

# Enzymmoderierte Adressierung von synthetischen Polymeren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. rer. nat

vorgelegt  
der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Universität Paderborn

von

**David Wedegärtner**

Geboren am 27.09.1989 in Geseke

Paderborn, den 11.12.2023

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Hans-Joachim Warnecke

Hauptgutachter: Univ.-Prof. Dr. Oliver Strube

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Bremser

Drittprüfer: Priv.-Doz Dr. Hans Egold

### Veröffentlichungen aus dieser Arbeit:

- [1] Wedegärtner, D. & Strube, O. I. Site-Specific Addressing of Particles and Coatings via Enzyme-Mediated Destabilization. *Catalysts* **9**, 354; 10.3390/catal9040354 (2019).<sup>1</sup>
- [2] Appel, D., Wedegärtner, D., Lüther, M. & Strube, O. I. Enzyme-Mediated In Situ Buildup and Site-Specific Addressing of Polymeric Coatings. *Macromol. Mater. Eng.* **304**, 1800536; 10.1002/mame.201800536 (2019).<sup>2</sup>
- [3] Wedegärtner, D. & Strube, O. I. Enzyme-mediated and formaldehyde-free formation of phenolic resin coatings. *Progress in Organic Coatings* **186**, 108078; 10.1016/j.porgcoat.2023.108078 (2024).<sup>3</sup>

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit bis auf die offizielle Betreuung durch die Universität Paderborn selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen und in Zitaten kenntlich gemachten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Paderborn, den 11.12.2023

---

David Wedegärtner



## Danksagung

Während meiner akademischen Laufbahn haben zahlreiche Personen meinen Weg begleitet, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Oliver Strube, dem ich nicht nur die grundlegende Idee zum Forschungsthema, sondern auch die tolle Betreuung und Zusammenarbeit sowie die Teilnahme an zahlreichen spannenden Industrie- und Forschungsprojekten, einem Forschungspreis, mehreren Kongressen und einem Patent verdanke.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Wolfgang Bremser, meinem Zweitprüfer. Die damalige Entscheidung „seinen“ Studiengang Chemie und Technologie der Beschichtungsstoffe zu wählen, hat mich persönlich ungemein weitergebracht. Ebenso danke ich ihm für die Nutzung der Labore und der Infrastruktur seines Arbeitskreises CMP.

Meine vielen Freunde und Kollegen im Labor und Büro, ich danke euch für die gemeinsame Zeit. Besonders zu erwähnen sind hier Anne, Lea, Dominik, Freddie, Knud, Stephan, Tobi, Nadine, Manuel, Arthur, Anna, Arne, Ulf, Minghui, Sebastian, Marco und Sven.

„Freunde sind Menschen, die dir nicht den Weg zeigen, sondern ihn einfach mit dir gehen.“ Deniz Dogan, wir sind unser gesamtes Studium „Hand in Hand“ gegangen. Ich würde es jederzeit wieder genau so machen. **DANKE!**

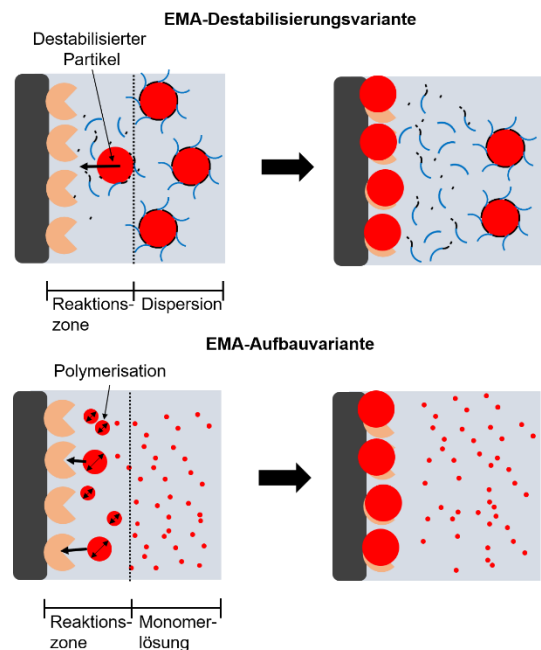
Simon Ruthmann und Daniel Appel, mit Euch teile ich innerhalb und außerhalb des Labores so viele schöne Erinnerungen. Simon, die vielen Telefonate tun mir gut. Daniel, es gibt noch so vieles, das ich dir gerne erzählen würde. Du fehlst hier unten.

Meine **Familie**. Mama, Papa, Anna, Aaron und meine Freundin Verena. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich jederzeit bedingungslos unterstützt. Ich danke Euch für Eure Liebe und Euer Vertrauen.



## Kurzfassung

In dieser Dissertation ist der Transfer der Technologie der "Enzymmoderierten Adressierung" (EMA), die bisher auf rein biologische Systeme begrenzt war, auf synthetische Polymere erfolgt. Die EMA basiert auf der ortsspezifischen Abscheidung durch auf einer Materialoberfläche immobilisierte Enzyme. In dieser Arbeit werden zwei Prozesse entwickelt und analysiert. Zum einen eine Destabilisierungsvariante mit immobilisierter Lipase, bei der synthetisierte Partikel in enzymatisch abbaubaren Mizellen stabilisiert und



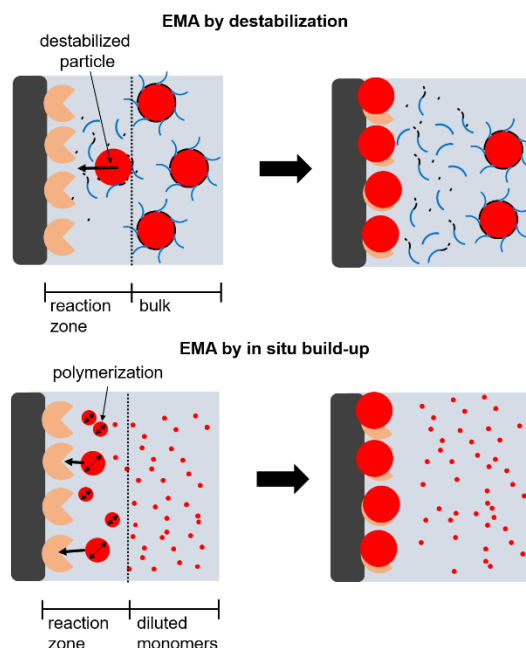
**Abbildung 1: Kurzübersicht der beiden EMA-Varianten**

durch das Enzym in unmittelbarer Nähe zur Materialoberfläche partikular oder als Film abgeschieden werden. Zum anderen eine Aufbauvariante bei der durch immobilisierte Meerrettichperoxidase radikalisch polymerisierbare Monomere polymerisiert und durch die dadurch entstehende Unlöslichkeit auf der Substratoberfläche abscheiden. Dabei unterscheiden sich auch innerhalb der Varianten je nach System und Polymerauswahl die Abscheidemechanismen voneinander. Neben Parametern wie Temperatur, pH-Wert, Abscheidezeit, Konzentrationseinflüssen oder der Glasübergangstemperatur des Polymers bestimmt vor allem die Immobilisierungstechnik des Enzyms die endgültige Morphologie der Abscheidung. Unterschieden wird hier zwischen physikalischer Adsorption, direkter kovalenter Anbindung und kovalenter Anbindung über Abstandshaltermoleküle. Aufgrund der höheren Mobilität der Enzyme wird mit der Adsorption der quantitativ höchste Grad an Abscheidung erzielt. Je nach System ist in diesem selbstterminierenden Prozess eine Schichtdicke von bis zu 400 nm realisierbar. Mit der kovalenten Abscheidung wird hingegen mit quantitativen Einbußen das höchste Maß an Prozesskontrolle und Ortsspezifität erreicht.

## Abstract

This dissertation has extended the technology of enzyme-moderated addressing (EMA), previously limited to purely biological systems, to synthetic polymers. EMA is based on site-specific deposition by enzyme immobilized on a material surface. In this work, two processes are developed and analyzed. One is a destabilization variant with immobilized lipase, in which synthesized particles are stabilized in enzymatically degradable micelles and deposited by the enzyme in close proximity to the material surface in particulate or film

form. On the other hand, there is an in situ buildup variant in which monomers are radically polymerized by immobilized horseradish peroxidase and deposited on the material surface due to the resulting insolubility. Even within the variants, the deposition mechanisms differ from one another depending on the system and polymer selection. In addition to parameters such as temperature, pH, deposition time, concentration or the glass transition temperature of the polymer, the immobilization technique of the enzyme determines the final morphology of the deposition. A distinction is made between physical adsorption, direct covalent binding, and covalent binding via spacer molecules. Due to the higher mobility of the enzymes, the quantitatively highest degree of deposition is achieved with the adsorption immobilization technique. Depending on the system, a film thickness of up to 400 nm can be achieved in this self-terminating process. With covalent deposition, on the other hand, the highest degree of process control and site specificity is achieved with quantitative losses.



**Figure 1: Brief overview of the two EMA variants**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Ausgangslage .....	1
1.2	Zielsetzung .....	2
<b>2</b>	<b>Stand der Technik.....</b>	<b>3</b>
2.1	Tauchbeschichtung.....	3
2.1.1	Konventionelles Tauchen .....	3
2.1.2	Elektrotauchlackierung .....	4
2.1.3	Stromlose Autophorese .....	11
2.2	Technische Enzyme.....	13
2.2.1	Chymosin.....	15
2.2.2	Lipasen .....	17
2.2.3	Meerrettichperoxidase .....	20
2.3	Immobilisierung von Enzymen .....	26
2.3.1	Auswirkung verschiedener Oberflächenmaterialien auf die Enzymstruktur .....	26
2.3.2	Übersicht verschiedener Immobilisierungstechniken .....	29
2.4	EMA - Enzymmoderierte Adressierung durch Destabilisierung .....	34
2.5	EMA als Aufbauvariante zur Abscheidung von Eumelanin .....	38
<b>3</b>	<b>Auswertung .....</b>	<b>41</b>
3.1	Einleitung .....	41
3.2	EMA-Ansatz über chymosinspaltbaren Peptid-Linker .....	43
3.3	EMA in der Destabilisierungsvariante über enzymatisch abbaubare Mizellen .....	50
3.3.1	Aufbau der enzymatisch abbaubaren Mizellen .....	52

3.3.2	Partikelherstellung und Analyse .....	56
3.3.3	Enzymmoderierte Abscheidung im Destabilisierungsprozess von Polystyrolpartikeln .....	61
3.3.4	Teilkapitelzusammenfassung .....	76
3.3.5	Steuerung der Partikelgröße .....	77
3.3.6	Variation der Enzymimmobilisierungstechnik .....	81
3.3.7	Variation der Partikel .....	89
3.3.8	Kapitelzusammenfassung .....	103
3.4	EMA als Aufbauvariante synthetischer Polymere .....	104
3.4.1	EMA von radikalisch polymerisierten Polymeren am Beispiel des Modellsystems PMMA .....	105
3.4.2	EMA im Aufbauverfahren über radikalische Polymerisation durch HRP mit nicht wasserlöslichen Monomeren .....	123
3.4.3	EMA in der Aufbauvariante über oxidative Kupplungspolymerisationen mit HRP .....	128
3.4.4	EMA als Methode der Mikrostrukturierung .....	153
3.4.5	Kapitelzusammenfassung .....	155
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung &amp; Ausblick .....</b>	<b>156</b>
4.1	Zusammenfassung .....	156
4.2	Ausblick .....	158
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>159</b>
5.1	Materialien .....	159
5.2	Experimentelle Prozeduren und Synthesen .....	159
5.2.1	Herstellung eines Chymosinspaltbaren Stabilisators .....	159
5.2.2	Untersuchung der Eigenschaften der PEG-PCL-Blockcopolymere 159	
5.2.3	Enzymimmobilisierung .....	163

5.2.4	Abscheideversuche .....	166
5.3	Analytische Methoden.....	168
5.3.1	Rasterlektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX) .....	168
5.3.2	Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zeta-Potential .....	168
5.3.3	UV/Vis-Spektroskopie .....	168
5.3.4	Kernresonanzspektroskopie .....	168
5.3.5	Gelpermeationschromatographie.....	169
5.3.6	Dynamische Differenzkalorimetrie .....	169
5.3.7	Massenspektrometrie .....	169
5.3.8	Thermogravimetrische Analyse .....	169
5.3.9	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie .....	169
5.3.10	Kontaktwinkelmessung .....	170
5.3.11	Bildauswertungssoftware .....	170
<b>Appendix.....</b>		<b>171</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>		<b>175</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>		<b>176</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>		<b>187</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>188</b>





# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangslage

Es existieren zahlreiche Methoden Oberflächen zu beschichten. Zu den klassischen Beschichtungsverfahren zählt die Tauchbeschichtung. Derzeitig industriell eingesetzte Tauchverfahren funktionieren aufgrund von äußeren Stimuli, die dazu führen, dass der Nasslack auf der Oberfläche abscheidet. Zu diesen Stimuli zählen vor allem Strom (Elektrotauchlackierung) und pH-Wertänderung an der Materialoberfläche (stromlose Autophorese). Entscheidender Nachteil dieser Verfahren ist die spezifische Materialabhängigkeit. Bei beiden Verfahren kommen ausschließlich Metalle als Beschichtungsobjekte zum Einsatz. Ursache dafür ist, dass sie für den Beschichtungsvorgang entweder elektrisch leitfähig (Elektrotauchlackierung) oder Metallkationen aus der Oberfläche auslösbar sein müssen (stromlose Autophorese).

Ein neuer Ansatz für Tauchbeschichtungen ist die EMA – Enzymmoderierte Adressierung. Statt auf die äußeren Stimuli zu setzen, sind bei der EMA die Enzyme der entscheidende Faktor. Diese Klasse biologischer Katalysatoren hebt sich durch ihre Spezifität, Energieeffizienz und Anpassungsfähigkeit von allen anderen Molekülklassen ab.<sup>4,5</sup> Bei der EMA werden Enzyme auf der Materialoberfläche immobilisiert, um im Tauchverfahren Beschichtungspartikel aus der Lösung abzuscheiden. Dabei werden sie entweder aus der Lösung destabilisiert oder erst in situ aus Präkursoren aufgebaut und aufgrund der beim Wachstum entstehenden Unlöslichkeit abgeschieden.

Die Vorteile dieser Beschichtungsmethode liegen u. a. in der hohen Ortsspezifität und der breiteren Materialauswahl bzgl. des zu beschichtenden Objektes. Im dieser Arbeit zugrundeliegenden Stand der Technik war die natürliche Proteine bzw. Biopolymere limitiert.

## 1.2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Methoden zu entwickeln den Beschichtungsprozess der EMA um die Abscheidung synthetischer Polymere zu erweitern. Als Modellsysteme dienen die zwei bisherigen EMA-Systeme bestehend aus einer Destabilisations- und einer Aufbauvariante. Die Destabilisationsvariante basiert auf der enzymatischen Abscheidung von Casein durch Destabilisierung der Mizellen durch das Enzym Chymosin. Die Aufbauvariante bedient sich des enzymatischen Aufbaus und der Abscheidung von Eumelanin aus L-DOPA (3,4-Dihydroxy-Phenylalanin) durch das Enzym Tyrosinase.

Beide Abscheidungsprozesse müssen für die synthetische Nutzung neu gedacht werden. Als Schlüsselbausteine der Destabilisationsvariante werden passende Enzyme, Stabilisatoren und Polymere identifiziert. Bei der Aufbauvariante obliegt, es Enzyme zu identifizieren, die zur Radikalübertragung in wässrigem Milieu befähigt sind, radikalische Polymerisationsreaktionen nah an der Oberfläche zu katalysieren.

Beim Transfer dieser Varianten auf synthetische Polymere werden die Schlüsselparameter bzgl. Temperatur, pH-Wert, Konzentrationseinflüsse und Abscheidezeiten ermittelt sowie die jeweiligen Abscheidungen mittels verschiedener bildgebender und analytischer Verfahren untersucht. Dabei sollen die jeweiligen verschiedenen phänomenologischen Grundlagen der entstehenden Abscheidemechanismen verstanden werden.

## **2 Stand der Technik**

In dem folgenden Abschnitt werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen herausgearbeitet, die zum Verständnis der vorliegenden Arbeit notwendig sind. Zunächst werden klassische Tauchbeschichtungsverfahren erläutert, um die Grundlagen dieses innovativen biologischen Beschichtungsprozesses darzulegen. Im nächsten Abschnitt geht es um ausgewählte Enzymklassen und deren Einsatzmöglichkeiten, bevor anschließend deren Immobilisierungsverfahren erläutert werden. Danach werden bekannte Vorarbeiten zum EMA-Prozess sowohl thematisiert.

### **2.1 Tauchbeschichtung**

Grundsätzlich thematisiert diese Arbeit eine enzymmoderierte Tauchbeschichtung, weshalb in diesem Kapitel klassische Tauchbeschichtungen als Grundlage thematisiert werden.

Die Beschichtung von Industriegütern mithilfe von Tauchverfahren zählt zu den ältesten und grundlegendsten Beschichtungsmethoden in der Verarbeitung von Nasslacken. Im Gegensatz zu Verfahren wie dem Rollen, Walzen, Gießen oder Fluten wird mit geringem Materialverlust gearbeitet, da das zu beschichtende Objekt zum Lack gebracht wird und nicht umgekehrt. Grundsätzlich wird bei industriell verwendeten Tauchbeschichtungen zwischen dem konventionellen Tauchen und der Elektrotauchlackierung unterschieden.

#### **2.1.1 Konventionelles Tauchen**

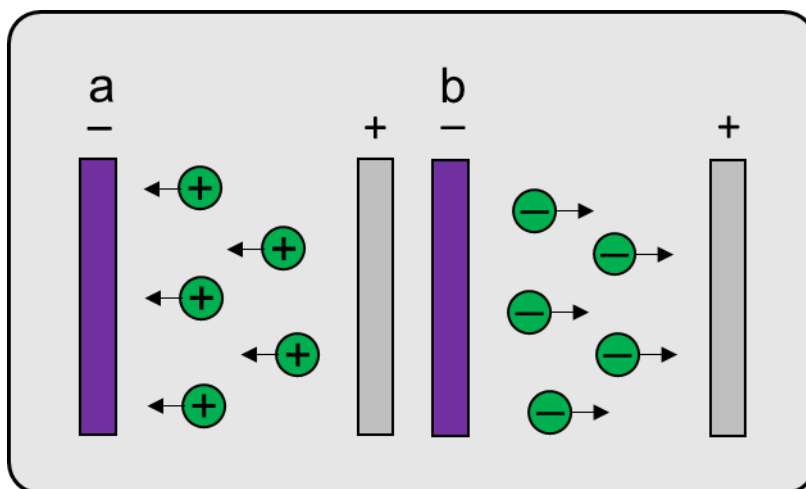
Beim konventionellen Tauchen wird der Lack relativ niedrigviskos eingestellt, um eine gleichmäßige Benetzung des Werkstücks zu erleichtern. Werkstücke können sowohl im Takt- als auch im Durchlaufverfahren getaucht und herausgeführt werden, bevor sie üblicherweise nach einer Abtropfstrecke in einem Ofen getrocknet werden, wobei das Lösemittel verdampft.<sup>6</sup>

Aufgrund der hohen Brand- und Explosionsgefahr von großen Tauchbecken mit lösemittelhaltigen Lacksystemen werden heute üblicherweise wässrige

Lacksysteme verwendet. Beim konventionellen Tauchen kann jedoch keine gleichmäßige Schichtdicke über die gesamte Oberfläche erzielt werden und besonders der Schutz von Hohlräumen gestaltet sich neben weiteren Problemen wie der Ausbildung von Läufern und Kantenflucht als problematisch. Aufgrund dieser Probleme gibt es heutzutage kaum noch konventionelle Tauchlackierungsanlagen in der Beschichtungsbranche.<sup>6,7</sup>

### 2.1.2 Elektrotauchlackierung

Im Gegensatz zum konventionellen Tauchen lassen sich mithilfe der Unterstützung durch elektrochemische Koagulierung gleichmäßigere Beschichtungen auch bei komplizierten Objekten mit Hohlräumen erreichen. Mit Einführung der Ultrafiltration konnte der Materialnutzungsgrad zudem auf über 99 Prozent gesteigert werden. Grundlage ist hierbei die Verwendung von elektrisch leitfähigen Substraten in Kombination mit einer ionischen, wässrigen Dispersion.<sup>8</sup>

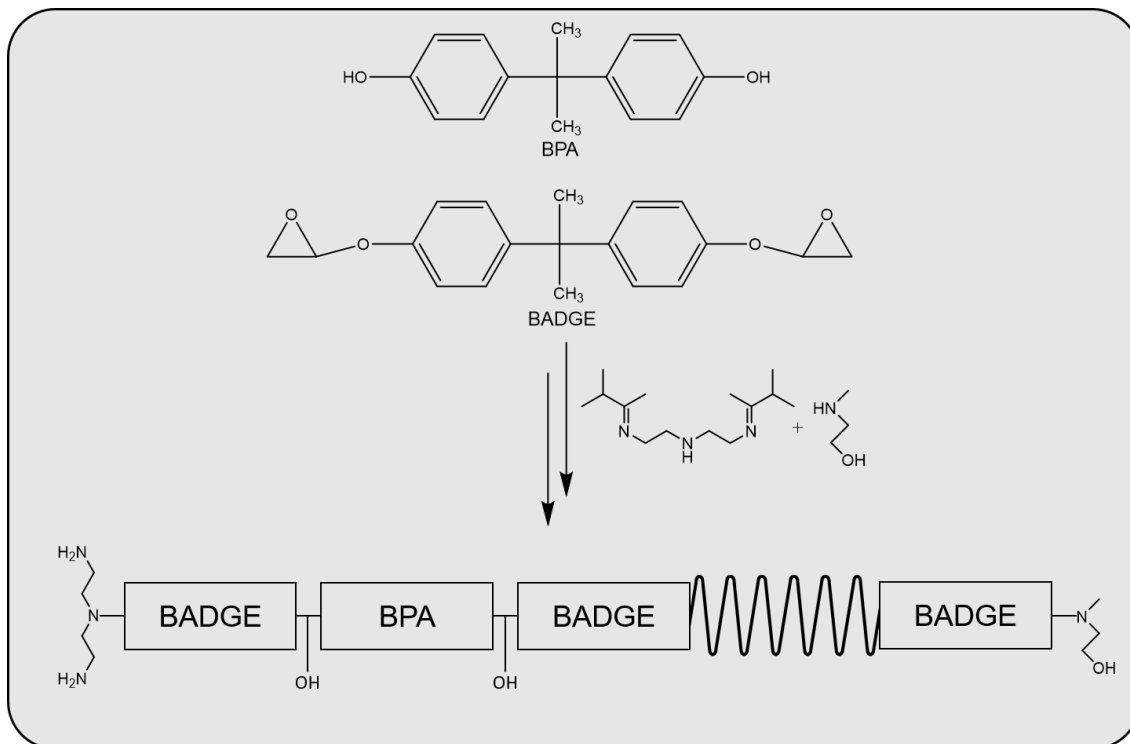


**Abbildung 2:** Vereinfachte schematische Abbildung der Elektrotauchlackierung. (a) Kathodische Tauchlackierung und (b) Anodische Tauchlackierung. In Anlehnung an L. BESRA, M. LIU, *Progress in Materials Science* 2007, 52, 1.<sup>9</sup>

