

Ina Sittko

**Aktivierende Trägerung von Enzymen für  
die Biokatalyse in organischen Medien**



**Cuvillier Verlag Göttingen**  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag



## Aktivierende Trägerung von Enzymen für die Biokatalyse in organischen Medien





# **Aktivierende Trägerung von Enzymen für die Biokatalyse in organischen Medien**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Dr. rer. nat.**

von der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen  
der Technischen Universität Dortmund  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

**Dipl.- Ing. Ina Sittko**

aus

Datteln

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2015

1. Gutachter: Prof. Dr. J.C. Tiller

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Wichmann

**Dortmund 2016**



---

## **Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek**

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2016

Zugl.: Dortmund, Univ., Diss., 2016

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2016

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

[www.cuvillier.de](http://www.cuvillier.de)

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2016

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9373-0

eISBN 978-3-7369-8373-1



---

Für meine Eltern.





---

Diese Arbeit wurde in der Zeit von März 2011 bis Oktober 2014 am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen der Technischen Universität Dortmund angefertigt.





Mein besonderer Dank gilt meinem betreuenden Professor, Herrn Prof. Jörg C. Tiller für die Aufnahme in seinen Lehrstuhl, die Bereitstellung des interessanten Themas und die gute Betreuung.

Herrn Prof. Wichmann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Herr Prof. Kayser und Herrn Prof. David W. Agar danke ich für die Bereitschaft, die Prüfungskommission zu vervollständigen.

Ich danke allen Kollegen und Mitarbeitern am Lehrstuhl BMP für die hervorragende fachliche und menschliche Unterstützung. Das sind Herr Dr. Frank Katzenberg, Herr Dr. Stefan Konieczny, Herr Dr. Christian Krumm, Frau Melanie Leurs, Herr Dr. Christoph Fik, Frau Ramona Tillmann, Frau Anna Pipetz, Herr Dr. Matthias Thiel, Herr Dr. Stephan Dech, Herr Peter von Czarnecki, Herr Marco Müller, Herr Nicolas Rauner, Herr Arne Straßburg, Herr Martin Schmidt, Herr Dr. Benjamin Heuwers, Herr Dominik Quitmann, Herr Robin Höher, Herr Thomas Raidt, Frau Monika Meuris, Herr Thorsten Moll, Herr Marc Milbradt, Frau Kristine Katzmarczyk und Frau Elisa Ferrao-Prates.

Herrn Dr. Wolf Hiller und seinem Team danke ich für die schnellen NMR-Messungen.

Herrn Dr. Ralf Wyrwa danke ich für die ausführlichen Erklärungen zum Elektrospleinprozess und die Einladung nach Innovent.

Mein Dank gilt meinen Studenten, die ich während meiner Zeit als Doktorandin betreut habe. Das sind Frau Meike Roth, Frau Franziska Lanfer, Frau Kathrin Kremser, Herr Maximilian Fortmann, Herr Stefan Josten, Frau Lumnie Qeriqi, Frau Stefanie Kühne, Frau Britta Glowacki, Frau Susan Stuhr und Frau Sabine Ring.

Ich danke dem Cluster Industrielle Biotechnologie (CLIB 2021) für die finanzielle Unterstützung.

Ich danke, von Herzen, meiner Familie. Besonders meinen Eltern Wolfgang und Renate Schönfeld, die mich während meiner gesamten Ausbildungszeit finanziell und moralisch unterstützt haben, sowie meinem Bruder Dominik Schönfeld. Ich danke meinen Großeltern und meiner Schwiegerfamilie. Bedanken möchte ich mich auch bei Katrin Linßen, Christina Vogelpohl, Dana Böttcher und Markus Kampmann.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinem Mann Martin Sittko. Danke.



## Publikationen

- 1) I. Schönfeld, S. Dech, B. Ryabenky, B. Daniel, B. Glowacki, R. Ladisch, J.C. Tiller.  
„Investigations on Diffusion Limitations of Biocatalyzed Reactions in Amphiphilic Polymer Conetworks in Organic Solvents”, *Biotechnology and Bioengineering* **2013**, 110, 9, 2333-2342
- 2) C. P. Fik, S. Konieczny, C. Krumm, I. Schönfeld, J.C. Tiller.  
„Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, *Macromolecular Rapid Communications* **2011**, 32, 2, F37-F74
- 3) I. Sittko, K. Kremser, M. Roth, S. Kühne, S. Stuhr, J. C. Tiller.  
„Amphiphilic polymer conetworks with defined nanostructure and tailored swelling behavior for exploring the activation of an entrapped lipase in organic solvents”, *Polymer* **2015**, 64, 122-129
- 4) R. Plothe, I. Sittko, F. Lanfer, M. Fortmann, M. Roth, V. Kolbach, J. C. Tiller.  
„Poly(2-ethyloxazoline) as matrix for highly active electrospun enzymes in organic solvents”, *Biotechnology and Bioengineering*, accepted **2016**, DOI:10.1002/bit.26043



## Vorträge

- 1) I. Schönfeld, J. C. Tiller, "Bioactive polymer networks for tandem catalysis", CLIB-GC Retreat **2013**, Lünen
- 2) I. Schönfeld, J. C. Tiller, "Bioactive polymer networks for enzyme catalysis in organic media", 17<sup>th</sup> International Pushchino School Conference of Young Scientists **2013**, Pushchino, Russland
- 3) I. Schönfeld, J.C. Tiller, "Amphiphile Conetzwerte", Innovent Jena **2013**, Jena

## Poster

- 1) I. Schönfeld, J. C. Tiller, „Bioactive polymer networks for tandem catalysis“, CLIB-GC Retreat **2014**, Lünen
- 2) I. Schönfeld, J. C. Tiller, „Bioactive polymer networks for tandem catalysis“, CLIB-GC Retreat **2013**, Lünen
- 3) I. Schönfeld, J. C. Tiller, „Bioactive polymer networks for tandem catalysis“, CLIB-GC Retreat **2012**, Bergisch Gladbach
- 4) C. P. Fik, S. Konieczny, C. Krumm, I. Schönfeld, J. C. Tiller, „Telechelic Poly(oxazoline)s for Bioactive Conjugates“, Makromolekulares Kolloquium **2011**, Freiburg
- 5) S. Konieczny, I. Schönfeld, J. C. Tiller, „Polymer Protein conjugates for tandem catalysis“, CLIB-GC Retreat **2010**, Wuppertal



## Inhaltsverzeichnis

1. Motivation .....	1
2. Einleitung.....	2
2.1. (Bio)katalysatoren .....	2
2.2. Amphiphile Polymerconetze .....	8
2.2.1. Synthese von APCNs.....	10
2.2.2. Industrieller Einsatz von APCNs.....	11
2.2.3. APCNs als Enzymträger.....	12
2.3. Nanofasern .....	14
2.3.1. Polymere Nanofasern als Träger für Biokatalysatoren.....	20
3. Aufgabenstellung.....	27
4. Material und Methoden .....	28
4.1. Chemikalien und Geräte .....	28
4.1.1. Chemikalien .....	28
4.1.2. Enzyme.....	32
4.1.3. Proteinmarker.....	33
4.1.4. Geräte .....	33
4.1.4.1. Mikrowellensynthesen .....	33
4.1.4.2. Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	33
4.1.4.3. Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie unter abgeschwächter Totalreflexion (ATR-FTIR) .....	34
4.1.4.4. Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	34
4.1.4.5. Dynamische Lichtstreuung (DLS) .....	34
4.1.4.6. Gaschromatographie (GC) .....	35
4.1.4.7. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) .....	35
4.1.4.8. Rasterelektronenmikroskop (REM) .....	35
4.1.4.9. Geräteliste .....	36



4.1.5.	Gase und Flüssiggase.....	37
4.2.	Polymersynthese.....	38
4.2.1.	Umkristallisieren von $\alpha$ - $\alpha'$ - <i>para</i> -Dibromxylool ( <i>p</i> DBrX).....	38
4.2.2.	Destillation von 2-Methyl-2-Oxazolin (MeOx) und 2-Ethyl-2-Oxazolin (EtOx).....	38
4.2.3.	Destillation von <i>N</i> -[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamid (DMAPMA).....	39
4.2.4.	Trocknung von Chloroform.....	39
4.2.5.	Polymersynthese.....	39
4.2.5.1.	Polymerisation der Homopolymere.....	39
4.2.5.2.	Terminierung der Poly(2-Oxazoline) für die Linkersynthese.....	41
4.2.5.3.	Aufreinigung der Poly(2-Oxazoline).....	41
4.3.	Netzwerksynthese.....	42
4.3.1.	Destillation von 2 - Hydroxyethylacrylat (HEA).....	42
4.3.2.	Destillation von 2 - Ethylhexylacrylat (EhAc).....	42
4.3.3.	Dialyse der RmL- und CaL B-Formulierung.....	42
4.3.4.	Änderung des pH-Wertes des $\alpha$ -Chymotrypsins (CT).....	43
4.3.5.	Synthese von amphiphilen Polymerconetzwerken.....	43
4.3.5.1.	Synthese der RmL-beladenen PHEA-I-PEtOx APCNs.....	43
4.3.5.2.	Synthese der PBuAc-I-PMeOx bzw. PEhAc-I-PMeOx APCNs.....	44
4.3.5.3.	Synthese der enzymbeladenen PBuAc-I-PMeOx bzw. PEhAc-I-PMeOx APCNs.....	46
4.3.5.4.	Synthese der Polymernetzwerke mit PEtOx <sub>5000</sub> und PEtOx <sub>240</sub> .....	47
4.3.6.	Untersuchungen der amphiphilen Polymerconetzwerke.....	48
4.3.6.1.	Bestimmung des Sol-Gel Gehaltes.....	48
4.3.6.2.	Bestimmung der Quellgrade.....	48
4.4.	Mikropartikel aus amphiphilen Conetzwerken.....	49
4.4.1.	Synthese.....	49
4.4.2.	Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße.....	49
4.5.	Nanofasern.....	49



4.5.1.	Synthese .....	49
4.5.1.1.	Polymerlösungen ohne Enzym .....	49
4.5.1.2.	Polymerlösungen mit Enzym .....	52
4.5.2.	Bestimmung der durchschnittlichen Faserdurchmesser .....	54
4.6.	Enzymatische Aktivitätsbestimmung im Wässrigen .....	55
4.6.1.	Lipase .....	55
4.6.2.	Peptidase .....	56
4.6.3.	Peroxidase .....	57
4.6.4.	Laccase .....	58
4.6.5.	Alkoholdehydrogenase (ADH) .....	58
4.7.	Enzymatische Aktivitätsbestimmung in organischen Lösemitteln .....	60
4.7.1.	Lipase .....	60
4.7.1.1.	Umsetzung von 1-Octanol und Laurinsäure .....	60
4.7.2.	Peptidase .....	61
4.7.3.	Peroxidase .....	62
4.7.4.	Laccase .....	63
4.7.5.	Alkoholdehydrogenase .....	64
4.8.	Berechnung des Thiele-Moduls .....	64
4.9.	Elektrophorese .....	65
4.9.1.	Sodium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	65
4.9.2.	Coomassie-Färbung .....	67
5.	Ergebnisse und Diskussion .....	68
5.1.	Poly(2-Oxazoline) .....	68
5.1.1.	Synthese .....	68
5.1.2.	Polymercharakterisierung .....	71
5.2.	Ermittlung des Enzymgehaltes der aufgereinigten CaL B. ....	74
5.3.	PBuAc- <i>l</i> -PMOx und PEhAc- <i>l</i> -PMOx APCNs .....	76



5.3.1.	Synthese und Charakterisierung .....	77
5.3.1.1.	Bestimmung des Solanteils und der resultierenden Zusammensetzung.....	82
5.3.1.2.	Untersuchungen zur Phasenseparation .....	85
5.3.1.3.	Untersuchungen zum Quellverhalten .....	89
5.3.2.	Aktivitätsmessungen .....	91
5.3.3.	Fazit .....	96
5.4.	PHEA-/PEtOx APCNs .....	96
5.4.1.	PHEA-/PEtOx Mikropartikel als Enzymträger .....	101
5.4.2.	Fazit .....	108
5.5.	Nanofasern.....	109
5.5.1.	Nanofasern mit kurzkettigen PEtOx-Polymeren .....	115
5.5.2.	Untersuchungen zur chemischen Vernetzung .....	122
5.5.3.	Nanofasern als Träger für Biokatalysatoren.....	134
5.5.3.1.	Vergleich der unterschiedlichen Trägersysteme.....	134
5.5.3.2.	Beladungsmessungen mit CaL B.....	136
5.5.3.3.	PEtOx-Nanofasern als Träger für weitere Enzyme .....	143
5.5.3.4.	Design eines biokatalytisch wirksamen Rührers .....	153
5.5.4.	Fazit .....	156
6.	Zusammenfassung.....	157
6.1.	APCNs und APCN-Mikropartikel.....	157
6.2.	Nanofasern.....	159
7.	Kurzzusammenfassung.....	161
8.	Literaturverzeichnis.....	163
9.	Kurzlebenslauf.....	185



## Abkürzungen und Symbole

$\lambda$	Wellenlänge
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Å	Ångström
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)
ADH	Alkoholdehydrogenase
AFM	Atomic force microscopy; Rasterkraftmikroskopie
AlO <sub>x</sub>	Aluminiumoxid
AOT	Aerosol OT, Docusat-Natrium
APCN	Amphiphiles Polymerconetzwerk
APEE	<i>N</i> -Acetyl-L-phenylalaninethylester
APPE	<i>N</i> -Acetyl-L-phenylalaninpropylester
ATR-FTIR	Infrarotspektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion, engl. <i>attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy</i>
BHT	Butylhydroxytoluol
Br <sup>-</sup>	Bromid-Ion
BSA	Bovines Serum Albumin
BuAc	Butylacrylat
CaH <sub>2</sub>	Calciumhydrid
CaL B	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>



---

CrL	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>
CROP	Kationische Ringöffnungspolymerisation, Engl. <i>cationic ring opening polymerization</i>
CT	$\alpha$ -Chymotrypsin
d	Dublett
Da	Dalton
DA	Desoxycholsäure Natriumsalz
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
D <sub>eff</sub>	Diffusionskoeffizient
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMAPMA	<i>N</i> -[3-(Dimethylamino)propyl]- methacrylamid
DMF	Dimethylformamid
DMP	2,6-Dimethoxyphenol
DP	Polymerisationsgrad, engl. <i>degree of polymerization</i>
DPD	<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin
DTT	Dithiothreitol
E <sub>act</sub>	Aktivierungsenergie
EhAc	2-Ethylhexylacrylat
Et <sub>2</sub> O	Diethylether
EtOH	Ethanol
EtOx	2-Ethyl-2-oxazolin
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GDMA	Glyceroldimethacrylat
Gew%	Gewichtsprozent



GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunden
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HEA	2-Hydroxyethylacrylat
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
I651	Irgacure® 651
IR	Infrarotspektroskopie
J	Joule
kat	katalysiert
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LiCl	Lithiumchlorid
LS	Laurinsäure
Lsg.	Lösung
m	Multipllett
M	Molmasse
max	maximal
MeOH	Methanol
min	Minute
mol%	Molprozent
MOx	2-Methyl-2-oxazolin
MP	Mikropartikel
1M2P	1-Methoxy-2-propanol
MWCO	Molecular Weight Cut Off; auf das Molekulargewicht bezogene Ausschlussgrenze



n.b.	nicht bestimmt
n.m.	nicht messbar
n.t.	nicht terminiert
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NAD <sup>+</sup>	Oxidierte Form des NAD
NADH	Reduzierte Form des NAD
NaPD	Natriumphosphatpuffer
NF	Nanofaser
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie, engl. <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>
NP	Nanopartikel
NW	Netzwerk
Org.	organisch
p.a.	Zur Analyse, lat. <i>pro analysi</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBuAc	Polybutylacrylat
PBuOx	Poly(2-butyloxazolin)
<i>p</i> DBrX	$\alpha$ - $\alpha'$ - <i>para</i> -Dibromxylol
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglycol
PEhAc	Poly(2-ethylhexylacrylat)
PEtOx	Poly(2-ethyloxazolin)
pH	potentia Hydrogenii
PHEA	Polyhydroxyethylacrylat



Ph. Eur.	Europäische Pharmacopöe
PMOx	Poly(2-methyloxazolin)
POX	Poly(2-oxazolin)
ppm	Anteil, engl. <i>parts per million</i>
PVA	Polyvinylalkohol
q	Quartett
R	Universelle Gaskonstante
REM	Rasterelektronenmikroskop
RI	Brechungsindex, engl. <i>refractive index</i>
RmL	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
S	Quellgrad
s <sub>0</sub>	Substratkonzentration
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfat</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, engl. <i>sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie, engl. <i>size exclusion chromatography</i>
SEM	Rasterelektronenmikroskopie, engl. <i>scanning electron microscopy</i>
spez	spezifisch
t	Triplett
T	Terminierungsmittel
T <sub>g</sub>	Glasübergangstemperatur



Tab.	Tabelle
TD	<i>n</i> -Tetradecan
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetramethylethylendiamin
TEOS	Tetraethyl-orthosilicat
TMS	Tetramethylsilan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
unkat	unkatalysiert
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
Z	Katalytische Aktivität
$Z_{APCN}$	Aktivität pro $m_{APCN}$
$Z_{MP}$	Aktivität pro $m_{MP}$
$Z_{NF}$	Aktivität pro $m_{NF}$
$Z_{spez}$	Spezifische Aktivität; Aktivität pro $m_{Enzym}$

## Präfixe

n	nano
$\mu$	micro
m	milli
c	centi
k	kilo
M	Mega





## **1. MOTIVATION**

Biokatalysatoren gehören zu den wichtigsten Werkzeugen der Natur. Ohne sie wäre kein Leben möglich, da Enzyme die Geschwindigkeit von Reaktionen um mindestens das Millionenfache steigern (1).

Dabei gehen sie keinesfalls wahllos vor, sondern weisen sowohl eine hohe Substratspezifität (diese kann sich auf eine ganze Stoffgruppe ausweiten) als auch Regioselektivität auf, d.h. sie setzen nur bestimmte Moleküle und hier in der Regel nur bestimmte reaktive Gruppen um. Darüber hinaus arbeiten Enzyme reaktionsspezifisch, so dass keine Nebenprodukte entstehen. Durch die Stereoselektivität können zudem enantiomerenreine Produkte hergestellt werden. (2, 1, 3)

Diese Eigenschaften sind nicht nur in vivo bedeutsam, auch bei industriellen Prozessen ist das Potential von Biokatalysatoren bekannt und sie werden auch bereits für viele Anwendungen eingesetzt. So nennt die Deutsche Industrievereinigung Biotechnologie die Reinigungs- und Waschmittelherstellung, Textilindustrie und Käseherstellung als Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von Enzymen (4). Da sie bei geringen Temperaturen und Normaldruck arbeiten, bedeutet ihre Anwendung eine Ersparnis von Energie, ihre biologische Abbaubarkeit spart häufig zusätzlich Abwasser. Unter anderem der ökologische Vorteil und die um mehrere Größenordnungen stärkere Beschleunigung von Reaktionen gegenüber chemischen Katalysatoren haben bereits dafür gesorgt, dass chemische Verfahren durch Biokatalyse abgelöst worden sind. Dazu gehören z.B. die Synthese von Aspartam und Acrylamid in einem Maßstab von mehr als 1000 t/a (3). Ebenfalls für die Produktion von Biodiesel, die in den letzten Jahren gesellschaftlich in den Fokus gerückt ist, werden derzeit biokatalytische Verfahren wissenschaftlich erforscht (5).

Auch wenn die Akzeptanz von biokatalytischen Alternativverfahren also mittlerweile zugenommen hat, ist deren Potential bisher nicht ausgeschöpft. Die Ursachen liegen häufig in der oft schwierigen Rückgewinnung oder daran, dass industriell interessante Substrate nicht umgesetzt werden. Hier kommt hinzu, dass sich der Einsatz von Enzymen bisher meistens auf wässrige Systeme beschränkt, in denen viele industriell relevante Substrate nicht löslich sind. (3).



## 2. EINLEITUNG

### 2.1. (Bio)katalysatoren

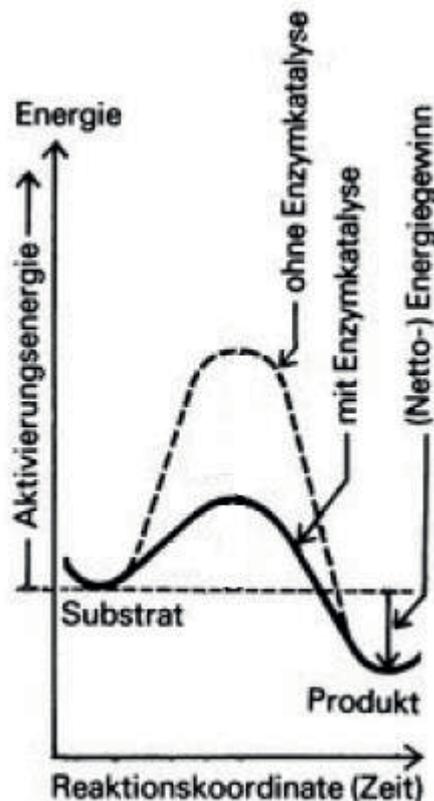
Die Entdeckung von (chemischen) Katalysatoren geschah zu Beginn des 19. Jahrhunderts, als u.a. Berzelius, Mitscherlich und Liebig bemerkten, dass bestimmte, an sich reaktionsträge Substanzen bei Kontakt mit anderen Substanzen in der Lage sind, sehr schnell Reaktionen einzugehen. Der Begriff „Katalyse“ bzw. „Katalysator“ wurde 1836 von Jöns Jakob Berzelius geprägt (6). Ob diese Entdeckung zufällig zur Blütezeit der industriellen Revolution stattfand ist ungewiss, sicher ist jedoch die große Bedeutung ihrer Entdeckung für den industriellen Fortschritt. Heute wird geschätzt, dass 85 bis 90 % aller Chemieanlagen unter Nutzung eines Katalysators betrieben werden (7).

Einen großen Beitrag für das Verständnis von katalysierten Reaktionen lieferte Wilhelm Ostwald, der für seine Forschung im Jahr 1909 mit einem Nobelpreis ausgezeichnet wurde. Seitdem wurden weit mehr als 10 Nobelpreise im Zusammenhang mit der Erforschung von Katalysatoren verliehen, der letzte 2010 an R. F. Heck, E. Negishi und A. Suzuki für Palladium-katalysierte Kreuzkupplungen in der organischen Synthese (8). Dies zeigt die enorme Bedeutung von Katalysatoren.

Das Prinzip einer katalytischen Umsetzung besteht unabhängig von der Art des Katalysators (chemisch oder biologisch) immer darin, die Aktivierungsenergie einer Reaktion herabzusetzen (Abb. 2.1). Chemische Umsetzungen laufen nur ab, wenn das Produkt einer Reaktion ein niedrigeres Energieniveau besitzt als die Edukte, d.h. wenn die freie Reaktionsenthalpie negativ ist. Um dieses Energieniveau zu erreichen, muss oft zuerst Energie aufgebracht werden, etwa um bestehende Bindungen zwischen Atomen aufzuspalten. Diese sogenannte Aktivierungsenergie ist oft sehr hoch, so dass es mehrere Millionen Jahre dauern kann, bis diese Reaktionen in nennenswertem Umfang von selbst ablaufen. Mit dem Einsatz von Katalysatoren verringert sich diese Zeit auf wenige Millisekunden (9). Dabei geht der Katalysator unverändert aus der Reaktion hervor, kann also potentiell unendlich viele Umsetzungen katalysieren. Die Herabsetzung der Aktivierungsenergie beruht dabei auf zwei unterschiedlichen Strategien. Der Katalysator stabilisiert einerseits den Übergangszustand des Substrates und bietet andererseits durch vermehrte Bildung von Zwischenprodukten bzw. Übergangszuständen einen insgesamt weniger energieaufwändigen Reaktionsweg dar. Der Unterschied zwischen einem Zwischenprodukt und einem Übergangszustand liegt in dem



Energiegehalt des jeweiligen Zustandes. Während Zwischenprodukte lokale Minima der inneren Energie darstellen, zeichnen sich Übergangszustände durch lokale Maxima im Energieniveau aus (10).



**Abbildung 2.1: Energiediagramm einer chemischen Reaktion; durch Verwendung eines Katalysators wird die Aktivierungsenergie herabgesetzt; (Mit Abwandlungen übernommen aus (11)).**

Ein gutes Beispiel, um das Ausmaß und damit die Bedeutung der Beschleunigung durch Katalysatoren zu veranschaulichen, findet sich bei T.D.H Bugg (10) und soll hier kurz dargestellt werden. Ausgangspunkt ist die Gleichung von Arrhenius, die einen Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion und der Temperatur aufzeigt.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_{act}}{R \cdot T}}$$

**Gleichung 2.1: Gleichung von Arrhenius.**

Aus dem Quotient der Reaktionsgeschwindigkeiten von katalysierter und unkatalysierter Reaktion, ergibt sich folgende Gleichung.



$$\frac{k_{kat}}{k_{unkat}} = e^{\frac{E_{unkat} - E_{kat}}{R \cdot T}}$$

**Gleichung 2.2 Formel zur Berechnung des Verhältnisses der Geschwindigkeiten von katalysierten zu unkatalysierten Reaktionen nach Arrhenius.**

Ein Katalysator, der die Aktivierungsenergie um  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$  senkt, beschleunigt eine bei  $55 \text{ °C}$  ablaufende Reaktion um den Faktor 55. Herabsetzung um  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$  resultiert bereits in einer 3000-fachen Beschleunigung. Aus diesen Beispielen wird deutlich, dass aufgrund des exponentiellen Zusammenhangs zwischen Aktivierungsenergie und Reaktionsgeschwindigkeit schon eine kleine Änderung der Aktivierungsenergie eine große Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Reaktion hat. Das Verhältnis der Geschwindigkeiten von katalysierten zu unkatalysierten Reaktionen  $k_{kat}/k_{unkat}$  liegt üblicherweise bei  $10^6$ - $10^{14}$ . (10)

Die industrielle Technik beschränkt sich bis heute hauptsächlich auf chemische Katalysatoren. Diese benötigen oft hohe Temperaturen und Drücke, sind also sehr energieintensiv und können zudem nicht biologisch abgebaut werden (7, 12). Zudem sind nur sehr wenige chemische Katalysatoren in der Lage, die zum Beispiel für pharmazeutische und medizinische Zwecke benötigten enantiomerenreinen Produkte herzustellen. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte Asymmetrische oder, nach ihrem Erfinder, Sharpless-Dihydroxylierung von Olefinen (13). Für die anderen chemischen Katalysatoren bedeutet das oft eine teure und aufwändige Aufarbeitung der Produkte. Davon abgesehen besitzen natürliche Substanzen, vor allem medizinisch wirksame Moleküle, oft eine derart hohe Komplexität, dass eine Synthese unter derartigen Bedingungen nahezu unbezahlbar wäre. Beispiele sind hier das Cyclosporin A, das die Immunabwehr bei Transplantationen unterdrückt oder Taxol, welches bei der Krebstherapie eingesetzt wird (10).

Im Gegensatz dazu stehen die sogenannten Biokatalysatoren. Sie lassen sich weiter in Enzyme und Ribozyme unterteilen, wobei Ribozyme als katalytisch wirksame RNA für die weitere Betrachtung keine Bedeutung haben. Enzyme kommen ubiquitär in allen Lebewesen vor und sind verantwortlich dafür, dass sämtliche in einem Organismus vorkommenden biochemischen Reaktionen in überschaubaren Zeiträumen ablaufen und damit Leben ermöglichen. Interessanterweise wurden Enzyme, genau wie chemische Katalysatoren, erst im 19. Jahrhundert „entdeckt“, obwohl ihre katalytischen Fähigkeiten bereits seit Hunderten von Jahren z.B. für die Herstellung von Wein und Bier genutzt wurden (10).



Enzyme sind Proteine, deren Aminosäuresequenz (AS-Sequenz, Primärstruktur) sich durch van-der-Waals Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen und Disulfidbrücken zu den sogenannten Sekundär- und Tertiärstrukturen (diese sind dreidimensional) zusammenlagert. Mehrere Proteine können sich zu einer Quartärstruktur zusammen finden. Dieses „Ökonomieprinzip“, d.h. die Zusammenlagerung mehrerer Aminosäureketten anstatt der Synthese gleichlanger einzelner AS-Stränge (14) macht die einfache Bildung auch großer Enzyme möglich, da ohne diese Möglichkeit sehr viel mehr Nucleotid-Basenpaare für die Proteinbiosynthese notwendig wären. Der Größenbereich von Enzymen liegt zwischen 5.000 und 5.000.000 Da, am häufigsten kommen Molmassen in einem Bereich zwischen 20.000 und 100.000 Da vor (10). Enzyme werden nach der Art der katalysierten Reaktion in sechs Hauptklassen eingeteilt. Daran anschließend werden weitere Unterteilungen vorgenommen. So hat heute jedes Enzym eine vierteilige Identifizierungsnummer, die sogenannte Enzyme commission (EC) number (2).

Das aktive Zentrum eines Enzyms, d.h. der Ort, wo die eigentliche katalytische Reaktion stattfindet, besteht üblicherweise aus einer Art hydrophober Tasche mit kurzen Aminosäuresequenzen, welche für die Substratbindung und –umsetzung verantwortlich ist. Trotz der enormen Bedeutung dieser Region liegt ihr Anteil an dem Gesamtvolumen des Enzyms nur bei etwa 10 bis 20 % (10). Die meisten Enzyme benötigen außerdem Cofaktoren, um katalytisch wirksam sein zu können (15).

Es gibt unterschiedliche Arten von Cofaktoren, von denen keiner eine Proteinstruktur besitzt. Dazu gehören prosthetische Gruppen, niedermolekulare Moleküle, die kovalent an das Enzym gebunden sind. Die ebenfalls niedermolekularen Coenzyme gehen keine kovalente Bindung mit dem Enzym ein und dissoziieren nach Vollendung der Katalyse vom Enzym. Sie werden genau wie prosthetische Gruppen während der Katalyse verändert, d.h. sie nehmen Protonen oder Elektronen auf oder geben diese ab, so dass sich ihre Reaktivität ändert. Vor dem erneuten Einsatz müssen sie in ihren ursprünglichen Zustand überführt werden. Besteht der Cofaktor aus Metallionen, so wird der Komplex aus Enzym und Metall als Metalloenzym bezeichnet. Abgesehen von den Metallionen, welche oft direkt an der katalytischen Umsetzung beteiligt sind, haben die meisten Cofaktoren eher regulatorische Bedeutung, sie können z.B. durch kompetitive Hemmung die Katalyse unterbinden oder zumindest stark



verlangsamen. Cofaktoren erschweren den industriellen Einsatz von Enzymen und sind ebenfalls einer der Gründe für ihre bisher nur eingeschränkte Nutzung.

Zu den Enzymen, die nicht auf Cofaktoren angewiesen sind, gehören alle Hydrolasen, also die EC-Klasse 3. Dementsprechend finden sie sich am häufigsten in der industriellen Anwendung wieder. Lipasen, eine Unterklasse der Hydrolasen, besitzen oft eine weitere strukturelle Besonderheit, das sogenannte „Lid“. Das Lid besteht aus einer Aminosäuresequenz, die wie eine Art Deckel über dem aktiven Zentrum liegt. Bei Kontakt mit hydrophoben Substanzen öffnet sich das Lid innerhalb weniger Nanosekunden, so dass eine Grenzflächenaktivität vorliegt (16).

Der Mechanismus der Biokatalyse wird vereinfacht als Schlüssel-Schloss-Prinzip beschrieben und drückt die hohe Selektivität und Spezifität von Enzymen aus. Enzyme zeigen eine hohe Substrat- und Produktselektivität, darüber hinaus katalysieren sie regioselektiv und aufgrund der Chiralität des aktiven Zentrums (Enzyme bestehen immer aus L-Aminosäuren (14)) oft enantiomerenrein, zumindest wird ein Enantiomer bevorzugt gebunden. Dass diese Katalyse unter relativ milden Bedingungen stattfindet, meistens bei Normaldruck und Temperaturen, die denen lebender Organismen entsprechen, macht sie zu einer gefragten Alternative in industriellen chemischen Prozessen.

Der Einsatz von Enzymen führt zusammengefasst also zu weniger energieintensiven Verfahren, sie sind umweltfreundlich, biologisch abbaubar und führen zu reineren Produkten. Seit die Tatsache, dass Biokatalysatoren prinzipiell in organischen Lösemitteln eingesetzt werden können, zum Gegenstand intensiver Forschungen wurde (17, 18), gibt es Bestrebungen, sie für großindustrielle Projekte einzusetzen. Schätzungen zu Folge werden etwa 4-5 % der Chemikalien und Medikamente weltweit unter Zuhilfenahme von Enzymen produziert (19).

Der Hauptgrund für ihren bisher eingeschränkten industriellen Einsatz ist vor allem ihre geringe Löslichkeit in organischen Lösemitteln (und ebenfalls der fehlenden Löslichkeit der Cofaktoren). Die Nutzung dieser Medien ist unverzichtbar, da die meisten industriell relevanten Edukte hier ausschließlich oder besser löslich sind. Darüber hinaus wird die Bildung von Nebenprodukten und Fouling unterdrückt. Dabei ist es nötig, zwischen wassermischbaren und nicht wassermischbaren organischen Lösemitteln zu unterscheiden. Mischbare Lösemittel entziehen dem Enzym die für die Struktur nötigen Wassermoleküle, ohne die diese



nicht aufrechterhalten werden kann und das Enzym denaturiert (20). Klibanov stellte 1999 einen Zusammenhang her zwischen der Enzymaktivität und dem Wassergehalt sowie der Hydrophilie der organischen Lösungsmittel (21). Allgemein erhöht sich die Enzymaktivität mit steigendem Wassergehalt, mit einem für jedes System aus Enzym und Medium spezifischen optimalen Wassergehalt. Trockenes Lysozym zum Beispiel benötigt eine Mindest-Wassermenge von 0,2 g H<sub>2</sub>O pro g Enzym um aktiv zu werden, was etwa 220 Wassermolekülen entspricht (22). Für eine Monoschicht Wasser werden hingegen 300 Moleküle (0,38 g/g) benötigt.

In nicht wassermischbaren organischen Lösemitteln erfahren Enzyme ebenfalls die Tendenz zu denaturieren, indem die hydrophoben Kompartimente nach außen drängen, allerdings fehlt hier die nötige Konformationsflexibilität, die durch nicht kovalente Wechselwirkung mit Wassermolekülen entsteht (23). Als Folge behält das Enzym die Struktur, die es zuletzt in einem wässrigen Medium gehabt hat. Dieser Effekt wird unter anderem „pH-memory“ (24) genannt, da der Protonierungsgrad ebenfalls beibehalten wird. Der Nutzen des pH-memory liegt darin, dass das Enzym in seiner aktivsten Konformation „eingefroren“ werden kann und diese Konformation behält, bis es erneut in eine wässrige Lösung gegeben wird. Diese Vorbehandlung kann jedoch ebenfalls zu einer Abnahme der katalytischen Aktivität führen, da nicht jedes Enzym den Transfer vom wässrigen ins organische Medium übersteht (21). Die häufigste Methode, um Enzyme in organischen Medien zu stabilisieren, ist die Gefriertrocknung. Hier werden wässrige Enzym Lösungen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und das Wasser anschließend sublimiert.

Diese Behandlung alleine reicht jedoch nicht aus, um das Potential der Katalysatoren in organischen Lösemitteln auszuschöpfen, da sie nach wie vor unlöslich sind. Mittlerweile gibt es erfolgreiche Ansätze, um eine Löslichkeit von Enzymen in organischen Lösemitteln zu erreichen, hauptsächlich durch Modifizierung mit Polymeren über ihre Aminogruppen (25). Diese kovalente Bindung von Polymeren an die Enzymoberfläche führt in den meisten Fällen zu einer stark erniedrigten Restaktivität, so dass bis heute eine Immobilisierung der Enzyme die Methode der Wahl für industriellen Einsatz von Biokatalysatoren ist. Es gibt bereits sehr gute Arbeiten über die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Methoden zur Immobilisierung (26–28), so dass im Folgenden hauptsächlich die für diese Arbeit relevanten



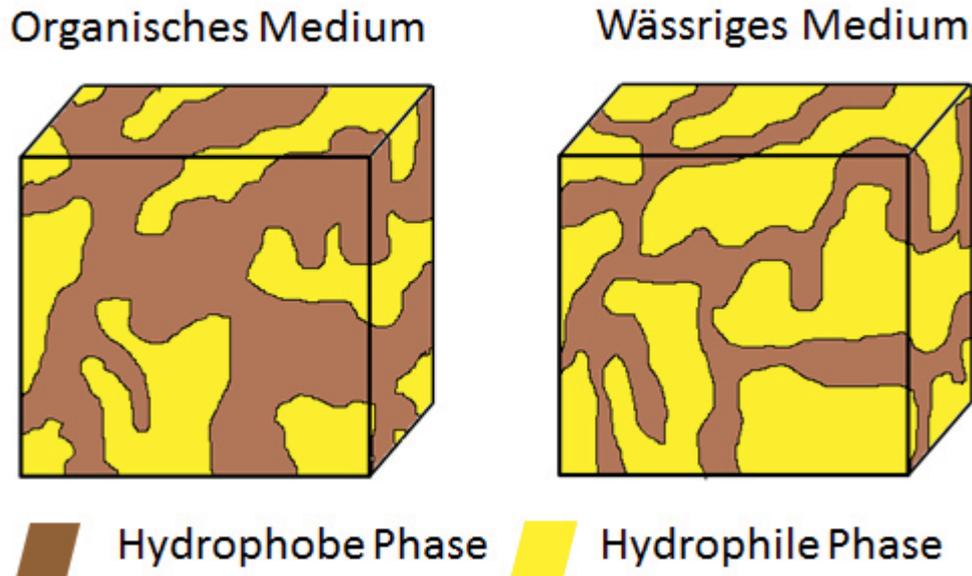
Materialklassen, nämlich amphiphile Polymerconetzwerke (APCNs) und Nanofasern (NF) betrachtet werden.

## 2.2. Amphiphile Polymerconetzwerke

Amphiphile Polymerconetzwerke (APCNs) wurden bereits 1977 und 1978 entwickelt und patentiert (29, 30) und es dauerte nur zehn Jahre, bis sie in den Fokus von vorerst zwei Forschergruppen gerieten, die ihr Potential erkannten und untersuchten. Bis heute beschäftigen sich über 30 wissenschaftliche Gruppen mit der Synthese und Erforschung von immer weiteren APCNs, deren Eigenschaften und industriellen Einsatzmöglichkeiten. APCNs grenzen sich von anderen Polymernetzwerken ab, welche aus einem oder mehreren verschiedenen Polymeren bestehen können und durch chemische (kovalente) oder physikalische (kristalline Bereiche, ionische und van-der-Waals Bindungen) Bindungen zu einem Netzwerk verknüpft sein können. APCNs bestehen dagegen immer aus mindestens zwei unterschiedlichen Polymeren mit gegensätzlichen Lösungseigenschaften (daraus resultiert ihre Amphiphilie), die kovalent miteinander verknüpft sind. Am häufigsten ist dabei die Kombination von hydrophilen und hydrophoben Phasen (Abb. 2.2), es gibt aber auch APCNs, die aus einer hydrophilen und einer fluorophilen Phase bestehen (31).

Die bis heute gebräuchlichste und bekannteste Definition von APCNs stammt von Kennedy aus dem Jahr 2005, die deutsche Übersetzung ist der Doktorarbeit von Bruns entnommen, der außerdem die Forderung nach der cokontinuierlichen Morphologie in Frage stellte (32):

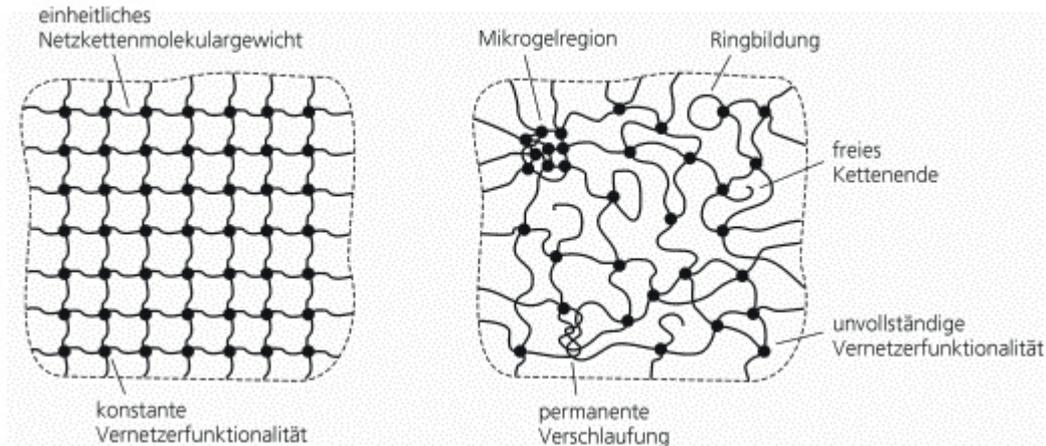
*„Amphiphile Conetzwerke (APCNs) sind Zweikomponenten-Netzwerke, die aus kovalent verbundenen hydrophilen und hydrophoben Phasen aufgebaut sind und eine cokontinuierliche Morphologie aufweisen. Als solche quellen sie sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln und reagieren auf Änderungen des Quellmediums mit morphologischer Isomerisation. Sie können daher als „intelligente“ Netzwerke bezeichnet werden. Verkürzt formuliert sind APCNs Hydrogele, die zusätzlich in organischen Lösungsmitteln quellen.“*



**Abbildung 2.2:** Quellverhalten eines APCNs bestehend aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Phase. In organischen Medien quillt die hydrophobe Phase, während die hydrophile Phase kollabiert. In wässrigen Medien quillt die hydrophile Phase, während die hydrophobe Phase kollabiert. Durch die kovalente Verknüpfung ist eine Phasentrennung unmöglich, so dass die Quellung durch den Gegendruck der kollabierten Phase gestoppt wird.

Der Begriff Kontinuität gibt im Zusammenhang mit Polymernetzwerken an, dass eine Polymerphase in dem Netzwerk ohne Unterbrechung durch das komplette Netzwerk reicht. Es ist also möglich, innerhalb einer Phase von einem Punkt des Netzwerkes zu jedem beliebigen anderen Punkt zu gelangen. Liegt das Polymernetzwerk als APCN vor, gilt diese Forderung für beide Phasen und ist nicht über den kompletten Zusammensetzungsbereich erfüllt. So stellte zum Beispiel Dech in seinen Arbeiten über APCNs bestehend aus Polyethyloxazolin (PEtOx) und Polyhydroxyethylacrylat (PHEA) fest, dass die Kontinuität für die PHEA-Phase erst bei einem Anteil von 30 Gewichtsprozent gegeben ist (33). Nach der strengeren Definition von Erdodi sind also APCNs nicht nur von der gegensätzlichen Phase der Komponenten abhängig, sondern auch von deren Anteil im Netzwerk.

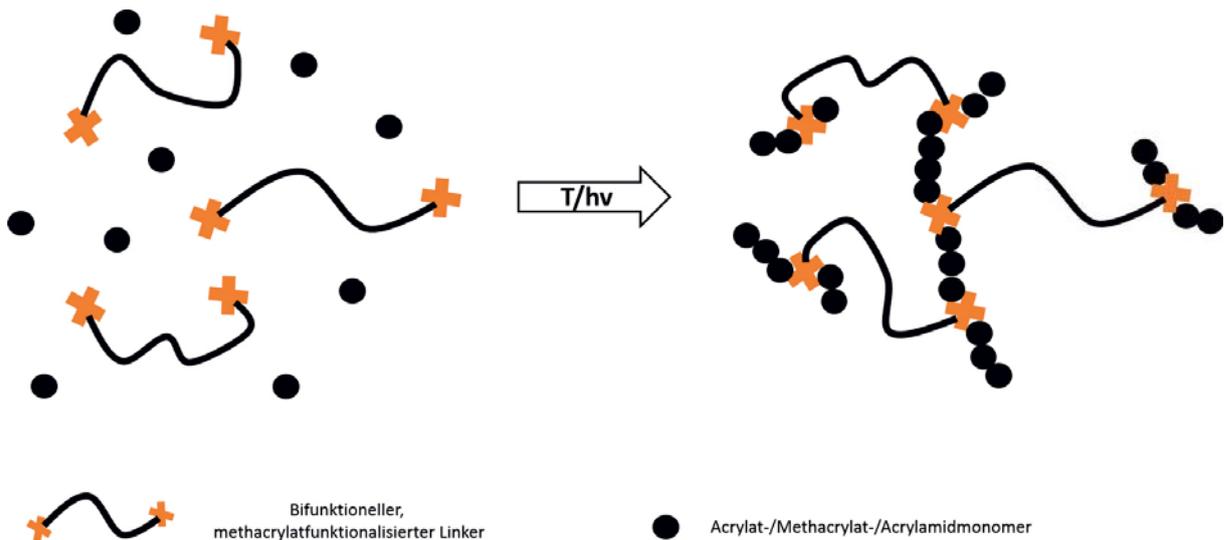
Eine weitere wichtige Eigenschaft von APCNs ist ihre nanophasenseparierte Struktur (Abb. 2.2). Die Dicke der einzelnen Polymerphasen liegt üblicherweise zwischen 2 und 100 nm (32), so dass die Netzwerke makroskopisch homogen erscheinen. Idealerweise liegt eine vollständige Vernetzung ohne Defekte wie z.B. freie Polymerketten vor. Abb. 2.3 zeigt links ein ideales Netzwerk mit gleichmäßigen langen Kettensegmenten, was für die in dieser Arbeit synthetisierten APCNs nicht erreichbar ist.



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung eines idealen (links) und eines realen (rechts) Netzwerks (34).**

### 2.2.1. Synthese von APCNs

Um prinzipiell eine kovalente Verknüpfung von zwei Polymeren gegensätzlicher Polarität zu erreichen, gibt es mehrere Lösungsansätze, die bereits sehr ausführlich dargelegt wurden (32, 35). Daher beschränkt sich dieses Kapitel auf die für diese Arbeit relevante Synthesestrategie, bei der eine Komponente als Polymer (Makromonomer bzw. Linker) und die zweite als Monomer vorliegt (Abb. 2.4). Ein gemeinsames Lösemittel (Mediator oder Vermittler) sorgt für eine homogene Mischung der beiden Komponenten. Dabei kann der Linker die hydrophile oder hydrophobe Phase darstellen, wichtig ist, dass er an beiden Enden mit funktionellen Gruppen (z.B. Methacrylatgruppen) ausgerüstet ist, die eine Copolymerisation mit den Monomeren erlauben. Beide Varianten sind in der Literatur bereits bekannt, wobei die hydrophoben Linker zahlreicher eingesetzt werden (32). Die Monomere basieren auf Acrylaten, Methacrylaten oder Acrylamiden (36). Die Polymerisation der Netzwerke erfolgt radikalisch.



**Abbildung 2.4: Allgemeines Schema der APCN-Synthese mit einem bifunktionellen (hydrophoben oder hydrophilen) Linker und einem Monomer mit gegensätzlicher Philie.**

Stellt der Linker die hydrophobe Phase dar, so werden hauptsächlich Polyisobutylen (PIB) (37, 38), Polydimethylsiloxan (PDMS) (39) oder Polytetrahydrofuran (PTHF) (40) eingesetzt. Als hydrophile Makromonomere sind hauptsächlich Polyethylenglykol (PEG) (41, 42) und Polydioxolan (PDXL) (43) bekannt, aber auch hydrophile Poly-2-Oxazoline wurden bereits verwendet (44).

### 2.2.2. Industrieller Einsatz von APCNs

Der industrielle Einsatz von APCNs beschränkt sich bisher auf weiche Kontaktlinsen, hier gibt es z.B. Varianten aus einem PDMS/Polydimethylacrylamid (PDMAAm)/Polyvinylpyrrolidon (PVP)-Conetzwerk. Dabei sorgt die hydrophobe Phase für eine gute Diffusion von Luftsauerstoff zum Auge, während die hydrophile Phase den Wasserfilm auf dem Augapfel stabil hält. So haftet die Kontaktlinse nicht an und der Tragekomfort ist deutlich erhöht gegenüber den vorherigen Linsen aus Glas oder Plexiglas bzw. rein hydrophilen Polymernetzwerken (45). Damit ist das Potential dieser Netzwerke jedoch nicht ausgeschöpft. Eine im ersten Augenblick ungewöhnlich scheinende Anwendungsmöglichkeit für APCNs besteht als Antifouling-Überzug für Schiffskörper als Alternative zum mittlerweile verbotenen, hochgiftigen Tributylzinnhydrid (TBT). Hier wird mit APCNs bestehend aus hydrophilen und fluorophilen Phasen gearbeitet (46).

Auch der Einsatz als Freisetzungssystem war und ist Gegenstand intensiver Forschung. Kennedy veröffentlichte bereits 2001 Arbeiten über eine künstliche Bauchspeicheldrüse aus



Betazellen vom Schwein. Sie wird als Implantat getragen und ist permeabel für Glucose und Insulin, nicht aber für weiße Blutkörperchen und Antikörper. Der Einsatz wurde bei zuckerkranken Hunden geprobt und war prinzipiell, wenn auch nur für eine Dauer von drei Wochen, erfolgreich. (47)

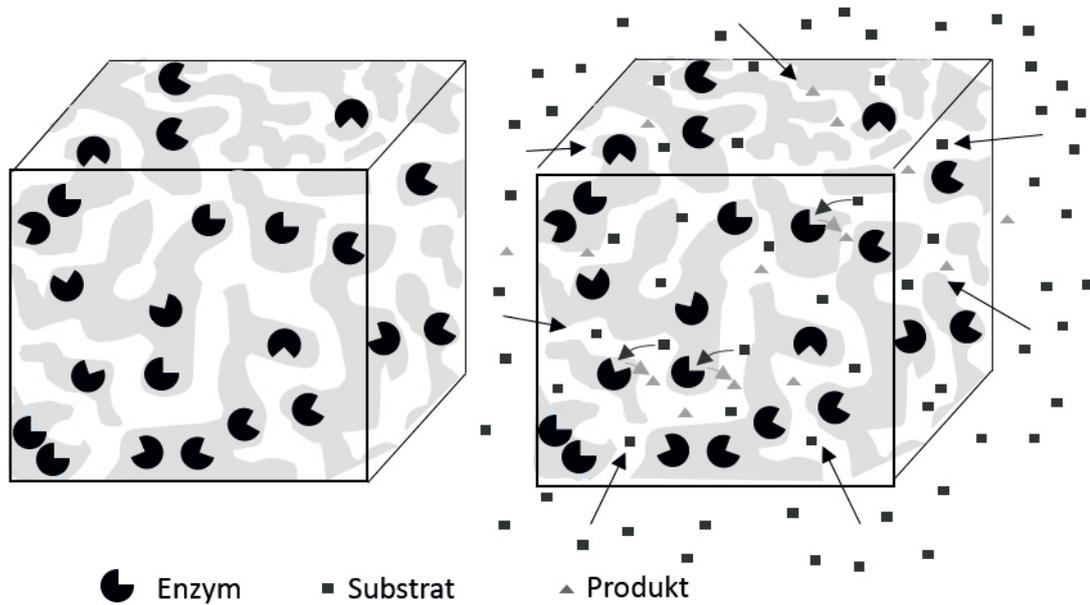
Ein mit dem Desinfektionsmittel Cetrimoniumchlorid beladenes APCN bestehend aus PHEA/PAA-/PDMS zeigte eine dreiwöchige Wirksamkeit gegen das potentiell pathogene Bakterium *Staphylococcus aureus*, so dass der Einsatz als Biozid-freisetzende Oberfläche z.B. für Telefonhörer oder Türklinken in Krankenhäusern sinnvoll wäre, um die Übertragung von Keimen zu verhindern. (48)

Vielversprechende Erfolge werden auch auf dem Gebiet der chemischen und biochemischen Sensoren auf Basis von APCNs gemacht. Netzwerke auf Basis von PDMS mit unterschiedlichen hydrophilen Komponenten zeigen ein sehr hohes Potential für die Indikation von giftigen Gasen und Dämpfen (49).

Ein biochemischer Sensor bestehend aus Poly-*N,N*-dimethylaminoethylacrylat (PDMAEA)-/PDMS mit immobilisierter Peroxidase aus Meerrettich (HRP, engl. horseradish peroxidase) zeigt bereits eine Konzentration von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) von 1 ppm innerhalb weniger Sekunden an (50).

### 2.2.3. APCNs als Enzymträger

Das Beispiel des biochemischen Sensors mit immobilisierter HRP zeigt, dass APCNs grundsätzlich für den Einsatz als Trägermaterial für Biokatalysatoren geeignet sind. Dabei wird davon ausgegangen, dass das Enzym in der hydrophilen Phase akkumuliert, da dies ihrem natürlichen Umfeld am nächsten kommt. Wird das enzymhaltige Netzwerk in eine organische Substratlösung überführt, beginnt die hydrophobe Phase zu quellen, und das Substrat diffundiert zusammen mit dem Lösemittel in das Netzwerkvolumen. Dabei kommt es in Kontakt mit der hydrophilen Phase und wird von den darin enthaltenen Enzymen katalytisch umgesetzt (Abb. 2.5). Es kommt also zu einer Reaktion an der Phasengrenzfläche und das Produkt diffundiert aus dem Netzwerk heraus. Da die hydrophile Phase nicht quillt, wird ein Leaching, d.h. ein Auswaschen der Katalysatoren verhindert.



**Abbildung 2.5:** Schema der Biokatalyse in einem amphiphilen Conetzwerk. In einem organischen Medium diffundieren Lösemittel (angedeutet durch Pfeile) und Substrat (Rechteck) in das Netzwerk hinein. An den Grenzflächen trifft das Substrat auf das Enzym (Kreis mit Ausparung) und wird zum Produkt (Dreieck) umgesetzt.

Eine verbreitete Strategie, um Enzyme in oder auf amphiphile Conetzwerke bzw. Hydrogele zu immobilisieren ist die vollständige Synthese des Netzwerkes mit nachträglicher Absorption der Katalysatoren durch Diffusion. Hierfür wird das Netzwerk in einer gepufferten Enzymlösung gequollen. Dabei hängt die Aufnahmefähigkeit der Netzwerke u.a. von dem pH-Wert der Lösung, der Zusammensetzung des jeweiligen Netzwerkes und der Enzyme an sich, speziell ihres hydrodynamischen Volumens ab. Der Nachweis über die erfolgreiche Immobilisierung erfolgt indirekt über die Messung der Abnahme der spezifischen Absorption der Enzymlösung bei 280 nm oder deren Proteinkonzentration via Bradford Assay (32, 51–53). Yasuda *et al.* erreichten durch eine solche Immobilisierung von Lipase aus *Rhizopus delemar* eine Aktivierung um den Faktor 93,4 im Vergleich zu dem freien, lyophilisierten Enzym (53). Hier stellt sich die Frage, wie weit das Volumen der APCNs ausgenutzt wird, wie groß also die Eindringtiefe der Katalysatoren ist. Weiterhin muss der optimale pH-Wert für die Enzymaktivität nicht unbedingt dem pH-Wert entsprechen, bei dem die Beladung des Conetzwerkes maximal ist (32). Letztendlich ist die Quellung des Netzwerkes in der Pufferlösung und damit die Aufnahmefähigkeit am größten bei geringen Anteilen an hydrophober Phase, zum Beispiel im Fall von PHEA-*l*-PDMS-APCNs liegt die höchste Aufnahmefähigkeit bei PDMS-Anteilen von 23 wt%, bei der die PDMS-Phase nur vereinzelt interkonnektiv vorliegt (52). Hier



wäre also der Kompromiss zwischen höchstmöglicher Beladung und maximaler Quellung im organischen Reaktionsmedium zu schließen.

Eine Lösung dieser Nachteile schien Dech 2012 gefunden zu haben, indem er ein Conetzwirk entwickelte, in welchem sich das Enzym direkt einpolymerisieren ließ (33). Mit diesem Netzwerk bestehend aus HEA als hydrophilem Monomer und beidseitig methacrylatfunktionalisiertem Poly(2-Ethylloxazolin) (PEtOx) als hydrophoberen Linker war es nun möglich, den Enzymanteil nicht nur durch Einwaage genau zu bestimmen, sondern auch einzustellen. So konnte die Enzymaktivität im Vergleich zum vorherigen, diffusionsbasierten System um bis zu einen Faktor von 8 erhöht werden. Zudem wurde ein aktivierender Einfluss des PEtOx auf das Enzym festgestellt, was den Einsatz von 2-Alkyl-2-Oxazolinen als Trägerkomponente sehr interessant macht. Da diese APCNs jedoch keine ideale Amphiphilität aufweisen, sie sind z.B. nicht in stark unpolaren Lösungsmitteln wie *n*-Heptan quellbar, wurde hier der Kompromiss zu Gunsten der höchstmöglichen Beladung geschlossen, die aber, aufgrund der fehlenden Quellung, nicht in jedem Medium voll ausgenutzt werden kann. Der Einfluss der Quellung auf die Enzymaktivität wurde damit nicht vollständig geklärt.

### 2.3. Nanofasern

Fasern werden in der Natur vielfältig produziert (Abb. 2.6), das bekannteste Beispiel sind Spinnennetze oder die Kokons von Seidenspinnerräupen. Aber auch z.B. in Vulkanen werden bei der Freisetzung von komprimierten Gasen und Dämpfen Fasern aus Gesteinsglas erzeugt, das sogenannte Pele-Haar (54). Diese natürlichen Vorbilder werden industriell vielfältig genutzt, u.a. bei der Herstellung von Textilfasern durch mechanisches Verspinnen oder Dämmungsmaterialien wie Glas- oder Mineralwolle durch Erhitzen und nachfolgendes Verschleudern. Ein weiteres, vielversprechendes Verfahren zur Herstellung von Polymerfasern im Nanometerbereich ist das sogenannte Elektrosppinnverfahren, welches im Folgenden vorgestellt wird.



**Abbildung 2.6: Natürlich produzierte Fasern. A) Kokons von *Bombyx mori* (55), B) Pele Haar des Vulkans Nyiragongo (Kongo) (56), C) Spinnennetz (57).**

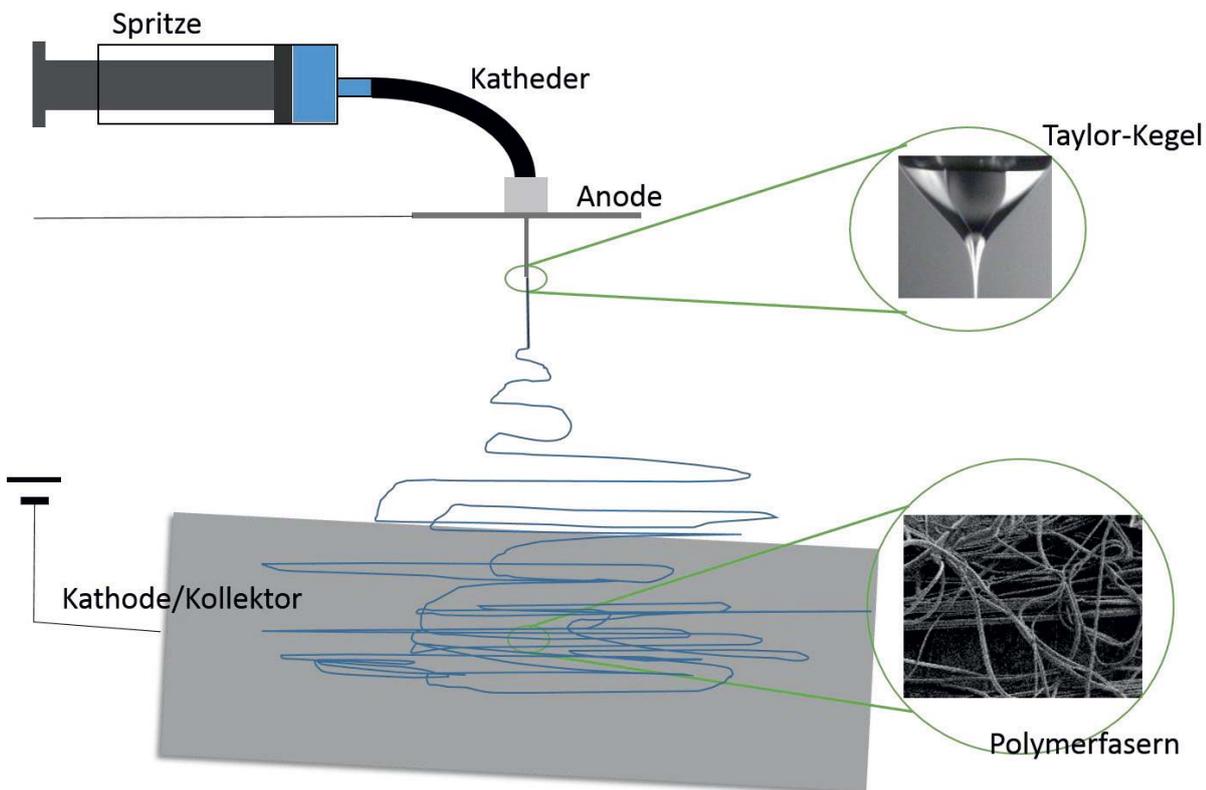
Das Phänomen der Beeinflussung von Flüssigkeiten und Lösungen durch elektrische Ladungen ist bereits seit dem späten 16ten Jahrhundert bekannt (58). Es dauerte nahezu 150 Jahre, bis Lord Rayleigh seine Forschungen über elektrisch induziertes Gleichgewicht und Instabilitäten von Flüssigkeiten und dünnen Flüssigkeitsstrahlen, sogenannten „Jets“ veröffentlichte (59, 60). Ebenfalls zu dieser Zeit begann Boys mit Experimenten zum elektrischen Verspinnen von unterschiedlichen Biopolymeren und Gläsern (61).

Diesen Veröffentlichungen folgten bald erste Patentanmeldungen über den Elektrospinnprozess von Cooley (62, 63) und Morton (64).

Weitere Patente über den Elektrospinnprozess selbst (65, 66) und dessen mathematische Grundlagen (67, 68) wurden publiziert. In Russland wurden die sogenannten Petryanov's-Filter entwickelt, die bis heute produziert werden. Von diesen Filtern abgesehen geriet das Elektrospinnen nahezu in Vergessenheit, bis in den 1990er Jahren vor allem die Forschergruppen um Reneker (69, 70) und Rutledge (71, 72) zu einem Wiederaufleben des wissenschaftlichen Interesses sorgten, das bis heute anhält (73–75). Die fundamentalen Prinzipien der Faserbildung während des Spinnprozesses liegen dabei im Fokus vieler Untersuchungen (76, 77).

Die typische Durchführung und der Aufbau des Prozesses heutzutage ähneln denjenigen, welche Baumgarten 1971 beschrieb (78). Dabei wird eine Polymerlösung oder auch –schmelze konstant durch eine dünne Düse bzw. Kanüle gepumpt. An diese Düse ist eine Elektrode, die Anode angeschlossen, an die Hochspannung angelegt wird. In einem Abstand von wenigen Zentimetern ist die Gegenelektrode, die gleichzeitig als Kollektor dient, angeordnet. Durch die hohe Spannung von mehreren tausend Volt wird ein sogenannter Taylorkegel erzeugt, aus

denen Polymerjets austreten, die in Richtung der Gegenelektrode beschleunigt werden. Auf dem Weg verdunstet das Lösemittel, während der Polymerfaden mehreren Instabilitäten unterliegt (79), die zu einer enormen Verstreckung führen, so dass extrem dünne, verstreckte Fasern auf der Kathode gesammelt werden. Die Elektroden sind dabei senkrecht angeordnet (Abb.2.7).



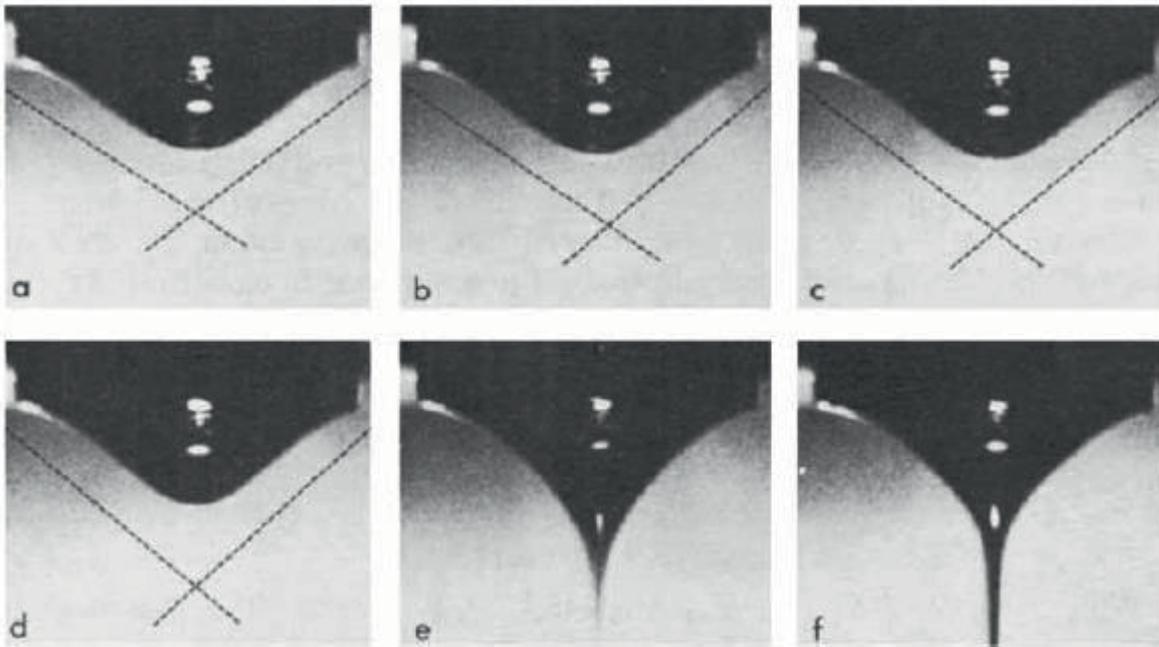
**Abbildung 2.7: Typischer Aufbau eines Elektrospinprozesses. Die Polymerlösung wird in ein elektrisches Feld gepumpt, die Hochspannung bewirkt die Ausbildung eines sogenannten Taylorkegels, aus dem ein Polymerfaden („Jet“) austritt und nach enormer Verstreckung und Lösemittelverdampfung auf dem Kollektor gesammelt wird. Die Abbildung des Taylorkegels wurde entnommen aus (80).**

Die Ausbildung des Taylorkegels ist abhängig vom elektrostatischen Potential (Abb. 2.8). Er wurde nach Sir Geoffrey Taylor benannt, der diesen bei Untersuchungen zum Zerfall von Wassertropfen im elektrischen Feld beschrieb (68).

Die Hochspannung induziert positive Ladungsträger in der Polymerlösung, so dass der Tropfen eine zusätzliche Beschleunigung durch das elektrische Feld erfährt. Bei einem kritischen Potential herrscht ein Gleichgewicht zwischen der abstoßenden Wirkung der Ladungsträger auf der Tropfenoberfläche und der anziehenden Wirkung der Oberflächenspannung. Aus dem Prinzip der Minimierung der freien Energie kommt es zur Ausbildung des Taylorkegels (81).



Der Öffnungswinkel für niedermolekulare Flüssigkeiten beträgt hier  $49,3^\circ$ , und wird in einigen Veröffentlichungen auch für Polymerlösungen bestätigt (82), hier wurden aber auch kleinere Winkel von etwa  $30^\circ$  beobachtet (83). Wird das kritische Potential überschritten, tritt der Jet aus (Abb. 2.8).

