



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2005 051 515 A1** 2007.05.03

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2005 051 515.0**

(22) Anmeldetag: **26.10.2005**

(43) Offenlegungstag: **03.05.2007**

(51) Int Cl.⁸: **B05D 7/24** (2006.01)
B05D 5/00 (2006.01)

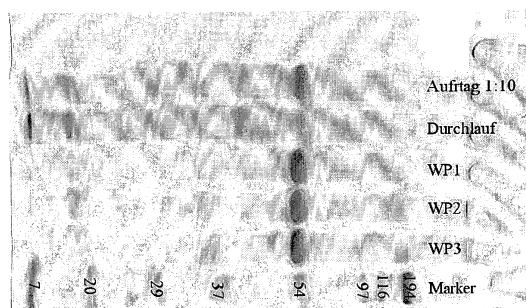
(71) Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(72) Erfinder:
**Subkowski, Thomas, Dr., 68526 Ladenburg, DE;
Karos, Marvin, Dr., 68723 Schwetzingen, DE;
Bollschweiler, Claus, Dr., 69118 Heidelberg, DE;
Baus, Ulf, Dr., 69221 Dossenheim, DE; Rüdiger,
Patrick, 67454 Haßloch, DE; Lang, Michael, 68535
Edingen-Neckarhausen, DE; Montag, Thorsten,
67574 Osthofen, DE; Kasprzyk, Alexandra, 76756
Bellheim, DE**

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit Hydrophobinen**

(57) Zusammenfassung: Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit Fusions-Hydrophobinen bei einem pH-Wert von ≥ 4 sowie Oberfläche mit einer Beschichtung, welche mindestens ein Fusions-Hydrophobin umfasst.



Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit Fusions-Hydrophobinen bei einem pH-Wert ≥ 4 sowie Oberflächen mit einer Beschichtung, welche Fusions-Hydrophobine umfassen.

[0002] Hydrophobine sind kleine Proteine von etwa 100 bis 150 Aminosäuren, die charakteristisch für filamentöse Pilze, beispielsweise *Schizophyllum commune*, sind. Sie weisen in aller Regel 8 Cystein-Einheiten auf. Hydrophobine können beispielsweise aus natürlichen Quellen isoliert werden.

[0003] Hydrophobine weisen eine ausgeprägte Affinität zu Grenzflächen auf und eignen sich daher zur Beschichtung von Oberflächen. So lässt sich beispielsweise Teflon mittels Hydrophobinen unter Erhalt einer hydrophilen Oberfläche beschichten.

[0004] Im Stand der Technik ist die Verwendung von Hydrophobinen für verschiedene Anwendungen vorgeschlagen worden.

Stand der Technik

[0005] WO 96/41882 schlägt die Verwendung von aus essbaren Pilzen gewonnenen Hydrophobinen als Emulgatoren, Verdicker, oberflächenaktive Substanzen, zum Hydrophilieren hydrophober Oberflächen, zur Verbesserung der Wasserbeständigkeit hydrophiler Substrate, zur Herstellung von Öl-in-Wasser-Emulsionen oder von Wasser-in-Öl-Emulsionen vor. Weiterhin werden pharmazeutische Anwendungen wie die Herstellung von Salben oder Cremes sowie kosmetische Anwendungen wie Hautschutz oder die Herstellung von Haarschampoos oder Haarspülungen vorgeschlagen.

[0006] EP-B 1 252 516 offenbart die Beschichtung von Fenstern, Kontaktlinsen, Biosensoren, medizinischen Vorrichtungen, Behältern zur Durchführung von Versuchen oder zur Lagerung, Schiffsrümpfen, festen Teilchen oder Rahmen oder Karosserie von Personenkraftwagen mit einer Hydrophobine enthaltenden Lösung bei einer Temperatur von 30 bis 80°C. Bevorzugt wird zusätzlich eine oberflächenaktive Substanz als Beschichtungshilfsmittel eingesetzt. In den Beispielen wird ein aus Pilzen (*Schizophyllum commune*) gewonnenes Hydrophobin vom Typ SC3 eingesetzt. Zum Ansetzen der Lösung zum Beschichten wird gefriergetrocknetes SC3 eingesetzt, mit Trifluoressigsäure gelöst, die Mischung in einem Stickstoffstrom getrocknet und anschließend in Wasser oder einer Pufferlösung gelöst. Diese Vorgehensweise ist umständlich.

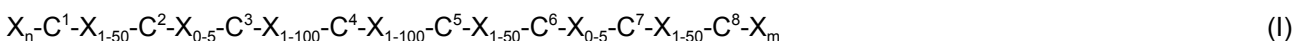
[0007] WO 2005/068087 schlägt als Alternative zum Erwärmen die Beschichtung im sauren pH-Bereich vor. Die Schrift offenbart ein Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit Hydrophobinen bei einem pH-Wert kleiner 7, bevorzugt kleiner 4 und besonders bevorzugt kleiner 2. Weiterhin wird ein Verfahren zum Optimieren der Beschichtungsbedingungen unter Variation der Parameter pH-Wert, Inkubationszeit, Konzentration sowie der Anwesenheit eines Puffers vorgeschlagen. In den Beispielen wird ein Hydrophobin vom Typ SC3 aus natürlichen Quellen eingesetzt.

[0008] Die vorliegende Anmeldung betrifft die Beschichtung von Oberflächen mit einer neuartigen Klasse von nicht natürlich vorkommenden Hydrophobinen. Es handelt sich hierbei um Fusions-Hydrophobine, bei denen natürlich vorkommende Hydrophobine mit mindestens 20 Aminosäuren langen Peptidsequenzen verknüpft sind, welche natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft sind. Auch derartige Fusions-Hydrophobine eignen sich zum Beschichten von Oberflächen.

[0009] Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Qualität der mit Fusions-Hydrophobinen erhaltenen Beschichtungen auch bei erhöhten pH-Werten nicht abnimmt. Dieses zu natürlich vorkommenden Hydrophobinen inverse Verhalten ermöglicht es, auch im alkalischen Bereich qualitativ hochwertige Beschichtungen zu erhalten.

[0010] Zu der Erfindung ist im Einzelnen das Folgende auszuführen:

Zur Ausführung der vorliegenden Erfindung werden „Fusions-Hydrophobine“ eingesetzt, welche die folgende, allgemeine Strukturformel (I) aufweisen,



wobei X für jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren (Phe, Leu, Ser, Tyr, Cys, Trp, Pro, His, Gln, Arg,

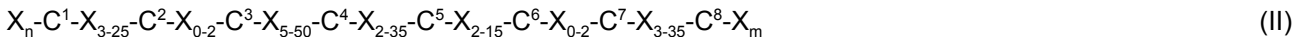
lle Met, Thr, Asn, Lys, Val, Ala, Asp, Glu, Gly) stehen kann. Dabei können X jeweils gleich oder verschieden sein. Hierbei stellen die bei X stehenden Indizes jeweils die Anzahl der Aminosäuren dar, C steht für Cystein, Alanin, Serin, Glycin, Methionin oder Threonin, wobei mindestens vier der mit C benannten Reste für Cystein stehen. Die Indizes n und m stehen unabhängig voneinander für natürliche Zahlen von 0 und 500, bevorzugt von 15 bis 300, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit X_n und X_m bezeichneten Peptidsequenzen für eine mindestens 5, bevorzugt mindestens 20 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist.

[0011] Die Polypeptide gemäß Formel (I) sind weiterhin durch die Eigenschaft charakterisiert, dass sie bei Raumtemperatur nach Beschichten einer Glasoberfläche eine Vergrößerung des Kontaktwinkels eines Wassertropfens von mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25° und besonders bevorzugt 30° bewirken, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

[0012] Die mit C^1 bis C^8 benannten Aminosäuren sind bevorzugt Cysteine; sie können aber auch durch andere Aminosäuren ähnlicher Raumerfüllung, bevorzugt durch Alanin, Serin, Threonin, Methionin oder Glycin ersetzt werden. Allerdings sollen mindestens vier, bevorzugt mindestens 5, besonders bevorzugt mindestens 6 und insbesondere mindestens 7 der Positionen C^1 bis C^8 aus Cysteinen bestehen. Cysteine können in den erfindungsgemäß verwendeten Proteinen entweder reduziert vorliegen oder miteinander Disulfidbrücken ausbilden. Besonders bevorzugt ist die intramolekulare Ausbildung von C-C Brücken, insbesondere die mit mindestens einer, bevorzugt 2, besonders bevorzugt 3 und ganz besonders bevorzugt 4 intramolekularen Disulfidbrücken. Bei dem oben beschriebenen Austausch von Cysteinen durch Aminosäuren ähnlicher Raumerfüllung werden vorteilhaft solche C-Positionen paarweise ausgetauscht, die intramolekulare Disulfidbrücken untereinander ausbilden können.