Unterschieden wird dabei zwischen der anodischen und kathodischen Tauchlackierung (s. **Abbildung 2**). Die meist wässrigen Elektrotauchlacke bestehen dabei aus speziell aufgebauten Dispersionen von Filmbildnern, Additiven sowie Pigmenten und Extendern, also Füllstoffen wie z.B. Silikaten. Die

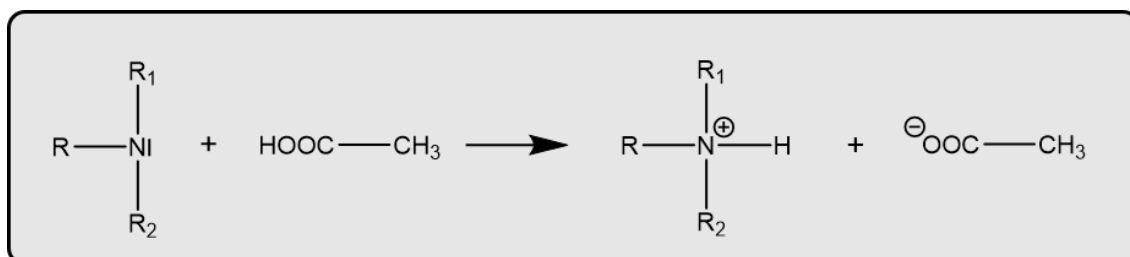
Abscheidung erfolgt durch Neutralisierung der jeweiligen Polymerpartikel. Bei der anodischen Tauchlackierung (ATL) sind die Dispersionen durch negative Ladung stabilisiert und werden bei Ansetzen eines Gleichstroms an der Anode neutralisiert und somit unlöslich im umgebenden Medium, wodurch sie sich an der Anode abscheiden. Bei der kathodischen Tauchlackierung (KTL) werden dementsprechend mit positiver Ladung stabilisierte Partikel neutralisiert und an der Kathode abgeschieden. Seit den 70er Jahren hat sich die kathodische Tauchlackierung jedoch weitestgehend durchgesetzt<sup>6</sup>, weshalb hauptsächlich auf diese eingegangen wird. Der Grund hierfür liegt hauptsächlich in der verbesserten Beschichtung von Hohlräumen (Umgriff) und dem besseren Korrosionsschutz der KTL im Vergleich zur ATL, da basische Polymere hydrolysebeständiger sind und korrosionsinhibierend wirken. Zusätzlich kann es zu keiner elektrochemischen Auflösung des Metalls kommen, wie es bei der ATL der Fall ist. Hauptanwendungsgebiete der KTL sind Automobile, Fahrwerkteile, Landmaschinen, sowie Heizkörper und Türzargen. Die KTL dient dabei vorrangig dem Korrosionsschutz und wird anschließend mit weiteren funktionalen Schichten überlackiert. Ausnahmen bilden acrylatische Systeme, die vereinzelt aufgrund ihrer UV-Beständigkeit je nach Anwendung auch als Einschichtsysteme zum Einsatz kommen können.<sup>6</sup>

Grundbaustein für die kathodischen Tauchlacke sind für Grundierungssysteme in der Regel aromatische Epoxidharze. Dabei kommen hauptsächlich Bisphenol A (BPA) und Bisphenol-A-diglycidylether (BADGE) als Hartsegmente zum Einsatz, sowie ethoxiliertes BPA als zusätzliches Weichsegment. Zunächst werden BADGE und BPA umgesetzt, um das Polymergrundgerüst aufzubauen. Die endständigen Epoxidgruppen werden anschließend mit Aminen wie z. B. Diethylentriamin und Methylethanolamin umgesetzt. Ein stark vereinfachtes Reaktionsschema ist in **Abbildung 3** dargestellt.<sup>6,10</sup>



**Abbildung 3: Schematisch vereinfachte Reaktionsführung beim Aufbau der kationischen Dispersion**

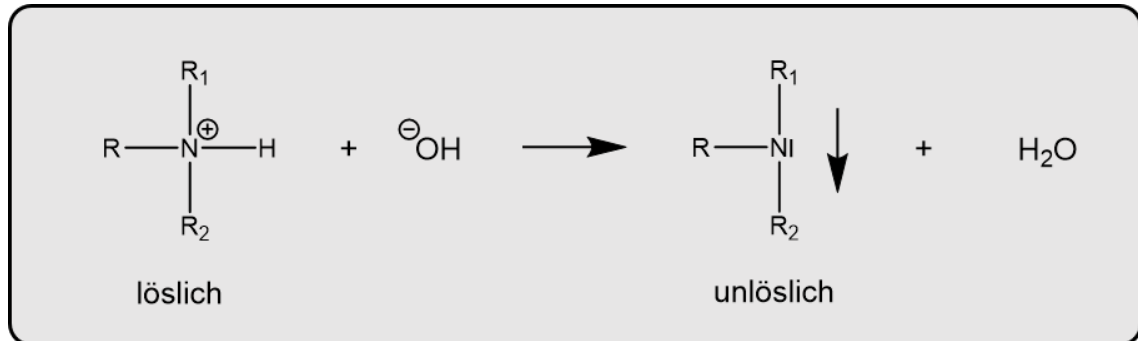
Bei der klassischen kathodischen Tauchlackierung sind positiv geladene Funktionalitäten wie Ammoniumionen notwendig. Die Dispergierung und Stabilisierung dieser Aminofunktionalitäten im wässrigen Bad wird über deren Reaktion mit Carbonsäuren ermöglicht. Die zugrundeliegenden chemischen Reaktionsgleichungen sind in **Abbildung 4** vereinfacht dargestellt. Durch den Einsatz von Säuren ergibt sich ein saurer pH-Wert im Abscheidebecken.<sup>6</sup>



**Abbildung 4: Lösereaktion von kathodisch abscheidbaren Filmbildnern. (In Anlehnung an A. Goldschmidt, H.-J. Streitberger, *BASF Handbuch Lackiertechnik*, Vincentz Network, 2014.<sup>6</sup>)**

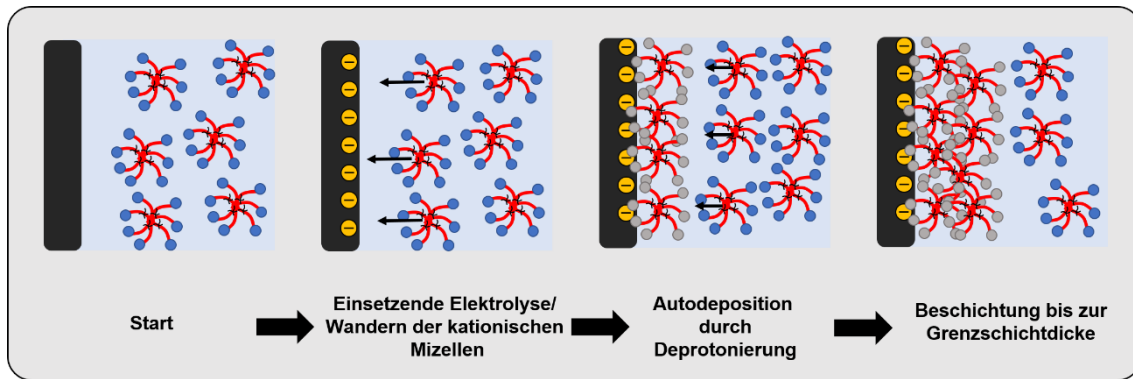
Die entsprechende Abscheidung der kathodisch abscheidbaren Filmbildner im KTL-Prozess erfolgt nach dem Eintauchen des Lackierobjekts und der Gegenelektrode in das wässrige KTL-Bad. Dabei wird das leitfähige

Lackierobjekt entsprechend als Kathode geschaltet. Die eigentliche Abscheidung ergibt sich somit durch die Deprotonierung der Aminofunktionellen Polymere (s. **Abbildung 5**)



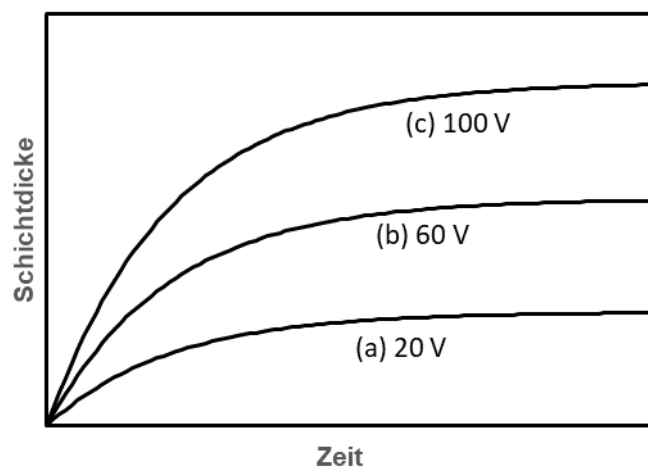
**Abbildung 5: Abscheidereaktion von kathodischen Filmbildnern mittels KTL.** In Anlehnung an A. Goldschmidt, H.-J. Streitberger, *BASF Handbuch Lackiertechnik*, Vincentz Network, 2014.<sup>6</sup>

In **Abbildung 6** wird der KTL-Prozess schematisch betrachtet. Die abzuscheidenden kationischen Mizellen bestehen i. d. R. gerade im Automobilsektor aus Epoxidharz-Aminaddukten und blockierten Isocyanaten zur späteren Vernetzung, sowie weiteren Additiven und Pigmentpaste. Beim Anlegen der Spannung entstehen vier Prozesse parallel: Elektrolyse, Elektrophorese, Elektrodeposition und Elektroosmose. Durch die einsetzende Elektrolyse entstehen Hydroxydionen und Wasserstoffgas an der Kathode. Zum anderen wandern die kationischen Mizellen im elektrischen Feld in Richtung der Kathode (Elektrophorese). Die Hydroxydionen deprotonieren die Aminogruppen der Mizellen wie zuvor in Abbildung 5 beschrieben, wodurch diese unlöslich werden und sich an der Kathode abscheiden und koagulieren (Elektrodeposition). Durch die steigende Anzahl an Partikeln auf der Kathode, bilden diese einen zunehmend dichter werdenden Film. Der Film isoliert die Kathode mehr und mehr und erschwert so u. a. die Diffusion von Hydroxidionen, wodurch die Feldstärke der Kathode nicht mehr für eine Elektrolyse ausreicht. Das Wasser wird aus dem Nassfilm verdrängt und es bildet sich ein kompakter Film (Elektroosmose).<sup>6</sup>



**Abbildung 6: Schematischer Ablauf des KTL-Prozesses**

In dem koagulierten Film befinden sich weiterhin auch die Säureanionen (der Einfachheit halber nicht im Bild gezeigt), welche durch Elektroosmose den Film mitsamt ihrer Hydrathülle verlassen und zur gegengeschalteten Anode wandern. Dies führt zu einer Entwässerung und damit einhergehenden Verdichtung des Films. Dies verstärkt die Isolation der Kathode und führt somit zu einem steigenden elektrischen Widerstand der den Filmaufbau verlangsamt, bis die Grenzsichtdicke erreicht ist.<sup>11</sup>



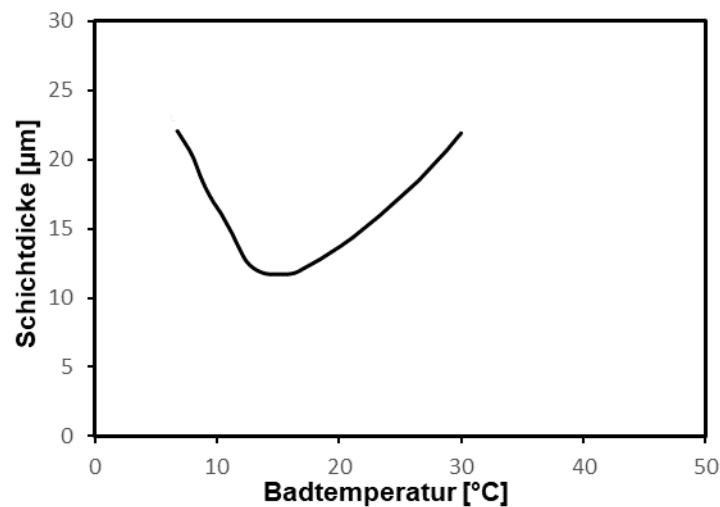
**Abbildung 7: Beispielhafter Zusammenhang zwischen Schichtdicke und Beschichtungszeit der KTL bei verschiedenen Spannungen (a): 20 V, (b): 60 V und (c): 100 V. (Frei nach Yuan-Chung Wang, Ing-Chi Leu, Min-Hsiung Hon, Journal of the American Ceramic Society 2004, 87, 84.)<sup>12</sup>**

Der zuvor beschriebene Zusammenhang ist in **Abbildung 7** zu sehen. Die Filmschichtdicke steigt zu Beginn stark an und nähert sich anschließend einem Sättigungsbereich. Die verschiedenen Spannungen bestimmen dabei die sowohl den primären Anstieg als auch die maximal zu erzielende Schichtdicke. Eine



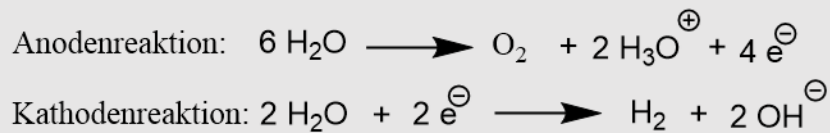
höhere Spannung führt zu einem schnelleren Schichtdickenwachstum, da die Ionen stärker von der Kathode angezogen werden. Die höhere Spannung bewirkt ebenfalls, dass die Potentialdifferenz erst bei größerer Schichtdicke nach und nach stärker isoliert wird. Somit erfolgt eine Steigerung der maximal erzielbaren Schichtdicke.<sup>12</sup>

Die Isolationswirkung führt dabei zu einem gleichmäßigen Schichtaufbau mit gutem Umgriff innerhalb weniger Minuten. Der notwendige Stromfluss sinkt dabei mit steigender Schichtdicke. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die richtige Einstellung der Badtemperatur. KTL-Systeme weisen ein relativ hohes Molekulargewicht der Epoxidgrundstruktur auf, was zu einer Erhöhung der Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) führt. Folglich ist die Koaleszenz der Partikel bei niedriger Temperatur erschwert. Dies führt zu einer geringeren Isolation und somit zu einer Erhöhung der Schichtdicke. Der poröse Film weist jedoch aufgrund der Porosität erheblich schlechtere Eigenschaften auf, weshalb die Temperatur in der Industrie höher gewählt wird. Bei höherer Badtemperatur bleibt der Film niedrigviskoser, wodurch die Hydroxidionen besser diffundieren können. Darauf folgt wiederum eine verbesserte Koagulation der Partikel, die einen Anstieg der Schichtdicke bewirkt. Aufgrund der geringeren Viskosität des Films, kommt es zudem zu weniger Ungleichmäßigkeiten im Film, was den Verlauf erheblich steigert. Der Schichtdickenverlauf bei unterschiedlichen Badtemperaturen ist beispielhaft in **Abbildung 8** dargestellt.<sup>8</sup> Industrielle Anwendungen erfolgen aufgrund der zuvor genannten Faktoren hauptsächlich auf dem rechten Ast der Kurve. Typische KTL-Formulierungen erreichen Schichtdicken von ca. 20 bis 35  $\mu\text{m}$ .<sup>6,8</sup>



**Abbildung 8:** Beispielhafter Zusammenhang zwischen Schichtdicke und Badtemperatur im KTL-Prozess. Angelehnt an BASF Coatings, Elektrotauchlacke. Elektrotauchlacke für industrielle Anwendungen, 2002.<sup>8</sup>

Im KTL-Prozess entsteht während der Elektrolyse an der Kathode neben den für die Abscheidereaktion notwendigen Hydroxydionen auch Wasserstoffgas (s. **Abbildung 9**).



**Abbildung 9:** Reaktionsgleichungen der Elektrolyse bei der KTL

Das entstandene Wasserstoffgas tritt an der Kathode aus und verlässt den sich bildenden Film. Daher bildet sich abhängig von der Viskosität des Films eine für KTL-Lacke charakteristische Oberflächenmorphologie in Form von Blasen und Poren. Mit Steigerung der Temperatur kann dieser Effekt zwar gemindert, aber nicht aufgehoben werden. Beispielhafte Aufnahmen dieses Sachverhalts sind in **Abbildung 10** dargestellt.

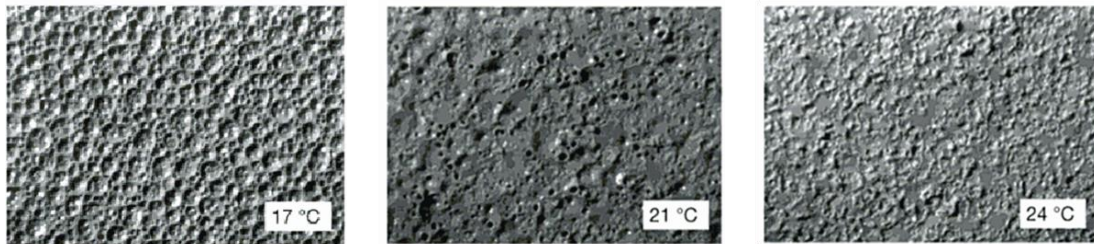


Abbildung 10: Morphologie kathodisch abgeschiedener Elektrotauchfilme<sup>6</sup>

### 2.1.3 Stromlose Autophorese

Eine weitere Variante der Tauchlackierung stellt die stromlose Autophorese dar. Das zu beschichtende Objekt (z.B. Stahl) wird wie beim klassischen Tauchen in ein Becken getaucht und benötigt keine weitere Vorbehandlung. Der dünnflüssige, wässrige Autophoreselack ist sauer eingestellt (pH zwischen 1 und 3) und die  $H^+$ -Ionen bewirken eine Anbeizung des Stahls wodurch  $Fe^{2+}$ -Ionen freigesetzt werden und Wasserstoff entweicht. Die anionisch stabilisierten Bindemittelteilchen destabilisieren und koagulieren durch die Freisetzung der Eisenionen und der damit einhergehenden Steigerung des pH-Wertes. Dieser Prozess findet dabei in Substratnähe statt. Der schematische Ablauf ist vereinfacht in **Abbildung 11** dargestellt.<sup>6,13</sup>

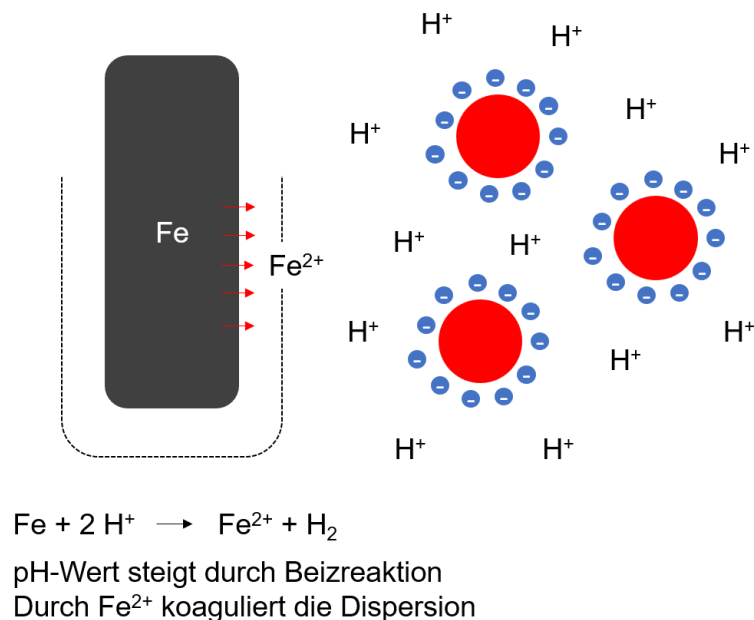


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Abscheidung beim Autophoreseverfahren<sup>6</sup>

Der entstehende Film enthält viel Wasser, wodurch er vergleichsweise porös wird. Die Schichtdicke wird vor allem durch die Abscheidezeit im Tauchbecken bestimmt und das Schichtdickenwachstum verhält sich weitgehend linear. Nach einer Vortrocknung für 5 bis 10 Minuten erfolgt die Vernetzung des Films je nach Bindemittelauswahl bei ca. 130 bis 160 °C. Durch die Eisenauflösung an der Oberfläche und Einbettung in den Film sind die Einsatzmöglichkeiten jedoch erheblich eingeschränkt.<sup>6</sup>

## 2.2 Technische Enzyme

Das Thema der Arbeit behandelt ein von der KTL inspiriertes innovatives Abscheideverfahren. Anstelle von elektrischen Ladungen werden Enzyme als Trigger für die Abscheidemechanismen verwendet. In diesem Kapitel wird daher näher auf die hierfür verwendeten Enzyme eingegangen.

Bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Ribozyme) sind alle Enzyme Proteine. Sie dienen dazu in biologischen Systemen chemische Reaktionen zu katalysieren. Sie werden, wie bei Proteinen üblich, durch Proteinbiosynthese an den Ribosomen gebildet. Enzyme ermöglichen Reaktionen im lebenden Körper, die ohne sie normalerweise äußere Bedingungen benötigen, die ein lebender Organismus nicht tolerieren könnte. Zu diesen zählen vor allem Druck, erhöhte Temperatur sowie der pH-Wert. Ähnlich wie herkömmliche Katalysatoren werden die Enzyme bei der Reaktion nicht verbraucht, sondern senken die Aktivierungsenergie und stehen nach der Beteiligung an der Reaktion für weitere Reaktionen zur Verfügung.<sup>14,15</sup>

Das Backen von Brot mithilfe der Enzyme von Bakterien und Hefen ist bereits seit ca. 5000 Jahren in Jericho belegt und stellt wohlmöglich die erste technische Nutzung von Enzymen dar.<sup>16</sup> Weitere frühe Anwendungsbeispiele für Enzyme sind das Konservieren von Sauerkraut durch Fermentation oder das Haltbarmachen von Milch durch die Käseproduktion. Ebenso wurde auch Wein schon zu antiken Zeiten über Fermentationsprozesse hergestellt.<sup>17</sup>

Heutige technische Anwendungsgebiete für Enzyme gehen aufgrund ihrer im Vergleich zu synthetischen Katalysatoren milden Reaktionsbedingungen (Temperatur, Druck etc.) wie der hohen Produktselektivität, hoher Ausbeute und geringer Toxizität weit über die ursprünglichen Anwendungsfelder hinaus.<sup>18</sup>

Daher gibt es heute bereits zahlreiche Anwendungen z. B. in den Bereichen der Pharmazie, Nahrungsmittel- und Getränkebranche, Landwirtschaft, Papier-, Leder oder Textilindustrie.<sup>19–23</sup> Gerade die hohe Produktselektivität enzymatischer Reaktionen ist aufgrund der bei manchen Medikamenten enorm wichtigen Chiralität von großem Vorteil.<sup>24,25</sup>

Die Klassifizierung verschiedener Enzymtypen erfolgt dabei entsprechend der von ihnen katalysierten Reaktionen nach der systematischen Nomenklatur durch IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) und der IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), wobei die jeweiligen Enzyme auch mehreren Klassen gleichzeitig zugeordnet werden können.<sup>26–28</sup>

Eine kurze Übersicht der Enzymklassen und ihrer Funktionen nach einer aktualisierten Fassung der IUBMB ist in **Tabelle 1** dargestellt. Die jeweiligen EC-Klassen besitzen diverse Untergruppierungen.<sup>29,30</sup>

**Tabelle 1: Vereinfachte Übersicht der Einteilung der verschiedenen Enzymklassen nach der systematischen Nomenklatur der IUBMB<sup>30</sup>**

EC 1	Oxidoreductasen	Katalyse von Redoxreaktionen.
EC 2	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen.
EC 3	Hydrolasen	Hydrolytische Spaltung von Bindungen.
EC 4	Lyasen	Nicht-hydrolytische Spaltung von Bindungen.
EC 5	Isomerasen	Beschleunigung der Umwandlung von Isomeren.
EC 6	Ligasen	Verknüpfung zweier Moleküle durch kovalente Bindungen.
EC 7	Translokasen	Transport von Stoffen durch Zellmembranen

Da Enzyme aufgrund der zuvor genannten Vorteile als hocheffektive Biokatalysatoren eine immer größere Rolle in Wissenschaft, Forschung und derzeitigen wie zukünftigen Anwendungsfeldern spielen, liegt ein großer Fokus auf deren kostengünstigen Herstellung. Üblicherweise werden Enzyme mithilfe von Mikroorganismen durch submerse Gärung oder Festkörperfermentation hergestellt.<sup>31–33</sup> Dabei kommen sowohl Pilze als auch spezielle Bakterien zum Einsatz.<sup>34</sup>

Ein Scale-up auf großtechnische Mengen ist für diverse Enzyme u. a. aufgrund ihrer Instabilität durch Denaturierung, gerade bei höheren Temperaturen noch immer stark limitiert.<sup>18,35</sup> Studien haben gezeigt, dass es bei den Fermentationsprozessen schon bei leichten Temperaturerhöhungen auf 40 °C zu einer Denaturierung von bis zu 85 % der Enzyme kommen kann.<sup>35</sup>

Die industrielle Biotechnologie und Bioverfahrenstechnik haben generell das Ziel biotechnologische Methoden in der technischen Industrie einzusetzen. Dies geschieht entweder, um Kosten zu sparen, neuartige Prozesse zu schaffen oder nachhaltiger mit Ressourcen umzugehen.<sup>36</sup> Der Einsatz von technischen Enzymen bietet daher nicht nur durch ihre Energieeffizienz großes Potential noch stärker Einzug in der Industrie zu erhalten.<sup>5,37,38</sup>

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit genutzten Enzyme genauer betrachtet.

### 2.2.1 Chymosin

Chymosin ist auch unter dem Namen Rennin bekannt, ist eine Aspartat-Endopeptidase (Protease) und zählt damit zu der Enzymklasse EC 3, den Hydrolasen. Dementsprechend führt sie eine Hydrolyse von Peptidbindungen durch. Die genaue Klassifikation ist EC 3.4.23.4.<sup>39,40</sup> Aufgebaut ist das bovine Chymosin (aus dem Rind) aus einem einzelnen Polypeptidstrang aus 323 Aminosäuren und besitzt eine Molekülmasse von 35653 Da.<sup>41</sup> Genauere Strukturaufklärung ist in der Literatur von Palmer et al. zu finden.<sup>42</sup>

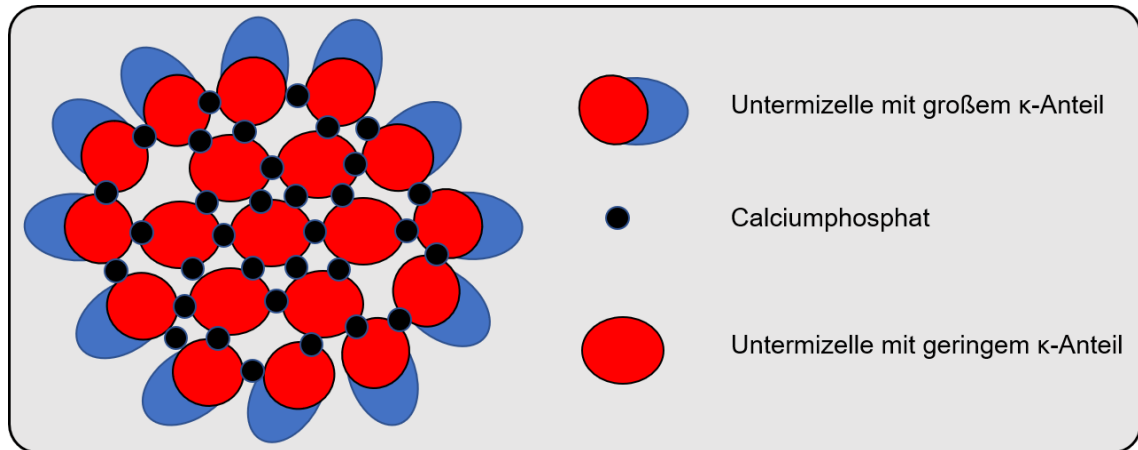
Chymosin wird in den Mägen von allen stillenden Landsäugetieren zunächst als inaktives Prochymosin produziert. Durch Proteolyse entsteht bei saurem pH-Wert erst die aktive Form, das Chymosin selbst. Insgesamt gibt es dabei drei verschiedene Typen (A, B und C) von Chymosin.<sup>43,44</sup> Chymosin spielt in Lebewesen als Verdauungsenzym für die Spaltung von Milchproteinen die entscheidende Rolle. Dabei wird das Milchprotein Casein durch Chymosin zwischen Phenylalanin und Methionin (Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>) hydrolytisch gespalten, wodurch das Milcheiweiß unlöslich wird.<sup>45</sup> Großtechnisch wird Chymosin inzwischen zu über 80 % durch Fermentationsverfahren mithilfe von Fermentationsverfahren gewonnen, bei denen hauptsächlich Schimmelpilze oder Hefen verwendet werden.<sup>46–48</sup>

Industriell genutzt wird Chymosin hauptsächlich in der Käseproduktion. Hauptfunktion ist hierbei die zuvor beschriebene Spaltung von Casein.<sup>49</sup> Hierbei verklumpt dieses und wird somit von der wässrigen Molke getrennt, um es zu Käse weiterzuverarbeiten. Dieser Prozess wird auch als Gerinnung bezeichnet. Die Herstellung von Quark basiert ebenfalls auf diesem Prozess.<sup>50–52</sup>

Casein hat sich ursprünglich aus verschiedenen Calciumphosphatbindenden Phosphoproteinen gebildet.<sup>53</sup> In der Milch kommt Casein üblicherweise in Form von vier (selten fünf) verschiedenen Proteinen vor. Dazu zählen das  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - und  $\kappa$ -Casein. Seit dem antiken Ägypten gibt es auch außerhalb von Milch oder Käse Anwendungen für Casein. U. a. kann das Biopolymer es aufgrund seiner amphiphilen Teilstruktur als eine Art Tensid bei wasserhaltigen Verbindungen z. B. im Kosmetikbereich benutzt werden.<sup>54</sup>

Die amphiphile Struktur von Casein kommt aufgrund der unterschiedlichen Bestandteile der vier Hauptproteintypen zustande. Die  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - und  $\beta$ -Caseine weisen primär hydrophobe Eigenschaften auf, während  $\kappa$ -Casein zusätzlich hydrophile Strukturen aufweist. In Wasser kommt es zu einer Mizellbildung, bei der das  $\kappa$ -Casein als Stabilisator auf der Außenseite der Mizelle agiert. Der genaue Mizellbildungsmechanismus ist bis heute nicht endgültig geklärt. Es gibt jedoch eine Vielzahl von Modellen in der Literatur<sup>55</sup>. Ein mögliches Modell nach Horne<sup>56</sup> des Mizellaufbaus ist in **Abbildung 12** schematisch dargestellt. Dabei aggregieren die Caseinmoleküle zunächst aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen zu kleineren Clustern. Während dieser Clusterbildung entstehen Sub-Mizellen mit unterschiedlichen Anteilen des amphiphilen  $\kappa$ -Caseins. Die Sub-Mizellen mit geringerem Anteil sind deutlich hydrophober und wechselwirken daher stärker miteinander. Bei der eigentlichen Mizellbildung bilden diese Submizellen daher den Kern, während sich die Sub-Mizellen mit großem Anteil nach außen orientieren und aufgrund der Wechselwirkung mit dem Wasser die gesamte Mizelle stabilisieren.<sup>56,57</sup> Die Verbindung der Sub-Mizellen läuft über kolloidales Calciumphosphat.<sup>58</sup> Der Gewichtsanteil an Calciumphosphat innerhalb des Caseins (Trockengewicht) liegt bei ca. 7 %.<sup>59</sup>





**Abbildung 12: Schematisches Mizellaufbaumodell von Casein nach D. S. Horne, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2006, 11, 148.<sup>56</sup>**

Die Spaltung durch Chymosin erfolgt ausschließlich am  $\kappa$ -Casein, wodurch der weitaus hydrophilere Part abgespalten wird und der weitaus größere Rest des hydrophoben Caseins ausfällt. Studien haben gezeigt, dass die Spaltung zwischen Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> aufgrund der spezifischen Anordnung der Positionen 95 bis 111 erleichtert erfolgen kann. Gerade die Stellung von Arg<sub>97</sub> scheint durch eine Interaktion mit Asp<sub>249</sub> des Chymosins zur erleichterten Lokalisation der zu spaltenden Kette beizutragen.<sup>60</sup>

Mit Chymosin wurden bereits enzymmoderierte Abscheidungen von biologischen Partikeln vorgenommen, die als Inspiration für diese Arbeit dienen. Genauerer hierzu ist im nachfolgenden Kapitel 2.5 dargestellt.

### 2.2.2 Lipasen

Lipasen zählen zur Enzymklasse EC 3.1.1<sup>61</sup>, den sogenannten Esterasen, und sind damit, genau wie Chymosin, den Hydrolasen zugehörig. Sie katalysieren vorrangig die Hydrolyse von Triglyceriden und anderen Lipiden, indem sie in wässriger Umgebung Fettsäuren abspalten. Lipasen finden dabei in zahlreichen Industrien ihre Anwendung. Dazu zählen die Nahrungsmittel-, Medizin-, Kosmetik- und Lederindustrie, um nur einige zu nennen.<sup>62</sup> Sie zählen aufgrund ihrer großen Vielseitigkeit zu den am meisten industriell verwendeten Enzymen überhaupt.<sup>63</sup>

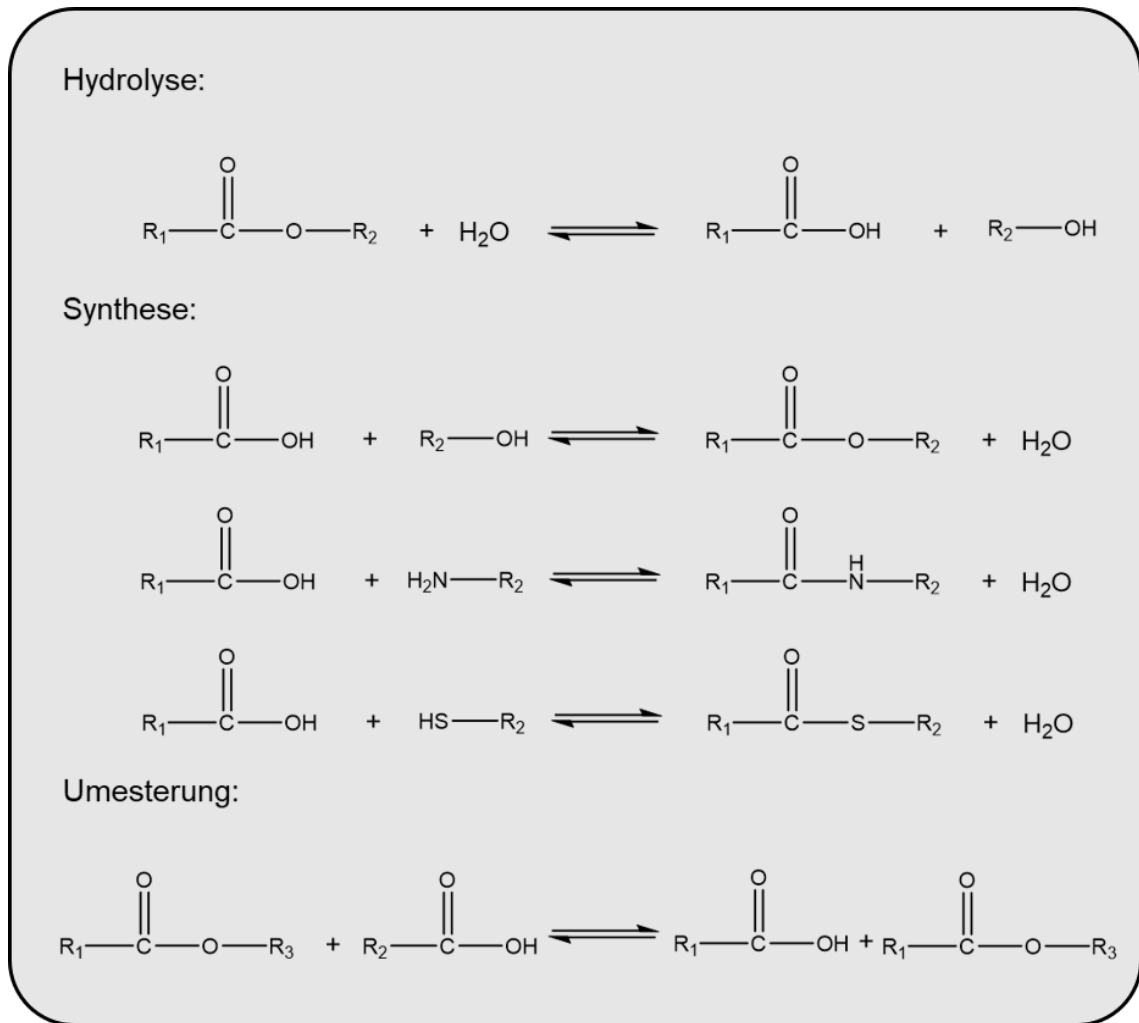
Lipasen spielen in den Stoffwechseln einer Vielzahl von Organismen eine entscheidende Rolle. Diese reichen von kleinsten Mikroorganismen bis hin zu

großen Säugetieren.<sup>64</sup> In den Langsäugetieren spielen vor allem die Pankreaslipase (im Dünndarm), Lipoproteinlipase (an Blutkapillaren) und die Hepatische Triglycerid-Lipase (in der Leber) bei der Spaltung von Fetten eine bedeutende Rolle.<sup>65</sup>

Die Lipasen, die von den jeweiligen Spezies produziert werden, sind individuell und unterscheiden sich vor allem in puncto Stabilität, Aktivität und Substratspezifität. Daher gilt es für die Industrie die passenden Lipasen zu identifizieren und in großer Menge und Reinheit herzustellen. Zu den am häufigsten genutzten Quellen bzw. Wirten für biotechnologisch genutzten Lipasen zählen vor allem *Escherichia coli*, ein Darmbakterium, und *Komagataella phaffii*, eine methylotrophe Hefeart.<sup>66</sup>

Wie erwähnt, ist die natürliche Katalyse der Aufspaltung bzw. Hydrolyse von Esterbindungen die Hauptaufgabe der Lipasen. Jedoch können sie auch eine Vielzahl weiterer Reaktionen katalysieren und können daher auch bei zahlreichen Syntheseschritten eingesetzt werden.

Eine kurze Übersicht der verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten ist in **Abbildung 13** dargestellt.<sup>67</sup>



**Abbildung 13: Kurze Übersicht ausgewählter Katalysiemöglichkeiten von Lipasen<sup>67</sup>**

Abbildung 13 zeigt, dass neben der Hydrolyse von Estern auch die umgekehrte Reaktion, die Veresterung möglich ist. Die Hydrolyse geschieht bevorzugt in wässriger Umgebung, während für die Veresterung ein organisches Lösungsmittel benötigt wird. Analog sind ebenso die Synthesen von Amiden und Thioestern mithilfe von Lipasen durchführbar. Darüber hinaus können auch Umesterungen durchgeführt werden.<sup>67</sup> Umesterungen mit Lipasen spielen schon heute eine Rolle im Bereich der erneuerbaren Energien, insbesondere bei der Umesterung von natürlichen Fetten und Ölen zu Biodiesel.<sup>68,69</sup>

Im Rahmen dieser Arbeit wird eine *Pseudomonas Cepacia* Lipase verwendet. Das produzierende Bakterium wird neuerdings auch als *Burkholderia cepacia* bezeichnet und findet sich in diversen Spezies sowie vor allem auch Grundwasser und Erdboden wieder und gilt als besonders anpassungsfähig.<sup>70</sup>

Lipasen der *Burkholderia cepacia* besitzen ein Temperaturoptimum von ca. 40 °C. Bei höheren Temperaturen kommt es schnell zu einer Denaturierung. Das pH- Optimum liegt ca. bei 9. Im sauren pH-Bereich entfaltet sich das Enzym.<sup>71–73</sup>

Die Lipase der *Pseudomonas Cepacia* gilt als besonders effiziente Lipase, die sowohl bei Veresterungen als auch bei Hydrolysen hohe Ausbeuten in hohem Enantiomerenüberschuss liefert.<sup>74</sup> Genutzt wird in dieser Arbeit die hydrolytische Spaltung von Poly-ε-Caprolacton mithilfe dieser Klasse der Lipasen, welche in der Fachliteratur bereits bekannt ist.<sup>75,76</sup>

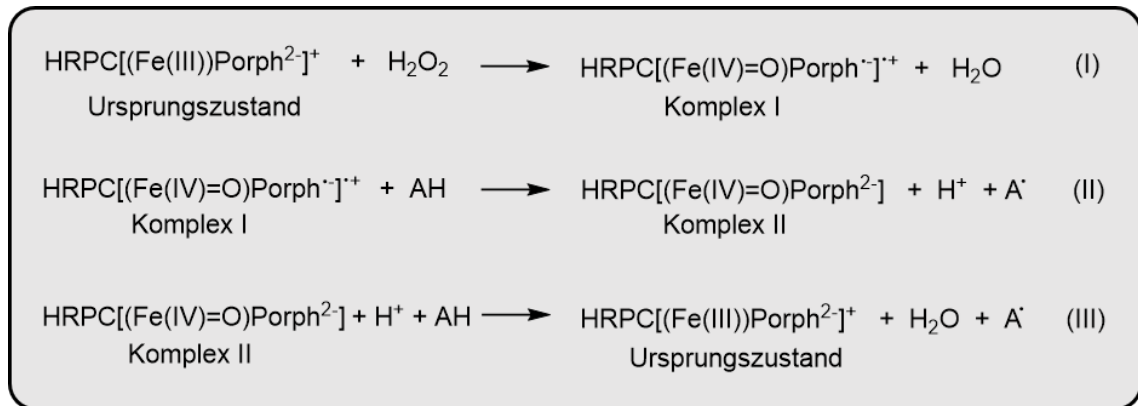
### 2.2.3 Meerrettichperoxidase

Die Meerrettichperoxidase (engl.: Horseradish Peroxidase), kurz: HRP, zählt zu der Klasse der Peroxidasen EC 1.11.1.7.<sup>77</sup> und besitzt ein Molekulargewicht von ca. 40000 Da.<sup>78–80</sup> Es existieren mindestens sieben verschiedene Isoenzyme der HRP, von denen das am häufigsten verwendete das Isoenzym C ist.<sup>81–83</sup>

Peroxidasen üben viele wichtige Funktionen in lebenden Organismen aus. Dabei werden Peroxide als Elektronenakzeptoren genutzt, um oxidative Reaktionen zu katalysieren.<sup>84,85</sup> HRP zählt zu den Metalloenzymen der Ferroprotoporphyrinuruppe und bildet mit Hämen (Komplexverbindungen, bei denen Eisen als Zentralatom in einem Porphyrinliganden agiert) während der Katalyse verschiedene Übergangszustände. Dabei nutzt HRP Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Substrat, um aromatische Moleküle (z. B. Phenole) zu oxidieren.<sup>86</sup>

Zunächst wird dabei HRP im Grundzustand (mit Eisen(III) im Zentrum) durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum sogenannten Komplex I (mit Eisen(IV) im Zentrum) oxidiert. Anschließend finden in Anwesenheit von aromatischen Elektronendonoren (AH) zwei aufeinanderfolgende Elektronenübertragungen statt, bei denen der Komplex I über den relativ stabilen Komplex II wieder zum ursprünglichen HRP reduziert wird, während sich am aromatischen Molekül ein Radikal bildet.<sup>86,87</sup> Dieser Mechanismus des Isoenzym C der HRP ist beispielhaft und vereinfacht in **Abbildung 14** nach Henriksen et al. dargestellt. Der detaillierte

Reaktionsmechanismus ist in der Literatur von Rodriguez-Lopez, Lowe et al. zu finden.<sup>88</sup>