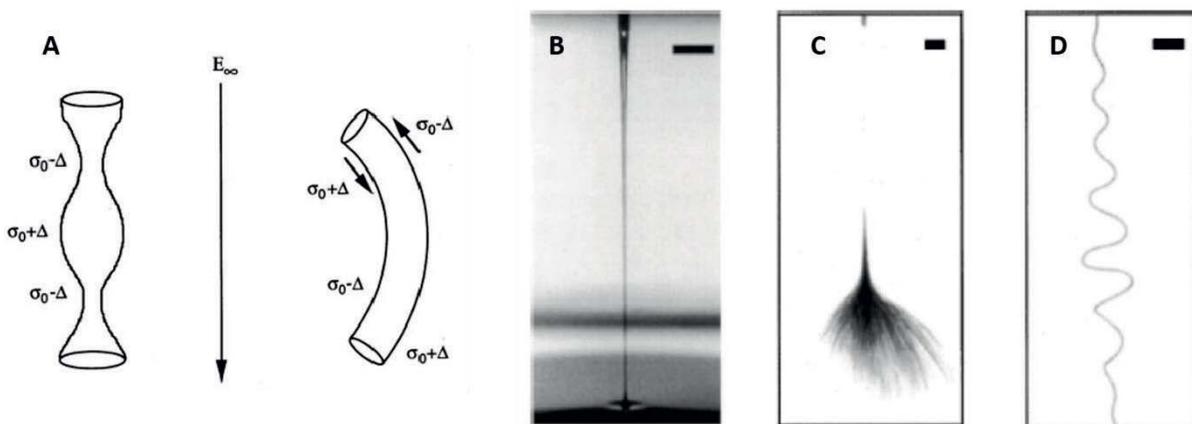


**Abbildung 2.8: Ausbildung eines Taylor-Konus' (84). a-d) Der Tropfen verformt sich unterhalb des kritischen Potentials bis zum Erreichen des Gleichgewichts. e), f) Oberhalb des kritischen Potentials kommt es zur Bildung des Polymerjets.**

Nachdem der Jet austritt, ist er über eine sehr kurze Strecke stabil, bevor er verschiedenen Instabilitäten unterliegt, von denen zwei auch bei ungeladenen Flüssigkeitsstrahlen wirken. Die erste ist die Rayleigh-Instabilität, welche durch die Oberflächenspannung verursacht wird und den Zerfall eines niedermolekularen Flüssigkeitsstrahls in Tropfen verursacht. Bei dem Elektrospinprozess verhindern die gelösten Polymere diesen Zerfall. Die Rayleigh-Instabilität verliert bei Anlegen der Spannung an Bedeutung, da auch die Oberflächenspannung bei steigender Oberflächenladung an Bedeutung verliert. Die zweite dieser Instabilitäten ist ein mechanisches Verknicken des Strahls (85).

Beide Instabilitäten spielen für die Verstreckung des Jets eine untergeordnete Rolle. Den größten Einfluss haben zwei elektrostatisch hervorgerufene Instabilitäten. Diese sogenannten „Conducting-Modes“ sind bei Erhöhung des elektrostatischen Potentials empfindlicher auf die Leitfähigkeit der Flüssigkeit als auf deren Oberflächenspannung. Die erste ist achsensymmetrisch und dadurch bedingt, dass innerhalb des Strahls keine gleichmäßige

Verteilung der Oberflächenladung vorliegt. Dadurch kommt es zu einer Verstreckung des Jets. Die zweite ist nicht achsensymmetrisch und verursacht ein auf den Jet wirkendes Drehmoment („Whipping“). Sie wird durch die Abstoßung der nahe beieinander liegenden Oberflächenladungen hervorgerufen. Der Strahl verbiegt sich folglich und verläuft spiralförmig bzw. bildet Schleifen, was bedingt durch die elektrostatische Abstoßung entlang der Faser (die gesamte Oberfläche ist positiv geladen) ebenfalls zu einer Verstreckung führt (Abb. 2.9, links). Die Überlagerung dieser Instabilitäten führt zu einem chaotischen Verlauf des Strahls, der allerdings innerhalb einer konusförmigen Einhüllenden bleibt, weshalb in früheren Arbeiten oft postuliert wurde, dass der Jet sich im Laufe seines Weges aufspaltet. Dies konnte mittels Hochgeschwindigkeitskameras widerlegt werden. Die Frequenz der Spiralbildung aufgrund der Instabilitäten ist derart hoch, dass eine zeitliche Auflösung von 12,5 ns nötig ist, um den einzelnen Polymerstrahl zu erkennen (Abb. 2.9, rechts) (81, 85). Die Schleifenbildung wird erst beendet, wenn der Faden erstarrt, so extrem dünn ist, dass er resistent gegen die Instabilitäten geworden ist oder, unerwünschterweise, vorzeitig auf dem Kollektor auftritt (74).

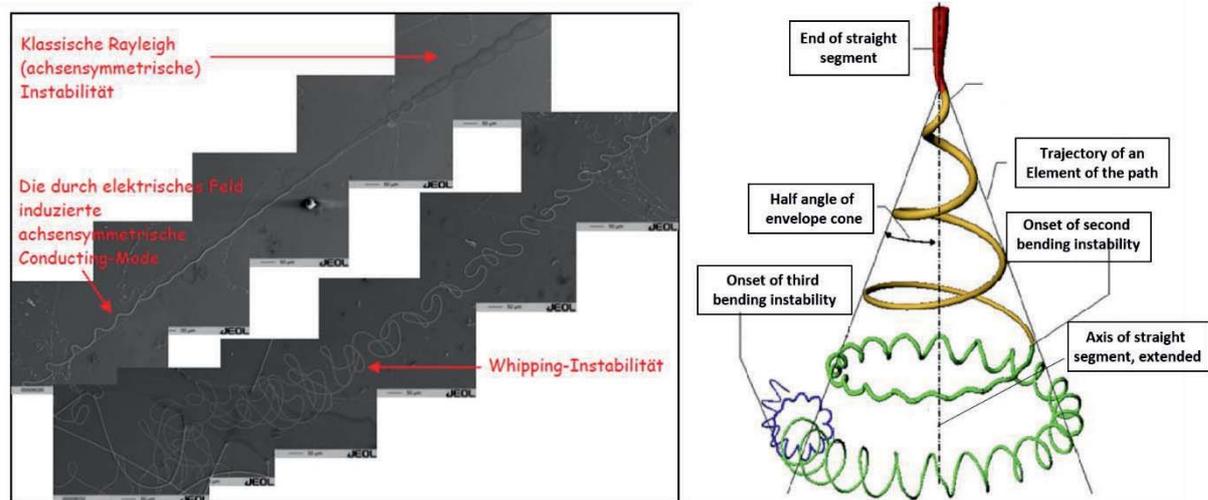


**Abbildung 2.9: Auf den Polymerjet wirkende Instabilitäten (86); A) achsensymmetrische Instabilität (links) und nichtachsensymmetrische Instabilität (rechts), mit  $\sigma_0$  als ursprünglicher Oberflächenladungsdichte und  $\Delta$  als Abweichung von dieser; B)-D) Ausbildung der Jets aus einer 2 Gew.% PEO/Wasserlösung B) stabiler Jet; C) instabiler Jet, zeitliche Auflösung 1 ms; D) instabiler Jet, zeitliche Auflösung 0,18 ns.**

Zusätzlich zu diesen Verstreckungen verdunstet das Lösemittel auf dem Weg zur Kathode, so dass sich auf der Kathode ineinander verschlungene, chaotische Fasern mit einem Durchmesser im Nanometerbereich sammeln (81). Anschauliche Übersichten des



Faserverlaufs während des Spinnprozesses sind bei Kim in seiner Habilitationsschrift (81) und Garg and Bowlin (75) zu finden (Abb. 2.10).



**Abbildung 2.10:** Links: Entwicklung eines Jets während des Elektrospleinvorganges von 2 Gew.% PEO in Chloroform (81); Rechts: Schematische Darstellung von Beginn und Entwicklung der Instabilitäten während des Elektrospleinprozesses (75).

Zunächst tritt die achsensymmetrische Rayleigh-Instabilität auf, wodurch die Oberfläche des Jets sinusförmig deformiert wird. Je weiter sich der Jet von der Anode entfernt, desto größer wird die Oberflächenwellenlänge (z.B. durch Erschütterung der Kapillare hervorgerufen) des Jets, während sein Durchmesser abnimmt. Nach der Rayleigh-Instabilität wirkt die achsensymmetrische, elektrostatische Instabilität (achsensymmetrischer Conducting-Mode), wobei der Jet durch die Abstoßungskräfte gleicher Ladungen, die nahe beieinander liegen, stark verstreckt wird. Auch der Einfluss der nicht-achsensymmetrischen Whipping-Instabilität wird immer größer, erkennbar daran, dass der Jet sich nicht mehr in gerader Linie von der Anode entfernt. Die Instabilitäten wirken immer stärker auf den Jet, welcher einen zunehmend chaotischen Verlauf bekommt und schließlich als ungeordnete Faser auf der Kathode landet. Die Auslenkung des Jets hat zur Folge, dass sein Weg sehr viel länger ist als der Abstand der Kathoden, so dass nicht nur die Verstreckung stärker ist, auch das Lösemittel hat mehr Zeit zu verdampfen. Auch wenn das Verständnis für diesen komplizierten Prozess stetig zunimmt, kann bisher von einem vollständigen Verstehen keine Rede sein (81).

Nichtsdestotrotz werden mittlerweile Polymerfasern sehr erfolgreich unter modifizierten Bedingungen synthetisiert. Dazu gehören u.a. coaxiales, paralleles oder horizontales Spinnen, rotierende Kollektoren und Strategien, um ein stabileres elektrisches Feld zu erzeugen.



Zahlreiche Publikationen geben über diese Entwicklungen und die daraus resultierenden Fasermorphologien Auskunft (87, 88, 73–75, 89).

Trotz aller Fortschritte in Forschung und Entwicklung ist der industrielle Einsatz von Nanofasern limitiert, vor allem aufgrund der Schwierigkeiten beim Scale up von einzeln produzierten Fasern im Labormaßstab. Aktuell existieren vereinzelt industrielle Fabrikationen, wie zum Beispiel die bereits erwähnten Petryanov's Filter in Russland, eSpin Technologies in den USA und die ULTRA-WEB® Filterserie der Firma Donaldson Filtration Solutions mit globalen Standorten. Da die Forschung sich bereits mit diesem Problem befasst (88), stehen die Chancen gut, dass sich in Zukunft mehr industrielle Anwendungen für Nanofasern realisieren lassen.

Potentielle Einsatzgebiete von Nanofasern sind zahlreich, daher beschränkt sich der weitere Teil der Arbeit mit ihrem Einsatz als Träger für (Bio)Katalysatoren. Der interessierte Leser sei daher verwiesen auf Veröffentlichungen über das Einschließen von Nanopartikeln (90), ganzen Zellen (91, 92), Medikamenten (93) und bioaktiven Wirkstoffen (94).

### 2.3.1. Polymere Nanofasern als Träger für Biokatalysatoren

Der größte Vorteil eines nanoskaligen Trägers im Allgemeinen und damit auch der Hauptgrund für deren Entwicklung seit den späten 1980er Jahren (95) ist die große Oberfläche und das große Oberfläche-zu-Volumen Verhältnis (96). Zu den Nanomaterialien, die für die Katalyse eingesetzt werden, zählen neben den Nanofasern auch Nanopartikel bzw. Nanotubes und poröse Körper (Abb. 2.11), wobei Nanofasern gegenüber diesen Systemen zusätzliche Vorteile bieten. So haben z.B. Nanopartikel und Nanotubes zwar kleinere Dimensionen, tendieren aber zu Agglomerationen und können nur schwer aus Reaktionslösungen entfernt werden (97). Darüber hinaus werden sie, wenn sie sich nicht in Lösung befinden, als gesundheits- und umweltschädlich eingestuft (98). Poröse Körper hingegen, wie z.B. metallorganische Gerüstverbindungen (metal organic frameworks, MOF) und Zeolithe, bergen andere Nachteile. Ihre riesige Oberfläche wird durch die sehr kleine Porengröße hervorgerufen, welche oft im einstelligen Ångströmbereich liegt (99). Selbst wenn jede einzelne Pore zugänglich ist, stellt eine enge Pore eine Diffusionslimitierung dar und kann durch Ablagerungen vollständig verstopft werden (100).



**Abbildung 2.11: Darstellung unterschiedlicher Geometrien von nanoskaligen Trägermaterialien (v.l.n.r. sphärische Partikel, Fasern, Schäume) (85).**

Polymere Nanofasern bieten, neben ihrer einfachen Synthese, Handhabung und Sicherheit, durch Aushöhlungen oder andere, selbst-aggregierende Strukturen eine weitere Vergrößerung der Oberfläche (101–104). Es verwundert daher nicht, dass sich ein Großteil der Forschung mit dem Einsatz von Nanofasern als Trägermaterial für Katalysatoren befasst (105). Dabei gibt es generell zwei Methoden für die Immobilisierung von Katalysatoren allgemein und Enzymen im Speziellen. Die erste besteht in chemischer oder physikalischer Adsorption nachträglich zum Spinnverfahren. Hier wird lediglich die Faseroberfläche von Enzymen benetzt. Bei der zweiten Methode werden die Enzyme direkt mit der Polymerlösung versponnen.

Ein Vorteil der nachträglichen Adsorption ist die Möglichkeit, die Polymerfasern in organischen Lösungsmitteln zu verspinnen. Wasser als Lösungsmittel beeinflusst das elektrische Feld oft negativ und verdunstet weniger schnell als organische Medien. Werden die Fasersynthese und die Immobilisierung nacheinander durchgeführt, ist es möglich, beide Prozessschritte unter optimalen Bedingungen durchzuführen. Das erste Enzym, welches auf diese Art immobilisiert wurde, war  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) auf Polystyrolfasern (106). Dabei bedeckte CT 27% der Faseroberfläche und zeigte eine 18fach höhere Stabilität und 3fach höhere Aktivität als das native Enzym.

Eine komplette Bedeckung von Nanofasern mit Enzymen wurde von den Forschergruppen um Chen und Nair (für direkte Modifizierung über die Aminogruppen der Enzyme) für kleine Faserdurchmesser erreicht, beide stellten jedoch fest, dass die Beladung bei größeren Faserdurchmessern abnimmt. Chen *et al.* immobilisierten Lipase aus *Candida rugosa* (CrL) auf elektrogewebenen Poly(methylmethacrylat) (PMMA) Fasern, und entdeckten, dass die Enzymbeladung bei einem mittleren Faserdurchmesser von 36 nm 7,7-fach höher ist



( $332 \frac{\text{mg}}{\text{g Faser}}$ ) als bei Fasern mit einem mittlerem Durchmesser von 500 nm. Hier lag die Restaktivität der CrL unabhängig von Faserdurchmesser und Beladung bei 43 bis 50 % (107). Nair *et al.* immobilisierten Lipase aus *Mucor javanicus* (MjL) kovalent auf Polystyrol-Poly(styrol-co-Maleinsäureanhydrid) (PS-PSMA) Nanofasern, von denen einige vorher mit Alkohol behandelt wurden. Diese Vorbehandlung führte zu der Ausbildung einer Dispersion in wässriger Lösung, so dass die für das Enzym erreichbare Oberfläche und damit das Oberflächen zu Volumenverhältnis dieser Fasern vergrößert wurden. Auch hier zeigte sich eine wesentlich höhere Enzymbeladung der vorbehandelten Fasern ( $5,4 \pm 2,2$  verglichen mit  $42,4 \pm 18,5 \frac{\mu\text{g MjL}}{\text{mg Faser}}$ ). Die Restaktivitäten waren auch hier vergleichbar ( $31 \pm 6,9 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$  und  $31 \pm 7 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ ) und geringer als die Aktivität des freien Enzyms mit  $187,2 \pm 34,1 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ . Die Autoren führen diesen Effekt auf Denaturierung der Enzyme oder Blockade ihrer aktiven Zentren während der Immobilisierung zurück (108).

Ein direkter Vergleich von physikalischer Adsorption und chemischer Bindung mit Glutaraldehyd als Crosslinker wurde von Kim *et al.* mit CT und PS und PS-PSMA Nanofasern durchgeführt. Hier zeigte sich, dass physikalisch gebundenes CT eine niedrigere Aktivität ( $0,051 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Faser}}$  verglichen mit  $0,098 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg Faser}}$ ), eine geringere Stabilität (Aktivitätsverlust während der ersten 3 Tage bei physikalischer Bindung 90,2 %, bei kovalenter Bindung 85,7 %) und ein höheres Maß an Leaching ( $4,8 \mu\text{g}$  im Vergleich zu  $3,2 \mu\text{g}$  Leaching in die Pufferlösung) zeigt als das chemisch gebundene. Die Aktivität des chemisch gebundenen CT konnte darüber hinaus um den Faktor 8 erhöht werden, indem nicht einzelne Enzyme, sondern ganze Enzymaggregate an die Faseroberfläche gebunden wurden, hier konnte auch ein Leaching vollständig unterbunden werden und die Halbwertszeit des Enzyms betrug 33 Tage, während sie für Monophasen bei wenigen Stunden lag (109). Derartige Aggregate haben jedoch, zumindest für den industriellen Einsatz, den Nachteil dass ihre Produktion einen erhöhten Aufwand fordert und nur die Enzyme der äußeren Schicht an der Produktbildung beteiligt sind (110, 111).

Diese Nachteile können durch direktes Verspinnen der Enzyme mit der Polymerlösung vermieden werden. Die ersten, die ein solches Verfahren untersuchten, waren Xie und Hsieh. Sie gaben CrL zu einem Polymergebisch aus Casein und Polyethylenglykol (PEG) bzw. Casein und Polyvinylalkohol (PVA), und führten nach dem Verspinnen eine Quervernetzung durch



(112). Dabei ergab sich für Casein/PEG Nanofasern eine Beladung bis zu 30 Gew%, für Casein/PVA Nanofasern eine Beladung von bis zu 20 Gew%. Die Aktivität, gemessen anhand der Hydrolyse von Olivenöl, zeigte eine um zwei Größenordnungen niedrigere Aktivität als die des nativen Enzyms. Vermutlich lag der Grund in der mangelnden Diffusion des Substrates innerhalb der Nanofasern. Auch Veränderungen der Enzymstruktur während des Spinnprozesses oder der Quervernetzung können Ursache für die reduzierte Aktivität sein. Eine Ablösung der enzymbeladenen Fasern von der Alufolie zeigte eine um den Faktor 8 erhöhte Aktivität (112). Smith *et al.* versponnen Trypsin direkt mit Polyethyloxazolin (PEtOx), PEG und Polyvinylpyrrolidon (PVP), sowie RNase (0,25 Gew%) mit PEtOx. Die Restaktivitäten des Trypsins nahmen in der Reihenfolge PEtOx (73 %), PVP (65 %) und PEG (38 %) ab. Mit RNase/PEtOx Nanofasern wurde eine Restaktivität von 71 % erreicht. Die Autoren erklären diese Unterschiede mit der geringeren Tendenz von PVP und PEG, Wasser zu absorbieren. Die generelle Abnahme der Aktivität führen sie auf die Bedingungen während des Elektrospinnens zurück. Eine Erhöhung der Trypsinbeladung resultierte in einer Erhöhung der Restaktivität (mit 10 Gew% Beladung wurde eine Restaktivität von 90 % erreicht), genauso wie die Zugabe von Additiven. Hier hatte Glucose (0,1 M) den größten positiven Einfluss, die Restaktivität lag bei 80 % (113).

Die Gruppe um Wu erforschte die Verspinnbarkeit von Cellulase und PVA, wobei sich eine höhere Enzymbeladung negativ sowohl auf die Faserqualität (erhöhte Ausbildung von Beads) als auch auf die Restaktivität auswirkte (65,6 % Restaktivität bei 10 Gew% Cellulase gegenüber 99,0 % Restaktivität bei 2,5 Gew% Cellulase) (114). Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass Nanofasern ein geeignetes Trägermaterial für Enzyme darstellen. Da Enzyme, die im Faserinneren gebunden sind, geschützt gegen harsche Reaktionsbedingungen sind, ist ihr direktes Verspinnen vorteilhaft. Dabei ist die Herausforderung einerseits, dass Leaching von Enzymen zu verhindern, und oft auch der Einsatz von nicht-wasserlöslichen Polymeren. Herricks *et al.* untersuchten einen Ansatz, bei dem CT mit Aerosol OT (AOT, Docusat-Natrium) als grenzflächenaktivem Molekül in Toluol gelöst und versponnen wurde. Das so immobilisierte Enzym war über eine Woche stabil, mit zusätzlicher Quervernetzung durch Glutaraldehyd sogar noch länger. Im Gegensatz dazu zersetzte sich natives CT innerhalb einer Stunde durch Autolyse (115).



Als Alternative zu dieser Methode besteht die Möglichkeit, Enzyme in Nanofasern durch nachträgliche Beschichtung zu stabilisieren. Zeng *et al.* konnten durch die Beschichtung von BSA (bovines serum albumin)-haltigen Fasern aus PVA mit Polyxylylen ein um mehrere Größenordnungen reduziertes Proteinleaching nachweisen. Vor allem das bei nicht beschichteten Fasern auftretende extreme Leaching („burst release“) während der ersten beiden Stunden wurde unterdrückt. Das Verspinnen von Luciferase statt BSA zeigte weiterhin, dass das Enzym auch nach dem Verspinnen und Beschichten aktiv bleibt (116). Eine neue Entwicklung nutzt coaxiales Elektrosponnen, um hohle Nanofasern aus Polyurethan zu erzeugen, in denen Enzyme eingeschlossen sind (117). Hier wurde ein Multi-Enzym-System bestehend aus einer Dehydrogenase und einer Diaphorase sowie NADH in einem Glycerin/Wasser-Gemisch als innere Phase eingesetzt, Polyurethan in *N,N*-Dimethylacetylamid bildete die äußere Phase. Die Restaktivität dieses Enzymsystems lag bei 82 %, mit einer Erhöhung der Halbwertszeit um den Faktor 170 bei 25°C.

Patel *et al.* wiederum nutzten Tetramethoxysilan (TMOS) als Precursor für die Immobilisierung von Meerrettichperoxidase (HRP), und versponnen diese Träger mit PVA. Die daraus entstandenen mesoporösen Silikatfasern wurden als Glucosesensor eingesetzt und zeigten Restaktivitäten von bis zu 50 % bei einer erhöhten Stabilität gegen pH-Werten über dem Optimum der HRP von 6,5 sowie Reaktionstemperaturen von bis zu 80 °C (118).

Auch wenn viele Forschergruppen das Potential von Nanofasern als Trägermaterial für Biokatalysatoren erforschen, gibt es bisher wenige Beispiele für deren Einsatz in organischen Medien. Hong *et al.* untersuchten den Einfluss von unterschiedlichen Methoden der Immobilisierung von CrL auf Polyanilin (PAN)-Nanofasern auf die Aktivität des Enzymes. Dabei kamen Enzymadsorption (EA), Enzymadsorption und Quervernetzung (EAC) sowie Enzymadsorption in Kombination mit Fällung und Quervernetzung (EAPC) zum Einsatz.

Die Aktivität der CrL wurde anhand der Produktion von Ibuprofenester in Isooktan als Lösemittel mit 1-Propanol als Alkoholdonor bestimmt. Dabei ergaben sich die besten Ergebnisse mit der EAPC-Methode, hier betrug die Restaktivität 84 %, nach 84 Tagen Inkubation konnten 74 % der Ursprungsaktivität erhalten werden. Im Fall des freien Enzyms war nach dieser Zeit weniger als 1 % der Aktivität erhalten. Die Produktbildung des Ibuprofenesters war mit der EAPC-Methode, verglichen mit EA und EAC, um den Faktor 75 erhöht (119). Die Aktivierung gegenüber dem freien CrL-Pulver wurde hier nicht angegeben.



Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Forschergruppen, die die Aktivität von freier CrL anhand der gleichen Reaktion in Isooktan testeten (gleiche Substanzen, abweichende Temperaturen und Molaritäten) zeigt für CrL, immobilisiert nach der EAPC-Methode, eine um mehrere Größenordnungen höhere Aktivität an (120–122).

Jia *et al.* immobilisierten CT kovalent auf Polystyrol (PS)-Nanofasern und bestimmten die Aktivität für die Transesterifizierung von *n*-Acetyl-L-Phenylalaninethylester (APEE) in Hexan und Isooktan. Dabei betrug die Restaktivität 65 %, der Aktivierungsfaktor gegenüber dem freien Enzym in Isooktan lag bei bis zu 5670, in Hexan bei 3000. Damit konnte eine höhere Aktivierung erzielt werden als durch Ionenpaarung, bei der CT löslich in organischen Medien wird und eine homogene Katalyse stattfinden kann (123)(124).

Sakai *et al.* erreichten nach der physikalischen Adsorption einer Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (PcL) auf PAN-Nanofasern bei der Transesterifizierung von (*S*)-Glycidol und *n*-Butyrat in Isooktan eine 23fach höhere Aktivität als die der freien PcL. Die geträgerte PcL erreichte nach 10 Versuchszyklen noch 80 % der ursprünglichen Aktivität (125).

Im Gegensatz dazu führte die direkte Verspinnung einer Lipase aus *Rhizopus oryzae* (RoL) aus einer Suspension mit Polystyrol in DMF bei der Transesterifizierung von (*S*)-Glycidol und *n*-Butyrat in Isooktan zu einer 100fach geringeren Aktivität gegenüber dem freien Enzym ( $9,00 \cdot 10^{-4} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$  im Vergleich zu  $9,01 \cdot 10^{-2} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$ ). Eine nachträgliche Behandlung der enzymbehafteten Nanofasern mit Wasser entweder durch Dampf, Einlegen in Wasser oder Besprühen mit Wasser erhöhte die Aktivität der RoL bei der Transesterifizierung auf bis zu  $2,07 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$  im Fall der in Wasser eingelegten Fasern (mit Wasser besprühte RoL erreichte  $2,04 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$ , mit Dampf behandelte RoL  $0,9 \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \cdot \text{mg}}$ ) (126). Weiterhin untersuchten Sakai *et al.*

die Trägerung von Lipase aus *Burkholderia cepacia* (BcL) in PVA-Nanofasern durch direktes Verspinnen (127). Dabei konnten sie nicht nur eine Verbesserung der Produktivität des Spinnprozesses an sich (Zusammenhang zwischen der Polymermenge, welche während des Spinnens nicht auf dem Kollektor landet, und der Polymermenge, welche innerhalb von 30 Minuten durch die Kanüle gepumpt wird) feststellen, indem sie DMF zu der Spinnlösung zugaben (von 10 % Produktivität ohne DMF auf 92 % Produktivität mit 10 Gew% DMF). Sie entdeckten darüber hinaus auch einen aktivierenden Einfluss des organischen Lösemittels auf die Enzymaktivität. Dabei wurde bei der Transesterifizierung von (*S*)-Glycidol und *n*-Butyrat in



Isooktan eine 14-fach höhere Aktivität der geträgerten gegenüber der freien Bcl gemessen, wenn die Spinnlösung nur aus Wasser bestand. Bei Zugabe von DMF zur Spinnlösung wurde eine bis zu 1,5-fach höhere Aktivität gegenüber den Versuchen ohne DMF erreicht. Dieser Effekt wurde einerseits durch Porenbildung während des Elektrospinnens erklärt, des Weiteren ändert sich die Konformation der Bcl bei Kontakt mit organischen Medien, so dass das aktive Zentrum leichter für Substrat zugänglich ist (128).

Diese Ergebnisse zeigen das große Potential von Nanofasern, deren Erforschung als Trägersystem für Biokatalysatoren nicht ausgeschöpft ist.



### **3. AUFGABENSTELLUNG**

Zunächst sollen unterschiedliche amphiphile Polymernetzwerke (APCNs) auf ihre Eignung als Enzymträger untersucht werden. Dabei sollen die Enzyme direkt in die Polymermischung eingewogen werden, um deren gleichmäßige Verteilung über das gesamte Netzwerkvolumen zu gewährleisten. Es sollen APCNs auf Basis von Poly(2-Methyloxazolin) und den hydrophoben Acrylaten Butylacrylat und 2-Ethylhexylacrylat synthetisiert und in Bezug auf Solgehalt, Zusammensetzung, Quellung in wässrigen und organischen Lösemitteln und Nanophasenseparation charakterisiert werden. Da die hydrophoben Acrylate ein unterschiedliches Lösungsverhalten aufweisen, soll nach Prüfung der generellen Eignung als Träger für Biokatalysatoren, der Einfluss des Quellvermögens auf die enzymatische Aktivität gezogen werden.

An bereits erfolgreich getesteten APCNs basierend auf Poly(2-Ethylloxazolin) und Poly(2-Hydroxyethylacrylat) soll erforscht werden, ob die Größe des Trägers Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Hier sollen aus den Netzwerken durch mechanische Zerstörung Mikropartikel gewonnen werden. Diese sollen durch Sieben klassiert und durch REM-Aufnahmen charakterisiert werden. Der Einfluss auf die Enzymaktivität soll anhand der Beladung mit einer Lipase untersucht werden.

Letztendlich sollen elektrogesponnene Nanofasern aus amphiphilen Polymermischungen in wässrigen Lösungen synthetisiert werden. Hier soll eine Vernetzung stattfinden, die den lösemittelunabhängigen Einsatz garantiert. Zusätzlich soll die Eignung der Nanofasern als Träger für unterschiedliche Enzyme getestet werden, welche direkt mit versponnen werden sollen. Die Messung der Restaktivität soll klären, welchen Einfluss der Spinnprozess auf die Enzymaktivität hat. Die Enzymaktivität soll verglichen werden mit der von Enzymen, die in Netzwerken immobilisiert sind. Weiterhin soll die maximale Enzymbeladung mit einer Lipase und der Einfluss auf die Enzymaktivität untersucht werden. Ein biokatalytisch aktiver Rührer soll die industrielle Eignung von Nanofasern prinzipiell beweisen. Alle Nanofasern sollen anhand von REM-Aufnahmen charakterisiert werden.



## 4. MATERIAL UND METHODEN

### 4.1. Chemikalien und Geräte

#### 4.1.1. Chemikalien

**Tabelle 4.1: Chemikalien**

Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheit	CAS-Nummer
$\alpha,\alpha'$ -Dibromo- <i>p</i> -Xylol	Fluka	97 %	623-24-5
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem	> 99 %	60-24-2
1-Methoxy-2-Propanol	Sigma Aldrich	$\geq 99,5$ %	107-98-2
1-Oktanol	AppliChem	98 %	111-87-5
1-Propanol	Merck	$\geq 99,5$ %	71-23-8
( $\pm$ ) 2-Oktanol	Fluka	> 99,5 %	123-96-6
( $\pm$ ) 1-Phenylethan-1,2-diol	ABCR	97 %	93-95-1
2-Ethyl-2-Oxazolin	Merck	99 %	10431-98-8
2-Hydroxyethylacrylat	Alfa Aesar	97 %	818-61-1
2-Methyl-2-Oxazolin	Alfa Aesar	99 %	1120-64-5
2- Oktanon	Sigma Aldrich	98 %	111-13-7
2-Propanol	Sigma Aldrich	$\geq 99,8$ %	67-63-0
2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)diammoniumsalz	Sigma Aldrich	$\geq 98$ %	30931-67-0
2,6-Dimethoxyphenol	Acros Organics	99 %	91-10-1
4-Nitrophenylpalmitat	Sigma Aldrich	$\geq 98$ %	1492-30-4
Albumin bovine Fraction V	Roth	$\geq 98$ % proteasefrei	90604-29-8
Aluminiumoxid 90 aktiv basisch 0,063-0,200 mm	Merck	--	1344-28-1
Ammoniumperoxodisulfat	Roth	$\geq 98$ %	7727-54-0



<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Reinheit</b>	<b>CAS-Nummer</b>
Butylhydroxytoluol	AppliChem	> 99 %	128-37-0
Bromphenolblau	Serva	p.a.	34725-61-6
Butylacrylat	Merck	≥ 99 %	141-32-2
Calciumchlorid	Alfa Aesar	97 %	10043-52-4
Calciumhydrid	Merck	zur Synthese	7789-78-8
Chloroform	VWR	99-99,4 %	67-66-3
Chlorwasserstoff	Merck	37 %	7647-01-0
CombiCoulomat fritless			
Karl Fischer Reagenz	Merck	--	--
Coomassie Brilliant Blau R 250	Roth	rein	6104-59-2
Cyclohexan	VWR	≥ 99,5 %	110-82-7
Deuteriertes Chloroform	Amar Chemicals	99,80 %	865-49-6
Diethylether	VWR	99 %	60-29-7
Dimethylformamid	VWR	99,9 %	68-12-2
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem	Reinst	7558-79-4
Dithiothreitol	AppliChem	≥ 99,5 %	3483-12-3
Essigsäure	Roth	100 %	64-19-7
Ethanol, vergällt	VWR	96 %	64-17-5
Glycerindimethacrylat	Sigma Aldrich	85 %	1830-78-0
Glycin	AppliChem	Reinst Ph. Eur.	56-40-6
Gummi Arabicum	Sigma Aldrich	> 99 %	9000-01-5
Irgacure <sup>®</sup> 651	Ciba	--	91274-91-8
Kaliumdihydrogenphosphat	VWR	99,5 %	7778-77-0



Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheit	CAS-Nummer
Laurinsäure	Sigma Aldrich	98 %	143-07-7
Lithiumbromid	Sigma Aldrich	99 %	7550-35-8
Molsieb 3 Å	Merck	--	--
Molsieb 4 Å	Merck	--	--
<i>N</i> -[3-(Dimethylamino)propyl]methacrylamid	Sigma Aldrich	99 %	5205-93-6
Natriumdesoxycholat	Sigma Aldrich	≥ 98 %	83-44-3
Natriumlaurylsulfat	Roth	99,5 %	151-21-3
<i>N</i> -Acetyl-L-Phenylalaninethylester	Sigma Aldrich	95 %	2361-96-8
Nicotinamidadenindinucleotid	Roth	≥ 98 %	53-48-9
Natriumhydroxid	Roth	99 %	1310-73-2
<i>n</i> -Heptan	Merck	≥99 %	142-82-5
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -phenylendiamin	Sigma Aldrich	97 %	99-98-9
<i>N</i> -Succinyl-L-phenylalanin- <i>p</i> -nitroanilid	Sigma Aldrich	≥ 98 %	2440-62-2
<i>n</i> -Tetradecan	Merck	zur Synthese	629-59-4
Phenol	Merck	zur Synthese	108-95-2
Poly(2-ethyl-2-oxazoline) M.W. 500000	Alfa Aesar	--	25805-17-8
Polyethylenglycol 2000	Merck	--	25322-68-3
<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat	Sigma Aldrich	≥ 98 %	1492-30-4
Roti <sup>®</sup> -Mark 10-150	Roth	--	--
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 40 (37,5:1)	Roth	--	--
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Sigma Aldrich	Lsg. 6 M in Decan	75-91-2
Toluol	VWR	≥ 99,5 %	108-88-3
TRIS-Base	Roth	≥ 99,9 %	77-86-1



<b>Chemikalie</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Reinheit</b>	<b>CAS-Nummer</b>
TRIS-HCl	Roth	≥ 99 %	1185-53-1
Triton-X 100	Roth	reinst	9002-93-1
Vinylacetat	Merck	≥ 99 %	108-05-4
Wasserstoffperoxid	Merck	30 %	7722-84-1
Xylol-Isomerengemisch	AppliChem	≥ 97 %	1330-20-7

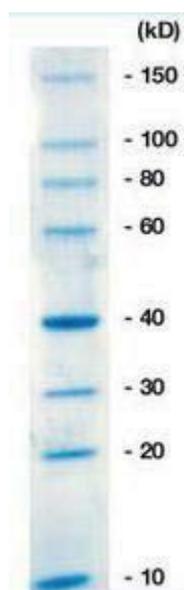
## 4.1.2. Enzyme

Tabelle 4.2: Enzyme; Aktivitätsdaten aus Konieczny 2014 (129)

Bezeichnung	Hersteller	Ursprungorganismus	Aktivität
Peroxidase Type II	Merck	Meerrettich	$20000 \frac{U}{\text{vait}}$
$\alpha$ -Chymotrypsin	Fluka	Rinderpankreas	$90 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 28 °C, pH 7,8; N-Succinyl-L-Alanyl-L-Prolyl-L-Phenylalanin-4-Nitroanilid
Lipase	Sigma Aldrich	<i>Candida antarctica</i>	$\approx 9 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 40 °C, pH 8; Tributyrin
CrL	BioChemika	<i>Candida rugosa</i> Typ VII	$\geq 700 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 37 °C, pH 7,2; Triglycerid
RmL	Sigma Aldrich	<i>Rhizomucor miehei</i>	$20000 \frac{U}{\text{g}}$ ; pH 6,2
Laccase	Applichem	<i>Trametes versicolor</i>	$\geq 10 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 25 °C, pH 5,0; Hefe-RNA
Papain	Sigma Aldrich	<i>Carica papaya</i>	$\geq 3 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 25 °C, pH 6,2; N-Benzoyl-L-Argininethylester
Alkohol-Dehydrogenase	Sigma Aldrich	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$\geq 10 \frac{U}{\text{mg}}$ ; 25 °C, pH 8,8; Ethanol



### 4.1.3. Proteinmarker



**Abbildung 4.1: Proteinmarker SDS-PAGE, Roti<sup>®</sup>-Mark 10-150 (Roth).**

### 4.1.4. Geräte

#### 4.1.4.1. Mikrowellensynthesen

Die Polymersynthesen wurden in Synthesemikrowellen (maximale Leistung 300 W), ausgestattet mit Druckluftkühlung, Magnetührwerk und einem vertikal fokussierten Infrarotsensor für die kontinuierliche Temperaturüberwachung und -regelung der Firma Discover durchgeführt. Die Reaktionsführung erfolgte rechnergesteuert mittels der Software Synergy (CEM Corporation) Version 1.36.

Als Probengefäße für die Polymersynthese dienten Schottflaschen mit einem Volumen von 50 mL.

#### 4.1.4.2. Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Analyse der Netzwerkzusammensetzung geschah mit einem Veeco Dimension Icon Rastersondenmikroskop von Veeco Instruments mit einer Nanoscope V Steuereinheit und einer AVH-1000 Workstation. Untersucht wurden die Querschnittsflächen von Polymernetzwerken, die dafür in flüssigem Stickstoff eingefroren und gebrochen wurden. Die Messungen wurden im Tappingmode im Bereich von 300 bis 400 kHz durchgeführt. Dabei wurden geätzte Cantilever (RTESP oder TESPA) der Firma Bruker eingesetzt, die mit einer Frequenz angeregt wurden, welche 5 % unterhalb der Resonanzfrequenz des Cantilevers liegt. Die Scanrate lag bei 1 Hz und die Auflösung betrug 512 Bildpunkte pro Zeile.



#### 4.1.4.3. *Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie unter abgeschwächter Totalreflexion (ATR-FTIR)*

Infrarotspektroskopie der Netzwerke und deren Edukte wurden an einem Spektrometer Alpha P der Firma Bruker mit abgeschwächter Totalreflexion aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer Auflösung von  $4\text{ cm}^{-1}$  und 24 Scans pro Minute in einem Wellenlängenbereich zwischen  $400$  und  $4000\text{ cm}^{-1}$  aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der Software OPUS. Die Oberfläche der Netzwerke wurden vor den Aufnahmen mit einer Kanüle vorsichtig eingeritzt, um Messungen der Netzwerkvolumina aufnehmen zu können.

#### 4.1.4.4. *Gelpermeationschromatographie (GPC)*

Die Polymerprecursor wurden mittels eines GPCMax Systems, ausgestattet mit einem Brechungsindexdetektor, sowie zwei TSKgel<sup>®</sup> GMHHR-M 7,8 x 380 mm Säulen mit  $5\text{ }\mu\text{m}$  Porengröße der Firma Tosoh und einer TSKgel<sup>®</sup> Vorsäule, vermessen. Die Säulenofentemperatur betrug  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , der Detektor war auf  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperiert.

Als Laufmittel (Flussrate  $0,7\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ) diene *N,N*-Dimethylformamid (DMF), versetzt mit  $20\text{ mmol/L}$  Lithiumbromid (LiBr). Die Proben mit einer Konzentration von  $3,0$  bis  $6,0\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$  wurden über Nacht im Laufmittel äquilibriert und im Anschluss durch einen  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  PTFE Spritzenvorsatzfilter filtriert. Das Injektionsvolumen betrug  $100\text{ }\mu\text{L}$ .

Die Kalibrierung geschah mittels Polystyrolstandards ( $1050\frac{\text{g}}{\text{mol}} < M < 3800000\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) der Firma Viscotek.

Die Chromatogramme wurden mittels der Software OmniSEC (Viscotek) Version 4.6.0.346 ausgewertet.

#### 4.1.4.5. *Dynamische Lichtstreuung (DLS)*

Die Proben wurden mit einem Zetasizer Nano S, ausgestattet mit einem Helium-Neon Laser ( $\lambda = 633\text{ nm}$ ), bei einem Winkel von  $173^{\circ}$  vermessen. Die Vermessung der Proben erfolgte in doppelt-destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O), temperiert auf  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mit einer Äquilibrierzeit von  $3\text{ min}$ . Vor der Messung wurden die Proben durch einen Spritzenvorsatzfilter (CHROMAFIL<sup>®</sup> PET) mit einer Porengröße von  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  filtriert.



#### 4.1.4.6. Gaschromatographie (GC)

Die Messung der Proben erfolgte mit einem Clarus GC 500 mit Stickstoff als Trägergas ( $1 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ). Das Injektionsvolumen betrug 0,5  $\mu\text{L}$  bei einer Injektionstemperatur von 230 °C und einem Split-Verhältnis von 5:1. Die Temperatur des FID-Detektors betrug 280 °C. Die Chromatogramme wurden mittels der Software TotalChrom (Perkin Elmer) Version 6.3.1.0504 ausgewertet.

Für die Probenmessungen wurde eine CP-Sil 8 CB-Säule der Firma Varian (Länge 30 m, Außendurchmesser 0,32 mm, Innendurchmesser 0,1  $\mu\text{m}$ ) eingesetzt.

Für die Bestimmung der Kalibrierfaktoren der Edukte wurden jeweilige Verdünnungsreihen mit konstanter Konzentration an internem Standard (*n*-Tetradecan) angesetzt und vermessen. Mittels Auftragung der Integralverhältnisse von Edukt und internem Standard und lineare Regression wurden die Kalibrierfaktoren berechnet.

Die Temperaturprogramme und Kalibrierfaktoren sind der Beschreibung des jeweiligen Assays zu entnehmen.

#### 4.1.4.7. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden in deuteriertem Chloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) an Geräten der Firma Bruker, DPX-200 (200 MHz), DPX-300 (300 MHz), DPX-400 (400 MHz) und DPX-500 (500 MHz), ausgestattet mit 5 mm Probenkopf bei Raumtemperatur (RT) aufgenommen. Die Probenkonzentration für niedermolekulare Substanzen lag bei 30 mg/mL, für Polymerproben bei 100 bis 120  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ . Als Referenz für die chemische Verschiebung dienten die Restprotonen des nicht vollständig deuterierten Lösemittels ( $\text{CDCl}_3$ :  $\delta = 7,27$ ). Die Auswertung der Spektren erfolgte mittels der Software NMR Processor Academic Edition (ACD Labs) Version 12.0.

Für die Spin-Spin-Kopplungen wurden folgende Abkürzungen verwendet: s (Singulett), d (Duplett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multiplett).

#### 4.1.4.8. Rasterelektronenmikroskop (REM)

Die Vermessung der Proben erfolgte mit einem Hitachi S-4500 Feldemissionsrasterelektronenmikroskop, ausgestattet mit einer Objektivlinse und einem Sekundärelektronendetektor mit einer hohen Bildauflösung bei geringen Betriebsspannungen. Die Aufnahmen werden auf flimmerfreien Kathodenstrahlröhrenbildschirmen angezeigt und bei einer Anregungsspannung von 1 kV und



einer Stromstärke von 10 mA aufgenommen. Die Auswertung der Aufnahmen geschah durch die Software Gimp Version 2.8.

#### 4.1.4.9. Geräteliste

**Tabelle 4.3: Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
AFM	Veeco Dimension Icon	Veeco Instruments
ATR-FTIR	Alpha P	Bruker
DLS	Zetasizer Nano S	Malvern
Elektrospinner	E-Spintronic	Erich Huber GmbH
Feinwaage	XS105	Mettler-Toledo
GC	Clarus GC 500	Perkin Elmer
Gefriertrocknung	Alpha 1-2 LD plus	Christ
GPC	GPCMax	Viscotek
Heizrührer	RCT classic	IKA
Hochvakuumpumpe	RZ6	Vacuubrand
Karl-Fischer Titrator	TitroLine KF	Schott
Kryostat (Photometer)	RM6	Lauda
Kryostat (Refraktometer)	C6	Lauda
Lichtpolymerisationsgerät	Heraflash	Heraeus Kulzer
NMR Spektrometer	DPX 500	Bruker
NMR Spektrometer	DPX 400	Bruker
NMR Spektrometer	DPX 300	Bruker
NMR Spektrometer	DPX 200	Bruker
pH-Meter	GMH 3530	Greisinger electronic GmbH
Photometer	Specord 210	Analytik Jena
Pipetten	Research, Reference	Eppendorf



Gerät	Modell	Hersteller
Refraktometer	2WAJ	Abbe
REM	S-4500 FEG	Hitachi
Rotationsverdampfer	Laborata 4001 efficient	Heidolph Instruments
Rührwerk SDS- Gelelektrophoresekammer	EUROSTAR digital MiniTwin	IKA Analytik Jena
Spannungsquelle SDS	EV231	Consort
Synthesemikrowelle	Discover	CEM
Taumelschüttler	Polyma 1040	Heidolph Instruments
Thermoshaker	Thermomixer comfort	Eppendorf
Trockenschrank	T 6030	Heraeus Instruments
Ultraschallbad	RK 100H	Lauda
Vortex	Genius 3	IKA
Zentrifuge	Z300	Hermle

#### 4.1.5. Gase und Flüssiggase

**Tabelle 4.4: Gase und Flüssiggase**

Gas	Reinheit	Hersteller	Verwendungszweck
Argon, Ar	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Schutzgas/ Inertisierung
Sauerstoff, O <sub>2</sub>	99,5 %	Messer	Laccaseassay
Stickstoff, N <sub>2</sub>	$\geq 99,8$ %	Messer	Schutzgas/ Inertisierung
Stickstoff, N <sub>2</sub>	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Trägergas GC
Synthetische Luft (N <sub>2</sub> :O <sub>2</sub> ; 79,5:20,5)	5.0, $\geq 99,999$ %	Messer	Brenngas FID- Detektor



Gas	Reinheit	Hersteller	Verwendungszweck
Wasserstoff, H <sub>2</sub>	5.0, ≥ 99,999 %	Messer	Brenngas FID-Detektor
Fl. Stickstoff, N <sub>2</sub>	2.8, ≥ 99,8 %	Linde	Kühlung

## 4.2. Polymersynthese

### 4.2.1. Umkristallisieren von $\alpha$ - $\alpha'$ -*para*-Dibromxylo (pDBrX)

2 g pDBrX wurden in 80 mL abdestilliertem Chloroform gelöst. Nachdem ein Drittel des Lösemittelvolumens abdestilliert wurde, wurde die Lösung über Nacht bei -18 °C gelagert, so dass das pDBrX auskristallisierte. Das Lösemittel wurde mit einer Nutsche abfiltriert. Der gesamte Vorgang wurde wiederholt. Nach der erneuten Filtration wurden die Initiatorokristalle zunächst am Rotationsverdampfer vorgetrocknet und für zwei Stunden im Feinvakuum getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -18 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  [ppm] = 4.49 (s, 4H, CH<sub>2</sub>), 7.28 (d, 4H, CH).

### 4.2.2. Destillation von 2-Methyl-2-Oxazolin (MeOx) und 2-Ethyl-2-Oxazolin (EtOx)

Die Monomere wurden jeweils zwei Mal mit einer Vigreuxdestille destilliert. Die Destille wurde vor dem Einsatz drei Mal im Vakuum ausgeheizt und zum Abkühlen mit Inertgas gespült. Die erste Destillation fand über CaH<sub>2</sub> statt, die nachfolgende Destillation ohne Zusätze. MOx wurde bei 42 °C und 42 mbar destilliert. EtOx wurde bei 60 °C und 50 mbar destilliert.

Nach der zweiten Destillation wurden die Monomere unter Inertgas bei -18 °C gelagert.

<sup>1</sup>H-NMR MeOx (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) :  $\delta$  [ppm] = 4.09 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>), 3.67 (t, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 1.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>)

<sup>1</sup>H-NMR EtOx (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C):  $\delta$  [ppm] = 4.18 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-N), 3.77 (t, 2H, O-CH<sub>2</sub>-), 2.24 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-), 1.14 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>)



4.2.3. Destillation von *N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamid (DMAPMA)  
10 mL DMAPMA wurden destillativ bei 115 °C und 0,6 mbar unter Lichtausschluss aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte inert und unter Lichtausschluss bei 4 °C.

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C) : δ [ppm] =7.88 (s, 1H, -NH-), 5.73 (m, 1H, C<sub>vinyl</sub>-H<sub>2</sub>), 5.29 (m, 1H, C<sub>vinyl</sub>-H<sub>2</sub>), 3.42 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-N), 2.42 (m, 2H, N-CH<sub>2</sub>), 2.24, (s, 6H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-N), 1.93, (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.66, (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)

#### 4.2.4. Trocknung von Chloroform

1 Liter Chloroform wurde bei 40 °C und 280 mbar im Rotationsverdampfer destilliert.

Im Anschluss wurde der Rotationsverdampfer mit Toluol und anschließend Essigsäureethylester unter verminderter Kühlung abdestilliert und eine Inertatmosphäre hergestellt, die über alle nachfolgenden Wechsel der Kolben aufrecht erhalten wurde. Das bereits destillierte Chloroform wurde (mit 10 % Vorlauf) destilliert und anschließend auf ausgeheiztes (350 °C, 16 h), basisches Aluminiumoxid gegeben und für 45 Minuten bei 850 mbar am Rotationsverdampfer gerührt. Das Chloroform wurde erneut destilliert und mittels einer ausgeheizten Transferkanüle unter inerten Bedingungen in einen zu einem Drittel mit ausgeheiztem 4 Å-Molekularsieb (ausgeheizt bei 350 °C über Nacht) befüllten Schlenkkolben überführt und bei 4 °C gelagert. Der Wassergehalt wurde mittels Karl-Fischer-Titration bestimmt und lag unter 1 ppm.

#### 4.2.5. Polymersynthese

##### 4.2.5.1. Polymerisation der Homopolymere

Die Synthese der Poly(2-Oxazolin)-Homopolymere erfolgte unter Argonatmosphäre in einer 50 mL Schottflasche, welche über Nacht bei 130 °C ausgeheizt wurde.

Nach Abkühlung der Schottflasche auf Raumtemperatur wurde 20 mL trockenes Chloroform (4 mL je g Monomer) vorgelegt und 5 g des jeweiligen Monomers zugegeben. Die Initiatorzugabe (*p*DBrX, bifunktional) erfolgte anschließend. Die benötigte Menge wurde nach den Gl. 4.1 berechnet:



$$n_{\text{Polymerketten}} = \frac{m_{\text{Monomer}}}{DP_{\text{set}} \cdot M_{\text{Monomer}}}$$

$$m_{\text{Initiator}} = n_{\text{Polymerketten}} \cdot M_{\text{Initiator}}$$

**Gleichungen 4.1: Berechnung der benötigten Menge an Initiator für einen bestimmten Polymerisationsgrad und eine bestimmte Ansatzgröße.**

Mit:

$n_{\text{Polymerketten}}$  = Stoffmenge Polymer in mol

$m_{\text{Monomer}}$  = Masse Monomer in g

$DP_{\text{set}}$  = angesetzter Polymerisationsgrad

$M_{\text{Monomer}}$  = Molmasse Monomer in  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$

$m_{\text{Initiator}}$  = Masse Initiator in g

$M_{\text{Initiator}}$  = Molmasse Initiator in  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$

Die physikalischen Daten der verwendeten Monomere sind in Tab. 4.5 aufgelistet.

**Tabelle 4.5: Physikalische Daten der verwendeten 2-R-2-Oxazolinmonomere. <sup>a</sup>Daten aus (130); <sup>b</sup>Daten aus (131); <sup>c</sup>Daten aus (25).**

Monomer	Molmasse $\left[\frac{\text{g}}{\text{mol}}\right]$	Dichte $\left[\frac{\text{g}}{\text{mL}}\right]$
MOx <sup>a</sup>	85,11	1,01
EtOx <sup>b</sup>	99,13	0,98

Die jeweilige Polymerisation wurde in der Synthesemikrowelle (Maximalleistung 300 W, Power Max: Off) durchgeführt (Tab. 4.6).

**Tabelle 4.6: Übersicht über die Polymerisationsbedingungen der synthetisierten POX Homopolymere.**

Monomer	$DP_{\text{set}}$	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Rührgeschwindigkeit
MOx	40	100	240	Medium
EtOx	20	120	96	Medium
EtOx	50	120	240	Medium



Monomer	DP <sub>set</sub>	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Rührgeschwindigkeit
EtOx	100	105	1440	Medium
EtOx	120	105	2880	Medium
EtOx	240	105	5400	Medium

Nach beendeter Polymerisation wurden die Polymere entweder direkt terminiert (Kap. 4.2.5.2) oder aufgereinigt (Kap. 4.2.5.3).

Nachfolgend sind exemplarisch die <sup>1</sup>H-NMR Daten der synthetisierten POX Homopolymere aufgelistet, von denen einige mit DMAPMA terminiert wurden:

PMOx:

<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ [ppm] = 7.7-7.5 (s, 2H, -NH-), 7.2-7.0 (m, 4H, ArH), 5.8-5.7 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 5.3-5.2 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.6-4.4 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-), 4.0-3.3 (m, n x 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 3.4-3.2 (s, 12H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2.3-1.9 (m, n x 3H, NCO-CH<sub>3</sub>), 2.0-1.8 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

PEtOx:

<sup>1</sup>H-NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C): δ [ppm] = 7.7-7.5 (s, 2H, -NH-), 7.2-7.0 (m, 4H, ArH), 5.8-5.7 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 5.4-5.3 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.6-4.4 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.7-3.2 (m, n x 4H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 2.5-2.2 (m, n x 2H, R<sub>2</sub>N-C(O)CH<sub>2</sub>), 2.0-1.8 (s, 6H, N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.2-0.9 (m, n x 3H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>).

#### 4.2.5.2. Terminierung der Poly(2-Oxazoline) für die Linkersynthese

Im Anschluss an die Polymerisation erfolgte die Terminierung einiger der erhaltenen Polymere mit 25fachem molarem Überschuss N-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamid (DMAPMA) (Zugabe unter Schutzgasatmosphäre) bei 45 °C für 48 Stunden unter Lichtausschluss. Dazu wurden zwei Spatelspitzen BHT als Stabilisierungsmittel zugegeben.

#### 4.2.5.3. Aufreinigung der Poly(2-Oxazoline)

Die Aufreinigung der Polymere erfolgte durch Umfällen in Diethylether (Et<sub>2</sub>O). Dafür wurde ein 1L-Kolben zu drei Viertel mit Et<sub>2</sub>O gefüllt und stark gerührt. Die Polymerlösung wurde direkt nach der Polymerisation in den Kolben gegeben und für 15 min weiter gerührt. Im Anschluss wurde der Rührer ausgestellt und gewartet, bis sich das Polymer als weißer Niederschlag am Boden abgesetzt hatte. Der Ether wurde abdekantiert und das Polymer in



abdestilliertem Chloroform gelöst. Für Polyethyloxazolinlinker reichten vier Fällungsschritte, Polymethyloxazolinlinker mussten bis zu sieben Mal gefällt werden, um Restmonomer und überschüssiges Terminierungsmittel vollständig zu entfernen. Zwischen den Fällungsschritten wurde das jeweilige Polymer in  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Funktionalisierte Polymere wurden unter Lichtausschluss umgefällt.

Nach dem letzten Fällungsschritt wurden die Polymere in  $\text{CHCl}_3$  gelöst und das Lösemittel im Rotationverdampfer abdestilliert. Anschließend wurden sie im Feinvakuum für weitere 2 h getrocknet und bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

### 4.3. Netzwerksynthese

#### 4.3.1. Destillation von 2 - Hydroxyethylacrylat (HEA)

HEA wurde bei 40 °C und 0,6 mbar destillativ aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte bei -18 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C):  $\delta$  [ppm] = 3.03 (s, 1H, OH), 3.8 (m, 2H,  $\text{C}_{\text{vinyl}}\text{H}_2$ ), 4.29 (m, 2H,  $\text{C}_{\text{vinyl}}\text{H}_2$ ), 6.2 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ).

#### 4.3.2. Destillation von 2 - Ethylhexylacrylat (EhAc)

EhAc wurde bei 55 °C und 0,6 mbar unter Lichtausschluss destillativ aufgereinigt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei -18 °C.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , 25 °C) :  $\delta$  [ppm] = 6.37 (d, 2H,  $=\text{CH}_2$ ), 6.16 (q, 1H, CH), 5.48 (d, 2H,  $=\text{CH}_2$ ), 4.07 (m, 2H, O- $\text{CH}_2$ ), 1.60 (m, 1H, CH), 1.31 (m, 8H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ ), 0.91 (m, 6H,  $\text{CH}_3$ )

#### 4.3.3. Dialyse der RmL- und CaL B-Formulierung

5 mL der Enzymlösung wurde über vier Tage bei 4 °C in Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,7) dialysiert. Die Pufferlösung wurde täglich gewechselt. Im Anschluss wurde zwecks Entsalzung über zwei Tage bei 4 °C in verdünntem Acetatpuffer (0,001 M, pH 5,7) weiter dialysiert. Die Pufferlösung wurde dreimal täglich gewechselt. Der Dialyseschlauch ZelluTrans von Roth besaß ein MWCO von 10000. Die dialysierte und entsalzte Enzymlösung wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und mittels Gefriertrocknung über Nacht getrocknet. Die erhaltenen hellbraunen Enzymflocken wurden bei -18 °C gelagert.



#### 4.3.4. Änderung des pH-Wertes des $\alpha$ -Chymotrypsins (CT)

Da CT sich selbst verdaut, wird es bei einem pH-Wert von 1 verschickt, bei dem das Enzym inaktiv vorliegt. Für die Änderung des pH-Wertes wurde das native Enzym in TRIS-HCl-Puffer (50 mM, pH 7,7) gelöst und für 17 Stunden gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.3.5. Synthese von amphiphilen Polymerconetzwerken

##### 4.3.5.1. Synthese der RmL-beladenen PHEA-I-PEtOx APCNs

Es wurden 0,5 mg des Photoinitiators Irgacure<sup>®</sup> 651 (I651) vorgelegt und 70 mg PEtOx zugefügt. Gefriergetrocknete RmL wurde für verschiedene Beladungen (0,2 bis 11 Gew%) hinzugefügt (Tab. 4.7) und die Feststoffe vorvermischt. 30 mg HEA und 20 mg ddH<sub>2</sub>O wurden zugefügt und der Ansatz zum Vorlösen für 20 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert und danach im Ultraschallbad homogenisiert. Für einige Netzwerksynthesen wurde der vierfache Ansatz hergestellt, um Materialverluste so gering wie möglich zu halten.

Die Mischung wurde auf einen mit Tesafilm beschichteten Objektträger überführt und mit einem zweiten, ebenfalls mit Tesafilm beschichteten Objektträger bedeckt. Als Abstandshalter wurde der untere Objektträger an den Enden mit drei zusätzlichen Lagen Tesafilm umwickelt, was in Netzwerkdicken von  $170\text{ }\mu\text{m}$  resultiert. Die Polymerisation fand mittels Blitzlicht (450 nm, Heraflash, Heraeus Kulzer) für 3 mal 180 s statt. Zwischen den Polymerisationsschritten wurden die Netzwerke für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Für den dritten Polymerisationsschritt wurde das Netzwerk umgedreht. Die Netzwerke wurden von den Objektträgern gelöst und bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**Tabelle 4.7: Einwaagen der synthetisierten PHEA-I-PEtOx Netzwerke.**

Irgacure 651 [mg]	PEtOx [mg]	RmL [mg]	HEA [mg]	H <sub>2</sub> O [ $\mu\text{L}$ ]
0,81	72,93	-	30,52	20,00
0,47	71,15	1,30	29,76	20,00
0,56	71,08	0,95	30,68	20,00
0,53	70,20	1,00	30,09	20,00
0,64	69,68	0,99	31,14	20,00
0,48	71,45	0,54	29,11	20,00



Irgacure 651 [mg]	PEtOx [mg]	RmL [mg]	HEA [mg]	H <sub>2</sub> O [μL]
0,60	70,76	0,47	30,96	20,00
0,72	69,88	0,52	30,05	20,00
0,63	69,52	0,53	31,14	20,00
2,21	288,17	1,32	121,20	80,00
2,83	276,47	0,77	119,92	100,00
0,59	74,77	-	30,07	20,00
0,52	70,54	11,90	30,64	40,00
0,76	70,03	11,98	31,68	40,00
0,48	73,72	-	30,78	20,00
0,46	76,30	-	31,11	20,00
1,98	282,28	1,19	122,67	80,00
2,06	286,84	1,16	121,77	80,00
2,04	280,30	1,20	120,00	80,00
0,57	75,28	-	30,64	20,00

#### 4.3.5.2. *Synthese der PBuAc-I-PMeOx bzw. PEhAc-I-PMeOx APCNs*

Für die Synthese der Netzwerke wurde entweder 2-Hydroxyethylacrylat (HEA), 1-Methoxy-2-Propanol (1M2P) oder Ethanol (EtOH) als Vermittler eingesetzt. Die typische Vorgehensweise war wie folgt:

Zunächst wurden 30 bis 60 mg PMOx vorgelegt und im Vermittler gelöst. Die Menge des Vermittlers wurde abhängig vom angestrebten Acrylatanteil eingewogen und ist in den Tabellen 4.8 bis 4.11 aufgelistet. Anschließend wurde in mehreren Schritten das jeweilige Acrylat zugegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass das Probengefäß nach der Acrylatzugabe sehr schnell fest verschlossen wurde, um ein Ausdampfen zu verhindern. Nach jeder Acrylatzugabe wurde die Mischung durch kräftiges Schütteln und Klopfen homogenisiert. Im Falle eines Niederschlags wurde erneut Vermittler zugegeben. Zuletzt



wurden 0,5 mg I651 zugegeben und gelöst. Die Polymerisation erfolgte wie bei den PHEA-/PEtOx APCNs zwischen zwei mit Tesafilm bedeckten Objektträgern, die einen Abstand von drei Lagen Tesafilm besaßen. Diese Netzwerke wurden von jeder Seite für 2 x 180 s mit UV-Blitzlicht bei 450 nm bestrahlt. Anschließend wurden die Netzwerke von den Objektträgern abgelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 4.8: Einwaagen der synthetisierten PBuAc-/PMOx-APCNs mit HEA als Vermittler.**

PMOx [mg]	BuAc [mg]	HEA [mg]	Initiator [mg]
53,20	20,29	98,87	0,65
62,00	36,06	95,33	1,22
27,47	19,92	50,68	1,05
28,79	29,27	43,29	1,09
31,44	36,44	36,15	1,03
28,85	39,20	42,04	1,09

**Tabelle 4.9: Einwaagen der synthetisierten PBuAc-/PMOx-APCNs mit EtOH als Vermittler.**

PMOx [mg]	BuAc [mg]	EtOH [mg]	Initiator [mg]
49,18	23,81	24,30	0,98
56,97	39,50	23,23	0,61
55,73	51,13	29,89	0,98

**Tabelle 4.10: Einwaagen der synthetisierten PBuAc-/PMOx-APCNs mit 1M2P als Vermittler.**

PMOx [mg]	BuAc [mg]	1M2P [mg]	Initiator [mg]
31,2	6,1	58,6	0,62
31,7	8,8	53,6	3,0
31,8	12,3	56,6	2,4
32	23,8	57,6	1,7
30,3	27,2	59,7	0,5
31,2	42,8	81,7	2,4
31,4	53,8	72,4	1,9
32,6	71,9	103,3	3,5
29,3	81,7	122,6	2,4

**Tabelle 4.11: Einwaagen der synthetisierten PEhAc-*l*-PMOx-APCNs mit 1M2P als Vermittler.**

PMOx [mg]	EhAc [mg]	1M2P [mg]	Initiator [mg]
39,0	6,0	61,7	0,6
29,6	13,0	69,0	1,1
30,6	31,4	73,6	1,0
29,9	36,7	82,8	0,8
29,6	64,9	110,4	0,9

#### 4.3.5.3. *Synthese der enzybeladenen PBUAc-*l*-PMeOx bzw. PEhAc-*l*-PMeOx APCNs*

Zunächst wurden 60 bis 70 mg PMOx vorgelegt und mit gefriergetrockneter CaL B (0,2-0,4 Gew%) gründlich vermischt. Die Mischung wurde analog zu den APCNs ohne Enzym in 1M2P gelöst, mit dem jeweiligen Acrylat versetzt und sorgfältig homogenisiert. Nach Initiatorzugabe wurde die Lösung analog zu den vorher beschriebenen Netzwerken 2 x von jeder Seite polymerisiert und zwischen den einzelnen Polymerisationen bei 4 °C gekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -18 °C. Die Zusammensetzungen der enzybeladenen Netzwerke zeigen die Tabellen 4.12 und 4.13.

**Tabelle 4.12: Einwaagen der enzybeladenen PBUAc-*l*-PMOx-APCNs.**

PMOx [mg]	Vermittler [mg]	BuAc [mg]	Initiator [mg]	CaL B [mg]
69,34	98,51	0	2,13	0,13
71,44	95,60	7,28	1,70	0,17
69,96	82,01	17,29	1,93	0,28
70,53	117,38	31,63	1,94	0,24
71,69	108,15	45,28	1,77	0,23
71,49	87,78	46,42	1,68	0,15
70,18	129,93	80,00	2,69	0,22
70,76	114,19	94,17	1,61	0,27
69,68	83,03	116,29	1,83	0,2
70,68	138,07	128,84	2,14	0,28

**Tabelle 4.13: Einwaagen der enzymbeladenen PEhAc-/PMOx-APCNs.**

PMOx [mg]	Vermittler [mg]	EhAc [mg]	Initiator [mg]	CaL B [mg]
61,50	100,98	3,70	0,48	0,25
59,40	103,65	13,10	0,42	0,29
61,74	117,54	23,42	0,49	0,32
59,80	110,50	35,80	0,55	0,39
58,70	133,16	51,50	0,61	0,46
62,80	164,23	71,60	0,53	0,53

#### 4.3.5.4. Synthese der Polymernetzwerke mit PEtOx<sub>5000</sub> und PEtOx<sub>240</sub>

Für die Netzwerksynthese mit PEtOx<sub>5000</sub> wurden typischerweise 300 mg hochmolekulares PEtOx der Firma Alfa Aeser mit einem angegebenen Molekulargewicht von 500.000 g/mol, vermischt mit 300 mg PEtOx-Linker ( $M_{\text{set}} = 2000$  g/mol), in 650  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O im Ultraschallbad suspendiert (Tab. 4.14). Dazu wurden typischerweise 6 mg Enzym (0,5 Gew.%) und 5-15 mg Irgacure<sup>®</sup> 651 gegeben und die Mischung homogenisiert.

Die Probe wurde auf einen mit Tesafilm präparierten Objektträger ausgestrichen und mit einem zweiten, ebenfalls mit Tesafilm beschichteten Objektträger (3 Lagen Tesafilm als Abstandshalter). Die Polymerisation im Lichtpolymerisationsgerät erfolgte analog zu den PHEA-/PEtOx APCNs.

**Tabelle 4.14: Einwaagen der Polymernetzwerke mit PEtOx<sub>5000</sub> und PEtOx<sub>20</sub>. <sup>a</sup>Enthält zusätzlich 1,7 mg NAD.**

Enzym	PEtOx $M_{\text{set}} =$ 500.000 g/mol [mg]	PEtOx $M_{\text{set}} =$ 2000 g/mol [mg]	ddH <sub>2</sub> O [ $\mu\text{L}$ ]	Enzym [mg]	I651 [mg]
ADH <sup>a</sup>	300,3	300,0	650,0	6,0	11,7
CrL	300,8	301,0	650,0	6,4	10,2
Laccase	299,7	299,1	650,0	6,5	10,4
Papain	299,1	299,3	650,0	6,9	10,3
HRP	301,9	301,1	650,0	6,0	10,5
CT	299,7	301,5	650,0	6,8	9,9
CaL B	254,6	250,9	550,0	4,0	3,2
CaL B	250,9	252,5	900,0	4,1	14,1



Für die Synthese des Netzwerks mit PEtOx<sub>240</sub> wurden zunächst 0,6 mg I651 und anschließend 71,2 mg PEtOx<sub>240</sub> in ein Eppendorfcup eingewogen. Nach Zugabe von 64,4 mg HEA und 20 mL ddH<sub>2</sub>O wurde der Ansatz im Ultraschallbad homogenisiert. Die Polymerisation erfolgte analog zu den PHEA-/PEtOx-APCNs mit 4 Lagen Tesafilm als Abstandshalter.