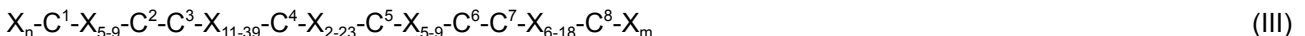
[0013] Falls in den mit X bezeichneten Positionen auch Cysteine, Serine, Alanine, Glycine, Methionine oder Threonine verwendet werden, kann sich die Nummerierung der einzelnen C-Positionen in den allgemeinen Formeln entsprechend verändern.

[0014] Bevorzugt werden Fusions-Hydrophobine der allgemeinen Formel (II)



zur Ausführung der vorliegenden Erfindung eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, jedoch stehen die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 300, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit X_n und X_m bezeichneten Peptidsequenzen für eine mindestens 15, bevorzugt mindestens 35 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist.

[0015] Besonders bevorzugt werden Fusions-Hydrophobine der allgemeinen Formel (III)



eingesetzt, wobei X, C und die bei X und C stehenden Indizes die obige Bedeutung haben, die Indizes n und m für Zahlen zwischen 0 und 200 stehen, und sich die Proteine weiterhin durch die oben erwähnte Kontaktwinkeländerung auszeichnen, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der mit X_n und X_m bezeichneten Peptidsequenzen für eine mindestens 20 Aminosäuren, bevorzugt mindestens 50 Aminosäuren lange Peptidsequenz steht, die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpft ist, und es sich weiterhin bei mindestens 6 der mit C benannten Reste um Cystein handelt. Besonders bevorzugt handelt es sich bei allen Reste C um Cystein.

[0016] Die natürlicherweise nicht mit einem Hydrophobin verknüpften Reste sollen im Folgenden auch als Fusionspartner bezeichnet werden. Damit soll ausgedrückt werden, dass die Proteine aus mindestens einem Hydrophobinteil und einem Fusionspartner bestehen können, die in der Natur nicht zusammen in dieser Form vorkommen.

[0017] Der Fusionspartner kann aus einer Vielzahl von Proteinen ausgewählt werden. Es können auch mehrere Fusionspartner mit einem Hydrophobinteil verknüpft werden, beispielsweise am Aminoterminus (X_n) und am Carboxyterminus (X_m) des Hydrophobinteils. Es können aber auch beispielsweise zwei Fusionspartnerteile mit einer Position (X_n oder X_m) des Hydrophobins verknüpft werden.

[0018] Besonders geeignete Fusionspartnerteile sind Proteine, die natürlicherweise in Mikroorganismen, insbesondere in *E. coli* oder *Bacillus subtilis* vorkommen. Beispiele für solche Fusionspartnerteile sind die Sequenzen yaad (SEQ ID NO:15 und 16), yaae (SEQ ID NO:17 und 18), und Thioredoxin. Gut geeignet sind auch Fragmente oder Derivate dieser genannten Sequenzen, die nur einen Teil, beispielsweise 70 bis 99 % bevorzugt 5 bis 50 % und besonders bevorzugt 10 bis 40 % der genannten Sequenzen umfassen, oder bei denen einzelne Aminosäuren, bzw. Nukleotide gegenüber der genannten Sequenz verändert sind, wobei sich die Prozentangaben jeweils auf die Anzahl der Aminosäuren bezieht.

[0019] In einer weiterhin bevorzugten Ausführungsform weist das Fusion-Hydrophobin neben dem Fusionspartner als eine Gruppe X_n oder X_m noch eine sogenannte Affinitätsdomäne (affinity tag/affinity tail) auf. Hierbei handelt es sich in prinzipiell bekannter Art und Weise um Ankergruppen, welche mit bestimmten komplementären Gruppen wechselwirkend können und der leichteren Aufarbeitung und Reinigung der Proteine dienen können. Beispiele derartiger Affinitätsdomänen umfassen $(\text{His})_k$, $(\text{Arg})_k$, $(\text{Asp})_k$, $(\text{Phe})_k$ oder $(\text{Cys})_k$ -Gruppen, wobei k im allgemeinen für eine natürliche Zahl von 1 bis 10 steht. Bevorzugt kann es sich um eine $(\text{His})_k$ -Gruppe handeln, wobei k für 4 bis 6 steht.

[0020] Die erfindungsgemäß eingesetzten Fusions-Hydrophobine können auch noch in ihrer Polypeptidsequenz modifiziert sein, beispielsweise durch Glycosylierung, Acetylierung oder auch durch chemische Quervernetzung beispielsweise mit Glutaraldehyd.

[0021] Eine wesentliche Eigenschaft der erfindungsgemäß verwendeten Fusionsproteine ist die Änderung von Oberflächeneigenschaften, wenn die Oberflächen mit den Fusionsproteinen beschichtet werden. Die Änderung der Oberflächeneigenschaften lässt sich experimentell dadurch bestimmen, dass der Kontaktwinkel eines Wassertropfens vor und nach der Beschichtung der Oberfläche mit dem Protein gemessen wird und die Differenz der beiden Messungen ermittelt wird.

[0022] Die Durchführung von Kontaktwinkelmessungen ist dem Fachmann prinzipiell bekannt. Die Messungen beziehen sich auf Raumtemperatur sowie Wassertropfen von 5 μl und die Verwendung von Glasplättchen als Substrat. Die genauen experimentellen Bedingungen für eine beispielhaft geeignete Methode zur Messung des Kontaktwinkels sind im experimentellen Teil dargestellt. Unter den dort genannten Bedingungen besitzen die erfindungsgemäß verwendeten Fusionsproteine die Eigenschaft, den Kontaktwinkel um mindestens 20°, bevorzugt mindestens 25°, besonders bevorzugt mindestens 30° zu vergrößern, jeweils verglichen mit dem Kontaktwinkel eines gleich großen Wassertropfens mit der unbeschichteten Glasoberfläche.

[0023] Bevorzugte Fusions-Hydrophobine zur Ausführung der vorliegenden Erfindung sind solche mit einem Hydrophobinteil des Typs *dewA*, *rodA*, *hypA*, *hypB*, *sc3*, *basf1*, *basf2*, die im nachfolgenden Sequenzprotokoll strukturell charakterisiert sind. Es kann sich auch nur um Teile oder Derivate davon handeln. Es können auch mehrere Hydrophobinteile, bevorzugt 2 oder 3, gleicher oder unterschiedlicher Struktur miteinander verknüpft werden.

[0024] Besonders geeignet zur Durchführung der vorliegenden Erfindung sind die Fusionsproteine mit den in SEQ ID NO: 20, 22, 24 dargestellten Polypeptidsequenzen sowie den dafür codierenden Nukleinsäuresequenzen, insbesondere den Sequenzen gemäß SEQ ID NO: 19, 21, 23. Auch Proteine, die sich ausgehend von den in SEQ ID NO. 20, 22 oder 24 dargestellten Polypeptidsequenzen durch Austausch, Insertion oder Deletion von mindestens einer, bis hin zu 10. bevorzugt 5, besonders bevorzugt 5 % aller Aminosäuren ergeben, und die die biologische Eigenschaft der Ausgangsproteine noch zu mindestens 50 % besitzen, sind besonders bevorzugte Ausführungsformen. Unter biologischer Eigenschaft der Proteine wird hierbei die bereits beschriebene Vergrößerung des Kontaktwinkels um mindestens 20° verstanden.

[0025] Die erfindungsgemäß verwendeten Fusions-Hydrophobine lassen sich durch bekannte Verfahren der Peptidsynthese, beispielsweise durch Festphasensynthese nach Merrifield, chemisch herstellen.

[0026] Bevorzugt erfolgt die Herstellung der Fusions-Hydrophobine durch gentechnische Verfahren, bei denen eine für den Fusionspartner und eine für den Hydrophobinteil codierende Nukleinsäuresequenz, insbesondere DNA-Sequenz, so kombiniert werden, dass in einem Wirtsorganismus durch Genexpression der kombinierten Nukleinsäuresequenz das gewünschte Fusions-Hydrophobin erzeugt wird.

[0027] Geeignete Wirtsorganismen (Produktionsorganismen) für das genannte Herstellverfahren können dabei Prokaryonten (einschließlich der Archaea) oder Eukaryonten sein, besonders Bakterien einschliesslich Halobakterien und Methanococcen, Pilze, Insektenzellen, Pflanzenzellen und Säugerzellen, besonders bevor-

zugt *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, *Pseudomonas spec.*, Lactobacillen, *Hansenula polymorpha*, *Trichoderma reesei*, SF9 (bzw. verwandte Zellen) u.a..

