ -gebundenen Glucoseeinheiten zusammengesetzt sind, das heißt Zellulose), Pektine (Polyuronsäuren und -ester) und Stärken ($\alpha(1-4)$ -gebundene Polyglucose mit oder ohne $\alpha(1-6)$ -Seitenkettenverzweigung). Xyloglucan, das ein Polysaccharid ist, das aus einem $\beta(1-4)$ -gebundenen Polyglucose-Grundgerüst zusammengesetzt ist, das mit $\alpha(1-6)$ -Xyloseresten dekoriert ist, die selber weiter mit anderen Sacchariden wie z.B. Fucose und Arabinose substituiert sein können, ist ein Beispiel für ein solches SCP, insbesondere einer Hemizellulose. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das SCP in der Lage, an das PCM zu binden, z.B. über eine oder über mehrere Wasserstoffbindungen, eine ionische Interaktion, eine oder mehrere kovalente Bindungen, van-der-Waals-Kräfte oder über jede Kombination von diesen. In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das SCP ein CPF gemäß der nachfolgenden Beschreibung sein.

[0027] Der Ausdruck "Kohlenhydratpolymerfragmente", der mit "CPF" abgekürzt wird, betrifft Moleküle, die enzymatisch oder chemisch hergestellte Fragmente der SCPs sein können. Beispiele von solchen Fragmenten umfassen jede Anzahl der sich wiederholenden Einheiten der SCPs. Geeignete Fragmente können daher von 2 bis zu etwa 5000 Monosaccharideinheiten in dem Polymer-Grundgerüst wie z.B. etwa 2-10, 4-10, 3-100, 11-15, 20-25, 26-40, 41-60, 61-100, 101-200, 201-300, 301-400, 401-500, 501-1000, 1001-2000, 2001-3000, 3001-4000 oder 4001-5000 Monosaccharideinheiten enthalten. Das CPF kann des weiteren Seitenketten von

unterschiedlicher Länge und Zusammensetzung umfassen. Spezifische Beispiele schließen Xylogluco-Oligosaccharide (XGO) ein, wie z.B. solche, die eine Struktur besitzen, wie sie in [Fig. 4](#) beschrieben wird, oder ein Fragment davon, oder solche, die mit einem oder mit mehreren Fucosylresten oder mit anderen Monosacchariden weiter modifiziert sind, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0028] XGOs sind im Allgemeinen gemäß des Nomenklatorsystems, das in Fry et al. (1993), *Physiologia Plantarum* 89, 1-3 zusammengefasst wird, benannt, wobei unter anderem G einen nicht substituierten beta-Glycopyranosylrest darstellt, X eine Xylopyranosyl-alpha(1-6)-glucopyranosyleinheit darstellt, L eine Galactopyranosyl-beta(1-2)-xylopyranosyl-alpha(1-6)-glycosyleinheit darstellt, F eine Fucopyranosyl-alpha(1-2)-galactopyranosyl-beta(1-2)-xylopyranosyl-alpha(1-6)-glycosyleinheit darstellt. Diese verschiedenen Einheiten können über eine beta(1-4)-Bindung zwischen den Glycopyranosyleinheiten verbunden sein, um ein beta(1-4)-Glucan-Polysaccharid-Grundgerüst zu erzeugen. Unter Verwendung dieser Nomenklatur sind die XGOs, die im Allgemeinen nach der Spaltung von Xyloglucan der Tamarinde mit Endoglucanase isoliert werden, XXXG, XLXG, XXLG und XLLG (vergl. [Fig. 4](#)). Wenn die Glucose (G) des reduzierenden Endes dieser Oligosaccharide in der reduzierten Alditolform vorliegt, wird diese Einheit durch "Gol" dargestellt. Die reduzierten (Alditol)-Derivate der vorstehend beschriebenen Oligosaccharide von dem Xyloglucan der Tamarinde werden daher zum Beispiel als XXXGol, XLXGol, XXLGol und XLLGol bezeichnet.

[0029] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung betrifft der Ausdruck "chemische Gruppe" jede chemische radikale Gruppe (R-) mit einem möglichen Interesse für die Aktivierung oder Modifikation der unlöslichen polymeren Kohlenhydratoberflächen. Die Aktivierung der unlöslichen polymeren Kohlenhydratoberflächen wird als eine Modifikation definiert, die es ermöglicht, weitere chemische oder enzymatische Reaktionen durchzuführen, während die Modifikation der Oberflächen als eine Behandlung definiert wird, die als solche ausreichend ist, um die funktionellen Eigenschaften zu verändern.

[0030] Beispiele von chemischen Gruppen, die für eine solche Aktivierung oder Modifikation geeignet sind, können ionische Gruppen (kationische, wie z.B. quaternäre Aminogruppen, Ammoniumgruppen, Carbokationen, Sulfoniumgruppen oder Metallkationen, etc.; anionische, wie z.B. Alcoxide, Thiolate, Phosphonate, Carbanionen, Carboxylate, Boronate, Sulfonate, Bunte-Salze, etc., oder zwitterionische, wie z.B. Aminosäuren, Ylide oder andere Kombinationen von anionischen und kationischen Gruppen auf dem gleichen Molekül) oder deren nicht ionisierten Konjugatsäuren oder -basen (wie es geeignet ist), hydrophobe Gruppen (Alkyl-Kohlenwasserstoffe, wie z.B. fetthaltige Acyl- oder Alkylgruppen und ungesättigte Derivate oder Perfluor-Alkane oder Aryl-Kohlenwasserstoffe, wie z.B. aromatische oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Heterozyklen), ungeladene hydrophile Gruppen (z.B. Polyether, wie z.B. Polyethylenglykol), potentielle reaktive Gruppen wie z.B. solche, die elektrophile Atome enthalten (wie z.B. Carbonylverbindungen, Carbokationen, Alkylhalide, Acetate, etc.), Nucleophile (z.B. Stickstoff, Schwefel, Sauerstoff, Carbanione, etc.) oder Monomere für Polymerisationsreaktionen (freie Radikale, wie z.B. Acrylamid, Brombutyrat, Vinyl, Styrol, etc. oder ansonsten z.B. nucleophile oder elektrophile Reagenzien), chromophore oder fluorophore Gruppen (Pigmente, Farbstoffe oder optische Aufheller, wie z.B. C.1-Farbstoffe, Fluorescein, Sulfo-Rhodamin, Pyren), Biotin, radioaktive Isotope, Vorläufer freier Radikale und stabile freier Radikal-Gruppen (z.B. TEMPO), Nucleinsäuresequenzen, Aminosäuresequenzen, Proteine oder proteinbindende Mittel (z.B. Affinitätsliganden, Biotin, Avidin, Streptavidin, Kohlenhydrate, Antikörper oder Enzymsubstrate oder deren Analoge), Rezeptoren, Hormone, Vitamine und Arzneistoffe einschließen.

[0031] Der Ausdruck "Kohlenhydrat-Bindemoleküle", der mit "CLM" abgekürzt wird, betrifft ein Molekül oder Komplex, das/der mindestens einen Teil eines SCP gemäß der vorstehenden Beschreibung und eine chemische Gruppe enthält. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das CLM in der Lage, an das PCM zu binden, z.B. über eine oder mehrere Wasserstoffbindungen, eine ionische Interaktion, eine oder mehrere kovalente Bindungen, van-der-Waals-Kräfte oder über jede Kombination von diesen.

[0032] Beispiele 9, 13, 15, 16, 18a und 30 zeigen die Anwendung einer chemischen Gruppe, Sulfo-Rhodamin, die ein Chromophor, Fluorophor oder ein Zwitterion ist, zur Modifikation von Zellulosematerialien. Chromophore Gruppen sind im Allgemeinen als Pigmente bekannt, Fluorophore werden als optische Aufheller in Textilien und bei anderen Applikationen verwendet und ionische Verbindungen wirken als Retentionshilfen bei der Herstellung von Papier. Beispiele 10, 14, 17, 18b und 21 zeigen Modifikationen von zellulosehaltigen Fasern mit Fluorescein, das ebenfalls chromophor, fluorophor und anionisch über einen weiten pH-Bereich ist und daher Anwendungen haben wird, bei denen diese Gruppen erwünscht sind. Beispiele 8, 19 und 20 stellen Verfahren zum Einbringen einer Aminogruppe auf der Faseroberfläche dar, die über einen weiten pH-Bereich kationisch ist und daher als ein Ionenaustauschmittel geeignet ist und die ebenfalls die Retention bei der Herstellung von Papier erhöhen kann.

[0033] Des weiteren ist die Aminogruppe an sich reaktiver als die chemischen Gruppen, die schon in den zellulosehaltigen Fasern vorhanden sind, und kann daher für die Bindung von einer großen Auswahl von anderen chemischen Stoffen auf die Faseroberfläche verwendet werden. Der Einbau von Radioaktivität wird in dem Beispiel 11 und in dem XET-Enzymtest dargestellt, der im Teil "a" unter dieser Überschrift beschrieben wird. Die Radioaktivität kann für Suchanwendungen und Studien der Fasermorphologie verwendet werden. Reaktionen zum Einbau von Alkylketten werden in den Beispielen 22, 24 und 25 beschrieben. Insbesondere zeigen die Beispiele 24 und 25, wie Alkenylbernsteinsäureanhydrid, ein typisches Mittel zur Hydrophobisierung von Papier, spezifisch an die Faseroberfläche gebunden werden kann, wobei die Retention dieser Gruppe möglicherweise erhöht wird.

[0034] Die Beispiele 23 und 26 zeigen, dass die nicht fluorophoren, aromatischen Gruppen an die Faser gebunden werden können; wobei das zweite Beispiel eine Cinnamoyl-Gruppe einbringt, die Polymerisierungsreaktionen eingehen kann, wie z.B. solche, die Polystyrol und Lignin herstellen. Die Bromisobutyryl-Gruppe, die gebunden wird, wie im Beispiel 27 beschrieben wird, ist ebenfalls ein anderer Initiator für Polymerisierungsreaktionen durch freie Radikale. Wie in Beispiel 31 beschrieben wird, können solche Gruppen verwendet werden, um auf Zellulose basierende Pfropf-Kopolymere herzustellen, die hochqualitative Faser-Grundsubstanz-Grenzflächen mit einer sehr starken, beidseitigen Adhäsion, aber nur eine geringe oder keine schädigende Wirkung auf die Faser/Zellulosestruktur besitzen. Das Einbringen von Biotin in Beispiel 28 ermöglicht die direkte Bindung von Avidin-Protein-Konjugaten auf die Faseroberfläche, was weitverbreitet ist und verwendet werden kann, um eine Enzym- und Protein-Bindungsaktivität auf der Faser einzuführen.

[0035] Die Zugabe einer Thiol- (oder Sulfhydryl-) Gruppe ermöglicht eine hohe Spezifität und, was besonders wichtig ist, die reversible Bindung von anderen Thiolen über die Erzeugung von Disulfidbindungen, wie in den Beispielen 29 und 30 beschrieben wird. Eine große Anzahl von chemischen Gruppen kann spezifisch durch dieses Verfahren eingeführt und anschließend entfernt werden, wenn diese nicht länger erwünscht sind. Schließlich zeigen alle Beispiele, die vorstehend erwähnt werden, dass eine große Vielfalt von Amin-reaktiven chemischen Gruppen verwendet werden können, um andere Funktionalitäten einzuführen, was Sulfonylchloride, Isothiocyanate, Isocyanate, Säureanhydride, aktivierte Carboxyl-Verbindungen (sogar solche, die in situ hergestellt werden) und Thioester einschließt, aber nicht darauf begrenzt ist. Viele dieser chemischen Stoffe können verwendet werden, um unsere Reaktionen durchzuführen, die zum Beispiel die Faser-Faser-Bindung oder die Reaktivität der Zellulose mit anderen Materialien verstärken.

[0036] Das CLM kann durch eine organische oder chemische Synthese und/oder durch die Verwendung der katalytischen Aktivität bestimmter Enzyme hergestellt werden. Eine Ausführungsform der Herstellung eines CLM unter Verwendung eines Enzyms und eines CPF wird in [Fig. 2](#) dargestellt. Das SCP (8) wird mit einem Enzym (7) und einem CPF (4), das eine chemische Gruppe (5) umfasst, in Kontakt gebracht. In dieser Ausführungsform spaltet das Enzym (7) das SCP und führt stattdessen das CPF mit der chemischen Gruppe ein, was zu dem Produkt CLM (2) führt. Das CLM kann eine oder mehrere chemische Gruppen umfassen.

[0037] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das CLM unter Verwendung eines Enzyms hergestellt werden, das in der Lage ist, native oder chemisch modifizierte Mono- oder Oligosaccharide an die Enden von Oligo- oder Polysacchariden zu transferieren. Solche Enzyme schließen Enzyme, die eine hohe Transglykosylierungsaktivität, aber eine niedrige hydrolytische Aktivität besitzen, Glycosylhydrolasen mit einer hohen innewohnenden Transglykosylierungsaktivität, Enzyme, die biotechnologisch hergestellt wurden, um deren Transglykosylierungsaktivität zu erhöhen, und Glycosyltransferasen, die Nucleotidzucker als Substrate verwenden, ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0038] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann das Enzym als jedes Enzym definiert werden, das, wenn es mit einem geeigneten Glycosyl-Spendersubstrat (z.B. Xyloglucan) in der Gegenwart oder beim Fehlen von einem Mono-, Oligo- oder Polysaccharid-Akzeptorsubstrat (z.B. XGO) unter geeigneten Bedingungen zur Erhaltung der Enzymaktivität untersucht wird, eine Rate des Einbringens des Akzeptorsubstrats in das Spendersubstrat zeigt, die mindestens 10% der Hydrolyserate beträgt, wie z.B. mindestens 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 75%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, wie z.B. mindestens 1000% der Hydrolyserate. Die Analyse, die zur Bestimmung der Raten des Einbringens des Akzeptorsubstrats in das Spendersubstrat verwendet wird, kann die radiometrische Analyse und/oder die kolorimetrische Analyse zur Bestimmung der Enzymaktivität sein, die hierin beschrieben werden.

[0039] Repräsentative Beispiele von Enzymen mit einer natürlich hohen Transglykosylierungsaktivität schließen Amylosucrasen (Skov et al., 2001, J Biol Chem 276:25273-8) und die Cyclodextrin-Glycosyltransferase (Ven der Veen et al., 2000, Biochim Biophys Acta 1543:336-360) ein, sind aber nicht darauf beschränkt. Viele

Glycosylhydrolasen, die über einen Retentionsmechanismus wirken, besitzen eine Transglycosylierungsaktivität, die durch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln verstärkt werden kann. Beispiele von solchen Hydrolasen schließen einige Cellulasen und Mannasen (Kwon et al., 2002, *Biosci Biotechnol Biochem* 66:110-6; Harjunpaa et al., 1999, *FEBS Lett* 443:149-53), Xylanasen (Christakopoulos et al., 1996, *Carbohydr Res* 289:91-104) und Chitinasen (Sasaki et al., 2002, *J Biochem (Tokyo)* 131:557-64) ein. Beispiele von Enzymen, die gentechnisch zur Erhöhung der Transglycosylierungsaktivität hergestellt werden, sind so genannte auf zurückhaltende Glycosylhydrolasen basierende Glycosynthasen (Meyer et al., 2001, *Chem Biol* 8:437-43; Fairweather et al., 2002, *Chembiochem* 3:866-73). Beispiele für diese Arten von Enzymen werden zur Synthese von Designer-Oligosacchariden für akademische, industrielle und potentiell therapeutische Zwecke verwendet.

[0040] Vorzugsweise wird ein Enzym ausgewählt, das eine hohe Transglycosylierungsaktivität besitzt, und am stärksten bevorzugt, auch für alle praktischen Zwecke, wird ein Enzym, das eine niedrige oder nicht detektierbare hydrolytische oder eine andere abbauende Aktivität besitzt. Vorzugsweise werden keine Nucleotidzucker oder organische Lösungsmittel benötigt, um die Transglycosylierungsaktivität zu fördern. Ein Beispiel für solche transglycosylierenden Enzyme ist die Xyloglucanendotransglycosylase, ein Enzym, das von Pflanzen bekannt ist.

[0041] Stephen C. Frey et al. weisen in *Biochem J* 15 (1992) 282, S. 821-828 zum Beispiel darauf hin, dass XET für das Spalten und die Wiedervereinigung von intermikrofibrillären Xyloglucanketten verantwortlich ist und dass XET daher das Lockern der Wände hervorruft, das für die Ausdehnung der Pflanzenzelle benötigt wird. Man nimmt an, dass XET in allen Pflanzen vorhanden ist, insbesondere in allen Landpflanzen. XET wurde aus dikotylen Pflanzen, monokotylen Pflanzen extrahiert, insbesondere aus monokotylen grasartigen Pflanzen und aus monokotylen Liliengewächsen und ebenfalls aus einem Moos und einem Lebermoos. XET kann ebenfalls von einer Pflanze erhalten werden, wie in Beispiel 1 (Blumenkohl) und in Beispiel 5 (Suspensionskultur von hybriden Espenzellen) beschrieben wird, oder es kann erhalten werden, wie in Fry et al. (vorstehend) beschrieben wird.