#### 4.3.6. Untersuchungen der amphiphilen Polymerconetze

##### 4.3.6.1. Bestimmung des Sol-Gel Gehaltes

Um den Anteil der nicht bzw. nicht als Netzwerk polymerisierten Bestandteile (Sol) zu ermitteln, wurden Netzwerkstücke von 8 mg für 24 Stunden in Chloroform extrahiert. Nach der Trocknung wurden diese Netzwerkstücke erneut gewogen. Der Solanteil ist der Massenverlust des Netzwerks vor und nach der Extraktion, angegeben in Prozent.

##### 4.3.6.2. Bestimmung der Quellgrade

Zuerst wurden die Netzwerke in asymmetrische Stückchen mit geraden Kanten geschnitten und unter einem Stereomikroskop mit Auflicht (KL Electronics 1500, 3000 K) fotografiert (MZ 95, Leica, Deutschland). Die Stücke wurden über Nacht in Heptan, Toluol oder Wasser eingelegt und erneut fotografiert. Mittels des Bildbearbeitungsprogramms GIMP 2.8 wurden die jeweiligen Kantenlängen vor und nach dem Einlegen verglichen. Der Quellgrad  $S$  ergibt sich aus der dritten Potenz des Mittelwertes dieser Verhältnisse (Gl. 4.2).

$$S = \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{l_i}{l_{0i}} \right)^3$$

#### Gleichung 4.2: Berechnung des Quellgrades von APCNs.

Mit:

$S$  = Quellgrad

$l_i$  = jeweilige Kantenlänge des gequollenen Netzwerkstückes im Gleichgewicht

$l_{0i}$  = Kantenlänge des Netzwerkstückes zu Beginn.



## 4.4. Mikropartikel aus amphiphilen Conetzwerken

### 4.4.1. Synthese

Die zuvor synthetisierten APCNs wurden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in Mahlzylinder gegeben. Diese wurden in einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Kryomühle (SPEX Certi Prep 6850 Freezer/Mill) eingespannt. Tabelle 4.15 zeigt die eingestellten Mahlparameter.

**Tabelle 4.15: Parametereinstellungen für den Mahlprozess in der Cryomühle.**

Anzahl Mahlzyklen	Mahlrate [Hz]	Mahldauer [s]	Zwischenkühlzeit [s]	Vorkühlzeit [min]
5	7	6	60	1
6	6	6	60	1
13	4	6	90	10
15	7;5;4;3;2	6	30;90	2;5;10

Der Mahlvorgang erfolgte in 13 Zyklen zu jeweils 6 Sekunden und zwischenzeitlicher Pause von 90 Sekunden. Die Vorkühlzeit betrug 10 Minuten und die Mahlrate 4 Schläge pro Sekunde. Die Partikel wurden bei  $-18^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.4.2. Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße

Für die Bestimmung der durchschnittlichen Partikelgröße wurden REM-Aufnahmen der Partikel angefertigt und diese mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.8 analysiert. Dafür wurde die jeweils größte Dimension von einzelnen Partikeln vermessen. Insgesamt wurden für jede Siebfraction und der ungesiebten Probe jeweils mindestens 300 einzelne Partikel vermessen.

## 4.5. Nanofasern

### 4.5.1. Synthese

#### 4.5.1.1. Polymerlösungen ohne Enzym

##### 4.5.1.1.1. Polymerlösungen für Vorversuche

Für die Vorversuche wurden die Polymere bzw. Polymergemische durch Ultraschallbehandlung in ddH<sub>2</sub>O, CHCl<sub>3</sub> bzw. TRIS-HCl Puffer (pH 7,6, 0,5 mM) gelöst und direkt versponnen.

Die Zusammensetzung der Spinnlösungen für die Vorversuche ist Tab. 4.16 zu entnehmen.



**Tabelle 4.16: Zusammensetzung der Spinnproben für Vorversuche; <sup>a</sup>CHCl<sub>3</sub> statt ddH<sub>2</sub>O;  
<sup>b</sup>TRIS-HCl Puffer (pH 7,6, 0,5 mM) statt ddH<sub>2</sub>O.**

5000	20	DP <sub>set</sub> PEtOx [mg]			240	ddH <sub>2</sub> O [mL]
		50	100	240		
		1002,8				200,0
		1002,8				200,0
			610,2			670,0 <sup>a</sup>
			617,7			200,0
			504,0			190,0
			507,2			170,0
				1600,0		1000,0
233,9						1330,0
312,9						900,0
152,2						700,0
187,9	174,5					900,0 <sup>b</sup>

#### 4.5.1.1.2. Polymerlösungen für Vernetzungsreaktionen

Die Versuche für die Vernetzung von Nanofasern wurden auf unterschiedliche Weise durchgeführt.

Versuche ohne Wasser als Lösemittel wurden typischerweise wie folgt durchgeführt. 750 mg PEtOx<sub>50</sub> wurden in 500 µL HEA gegeben und für 3 h im Ultraschallbad gelöst. Nach Zugabe von 10 mg I651 wurde die Mischung erneut für 1 h im Ultraschallbad behandelt, bis eine homogene Lösung entstanden war. Sollte die Verspinnbarkeit der Lösungen ohne Vernetzungen überprüft werden, wurde kein Initiator zugegeben. Die jeweiligen Einwaagen sind in Tab. 4.17 aufgelistet.

**Tabelle 4.17: Einwaagen der Spinnlösungen ohne Wasser als Lösemittel.**

PEtOx <sub>50</sub> [mg]	HEA [µL]	I651
680,4	680,0	
650,3	450,0	
750,7	500,0	10,2
946,4	300,0	
982,5	100,0	14,7



Für Versuche mit Wasser als Lösungsmittel wurde entweder reines PEtOx<sub>50</sub> oder Mischungen aus PEtOx<sub>50</sub> und entweder einem PEtOx mit einem DP<sub>set</sub> = 120 oder 240 eingesetzt. Im Folgenden wird die Durchführung beispielhaft für ein Polymergemisch aus PEtOx (DP<sub>set</sub> = 50 und DP<sub>set</sub> = 240) im Verhältnis 3:2 (w/w) beschrieben.

Dafür wurden zunächst die Polymere eingewogen und mit 450 µL HEA und 400 µL ddH<sub>2</sub>O versetzt (Volumenverhältnis HEA/ddH<sub>2</sub>O 1:1). Die Mischung wurde im Ultraschallbad für 3 h gelöst bis eine klare Lösung erhalten wurde. Im Anschluss wurde Initiator (0,3 bis 0,5 Gew%) eingewogen und die Mischung erneut im Ultraschallbad homogenisiert. Proben, die nach dem Spinnen nicht vernetzt werden sollen, werden ohne Initiatorzugabe versponnen. Die jeweiligen Einwaagen sind in Tab. 4.18 aufgeführt.

**Tabelle 4.18: Einwaagen der Spinnlösungen für Vernetzungsreaktionen mit Wasser als Lösemittel.**

	PEtOx DP <sub>set</sub> [mg]			HEA [µL]	H <sub>2</sub> O [µL]	I651 [mg]
	50	120	240			
1021,0				100,0	300,0	
1019,4				100,0	300,0	5,2
698,2		301,3		200,0	250,0	
601,0		1404,0		100,0	500,0	13,0
898,6			601,6	400,0	350,0	7,6
900,2			599,2	400,0	400,0	7,9
904,6			600,5	400,0	400,0	11,6

Für die Versuche zur Vernetzung von Nanofasern ohne die Zugabe von HEA wurde typischerweise ein Polymergemisch bestehend aus einem hochmolekularen PEtOx und einem telechelen endgruppenfunktionalisierten PEtOx (DP<sub>set</sub> = 20 bzw. 50) angesetzt und in ddH<sub>2</sub>O im Ultraschallbad gelöst. Im Anschluss wurde der Initiator für die Vernetzungsreaktion eingewogen und für 15 min im Ultraschallbad gelöst.

Die Zusammensetzung der Proben ist Tab. 4.19 zu entnehmen.



**Tabelle 4.19: Zusammensetzung der Spinnproben für die Untersuchung von Vernetzungsreaktionen ohne Zugabe von HEA.**

PEtOx DP <sub>set</sub> [mg]			ddH <sub>2</sub> O [μL]	I651 [mg]
5000	50	20		
149,4	149,7	--	700,0	--
187,6	188,1	--	850,0	6,3
188,5	188,5	--	850,0	25,6
150,3		150,3	700,0	15,0
150,0		150,0	700,0	5,0
150,0		150,0	700,0	10,0
150,0		150,0	700,0	15,0
150,0		150,0	700,0	30,0
187,5		188,2	850,0	6,3

Für einige Versuche wurde zusätzlich GDMA in die Spinnlösung gegeben. Hier wurde typischerweise zunächst PEtOx<sub>5000</sub>, gefolgt von PEtOx<sub>20</sub> und GDMA eingewogen und vermischt. Nach Zugabe von ddH<sub>2</sub>O wurde die Probe für 3 h im Ultraschallbad gelöst. Nach Zugabe von I651 wurde die Probe erneut für 15 Minuten im Ultraschallbad gelöst. Die Zusammensetzungen der Proben sind in Tab. 4.20 aufgeführt.

**Tabelle 4.20: Zusammensetzung der Spinnproben für die Untersuchung von Vernetzungsreaktionen mit GDMA.**

PEtOx DP <sub>set</sub> [mg]		GDMA [mg]	ddH <sub>2</sub> O [μL]	I651 [mg]
5000	20			
300,9	280,3	20,3	1400,0	18,9
186,4	150,0	37,2	900,0	18,3
188,8	126,0	65,2	400,0	10,0

#### 4.5.1.2. Polymerlösungen mit Enzym

##### 4.5.1.2.1. Vergleich unterschiedlicher Trägersysteme

Für den Vergleich unterschiedlicher Trägersysteme für die heterogene Katalyse wurden zunächst 150,2 mg PEtOx<sub>5000</sub> und 150,0 mg PEtOx<sub>20</sub> sowie 5,0 mg I651 in 700 μL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Im Anschluss wurden 0,62 mg CaL B hinzugefügt und die Mischung bei 4 °C für 30 Minuten gerührt, bis das Enzym vollständig gelöst war.



4.5.1.2.2. Beladungsmessungen mit CaL B

Für die Beladungsmessungen wurden zwei Messreihen angesetzt, die sich in dem Polymergehalt der Spinnlösung (20 bzw. 25 Gew%) unterscheiden.

Für die Herstellung der Polymer-CaL B-Lösungen wurde typischerweise zunächst das hochmolekulare PEtOx bei 4 °C in 1000 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Enzymzugabe in unterschiedlichen Gewichtsanteilen, immer bezogen auf den Polymergehalt der Lösung, wurde der Ansatz für mindestens eine Stunde weiter bei 4 °C gerührt, bis das Enzym vollständig gelöst war. Die Zusammensetzungen aller Proben sind Tab. 4.21 bis 4.23 zu entnehmen.

**Tabelle 4.21: Zusammensetzung der Spinnproben mit 25 Gew% PEtOx<sub>5000</sub> für die Beladungsmessung mit CaL B; <sup>a</sup> bezogen auf den POX-Anteil der Spinnlösung.**

PEtOx <sub>5000</sub> [mg]	ddH <sub>2</sub> O [µL]	CaL B [mg]	CaL B [Gew%] <sup>a</sup>
312,23	1000,0	0,67	0,21
313,40	1000,0	1,58	0,50
313,17	1000,0	3,2	1,02
312,88	1000,0	9,24	2,95

**Tabelle 4.22: Zusammensetzung der Spinnproben mit 20 Gew% POX für die Beladungsmessung mit CaL B; <sup>a</sup> bezogen auf den POX-Anteil der Spinnlösung.**

PEtOx <sub>5000</sub> [mg]	ddH <sub>2</sub> O [µL]	CaL B [mg]	CaL B [Gew%] <sup>a</sup>
250,54	1000,0	1,25	0,50
250,96	1000,0	7,74	3,08
249,63	1000,0	17,43	6,98
250,01	1000,0	26,57	10,63

**Tabelle 4.23: Zusammensetzung der Spinnproben mit 10 Gew% POX für die Beladungsmessung mit CaL B; <sup>a</sup> bezogen auf den POX-Anteil der Spinnlösung.**

PEtOx <sub>5000</sub> [mg]	ddH <sub>2</sub> O [µL]	CaL B [mg]	CaL B [Gew%] <sup>a</sup>
91,70	850,0	22,90	19,98

4.5.1.2.3. Polymerlösungen mit weiteren Enzymen

Für die Herstellung der Polymer-Enzym-Lösungen wurden typischerweise zunächst 250 mg des hochmolekularen PEtOx bei 4 °C in 1000 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Enzymzugabe (0,5 Gew%, bezogen auf den Polymeranteil) wurde der Ansatz für mindestens eine Stunde weiter bei 4 °C gerührt, bis das Enzym vollständig gelöst war.



Für einige Enzyme wurden zusätzliche Versuchsvarianten durchgeführt. So wurde z.B. bei einigen Versuchen die Beladung des Enzyms auf 1 Gew% erhöht. Bei anderen Versuchen wurde anstatt ddH<sub>2</sub>O ein TRIS-HCl Puffer (pH 7,6, 0,5 mM) verwendet. Andere Versuche wurden unter Zugabe von kurzkettigen Polymeren durchgeführt, um deren Einfluss auf die Enzymaktivität zu prüfen. Hier wurde das kurzkettige Polymer zusammen mit PEtOx<sub>5000</sub> gelöst, das weitere Vorgehen war analog der Probenvorbereitung ohne Additive.

Die Einwaagen aller Spinnproben sind in Tab. 4.24 aufgelistet.

**Tabelle 4.24: Einwaagen der Spinnproben zur Untersuchung verschiedener Enzyme; <sup>a</sup>Probe enthält zusätzlich 0,27 mg NAD; <sup>b</sup>TRIS-HCl Puffer anstatt ddH<sub>2</sub>O; <sup>c</sup>enthält zusätzlich 13,5 mg PEG als Additiv.**

PEtOx 500.000 $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ [mg]	ddH <sub>2</sub> O [μL]	Enzym	Enzym [mg]
251,38	1000,0	Laccase	1,3
251,42	1000,0	ADH <sup>a</sup>	1,21
250,70	1000,0	HRP	1,24
199,38	800,0	HRP	1,24
250,07	1000,0	CrL	1,29
164,31	1000,0	CrL	18,4
251,44	1000,0	Papain	1,24
210,21	700,0	Papain <sup>b</sup>	1,02
250,43	1000,0	CT	1,27
210,68	700,0	CT <sup>b</sup>	1,04
313,40	1000,0	CaL B	1,58
209,52	700,0	CaL B <sup>b</sup>	1,04
211,40	800,0	CaL B <sup>c</sup>	1,00

#### 4.5.2. Bestimmung der durchschnittlichen Faserdurchmesser

Für die Bestimmung der durchschnittlichen Faserdurchmesser wurden REM-Aufnahmen der gesponnenen Fasern angefertigt und diese mit dem Bildbearbeitungsprogramm Gimp 2.8 analysiert. Dafür wurden für jede Spinnprobe, bei ausreichend guter Faserqualität, die Durchmesser von mindestens 200 einzelnen Fasern vermessen.



#### 4.6. Enzymatische Aktivitätsbestimmung im Wässrigen

Es wurden jeweils die Aktivität des freien, nativen Enzyms als auch die Restaktivität der elektrogenesponnenen Enzyme bestimmt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Untersuchungen mit 2 mg des freien Enzympulvers und 15 mg der mit Nanofasern versehenen Alufolie durchgeführt. Die Masse der Nanofasern wurde nachträglich bestimmt (Gl. 4.3).

$$m_{NF} = m_{NF\text{-bedeckte Alufolie vor Versuch}} - m_{\text{gesäuberte Alufolie nach Versuch}}$$

#### Gleichung 4.3: Massenbestimmung der Nanofasern für die jeweilige Aktivitätsmessung

##### 4.6.1. Lipase

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Winkler und Stuckmann (132). Dafür wurden drei Lösungen benötigt:

- 4-Nitrophenylpalmitat (pNPP)-Lösung: 7,29 mg pNPP wurden in 2 mL Isopropanol gelöst
- Sörensen-Phosphatpuffer (pH 8, 50 mM): Eine 17:1 Mischung aus  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung ( $8,9 \frac{\text{g}}{\text{L}}$  in ddH<sub>2</sub>O) und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung ( $6,8 \frac{\text{g}}{\text{L}}$  in ddH<sub>2</sub>O)
- Gummi-Arabicum-Lösung: 17,7 mg Gummi Arabicum wurden mit 40 mg Natriumdesoxycholat versetzt und in 18 mL des Sörensen Puffers gelöst

Die pNPP- und Gummi-Arabicum Lösung wurden im Verhältnis 1:9 vermischt, um die Substratlösung zu erhalten.

Für die Vermessung der Enzymproben wurden 960  $\mu\text{L}$  der Substratlösung für 5 min bei 37 °C vorgeheizt. Nach Zugabe von 40  $\mu\text{L}$  Probe oder ddH<sub>2</sub>O für den Blindwert wurde die Lösung bei 650 rpm und 37 °C für 15 min inkubiert und direkt im Anschluss die Extinktion bei 410 nm gemessen. Als Referenz diente dabei ddH<sub>2</sub>O.

Die Aktivität der Lipase wurde anhand Gl.4.4 berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{410 \text{ nm}} \cdot 1 \text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot 15 \text{ min} \cdot \epsilon_{410 \text{ nm}} \cdot c_{\text{Enzym}}}$$

#### Gleichung 4.4: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Lipasen in wässrigen Medien.

Mit:

$\Delta E_{410 \text{ nm}}$  = Extinktion der Probe – Extinktion des Blindwertes

$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$

$\epsilon_{410 \text{ nm}} = 18,45 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$  molarer Extinktionskoeffizient des p-Nitrophenol (129)



#### 4.6.2. Peptidase

Die Aktivität wurde nach Erlanger *et al.* (133) anhand der enzymatischen Umwandlung von N-Succinyl-L-Phenylalanin-*p*-Nitroanilid (SPNA) bestimmt. Während der Reaktion wird farbiges *p*-Nitroanilin freigesetzt.

Folgende Lösungen werden benötigt:

- SPNA-Lösung (0,5 mM, frisch angesetzt): 19,3 mg SPNA wurden in 1 mL Methanol gelöst
- TRIS-HCl-Puffer (0,05 mM, pH 7,6) mit 0,02 M CaCl<sub>2</sub>: 1,97 g TRIS-HCl und 0,74 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O wurden in 200 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,6 wurde die Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 250 mL aufgefüllt.
- 30 %ige Essigsäurelösung

Für den Assay mit nativem Enzym wurden 250 µL Enzymlösung ( $1 \frac{\text{mg Enzym}}{\text{mL}}$ ), für den Nachweis mit immobilisierten Enzymen mind. 15 mg der mit Nanofasern besponnene Alufolie und 250 µL ddH<sub>2</sub>O und für den Blindwert 250 µL reines ddH<sub>2</sub>O eingesetzt.

Dazu wurden jeweils 1225 µL des TRIS-HCl-Puffers sowie 25 µL der SPNA gegeben und der komplette Ansatz für 15 min bei 37 °C inkubiert.

Durch Zugabe von 250 µL Essigsäurelösung wurde die Reaktion gestoppt und die Ansätze bei 25 °C und 410 nm photometrisch vermessen. Als Referenz diente ddH<sub>2</sub>O.

Die Aktivität wurde anhand Gl. 4.5 berechnet:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E_{410 \text{ nm}} \cdot 1,75 \text{ mL}}{V_{\text{Probe}} \cdot 15 \text{ Min} \cdot \epsilon_{410 \text{ nm}} \cdot d_{\text{Küvette}} \cdot c_{\text{Enzym}}}$$

**Gleichung 4.5: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Peptidasen in wässrigen Medien.**

Mit:

$\Delta E_{410 \text{ nm}}$  = Extinktion der Probe – Extinktion des Blindwertes

$V_{\text{Probe}} = 0,25 \text{ mL}$

$\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8,8 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$  molarer Extinktionskoeffizient des *p*-Nitroanilin (129)

$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$



### 4.6.3. Peroxidase

Die Aktivitätsbestimmung der HRP wurde nach Pütter und Becker (134) mit 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) als Substrat photometrisch bestimmt.

Die benötigten Lösungen waren:

- Kaliumphosphatpuffer (pH 5, 100 mM): 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden in 80 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und nach Einstellung des pH-Wertes auf 100 mL aufgefüllt.
- ABTS-Lösung (9,1 mM): 149,8 mg ABTS wurden in 30 mL des Kaliumphosphatpuffers (pH 5, 100 mM) gelöst und bei 4 °C aufbewahrt. Die Lösung wurde frisch angesetzt.
- Wasserstoffperoxidlösung (0,3 %): Die Lösung wurde frisch angesetzt.
- Kaliumhydrophosphatpuffer (pH 6,8, 40 mM) mit BSA (0,25 % w/v) und Triton X-100 (0,5 % v/v: 544,36 mg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden in 80 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und 250 mg BSA sowie 500 µL Triton X-100 zugefügt. Nach Einstellen des pH-Wertes wurde die Lösung auf 100 mL aufgefüllt. Die Lösung war bei 4 °C maximal eine Woche haltbar.

Die Proben wurden in dem 40 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,8, 40 mM, mit 0,25 % w/v BSA und 0,5 % v/v Triton X-100) gelöst (Konzentration der freien HRP 0,25 mg/mL, Menge an mit Nanofasern bedeckter Alufolie mindestens 5 mg, Blindwert reines ddH<sub>2</sub>O). Von dieser Probenlösung wurden 25 µL mit 1,45 mL der ABTS-Lösung gemischt und im Photometer auf 25 °C temperiert. Die Extinktion bei 405 nm wurde gemessen bis sie einen konstanten Wert erreichte, dann wurden 50 µL der Wasserstoffperoxidlösung zugegeben und die Zunahme der Extinktion bei 405 nm für weitere 5 min gemessen. Als Referenz für die Messung diente ddH<sub>2</sub>O.

Aus den Messwerten wurde die Enzymaktivität nach Gl. 4.6 berechnet:

$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{\Delta E_{405 \text{ nm}, Probe}}{min} - \frac{\Delta E_{405 \text{ nm}, Blind}}{min} \cdot 1,525 \text{ mL}}{V_{Probe} \cdot \epsilon_{405 \text{ nm}} \cdot d_{Küvette} \cdot c_{HRP}}$$

**Gleichung 4.6: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Peroxidasen in wässrigen Medien.**

Mit:

$\frac{\Delta E_{405 \text{ nm}}}{min}$  = Zunahme der Extinktion pro Minute

$V_{Probe} = 0,025 \text{ mL}$

$\epsilon_{410 \text{ nm}} = 36,8 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$  molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten ABTS (135)

$d_{Küvette} = 1 \text{ cm}$

$c_{HRP}$  = Enzymkonzentration der Probe in  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$



#### 4.6.4. Laccase

Die Bestimmung der Laccaseaktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von Wan *et al.* durchgeführt (136). Der Nachweis verläuft photometrisch über die Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) zu einem farbigen Produkt.

Es wurden folgende Lösungen benötigt:

Acetatpuffer (pH 4,5, 0,1 M): 0,6 g Essigsäure wurden in 80 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und nach Einstellung des pH-Wertes auf 100 mL aufgefüllt.

DMP-Lösung (28,8 mM): 44,5 mg DMP wurden in 10 mL Acetatpuffer (pH 4,5, 0,1 M) unter leichtem Erwärmen gelöst. Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Die Probenkonzentration lag für die freie Laccase bei  $0,1 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$ , hier wurden für den Assay 100  $\mu\text{L}$  benötigt. Für die Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Laccase wurden mindestens 5 mg der mit Nanofasern benetzten Alufolie eingewogen und 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O zugegeben. Die Messung des Blindwertes wurde mit 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O durchgeführt. Zu den 100  $\mu\text{L}$  Probe wurden jeweils 900  $\mu\text{L}$  der DMP-Lösung gegeben und über 5 min die Änderung der Extinktion bei 468 nm beobachtet.

Aus den Messwerten wurde die Aktivität nach Gl. 4.7 bestimmt:

$$\frac{\hat{U}_{Laccase,25^{\circ}C}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\Delta E_{468 \text{ nm}, Probe}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{468 \text{ nm}, Blind}}{\text{min}}}{V_{Probe} \cdot 0,001 \cdot c_{Laccase}}$$

**Gleichung 4.7: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Laccase in wässrigen Medien.**

Mit:

$\frac{\Delta E_{468 \text{ nm}}}{\text{min}}$  = Zunahme der Extinktion pro Minute

$V_{Probe} = 0,1 \text{ mL}$

$c_{Laccase}$  = Enzymkonzentration der Probe in  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$

#### 4.6.5. Alkoholdehydrogenase (ADH)

Die Aktivität wurde über die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd bestimmt. Zeitgleich fand die Reduktion des Cosubstrates NAD<sup>+</sup> zu NADH statt, welche photometrisch bei 340 nm detektiert werden kann (137).

Es wurden folgende Lösungen benötigt:



Pyrophosphatpuffer (pH 8,8, 50 mM): 664 mg Natriumpyrophosphat wurden in 40 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes mit 8 %-iger Phosphorsäure auf pH 8,8 wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 mL aufgefüllt.

Natriumphosphatlösung (10 mM): 0,664 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O wurden in 100 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Phosphatpuffer (pH 7,5, 10 mM): 142 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in 90 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes mit der Natriumphosphatlösung (10 mM) auf 7,5 wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt.

Phosphatpuffer (pH 7,5, 10mM) mit BSA (0,1 % w/v): 142 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurden in 90 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und 100 mg BSA zugegeben. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,5 wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 mL aufgefüllt.

NAD<sup>+</sup>-Lösung (15 mM): 49,75 mg NAD<sup>+</sup> in 5 mL ddH<sub>2</sub>O lösen und kühl halten. Die Lösung wurde frisch angesetzt.

Ethanollösung (95 % v/v): 9,5 mL absolut Ethanol wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 mL aufgefüllt.

ADH-Stammlösung: 1  $\frac{\text{mg}}{\text{mL}}$  ADH wurden in kaltem Phosphatpuffer (pH 7,5, 10 mM) gelöst. Die Lösung wurde frisch angesetzt und kühl gehalten.

ADH-Arbeitslösung: 10 µL der ADH Stammlösung wurden mit 4990 µL kaltem Phosphatpuffer mit BSA (pH 7,5, 10 mM) verdünnt. Die Lösung wurde frisch angesetzt und kühl gelagert.

Für die Messung der Aktivität wurden zunächst 1,3 mL des Pyrophosphatpuffers (pH 8,8, 50 mM) mit 1,1 mL der Ethanollösung (95 % v/v) und 1,5 mL der NAD<sup>+</sup>-Lösung (15 mM) gemischt und im Photometer auf 25 °C temperiert und die Extinktion bei 340 nm gemessen. Bei Erreichen eines konstanten Wertes wurden 100 µL Probe bzw. Phosphatpuffer mit BSA (pH 7,5, 10 mM) für den Blindwert zugegeben und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm über 6 min verfolgt.

Die Enzymaktivität wurde anhand Gl. 4.8 bestimmt:

$$\frac{U}{\text{mg}} = \frac{\left( \frac{\Delta E_{340 \text{ nm, Probe}}}{\text{min}} - \frac{\Delta E_{340 \text{ nm, Blind}}}{\text{min}} \right) \cdot V_{\text{gesamt}}}{V_{\text{Probe}} \cdot \epsilon_{340 \text{ nm}} \cdot C_{\text{ADH}} \cdot d_{\text{Küvette}}}$$

**Gleichung 4.8: Berechnung der enzymatischen Aktivität der ADH in wässrigen Medien.**



Mit:

$$\frac{\Delta E_{340 \text{ nm}}}{\text{min}} = \text{Zunahme der Extinktion pro Minute}$$

$$V_{\text{Probe}} = 0,1 \text{ mL}$$

$$V_{\text{gesamt}} = 4 \text{ mL}$$

$$E_{340 \text{ nm}} = 6,22 \frac{\text{mL}}{\mu\text{mol}\cdot\text{cm}} \text{ molarer Extinktionskoeffizient des NADH (138)}$$

$$d_{\text{Küvette}} = 1 \text{ cm}$$

$$c_{\text{ADH}} = \text{Enzymkonzentration der Probe in } \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$

#### 4.7. Enzymatische Aktivitätsbestimmung in organischen Lösemitteln

Die Untersuchungen wurden mit 2 mg des freien Enzympulvers, 5 mg Netzwerk oder 15 mg der mit Nanofasern versehenen Alufolie durchgeführt. Die Masse der Nanofasern wurde nachträglich bestimmt (Gl. 4.3).

##### 4.7.1. Lipase

###### 4.7.1.1. Umsetzung von 1-Octanol und Laurinsäure

Die Aktivitäten der RmL, CaL B und CrL wurden nach der literaturbekannten Veresterung von Laurinsäure (LS) mit 1-Octanol (Oct) bestimmt (139). Die Esterbildung wurde chromatographisch mit Tetradecan (TD) als internem Standard verfolgt. Die benötigten Stammlösungen (SL) sowie die Zusammensetzung der Reaktionslösung sind Tabelle 4.25 zu entnehmen. Es wurden Versuche in Chloroform (19 ppm), Toluol (15 ppm) und Heptan (12 ppm) durchgeführt sowie lösemittelfreie Systeme (1-Oktanol 251 ppm, molares Verhältnis 1-Oktanol: Laurinsäure 2:1)). Der in Klammern stehende Wert bezeichnet den Wassergehalt des Lösemittels, welcher mit Karl-Fischer-Titration bestimmt wurde. Die Blindwerte wurden abgezogen.

**Tabelle 4.25: Stammlösungen und Zusammensetzung der Reaktionslösung für den Lipase Assay in organischen Lösemitteln.**

Stammlösung	$c \left[ \frac{\mu\text{L}}{\text{mL}} \right]$	$c \left[ \frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]$	Volumenanteil in der Reaktionslösung
TD	0,296		2
LS		40	1
Oct		52	1



Nach Zugabe der Stammlösungen (Tab. 4.25) wurden die Ansätze bei 37 °C inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen Proben von 50 µl entnommen. Die Rührerversuche fanden bei 37 °C und 200 rpm in *n*-Heptan als Lösemittel statt. Dabei wurde das Rührwerk für den kontinuierlichen Versuch direkt eingesponnen und die Reaktion in einem Glasreaktor mit 400 mL Reaktionslösung durchgeführt. Die Rührversuche mit wechselnd eingesetzten Reaktionslösungen wurden in Bechergläsern durchgeführt, die mit Parafilm verschlossen wurden. Hier wurden die Polymerfasern auf Alufolie versponnen und diese um den Rührer gewickelt. In allen Fällen wurde darauf geachtet, dass der Rührer stets vollständig mit Reaktionslösung bedeckt war. Die Probenahme (50 µL) erfolgte in regelmäßigen Zeitabständen sowohl von den gerührten als auch den ruhenden Reaktionslösungen.

Die gaschromatographische Untersuchung startet bei 100 °C (1 Minute halten), danach folgte eine Temperaturerhöhung um 20 °C pro Minute bis zu einer maximalen Temperatur von 250 °C. Diese Temperatur wurde für weitere zwei Minuten gehalten.

Die Retentionszeiten und Kalibrierfaktoren sind in Tab. 4.26 aufgelistet.

**Tabelle 4.26: Retentionszeiten und Kalibrierfaktoren der einzelnen Substanzen für die Auswertung der GC-Spektren für die Aktivitätsbestimmung von Lipasen in organischen Medien.**

Substanz	Retentionszeit [min]	Kalibrierfaktor
1-Octanol	3,5	--
Laurinsäure	5,5	--
<i>n</i> -Tetradecan	5,2	--
Laurinsäureoctylester	9,15	0,92285

#### 4.7.2. Peptidase

Die Aktivität von CT und Papain in *n*-Heptan wurde anhand der Umesterung von *N*-Acetyl-L-phenylalanin-ethylester (APEE) zu *N*-Acetyl-L-phenylalanin-propylester (APPE) bestimmt (140).

Es wurde jeweils 1 mL Heptan sowie APEE-Lösung (60 mM) zu der freien oder immobilisierten Enzymprobe gegeben.

- APEE Lösung: 144 mg APEE mit 1,5 mL 1-Propanol lösen, 8,5 mL Heptan sowie 5,2 µL Tetradecan hinzufügen und ebenfalls lösen.



Die Reaktion fand bei 37 °C statt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben (50 µL) entnommen und gaschromatographisch untersucht.

Um zu verhindern, dass eventuell bei der Probenahme mit aufgezugene Enzyme nach der Probenahme weiterreagieren, wurden einige Proben mit 1,5 µL β-Mercaptoethanol versetzt. Die Temperatur der gaschromatographischen Untersuchung wurde zu Beginn für zwei Minuten bei 50 °C gehalten, danach folgte eine Temperaturerhöhung um 20 °C pro Minute bis zu einer Temperatur von 150 °C und ohne Halten weiter mit 10 °C pro Minute bis auf 200 °C. Eine weitere Erhöhung um 20 °C pro Minute bis auf 280 °C folgte.

Die Retentionszeiten waren wie folgt (Tab. 4.27).

**Tabelle 4.27: Retentionszeiten und Kalibrierfaktoren der einzelnen Substanzen für die Auswertung der GC-Spektren für die Aktivitätsbestimmung von Proteasen in organischen Medien. <sup>a</sup> nach Konieczny (129).**

Substanz	Retentionszeit [min]	Kalibrierfaktor
APEE	11,9	0,5236 <sup>a</sup>
APPE	12,6	0,5236 <sup>a</sup>
<i>n</i> -Tetradecan	8,8	--

#### 4.7.3. Peroxidase

Die Aktivität der Horseradish Peroxidase (HRP) wurde anhand der Umsetzung von Phenol und *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin (DPD) getestet (141).

Die benötigten Lösungen waren:

- DPD-Lösung: 5,4 mg DPD in 2 mL Heptan lösen
- Phenollösung: 3,8 mg Phenol in 2 mL Heptan lösen
- *tert*-Butylhydroperoxidlösung: 1,82 µL *tert*-Butylhydroxyperoxid in 2 mL Heptan lösen

Die Enzymproben wurden jeweils mit 900 µL Heptan versetzt. Anschließend wurden jeweils 100 µL der Lösungen in der aufgelisteten Reihenfolge hinzugegeben. Für die Blindproben wurden je 100 µL Lösung zu 900 µL Heptan gegeben. Die Bestimmung der Aktivitäten erfolgte photometrisch bei 546 nm und 25 °C unter Rühren über einen Zeitraum von 50 Minuten.

Die Berechnung der Aktivitäten erfolgte nach Gl. 4.9:



$$\frac{U}{mg} = \frac{\frac{\Delta E_{546nm, Probe}}{min} - \frac{\Delta E_{546nm, Blind}}{min}}{0,001 \cdot m_{HRP}}$$

**Gleichung 4.9: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Peroxidasen in organischen Medien.**

Mit:

$\Delta E_{546nm}$  = Zunahme der Extinktion bei 546 nm

$m_{Enzym}$  = Masse des eingesetzten Enzyms

U = Unit = Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen eine Differenz der Extinktion von 0,001 zur Folge hat.

#### 4.7.4. Laccase

Die Aktivität der Laccase wurde anhand der Oxidation von 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) bestimmt, bei der ein farbiges Produkt entsteht (136).

Zu Beginn wurde die benötigte DMP-Lösung angesetzt.

- DMP-Lösung: 40,08 mg DMP in 10 mL Xylol lösen

Zunächst wurden die jeweiligen Enzymproben mit 1 mL DMP-Lösung und 1 mL Xylol versetzt. Die Messung fand statt bei 468 nm und 37 °C gegen reines Xylol über einen Zeitraum von 60 Minuten für das native Enzym und 5 Minuten für Netzwerke und Nanofasern. Alle Proben wurden während der Messung mit reinem Sauerstoff begast. Die Blindproben bestanden aus 1 mL DMP-Lösung und 1 mL Xylol.

Zur Berechnung der Aktivitäten diene Gl. 4.10:

$$Z_{nat/NW/NF} \left[ \frac{U}{mg} \right] = \frac{\frac{\Delta E_{468nm, nat/NW/NF}}{min} - \frac{\Delta E_{468nm, Blind}}{min}}{0,001 \cdot m_{Laccase}}$$

**Gleichung 4.10: Berechnung der enzymatischen Aktivität von Laccase in organischen Medien.**

Mit:

$\Delta E_{468nm}$  = Änderung der Extinktion bei 468 nm

$m_{Enzym}$  = Masse des eingesetzten Enzyms

U = Unit = Enzymmenge, die unter den angegebenen Bedingungen eine Differenz der Extinktion von 0,001 zur Folge hat.



#### 4.7.5. Alkoholdehydrogenase

Die Aktivität der Alkoholdehydrogenase (ADH) wurde über die Oxidation von 2-Octanol zu 2-Octanon bestimmt. Die Grundlage des Assays beruht auf Arbeiten von Yang und Russell (142). Dafür wurde das native Enzym mit 0,1 Gew% NAD versetzt. Zu jedem Ansatz wurde 1 mL Heptan, 1,98  $\mu\text{L}$  Aceton, 20  $\mu\text{L}$  2-Octanol und 0,26  $\mu\text{L}$  Tetradecan (TD) gegeben. Der Assay erfolgte bei 26 °C unter Rühren über 36 Stunden bei regelmäßiger Probenahme (50  $\mu\text{L}$ ).

Das Temperaturprogramm der gaschromatographischen Untersuchung sah wie folgt aus. Zunächst wurde die Temperatur für eine Minute auf 50 °C gehalten und dann mit 2,5 °C pro Minute bis auf 65 °C erhöht. Nach einer zweiten Temperaturerhöhung von 30 °C pro Minute bis auf 250 °C und Halten für eine Minute war das Programm beendet.

Die Retentionszeiten waren wie folgt (Tab. 4.28).

**Tabelle 4.28: Retentionszeiten und Kalibrierfaktoren der einzelnen Substanzen für die Auswertung der GC-Spektren für die Aktivitätsbestimmung der ADH in organischen Medien.**  
<sup>a</sup> nach Konieczny (129).

Substanz	Retentionszeit [min]	Kalibrierfaktor
2-Oktanon	8,6	0,3155 <sup>a</sup>
2-Octanol	8,1	0,2975 <sup>a</sup>
<i>n</i> -Tetradecan	11,7	--

#### 4.8. Berechnung des Thiele-Moduls

Der Thiele Modul wurde für die PHEA-*l*-PEtOx-APCNs und -Partikel nach Dalvie und Baltus (Dalvie und Baltus 1992) unter der Annahme einer konstant hohen Substratkonzentration nach Gl. 4.11 berechnet.

$$\phi = 0,5 \cdot d \cdot \sqrt{\frac{k_{cat} \cdot [E]}{S_0 \cdot D_{eff}}}$$

#### Gleichung 4.11: Berechnung des Thiele-Moduls.

Mit

$\phi$  = Thiele Modul

$d$  = Dicke [ $\mu\text{m}$ ]

$k_{cat}$  = maximale gemessene Reaktionsgeschwindigkeit [ $\frac{1}{\text{s}}$ ]

$[E]$  = Enzymkonzentration [ $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ]

$S_0$  = Substratkonzentration der Bulkphase [ $\frac{\text{mol}}{\text{L}}$ ]



$D_{\text{eff}}$  = Diffusionskoeffizient  $[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}]$

Für die Diffusionskoeffizienten  $D_{\text{eff}}$  wurden folgende Werte eingesetzt:

Chloroform und 1-Oktanol:  $D_{\text{eff}} = 100 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$

*n*-Heptan:  $D_{\text{eff}} = 0,6 \frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$

## 4.9. Elektrophorese

### 4.9.1. Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die denaturierende SDS-PAGE wurde nach Laemmli durchgeführt (143). Dafür wurde das MiniTwin-System von Analytik Jena mit einer Gelstärke von 1 mm eingesetzt.

Folgende Lösungen wurden benötigt:

#### Laufpuffer, 10x

Tris-Base	30,2 g	Lagerung bei 4 °C.
Glycin	144,2 g	Vor Gebrauch 1:10 v/v Verdünnung mit ddH <sub>2</sub> O.
SDS	1,0 g	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	

#### Lower Tris, 4x

Tris-Base	181,7 g	Lagerung bei 4 °C.
SDS	0,4 g	Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 8,8.
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	

#### Upper Tris, 4x

Tris-Base	60,55 g	Lagerung bei 4 °C.
SDS	0,4 g	Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf 6,8.
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 mL	

#### Probenauftragspuffer (PAP)

1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,0 ml	Aliquotierung und Lagerung bei -20 °C.
20 %ige SDS-Lösung	2,0 ml	
Bromphenolblau	20,0 mg	
87 %ige Glycerinlösung	2,3 ml	
ddH <sub>2</sub> O	ad 8 mL	



Ammoniumpersulfat-Lösung (APS)

APS 4,0 g Aliquotierung und Lagerung bei -20 °C.  
ddH<sub>2</sub>O ad 10 mL

Die Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel ist in Tab. 4.29 aufgeführt.

Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von 1 cm unter dem Kamm aufgefüllt und mit Isopropanol (IPA) bedeckt, um eine gerade Gelkante zu gewährleisten und ein Austrocknen des Gels zu verhindern. Nach beendeter Polymerisation (30 min) wurde das IPA sorgfältig mit ddH<sub>2</sub>O ausgespült und das Restwasser entfernt.

Das Sammelgel wurde auf das Trenngel gegossen und für 20 Minuten polymerisiert.

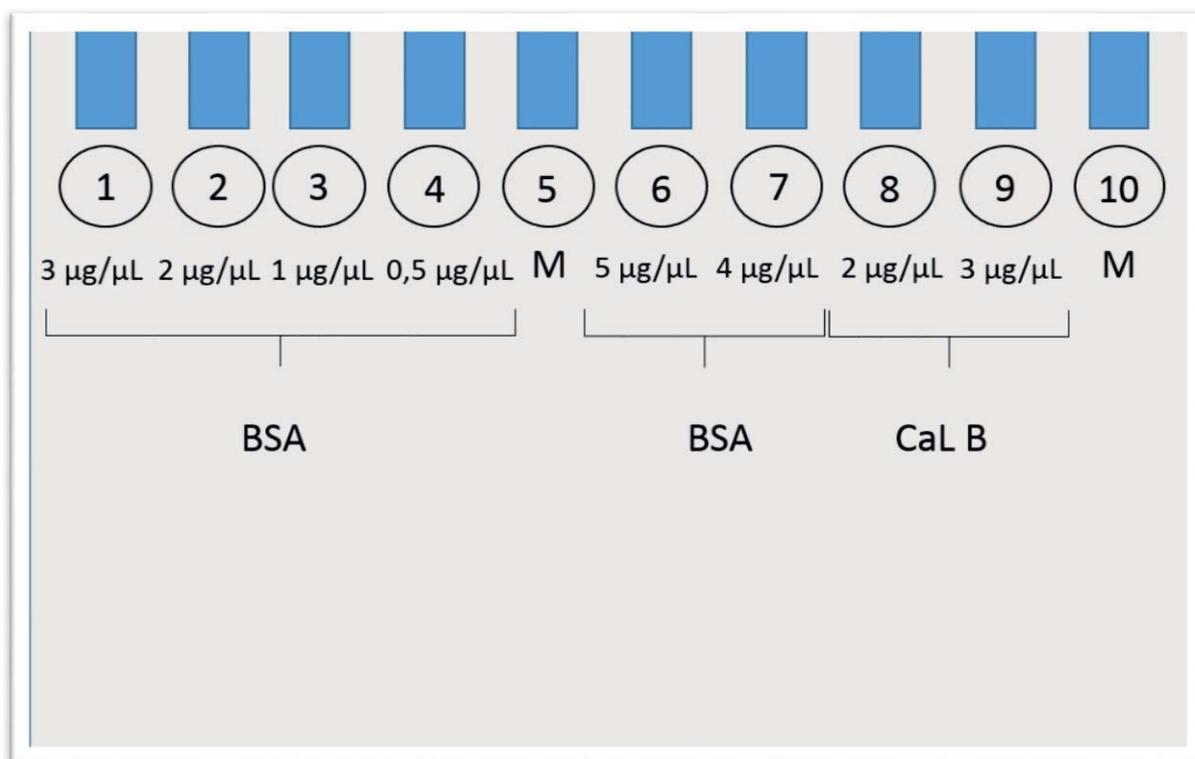
**Tabelle 4.29: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für die SDS-PAGE; Angaben für zwei Gele, <sup>a</sup> Prozentsatz bezogen auf Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1; Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40)-Anteil.**

Komponente	Sammelgel 4 % <sup>a</sup>	Trenngel 12 % <sup>a</sup>
Lower Tris, 4x	--	3 mL
Upper Tris, 4x	0,75 mL	--
ddH <sub>2</sub> O	1,8 mL	5,4 mL
Acrylamid/Bisacrylamid 40	0,45 mL	3,6 mL
%		
TEMED	6 µL	15 µL
APS	15 µL	30 µL

Die Proben wurden jeweils 1:1 v/v mit Probenauftragspuffer (PAP) vermischt und für 10 Minuten auf 96 °C erhitzt.

Dabei wurde die Probenmenge so angepasst, dass pro erwarteter Bande 5 µg Protein in einem maximalen Gesamtvolumen (Probe + Auftragspuffer) von 30 µL aufgetragen wurden.

Nach dem Erhitzen wurden die Proben für 10 Minuten auf Eis gekühlt und Dithiothreitol (DTT) (2 µL pro 10 µL Probe ohne PAP) zugegeben. Anschließend wurden die Proben auf die Gelkammern verteilt (Abb. 4.2). Als Proteinmarker diente Roti<sup>®</sup>-Mark Standard 10-150, hier wurden in zwei Kammern jeweils 6,5 µL gegeben.



**Abbildung 4.2: Probenverteilung auf die Gelkammern (1-10) der SDS-PAGE, M = Marker.**

Für den Lauf der Proben durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 60 V angelegt, die auf 180 V erhöht wurde sobald die Proben das Trenngel erreichten. Mit Austreten der Bromphenolblaubande aus dem Gel wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel in Coomassie Färbelösung eingelegt.

#### 4.9.2. Coomassie-Färbung

Das Gel wurde über Nacht in der Coomassie-Färbelösung (Tab. 4.30) fixiert und gefärbt. Anschließend wurde der Hintergrund mit Entfärbelösung (Tab. 4.30) entfärbt. Das Gel wurde bis zur Entsorgung in ddH<sub>2</sub>O gelagert (144).

**Tabelle 4.30: Zusammensetzung der Lösungen für die Coomassie-Färbung.**

Komponente	Färbelösung	Entfärbelösung
Ethanol [%]	40	25
Konz. Essigsäure [%]	10	8
Coomassie Brillant Blau R	290	--
250 $\left[\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right]$		

Die Auswertung der SDS-PAGE erfolgte mit der Software Scion Image – Release Beta 4.0.2.



## 5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Konzept von amphiphilen Polymerconetzwerken (APCNs) für die Immobilisierung wurde bereits erfolgreich getestet (vgl. Kap. 2.2). Zudem konnte ein aktivierender Einfluss von Polyoxazolinen (POX), zumindest PEtOx, auf Enzyme nachgewiesen werden (33). Auch die Kombination, APCNs mit PEtOx als vernetzende Komponente, zeigte hervorragende Ergebnisse für die Aktivität von einer Lipase in organischen Lösemitteln. Diese Arbeit folgt der Kombination von aktivierenden Polyoxazolinkomponenten in selektiv quellbaren Strukturen. Der Fokus liegt dabei zunächst auf der Untersuchung der Aktivität in Abhängigkeit der Quelleigenschaften (vgl. Kap. 5.2). Weiterführend wird versucht, die Aktivität der Enzyme weiter zu erhöhen, indem unterschiedliche polymerbasierte Strukturen als Enzymträger eingesetzt werden (vgl. Kap. 5.3 & 5.4). Dafür wird als erstes auf die Basis, nämlich die Polymersynthese eingegangen.

### 5.1. Poly(2-Oxazoline)

Dieses Kapitel befasst sich mit der Synthese von Poly(2-Oxazolinen) aus ihren jeweiligen Monomeren. Dabei sollen unterschiedliche Polymerstrukturen entstehen, die alle eine definierte Struktur aufweisen und, je nach Verwendungszweck, einer gezielten Endgruppenfunktionalisierung unterzogen werden.

#### 5.1.1. Synthese

Die für diese Arbeit synthetisierten Polymere sind idealerweise nach dem Mechanismus einer bimolekularen nukleophilen Substitution ( $S_N2$ -Reaktion) (Abb. 5.1) entstanden. Alle Polymere wurden mit dem bifunktionalen Initiator *para*-Dibromxylol (pDBrX) gestartet. Die Polymere, bei denen eine gezielte Terminierung durchgeführt werden sollte, wurden mit *N*-[3-(Dimethyl)aminopropyl]methacrylamid (DMAPMA) versetzt. Bei einer nicht gezielten Terminierung wurde das lebende Polymer nach beendeter Polymerisation in Diethylether gefällt, was höchstwahrscheinlich zu einer Terminierung mit dem darin enthaltenen Wasser führt.

Bei der Initiation erfolgt der Angriff des elektrophilen  $\alpha$ -Methylenkohlenstoffs des Initiators durch das freie Elektronenpaar des Oxazolin-Stickstoffatoms (145). Eine kovalente Bindung entsteht und das Bromid-Ion ( $Br^-$ ) wird als Gegenion freigesetzt. Nachdem alle Monomere aufgebraucht sind, ist es möglich durch erneute Zugabe einen weiteren Polymerblock



anzulagern. Das Kettenwachstum wird fortgesetzt bis entweder alle Monomere aufgebraucht sind oder ein Terminierungsmittel eingesetzt wird.

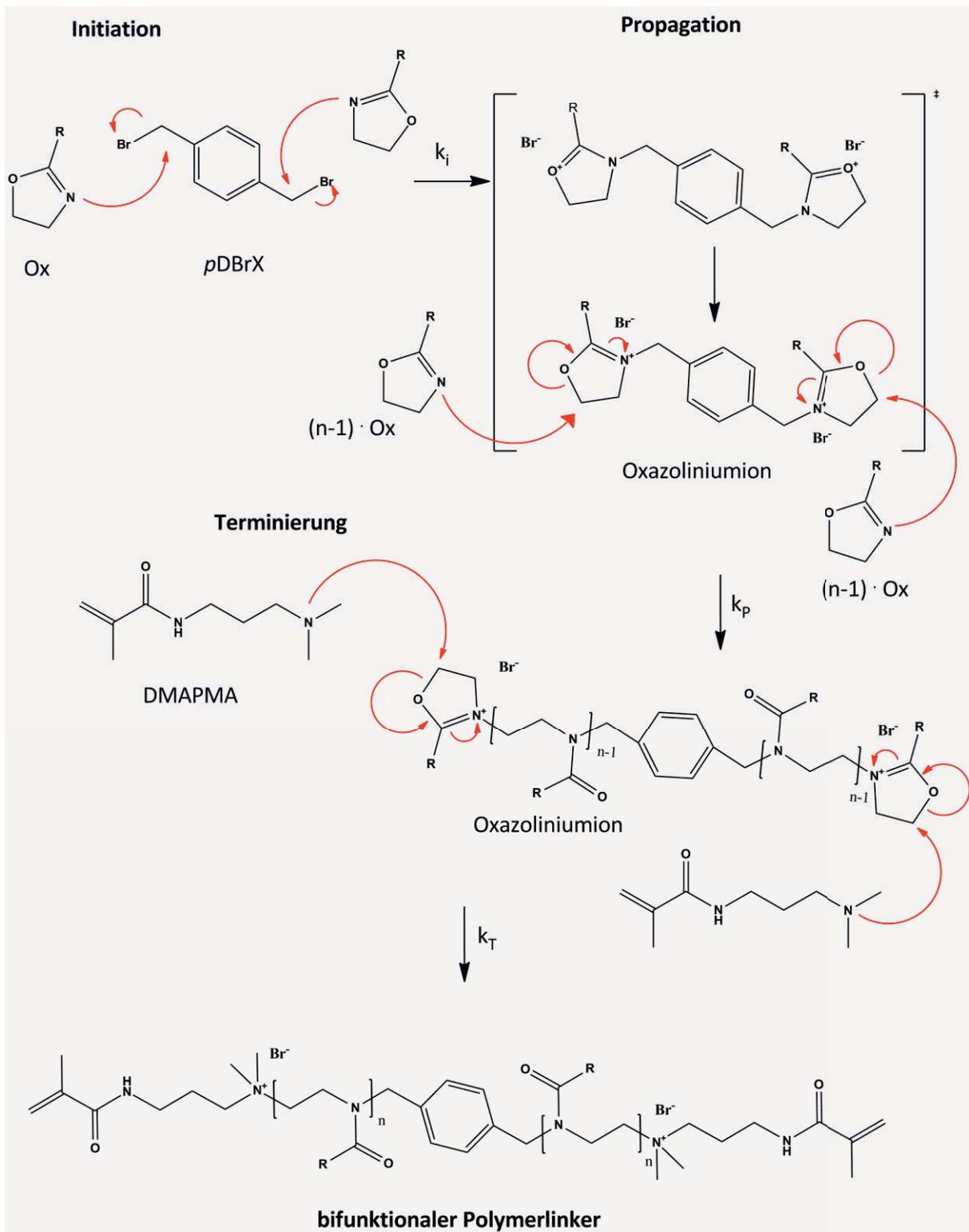
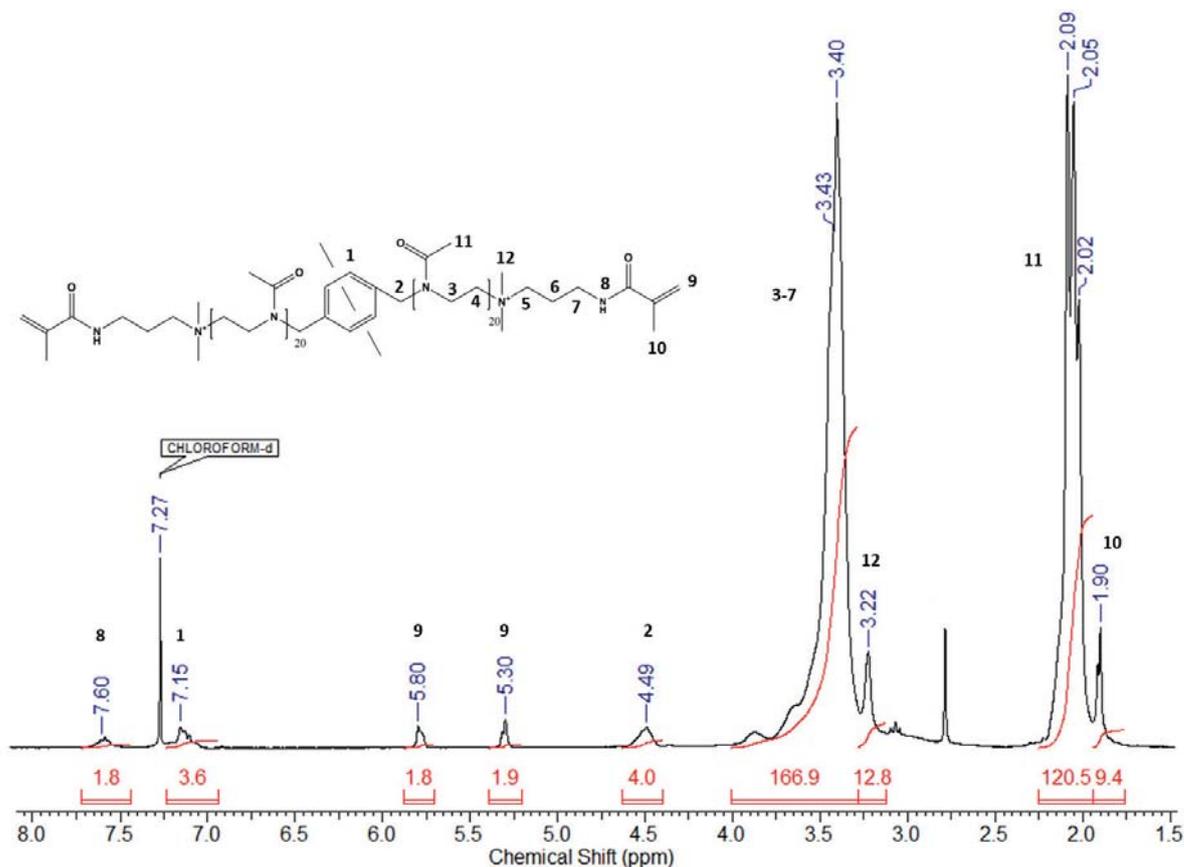


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der lebenden kationischen ringöffnenden Polymerisation eines 2-R-2-Oxazolins (Ox) mit dem bifunktionalen Initiator *para*-Dibromxylole (*p*DBrX) und der Terminierung mit *N*-[3-(Dimethyl)aminopropyl]methacrylamid (DMAPMA).

### 5.1.2. Polymercharakterisierung

Alle Polymere wurden ausgehend von dem bifunktionellen Initiator pDBrX synthetisiert. Die Polymere, die später als Linker eingesetzt werden sollten, wurden mit großem molarem Überschuss an DMAPMA unter Lichtausschluss terminiert, so dass telechele, methacrylat-terminierte Polymere erhalten wurden. Polymere, die als Zugabe zu den Spinnlösungen synthetisiert wurden und keine vernetzende Funktion erfüllen sollten, wurden ohne gezielte Terminierung eingesetzt. Alle Polymere wurden durch Fällung in Diethylether (Et<sub>2</sub>O) aufgereinigt.

In Abb. 5.2 ist beispielhaft der relevante Bereich des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums für ein DMAPMA-terminiertes Poly(2-Methyloxazolin) (PMOx) mit einem DP<sub>set</sub> von 40 gezeigt.



**Abbildung 5.2:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum eines bifunktionellen, methacrylat-funktionalisierten Poly(2-Methyloxazolin) (DP<sub>set</sub> = 40).

Das Integral des Signals der α-Methylengruppen bei 4,49 ppm wurde als Referenz für die <sup>1</sup>H-NMR-Auswertung gesetzt. Das Signal bei 7,60 ppm wird von den Protonen der stickstoffbündigen Wasserstoffatome erzeugt und zeigt 1,8 Protonen. Heteroatome können Protonen mit den deuterierten Lösemitteln austauschen, so dass diese Integrale oft nicht



korrekt auswertbar sind. Das Signal der benzylichen Protonen bei 7,15 ppm wird durch das Lösemittelsignal des deuterierten Chloroforms leicht überlagert und ist ebenfalls nicht korrekt auswertbar. Das Signal bei 3,75-3,25 ppm wird durch die Rückgratprotonen des Polymers erzeugt und zeigt 166,9 Protonen auf. Hier sind ebenfalls die Signale der Kohlenstoffkette des Terminierungsmittels angesiedelt, welche aber aufgrund der geringen Anzahl und damit Signalintensität nicht weiter beachtet werden. Das Signal der Methylenseitengruppen liegt bei 2,25-2,0 ppm und weist 120,5 Protonen auf.

Daraus lässt sich der gemittelte Polymerisationsgrad nach Gl. 5.1 auf  $DP_{NMR} = 40$  bestimmen, was dem  $DP_{set}$  entspricht.

$$DP_{NMR} = \frac{1}{2} \cdot \left( \frac{\sum \text{Polymerrückgratprotonen}}{4} + \frac{\sum \text{Polymerseitengruppenprotonen}}{3} \right)$$

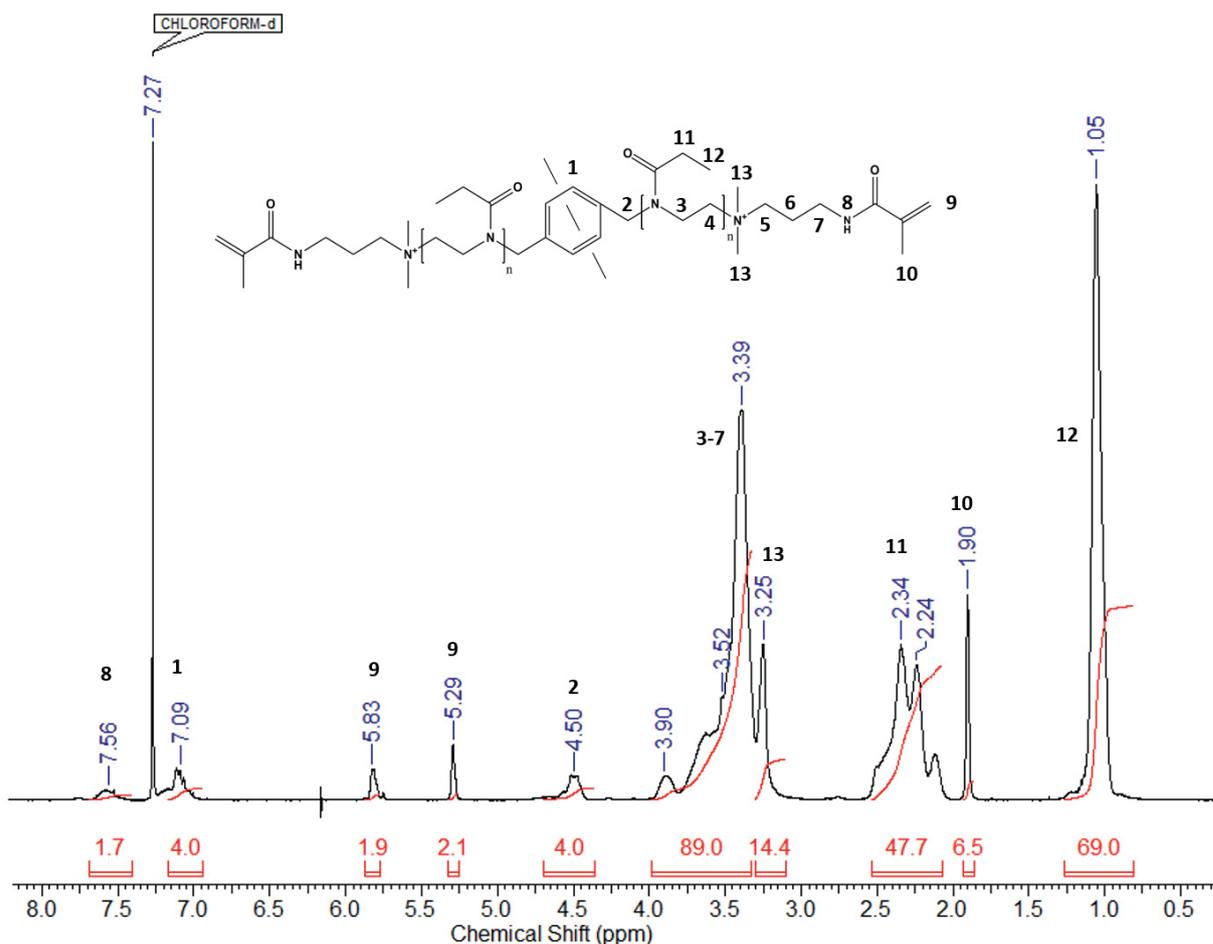
**Gleichung 5.1: Berechnung des mittleren Polymerisationsgrades anhand eines  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums (35).**

Die GPC - Messung ergab eine Molmasse von  $M_{GPC} = 3400 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  bei einem PDI von 1,142.

Die Signale der Protonen der Doppelbindung des Terminierungsmittels werden bei 5,8 und 5,3 ppm erzeugt und zeigen 1,8 bzw. 1,9 Protonen an. Damit liegt die Funktionalisierung bei 92,5 %.

Die restlichen Signale bei 3,22 ppm (Position 12) und 1,90 ppm (Position 10) können eindeutig dem Terminierungsmittel zugeordnet werden, sind aber durch die teilweise Überlagerung mit den Signalen der Polymerprotonen nicht korrekt auswertbar.

Die Auswertung der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der PEtOx-Homopolymere erfolgt analog. Abb. 5.3 zeigt beispielhaft das  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum eines mit DMAPMA bifunktionalisierten Poly(2-Ethylloxazolins) mit einem  $DP_{set}$  von 20.



**Abbildung 5.3:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum eines bifunktionellen, methacrylat-funktionalisierten Poly(2-Ethyloxazolin) ( $\text{DP}_{\text{set}} = 20$ ).

Auch hier wurde das Integral des Signals der  $\alpha$ -Methylengruppen bei 4,50 ppm als Referenz für die Auswertung gesetzt. Die Signale können dem Polymer eindeutig zugeordnet werden, so dass im Folgenden nur auf die für die Charakterisierung des Linkers relevanten Signale eingegangen wird.

Die Signale bei 3,8-3,3 ppm werden von den Rückgratprotonen des Polymers hervorgerufen und zeigen 92,1 Protonen an. Die Signale bei 2,5-2,2 ppm werden durch die  $\text{CH}_2$ -Gruppe der Seitenketten des Polymers erzeugt und die Signale bei 1,23-0,8 ppm von deren Methylengruppen.

Daraus ergibt sich nach Modifizierung der Gl. 5.2 für Poly(2-Ethyloxazoline) ein  $\text{DP}_{\text{NMR}}$  von 23. Die Molmasse berechnet sich damit zu  $M_{\text{NMR}} = 2800 \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$ . Die GPC – Messungen ergeben ebenfalls eine Molmasse von  $M_{\text{GPC}} = 2800 \left[ \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$  und einen PDI von 1,189.

Die Signale der Doppelbindungen des Terminierungsmittels (5,29 und 5,83 ppm) lassen auf eine vollständige Terminierung schließen.



Eine exemplarische Charakterisierung der synthetisierten Poly(2-Oxazoline) ist in Tab. 5.1 zusammengefasst.

**Tabelle 5.1: Molmassen, PDIs und Terminierungsgrade (TG) der synthetisierten Poly(2-Ethylloxazoline).** <sup>a</sup> n.t. = nicht terminiert

DP <sub>set</sub>	M <sub>set</sub> [ $\frac{g}{mol}$ ]	M <sub>NMR</sub> [ $\frac{g}{mol}$ ]	M <sub>GPC</sub> [ $\frac{g}{mol}$ ]	PDI	TG [%]
20	2.600	2.800	2.800	1,189	100
50	5.600	5.900	6.300	1,171	95
100	10.200	10.900	11.500	1,212	n.t. <sup>a</sup>
120	12.150	12.600	12.100	1,229	n.t.
120	12.500	14.700	14.200	1,195	85
240	24.050	22.500	22.500	1,220	n.t.
240	24.400	24.300	26.000	1,193	72

Die durch <sup>1</sup>H-NMR- und GPC- Messungen erhaltenen Daten für die Molmasse stimmen mit Abweichungen unter 13 % gut mit den angesetzten Molmassen überein. Dabei wurden die angesetzten Molmassen jeweils aus den Molmassen der Monomere sowie des Initiators und, für die funktionalisierten Polymere, zusätzlich der Molmassen des Terminierungsmittels berechnet. Die PDIs der Polymere mit einem DP<sub>set</sub> liegen bis auf ein Polymer über 1,2, so dass hier streng genommen nicht mehr von einer reinen lebenden Polymerisation ausgegangen werden kann. Anscheinend traten hier Übertragungsreaktionen auf. Dies ist bei der Länge der Polymere und der geringen Überschreitung annehmbar. Die schlechtere Terminierungsrate von 72 % des PEtOx mit einem DP<sub>set</sub> von 240 im Vergleich mit kürzerkettigen Polymeren ist erklärbar, da bei diesen Kettenlängen wahrscheinlich verstärkt Knäuelbildung auftritt, so dass das Polymerende eventuell nicht für das Terminierungsmittel zugänglich war.

Alle Polymere sind im Rahmen dieser Arbeit einsetzbar.