[0028] Gegenstand der Erfindung ist außerdem die Verwendung von Expressionskonstrukten, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen, eine für ein erfindungsgemäß verwendetes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz, sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte.

[0029] Vorzugsweise umfassen eingesetzte Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

[0030] Unter einer "operativen Verknüpfung" versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0031] Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z. B. beschrieben in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

[0032] Zusätzlich zu diesen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde.

[0033] Ein bevorzugtes Nukleinsäurekonstrukt enthält vorteilhaft auch eine oder mehrere der schon erwähnten "Enhancer"-Sequenzen, funktionell verknüpft mit dem Promotor, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren.

[0034] Die Nukleinsäuren können in einer oder mehreren Kopien im Konstrukt enthalten sein. Im Konstrukt können noch weitere Marker, wie Antibiotikaresistenzen oder Auxotrophien komplementierende Gene, gegebenenfalls zur Selektion auf das Konstrukt enthalten sein.

[0035] Vorteilhafte Regulationssequenzen für das Verfahren sind beispielsweise in Promotoren wie *cos-*, *tac-*, *trp-*, *tet-*, *trp-tet-*, *lpp-*, *lac-*, *lpp-lac-*, *lacIq-T7-*, *T5-*, *T3-*, *gal-*, *trc-*, *ara-*, *rhaP(rhaPBAD)* *SP6-*, *lambda-PR-* oder *imlambda-P-Promotor* enthalten, die vorteilhaft in gram-negativen Bakterien Anwendung finden. Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren *amy* und *SP02*, in den Hefe- oder Pilzpromotoren *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* enthalten.

[0036] Es können auch künstliche Promotoren für die Regulation verwendet werden.

[0037] Das Nukleinsäurekonstrukt wird zur Expression in einem Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen Vektor, wie beispielsweise einem Plasmid oder einem Phagen inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Unter Vektoren sind außer Plasmiden und Phagen auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, also z. B. Viren, wie *SV40*, *CMV*, *Baculovirus* und *Adenovirus*, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA, sowie das *Agrobacterium*-System zu verstehen.

[0038] Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden. Diese Vektoren stellen eine weitere Ausgestaltung der Erfindung dar. Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* *pLG338*, *pACYC184*, *pBR322*, *pUC18*, *pUC19*, *pKC30*, *pRep4*, *pHS1*, *pKK223-3*, *pDHE19.2*, *pHS2*, *pLc236*, *pMBL24*, *pLG200*, *pUR290*, *pIN-III"3-B1*, *tgt11* oder *pBdCl*, in *Streptomyces* *pIJ101*, *pIJ364*, *pIJ702* oder *pIJ361*, in *Bacillus* *pUB110*, *pC194* oder *pBD214*, in *Corynebacterium* *pSA77* oder *pAJ667*, in Pilzen *pALS1*, *pIL2* oder *pBB116*, in Hefen *2alpha*, *pAG-1*, *YEp6*, *YEp13* oder *pEMBLye23* oder in Pflanzen *pLGV23*, *pGHlac+*, *pBIN19*, *pAK2004* oder *pDH51*. Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und können beispielsweise aus dem Buch *Clooning Vectors* (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) ent-

nommen werden.

[0039] Vorteilhaft enthält das Nukleinsäurekonstrukt zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3'- und/oder 5'-terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

[0040] Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

[0041] Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

[0042] In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann der das Nukleinsäurekonstrukt oder die Nukleinsäure enthaltende Vektor auch vorteilhaft in Form einer linearen DNA in die Mikroorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Vektor wie einem Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurekonstrukt oder der Nukleinsäure bestehen.

[0043] Für eine optimale Expression heterologer Gene in Organismen ist es vorteilhaft die Nukleinsäuresequenzen entsprechend des im Organismus verwendeten spezifischen "codon usage" zu verändern. Der "codon usage" lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

[0044] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator- oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T. J. Silhavy, M. L. Berman und L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F. M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

[0045] Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus, vorteilhaft in einen wirtsspezifischen Vektor inseriert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht. Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden.

[0046] Mit Hilfe der Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem Vektor transformiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäß verwendeten Proteine eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in *Current Protocols in Molecular Biology*, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

[0047] Es sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäß zu verwendenden Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die Sequenz zu verändern, z. B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"-Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z. B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, dass das endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein kodiert (z. B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, dass dadurch die Expression des endogenen Proteins

verändert wird). Der veränderte Abschnitt des erfindungsgemäß verwendeten Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z. B. beschrieben in Thomas, K. R. und Capecchi, M. R. (1987) Cell 51 : 503.

[0048] Als rekombinante Wirtsorganismen für die erfindungsgemäß verwendete Nukleinsäure oder dem Nukleinsäurekonstrukt kommen prinzipiell alle prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen in Frage. Vorteilhafterweise werden als Wirtsorganismen Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze oder Hefen verwendet. Vorteilhaft werden grampositive oder gram-negative Bakterien, bevorzugt Bakterien der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Rhizobiaceae, Streptomycetaceae oder Nocardiaceae, besonders bevorzugt Bakterien der Gattungen Escherichia, Pseudomonas, Streptomyces, Nocardia, Burkholderia, Salmonella, Agrobacterium oder Rhodococcus verwendet.

[0049] Die im Herstellverfahren für Fusions-Hydrophobine verwendeten Organismen werden je nach Wirtsorganismus in dem Fachmann bekannter Weise angezogen bzw. gezüchtet. Mikroorganismen werden in der Regel in einem flüssigen Medium, das eine Kohlenstoffquelle meist in Form von Zuckern, eine Stickstoffquelle meist in Form von organischen Stickstoffquellen wie Hefeextrakt oder Salzen wie Ammoniumsulfat, Spurenelemente wie Eisen-, Mangan- und Magnesiumsalze sowie gegebenenfalls Vitamine enthält, bei Temperaturen zwischen 0 und 100 °C, bevorzugt zwischen 10 bis 60 °C unter Sauerstoffbegasung angezogen. Dabei kann der pH-Wert der Nährflüssigkeit auf einem festen Wert gehalten werden, das heißt während der Anzucht reguliert werden oder nicht. Die Anzucht kann "batch"-weise, "semi-batch"-weise oder kontinuierlich erfolgen. Nährstoffe können zu Beginn der Fermentation vorgelegt oder semikontinuierlich oder kontinuierlich nachgefüttert werden. Die Enzyme können nach dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren aus den Organismen isoliert werden oder als Rohextrakt für die Reaktion verwendet werden.

[0050] Erfindungsgemäß verwendete Fusionsproteine oder funktionelle, biologisch aktive Fragmente davon, können mittels eines rekombinanten Verfahrens hergestellt werden, bei dem man einen Proteine-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Proteine induziert und diese aus der Kultur isoliert. Die Proteine können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist. Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

[0051] Die Zellen werden dann, falls die erfindungsgemäß verwendeten Proteine nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem LySAT gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z. B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

[0052] Eine Aufreinigung der erfindungsgemäß verwendeten Fusionsproteine kann mit bekannten chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Water de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben.

[0053] Besonders vorteilhaft kann es sein, die Fusions-Hydrophobine zur Erleichterung der Isolierung und Reinigung mit speziellen Ankergruppen zu versehen, die an entsprechende komplementäre Gruppen an festen Trägern, insbesondere geeigneten Polymeren anbinden können. Derartige feste Träger können beispielsweise als Füllung für Chromatographiesäulen verwendet werden, und auf diese Art und Weise kann die Effizienz der Trennung in der Regel deutlich gesteigert werden. Solche Trennverfahren sind auch als Affinitätschromatographie bekannt. Zum Einbau der Ankergruppen kann man bei der Herstellung der Proteine Vektorsysteme oder Oligonukleotide verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit veränderte Proteine oder Fusionsproteine kodieren. Zur leichteren Reinigung modifizierte Proteine umfassen als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie beispielsweise die als Hexa-Histidin-Anker bekannte Modifikation. Mit Histidin-Ankern modifizierte Fusions-Hydrophobine lassen sich beispielsweise unter Verwendung von Nickel-Sepharose als Säulenfüllung chromatographisch reinigen. Das Fusions-Hydrophobin kann anschließend mittels

geeigneten Mitteln zum Eluieren, wie beispielsweise einer Imidazol-Lösung, wieder von der Säule eluiert werden.

[0054] Aufarbeitungsmethoden können selbstverständlich auch miteinander kombiniert werden. Beispielsweise kann man zunächst mittels Chromatographie trennen, und die erhaltene Lösung anschließend mittels Dialyse von zum Eluieren verwendeten Stoffen reinigen.