[0042] In einer anderen Ausführungsform wird das transglycosylierende Enzym durch die aerobe Kultivierung von einem Wirtsorganismus hergestellt, der mit der genetischen Information transformiert wurde, die das transglycosylierende Enzym codiert. Der Wirtsorganismus kann eine Pflanze sein, insbesondere Tabak, Mais oder eine hybride Espe, Pilze, insbesondere Hefen wie z.B. *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*, filamentöse Pilze wie z.B. *Trichoderma reesei* oder *Aspergilli*, welche die geeigneten genetischen Informationen besitzen, die für die Expression des heterologen Proteins in dem in Frage kommenden Wirt benötigt wird. Solche Transformanten können durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, hergestellt und kultiviert werden.

[0043] Gene: Das Gen, welches das transglycosylierende Enzym codiert, kann aus der Natur von einem Organismus, der ein geeignetes transglycosylierendes Enzym exprimiert, z.B. eine Pflanze oder ein Mikroorganismus, erhalten werden. Das Gen kann ebenfalls mittels Gentechnik basierend auf dem zur Verfügung stehenden Wissen über natürlich vorkommende Enzyme hergestellt werden und es kann durch Deletion, Substitution oder Addition von Sequenzinformationen wie z.B. codierenden Regionen und Promotoren modifiziert werden. Das XET-Gen kann zum Beispiel von Blumenkohl (Beispiel 3), von hybrider Espe (Beispiel 4) oder wie in EP 562 836 offenbart wurde, erhalten werden.

[0044] Wirtszellen: Die Wirtszellen, die das so erhaltene DNA-Konstrukt umfassen, können unter Verwendung von Verfahren erhalten werden, die dem Fachmann bekannt sind.

[0045] Die Wirtszelle ist vorzugsweise eine eukaryontische Zelle, insbesondere eine Pflanzenzelle wie z.B. eine Suspension von Pappel- oder Tabakzellen oder eine Gewebekultur oder die Blätter oder die Samen dieser Pflanzen und ähnlicher Pflanzen. Die Pflanzenzellen können durch *Agrobacterium* vermitteltem Gentransfer oder durch die Verwendung einer Particle-Gun in einer Weise, die an sich bekannt ist, transformiert werden. Die Wirtszelle kann ebenfalls Hefe oder eine filamentöse Pilzzelle oder eine Bakterienzelle sein. Insbesondere kann die Zelle einer Art von *Trichoderma* angehören, vorzugsweise *Trichoderma harzianum* oder *Trichoderma reesei*, oder einer Art von *Aspergillus*, am stärksten bevorzugt *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger*. Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das die Erzeugung eines Protoplasten und die Transformation des Protoplasten gefolgt durch die Regeneration der Zellwand in einer Weise, die an sich bekannt ist, beinhaltet.

[0046] Die Verwendung von *Aspergillus* als ein Wirtsmikroorganismus wurde unter anderem in EP 238 023

(Novo Nordisk A/S) beschrieben und die Verwendung von Trichoderma wurde unter anderem in EP0244234 A2 04-11-1987 [1987/45], EP0244234 A3 12-10-1988 [1988/41], EP0244234 B1 21-07-1993 [1993/29], EP0244234 B2 07-11-2001 [2001/45] beschrieben; wobei deren Inhalt durch Bezugnahme hiermit aufgenommen wird. Die Wirtszelle kann ebenfalls eine Hefezelle sein, z.B. ein Stamm von *Saccharomyces*, insbesondere von *Saccharomyces cerevisiae*, oder ein Stamm von *Pichia* sp. wie z.B. *Pichia pastoris* oder *Kluyveromyces* sp. wie z.B. *Kluyveromyces lactis*. Die Wirtszelle kann ebenfalls ein Bakterium sein wie zum Beispiel das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* oder Gram-negative Bakterien wie z.B. *E. coli*. Die Transformation der Bakterien kann zum Beispiel durch eine Protoplastentransformation oder durch die Verwendung von kompetenten Zellen in einer Weise, die an sich bekannt ist, durchgeführt werden.

[0047] Gemäß der Erfindung kann ein transglycosylierendes Enzym von einer dikotylen Pflanze oder einer monokotylen Pflanze erhalten werden, insbesondere einer dikotylen Pflanze, die aus der Gruppe bestehend aus den nachfolgenden Pflanzenfamilien Blumenkohl, Sojabohne, Tomate, Kartoffel, Raps, Sonnenblume, Baumwolle, Tabak und Pappel ausgewählt ist, oder einer monokotylen Pflanze, die aus der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Korn, Schilfrohr und Zuckerrohr ausgewählt ist. Ein Beispiel von solchen Enzymen ist jedes Enzym, das durch eine der Sequenzen SEQ ID Nr.: 1, 2, 3 oder durch ein funktionelles Homolog davon codiert wird. Mit einem funktionellen Homolog ist hierin eine Sequenz gemeint, die eine Homologie mit einem Enzym zeigt, das durch eine der Sequenzen SEQ ID Nr.: 1, 2, 3 codiert wird, wobei die Homologie mindestens 50% wie z.B. mindestens 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% oder 100% beträgt.

[0048] Das funktionelle Homolog kann in einer anderen Ausführungsform ein Enzym sein, das durch eine Nucleinsäuresequenz codiert wird, wobei die Nucleinsäuresequenz eine Homologie mit mindestens einer der Sequenzen in SEQ ID Nr.: 1, 2, 3 von mindestens 50% wie z.B. mindestens 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% oder 100% besitzt.

[0049] In dem vorliegenden Kontext bedeutet der Ausdruck "Homologie" ein quantitatives Maß des Grades der Homologie zwischen zwei Aminosäuresequenzen von gleicher Länge oder zwischen zwei Nucleotidsequenzen von gleicher Länge. Wenn die zwei Sequenzen, die verglichen werden sollen, nicht von gleicher Länge sind, müssen sie in der best möglichen Passform angeordnet werden. Die Sequenzidentität kann als

$$\frac{(N_{\text{ref}} - N_{\text{dif}})}{N_{\text{ref}}} 100$$

berechnet werden, wobei N_{dif} die Gesamtzahl der nicht identischen Reste in den zwei Sequenzen bedeutet, wenn diese angeordnet sind, und wobei N_{ref} die Anzahl der Reste in einer der Sequenzen bedeutet. Die DNA-Sequenz AGTCAGTC wird daher eine Sequenzidentität von 75% mit der Sequenz AATCAATC besitzen ($N_{\text{dif}} = 2$ und $N_{\text{ref}} = 8$). Eine Lücke wird als Nicht-Identität des spezifischen Rests/der spezifischen Reste gewertet, das heißt die DNA-Sequenz AGTGTC wird eine Sequenzidentität von 75% mit der DNA-Sequenz AGTCAGTC besitzen ($N_{\text{dif}} = 2$ und $N_{\text{ref}} = 8$). Die Sequenzidentität kann in einer anderen Ausführungsform durch das BLAST-Programm berechnet werden, z.B. das BLASTP-Programm (Pearson & Lipman (1988) (www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST)). In einem Aspekt der Erfindung wird das Anordnen mit dem allgemeinen Anordnungsalgorithmus mit Standardparameter durchgeführt, wie von Huang & Miller (1991) beschrieben wurde, erhältlich bei http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html.

[0050] In einer anderen Ausführungsform kann das Enzym ein Enzym sein, das eine niedrigere Sequenzhomologie mit den Sequenzen besitzt, das aber so aufgebaut wurde, dass es eine transglycosylierende Aktivität besitzt.

[0051] Die hier genannten Erfinder haben die Erfindung unter anderem auf die Tatsachen begründet, dass Xyloglucan, das in den primären Zellwänden von Pflanzenfasern auf natürliche Weise vorkommt, in der Lage ist, starke Wasserstoffbindungen mit Zellulose zu erzeugen, und dass die endogene XET-Aktivität von Pflanzen zum Einbringen von radioaktiven und fluorszierenden XGOs an die Xyloglucan-Komponente von Suspensionskulturen von Pflanzenzellen führt (vgl. Biochem J. 279, 1991, S. 529-535 und Plant Cell Physiol 40, 1999, S. 1172-1176).

[0052] Die Erfinder haben anschließend nachgewiesen, dass isolierte Xyloglucanpolymere chemisch und/oder enzymatisch modifiziert werden können, um eine große Anzahl von verschiedenen chemischen Gruppen zu enthalten, und dass solche chemisch modifizierten Xyloglucanpolymere als eine Grenzfläche für das Einbringen von neuen chemischen Gruppen auf die zellulosehaltigen Faseroberflächen verwendet werden können. Ein deutlicher Vorteil des Verfahrens ist, dass die Verwendung von solchen Grenzflächen-Polymeren

den nachfolgenden Verlust der Faserstruktur vermeidet, ein Ergebnis, auf das ansonsten im Allgemeinen mit der direkten chemischen Modifikation von Zellulose gestoßen wird. Die Erfinder haben nachgewiesen, dass ein transglycosylierendes Enzym wie z.B. XET als Empfängerzucker Oligosaccharide, die verschiedene Arten von chemischen Gruppen enthalten, verwenden kann.

[0053] Da Wasser für solche Enzyme nicht in Konkurrenz als ein Empfänger der Transglycosylierung steht, können sie in wässrigen Lösungen verwendet werden, um effizient die chemischen Gruppen auf die Grenzflächenpolymere wie z.B. Xyloglucan einzuführen, die entweder in Lösung oder gebunden an ein anderes polymeres Material wie z.B. Zellulose vorliegen. Des weiteren haben die Erfinder nachgewiesen, dass Xyloglucan, sogar wenn es chemisch modifiziert ist, fest an die Oberfläche von Zellulose bindet und dass die eingeführten chemischen Gruppen, auch wenn sie an den porösen Oberflächen von zellulosehaltigem Material über XG gebunden sind, trotzdem weiter für chemische Reaktionen zugänglich sind. Die Erfinder haben anschließend nachgewiesen, dass es überraschenderweise möglich war, durch die Zugabe eines transglycosylierenden Enzyms und von chemisch modifizierten CPFs zu den SCPs viele verschiedene neue chemische Gruppen mit einer erwünschten Funktionalität auf die Oberflächen des PCM mit einer hohen Ausbeute zu binden.

[0054] Das PCM, das modifiziert werden soll, kann von einer Pflanze abgeleitet werden, die aus der Gruppe ausgewählt ist bestehend aus einer monokotylen Pflanze wie z.B. eine Pflanze der Familie Gramineae und einer dikotylen Pflanze wie z.B. einer Pflanze, die aus der Gruppe bestehend aus angiospermen Pflanzen (Hartholz), zapfentragenden Pflanzen (Weichholz) und Pflanzen, die der Familie Gossypium angehören, ausgewählt ist.

[0055] Das PCM kann in der Form von zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder in der Form von zellulosehaltigen Mikrofibrillen, die von zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder von einem Bakterium stammen, vorliegen.

[0056] Das SCP kann einen Teil des PCM, das modifiziert werden soll, erzeugen, weswegen der Schritt des Einbringens des CPF, das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität umfasst, in das SCP, z.B. unter Verwendung eines Enzyms, direkt auf dem PCM-SCP-Komplex erfolgen kann. Das Prinzip wird in [Fig. 3](#) dargestellt. Im oberen Teil von [Fig. 3](#) ist der PCM-SCP-Komplex (9) zu sehen, der das PCM (1) und das SCP (2), das Enzym (7) und ein CPF (4) umfasst, das eine chemische Gruppe (5) mit einer gewünschten Funktionalität umfasst. Im mittleren Teil von [Fig. 3](#) bindet das Enzym (7) an das SCP (2) des PCM-SCP-Komplexes (9) und kann einen Zwischenkomplex (10) erzeugen. In dem Prozess, der zu dem unteren Teil von [Fig. 3](#) führt, spaltet das Enzym (7) das SCP (2) und bringt (12) das CPF (4), das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität (5) umfasst, ein. (12) ist das SCP-Fragment, das durch das SCP abgespalten wurde.

[0057] In einer anderen Ausführungsform muss das SCP nicht an dem PCM gebunden sein, um modifiziert zu werden. In dem Fall kann das SCP modifiziert sein, um die chemische Gruppe zu umfassen, und das Produkt der SCP-Modifikation, CLM, wird anschließend mit dem PCM in Kontakt gebracht. In einer anderen Ausführungsform wird das SCP zuerst mit dem SCP ohne PCM in Kontakt gebracht. Wenn der SCP-PCM-Komplex erzeugt wurde, kann der Schritt des Einbringens des CPF, das eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität umfasst, in das SCP, z.B. unter Verwendung eines Enzyms, direkt auf dem PCM-SCP-Komplex erfolgen.

[0058] Es ist möglich, das PCM mit einem Gemisch von chemischen Gruppen zu modifizieren, z.B. durch das Durchführen der hierin beschriebenen Verfahren in der Sequenz und/oder durch die Verwendung eines Gemisches von CLMs, die verschiedene chemische Gruppen umfassen, und durch die Bindung des Gemisches von CLMs, die verschiedene chemische Gruppen umfassen, an das PCM in einem Verfahrensschritt.

[0059] Sowohl das SCP als auch das CPF können chemische Gruppen enthalten.

[0060] Das CPF kann von Xyloglucan abgeleitet sein und es kann von 3 bis etwa 100, einschließlich von 4 bis 10 Monosaccharideinheiten des Polymergrundgerüsts enthalten.

[0061] In einer Ausführungsform wird das CPF, das die chemische Gruppe umfasst, mit dem löslichen polymeren Kohlenhydrat (SCP) in der Gegenwart eines Enzyms, das in der Lage ist, die Erzeugung des Komplexes, der aus dem CPF besteht, das die chemische Gruppe umfasst, in Kontakt gebracht und ist mindestens ein Teil des SCP. Das Enzym kann in der Lage sein, native oder chemisch modifizierte Mono- oder Oligosaccharide auf Oligo- und/oder Polysaccharide zu transferieren. In einer Ausführungsform kann das Enzym eine transglycosylierende Aktivität besitzen.

[0062] In einer anderen Ausführungsform zeigt das Enzym eine Rate des Einbringens des Empfängersubstrats in das Spendersubstrat, die mindestens 10% der Hydrolyserate beträgt, wie z.B. mindestens 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% oder 75%, wie z.B. mindestens 100% beträgt, wenn die Untersuchung mit einem geeigneten Glycosyl-Spendersubstrat in Gegenwart und beim Fehlen eines Mono-, Oligo- oder Polysaccharid-Empfängersubstrats unter geeigneten Bedingungen zur Erhaltung der Enzymaktivität durchgeführt wird.

[0063] Die Analyse zur Evaluierung der Rate des Einbringens des Empfängersubstrats in das Spendersubstrat kann eine Analyse sein, die aus den nachfolgenden Schritten besteht:

- i) Inkubieren von 0,1 mg Xyloglucan, 0,1 mg Xyloglucan-Oligosaccharide (Gemisch von XXXG, XLXG, XXLG und XLLG; 15:7:32:46 Gewichtsverhältnis) in 200 µl 40 mM Citratpuffer, pH-Wert 5,5 für 30 Minuten bei 30°C.
- ii) Beenden der Reaktion mit 100 µl 1 M HCl.
- iii) Einstellen der Ionenstärke durch Zugabe von 800 µl 20% Na₂SO₄ und 200 µl einer I₂ (0,5% I₂, 1% KI, w/w)-Lösung.
- iv) Messen der optischen Dichte bei 620 nm.
- v) Durchführen der Schritte i)-iv) ohne Zugabe der Xyloglucan-Oligosaccharide (XGO) aus Schritt i)
- vi) Berechnen der Zunahme der optischen Dichte in Prozent zwischen der Inkubation mit XGO und der Inkubation ohne XGO.

[0064] Das Enzym kann von der Gruppe bestehend aus einer Transglycosylase, einer Glycosylhydrolase, einer Glycosyltransferase ausgewählt sein. Das Enzym kann ein Wildtyp-Enzym oder ein funktional und/oder strukturell modifiziertes Enzym sein, das von einem solchen Wildtyp-Enzym abgeleitet ist. In einer Ausführungsform ist das Enzym eine Xyloglucan-Endotransglycosylase (XET, EC 2.4.1.207).

[0065] Das Enzym, das eine Transglycosylierungsaktivität besitzt, kann von einer Pflanze abgeleitet sein, einschließlich einer Pflanze, die zu der Familie Brassica gehört, oder einer Pflanze einer Populus-Art, oder es kann mittels einer rekombinanten Technik hergestellt werden.

[0066] In einer Ausführungsform kann die chemische Gruppe, die eine gewünschte Funktionalität besitzt, ausgewählt sein aus einer Gruppe bestehend aus einer ionischen Gruppe, einer hydrophoben Gruppe, einer ungeladenen hydrophilen Gruppe, einer reaktiven Gruppe, einem Nucleophil, einem polymerisierbaren Monomer, einer chromophoren Gruppe, einer fluorophoren Gruppe, Biotin, einem radioaktiven Isotop, einem Vorläufer freier Radikale, einer stabilen freien Radikal-Gruppe, einem Protein und einem proteinbindenden Mittel.