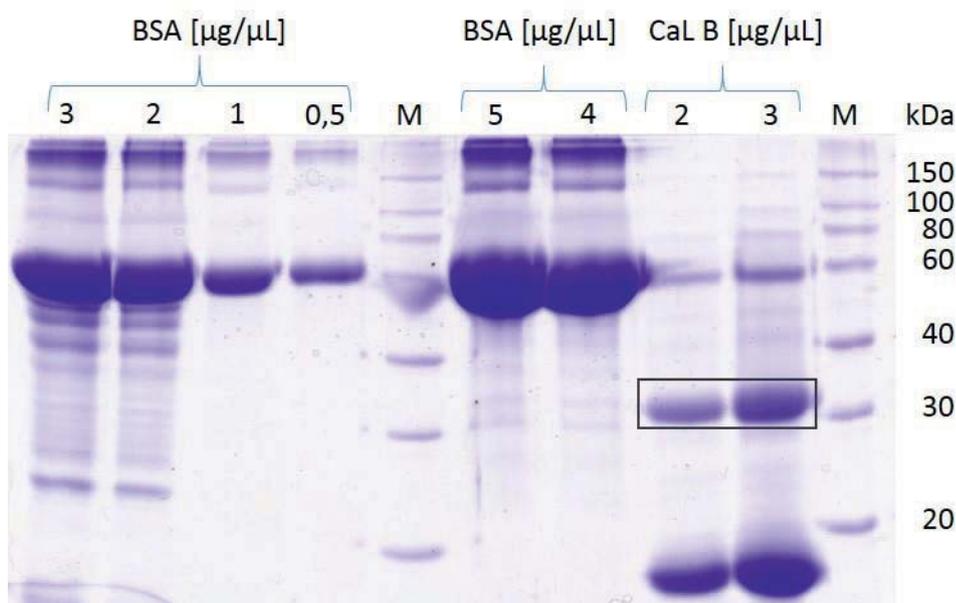
## 5.2. Ermittlung des Enzymgehaltes der aufgereinigten CaL B

Die käuflich erwerbbar Lipase aus *Candida antarctica* (CaL B) der Firma Novozymes ist typischerweise wie folgt zusammengesetzt (146):

Enzym (Feststoff, TOS)	4 %
Glycerin	25 %
Sorbitol	25 %
Wasser	46 %
Natriumbenzoat	0,2 %
Kaliumsorbat	0,1 %

Dabei steht TOS für Total Organic Solids, definiert als 100 % abzüglich Wasser, Asche und Verdünnungsmittel.

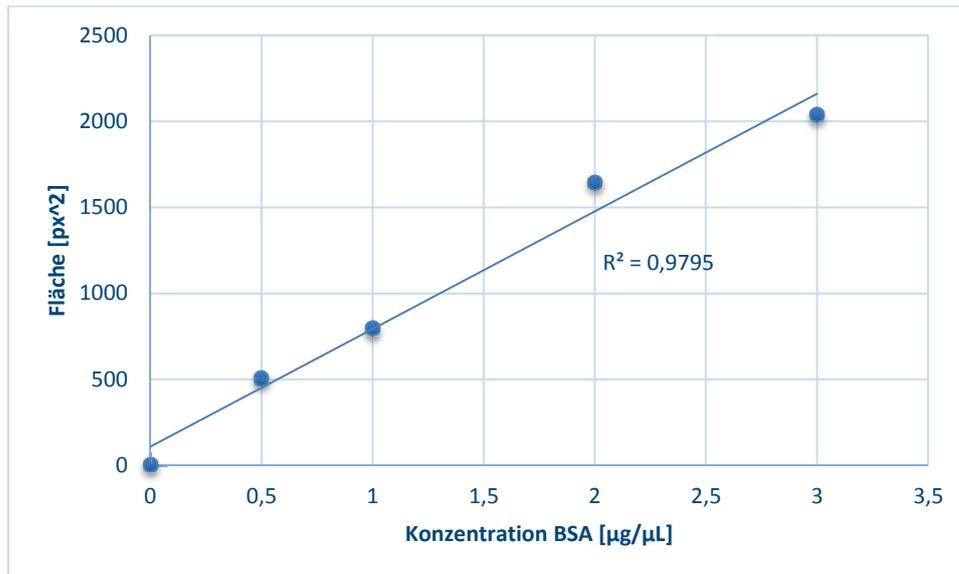
Da der geringe Enzymanteil und insbesondere der hohe Flüssiganteil für viele Anwendungen hinderlich sind, wurde das Präparat durch Dialyse aufgereinigt und anschließend gefriergetrocknet. Das erhaltene Enzympulver wurde mittels SDS-PAGE auf den resultierenden CaL B-Gehalt untersucht (Abb. 5.4).



**Abbildung 5.4: SDS PAGE zur Auswertung des CaL B-Gehaltes der aufgereinigten Enzymprobe; M = Marker. Die Markierung zeigt die wahrscheinlich durch CaL B verursachten Banden an. 12 %-iges Gel, Coomassiefärbung.**

Die SDS-PAGE zeigt für die aufgereinigte CaL B mehrere Banden an, was eine Verunreinigung mit Proteinen bedeutet. Das Molekulargewicht der CaL B beträgt 33 kDa (147), daher zeigen die in Abb. 5.4 markierten Banden wahrscheinlich CaL B an. Die stärksten Banden werden durch Proteine mit einem Molekulargewicht unter 20 kDa verursacht.

Da die Banden mit einer BSA-Konzentration von 4 und 5  $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}}$  teilweise ineinander laufen (Abb. 5.4), wurden sie für die Kalibrierung (Abb. 5.5) nicht verwendet. Für den Nullwert der Kalibrierkurve wurde eine Fläche der SDS-PAGE ausgewählt, die keine Färbung aufweist.



**Abbildung 5.5:** Kalibrierkurve für die Bestimmung des CaL B-Gehaltes nach der Aufreinigung.

Anhand der Kalibrierung wurde der CaL B-Gehalt der Probe auf  $7,3 \pm 1,2$  % bestimmt.

### 5.3. PBuAc-*l*-PMOx und PEhAc-*l*-PMOx APCNs

An der Synthese dieser APCNs waren Kathrin Kremser (Bachelorarbeit), Meike Roth (Forschungspraktikum), Stefanie Kühne (Wahlpflichtpraktikum), Susan Stuhr (Wahlpflichtpraktikum) und Sabine Ring (Vertiefungspraktikum) beteiligt.

Der Einsatz von APCNs als Träger von Biokatalysatoren hat großes Potential. Die Vorstellung ist, dass die Enzyme in der hydrophilen Phase eingeschlossen sind, also in ihrer bevorzugten (wasserliebenden), Umgebung befinden. Das Substrat soll durch die gequollene hydrophobe Phase zu den internen Phasengrenzen diffundieren und wird dort katalytisch umgesetzt. Das Produkt diffundiert ebenfalls durch die hydrophobe Phase nach außen (Abb. 2.5). Durch die nanophasenseparierte Netzwerkstruktur ist die interne Phasengrenze und damit die Reaktionsmöglichkeit um ein Vielfaches erhöht. Dieses Konzept wurde von Bruns mit Polydimethylsiloxan (PDMS)-basierten APCNs aufgestellt (32). Als hydrophile Komponente wurde 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) eingesetzt, welches vorher durch Schutzgruppen hydrophobiert wurde. So konnten sich die eigentlich unverträglichen Monomere und Makromere gut vermischen, aufgrund der Entschützungsbedingungen mussten die Netzwerke jedoch über mehrere Tage in einer Methanol/Wasser Lösung gewaschen werden, um die Schutzgruppen zu entfernen und den amphiphilen Charakter des Netzwerks zu erreichen. Dadurch konnten die Enzyme erst nachträglich durch Absorption in die Netzwerke eingebracht werden, was eine Steuerung der Beladung nicht zulässt.



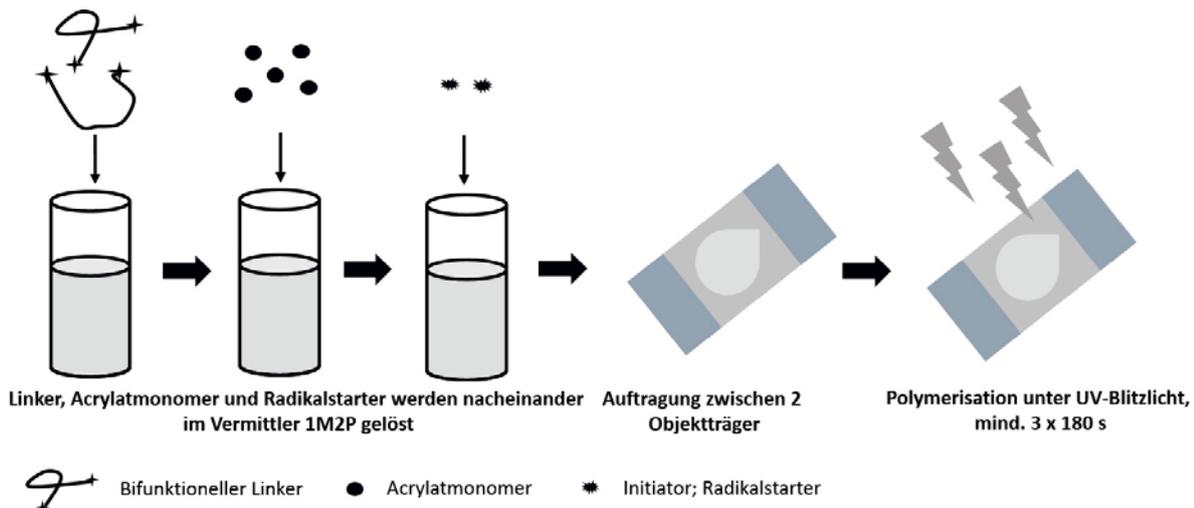
Mit der Entwicklung von amphiphilen Netzwerken auf PEtOx-Basis mit HEA als hydrophiler Komponente konnte eine Netzwerksynthese im Wässrigen, d.h. ohne aufwändige Schutzgruppen erreicht werden. Hier konnte das Enzym direkt eingewogen werden, was eine Beladung der hydrophilen Phase im gesamten Netzwerk bedeutet. Durch die Auswahl zweier wasserlöslicher Komponenten büßten die Netzwerke die Fähigkeit ein, in stark wasserabweisenden organischen Lösungsmitteln wie z.B. Heptan zu quellen. Interessanterweise war die Enzymaktivität üblicherweise in Heptan in allen Netzwerken am höchsten, und zwar unabhängig von der Quellung (33, 32). Im Folgenden soll daher die Bedeutung der Quellung von APCNs für die Enzymaktivität untersucht werden. Dafür wurden neuartige APCNs auf Basis von Poly(2-methyloxazolin) (PMOx) als hydrophiler Komponente synthetisiert. Mit der Wahl von Butylacrylat (BuAc) bzw. 2-Ethylhexylacrylat (EhAc) als hydrophobem Monomer soll ein unterschiedliches Quellverhalten erreicht werden.

### 5.3.1. Synthese und Charakterisierung

Um später die direkte Einwaage des Enzyms zu gewährleisten wurde eine Syntheseroute gewählt, die auf dem Einsatz einer vermittelnden Komponente beruht, in dem alle Netzwerkkomponenten löslich sind (148, 149).

Dabei wurde zunächst bei den Netzwerken mit BuAc versucht, HEA als vermittelnde und gleichzeitig copolymerisierende Komponente einzusetzen. Das hätte den Vorteil, dass das entstandene APCN nicht von vornherein in einem gequollenen Zustand vorliegt, wie es bei einem nicht copolymerisierenden Vermittler der Fall ist. Hier wurden jedoch schon bei der Zugabe geringer Mengen an BuAc im Rasterkraftmikroskop (AFM) Entmischungen erhalten. Entmischungen bedeuten eine Verringerung der internen Phasengrenzfläche und können die Interkonnektivität zerstören (vgl. Kap. 2), was eine Beeinträchtigung der enzymatischen Katalyse zur Folge hätte, so dass dieser Syntheseweg eingestellt wurde.

Weitere Versuche wurden mit 1-Methoxy-2-Propanol oder Ethanol als vermittelnde, aber nicht an der Polymerisation beteiligte Komponente durchgeführt. Das allgemeine Syntheschema zeigt Abb. 5.6.

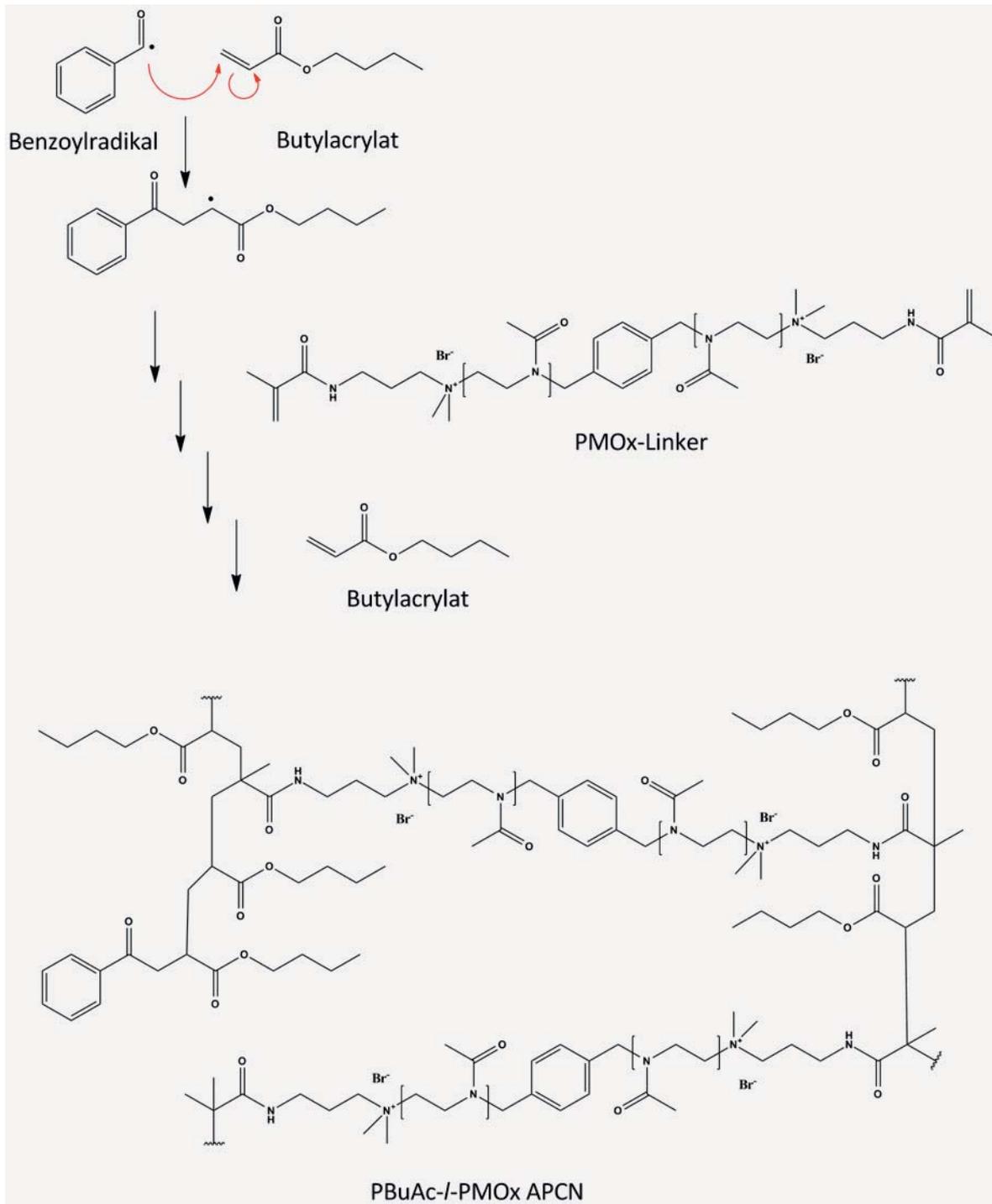


**Abbildung 5.6: Allgemeine Syntheseroute für PBUAc-*I*-PMOx- und PEhAc-*I*-PMOx APCNs. Zunächst wurde PMOx im Vermittler 1M2P gelöst. Nach der Acrylatzugabe und vollständigen Vermischung wurde der Initiator zugegeben und die Lösung zwischen zwei Objektträgern durch UV-Bestrahlung polymerisiert.**

Hier stellte sich 1-Methoxy-2-Propanol gegenüber Ethanol als geeigneter heraus, da die resultierenden Netzwerke weniger klebrig und instabil gegen mechanische Beanspruchung und daher leichter zu handhaben waren. Dabei wurde zunächst PMOx oder, im Falle der enzymbeladenen Netzwerke, PMOx und CaL B in 1M2P gelöst. Das Lösen des Enzyms war nur in Gegenwart des Polyoxazolins möglich, hier musste auf eine sehr gute mechanische Vorvermischung (z.B. durch Schütteln) geachtet werden, um eine Verklumpung bei Kontakt mit dem Vermittler zu verhindern. Nach der Acrylatzugabe wurde die Mischung durch Vortexten homogenisiert. Das Acrylat wurde dabei schrittweise zugegeben, da eine vollständige Vermischung bei größeren Zugabemengen häufig nicht erfolgreich war. In einigen Fällen war auch eine erneute Zugabe von 1M2P nötig, um eine homogene Mischung zu erhalten. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Zugabe der Acrylate sowie die nachträgliche Zugabe des Vermittlers sehr schnell geschahen und das Probengefäß gut verschlossen wurde, da die Acrylate sonst verdampften und die Einwaage zu ungenau war. Der Initiator wurde zuletzt zugegeben und die Lösung im UV-Polymerisationsgerät radikalisch vernetzt. Dabei zerfällt zunächst der Photoinitiator Irgacure<sup>®</sup> 651 in das Benzoylradikal und das Dimethoxybenzylradikal. Das Benzoylradikal reagiert entweder mit einer Doppelbindung des Butylacrylats oder einer funktionellen Methacrylat-Endgruppe des Linkers. Das neu gebildete Radikal reagiert weiter, bis alle verfügbaren funktionellen Gruppen reagiert haben und ein Netzwerk entstanden ist (Abb. 5.7). Finden Polymerisation und Vernetzung wie hier



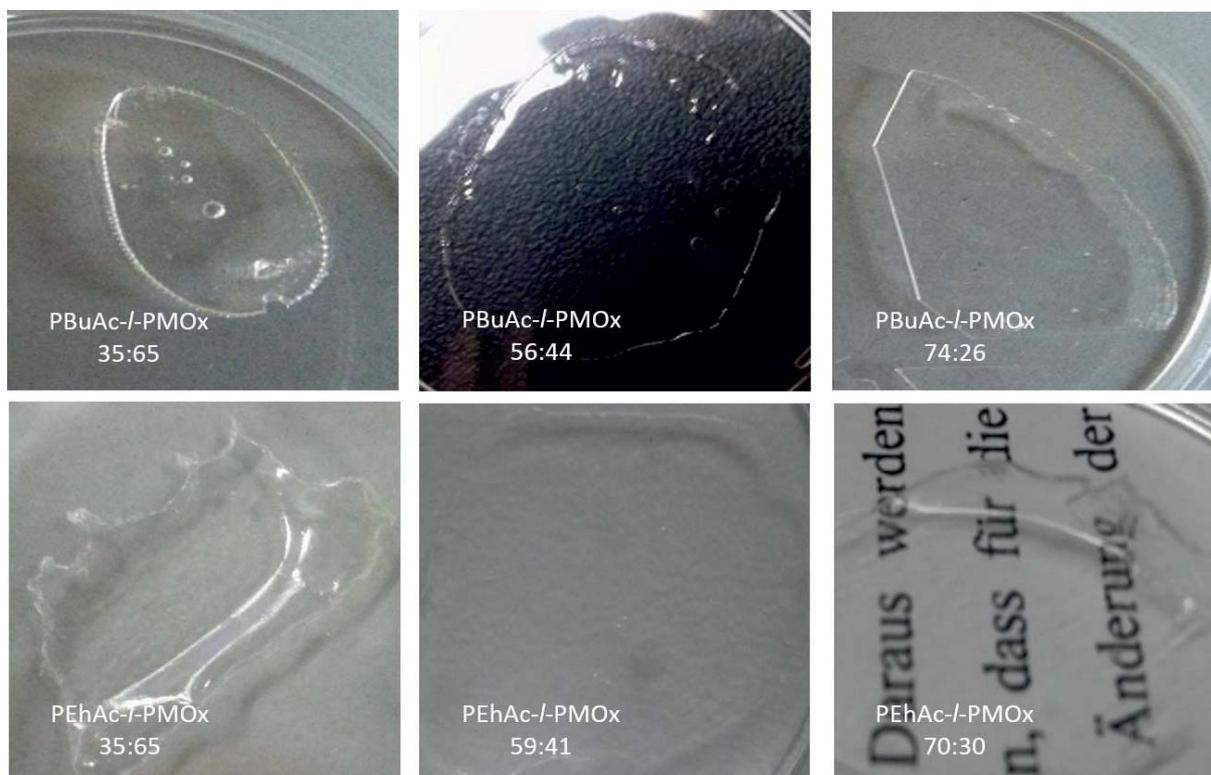
gleichzeitig statt, wird von vernetzender, radikalischer Copolymerisation gesprochen. Die Theorie der Vernetzung geht davon aus, dass sich der bifunktionale Vernetzer statistisch in die verschiedenen Polymerketten einbaut, wodurch ein dreidimensionales Netzwerk gebildet wird (150).



**Abbildung 5.7: Theorie der Netzwerksynthese. Das Benzoylradikal greift die Doppelbindung des Butylacrylats oder der funktionellen Methacrylat-Endgruppe des Linkers an und bildet ein neues Radikal. Aus der fortschreitenden Reaktion resultiert das PBuAc-/PMOx APCN.**

Zwischen den einzelnen Polymerisationszeiten wurden die enzymbeladenen Netzwerke für einige Minuten bei 4 °C gelagert, um einer Überhitzung des Enzyms entgegenzuwirken. Abb. 5.8 zeigt beispielhaft Aufnahmen der erhaltenen Netzwerke mit unterschiedlichen Zusammensetzungen. Insgesamt waren die Netzwerke mit EhAc als Monomer schwieriger zu

synthetisieren, da hier bei der Acrylatzugabe sehr schnell Entmischungen auftraten. Die erhaltenen Netzwerke waren, vor allem bei höheren Acrylatanteilen, sehr klebrig und wenig stabil gegen mechanische Einwirkung.



**Abbildung 5.8:** Fotos von synthetisierten APCNs. Oben: PBUAc-/-PMOx, Zusammensetzungen PBUAc:PMOx: links 35:65, Mitte 56:44, rechts 74:26, Unten: PEhAc-/-PMOx, Zusammensetzungen PEhAc:PMOx: links 35:65, Mitte 59:41, rechts 70:30. (151)

Eine Synthese von Netzwerken mit einem höheren Acrylatanteil als in Abb. 5.8 gezeigt (74 bzw. 70 Gew%) war nicht möglich, da hier die nötige Zugabe an 1M2P für eine vollständige Vermischung in der Komponentenmischung so hoch war, dass die Konzentration an reaktiven Gruppen nicht für eine vollständige Vernetzung ausreichte. In diesen Fällen wurde eine zähflüssige Substanz erhalten, die nicht weiter verwendet werden konnte.

Es ist also möglich, durch Synthese mit 1M2P als Vermittler, optisch klare und homogene Netzwerke aus PMOx, PBUAc und PEhAc zu erhalten. Dabei setzt die für eine homogene Lösung benötigte Menge an Vermittler eine Begrenzung für den maximal möglichen Anteil an Acrylaten im Netzwerk.



### 5.3.1.1. Bestimmung des Solanteils und der resultierenden Zusammensetzung

Die Ausgangslösung für eine Netzwerksynthese muss so gewählt werden, dass die Konzentration an reaktiven Gruppen hoch genug ist, damit eine Vernetzung stattfinden kann. Während der Reaktion steigt die Viskosität der Lösung an, so dass die Diffusion verlangsamt wird und nicht alle Monomere oder Linker eingebaut werden können. Diese freien, nicht abreagierten Bestandteile werden als Sol bezeichnet, das Netzwerk als Gel. Damit gibt eine Analyse des Solanteils Aufschluss darüber, wie effektiv die Vernetzung abläuft. Bei radikalischen Vernetzungsreaktionen ist der Solgehalt häufig gering (150). Da meist eine der Komponenten stärker von der Diffusionslimitierung betroffen ist, ergeben sich auch Änderungen an der resultierenden Zusammensetzung der Netzwerke.

Die Tab. 5.2 und 5.3 zeigen die Ergebnisse der Sol-Gel-Analyse und die resultierenden Zusammensetzungen der in dieser Arbeit synthetisierten Netzwerke. Dabei wird der Solanteil generell extraktiv bestimmt, hier mit Chloroform als Lösemittel, in dem sowohl das Polyoxazolin als auch die Acrylate gut löslich sind. Die Zusammensetzung der Netzwerke nach der Extraktion wurde mittels ATR-FTIR gemessen, da die Signale der PMOx-Amidgruppen ( $1730 \frac{1}{cm}$ ) leicht von denen der Acrylat-Carbonylgruppen ( $1600 \frac{1}{cm}$ ) unterscheidbar sind (Abb. 5.9).



**Tabelle 5.2: Zusammensetzung und Solgehalt der PBUAc-*l*-PMOx APCNs. a) nicht messbar, da das NW während der Extraktion in mehrere Teile zerfällt. (151)**

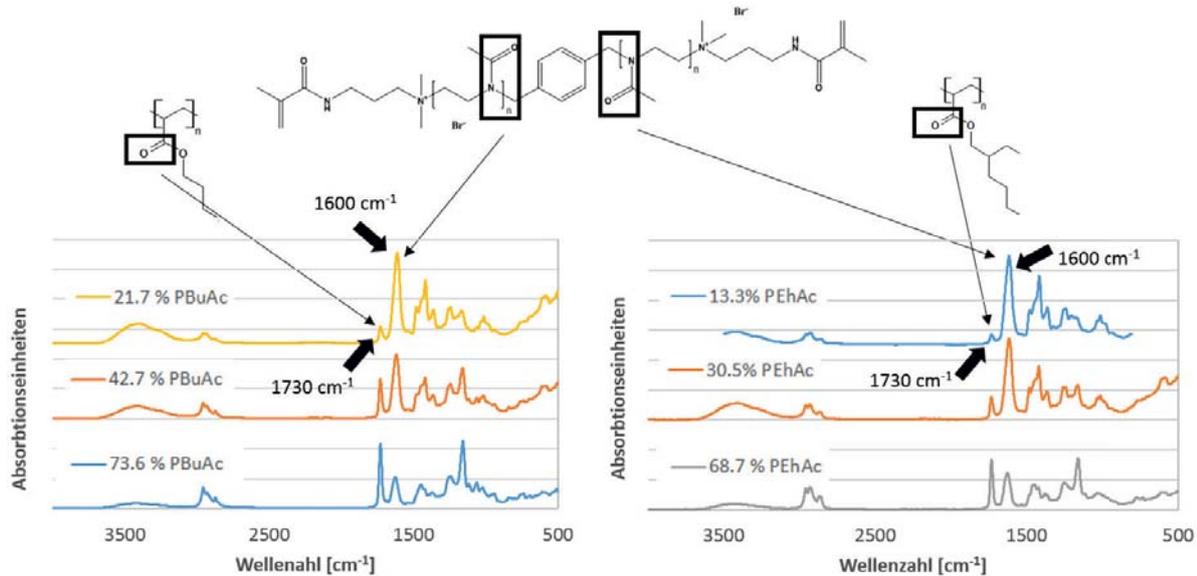
PBUAc Gehalt nach Einwaage [Gew.-%]	PBUAc Gehalt nach Extraktion [Gew.-% IR]	Solgehalt [Gew%]
16,3	15,2	3,4
21,7	20,7	4,6
27,9	26,3	13,1
42,7	40,6	15,8
47,3	45,3	15,6
57,8	55,6	20,8
63,1	59,8	15,2
68,8	65,4	17,4
73,6	63,1	n.m. <sup>a</sup>

**Tabelle 5.3: Zusammensetzung und Solgehalt der PEhAc-*l*-PMOx APCNs. a) nicht messbar, da das NW während der Extraktion in mehrere Teile zerfällt (151)**

PBUAc Gehalt nach Einwaage [Gew.-%]	PBUAc Gehalt nach Extraktion [Gew.-% IR]	Solgehalt [Gew%]
13,3	9,9	18,7
30,5	30,3	18,6
50,6	35,4	21,6
55,3	49,8	18,7
68,7	57,5	n.m. <sup>a</sup>

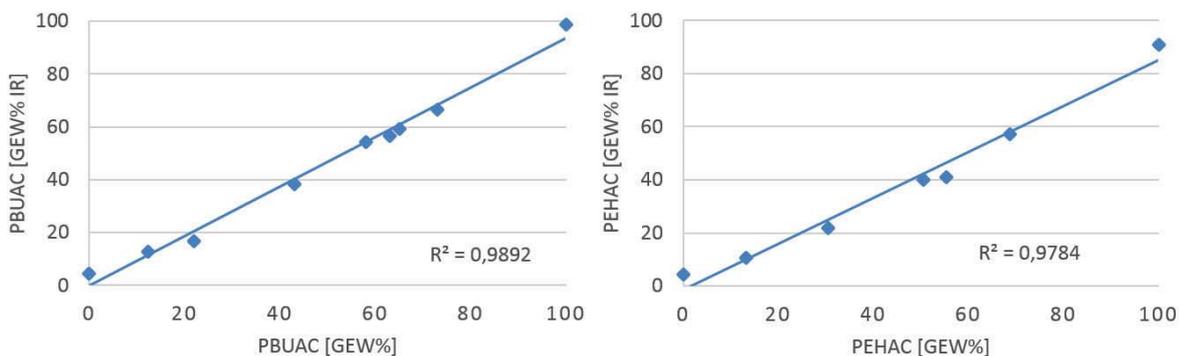
Die Messung des Solanteils zeigte für alle Netzwerke, mit Ausnahme der derjenigen mit der jeweils höchsten Acrylatkonzentration, eine erfolgreiche Vernetzung an. Hier zerfiel das Netzwerk während der Extraktion in mehrere kleinere Netzwerkstückchen, was eine unvollständige Vernetzung bedeutet. Hier war also die Konzentration an reaktiven Gruppen während der Polymerisation zu gering, um eine vollständige Vernetzung zu erreichen.

Dennoch trat keine makroskopische Phasenseparation auf (Abb. 5.8), so dass diese Netzwerke nicht verworfen wurden. Bei den übrigen Netzwerken fand keine Separation statt. Der Solanteil dieser Netzwerke liegt mit bis zu 21,6 Gew% im höheren Mittelfeld, wenn sie mit APCNs generell verglichen werden. Für APCNs, die in der Literatur ebenfalls mit Hilfe eines Vermittlers hergestellt wurden, beträgt der Solanteil bis zu 30 Gew% (148).



**Abbildung 5.9:** FTIR-Daten der PBUAc-I-PMOx (links) und PEhAc-I-PMOx APCNs (rechts) verschiedener Zusammensetzung. Das Signal bei  $1730 \frac{1}{cm}$  wird durch die Carbonylgruppe der Acrylate hervorgerufen. Die Amidgruppen des PMOx erzeugen das Signal bei  $1600 \frac{1}{cm}$ . (151)

**Abb. 5.10** zeigt die aus den FTIR-Messungen resultierenden Kalibrierkurven.



**Abbildung 5.10:** Kalibrierkurven für die IR-spektroskopische Untersuchung von PBUAc-I-PMOx (links) und PEhAc-I-PMOx (rechts) APCNs. (151)

Die Zusammensetzung nach der Extraktion zeigt für die PBUAc-I-PMOx-APCNs eine Abweichung zwischen 4 und 7 % an. Eine Ausnahme bildet das Netzwerk mit der höchsten Acrylatkonzentration, hier beträgt sie 15 %.



Für die PEhAc-/PMOx-APCNs liegen die Abweichungen insgesamt höher, mit Ausnahme des Netzwerks mit 30 Gew% Acrylat. Hier tritt bei den meisten Netzwerken eine Abweichung im zweistelligen Prozentbereich auf, die höchste Abweichung beträgt 30 % bei gleichen Anteilen der Netzwerkkomponenten. Diese Werte bestätigen die schwierigen Synthesebedingungen.

Für die Zielsetzung dieser Arbeit ist eine gute Nanophasenseparation und Quellung von größerer Bedeutung, so dass diese Netzwerke für die weiteren Versuche geeignet sind.

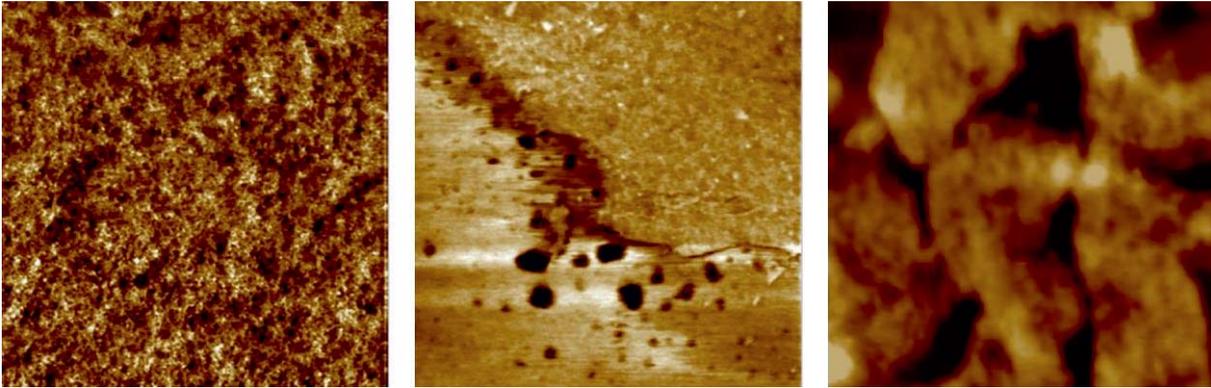
### 5.3.1.2. Untersuchungen zur Phasenseparation

Die Nanophasenseparation ist ein wichtiges Merkmal von APCNs. Je kleiner die einzelnen Phasen, desto größer die innere Austauschfläche. Für enzymkatalysierte Reaktionen bedeutet das, je größer die innere Austauschfläche, desto mehr Enzyme finden dort Zugang und desto größer ist die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenstoßes und damit der Umsetzung von Substrat.

Die Transparenz der Netzwerke (Abb. 5.8) ist dabei eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für eine Nanophasenseparation. Einen direkten Nachweis ergibt die Rasterkraftmikroskopie. Dabei wurden die Querschnitte untersucht, da es an den Oberflächen zu Entmischungen kommen kann (32). Zudem könnten die Netzwerkoberflächen durch die Objektträger beeinflusst werden. Die Netzwerke wurden für die Messung zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und in diesem Zustand gebrochen. Die Bruchkanten wurden im AFM untersucht.

Bei den Netzwerken mit HEA als Vermittler wurde der PMOx-Anteil auf insgesamt 30 Gew% festgelegt und der PBUAc-Anteil der Acrylatphase schrittweise erhöht. Dabei wurde zunächst das PMOx in HEA gelöst, anschließend BUAc und zum Schluss der Photoinitiator Irgacure 651<sup>®</sup> zu der Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde homogenisiert und zwischen zwei Objektträgern (Abstand 3 Lagen Tesafilm) für 3 mal 180 s mit Licht der Wellenlänge 450 nm bestrahlt. Die erhaltenen Netzwerke waren transparent und zeigen bei einem PBUAc-Anteil von 12 Gew% eine Nanophasenseparation an (Abb. 5.11, links). Bereits bei einem PBUAc-Anteil von 18,6 Gew% treten jedoch größere Phasenseparationen auf (Abb. 5.11, Mitte). Netzwerke mit höheren PBUAc-Anteilen waren sehr schwer zu vermessen, lassen aber große Bereiche erkennen, die nur eine Komponente enthalten (Abb. 5.11, rechts). Bereits bei 35,6 Gew% PBUAc tritt also eine starke Entmischung der Komponenten auf.

Die Netzwerke sind daher für das Ziel dieser Arbeit nicht geeignet und wurden nicht weiter untersucht.

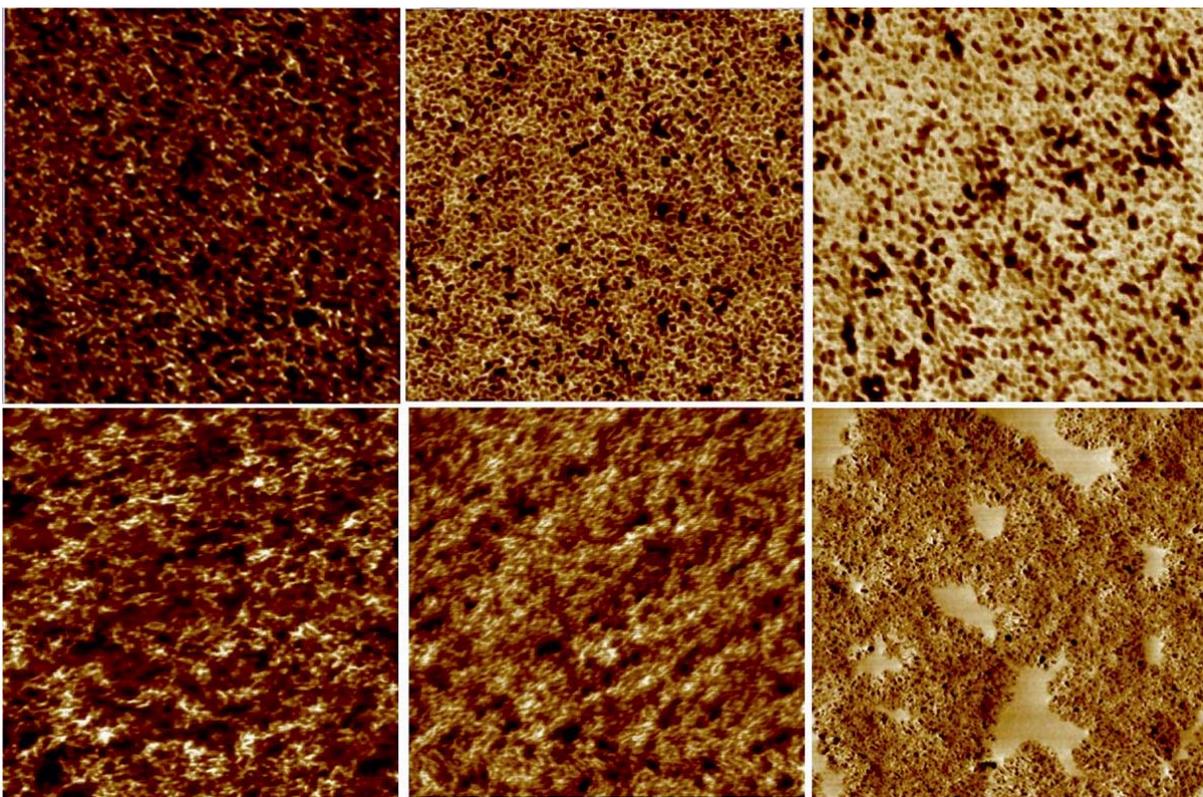


**Abbildung 5.11: AFM-Aufnahmen von PBUAc/PHEA-*l*-PMOx Netzwerken. Der PMOx-Anteil aller Netzwerke beträgt 30 Gew%. Links 12 Gew% PBUAc,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ,  $3,5^\circ$ . Mitte 18,6 Gew% PBUAc,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ,  $12^\circ$ . Rechts 35,6 Gew% PBUAc,  $0,7 \times 0,7 \mu\text{m}^2$ ,  $70^\circ$ . Alle Messungen wurden im Tappingmode mit einer Scanrate von 1 Hz und 512 Bildpunkten pro Zeile mit einem RTESP-Cantilever durchgeführt.**

Bei AFM-Aufnahmen im Tapping-Mode, wie sie für diese Arbeit durchgeführt wurden, erscheinen weiche Phasen im Phasenbild dunkel und harte Phasen hell (152). Da PBUAc mit  $-55^\circ\text{C}$  (153) (154) eine niedrigere Glasübergangstemperatur  $T_g$  als PHEA ( $-15^\circ\text{C}$  (154)) und PMOx ( $70^\circ\text{C}$  (155)) besitzt, werden die dunklen Bereiche des 18,5 Gew% Netzwerkes (Abb. 5.11, rechts) durch die Acrylatkomponenten verursacht.

Die AFM-Aufnahmen der PBUAc-*l*-PMOx und PEhAc-*l*-PMOx Netzwerke sind in Abb. 5.12 dargestellt. Man erkennt bei allen Netzwerken eine homogene Nanophasenseparation. Mit Ausnahme des PEhAc-*l*-PMOx Netzwerkes mit einer Zusammensetzung von 30:70 (PEhAc:PMOx, w/w) ergibt sich das erwartete Phasenbild eines APCNs (33).

Während die hellen Bereiche durch die definierte Länge des Linkers in ihren Dimensionen stärker festgelegt sind, können die dunklen Bereiche, also die Acrylatphase, größere Ausmaße annehmen (vgl. auch Kap. 5.2.1).



**Abbildung 5.12: AFM-Aufnahmen von PBUAc-I-PMOx und PEhAc-I-PMOx APCNs unterschiedlicher Zusammensetzung. Oben: PBUAc-I-PMOx,  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ ; PMOx-Anteil und Phasenwinkel von links nach rechts 26 Gew% ( $5,5^\circ$ ), 44 Gew% ( $20^\circ$ ), 65 Gew% ( $25^\circ$ ). Unten: PEhAc-I-PMOx, linke und mittlere Aufnahme  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , rechte Aufnahme  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ ; PMOx-Anteil und Phasenwinkel von links nach rechts 31 Gew% ( $10^\circ$ ), 49 Gew% ( $13^\circ$ ), 70 Gew% ( $13^\circ$ ). Alle Messungen wurden im Tappingmode mit einer Scanrate von 1 Hz und 512 Bildpunkten pro Zeile mit einem TESPA-Cantilever durchgeführt. (151)**

Für die hier synthetisierten PBUAc-I-PMOx Netzwerke ergibt sich für alle Zusammensetzungen eine konstante Größe der Polyoxazolinphase von 12 nm. Diese Phase liegt in allen Netzwerken interkonnektiv vor. Die Größe der Acrylatphase variiert mit seinem Anteil im Netzwerk. Bei 35 Gew% hat sie in etwa die gleiche Größe wie die PMOx-Phase und zeigt einige isolierte Bereiche. Eine Erhöhung auf 56 Gew% PBUAc zeigt kleinere Phasen von 8 nm, welche interkonnektiv vorliegen. Weitere Erhöhung des Acrylatanteils führt zu einer Vergrößerung der dunklen Phasenbereiche. Auch hier sind beide Phasen interkonnektiv.

Für die PEhAc-I-PMOx APCNs mit Konzentrationen von 50 Gew% Acrylat und darüber zeigen die AFM-Aufnahmen ähnliche Ergebnisse. Auch hier bildet das Acrylat die weiche, dunkle Phase ( $T_g(\text{PEhAc}) = 50 \text{ }^\circ\text{C}$  (153)). Beide Phasen liegen interkonnektiv vor (Phasengröße PMOx 12 nm, PEhAc bis zu 45 nm) und die Acrylatphase vergrößert sich bei steigendem Anteil im Netzwerk. Bei einer Konzentration von 30 Gew% PEhAc im Netzwerk bilden sich

unterschiedliche Bereiche aus. Neben Bereichen, die den typischen, erwarteten nanophasenseparierten Aufbau mit einer interkonnektiven PMOx-Phase und einigen isolierten Acrylatphasen zeigen, existiert eine reine PMOx-Phase mit Dimensionen von teilweise mehr als 100 nm.

Der nanophasenseparierte Charakter der Netzwerke bestätigt sich auch für Aufnahmen von Flächen bis zu  $9 \times 9 \mu\text{m}^2$ , die, mit Ausnahme des PEhAc-/PMOx Netzwerkes mit PEhAc:PMOx 30:70 (w/w), keine Phasenseparationen aufweisen. Abb. 5.13 zeigt für jedes Netzwerk die Aufnahme größerer Netzwerkausschnitte.



**Abbildung 5.13: AFM-Aufnahmen von PBUAc-/PMOx und PEhAc-/PMOx APCNs unterschiedlicher Zusammensetzung, jeweils größte gemessene Fläche. Oben: PBUAc-/PMOx; Fläche, PMOx-Anteil und Phasenwinkel von links nach rechts  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , 26 Gew% ( $6^\circ$ ),  $9 \times 9 \mu\text{m}^2$  44 Gew% ( $17^\circ$ ),  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ , 65 Gew% ( $25^\circ$ ). Unten: PEhAc-/PMOx; Fläche, PMOx-Anteil und Phasenwinkel von links nach rechts  $9 \times 9 \mu\text{m}^2$ , 31 Gew% ( $15^\circ$ ),  $9 \times 9 \mu\text{m}^2$ , 49 Gew% ( $16,5^\circ$ ),  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$ , 70 Gew% ( $8^\circ$ ). Alle Messungen wurden im Tappingmode mit einer Scanrate von 1 Hz und 512 Bildpunkten pro Zeile mit einem TESPA-Cantilever durchgeführt. (151)**

Damit erfüllen die Netzwerke insgesamt ein wichtiges Kriterium für APCNs und sind für die weiteren Untersuchungen geeignet.

### 5.3.1.3. Untersuchungen zum Quellverhalten

Bei der Quellung von Netzwerken kommt es zu einer Vermischung von Polymer und Lösemittel, welche zu einer Volumenzunahme des Netzwerkes führt. Dabei werden die Polymerketten zwischen den Vernetzungspunkten deformiert und wirken einer weiteren Ausdehnung entgegen (156). Je mehr Vernetzungspunkte (pro Volumeneinheit), desto geringer ist die Quellung. Die Quellgrade von APCNs, welche mit einem makromolekularen Linker hergestellt wurden können im zweistelligen Bereich liegen (44).

Die Quellgrade der in dieser Arbeit synthetisierten Netzwerke wurden in ddH<sub>2</sub>O, Toluol und *n*-Heptan aufgenommen. Dafür wurden die Netzwerke über Nacht in dem jeweiligen Lösungsmittel eingelegt und anhand von Mikroskopaufnahmen die Kantenlängen PEh vor und nach der Quellung verglichen. Die Bezeichnungen Acrylatkomponente oder Acrylatphase beziehen sich nur auf PBUAc bzw. PEhAc. Abb. 5.14 und Tab. 5.4 und 5.5 zeigen die erhaltenen Quellgrade.

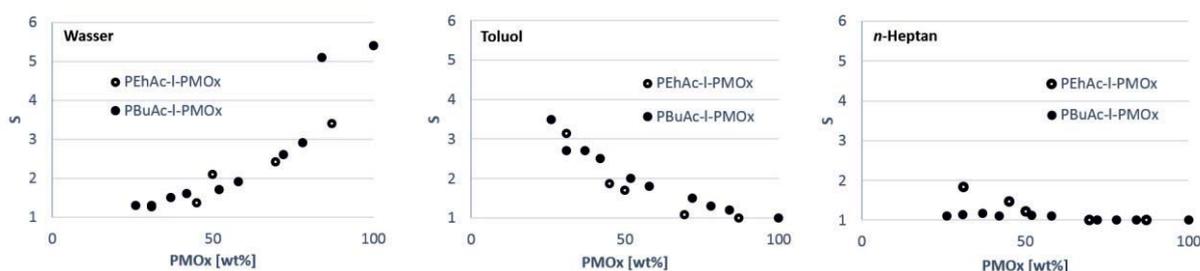


Abbildung 5.14: Quellgrade von PBUAc-*I*-PMOx und PEhAc-*I*-PMOx APCNs in ddH<sub>2</sub>O (Links), Toluol (Mitte), *n*-Heptan (Rechts). (151)

Tabelle 5.4: Quellgrade der PBUAc-*I*-PMOx APCNs in Wasser, Toluol und *n*-Heptan.

PMOx [Gew%]	S <sub>ddH<sub>2</sub>O</sub>	S <sub>Toluol</sub>	S <sub>Heptan</sub>
100	5,40	1,00	1,00
84	5,10	1,20	1,00
78	2,90	1,30	1,00
72	2,60	1,50	1,00
58	1,90	1,80	1,10
52	1,70	2,00	1,12
42	1,60	2,50	1,11
37	1,50	2,70	1,17
31	1,30	2,70	1,13
26	1,30	3,50	1,10

**Tabelle 5.5: Quellgrade der PEhAc-*l*-PMOx APCNs in Wasser, Toluol und *n*-Heptan.**

PMOx [Gew%]	$S_{\text{ddH}_2\text{O}}$	$S_{\text{Toluol}}$	$S_{\text{Heptan}}$
87	3,40	1,00	1,00
70	2,42	1,11	1,00
49	2,09	1,69	1,22
45	1,36	1,86	1,48
31	1,25	3,14	1,83

In Wasser zeigen beide Netzwerke das erwartete Verhalten, eine höhere Quellung mit steigendem Anteil der hydrophilen PMOx-Phase mit einer maximalen Quellung von 5,4 ohne Acrylatkomponente. Dass diese Phase in allen Zusammensetzungen interkonnektiv vorliegt, erklärt sowohl den kontinuierlichen Verlauf der Quellkurven, als auch die Quellung bei niedrigen PMOx-Gehalten. Ähnliche Quellkurven zeigten sich auch bei APCNs, die gleichermaßen mit einem makromolekularen Linker vernetzt wurden (44, 157–159).

Die Quellkurven für Toluol (Abb. 5.14b) zeigen ein voneinander abweichendes Verhalten. Für die PBuAc-*l*-PMOx APCNs zeigt sich eine mit steigendem Acrylatgehalt kontinuierliche Zunahme der Quellgrade bis zu einem Maximum von  $S_{\text{PBuAc, Toluol}} = 3,5$ . Ausgehend von der AFM-Messung (Abb. 5.12), wo eher isolierte Acrylatphasen vorlagen, ist ein kontinuierlicher Verlauf über alle Zusammensetzungen unerwartet. Hier wurde eine nur geringe Quellung für Zusammensetzungen unterhalb von 50 Gew% Acrylat erwartet. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass in der zweidimensionalen AFM-Aufnahme einige Phasenverbindungen nicht sichtbar sind. Literaturvergleiche ergeben z.B. für APCNs aus PMOx- und PBuOx-Homopolymeren in THF und APCNs aus PMOx-*b*-PBuOx-*b*-PMOx Triblockcopolymeren in Wasser (160) oder Poly(methacrylsäure)-*l*-Poly(isobuten) APCNs mit einem Molgewicht des Linkers bis zu  $5000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  in Wasser und *n*-Hexan (161) das erwartete, sprunghafte Quellverhalten. APCNs aus Poly(N-vinylimidazol) und Poly(tetrahydrofuran) zeigen bei Quellung in Wasser, CCl<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>OH und THF ein vergleichbares Verhalten wie die PBuAc-*l*-PMOx Netzwerke in dieser Arbeit (162), ebenso wie APCNs aus Poly[2-(*N,N*-dimethylamino)ethylmethacrylat]] und Poly(isobuten) bei Quellung in Wasser und *n*-Heptan (37). Eine solche Quellkurve ist also nicht ungewöhnlich.

Die PEhAc-*l*-PMOx APCNs zeigen ein Quellverhalten, welches den Erwartungen entspricht. Hier findet bei Acrylatgehalten unter 50 Gew% keine bzw. keine signifikante Quellung statt. Anhand der AFM-Aufnahmen (Abb. 5.12) lässt sich dieses Phänomen durch die isolierten

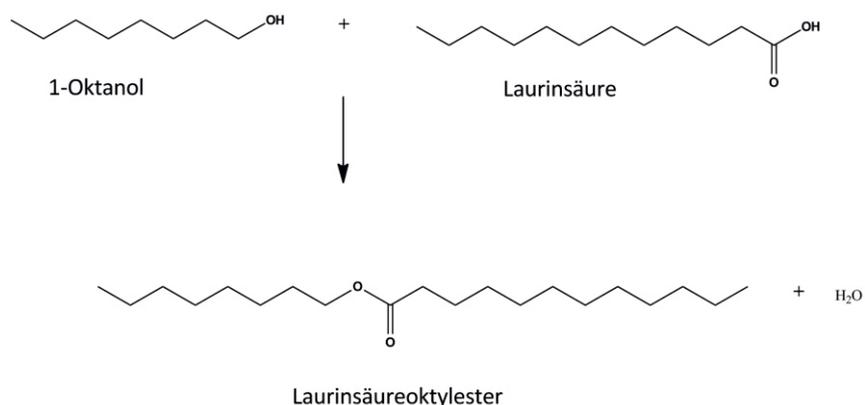
Bereiche der nanophasenseparierten Struktur erklären, die vermutlich durch die großen, nicht quellbaren PMOx-Phasen abgeschirmt werden. Erst bei höheren Acrylatanteilen, wenn beide Phasen interkonnektiv vorliegen, ist eine Quellung möglich. Diese zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die der PBUAc-*l*-PMOx APCNs, mit einem maximalen Quellgrad von 3,14.

In *n*-Heptan zeigen die PBUAc-*l*-PMOx keine signifikante Quellung, während die PEhAc-*l*-PMOx APCNs ab einem Acrylatanteil von 50 Gew% kontinuierlich bis zu einem Grad von 1,83 für eine PMOx:PBUAc Zusammensetzung von 31:69 (w/w) quellen.

Es quellen also sowohl die PBUAc-*l*-PMOx, als auch die PEhAc-*l*-PMOx APCNs in Toluol, während in *n*-Heptan nur die PEhAc-*l*-PMOx APCNs eine signifikante Quellung zeigen. Damit kann nun der Einfluss der Quellung auf die Aktivität von Netzwerk-geträgerten Enzymen untersucht werden.

### 5.3.2. Aktivitätsmessungen

Wie bereits erwähnt, wurde die höchste Aktivität der bisher in den betrachteten APCNs eingeschlossenen Lipasen in *n*-Heptan erhalten. Das gilt ebenso für die Aktivität des nicht geträgerten, suspendierten Enzympulvers der in dieser Arbeit verwendeten Lipase B aus *Candida antarctica* (CaL B). Hier liegt die Aktivität in *n*-Heptan bei  $307 \pm 7,6 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ , während sie in Toluol mit  $145 \pm 4,5 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  halb so groß ist. Die Enzymaktivität wurde über die Veresterung von Laurinsäure und 1-Oktanol zu Laurinsäureoktylester gemessen (Abb. 5.15).



**Abbildung 5.15: Veresterung von 1-Oktanol und Laurinsäure zu Laurinsäureoktylester durch Cal B.**

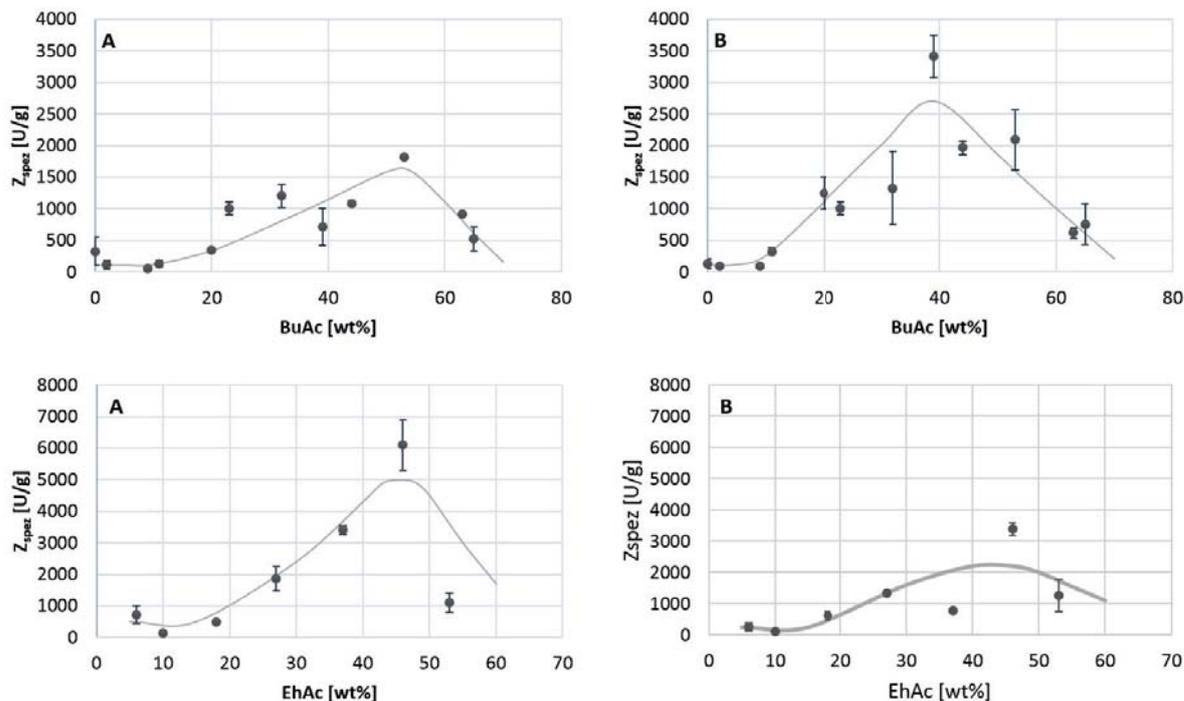
Es scheint also, als würde die Aktivitätserhöhung der in APCNs geträgerten Enzyme nicht durch deren Nanostruktur, sondern durch eine Aktivierung der oberflächennahen Enzyme erreicht.



Mit den hier synthetisierten Netzwerken ergibt sich die Möglichkeit, diese Theorie zu prüfen und die Bedeutung des Quellverhaltens von APCNs für die Enzymaktivität zu klären. Dafür wird zunächst die Aktivität der CaL B, geträgert in einem toluol- aber nicht heptanquellbaren PBuAc-*l*-PMOx APCN gemessen. Auch die Aktivität von CaL B geträgert in einem PEhAc-*l*-PMOx APCN, welches in beiden Lösungsmitteln quellbar ist, wird ermittelt. Sollte die Aktivität auch in beiden Fällen in *n*-Heptan maximal sein, so spielt die Struktur der APCNs und damit die große innere Grenzfläche keine bedeutende Rolle für die Enzymaktivierung.

Für die Synthese der enzymbeladenen Netzwerke war es wichtig, das Enzym gut vermischt mit dem Linker in den Vermittler zu geben, da das Enzym alleine nicht darin lösbar war. Daraus resultierte eine nur begrenzte Möglichkeit der Beladung der APCNs mit CaL B, der höchste Wert lag hier bei 0,42 Gew%. Dech et al. konnten zeigen, dass die Beladung der Netzwerke einen bedeutenden Einfluss auf die Enzymaktivität besitzt (33). So nimmt die Trägeraktivität mit steigendem Enzymgehalt zu, während die spezifische Aktivität abnimmt. Gerade bei geringen Enzymgehalten waren die Auswirkungen enorm, eine Erhöhung von 0,21 auf 0,7 Gew% RmL führte zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität um fast 30 % (von  $3450 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  auf  $2460 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ ). Nach einer weiteren Erhöhung des Enzymgehaltes auf 1,43 Gew% nahm die spezifische Aktivität nur noch um 15 % ab. Daraus resultieren Fehlerquellen, die im Folgenden diskutiert werden. Zum einen wirkt sich durch die geringen Mengen der Wägefehler stärker aus als bei großen Einwaagemengen. Zusätzlich konnte durch die schwierigen Bedingungen bei der Acrylatzugabe (s. oben) die zugegebene Acrylatmenge erst nach der Zugabe genau bestimmt werden. Daraus resultieren ebenfalls Unterschiede bei den Enzymbeladungen, die insgesamt zwischen 0,15 und 0,42 Gew% schwanken. Als Folge ergeben sich Schwankungen im Aktivitätsverlauf, wie Abb. 5.16 zeigt.

Bei der Synthese der CaL B-beladenen Netzwerke wurde der Acrylatanteil der APCNs variiert, um die Zusammensetzung herauszufinden, bei der maximale Aktivität erreicht wird. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.16 gezeigt.



**Abbildung 5.16:** Spezifische Aktivitäten ( $Z_{\text{spez}}$ ) von CaL B, geträgert in PBUAc-/-PMOx (oben) und PEhAc-/-PMOx (unten) APCNs. Der Assay wurde bei 37 °C mit den Substraten 1-Oktanol und Laurinsäure durchgeführt. A) Assay in *n*-Heptan als Lösungsmittel. B) Assay in Toluol als Lösungsmittel. 1 U entspricht der Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Laurinsäureoktylester pro Minute. Die durchgezogenen Linien illustrieren den Datenverlauf und sind keine Fits. (151)

Zunächst ist erkennbar, dass unabhängig von der Art des Netzwerks und seiner Zusammensetzung eine Enzymaktivität gemessen wurde. Die niedrigen Netzwerkaktivitäten  $Z_{\text{APCN}}$  sind eine Folge der nur in geringen Mengen möglichen Enzymbeladung (163).

Auffällig ist weiterhin dass, obwohl die Messdaten wie bereits erwähnt zum Teil starken Schwankungen unterliegen, die maximale Aktivität für beide APCNs und Lösemittel bei einem Acrylatanteil von 50 Gew% (bzw. 40 Gew% in Abb. 5.16 B, oben) liegen. Im Gegensatz dazu wurde bei Messungen mit PHEA-/-PEtOx APCNs die höchste Aktivität bei höheren Acrylatanteilen ermittelt (33). Ähnliche Ergebnisse wie in dieser Arbeit erhielten Heinze *et al.* bei der Entwicklung eines Biosensors, der auf einem PDMAEA-/-PDMS APCN basiert. Hier ergab sich die beste Detektion von  $\text{NO}_2$  mit einem PDMS Anteil von 50 Gew% (161). Die durchgezogenen roten Linien zeigen einen aus den Messwerten geschätzten Verlauf der Aktivität in Abhängigkeit von der Enzymbeladung.

Bei allen Versuchsreihen in Abb. 5.16 zeigt sich ein Aktivitätsanstieg zwischen 0 und 50 Gew% Acrylat. Dieser lässt sich unter Einbeziehung der AFM-Aufnahmen (Abb. 5.12), die eine



interkonnektive PMOx-Phase für alle Zusammensetzungen zeigt, und der Annahme, dass sich das Enzym in dieser Phase befindet, erklären. Die Enzyme haben bei diesen Netzwerkzusammensetzungen ausreichend Raum in der hydrophilen Phase, während mit steigendem Acrylatanteil die Phasengrenzfläche zunimmt und ebenfalls die Quellung stärker wird, also der Substratfluss stärker wird. Bei einer Zusammensetzung der APCNs von 50:50 (PMOx:Polyacrylat, w/w) ist die Grenzfläche am größten, da hier die Acrylatphase interkonnektiv vorliegt, sich aber noch nicht so weit ausgebreitet hat wie bei höheren Acrylatanteilen. Dementsprechend bewirkt eine Verringerung des PMOx-Anteils im Netzwerk eine Verringerung der Enzymaktivität.

Die spezifische Aktivität der CaL B in PBUAc-*l*-PMOx APCNs in *n*-Heptan liegt in einem breiten Zusammensetzungsbereich von 20 bis 60 Gew% PBUAc zwischen  $1000$  und  $1900 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  (Abb. 5.16 A, oben). Das Aktivitätsmaximum bei 50 Gew% PBUAc ist hier schwach ausgeprägt. Das lässt darauf schließen, dass die Nanostruktur hier nur einen untergeordneten Einfluss hat. Diese Vermutung wird von den Quelldaten untermauert, die für diese Netzwerke keine signifikante Quellung zeigen (Abb. 5.14 c). Damit kann die Interkonnektivität der Phasen nicht ausgenutzt werden, die Enzyme im Netzwerkvolumen kommen, wenn überhaupt, nur geringfügig mit den Substraten in Kontakt. Dennoch zeigt der Vergleich mit dem suspendierten Enzympulver eine gut 6-fach höhere Aktivität, so dass für die hier synthetisierten APCNs eine Aktivierung vor allem der oberflächennahen Enzyme angenommen wird.

Bei einem Wechsel zu Toluol als Reaktionsmedium zeigt sich ein anderer Verlauf (Abb. 5.16 B, oben). Hier ist die Aktivität insgesamt höher, mit einem ausgeprägten Maximum bei 40 Gew% ( $3400 \pm 340 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ ). Dies ist nicht nur eine 1,8-fach höhere Aktivität als die maximal in *n*-Heptan erreichte ( $1800 \pm 25 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ , PBUAc- Anteil 53,2 Gew%), sondern auch eine 23-fach höhere Aktivität als die des suspendierten Enzympulvers in Toluol ( $145 \pm 4 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ ). Hier spielt die Interkonnektivität der separierten Nanophasen anscheinend eine große Rolle bei der Kontrolle der Enzymaktivität. Auch diese These lässt sich anhand der Quelldaten der PBUAc-*l*-PMOx APCNs erklären, diese Netzwerke weisen eine Volumenzunahme bis zu 350 % auf. (Abb. 5.14 b). Während das suspendierte CaL B Pulver eine höhere Aktivität in *n*-Heptan aufweist, bewirkt das Quellverhalten des PBUAc-*l*-PMOx APCNs eine höhere Aktivität der geträgerten CaL B in



Toluol. Damit ist es hier zum ersten Mal gelungen, anhand des Quellverhaltens eines APCNs eine Enzymaktivierung zu kontrollieren.

Bei einem Wechsel der hydrophoben Acrylatkomponente im Netzwerk zu PEhAc-*l*-PMOx APCNs, welche sowohl in Toluol als auch in *n*-Heptan quellen, zeigt sich ebenfalls für beide Reaktionsmedien eine Aktivierung des Enzyms gegenüber des suspendierten CaL B Pulvers (Faktor 23 für die Reaktion in Toluol, Faktor 20 für die Reaktion in *n*-Heptan, s.u.). Die spezifische Aktivität der in PEhAc-*l*-PMOx APCNs geträgerten CaL B liegt für Toluol als Reaktionsmedium in einem vergleichbaren Bereich wie für CaL B geträgert in PBUAc-*l*-PMOx APCNs im gleichen Reaktionsmedium (Abb. 5.16 B, unten). Das Maximum liegt hier bei einer  $Z_{\text{spez}}$  von  $3400 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  bei einem Acrylatgehalt von 46 Gew%. Die Quellkurven der PBUAc-*l*-PMOx und PEhAc-*l*-PMOx Netzwerke in Toluol ähneln sich (Abb. 5.14 b), genauso wie die AFM-Aufnahmen (Abb. 5.12, Mitte). Es scheint also, dass eine ähnliche Nanophasenstruktur sowohl in ähnlichem Quellverhalten als auch in einer ähnlichen Aktivierung von geträgerten Enzymen resultiert. Die maximale Aktivität in *n*-Heptan tritt ebenfalls bei einem PEhAc-Gehalt von 46 Gew% auf, hier erreicht sie jedoch einen Wert von  $6000 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ , was mehr als dem dreifachen maximal erreichten Wert für CaL B eingeschlossen in PBUAc-*l*-PMOx-APCNs in *n*-Heptan entspricht. Hier führt also die Kombination aus Quelleffekt und Lösemiteleinfluss zu einer verstärkten Aktivierung der CaL B.

Interessant ist auch die Aktivierung des Enzyms durch den Einschluss. Anscheinend führt der Einschluss in die hydrophile PMOx-Nanophase, welche bei den relevanten Zusammensetzungen, genau wie die Acrylatphase eine ideale Phasenseparation und Interkonnektivität aufzeigt, zu einer mindestens 20-fachen Aktivierung, und zwar unabhängig vom Reaktionsmedium. Die einzige Bedingung, die hierfür scheinbar erfüllt sein muss, ist ein Quellgrad des APCNs von 1,5. Untermuert wird dies durch die Aktivierung in PBUAc-*l*-PMOx-APCNs, bei denen eine Quellung in Toluol ebenfalls zu den genannten Aktivierungen führt, während die Aktivierung in *n*-Heptan, wo das Netzwerk nicht löslich ist, nur ein Viertel dieser Ausmaße erreicht.



### 5.3.3. Fazit

Es wurden zwei neue Arten von APCNs als Träger für CaL B synthetisiert. Dabei wurde in beiden Fällen beidseitig methacrylatterminiertes Poly (2-Methyloxazolin) (PMOx) als hydrophile Komponente eingesetzt. Die hydrophoben Phasen bestanden in einem Fall aus Poly(Butylacrylat) (PBuAc), im anderen aus Poly(2-Ethylhexylacrylat) (PEhAc).

Durch die Wahl von 1-Methoxy-2-Propanol (1M2P) als Vermittler konnte das Enzym direkt einpolymerisiert werden.