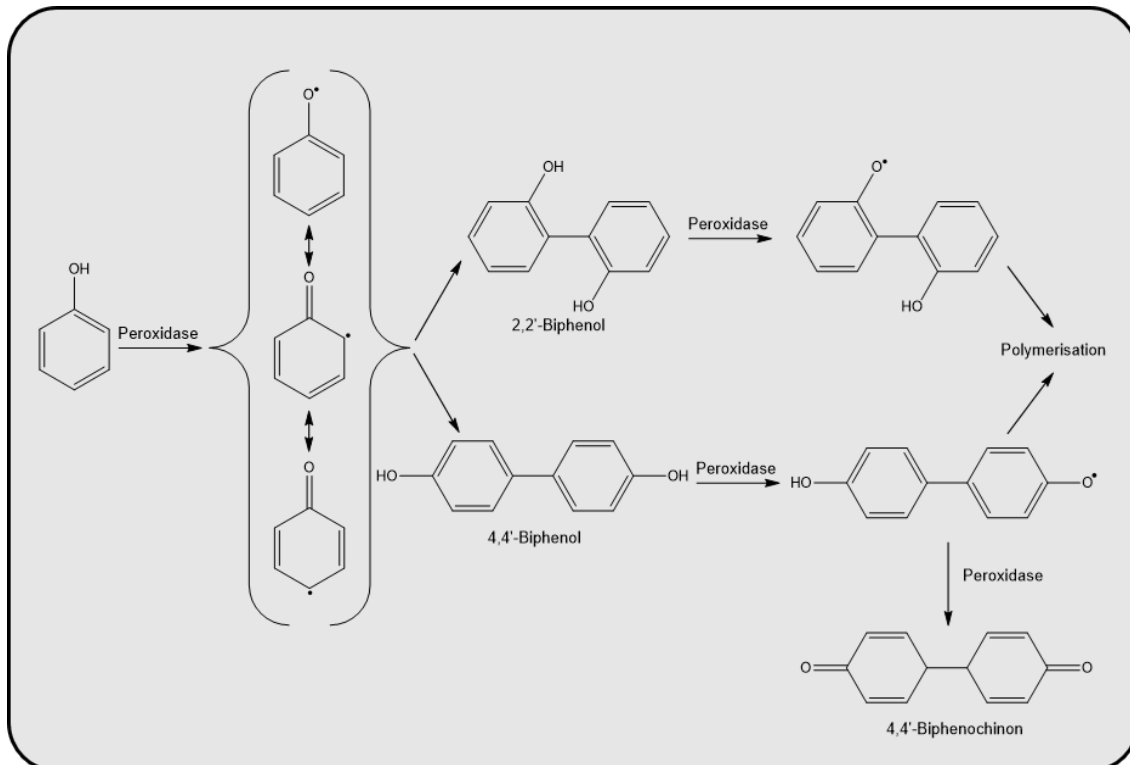
**Abbildung 14: Vereinfachter Katalysemechanismus der HRP nach A. Henriksen, A. T. Smith, M. Gajhede, *Journal of Biological Chemistry* 1999, **274**, 35005.<sup>87</sup>**

Phenole zählen mit zu den häufigsten Bestandteilen von klassischen Kunststoffen und Lacken. Bisphenol-A ist Hauptbestandteil vieler Epoxidharze (s. z. B. Kapitel 2.1.2) und Phenol wird mit Formaldehyd zu Phenolharzen weiterverarbeitet.<sup>89</sup>

Phenolkomponenten stellen aufgrund ihrer Toxizität und Kanzerogenität sowie ihrem häufigen Vorkommen in der chemischen Industrie, die Abwasserwirtschaft vor Probleme. Sie stellen heutzutage die größte organische Verunreinigung im Abwasser dar.<sup>90,91</sup>

Daher wird großer Aufwand betrieben Phenole aus dem Abwasser zu entfernen. Ein Forschungsansatz ist die Entfernung mithilfe von HRP. HRP ist, wie in Abbildung 14 beschrieben, in der Lage, Phenole oxidativ zu radikalisieren. Durch anschließende oxidative Kupplungspolymerisation kann es aus aufgrund der dadurch entstehenden Unlöslichkeit aus dem Abwasser ausgefällt werden.<sup>92–94</sup>

Der Reaktionsmechanismus dieses Vorgehens nach Torres-Duarte et al. ist in **Abbildung 15** dargestellt.<sup>95</sup>



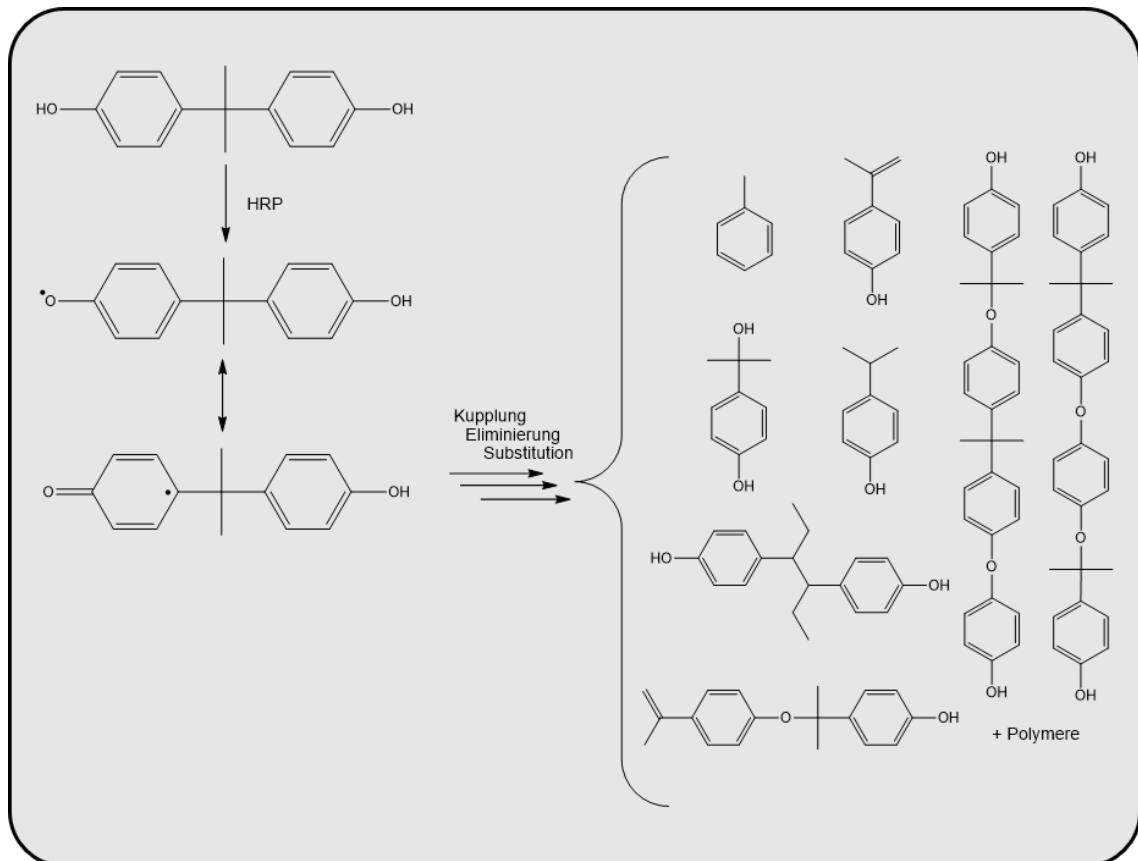
**Abbildung 15: Mechanismus der Oxidation und anschließenden Polymerisation von Phenol durch peroxidasekatalysierte Reaktionen nach Torres-Duarte.<sup>95</sup>**

In der Gegenwart von HRP und Wasserstoffperoxid wird Phenol zu Phenolradikalen umgewandelt und kann in anschließenden postenzymatischen Kupplungsreaktionen mit sich selbst dimerisieren und schließlich nach weiterer enzymatischer Oxidation weiterpolymerisieren. Die Ausbildung von Neben- und Abbruchreaktionen ist ebenso wie die Bildung anderer Dimere jedoch ebenfalls möglich.<sup>96</sup> Die polymerisierten Phenolkomponenten werden schließlich im Abwasser unlöslich und sedimentieren, wodurch sie sich leichter abtrennen lassen sollen.<sup>97</sup> Diese Form der Polymerisation wird auch als enzymmoderierte oxidative Kupplungspolymerisation bezeichnet.<sup>98–100</sup>

HRP ist mit Wasserstoffperoxid darüber hinaus ebenso in der Lage höherwertige Phenole wie z. B. Bisphenol A auf diese Art zu polymerisieren.<sup>101,102</sup>

In **Abbildung 16** ist die oxidative Kupplungspolymerisation von BPA mittels HRP angezeigt. Die Grafik basiert schematisch auf den Ergebnissen von Huang und Weber sowie Torres-Duarte und Vazquez-Duhalt.<sup>95</sup> Der genaue Mechanismus ist der Literatur von Huang und Weber zu finden.<sup>103</sup> Nach der Aktivierung durch HRP treten eine Vielzahl parallel ablaufender Kupplungs-, Eliminierungs- und

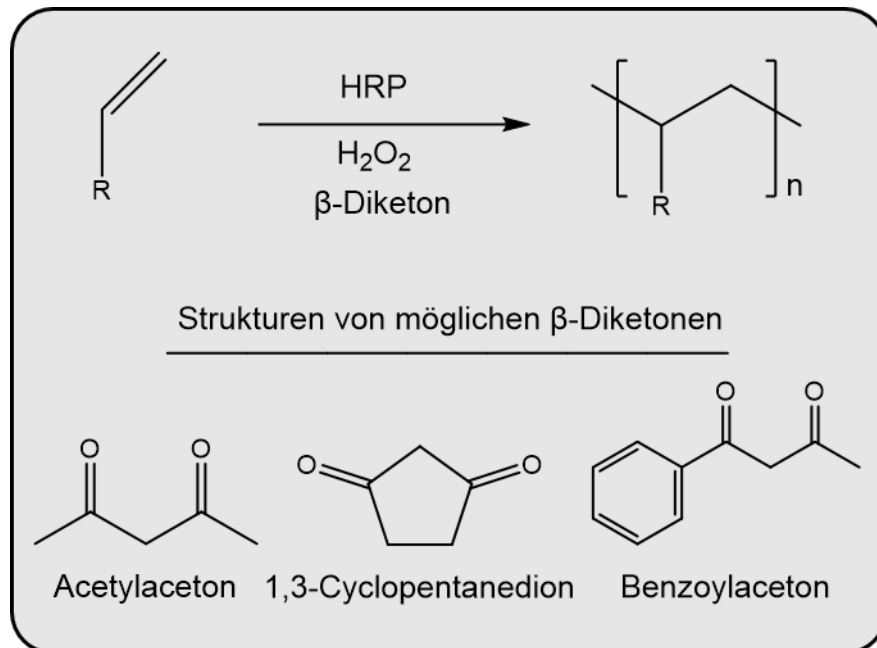
Substitutionsreaktionen mit weiteren BPA-Molekülen sowie den Zwischenprodukten auf, die jeweils zu verschiedenen Endprodukten führen. Aus diesem heterogenen Reaktionsverlauf folgt, dass für BPA keine Homopolymerisation stattfindet. Um zu höheren Oligomeren zu gelangen, muss am Zwischenprodukt erneut ein Radikal gebildet werden. Dadurch sind HRP und Wasserstoffperoxid mehrfach als Katalysator an der Reaktion beteiligt.



**Abbildung 16: Verkürzter schematischer Reaktionsweg der Oxidation von Bisphenol-A mittels HRP frei nach Huang und Weber sowie Torres-Duarte und Vazquez-Duhalt.<sup>95,103</sup>**

Neben der oxidativen Kupplungspolymerisation von phenolischen Verbindungen besteht auch die Möglichkeit vinylhaltige Moleküle mithilfe von HRP zu polymerisieren. Dies wurde zuerst von Derango et al. beschrieben.<sup>104</sup> Gerade für die Emulsionspolymerisation von Methylmethacrylat oder Styrol ist der Reaktionsweg gut erforscht.<sup>105–107</sup> HRP initiiert die radikalische Polymerisation über die Oxidation von einem Diketon (z. B. Acetylaceton) unter der Beteiligung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Raumtemperatur. Dadurch wird am Acetylaceton ein Primärradikal erzeugt, welches die radikalische Kettenreaktion an vinylhaltigen Monomeren

startet. Mit dieser Art der Polymerisation lassen sich in wässrigen Systemen Nanopartikel mit hohen Molmassen im Bereich von  $10^6$  g/mol ( $M_w$ ) erzeugen.<sup>106</sup>



**Abbildung 17: Generelles Reaktionsschema für die radikalische Polymerisation von Vinylmonomeren. Frei nach Kohri, Uzawa et al.<sup>107</sup>**

Der genaue Mechanismus der Radikalübertragung und anschließenden klassischen radikalischen Kettenreaktion am Beispiel von Styrol ist in der Literatur von Amarjit Singh et al. zu finden.<sup>108</sup> Die vereinfachte Reaktionsgleichung wird in **Abbildung 17** gezeigt.

HRP erweist sich über einen relativ breiten pH-Bereich von 5 bis 9 in der Aktivität als relativ stabil. Das Optimum der Aktivität liegt im fast neutralen Bereich bei ca. 6,5. Auch beim pH-Wert von 7,5 liegt die Aktivität noch bei 84 %.<sup>109,110</sup> Andere Quellen geben das Maximum bei pH 7 an.<sup>111</sup> Die optimale Temperatur liegt je nach System zwischen 20 und 40 °C.<sup>111</sup> Für einzelne Systeme kann die optimale Aktivität auch deutlich höher liegen (im Bereich von 60 bis 80 °C). Jedoch spielt die Thermostabilität hier eine große Rolle, da diese mit steigender Temperatur erheblich sinkt und sich die HRP bei Temperaturen jenseits der 40 °C thermisch degradiert.<sup>112</sup> Zur Steigerung der Thermostabilität gibt es Möglichkeiten der Modifikation der HRP.<sup>113</sup>

Ein weiterer wichtiger zu untersuchender Faktor ist der Anteil an zugeführtem Wasserstoffperoxid. Wasserstoffperoxid ist zur Katalyse der oben genannten



---

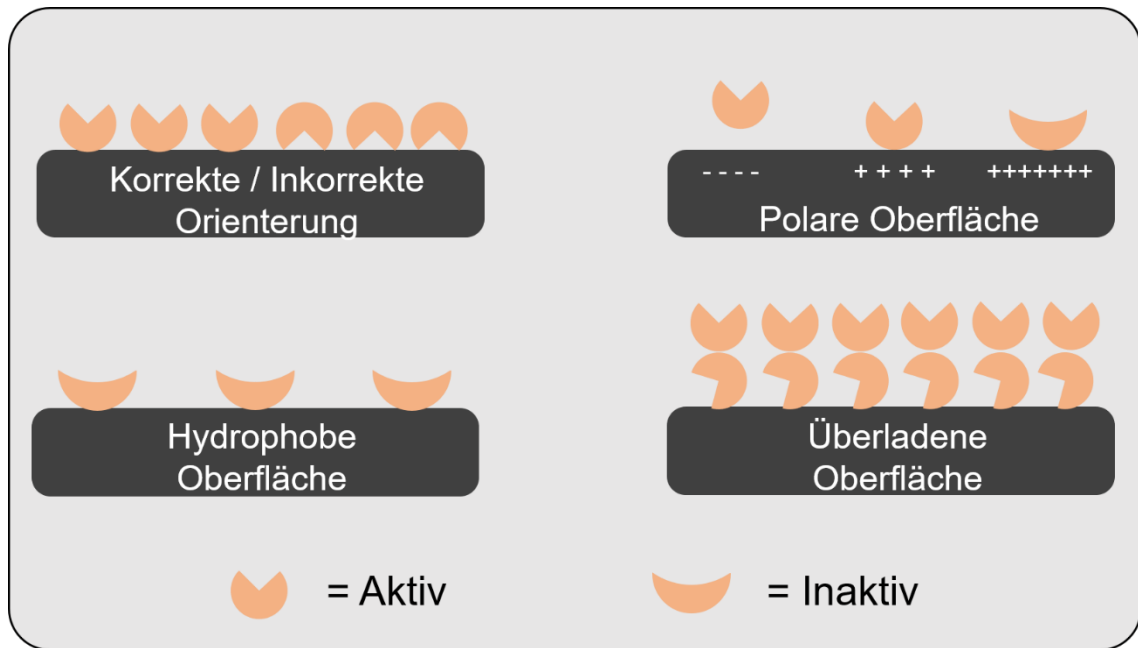
Reaktionen zwingend notwendig, jedoch inhibiert es mit steigendem Anteil peu à peu gleichzeitig die Peroxidase, da es das Enzym in eine inaktive Form (Oxyperoxidase) umwandelt.<sup>114,115</sup>

## 2.3 Immobilisierung von Enzymen

Ein großes Problem bei der industriellen Nutzung von Enzymen ist neben den hohen Produktionskosten die relative Instabilität der Enzyme gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur, pH-Wert, Lösemitteln etc. Ebenso können aktive Enzyme für eine erneute Verwendung nach erfolgter Reaktion häufig nur schwer vom übrigen Reaktionsmedium getrennt werden.<sup>116</sup> Um diesen Problemen entgegenzuwirken, besteht die Möglichkeit, Enzyme auf Substratoberflächen zu immobilisieren. Seit Jahrzehnten wurden erhebliche Erfolge in Bezug auf die Haltbarkeit, Wiederverwendbarkeit und damit einhergehenden Leistungssteigerungen und Kostenersparnisse mithilfe von Immobilisierungstechniken erzielt.<sup>117</sup> Die Forschung an neuen Immobilisierungstechniken läuft dabei stetig weiter.<sup>118–120</sup> Hohen Nutzen verspricht man sich vor allem im industriellen und medizinischen Sektor sowie in der Nahrungsmittelbranche.<sup>121–123</sup> Diese Arbeit befasst sich mit der dieser Methode zur Initiierung einer darauffolgenden Beschichtung.

### 2.3.1 Auswirkung verschiedener Oberflächenmaterialien auf die Enzymstruktur

Die Struktur der Enzyme hat direkte Auswirkung auf ihre katalytische Aktivität. Dies betrifft sowohl die spezifische chemische Funktionalität als auch die Regio- und Stereoselektivität.<sup>124</sup> Neben der Aktivität wird auch die Stabilität der Enzyme erheblich durch die Proteinstruktur beeinflusst. Die Art und Weise der Faltung bestimmt dabei über die intern und extern möglichen chemischen Wechselwirkungen.<sup>125,126</sup> Die Konformation und Ausrichtung der Enzyme spielt folglich bei jeglicher Anwendung eine essentielle Rolle und ist daher bei den verschiedenen Enzymimmobilisierungstechniken stets zu berücksichtigen, um das aktive Zentrum in die gewünschte Richtung auszurichten. Eine Auswahl an möglichen Auswirkungen verschiedener Substrateigenschaften auf die Enzymkonformationen ist auszugsweise in **Abbildung 18** dargestellt.<sup>127</sup>



**Abbildung 18: Mögliche Auswirkungen verschiedener Substrateigenschaften auf die Enzymkonformation nach Secundo.<sup>127</sup>**

Enzyme neigen dazu Wasserstoffbrückenbindungen oder Salzbrücken mit Oberflächen oder anderen Molekülen auszubilden. Wenn auf der Oberfläche polare oder ionisierbare funktionelle Gruppen vorliegen, wird diese Neigung verstärkt. Ähnliches gilt für die Anwesenheit von elektrostatischen Gruppen z. B. in Form von Polyelektrolyten auf der Oberfläche. Durch die Interaktion bestimmter ionischer Aminosäuren mit den jeweiligen Ladungen kann es zu Attraktion oder Repulsion der einzelnen Aminosäuren oder sogar des gesamten Enzyms kommen. Dies hätte nicht nur Auswirkungen auf die freie Energie des Gesamtsystems, sondern kann auch zu Änderungen in der Enzymkonformation und damit Inaktivierung des Enzyms führen.<sup>128</sup> Bei Kontakt mit stark geladenen Oberflächen wird ebenso die Orientierung bzw. Ausrichtung mancher Enzyme direkt beeinflusst.<sup>129</sup> Bei besonders hydrophoben Substraten ergibt sich für Enzyme mit einer hohen Anzahl an hydrophoben Aminosäuren eine besonders starke Anlagerung. Diese starke Interaktion führt zu einer Dehydratisierung und damit einhergehenden Änderung der Enzymstruktur und anschließenden Inaktivierung.<sup>127,130–132</sup>

Neben den physikalisch chemischen spielen auch die topografischen Eigenschaften des Substrats eine bedeutende Rolle in Bezug auf die Enzymaktivität.<sup>133</sup>

Ebenso kann der pH-Wert oder die Ionenstärke des umgebenden Mediums/ Lösemittels die Konformation und damit Aktivität immobilisierter Enzyme in erheblichem Maße beeinflussen.<sup>134</sup>

Durch die richtige Wahl der Immobilisierungstechnik und Berücksichtigung aller angegebenen Faktoren können jedoch sowohl die Aktivität, Stabilität und Selektivität der Enzyme durch Immobilisierung verbessert werden.<sup>135,136</sup>

Prinzipiell kann fast jedes Substrat zur Immobilisierung von einzelnen Enzymen via einer der spezifischen Wechselwirkungen in stark unterschiedlich ausgeprägter Qualität dienen. Unterteilen lassen sich diese in anorganische und organische Substrate. Anorganische Substrate verfügen i. d. R. über eine geringere Biokompatibilität als viele organische Trägermaterialien, besitzen dafür andere Vorteile. Bei den anorganischen Substraten sticht vor allem Siliziumdioxid heraus. Siliziumdioxid eignet sich aufgrund seiner variablen funktionellen und morphologischen Modifizierbarkeit hervorragend als vielseitig verwendbares Trägermaterial für Enzyme.<sup>137</sup> Besonders interessant sind Silikapartikel aufgrund ihrer einstellbaren Porösität<sup>138,139</sup> oder z. B. auch pyrogenes Siliziumdioxid, also vollständig amorphe, aggregierte Silikapartikel mit hoher Härte.<sup>140</sup> Weitere anorganisch nutzbare Substrate sind neben Glas<sup>141</sup> z. B., Aluminium<sup>142</sup>, Gold<sup>143</sup> und weitere Metalle<sup>144</sup>, Mineralien wie Hydroxylapatit<sup>145</sup>, Bentonit<sup>146</sup> oder Mica.<sup>147</sup> Diese Arbeit befasst sich neben Glas noch mit typischeren Beschichtungsmaterialien wie den Metallen Aluminium, Stahl und Messing.