[0067] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren, in dem das erhaltene modifizierte PCM relativ zu dem nicht modifizierten PCM veränderte Oberflächeneigenschaften wie z.B. veränderte Störkeeigenschaften, eine veränderte Oberflächenspannung, veränderte wasserabstoßende Eigenschaften, eine veränderte Reaktivität, veränderte optische Eigenschaften oder Kombinationen von diesen besitzt.

[0068] Ein anderer Aspekt der Erfindung ist ein modifiziertes polymeres Kohlenhydratmaterial (mPCM), das durch das Verfahren von jedem hierin beschriebenen Verfahren erhältlich ist, wobei chemische Gruppen mit einer gewünschten Funktionalität an das Material gebunden sind, indem die Bindung durch ein Kohlenhydrat-Bindemolekül vermittelt wird, das eine chemische Gruppe und ein SCP, das eine Hemizellulose ist, umfasst, wobei das Kohlenhydrat-Bindemolekül an das PCM binden kann. Das mPCM kann in der Form von zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder von zellulosehaltigen Mikrofibrillen, die von einer zellulosehaltigen Pflanzenfaser oder von einem Bakterium abstammen, vorliegen.

[0069] Die chemischen Gruppen des mPCM können reaktive Gruppen sein, die andere funktionale Gruppen binden können, und das mPCM kann daran zwei oder mehrere verschiedene Arten von chemischen Gruppen gebunden haben.

[0070] Ein Aspekt der Erfindung ist ein Verbundmaterial, das die Materialien umfasst, die hierin beschrieben werden.

[0071] Ein anderer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung des mPCM oder der Verbundmaterialien bei der Herstellung von Papierblättern, Wellpappe, Webware, Hilfsmitteln in einem diagnostischen oder chemischen Assay oder Verfahren, Verpackungsmittel für Flüssigkeiten und Lebensmittel, Papier und Karton, die häufig mit einem Thermoplastik wie z.B. Polyethylen laminiert sind, um eine undurchdringbare Grenzschicht für die wässrigen Lösungen zur Verfügung zu stellen, Textilien, Wertpapieren, Banknoten, verfolgbaren Dokumenten, Füllstoffen, Laminaten und Panelprodukten, holzpolymeren Verbundstoffen, polymeren Verbundstof-

fen, Legierungen und Mischungen oder Zellulosederivaten (zellulosehaltigen Stoffen).

[0072] Gemäß der vorliegenden Erfindung können neue chemische Gruppen dem PCM, das ein innewohnendes geeignetes SCP enthält, durch die Verwendung des transglycosylierenden Enzyms zugefügt werden, um die chemisch modifizierten CPFs an das SCP, das in den zellulosehaltigen Materialien enthalten ist, zu binden. In dem vorliegenden Zusammenhang bedeutet der Ausdruck "innewohnend", dass das PCM ein SCP vor der Modifikation umfasst. Gemäß der vorliegenden Erfindung können neue chemische Gruppen ebenfalls dem PCM, das kein innewohnendes SCP enthält, zugegeben werden, indem zuerst ein transglycosylierendes Enzym verwendet wird, um die chemisch modifizierten CPFs an das SCP in Lösung zu binden, gefolgt durch die Sorption des modifizierten SCP an das PCM.

[0073] Gemäß einer spezifischen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können neue chemische Gruppen an Zellulosematerialien, die kein innewohnendes Xyloglucan enthalten, gebunden werden, indem zuerst das XET-Enzym verwendet wird, um die chemisch modifizierten XGOs an Xyloglycan (XG) in Lösung zu binden, gefolgt durch die Sorption des modifizierten XG an die Zellulosematerialien.

[0074] Gemäß der vorliegenden Erfindung erhält ein PCM eine veränderte Oberflächenchemie und/oder eine verbesserte chemische Reaktivität nach der Behandlung mit chemisch modifizierten CPFs, die an ein SCP unter Verwendung des transglycosylierenden Enzyms gebunden werden. Die SCPs, welche die chemisch reaktiven Gruppen tragen, werden fest an die Oberflächen des PCM binden, wodurch die chemische Reaktivität der Oberflächen erhalten wird. Die chemische Reaktivität an sich oder wenn sie durch weitere chemische und/oder polymerisierende Reaktionen modifiziert wurde, beeinflusst die Oberflächeneigenschaften des PCM. Des weiteren wird die Dichte der chemisch reaktiven Gruppen durch die Veränderung der Konzentrationen des transglycosylierenden Enzyms und/oder der CPFs und/oder der Reaktionszeit kontrolliert, wie in den Beispielen 14a und 14b gezeigt wird. Die Oberflächeneigenschaften können durch jedes Verfahren, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, gemessen werden, wie in den beigefügten Beispielen, z.B. Beispiel 16b, gezeigt wird.

[0075] In der Natur arbeiten transglycosylierende Enzyme wie z.B. das XET-Enzym in vivo in der lebenden Pflanze, so dass das Enzym offensichtlich in einer wässrigen Umgebung arbeiten kann. Das Verfahren gemäß der Erfindung kann daher in einer wässrigen Lösung durchgeführt werden oder es kann in Wasser in der Gegenwart von bestimmten Komponenten wie z.B. einem Puffer und/oder einem Netzmittel und/oder einem Stabilisator und/oder einem Polymer und/oder einer organischen Komponente, welche die Aktivität des Wassers vermindert, wie z.B. DMSO, durchgeführt werden.

[0076] Der Puffer kann geeigneterweise ein Phosphat, Borat, Citrat, Acetat, Adipat, Triethanolamin, Monoethanolamin, Diethanolamin, Carbonat (insbesondere Alkalimetall, Erdalkalimetall, insbesondere Natrium- oder Kaliumcarbonat oder Ammonium- und HCL-Salze), Diamin, insbesondere Diaminoethan, Imidazol, Tris oder Aminosäurepuffer sein.

[0077] Das Netzmittel dient der Verbesserung der Benetzbarkeit des PCM. Das Netzmittel ist vorzugsweise von einer nichtionischen Art der Grenzflächenaktivierung. Der Stabilisator kann ein Mittel zur Stabilisierung des Enzyms sein.

[0078] Es wird im Allgemeinen geeignet sein, das Reaktionsmedium, das z.B. das PCM, das CLM und gegebenenfalls eine oder mehrere Komponenten umfasst, die von der Gruppe bestehend aus einem SCP, das eine chemische Gruppe umfassen kann oder nicht, einem CPF, das chemische Gruppen und ein Enzym umfasst, ausgewählt sind, für einen Zeitraum von mindestens einigen Minuten in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen zu inkubieren. Eine Inkubationszeit von etwa einer Minute bis zu 20 Stunden wie z.B. etwa 2-5 Minuten, 5-7 Minuten, 7-10 Minuten, 10-15 Minuten, 15-20 Minuten, 20-30 Minuten, 30-40 Minuten, 40-60 Minuten, 1-2 Stunden, 2-4 Stunden, 4-6 Stunden, 6-8 Stunden, 8-10 Stunden, 10-12 Stunden, 12-14 Stunden, 14-16 Stunden, 16-18 Stunden oder 18-20 Stunden wird im Allgemeinen geeignet sein. Insbesondere eine Inkubationszeit von 30 Minuten bis zu 10 Stunden wird häufig bevorzugt werden. Die Inkubationszeit wird vorzugsweise mit einem Zeitabstand begrenzter als ± 5 Stunden kontrolliert, wie z.B. begrenzter als ± 2 Stunden, ± 1 Stunde, ± 45 Minuten, ± 30 Minuten, ± 15 Minuten, ± 10 Minuten, ± 5 Minuten, ± 2 Minuten, ± 1 Minute, ± 30 Sekunden, ± 10 Sekunden, ± 1 Sekunden, $\pm 0,1$ Sekunden, $\pm 0,01$ Sekunden.

[0079] Die Temperatur des Reaktionsmediums in dem Verfahren der Erfindung kann geeigneterweise in dem Bereich von -5 bis 100°C liegen, wie z.B. $0-5$, $5-10$, $10-15$, $15-20$, $20-25$, $25-30$, $30-33$, $33-36$, $36-38$, $38-40$, $40-50$, $50-60$, $60-70$, $70-80$, $80-90$ oder $90-100^{\circ}\text{C}$. In Ausführungsformen, in denen das Reaktionsgemisch ein Enzym umfasst, sollte die Temperatur des Reaktionsgemisches während der Inkubation vorzugsweise in der Nähe der

Temperatur liegen, die einen optimalen Umsatz während der Inkubation erzeugt. Die bevorzugte Temperatur sollte weniger als 10°C von der Temperatur entfernt sein, die einen optimalen Umsatz während der Inkubation erzeugt, wie z.B. weniger als 10°C, 8°C, 6°C, 4°C, 2°C, 1°C, 0,5°C oder 0,1°C.

[0080] Für die Bindung des modifizierten oder nicht modifizierten SCP an das PCM wird es im Allgemeinen geeignet sein, das Gemisch für einen Zeitraum von mindestens einigen Minuten in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen zu inkubieren. Eine Inkubationszeit von etwa einer Minute bis zu 48 Stunden wird im Allgemeinen geeignet sein, insbesondere eine Inkubationszeit von 30 Minuten bis zu 10 Stunden wird häufig bevorzugt. Die Inkubationslösung kann geeigneter Weise in einem pH-Bereich von 2-11 gepuffert sein, vorzugsweise bei einem pH-Wert von 5-8, mit einer Pufferkonzentration zwischen 0 und 5 M, vorzugsweise 0,0-0,1 M. Die Temperatur des Reaktionsmediums in diesem Verfahren kann geeigneter Weise in dem Bereich von 10-100°C in Abhängigkeit der Stabilität der individuellen Komponenten in dem Gemisch sein.

[0081] Die Erfindung wird nun ausführlicher mit Bezug auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben, wobei:

[0082] [Fig. 1](#) das Prinzip der Modifizierung eines polymeren Kohlenhydratmaterials darstellt,

[0083] [Fig. 2](#) das Prinzip der Einfügung eines löslichen Kohlenhydratpolymers, das eine chemische Gruppe in einem polymeren Kohlenhydratmaterial umfasst, darstellt,

[0084] [Fig. 3](#) das Prinzip der Modifizierung von PCM, das ein SCP vor der Modifikation umfasst, darstellt,

[0085] [Fig. 4](#) Beispiele von Xyloglucan-Oligosaccharidstrukturen (XGO-7 (XXXG), XGO-8 (XLXG, XXLG) und XGO-9 (XLLG)) zeigt,

[0086] [Fig. 5](#) die Zeitabhängigkeit der Herstellung von XG-FITC zeigt,

[0087] [Fig. 6](#) die Abhängigkeit der Herstellung von XG-FITC von der Menge des Enzyms in der Reaktion darstellt,

[0088] [Fig. 7](#) ein Bild von XG-FITC-behandeltem Papier mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigt,

[0089] [Fig. 8](#) ein Photo der Aufnahme von Fluorescein in das mit XG-NH₂ behandelte Papier zeigt,

[0090] [Fig. 9](#) die relativen Mengen der Aminogruppen darstellt, die auf der Oberfläche von XG-NH₂ behandeltem, zellulosehaltigem Papier nach der Behandlung mit verschiedenen Amino-reaktiven Reagenzien vorhanden sind,

[0091] [Fig. 10](#) die Reaktivität von Papier mit und ohne Modifikationen durch XG-NH₂ auf FITC darstellt und

[0092] [Fig. 11](#) die Reaktion von Thiol behandeltem Papier mit Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat darstellt.

BEISPIELE

MATERIAL UND VERFAHREN

Bestimmung der Enzymaktivität und insbesondere der XET-Aktivität

a. Radiometrische Analyse

[0093] Die hier genannten Erfinder haben ein modifiziertes Analyseverfahren entwickelt, das dem von Steele, N et al. (Phytochemistry, 2000, 54, 667-680) ähnlich ist und das verwendet wurde, wie nachfolgend beschrieben wird. [1-³H]-XLLGol (300 µl, 0,36 µmol in H₂O) wurde zu dem nicht radioaktiven xgo-9-Alditol (700 µl, 8,6 µmol) in 50 mM Citratphosphatpuffer, pH-Wert 5,5, zugegeben. Wenn diese Stammlösung in der Analyse verwendet wurde, wurde sie in Puffer auf eine Konzentration von 2,24 µmol/ml (3,1 mg/ml) verdünnt. Die radioaktive XLLGol-Stammlösung (10 µl, 2,24 µmol/ml) wurde zu dem Xyloglucan (10 µl, 3,0 mg/ml in Puffer) zugegeben. Die verdünnte Enzymlösung (10 µl) wurde zugegeben und das Reaktionsgemisch wurde bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit einer 50% Lösung Ameisensäure in Wasser (20 µl) beendet. Das Reaktionsgemisch (40 µl) wurde auf rundem Whatman-3MM-Chromatographiepapier (20 mm Durchmesser) getrocknet. Die runden Papiere wurden für 4 Stunden unter fließendem Wasser gewaschen, in einem

65°C warmen Ofen getrocknet und der radioaktive Einschluss wurde in Szintillationsgefäßen, die den Ready-safe-Szintillationscocktail (6 ml, Beckman Coulter AB, Bromma, Schweden) enthielten, mit einem Packard Tricarb 1500 Szintillationsmessgerät untersucht. Es erfolgte keine Elution der Radioaktivität aus dem Papier in die Szintillationsflüssigkeit. Leerwerte wurden durch die Zugabe von Säure zu der Reaktion vor der Zugabe des Enzyms gemessen, die Kontrolle der insgesamt zugegebenen Radioaktivität wurde dadurch gemessen, dass die runden Papiere der Kontrolle nicht gewaschen wurden. Ein Maß dafür, wie das Filterpapier die Analyse beeinflusst, wurde durch den Vergleich der Kontrollen mit der Szintillationsmessung von dem Kontrollgemisch ohne dem Filterpapier erhalten.

b. Kolorimetrische Analyse

[0094] Die Enzymaktivität wurde gemäß einem modifiziertem Protokoll, das auf das Protokoll von Slulová et al. (1995), Anal Biochem 229, 80-85 basierte, gemessen. XET wurde mit 0,1 mg Xyloglucan, 0,1 mg Xyloglucan-Oligosaccharide (Gemisch von XXXG, XLXG, XLG und XLLG; 15:7:32:46) in 200 µl 40 mM Citratpuffer, pH-Wert 5,5 für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Analyse wurde mit der Zugabe von 100 µl 1 M HCl beendet, die Ionenstärke wurde durch Zugabe von 800 µl 20% Na₂SO₄ und 200 µl einer I₂ (0,5% I₂, 1% KI, w/w)-Lösung eingestellt. Die optische Dichte wurde bei 620 nm gemessen. Für die Zwecke dieses Dokuments wird eine Einheit der Enzymaktivität als 0,1 Einheiten der Veränderung der optischen Dichte (nach der Korrektur der Hintergrundhydrolyse) über einen Zeitraum von 30 Minuten definiert.

BEISPIEL 1

EXTRAKTION VON XET AUS BLUMENKOHL

[0095] Die Extraktion aus Blumenkohl wurde durch die Homogenisierung der Blumenkohlröschen im eiskalten Citratpuffer (0,35 M, pH-Wert 5,5, 10 mM CaCl₂ enthalten) und durch das Filtern des Gemisches durch Miracloth durchgeführt. Das Filtrat wurde mit ultrareinem Wasser (18 MΩ.cm) verdünnt, bis die Leitfähigkeit der Lösung die gleiche war, wie die von 0,1 M Ammoniumacetatpuffer, pH-Wert 5,5. Die Lösung wurde anschließend mit dem SP-Fast-Flow-Kationenaustauscher (Amersham Biosciences, Schweden) vorsichtig für 1 Stunde bei 4°C gerührt. Das SP-FF-Gel wurde auf einem Glasfrittenfilter gesammelt und mit 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, gewaschen, bis das Filtrat klar war. Das Gel wurde in eine Säule gegeben und die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1,0 M NaCl in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5 über 10 Säulenvolumen eluiert. Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat (1 M) gemischt. Die Probe wurde auf eine Resource-ISO-Säule (1 ml, Amersham Biosciences, Schweden) gegeben und anschließend mit einem linearen Gradienten von 1,0 M bis 0 Ammoniumsulfat in Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, über 20 Säulenvolumen eluiert. Die Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung auf ihre Reinheit untersucht. Das Gel zeigte nur eine einzelne Bande, von der durch Immunoblotting nachgewiesen wurde, dass es sich um XET handelt.

BEISPIEL 2

EXTRAKTION VON XET AUS EINER ZELLSUSPENSIONSKULTUR EINER HYBRIDEN ESPE, *Populus tremula* x *tremuloides* Mich.