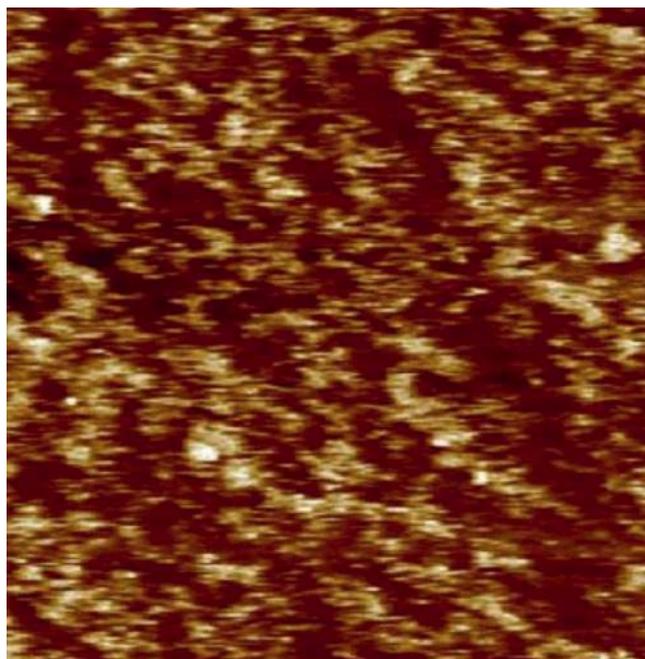
Die AFM-Aufnahmen ergaben für beide Netzwerke eine nanophasenseparierte Struktur mit einer interkonnektiven PMOx Phase über den kompletten Zusammensetzungsbereich. Ab einem Acrylatanteil von 50 Gew% liegt auch die jeweilige Acrylatphase interkonnektiv vor.

Der besondere Vorteil dieser Netzwerke besteht darin, dass PBuAc-*l*-PMOx-APCNs in Toluol, aber nicht in *n*-Heptan quellbar sind, während PEhAc-*l*-PMOx-APCNs in beiden Lösemitteln quellen. Anhand von Aktivitätsassays in diesen beiden Lösemitteln konnte gezeigt werden, dass sowohl die Nanostruktur als auch das Quellverhalten für die Enzymaktivität von Bedeutung sind. Der industrielle Einsatz dieser Netzwerke ist aufgrund der schwierigen Synthese und nur gering möglichen Enzymbeladung limitiert.

### 5.4. PHEA-*l*-PEtOx APCNs

Einige Versuche wurden mit Hilfe von Britta Glowacki im Rahmen ihres Wahlpflichtpraktikums durchgeführt.

Dech entwickelte die Synthese von APCNs basierend auf einem telechelen, beidseitig methacrylat-funktionalisiertem Poly(2-Ethyloxazolin) (PEtOx), welches als Crosslinker für PHEA dient (164). Da beide Komponenten wasserlöslich sind, ist die Zugabe von Enzymen vor der Vernetzungsreaktion sehr einfach möglich und auch große Enzyme können direkt eingeschlossen werden. Dabei ermittelte Dech einen Mindestgehalt an HEA von 30 Gew%, bei dem diese Phase im Netzwerk interkonnektiv vorliegt. Weiterhin setzte Dech u.a. Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RmL) ein um die Auswirkungen der Trägerung zu untersuchen und fand heraus, dass PEtOx einen aktivierenden Einfluss auf dieses Enzym besitzt (164). Ein PEtOx:PHEA-Verhältnis von 70:30 (w/w) ist daher optimal, da hier beide Phasen interkonnektiv vorliegen und die für die RmL wichtige PEtOx-Phase maximal ist (Abb.5.17).



**Abbildung 5.17: AFM-Aufnahme eines PHEA-/-PEtOx-APCNs mit einem PEtOx-Anteil von 70 Gew%.  $0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$ , Phasenwinkel  $40^\circ$ . Die Messung wurde im Tappingmode mit einer Scanrate von 1 Hz und 512 Bildpunkten pro Zeile mit einem RTESP-Cantilever durchgeführt.**

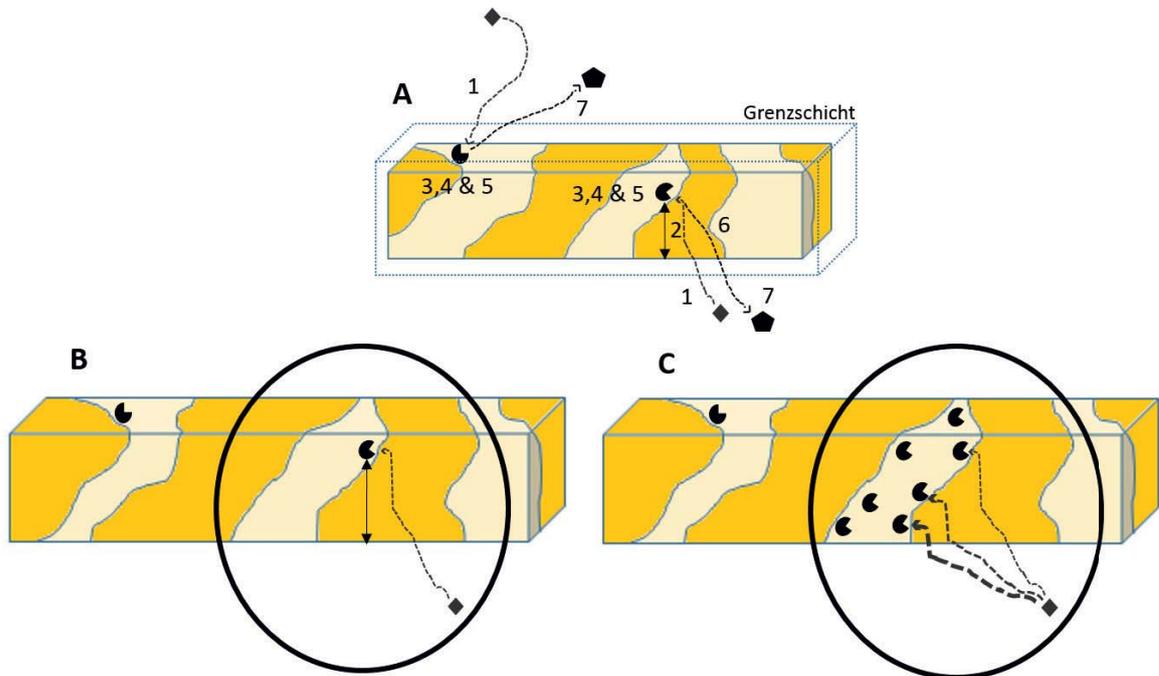
Diese Zusammensetzung wurde für alle Versuche eingesetzt. Dabei stellte Dech eine mögliche Beladung von bis zu 8,4 Gew% RmL bezogen auf die Membran fest. Die Aktivierung in Toluol betrug dabei den Faktor 41 gegenüber der freien RmL. Hier nahm die spezifische Aktivität der RmL mit steigender Beladung ab, was auf die langsame Diffusion zurückgeführt wurde, die bei steigender Beladung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Auch eine Abhängigkeit des Lösemittels wurde beobachtet, so ist die Aktivität der RmL in *n*-Heptan doppelt so hoch wie in Toluol, obwohl die Netzwerke hier nicht quellbar sind (164).

Diese APCNs sind daher für die Trägerung von Biokatalysatoren geeignet. Die einfache Synthese und hohen möglichen Enzymbeladungen machen sie zusätzlich interessant für den industriellen Einsatz. Um die Diffusionslimitierungen zu verringern, begann Dech mit Untersuchungen über die Trägerdimensionen, die in dieser Arbeit weitergeführt wurden. An dieser Stelle soll zunächst kurz allgemein auf die Diffusion und ihre Bedeutung für die heterogene Katalyse eingegangen werden, bevor die Ergebnisse im Einzelnen vorgestellt werden. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die heterogene, katalytische Reaktion aus bis zu sieben Teilschritten besteht (Abb. 5.18 A) (165). Dabei wurde die nachfolgende Beschreibung dieser Teilschritte auf die Reaktion von in APCNs eingeschlossenen Enzyme



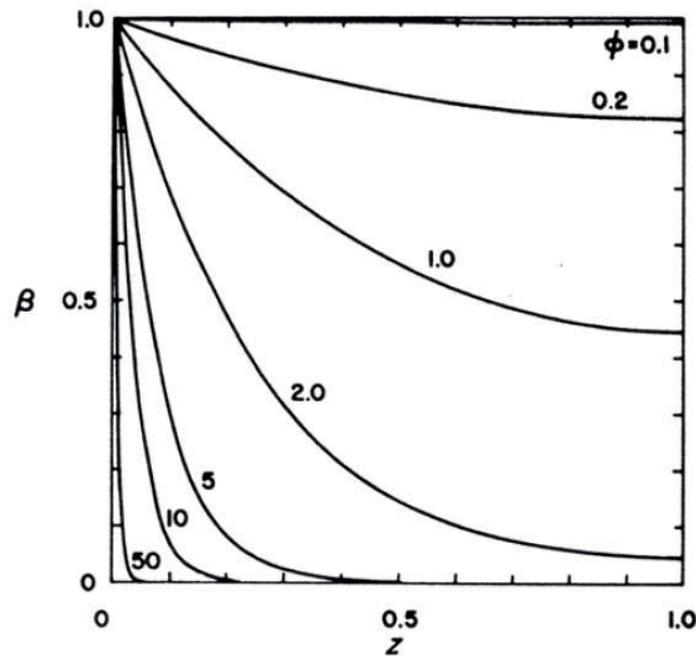
übertragen. Zunächst wird der Fall betrachtet, dass sich das Enzym im Inneren des Trägers befindet (Abb. 5.18 A, rechtes Enzym).

Zunächst diffundiert das Substrat aus dem Bulk durch eine Grenzschicht zur äußeren Oberfläche des Netzwerks (1). Danach folgt eine weitere Diffusion durch die hydrophobe Phase des APCN ins Innere des Trägers (2) und die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes (3). Nach der Reaktion (4) wird das Produkt freigesetzt (5) und diffundiert durch die hydrophobe Phase des APCN an dessen Oberfläche (6) und von dort aus durch die Grenzschicht in den Bulk (7). Wird das Substrat durch Enzyme umgesetzt, die sich an der Trägeroberfläche befinden, entfallen die Schritte der Porendiffusion (2 und 6). Dabei kann jeder dieser Teilschritte den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der katalytischen Reaktion darstellen. Ist die Substratkonzentration innerhalb des Netzwerkes so hoch, dass alle aktiven Zentren gesättigt vorliegen, ist die Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung geschwindigkeitsbestimmend für die heterogene Katalyse. Wird die Sättigungskonzentration nicht erreicht, ist die Diffusion der limitierende Faktor. Dabei kann sowohl der externe Stofftransport zur Trägeroberfläche als auch die Diffusion innerhalb des Trägers langsamer sein als die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms. Die externe Diffusion ist nur im Falle sehr aktiver Katalysatoren und geringer Substratkonzentration im Lösemittel entscheidend. Meistens stellt die innere Diffusion den limitierenden Faktor dar (166). Für Enzyme die sich an der Oberfläche des Trägers befinden (Abb. 5.18 A, linkes Enzym) entfällt der Weg des Substrates sowie des Produktes durch das innere des Trägers (Teilschritte 2 und 6), so dass die innere Diffusion hier keine Rolle spielt.



**Abbildung 5.18: A) Teilschritte der heterogenen Katalyse (auf APCNs übertragen aus (165)). B) Verlängerung der Diffusionswege durch Quellung. C) Diffusionslimitierung bei höherer Enzymbeladung.**

Die Kennzahl für die innere (auch intrinsische oder inhärente) Diffusion ist der dimensionslose Thiele-Modul (Gl. 5.10). Dieser stellt einen Zusammenhang her zwischen Enzymaktivität und innerer Diffusion. Abbildung 5.19 zeigt den Zusammenhang zwischen Thiele-Modul, auf die Michaelis-Konstante genormte Substratkonzentration  $\beta$  und die Trägerabmessung  $Z$  (167).



**Abbildung 5.19: Profil der Substratkonzentration im Inneren eines heterogenen Katalysators für verschiedene Werte des Thiele-Moduls.  $\Phi$  = Thiele-Modul,  $\beta$  = Auf KM normierte dimensionslose Konzentration des Substrates,  $Z$  = Position innerhalb des Trägers (167).**

Je höher der Thiele-Modul, desto größer ist der Konzentrationsgradient innerhalb des Trägers, d.h. ein hoher Thiele-Modul ( $\Phi > 5$  (166)) bedeutet eine diffusionskontrollierte Katalyse. Bei einem kleinen Thiele-Modul ( $\Phi < 0,3$ ) sind Diffusionslimitierungen vernachlässigbar (168).

Bei einem gequollenen APCN verlängern sich die Wege, die Substrat und Produkt innerhalb des Netzwerks zurückzulegen haben, und damit die Dauer der Reaktion (Abb. 5.18, B). Wird die Beladung der Biokatalysatoren erhöht, wird die Sättigungskonzentration innerhalb des Netzwerks nicht erreicht, so dass den Enzymen, die weiter im Netzwerkinnen liegen, nicht ausreichend Substrat zur Verfügung steht (Abb. 5.18, C).

Damit ist der Thiele-Modul zur Einschätzung der hier untersuchten RmL-geträgerten Netzwerke geeignet.

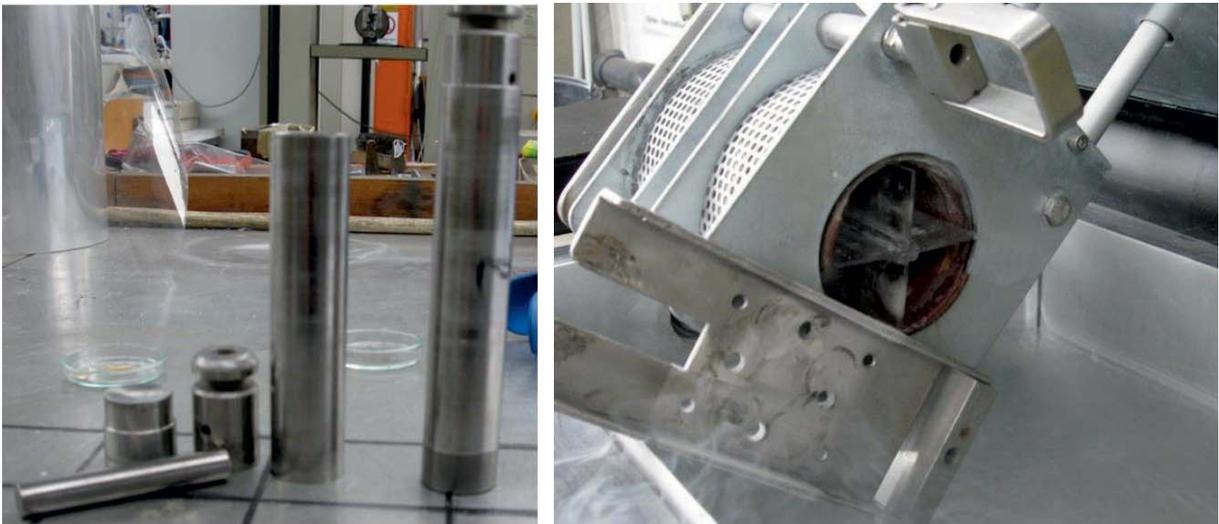
Eine Möglichkeit, den Diffusionslimitierungen von Katalysereaktionen entgegen zu wirken ist die Verkürzung der Diffusionswege. Diesen Ansatz verfolgte z. B. Savin mit der Herstellung von PHEA-/PDMS- Partikeln unterschiedlicher Durchmesser (80, 40, 20, 5  $\mu\text{m}$ ), die nach der Synthese mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) beladen wurden. Die Aktivität des geträgerten Enzyms zeigte eine starke Abhängigkeit von der Partikelgröße, bei einem Durchmesser von 80  $\mu\text{m}$  betrug sie  $0,3 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ , und war damit 150-fach höher als die Aktivität des freien CT-Pulvers im

gleichen Lösemittel (*n*-Oktan). Eine Verringerung des Partikeldurchmessers auf 5  $\mu\text{m}$  erhöhte die Aktivität auf  $56 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  (163).

Zhu *et al.* zeigten ähnliche Ergebnisse bei der Immobilisierung von Glucoseoxidase auf  $\text{SiO}_2$ -Partikeln mit Durchmessern zwischen 17 und 520 nm. Dabei zeigten Enzyme, die auf den kleinsten Partikeln immobilisiert waren, eine ca. vierfach höhere Aktivität als diejenigen auf den größten Partikeln (169). Sie führen dieses Phänomen auf die größere Oberfläche von kleinen Partikeln zurück.

#### 5.4.1. PHEA-*I*-PEtOx Mikropartikel als Enzymträger

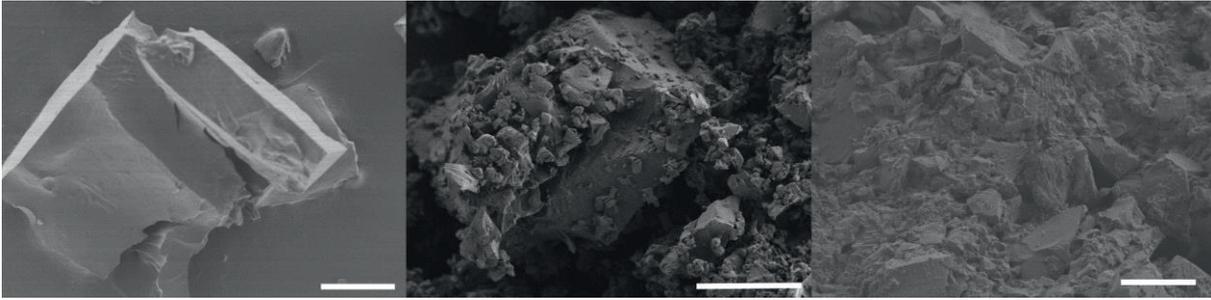
Die Synthese der APCN-Mikropartikel erfolgte aus den synthetisierten Membranen mit Hilfe einer Cryomühle (Abb. 5.20).



**Abbildung 5.20: Fotos der Cryomühle. Links: Mahlkörper; Rechts Einsatz für die Mahlkörper und mit flüssigem Stickstoff gefüllte Mahlwanne.**

Dabei wurden die Netzwerke in die Mahlkörper gegeben (Abb. 5.20, links) und in die Mühle eingesetzt (Abb. 5.20, rechts). Es stellte sich heraus, dass eine zu kurze Mahldauer oder Mahlrate dazu führt, dass die Netzwerke nicht gründlich zerkleinert werden und größere Partikel erhalten werden (Abb. 5.21, links).

Eine zu lange Mahldauer oder zu hohe Mahlrate führt hingegen zu agglomerierten und miteinander verbackenen Partikeln (Abb. 5.21, rechts). Diese Verbackungen sind auf Wärmeentwicklung durch den Mahlbolzen zurückzuführen und unerwünscht. Einerseits wird die Oberfläche wieder verkleinert und das Substrat hat hier eventuell keinen freien Zugang, andererseits könnte das Enzym durch die Wärme denaturieren.

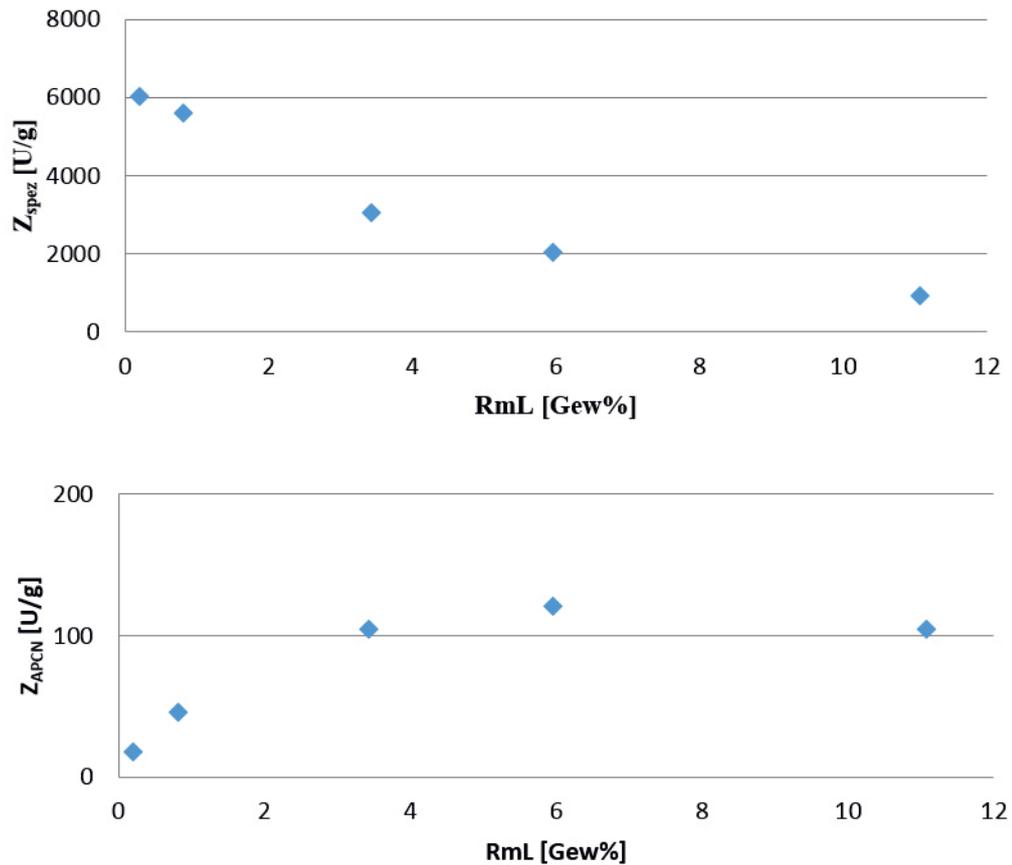


**Abbildung 5.21: REM-Aufnahmen von gemahlene PHEA-/PEtOx-APCNs. Mahlparameter (Anzahl der Zyklen, Dauer der Zyklen, Mahlrade, Zwischenkühlzeit, Vorkühlzeit) von links nach rechts: 15, 6 s, 2 Hz, 90 s, 10 min; 13, 6 s, 4 Hz, 90 s, 10 min; 15, 6 s, 5 Hz, 90 s, 10 min. Die Länge der Balken beträgt für die mittlere Aufnahme 60  $\mu\text{m}$ , für die anderen Aufnahmen jeweils 100  $\mu\text{m}$ .**

Als optimale Mahlparameter, bei denen die Netzwerke zu möglichst kleinen Partikeln vermahlen werden ohne stark zu agglomerieren wurde eine Vorkühlzeit von 10 Minuten, gefolgt von 13 Mahlzyklen zu je 6 s mit jeweils 90 s Pause und einer Mahlrade von 4 Hz gewählt (Abb. 5.21, Mitte). Die Auswertung der REM-Aufnahmen von mindestens 300 Partikeln je Probe ergab durchschnittliche Partikelgrößen von  $55 \pm 20 \mu\text{m}$ . Dabei wurde die jeweils größte Dimension eines Partikels gemessen.

Die Untersuchung der Partikelsynthese durch die Cryomühle wurde von Dech begonnen. Dabei wurde zunächst untersucht, ob auch für die Partikel eine Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Beladung besteht. Dabei erreichte Dech eine Beladung von bis zu 11 Gew% RmL, bei der die Nanostrukturierung des APCNs erhalten blieb (163).

Die Aktivität wurde dabei in *n*-Heptan gemessen, da hier eine höhere Aktivität als in anderen Lösemitteln erreicht wird. Dabei wurden alle Versuche zu RmL-Beladungen über 0,2 Gew% von Dech durchgeführt (164) (Abb. 5.22).



**Abbildung 5.22: Aktivität von RmL geträgert in PHEA-I-PEtOx-APCN-Mikropartikeln in Abhängigkeit von der Enzymbeladung. Die Standardabweichungen liegen bei allen Versuchen unter 25 %. Alle Versuche zu Beladungen über 0,2 Gew% RmL wurden von Dech durchgeführt (164). (163)**

Wie in Abb. 5.22 zu sehen, führt eine steigende Enzymbeladung auch im Falle der Mikropartikel zu einer sinkenden spezifischen Aktivität. Dabei wurde hier bei 0,2 Gew% RmL-Beladung eine spezifische Aktivität von  $6040 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  erreicht, die bis auf  $940 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  für 11 Gew% RmL abfällt. Im Falle der nicht gemahlten PHEA-I-PEtOx-APCNs fällt die spezifische Aktivität von  $3450 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  für eine Beladung von 0,2 Gew% RmL auf  $510 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  bei 8,4 Gew% Enzym (33). Damit konnte generell durch die kleinere Trägerdimension eine Verbesserung der Enzymaktivität erreicht werden. Die Trägeraktivität steigt sogar bei Beladungen über 3,7 Gew% auf bis zu  $100 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ , im Vergleich zu einer maximal gemessenen Trägeraktivität von  $43 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  für PHEA-I-PEtOx-APCNs. Durch Immobilisierung der RmL in Mikropartikel konnte also eine 3-fach höhere Trägeraktivität als die der käuflich erhältlichen RmL (RmL immobilisiert auf Immobead 150,



Sigma-Aldrich Nr. 52001) erreicht werden. Dennoch scheint für die Reaktion in den Partikeln eine ähnliche Diffusionslimitierung wie in den Netzwerken zu existieren. Die Thiele-Moduli für die PHEA-*l*-PEtOx-Mikropartikel zeigen für alle Beladungen starke intrinsische Diffusionslimitierungen an (Tab. 5.6).

**Tabelle 5.6: Thiele-Moduli für PHEA-*l*-PEtOx-APCN-Mikropartikel in Abhängigkeit von der Enzymbeladung für Aktivitätsbestimmungen in *n*-Heptan. (163)**

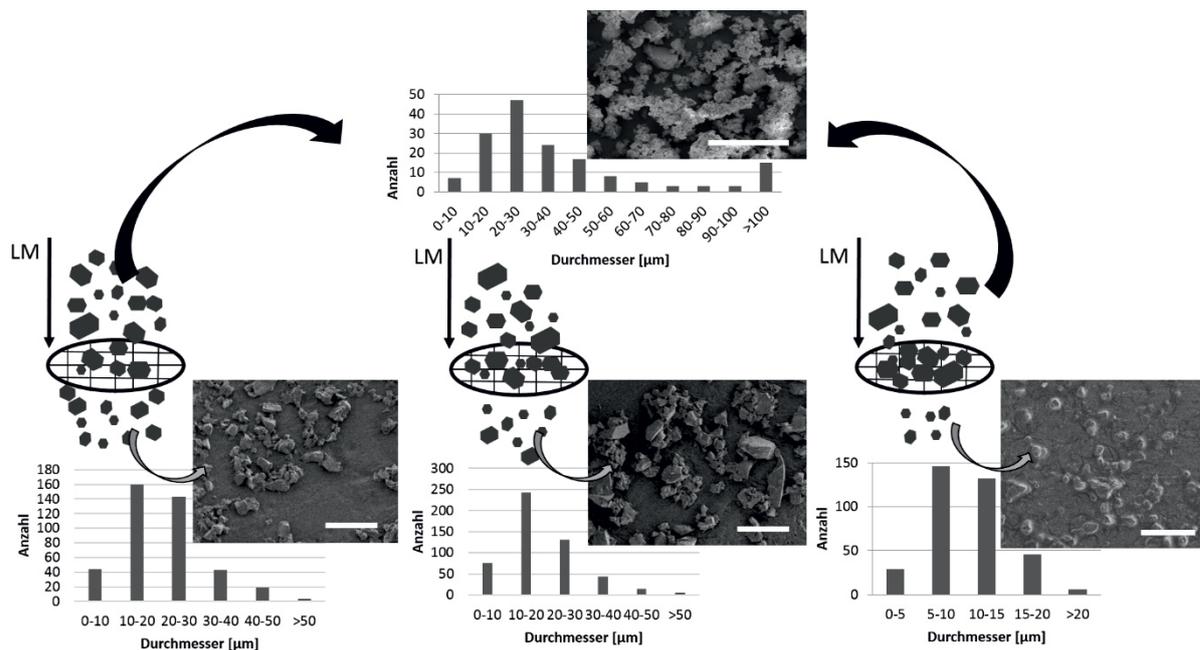
Beladung [Gew%]	Thiele-Modul
0,2	3,97
0,8	4,57
3,4	12,93
6,0	21,17
11,1	28,87

Diese Versuche zeigen, dass die Enzymaktivität durch eine Verminderung der Trägergröße gesteigert werden kann da hier, wie oben beschrieben, die Diffusionsstrecken minimiert werden und so den Enzymen im Inneren der Netzwerke mehr Substrat zur Verfügung steht. Daher wurde untersucht, ob die Aktivität durch eine Klassierung der Partikel weiter verbessert werden kann und die Diffusionslimitierung bei einer Verkleinerung der Partikel vermieden werden kann, um so die volle Katalysatorkapazität zu erreichen. Dafür wurden die Partikel durch Metallsiebe mit unterschiedlicher Maschenweite (20, 40 und 80  $\mu\text{m}$ ) gesiebt.

Die Partikel waren dabei im trockenen Zustand nicht siebbar, sie blieben als Schicht auf den Siebflächen liegen. Daraufhin wurde versucht, die Partikel zunächst in ddH<sub>2</sub>O zu suspendieren und in diesem Medium zu sieben, durch die starke Quellung (Quellgrad  $S = 3,7$ ) erreichen die Partikel hier jedoch eine Größe die das Sieben unmöglich machte. Auch hier war das Resultat eine Partikelschicht auf der Siebfläche, die keine Partikel durchließ. Der Versuch, die Partikel in Lösemitteln zu suspendieren, in denen sie nicht quellen (THF, Toluol und *n*-Heptan) war ebenfalls nicht möglich. Hier klebten die Partikel an den Wänden der Rollrandgläschen fest und konnten nicht suspendiert werden, so dass sie nicht auf die Siebe überführt werden konnten.

Als Kompromiss wurde versucht, die Partikel in Lösemitteln zu sieben, in denen die Quellung weniger stark als in Wasser ist, in denen die Partikel aber suspendiert werden können. Hier bieten sich Chloroform und 1-Oktanol aufgrund ihrer moderaten Quellgrade ( $S = 2,5$  bzw.  $2,7$ ) an.

Die Auswertung der REM-Aufnahmen wurde jeweils für die Partikel vorgenommen, die erfolgreich klassiert werden konnten (Abb. 5.23).

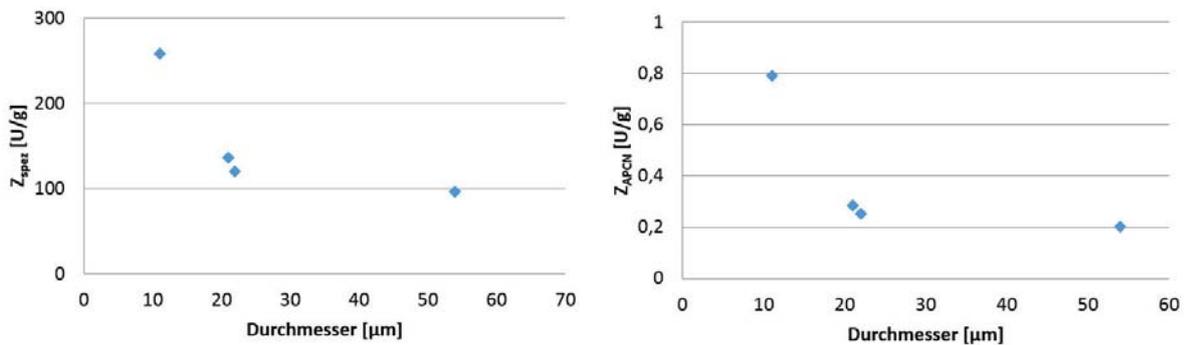


**Abbildung 5.23: REM-Aufnahmen von PHEA-l-PEtOx-APCN-Mikropartikel und Auswertung der Partikeldurchmesser für die unterschiedlichen Siebgrößen. Oben: ungesiebte Partikel, Länge des Balkens 300 µm; Unten links: Maschenweite 80 µm, Unten Mitte: Maschenweite 40 µm, Unten rechts. Maschenweite 20 µm; Länge der Balken jeweils 100 µm. Das Schema verdeutlicht, dass die REM-Aufnahmen der ungesiebten Partikel nach dem Vermahlen der Netzwerke aufgenommen wurden, die Aufnahmen der Siebproben jeweils die Partikel zeigen, die durch das Sieb hindurch gekommen sind.**

Die ungesiebten Partikel weisen nach Entfernung des Lösemittels einen Durchmesser von  $55,0 \pm 20,4 \mu\text{m}$  auf, die mit 80 µm Maschenweite gesiebten Partikel  $21,0 \pm 5,0 \mu\text{m}$ , mit 40 µm  $22,0 \pm 6,6 \mu\text{m}$  und die mit 20 µm Maschenweite gesiebten Partikel  $11,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$ . Dabei liegen die Partikeldurchmesser insbesondere für das 40 µm und das 80 µm Sieb weit unter der Maschenweite, da die Partikel in gequollenem Zustand gesiebt werden und nach der Trocknung wieder ihre ursprüngliche Größe annehmen. Die Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie wurde mit den getrockneten Partikeln vorgenommen.

Es stellte sich heraus, dass die gesiebten Partikel während des Trocknens dazu neigten, Agglomerate zu bilden, die nicht resuspendiert werden konnten. Daher wurde die Aktivitätsbestimmung der immobilisierten RmL direkt im Anschluss an den Siebprozess in dem jeweiligen Lösemittel (Chloroform oder 1-Oktanol) durchgeführt. Zunächst wurde der Einfluss

der Partikelgröße auf die Aktivität untersucht (Abb. 5.24). Dabei wurde eine Enzymbeladung von 0,2 Gew% eingesetzt, um eine maximale spezifische Aktivität zu erreichen.



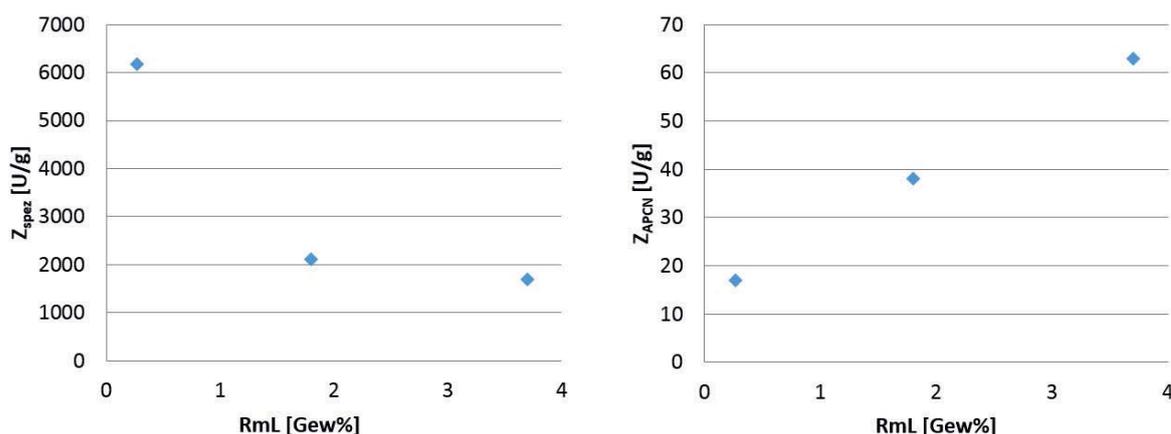
**Abbildung 5.24: Spezifische (links) und Trägeraktivität (rechts) der in PHEA-I-PEtOx-Mikropartikel immobilisierten RmL in Chloroform. Der Enzymgehalt der Partikel betrug 0,2 Gew%. (163)**

Auffällig ist die um eine Größenordnung niedrigere Aktivität der RmL in Chloroform als in *n*-Heptan. Die ungesiebte Probe zeigt hier eine spezifische Aktivität von  $96 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  und eine Trägeraktivität von  $0,2 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ . Bei geringeren Partikeldurchmessern von 20 µm steigt die spezifische Aktivität der RmL auf  $136 \pm 12 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  an, weitere Verringerung auf 11 µm resultiert in einer spezifischen Aktivität von  $258 \pm 67 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ . Die Aktivierung gegenüber dem freien Enzympulver in Chloroform liegt hier bei einem Faktor 27. Der Kurvenverlauf zeigt hier eine geringere Diffusionslimitierung an als für *n*-Heptan als Lösemittel, vermutlich aufgrund der höheren Quellung der Partikel in Chloroform ( $S_{\text{CHCl}_3} = 2,5$  und  $S_{\text{Heptan}} = 1,1$ ) und der allgemein niedrigeren Enzymaktivität. Das wird ebenfalls durch die Thiele-Moduli bestätigt, die hier unter 0,06 liegen (Tab. 5.7), womit der Prozess keiner intrinsischen Diffusionslimitierung unterliegt.

**Tabelle 5.7: Thiele-Moduli für PHEA-I-PEtOx-APCN-Mikropartikel in Abhängigkeit von der Partikelgröße. Die Aktivitätsbestimmung (RmL-Beladung 0,2 Gew%) erfolgte in Chloroform. (163)**

Partikeldurchmesser [µm]	Thiele-Modul
11	0,01
21	0,02
22	0,02
55	0,06

Da hier in einem für das Enzym nicht optimalen Lösemittel gearbeitet werden musste, sollte das System im Weiteren durch ein geeignetes Reaktionsmedium weiter verbessert werden. Das Sieben in Oktanol vereinfacht den nachfolgenden Assay, da 1-Oktanol hier ein Substrat darstellt. Eine lösemittelfreie Veresterung ist für industrielle Maßstäbe von Bedeutung. Hier wurden erste Versuche mit ungemahlten PHEA-*l*-PEtOx-Netzwerken untersucht, um eine generelle Eignung dieses Systems zu prüfen (Abb. 5.25).



**Abbildung 5.25: Spezifische (links) und Trägeraktivität (rechts) von RmL immobilisiert in PHEA-*l*-PEtOx-APCNs in Abhängigkeit von der Enzymbeladung. Der Assay wurde lösemittelfrei durchgeführt. Die Standardabweichungen liegen unter 25%. (163)**

Wie in Abb. 5.25 erkennbar, ist die Aktivität in dem lösemittelfreien System allgemein höher als in *n*-Heptan, was den aktivierenden Einfluss der PHEA-*l*-PEtOx-APCNs auf RmL-katalysierte Reaktionen bestätigt. Die Thiele-Moduli dieser Reaktionen zeigen jedoch für die Membranen eine intrinsische Diffusionslimitierung an (Tab. 5.8).

**Tabelle 5.8: Thiele-Moduli für PHEA-*l*-PEtOx APCNs in Abhängigkeit von der Enzymbeladung für die Aktivitätsbestimmung im lösemittelfreien System. (163)**

RmL [Gew%]	Thiele-Modul
0,2	0,85
1,8	2,48
3,7	3,55

Die Aktivität der RmL immobilisiert in gemahlten und gesiebten Partikeln erreicht für die kleinsten Partikeldurchmesser eine Aktivierung um den Faktor 7 bei einer Beladung von 0,2 Gew%. Eine Beladung von 3,7 Gew% ergab bei gleicher Partikelgröße eine Aktivierung um den Faktor 1,5, so dass auch bei diesen geringen Trägerdimensionen eine Diffusionslimitierung



vorliegt. Die Thiele-Moduli erreichen hier Werte unter 0,3, der Massentransfer innerhalb der Partikel ist demnach keine Limitierung. Daher wird hier von Oberflächeneffekten als limitierender Faktor ausgegangen (Tab. 5.9).

**Tabelle 5.9: Spezifische Aktivität, Trägeraktivität und Thiele-Moduli für RmL immobilisiert in PHEA-/PEtOx Mikropartikel in Abhängigkeit der Enzymbeladung für lösemittelfreie Reaktionssysteme. (163)**

RmL [Gew%]	$Z_{\text{spez}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{g}} \right]$	$Z_{\text{APCN}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{g}} \right]$	$\phi$
0,2	$42310 \pm 7358$	$89 \pm 15$	0,04
3,7	2400	89	0,15

Ungeachtet der Diffusionslimitierungen ist die hier immobilisierte RmL um zwei Größenordnungen aktiver als das freie Enzym. Die käuflich erwerbbar immobilisierte RmL (immobilisiert auf Immobead 150) zeigt hier eine Trägeraktivität von  $9,6 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  bei einer Enzymbeladung zwischen 5 und 10 Gew%. Das bedeutet, dass die in PHEA-/PEtOx Partikeln eine 10-fach höhere Aktivität bei 25 bis 50-fach geringerer Beladung aufweisen. Damit wurde eine höhere Aktivität erreicht als z.B. bei Cruz *et al.*, die mit der Immobilisierung von CaL B auf Kieselsäurepartikeln eine zweifach höhere Aktivität in Hexan verglichen mit Novozyme 435 erreichten (170).

Die Immobilisierung einer Lipase aus *Candida rugosa* auf epoxidhaltigen Mikropartikeln mit spacer arms erreichte eine 1,5-fache Aktivierung (171).

Der Vergleich mit diesen Systemen zeigt die vielversprechenden Eigenschaften der PEtOx-basierten Mikropartikeln als aktivierende Matrix für enzymbasierte Umsetzungen in organischen Medien.

#### 5.4.2. Fazit

Die Arbeiten von Dech zeigten bereits das enorme Potential von APCNs für biokatalytische Umsetzungen. Jedoch waren die hier erreichten Aktivierungen noch nicht das Optimum für diese Systeme, da die Diffusion der Substrate innerhalb der Netzwerke einen limitierenden Faktor darstellt. Daher wurden hier RmL-beladene Mikropartikel, basierend auf PHEA-/PEtOx APCNs mit einem PEtOx Anteil von 70 Gew% synthetisiert, deren Durchmesser in der Größenordnung von 10 bis über 50  $\mu\text{m}$  lagen. Der Einsatz in allen getesteten organischen Medien sowie dem industriell relevanten lösemittelfreien System zeigte eine 10 bis 100-fache



Aktivierung gegenüber dem suspendierten Enzypulver. Das lösemittelfreie System zeigte bei einer 25 bis 50-fach geringerer Beladung eine höhere Aktivität als die käuflich erwerbliche, immobilisierte RmL.

Die intrinsische Diffusionslimitierung konnte sowohl in Chloroform als auch in 1-Oktanol für die kleinsten Partikel aufgehoben werden. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Reaktion immer noch Limitierungen unterliegt. Die hier erreichten Aktivierungen stellen noch immer nicht die maximal erreichbaren enzymatischen Aktivitäten dar. Ziel ist es damit, durch eine weitere Erhöhung des Oberflächen-zu-Volumenverhältnisses des Trägers eine katalytische Umsetzung zu erzielen, die durch die Enzymgeschwindigkeit limitiert wird.

### 5.5. Nanofasern

Diese Versuche wurden mit Hilfe von Franziska Lanfer (Bachelorarbeit), Maximilian Fortmann (Bachelorarbeit), Meike Roth (Forschungspraktikum) und Stefanie Kühne (Wahlpflichtpraktikum) durchgeführt.

Das Verspinnen von Polymerlösungen oder –schmelzen an sich ist einfach durchzuführen. Der Prozess bzw. die Vorgänge während der Faserbildung sind jedoch sehr komplex und von vielen Faktoren abhängig. Im Folgenden soll daher zunächst ein Zusammenhang zwischen der erfolgreichen Faserbildung und den Prozessparametern hergestellt werden, bevor erklärt wird, welchen Kräften ein Protein während des Spinnens ausgesetzt wird und was die Auswirkungen davon sind.

Die den Spinnprozess beeinflussenden Parameter werden nach Kim in Systemparameter, Prozessparameter und Umgebungsparameter unterteilt (81) (Tab. 5.10).

**Tabelle 5.10: Parameter des Elektrospleinverfahrens (81).**

<b>Systemparameter</b>	Lösungseigenschaften	Konzentration Viskosität Oberflächenspannung Leitfähigkeit Dampfdruck
	Polymereigenschaften	Molekulargewicht Molekulargewichtsverteilung Molekulare Architektur (lineare oder verzweigte Ketten)
<b>Prozessparameter</b>		Elektrisches Potential Flussrate Arbeitsabstand (Abstand zwischen Kapillardüse und Sammelelektrode)
<b>Umgebungsparameter</b>		Temperatur Feuchtigkeit Luftgeschwindigkeit Bewegung der Sammelelektrode

Eine gute Verspleinbarkeit hängt unmittelbar von der erfolgreichen Verschlaufung des eingesetzten Polymers ab. Dafür ist sowohl eine bestimmte Anzahl an Wiederholungseinheiten nötig, als auch das Erreichen der sogenannten „Critical Entanglement Concentration“ (172) des Polymers, d.h. der Konzentration, bei der stabile Verschlaufungen gebildet werden. Unterhalb dieser Konzentration zerfällt der Jet in Tropfen. Dabei steigt mit steigender Polymerkonzentration auch die Viskosität der Spinnlösung an, was zunächst in homogenen Fasern mit weniger Beads resultiert. Weitere Erhöhung der Polymerkonzentration führt zu einer stärkeren viskoelastischen Kraft, die dem Verstrecken der Fasern entgegenwirkt (81). Dadurch werden Fasern mit einem höheren Durchmesser erzeugt. Ab einer bestimmten Konzentration ist der Widerstand innerhalb der Kanüle zu hoch um einen kontinuierlichen Massentransfer zu gewährleisten, so dass keine Fasern gebildet werden (82).

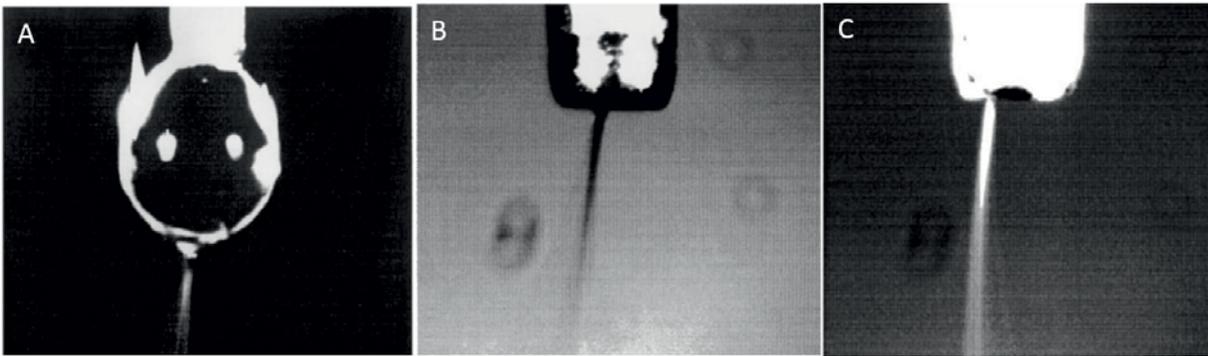


Die Oberflächenspannung hat eine stabilisierende Funktion auf den Jet, da sie der durch die Spannung induzierten Ladungsdichte entgegenwirkt. Je geringer die Oberflächenspannung der Polymerlösung, desto leichter lässt sich der Jet verstrecken, wodurch dünnere Fasern entstehen (173).

Besitzt eine Polymerlösung eine hohe Leitfähigkeit, so ist im Allgemeinen auch die Ladungsdichte auf dem Jet hoch. Daraus wiederum ergibt sich eine stärkere Verstreckung und kleinere Faserdurchmesser. Die Leitfähigkeit spielt ebenfalls eine Rolle für die Stabilität des Jets, eine niedrige Leitfähigkeit begünstigt die Bildung von Beads (81). Eine übliche Methode um die Leitfähigkeit einer Lösung zu erhöhen ist die Zugabe von Salzen (174).

Der Dampfdruck bestimmt die Zeit, die für eine vollständige Verdunstung des Lösemittels benötigt wird, dabei ist eine schnelle Verdunstung von Vorteil. Darüber hinaus beeinflusst er die Nanostrukturierung auf der Faseroberfläche, d.h. für poröse Faseroberflächen ist z.B. ein schnell verdampfendes Lösemittel notwendig (175, 176).

Die angelegte Spannung liegt üblicherweise bei 10 bis 30 kV (75, 177). Dabei erfährt der Jet eine Beschleunigung von bis zu  $600 \frac{\text{m}}{\text{s}^2}$ , so dass der Einfluss der Gravitation vernachlässigbar ist und auch horizontal angeordnete Spinnapparaturen nach dem gleichen Mechanismus funktionieren (178). Hohe Spannungen können dabei durch die stärkere Verstreckung zu dünneren Fasern führen (179, 101), es wurde aber auch der gegenteilige Effekt beobachtet, der durch die kürzere für die Verstreckung zur Verfügung stehende Zeit begründet wird (180). Deitzel *et al.* zeigten für PEG, gelöst in Wasser (7 Gew%), zudem einen erhöhten Anteil an Defekten in Form von Beads bei Erhöhung der angelegten Spannung unter ansonsten konstanten Bedingungen. Bei einer Spannung von 5,5 kV ist die Ausbildung eines Flüssigkeitstropfens mit einem Durchmesser größer als der der Kapillare zu beobachten, aus dessen unteren Ende der Jet gebildet wird. Bei einer angelegten Spannung von 7 kV ist eine vollständige Rückbildung des Tropfens zu beobachten. Weitere Erhöhung der Spannung auf 9 kV resultierte in einer Jetausbildung mit einem innerhalb der Kapillare liegenden Taylorkegel. Die Ausbildung von Beads nahm dabei mit steigender Spannung signifikant zu (82) (Abb. 5.26).



**Abbildung 5.26: Änderung der Jetausbildung für eine PEG/Wasser Spinnlösung (7 Gew%) in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Spannung von links nach rechts: 5,5 kV, 7 kV, 9 kV (82). Änderung der Jetausbildung für eine PEG/Wasser Spinnlösung (7 Gew%) in Abhängigkeit der angelegten Spannung. Spannung von links nach rechts: 5,5 kV, 7 kV, 9 kV (82).**

Eine zu geringe Pumprate führt zu einem wiederholten Abreißen des Jets, da hier nicht genügend Material nachgeliefert wird und der Tropfen an der Spitze der Kanüle, aus dem der Taylorkonus entsteht, eintrocknet bevor sich dieser Konus ausbilden kann. Eine zu hohe Pumprate wiederum führt zu einem Überfluss an Material, welches nicht im Strahl abtransportiert werden kann und daher parallel abtropft (85, 181).

Der Abstand zwischen den Elektroden liegt häufig bei bis zu 25 cm (178), mit abnehmendem Arbeitsabstand wurden nasse Fasern mit ausgeprägter Bead-Struktur erhalten (179). Die maximale Verstreckung ist jedoch bereits recht schnell erreicht, so dass ein Abstand von mehr als 10 cm keinen unbedingt großen Einfluss haben soll (85).

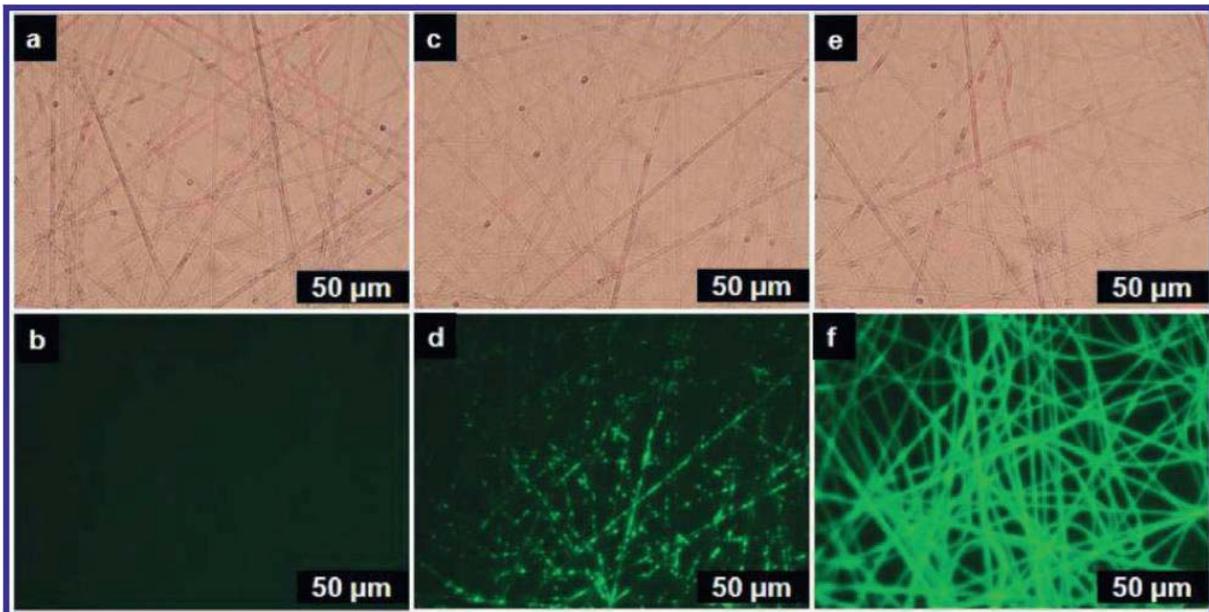
Die Umgebungsbedingungen können dazu führen, dass der Elektrosppinnprozess nicht erfolgreich verläuft. Eine zu niedrige oder zu hohe Luftfeuchtigkeit erschwert den Prozess, nach Wyrwa ist oberhalb einer Luftfeuchtigkeit von 50 % keine Faserbildung erreichbar (182), während Ding *et al.* im Falle von PAA in Ethanol bei 75 % relativer Luftfeuchte von feuchten und abgeflachten Fasern berichten, die sich als porösen Faserfilm auf dem Kollektor abschieden (183). Darüber hinaus bestimmen die Temperatur und relative Luftfeuchte die Morphologie der Fasern (78, 101, 184).

Mit den Kräften, denen Proteine während des Elektrosppinnprozess unterworfen sind, haben sich Tang *et al.* (185) beschäftigt, nachdem sie eine pH-abhängige Verteilung der Enzyme auf der Faseroberfläche beobachteten (Abb. 5.27).



Proteine sind Zwitterionen, die vom pH-Wert des umgebenden Mediums abhängig positiv, negativ oder ungeladen vorliegen können. Der pH-Wert, bei dem sich die positiven und negativen Ladungen aufheben, ist der isoelektrische Punkt ( $pI$ ). Bei pH-Werten oberhalb des  $pI$  ist das Protein negativ geladen, bei pH-Werten unterhalb des  $pI$  positiv. Trägt das Protein eine Ladung, bewegt es sich in einem elektrischen Feld (2). Abb. 4.27 zeigt Ergebnisse aus der Arbeit Tangs (185), die die Frage nach der Verteilung von Proteinen in den elektrogenesponnenen Fasern beantworten. Dafür wurden Polymerproben versponnen, die sich im pH-Wert der Spinnlösung unterscheiden und die Faserproben mikroskopisch untersucht. Das eingesetzte Protein wurde mit einem Fluoreszenzmarker versetzt um es im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Lichtmikroskopische Aufnahmen zeigen die jeweils erhaltenen homogenen Fasern (Abb. 5.27, a, c, e).

Die weiteren Aufnahmen (Abb. 5.27, b, d, f) zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der jeweiligen Faserproben, bei denen nur die markierten Proteine, nicht jedoch die Fasern sichtbar sind. Je heller die Proben, desto mehr Protein befindet sich auf der Oberfläche der Fasern. Dabei zeigen die Abb. 5.27 a und b die Referenzprobe, d.h. Fasern ohne Protein. Bei den Aufnahmen in Abb. 5.27 c und d bzw. e und f wurde jeweils die gleiche Proteinkonzentration in der Spinnlösung eingesetzt, so dass Unterschiede in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nur durch Unterschiede bei den pH-Werten der Spinnlösung resultieren. Das Schema in Abb. 5.28 verdeutlicht diese Abhängigkeit.



**Abbildung 5.27: Optische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen einer wässrigen, 7 Gew% PVA Lösung. a und b: ohne BSA; c und d: mit 0,3 % Fluorescein-conjugiertem BSA (FITC-BSA) bei pH 5,0; e und f: mit 0,3 % FITC-BSA bei pH 8,6 (185).**

Bei der Referenzprobe ohne FITC-BSA ist kein fluoreszierendes Signal zu erkennen (Abb. 5.27, a und b). Mit 0,3 % FITC-BSA bei pH 5,0 sind einige der Fasern gut zu erkennen, hier haben sich die Proteine an der Oberfläche der Fasern angesiedelt (Abb. 5.27, c und d). Der  $pI$  von BSA liegt zwischen 4,7 und 5,2 (185), so dass diese Faserprobe im Bereich des isoelektrischen Punktes ( $pI$ ) liegt. Ein pH-Wert oberhalb des  $pI$  von BSA führt bei gleicher Beladung zu deutlich mehr erkennbaren Fasern unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abb. 5.27, e und f).

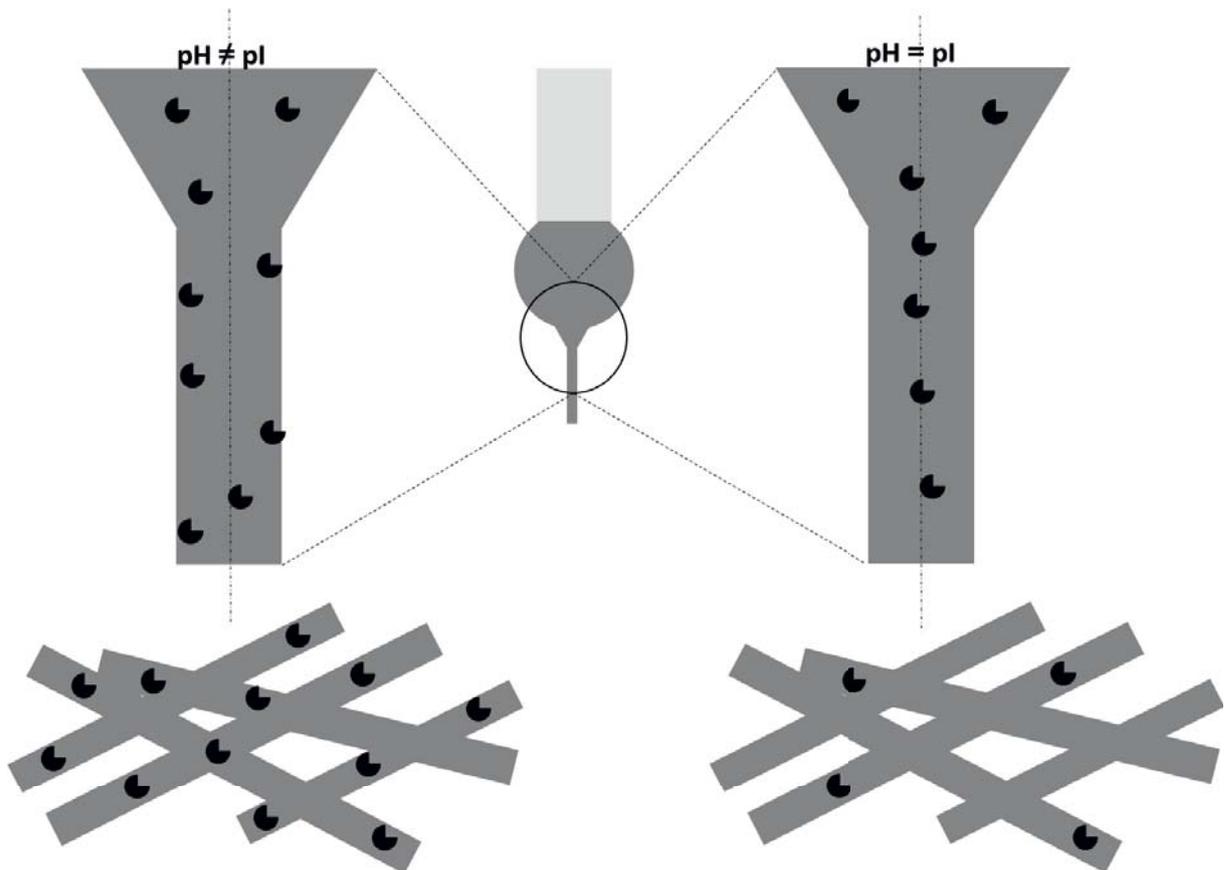
Der Ort des stärksten elektrischen Feldes ist die Spitze der Kanüle, wo der Taylorkonus ausgebildet wird, so dass sich sämtliche Überlegungen hierauf beziehen (185).

Es existieren verschiedene Kräfte, die im Elektrospinnprozess die Anordnung von Makromolekülen allgemein und Proteinen im Speziellen beeinflussen können (185).

Dazu gehören:

- Brownsche Molekularbewegung
- Gravitation
- Coulombkräfte des elektrischen Feldes
- Dielektrophoretische Kräfte, verursacht durch einen Feldgradienten zwischen dem inneren Taylorkonus und seiner Oberfläche
- Reibungskräfte, die der Bewegung der Moleküle im viskosen Medium entgegenwirken

Dabei zeigte sich, dass die dielektrophoretischen Kräfte den größten Einfluss auf die Proteine haben. Die Auswirkungen dieser Kraft werden in Abb. 5.28 verdeutlicht.



**Abbildung 5.28: Proteinanordnung während des Elektrospinprozesses in Abhängigkeit des pH-Wertes der Spinnlösung.**

Entspricht der pH-Wert der Spinnlösung dem  $pI$  des Proteins, so ordnet es sich bevorzugt entlang der Jetachse an und ist innerhalb der Fasern eingebettet.

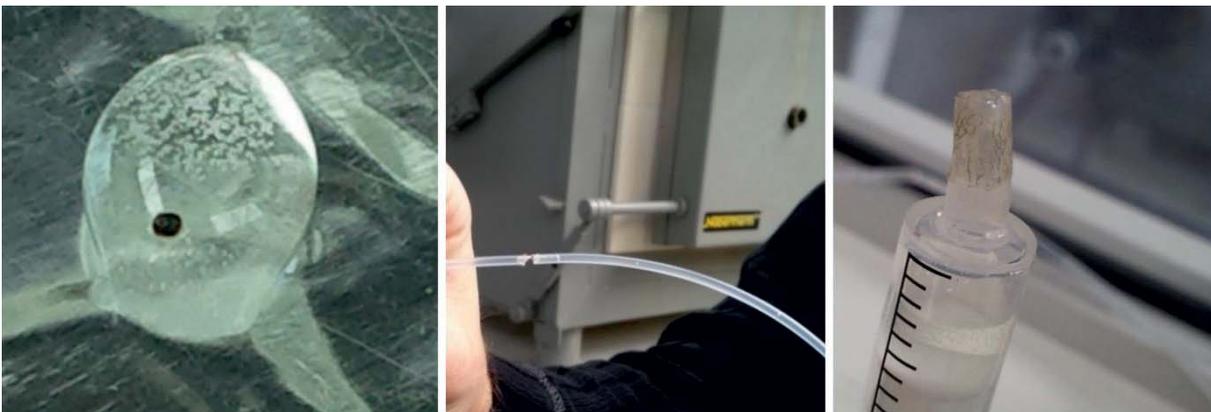
Ist die Verteilung der Proteine an der Faseroberfläche erwünscht, sollte der pH-Wert der Spinnlösung über oder unter dem  $pI$  des Proteins liegen und ein Polymer gewählt werden, welches weniger stark polarisierbar ist als das Protein.

#### 5.5.1. Nanofasern mit kurzkettigen PEOx-Polymeren

Um ein APCN in Faserform zu erzeugen, ist es wichtig das minimal einsetzbare Molekulargewicht des Polymers zu kennen. Einerseits muss es genügend Wiederholungseinheiten besitzen, um die physikalische Vernetzung in Form von Verschlaufungen zu ermöglichen, ohne die keine Faserbildung stattfindet. Andererseits sollte das Molekulargewicht möglichst gering sein, um eine vollständige, beidseitige Funktionalisierung zu gewährleisten, die eine chemische Vernetzung möglich macht. Daher

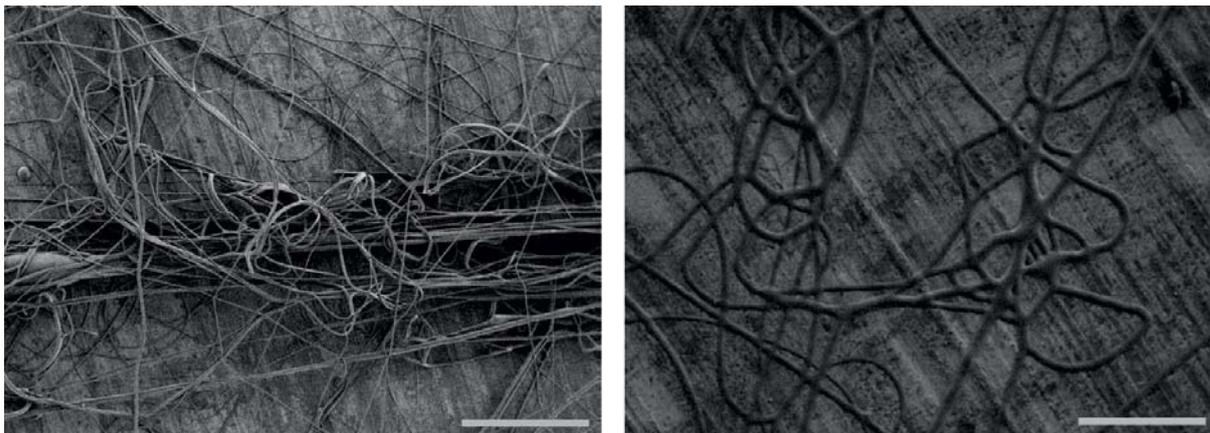
wurden zunächst Poly(2-Ethylloxazoline) unterschiedlichen Molekulargewichts generiert, um die Einsatzmöglichkeit für das Elektrosponnen zu testen (Tab. 5.1). Die literaturüblichen Molmassen von spinnbaren Polymeren liegen zwischen 10.000 und 900.000  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$  (87, 101).

Dabei wurde zunächst PEOx mit einem  $DP_{\text{set}}$  von 50 (PEOx<sub>50</sub>,  $M_{\text{set}} = 5.600 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) eingesetzt. Hier war es nötig, bei einer Spannung von mindestens 46 kV zu arbeiten, um eine Faserbildung zu erreichen. Darunter tropfte die Polymerlösung ohne Faserbildung aus der Kanüle. Das stellte eine große Herausforderung dar, da es während allen Spinnversuchen zu einer Stromleitung durch den Katheder kam, die in den meisten Fällen zu einer Schädigung der Spritze oder des Katheders führten. Oft wurde auch ein Verbrennen des Taylorkegels beobachtet (Abb. 5.29). Eine Spannung von 60 kV führte dazu, dass die Spinnlösung unabhängig von der Pumprate sehr schnell aus dem Katheder gezogen wurde, so dass sich kein Taylorkegel ausbilden konnte.



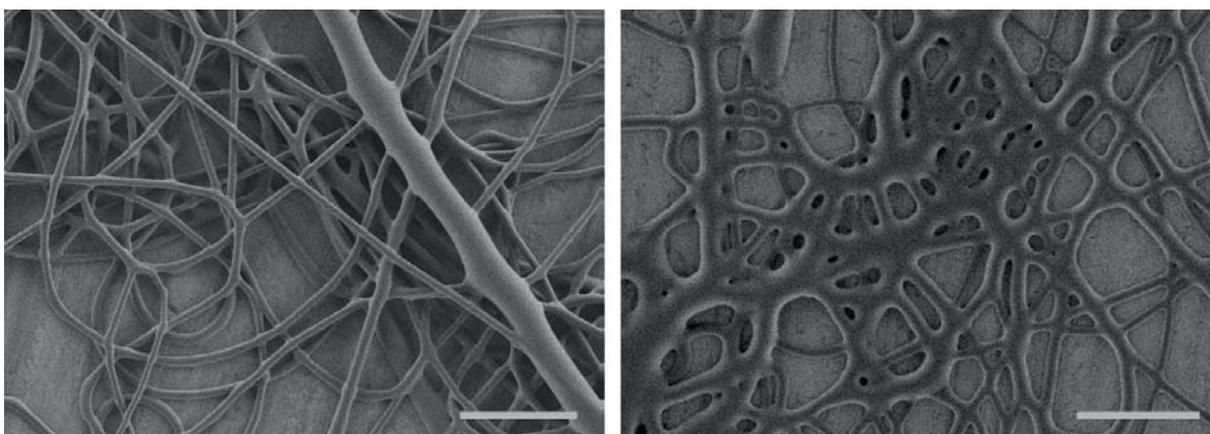
**Abbildung 5.29: Folgen des Elektrosponnens bei Spannungen über 40 kV. Links: Verbrannter Taylorkegel bzw. Jetaustritt; Mitte: zerstörter Katheder (186), Rechts: verschmorte Spritze.**

Dennoch wurden in einem Versuch als Produkt gleichmäßige Fasern ohne Verdickungen („Beads“) oder Verklebungen erhalten (Abb. 5.29, links). Die Durchmesser liegen in einem Größenbereich von 1,3 bis 2,3  $\mu\text{m}$ . Damit sind sie zwar kleiner als die aus den APCNs generierten Mikropartikel (Kap. 5.4.1) liegen aber immer noch über den üblicherweise in der Literatur erreichten Werten von 100 bis 500 nm (88). Auch die große Verteilungsbreite der Faserdurchmesser ist nicht erwünscht. Zudem war es nicht möglich, dieses Ergebnis zu reproduzieren (Abb. 5.30, rechts), so dass ein derart kurzkettiges PEOx nicht für den Einsatz in Elektrosponnprozessen geeignet ist.