[0055] In einem vereinfachten Reinigungsverfahren kann auf die chromatographische Reinigung verzichtet werden. Hierzu werden die Zellen zunächst mittels einer geeigneten Methode aus der Fermentationsbrühe abgetrennt, beispielsweise durch Mikrofiltration oder durch Zentrifugieren. Anschließend können die Zellen mittels geeigneter Methoden, beispielsweise mittels der bereits oben genannten Methoden, aufgeschlossen, und die Zelltrümmer von den Einschlusskörpern (inclusion bodies) getrennt werden. Letzteres kann vorteilhaft durch Zentrifugieren erfolgen. Schließlich können die Einschlusskörper in prinzipiell bekannter Art und Weise aufgeschlossen werden, um die Fusions – Hydrophobine freizusetzen. Dies kann beispielsweise durch Säuren, Basen und/oder Detergentien erfolgen. Die Einschlusskörper mit den erfindungsgemäß verwendeten Fusions-Hydrophobinen können in der Regel schon unter Verwendung von 0,1 m NaOH innerhalb von ca. 1 h vollständig gelöst werden. Die Reinheit der nach diesem vereinfachten Verfahren erhaltenen Fusions-Hydrophobine liegt in der Regel bei 60 bis 80 Gew. % bzgl. der Menge aller Proteine. Die nach dem beschriebenen, vereinfachten Reinigungsverfahren erhaltenen Lösungen können ohne weitere Reinigung zum Beschichten von Oberflächen eingesetzt werden. In aller Regel stören die Nebenkomponten nicht und beeinflussen das Beschichtungsergebnis allenfalls unwesentlich.

[0056] Die erhaltenen Hydrophobin-Lösungen weisen üblicherweise eine Konzentration von 0,1 mg/ml bis 50 mg/ml an Fusions-Hydrophobinen auf.

[0057] Die Fusions-Hydrophobine können aus den Lösungen auch als Feststoff isoliert werden. Dies kann beispielsweise in prinzipiell bekannter Art und Weise durch Gefrier- oder Sprühtrocknen erfolgen.

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung kann die Isolierung mittels Sprühtrocknen erfolgen. Das Sprühtrocknen kann mit der chromatographisch gereinigten Lösung vorgenommen werden, bevorzugt können aber auch die nach dem vereinfachten Reinigungsverfahren durch Aufbereitung der Einschlusskörper (inclusion bodies) erhaltenen Lösungen eingesetzt werden.

[0059] Zur Durchführung des Sprühtrocknens können die Lösungen ggf. neutralisiert werden. Ein pH-Bereich von 7 bis 9 hat sich als besonders vorteilhaft herausgestellt.

[0060] Weiterhin empfiehlt es sich im Regelfalle, die Ausgangslösungen etwas aufzukonzentrieren. Bewährt hat sich in der Ausgangslösung eine Feststoffkonzentration von bis zu 30 Gew. %. Ein Feststoffanteil von > 5% führt im Allgemeinen zu einem feinpulverigem Produkt. Anschließend kann die Lösung in prinzipiell bekannter Art und Weise sprühtrocknet werden. Geeignete Apparaturen zum Sprühtrocknen sind kommerziell erhältlich. Die optimalen Sprühtrocknungsbedingungen variieren mit Gerätetyp und angestrebtem Durchsatz. Eingangstemperaturen von 130 bis 180°C und Ausgangstemperaturen von 50 bis 80°C haben sich bei Hydrophobinlösungen als günstig herausgestellt. Optional können zum Sprühtrocknen Hilfsstoffe wie beispielsweise Zucker, Mannitol, Dextran oder Maltodextrin eingesetzt werden. Bewährt hat sich eine Menge von 0 bis 30 Gew. %, bevorzugt 5 bis 20 Gew. % derartiger Hilfsstoffe bezüglich des Hydrophobins.

[0061] Zur Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zum Beschichten wird eine Formulierung (F) eingesetzt, welche mindestens Wasser oder wässriges Lösemittelgemisch sowie ein Fusions-Hydrophobin umfasst.

[0062] Geeignete wässrige Lösemittelgemische umfassen Wasser sowie eines oder mehrere, mit Wasser mischbare Lösemittel. Die Auswahl derartiger Komponenten ist nur insofern beschränkt, als die Fusions-Hydrophobine und die anderen Komponenten im Gemisch in ausreichendem Maße löslich sein müssen. Im Regelfalle umfassen derartige Gemische zumindest 50 Gew. %, bevorzugt mindestens 65 Gew. % und besonders bevorzugt mindestens 80 Gew. % Wasser. Ganz besonders bevorzugt wird nur Wasser eingesetzt. Der Fachmann trifft unter den mit Wasser mischbaren Lösemitteln je nach den gewünschten Eigenschaften der Formulierung F eine geeignete Auswahl. Beispiele geeigneter, mit Wasser mischbarer Lösemittel umfassen Monoalkohole wie Methanol, Ethanol oder Propanol, höhere Alkohole wie Ethylenglykol oder Polyetherpolyole sowie Etheralkohole wie Butylglykol oder Methoxypropanol.

[0063] Erfindungsgemäß weist die zur Behandlung eingesetzte Formulierung einen pH-Wert ≥ 4 , bevorzugt ≥ 6 und besonders bevorzugt ≥ 7 auf. Beispielsweise kann der pH-Wert 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 betragen. Insbesondere liegt der pH-Wert im Bereich von 4 bis 11, bevorzugt 6 bis 10, besonders bevorzugt 7 bis 9,5 und ganz besonders bevorzugt 7,5 bis 9. Beispielsweise kann der pH-Wert 7,5 bis 8,5 oder 8,5 bis 9 betragen.

[0064] Zur Einstellung des pH-Wertes umfasst die Formulierung bevorzugt einen geeigneten Puffer. Der Fachmann wählt je nach dem zum Beschichtung vorgesehenen pH-Bereich einen geeigneten Puffer. Zu nennen sind beispielsweise Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer, Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Puffer (Tris-Puffer), Borax-Puffer, Natriumhydrogencarbonat-Puffer oder Natriumhydrogenphosphat-Puffer. Bevorzugt ist Tris-Puffer.

[0065] Die Konzentration des Puffers in der Lösung wird vom Fachmann je nach den gewünschten Eigenschaften der Formulierung bestimmt. Der Fachmann wird in der Regel auf eine ausreichende Pufferkapazität achten, um möglichst konstante Beschichtungsbedingungen zu erreichen. Bewährt hat sich eine Konzentration von 0,001 mol/l bis 1 mol/l, bevorzugt 0,005 mol/l bis 0,1 mol/l und besonders bevorzugt 0,01 mol/l bis 0,05 mol/l.

[0066] Weiterhin umfasst die Formulierung mindestens ein Fusions-Hydrophobin. Fusions-Hydrophobine sowie bevorzugte Fusions-Hydrophobine wurden bereits eingangs genannt. Selbstverständlich können auch Gemische verschiedener Fusions-Hydrophobine eingesetzt werden. Besonders geeignet zur Ausführung der vorliegenden Erfindung ist das Fusions-Hydrophobin yaad-Xa-dewA-his (SEQ ID NO: 20), bzw. davon abgeleitete Proteine, bei denen der Fusionspartner yaad verkürzt ist.

[0067] Die Konzentration der Fusions-Hydrophobine in der Lösung wird vom Fachmann je nach den gewünschten Eigenschaften der Beschichtung gewählt. Mit höheren Konzentrationen lässt sich in der Regel eine schnellere Beschichtung erreichen. Bewährt hat sich im Regelfalle eine Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 1000 $\mu\text{g/ml}$, bevorzugt 1 $\mu\text{g/ml}$ bis 500 $\mu\text{g/ml}$, besonders bevorzugt 10 $\mu\text{g/ml}$ bis 250 $\mu\text{g/ml}$, ganz besonders bevorzugt 30 $\mu\text{g/ml}$ bis 200 $\mu\text{g/ml}$ und beispielsweise 50 bis 100 $\mu\text{g/ml}$.

[0068] Die Formulierung F kann darüber hinaus optional weitere Komponenten bzw. Additive umfassen.