[0096] Espen-XET wurde durch die Homogenisierung des Materials einer granulösen Zellkultur in eiskaltem Citratpuffer (0,35 M, pH-Wert 5,5, 10 mM CaCl₂ enthalten), durch das Rühren des Gemisches für 2 Stunden bei 4°C und durch das Filtern durch Miracloth extrahiert. Das Filtrat wurde mit ultrareinem Wasser (18 MΩ.cm) verdünnt, bis die Leitfähigkeit der Lösung die gleiche war, wie die von 0,1 M Ammoniumacetatpuffer, pH-Wert 5,5. Die Lösung wurde anschließend mit dem SP-Fast-Flow-Kationenaustauscher (Amersham Biosciences, Schweden) vorsichtig für 1 Stunde bei 4°C gerührt. Das SP-Trisacryl-Gel wurde gesammelt und mit 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, durch einen Glasfrittenfilter gewaschen, bis das Filtrat klar war. Das Gel wurde in eine Säule gegeben und die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0,0 bis 1,0 M NaCl in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5 über 10 Säulenvolumen eluiert. Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereinigt, der Puffer wurde durch 0,1 M Ammoniumacetat pH-Wert 5,5 in einer Sephadex G-25 Größenausschlusssäule ausgetauscht und auf eine Resource-S-Austauschsäule (1 ml, Pharmacia) geladen. Die gebundenen Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0,0 bis 1,0 M NaCl in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, über 10 Säulenvolumen eluiert. Die Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereint, auf eine Sephacryl S200-Säule (120 ml, Amersham Biosciences, Schweden) gegeben und mit 2 Säulenvolumen 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, eluiert. Fraktionen, die der letzten Spitze ent-

sprachen, welche die größte Menge der XET-Aktivität enthielten, wurden vereint und auf eine Resource-S-Säule (1 ml, Amersham Biosciences, Schweden) gegeben. Die Fraktionen wurden anschließend mit einem linearen Gradienten von 0,0 bis 0,5 M NaCl in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, in einem Volumen, das mehr als 10 Säulenvolumen entsprach, eluiert. Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und es wurde mittels SDS-PAGE gezeigt, dass sie homogen waren.

BEISPIEL 3

REINIGUNG DES REKOMBINANTEN XET AUS DER KULTIVIERUNG VON *Pichia pastoris*

[0097] Zellen von *Pichia pastoris*-Kulturen, die mit dem genetischen Material transformiert wurden, das XET (vergl. Beispiele 4 und 5) codierte, zeigten im Allgemeinen die höchste XET-Aktivität im Kulturmedium 3 Tage nach einer Induktion mit Methanol. Diese Hefezellen wurden durch Zentrifugation geerntet und die Kulturmedien wurde des weiteren durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und anschließend konzentriert und durch Ultrafiltration entsalzt. Das XET wurde durch eine zweiphasige Kationenaustausch-Chromatographie gereinigt. Das konzentrierte Kulturfiltrat (in einem Puffer von 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5) wurde zuerst auf eine SP-Trisacryl-Säule aufgetragen und anschließend durch einen linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, eluiert. Die Fraktionen, welche die XET-Aktivität enthielten, wurden vereint, in 0,1 M Ammoniumacetat, pH-Wert 5,5, entsalzt und auf eine Resource-S-Säule aufgetragen, anschließend durch denselben linearen Salzgradienten, der in der ersten Phase der Kationenaustausch-Chromatographie verwendet wurde, eluiert. Die Homogenität des Proteins wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung untersucht. Es wurde nur eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 32 kDa detektiert und von dieser wurde durch Immunoblotting bestätigt, dass es sich um XET handelt. Es wurde gezeigt, dass das Protokoll für die Expression von allen Sequenzen SEQ ID Nr.: 1, 2, 3, welche die verschiedenen Isoenzyme von XET codieren, erfolgreich war.

BEISPIEL 4

ISOLIERUNG DES GENS, WELCHES DAS XET VON BLUMENKOHL CODIERT

[0098] Die cDNA, die dem XET-Gen entsprach, wurde durch die Extraktion der RNA durch das Zerreiben von frischem Blumenkohlgewebe unter flüssigem Stickstoff (N₂) und der Lyse der Zellen unter denaturierenden Bedingungen isoliert. Die lysierte Zellprobe wurde anschließend durch eine QIA-Shredder-Säule zentrifugiert, um das unlösliche Material zu entfernen. Die RNA wurde anschließend selektiv an eine RNeasy-Membran gebunden, mit Puffer gewaschen und schließlich in Wasser eluiert. Die XET cDNA wurde unter Verwendung einer zweiphasigen Polymerasen-Kettenreaktion (PCR) gemäß dem Protokoll, das auf dem Fachgebiet bekannt ist, hergestellt. Der erste Strang der cDNA wurde bei 55°C für eine Stunde synthetisiert, wobei 1 µg RNA und ein Oligo-dT₍₁₈₎-Primer mit der reversen Transkriptase verwendet wurden. Die Matrizen für die degenerierten Primer für die spezifische PCR-Reaktion wurden durch die N-terminale Sequenzierung des Blumenkohl-XET-Proteins erhalten, welche eine nachfolgende Sequenz anzeigte:

I P P R K A I D V P F G R N Y.

[0099] Die Primersequenzen aller Primer, die verwendet wurden, werden in Tabelle 1 gezeigt. Der reverse Primer CFXETR1 und die Nested-Primer CFXET F1 wurden für eine zweiphasige Nested-PCR verwendet, was zu einem PCR-Produkt mit dem korrekten Molekulargewicht und der Sequenz, die dem XET in der Glycosylhydrolase-/Transglycosylase Familie 16 entsprach, führte. Die cDNA mit vollständiger Länge wurde anschließend amplifiziert, wobei eine Serie von degenerierten Nested-Primern (Tabelle 1) verwendet wurden, gefolgt von der Sequenzbestimmung der cDNA mit vollständiger Länge (SEQ ID Nr.: 1).

Tabelle 1. In den Beispielen verwendeten Primer

CFXETFI	AARGCNATHGAYGTNCCNTTYGG
CFXETF2	CCNCCNAGRAARGCNATHGAYGT
CFXETRI	AAYTCRAARTCDATYTCRTCRTGYTC
CFXET -5r-1	TGCAGTGACGACCCCAGCGGT A TC
CFXET -5r-2	CAGCGGTATCACCAGCCGGCAG
CFXET -3r-1	CTGCCGGCTGGTGATACCGCTG
CFXET -3r-2	GAT ACCGCTGGGGTCGTCACTGCA
5'RACEOUTER	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5'RACEINNER	CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTGATG
3'RACEOUTER	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3'RACEINNER	CGAGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG
CF FL-F1	AACATCATTATCATCATCACCATCACC
CF FL-F2	CATCACCATCACCATCACCATAACATCT
CF FL RI	TGAACAGAAGCATAATACTCATAATAATCCGG
CF FL R2	CATAATAATCCGGTTCATTGAAAGTTTCG

IBU-Code für gemischte Basen: M = A + C, R = A + G, W = A + T, S = G + C, Y = C + T, V = A + G + C, N = A + C + T, B = G + T + C, K = G + T.

[0100] Die Primer CFXETFI, CFXETF2 und CFXETRI sind genspezifische, degenerierte Primer für die RT-PCR. CFXET-5r-1, CFXET-5r-2, CFXET-3r-1 und CFXET-3r-2 sind genspezifische, interne Primer, während 5'RACE OUTER, 5'RACE INNER, 3'RACE OUTER und 3'RACE INNER komplementäre Primer zu den Adaptoren der RLM-RACE sind. CF-FL-F1, CF-FL-F2, CF-FL-RI sind CF-FL-R2 genspezifische Primer für die Amplifikation der cDNA mit vollständiger Länge.

Beispiel 5

ISOLIERUNG DES GENS, WELCHES DAS XET VON HYBRIDER ESPE CODIERT

[0101] Die cDNA, die das Pappel-XET codiert, wurde zum Beispiel aus einer kombialen EST-Bibliothek einer hybriden Espe isoliert, die aufgebaut war, wie in Hertzberg et al., 1998, beschrieben wurde. Die Anmerkungen der Bibliothek offenbarten drei Sequenzen, die den XET-ähnlichen Enzymen entsprachen. Die Sequenzierung der vollständigen Länge von einem der Klone zeigte, dass er eine cDNA-Kopie des XET-Enzyms in vollständiger Länge enthielt, das als XET16A (SEQ ID Nr.: 3) bezeichnet wurde, während ein anderer Klon einem zweiten XET-Enzym in vollständiger Länge entsprach, das als XET16C (SEQ ID Nr.: 2) bezeichnet wurde.

BEISPIEL 6

EXTRAKTION VON XYLOGLUCAN AUS DEM SAMENKERNPULVER DER TAMARINDE

[0102] Das Verfahren von Edwards et al. (Planta 1985, 163, 133-140) wurde modifiziert, wie nachfolgend beschrieben wird. NaBH₄ (0,75 g) wurde in 2,0 M NaOH (1,5 L) gelöst. Das entölte Samenkernpulver der Tamarinde (30 g) wurde langsam zu der Lösung unter kräftigem Rühren (Schaufelrührer) zugegeben, um ein Verklumpen zu verhindern. Das Gemisch wurde anschließend auf 90°C erhitzt und bei dieser Temperatur für 1 Stunde unter kontinuierlichem Rühren gehalten. Nach einer unvollständigen Abkühlung wurden die Feststoffe über Glasfasern abgefiltert und verworfen. Nach einer weiteren Abkühlung wurde das Filtrat durch die langsame Zugabe von Eisessig (300 ml) angesäuert, gefolgt von der langsamen Zugabe von EtOH (3,0 l), um das

Xyloglucan als eine farblose, gelatineartige Masse zu präzipitieren. Die Feststoffe wurden durch die Filterung über ein Baumwolltuch gesammelt und das Filtrat wurde anschließend verworfen. Das Xyloglucan wurde anschließend in reinem Wasser (1,5 L, 18 MΩ.cm) unter leichtem Erhitzen gelöst und durch die langsame Zugabe von EtOH (3,0 L) erneut präzipitiert. Die feste Masse wurde erneut durch Filtration durch ein Baumwolltuch gesammelt, das per Hand ausgewrungen wurde, um das überschüssige Filtrat freizusetzen. Die Feststoffe wurden anschließend unter vermindertem Druck (Ölpumpe) getrocknet und in einer Haushaltskaffeemühle (Braun) gemahlen, um ein feines Pulver (17 g) zu erhalten.

BEISPIEL 7

ENDOGLUCANASE VERMITTELTE HERSTELLUNG VON XYLOGLUCAN-OLIGOSACCHARIDEN

[0103] Xyloglucan (3 g) wurde in 200 ml aufbereitetem Wasser (18 MΩ.cm) bei 50°C unter starkem Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen auf 30°C wurde Cellulase (30 mg, 4 E/mg, von T. reesei, Fluka) zugegeben und die Lösung wurde bei dieser Temperatur übernacht gehalten. Aktivierter Kohlenstoff (3 g) wurde anschließend zugegeben und das Gemisch wurde für 15 Minuten gerührt. Nach der Zugabe von Acetonitril (200 ml) wurde das Gemisch durch einen Celite-Filter auf einem Glasfaserfilterpapier (Whatman GF/A) gefiltert. Das Filtrat wurde anschließend unter Vakuum (Wasserentlüfter) konzentriert und das restliche Lösungsmittel wurde mit einer starken Vakuum(Öl)-pumpe entfernt. Das Gemisch von Xyloglucan-Oligosacchariden (XXXG, XLXG, XXLG und XLLG im molaren Verhältnis von 15:7:32:46, wie durch eine Hochleistungs-Anionenaustausch-Chromatographie mit Wechselstromnachweis, HPAEC-PAD bestimmt wurde) wurde durch eine semipräparative HPLC auf einer Amid-80-Säule (TosoHaas, 21,5 mm × 300 mm, Eluent 55:45 Acetonitril-Wasser) fraktioniert, wenn dies benötigt wurde. XLXG und XXLG waren unter diesen Bedingungen nicht lösbar. Massenspektrometrie durch Elektrospray-Ionisation (Micromass Q-TOF2) wurde verwendet, um die Identität der Oligosaccharide zu bestätigen.

[0104] Xyloglucan (3 g) wurde in 200 ml reinem Wasser (18 MΩ.cm) bei 50°C unter starkem Rühren gelöst. Nach dem Abkühlen auf 30°C wurde Cellulase (30 mg, 4 E/mg, von Trichoderma reesei, Fluka) zugegeben und die Lösung wurde bei dieser Temperatur übernacht gehalten. Beta-Galactosidase (150 mg, 9 E/mg gegen Lactose, von Aspergillus oryzae, Sigma G-5160) wurde anschließend zugegeben und die Lösung wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde für 3 min gekocht, gefolgt durch die schnelle Abkühlung vor der Zugabe von aktiviertem Kohlenstoff (3 g). Das Gemisch wurde anschließend für 15 min bei Raumtemperatur gerührt. Nach der Zugabe von Acetonitril (200 ml) wurde das Gemisch durch einen Celite-Filter auf einem Glasfaserfilterpapier (Whatman GF/A) gefiltert. Das Filtrat wurde anschließend unter Vakuum (Wasserentlüfter) konzentriert und das restliche Lösungsmittel wurde mit einer starken Vakuum(Öl)-pumpe entfernt. Das Gemisch von Xyloglucan-Oligosacchariden wurde anschließend durch eine semipräparative HPLC auf einer Amid-80-Säule (TosoHaas, 21,5 mm × 300 mm, Eluent 55:45 Acetonitril-Wasser) fraktioniert. Massenspektrometrie durch Elektrospray-Ionisation (Micromass Q-TOF2) wurde verwendet, um die Identität der Oligosaccharide zu bestätigen.

BEISPIEL 8

HERSTELLUNG VON AMINOALDITOL-DERIVATEN VON XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARIDEN (XGO-NH₂)

[0105] Xyloglucan-Oligosaccharide (2,4 g, 1,9 mmol, Gemisch von XXXG, XLXG, XXLG und XLLG) wurden in einer gesättigten Ammoniumhydrogencarbonatlösung (50 ml) gelöst. Natriumcyanoborohydrid (2,4 g, 39 mmol) wurde anschließend zugegeben und die Reaktion wurde bei Raumtemperatur in der Dunkelheit gerührt. Nach sieben Tagen wurde die Reaktion gefiltert und Essigsäure wurde zugegeben, bis die Lösung einen pH-Wert von 2 erreichte. Nach der Konzentration unter Vakuum wurde das unbearbeitete Produkt erneut in 75 ml Wasser gelöst und in 10 Portionen auf eine P2-Säule (BioRad, Bio-Gel P2, 5 cm × 22 cm) aufgetragen. Die Fraktionen von jedem Säulendurchlauf, die das XGO-NH₂ enthielten und die eine niedrige Leitfähigkeit aufwiesen, wurde vereint und bis zur Trockenheit konzentriert (Ausbeute 1,31 g, 51%). Die Massenspektrometrie durch Elektrospray-Ionisation (Micromass Q-TOF2) wurde verwendet, um die Identität der modifizierten Oligosaccharide zu bestätigen.

BEISPIEL 9

HERSTELLUNG VON SULFO-RHODAMIN-DERIVATEN VON XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARIDEN (XGO-SR)

[0106] XGO-Aminoalditole (XGO-NH₂, 0,5 g, 0,4 mM, Gemisch von XXXG-NH₂, XLXG-NH₂, XXLG-NH₂ und XLLG-NH₂) wurden in 3% wässriges Natriumtetraborat (30 ml) gelöst. Sulfo-Rhodamin B-Säurechlorid (192 mg, 0,3 mM, Fluka 86186) wurde in Dimethylformamid (DMF, 1 ml) gelöst und tropfenweise in die gerührte Flüssigkeit zugegeben. Die Reaktion wurde durch TLC (5:4:1 Chloroform: Methanol: Wasser) überwacht und nach sieben Tagen bis zur Trockenheit konzentriert. Das unbearbeitete Produkt wurde durch eine Flash-Chromatographie auf Kieselsäuregel gereinigt (schrittweise Elution mit 55:45:5 und 5:4:1 Chloroform: Methanol: Wasser). Um kleinste Mengen von Kieselsäure aus dem Produkt zu entfernen, wurde das Material auf eine Säule (Supelclean ENVI-18 SPE-Gefäß, 6 ml, Supelco, Bellefonte, PA, USA) für eine Umkehrphasen-Chromatographie geladen und durch einen abgestuften Gradienten aus voll entsalztem Wasser, 10% wässrigem Acetonitril und 20% wässrigem Acetonitril eluiert (Ausbeute: 20 mg, 2,7%).