**Abbildung 5.30: REM-Aufnahmen von Spinnansätzen mit PEtOx<sub>50</sub> in ddH<sub>2</sub>O. Links: erfolgreiche Faserbildung, Rechts: Reproduktion. Von links nach rechts (Spannung, Pumprate): Links: 46 kV, 0,002  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Rechts: 50 kV, 0,002 bis 0,007  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Die Länge des Balkens beträgt für beide Aufnahmen 100  $\mu\text{m}$ .**

Weitere Versuche wurden mit PEtOx mit einem  $\text{DP}_{\text{set}} = 100$  (PEtOx<sub>100</sub>,  $M_{\text{set}} = 10.200 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) durchgeführt. Hier wurde zusätzlich CHCl<sub>3</sub> statt ddH<sub>2</sub>O als Lösungsmittel eingesetzt, um den oft negativen Einfluss von Wasser auf den Spinnprozess zu unterbinden (Abb. 5.30). Dabei wurde beobachtet, dass die zuerst als weißer Niederschlag auf dem Kollektor auftreffenden Fasern nach kurzer Zeit durchsichtig und feucht aussahen, so dass ein Teil der Proben über Nacht unter Argonatmosphäre gelagert wurde, um den Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Stabilität der Fasern zu untersuchen (Abb. 5.31).

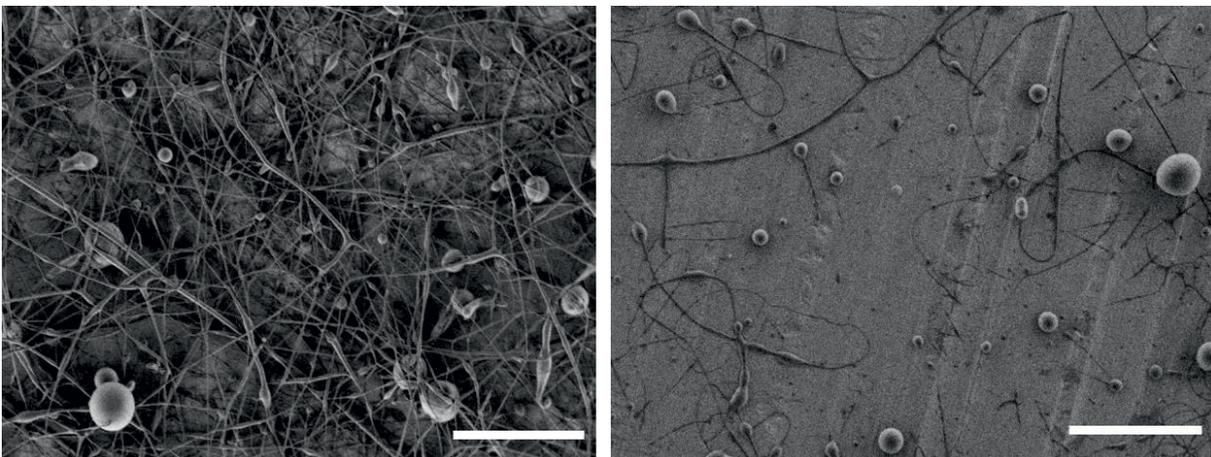


**Abbildung 5.31: REM-Aufnahmen des Spinnansatzes mit PEtOx<sub>100</sub> in CHCl<sub>3</sub>. Bedingungen während des Spinnens: Spannung 48 kV, Pumprate 0,003  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Links: Über Nacht bei 4 °C in Argon gelagert, Länge des Balkens 50  $\mu\text{m}$ . Rechts: Über Nacht bei 4 °C ohne Argon gelagert. Länge des Balkens 40  $\mu\text{m}$ .**

Die mikroskopische Untersuchung der unter Argonatmosphäre gelagerten Probe zeigt stabile Fasern, die an den Berührungspunkten zusammenkleben (Abb. 5.31, links). Im Gegensatz dazu führt eine Lagerung an Luft zu einem Verlaufen der Fasern, hier sind noch Faserumrisse erkennbar (Abb. 5.31, rechts). Die Anzahl der Wiederholungseinheiten der Polymere ist also ausreichend, um Fasern zu generieren, jedoch nicht um sie auch dauerhaft zu stabilisieren. Die Verschlaufungen, durch die die physikalische Vernetzung hervorgerufen wird, lösen sich vermutlich durch Quellung der wasserlöslichen PEtOx-Moleküle durch die Luftfeuchtigkeit nach kurzer Zeit auf.

Eine Übertragung der Versuche auf ein wässriges System führte, trotz Variation der Spinnparameter, in den meisten Versuchen nicht zu einer Ausbildung von Fasern (Abb. 5.32 rechts). Hier sind hauptsächlich sphärische Partikel zu sehen, die vermutlich entweder durch die Tropfenbildung an der Kanülenspitze oder einen instabilen Jet („Electrospraying“ (187)) entstanden sind. Die Lösemittelabhängigkeit des Spinnprozesses ist literaturbekannt (101).

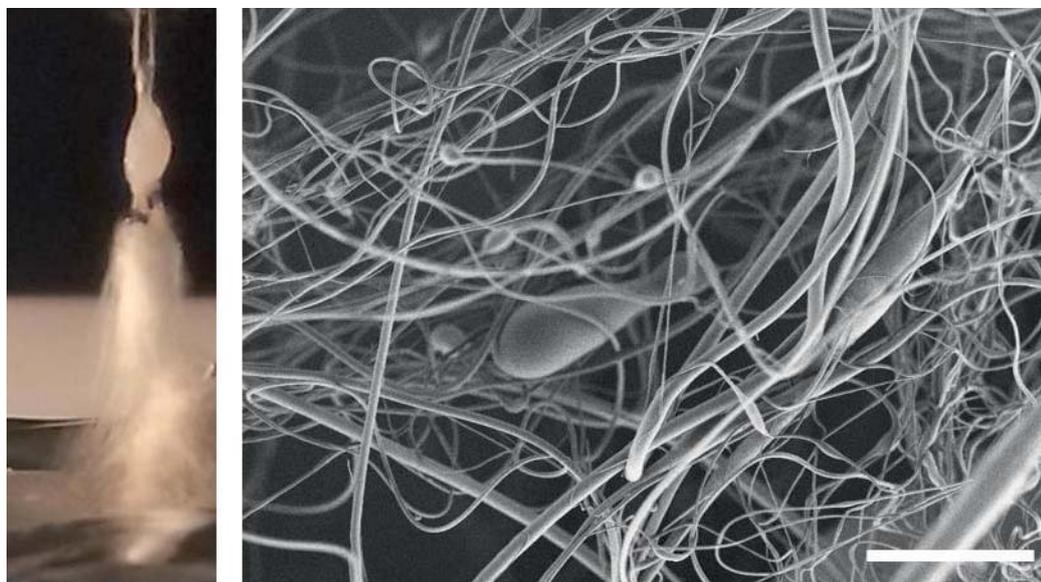
Eine Ausbildung von stabilen Fasern wurde nur bei einem Experiment erreicht. Diese wiesen eine große Verteilung der Faserdurchmesser und ein insgesamt unregelmäßiges Erscheinungsbild auf. Zudem wurde auch hier der Spinnprozess durch die wiederholte Tropfenbildung an der Kanülenspitze erschwert (Abb. 5.32, links).



**Abbildung 5.32: REM-Aufnahmen von Spinnansätzen mit PEtOx<sub>100</sub> in ddH<sub>2</sub>O. Von links nach rechts (Spannung, Pumprate, Länge des Balkens): Links: 38 kV, 0,002  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , 40  $\mu\text{m}$ . Rechts: 40 - 60 kV, 0,001-0,007  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , 30  $\mu\text{m}$ .**

Auch hier kam es durch die hohe benötigte Spannung wiederholt zu elektrischen Entladungen am Injektor bzw. Hot Spots im Katheter, so dass auch PEtOx<sub>100</sub> als nicht geeignet für den Elektrospinnprozess in Wasser eingestuft wird.

Daraufhin wurden Versuche mit PEtOx<sub>240</sub> ( $DP_{\text{set}} = 240$ ,  $M_{\text{set}} = 24.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) durchgeführt, wobei selbst bei niedrigen Spannungen von 10 bis 20 kV stabile Fasern erhalten wurden (Abb. 5.33). Bei diesen Spannungen wurde kein Stromfluss durch den Katheter festgestellt.



**Abbildung 5.33: Spinnprozess mit PEtOx<sub>240</sub> in ddH<sub>2</sub>O. Links: Foto der Faserbildung (Spannung 20 kV, Pumprate  $0,005 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ); Rechts: REM-Aufnahme (Spannung 10 kV, Pumprate  $0005 - 0,01 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , Länge des Balkens  $40 \mu\text{m}$ ).**

Die Aufnahme (Abb. 5.23, links) zeigt eine deutliche Faserbildung während des Spinnprozesses. An der Spitze der Kanüle entstand zunächst ein Polymertropfen, aus dem sich der Jet ausbildete. Im Gegensatz zu der vorher beschriebenen Tropfenbildung wurden die hier gebildeten Tropfen zwar im Laufe des Versuchs kontinuierlich größer und wurden zwischenzeitlich entfernt, es kam jedoch nicht zu schnell hintereinander folgender Tropfenbildung und- fall. Die Fasern sind stabil, weisen jedoch vereinzelt Beads auf. Darüber hinaus unterscheiden sich die Faserdurchmesser stark voneinander. Es wurden Durchmesser zwischen  $0,5$  und  $5 \mu\text{m}$  ermittelt, womit auch diese Fasern als nicht geeignet für den Einsatz als Trägermaterial angesehen werden.

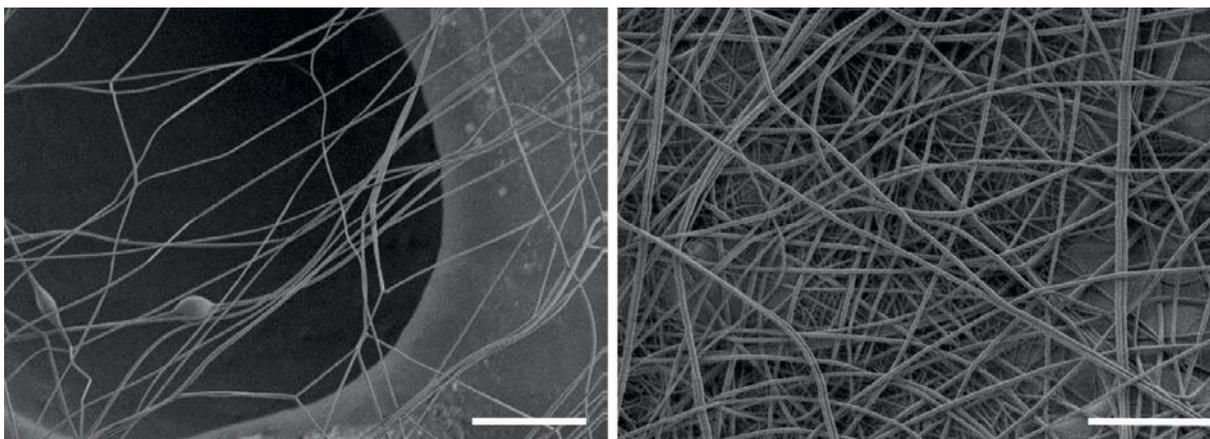
Es konnten also prinzipiell auch mit PEtOx-Polymeren geringer Molmasse ( $DP_{\text{set}} = 50$  bis  $120$ ,  $M_{\text{set}} = 5.600 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  bis  $12.100 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ,  $M_{\text{NMR, GPC}} = 6.100 \pm 200 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  bis  $11.200 \pm 300 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) erfolgreiche Fasersynthesen erreicht werden, die Synthese war jedoch erst ab einem  $DP_{\text{set}}$  von  $240$  ( $M_{\text{set}} = 24.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ,  $M_{\text{NMR, GPC}} = 22.500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$ ) reproduzierbar. Auch konnte erst bei dieser Molmasse mit einer Spannung gearbeitet werden, bei der weder elektrische Entladungen am Injektor bzw.



ein Verbrennen des Katheters den Spinnprozess störten. Die synthetisierten Fasern zeigten zum Teil eine Bildung von Beads. Allgemein ist die Verteilung der Faserdurchmesser sehr breit, mit mittleren Faserdurchmessern im einstelligen  $\mu\text{m}$ -Bereich.

Da für eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber den in Mikropartikeln geträgerten Enzymen sehr geringe Faserdurchmesser kleiner  $1 \mu\text{m}$  erreicht werden sollen, sind die bisher synthetisierten Nanofasern nicht geeignet. Im Weiteren wird daher untersucht, inwiefern Mischungen aus kurzen PEtOx-Polymeren und langkettigen anderen Polymeren verspinnbar sind.

Als langkettige Polymerkomponente wurden Agarose, Gelatine, Polyacrylsäure (PAA) und PEtOx<sub>5000</sub> (Alfa Aesar) auf Eignung geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass bis auf das langkettige PEtOx keines der Polymere als Strukturkomponente geeignet ist. Agarose konnte nur zu 1 Gew% in Wasser gelöst werden, was bei Einsatz im Elektrosinner nicht in einer Fadenbildung resultierte. Das Lösen von Gelatine in Wasser resultierte in einer Gelbildung. Hier gibt es bereits Veröffentlichungen, die eine erfolgreiche Faserbildung nur bei Temperaturen oberhalb von  $36 \text{ }^\circ\text{C}$  beschreiben (188). PAA in Wasser (13,5 Gew%) konnte erfolgreich versponnen werden, eine Mischung aus PAA und PEtOx<sub>50</sub> mit einem Polyoxazolinanteil zwischen 10 und 50 Gew% bezogen auf PAA war jedoch nicht wasserlöslich. Keines dieser Polymere kann also in dieser Arbeit als Strukturkomponente eingesetzt werden. PEtOx<sub>5000</sub> konnte in unterschiedlichen Gewichtsanteilen in wässriger Lösung versponnen werden (Abb. 5.34).



**Abbildung 5.34: REM-Aufnahmen von elektrogesponnenen PEtOx<sub>5000</sub>-Nanofasern. Links 15 Gew% (186), rechts 25 Gew% PEtOx<sub>5000</sub> (189) in Spinnlösung (Lösemittel ddH<sub>2</sub>O) Von links nach rechts (Spannung, Pumprate, Länge des Balkens): 40 kV, Pumprate 0,002  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , Länge des Balkens 8  $\mu\text{m}$ ); Rechts: REM-Aufnahme (Spannung 20 kV, Pumprate 0,007  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ , Länge des Balkens 7  $\mu\text{m}$ ).**

Die GPC-Auswertung von PEtOx<sub>5000</sub> ergab ein Molekulargewicht von  $M_n = 75.385 \pm 3073 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  bei einem PDI von  $4,9 \pm 0,3$ . Die Kettenlängenverteilung des Polymers ist also sehr breit. Trotz des hohen PDIs wurden reproduzierbar formstabile Fasern erhalten. Nach Palangetic *et al.* ist eine breite Verteilung sogar vorteilhaft für den Elektrosppinnprozess (190). Dafür führte er den Begriff des „extensibility average molecular weight“ ein, des dehnbaren durchschnittlichen Molekulargewichts der Polymerprobe. Danach steigt die Elastizität eines Polymers mit steigender Molmasse stark an und erleichtert die Bildung von Verschlaufungen. Eine Polymerprobe mit einheitlicher Molmassenverteilung enthält, bei gleicher durchschnittlicher Molmasse, weniger lange Polymerketten als Polymerproben mit hohem PDI. Palangetic *et al.* untersuchten diesen Effekt mit PMMA mit einer durchschnittlichen Molmasse von  $M_w = 370 \frac{\text{kg}}{\text{mol}}$ , hier erzielten sie bessere Ergebnisse mit einer bimodalen ( $134 \frac{\text{kg}}{\text{mol}}$  und  $1772 \frac{\text{kg}}{\text{mol}}$ ) anstatt einer monomodalen Probe, obwohl der Anteil des hochmolekularen Polymers nur 14,4 Gew% ausmachte.

Bei 15 Gew% PEtOx ergab sich ein mittlerer Faserdurchmesser von  $200 \pm 70 \text{ nm}$  (Abb. 5.34, links). Damit wurden Fasern im angestrebten Nanometerbereich erhalten, jedoch mit einer breiten Verteilung. Zusätzlich wurde die Bildung von Beads beobachtet. Bei 25 Gew% ergibt sich ein dichtes Flies aus Nanofasern mit einem Durchmesser von  $270 \pm 95 \text{ nm}$  und nur vereinzelter Beadbildung. Da hier auch die Mischbarkeit mit PEtOx-Polymeren geringerer



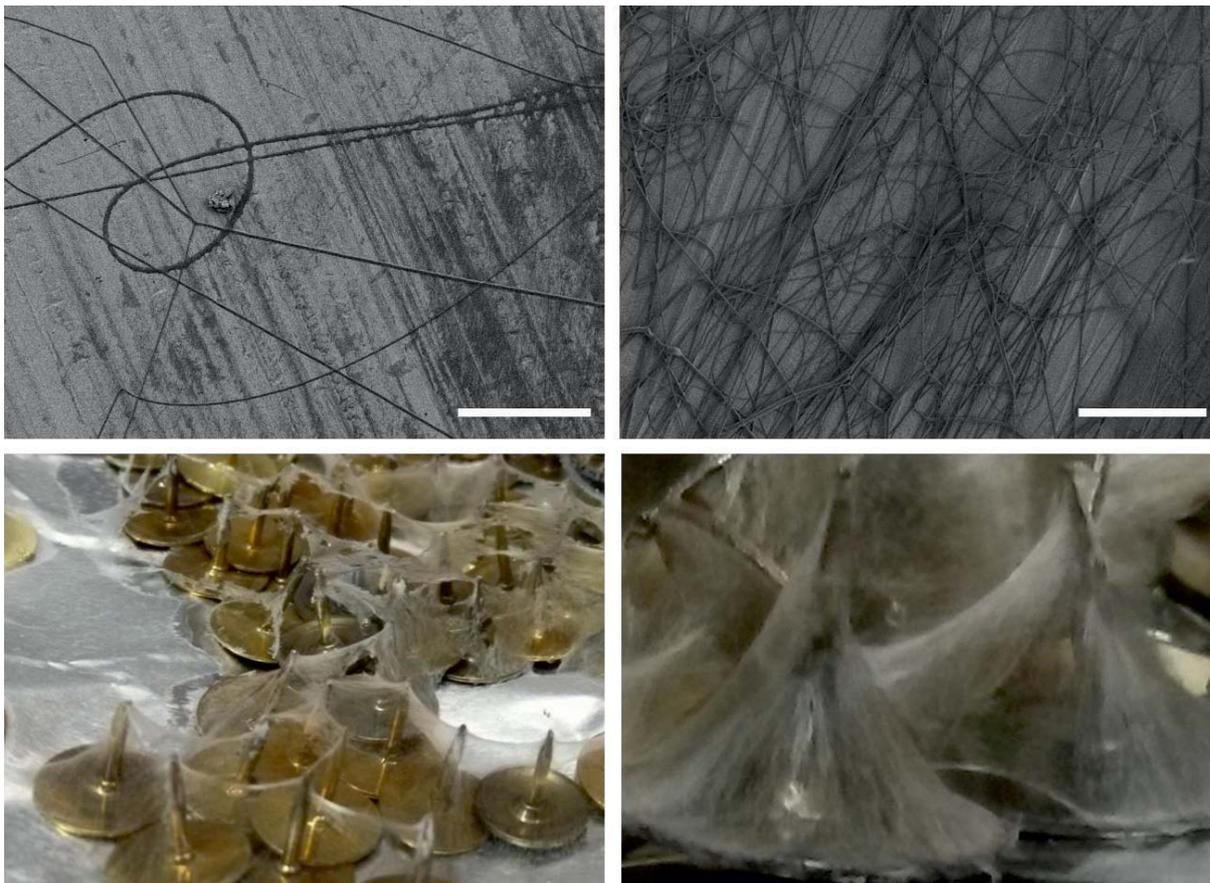
Kettenlänge gegeben ist, wurde dieses Polymer im Folgenden als Strukturkomponente eingesetzt.

### 5.5.2. Untersuchungen zur chemischen Vernetzung

Die chemische Vernetzung der Nanofasern als Pendant zu den APCNs wurde parallel zu den Vorversuchen begonnen, so dass zunächst Ergebnisse ohne langkettige Strukturkomponente vorgestellt werden. Dabei kam es auch in dieser Versuchsreihe zu ungewollten elektrischen Entladungen während des Spinnprozesses. Es wurde häufig ein Abreißen des Jets beobachtet, so dass der Spinnprozess mehrfach neu gestartet werden musste. Alle eingesetzten Polymere, mit Ausnahme des gekauften PEtOx<sub>5000</sub>, wurden mit *N*-(3-Dimethylaminopropyl)methacrylamid (DMAPMA) funktionalisiert.

Dabei wurde zunächst mit den Komponenten gearbeitet, die auch in den Netzwerken eingesetzt wurden, also PEtOx<sub>50</sub>, HEA und Irgacure 651<sup>®</sup> (2 bis 5 Gew%). Um die generelle Eignung des wasserfreien Systems auf die Spinnbarkeit zu prüfen, wurden einige Versuche ohne Initiator durchgeführt. Ein Verspinnen von PEtOx und HEA ohne Wasser als Lösungsmittel führte nicht zu einer Ausbildung von Fasern, hier kam es nur zu einem Austropfen der Spinnlösung. Dabei wurden Gewichtsverhältnisse von PEtOx zu HEA von 1:1, 3:2, 3:1 und 10:1 eingesetzt, bei Spannungen zwischen 10 und 40 kV und Pumpraten zwischen 0,016 und  $0,16 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ .

Daher wurde im Weiteren der Anteil an HEA in der Spinnlösung reduziert und Wasser als Lösungsmittel eingesetzt. Es konnten in zwei Versuchen Fasern erhalten werden (Abb. 5.35). Die gebildeten Fasern waren dabei nur 15 min stabil, bevor sie ihre Struktur verloren. Ein Teil der gebildeten Fasern wurde nach dem Spinnprozess für 45 min unter UV-Licht gelagert, um die chemische Vernetzung zu initiieren. Diese Fasern behielten ihre Struktur für weitere 45 min bei.



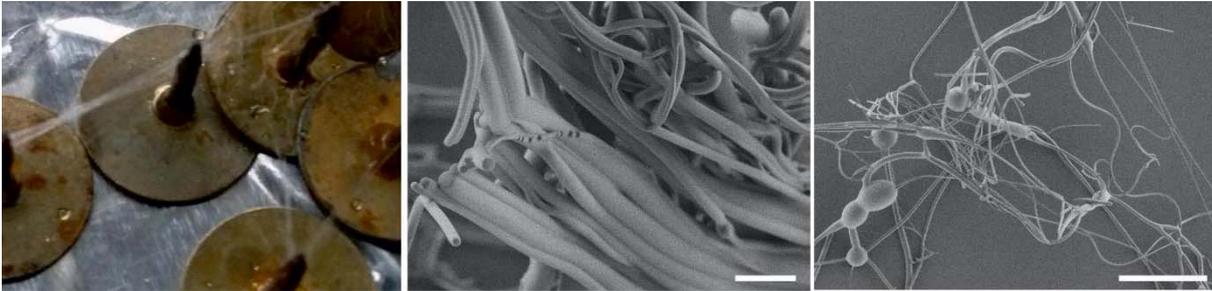
**Abbildung 5.35: REM-Aufnahmen und Fotos von elektrogewonnenen PEtOx/HEA Fasern. Links: Spinnprozess ohne nachträgliche Vernetzung. Rechts: Spinnprozess mit nachträglicher Vernetzung. Spinnparameter (Spannung, Pumprate): Links: 36 kV,  $0,06 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ; Rechts: 40 kV,  $0,015 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Länge der Balken 100  $\mu\text{m}$ .**

Das Verspinnen auf Reißzwecken wurde von Bistram durchgeführt, um orientierte Fasern zu erhalten (85). Hier wurden sie eingesetzt, um im Fall von erfolgreicher Faserbildung diese von dem Kollektor lösen zu können.

Für die nicht UV-Licht behandelten Proben ist auf dem Foto bereits die Auflösung der Faserstruktur zu erkennen. Die REM-Aufnahmen bestätigen den Zerfall und zeigen hauptsächlich linienartige, zerlaufene Strukturen statt dreidimensionaler Fasern. Durch die Vernetzung werden die Fasern länger stabil und zeigen ein dichtes Vlies homogener Fasern. Auch bei dieser Probe konnten jedoch an den Berührungspunkten von Fasern bereits Verschmelzungen beobachtet werden. Der Faserdurchmesser betrug dabei  $1800 \pm 900 \text{ nm}$ .

Daraufhin wurde versucht, durch den Einsatz eines Polymergemisches aus PEtOx ( $DP_{\text{set}} = 50$  und  $DP_{\text{set}} = 120$ , Gewichtsverhältnis 30:70) stabile Fasern zu erhalten (Abb. 5.3). Hier wurde die Spannung zu Beginn auf 20 kV eingestellt, um einen störungsfreien Stromfluss zu

ermöglichen, was aber nicht in kontinuierlicher Faserbildung resultierte. Daher wurde sie während des Prozesses bis auf 40 kV erhöht.



**Abbildung 5.36: Foto und REM-Aufnahmen von elektrogewonnenem PEtOx ( $DP_{\text{set}}$  50 und 120), 60:40 (w/w)/HEA. Spannung 20-40 kV, Pumprate  $0,07 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Länge der Balken: Mitte 10  $\mu\text{m}$ , Rechts 90  $\mu\text{m}$ .**

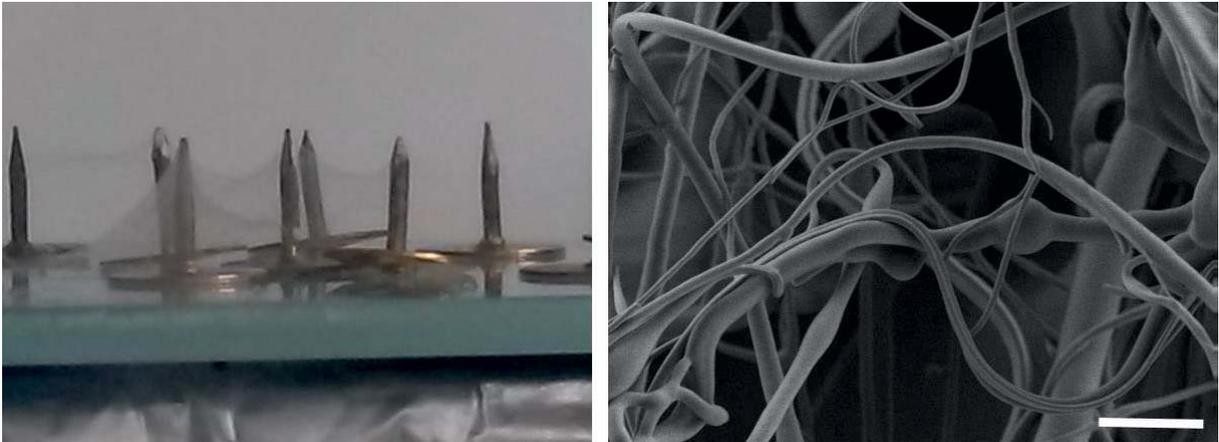
Das Foto (Abb. 5.36, links) zeigt die Bildung von Fasern zwischen den Spitzen der Reißzwecken. Die REM-Aufnahmen wurden von den freistehenden Fasern aufgenommen und zeigen einen Durchmesser von  $2840 \pm 1820$  nm für sie an. Dabei kam es ebenfalls zur Ausbildung von Beads. Die Fasern waren bei Lagerung in Argonatmosphäre für einen Tag formstabil, lösten sich jedoch nach Berührung mit Luft innerhalb von 45 min vollständig auf.

Daraufhin sollte PEtOx<sub>120</sub> gegen PEtOx<sub>240</sub> ausgetauscht werden, da die längere Polymerkette die Stabilität verbessern sollte. Zunächst wurde hier getestet, ob mit PEtOx<sub>240</sub> eine vollständige Vernetzung möglich ist, zumal der Grad der Funktionalisierung hier nur 72 % beträgt (Tab. 5.1). Dafür wurde ein Netzwerk aus PEtOx<sub>240</sub>, HEA und ddH<sub>2</sub>O synthetisiert und in Wasser eingelegt (Abb. 5.37). Das erhaltene Netzwerk war klebrig und lies sich nur schwer vom Objektträger lösen (Abb. 5.37, links). Nach dreitägiger Lagerung in Wasser war das Netzwerk noch immer intakt (Abb. 5.37, rechts).



**Abbildung 5.37: Fotos eines Netzwerks bestehend aus PEtOx<sub>240</sub>, HEA und ddH<sub>2</sub>O. Links: Netzwerk nach der Synthese. Rechts: Netzwerk nach dreitägiger Lagerung in Wasser. (186)**

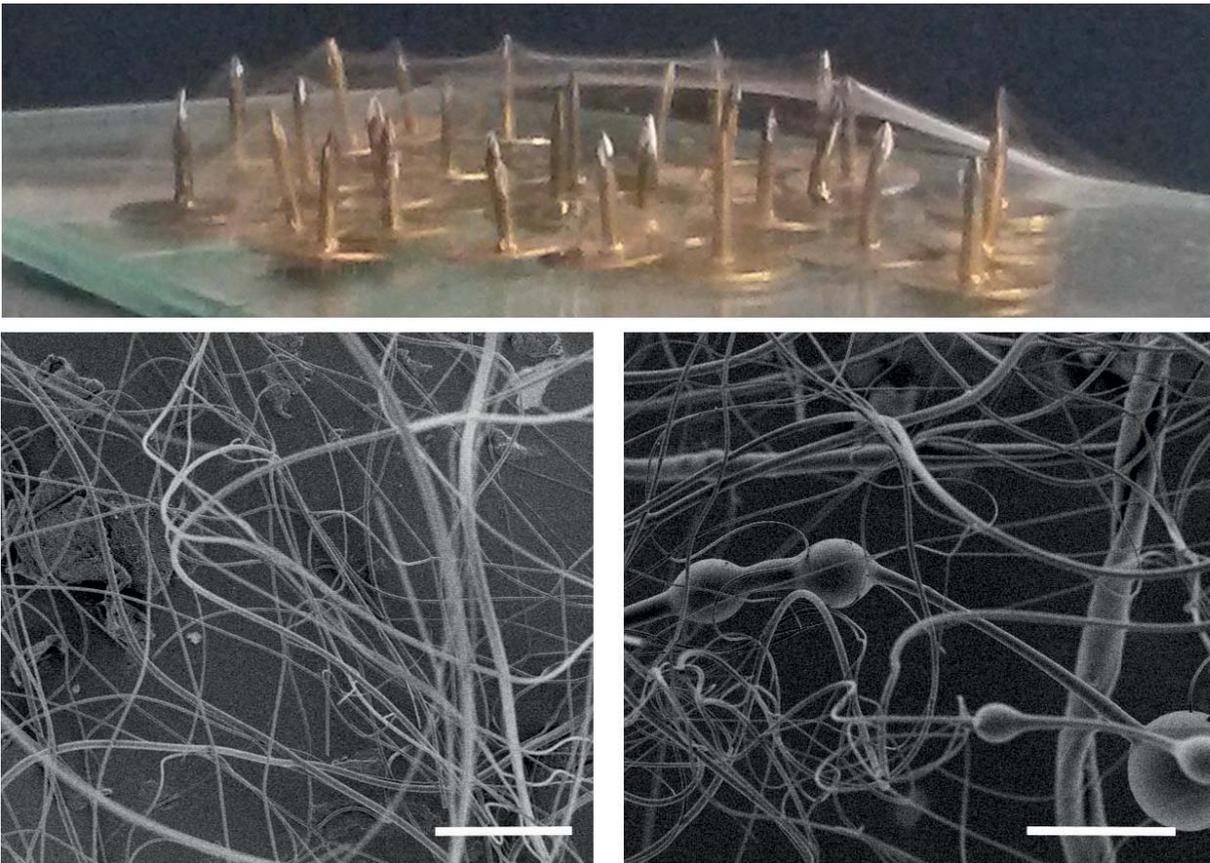
Der Einsatz des PEOx<sub>240</sub> für die Synthese der Nanofasern zeigte keine Verbesserung gegenüber dem PEOx<sub>120</sub> (Abb. 5.38). Hier wurden Spiegel als Kollektor benutzt, die eine leichte Ablösung der Fasern gewährleisten sollten (182), diese Methode war jedoch nicht erfolgreich.



**Abbildung 5.38: Foto und REM-Aufnahmen (186) von elektrogesponnenem PEOx (DP<sub>set</sub> 50 und 240), 60:40 (w/w)/HEA. Spannung 20 kV, Pumprate 0,001  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Länge des Balkens 10  $\mu\text{m}$ .**

Das Foto (Abb. 5.38, links) zeigt die erfolgreiche Bildung von Nanofasern zwischen den Spitzen der Reißzwecken, das Vlies ist jedoch nicht sehr dicht. Die Auswertung der REM-Aufnahmen von 150 Fasern ergab Faserdurchmesser von  $1090 \pm 655$  nm. Auch diese Fasern lösten sich nach der UV-Bestrahlung innerhalb einer Stunde vollständig auf.

In einem weiteren Versuch sollte direkt unter inerten Bedingungen versponnen werden, in der Erwartung den Auflösungsprozess so direkt zu unterbinden und langzeitstabile Fasern zu erhalten. Dafür wurde die komplette Spinnapparatur während des Spinnens mit Stickstoff geflutet. Die resultierenden Fasern zeigen mit  $1180 \pm 1040$  nm (es wurden Durchmesser von 300 Fasern bestimmt) einen Durchmesser ähnlich dem der ohne Stickstoffatmosphäre versponnenen Fasern (Abb. 5.39).



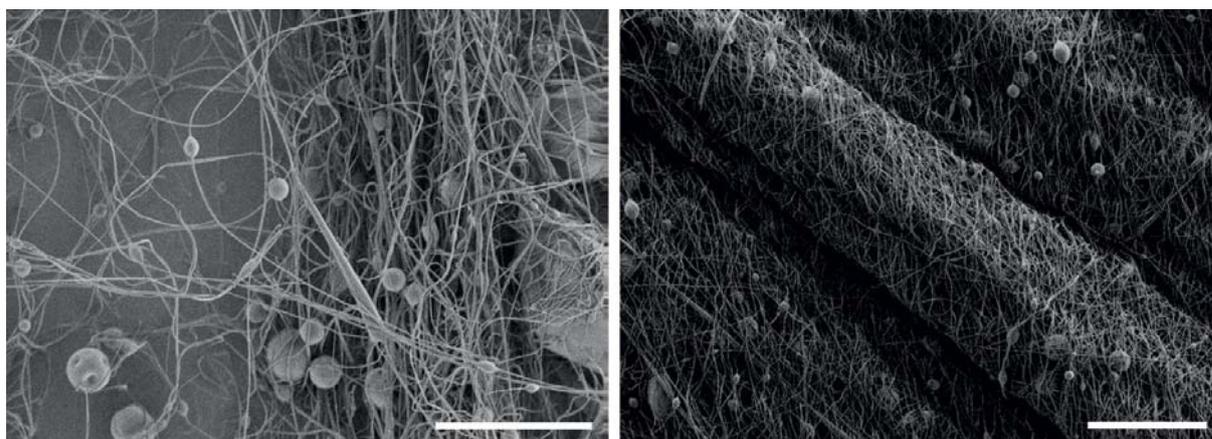
**Abbildung 5.39: Foto (oben) und REM-Aufnahmen von elektrogesponnenem PEtOx ( $DP_{\text{set}} = 50$  und  $240$ ),  $60:40$  (w/w)/HEA. Spannung  $20$  kV, Pumprate  $0,001 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Länge des Balkens links  $40 \mu\text{m}$ , rechts  $50 \mu\text{m}$ .**

Die REM-Aufnahmen zeigen überwiegend homogene Fasern, stellenweise treten dennoch Verdickungen auf. Auch bei diesen Fasern beginnt der Auflösungsprozess bei Kontakt mit der Umgebungsluft. Die Vernetzungsreaktion ist zumindest unvollständig und kann die Faserauflösung nicht verhindern.

Insgesamt war mit diesen Prozessparametern also eine Ausbildung von Fasern erfolgreich, auch wenn diese einen mittleren Durchmesser im einstelligen  $\mu\text{m}$ -Bereich aufwiesen und zum Teil eine große Verteilungsbreite aufwiesen. Ein Verspinnen mit HEA als Lösemittel war dabei nicht erfolgreich, erst die Reduktion des HEA-Anteils in der Spinnlösung und Zugabe von Wasser als Lösemittel zeigte hier Erfolg. Die Fasern waren, trotz langer UV-Bestrahlungszeiten und teilweiser Herstellung/Lagerung in inerter Atmosphäre, nicht formbeständig und lösten sich bei Kontakt mit Umgebungsluft innerhalb kurzer Zeit auf.

Die Zugabe von PEtOx<sub>5000</sub> als Strukturkomponente zeigte deutliche Verbesserungen bezüglich der erhaltenen Fasern. Bei den folgenden Versuchen wurde zunächst vollständig auf die

Zugabe von HEA verzichtet, um die Parametereinflüsse so gering wie möglich zu halten. Dabei wurde der Anteil an PEOx<sub>5000</sub> auf 15 Gew% und der Anteil an kürzerkettigen PEOx-Polymeren ( $DP_{\text{set}} = 50$  oder 20) zu 5 Gew% festgelegt, was in einer hohen Anzahl von Beads resultierte (Abb. 5.40, links). Auch eine Erhöhung der kürzerkettigen Polymerkomponente auf 10 Gew% brachte kaum Besserung (Abb. 5.40, rechts). Eine Zugabe von HEA (5 Gew% in der Spinnlösung) verschlechterte die Qualität der Fasern, neben des ebenfalls enormen Beadanteils waren die Fasern hier feucht und klebten zusammen, so dass auf die Zugabe von HEA vollständig verzichtet wurde.



**Abbildung 5.40: REM-Aufnahmen von elektrogesponnenen PEOx-Mischungen. Parameter von links nach rechts (Anteil PEOx<sub>5000</sub>, Anteil PEOx<sub>50</sub>, Spannung, Flussrate): 15 Gew%, 5 Gew%, 30 kV, 0,001  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ; 15 Gew%, 10 Gew%, 30 kV, 0,012  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Länge der Balken jeweils 20  $\mu\text{m}$ .**

Erst eine weitere Erhöhung des kürzerkettigen Polymers auf 15 Gew%, d.h. ein Verhältnis der Polymere von 1:1 (w/w) resultierte in einer homogenen Faserbildung nahezu ohne Beads (Abb. 5.41, rechts).

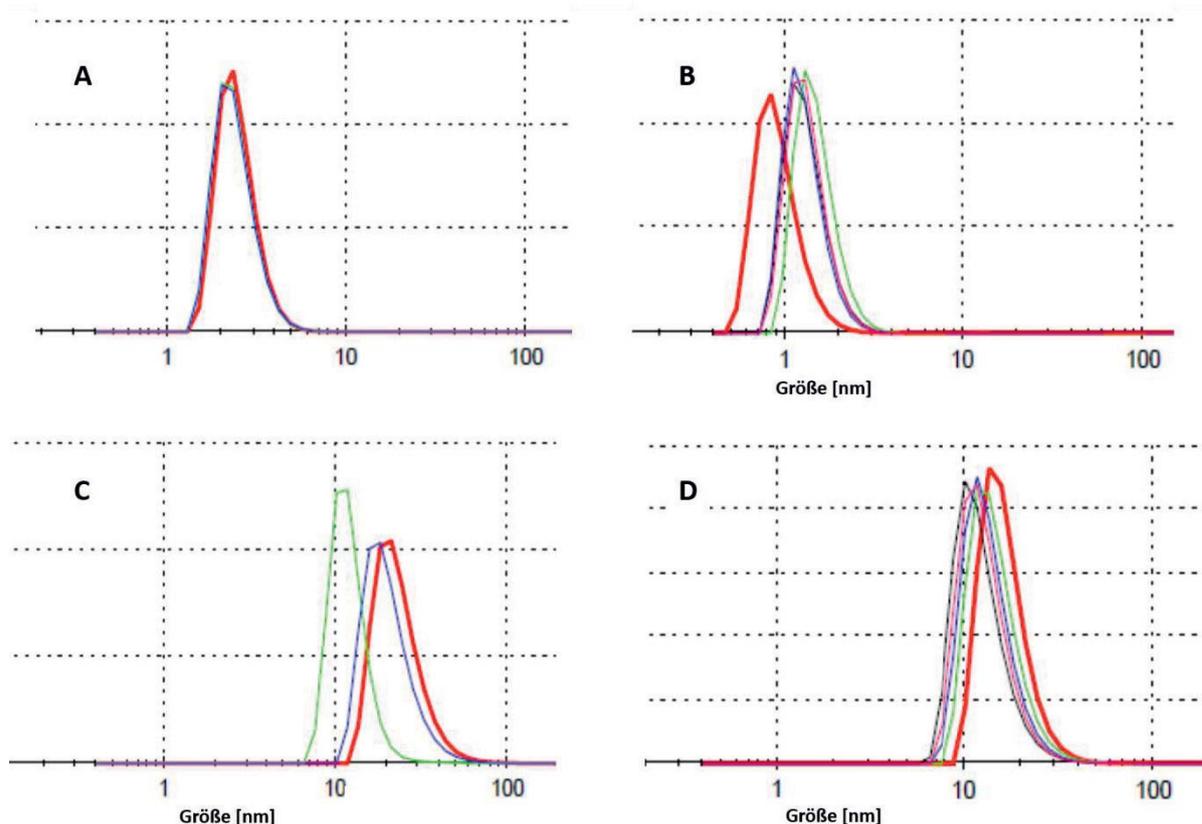


**Abbildung 5.41: Elektrospinprozess von PEOx-Mischungen ( $DP_{\text{set}} = 5000$  und  $DP_{\text{set}} = 20$ , jew. 15 Gew% in der Spinnlösung) Links: Foto der Faserherstellung. Mitte: Foto der gesponnenen Nanofasern. Rechts: REM-Aufnahme der elektrogewonnenen Fasern. Spannung 24 kV, Flussrate  $0,001 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ ; Länge des Balkens 5  $\mu\text{m}$ .**

Die Fotos zeigen die erfolgreiche Verspinnung und das erhaltene dichte Faservlies dieses Versuches (Abb. 5.41, links und Mitte). Die REM-Aufnahme zeigt homogene PEOx-Fasern nahezu ohne Ausbildung von Beads. Der Durchmesser zeigt eine recht breite Verteilung von  $285 \pm 132$  nm. Da dies jedoch den gewünschten Größenbereich trifft, werden sie für die folgenden Versuche als geeignet angesehen.

Da der Erfolg der Vernetzung u.a. von der Anzahl der potentiellen Vernetzungspunkte abhängt, und diese bei gleicher Einwaage bei PEOx<sub>20</sub> höher ist als bei PEOx<sub>50</sub>, wurden alle folgenden Versuche mit dem kürzeren Polymer durchgeführt.

Der Einfluss der Initiatormenge auf die Vernetzung wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) geprüft. Dafür wurde der Initiatorgehalt unter sonst gleichen Bedingungen zwischen 1,6 und 9 Gew% bezogen auf den Polymergehalt der Probe variiert. Die Verteilung des Initiators entlang der Faser sollte möglichst gleichmäßig sein, um eine vollständige Vernetzung zu erreichen. Darüber hinaus ist wahrscheinlich durch die Verstreckung und das Verdampfen des Lösemittels die Bewegungsfreiheit der Komponenten innerhalb der Faser reduziert, so dass vermutlich eine hohe Initiatorkonzentration vorteilhaft ist. Dafür wurden die versponnenen Fasern nach 45 minütiger UV-Bestrahlung in 3 mL ddH<sub>2</sub>O gegeben, 10 min stehen gelassen und die Lösung vor der Vermessung durch einen 0,25  $\mu\text{m}$  Spritzenvorsatzfilter filtriert (Abb. 5.42).

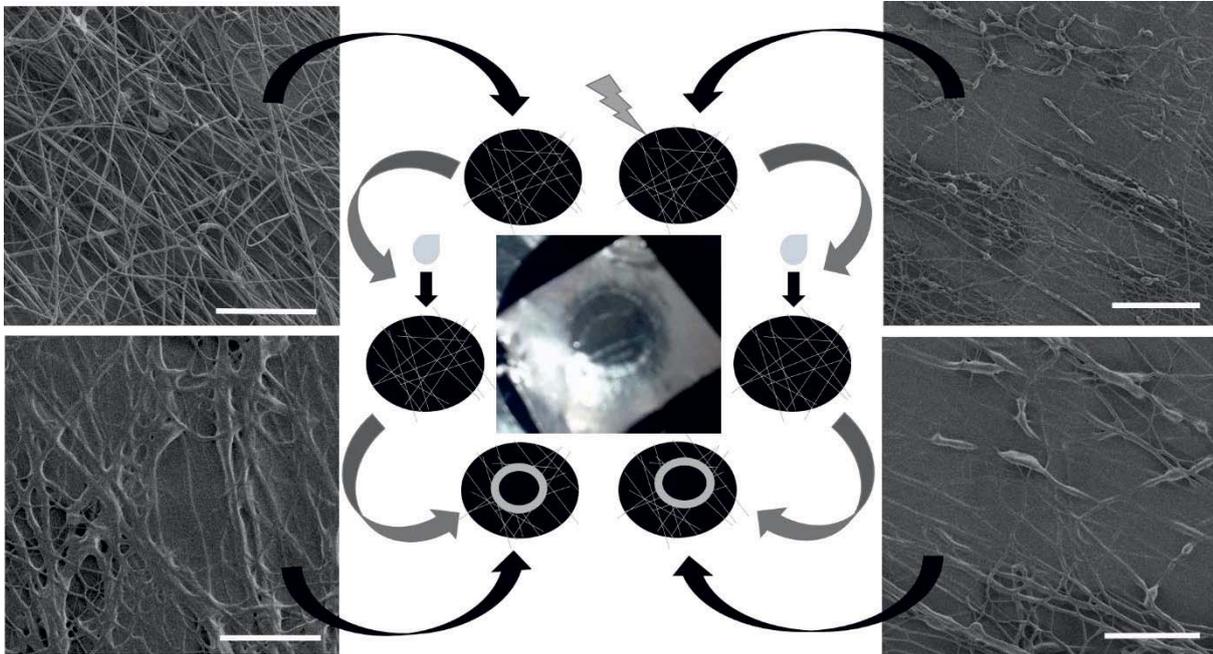


**Abbildung 5.42: Ergebnisse der DLS-Messungen. Aufgetragen ist die Anzahlverteilung der Partikelgröße im relevanten Bereich. A) PEtOx<sub>5000</sub>; B) PEtOx<sub>20</sub>; C) elektrogesponnene PEtOx-Nanofasern mit 1,6 Gew% I651; D) elektrogesponnene PEtOx-Nanofasern mit 9 Gew% I651.**

Die Auswertung der DLS-Messung ergibt für langkettiges PEtOx<sub>5000</sub> einen mittleren Durchmesser von 2,4 nm und kurzkettiges PEtOx<sub>20</sub> einen Durchmesser von 1,3 nm (Abb. 5.42, A und B). Der Unterschied erscheint zunächst nicht besonders groß, lässt sich aber durch wahrscheinlich aufgetretene Knäuelung und Agglomeration der Polymere erklären. Für die Nanofasern wurde erwartet, dass bei erfolgreicher Vernetzung kein Signal erhalten wird, da die Fasern im Vorsatzfilter zurückgehalten werden. Da für alle Initiator Mengen ähnliche Signale gemessen wurden, werden hier nur die Ergebnisse der niedrigsten und höchsten Konzentration gezeigt (Abb. 5.42, C und D). Dabei treten Signale bei 20 nm und 13 nm auf, was auf eine mangelnde Vernetzung hinweist. Die Abwesenheit von Signalen im Bereich der Reinstoffe lässt jedoch auf eine zumindest teilweise erfolgte Vernetzung schließen, die offensichtlich unabhängig von der Initiatorkonzentration auftritt.

Um den Erfolg der Vernetzung direkt zu prüfen, wurde ein Teil der versponnenen Fasern für 45 Minuten mit UV-Licht bestrahlt, während der andere Teil keiner gezielten

Vernetzungsreaktion unterworfen wurde. Beide Proben wurden unter dem REM untersucht und anschließend ein Tropfen Wasser oder Chloroform auf die Probe gegeben. Eine erneute REM-Untersuchung sollte zeigen, ob die Faserstruktur erhalten geblieben ist (Abb. 5.43).



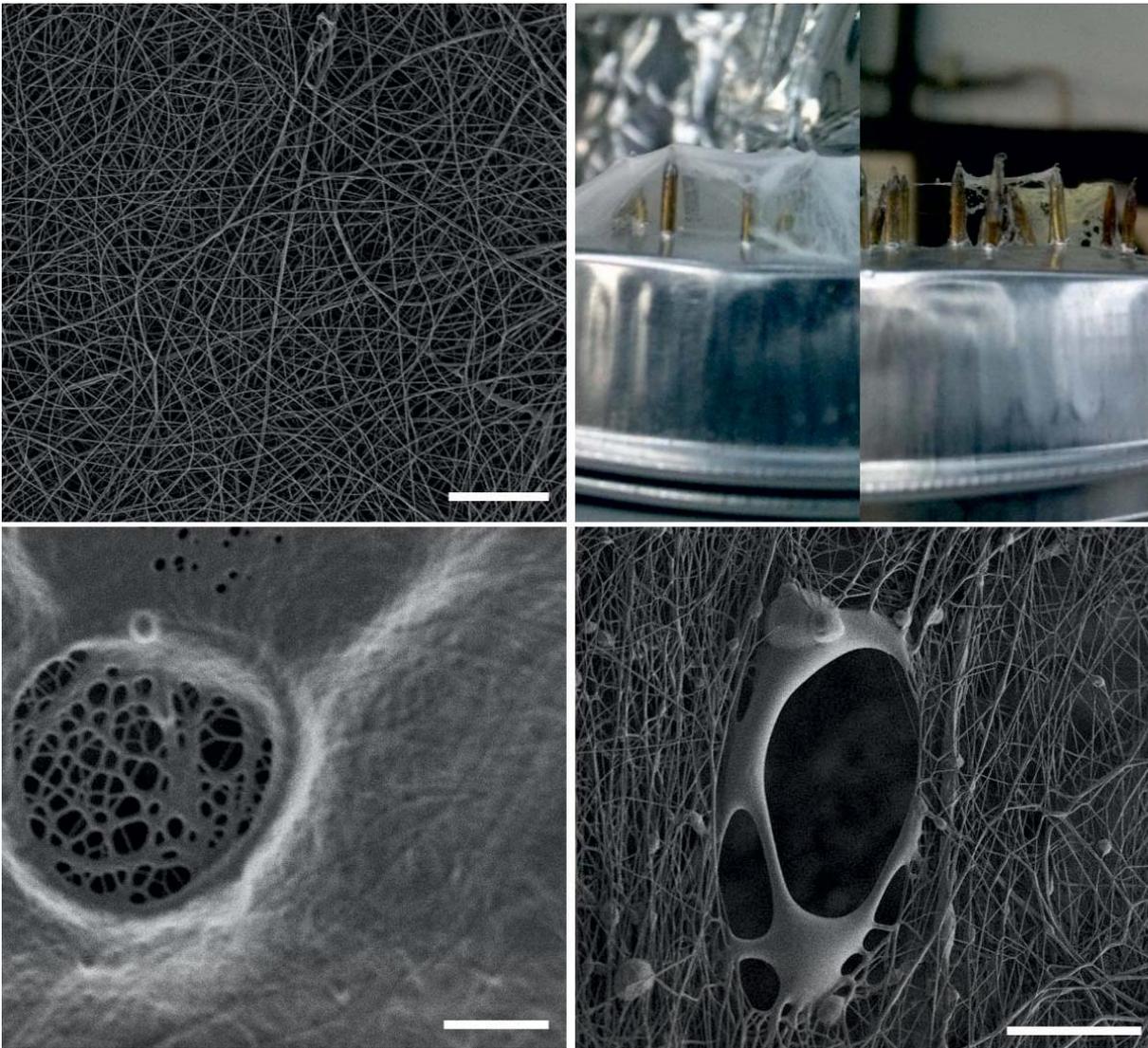
**Abbildung 5.43:** REM-Aufnahmen und Foto von elektrogesponnenen PEtOx-Fasern ( $DP_{\text{set}} = 5000$  und  $DP_{\text{set}} = 20$ , jew. 15 Gew% in der Spinnlösung) sowie Schema des Versuches. Schema (kleine Pfeile): Die unvernetzte (oben links) und die vernetzte (oben rechts, Vernetzung angedeutet durch Blitz) Faserprobe wurden jeweils an einer Stelle mit einem Tropfen ddH<sub>2</sub>O benetzt (Mitte). Dort wo die Fasern mit der Flüssigkeit in Berührung gekommen sind gibt es in beiden Fällen keine Fasern mehr, angedeutet durch den leeren Kreis (unten). Der breite Ring (unten) stellt den Randbereich dar, indem die Fasern stark zerstört vorliegen. Die REM-Aufnahmen (große Pfeile) zeigen die unvernetzte (oben links) und die vernetzte (oben rechts) Faserprobe vor der Behandlung mit ddH<sub>2</sub>O sowie die Randbereiche (im Schema dargestellt durch den breiten Ring) nach der Benetzung (unten links unvernetzte Probe, unten rechts vernetzte Fasern). Länge der Balken oben links und unten rechts 30  $\mu\text{m}$ , unten links 40  $\mu\text{m}$ , oben rechts 60  $\mu\text{m}$ . Die unvernetzten Fasern wurden bei 20 kV und einer Flussrate von  $0,007 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$  versponnen, die vernetzten Fasern bei 20 kV und  $0,005 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Das Foto in der Mitte zeigt die unvernetzten Fasern nach der Behandlung mit ddH<sub>2</sub>O.



Sowohl die vernetzte als auch die unvernetzte Probe zeigen vor der Benetzung mit ddH<sub>2</sub>O homogene, sphärische Fasern ohne Verklebungen oder Beads (Abb. 5.43, oben). Nach der Vernetzung zeigen beide Proben verklebte Regionen mit kaum noch erkennbarer Faserstruktur (Abb. 5.43, unten). Das Foto der Probe (Abb. 5.43, Mitte) zeigt, dass an der Stelle, wo der Tropfen gelandet ist, keine Fasern oder sonstige Polymerstrukturen erhalten geblieben sind. Die REM-Aufnahmen nach der Benetzung wurden aus der Randschicht der Region aufgenommen wurden, auf der der Lösemitteltropfen gelandet ist. Für die unvernetzte Probe entspricht das Ergebnis den Erwartungen, sowohl Wasser als auch Chloroform sind gute Lösemittel für PEtOx, so dass die Faserstruktur bei Kontakt aufgelöst wird. Dass die UV-bestrahlte Probe das gleiche Ergebnis zeigt, bedeutet dass die Vernetzung nicht erfolgreich war. Daraufhin wurde untersucht, ob durch Zugabe von Glycerindimethacrylat (GDMA) eine ausreichende Erhöhung der reaktiven Gruppen erreicht werden kann, die eine vollständige Vernetzung gewährleistet. Dabei wurden der Anteil des langkettigen PEtOx konstant bei 15 Gew% gehalten, PEtOx<sub>20</sub> und GDMA wurden im Verhältnis 2:1, 4:1 und 14:1 eingesetzt bei jeweils insgesamt 15 Gew% der Spinnlösung. Die Proben wurden nach dem Spinnprozess für 45 Minuten mit UV-Licht bestrahlt und anschließend im REM untersucht.

Ein hoher Gehalt an GDMA führte dabei zur Ausbildung einer homogenen Schicht auf dem Kollektor, die keinerlei Struktur zeigte. Nach dem Auftropfen von Chloroform änderte sich diese Schicht nicht, so dass zwar von einer erfolgreichen Vernetzung ausgegangen wurde, die jedoch ohne Ausbildung von Nanofasern keine Bedeutung hat.

Eine Reduktion des GDMA-Anteils führte in beiden Fällen zu einer Fasersynthese. Bei 1 Gew% GDMA wurden homogene, beadfreie Fasern mit einem Durchmesser von  $180 \pm 62$  nm erhalten, die jedoch durch Kontakt mit Chloroform zerstört wurden (Abb. 5.44).

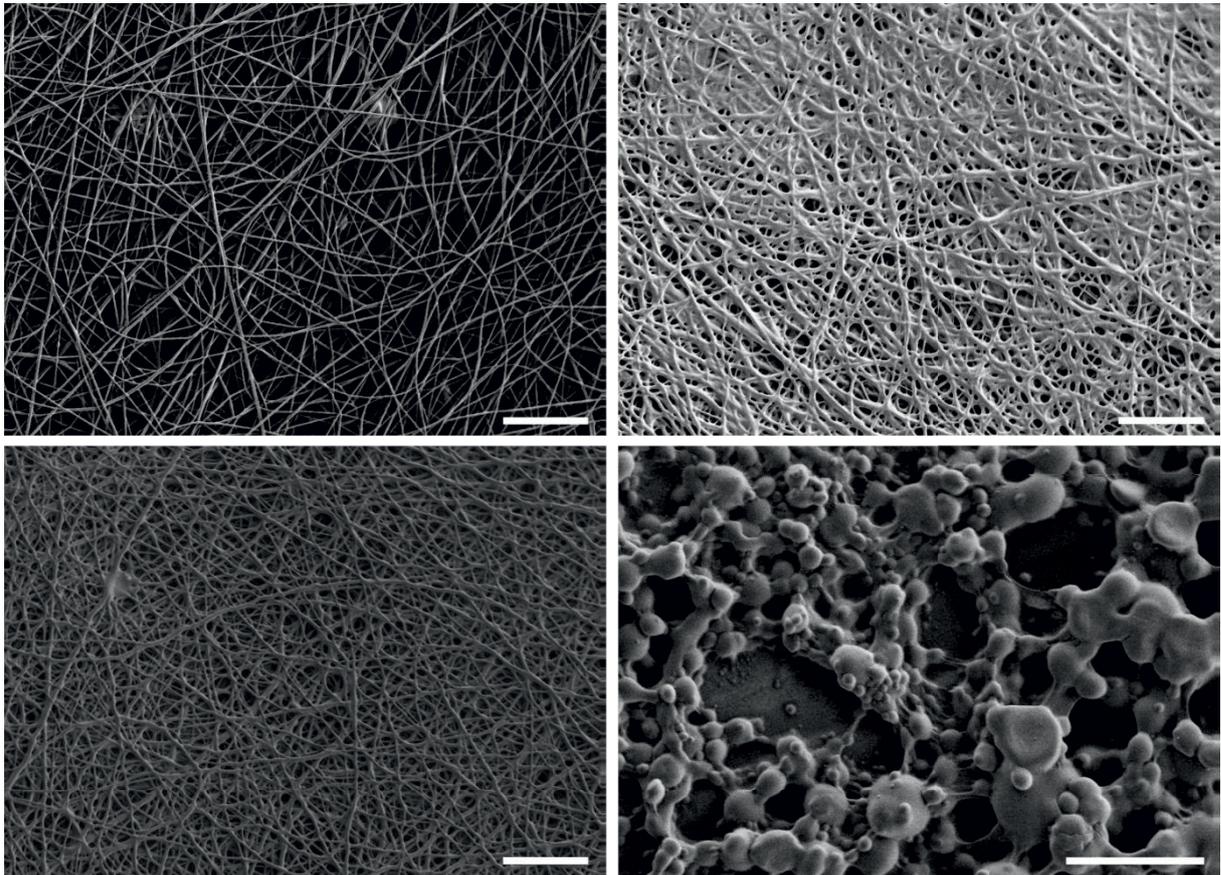


**Abbildung 5.44: Elektrogesponnene PETox/GDMA-Fasern (Verhältnis PETox<sub>5000</sub>/ PETox<sub>20</sub>/ GDMA 15:14:1, insgesamt 30 Gew% in der Spinnlösung). Spannung 20 kV, Flussrate  $0,007 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Oben links: REM-Aufnahme der UV-bestrahlten Probe. Oben rechts: Foto der Fasern vor und nach der Benetzung mit CHCl<sub>3</sub>. Unten: REM-Aufnahmen der Fasern nach Kontakt mit CHCl<sub>3</sub>. Die Länge der Balken oben und unten links beträgt 10 µm, unten rechts 70 µm.**

Auch hier wurden die REM-Aufnahmen nach dem Kontakt mit Lösemittel aus den Randbereichen der Tropfenaufgabe aufgenommen (Abb. 5.44, unten). Das Foto zeigt die nahezu vollständige Zerstörung der Fasern durch den Lösemittelkontakt (Abb. 5.44, oben rechts).

Die Probe mit 3 Gew% GDMA in der Spinnlösung schien zunächst eine erhöhte Stabilität gegenüber Chloroform aufzuweisen, sie zeigte in den Randbereichen der Kontaktfläche mit Chloroform zwar feuchte und verklebte Fasern, die Faserstruktur ist hier jedoch noch zu

erkennen (Abb. 5.45 oben). Daher wurde die Probe über Nacht in Chloroform-gesättigter Atmosphäre gelagert.



**Abbildung 5.45:** REM-Aufnahmen der elektrogesponnenen und UV-bestrahlten PEOx/GDMA-Fasern (Verhältnis PEOx<sub>5000</sub>/ PEOx<sub>20</sub>/ GDMA 15:12:3, insgesamt 30 Gew% in der Spinnlösung). Spannung 20 kV, Flussrate 0,007  $\frac{\text{mL}}{\text{min}}$ . Oben links: Probe vor Lösemittelkontakt. Oben rechts: Probe nach Kontakt mit CHCl<sub>3</sub>. Unten links: Probe nach Lagerung an Luft über Nacht. Unten rechts: Probe nach Lagerung in Chloroform-gesättigter Atmosphäre über Nacht. Die Länge der Balken oben und unten links beträgt 10  $\mu\text{m}$ , unten rechts 20  $\mu\text{m}$ . (189)

Während die Fasern nach einer Nacht an Luft gut erhalten blieben, trotz ersten Verklebungen an den Kontaktstellen (Abb. 5.45, unten links), zeigt die in Chloroform-gesättigter Luft gelagerte Probe eine Neustrukturierung der Fasern zu kugelförmigen Gebilden hin (Abb. 5.45, unten rechts). Damit wurde auch für GDMA-haltige PEOx-Nanofasern keine vollständige Vernetzung erreicht.

Insgesamt wurde damit trotz langer Bestrahlungszeiten mit UV-Licht von 45 Minuten keine ausreichende Vernetzung erreicht. Die Zugabe von HEA führte im Allgemeinen zu einer geringeren Faserqualität. Mit PEOx<sub>5000</sub> als Stützkomponente können homogene Fasern im



Nanometerbereich hergestellt werden, die nach längerer Lagerung an Luft (über Nacht) ihre Faserstruktur beibehalten und nur an den Kontaktstellen verkleben. Bei Kontakt mit Lösemitteln bleibt die Faserform nicht erhalten, auch die Zugabe des niedermolekularen Vernetzers GDMA zeigte keine wesentliche Verbesserung. Daher wurde für die Versuche zur Enzymträgerung auf eine Vernetzung verzichtet. Somit wird auch die Zugabe der kurzkettigen PEtOx-Polymere unnötig, was den Spinnprozess weiter vereinfacht.

### 5.5.3. Nanofasern als Träger für Biokatalysatoren

Die Eignung der Nanofasern als Träger wurde für CaL B in unterschiedlichen Beladungen sowie Polymerkonzentrationen geprüft. Im Anschluss wurden unterschiedliche Enzyme eingeschlossen und jeweils deren Restaktivität und Aktivität in organischen Lösemitteln untersucht. Der Literaturvergleich soll zeigen, ob Nanofasern als Trägermaterial einen Vorteil gegenüber anderen Verfahren zeigen.

#### *5.5.3.1. Vergleich der unterschiedlichen Trägersysteme*

Um einen direkten Vergleich der Aktivität der geträgerten CaL B ziehen zu können, wurden Netzwerke bestehend aus PEtOx<sub>5000</sub> und PEtOx<sub>20</sub> (als vernetzende Komponente) im Verhältnis 1 zu 1 synthetisiert und CaL B (0,2 Gew%) direkt einpolymerisiert. Die erhaltenen Netzwerke wiesen Trübungen auf (Abb. 5.46, links), waren aber nicht klebrig und insgesamt mechanisch stabil und gut handhabbar. Diese Netzwerke wurden in der Cryomühle in 13 Zyklen von 6 s zu je 4 Hz zermahlen, mit einer Kühlzeit von 1,5 min zwischen den einzelnen Mahlzyklen und einer Vorkühlzeit von 10 min (Abb. 5.47). Weiterhin wurden Nanofasern hergestellt, die ebenfalls aus PEtOx<sub>5000</sub> und PEtOx<sub>20</sub> (1 zu 1 (w/w)) bestanden, mit einem Gesamtpolymergehalt von 30 Gew% in der Spinnlösung und 0,2 Gew% CaL B bezogen auf die Polymere.



**Abbildung 5.46:** Fotos eines Polymernetzwerkes bestehend aus  $\text{PEtOx}_{5000}/\text{PEtOx}_{20}$  im Verhältnis 1 zu 1 (w/w). Links: Netzwerke direkt nach der Synthese. Rechts: Netzwerke nach Lagerung bei  $-20^\circ\text{C}$ .

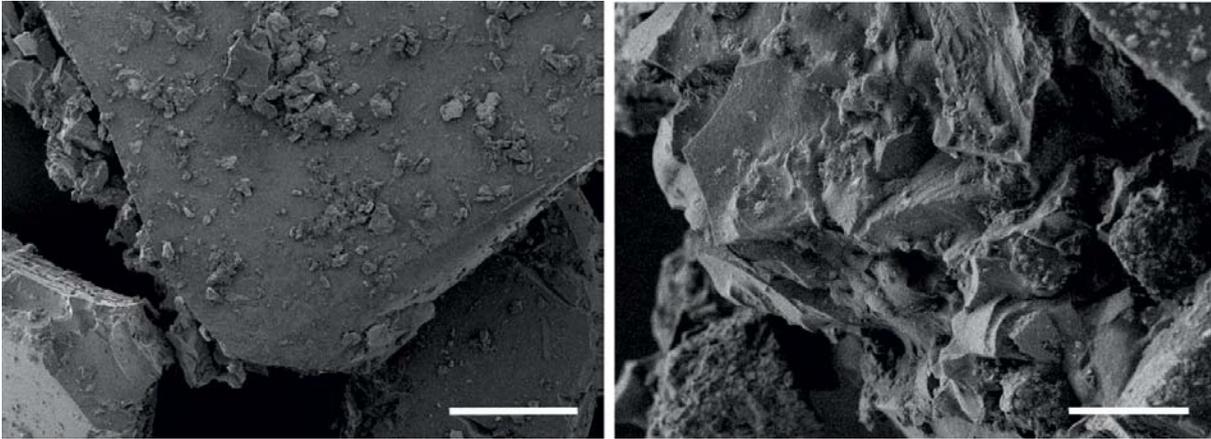
Alle Assays wurden bei  $37^\circ\text{C}$  in *n*-Heptan durchgeführt, untersucht wurde die Veresterung von Laurinsäure und Oktanol (Tab. 5.11).

**Tabelle 5.11:** Vergleich der Aktivitäten von CaL B geträgert auf unterschiedlichen Trägersystemen. Für alle Träger wurde ein Polymergemisch aus  $\text{PEtOx}_{5000}$  und  $\text{PEtOx}_{20}$  im Verhältnis 1 zu 1 (w/w) eingesetzt. Der CaL B Gehalt beträgt 0,2 Gew%. Untersucht wurde die Veresterung von Laurinsäure und Oktanol bei  $37^\circ\text{C}$  in *n*-Heptan. Bei den gezeigten Ergebnissen wurden die Restaktivitäten nicht berücksichtigt. Die Nanofasern wurden bei 20 kV und  $0,003 \frac{\text{mL}}{\text{min}}$  versponnen.