[0069] Beispiele zusätzlicher Komponenten umfassen Tenside. Geeignete Tenside sind beispielsweise nichtionische Tenside, welche Polyalkoxygruppen, insbesondere Polyethylenoxidgruppen umfassen. Beispiele umfassen Polyoxyethylenstearate, alkoxylierte Phenole und dergleichen. Weitere Beispiele geeigneter Tenside umfassen Polyethyleneglycol(20)sorbitanmonolaurat (Tween[®] 20), Polyethyleneglycol(20)sorbitanmonopalmitat (Tween[®] 40), Polyethyleneglycol(20)sorbitanmonostearat (Tween[®] 60), Polyethyleneglycol(20)sorbitanmonooleat (Tween[®] 80), Cyclohexyl-methyl- β -D-Maltosid, Cyclohexyl-ethyl- β -D-Maltosid, Cyclohexyl-n-hexyl- β -D-Maltosid, n-Undecyl- β -D-Maltosid, n-Octyl- β -D-Maltopyranosid, n-Octyl- β -D-Glucopyranosid, n-Octyl- α -D-Glucopyranosid, n-Dodecanoylsucrose. Weitere Tenside sind beispielsweise in WO 2005/68087 Seite 9, Zeile 10 bis Seite 10, Zeile 2 offenbart. Die Konzentration an Tensiden beträgt in der Regel 0,001 Gew. % bis 0,5 Gew. %, bevorzugt 0,01 Gew. % bis 0,25 Gew. % und besonders bevorzugt 0,1 Gew. % bis 0,2% Gew. %, jeweils bezogen auf die Menge aller Komponenten der Formulierung.

[0070] Weiterhin können der Formulierung noch Metallionen, insbesondere zweiwertige Metallionen zugegeben werden. Metallionen können zu einer gleichmäßigeren Beschichtung beitragen. Beispiele geeigneter zweiwertiger Metallionen umfassen, beispielsweise Erdalkalimetallionen wie Ca^{2+} -Ionen. Derartige Metallionen können bevorzugt als in der Formulierung lösliche Salze zugegeben werden, beispielsweise in Form von Chloriden, Nitraten oder Carbonat, Acetat, Citrat, Gluconat, Hydroxid, Lactat, Sulfat, Succinat, Tartrat. Beispielsweise können CaCl_2 oder MgCl_2 zugegeben werden. Die Löslichkeit kann optional auch durch geeignete Hilfsmittel, beispielsweise Komplexbildner gesteigert werden. Falls vorhanden, beträgt die Konzentration derartiger Metallionen in der Regel 0,01 mmol/l bis 10 mmol/l, bevorzugt 0,1 mmol/l bis 5 mmol/l und besonders bevorzugt 0,5 mmol/l bis 2 mmol/l.

[0071] Bei zusätzlichen Komponenten kann es sich weiterhin auch um natürlich vorkommende Hydrophobine handeln, welche im Gemisch mit den Fusions-Hydrophobinen eingesetzt werden.

[0072] Zum Herstellen der Formulierungen F können prinzipiell diejenigen Lösungen verwendet werden, die bei der Herstellung bzw. Aufarbeitung der Hydrophobine anfallen. Es kann sich dabei sowohl um chromatographisch gereinigte Fusions-Hydrophobine handeln, oder auch um die Lösungen, welche durch Abschluss der inclusion bodies erhalten werden. Derartige Lösungen können neben dem Fusions-Hydrophobin auch noch wei-

tere Komponenten aus der Aufarbeitung enthalten, beispielsweise Puffer, Reste der zum Eluieren verwendeten Hilfsmittel oder Hilfsstoffe aus der Sprühtrocknung. Sofern derartige Komponenten den Beschichtungsvorgang nicht stören, brauchen sie nicht entfernt zu werden.

[0073] Die Lösungen aus der Aufarbeitung weisen in der Regel eine deutlich höhere Hydrophobin-Konzentration auf, als zum Beschichten erforderlich. Sie können durch Zugabe von Wasser, weiterer, mit Wasser mischbarer Lösemittel oder Pufferlösungen auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden.

[0074] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden zum Herstellen der Formulierung F feste Fusions-Hydrophobine eingesetzt, bevorzugt die vorstehend genannten, durch Sprühtrocknen hergestellten Fusions-Hydrophobine. Besonders vorteilhaft lässt sich das sprühgetrocknete Fusions-Hydrophobin in Wasser oder im wässrigen Lösemittelgemisch leicht lösen. Dies ist ein deutlicher Vorteil zu festen, natürlich vorkommenden Hydrophobinen, welche nach dem Stand der Technik unter Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) oder Ameisensäure gelöst werden müssen. TFA/Ameisensäure ist aber für die Beschichtung einer Reihe von Substraten unerwünscht, so dass TFA bzw. Ameisensäure nach dem Lösen des Hydrophobins wieder aufwändig entfernt werden muss.

[0075] Weitere Komponenten können in der Formulierung gelöst werden, beispielsweise durch einfaches Einrühren. Selbstverständlich ist es auch möglich, zusätzliche Komponenten vorzulösen und dann die Lösungen zu vereinigen. Verschiedene sprühgetrocknete Materialien lassen sich vor dem Auflösen mischen. Das sprühgetrocknete Fusions-Hydrophobin kann auch in einem weiteren Schritt mit zusätzlichen Komponenten versehen werden, z.B. durch Aufsprühen anderer Verbindungen und anschließendem Trocknen. Umgekehrt kann auch Fusions-Hydrophobin auf schon bestehende Partikel von Hilfsstoffen aufgebracht werden. Eine Modifizierung des sprühgetrockneten Hydrophobins z.B. in Form von Granulierung ist ebenfalls möglich.

[0076] Erfindungsgemäß wird zur Beschichtung die zu beschichtende Oberfläche mit der Formulierung behandelt.

[0077] Die Auswahl der Oberflächen ist hierbei nicht beschränkt. Es kann sich beispielsweise um die Oberflächen von Formkörpern wie Platten, Folien oder dergleichen handeln. Die Oberflächen können beispielsweise aus Kunststoffen wie Teflon, Polyethylen, Polypropylen, Polystyrol oder anderen polymeren Materialien, aus Metallen wie beispielsweise Stahl, Aluminium, Zink, Zinn, Kupfer oder Metalllegierungen wie beispielsweise Messing, aus natürlichen oder veränderten natürlichen Materialien wie beispielsweise Leder, Textilien (z.B. Baumwolle), Papier, sowie für die Kosmetik relevante Oberflächen (z.B. Haut, Haar, Zähne, Schleimhäute) oder aus Glas oder keramischen Materialien bestehen. Zu beschichtende Gegenstände können auch Oberflächen aus verschiedenen Materialien aufweisen, beispielsweise Kombinationen aus Glas, Metall und Kunststoffen.

[0078] Die Methode zur Behandlung der Oberfläche wird vom Fachmann je nach der Art der Oberfläche gewählt. Beispielsweise kann der zu beschichtende Gegenstand in die Formulierung eingetaucht werden, oder die Formulierung kann durch Aufsprühen auf die Oberfläche aufgebracht werden. Diese Art der Oberflächenbehandlung eignet sich sowohl für ebene wie für unregelmäßig geformte Oberflächen. Flächige Formkörper wie beispielsweise Platten oder Folien können weiterhin auch vorteilhaft durch Beschichten oder Aufwalzen behandelt werden. Überschüssige Formulierung kann mittels geeigneter Methoden wieder entfernt werden, beispielsweise durch Abrakeln oder Anquetschen. Besonders bevorzugt kann die Beschichtung mittels Sprühen vorgenommen werden. Geeignete Sprühapparaturen sind dem Fachmann bekannt.

[0079] In der Regel ist eine gewisse Einwirkzeit erforderlich, um die Fusions-Hydrophobine auf der Oberfläche abzuscheiden. Der Fachmann wählt je nach dem gewünschten Ergebnis eine geeignete Einwirkzeit. Beispiele typischer Einwirkzeiten liegen bei 0,1 bis 12 h, ohne dass die Erfindung hierauf beschränkt sein soll.

[0080] Im Regelfalle ist die Einwirkzeit von der Temperatur sowie von der Konzentration des Fusions-Hydrophobins in der Lösung abhängig. Je höher die Temperatur und je höher die Konzentration im Zuge des Beschichtungsvorganges, desto kürzer kann die Einwirkzeit sein. Die Temperatur im Zuge des Beschichtungsvorganges kann bei Raumtemperatur liegen oder aber es kann sich um erhöhte Temperaturen handeln. Beispielsweise kann es sich um Temperaturen von 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, oder 120°C handeln. Bevorzugt handelt es sich um Temperaturen von 15 bis 120°C, besonders bevorzugt 20 bis 100°C, und beispielsweise 40 bis 100°C oder 70 bis 90°C. Die Temperatur kann beispielsweise durch Erwärmen des Bades, in welches der zu beschichtende Gegenstand eingetaucht wird, eingebracht werden. Man kann aber auch einen eingetauchten Gegenstand nachträglich erwärmen, beispielsweise mithilfe von IR-Strahlern.