BEISPIEL 10

HERSTELLUNG VON FLUORESCEIN-DERIVATEN VON XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARIDEN (XGO-FITC)

[0107] Fluorescein-Isothiocyanat-Isomer I (FITC, 12 mg, 0,03 mmol, Fluka 46952) wurde zu einer Lösung von XGO-Oligoalditolen (XGO-NH₂, 45 mg, 0,036 mmol, Gemisch von XXXG-NH₂, XLXG-NH₂, XXLG-NH₂ und XLLG-NH₂) in Natriumbicarbonatpuffer (100 mM, pH-Wert 9,0, 20 ml) gegeben. Die Reaktion wurde durch TLC (70:30:1 Acetonitril: Wasser: Essigsäure) überwacht und wurde nach dem Rühren für 24 Stunden unter Vakuum bis zur Trockenheit konzentriert. Das unbearbeitete Produkt wurde in 1,5 ml ultrareinem Wasser erneut gelöst, auf eine P2-Säule (BioRad, Bio-Gel P2, 1,6 cm × 50 cm) gegeben und mit 10 mM wässrigem Ammoniumbicarbonat mit einer Flussrate von 0,2 ml/min eluiert. Alle Fraktionen wurden durch TLC (70:30:1 Acetonitril: Wasser: Essigsäure) überwacht, welches zeigte, dass das nicht umgesetzte FITC und XGO-NH₂ erfolgreich von dem erwünschten Produkt getrennt wurde. Fraktionen, die XGO-FITC enthielten (nachgewiesen durch einen angeschlossenen UV-Detektor und TLC) und die eine niedrige Leitfähigkeit zeigten, wurden vereint und unter Vakuum konzentriert, um einen orangefarbenen Feststoff zu erhalten (Ausbeute: 34 mg, 60%). Die Massenspektrometrie durch Elektrospray-Ionisation (Micromass Q-TOF2) wurde verwendet, um die Identität der modifizierten Oligosaccharide zu bestätigen.

BEISPIEL 11

SYNTHESE VON RADIOAKTIVEN UND NICHT RADIOAKTIVEN ALDITOL-DERIVATEN VON XLLG-XYLOGLUCO-OLIGOSACCHARID ([1-³H]-XLLGoI UND [1-¹H]-XLLGoI)

[0108] Das Xylogluco-Oligosaccharid XLLG (8,6 µmol) wurde in aufbereitetem Wasser (250 µl, 18 MΩ.cm) gelöst, das auf einen pH-Wert von 11,5 mit NaOH eingestellt wurde. NaB³H₄ (8,2 µmol, 3,76 GBq) wurde anschließend zugegeben und man ließ die Reaktion übernacht bei Raumtemperatur stehen. Die Reaktion wurde durch die vorsichtige Zugabe von Eisessig gestoppt, bis der pH-Wert der Lösung etwa 4 betrug. Man ließ die Lösung anschließend für einen Zeitraum von 30 min stehen, um zu ermöglichen, dass das Tritiumgas durch den Abzug entlüftet wurde. Salze wurden aus dem Produkt durch eine Gelfiltrations-Chromatographie auf Bio-Gel P-2-Harz (BioRad, Lagervolumen 20 ml) mit gereinigtem Wasser (18 MΩ.cm) als Eluent entfernt. Fraktionen mit etwa 1 ml Volumen wurden gesammelt. Die Fraktionen wurden durch eine Flüssigkeitsszintillationsmessung und Dünnschichtchromatographie (Kieselsäuregel, 7:3 Acetonitril-Wasser als Eluent, Ammoniummolybdat/Schwefelsäure-Färbung) analysiert. Die Fraktionen, die sowohl radioaktiv waren als auch ein Produkt mit einem R_f enthielten, der identisch zu XLLG war, wurden vereinigt. Ein qualitativer Tollens-Test für die Reduzierung von Zucker auf diesem Produkt war negativ, was darauf hinweist, dass die Reduktionsreaktion vollständig abgelaufen war. Das Produkt besaß eine Radioaktivität von 115270 Bq/µl.

[0109] Die Synthese von nicht radioaktivem XLLGoI wurde in einer Weise durchgeführt, die identisch zu der war, die vorstehend beschrieben wurde, mit der Ausnahme, dass NaB³H₄ durch NaBH₄ als Reduktionsmittel ausgetauscht wurde. Das Verdampfen der Chromatographielösung ergab das Produkt als ein weißes Pulver, das ein Proton im NMR-Spektrum ergab, das identisch zu dem war, von dem zuvor berichteten wurde (York W. et al., Carbohydrate Research, 1990, 200, 9-31). Die durchschnittliche Ausbeute der drei Reaktionen (50 (+/-) 3%) wurde verwendet, um die Ausbeute der radioaktiven Synthese zu schätzen, die eine Konzentration von

$1,21 \times 10^{-9}$ mol/L und eine spezifische Aktivität von 95 MBq/ μ l anzeigte.

BEISPIEL 12

HERSTELLUNG VON REGENERIERTEN ZELLULOSEMEMBRANEN

a. Herstellung von regenerierten Zellulosemembranen aus Kupferammonium-Lösung

[0110] Gemäß des Verfahrens von Okajima [Okajima K (1995), Polymer Journal 27(11), 1113-1122] wurden 10 g Zellulose (Whatman Nr. 1 Filterpapier, UK) in einem Gemisch von 65 g NH_4OH (20%) gelöst, 12 g frisch hergestelltes $\text{Cu}(\text{OH})_2$, 8 g 10% (w/v) NaOH und 30 g Wasser gelöst, um eine klare blaue, visköse Lösung bei 4°C zu ergeben. Die Lösung wurde auf eine Glasplatte gegossen, um eine Stärke von 0,3 mm zu erhalten, und anschließend in Eindickungsbäder gegeben, die bei 4°C in 10% wässrigem NaOH gehalten wurden, gefolgt von 4% wässriges H_2SO_4 für jeweils 5 Minuten. Die so erhaltenen Regenerat-Zellulosefilme wurden unter fließendem Wasser gewaschen und auf einer Glasplatte bei Raumtemperatur getrocknet.

b. Herstellung von regenerierter Zellulosemembran aus wässriger NaOH/Harnstoff-Lösung

[0111] Bemliese® Vliesstoff, der aus Baumwoll-Linterstoffen in Kupferammonium-Lösung (DP = 650, Asahi Chemical Industry Co. Ltd, Japan) hergestellt wurde, wurde als Quelle der Zellulose verwendet. 10 g Bemliese® Vliesstoff wurde in 200 ml 6 Gew.-% NaOH/4 Gew.-% wässrige Harnstofflösung gelöst, um eine klare Zelluloselösung bei 4°C zu erhalten. Die Lösung wurde auf eine Glasplatte gegossen, um eine Stärke von 0,5 mm zu erhalten, anschließend sofort in eine 5 Gew.-% wässrige H_2SO_4 -Lösung getaucht, um das Festwerden für 5 min bei 4°C zu ermöglichen. Die so erhaltenen Membrane wurden mit fließendem Wasser gewaschen und an der Luft auf einer Glasplatte bei Raumtemperatur getrocknet.

BEISPIEL 13

XET VERMITTELTHER EINBAU VON SULFO-RHODAMIN MODIFIZIERTEN XYLOGLUCAN-OLIGOSACCHARIDEN (XGO-SR) IN XYLOGLUCAN IN LÖSUNG

[0112] Das Fluorophor Sulfo-Rhodamin wurde chemisch in das reduzierende Ende von Xyloglucan-Oligosacchariden eingebaut, um XGO-Rhodamin herzustellen, wie in dem Beispiel 8. A beschrieben wurde. Ein Gemisch (4 ml) von Xyloglucan (XG, 0,5 mg/ml), XGO-Rhodamin (0,5 mg/ml) und XET (0,025 mg/ml) in Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH-Wert 5,5) wurde bei Raumtemperatur (22°C) für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Eluieren des Reaktionsgemisches durch eine HiTrap SP FF-Säule (Amersham Bioscience, Schweden) zur Entfernung des XET-Enzyms beendet. Etwa 25% des zugegebenen Enzyms wurde mit XGO-Rhodamin modifiziert, wie durch die kolorimetrische Analyse von Kooiman [Kooiman P (1960), Recl Trav Chim Pay-Bas, 79, 675-678] bestimmt wurde.

BEISPIEL 14

XET VERMITTELTHER EINBAU VON FLUORESCHEIN MODIFIZIERTEN XYLOGLUCAN-OLIGOSACCHARIDEN (XGO-FITC) IN XYLOGLUCAN IN LÖSUNG

[0113] Fluorescein-Isothiocyanat Isomer I wurde chemisch in das reduzierende Ende von Xyloglucan-Oligosacchariden eingebaut, um XGO-FITC herzustellen, wie in dem Beispiel 10 beschrieben wurde. Die Wirkungen der Konzentration des XET-Enzyms und der Reaktionszeit auf den Einbau von XGO-FITC in Xyloglucan in Lösung wurde analysiert, wie nachfolgend beschrieben wird.

a. Zeitabhängigkeit

[0114] Proben, die ein Gemisch (200 μ l Gesamtvolumen) von Xyloglucan (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) und XET (8 Einheiten) in Citratpuffer (20 mM, pH-Wert 5,5) enthielten, wurden bei 30°C für 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 300 und 360 min inkubiert. Zum gegebenen Zeitpunkt wurde jede Reaktion durch das Erhitzen auf 75°C für 5 min beendet. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 400 μ l Ethanol zugegeben und das Gemisch wurde bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, um das modifizierte und nicht modifizierte XG zu präzipitieren, während das XGO-FITC in Lösung blieb. Sowohl das Präzipitat als auch der Überstand wurden unter Vakuum getrocknet und erneut getrennt in je 200 μ l Wasser gelöst. 0,019; 0,025; 0,031; 0,035; 0,038; 0,041; 0,042; 0,043; 0,044 mg XGO-FITC wurden jeweils in das reduzierende Ende von Xyloglucan in

den 5, 10, 20, 40, 60, 120, 180, 300 und 360 min-Proben eingebaut, wie durch die UV-Absorption bei 495 nm der erneut gelösten Präzipitatlösung bestimmt wurde, wobei eine Standardkurve verwendet wurde, die von XGO-FITC-Lösungen mit einer steigenden Konzentration abgeleitet wurde. Die Ergebnisse werden in [Fig. 5](#) aufgezeichnet.

b. Enzymabhängigkeit

[0115] Ein Gemisch (200 µl Gesamtvolumen) von Xyloglucan (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) in Citratpuffer (20 mM, pH-Wert 5,5) wurde mit abnehmenden Mengen von XET (32,0; 16,0; 14,4; 12,8; 9,6; 6,4; 4,8; 3,2; 1,6 und 0,8 Einheiten) bei 30°C für 40 min inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Reaktionsgemische genauso behandelt, wie in Beispiel 13b beschrieben wurde. Unter Verwendung dieses Verfahrens wurde gezeigt, dass 0,042; 0,038; 0,038; 0,037; 0,034; 0,031; 0,027; 0,022; 0,015 und 0,009 mg XGO-FITC in das reduzierende Ende von Xyloglucan in den Proben, die jeweils 32,0; 16,0; 14,4; 12,8; 9,6; 6,4; 4,8; 3,2; 1,6 und 0,8 Einheiten des XET-Enzyms enthielten, eingebaut wurden. Die Ergebnisse werden in [Fig. 6](#) aufgezeichnet.

BEISPIEL 15

ADSORPTION VON SULFO-RHODAMIN MODIFIZIERTEN XYLOGLUCANEN AUF ZELLULOSE MATERIALIEN

[0116] Zellulosehaltige Materialien (0,1 g Munktell-Filterpapierstreifen) wurden in die Lösung getaucht, die das Rhodamin modifizierte XG enthielt (4 ml, hergestellt gemäß dem Verfahren in Beispiel 10), und wurden übernacht (ca. 15 Stunden) in einem End-Over-End-Mixer bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Binden von XG an die zellulosehaltigen Fasern (11,4 mg XG/g Zellulose) wurde durch den Rückgang von XG aus der Lösung analysiert, wie durch das kolorimetrische Verfahren von Kooiman bestimmt wurde. Das zellulosehaltige Material wurde anschließend aus der ursprünglichen Lösung entfernt und wiederholt mit ultrareinem Wasser in einem End-Over-End-Mixer gewaschen, um überschüssiges XGO-Rhodamin zu entfernen. Nach dem intensiven Waschen wurde die Adsorption von Rhodamin-XG auf der Zellulose ebenfalls als eine intensive rosa Färbung unter Umgebungslicht und als eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht beobachtet. Kontrollproben, die unter identischen Bedingungen behandelt wurden, die aber nur unmodifiziertes Xyloglucan und XGO-SR enthielten, waren nach dem Waschen farblos.

BEISPIEL 16

XET VERMITTELTER EINBAU VON CHEMISCH MODIFIZIERTEN XYLOGLUCAN-OLIGOSACCHARIDEN IN XYLOGLUCAN. DAS ZUVOR AN ZELLULOSEFASERN ANGELAGERT WURDE

[0117] XG (0,5 mg/ml) wurde mit zellulosehaltigen Fasern übernacht (15 h, leichtes Mischen im End-Over-End-Mixer) inkubiert, um zunächst das XG an die Zellulose anzulagern. Die XG-Zellulose wurde anschließend mit einem Gemisch von XGO-Rhodamin (0,1 mg/ml) und XET (0,025 mg/ml) in einem 50 mM Ammoniumacetatpuffer, pH-Wert 5,5 behandelt. Nach dem Mischen in einem End-Over-End-Mixer bei Raumtemperatur für 4 Stunden wurde die Probe intensiv mit ultrareinem Wasser gewaschen. Der kovalente Einbau der fluoreszierenden Oligosaccharide wurde durch eine starke rosa Färbung auf den Zellulosefasern nachgewiesen, die ebenfalls eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht zeigten.

BEISPIEL 17

ADSORPTION VON FLUORESCEIN MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-FITC) AUF ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER

a. Ein Gemisch (4 ml Gesamtvolumen) von Xyloglucan (XG, 0,5 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) und XET (0,025 mg/ml) in Ammoniumacetatpuffer (25 mM, pH-Wert 5,5) wurde bei Raumtemperatur (22°C) für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Eluieren des Reaktionsgemisches durch eine HiTrap SP FF-Säule (Amersham Bioscience, Schweden) zur Entfernung des XET-Enzyms beendet. Zellulosehaltiges Material (0,1 g Whatman Nr. 1 Filterpapierstreifen) wurden anschließend in die Lösung eingetaucht und in einem End-Over-End-Mixer für 15 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Bindung von XG an die zellulosehaltigen Fasern (12,6 mg XG/g Zellulose) wurde durch den Rückgang von XG aus der Lösung analysiert, wie durch das kolorimetrische Verfahren von Kooiman bestimmt wurde. Das zellulosehaltige Material wurde anschließend aus der ursprünglichen Lösung entfernt und wiederholt mit ultrareinem Wasser in einem End-Over-End-Mixer gewaschen, um überschüssiges XGO-FITC zu entfernen. Die Adsorption von

XG-FITC auf der Zellulose wurde als eine intensive rosa Färbung unter Umgebungslicht und als eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht beobachtet. Kontrollproben, zu denen kein XET-Enzym zu der XG/XGO-FITC-Lösung zugegeben wurden, waren nach dem Waschen farblos und zeigten keine Fluoreszenz.

b. Ein Gemisch (200 µl) von Xyloglucan (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) und XET (8 Einheiten) in Citratpuffer (20 mM, pH-Wert 5,5) wurde bei 30°C für 60 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Erhitzung auf 75°C für 5 min beendet. 100 µl dieser Lösung wurden in ultrareinem Wasser auf 500 µl verdünnt und zellulosehaltiges Material (Whatman Nr. 1 Filterpapierscheiben, 1,5 cm Durchmesser, 15,4 mg) wurde in die Lösung eingetaucht, gefolgt durch das Schütteln in einem End-Over-End-Mixer für 15 Stunden bei Raumtemperatur. Das Filterpapier wurde anschließend entfernt und mit ultrareinem Wasser (2 × 1 ml) gewaschen. Die Menge des XGO-FITC, die in XG eingebaut wurde und anschließend an das Filterpapier gebunden wurde (0,0232 mg), wurde durch den Rückgang von XGO-FITC aus der Lösung (einschließlich der Waschlösung) analysiert, wie durch die Adsorption bei 495 nm in 0,1 M Natriumbicarbonat gegen eine Standardkurve von XGO-FITC bestimmt wurde. Um die Menge des FITC modifizierten Xyloglucans (XG-FITC) auf der Papieroberfläche direkt zu quantifizieren, wurde das Papier sowohl mit einer CCD-Kamera während einer Fluoreszenzanregung (Fujifilm Imager) und mit einem Desktop-Scanner abgebildet. Man konnte zeigen, dass die Intensität des blauen Kanals eine lineare Korrelation mit der Menge des auf dem Papier adsorbierten XG-FITC zeigte, wenn es in einem Fullcolor RGB Modus gescannt wurde. Des weiteren konnte gebundenes XG-FITC von dem Papier mit 2 M wässriger NaOH extrahiert und anschließend durch eine UV-Adsorption bei 495 nm in 0,1 M Natriumbicarbonat quantifiziert werden. Man konnte zeigen, dass die Behandlung von XG-FITC mit 2 M NaOH keine Wirkung auf die UV-Adsorption oder der Fluoreszenzemission und dem Spektrum der Anregung der Verbindung hatte. Die Bilder der konfokalen Mikroskopie zeigten, dass das Fluorophor spezifisch auf der Faser Oberfläche lokalisiert war, und wiesen nach, dass das Signal trotz der Porosität des Materials deutlich detektierbar war.