Träger	$Z_{\text{spez}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{g}} \right]$	$Z_{\text{NF}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{g}} \right]$
Netzwerk	$720 \pm 210$	$1,7 \pm 0,5$
Partikel	$800 \pm 170$	$1,9 \pm 0,4$
Nanofaser	$2340 \pm 320$	$4,7 \pm 0,6$

Überraschenderweise steigt die Aktivität der CaL B durch das Mahlen der Netzwerke nicht signifikant an ( $720 \pm 210 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  im Falle der Netzwerke,  $800 \pm 170 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  im Falle der Mikropartikel). Das steht im Widerspruch zu den Ergebnissen aus Kapitel 4.4.1, hier wurde durch die Verringerung der Trägerdimension durch Mahlen der Netzwerke nahezu eine Verdoppelung der Aktivität erreicht. Der Hauptgrund wird hier in der Qualität der erhaltenen Partikel liegen. Die REM-Aufnahmen (Abb. 5.47) zeigen dass viele große Partikel mit Dimensionen größer als

100 µm erhalten wurden, während die Bereiche kleinerer Partikel häufig starke Verbackungen aufweisen. Wie bereits in Kap. 5.4 diskutiert, könnte das Enzym durch die hohe Wärmeentwicklung in den verbackenen Regionen denaturieren und es ist unklar, wie sich die Verbackungen auf die Substrat- und Produktdiffusion auswirken.



**Abbildung 5.47: REM-Aufnahmen von Mikropartikeln aus PEtOx<sub>5000</sub>/PEtOx<sub>20</sub>-Netzwerken (1:1 w/w). Die Netzwerke wurden für 10 Minuten in flüssigem Stickstoff vorgekühlt, und für 13 Zyklen je 6 Sekunden gemahlen (Schlagrate 4 Hz). Die Zeit zwischen den einzelnen Mahlvorgängen betrug jeweils 90 Sekunden. Die Länge der Balken beträgt links 100 µm, rechts 10 µm.**

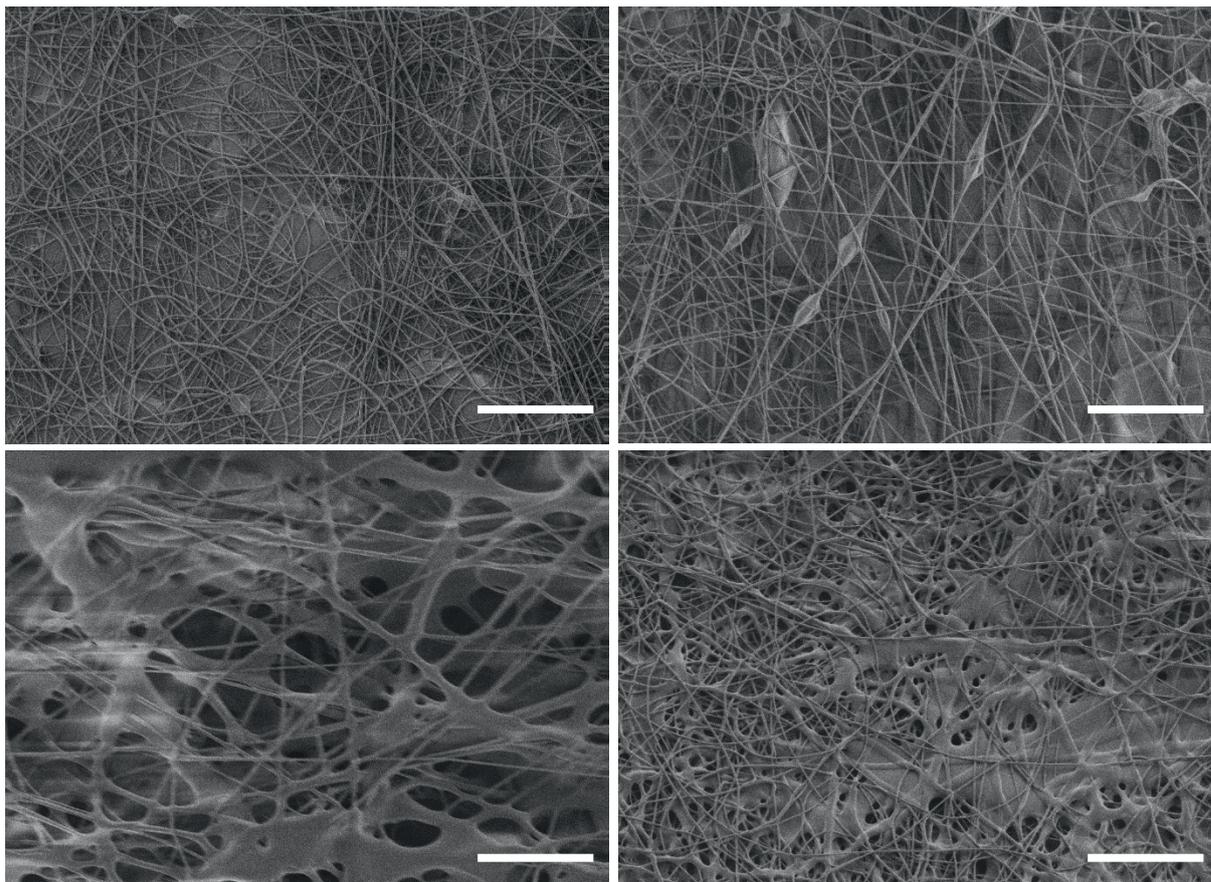
Darüber hinaus ist durch die Trübung der Netzwerke keine homogene Verteilung des Enzyms im Netzwerk gewährleistet. Zudem wiesen die Netzwerke nach Lagerung bei -20°C über Nacht reversible Veränderungen auf (Abb. 5.46, links), die wahrscheinlich durch die Kristallisation des im Netzwerk gespeicherten Wassers auftreten. Dadurch kann es ebenfalls zu Denaturierung der geträgerten Enzyme kommen (191).

Die Aktivität der in Nanofasern geträgerten CaL B ist mit  $2337 \pm 317 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  um den Faktor 2,9 höher als die der Mikropartikel-geträgerten CaL B, womit das Potential der PEtOx-Nanofasern gegenüber den anderen Systemen gezeigt werden konnte.

#### 5.5.3.2. Beladungsmessungen mit CaL B

Zunächst wurde, in Anlehnung an Al-Shehri *et al.* und Buruaga *et al.*, die mögliche CaL B-Beladung bei einem Polymergehalt der Spinnlösung von 25 Gew% untersucht (Abb. 5.47, Abb. 5.48, Tab. 5.14) (113, 192). Dabei wurde die erfolgreiche Faserbildung mittels REM überprüft.

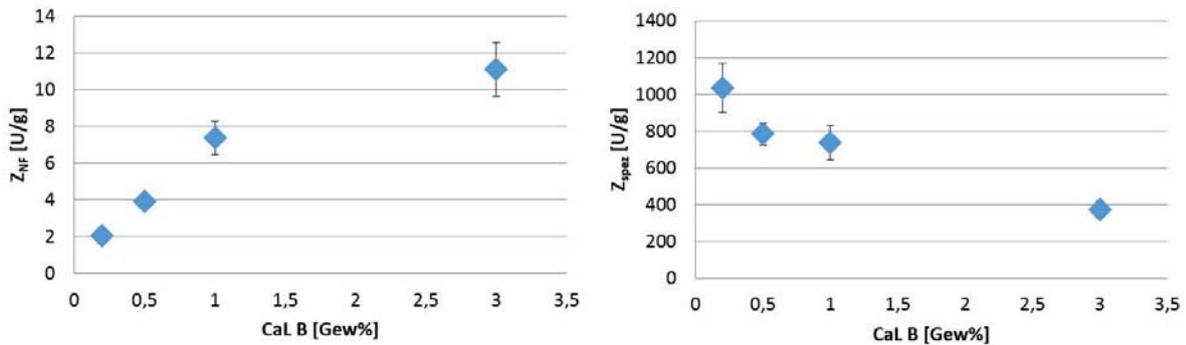
Bereits bei 0,2 Gew% Enzymbeladung verdoppelt sich der Durchmesser der Fasern verglichen zu PEOx-Nanofasern ohne Enzymbeladung (Abb. 5.47). Zudem wurden hier bereits erste Beads gebildet. Eine weitere Erhöhung auf 0,5 Gew% CaL B resultiert in der Produktion von Fasern, die über weite Bereiche zusammenkleben und flache Regionen ausbilden anstatt der sphärischen Fasern. Bei einer Enzymbeladung von 3 wt% sind die Fasern nahezu vollständig verklebt.



**Abbildung 5.47: REM-Aufnahmen von PEOx-Nanofasern. Oben links ohne Additiv, oben rechts mit 0,2 Gew% CaL B, unten links 0,5 Gew%, unten rechts 3 wt% (bezogen auf die Menge des Polymers). Der Polymergehalt der Spinnlösung beträgt in allen Proben 25 Gew%. Die Länge aller Balken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . (189)**

Bei diesem heterogenen Katalysatorsystem steigt die Trägeraktivität mit steigendem Enzymgehalt, während die spezifische Aktivität bei der geringsten Beladung am höchsten ist (Abb. 5.48). Dieser Aktivitätsverlauf ist bereits von dem Trägersystem aus PHEA-/PEOx-APCNs geträgert mit RmL bekannt (Kap. 5.3) und lässt auf Diffusionslimitierungen schließen,

die wahrscheinlich in der schlechter werdenden Faserqualität begründet liegen. Dabei liegen die maximal erreichten Aktivitäten bei  $Z_{NF} = 11,1 \pm 1,5 \frac{U}{g}$  und  $Z_{spez} = 1107 \pm 33 \frac{U}{g}$  (Tab. 5.12).

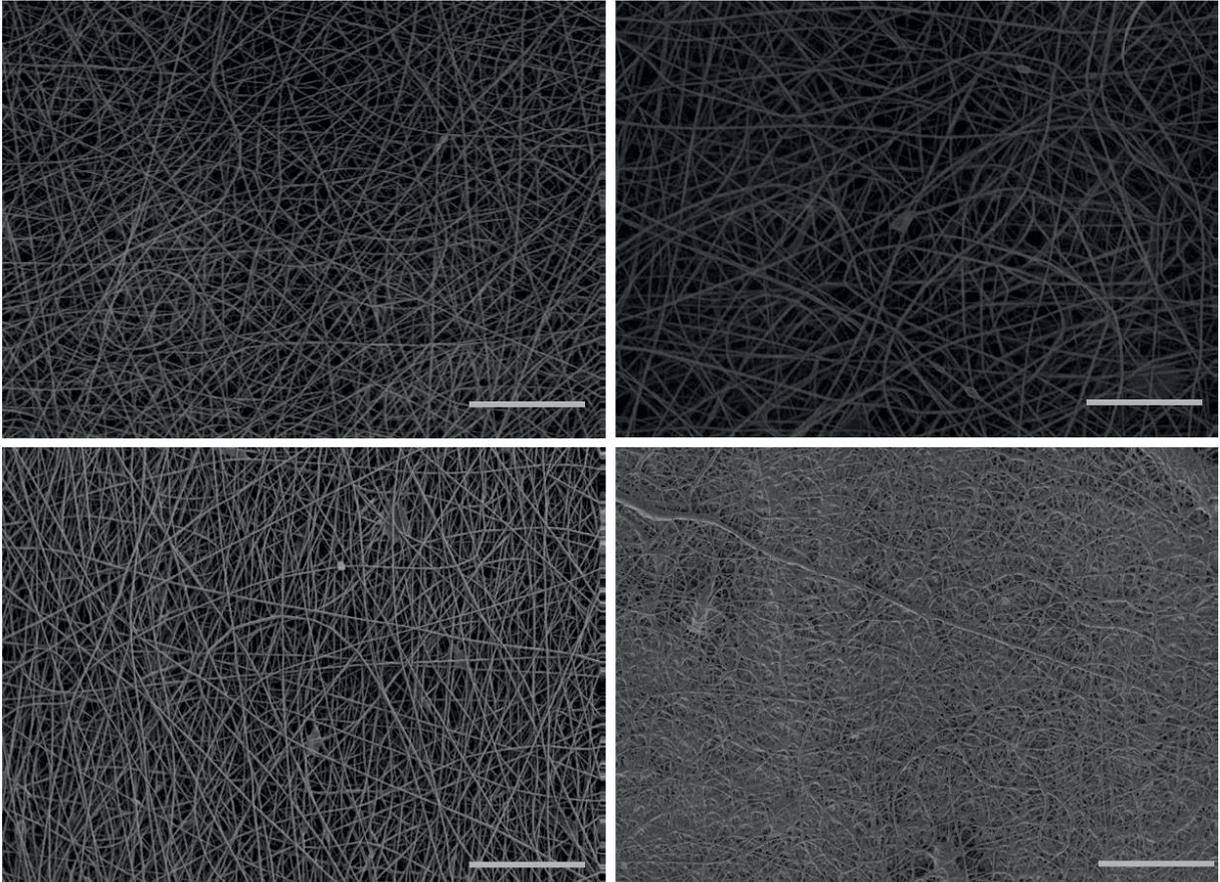


**Abbildung 5.48: Trägeraktivität (links) und spezifische Aktivität (rechts) von CaL B geträgert in PEOx-Nanofasern. Der Polymergehalt der Spinnlösung beträgt 25 Gew%. Die Aktivität wurde bestimmt anhand der Veresterung von 1-Oktanol mit Laurinsäure bei 37 °C. 1 U zeigt die Bildung von 1  $\mu$ mol Ester pro Minute an. (189)**

**Tabelle 5.12: Spezifische ( $Z_{spez}$ ) und Trägeraktivität ( $Z_{NF}$ ) von CaL B geträgert in PEOx<sub>5000</sub>-Nanofasern bei verschiedenen Beladungen. Der Polymergehalt der Spinnlösung lag in allen Fällen bei 25 Gew%. Die maximal erreichten Werte sind hervorgehoben.**

CaL B-Beladung [Gew%]	$Z_{spez} \left[ \frac{U}{g} \right]$	$Z_{NF} \left[ \frac{U}{g} \right]$
0,2	<b>1030 <math>\pm</math> 135</b>	2,1 $\pm$ 0,3
0,5	783 $\pm$ 60	3,9 $\pm$ 0,2
1,0	737 $\pm$ 91	7,4 $\pm$ 0,9
3,0	371 $\pm$ 49	<b>11,1 <math>\pm</math> 1,5</b>

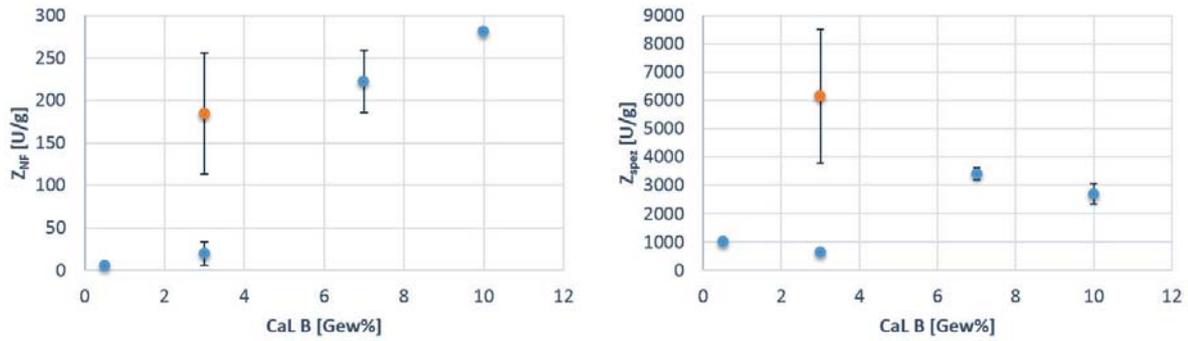
Eine Erniedrigung des Polymergehaltes auf 20 Gew% in der Spinnlösung erlaubte Enzymbeladungen bis zu 10,4 Gew%, wobei bis zu einem Gehalt von 6,5 Gew% CaL B homogene Fasern mit Durchmessern zwischen 240 und 560 nm erhalten wurden (Abb. 5.49).



**Abbildung 5.49: REM-Aufnahmen von PETox-Nanofasern, beladen mit CaL B (CaL B-Gehalt oben links 0,5 Gew%, oben rechts 3,0 Gew%, unten links 6,5 Gew%, unten rechts 10,4 Gew%). Der Polymergehalt der Spinnlösung beträgt für alle Proben 20 Gew%. Die Länge aller Balken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . (189)**

Eine Beladung von 10,4 Gew% CaL B resultierte in feuchten, verklebten Matten, bei denen die Fasern nur ansatzweise erkennbar sind (Abb. 5.49, rechts unten).

Die gemessenen Aktivitäten legen eine starke Aktivierung des Enzyms nahe (Abb. 5.50, Tab. 5.13).



**Abbildung 5.50: Trägeraktivität (links) und spezifische Aktivität (rechts) von CaL B geträgert in PEtOx-Nanofasern. Der Polymergehalt der Spinnlösung beträgt 20 Gew%. Die Aktivität wurde bestimmt anhand der Veresterung von 1-Oktanol mit Laurinsäure bei 37 °C. 1 U zeigt die Bildung von 1  $\mu$ mol Ester pro Minute an. Der dargestellte Wert bei 3 Gew% CaL B und  $Z_{NF} = 185 \pm 63 \frac{U}{g}$  bzw.  $Z_{spez} = 6160 \pm 2100 \frac{U}{g}$  zeigt die Reproduktion durch R. Plothe (193). (189)**

**Tabelle 5.13: Spezifische ( $Z_{spez}$ ) und Trägeraktivität ( $Z_{NF}$ ) von CaL B geträgert in PEtOx<sub>5000</sub>-Nanofasern bei verschiedenen Beladungen. Der Polymergehalt der Spinnlösung lag in allen Fällen bei 20 Gew%. Die maximal erreichten Werte sind hervorgehoben.**

CaL B-Beladung [Gew%]	$Z_{spez} \left[ \frac{U}{g} \right]$	$Z_{NF} \left[ \frac{U}{g} \right]$
0,5	1030	5,1
3,0	655 ± 53	19,6 ± 1,6
6,5	<b>3410 ± 217</b>	222,5 ± 14,2
10,4	2700 ± 350	<b>281,4 ± 36,7</b>

Die Trägeraktivität erreicht bei diesem Polymergehalt einen maximalen Wert von  $281,4 \pm 36,7 \frac{U}{g}$  und liegt damit unter derjenigen des käuflich erwerbbaaren Produkts Novozyme 435 mit  $900 \pm 30 \frac{U}{g}$  (32). Dabei liegt der Enzymgehalt von Novozyme 435 mit  $200 \frac{\mu g}{mg}$  (194) weit über demjenigen der Nanofasern. Eine Erhöhung des CaL B-Gehaltes auf 20 Gew% war nicht verspinnbar. Eine höhere Aktivität als die des Novozyme 435 mit fasergeträgerter Lipase wurde bisher von Sakai et al. erreicht, die Lipase aus *Rhizopus oryzae* für den Vergleich verwendeten und diese vor dem Elektrosplennen mit PVA in Organosilikatkäfigen einschlossen (195). Getestet wurde hier die Transesterifizierung von Rapsöl mit *n*-Butanol. Die Aktivitäten waren dabei zunächst vergleichbar ( $1,59 \pm 0,29 \frac{U}{mg}$  im Falle der PVA-geträgerten Lipase und  $1,60 \pm 0,38 \frac{U}{mg}$  im Falle von Novozyme 435). Erst eine Zugabe von Wasser führte bei der PVA-



geträgerten Lipase für eine Erhöhung auf  $2,61 \pm 0,47 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ , während mit Novozyme 435 eine niedrigere Aktivität erhalten wurde ( $0,45 \pm 0,12 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$ ).

Die höhere Aktivität gegenüber den Proben mit 25 Gew% PEtOx kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen zeigen die REM-Aufnahmen keine Verklebungen oder Beads bis zu 7 Gew% CaL B, so dass die Oberfläche größer ist als bei den Proben mit höherem Polymergehalt der Spinnlösung. Auch ist der Faserdurchmesser hier geringer (durchschnittlich 300 nm verglichen mit 400 nm für 25 Gew% PEtOx).

Die Trägeraktivität steigt mit zunehmenden Enzymgehalt sehr stark an. Der ungewöhnliche Verlauf fällt noch stärker bei Betrachtung der spezifischen Aktivität auf.

Tatsächlich sind Abweichungen der üblichen Aktivitätsverläufe, d.h. steigende Trägeraktivitäten bei abnehmenden spezifischen Aktivitäten mit steigender Enzymbeladung, literaturbekannt. Unter anderem wurde beobachtet, dass sich Enzyme bei höheren Konzentrationen anscheinend selber gegen Denaturierung stabilisieren können (113, 196). Auch bei anderen Methoden der Immobilisierung sind bereits abweichende Aktivitätsverläufe beobachtet worden (197), auch im Fall von CaL B (198). Andere Gruppen berichten von optimalen Enzym/Träger Verhältnissen (199, 200). Weiterhin liegt der pH-Wert der Spinnlösung bei 6,6 und somit im Bereich des pI von CaL B (pH 4 bis 8 (201)). Daher lagern sich die Enzyme bevorzugt im Inneren der Fasern an (185), und die Wahrscheinlichkeit der Oberflächenbedeckung nimmt mit höherer Beladung zu. Da die Fasern in Heptan nicht quellen, sind wahrscheinlich generell nur die Enzyme an der Oberfläche an der Katalyse beteiligt. Das könnte auch der Grund dafür sein, dass mit diesen Systemen, trotz der großen Oberfläche, nicht die spezifischen Aktivitäten der PEhAc-*l*-PMOx-APCNs erreicht wurden (Kap. 5.2.2).

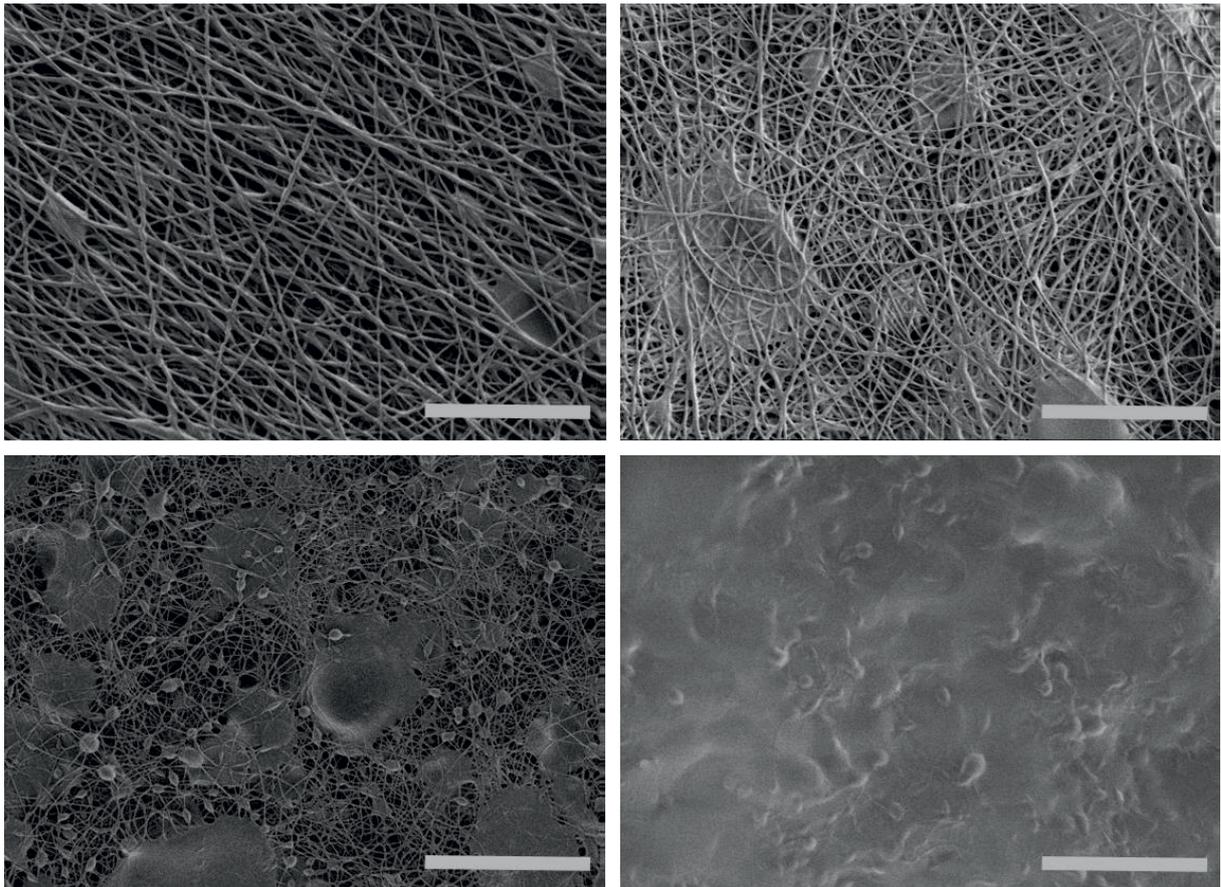
Eine Reproduktion des Versuches für eine CaL B-Beladung von 3 Gew% durch R. Plothe führte zu einem um eine Größenordnung höheren Wert (Abb. 5.40, rot dargestellter Wert), der annähernd einem normalen Aktivitätsverlauf entsprechen würde. Die hohe Standardabweichung lässt zudem den Schluss zu, dass die Messungen für unterschiedliche Faserproben bei gleichen Enzymbeladungen starken Schwankungen unterliegen. Das könnte möglicherweise eine Folge des Wägefehlers sein (vgl. Kap. 5.3.2). Auch die Versuchsdurchführung könnte eine Rolle spielen, bei der die Fasern durch den Rührfisch von



der Alufolie abgelöst werden könnten. Xie und Hsieh fanden heraus, dass die Aktivität der vom Kollektor abgelösten Fasern um einen Faktor 8 höher liegt (112).

Aufgrund dessen und der Tatsache, dass die Aktivitäten für 25 Gew% PEOx den erwarteten Verlauf zeigen, ist für diese Messreihe ein entsprechender Verlauf ohne Aktivitätssprung wahrscheinlicher.

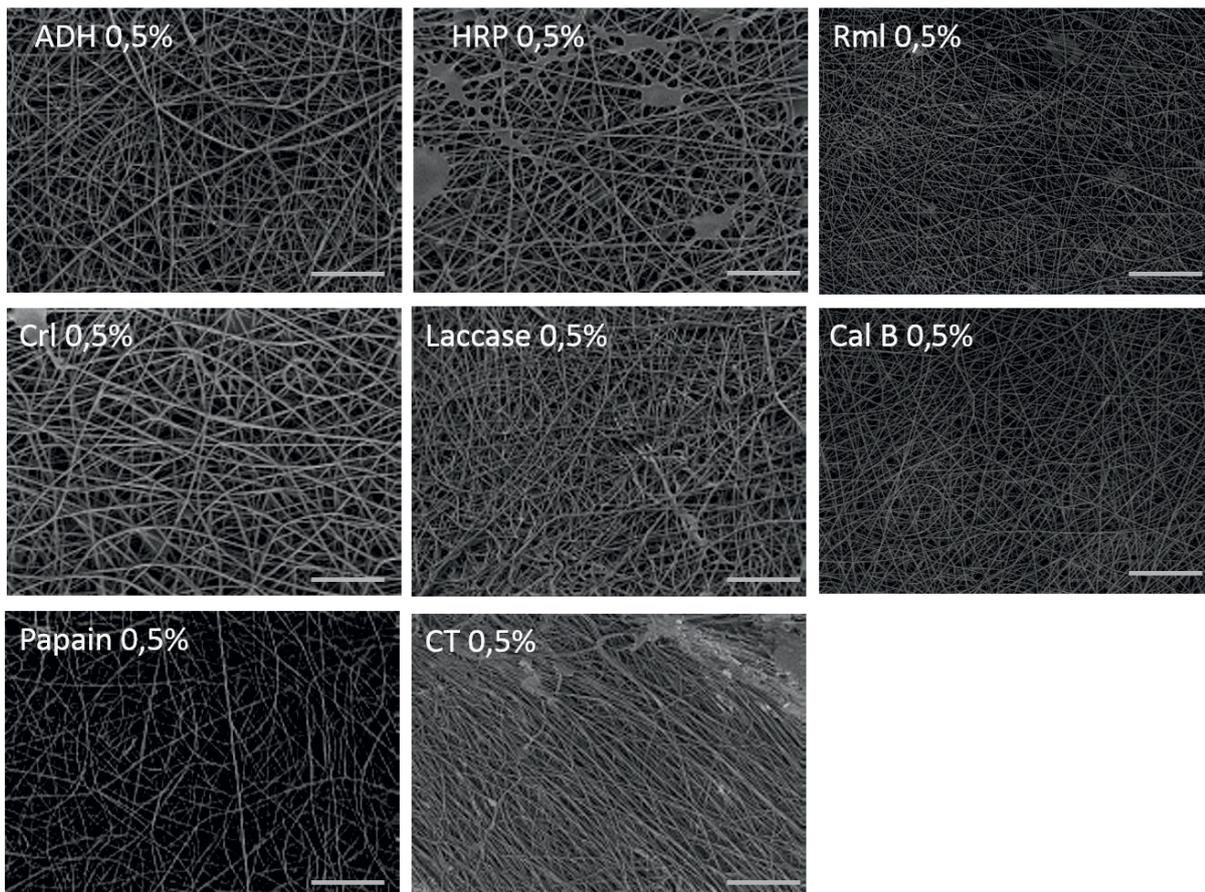
Eine weitere Reduktion des Polymergehaltes in der Spinnlösung auf 15 Gew% zeigte schon bei geringen Enzymgehalten von 0,5 Gew% zu klebrigen und geringfügig inhomogenen Fasern (Abb. 5.51). Zudem sind Bereiche zu erkennen, in denen die Spinnlösung ohne Faserbildung abgetropft zu sein scheint. Die Trägeraktivität dieser Probe liegt bei  $65 \pm 0,4 \frac{\mu}{g}$ , was einer 13-fach höheren Aktivität als derjenigen der 20 Gew% PEOx-Probe entspricht. Eine weitere Erhöhung der CaL B Beladung auf 3 und 14,5 Gew% führte zu einer Ausbildung großer Polymertropfen und einer erhöhten Beadkonzentration. Die Faserqualität nimmt mit steigendem Enzymgehalt stark ab. Bei einem Polymergehalt der Spinnlösung von 10 Gew% entstehen keine sichtbaren Fasern mehr. Anscheinend liegt diese Konzentration unterhalb der Critical Entanglement Concentration (Abb. 5.51, unten rechts) (172).



**Abbildung 5.51: REM Aufnahmen von PETox Nanofasern. Oben und unten links: Polymergehalt der Spinnlösung 15 Gew%, unten rechts 10 Gew%. CaL B Gehalt der Proben von oben links nach rechts unten: 0,5 Gew%, 3 Gew%, 14,5 Gew%, 10 Gew%. Die Länge aller Balken beträgt 9  $\mu\text{m}$ .**

#### *5.5.3.3. PETox-Nanofasern als Träger für weitere Enzyme*

Nieuwland *et al.* zeigten, dass die optimalen Parametereinstellungen für ein Protein/Polymer-System oft nicht ohne weitere Anpassungen auf andere Systeme übertragen werden können (202). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob PETox-Nanofasern auch als Trägermaterial für weitere Enzyme eingesetzt werden können (Abb. 5.52). Dabei wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, folgende Parameter eingestellt. Der Polymergehalt der Spinnlösung betrug 20 Gew%, als Lösungsmittel diente ddH<sub>2</sub>O. Der Enzymgehalt betrug 0,5 Gew% bezogen auf das Polymer. Versponnen wurde unter Umgebungsbedingungen bei 20 kV.



**Abbildung 5.52: REM-Aufnahmen von PEOx-Nanofasern geträgert mit verschiedenen Enzymen. Enzymgehalt jeweils 0,5 Gew% bezogen auf das Polymer. Die Enzyme wurden der Spinnlösung direkt zugesetzt, versponnen wurde bei 20 kV. Der Polymergehalt der Spinnlösung für alle Proben betrug 20 Gew%, außer für RmL mit 25 Gew%. Die Länge aller Balken beträgt 20  $\mu\text{m}$ . (189)**

Der Elektrospinnprozess für alle Proben resultierte in homogenen Nanofasern (s. auch Faserdurchmesser, Tab. 5.14). Im Falle von Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (CT) sind neben den Fasern an einigen Stellen bereits flache, verklebte Stellen zu sehen.



**Tabelle 5.14: Restaktivitäten (RA) und Aktivitäten in organischen Medien der freien, in PEtOx5000/PEtOx20-Netzwerke eingeschlossenen und mit PEtOx versponnenen Enzyme, Aktivierungsfaktoren (bezogen auf die Aktivitäten der Nanofaser-geträgerten verglichen mit den freien Enzymen) und Faserdurchmesser. Der Polymergehalt der Spinnlösung betrug 20 Gew% mit Ausnahme von RmL, hier betrug er 25 Gew%. Der Enzymgehalt betrug 0,5 Gew% bezogen auf das Polymer. Als organisches Medium wurde *n*-Heptan eingesetzt, außer im Falle von Laccase mit Xylol. a) CT wurde direkt aus der Packung eingesetzt. b) CT wurde vor dem Einsatz bei pH 7,7 über Nacht gefriergetrocknet. c) Bestimmt durch Dech (33). Die Restaktivitäten (RA) wurden nicht in die Ergebnisse des organischen Assays einbezogen. (189)**

Enzym	RA [%]	Organisches Medium			Aktivierung	Faserdurchmesser [nm]
		$Z_{\text{spez}} \left[ \frac{\text{U}}{\text{g}} \right]$				
		Freies Enzym	NW	NF		
CaL B	79	307 ± 7,6	720 ± 320	1030	3,4	300 ± 110
CrL	25	1,6 ± 0,3	23,0 ± 0,1	184 ± 8,5	115	520 ± 90
RmL	67	372 ± 1,0	3450 <sup>c</sup>	12620 ± 1790	34	280 ± 65
HRP	40	0,0015 ± 0,0001	0,011 ± 0,002	0,053 ± 0,012	35	370 ± 80
CT	140	0,4 ± 0,002 <sup>a</sup>	69,0 ± 3,0	160 ± 10	400	370 ± 100
		5,7 ± 1,4 <sup>b</sup>			28	
Papain	127	0,04 ± 0,003	3,2 ± 0,3	8,2 ± 0,6	205	370 ± 110
ADH	12	0,28 ± 0,001	0,3 ± 0,04	3,6 ± 1,3	13	330 ± 90
Laccase	35	0,0003 ± 0,00004	0,009 ± 0,0007	0,047 ± 0,005	157	340 ± 110

Die mittleren Faserdurchmesser liegen, mit Ausnahme der CrL-Probe, zwischen 300 und 400 nm. Bei der CrL ist der Faserdurchmesser mit durchschnittlich 600 nm etwas größer, liegt



aber immer noch im gewünschten Nanometerbereich. Die erreichten Durchmesser sind im Einklang mit literaturüblichen Werten (siehe Diskussion weiter unten).

Die Restaktivitäten der einzelnen Enzyme variieren stark. Während ADH durch den Elektrospinnprozess stark an Aktivität verliert, scheinen beide Proteasen sogar aktiviert zu werden. In der Literatur wurde solch ein Effekt bereits bei der Immobilisierung von Papain auf Magnetitnanopartikeln beschrieben (203), ebenso führte die Immobilisierung einer Lipase auf Nanofasern bestehend aus Poly(acrylnitril) (204) zu einer höheren hydrolytischen Aktivität verglichen mit dem freien Enzympulver.

Trotz der zum Teil hohen Deaktivierung zeigen alle geträgerten Enzyme im Vergleich zu den suspendierten freien Enzymen eine höhere Aktivität in organischen Medien. Dabei scheint die Aktivierung unabhängig von der Enzymklasse zu sein, sondern spezifisch für jedes einzelne Enzym. So liegen die Aktivierungen für die drei getesteten Lipasen bei drei verschiedenen Größenordnungen, von Faktor 3,4 für CaL B, Faktor 34 für RmL bis zu Faktor 115 für CrL. Die geträgerten Proteasen weisen beide hohe Aktivierungen auf, im Fall von CT zumindest bei Vergleich mit dem freien CT, welches direkt aus der Packung eingesetzt wurde. Ein Vergleich mit dem Enzym bei optimalem pH-Wert ist um eine Größenordnung geringer. Die Laccase erfährt ebenfalls eine starke Aktivierung (Faktor 157), während die Aktivierung der ADH (Faktor 13) und der HRP (Faktor 35) eher im mittleren Bereich liegen. Der Vergleich mit den Netzwerken zeigt für die meisten Enzyme eine 7 bis 15-fache Aktivierung. Ausnahmen bilden hier CaL B und ADH mit einer 2,3-bzw. 1,1-fachen Aktivierung und die Laccase mit einer 30-fachen Aktivierung. Es wurde also, trotz der unvollständigen Vermischung der Netzwerkkomponenten (Abb. 5.56), für alle Enzyme mit Ausnahme der ADH eine Aktivierung durch Einschluss in PEtOx<sub>5000</sub>/PEtOx<sub>20</sub>-Netzwerke erreicht.

Durch den Einschluss der Enzyme in Nanofasern kann die Enzymaktivität weiter gesteigert werden, hier liegen die Aktivierungen im einstelligen Bereich. Eine Ausnahme bildet hier wieder die ADH, die eine 12-fache Aktivierung aufweist. Interessant ist der Vergleich der CaL B Aktivität nach Einschluss in reinen PEtOx<sub>5000</sub> Nanofasern und einem 1 zu 1-Gemisch aus PEtOx<sub>5000</sub> und PEtOx<sub>20</sub>. Hier ist die Aktivität um den Faktor 2,3 erhöht, was auf einen aktivierenden Einfluss durch die Zugabe kurzer Polymerketten hinweist. Dieser Effekt wird im weiteren Text untersucht (Tab. 5.15).



Nachfolgend werden die in Tabelle 5.14 erhaltenen Ergebnisse genauer diskutiert und mit Ergebnissen anderer Forschergruppen verglichen.

#### 5.5.3.3.1. Lipasen

Für die Immobilisierung von Lipasen auf nanofaserigem Material gibt es unterschiedliche Beispiele. Kovalente Bindung von CrL auf Poly(Vinylalkohol-co-Ethylen) (PVA-co-PE) Nanofasern (Durchmesser 50 bis 350 nm) durch Einsatz von Glutaraldehyd (GA) zeigte unter optimalen Bedingungen Restaktivitäten von 60,73 % (205). Das direkte Verspinnen von CrL mit PVA mit bis zu 50 Gew% Enzymbeladung resultierte in Nanofasern mit Durchmessern unterhalb 500 nm ohne Aktivitätsverlust in wässrigen Medien. Bei Beladungen unterhalb von 20 Gew% CrL wurden geringere Restaktivitäten gemessen (206). Die Gruppe um Gupta immobilisierte Lipase von *Thermomyces lanuginosus* (TLL) adsorptiv und kovalent auf Polyacrylnitril (PAN) Nanofasern (Durchmesser 300 bis 400 nm) (204). Der Einsatz in organischen Medien zeigte hier eine generell höhere Stabilität für kovalent gebundene TLL, während das physikalisch gebundene Enzym höhere Aktivitäten in organischen als auch in wässrigen Medien zeigte. Hier führte die Immobilisierung zu einer um den Faktor 3,6 höheren Aktivität in Wasser verglichen mit dem freien Enzympulver (1,8 im Falle der kovalent gebundenen TLL), die Aktivierung bei der Transesterifizierung betrug 23 bzw. 9 für die kovalent gebundene TLL.

Ähnliche Werte wurden für Lipase von *Pseudomonas cepacia* (PcL) immobilisiert auf PAN-Fasern erhalten. Hier wurde mit physikalischer Adsorption eine 23fache Aktivierung für die Veresterung in Isooktan erreicht (125), während das kovalent gebundene Enzym in Hexan eine spezifische Aktivität von nur  $8,9 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$  im Vergleich zu  $11,2 \frac{\text{U}}{\text{mg}}$  bei freier PcL erreichte (207). Auch mit einer Lipase aus *Burkholderia cepacia* (BcL) wurde durch direktes Verspinnen mit PVA aus wässriger Lösung eine 14-fach höhere Aktivität in Isooktan erreicht. Diese konnte durch Zugabe von bis zu 10 Gew% DMF zu der Spinnlösung noch weiter um den Faktor 1,5 erhöht werden (127).

Das direkte Verspinnen einer Lipase aus *Burkholderia cepacia* (BcL) mit Polycaprolacton (PCL) in einer DMF/Chloroform Mischung als Lösemittel zeigte ebenfalls hohe Aktivierungen für Reaktionen in wässrigen (8-fach) und organischen (7-fach) Medien. Die optimale Enzymbeladung lag hier bei 5 Gew%, höhere Beladungen bis zu 40 Gew% zeigten eine stark reduzierte Aktivität verglichen mit dem freien Enzympulver (200).

Die in dieser Arbeit erreichten Aktivierungen sind, zumindest im Falle der RmL und CrL (34- bzw. 115-fach), vergleichbar oder höher als die Literaturwerte. Die Aktivierung, die bei CaL B durch die Verspinnung erreicht wurde, ist dagegen geringer. Um die Aktivität der geträgerten CaL B zu erhöhen, wurde PEG<sub>114</sub> als Additiv zu der Spinnlösung hinzugegeben (Tab. 5.15). Der positive Einfluss von Additiven ist bekannt, z.B. weisen Enzyme, die im Beisein von Liganden oder Zuckeralkoholen gefriergetrocknet wurden, höhere Aktivitäten auf (208, 209). Werden Zuckeralkohole, PEG oder Ca<sup>2+</sup>-Ionen zu wässrigen Enzymlösungen gegeben (210, 211), wirken sie ebenfalls stabilisierend, das gleiche gilt für wässrigen Ethanollösungen (212, 213). Auch bei der Immobilisierung von Enzymen eingesetzte Additive wie Polyole und Saccharide (214) oder PEG (215) aktivieren das Enzym zusätzlich. Der Mechanismus der Stabilisierung durch PEG ist nicht vollständig aufgeklärt, es scheint als würde PEG die Tertiärstruktur von Enzymen stabilisieren (216). PEG wird ebenfalls eingesetzt, um durch Porenbildung eine höhere Aktivität zu erreichen. Dror *et al.* setzten PEG zu diesem Zweck in Kern/Schale-Nanofasern ein, und erreichten in wässrigen Medien eine ungehinderte Diffusion, die in einer nahezu vollständigen Restaktivität resultierte (217).

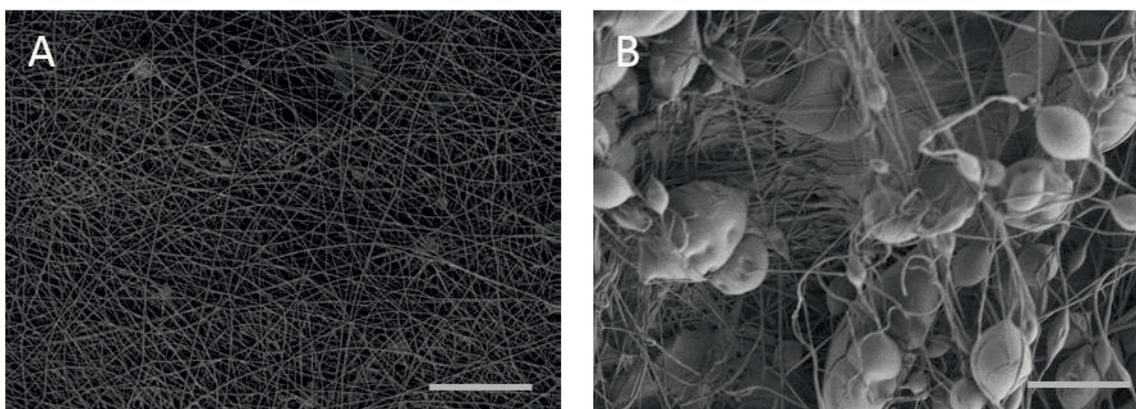
**Tabelle 5.15: Vergleich der Aktivität und Aktivierungen von CaL B eingeschlossen in Nanofasern, abhängig vom Polymergehalt der Spinnlösung und Zugabe von Additiven (6 Gew% PEG<sub>114</sub> bezogen PEtOx<sub>5000</sub>).**

Probe	Z <sub>spez</sub> $\left[\frac{\text{U}}{\text{g}}\right]$	Z <sub>NF</sub> $\left[\frac{\text{U}}{\text{g}}\right]$	Aktivierungsfaktor
25 Gew% PEtOx <sub>5000</sub> , 0,5 Gew% CaL B	783 ± 60	3,9 ± 0,2	2,5
20 Gew% PEtOx <sub>5000</sub> , 0,5 Gew% CaL B	1030	5,1	3,4
20 Gew% PEtOx <sub>5000</sub> , 0,5 Gew% CaL B	5670 ± 1300	25,1 ± 5,8	18,5
6 Gew% PEG <sub>114</sub>			

Der Aktivierungsfaktor der Proben ohne Additiv gegenüber dem freien Enzympulver liegt im einstelligen Bereich bei 5,5 bzw. 7,3 und damit sogar noch höher als durch die Beimischung von PEtOx<sub>20</sub> (Tab. 5.11). Die Zugabe von PEG<sub>114</sub> resultiert in einer 18,5-fach höheren Enzymaktivität verglichen mit dem freien Enzympulver, hier ist die Aktivität vergleichbar mit derjenigen, die durch Einschluss in PEhAc-*l*-PMOx-APCNs maximal erreicht werden konnte (Abb. 5.16). Da die Messungen an sich starken Schwankungen unterliegen (Abb. 5.50), müssen

diese Ergebnisse jedoch nicht unbedingt auf einen aktivierenden Effekt von kurzkettigen Polymeren als Additiv allgemein und insbesondere von PEG hinweisen.

Die spezifische Aktivität der in Nanofasern geträgerten RmL beträgt mehr als die doppelte Aktivität der in PHEA-/PEtOx Mikropartikel geträgerten RmL (163), bei einer ebenfalls höheren Beladung (0,5 Gew% im Falle der Fasern im Vergleich zu 0,2 Gew% in Mikropartikeln), was die Überlegenheit der Nanofasern gegen Mikropartikel beweist. Interessanterweise war RmL das einzige Enzym, welches nicht bei 20 Gew% PEtOx in der Polymerlösung verspinnbar war sondern erst bei 25 Gew% PEtOx (Abb. 5.53). Das deutet auf eine starke Wechselwirkung zwischen RmL und PEtOx hin (206), die den von Dech festgestellten aktivierenden Einfluss des Polymers auf die Enzymaktivität bekräftigt (33).



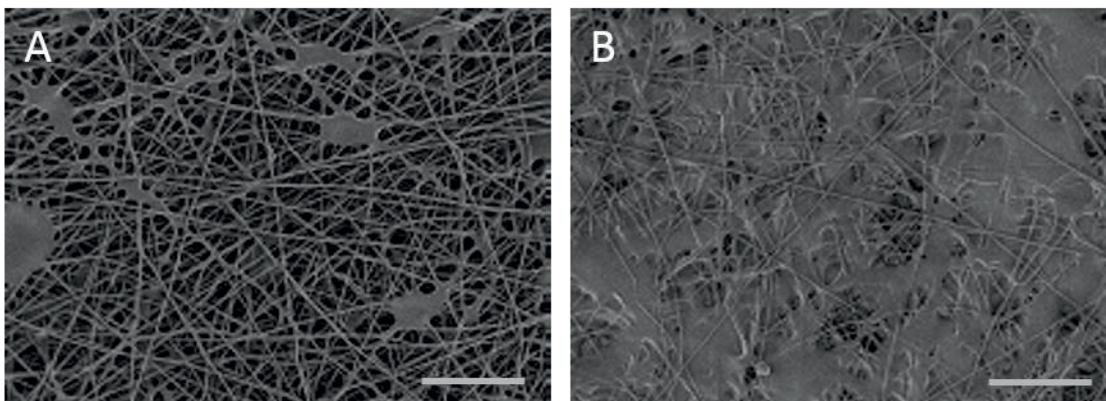
**Abbildung 5.53: REM-Aufnahmen von RmL/PEtOx Nanofasern. Der Enzymgehalt beträgt 0,5 Gew% bezogen auf PEtOx. Der Polymergehalt der Spinnlösung beträgt in der linken Aufnahme 25 Gew%, in der rechten 20 Gew%. Die Länge aller Balken beträgt 20  $\mu$ m.**

#### 5.5.3.3.2. Peroxidase

Die Immobilisierung von HRP nachträglich zum Spinnvorgang zeigt unterschiedliche Literaturergebnisse. Xu *et al.* immobilisierten HRP auf Poly(Methylmethacrylat-co-Ethylacrylat) (PMMA CEA) Nanofasern mit Durchmessern zwischen 300 und 500 nm und erreichten damit eine Restaktivität von 70 % (218). Bei einer nachträglichen Immobilisierung von HRP auf Polyimid (PI) konnten nur 2,38 % Restaktivität erreicht werden. Die Zugabe mehrwandiger Kohlenstoffnanoröhrchen (MWCNTs, multiwalled carbon nanotubes) bis zu 5 Gew% erhöhte die Restaktivität auf 12,5 %. Weitere Zugabe von MWCNTs resultierte in einer verminderten Restaktivität der immobilisierten HRP. Die Faserdurchmesser des

PI/HRP - Systems lagen hier bei durchschnittlich 380 nm, bei zusätzlichen MWCNTs verringerten sie sich auf 260 nm (219).

Das direkte Verspinnen von HRP mit PVA resultierte in einer Restaktivität von 50 %, bei Faserdurchmessern zwischen 100 und 200 nm (118). Dieses Ergebnis ist mit dem in dieser Arbeit gemessenen vergleichbar. Patel *et al.* arbeiteten dabei mit einer geringen Enzymbeladung von 1 mg HRP pro 0,3 g PVA. Auch in dieser Arbeit zeigten die Fasern bei 0,5 Gew% Enzymbeladung bereits erste Bereiche, in denen keine Fasern entstanden sind. Eine Beladung von 1 Gew% HRP führte zu einer sehr geringen Ausbildung von Fasern (Abb. 5.54).



**Abbildung 5.54: REM-Aufnahmen von elektrogesponnenen HRP/PETox Fasern. (189) Der PETox-Gehalt der Spinnlösung beträgt 20 Gew%. A) HRP-Beladung 0,5 Gew% B) HRP-Beladung 1,0 Gew%. Die Länge der Balken beträgt 20  $\mu\text{m}$ .**

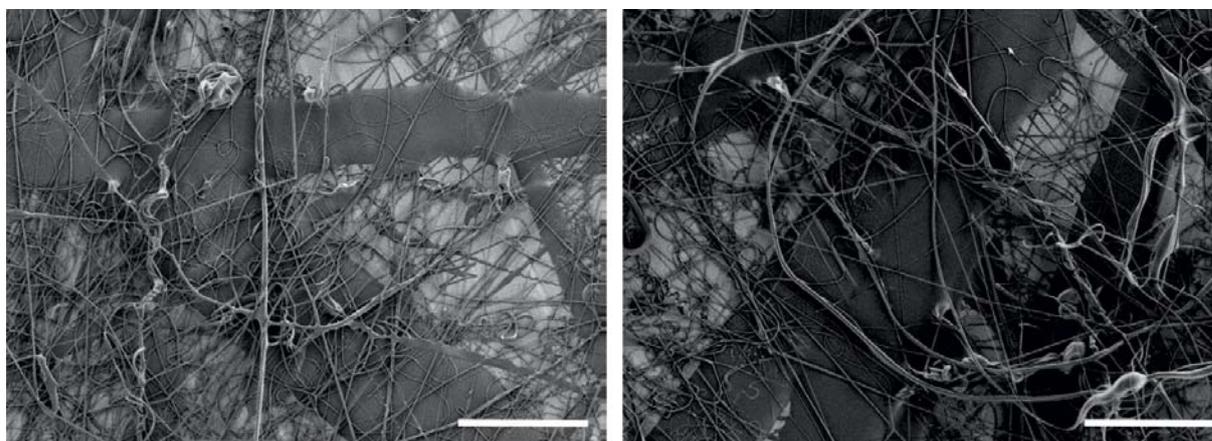
Die 35-fache Aktivierung der eingesponnenen HRP im Vergleich zum freien Enzym in *n*-Heptan ist höher als die Aktivierungen anderer Immobilisierungsarten. Zum Beispiel untersuchten Matveeva *et al.* die katalytische Aktivität in Ethanol von HRP auf unterschiedlichen Trägermaterialien ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ , Macronet MN 100, Sepabeads EC-HA). Dabei ergab sich eine höchste Aktivierung um den Faktor 1,8 bei Immobilisierung auf  $\text{SiO}_2$ -Partikeln (220).

#### 5.5.3.3.3. Proteasen

Die kovalente Immobilisierung von CT auf Polystyrol (PS) Nanofasern (Durchmesser 120 nm) führte zu einer Restaktivität von 65 % (123), während der direkte Einschluss von bis zu 10 Gew% CT in Poly(esterharnstoff) zu homogenen Nanofasern mit 458 nm Durchmesser führt, bei denen kein Aktivitätsverlust auftrat (221).

Die hier erreichten Restaktivitäten über 100 % für beide eingesetzten Proteasen, Chymotrypsin und Papain, deuten einen aktivierenden Effekt des PETox für diese Enzyme an.

Die Aktivierung in organischen Medien beträgt für CT das 28-fache, für Papain das 205-fache des jeweiligen freien Enzyms, wobei CT vorher bei seinem optimalen pH-Wert gefriergetrocknet wurde. Der Grund für diesen Unterschied könnte bei dem pH-Wert der Spinnlösung liegen. Das pH-Optimum von Papain liegt bei 6,4 (222), also nahe dem pH-Wert der Spinnlösung, so dass es nahezu in seiner aktivsten Konformation vorliegt. Bei CT mit einem pH-Optimum von 7,7 ist dies nicht der Fall. Verglichen mit freiem CT, welches direkt aus der Verpackung eingesetzt wurde (pH 1), konnte die 400-fache Aktivierung erreicht werden, so dass der pH-Wert hier offensichtlich eine Rolle spielt. Der Versuch, CT in Puffer (pH 7,7) zu verspinnen, um die aktivste Konformation zu erreichen, war nicht erfolgreich (Abb. 5.55).



**Abbildung 5.55: REM-Aufnahmen von CT/PETox, verspinnen in Puffer (pH 7,7) (189). CT-Beladung 0,5 Gew% bezogen auf PETox. Polymergehalt der Spinnlösung links 20 Gew%, rechts 25 Gew%. Länge der Balken 40  $\mu\text{m}$ .**

Verglichen mit Werten aus der Literatur für immobilisierte Proteasen liegen die erreichten Aktivierungen höher oder sind zumindest vergleichbar. Die Modifizierung von CT mit Pyromellitdianhydrid und nachträgliche Fällung mit Propanol von Solanki *et al.* zeigte eine Aktivierung um den Faktor 2,38 für Transesterifizierungsreaktionen in *n*-Oktan und 32,3 in Acetonitril (223). Novick und Dordick immobilisierten CT in Poly(Saccharoseacrylat) (PSA)-Hydrogel und entdeckten eine lösemittelabhängige Aktivierung. Die höchste Aktivierung wurde in Hexan erreicht (33,7-fach), gefolgt von *tert*-Amylalkohol (10,7-fach) und Diisopropylether (7,95-fach) (224). Die Immobilisierung von CT in einer Sol-Gel-Matrix aus Tetramethoxysilan resultierte in einer 40fachen Aktivierung verglichen mit freiem CT. Die gleiche Methode führte bei Subtilisin Carlsberg und Trypsin zu Aktivierungen um den Faktor 31 bzw. 437 (225).



#### 5.5.3.3.4. Dehydrogenase

Die Gruppe um An immobilisierte ADH auf PS-Fasern mit Durchmessern zwischen 1,2 und 3,5 µm. Dabei wurde bei Beladungen unterhalb von  $5 \frac{\text{mg Protein}}{\text{g Faser}}$  eine Restaktivität von 20 % erhalten (226), was vergleichbar mit den Werten dieser Arbeit ist. Direktes Verspinnen von Lactatdehydrogenase (LDH) mit PVA durch coaxiales Elektrosplennen resultierte in Nanofasern mit Durchmessern zwischen 124 und 145 nm, wobei steigende Enzymbeladung (bis zu 4 Gew%) in vermehrter Ausbildung von Beads resultierte. Hier konnte über eine Dauer von 20 Tagen eine Freisetzung von aktivem Enzym beobachtet werden, was auf eine Konservierung der Enzymfunktion hindeutet (227).

Alsafadi *et al.* immobilisierten eine Alkoholdehydrogenase aus *Haloferax volcanii* (HvADH) auf Sepabeads® EC-EP und untersuchten den Einfluss von DMSO und Methanol (30% v/v in TRIS-HCl- Puffer) auf die Enzymaktivität (228, 229). Im Fall von DMSO zeigte das freie Enzympulver eine höhere Stabilität (63 % RA nach 24 h, immobilisierte HvADH 55 %), während die immobilisierte HvADH stabiler gegen Methanol war (60 % RA nach 24 h, freie HvADH 50 %). Auch Musa *et al.* erhielten nach Immobilisierung von W110A Sekundärer Alkoholdehydrogenase aus *Thermoanaerobacter ethanolicus* (W110A TeSADH) auf Xerogel eine geringere Aktivität verglichen mit dem freien Enzym (230). Sie untersuchten die Umsetzung verschiedener Ketone in Hexan, wobei das freie Enzym einen bis zu 1,4-fach höheren Umsatz zeigte. Als Ursache für die geringere Aktivität wurden Diffusionsbarrieren der immobilisierten W110A TeSADH angegeben.

#### 5.5.3.3.5. Laccase

Auf PS-Nanofasern (500 nm Durchmesser) immobilisierte Laccase erreichte eine Restaktivität von 73 % (231). Ähnliche Ergebnisse erreichten Xu *et al.* mit der Immobilisierung von Laccase auf Polyacrylnitril (PAN)-Nanofasern mit Durchmessern zwischen 200 und 300 nm. Hier betrug die Restaktivität 72 % (232). Diese Ergebnisse deuten an, dass mit adsorptiver Immobilisierung höhere RA erhalten bleiben als durch das direkte Einsplennen wie in dieser Arbeit mit 35 % Restaktivität. Qiu *et al.* bestätigen dies für die Immobilisierung von Laccase auf nanoporösen Goldpartikeln durch verschiedene Ansätze, auch hier zeigt die adsorptive Bindung die höchsten Restaktivitäten (233).



Die versponnene Laccase zeigte hier eine 157-fache Aktivierung in Xylol gegenüber dem freien Enzym. Das ist vergleichbar mit Laccase, welche in gemahlenden Tetraethyl-Orthosilicat (TEOS)-Gelen immobilisiert wurde. Hier wurde die Aktivierung in Cyclohexan (123,5-fach), *n*-Hexan (90,9-fach) und *n*-Dekan (323,9-fach) bestimmt (234).

Aus diesen Vergleichen folgt eine prinzipielle Eignung von PEtOx als Träger für alle hier untersuchten Enzyme. Das direkte Verspinnen der Biokatalysatoren in wässriger Polymerlösung stellt eine einfache Methode dar. Die erhaltenen Restaktivitäten sind vergleichbar mit Literaturwerten anderer Elektrospinnprozesse. In organischen Medien erreichen die hier produzierten geträgerten Enzyme mit Ausnahme der CaL B eine vergleichbare und oft höhere Aktivierung als andere Immobilisierungsmethoden.

#### 5.5.3.4. Design eines biokatalytisch wirksamen Rührers

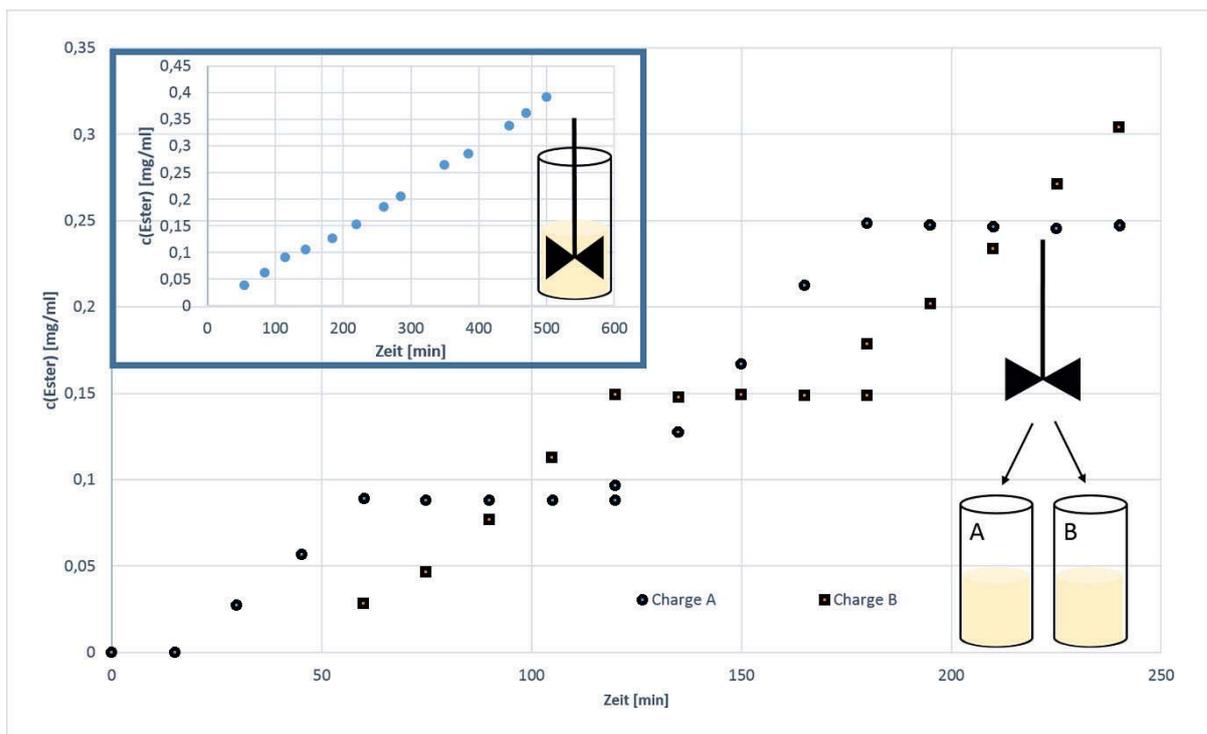
Die industrielle Nutzung von Enzymen erlangt einen immer höheren Stellenwert, so dass auch Nanofasern als potentielle Trägermaterialien in Reaktoren erforscht werden. Huang *et al.* immobilisierten CrL kovalent auf Poly(Acrylnitril-co-Hydroxyethylmethacrylat) (PANHEMA)-Nanofasern, die in einem stationär betriebenen Bioreaktor eingesetzt wurden. Die Hydrolysereaktion wurde über 10 Minuten aufrechterhalten. Obwohl die Enzymbelastung nicht ihr Optimum erreicht hat, zeigt dieser Versuch die grundsätzliche Eignung dieser Fasersysteme für industrielle Zwecke (235). Ein kontinuierlich betriebener Durchflussreaktor für eine Transesterifizierung durch eine Lipase aus *Rhizopus oryzae* (RoL) wurde von Sakai *et al.* designt (236). Dabei war die RoL direkt mit PVA versponnen worden. Durch Vorbehandlung der enzymbeladenen Fasern mit Siliziumalkoxiden konnte die Stabilität und Aktivität des Enzyms weiter erhöht werden. Das so behandelte Enzym zeigte nach 20 Minuten Verweilzeit einen Umsatz von 54 %.

In diesen Beispielen wurden kontinuierliche Reaktoren eingesetzt. Hier soll im Folgenden der Einsatz enzymbeladener PEtOx-Nanofasern in diskontinuierlichen Reaktoren geprüft werden. Dafür wurde ein biokatalytisch aktiver Rührer entworfen. Im ersten Versuch wurde der Rührer direkt als Kathode eingesetzt und mit der CaL B/PEtOx-Lösung versponnen (Abb. 5.56, links und Mitte).



**Abbildung 5.56: Fotos der Herstellung und Einsatz eines biokatalytischen Rührers. (189)**

Die Produktbildung hier war über mehr als 8 h linear (Abb. 5.57, kleines Diagramm). Dabei wurden 17,79 mg Nanofasern mit einem Enzymgehalt von 3,96 Gew% in insgesamt 400 mL Reaktionslösung eingesetzt (Abb. 5.56, Foto rechts). Die hier enthaltene, immobilisierte CaL B produzierte in den 8 h insgesamt 9,48 mg Ester. Eine CaL B-Menge von insgesamt 1 g würde damit unter den genannten Bedingungen theoretisch 1,25 kg Ester pro Stunde produzieren. Da die Herstellung des biokatalytischen Rührers auf diese Art umständlich war, z.B. musste der Spinnprozess mehrfach unterbrochen werden um eine gleichmäßige Verteilung der Fasern zu gewährleisten, zudem ist ein großer Teil der Fasern auf der Alufolie neben dem Rührer gelandet, wurde die Enzym/Polymerlösung in den weiteren Versuchen auf Alufolie versponnen, die um den Rührer gewickelt wurde.



**Abbildung 5.57: GC-Auswertung des enzymatisch aktiven Rührers. Charge A (Punkte) und B (Quadrate) stellen zwei Assay-Lösungen mit gleicher Zusammensetzung dar, in die der Rührer abwechselnd eingetaucht wird. Der Polymergehalt der Spinnlösung betrug 20 Gew%. Der Enzymgehalt lag bei 3,96 Gew%. Das kleine Diagramm (umrandet) zeigt die kontinuierliche Messung ohne Wechsel des Mediums (189). Hier betrug der Polymergehalt der Spinnlösung ebenfalls 20 Gew%, die Enzymbeladung lag bei 4,27 Gew%. Die Enzymaktivität wurde bestimmt anhand der Veresterung von Laurinsäure und 1-Oktanol bei 37 °C in *n*-Heptan.**

Für einen weiteren Versuch wurde das Medium wiederholt ausgetauscht (Abb. 5.57). Hier zeigt sich eine kontinuierliche Produktbildung für die Zeit während der Rührer eingetaucht war. Dabei zeigt die blaue bzw. orangene gepunktete Kurve jeweils die Produktbildung für eine Reaktionslösung an. Der Rührer wurde zunächst in Reaktionslösung A (blaue Kurve) eingetaucht und nach 60 Minuten aus dieser entfernt und in Reaktionslösung B (orangene Kurve) eingetaucht. Dieser Wechsel wurde noch zweimal wiederholt. Dabei wurde jedes Mal, wenn der Rührer in ein Medium eingetaucht war, eine Esterbildung gemessen. Ohne Rührer ist keine Produktbildung messbar, es kommt also nicht zu einem Leaching. Damit konnte das Potential der Nanofasern auch für Batchreaktoren gezeigt werden.



#### 5.5.4. Fazit

Der Einsatz von Nanofasern als Träger für Biokatalysatoren ist ein Forschungsfeld mit enormen Potential. In der vorliegenden Arbeit wurde PEOx als Polymerkomponente eingesetzt, um verschiedene Enzyme direkt einzuspinnen. Die Vorversuche zeigten, dass PEOx mit einem Molekulargewicht unterhalb von  $M_n = 22.500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  nicht reproduzierbar verspinnbar ist. Bessere Ergebnisse werden bei höheren Molekulargewichten erhalten, so dass ein käuflich erwerbbares PEOx mit einem angegebenen Molekulargewicht von  $M_w = 500.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  (PEOx<sub>5000</sub>) eingesetzt wurde. Eine vollständige Vernetzung der Nanofasern mit Hilfe von kürzerkettigen, beidseitig funktionalisierten PEOx-Polymeren und HEA konnte nicht realisiert werden.