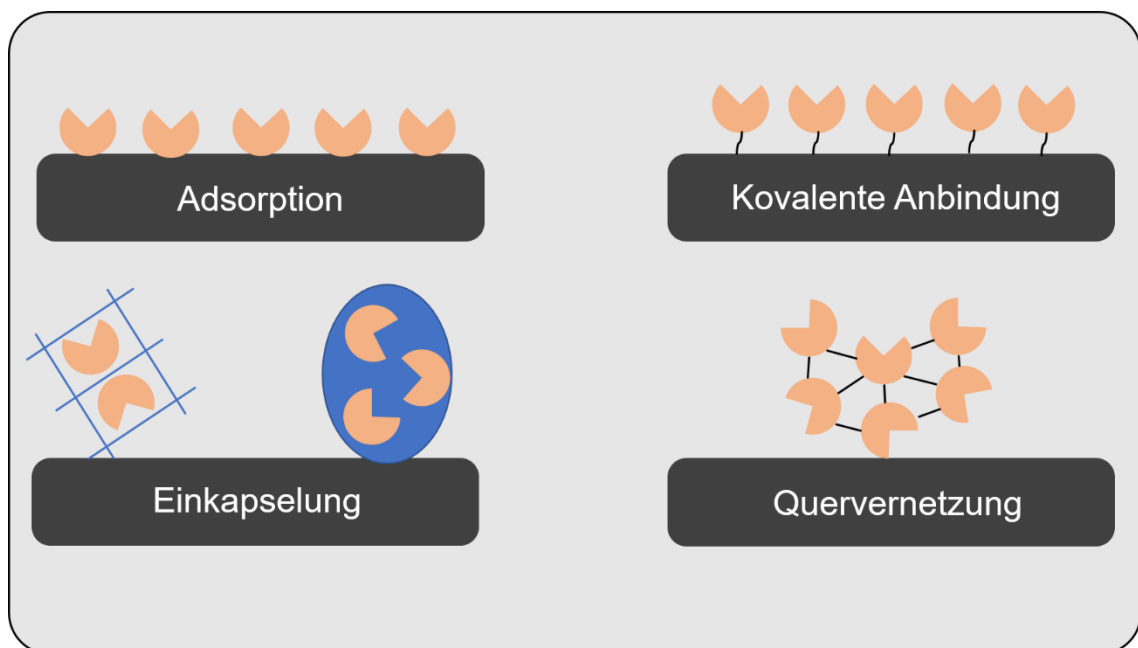
Bei den Biopolymeren der organischen Substrate spielt Chitosan eine bedeutende Rolle. Mit seiner Biokompatibilität und der hohen Anzahl an funktionellen Gruppen verfügt es über eine besonders große Affinität zu Enzymen. Daher zählt es bei der Enzymadsorption zu einem der am häufigsten genutzten Trägermaterialien.<sup>148–150</sup> Alginate, saure Polysaccharide aus den Zellwänden von Braunalgen, sind ebenfalls besonders interessante biopolymere Substrate. Aufgrund ihrer Neigung bei Anwesenheit von Natrium- oder Calciumionen zu gelieren, eignen sie sich hervorragend, um einzelne oder auch mehrere Enzyme gleichzeitig mit einzugliedern. Daher werden sie sehr häufig für zur Verkapselung von Enzymen eingesetzt.<sup>150,151</sup> Darüber hinaus ist Cellulose aufgrund seiner hohen Verfügbarkeit ebenfalls von Bedeutung.<sup>150,152,153</sup> Hinzu

kommt eine Vielzahl weiterer natürlich vorkommender möglicher Biopolymere wie z. B. Agarose oder Guaran.<sup>154</sup>

Auch synthetische Polymere finden als organische Substrate in der Enzymimmobilisierung Anwendung. Ihr Hauptvorteil liegt darin, dass sie aufgrund der Auswahlmöglichkeit an Monomeren genau auf ihr zu immobilisierendes Enzym hin aufgebaut werden können.<sup>119</sup> Dies ist nicht nur für die verbesserte Interaktion zur Adsorption sondern auch für kovalente Bindungen zum Enzym höchstinteressant. Zum Einsatz kommen daher je nach Enzym eine äußerst breite Anzahl an funktionellen Gruppen.<sup>155</sup> Beispiele für synthetische Polymere, die zur Enzymimmobilisierung genutzt werden, sind Amberlite<sup>156</sup>, modifiziertes PVC<sup>157</sup>, Polyamid 6,6<sup>158</sup> oder Polyurethanschäume<sup>159</sup>.

### 2.3.2 Übersicht verschiedener Immobilisierungstechniken

Es gibt eine große Anzahl an verschiedenen Immobilisierungstechniken. Man kann sie jedoch in vier Hauptkategorien einteilen. Dazu zählen die Adsorption, kovalente Anbindung, Einkapselung und Quervernetzung (s. **Abbildung 19**).<sup>120</sup> Gerade die Technik der Adsorption sowie kovalente Anbindung der Enzyme sind für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.



**Abbildung 19: Überblick verschiedener Immobilisierungstechniken nach Nguyen und Kim<sup>120</sup>**

## Immobilisierung durch Adsorption

Die Adsorption ist eine der direktesten Methoden, um Enzyme auf Oberflächen zu immobilisieren. Die Enzyme werden dabei durch physikalische Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, Van der Waal's-, elektrostatische oder hydrophobe Interaktionen auf dem Substrat gehalten.<sup>144,160</sup> Die einfachste Art ist die Lösung des Enzyms in einem geeigneten Lösungsmittel (häufig Wasser) und anschließendes Eintauchen des Substrats in die Enzymlösung für eine festgelegte Zeit. Nach Ablauf dieser definierten Zeitspanne wird das Substrat aus der Lösung entfernt und abgewaschen, um nicht adsorbierte Enzyme zu entfernen.<sup>161,162</sup>

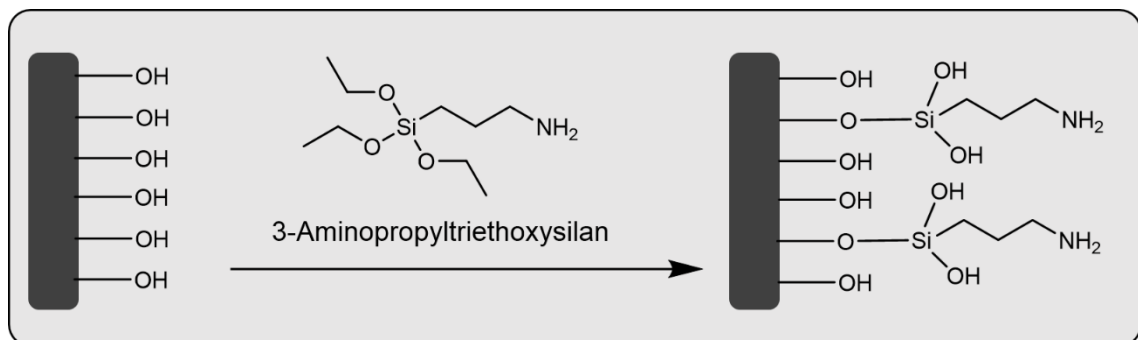
Eine weitere einfache Möglichkeit der Adsorption ist das Auftropfen der Enzymlösung auf das jeweilige Substrat. Dort wird der Tropfen so lange an der Luft gelassen, bis die Lösung komplett aufgetrocknet ist. Während des Trocknungsvorgangs adsorbieren die Enzyme an der Grenzschicht an die Substratoberfläche. Bei dieser Technik muss das Substrat anschließend besonders gründlich abgespült werden, um die nicht adsorbierten Enzyme abzuwaschen.<sup>163–165</sup>

Die Adsorption ist die am häufigsten genutzte Immobilisierungsmethode, da es bei passender Materialauswahl das aktive Zentrum der Enzyme nicht beeinflusst und die Enzymaktivität beibehalten wird.<sup>151,166</sup> Ein Nachteil dieser Methode ist die Reversibilität dieser Methode. Die verglichen mit chemischen kovalenten Immobilisierungstechniken, geringere Haftung der adsorbierten Enzyme führt dazu, dass die Enzyme relativ leicht wieder abgewaschen werden können.

Es gibt jedoch diverse Techniken, die Zugänglichkeit der Oberfläche der Substrate zu modifizieren, um die Enzymadsorption zu erleichtern. Eine wichtige Voraussetzung für eine gute Adsorptionswirkung ist die physikalische Interaktion des Enzyms mit funktionellen Gruppen auf der Substratoberfläche. Daher können die Substrate zum einen zum Einbringen weiterer funktioneller Gruppen mit starken Säuren angeätzt werden.<sup>167</sup> Dadurch wird die Oberfläche zusätzlich angeraut was mit einer Erhöhung der spezifisch zugänglichen Oberfläche einhergeht. Eine weitere Möglichkeit der Funktionalisierung des Substrats ist die

Plasmabehandlung. Diese Option hat allerdings aufgrund der hohen Kosten wirtschaftliche Nachteile.<sup>168,169</sup>

Ein weiterer Ansatz die Enzymadsorption zu steigern ist es Modifizierungsmittel einzusetzen, die mindestens zwei funktionelle Gruppen aufweisen. Eine funktionelle Gruppe dient dabei der Interaktion oder direkten kovalenten Bindung mit dem Substrat und die andere mit den funktionellen Gruppen des jeweiligen Enzyms. Generell werden hierfür z. B. bifunktionelle Silane eingesetzt. Zu den bedeutendsten eingesetzten Silanen zählt z. B. 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES), welches über Hydrolysereaktionen der Ethoxysilanfunktionen kovalent an ein OH-funktionelles Trägermaterial gebunden werden können (s. **Abbildung 20**). Durch ionische Interaktionen mit dem in wässriger Lösung positiv geladenem freien Aminfunktion kann schließend eine verbesserte Adsorption polarer Enzyme stattfinden.<sup>144,170</sup>



**Abbildung 20: Substratmodifizierung mit APTES zur Verbesserung der Enzymimmobilisierung durch Adsorption. Frei nach Jesionowski, Zdarta et al.<sup>144</sup>**

Möglich ist zudem die Funktionalisierung der Substratoberflächen mit bifunktionellen Carbonylverbindungen wie z. B. Glutaraldehyd. Diese ermöglichen neben starken ionischen Wechselwirkungen jedoch auch kovalente Bindungen, weshalb sie im folgenden Teilkapitel ausführlich behandelt werden.

### **Immobilisierung durch kovalente Anbindung**

Chemisch kovalente, irreversible Immobilisierungstechniken adressieren die Nachteile der Enzymimmobilisierung durch physikalische Adsorption. Aufgrund der kovalenten Bindung ist die Wechselwirkung mit dem Substrat erheblich stärker und ein Abwaschen des Enzyms wird deutlich minimiert. Die kovalente Anbindung gewährleistet ebenso eine erhöhte chemische und thermische

Stabilität sowie eine deutlich erhöhte Lebensdauer in industriellen Prozessen. Zu den Nachteilen dieser Technik zählt vor allem die Enzymorientierung. Durch unkontrollierte Anbindung an die Substratoberfläche kann das aktive Zentrum des Enzyms blockiert werden, was erhebliche Auswirkungen auf die Enzymaktivität mit sich bringt. Es gibt jedoch Methoden, die dies zum Teil verhindern können.<sup>171,172</sup>

Die zur kovalenten Immobilisierung am häufigsten genutzte funktionelle Gruppe der Enzyme sind die primären Amine entweder der N-terminalen Aminosäure oder von in die Ketten eingebauten Lysinaminosäuren. Auch die eingebauten Cysteinaminosäuren verfügen mit ihren Thiolgruppen über eine oft genutzte funktionelle Gruppe, da diese über eine Additionsreaktion mit ungesättigten Carbonylgruppen äußerst stabile Thioether ausbilden können.<sup>173</sup>

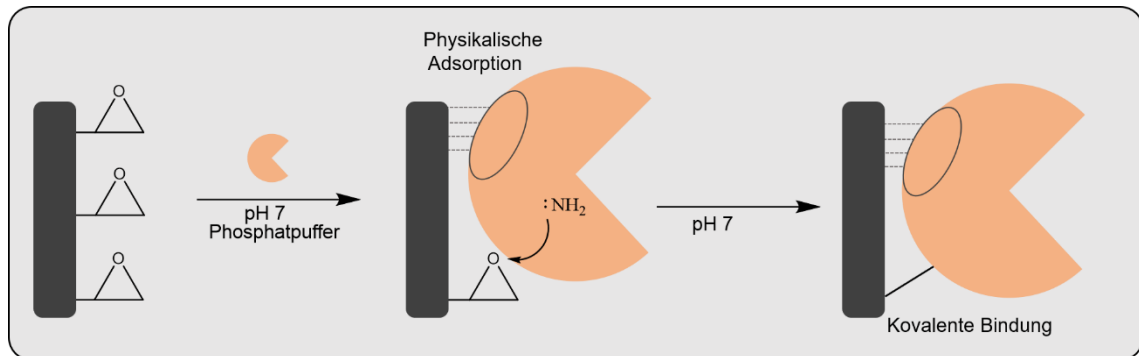
Aufgrund seiner hohen Reaktivität (vor allem mit Aminfunktionen) kann Glutaraldehyd vielseitig genutzt werden, um Enzyme sowohl an die Substratoberfläche als auch inter- und intramolekular zu verbinden.<sup>174–176</sup>

Von der Substratseite betrachtet stellen epoxydfunktionalisierte Oberflächen aufgrund der variablen Reaktionsmöglichkeiten eine Art idealen Reaktionspartner für Enzyme dar. Kovalente Anbindungen sind neben den meistgenutzten und zuvor erwähnten Aminen und Thiolen auch mit phenolischen und imidazolischen Gruppen möglich. Die Letztgenannten kommen z. B. in den Aminosäuren Tyrosin und Histidin vor. Gerade die Bindung an aminofunktionelle Aminosäuren überwiegt jedoch in der Regel.

Durchgeführt wird die Reaktion üblicherweise bei neutralen pH-Werten und niedriger Ionenstärke z. B. mithilfe eines Phosphatpuffers. Dabei kommt es häufig vor, dass es vor der chemischen Anbindung zu physikalischer Adsorption z. B. durch hydrophobe Wechselwirkungen mit hydrophoberen Teilen des Enzyms und damit zu einer Annäherung an die Substratoberfläche kommt. Anschließend finden über die Reaktion des Oxiranrings mit der Aminofunktion die kovalente Anbindung und damit irreversible Immobilisierung des Enzyms statt. Dabei kommt es durchaus auch zu Mehrfachanbindungen des Enzyms. Ein vereinfachter schematischer Ablauf dieses Vorgangs ist in **Abbildung 21** dargestellt.<sup>177,178</sup> Die Reaktionen der weiteren erwähnten funktionellen Gruppen



verlaufen analog nach ähnlichem Muster und können in der Literatur von Homaei et al. nachgelesen werden.<sup>173</sup> In dieser Arbeit wird in Bezug auf kovalente Enzymimmobilisierung ausschließlich auf epoxy-aminbasierte Reaktionsmechanismen zurückgegriffen.



**Abbildung 21: Schematische Darstellung kovalenter Enzymimmobilisierung über epoxidfunktionelle Substrate. Nach Mateo et al.<sup>178</sup>**

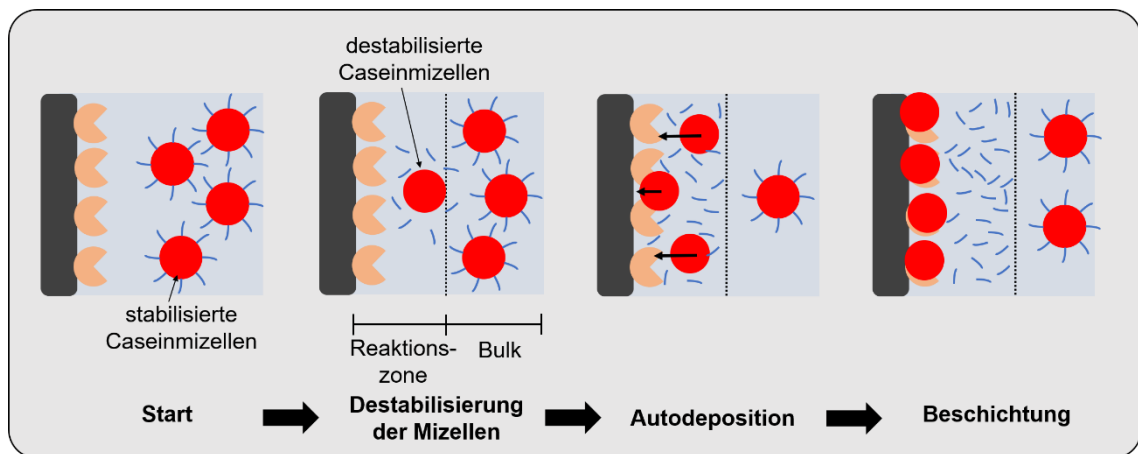
Ein weiterer Ansatz ist die Einbringung eines Spacermoleküls zwischen das Substrat und das Enzym. Hintergrund ist hauptsächlich die Steigerung der Enzymflexibilität, da es weniger sterisch durch die unmittelbare Nähe zum Substrat gehindert wird. Dabei zeigt sich, dass je länger der Spacer ist, die ursprüngliche konformelle Flexibilität des Enzyms besser beibehalten wird, während kürzere Spacer für eine bessere thermische Stabilität sorgen. Auch das Wegdriften des Enzyms vom Substrat, wird durch die kürzeren Spacermoleküle besser verhindert.<sup>179</sup> Als längeres Spacermolekül wird häufig Polyethylenglykol verwendet<sup>180</sup>, jedoch gelten auch Funktionalisierungen mit Glutaraldehyd in manchen Journals schon als Immobilisierungen via Spacer. Dies zeigt, dass der Übergang von einfacher Funktionalisierung der Substratoberfläche zur Funktionalisierung via Spacer fließend sein kann.<sup>181,182</sup>

## 2.4 EMA - Enzymmoderierte Adressierung durch Destabilisierung

2014 wurde von Strube, Rüdiger et. al. erstmals ein neues Konzept zur enzymmoderierten Adressierung (EMA) von biologischen Komponenten vorgestellt.<sup>183</sup> In dem System wird die zuvor beschriebene natürlich ablaufende Spaltungsreaktion der Aspartat-Endopeptidase Chymosin mit dem Milchprotein Casein in modifizierter Form ausgenutzt. Da der hydrophile Part der Caseinmizellen in dieser Reaktion hydrolytisch abgespalten wird, ist der verbleibende hydrophobe Kern in wässriger Umgebung im Anschluss unlöslich und fällt aus. Die Idee von Strube und Rüdiger war es, dies in unmittelbarer Nähe einer Substratoberfläche stattfinden zu lassen, um die verbliebenen hydrophoben Caseinpartikel auf dem Substrat abzuscheiden, und so eine biologische Beschichtung zu erzeugen.<sup>183</sup> Die Ausarbeitungen in der Dissertation von Rüdiger<sup>184</sup> stellen eine Inspirationen für die vorliegende Arbeit dar, da in dieser Arbeit das System der EMA von Caseinpartikeln auf Polymer- und anorganische Partikel ausgeweitet wird. Die Ergebnisse von Rüdiger et al. zu den Abscheidungen mit Casein werden im Folgenden weiter thematisiert.

Chymosin wird mit verschiedenen, zuvor erwähnten Methoden (s. Kapitel 2.3.2) auf Glas als Oberfläche immobilisiert. Nach der Immobilisierung wird das Substrat ähnlich einer klassischen Tauchbeschichtung (s. Kapitel 2.1) in ein Gefäß mit einer wässrigen Caseindispersion eingeführt, woraufhin die Reaktion startet. Dabei bildet sich aufgrund der Immobilisierung eine Reaktionszone nahe der Oberfläche aus.<sup>185,186</sup> Innerhalb dieser Reaktionszone nahe der Substratoberfläche kann das immobilisierte Chymosin mit den stabilisierten Caseinmizellen wechselwirken und die Mizellen durch Abspaltung des  $\kappa$ -Caseins gezielt destabilisieren. Da die Destabilisierung in unmittelbarer Nähe des Substrats stattfindet, scheiden sich die Caseinpartikel aufgrund ihrer Unlöslichkeit in Wasser ortsspezifisch auf dem Substrat ab und verhindern eine ungeordnete Agglomeration. Die Abscheidung ist selbstterminierend, da die abgeschiedenen Caseinpartikel die Chymosinenzyme nach der Abscheidung sterisch blockieren. Ein schematischer Ablauf des EMA-Prozesses ist in **Abbildung 22** dargestellt.<sup>183,187</sup> Stark vereinfacht ausgedrückt ähnelt der Prozess der EMA dem einer Elektrotauchlackierung, nur dass anstelle des

elektrischen Stroms Enzyme den Trigger für Caseinmizellen darstellen, um sich auf der Substratoberfläche abzuscheiden.

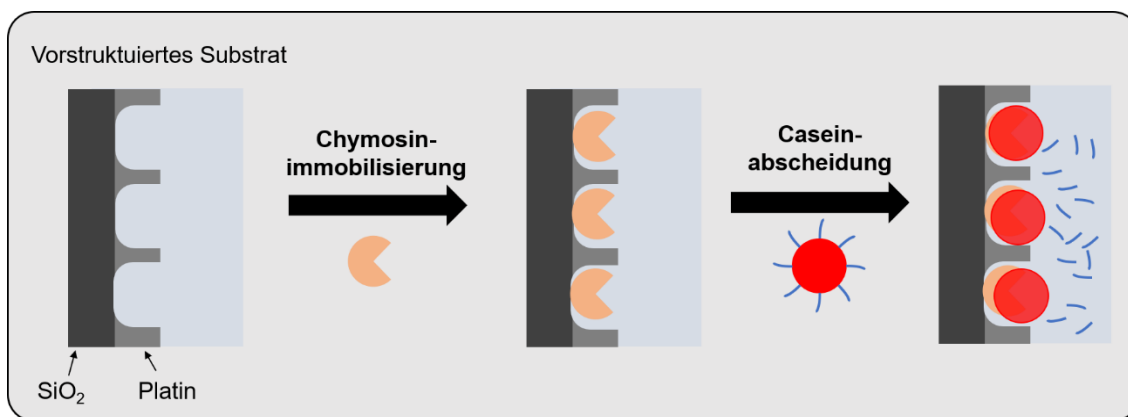


**Abbildung 22: Schematische Darstellung des EMA-Prozesses an Caseinmizellen. Frei nach Ruediger und Strube.**

Die Caseinmizellen sind in wässrigen Lösungen äußerst polydispers. Ihre Größenordnung liegt in der Regel im Bereich von 35 bis maximal 600 nm und damit im Bereich der sogenannten Nanopartikel.<sup>59,188,189</sup> Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen verbleiben die gespaltenen Caseinpartikel auf der Substratoberfläche und aggregieren, woraufhin sich ein Film bildet und die Reaktion nach und nach terminiert. Die Parameter zur Steuerung der entstehenden Schichtdicke bei adsorptiver Enzymimmobilisierung liegen in der Reaktionszeit, der Caseinmizellkonzentration und dem pH-Wert, welcher die Enzymaktivität steuert. Genauer hierzu ist in der Publikation von Rüdiger et al. nachzulesen.<sup>190</sup> Auch die Art der Immobilisierung des Chymosins spielt eine erhebliche Rolle auf die sich ausbildende Form der Abscheidung und die resultierende Schichtdicke. Aufgrund der höheren Mobilität bilden sich mit der adsorptiven Immobilisierungstechnik die größten Schichtdicken von mehreren 100 Nanometern aus.<sup>191</sup> Bei der direkten kovalenten Anbindung des Enzyms an die Substratoberfläche, besitzt das Enzym die geringsten Freiheitsgrade und ist daher in seiner Reaktivität eingeschränkt. Dies führt bei den Abscheidungsprozessen zu einer schnellen Bedeckung und damit einhergehenden Terminierung des Prozesses. Daraus resultieren deutlich geringere Schichtdicken von ca. 40 nm.<sup>184,192</sup> Bei kovalenter Anbindung mithilfe eines PEG-Spacers steht das Enzym ca. 150 nm weiter von der Oberfläche ab. Hier würde man eine höhere

resultierende Schichtdicke erwarten. Jedoch werden hier nur einzelne Partikel abgeschieden und eine Filmbildung findet nicht statt, da die für eine Koaleszenz nötige Anzahl an Caseinpartikeln nicht erreicht wird.<sup>192</sup> Begründet werden kann die deutlich geringere Effektivität möglicherweise mit partikel- bzw. proteinabweisende Eigenschaften von PEG.<sup>192,193</sup>

Die Möglichkeit der Nanostrukturierung der Caseinpartikel mithilfe des EMA-Prozesses konnte erfolgreich von Ruediger et al. aufgezeigt werden, da die Partikel ortsspezifisch nur an den Stellen auf dem Substrat abgeschieden werden, an denen zuvor Chymosin kovalent mittels Glycidoxypolytrimethoxysilan immobilisiert wurde. Zur Vorstrukturierung des SiO<sub>2</sub>-Substrats wurde ein lithographisches Verfahren mittels Plasmabehandlung und dem Aufbringen und anschließenden Ausätzen von Polystyrolpartikeln genutzt<sup>194</sup>, um nur bestimmte Zonen für die Enzymimmobilisierung zugänglich zu halten. Das nicht zugängliche Raster besteht dabei aus Platin. Die anschließende Caseinabscheidung erfolgte fast ausschließlich in den vorgegebenen Zonen, bevor die Reaktion sich selbst terminiert. **Abbildung 23** zeigt den Prozessablauf schematisch auf. Diese Vorgehensweise könnte z. B. in der Biosensortechnologie interessant sein.<sup>195</sup> Dies zeigt die enormen Möglichkeiten des EMA-Prozesses.