[0118] Ein Bild einer konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eines XG-FITC behandelten Papiers wird in [Fig. 7](#) gezeigt. Die hellen Bereiche deuten auf eine hohe relative Intensität der Fluoreszenz hin und die dunklen Bereiche deuten auf eine niedrigere relative Intensität der Fluoreszenz hin.

BEISPIEL 18

ADSORPTION VON SULFO-RHODAMIN MODIFIZIERTEM (XG-SR) UND FLUORESCEIN MODIFIZIERTEM (XG-FITC) XYLOGLUCAN AUF ZELLULOSEMEMBRANEN

a. Regenerierte Zellulosemembranen (0,05 g) wurden in eine Lösung getaucht, die das Sulfo-Rhodamin modifizierte XG (XG-SR, 4 ml, hergestellt gemäß dem Verfahren in Beispiel 13) enthielt, und wurde für 15 Stunden in einem End-Over-End-Mixer bei Raumtemperatur geschüttelt. Das Binden von XG-SR an die regenerierte Zellulosemembran wurde durch den Rückgang von XG-SR aus der Lösung auf 0,3 mg/g bestimmt, wobei das kolorimetrische Verfahren von Kooiman verwendet wurde. Das zellulosehaltige Material wurde anschließend aus der ursprünglichen Lösung entfernt und wiederholt mit ultrareinem Wasser in einem End-Over-End-Mixer gewaschen, um das überschüssige XGO-Rhodamin zu entfernen. Die Adsorption von XG-Rhodamin auf der Zellulose wurde als eine intensive rosa Färbung unter Umgebungslicht und als eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht beobachtet. Die konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass XG-SR auf den Membranoberflächen lokalisiert war.

b. Ein Gemisch (200 µl) von Xyloglucan (XG, 1 mg/ml), XGO-FITC (0,5 mg/ml) und XET (2 µg) in Citratpuffer (20 mM, pH-Wert 5,5) wurde bei 30°C für 40 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen auf 75°C für 5 min beendet. Die regenerierten Zellulosemembrane (0,05 g) wurden in die Lösung getaucht. Die Menge des XGO-FITC, die in XG eingebaut wurde und anschließend an die Membran gebunden wurde, wurde durch den Rückgang von XGO-FITC aus den Lösungen (einschließlich der Waschlösungen) analysiert, wie durch die UV-Adsorption bei 495 nm in 0,1 M Natriumbicarbonat gegen eine Standardkurve von XGO-FITC bestimmt wurde. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass XG-FITC ausschließlich auf den Membranoberflächen gebunden war.

BEISPIEL 19

HERSTELLUNG VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂)

[0119] Eine typische Reaktion bestehend aus 10 mg Xyloglucan der *Tamarindus indica*, 3,75 mg Amino-modifizierte Xyloglucan-Oligosaccharide (Gemisch von XXXG-NH₂, XLXG-NH₂, XXLXG-NH₂, XLXG-NH₂, hergestellt gemäß Beispiel 8) und 182 Einheiten XET (49 µg Protein, Bradford-Assay) wurden in 20 mM Citratpuffer,

pH-Wert 5,5, für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Das Enzym wurde durch das Erhitzen auf 75°C für zehn Minuten deaktiviert. Die kolorimetrische Analyse von Sulová et al. (1995), Anal Biochem 229, 80-85, zeigte typischerweise eine Veränderung von 0,4 Einheiten der optischen Dichte bei 620 nm nach der Inkubation, was vergleichbar mit dem war, wenn XGO-FITC als ein Substrat unter ähnlichen Bedingungen verwendet wurde.

BEISPIEL 20

ADSORPTION DES AMINO-MODIFIZIERTEN XYLOGLUCANS (XG-NH₂) AUF ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER

[0120] Amino-modifiziertes Xyloglucan (XG-NH₂, hergestellt, wie in Beispiel 19 beschrieben wurde) wurde 1:1 mit Wasser verdünnt und mit einem Blatt Filterpapier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg) in einem Glasgefäß übernacht bei Raumtemperatur unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde intensiv mit ultrareinem Wasser gewaschen. Typischerweise wurden 70 bis 80% des Aminomodifizierten Xyloglucans an das Papier adsorbiert, wie durch das kolorimetrische Verfahren von Kooimann bestimmt wurde. Der Gehalt der Aminogruppen auf dem Papier wurde mit Ninhydrin quantifiziert, wie von Sarin et al. (1981), Anal Biochem 17, 147-157, beschrieben wurde, was typischerweise 70-80 nmol der nachgewiesenen Aminogruppen pro Blatt des Papiers ergab.

BEISPIEL 21

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN

DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT FLUORESCEIN-ISOTHIOCYANAT

[0121] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit Fluorescein-Isothiocyanat, Isomer I (0,6 mg) in 500 µl 0,1 M NaHCO₃ übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde intensiv mit 0,1 M NaHCO₃ und ultrareinem Wasser gewaschen. Papier, das in dieser Weise behandelt wurde, erschien intensiv gelb unter Umgebungslicht und zeigte eine starke Fluoreszenz. Der Grad der Modifikation wurde quantifiziert, wie in Beispiel 17 b dargestellt wurde. Kontrollproben des Papiers, die in der gleichen Weise behandelt wurden, denen aber kein XG-NH₂ zugegeben wurde, waren farblos und zeigten keine Fluoreszenz.

[0122] Ein Foto von dem Ergebnis des Einbaus von Fluorescein in das Papier, das mit XG-NH₂ behandelt und mit FITC umgesetzt wurde, wird in [Fig. 8](#) gezeigt. Die linke Filterscheibe, die dunklere, ließ man mit FITC reagieren, wohingegen die rechte Filterscheibe identisch zu der linken behandelt wurde, außer dass kein XG-NH₂ vor der Reaktion mit FITC gebunden wurde. Von [Fig. 8](#) wird deutlich, dass das FITC an der Filterscheibe gebunden ist.

BEISPIEL 22

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT ESSIGSÄURE

[0123] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit 3,75 mM Essigsäureanhydrid und 11 mM Triethylamin in 2 ml wasserfreies Methanol übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde anschließend mit Methanol gewaschen, gefolgt von einem Überschuss an Wasser. Die Menge der Aminogruppen, die durch den quantitativen Ninhydrin-Assay [Sarin et al. (1981), Anal Biochem 117, 147-157] nachgewiesen wurde, nahm um 84% im Vergleich zu einer Kontrollprobe ab. Acetyliertes Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 20 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 100% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 23

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT PHENYLISOCYANAT

[0124] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit einer 1 M Phenylisocyanat-Lösung in Methanol (2 ml) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde anschließend mit Methanol (3 × 5 ml, in Gefäßen) gewaschen, gefolgt von einem Überschuss (1 L, auf einer Glasfritte) von Wasser. Die Menge der Aminogruppen, die durch den quantitativen Ninhydrin-Assay [Sarin et al. (1981), Anal Biochem 117, 147-157] nachgewiesen wurde, nahm um 70% im Vergleich zu einer Kontrollprobe, ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 20 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 64% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 24

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT ALKENYLBERNSTEINSÄUREANHYDRID (ASA) IN DIMETHYLSULFOXID DMSO

[0125] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit einer 4 mM ASA-Lösung in DMSO (2 ml) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde zweimal mit 10 ml 2-Propanol, zweimal mit 10 ml Methanol und zweimal mit 10 ml Wasser in dem Gefäß und anschließend mit 1 L gereinigtem Wasser auf einer Glasfritte gewaschen. Die Menge der nachgewiesenen Aminogruppen nahm um 63% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 21 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 63% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 25

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYIOGLUCAN (XG-NH₂)DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT BERNSTEINSÄUREANHYDRID IN METHANOL (MeOH)

[0126] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit einer 1,5 M Bernsteinsäureanhydrid-Lösung in wasserfreiem Methanol (2 ml) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde zweimal mit 10 ml Methanol, zweimal mit 10 ml gereinigtem Wasser in dem Gefäß und anschließend mit 1 L gereinigtem Wasser auf einer Glasfritte gewaschen. Die Menge der nachgewiesenen Aminogruppen nahm um 48% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 21 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 38% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 26

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT N-CINNAMOYL-IMIDAZOL

[0127] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit 1 M N-Cinnamoyl-Imidazol in Dimethylsulfoxid (2 ml) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde anschließend mit 2-Propanol (2 × 5 ml), Methanol (2 × 5 ml) und einem Überschuss von Wasser (1 L) gewaschen. Die Menge der Aminogruppen, die durch den quantitativen Ninhydrin-Assay [Sarin et al. (1981), Anal Biochem 117, 147-157] nachgewiesen wurde, nahm um 65% im Vergleich zu einer Kontrollprobe ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Bei-

spiel 21 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 84% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 27

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT BROM-ISOBUTTERSÄURE

[0128] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit einer Lösung, die 1 M Brom-Isobuttersäure und 1 M 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid enthielt, in MeOH (2 ml) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde mit Methanol (2 × 10 ml) und ultrareinem Wasser (2 × 10 ml) in dem Gefäß und anschließend mit 1 L ultrareinem Wasser auf einer Glasfritte gewaschen. Die Menge der nachgewiesenen Aminogruppen nahm um 50% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 21 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 79% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

BEISPIEL 28

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR MIT BIOTIN-3-SULFO-N-HYDROXYCUCCINIMIDES-TER (SUCCINIMIDYL-BIOTIN)

[0129] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit einer Lösung, die 180 µM Succinimidyl-Biotin-Lösung in 10 mM NaHCO₃ (2 ml) enthielt, übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde viermal mit 10 ml gereinigtem Wasser in dem Gefäß und anschließend mit 1 L gereinigtem Wasser auf einer Glasfritte gewaschen. Die Menge der nachgewiesenen Aminogruppen nahm um 71% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe ab. Papier, das auf dieser Weise hergestellt wurde, wurde ebenfalls mit Fluorescein-Isothiocyanat in eine Weise umgesetzt, die in Beispiel 21 dargestellt wurde, und wurde gemäß Beispiel 17 b quantifiziert, wodurch gezeigt wurde, dass 57% der Aminogruppen im Vergleich zu einer Kontrolle aus nicht modifiziertem Amino-Papier umgesetzt wurden.

[0130] Das biotinylierte Papier und eine Kontrollprobe wurde übernacht mit 500 µl einer 0,1% BSA-Lösung mit einem End-Over-End-Mixer inkubiert, um eine unspezifische Bindung von Proteinen an das Papier zu blockieren. Das Papier wurde zweimal mit 1 ml Wasser gewaschen und mit 10 µg Streptavidin-alkalische Phosphatase-Konjugat in 100 mM Tris, pH-Wert 9,5 für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Papier wurde viermal mit 1 ml des gleichen Tris-Puffers gewaschen. Das Papier wurde anschließend mit 18 µg 5 Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat/Nitro blue (BCIP/NBT) in 320 µl Tris-Puffer, pH-Wert 9,5 für 5 min inkubiert. Das Papier wurde anschließend zweimal mit 20 µl gereinigtem Wasser gewaschen und getrocknet. Das Papier wurde für eine Bildanalyse nach dem Scannen auf einem Desktop-Bild-Scanner verwendet. Das sichtbare blaue Papier war 40% stärker gefärbt als die Kontrolle, das nicht biotinylierte Amino-Papier.

BEISPIEL 29

REAKTION VON AMINO-MODIFIZIERTEM XYLOGLUCAN (XG-NH₂), DAS AN DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER ADSORBIERT WAR, MIT γ-THIOBUTYROLACTON

[0131] Zellulosehaltiges Papier (Whatman Nr. 1, 1,5 cm Durchmesser, 15 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 20 beschrieben wurde, wurde mit γ-Thiobutylolacton (87 µl, 1 mol) in einem Gemisch von Ethanol (98%, 500 µl) und einer wässrigen Lösung von Natriumbicarbonat (0,1 M, 500 µl) übernacht bei Raumtemperatur in Glasgefäßen unter kreisförmigen Schütteln inkubiert. Das Papier wurde zweimal mit 5 ml einer wässrigen Lösung von 0,1 M Natriumbicarbonat und schließlich mit etwa 1 L reinem Wasser gewaschen. Die Menge der nachgewiesenen Aminogruppen nahm um 52% im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollprobe ab.

[0132] [Fig. 9](#) zeigt die relativen Mengen von Aminogruppen auf der Oberfläche von XG-NH₂-modifiziertem zellulosehaltigen Papier nach der Behandlung mit verschiedenen aminoreaktiven Reagenzien. Hellgraue Säulen betreffen die Bestimmung mittels der quantitativen Ninhydrin-Analyse, wohingegen die dunkelgrauen Säulen

len die Quantifizierung durch die Reaktion mit FITC, gefolgt durch eine quantitative Bildanalyse, betreffen. **Fig. 10** zeigt die Reaktivität von Papier mit und ohne Modifikation durch XG-NH₂ gegenüber FITC. Der "Leerwert" ist ein im Handel erhältliches Filterpapier, das mit FITC behandelt wurde, "XGN" ist ein im Handel erhältliches Filterpapier, das mit XG-NH₂, gefolgt von FITC behandelt wurde; "1" ist ein im Handel erhältliches Filterpapier, das mit XG-NH₂, gefolgt von Essigsäureanhydrid und anschließend mit FITC behandelt wurde.

BEISPIEL 30

REAKTION VON SULFO-RHODAMIN-METHANTHIOSULFONAT MIT DEN THIOL-GRUPPEN, DIE AUF DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM PAPIER EINGEBRACHT WURDEN

[0133] Die Hälfte des trockenen zellulosehaltigen Papier (7,7 mg), das hergestellt wurde, wie in Beispiel 29 beschrieben wurde, wurde mit 2 ml 10 mM Dithiothreitol (DTT) in einer wässrigen Lösung von 0,1 M NaHCO₃ unter Argon in einem Glasgefäß für 2 Stunden unter gelegentlichem Schütteln behandelt. Nachdem das Papier dreimal mit 2 ml entgastem, ultrareinem Wasser unter Argon gewaschen wurde, wurde 1 ml 1 mM Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat in einer Lösung von DMSO/H₂O (1:9) zugegeben und man ließ die Reaktion für 2 Stunden unter gelegentlichen Rühren ablaufen. Das Papier wurde mit DMSO gewaschen, um das nicht umgesetzte Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat zu entfernen, mit ultrareinem Wasser gewaschen und getrocknet.

[0134] Das Papier zeigte eine intensive rosa Färbung unter Umgebungslicht und eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht, während das leere Papier, das in der gleichen Weise behandelt wurde, farblos war. Die Hälfte des rosafarbenen Papiers (ca. 3 mg) wurde mit 500 µl 10 mM Dithiothreitol (DTT) in einer wässrigen Lösung von 0,1 M NaHCO₃ erneut behandelt, um das Disulfid gebundene Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat von der Papieroberfläche zu entfernen. Die Lösung des Überstands wurde mittels UV-Adsorption bei 565 nm quantifiziert. Das Papier wurde 3 mal mit 1 ml entgastem Wasser unter Argon gewaschen und man ließ es erneut mit 1 ml 1 mM Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat in einer Lösung eines DMSO/H₂O (1:9)-Gemisches für 2 Stunden unter gelegentlichen Rühren reagieren. Nach dem Waschen mit DMSO und Wasser zeigte das Papier erneut eine intensive rosa Färbung unter Umgebungslicht und eine starke Fluoreszenz unter UV-Licht, während das leere Papier, das in der gleichen Weise behandelt wurde, farblos war.

[0135] **Fig. 11** zeigt das Ergebnis einer Reaktion von thiolisiertem Papier mit Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat. Die Proben auf der linken Seite zeigen in jeder Reihe XG-NH₂-behandeltes Papier, während solche auf der rechten Seite XG-NH₂-behandeltes Papier zeigen, das anschließend mit Thiobutylolacton behandelt wurde, um eine Thiol (-SH)-Gruppe einzubringen. Obere Reihe: Proben nach der Behandlung mit Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat. Mittlere Reihe: Anteile von Proben aus der oberen Reihe nach dem Waschen mit der DTT-Lösung. Untere Reihe: DTT gewaschene Proben, die man erneut mit Sulfo-Rhodamin-Methanthiosulfonat reagieren ließ.

BEISPIEL 31

RADIKALE POLYMERISIERUNG DURCH ATOMTRANSFER UNTER VERWENDUNG EINES GEBUNDENEN INITIATORS MIT XG AUF DER OBERFLÄCHE VON ZELLULOSEHALTIGEM MATERIAL

[0136] Die radikale Polymerisierung durch Atomtransfer von Zellulosepapieroberflächen bei Umgebungstemperatur wurde beschrieben [Carlmark und Malström, 1002, J Am Chem Soc 124: 900-901], wenn jedoch große Ladungsmengen des Initiators verwendet werden, ist die Integrität des Papiers stark gefährdet. Wir haben die gleiche Polymerisierungsreaktion mit einem Initiator durchgeführt, der auf der Zelluloseoberfläche über Xyloglucan immobilisiert war, wie in Beispiel 27 beschrieben wurde, ein Verfahren, das große Mengen des Initiators auf der Papieroberfläche ohne die Degradation der Papierstruktur ergab. Das aufgepfropfte Kopolymer, das so hergestellt wurde, zeigte eine dramatisch verstärkte Faser-Polymer-Bindung im Vergleich zu den Kontrollproben, bei dem der Initiator nicht auf der Faseroberfläche gebunden war.