Für die Trägerung von Enzymen wurde daher ein Spinnansatz von PEOx<sub>5000</sub> und dem jeweiligen Enzym in reinem ddH<sub>2</sub>O eingesetzt. Eine Enzymbeladung von 0,5 Gew% bezogen auf das Polymer resultierte in allen Fällen in homogenen Fasern mit Durchmessern im Nanometerbereich. Eine höhere Beladung war nicht für alle Enzyme zu verwirklichen, hier nahm die Faserqualität bei 1 Gew% Enzym bereits stark ab. Für CaL B konnten Beladungen bis zu 10,4 Gew% realisiert werden, wobei die Fasern feucht und verklebt vorlagen.

Eine prinzipielle Eignung für industrielle Reaktoren wurde für CaL B gezeigt, hier konnte ein biokatalytisch wirksamer Rührer verwirklicht werden, bei dem kein Leaching auftrat und die Produktbildung kontinuierlich erfolgte.



## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war die Stabilisierung von Biokatalysatoren durch Einschluss in verschiedenartige, polyoxazolinbasierte Strukturen für den Einsatz in organischen Medien. Im Hinblick auf eine potentielle, industrielle Anwendung sollten die Enzyme direkt bei der Trägersynthese eingeschlossen werden. Dabei wurden zunächst telechele, bifunktionale Poly(2-R-Oxazoline) für die Herstellung von amphiphilen Conetzwerken synthetisiert, um den Einfluss der Quelleigenschaften dieser Netzwerke sowie den Trägerdimensionen auf die Enzymaktivität zu untersuchen. Des Weiteren wurden mit dem Elektrospleinverfahren Nanofasern aus Poly(2-Ethyloxazolin) (PEtOx) erzeugt und ihr Einsatz als nanoskalige heterogene Katalysatoren untersucht.

### 6.1. APCNs und APCN-Mikropartikel

Für die Synthese der APCNs wurden telechele PEtOx und Poly(2-Methyloxazolin)e (PMOx) durch mikrowellenassistierte, kationisch lebende Polymerisation hergestellt und mit *N*-[3-(Dimethylaminopropyl)methacrylamid] (DMAPMA) funktionalisiert. Die Charakterisierung der Polymere erfolgte über <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie und GPC.

Insgesamt wurden drei verschiedenartige APCNs synthetisiert. Zwei enthielten PMOx als hydrophile Komponente, hier stellten Polybutylacrylat (PBuAc) und Polyethylhexylacrylat (PEhAc) die jeweils hydrophoben Komponenten dar. Die resultierende Zusammensetzung dieser APCNs wurde anhand von FTIR-Messungen bestimmt, die Untersuchung der Nanostrukturierung erfolgte mittels AFM. Weiterhin wurden diese Netzwerke durch Quellungsmessungen und Bestimmung des Solanteils charakterisiert.

APCNs bestehend aus PEtOx und 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) wurden in der von Dech ermittelten optimalen Zusammensetzung von PEtOx/HEA 70/30 hergestellt. Eine Charakterisierung erfolgte durch Quellungsmessungen und Ermittlung der Nanostruktur anhand von AFM-Untersuchungen. Diese Netzwerke wurden in einer Cryomühle zu Mikropartikeln zermahlen, die anhand von REM-Untersuchungen charakterisiert wurden.

Dabei konnten für alle APCNs, bei PBuAc-*l*-PMOx und PEhAc-*l*-PMOx ab einem Acrylatanteil von 50 Gew%, eine interkonnektive, nanophasenseparierte Struktur erreicht werden (Abb. 5.12 und 5.17).



Anhand der PMOx-basierten APCNs wurden die Quelleigenschaften der Netzwerke als bedeutungsvoll für die enzymatische Aktivität identifiziert. PBuAc-*l*-PMOX wies, im Gegensatz zu PEhAc-*l*-PMOX keine Quellung in *n*-Heptan auf, während in Toluol beide APCNs gleichermaßen quellen (Abb. 5.14).

Eine in diesen Netzwerken eingeschlossene Lipase aus *Candida antarctica* (CaL B) war in allen APCN-Zusammensetzungen aktiv und zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Art des APCNs und des Lösemittels (Abb. 5.16). Die Aktivität des freien Enzympulvers sowie von CaL B, die in PEhAc-*l*-PMOX-APCNs immobilisiert ist, ist in *n*-Heptan höher als in Toluol. Das ändert sich, wenn PBuAc-*l*-PMOX-APCNs als Träger eingesetzt werden. Hier wurde in *n*-Heptan eine geringere Aktivität erreicht als in Toluol, was in der mangelnden Quellbarkeit des APCNs in diesem Lösemittel begründet liegt. Dabei wurde festgestellt, dass unabhängig von der Art des APCNs und Lösemittels die maximal erreichbare Aktivierung der CaL B den Faktor 23 beträgt.

Die von Dech etablierten und in dieser Arbeit weiter untersuchten APCNs bestehend aus PEtOx und PHEA wurden nach der Synthese zu Mikropartikeln mit einem Durchmesser von  $55 \pm 20,4 \mu\text{m}$  zermahlen. Durch die Verkleinerung der Trägerdimension sollte die intrinsische Diffusionslimitierung, die bei der Arbeit mit PHEA-*l*-PEtOx-APCNs auffiel, aufgehoben werden. Als Kennwert diente hier der Thiele-Modul. Bei einer Enzymbeladung von 0,2 Gew% Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RmL) wurde die Aktivität durch das Mahlen in *n*-Heptan mit  $6040 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  fast verdoppelt, Dech erreichte hier bei PHEA-*l*-PEtOx-APCNs eine spezifische Aktivität von  $3450 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ .

Der Einfluss der Partikelgröße wurde weiter untersucht, indem die Partikel direkt nach dem Mahlen in Chloroform gesiebt wurden. Bei Maschenweiten von 80, 40 und 20  $\mu\text{m}$  wurden dabei Partikelgrößen von  $21 \pm 5,0$ ,  $22 \pm 6,6$  und  $11 \pm 2,5 \mu\text{m}$  erhalten. Die Bestimmung der Aktivität für diese Fraktionen und der ungesiebten Partikel in Chloroform machte die Dependenz deutlich (Abb. 5.24). Je kleiner die Partikeldimension, desto höher die erhaltene Enzymaktivität.

Bei der lösemittelfreien Durchführung des Assays wurde bereits bei Netzwerken mit 0,2 Gew% Beladung eine Aktivität von  $6170 \pm 1220 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  erreicht. Nach Sieben mit 20  $\mu\text{m}$  Maschenweite wird die Aktivität um den Faktor 7 erhöht, hier wurde eine spezifische Aktivität von



$42.310 \pm 7.358 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  und eine Trägeraktivität von  $89 \pm 15 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  erreicht. Die maximal erreichte Trägeraktivität betrug unabhängig vom Lösemittel  $100 \frac{\text{U}}{\text{g}}$ . Bei den kleinsten Partikeln lag der Thiele-Modul unter 0,3, was bedeutet dass hier keine innere Diffusionslimitierung vorliegt. Dennoch wurde eine Limitierung des Stofftransportes festgestellt, so dass die hier synthetisierten Partikel noch nicht das optimale Trägersystem für Enzyme in organischen Lösemitteln darstellen.

## 6.2. Nanofasern

Für eine erfolgreiche und reproduzierbare Synthese der Nanofasern aus PEtOx konnte eine mindestens notwendige Molmasse von  $M = 22.500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  herausgefunden werden. Die so hergestellten Fasern wiesen jedoch einen Durchmesser im  $\mu\text{m}$ -Bereich auf, so dass für weitere Versuche ein käuflich erwerbliches PEtOx mit einer Molmasse von  $500.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  (PEtOx<sub>5000</sub>) eingesetzt wurde.

Versuche zur chemischen Vernetzung der Nanofasern wurden auf unterschiedliche Weise durchgeführt. Im Laufe der Arbeit wurde ein Polymergemisch aus bifunktionalem PEtOx<sub>20</sub> für die Vernetzungsreaktion und PEtOx<sub>5000</sub> als strukturgebende Komponente im Verhältnis 1:1 mit insgesamt 30 Gew% Polymergehalt der Spinnlösung in ddH<sub>2</sub>O als optimale Zusammensetzung der Spinnlösung herausgearbeitet. So wurden homogene Fasern mit Durchmessern von einigen 100 nm erhalten (Abb. 5.41).

Die chemische Vernetzung wurde durch 45 minütige Bestrahlung mit UV-Licht im Anschluss an den Spinnprozess durchgeführt. In allen eingesetzten Systemen blieb die Faserstruktur auf diese Weise für 45 Minuten erhalten, im Gegensatz zu den unbestrahlten Proben, die sich nach 15 Minuten auflösten. Zwar konnte durch DLS-Messungen zumindest eine teilweise Vernetzung nachgewiesen werden, diese reicht jedoch nicht aus um die Faserstruktur auch bei Kontakt mit Lösemittel zu konservieren.

Für die Herstellung von enzymgeträgerten Nanofasern durch direktes Einspinnen von Enzymen wurde auf die Zugabe der vernetzenden Polymerkomponente verzichtet und nur PEtOx<sub>5000</sub> eingesetzt. Dafür wurde ein Polymergehalt von 20 Gew% für eine möglichst hohe mögliche CaL B-Beladung bei homogenen Fasern ermittelt.



Die hier gemessene Enzymaktivität zeigt einen starken aktivierenden Effekt an (Abb. 5.50), mit einer maximal erreichten Trägeraktivität von  $281,4 \pm 36,7 \frac{\text{U}}{\text{g}}$  bei einer CaL B-Beladung von 10,4 Gew%. Die Reproduktion der Versuche bei einer Beladung von 3 Gew% CaL B lässt dabei auf starke Schwankungen bei den gemessenen Aktivitäten schließen.

Als weitere Enzyme wurden Lipasen aus *Candida rugosa* und *Rhizomucor miehei*, Peroxidase aus Rettich,  $\alpha$ -Chymotrypsin, Papain, Laccase und eine Alkoholdehydrogenase erfolgreich bei einer Beladung von 0,5 Gew% Enzym bezogen auf PEtOx<sub>5000</sub> elektrogesponnen. Die hier synthetisierten Nanofasern wiesen Durchmesser zwischen 300 und 500 nm auf bei einer insgesamt guten Faserqualität ohne Ausbildung von Beads (Abb. 5.52).

Die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen zeigen zum Teil große Unterschiede bei den Restaktivitäten (RA) und der Aktivierung an (Tab. 5.14). Im Fall der Alkoholdehydrogenase wurde mit 12 % die geringste Restaktivität erreicht, während die Proteasen durch die Trägerung Restaktivitäten über 100 % erreichten.

Die geringste Aktivierung in organischen Medien wurde im Falle der CaL B erhalten, der Faktor beträgt hier 3,4 gegenüber dem freien Enzympulver. Die höchste, 400-fache Aktivierung wurde bei CT erreicht, im Vergleich zu dem direkt aus der Packung eingesetzten Enzym. Der Vergleich von Restaktivitäten und Aktivierung zu Literdaten von auf Nanofasern oder anderen Materialien geträgerten Enzymen zeigt für alle der hier eingesetzten Enzyme vergleichbare oder bessere Werte.

Den Abschluss dieser Arbeit bildete der erfolgreiche Einsatz eines biokatalytisch aktiven Rührers mit CaL B, der über 8 Stunden eine kontinuierliche Produktbildung erreichte. Ein Wechsel zwischen zwei Lösungsmittelchargen zeigte in beiden Fällen kontinuierliche Produktbildung, solange der Rührer eingetaucht war und Stagnation in der restlichen Zeit (Abb. 5.57).

Damit konnte der potentielle industrielle Einsatz von Nanofasern in Batchreaktoren gezeigt werden.



## 7. KURZZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die direkte Trägerung von Enzymen in amphiphilen Polymerconetzwerken (APCNs) und elektrogenesponnenen Nanofasern, um deren Aktivität in organischen Medien zu erhöhen.

Anhand von APCNs unterschiedlicher Zusammensetzung, bestehend aus Poly(2-Methyloxazolin) und Poly(Butylacrylat) bzw. Poly(2-Ethylhexylacrylat), wurde eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität einer Lipase von der Quellbarkeit der Netzwerke in verschiedenen organischen Medien bewiesen. Die Trägerung aktivierte das Enzym um einen Faktor 23 (Toluol) oder 20 (*n*-Heptan). Der amphiphile Charakter der APCNs wurde anhand von AFM-Untersuchungen und Quellungsmessungen bewiesen.

Die Aktivität einer in APCNs aus Poly(2-Hydroxyethylacrylat) und Poly(2-Ethylloxazolin) (PEtOx) geträgerten Lipase wurde durch Kryomahlen der APCNs auf das Doppelte erhöht. Nach REM-Untersuchungen wurde die Größe der resultierenden Mikropartikel auf  $55 \pm 20 \mu\text{m}$  bestimmt. Die maximale Trägeraktivität bei Beladungen über 3,7 Gew% ist dreifach höher als die der käuflich erwerblichen Lipase. Sowohl für APCNs als auch Mikropartikel zeigt der Thiele-Modul intrinsische Diffusionslimitierungen an. Diese konnten mit Chloroform als Lösemittel umgangen werden, hier wurden jedoch nur geringe Aktivitäten erhalten. Durch Sieben ergaben sich als kleinste Fraktion Partikel mit einer Größe von  $11,0 \pm 2,5 \mu\text{m}$ . Diese eingesetzt im lösemittelfreien System zeigten zwar intrinsische Diffusionslimitierungen an, erreichten jedoch eine um zwei Größenordnungen höhere maximale spezifische Aktivität als die des freien Enzypulvers. Die Trägeraktivität ist zehnfach höher als die des käuflichen Immobilisats.

Das mindestens notwendige Molekulargewicht von PEtOx für reproduzierbare Faserbildung wurde zu  $22.500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  bestimmt. Nanofasern wurden mit PEtOx mit einem Molgewicht von  $500000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$  erhalten. Die Faseruntersuchungen erfolgten durch Rasterelektronenmikroskopie. Direktes Verspinnen verschiedener Enzyme mit PEtOx resultierte in homogenen Nanofasern. Alle Enzyme wurden durch die Trägerung um das 3,4 – bis zu 400-fache aktiviert und zeigen damit fast alle mindestens vergleichbare Resultate als aktuelle Literatur. Ein biokatalytisch wirksamer Rührer zeigte kontinuierliche Produktbildung über 8 Stunden. Bei wiederholtem



Wechsel des Reaktionsmediums trat kein Leaching auf, womit das Potential für industrielle Anwendungen gezeigt wurde.

### Abstract

The objective of this work was the direct immobilization of enzymes in amphiphilic polymer conetworks (APCNs) and electrospun nanofibers to enhance their catalytic activity in organic media.

Synthesis of APCNs with different compositions, containing poly(2-methyloxazoline) and poly(butylacrylate) or poly(2-ethylhexylacrylate), show a strong dependence of enzyme activity from the swelling behavior of the network. The enzyme was activated by a factor of 23 (toluene) or 20 (*n*-heptane). The amphiphilic character of the APCNs was proven with AFM and swelling measurements.

The specific activity of a lipase immobilized in an APCN from poly(2-hydroxyethylacrylate) und poly(2-ethyloxazoline) was doubled by cryomilling. The size of the microparticles was determined via REM to 55  $\mu\text{m}$ . Maximum carrier activity occurs with enzyme loading over 3,7 wt% and is threefold higher than the activity of the buyable immobilized lipase. Thiele modulus displays intrinsic diffusion limitations for APCNs and microparticles. This was circumvented by replacing the solvent through chloroform, however the activity here is very low. Classification of microparticles results in fractions with smallest diameter of 11,0  $\mu\text{m}$ . These microparticles used under solvent free conditions still show intrinsic diffusion limitations, but reach a maximum activity higher by two orders of magnitude compared to the free enzyme. Carrier activity is 10 fold higher compared to the buyable product.

The minimum molecular weight of poly(2-ethyloxazoline) for reproducible fiber formation was determined as 22.500  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ . Nanofibers were obtained with poly(2-ethyloxazoline) of 500000  $\frac{\text{g}}{\text{mol}}$ . All fibers were characterized by REM. Direct electrospinning of different enzymes with poly(2-ethyloxazoline) resulted in homogeneous fiber formation. All enzymes were activated by a factor of 3.4 to 400, which is almost always at least comparable to recent literature. A biocatalytically active stirrer showed continuous formation of product over 8 hours. Even with a change of reaction medium no leaching occurred, which proves its high potential for industrial application.



## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lebensmittelchemie*, 6th ed.; Springer-Lehrbuch; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2008.
2. *Stryer Biochemie*; Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Eds., 7. Aufl; Spektrum: Heidelberg, 2012.
3. Sylдатk, C.; Hauer, B.; May, O. Biokatalyse in der chemischen Industrie. *BIOspektrum* **2001**, *7*, 145–147.
4. Gent, R.; Roth, M.-L. Biotechnologie im Alltag. [www.vci.de](http://www.vci.de) (accessed September 2, 2015).
5. Basir, F. A.; Datta, S.; Roy, P. K. Studies on biodiesel production from *Jatropha Curcas* oil using chemical and biochemical methods – A mathematical approach. *Fuel* **2015**, *158*, 503–511. DOI: 10.1016/j.fuel.2015.05.048.
6. *Handbook of heterogeneous catalysis*; Ertl, G., Ed.; VCH: Weinheim, (1997).
7. *Chemische Technik. Prozesse und Produkte*; Dittmeyer, R., Keim, W., Kreysa, G., Oberholz, A., Winnacker, K., Küchler, L., Eds., 5. Aufl; Wiley-VCH: Weinheim, 2004-2006.
8. Wu, X.-F.; Anbarasan, P.; Neumann, H.; Beller, M. Vom Edelmetall zum Nobelpreis: Palladiumkatalysierte Kupplungen als Schlüsselmethode in der organischen Synthese. *Angewandte Chemie* **2010**, *122* (48), 9231–9234. DOI: 10.1002/ange.201006374.
9. *Bioanalytik für Einsteiger. [Diabetes, Drogen und DNA]*; Renneberg, R., Ed. Buch; Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg, 2009.
10. Bugg, T. *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, 3rd ed; John Wiley and Sons Ltd; Wiley: West Sussex, 2012.
11. *Lexikon der Biologie. In vierzehn Bänden*; Freudig, D., Sauermost, R., Eds.; Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, 1999.
12. *Technische Chemie*; Baerns, M., Ed., 02th ed.; Wiley-Vch Verlag GmbH: [S.l.], 2013.
13. Kolb, H. C.; VanNieuwenhze, M. S.; Sharpless, K. B. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation. *Chem. Rev.* **1994**, *94* (8), 2483–2547. DOI: 10.1021/cr00032a009.
14. *Große Moleküle*; Sund, H., Ed.; Suhrkamp Verlag: Frankfurt am Main, 1970.
15. *Bioanorganische Chemie. Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen*; Kaim, W., Schwederski, B., Eds., 2., überarb. Aufl; Teubner: Stuttgart, 1995.



16. Rehm, S.; Trodler, P.; Pleiss, J. Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2010**, *19* (11), 2122–2130. DOI: 10.1002/pro.493.
17. D.J. Hanahan. The enzymatic degradation of phosphatidyl choline in diethyl ether. *Journal of Biological Chemistry* **1952**, *195* (1), 199–206.
18. Zaks, A.; Klibanov, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **1985**, *82*, 3192–3196.
19. *Industrial biotransformations*; Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., Eds., 2nd completely rev. and extended ed; Wiley-VCH: Weinheim, 2006.
20. Zaks, A.; Klibanov, A. M. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263* (17), 8017–8021.
21. Klibanov, A. M. Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *trends in Biotechnology* **1997**, *15*, 97–101.
22. Rupley, J. Water and globular proteins. *Trends in Biomedical Science* **1983**, *8*, 18–22.
23. Griebenow, K.; Klibanov, A. M. On Protein Denaturation in Aqueous-Organic Mixtures but not in pure Organic Solvents. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 11695–11700.
24. Klibanov, A. M.; Zaks, A. Enzymatic Catalysis in Nonaqueous Solvents. *The Journal of Biological Chemistry* **1988**, *263*, 3194–3201.
25. Konieczny, S.; Krumm, C.; Doert, D.; Neufeld, K.; Tiller, J. C. Investigations on the activity of poly(2-oxazoline) enzyme conjugates dissolved in organic solvents. *Journal of Biotechnology* **2014**, *181*, 55–63.
26. Gianfreda, L.; Scarfi, M. R. Enzyme stabilization; state of the art. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1991**, *100*, 97–128.
27. Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349* (8-9), 1289–1307. DOI: 10.1002/adsc.200700082.
28. Cao, L. Immobilised enzymes: science or art? *Current opinion in chemical biology* **2005**, *9* (2), 217–226. DOI: 10.1016/j.cbpa.2005.02.014.
29. Deichert, W. G.; Su, K. C.; van Buren, M. F. Polysiloxane composition and contact lens. US 05/878,831, Jul 25, 1977.



30. Mueller, K. F.; Kleiner, E. K. Crosslinked, addition monomer or polymer. US 05/817,405, Jul 20, 1977.
31. Bruns, N.; Tiller, J. C. Nanophasic Amphiphilic Conetworks with a Fluorophilic Phase. *Macromolecules* **2006**, *39*, 4386–4394.
32. Bruns, N. Design von amphiphilen Conetzwerken zur Generierung von nanoskaligen Reaktionsräumen für Biotransformationen in nichtwässrigen Medien. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., Freiburg im Breisgau, 2006.
33. Dech, S.; Wruk, V.; Fik, C. P.; Tiller, J. C. Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents. *Polymer* **2012**, *53* (3), 701–707. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.12.027.
34. Wack, H. Zum Quellungsdruck von polymeren Hydrogelen. Dissertation; Universität Duisburg-Essen, Essen, 2006.
35. Krumm, C. Endgruppendesign von Poly(2-Oxazolin)en für nanostrukturierte Materialien und schaltbare bioaktive Polymere. Dissertation; TU Dortmund, Dortmund, 2014.
36. Mespouille, L.; Hedrick, J. L.; Dubois, P. Expanding the role of chemistry to produce new amphiphilic polymer (co)networks. *Soft Matter* **2009**, *5* (24), 4878. DOI: 10.1039/b910041p.
37. Domján, A.; Mezey, P.; Varga, J. Behavior of the Interphase Region of an Amphiphilic Polymer Conetwork Swollen in Polar and Nonpolar Solvent. *Macromolecules* **2012**, *45* (2), 1037–1040. DOI: 10.1021/ma202388f.
38. Haraszti, M.; Tóth, E.; Iván, B. Poly(methacrylic acid)-I-Polyisobutylene: A Novel Polyelectrolyte Amphiphilic Conetwork. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (20), 4952–4958. DOI: 10.1021/cm061119v.
39. Bruns, N.; Scherble, J.; Hartmann, L.; Thomann, R.; Iván, B.; Mülhaupt, R.; Tiller, J. C. Nanophase Separated Amphiphilic Conetwork Coatings and Membranes. *Macromolecules* **2005**, *38* (6), 2431–2438. DOI: 10.1021/ma047302w.
40. Domján, A.; Fodor, C.; Kovács, S.; Marek, T.; Iván, B.; Süvegh, K. Anomalous Swelling Behavior of Poly(N -vinylimidazole)-I -Poly(tetrahydrofuran) Amphiphilic Conetwork in Water Studied by Solid-State NMR and Positron Annihilation Lifetime Spectroscopy. *Macromolecules* **2012**, *45* (18), 7557–7565. DOI: 10.1021/ma301533g.
41. Okuno, H.; Okado, T.; Matsumoto, A.; Masayoshi, O.; Uragami, T. Permselective Properties for Aqueous Ethanol Solution through Copolymer Membranes from Benzyl Methacrylate and



- Polyethylene Glycol Dimethacrylate. *Separation Science and Technology* **1992**, 27 (12), 1599–1617.
42. Carrot, G.; Schmitt, B.; Lutz, P. Synthesis and characterization of amphiphilic networks obtained by copolymerization of poly(ethylene oxid) macromonomers with methylmethacrylate. *Polymer Bulletin* **1998**, 40 (2-3), 181–188.
43. De Clercq, Ronny R.; Goethals, E. J. Polymer networks containing degradable polyacetyl segments. *Macromolecules* **1992**, 25 (3), 1109–1113.
44. Christova, D.; Velichkova, R.; Goethals, E. J.; Du Prez, F. E. Amphiphilic segmented polymer networks based on poly(2-alkyl-2-oxazoline) and poly(methyl methacrylate). *Polymer* **2002**, 43 (17), 4585–4590.
45. Nicolson, P. C.; Vogt, J. Soft contact lens polymers: an evolution. *Biomaterials* **2001**, 22 (24), 3273–3283. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00165-X.
46. Gudipati, C. S.; Greenlief, C. M.; Johnson, J. A.; Prayongpan, P.; Wooley, K. L. Hyperbranched fluoropolymer and linear poly(ethylene glycol) based amphiphilic crosslinked networks as efficient antifouling coatings: An insight into the surface compositions, topographies, and morphologies. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2004**, 42 (24), 6193–6208. DOI: 10.1002/pola.20466.
47. Kennedy, J. P.; Fenyvesi, G.; Levy, R. P.; Rosenthal, K. S. Amphiphilic Membranes with Controlled Mesh Dimensions for Insulin Delivery. *Macromolecular Symposia* **2001**, 172, 56–66.
48. Tiller, J. C.; Sprich, C.; Hartmann, L. Amphiphilic conetworks as regenerative controlled releasing antimicrobial coatings. *Journal of Controlled Release* **2005**, 103 (2), 355–367.
49. Hanko, M.; Bruns, N.; Rentmeister, S.; Tiller, J. C.; Heinze, J. Nanophase-Separated Amphiphilic Conetworks as Versatile Matrixes for Optical Chemical and Biochemical Sensors. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, 6376–6383.
50. Meskath, S.; Heinze, J.; Urban, G. Silicone Containing Amphiphilic Co-Networks as Immobilisation Matrices for Enzyme based Biosensors: Optochemical Detection of Gaseous Hydrogen Peroxide. *Procedia Engineering* **2011**, 25, 31–34. DOI: 10.1016/j.proeng.2011.12.008.
51. Fänger, C. Schaltbare polymere Hydrogele für die reversible Immobilisierung von Enzymen. Dissertation; Universität Duisburg-Essen, Essen, 2005.
52. Dech, S.; Cramer, T.; Ladisch, R.; Bruns, N.; Tiller, J. C. Solid-solid interface adsorption of proteins and enzymes in nanophase-separated amphiphilic conetworks. *Biomacromolecules* **2011**, 12 (5), 1594–1601. DOI: 10.1021/bm1015877.



53. Yasuda, M.; Kobayashi, M.; Kotani, T.; Kawahara, K.; Nikaido, H.; Ueda, A.; Ogino, H.; Ishikawa, H. Synthesis of Amphiphilic Polymer Particles by Seed polymerization and Their Application for Lipase Immobilization. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2002**, *203*, 284–293.
54. Moune, S.; Fare, F.; Gauthier, P.-J.; Sims, W. W. Pele's hair and tears: Natural probe of volcanic plume. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* **2007**, *164* (4), 244–253.
55. Yukseloglu, S. M.; Sokmen, N.; Canoglu, S. Biomaterial applications of silk fibroin electrospun nanofibres. *Microelectronic Engineering* **2015**, *146*, 43–47.
56. Villermaux, E. The formation of filamentary structures from molten silicates: Pele's hair, angel hair, and blown clinker. *Comptes Rendus Mecanique* **2012**, *340*, 555–564.
57. Sittko, M. *Spinnennetz. privates Foto*, 2013.
58. Gilbert, W. *De Magnete, Magneticisque Corporibus, et de Magno Magnete Tellure*, 2nd ed.; Wolfgang Lockmans: Stettin, 1628.
59. Lord Rayleigh. On the Equilibrium of Liquid. *Proceedings of the Royal Society of London [Online]* **1881**, 184–186.
60. Lord Rayleigh. On the Instability of Cylindrical Fluid Surfaces. *Physical Society [Online]* **1892**, 177–180.
61. Boys, C. V. On the Production, Properties, and some suggested Uses of the Finest Threads. *Proceedings of the Physical Society in London [Online]* **1887**, 8–19.
62. Cooley, J. F. Apparatus for electrically dispersing fluids, Patentschrift US 692631 A, Oct 6, 1899.
63. Cooley, J. F. Improved Methods of an apparatus for electically separating the relatively volatile liquid component from the component of relatively fixed substances of composite fluids, Patentschrift GB 06385, 1900.
64. Morton, W. J. Method of dispersing fluids, Patentschrift US 7056910 A, Feb 20, 1900.
65. Formhals, A. Process and apparatus for preparing artificial threads, Patentschrift US 1975504 A, Dec 5, 1930.
66. Formhals, A. Method and apparatus for spinning, Patentschrift US 2349950 A, Aug 16, 1938.
67. Zeleny, J. The Electrical Discharge from Liquid Points, and a Hydrostatic method of Measuring the Electrical Intensity at Their Surfaces. *Physical Review Letters* **1914**, *3*, 69–91.



68. Taylor, G. Disintegration of water drops in an electric field. *Proceedings of the Royal Society of London A* **1964**, *280*, 383–397.
69. Reneker, D. H.; Chun, I. Nanometer diameter fibers of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* **1996**, *7*, 216–233.
70. Kim, J.; Reneker, D. H. Mechanical Properties of Composite Using Ultrafine Electrospun Fibers. *Polymer Composites* **1999**, *20* (1), 124–131.
71. Rutledge, G. C.; Oertli, A. G. Crystal structures of fibers from a novel rigid-rod aromatic polyamide containing a pyrimidine moiety. *Macromolecular Chemistry* **1991**, *192*, 2993–3004.
72. Glomm, B. H.; Rutledge, G. C.; Küchenmeister, P.; Suter, U. W. Spinning and characterization of fibers from poly(2,6-di-chloro-p-phenyleneterephthalamide): a study of constitutional isomerism and solid-state arrangements by comparison between simulation and experiment. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1994**, *195*, 475–510.
73. Teo, W. E.; Ramakrishna, S. A review on electrospinning design and nanofibre assemblies. *Nanotechnology* **2006**, *17* (14), R89-R106. DOI: 10.1088/0957-4484/17/14/R01.
74. Greiner, A.; Wendorff, J. H. Elektrospinnen: eine faszinierende Methode zur Präparation ultradünner Fasern. *Angew. Chem.* **2007**, *119* (30), 5770–5805. DOI: 10.1002/ange.200604646.
75. Garg, K.; Bowlin, G. L. Electrospinning jets and nanofibrous structures. *Biomicrofluidics* **2011**, *5* (1), 13403. DOI: 10.1063/1.3567097.
76. Leach, M. K.; Feng, Z.-Q.; Tuck, S. J.; Corey, J. M. Electrospinning fundamentals: optimizing solution and apparatus parameters. *Journal of visualized experiments : JoVE [Online]* **2011**, No. 47.
77. Melcher, J. R.; Taylor, G. Electrohydrodynamics; A Review of the Role of Interfacial Shear Stresses. *Annual Review of Fluid Mechanics* **1969**, *1*, 111–146.
78. Baumgarten, P. K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *Journal of Colloid and Interface Science* **1971**, *36* (1), 71–79.
79. Hohman, M. M.; Shin, M.; Rutledge, G.; Brenner, M. P. Electrospinning and electrically forced jets. I. Stability theory. *Phys. Fluids* **2001**, *13* (8), 2201. DOI: 10.1063/1.1383791.
80. Guerrero, J.; Gundabala, V. R.; Perez-Saborid, M.; Fernandez-Nieves, A. Whipping of electrified liquid jets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2014**, *111* (38), 13763–13767.



81. Kim, G.-M. Verstärkungsmechanismen auf Makro-, Mikro-, und Nano-Längenskalen in heterogenen Polymerwerkstoffen. Habilitation; Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale), 2007.
82. Deitzel, J. M.; Kleinmeyer, J., Harris, D.; beck tan, N. C. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* **2001**, *42*, 261–272.
83. Yarin, A. L.; Koombhongse, S.; Reneker, D. H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics* **2001**, *90*, 4836–4846.
84. Larrondo, L.; Manley, R. J. Electrostatic fiber spinning from polymer melts. I. Experimental observations on fiber formation and properties. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition* **1981**, *19* (6), 909–920.
85. Bistram, M. v. Strukturierte funktionelle Nanofasern durch Elektrospinnen. Dissertation; Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn, 2007.
86. Shin, M. Y.; Hohman, M. M.; Brenner M.P.; Rutledge, G. C. Experimental characterization of electrospinning: the electrically forced jet and instabilities. *Polymer* **2001**, *42* (25), 09955–09967.
87. Huang, Z.-M.; Zhang, Y.-Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Science and Technology* **2003**, *63* (15), 2223–2253. DOI: 10.1016/S0266-3538(03)00178-7.
88. Subbiah, T.; Bhat, G. S.; Tock, R. W.; Parameswaran, S.; Ramkumar, S. S. Electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, *96* (2), 557–569. DOI: 10.1002/app.21481.
89. Holzmeister, A.; Rudisile, M.; Greiner, A.; Wendorff, J. H. Structurally and chemically heterogeneous nanofibrous nonwovens via electrospinning. *European Polymer Journal* **2007**, *43* (12), 4859–4867. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.09.014.
90. Agarwal, S.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. Chemistry on electrospun polymeric nanofibers: merely routine chemistry or a real challenge? *Macromolecular rapid communications* **2010**, *31* (15), 1317–1331. DOI: 10.1002/marc.201000021.
91. Liu, Y.; Rafailovich, M. H.; Malal, R.; Cohn, D.; Chidambaram, D. Engineering of bio-hybrid materials by electrospinning polymer-microbe fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (34), 14201–14206. DOI: 10.1073/pnas.0903238106.



92. Tong, H.-W.; Mutlu, B. R.; Wackett, L. P.; Aksan, A. Manufacturing of bioreactive nanofibers for bioremediation. *Biotechnology and bioengineering* **2014**, *111* (8), 1483–1493. DOI: 10.1002/bit.25208.
93. Qi, H.; Hu, P.; Xu, J.; Wang, A. Encapsulation of drug reservoirs in fibers by emulsion electrospinning: morphology characterization and preliminary release assessment. *Biomacromolecules* **2006**, *7* (8), 2327–2330. DOI: 10.1021/bm060264z.
94. Zahedi, P.; Rezaeian, I.; Ranaei-Siadat, S.-O.; Jafari, S.-H.; Supaphol, P. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. *Polym. Adv. Technol. [Online]* **2009**, n/a.
95. Khmel'nitsky, Y.; Neverova, I. N.; Momtcheva, R.; Yaropolov, A. I.; Belova, A. B.; Levashov, A. V.; Martinek, K. Surface-modified polymeric nanogranules containing entrapped enzymes: A novel biocatalyst for use in organic media. *Biotechnology Techniques* **1989**, *3* (4), 275–280.
96. Wang, P. Nanoscale biocatalyst systems. *Current opinion in biotechnology* **2006**, *17* (6), 574–579. DOI: 10.1016/j.copbio.2006.10.009.
97. Shaffer, R. E.; Rengasamy, S. Respiratory protection against airborne nanoparticles: a review. *J Nanopart Res* **2009**, *11* (7), 1661–1672. DOI: 10.1007/s11051-009-9649-3.
98. Mohanraj, V. J.; Chen, Y. Nanoparticles- A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical research* **2006**, *5* (1), 561–573.
99. Murray, L. J.; Dincă, M.; Long, J. R. Hydrogen storage in metal-organic frameworks. *Chemical Society reviews* **2009**, *38* (5), 1294–1314. DOI: 10.1039/b802256a.
100. James, S. L. Metal-organic frameworks. *Chem. Soc. Rev.* **2003**, *32* (5), 276. DOI: 10.1039/b200393g.
101. Megelski, S.; Stephens, J. S.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Micro- and Nanostructured Surface Morphology on Electrospun Polymer Fibers. *Macromolecules* **2002**, *35* (22), 8456–8466. DOI: 10.1021/ma020444a.
102. Casper, C. L.; Stephens, J. S.; Tassi, N. G.; Chase, D. B.; Rabolt, J. F. Controlling Surface Morphology of Electrospun Polystyrene Fibers: Effect of Humidity and Molecular Weight in the Electrospinning Process. *Macromolecules* **2004**, *37* (2), 573–578. DOI: 10.1021/ma0351975.
103. Kalra, V.; Kakad, P. A.; Mendez, S.; Ivannikov, T.; Kamperman, M.; Joo, Y. L. Self-Assembled Structures in Electrospun Poly(styrene- block -isoprene) Fibers. *Macromolecules* **2006**, *39* (16), 5453–5457. DOI: 10.1021/ma052643a.



104. McCann, J. T.; Marquez, M.; Xia, Y. Highly porous fibers by electrospinning into a cryogenic liquid. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128* (5), 1436–1437. DOI: 10.1021/ja056810y.
105. Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science* **2006**, *61* (3), 1017–1026. DOI: 10.1016/j.ces.2005.05.067.
106. Jia, H.; Zhu, G.; Vugrinovich, B.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H.; Wang, P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology progress* **2002**, *18* (5), 1027–1032. DOI: 10.1021/bp020042m.
107. Chen, J.-P.; Ho, K.-H.; Chiang, Y.-P.; Wu, K.-W. Fabrication of electrospun poly(methyl methacrylate) nanofibrous membranes by statistical approach for application in enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science* **2009**, *340* (1-2), 9–15. DOI: 10.1016/j.memsci.2009.05.002.
108. Nair, S.; Kim, J.; Crawford, B.; Kim, S. H. Improving biocatalytic activity of enzyme-loaded nanofibers by dispersing entangled nanofiber structure. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (4), 1266–1270. DOI: 10.1021/bm061004k.
109. Kim, B. C.; Nair, S.; Kim, J.; Kwak, J. H.; Grate, J. W.; Kim, S. H.; Gu, M. B. Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate coating on polymer nanofibres. *Nanotechnology* **2005**, *16* (7), S382-8. DOI: 10.1088/0957-4484/16/7/011.
110. Nakanishi, K.; Murguruma, H.; Karube, I. A Novel Method of Immobilizing Antibodies on a Quartz Crystal Microbalance Using Plasma-Polymerized Films for Immunosensors. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (10), 1695–1700. DOI: 10.1021/ac950756u.
111. Chang, A.-C.; Gillespie, J. B.; Tabacco, M. B. Enhanced Detection of Live Bacteria Using a Dendrimer Thin Film in an Optical Biosensor. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (3), 467–470. DOI: 10.1021/ac000460a.
112. Xie, J.; Hsieh, Y. Ultra-high surface fibrous membranes from electrospinning of natural proteins: casein and lipase enzyme. *Journal of Material Science* **2003**, *38*, 2125–2133.
113. Al-Shehri, H.; Smith, D. J.; Hansen, L. M.; Reneker, D. H. Preservation of Enzymes in Electrospun Nanofibers. *Technical Papers-American Chemical Society, Rubber Division, Spring Technical Meeting 163 [Online]* **2003**, 670–698.



114. WU, L.; YUAN, X.; SHENG, J. Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning. *Journal of Membrane Science* **2005**, *250* (1-2), 167–173. DOI: 10.1016/j.memsci.2004.10.024.
115. Herricks, T. E.; Kim, S.-H.; Kim, J.; Li, D.; Kwak, J. H.; Grate, J. W.; Kim, S. H.; Xia, Y. Direct fabrication of enzyme-carrying polymer nanofibers by electrospinning. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15* (31), 3241. DOI: 10.1039/b503660g.
116. Zeng, J.; Aigner, A.; Czubayko, F.; Kissel, T.; Wendorff, J. H.; Greiner, A. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (3), 1484–1488. DOI: 10.1021/bm0492576.
117. Ji, X.; Wang, P.; Su, Z.; Ma, G.; Zhang, S. Enabling multi-enzyme biocatalysis using coaxial-electrospun hollow nanofibers: redesign of artificial cells. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *2* (2), 181. DOI: 10.1039/c3tb21232g.
118. Patel, A. C.; Li, S.; Yuan, J.-M.; Wei, Y. In situ encapsulation of horseradish peroxidase in electrospun porous silica fibers for potential biosensor applications. *Nano Letters* **2006**, *6* (5), 1042–1046. DOI: 10.1021/nl0604560.
119. Hong, S.-G.; Kim, H. S.; Kim, J. Highly stabilized lipase in polyaniline nanofibers for surfactant-mediated esterification of ibuprofen. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2014**, *30* (3), 911–915. DOI: 10.1021/la404189e.
120. Chen, Y. Z.; Yang, C. T.; Ching, C. B.; Xu, R. Immobilization of lipases on hydrophobilized zirconia nanoparticles: highly enantioselective and reusable biocatalysts. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2008**, *24* (16), 8877–8884. DOI: 10.1021/la801384c.
121. Li, X.; Huang, S.; Xu, L.; Yan, Y. Conformation and catalytic properties studies of *Candida rugosa* Lip7 via enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents and ionic liquids. *TheScientificWorldJournal* **2013**, *2013*, 364730. DOI: 10.1155/2013/364730.
122. Yousefi, M.; Mohammadi, M.; Habibi, Z. Enantioselective resolution of racemic ibuprofen esters using different lipases immobilized on octyl sepharose. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *104*, 87–94. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.03.005.
123. Jia, H.; Zhu, G.; Vugrinovich, B.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H.; Wang, P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology progress* **2002**, *18* (5), 1027–1032. DOI: 10.1021/bp020042m.



124. Jia, H.; Zhu, G.; Vugrinovich, B.; Kataphinan, W.; Reneker, D. H.; Wang, P. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology progress* **2002**, *18* (5), 1027–1032. DOI: 10.1021/bp020042m.
125. Sakai, S.; Liu, Y.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent. *Biotechnology letters* **2010**, *32* (8), 1059–1062. DOI: 10.1007/s10529-010-0279-8.
126. Sakai, S.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. Enhanced catalytic activity of lipase in situ encapsulated in electrospun polystyrene fibers by subsequent water supply. *Catalysis Communications* **2010**, *11* (6), 576–580. DOI: 10.1016/j.catcom.2009.12.023.
127. Sawada, K.; Sakai, S.; Taya, M. Enhanced productivity of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous mats using aqueous N,N-dimethylformamide solution and their application to lipase-immobilizing membrane-shaped catalysts. *Journal of bioscience and bioengineering* **2012**, *114* (2), 204–208. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.03.017.
128. Schrag, J. D.; Li, Y.; Cygler, M.; Lang, D.; Burgdorf, T.; Hecht, H.-J.; Schmid, R.; Schomburg, D.; Rydel, T. J.; Oliver, J. D.; Strickland, L. C.; Dunaway, C. M.; Larson, S. B.; Day, J.; McPherson, A. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. *Structure* **1997**, *5*, 187–202.
129. Konieczny, S. Organolösliche Polymer-Enzym-konjugate auf Basis von Poly-2-Alkyloxazolinen. Dissertation; Technische Universität Dortmund, Dortmund, 2014.
130. Sigma Aldrich. *Sicherheitsdatenblatt. 2-Ethyl-2-Oxazolin*, 2012 (accessed January 19, 2015).
131. Sigma Aldrich. *Sicherheitsdatenblatt. 2-Methyl-2-Oxazolin*, 2012 (accessed January 19, 2015).
132. Winkler, U. K.; Stuckmann, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* **1979**, *138*, 663–670.
133. Erlanger, B. F.; Edel, F.; Cooper, A. G. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1966**, *115*, 206–220.
134. *Methods of Enzymatic Analysis*; Pütter, J., Becker, R., Eds., 3rd ed.; Verlag Chemie GmbH: Deerfield Beach, 1983.
135. Keesey, J. *Biochemica Informtion*, 1st ed.; Boehringer Mannheim Biochemicals: Indianapolis, 1987.



136. Wan, Y.; Lu, R.; Xiao, L.; Du, Y.; Miyakoshi, T.; Chen, C.; Knill, C. J.; Kennedy, J. F. Effects of organic solvents on the activity of free and immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, *47*, 488–495.
137. Kägi, J.; Vallee, B. L. The role of zinc in alcohol dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* **1960**, *235*, 3188–3192.
138. Sadasivam, S.; Manickam, A. *Biochemical Methods*, 1st ed.; New Age International: Neu-Delhi, 1996.
139. Bruns, N.; Bannwarth, W.; Tiller, J. C. Amphiphilic conetworks as activating carriers for the Enhancement of enzymatic activity in supercritical CO<sub>2</sub>. *Biotechnology and bioengineering* **2008**, *101*, 19–26.
140. Savin, G.; Bruns, N.; Thomann, Y.; Tiller, J. C. Nanophase separated amphiphic microbeads. *Macromolecules* **2005**, *38*, 7536–7539.
141. Bruns, N.; Tiller, J. C. Amphiphilic Network as Nanoreactor for Enzymes in Organic Solvents. *Nano Letters* **2005**, *5*, 4386–4394.
142. Yang, F.; Russell, A. J. Optimization of Baker's Yeast Alcohol Dehydrogenase Activity in an Organic Solvent. *Biotechnology progress* **1993**, *9*, 234–241.
143. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
144. Fazekas de Groth, S.; Webster, R.; Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta* **1963**, *71*, 377–391.
145. Fik, C. P. Bioaktive, telechele Polyozoline mit funktionellen Satellitengruppen für neuartige antimikrobielle und Kollagenase-hemmende Materialien. Dissertation; TU Dortmund, Dortmund, 2012.
146. Gregg, L.; Hvass, P. *Lipozyme CaL B L. A lipase preparation produced by Aspergillus niger expressing a gene encoding a lipase from Candida antarctica*. GRAS notification LUNA No. 2004-39073-01, 2004.
147. Uppenberg, J.; Öhrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T. A. Crystallographic and Molecular-Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838–16851.



148. Kali, G.; Vavra, S.; László, K.; Iván, B. Thermally Responsive Amphiphilic Conetworks and Gels Based on Poly(N -isopropylacrylamide) and Polyisobutylene. *Macromolecules* **2013**, *46* (13), 5337–5344. DOI: 10.1021/ma400535r.
149. Shi, L.; Xie, P.; Li, Z.; Wu, Y.; Deng, J. Chiral pH-Responsive Amphiphilic Polymer Co-networks: Preparation, Chiral Recognition, and Release Abilities. *Macromol. Chem. Phys.* **2013**, *214* (12), 1375–1383. DOI: 10.1002/macp.201200729.
150. Eckert, F. Netzwerkheterogenität und kooperative Bewegung: Untersuchung von Netzwerken unterschiedlicher Vernetzungsmechanismen mit dynamischer Lichtstreuung. Dissertation; Technische Universität Dresden, Dresden, 2008.
151. Sittko, I.; Kremser, K.; Roth, M.; Kuehne, S.; Stuhr, S.; Tiller, J. C. Amphiphilic polymer conetworks with defined nanostructure and tailored swelling behavior for exploring the activation of an entrapped lipase in organic solvents. *Polymer* **2015**, *64*, 122–129. DOI: 10.1016/j.polymer.2015.03.038.
152. Delineau, L. Dynamik der Spitze-Probe Wechselwirkung bei der Rasterkraftmikroskopie an Elastomeren. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., Freiburg im Breisgau, 2001.
153. Kine, B. B.; Novak, R. W. Acrylic and methacrylic ester polymers. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* **1985**, *1*, 234–299.
154. BASF. *Technical Data. Specialty Monomers*, 2015.
155. Rettler, E. F.-J.; Kranenburg, J. M.; Lambermont-Thijs, H. M.; Hoogenboom, R.; Schubert, U. S. Thermal, Mechanical, and Surface Properties of Poly(2-N-alkyl-2-oxazoline)s. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, *211* (22), 2443–2448. DOI: 10.1002/macp.201000338.
156. Flory, P. J.; Rehner, J. Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.* **1943**, *11* (11), 521. DOI: 10.1063/1.1723792.
157. Iván, B.; Haraszti, M.; Erdódi, G.; Scherble, J.; Thomann, R.; Mülhaupt, R. New Nanophase Separated Intelligent Amphiphilic Conetworks and Gels. *Macromol. Symp.* **2005**, *227* (1), 265–274. DOI: 10.1002/masy.200550926.
158. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. Ideal tetrafunctional amphiphilic PEG/PDMS conetworks by a dual-purpose extender/crosslinker. I. Synthesis. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2005**, *43* (20), 4953–4964. DOI: 10.1002/pola.20978.



159. Erdodi, G.; Kennedy, J. P. Ideal tetrafunctional amphiphilic PEG/PDMS conetworks by a dual-purpose extender/crosslinker. II. Characterization and properties of water-swollen membranes. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2005**, *43* (20), 4965–4971. DOI: 10.1002/pola.20977.
160. Krumm, C.; Konieczny, S.; Dropalla, G. J.; Milbradt, M.; Tiller, J. C. Amphiphilic Polymer Conetworks Based on End Group Cross-Linked Poly(2-oxazoline) Homo- and Triblock Copolymers. *Macromolecules* **2013**, *46* (9), 3234–3245. DOI: 10.1021/ma4004665.
161. Meskath, S.; Urban, G.; Heinze, J. Nanophase separated amphiphilic polymer co-networks as efficient matrices for optical sensors: Rapid and sensitive detection of NO<sub>2</sub>. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *186*, 367–373. DOI: 10.1016/j.snb.2013.06.007.
162. Fodor, C.; Kali, G.; Iván, B. Poly(N -vinylimidazole)- I -Poly(tetrahydrofuran) Amphiphilic Conetworks and Gels: Synthesis, Characterization, Thermal and Swelling Behavior. *Macromolecules* **2011**, *44* (11), 4496–4502. DOI: 10.1021/ma200700m.
163. Schoenfeld, I.; Dech, S.; Ryabenky, B.; Daniel, B.; Glowacki, B.; Ladisch, R.; Tiller, J. C. Investigations on diffusion limitations of biocatalyzed reactions in amphiphilic polymer conetworks in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering* **2013**, *110* (9), 2333–2342. DOI: 10.1002/bit.24906.
164. Dech, S. Entwicklung von amphiphilen Poly(2-oxazolin)-basierten Polymerconetzwerken zur Trägerung von Biokatalysatoren. Dissertation; TU Dortmund, Dortmund, 2013.
165. Hagen, J. *Technische Katalyse. Eine Einführung*; VCH: Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, 1996.
166. Buchholz, K. Immobilisierte Enzyme - Kinetik, Wirkungsgrad und Anwendung. *Chemie Ingenieur Technik* **1989**, *61* (8), 611–620.
167. Weiß, T. Über die Denaturierungstemperatur des Enzyms Glukoseoxidase als Maß seiner Funktionsstabilität sowie ihre nano-kalorimetrische Bestimmung. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., Freiburg im Breisgau, 2006.
168. Xu, J.; Wang, Y.; Hu, Y.; Luo, G.; Dai, Y. Immobilization of lipase by filtration into a specially designed microstructure in the CA/PTFE composite membrane. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2006**, *42* (1-2), 55–63. DOI: 10.1016/j.molcatb.2006.06.007.
169. Yang, H.; Zhu, Y. Size dependence of SiO<sub>2</sub> particles enhanced glucose biosensor. *Talanta* **2006**, *68* (3), 569–574. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.04.057.



170. Cruz, J. C.; Würges, K.; Kramer, M.; Pfromm, P. H.; Rezac, M. E.; Czermak, P. Immobilization of Enzymes on Fumed Silica Nanoparticles for Applications in Nonaqueous Media. *Methods in Molecular Biology* **2011**, *743*, 147–160.
171. Bayramoglu, G.; Kaya, B.; Arica, M. Y. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres. *Food Chemistry* **2005**, *92* (2), 261–268.
172. Kong, L.; Ziegler, G. R. Role of molecular entanglements in starch fiber formation by electrospinning. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (8), 2247–2253. DOI: 10.1021/bm300396j.
173. Lee, K. H.; Kim, H. Y.; Bang, H. J.; Jung, Y. H.; Lee, S. G. The change of bead morphology formed on electrospun polystyrene fibers. *Polymer* **2003**, *44* (14), 4029–4034. DOI: 10.1016/S0032-3861(03)00345-8.
174. Huang, C.; Chen, S.; Lai, C.; Reneker, D. H.; Qiu, H.; Ye, Y.; Hou, H. Electrospun polymer nanofibres with small diameters. *Nanotechnology* **2006**, *17* (6), 1558–1563. DOI: 10.1088/0957-4484/17/6/004.
175. Bognitzki, M.; Czado, W.; Frese, T.; Schabper, A.; Hellwig, M.; Steinhart, M.; Greiner, A.; Wendorff, J. H. Nanostructured Fibers via Electrospinning. *Advanced Materials* **2001**, *13* (1), 70–72.
176. Lee, K. H.; Kim, H. Y.; La, Y. M.; Lee, D. R.; Sung, N. H. Influence of a mixing solvent with tetrahydrofuran and N,N-dimethylformamide on electrospun poly(vinyl chloride) nonwoven mats. *J. Polym. Sci. B Polym. Phys.* **2002**, *40* (19), 2259–2268. DOI: 10.1002/polb.10293.
177. Müller, G. F. J. Nanostrukturierte Trägerkatalysatoren und mesoskopische Formreplikation für Polyethylen-Reaktorblends und Nanokomposite. Dissertation; Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i.Br., Freiburg im Breisgau, 2010.
178. Greiner, A.; Wendorff, J. H. Functional Self-Assembled Nanofibers by Electrospinning. *Advances in Polymer Science* **2008**, *219*, 107–171. DOI: 10.1007/12\_2008\_146.
179. Buchko, C. J.; Chen, L. C.; Shen, Y.; Martin, D. C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer* **1999**, *40* (26), 7397–7407. DOI: 10.1016/S0032-3861(98)00866-0.
180. Zhao, S.; Wu, X.; Wang, L.; Huang, Y. Electrospinning of Ethyl-Cyanoethyl Cellulose/Tetrahydrofuran Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2004**, *91*, 242–246.



181. Wang, X.; Um, I. C.; Fang, D.; Okamoto, A.; Hsiao, B. S.; Chu, B. Formation of water-resistant hyaluronic acid nanofibers by blowing-assisted electro-spinning and non-toxic post treatments. *Polymer* **2005**, *46* (13), 4853–4867. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.03.058.
182. Wyrwa, R., Mitarbeiter bei Innovent e.V. Technologieentwicklung, Jena. *Electrospinning*. Telefonat, 2013.
183. Ding, B.; Li, C.; Miyauchi, Y.; Kuwaki, O.; Shiratori, S. Formation of novel 2D polymer nanowebs via electrospinning. *Nanotechnology* **2006**, *17* (15), 3685–3691. DOI: 10.1088/0957-4484/17/15/011.
184. Srinivasarao, M.; Collings, D.; Philips, A.; Patel, S. Three-dimensional ordered array of air Bubbles in a polymer film. *Science* **2001**, *292*, 79–83.
185. Tang, C.; Ozcam, A. E.; Stout, B.; Khan, S. A. Effect of pH on protein distribution in electrospun PVA/BSA composite nanofibers. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (5), 1269–1278. DOI: 10.1021/bm2017146.
186. Fortmann, M. Synthese von amphiphilen Polymernetzwerken durch Elektrospinnen. Bachelorarbeit; TU Dortmund, Dortmund, 2014.
187. Jaworek, A.; Sobczyk, A. T. Electrospaying route to nanotechnology: An overview. *Journal of Electrostatics* **2008**, *66* (3-4), 197–219. DOI: 10.1016/j.elstat.2007.10.001.
188. Elliott, D. E.; Davis, F. J.; Mitchell, G. R.; Olley, R. H. Structure development in electrospun fibres of gelatin. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2009**, *183*, 012021. DOI: 10.1088/1742-6596/183/1/012021.
189. Lanfer, F. Elektrogewebene Polymernanofasern für die Biokatalyse. Bachelorarbeit; TU Dortmund, Dortmund, 2014.
190. Palangetic, L.; Reddy, N. K.; Srinivasan, S.; Cohen, R. E.; McKinley, G. H.; Clasen, C. Dispersity and spinnability: Why highly polydisperse polymer solutions are desirable for electrospinning. *Polymer* **2014**, *55* (19), 4920–4931. DOI: 10.1016/j.polymer.2014.07.047.
191. Grimm, A. M. Fingerlyophilisation als schnelles Gefriertrocknungsverfahren. Dissertation; Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn, 2008.
192. Buruaga, L.; Gonzalez, A.; Irwin, J. J. Electrospinning of poly (2-ethyl-2-oxazoline). *J Mater Sci* **2009**, *44* (12), 3186–3191. DOI: 10.1007/s10853-009-3424-9.
193. Plothe, R., Wissenschaftliche Mitarbeiterin LS Biomaterialien und Polymerwissenschaften, BCI, TU Dortmund. *Aktivität von CaL B in Nanofasern*. E-Mail: Dortmund, 2015.



194. Miletić, N.; Abetz, V.; Ebert, K.; Loos, K. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles. *Macromolecular rapid communications* **2010**, *31* (1), 71–74. DOI: 10.1002/marc.200900497.
195. Sakai, S.; Antoku, K.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. Electrospun PVA fibrous mats immobilizing lipase entrapped in alkylsilicate cages: Application to continuous production of fatty acid butyl ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *63* (1-2), 57–61. DOI: 10.1016/j.molcatb.2009.12.004.
196. Brandts, J. F.; Fu, J.; Nordin, J. H. The low temperature denaturation of chymotrypsinogen in aqueous solution and in frozen aqueous solution. *The frozen Cell*; pp 189–212.
197. Chang, S.-F.; Chang, S.-W.; Yen, Y.-H.; Shieh, C.-J. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. *Applied Clay Science* **2007**, *37* (1-2), 67–73.
198. Liu, J. H.; Zhang, Y. Y.; Xia, Y. M.; Su, F. Optimization of Immobilization Conditions of *Candida antarctica* Lipase Based on Response Surface Methodology. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **2010**, *24* (2), 203–209.
199. Chang, S.-W.; Shaw, J.-F.; Yang, K.-H.; Chang, S.-F.; Shieh, C.-J. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly( $\gamma$ -glutamic acid) by RSM. *Bioresource technology* **2008**, *99* (8), 2800–2805. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.06.020.
200. Song, J.; Kahveci, D.; Chen, M.; Guo, Z.; Xie, E.; Xu, X.; Besenbacher, F.; Dong, M. Enhanced catalytic activity of lipase encapsulated in PCL nanofibers. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2012**, *28* (14), 6157–6162. DOI: 10.1021/la300469s.
201. Trodler, P.; Nieveler, J.; Rusnak, M.; Schmid, R. D.; Pleiss, J. Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. *Journal of chromatography. A* **2008**, *1179* (2), 161–167. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.108.
202. Nieuwland, M.; Geerdink, P.; Brier, P.; van den Eijnden, P.; Henket, J. T.; Langelaan, M. L.; Stroeks, N.; van Deventer, Henk C.; Martin, A. H. Food-grade electrospinning of proteins. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2013**, *20*, 269–275. DOI: 10.1016/j.ifset.2013.09.004.
203. Mosafa, L.; Moghadam, M.; Shahedi, M. Papain enzyme supported on magnetic nanoparticles: Preparation, characterization and application in the fruit juice clarification. *Chinese Journal of Catalysis* **2013**, *34* (10), 1897–1904. DOI: 10.1016/S1872-2067(12)60663-9.



204. Gupta, A.; Dhakate, S. R.; Pahwa, M.; Sinha, S.; Chand, S.; Mathur, R. B. Geranyl acetate synthesis catalyzed by *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on electrospun polyacrylonitrile nanofiber membrane. *Process Biochemistry* **2013**, *48* (1), 124–132. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.09.028.
205. Zhu, J.; Sun, G. Lipase immobilization on glutaraldehyde-activated nanofibrous membranes for improved enzyme stabilities and activities. *Reactive and Functional Polymers* **2012**, *72* (11), 839–845. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.08.001.
206. Wang, Y.; Hsieh, Y.-L. Immobilization of lipase enzyme in polyvinyl alcohol (PVA) nanofibrous membranes. *Journal of Membrane Science* **2008**, *309* (1-2), 73–81. DOI: 10.1016/j.memsci.2007.10.008.
207. Li, S.-F.; Fan, Y.-H.; Hu, J.-F.; Huang, Y.-S.; Wu, W.-T. Immobilization of *Pseudomonas cepacia* lipase onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for transesterification reaction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *73* (1-4), 98–103. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.08.005.
208. Debulis, K.; Klibanov, A. M. Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants. *Biotechnology and bioengineering* **1993**, *41* (5), 566–571. DOI: 10.1002/bit.260410509.
209. Yamane, T.; Ichiryu, T.; Nagata, M.; Ueno, A.; Shimizu, S. Intramolecular esterification by lipase powder in microaqueous benzene: factors affecting activity of pure enzyme. *Biotechnology and bioengineering* **1990**, *36* (10), 1063–1069.
210. Filatova, L. Y.; Becker, S. C.; Donovan, D. M.; Gladilin, A. K.; Klyachko, N. L. LysK, the enzyme lysing *Staphylococcus aureus* cells: specific kinetic features and approaches towards stabilization. *Biochimie* **2010**, *92* (5), 507–513. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.01.026.
211. Yadav, J. K.; Prakash, V. Stabilization of  $\alpha$ -Amylase, the Key Enzyme in Carbohydrates Properties Alterations, at Low pH. *International Journal of Food Properties* **2011**, *14* (6), 1182–1196. DOI: 10.1080/10942911003592795.
212. Simon, L.; Kotormán, M.; Garab, G.; Laczkó, I. Effects of polyhydroxy compounds on the structure and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2002**, *293* (1), 416–420. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00246-2.
213. Kotormán, M.; Laczkó, I.; Szabó, A.; Simon, L. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on catalytic activity and conformation of trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous ethanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *304* (1), 18–21. DOI: 10.1016/S0006-291X(03)00534-5.



214. Adlercreutz, P. Activation of enzymes in organic media at low water activity by polyols and saccharides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1993**, *1163* (2), 144–148. DOI: 10.1016/0167-4838(93)90175-Q.
215. Morgan, J. A.; Clark, D. S. Salt-activation of nonhydrolase enzymes for use in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering* **2004**, *85* (4), 456–459. DOI: 10.1002/bit.10895.
216. Simon, L. M.; Kotormán, M.; Szabó, A.; Garab, G.; Laczkó, I. Effects of polyethylene glycol on stability of alpha-chymotrypsin in aqueous ethanol solvent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *317* (2), 610–613. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.03.087.
217. Dror, Y.; Kuhn, J.; Avrahami, R.; Zussman, E. Encapsulation of Enzymes in Biodegradable Tubular Structures. *Macromolecules* **2008**, *41* (12), 4187–4192. DOI: 10.1021/ma071599r.
218. Xu, R.; Chi, C.; Li, F.; Zhang, B. Immobilization of horseradish peroxidase on electrospun microfibrous membranes for biodegradation and adsorption of bisphenol A. *Bioresource technology* **2013**, *149*, 111–116. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.09.030.
219. Zhang, T.; Xu, X.-L.; Jin, Y.-N.; Wu, J.; Xu, Z.-K. Immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on polyimide nanofibers blending with carbon nanotubes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, *106*, 56–62. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.04.015.
220. Matveeva, O.; Lakina, N.; Matveeva, V.; Sulman, M.; Sulman, E.; Valetsky, P.; Doluda, V. Biocatalytic Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol Over Immobilized Horseradish Peroxidase in Nonaqueous Media. *Top Catal* **2011**, *54* (16-18), 1309–1317. DOI: 10.1007/s11244-011-9753-3.
221. Díaz, A.; del Valle, Luis J; Tugushi, D.; Katsarava, R.; Puiggalí, J. New poly(ester urea) derived from L-leucine: electrospun scaffolds loaded with antibacterial drugs and enzymes. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2015**, *46*, 450–462. DOI: 10.1016/j.msec.2014.10.055.
222. Homaei, A. A.; Sajedi, R. H.; Sariri, R.; Seyfzadeh, S.; Stevanato, R. Cysteine enhances activity and stability of immobilized papain. *Amino acids* **2010**, *38* (3), 937–942. DOI: 10.1007/s00726-009-0302-3.
223. Solanki, K.; Shah, S.; Nath Gupta, M. Chemical modification of alpha-chymotrypsin for obtaining high transesterification activity in low water organic media. *Biocatal Biotransformation* **2008**, *26* (4), 258–265. DOI: 10.1080/10242420801897361.
224. Novick, S. J.; Dordick, J. S. Preparation of Active and Stable Biocatalytic Hydrogels for Use in Selective Transformations. *Chem. Mater.* **1998**, *10* (4), 955–958. DOI: 10.1021/cm9708123.



225. van Unen, D J; Engbersen, J. F.; Reinhoudt, D. N. Sol-gel immobilization of serine proteases for application in organic solvents. *Biotechnology and bioengineering* **2001**, *75* (2), 154–158. DOI: 10.1002/bit.1173.
226. An, H.; Jin, B.; Dai, S. Fabricating polystyrene fiber-dehydrogenase assemble as a functional biocatalyst. *Enzyme and microbial technology* **2015**, *68*, 15–22. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2014.09.010.
227. Moreno, I.; González-González, V.; Romero-García, J. Control release of lactate dehydrogenase encapsulated in poly (vinyl alcohol) nanofibers via electrospinning. *European Polymer Journal* **2011**, *47* (6), 1264–1272. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2011.03.005.
228. Alsafadi, D.; Paradisi, F. Effect of organic solvents on the activity and stability of halophilic alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii*. *Extremophiles : life under extreme conditions* **2013**, *17* (1), 115–122. DOI: 10.1007/s00792-012-0498-0.
229. Alsafadi, D.; Paradisi, F. Covalent immobilization of alcohol dehydrogenase (ADH2) from *Haloferax volcanii*: how to maximize activity and optimize performance of halophilic enzymes. *Molecular biotechnology* **2014**, *56* (3), 240–247. DOI: 10.1007/s12033-013-9701-5.
230. Musa, M. M.; Ziegelmann-Fjeld, K. I.; Vieille, C.; Zeikus, J. G.; Phillips, R. S. Xerogel-encapsulated W110A secondary alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus* performs asymmetric reduction of hydrophobic ketones in organic solvents. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2007**, *46* (17), 3091–3094. DOI: 10.1002/anie.200604615.
231. Wang, S.; Chen, W.; He, S.; Zhao, Q.; Li, X.; Sun, J.; Jiang, X. Mesosilica-coated ultrafine fibers for highly efficient laccase encapsulation. *Nanoscale* **2014**, *6* (12), 6468–6472. DOI: 10.1039/c4nr01166j.
232. Xu, R.; Chi, C.; Li, F.; Zhang, B. Laccase-polyacrylonitrile nanofibrous membrane: highly immobilized, stable, reusable, and efficacious for 2,4,6-trichlorophenol removal. *ACS applied materials & interfaces* **2013**, *5* (23), 12554–12560. DOI: 10.1021/am403849q.
233. Qiu, H.; Xu, C.; Huang, X.; Ding, Y.; Qu, Y.; Gao, P. Immobilization of Laccase on Nanoporous Gold: Comparative Studies on the Immobilization Strategies and the Particle Size Effects. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113* (6), 2521–2525. DOI: 10.1021/jp8090304.
234. Mohidem, N. A.; Mat, H. B. The catalytic activity enhancement and biodegradation potential of free laccase and novel sol-gel laccase in non-conventional solvents. *Bioresource technology* **2012**, *114*, 472–477. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.138.



235. Huang, X.-J.; Yu, A.-G.; Xu, Z.-K. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly(acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. *Bioresource technology* **2008**, *99* (13), 5459–5465. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.11.009.
236. Sakai, S.; Antoku, K.; Yamaguchi, T.; Kawakami, K. Development of electrospun poly(vinyl alcohol) fibers immobilizing lipase highly activated by alkyl-silicate for flow-through reactors. *Journal of Membrane Science* **2008**, *325* (1), 454–459. DOI: 10.1016/j.memsci.2008.08.008.





## 9. KURZLEBENSLAUF

### Daten zur Person:

Name: Ina Sittko, geb. Schönfeld  
Geburtsdatum &-ort: 12.04.1984 in Datteln  
Nationalität: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet

### Schulausbildung:

1990 – 1994 Kardinal-von-Galen Grundschule Waltrop  
1994 – 2003 Theodor-Heuss-Gymnasium Waltrop  
01.06.2003 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Studium:

2003-2010 Studium des Bioingenieurwesens, TU Dortmund  
12.12.2010 Abschluss: Dipl.-Ing.  
Diplomarbeit bei Prof. Dr. J.C. Tiller  
„Entwicklung eines polymeren Linkers für die Synthese von Hybridnetzwerken“

### Promotion:

03.2011-10.2014 Bei Prof. Dr. J. C. Tiller am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften an der Fakultät für Bio-und Chemieingenieurwesen der TU Dortmund  
„Aktivierende Trägerung von Enzymen für die Biokatalyse in organischen Medien“