**Abbildung 23: Nanostrukturierung von Caseinpartikeln mittels EMA-Prozess nach lithographischer Vorstrukturierung. Nach Ruediger, Brassat et al.<sup>195</sup>**

Darüber hinaus wurde der Mechanismus als neuartige Klebetechnik getestet. Hierzu wurde auf zwei gegenüberliegenden Substraten Chymosin per Adsorption immobilisiert und diese in geringem Abstand voneinander in die Caseinlösung geführt. Auf beiden Substraten wächst die Caseinbeschichtung infolge der EMA

nach und nach an, bevor sie sich an der Grenzfläche trifft und koalesziert. Der maximale Abstand bei diesem Verfahren beträgt ca. einen Mikrometer.<sup>191</sup>

Im Anschluss wurde der Prozess der EMA mit Casein auf mehreren verschiedenen Substraten getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich prinzipiell sowohl Metalle, Holz als auch verschiedene Polymere mittels EMA nach Adsorption von Chymosin beschichten lassen. Dabei zeigen PDMS, galvanisierter Stahl und PE die schwächste Benetzbarkeit, gerade auf PDMS und galvanisierter Stahl kam es zu keiner Abscheidung, während diese auf PE vergleichsweise sehr gering ausfiel. Auf Siliziumdioxid, Glas oder Aluminium funktionierte der EMA-Prozess am besten. Da sogar auf hydrophoben Oberflächen, wie PP oder porösen Oberflächen wie Holz, die generell als schwerer zu beschichten gelten, eine Abscheidung stattfand, wurde abermals die Vielseitigkeit des Prozesses aufgezeigt. Weiteres hierzu ist in der ausführlichen Literatur von Büngeler, Hense und Strube nachzulesen.<sup>196</sup>

## 2.5 EMA als Aufbauvariante zur Abscheidung von Eumelanin

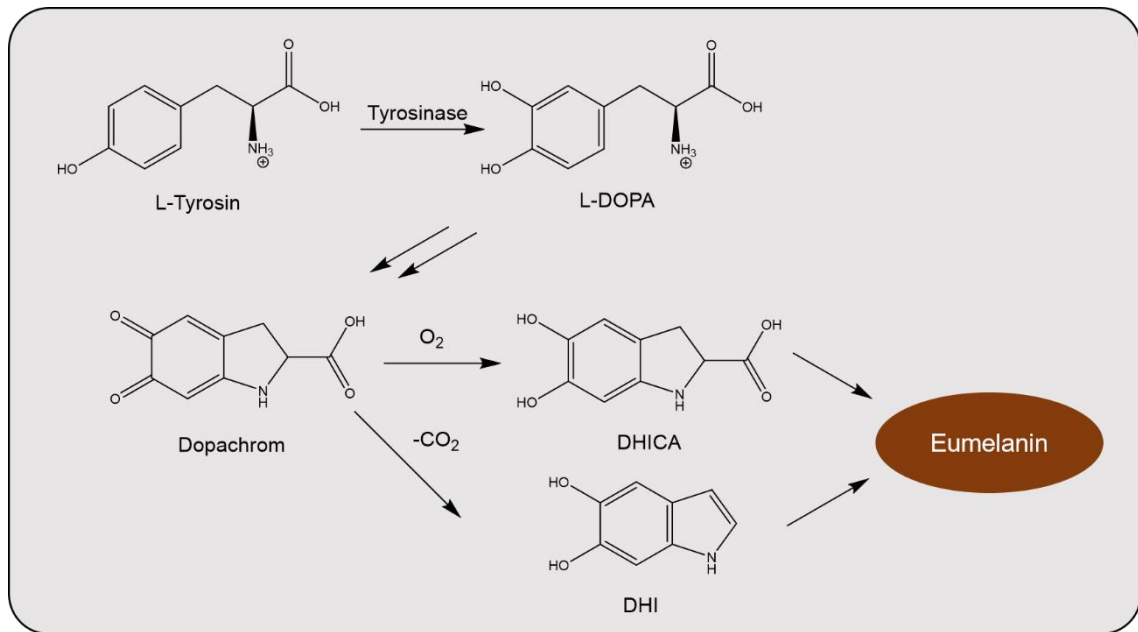
Strube und Büngeler haben 2015 erstmals einen EMA-Prozess als Aufbauvariante vorgestellt.<sup>197</sup> Also eine Variante bei der sich getriggert von auf dem Substrat immobilisierten Enzymen biologische Partikel in situ von unten nach oben am Substrat bilden. In dem Prozess geht es um die enzymmoderierte Autodeposition von Eumelanin.

Melanine sind Biomakromoleküle und zählen zu den natürlich vorkommenden Pigmenten. Sie werden mithilfe des Enzyms Tyrosinase (EC 1.14.181.1-Oxidoreductase)<sup>198,199</sup> von einer weiten Bandbreite an verschiedenen biologischen Lebewesen, vor allem auch Bakterien und Pilzen produziert.<sup>200</sup> Beim Menschen kommt es in zwei Varianten vor, das braun-schwärzliche Eumelanin und das gelblich-rötliche Phäomelanin. Sie bewirken u. a. die Färbung der Haut, Haare und Augen.<sup>201–203</sup>

Melanine verfügen über ein äußerst interessantes Eigenschaftspotential. Neben möglichen medizinischen<sup>204–206</sup> und biotechnologischen Anwendungen<sup>207,208</sup> sind auch Einsätze in technischen Einsatzfeldern wie Batterien als Radikalfänger möglich.<sup>209–211</sup> Darüber hinaus verfügt gerade Eumelanin aufgrund der schwarzbraunen Färbung über äußerst eine niedrige Fluoreszenz und ein breites Absorptionsspektrum.<sup>212–214</sup>

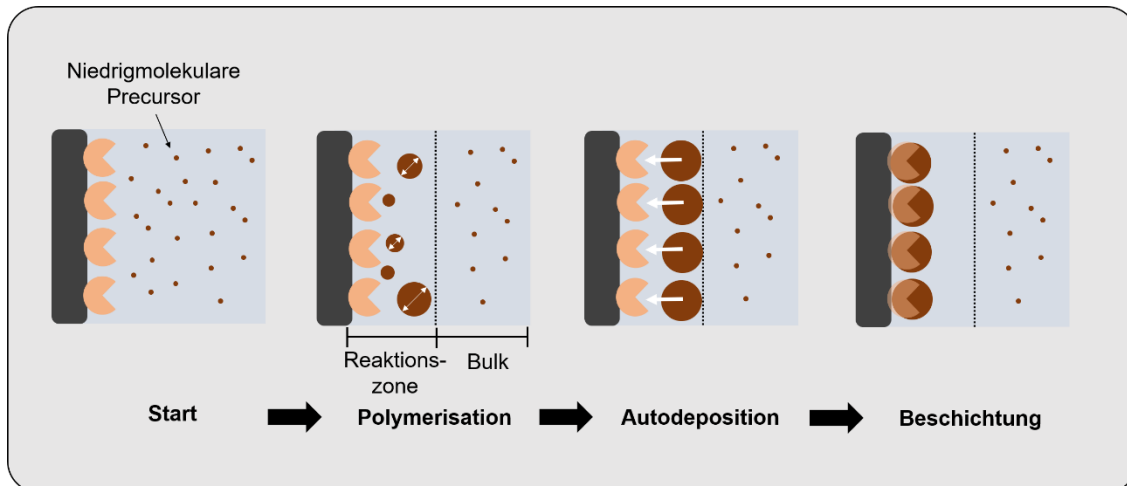
Die genaue Struktur der Melanine konnte bis heute nicht vollständig aufgeklärt werden.<sup>215</sup> Bereits seit den späten 50er Jahren ist es bekannt, dass es sich ein Copolymer hoher Molmassen mit vielen verschiedenen Untereinheiten handelt. Diese sind phenolischer und indolischer Natur und häufig negativ geladen.<sup>216</sup>

Die am besten erforschte Melaninform ist Eumelanin. Der Herstellungsprozess des Polymers verläuft über einen enzymatischen Prozess über Tyrosinase mit den Ausgangsstoffen L-Tyrosin oder L-DOPA(3,4-Dihydroxy-Phenylalanin) mit mehreren möglichen Zwischenschritten über eine der beiden Stufen DHICA (5,6-Dihydroxyindol-2-Carboxylsäure) oder DHI (5,6-Dihydroxyindol). Ein vereinfachter schematischer Mechanismus ist in **Abbildung 24** dargestellt. Ein ausführlicherer Mechanismus ist in der Literatur von Shosuke Ito nachzulesen.<sup>217</sup>



**Abbildung 24: Vereinfachter und verkürzter Mechanismus der in vivo Polymerisation von L-Tyrosin mittels Tyrosinase zu Eumelanin. Nach Strube et al.<sup>218</sup>**

Diesen Prozess über die enzymatische Polymerisation mittels Tyrosinase machen sich Strube und Büngeler zu nutze.<sup>197,218</sup> Im beschriebenen EMA-Prozess wird direkt mit L-DOPA gestartet, da dies eine deutlich bessere Wasserlöslichkeit besitzt als L-Tyrosin.<sup>219,220</sup> Die niedermolekularen L-DOPA Präkursor werden in Wasser gelöst und ein Substrat (i. d. R. Glas) mit immobilisierter Tyrosinase wird eingetaucht. Innerhalb der Reaktionszone, in der das immobilisierte Enzym aktiv ist, setzt die Polymerisation ein. Da bei steigender Partikelgröße und fortschreitender Polymerisation die Hydrophobie des sich bildenden Eumelanins nach und nach steigt, setzen sich die entstandenen Eumelaninpartikel aufgrund ihrer Unlöslichkeit ortsspezifisch auf dem Substrat ab und bedecken das Enzym, wodurch die Abscheidung sich selbst terminiert. Der Prozess läuft demnach analog zur EMA mit Casein mit dem Unterschied, dass sich die Partikel erst in situ nah der Oberfläche bilden. Daher ist dies „Aufbauverfahren“. Der Prozess ist anschaulich in **Abbildung 25** dargestellt.



**Abbildung 25: EMA-Prozess mit immobilisierter Tyrosinase und in Wasser gelöstem L-DOPA als Präkursor. Eumelaninabscheidung. Frei nach Strube**

Die Enzymimmobilisierung wurde in diesem Prozess ebenfalls sowohl via Adsorption<sup>197</sup> als auch kovalent<sup>213</sup> durchgeführt. Mit der Adsorption werden auch Multilayer an Partikeln abgeschieden, was durch die höhere Enzymmobilität begründet werden kann. Bei der kovalenten Immobilisierung ist die Reaktionszone kleine, was auch zu einer geringeren Abscheidung führt. Die Größe der sich bildenden Partikel steigt ebenfalls mit der Reaktionszone an. Bei der kovalenten Immobilisierung bilden sich Protopartikel von ca. 6 bis 10 nm, während die maximale Partikelgröße bei der Adsorption u. a. durch Agglomerationsprozesse Partikel von über 100 nm bilden. Es ergibt sich durch die verschiedenen Immobilisierungstechniken die Möglichkeit der Steuerung sowohl in Bezug auf die Schichtdicke als auch auf die Größe und Morphologie der abzuscheidenden Eumelaninpartikel. Dieser Zusammenhang ist in den Veröffentlichungen von Strube et al. ausführlich ausgearbeitet.<sup>197,213,218</sup>

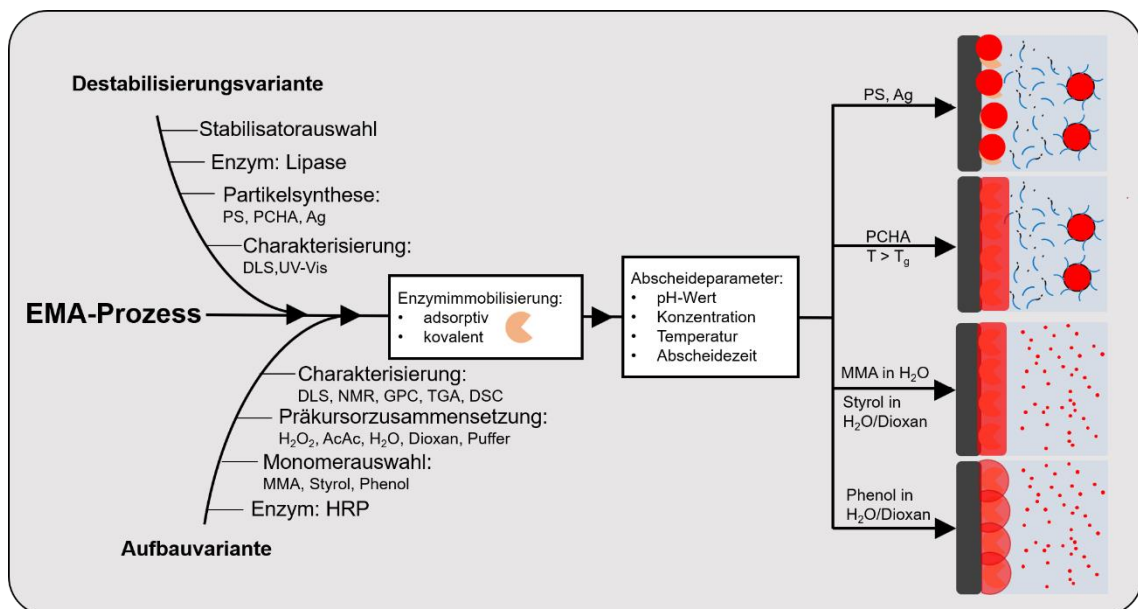
Die Aufbauvariante der EMA ist bisher auf die typische in der Natur vorkommende Reaktion von Tyrosinase und L-DOPA und somit auf das entstehende Biopolymer Melanin begrenzt. Mögliche Anwendungen werden aufgrund der Kontrollierbarkeit der Abscheidung und der hohen Biokompatibilität von Eumelanin vor allem im Bereich der Drug Delivery oder als neuartiges Material für Implantatbeschichtungen postuliert. Dies bedarf jedoch weiterer Forschung. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollen Möglichkeiten ermittelt werden, den EMA-Prozess auch auf synthetische Polymere, die üblicherweise in klassischen Beschichtungen eingesetzt werden, zu adaptieren.



### 3 Auswertung

#### 3.1 Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist der Transfer der EMA hin zur Abscheidung synthetischer Polymere. In **Abbildung 26** ist die Methodik und die experimentelle Vorgehensweise mit den wichtigsten Parametern, die im Prozess eine Rolle spielen, dargestellt. Bei Einhaltung der ermittelten Parameter können sowohl einzelne Partikel als auch Polymerfilme mit verschiedenen Mechanismen enzymatisch adressiert werden.



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Methodik der enzymmoderierten Adressierung mittels Destabilisierungs- und Aufbauvariante inklusive der Schlüsselparameter.**

Für die Destabilisierungsvariante werden zunächst zwei Ansätze verfolgt, von denen einer zielführend ist. Zunächst wird in Kapitel 3.2 versucht direkt auf den bekannten Caseinprozess aufzubauen und auf synthetische Polymere zu adaptieren. In dem Kapitel 3.3 wird der Prozess hingegen grundlegend verändert und generell enzymatisch spaltbare Stabilisatoren genutzt, was den Prozess deutlich flexibler gestaltet. Hier wird Lipase als Enzym eingesetzt. Dabei werden sowohl verschiedene organische Polymere als auch Silberpartikel als abzuscheidende Komponenten verwendet und die entsprechenden

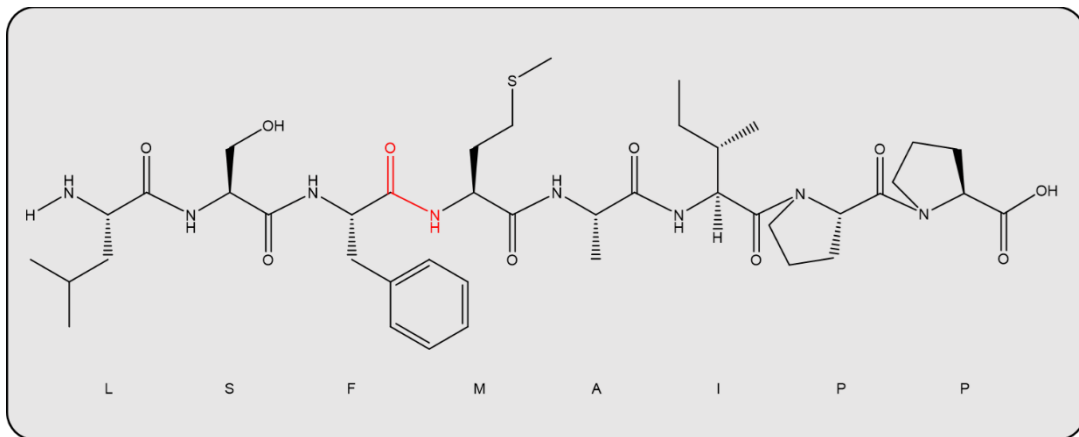
Abscheidemechanismen untersucht und durch externe Parameter direkt gesteuert.

Für die Aufbauvariante (Kapitel 3.4) werden mithilfe der HRP verschiedene funktionelle Monomere mit acryl- oder Vinylgruppen radikalisch polymerisiert und direkt abgeschieden. Im zweiten Teilkapitel wird Phenol über das gleiche Enzym durch oxidative Kupplungspolymerisation polymerisiert und ebenfalls abgeschieden. Die jeweiligen unterschiedlichen zugrundeliegenden Mechanismen werden ebenfalls untersucht.

In beiden Varianten wird das jeweilige Enzym mit den jeweils gleichen verschiedenen Verfahren auf der Oberfläche immobilisiert.

### 3.2 EMA-Ansatz über chymosinspaltbaren Peptid-Linker

Die in diesem Kapitel beschriebene Methode verfolgt für den Destabilisierungsansatz die direkte Adaption der bekannten Wechselwirkung von Chymosin mit Casein. Polymerpartikel sollen synthetisiert und in einer Mizelle stabilisiert werden, die von Chymosin gespalten werden kann, um anschließend über die EMA abgeschieden zu werden. Die Stabilisation der Mizelle soll somit anders als beim Casein nicht über eine kovalente, sondern lediglich über adsorptive, sterische Stabilisation mithilfe eines amphiphilen Tensids erfolgen. Damit die Spaltung durch Chymosin erfolgen kann, wird ein Peptid-Linker zwischen den hydrophilen und hydrophoben Teil des Tensids eingebaut, der spezifisch vom Chymosin erkannt wird. In der Natur Chymosin spaltet das  $\kappa$ -Casein spezifisch zwischen den Aminosäuren Phenylalanin und Methionin (Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub>) (vgl. Abschnitt 2.2.1) in das hydrophobe para-K-Casein und das hydrophile Caseinmakropeptid. Seit den 70er Jahren ist bekannt, dass die Aminosäuresequenz 102-109 (Lysin bis Prolin; s. **Abbildung 27**) des  $\kappa$ -Caseins ausreicht, um selektiv vom Chymosin als Substrat erkannt zu werden.<sup>221</sup>



**Abbildung 27: Strukturformel des genutzten Octapeptids Lysin, Serin, Phenylalanin, Methionin, Alanin, Isoleucin, Prolin und Prolin. Die spezifische Spaltung durch Chymosin erfolgt an der Peptidbindung zwischen Phenylalanin und Methionin (rot markiert).**

Vor diesem Hintergrund wurde der Ansatz verfolgt, dieses Octapeptid als Peptid-Linker so zu modifizieren, dass auf der C-terminalen Seite eine hydrophobe- und an der N-terminalen Seite eine hydrophobe Polymerkette angebracht wird, um ein enzymatisch spaltbares Tensid zu erzeugen.

Dieses würde im weiteren Verlauf synthetische Polymerpartikel stabilisieren, die mithilfe des EMA-Verfahrens abgeschieden werden sollen. Mit der Nutzung dieser Methode könnte auf das von Rüdiger et al. entwickelte Knowhow bzgl. der Chymosinimmobilisierung zurückgegriffen werden.

Die Spaltung des reinen Octapeptids durch Chymosin wurde experimentell durchgeführt und mittels Massenspektrometrie (ESI) nachgewiesen (**s. Abbildung 28**). ESI wurde verwendet, um eine ungewollte Fragmentierung des Produktes möglichst zu verhindern.

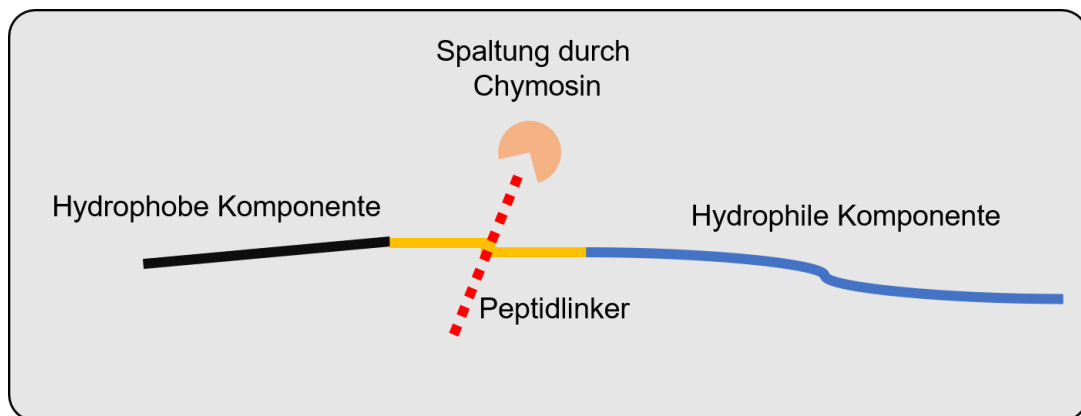


**Abbildung 28: MS-Spektrum des gespaltenen Octapeptids mit der Zuordnung der Massen-Ladungsverhältnisse 366 und 528.**

Das gesamte Octapeptid besitzt eine Masse von 875 g/mol. Nach der hydrolytischen Spaltung durch Chymosin konnte das Edukt im MS-Spektrum nicht in signifikanter Menge nachgewiesen werden. Die primären Spaltungsprodukte, die Aminosäuresequenzen LSF (365 g/mol) und MAIPP (527 g/mol) sind in den Signalen 366 und 528 jeweils in der einfach protonierten Form im Spektrum ausgewiesen. Auch ihre mit Natriumionen versetzten Formen sind in den Peaks 388 bzw. 550 aufgeführt. Dies weist die spezifische Spaltungsreaktion durch Chymosin eindeutig nach.