[0081] Nach dem Beschichten wird noch in der Beschichtung vorhandenes Lösemittel aus der Beschichtung entfernt. Dies kann beispielsweise durch einfaches Abdampfen an Luft erfolgen. Das Entfernen des Lösemittels kann aber auch durch Erhöhen der Temperatur und/oder mit geeigneten Gasströmen und/oder Anlegen eines Vakuums erleichtert werden. Das Abdampfen kann erleichtert werden, indem man beispielsweise beschichtete Gegenstände in einem Trockenschrank erwärmt oder mit einem erwärmten Gasstrom anbläst. Die Methoden können auch kombiniert werden, beispielsweise indem man in einem Umlufttrockenschrank oder einem Trockenkanal trocknet. Weiterhin kann die Beschichtung zum Entfernen des Lösemittels auch mittels Strahlung, insbesondere IR-Strahlung erwärmt werden. Hierzu können alle Arten von breitbandigen IR-Strahlern, bspw. NIR-, MIR- oder FIR-Strahler eingesetzt werden. Es können aber beispielsweise auch IR-Laser eingesetzt werden. Derartige Strahlungsquellen sind in diversen Strahlungsgeometrien kommerziell erhältlich.

[0082] Die Temperatur sowie die Trockenzeit im Zuge des Trocknens wird vom Fachmann festgelegt. Bewährt hat sich eine Trocknungstemperatur von 30 bis 130°C, bevorzugt 50 bis 120°C, besonders bevorzugt 70 bis 110°C, ganz besonders bevorzugt 75 bis 105°C und beispielsweise 85 bis 100°C. Gemeint ist hierbei die Temperatur der Beschichtung selbst. Die Temperatur in einem Trockner kann selbstverständlich auch höher sein. Die Trockenzeit ist naturgemäß umso kürzer, je höher die Trockentemperatur ist.

[0083] Die Temperaturbehandlung im Zuge des Beschichtens und die Trocknung können vorteilhaft miteinander kombiniert werden. So kann beispielsweise eine Oberfläche zunächst mit der Formulierung F bei Raumtemperatur behandelt werden und anschließend bei erhöhten Temperaturen getrocknet und getempert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird mindestens in einem der beiden Schritte „Behandlung“ oder „Trocknung“ erhöhte Temperatur angewandt. Bevorzugt wird in beiden Schritten höhere Temperatur angewandt.

[0084] Durch das Behandeln der Oberfläche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist eine mit Fusions-Hydrophobinen beschichtete Oberfläche erhältlich, welche das Material der Oberfläche sowie eine sich unmittelbar darauf befindliche Schicht umfasst, die mindestens ein Fusions-Hydrophobin sowie ggf. weitere Bestandteile der Formulierung aufweist. Es kann hierbei die gesamte Oberfläche mit dem Hydrophobin bedeckt sein, oder auch nur ein Teil der Oberfläche. Die Qualität kann mittels verschiedener Methoden beurteilt werden, beispielsweise mittels der bereits erwähnten Kontaktwinkelmessung. Der Kontaktwinkel verändert sich wie bei der Beschichtung mit natürlich vorkommenden Hydrophobinen deutlich. Weitere Methoden sind dem Fachmann aus dem eingangs zitierten Stand der Technik bekannt (z.B. „AFM“ atomic force microscopy zum direkten Nachweis der Proteinschicht auf der Oberfläche).

[0085] Die Fusions-Hydrophobin-Schicht kann vor oder nach dem Entfernen des Lösemittels noch weiter chemisch modifiziert werden. Es ist beispielsweise möglich, die Schicht mithilfe geeigneter Vernetzer zu vernetzen. Beispiele geeigneter Vernetzer umfassen Glutaraldehyd, Formaldehyd sowie weitere, aus der Proteinchemie bekannte homo- und heterobifunktionelle Proteinvernetzer. Hierdurch kann die Stabilität der Schicht gesteigert werden. Bei proteinhaltigen Substraten wie beispielsweise Leder, bestimmten Textilien, sowie für die Kosmetik relevanten Oberflächen kann außerdem die Anbindung an das Substrat zusätzlich verbessert werden. Die Vernetzung kann beispielsweise so vorgenommen werden, indem man die Schicht mit dem Fusions-Hydrophobin nach dem Beschichten mit einer zweiten Lösung mit dem Vernetzer behandelt und anschließend trocknet. Weiterhin ist es auch möglich, proteinhaltige aber auch andere Substrate so vorzubehandeln, dass Protein-reaktive funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Substrates gebildet werden. Eingesetzt werden können hierzu beispielsweise die oben genannten Vernetzer, aber andere Chemikalien wie z.B. Ozon, Peroxide oder Aldehyde. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer Kopplung bzw. Verstärkung der Kopplung über Metallionen. Entsprechende Protein-Sequenzen mit Affinität zu Metallionen sind dem Fachmann bekannt (z.B. His₆ zu Ni, Co, Fe etc.) und können mittels molekularbiologischer Standardtechniken bzw. proteinchemische Kopplung an die Hydrophobine angebracht werden. Die Metallionen können dabei vorab an die zu beschichtende Oberfläche gekoppelt sein oder gleichzeitig mit der Hydrophobinkopplung eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiel

[0086] Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher illustrieren:

Teil A) Herstellung der erfindungsgemäß verwendeten Fusions-Hydrophobine

Beispiel 1

Vorarbeiten für die Klonierung von yaad-His₆/yaaE-His₆

[0087] Mit Hilfe der Oligonukleotide Hal570 und Hal571 (Hal 572/Hal 573) wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Bakteriums *Bacillus subtilis* verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Gens yaaD/yaaE aus *Bacillus subtilis*, und an den Enden je eine NcoI bzw. BglII Restriktionsschnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den zuvor mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BglII linearisierten Vektor pQE60 der Firma Qiagen kloniert. Die so erstandenen Vektoren pQE60YAAD#2/pQE60YaaE#5 können zur Expression von Proteinen bestehend aus, YAAD::His₆ bzw. YAAE::His₆ verwendet werden.

Hal570: gcgcgcccatggctcaaacagggtactga

Hal571: gcagatctccagccgcttcttcatac

Hal572: ggccatgggattaacaatagggtactagg

Hal573: gcagatctacaagtcctttgcttatattcc

Beispiel 2

Klonierung von yaad-Hydrophobin DewA-His₆

[0088] Mit Hilfe der Oligonukleotide KaM 416 und KaM 417 wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Als Template DNA wurde genomische DNA des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans* verwendet. Das erhaltene PCR Fragment enthielt die codierende Sequenz des Hydrophobin Gens dewA und einer N-Terminale FaktorXa Proteinase Schnittstelle. Das PCR Fragment wurde gereinigt und mit der Restriktionsendonuklease BamHI geschnitten. Dieses DNA Fragment wurde als Insert verwendet, und in den zuvor mit der Restriktionsendonuklease BglII linearisierten Vektor pQE60YAAD#2 kloniert.

[0089] Der so erstandene Vektor #508 kann zur Expressions eines Fusionsproteins bestehend aus, YAAD::Xa::dewA::His₆ verwendet werden.

KaM416: GCAGCCCATCAGGGATCCCTCAGCCTTGGTACCAGCGC

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

Beispiel 3

Klonierung von yaad-Hydrophobin RodA-His₆

[0090] Die Klonierung des Plasmids #513 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 434 und KaM 435.

KaM434: GCTAAGCGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCATTGCTGC

KaM435: CCAATGGGGATCCGAGGATGGAGCCAAGGG

Beispiel 4

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF1-His₆

[0091] Die Klonierung des Plasmids #507 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonukleotide KaM 417 und KaM 418.

[0092] Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz – Hydrophobin BASF1-eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Beispiel 5

Klonierung von yaad-Hydrophobin BASF2-His₆

[0093] Die Klonierung des Plasmids #506 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonucleotide KaM 417 und KaM 418.

[0094] Als Template DNA wurde ein künstlich synthetisierte DNA Sequenz – Hydrophobin BASF2-eingesetzt (siehe Anhang).

KaM417: CCCGTAGCTAGTGGATCCATTGAAGGCCGCATGAAGTTCTCCGTCTCCGC

KaM418: CTGCCATTCAGGGGATCCCATATGGAGGAGGGAGACAG

Beispiel 6

Klonierung von yaad-Hydrophobin SC3-His₆

[0095] Die Klonierung des Plasmids #526 erfolgte analog zu Plasmid #508 unter Verwendung der Oligonucleotide KaM464 und KaM465.

[0096] Als Template DNA wurde cDNA von Schizophyllum commune eingesetzt (siehe Anhang).