[0137] Obwohl die Erfindung mit Bezug auf ihre bevorzugten Ausführungsformen beschrieben wurde, welche die besten Verfahren darstellen, die den Erfindern zur Zeit bekannt sind, sollte es selbstverständlich sein, dass verschiedene Veränderungen und Modifikationen gemacht werden können, die dem Fachmann offensichtlich sein werden, ohne den Umfang der Erfindung, wie er in den hierin beigefügten Ansprüchen dargelegt wurde, zu verlassen.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> SWETREEGENOMICS AB
TEERI, Tuula T.
BRUMER, Harry

<120> Enzymatisches Verfahren zur Modifikation von polymeren
Kohlenhydratmaterialien

<130> MH 47344

<160> 3

<170> PatentIn Version 3.1

<210> 1
<211> 885
<212> DNA
<213> Brassica oleracea

<400> 1
atggctgttt cttcaactcc gtgggctctc gtagctctgt ttctgatggc ctcttcta
ct 60

gtaatggcaa ttctccacg gaaagccatt gatgtgccat tcggccgaaa ctacgtcc
ca 120

acttgggctt ttgaccacca gaagcaactc aatggcgggt ccgaactcca actcatcc
tc 180

gacaaatata ctgggacagg gtttcaatcg aaagggtcgt atttgttcgg acatttca
gt 240

atgcacataa agctgccagc tggatgatacc gctggggctc tcaactgcatt ttatctgt
cg 300

tcgactaaca acgagcatga cgagatagat ttcgagtttc tcgggaacag gacaggcc
ag 360

ccagtaatat tgcagaccaa tgtattcaca ggaggaaagg gaaacagaga gcaacgca
tc 420

tatctctggc tcgacccttc aaaggettat catacttact ccgtcctctg gaatctct
ac 480

caaattgtat tctttgttga caacatacca atccgtgtgt tcaagaacgc taaggatc

ta 540

ggagtacgtt tcccattcaa ccaaccgatg aagctatact cgagcctttg gaacgctg
ac 600

gattggggcca cgagaggagg gctagagaaa accaattggg ctaatgcacc cttcatag
ct 660

tcctacagag gattccacat cgacggctgc caagcttctg tggaggccaa gtactgtg
ct 720

acccaaggcc gcatgtggtg ggatcagaat gagttccgtg atcttgatgc cgaacaat
at 780

cgtcgcctca aatgggtccg catgaaatgg accatctaca actactgtac cgaccgta
ca 840

aggttcccg ttatgccagc cgaatgtaga agggacagag acgtg
885

<210> 2

<211> 888

<212> DNA

<213> Populus tremula x tremuloides Mich.

<400> 2

atggctgttt cagtctttaa gatggtgggt ttctttgttg gtttctttct aattgtgg
gt 60

ttggttagtt cagctaagtt tgacgagctc tttcaaccaa gttgggctct tgatcact
tt 120

gcttatgaag gagagcttct caggctcaag cttgataatt attctgggtg tggatttc
aa 180

tccaaaagca agtatatgtt tggaaaagta acagtacaaa taaagcttgt agaggggtg
at 240

tctgctggaa ctgttactgc tttctatatg tcctctgagg gtccatacca caacgagt
tt 300

gattttgagt ttcttggcaa caccacagga gaaccttact tggttcaaac caatgtat
tt 360

gttaatggcg taggtcacia agaacaaga ctgaaccttt ggtttgacce taccaagg

at 420

ttccattctt actccttact ttggaaccag cgccaagttg tgtttctagt ggacgaga
cc 480

ccaattagat tgcataccaa tatggaaaac aaaggaattc cttttccaaa ggaccaag
cc 540

atgggtgtat acagctcaat atggaatgca gatgattggg ctacacaagg tggccgtg
tc 600

aagactgatt ggagtcatgc accctttgtt gcctcctata aaggatttga aattgatg
cg 660

tgtgagtgtc cagtatcagt agctgcagct gataatgcta agaaatgtag cagcagtg
gt 720

gagaaaaggt actggtggga tgaacctacg ttgtctgagc tcaatgcgca ccagagcc
at 780

cagcttttgt ggggtgaaggc taaccacatg gtctacgact actgcagcga cactgcta
gg 840

ttcccagtca ctctctaga gtgcctgcac cacagccacc gccaccac
888

<210> 3

<211> 882

<212> DNA

<213> Populus tremula x tremuloides Mich.

<400> 3

atggctgctg cttatccgtg gactttgttt cttggcatgc tggttatggg atctggaa
ca 60

atgggagctg ccctgaggaa gccagtggat gtggcgttcg gtaggaacta tgttccta
ca 120

tgggcttttg accacattaa gtacttcaat ggaggcaatg agattcagct gcacttgg
at 180

aaatacacag gtactggttt ccaatcaaaa ggttcatact tatttggcca tttcagta
tg 240

caaatgaagt tgggtcctgg tgactcagct ggaacagtca ctgctttcta tctatcct

ca 300

caaaactcgg agcatgacga gatagacttt gagttcttag gaaacaggac tggccagc
cc 360

tacattttgc agacaaatgt tttcacagga ggcaaggggg atagagaaca gaggattt
ac 420

ctctggtttg acccaaccaa ggaattccac tactattctg tcctctggaa catgtaca
tg 480

atagtgttcc tcgtggatga cgtgccaatc agagtgttca agaactgcaa agatttgg
ga 540

gttaagtttc cattcaacca gccaatgaag atctactcaa gcctatggaa tgccgatg
at 600

tgggctacca ggggtggact cgagaagaca gactgggtcca aggcaccgtt cattgcct
cc 660

tacaggagct tccacataga tgggtgcgag gcctccgtgg aagccaagtt ctgcgcca
ca 720

cagggtgcta gatggtggga ccagaaggag ttccaagatc tggatgcctt ccagtaca
gg 780

aggctcagct ggggtccgcca gaaatatacc atctacaatt actgcactga tagatcaa
ga 840

tacccttcaa tgccccaga atgcaagaga gacagagaca ta
882

Patentansprüche

1. Verfahren zur Modifizierung eines polymeren Kohlenhydratmaterials (PCM), wobei das Verfahren einen Schritt umfasst, wo eine chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität an das Kohlenhydratmaterial mit Hilfe eines Kohlenhydrat-Bindemoleküls (CLM), umfassend die chemische Gruppe und ein lösliches Kohlenhydratpolymer (SCP), das eine Hemizellulose umfasst, gebunden wird, wobei das Bindemolekül geeignet ist, an das PCM zu binden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das zu modifizierende PCM aus einer Pflanze abgeleitet ist, die aus der Gruppe bestehend aus einer monokotylen Pflanze und einer dikotylen Pflanze ausgewählt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die monokotyle Pflanze eine Pflanze der Familie Gramineae ist.
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die dikotyle Pflanze aus der Gruppe bestehend aus angiospermen Pflanzen (Hartholz), zapfentragenden Pflanzen (Weichholz) und Pflanzen, die der Familie Gossypium angehören, ausgewählt ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, wobei das PCM die Form von zellulosehaltigen Pflanzenfasern besitzt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, wobei das PCM in Form von zellulosehaltigen Mikrofibrillen vorliegt, die aus zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder einer Bakterie abgeleitet sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, wobei das SCP Xyloglucan ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, wobei die chemische Gruppe mit einer gewünschten Funktionalität aus der Gruppe bestehend aus einer ionischen Gruppe, einer hydrophoben Gruppe, einer ungeladenen hydrophilen Gruppe, einer reaktiven Gruppe, einem Nucleophil, einem polymerisierbaren Monomer, einer chromophorischen Gruppe, einer fluorophorischen Gruppe, Biotin, einem radioaktiven Isotop, einem radikalischen Precursor, einer stabilen radikalischen Gruppe, einem Protein und einem proteinbindenden Mittel ausgewählt ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die chemische Gruppe eine Amingruppe ist.

10. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die chemische Gruppe ein radikalischer Precursor ist.

11. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die chemische Gruppe eine stabile radikalische Gruppe ist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Gruppe ein Monomer für eine Polymerisationsreaktion ist.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Gruppe ein Initiator für radikalische Polymerisation ist.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-13, wobei das erhaltene, modifizierte, polymere Kohlenhydratmaterial, relativ zum nicht-modifizierten Material, veränderte Oberflächeneigenschaften besitzt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-14, wobei das erhaltene, modifizierte, polymere Kohlenhydratmaterial, relativ zum nicht-modifizierten Material, veränderte Störkeeigenschaften besitzt.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-15, wobei das erhaltene, modifizierte, polymere Kohlenhydratmaterial, relativ zum nicht-modifizierten Material, veränderte wasserabstoßende Eigenschaften besitzt.

17. Modifiziertes polymeres Kohlenhydratmaterial (mPCM), das durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1-16 erhältlich ist, wobei chemische Gruppen mit einer gewünschten Funktionalität an das Material gebunden sind, wobei die Bindung durch ein Kohlenhydrat-Bindemolekül, das eine chemische Gruppe und ein SCP, das eine Hemizellulose ist, umfasst, vermittelt wird, wobei das Kohlenhydrat-Bindemolekül geeignet ist, an das PCM zu binden.

18. Material nach Anspruch 17, welches in Form von zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder zellulosehaltigen Mikrofibrillen, die aus zellulosehaltigen Pflanzenfasern oder aus einer Bakterie abgeleitet sind, vorliegt.

19. Material nach Anspruch 17 oder 18, wobei die chemischen Gruppen reaktive Gruppen sind, die andere funktionelle Gruppen binden können.

20. Material nach einem der Ansprüche 17-19, woran zwei oder mehrere verschiedene Typen von chemischen Gruppen gebunden sind.

21. Material nach einem der Ansprüche 17-20, wobei die chemische Gruppe aus der Gruppe bestehend aus einem radikalischen Precursor, einer stabilen radikalischen Gruppe, einem Monomer für eine Polymerisationsreaktion und einem Initiator für radikalische Polymerisation ausgewählt ist.

22. Verbundmaterial, das das Material nach einem der Ansprüche 17-21 umfasst.

23. Gefropftes Polymermaterial auf Zellulosebasis, das durch Polymerisationsreaktion eines Materials nach Anspruch 22 erhältlich ist.

24. Verwendung des Materials nach einem der Ansprüche 17-23 zur Herstellung eines Papier- und Kartonprodukts.

25. Verwendung des Materials nach einem der Ansprüche 17-23 als ein Hilfsmittel in einem diagnostischen oder chemischen Assay oder Verfahren.

26. Verwendung des gefropften Polymermaterials auf Zellulosebasis nach Anspruch 23 in der Herstellung von Papierblättern, gewelltem Karton, Gewebe, Hilfsmitteln in einem diagnostischen oder chemischen Assay

oder Verfahren, Verpackungsmitteln für Flüssigkeiten oder Lebensmittel, Papier und Kartonagen, Textilien, Wertpapieren, Banknoten, verfolgbaren Dokumentfüllern, Laminaten, Panelprodukten, holzpolymeren Verbundstoffen, polymeren Verbundstoffen, Legierungen und Mischungen oder Zellulosederivaten (zellulosehaltigen Stoffen).