Mit dem Ziel der Herstellung eines enzymatisch spaltbaren Tensids auf Basis des Octapeptids, wurden einige Modifikationsschritte durchgeführt. Die hydrophilen

und hydrophoben Komponenten sollen über das spaltbare Octapeptid als Peptid-Linker verbunden sein (s. **Abbildung 29**), um im Anschluss durch Chymosin gespalten werden zu können. Als hydrophile Komponente eignet sich z. B. Polyethylenglykol (PEG), für die hydrophobe Komponente kommen langkettige Alkylverbindungen in Betracht.

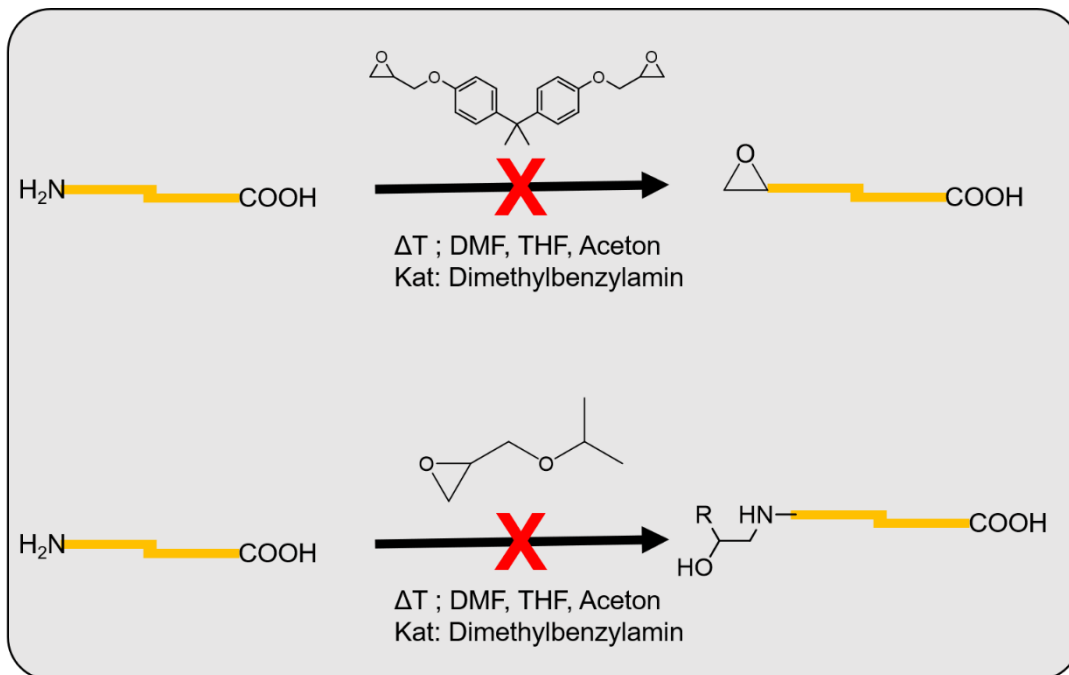


**Abbildung 29: Möglicher Aufbau des enzymatisch spaltbaren Tensids mit dem Peptidlinker (gelb markiert) im Zentrum, inkl. dessen schematischer Spaltung durch Chymosin.**

Für die Funktionalisierung steht vornehmlich die Aminofunktion des Lysins am N-Terminus sowie die Carbonsäuregruppe am C-Terminus zur Verfügung. Für die Aminogruppe des N-Terminus bieten sich z. B. Epoxid- oder Isocyanatverbindungen als potentielle Reaktionspartner an. Auf Umsetzungen der Aminofunktion mit anderen Carbonsäuren wird verzichtet, um eine ungewollte Reaktion mit dem eigenen C-Terminus zu verhindern.

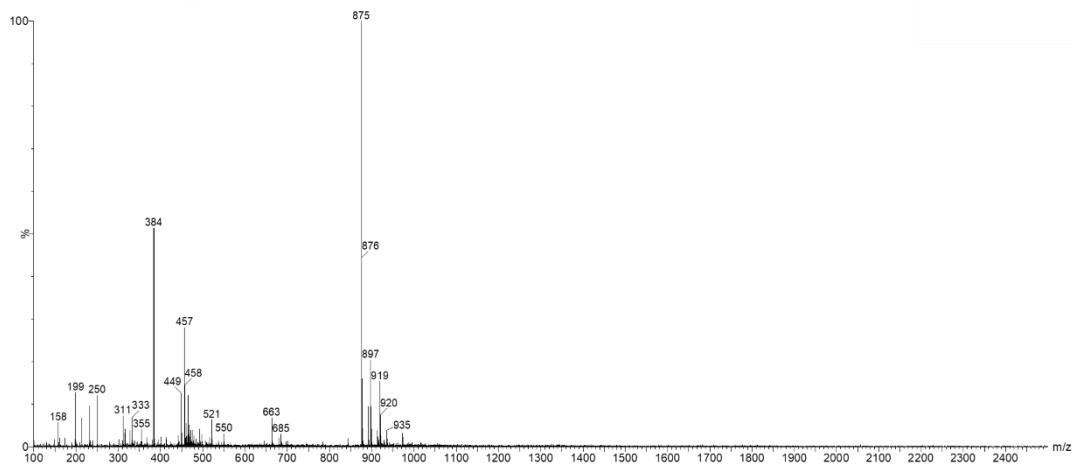
### **Aufbau des enzymatisch spaltbaren Stabilisatorss mithilfe von Epoxiden**

Epoxid-Amin-Reaktionen sind hinlänglich bekannt und zeichnen sich generell durch hohe Umsätze bereits bei milden Bedingungen aus.<sup>222</sup> Denkbar ist daher die Reaktion eines epoxidfunktionellen PEGs mit dem N-Terminus, um eine hydrophile Komponente an den Linker zu binden. Zunächst wurden daher Vorversuche mit weniger sterisch gehinderten, niedermolekularen epoxidfunktionellen Verbindungen wie BADGE oder Glycidylisopropylether in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt (s. **Abbildung 30**).



**Abbildung 30: Screeningphase zur Modifizierung des Peptid-Linkers mit den niedermolekularen Epoxiden BADGE und Glycidylisopropylether in verschiedenen Lösungsmitteln bei wechselnden Reaktionsbedingungen.**

Trotz einer Screeningphase mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (DMF) und Aceton oder dem etwas unpolaren THF oder auch in Substanz konnten das gewünschte Produkt nicht in substantiellen Mengen hergestellt werden. Eine Steigerung der Temperatur (bis zu 70 °C) und der Einsatz von typischen Katalysatoren wie DABCO oder Dimethylbenzylamin führten ebenfalls zu keinem Erfolg. Beispielhaft ist hierzu ein ESI-Massenspektrum der Reaktion des Octapeptids mit Glycidylisopropylether in **Abbildung 31** aufgeführt.



**Abbildung 31: MS-Spektrum der Umsetzung des Octapeptids mit Glycidylisopropylether**

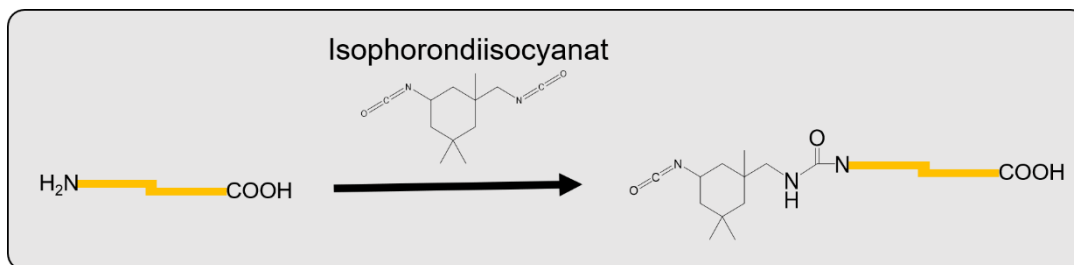
Das theoretische Produkt dieser Reaktion von Glycidylisopropylether mit dem N-Terminus des Octapeptids weist eine Masse von 991 g/mol auf. Das Spektrum zeigt jedoch nur die typischen Massepeaks des Octapeptids von 875 u, sowie kleinere Fragmente. Ein Produktpeak ist nicht zu erkennen. Die kleinen Signale bei höheren Massen als 875 u sind hauptsächlich auf Ionisierungen des Edukts zurückzuführen.

Die Vorversuche mit niedermolekularen Epoxiden führen nach analytischer Untersuchung zu keinem Umsatz. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass obwohl die Reaktion von Epoxiden mit ungehinderten primären Aminen sehr schnell ablaufen, die sterische Hinderung der Aminogruppe des Octapeptids in diesem Fall die Reaktion verhindert. Dass sterische Hinderung bei Proteinlinkern zu Problemen führen kann, ist bereits in der Literatur bekannt.<sup>223</sup> Da die Funktionalisierung selbst mit niedermolekularen Epoxiden nicht zum Erfolg führte, wurde auf die Funktionalisierung mit einem langkettigen epoxidfunktionellen PEG zur Einführung einer hydrophilen Gruppe nicht durchgeführt.

### Aufbau des enzymatisch spaltbaren Stabilisators mithilfe von Isocyanaten

Als Alternative wurde eine reaktivere Komponente zur Funktionalisierung des N-Terminus eingesetzt. Die Wahl fiel aufgrund der höheren Reaktivität mit Aminen auf Isocyanate.

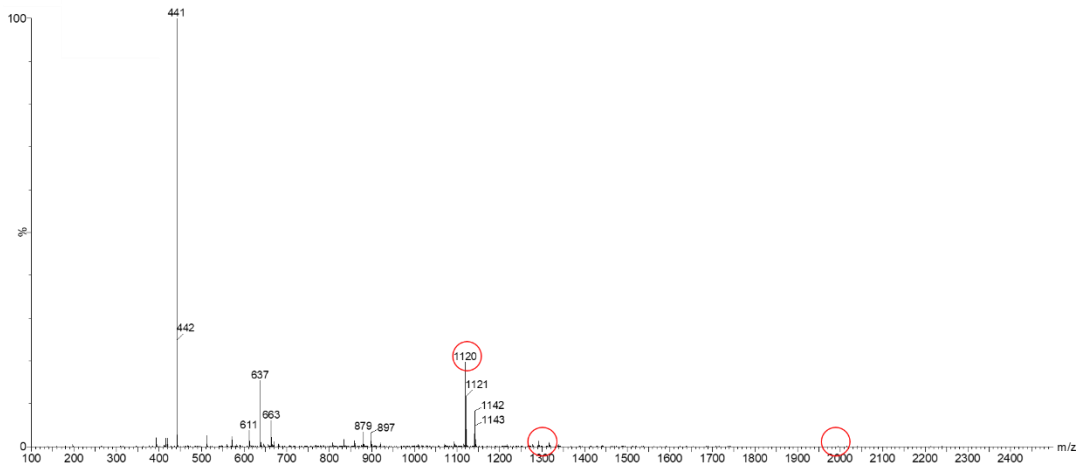
Das bifunktionelle Isophorondiisocyanat mit zwei unterschiedlich reaktiven Gruppen wurde eingesetzt, um eine doppelte Anbindung der Peptidsequenz bei abgestimmter molarer Zusammensetzung zu verhindern. Dafür stünde die freibleibende Isocyanatfunktion zur einfacheren Einführung einer hydrophilen oder hydrophoben Polymerkette zur Verfügung (s. **Abbildung 32**).



**Abbildung 32: Umsetzung des Octapeptids mit Isophorondiisocyanat**

Isocyanate reagieren neben Aminen auch sehr stark mit Hydroxy- und Carbonsäuregruppen. Somit wäre auch eine Anbindung des Isocyanats an die OH-Gruppe des Serins oder den C-Terminus am Octapeptid möglich. Jedoch findet die Reaktion von Isocyanaten bevorzugt mit Aminen statt<sup>224</sup>, weshalb auf die Einführung einer jeweiligen Schutzgruppe verzichtet wurde. Beim Isophorondiisocyanat besitzt die primäre Isocyanatfunktion die deutlich größere Reaktivität als die Sekundäre. Die Anbindung erfolgt daher bevorzugt über diese Funktion. Um den Anteil der Nebenprodukte, also der Anbindung an der zusätzlichen Isocyanatfunktion, möglichst gering zu halten, wurde ohne den Einsatz eines Katalysators gearbeitet. Der Einsatz eines Katalysators könnte die Reaktionsrate an der sekundären Isocyanatgruppe steigern.





**Abbildung 33: MS-Spektrum der Umsetzung von Isophorondiisocyanat und dem Octapeptid. Die Produktpeaks sind rot markiert.**

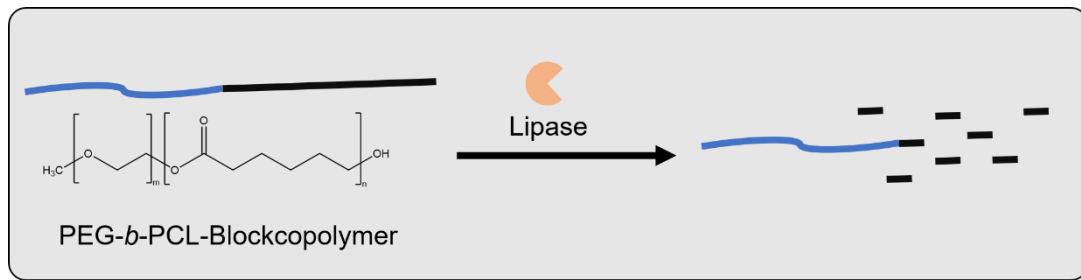
Das Produkt der Anbindung am N-Terminus ist bei  $m/z$  1120 klar zu erkennen (s. **Abbildung 33**). Die beiden Peaks um 1300  $m/z$  sind den Nebenprodukten zuzuordnen. Zusätzlich zur N-terminalen Kupplung sind hier jeweils eine Anbindung an die Hydroxylgruppe vom Serin bzw. am C-Terminus zu erkennen. Bei der Reaktion mit der Carboxylgruppe am C-Terminus wird zusätzlich  $\text{CO}_2$  frei, weshalb der Peak um einen Massenverhältnis 44 verschoben ist. Das schwache Signal bei 2000  $m/z$  ist der zusätzlichen Anbindung des Octapeptids an die unreaktivere Isocyanatgruppe des Isophorondiisocyanat zuzuordnen. Ein Eduktpeak bei 875  $m/z$  ist nicht mehr zu erkennen. Daher ist von einem vollständigen Umsatz auszugehen. Die gewählte Reaktionsführung ohne den Einsatz eines Katalysators führte überwiegend zum gewünschten Produkt. Trotzdem treten weiterhin Nebenprodukte auf, die eine theoretisch nachfolgende Anbindung eines hydrophilen Homopolymers erschweren. Aus diesem Grund und der aufwendigen Reaktionsführung wurde die Idee des direkten Aufbaus eines durch Chymosin spaltbaren Stabilisators, in dessen Kern Polymerpartikel synthetisch eingebracht werden, nicht weiterverfolgt. Stattdessen wird ein neuer Ansatz gewählt.

### 3.3 EMA in der Destabilisierungsvariante über enzymatisch abbaubare Mizellen

Für eine universelle, simple Methode zur enzymmoderierten Abscheidung von synthetischen Polymerpartikeln müssen andere Wege als der künstliche Nachbau des Caseinsystems evaluiert werden. Der Ansatz des vorherigen Kapitels scheitert am Aufbau des Stabilisators auf Basis der durch Chymosin spaltbaren Peptidsequenz. In diesem Kapitel wird daher ein Stabilisator ausgewählt, der in wässrigem Milieu und bei Raumtemperatur von einem Enzym gespalten werden kann. Als Enzym wurde eine Lipase der *Pseudomonas Cepacia* (andere Lipasen sollten analog dazu funktionieren vgl. 2.2.2) und als zu spaltenden Stabilisator ein PCL-b-PEG-Blockcopolymer gewählt.

Poly- $\epsilon$ -Caprolacton (PCL) ist ein biologisch abbaubarer Polyester und nur in geringem Maße wasserlöslich.<sup>225</sup> Der biologische Abbau von Copolymeren, die PCL enthalten, ist durch Lipasen bereits in der Literatur bekannt.<sup>75,76</sup> Polyethylenglykol (PEG) ist ein hydrophiles Polymer mit vielseitigem Anwendungsmöglichkeiten.<sup>226</sup> PEG wird u. a. in Tensiden eingesetzt, um für die nötige Hydrophilie zu sorgen.<sup>227</sup> PEG verweilt derweil inert gegenüber dem enzymatischen Abbau. Mit PCL als hydrophober und PEG als hydrophiler Komponente des Stabilisators wird der enzymatische Abbau durch die Lipase an der hydrophoben Komponente ermöglicht, wodurch die gestellten Anforderungen erfüllt werden.

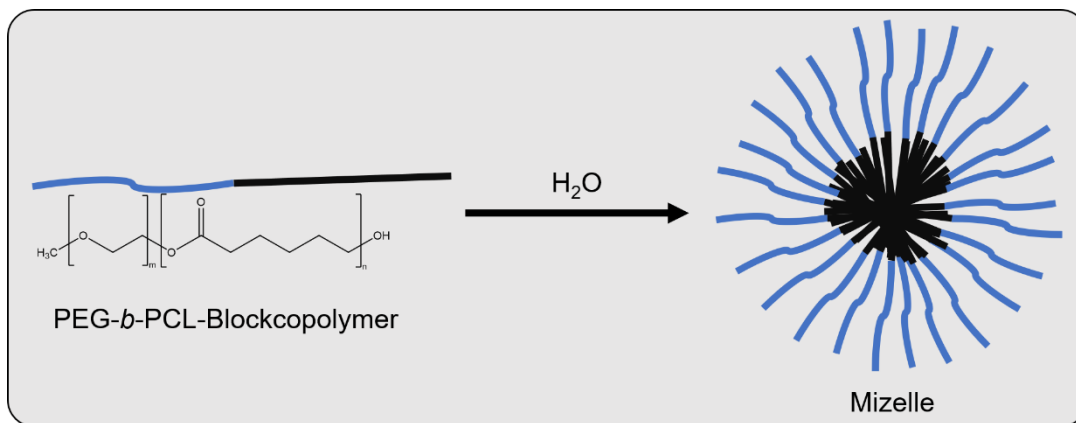
Hauptunterschied zum System mit dem caseinspezifischen Peptidlinker ist somit, dass die enzymatische Spaltung nicht an einer einzigen Stelle stattfindet (s. Abbildung 29), sondern der gesamte hydrophoben Teil des Blockcopolymers nach und nach abgebaut wird (s. **Abbildung 34**). Chemisch verläuft die Spaltung analog zu der im Kapitel 2.2.2 aufgezeigten hydrolytischen Spaltung von Polyestern durch Lipasen.



**Abbildung 34: Schematischer Ablauf der hydrolytischen Spaltung des PEG-*b*-PCL-Blockcopolymers. Die Spaltung erfolgt in Form eines kontinuierlichen Abbaus des hydrophoben Polyesters.**

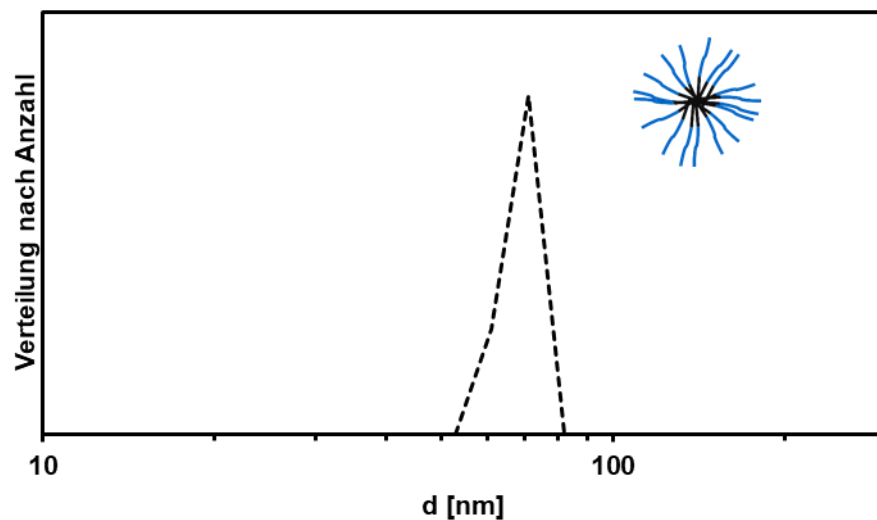
### 3.3.1 Aufbau der enzymatisch abbaubaren Mizellen

Zunächst wurden die PCL-*b*-PEG-Blockcopolymere analysiert. Eingesetzt wurde ein Blockcopolymer mit einer molaren Masse von 10.000 g/mol. Auf den PCL-Block entfallen ebenso wie auf den PEG-Block jeweils 5.000 g/mol. Die amphiphile Struktur führt nach Zugabe von Wasser zur Ausbildung von Mizellen (s. **Abbildung 35**). Der PCL-Block befindet sich im Inneren und der PEG-Block auf der Außenseite der Mizelle.



**Abbildung 35:** Ausbildung einer mizellaren Struktur des PCL-*b*-PEG-Blockcopolymer mit der hydrophoben Phase im Zentrum der Mizelle.

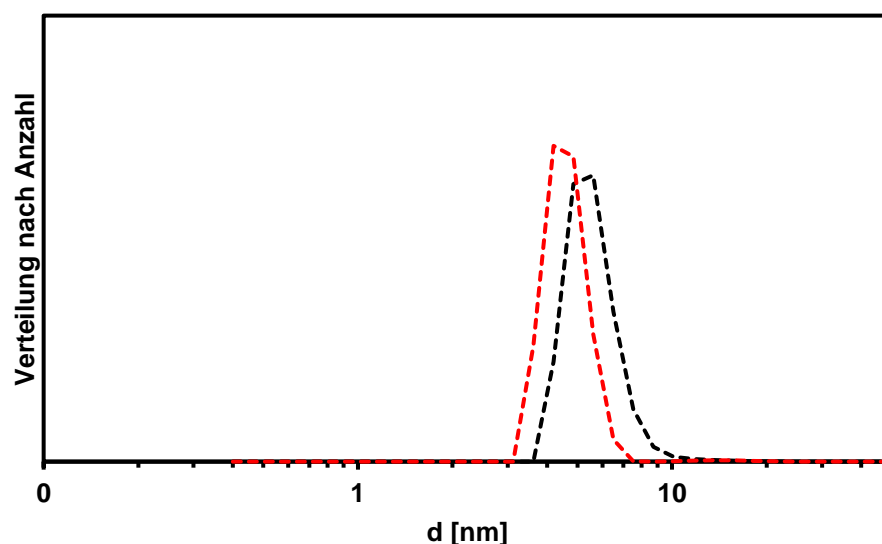
Die Mizellen wurden mit Dynamischer Lichtstreuung (DLS) auf ihre Größe untersucht. Wie üblich bei Mizellen dieser Größenordnung kommt es zu einer weißlichen Trübung in Wasser.<sup>228</sup>



**Abbildung 36:** Größenverteilung des 5000-5000 PCL-b-PEG-Blockcopolymers gewichtet nach der Anzahl

**Abbildung 36** zeigt die Größenverteilung der eingesetzten Mizellen. Die Größenverteilung der Mizellen ist sehr homogen mit einem Peak bei ca. 70 nm.