KaM464: CGTTAAGGATCCGAGGATGTTGATGGGGGTGC

KaM465: GCTAACAGATCTATGTTCCGCCGTCTCCCCGTCGT

Beispiel 7

Fermentation des rekombinanten E.coli Stammes yaad-Hydrophobin DewA-His₆

[0097] Inokulation von 3 ml LB Flüssigmedium mit einem yaad-Hydrophobin DewA-His₆ exprimierenden E.coli Stamm in 15 ml Greiner Röhrchen. Inkubation für 8h bei 37°C auf einem Schüttler mit 200 UpM. Je 2 l Erlemeyer Kolben mit Schikanen und 250 ml LB Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) werden mit jeweils 1 ml der Vorkultur angeimpft und 9h bei 37°C auf einem Schüttler mit 180 UpM inkubiert.

[0098] 13.5l LB-Medium (+100 µg/ml Ampicillin) in einem 20 l Fermenter mit 0,5 l Vorkultur (OD_{600nm} 1:10 gegen H₂O gemessen) animpfen. Bei einer OD_{600nm} von ~3.5 Zugabe von 140ml 100mM IPTG. Nach 3h Fermenter auf 10°C abkühlen und Fermentationsbrühe abzentrifugieren. Zellpellet zur weiteren Aufreinigung verwenden.

Beispiel 8

Reinigung des rekombinanten Hydrophobin-Fusionsproteins

(Reinigung von Hydrophobin-Fusionsproteinen, die ein C-terminales His₆-tag besitzen)

[0099] 100 g Zellpellet (100 – 500 mg Hydrophobin) werden mit 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 auf 200 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und resuspendiert. Die Suspension wird mit einem Ultraturax Typ T25 (Janke und Kunkel; IKA-Labortechnik) für 10 Minuten behandelt und anschließend für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 500 Einheiten Benzonase (Merck, Darmstadt; Best.-Nr. 1.01697.0001) zum Abbau der Nucleinsäuren inkubiert. Vor dem Zellaufschluss wird mit einer Glaskartusche (P1) filtriert. Zum Zellaufschluss und für das Scheren der restlichen genomischen DNA werden zwei Homogenisatorläufe bei 1.500 bar durchgeführt (Microfluidizer M-110EH; Microfluidics Corp.). Das Homogenisat wird zentrifugiert (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g), der Überstand auf Eis gestellt und das Pellet in 100 ml Natriumphosphatpuffer, pH 7,5 resuspendiert. Zentrifugation und Resuspendieren werden dreimal wiederholt, wobei der Natriumphosphatpuffer bei der dritten Wiederholung 1 % SDS enthält. Nach der Resuspension wird für eine Stunde gerührt und eine abschließende Zentrifugation durchgeführt (Sorvall RC-5B, GSA-Rotor, 250 ml Zentrifugenbecher, 60 Minuten, 4°C, 12.000 Upm, 23.000 g). Gemäß SDS-PAGE Analyse ist das Hydrophobin nach der abschließenden Zentrifugation im Überstand enthalten ([Abb. 1](#)). Die Versuche zeigen, dass das Hydrophobin wahrscheinlich in Form von Einschlusskörpern in den entsprechenden E.coli Zellen enthalten ist. 50 ml des Hydrophobin-enhaltenden Überstandes werden auf eine 50 ml Nickel-Sepharose High Performance 17-5268-02 Säule aufgetragen (Amersham), die mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer äquilibriert wurde. Die Säule wird mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer gewaschen und das Hydrophobin anschließend mit 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer, der 200 mM Imidazol enthält, eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wird die

Lösung gegen 50 mM Tris-Cl pH 8,0 Puffer dialysiert.

[0100] [Abb. 1](#) zeigt die Reinigung des hergestellten Fusions-Hydrophobins:

Spur 1: Auftrag Nickel-Sepharose Säule (1:10 Verdünnung)

Spur 2: Durchlauf = Eluat Waschschrift

Spuren 3 – 5: OD 280 Maxima der Elutionsfraktionen

[0101] Das Fusions-Hydrophobin der [Abb. 1](#) besitzt ein Molekulargewicht von ca. 53 kD. Die kleineren Banden repräsentieren zum Teil Abbauprodukte des Hydrophobins.

Beispiel 9

Vereinfachtes Reinigungsverfahren

[0102] Der in Beispiel 7 erhaltene E. coli-Zellpellet in Wasser wird mit 1000 bar durch eine Düse gepresst. Hierbei werden die Zellen vollständig aufgeschlossen. Mittels Zentrifugation wird das in Einschlusskörpern (inclusion bodies) anfallende Hydrophobin von den restlichen Zelltrümmern abgetrennt werden. Bei einer g-Zahl von 5000 separieren sich nach 30 Minuten 2 Phasen. Die untere, Fusions-Hydrophobin-enthaltende Phase wird noch einmal mit Wasser suspendiert und wie oben zentrifugiert. Die inclusion bodies werden anschließend in 0,1 M NaOH für 60 Minuten inkubiert und so vollständig gelöst. Der pH-Wert wird mit Phosphorsäure auf 8 eingestellt und die Proteinkonzentration auf 20 mg/ml eingestellt. Die Reinheit (bezogen auf Gesamtprotein) des so produzierten Fusions-Hydrophobins liegt bei 70%.

Beispiel 10

Sprühtrocknung von Hydrophobin

[0103] Die in Beispiel 9 erhaltene Hydrophobinlösung wird in einem handelsüblichen Sprühtrockner weiter verarbeitet.

[0104] Die Sprühtrocknung erfolgt mit einem Zusatz von 10 % w/w Mannitol bei einer Eingangstemperaturen von 160°C und Ausgangstemperaturen von 70°C. Es wurde ein feinpulvriges Produkt erhalten.

Beispiel 11

Anwendungstechnische Prüfung; Charakterisierung des Fusions-Hydrophobins durch Kontaktwinkeländerung eines Wassertropfens auf Glas

Substrat:

Glas (Fensterglas, Süddeutsche Glas, Mannheim):

- Sprühgetrocknetes Hydrophobin gemäß Beispiel 10 wird in einer wässrigen Pufferlösung (50mM Tris, pH 8 + 0,1 mM CaCl₂ (Endkonzentration) + 0,1% Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat (Tween® 20)) aufgenommen und auf eine Konzentration von 100 µg/mL eingestellt
- Inkubation von Glasplättchen über Nacht (Temperatur 80°C) danach Beschichtung waschen in destilliertem Wasser
- danach Inkubation 10min/80°C/1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS)-Lösung in dest. Wasser
- Waschen in dest. Wasser

[0105] Die Proben werden an der Luft getrocknet und der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser bei Raumtemperatur bestimmt.

[0106] Die Kontaktwinkelmessung wurde auf einem Gerät Dataphysics Contact Angle System OCA 15+, Software SCA 20.2.0. (November 2002) bestimmt. Die Messung erfolgte gemäss den Herstellerangaben.

[0107] Unbehandeltes Glas ergab einen Kontaktwinkel von 30 ± 5°; das beschichtete Glas wies einen Kontaktwinkel von 75 ± 5° auf.

Beispiel 12

Beschichtungsversuche mit dem Fusions-Hydrophobin mittels Sprühen:

1. Besprühen von Polyethylen – Platten:

[0108] Für die Versuche wurde eine gemäß Beispiel 8 erhaltene Lösung von yaad-Xa-dewA-his (SEQ ID NO: 20) eingesetzt. Die Lösung enthielt außerdem Natriumphosphat-Puffer in einer Konzentration von 50 mM. Die Konzentration des Fusion-Hydrophobins in der Lösung betrug 11,23 mg/ml, der pH-Wert der Lösung 7,5.

[0109] Weiterhin wurde die gemäß dem vereinfachten Reinigungsverfahren gemäß Beispiel 9 erhaltene Lösung eingesetzt.

[0110] Für die Sprühversuche wurden die Lösungen etwa 100-fach auf eine Konzentration von 100 µg/ml Fusionshydrophobin verdünnt. Zum Verdünnen wurden jeweils die folgenden Lösungen bzw. Lösungsmittel eingesetzt:

Beispiel Nr.	Hydrophobin	Lösung	pH-Wert der Lösung
10-1	chromatographisch gereinigt (Bsp. 8)	nur Wasser	8,0 – 8,5
10-2	chromatographisch gereinigt (Bsp. 8)	Tris-Puffer (50 mM)	7,5 – 8,0
10-3	chromatographisch gereinigt (Bsp. 8)	0,1 Gew. % nichtionisches Tensid in Wasser, (Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaurat, Tween® 20)	7,5 – 8,0
10-4	chromatographisch gereinigt (Bsp. 8)	(0,1 Gew. %) Polyamid-Derivat in Wasser (Lurotex® A 25)	4,0 – 4,5
10-5	chromatographisch gereinigt (Bsp. 8)	(0,1 Gew. %) anionisches Tensid in Wasser (Leophen® M)	8,5 – 9,0
10-6	aus Aufschluss (Bsp. 9)	nur Wasser	8,0 – 8,5
10-7	aus Aufschluss (Bsp. 9)	Tris-Puffer (50 mM)	7,5 – 8,0

[0111] Diese Lösungen 10-1 bis 10-5 wurden nun mit einem Laborsprüngerät (Desaga SG1) so auf Polyethylen – Platten (Simona® PE-HWU) aufgesprüht, so dass ein dünner, gleichmäßiger Film auf der Oberfläche entstand. Dieser Flüssigkeitsfilm trocknete innerhalb von 2 h bei RT vollständig ab. Nach einer Ruhezeit von weiteren 2 Stunden wurden die Platten sorgfältig mit viel Wasser gespült, und über Nacht an Luft getrocknet.