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

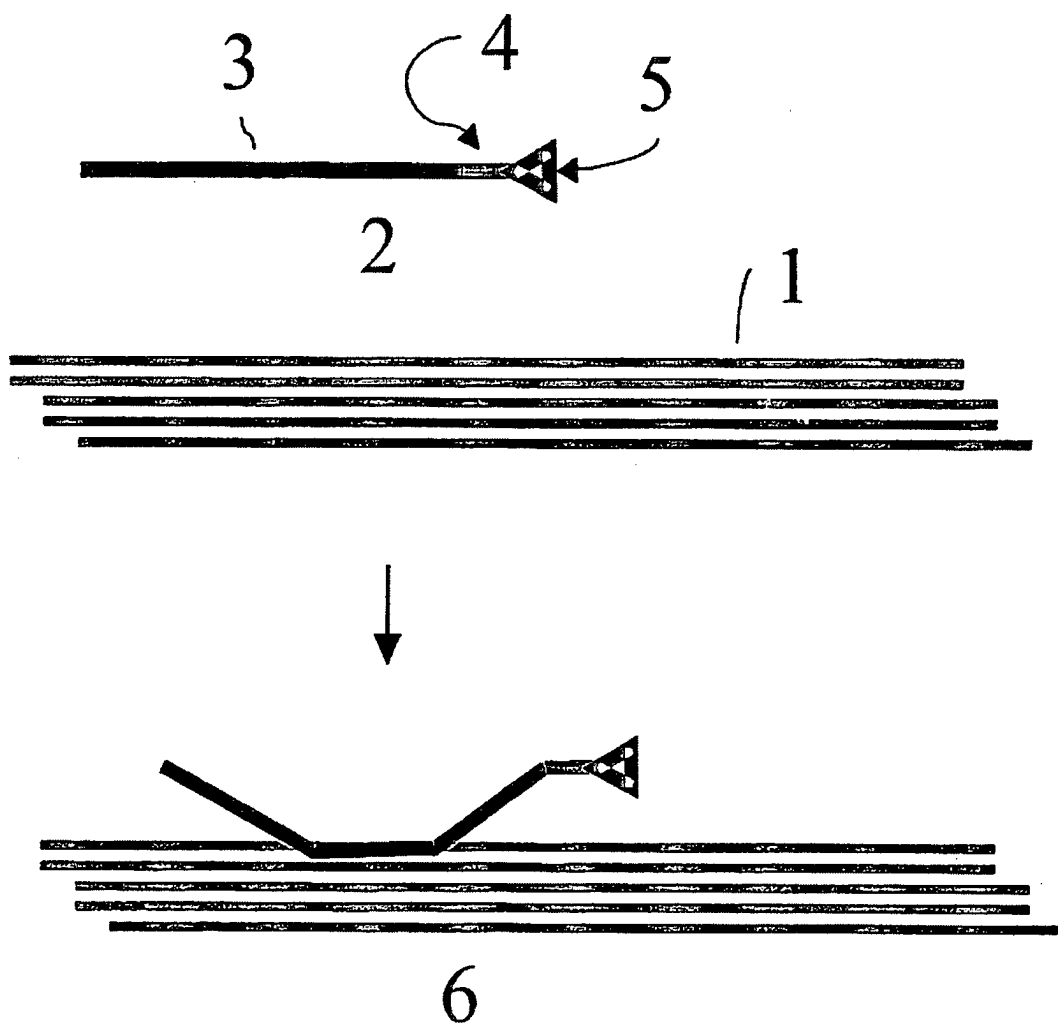


Fig. 1

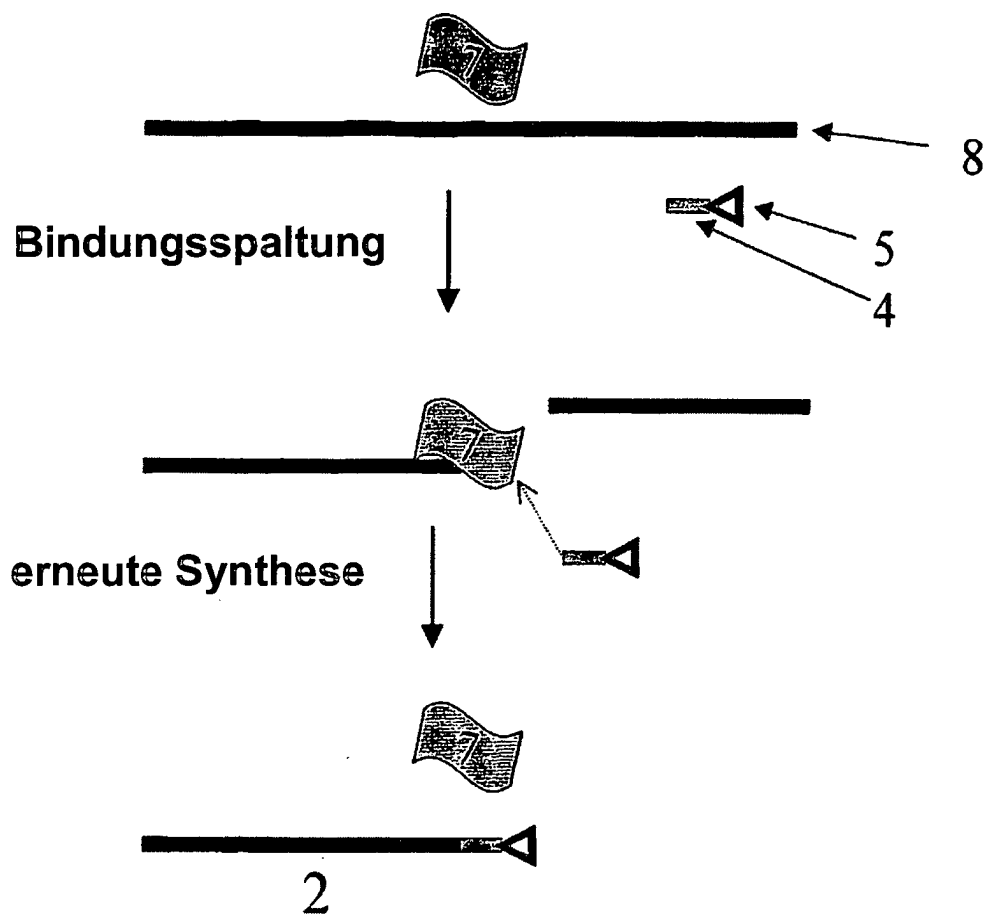


Fig. 2

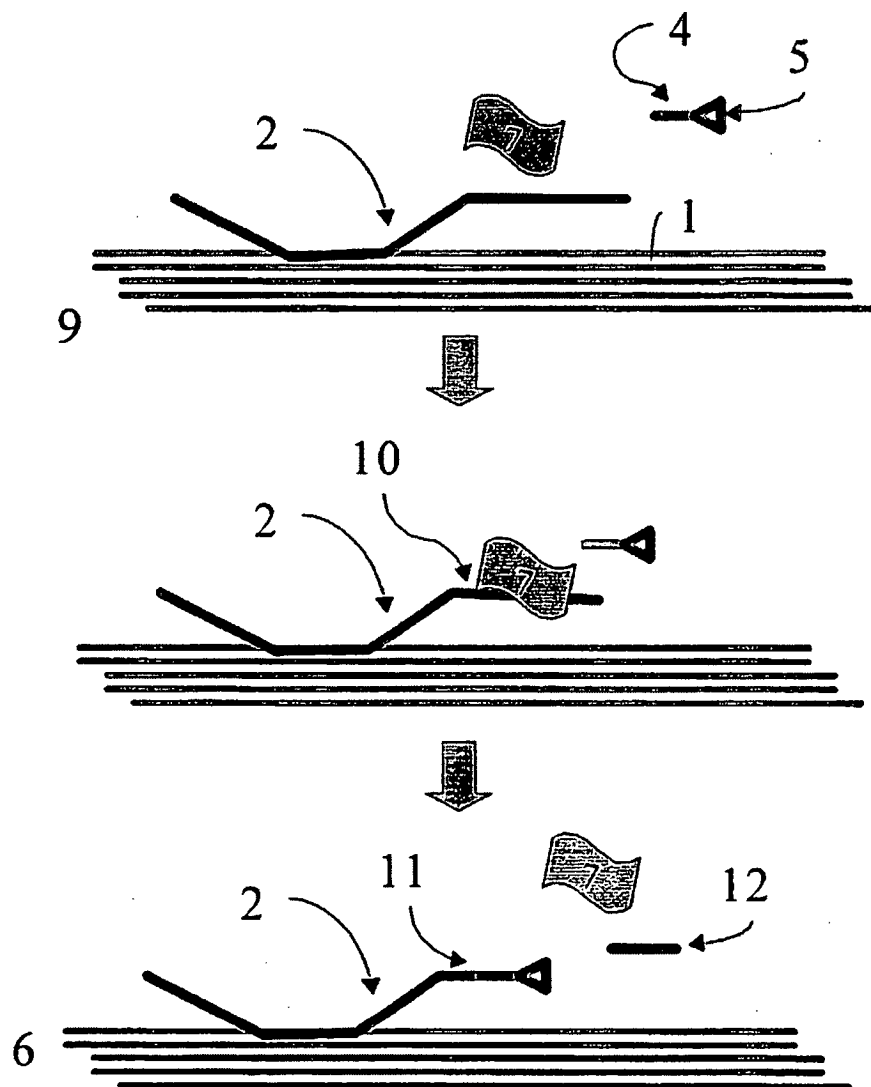


Fig. 3

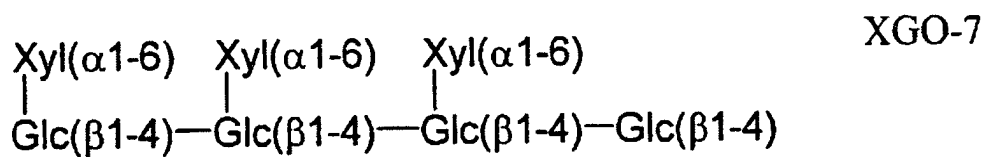
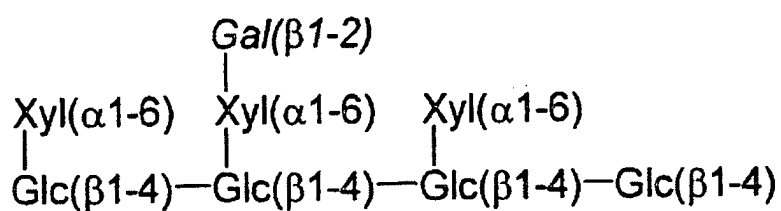
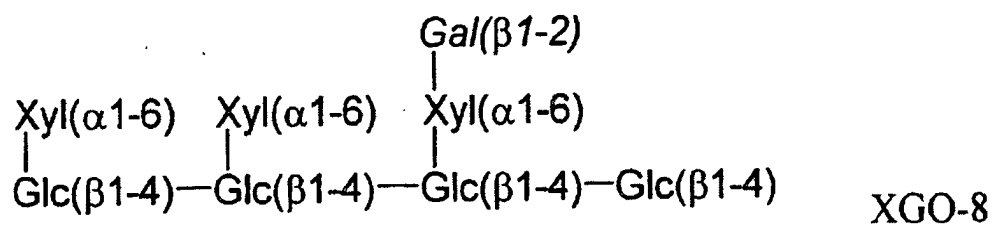
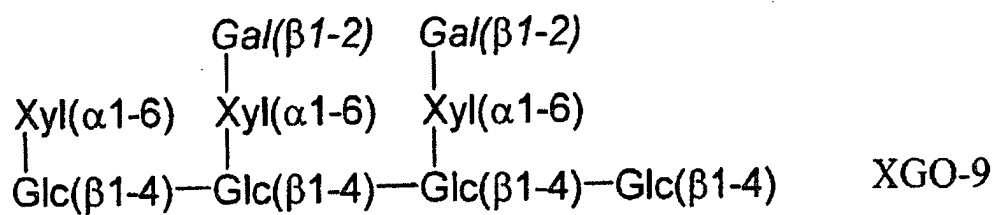


Fig. 4

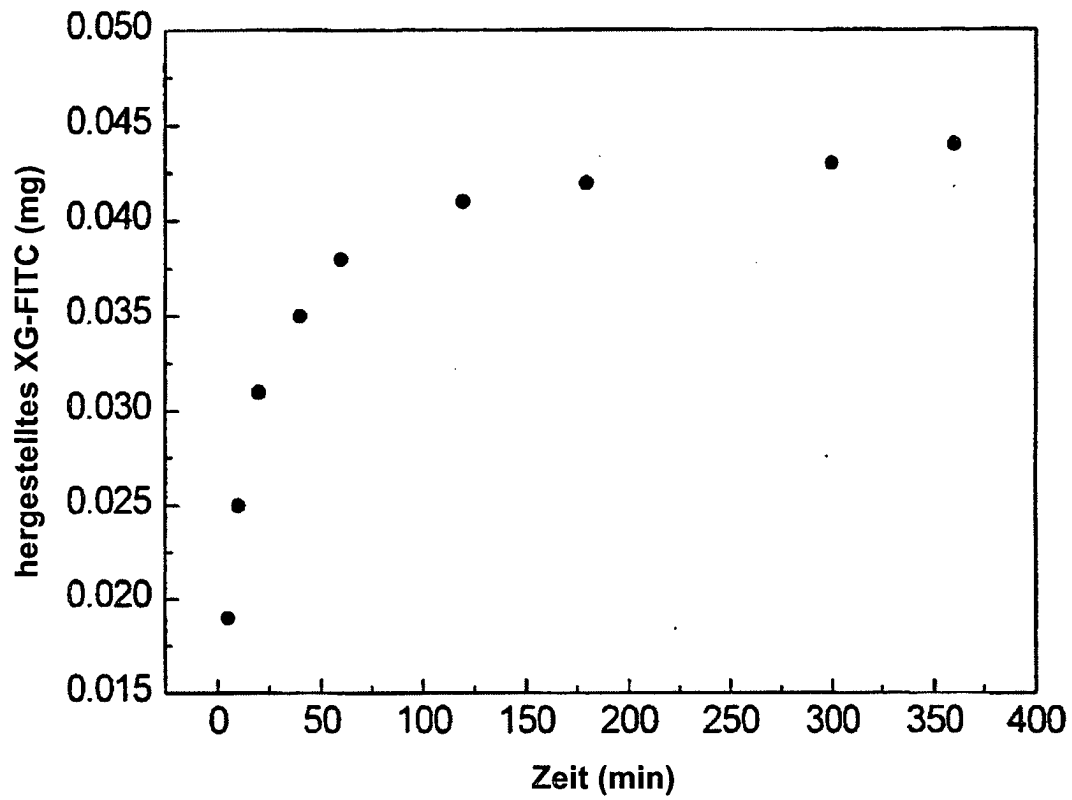


Fig. 5

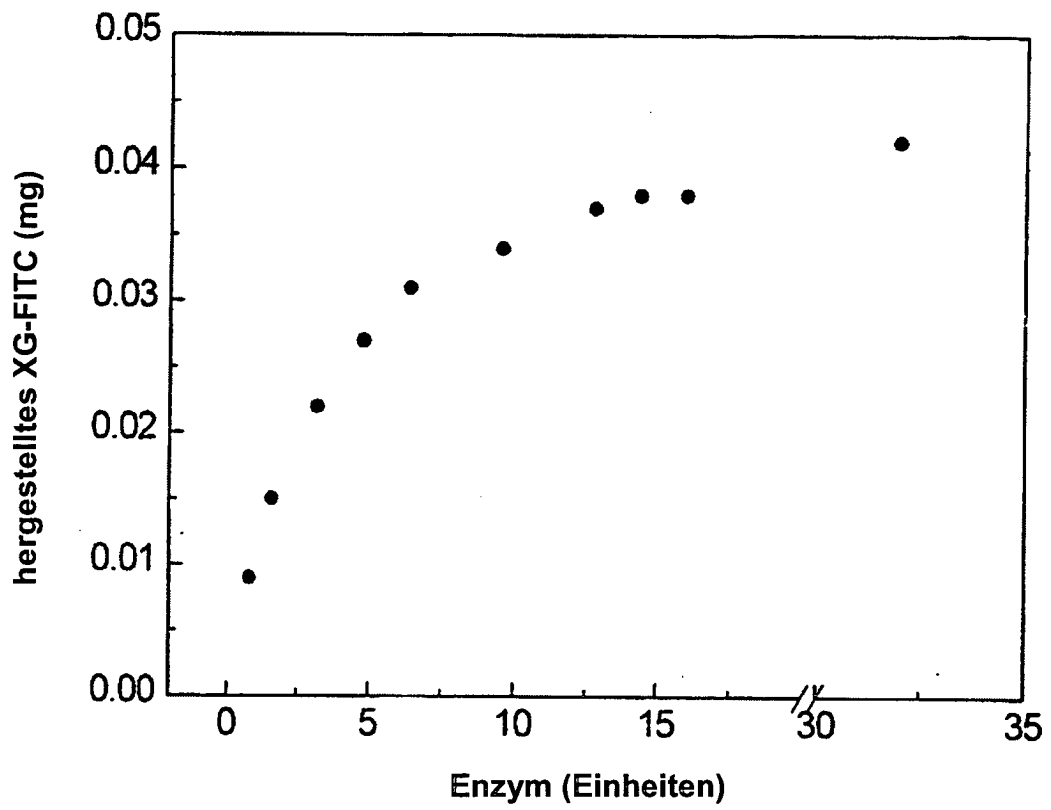


Fig. 6



Fig. 7

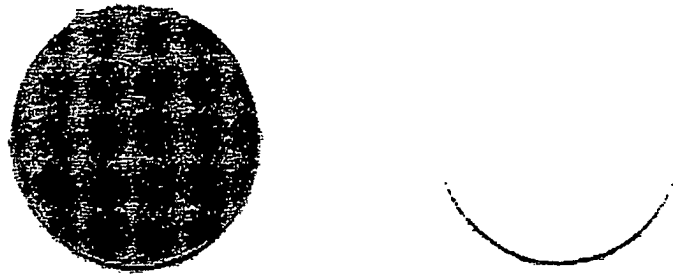


Fig. 8

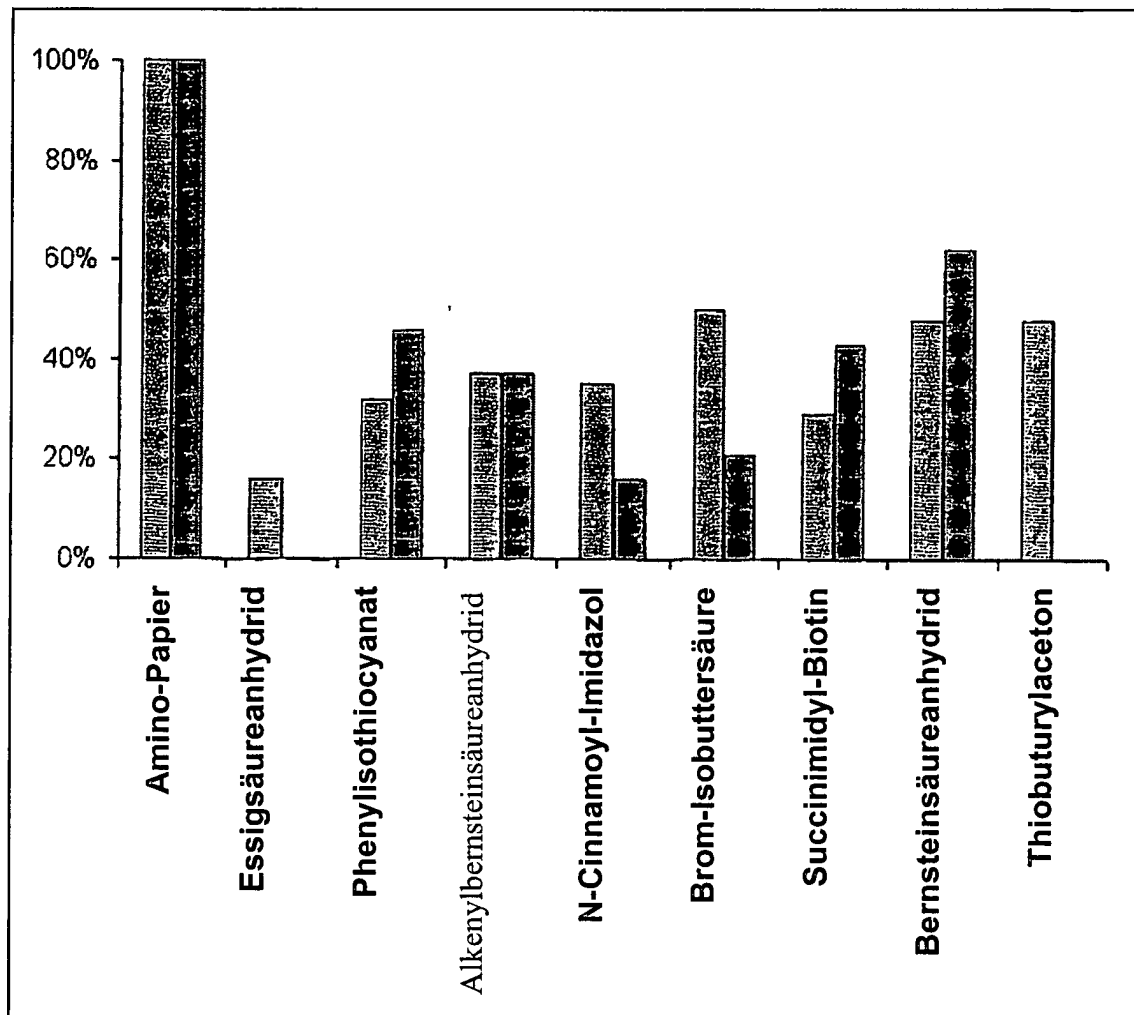


Fig. 9

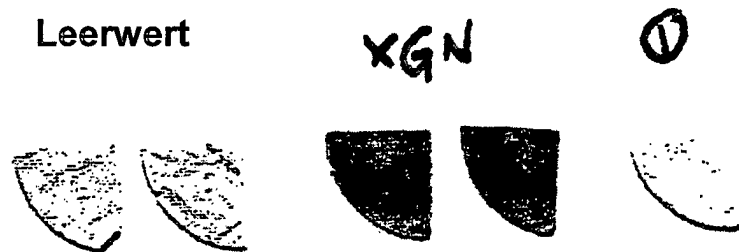


Fig. 10



Fig. 11