[0112] Zur Beurteilung der Qualität wurde der Kontaktwinkel der beschichteten Oberfläche wie oben beschrieben gemessen. Weiterhin wurde die Filmbildung von Wasser auf der Oberfläche optisch beurteilt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Lösung	Hydrophobin	Kontaktwinkel	Filmbildung von Wasser
Vergleich: unbehandeltes Polyethylen	-	90°	nein
Vergleich: nur Wasser	-	90°	nein
Vergleich: nur TRIS-Puffer	-	90°	nein
10-1 (Wasser)	100 µg/ ml	73°	ja
10-2 (Tris-Puffer)	100 µg/ ml	64°	ja
10-2 (Tensid)	100 µg/ ml	84°	teilweise
10-4 (Tensid)	100 µg/ ml	79°	teilweise
10-5 (Tensid)	100 µg/ ml	79°	teilweise

Tab. 1: Beschichtung von Polyethylen-Platten mit Fusions-Hydrophobinen

[0113] Mit allen Lösungen der Fusions-Hydrophobine ließ sich eine Hydrophilierung der Oberflächen erreichen. Dabei ist der Effekt mit einer gepufferten Lösung, aber ohne Tensid am deutlichsten.

2. Besprühen von Aluminiumblechen

[0114] Für die Versuche wurden handelsübliche Aluminium-Bleche verwendet (Fa. Elastogran).

[0115] Auf die gleiche Weise wie oben beschrieben wurden die Aluminiumbleche mit der Lösung 10-1 (nur Wasser) bzw. 10-2 (Fusions-Hydrophobin in Tris-Puffer) besprüht, getrocknet und mit VE-Wasser gespült. Der Verbrauch an Lösung betrug 150 mL EV 60646 (100µg/ml) für 1,2m² Blech, dies entspricht etwa 12,5mg Hydrophobin/m².

Hydrophobin	Konzentration Hydrophobin	Kontaktwinkel	Filmbildung von Wasser
Vergleich, unbeschichtetes Aluminium	-	73°	nein
10-1 (Wasser)	100µg/mL (chrom.)	84°	nein, nur punktuell
10-2 (Tris-Puffer)	100µg/mL (chrom.)	80°	ja
10-6 (Wasser)	100µg/mL (Aufschl.)	84°	nein, nur punktuell
10-7 (Tris-Puffer)	100µg/mL (Aufschl.)	81°	ja

Tab. 2: Beschichtung von Aluminium-Platten mit Fusions-Hydrophobinen

[0116] Es ist eine leichte Hydrophobierung der Aluminium-Oberfläche mittels Kontaktwinkelmessung zu erkennen. Hinsichtlich der Filmbildung von Wasser auf der Aluminiumoberfläche ist eine deutliche Modifizierung ersichtlich.

[0117] Die beiden unterschiedlich aufgearbeiteten Lösungen des Fusions-Hydrophobins unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Wirksamkeit.

Beispiel 13

Quervernetzung von Oberflächen und Hydrophobin

Substrat: Leder (Wet Blue)

- Sprühgetrocknetes Hydrophobin wird in Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 100 µg/mL eingestellt
- Inkubation von Lederstücken über Nacht (bei Raumtemperatur) in 50mM Tris pH 8 + 0,1 mM CaCl₂ (Endkonzentration) + 0,1% Polyoxyethylen(20)sorbitanmonolaureat (Tween[®] 20)
- danach Beschichtung waschen in destilliertem Wasser
- danach Inkubation 10min/80°C/1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS)-Lösung in dest. Wasser
- Waschen in dest. Wasser
- Inkubation mit 0,01 % Glutardialdehydlösung in Wasser (2 Stunden bei Raumtemperatur)
- Waschen in dest. Wasser

[0118] Es kommt zu einer signifikanten Hydrophilisierung des Leders, das durch die Quervernetzung zusätzliche mechanische Stabilität gewinnt. Die Hydrophilisierung kann in bekannter Art und Weise mittels Wassertropfenaufnahme bestimmt werden. Während ein Wassertropfen auf unbehandeltem Leder ca. 4 min bis zum Einziehen brauchte, zog ein gleich großer Wassertropfen innerhalb von weniger als 1 min in das mit Hydrophobin behandelte Leder ein.

Beispiel 15

Trocknung mittels IR-Strahlung

Substrat:

Glas (Fensterglas, Süddeutsche Glas, Mannheim):

- Sprühgetrocknetes Hydrophobin gemäß Beispiel 9 wird in 10mM Tris pH 8 aufgenommen und auf eine Konzentration von 50 µg/mL eingestellt.
- Glasplättchen werden mit der Hydrophobinlösung benetzt und mittels IR-Strahlung (IR125R von der Marke Philips) innerhalb von 10 min getrocknet. Temperatur der Oberfläche ca. 100 bis 120°C

[0119] Der Kontaktwinkel (in Grad) eines Tropfens von 5 µl Wasser wird bei Raumtemperatur bestimmt.

[0120] Die Kontaktwinkelmessung wurde auf einem Gerät Dataphysics Contact Angle System OCA 15+, Software SCA 20.2.0. (November 2002) bestimmt. Die Messung erfolgte gemäss den Herstellerangaben.

[0121] Unbehandeltes Glas ergab einen Kontaktwinkel von $30 \pm 5^\circ$; das behandelte Glas ergab einen Kontaktwinkel von $75 \pm 15^\circ$.

Zuordnung der Sequenznamen zu DNA- und Polypeptidsequenzen im Sequenzprotokoll

dewA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 1
dewA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 2
rodA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 3
rodA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 4
hypA DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 5
hypA Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 6
hypB DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 7
hypB Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 8
sc3 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 9
sc3 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 10
basf1 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 11
basf1 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 12
basf2 DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 13
basf2 Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 14
yaad DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 15
yaad Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 16
yaae DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 17
yaae Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 18
yaad-Xa-dewA-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 19
yaad-Xa-dewA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 20
yaad-Xa-rodA-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 21
yaad-Xa-rodA-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 22
yaad-Xa-basf1-his DNA- und Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 23
yaad-Xa-basf1-his Polypeptidsequenz	SEQ ID NO: 24

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Beschichten von Oberflächen mit Hydrophobinen umfassend mindestens die folgenden Verfahrensschritte:

- (1) Bereitstellen einer Formulierung (F) umfassend Wasser oder ein wässriges Lösemittelgemisch sowie ein Hydrophobin,
- (2) Behandeln der Oberfläche mit der Formulierung, sowie
- (3) Entfernen des Lösemittels,

dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Hydrophobin um ein Fusions-Hydrophobin handelt und die Formulierung einen pH-Wert ≥ 4 aufweist.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Formulierung einen pH-Wert ≥ 7 aufweist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Formulierung weiterhin einen Puffer umfasst.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man die Formulierung durch Lösen vom festem Fusions-Hydrophobin erhält.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um sprühgetrocknetes Fusions-Hydrophobin handelt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung der Formulierung eine Lösung einsetzt, welche durch Abtrennen der Zellen aus der Fermentationsbrühe, Aufschluss der Zellen sowie Auflösen der Einschlusskörper (inclusion bodies) hergestellt wird.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das Entfernen des Lösemittels bei 15 bis 120°C vornimmt.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man das Beschichten bei 20 bis 100°C vornimmt.
9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Beschichtung in einem zusätzlichen Verfahrensschritt vernetzt.
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man es sich bei dem Fusions-Hydrophobin um yaad-Xa-dewA-his6 (SEQ ID NO: 20), oder um ein Protein mit einem verkürzten yaad-Fusionspartner handelt.
11. Oberfläche, umfassend eine Beschichtung umfassend mindestens ein Fusions-Hydrophobin.
12. Oberfläche gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung vernetzt ist.
13. Oberfläche gemäß Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Fusions-Hydrophobin um yaad-Xa-dewA-his (SEQ ID NO: 20), oder um ein Protein mit einem verkürzten yaad-Fusionspartner handelt.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1