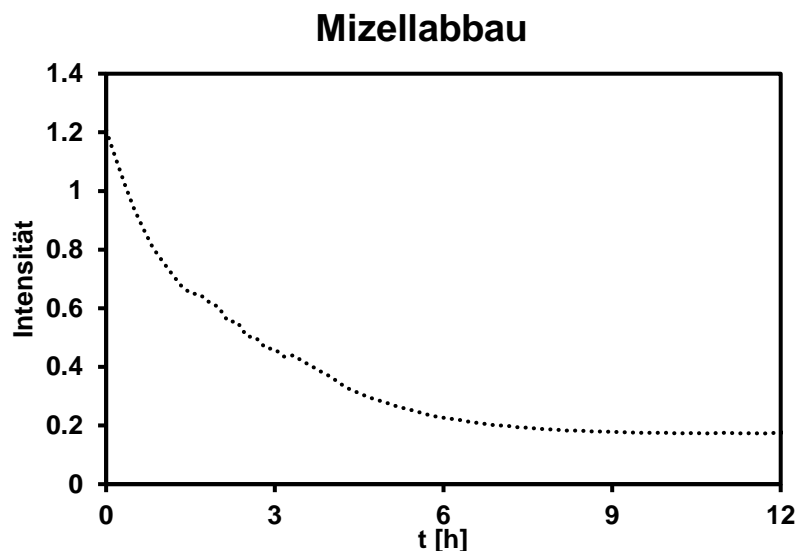
Darauffolgend wurde die eingesetzte *Pseudomonas Cepacia* Lipase in Wasser und in einem Natriumphosphatpuffer (pH 7) gelöst und ebenfalls per DLS analysiert (s. **Abbildung 37**).



**Abbildung 37:** DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Anzahl) der *Pseudomonas Cepacia* Lipase (1 mg/ml) in Pufferlösung (rot) und destilliertem Wasser (schwarz)

Die Lipase weist eine Größenordnung zwischen 5 und 6 nm in destilliertem Wasser bzw. 4 und 5 nm in Pufferlösung auf. Dies entspricht den Literaturwerten von 4 bis 5 nm<sup>72,229</sup> und zeigt, dass das Enzym bei den eingesetzten Konzentrationen als einzelnes Molekül vorliegt und keine Agglomerate bildet.

In einem ersten Test wurde überprüft, ob die in Abbildung 34 postulierte Spaltung durch Lipase am PCL-Block trotz der Mizellbildung stattfinden kann. Hierzu wurden einer 1 mg/ml Lösung des 5000-5000 PCL-b-PEG-Blockcopolymer bei pH 7 (Einstellung über einen Natriumphosphatpuffer) 0,1 mg/ml der Lipase hinzugegeben. Der neutrale pH-Wert wurde eingehalten, da Polyester wie PCL sowohl unter basischer als saurer Katalyse hydrolytisch gespalten werden können.<sup>230</sup> Durch Zugabe des Puffers wird sichergestellt, dass das Enzym für die Spaltung verantwortlich ist. Die hydrolytische Spaltung wurde per UV-VIS-Spektroskopie analysiert. Hierbei wird die Absorption bei einer mittleren Wellenlänge von 550 nm über einen Zeitraum von 12 Stunden unmittelbar nach Enzymzugabe verfolgt (s. **Abbildung 38**). Mit der Wellenlänge von 550 nm wurde eine Bande von Polycaprolacton gewählt.<sup>231</sup> Alle 10 Minuten erfolgt eine Messung. Eine reine Pufferlösung wurde als Basislinie verwendet.



**Abbildung 38:** UV-Vis-Spektrum des zeitlichen Verlaufs des enzymatischen Abbaus der Dispersion der PCL(5000)-b-PEG(5000)-Blockcopolymermizellen (1 mg/mL) bei pH 7,0 nach Zugabe von 0,1 mg/mL Lipase.

Das Spektrum weist den Lipaseinduzierten Abbau der Mizellen nach. Der Verlauf entspricht dem eines typischen exponentiellen Zerfalls. Die enzymatische

Spaltung setzt unmittelbar ein und ist nach ca. sechs Stunden nahezu vollständig abgelaufen. Ein möglicher Erklärungsansatz für das abschließende Plateau ist, dass nicht alle Polycaprolactoneinheiten am PEG-Polymer vollständig abgebaut werden und daher weiter im UV/Vis detektiert werden. Der nahezu komplette Abbau der reinen Mizellen innerhalb der ersten sechs Stunden ist vielversprechend für eine ausreichende Destabilisierung von potentiellen in den Mizellen synthetisierten Polymerpartikeln gemäß der geplanten enzymmoderierten Abscheidung.

Durch diese Vorversuche konnte gezeigt werden, dass die PEG-PCL-Blockcopolymere Mizellen bilden, die über die Lipase *Pseudomonas Cepacia* enzymatisch destabilisiert bzw. abgebaut werden können. Im nächsten Kapitel folgt die Synthese von Polymerpartikeln innerhalb dieser Mizellen.

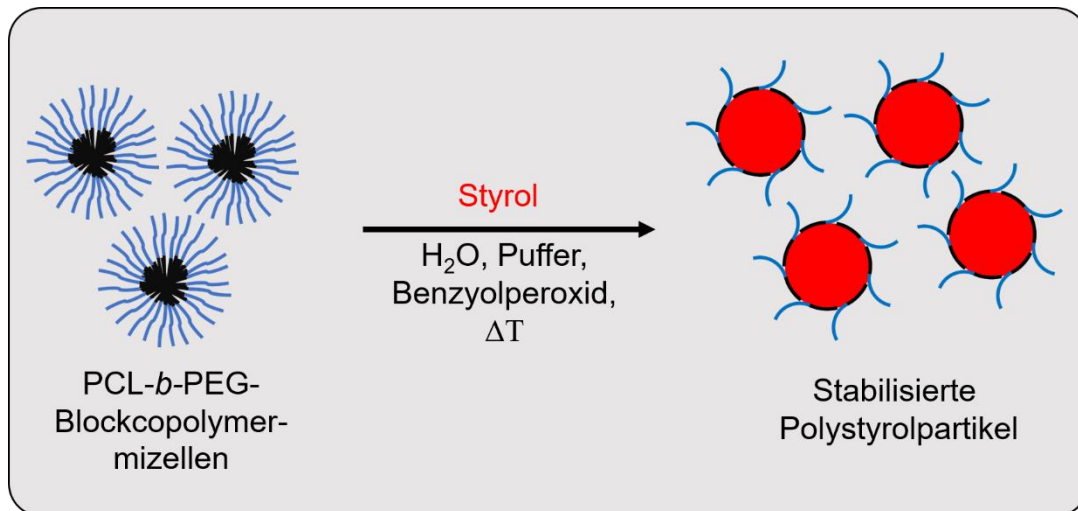
### 3.3.2 Partikelherstellung und Analyse

Dieses Kapitel umfasst die Herstellung und Analyse einer enzymatisch destabilisierbaren Polymerpartikeldispersion. Als Grundlage dienen die im vorherigen Kapitel beschriebenen enzymatisch abbaubaren Mizellen. Ziel ist es, Polymere innerhalb der Mizellen in einem wässrigen Medium bei neutralem pH-Wert aufzubauen. Auf diese Weise müsste für eine nachfolgende enzymmoderierte Abscheidung kein kompletter Austausch des Lösungsmittels stattfinden muss. Da die PCL-*b*-PEG-Blockcopolymere jedoch für diese Forschungsarbeit in hoher Reinheit gefordert wurden, sind diese mit vergleichsweise hohen Kosten verbunden, weshalb die Syntheseansätze aufgrund der begrenzten Menge mit jeweils maximal 40 mg Blockcopolymer gefahren werden konnten.

Um hydrophobe Polymerpartikel in Mizellen aufzubauen, kann auf Grundlagenwissen aus dem Bereich Emulsionspolymerisation zurückgegriffen werden. Üblicherweise werden bei der Emulsionspolymerisation hydrophobe Monomere einem amphiphilen Stabilisator in einem wässrigen System gemeinsam mit einem wasserlöslichen Initiator hinzugegeben. Die Polymerisation verläuft in der Regel radikalisch, weshalb die Monomere entsprechend über vinyliche Gruppen verfügen müssen.<sup>232,233</sup>

Die ersten Synthesen erfolgen nach Vorlage des Natriumphosphatpuffers (pH 7) und des PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymers in Wasser. Als Monomer wurde zunächst Styrol gewählt. Styrol ist nur in geringem Maße wasserlöslich (ca. 0,24 g/L)<sup>234,235</sup> und das resultierende Polymer weist hydrophobe Eigenschaften auf<sup>236</sup>. Die Initiierung läuft unter Temperatureinfluss über AIBN oder Benzoylperoxid, welche jeweils bei ihrer spezifischen Zersetzungstemperatur in zwei Radikale zerfallen und die radikalische Kettenpolymerisation in der wässrigen Phase starten. Die Synthese der Polystyrolpartikel ist schematisch in **Abbildung 39** dargestellt.

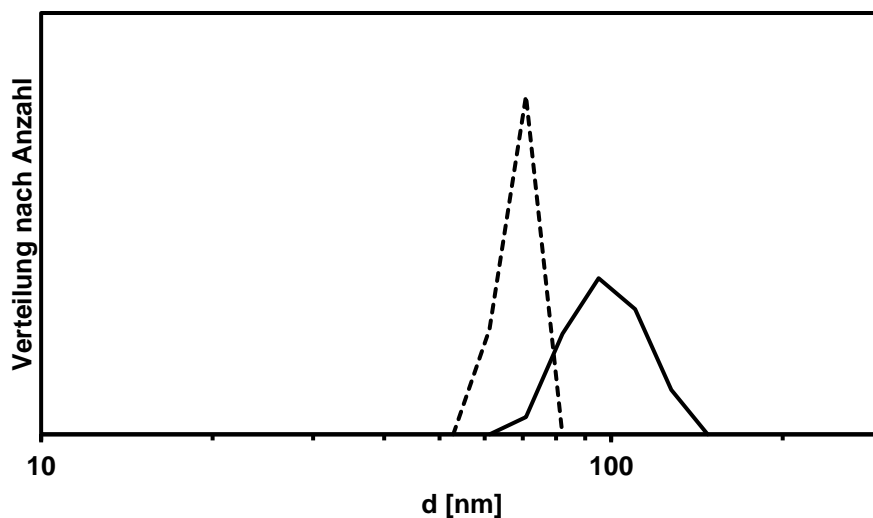




**Abbildung 39: Schematischer Reaktionsverlauf der Herstellung der stabilisierten Polystyrolpartikel über eine Emulsionspolymerisation mit Benzoylperoxid als Initiator und den PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymermizellen als Stabilisator.**

Die Synthesen wurden in einem 100 mL-Rundkolben mit Rückflusskühler im heizbaren Wasserbad durchgeführt. Das kaum mit Wasser mischbare Styrol bildet eine Phase oberhalb der mizellaren Lösung. Unter starkem Rühren wird ab der thermischen Initiierung des Benzoylperoxids bei 73 °C die radikalische Polymerisation gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde für hohe Umsätze bis zu 24 Stunden bei dieser Temperatur weitergerührt. Optisch lässt sich die Reaktion durch eine starke Eintrübung der zuvor nur leicht weißlich trüben Dispersion verfolgen. Der Anteil an Styrol und Stabilisator wurde so gewählt, dass ein möglichst hoher Umsatz an Partikeln erfolgen kann. Eine hohe Konzentration an Polymerpartikeln in der Lösung soll bei späteren Abscheideversuchen die Destabilisation durch eine höhere Interaktionsrate mit dem Enzym verbessern.

Die stabilisierten Polystyrol dispersionen wurden mehrfach mit VE-Wasser gewaschen und hinsichtlich der Größenverteilung ihrer Polymerpartikel mittels DLS-Messungen untersucht und mit denen der reinen Blockcopolymermizellen verglichen (s. **Abbildung 40**). Die Partikeldispersionen wurden im Verhältnis 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und vor den DLS-Messungen mit einem 5 µm Filter filtriert, um Staub und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die untersuchten Größenverteilungen beziehen sich auf die Gewichtung nach der Anzahl der Teilchen.

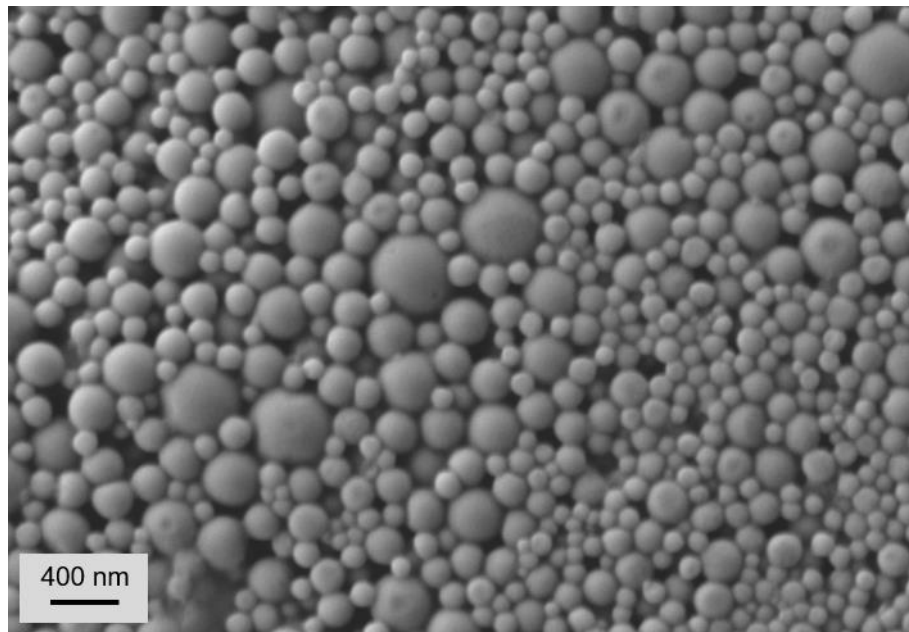


**Abbildung 40:** Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der synthetisierten Polystyrolpartikeldispersion (durchgezogene Linie) im Vergleich zum reinen PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer (gestrichelte Linie).

Wie erwartet wird die erfolgreiche Polymerisation innerhalb der Mizellen auch in der Größenverteilung der Dispersion sichtbar. Während die reinen Blockcopolymermizellen eine durchschnittliche Größe von ca. 70 nm aufweisen, liegen die Mizellen mit den Polystyrolpartikeln im Zentrum bei durchschnittlich ca. 100 nm. Die Größenverteilung der Polystyrolpartikeldispersion ist uneinheitlicher als die der reinen Mizellen. Die Synthesereihen haben ein entsprechend optimales Verhältnis von Mizell- zu Monomerkonzentration ergeben: 40 mg PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer zu 800  $\mu$ L Styrol in 50 mL Wasser und 40 mg Benzoylperoxid. Auch im Produkt gibt es noch Signale bei ca. 70 nm, was darauf hindeutet, dass noch ein kleiner Rest an Mizellen mit keinem oder nur sehr geringem Polystyrolanteil vorliegt. Dies stellt für die nachfolgenden Verfahren jedoch kein Problem dar, da so sichergestellt wird, dass ausreichend Mizellen vorgelegen haben, und alle entstandenen Polymere ausreichend durch das PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer stabilisiert sind. Ein weiterer Hinweis auf eine stabile Dispersion ist das Ausbleiben eines Bodensatzes.

Die Größenverteilung der Polystyrolpartikel wurde ebenfalls per Rasterelektronenmikroskopie analysiert (s. **Abbildung 41**). Dafür wurde die

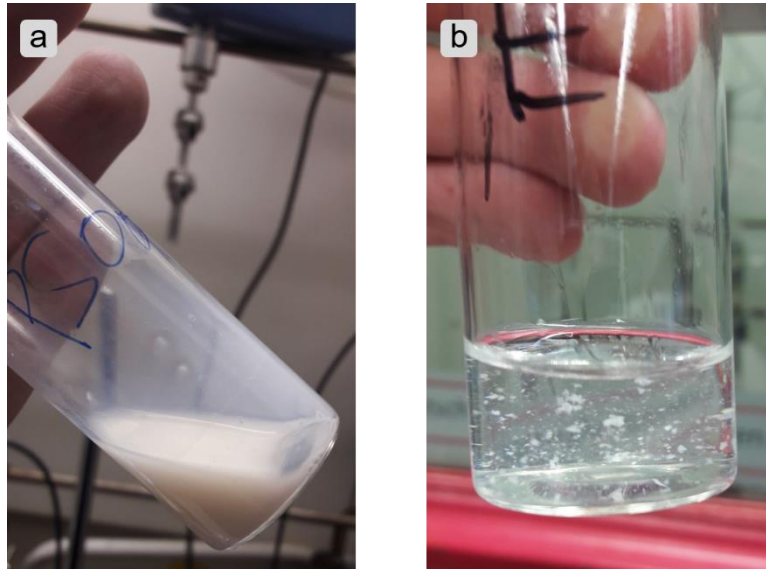
Dispersion verdünnt und auf einem Glassubstrat aufgetropft und anschließend luftgetrocknet.



**Abbildung 41: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der aufgetropften Polystyrolpartikeldispersion.**

Die REM-Aufnahmen bestätigen die mittels dynamischer Lichtstreuung aufgenommene Größenverteilung. Die große Mehrzahl der Nanopartikel liegt im Bereich zwischen 70 und 120 nm, jedoch gibt es einige Ausreißer nach oben. Die größten Partikel können Durchmesser von bis zu 300 nm aufweisen.

Nach der Synthese der Partikel ist die gezielte Destabilisation durch die Lipase entscheidend für den weiteren Einsatz im EMA-Verfahren. Die stabile Polystyrolpartikeldispersion wurde hierzu stark verdünnt und mit 0,1 mg/ml Lipase versetzt. Der enzymatische Abbau der PCL-Komponente führt zum Verlust der sterischen Stabilisation der Polystyrolpartikel. Durch die fehlende Stabilisation kommt es zur Agglomeration und somit zur Fällung des Polystyrols. Dieser Vorgang lässt sich visuell verfolgen. **Abbildung 42** zeigt Fotoaufnahmen vor und nach dem enzymatischen Abbau.



**Abbildung 42: Fotoaufnahmen der stabilisierten Polystyrolpartikeldispersion im Rollrandglas (a) und der durch die Lipase destabilisierten, verdünnten Dispersion (b)**

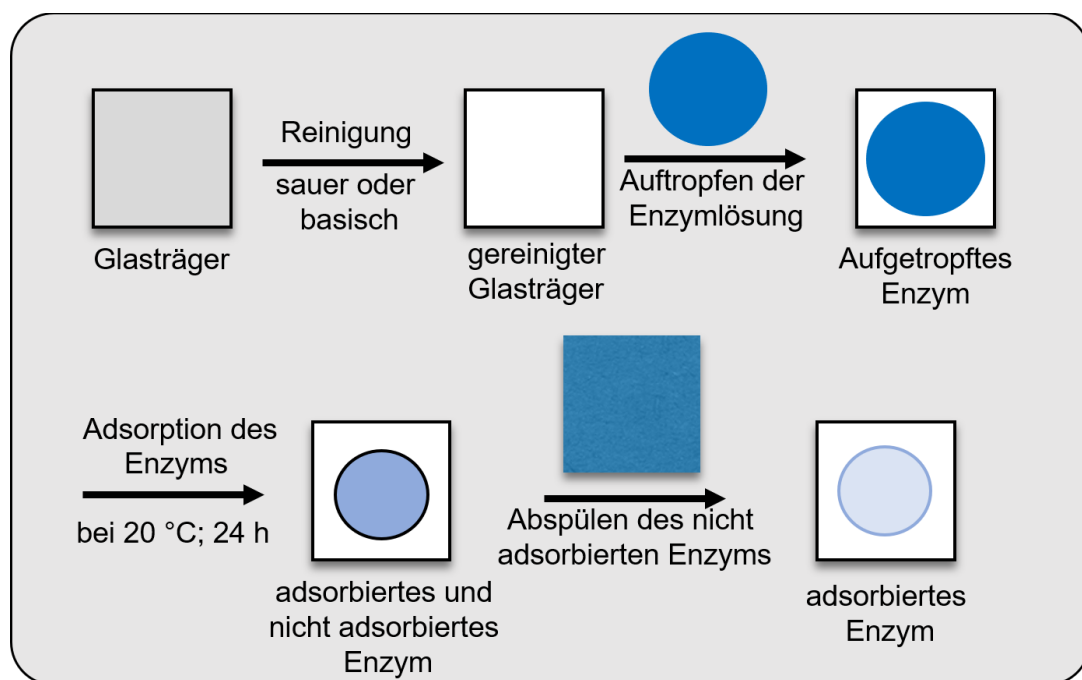
Mithilfe der Fällungsversuche konnte eindeutig gezeigt werden, dass die mit dem enzymatisch spaltbaren Stabilisator stabilisierten Polymerpartikel erfolgreich durch die Lipase in Lösung destabilisiert werden können.

### 3.3.3 Enzymmoderierte Abscheidung im Destabilisierungsprozess von Polystyrolpartikeln

In diesem Kapitel wird die EMA von Polystyrolpartikeln mittels Enzymimmobilisierung durch Adsorption untersucht.

#### 3.3.3.1 Immobilisierung der Lipase auf Glasträgern durch Adsorption

Im ersten Schritt wird die Lipase auf einem Substrat immobilisiert, um den Prozess der enzymmoderierten Autophorese von Polymerpartikeln erstmals testen zu können. Da Glasträger eine besonders glatte Oberfläche aufweisen, auf der Mikro- und Nanostrukturen besonders gut sichtbar sind, wurden Glasträger als erstes Substrat gewählt. Bezüglich der Reinigung gibt es dort bereits Vorkenntnisse durch die Arbeiten von Rüdiger, auf die aufgebaut werden kann (s. Kapitel 2.4)<sup>183</sup>. Als erste Immobilisierungsmethode wurde u. a. aufgrund der vergleichsweise simplen Vorgehensweise die Adsorption als gewählt. (s. Kapitel 2.3.2) (s. **Abbildung 43**).



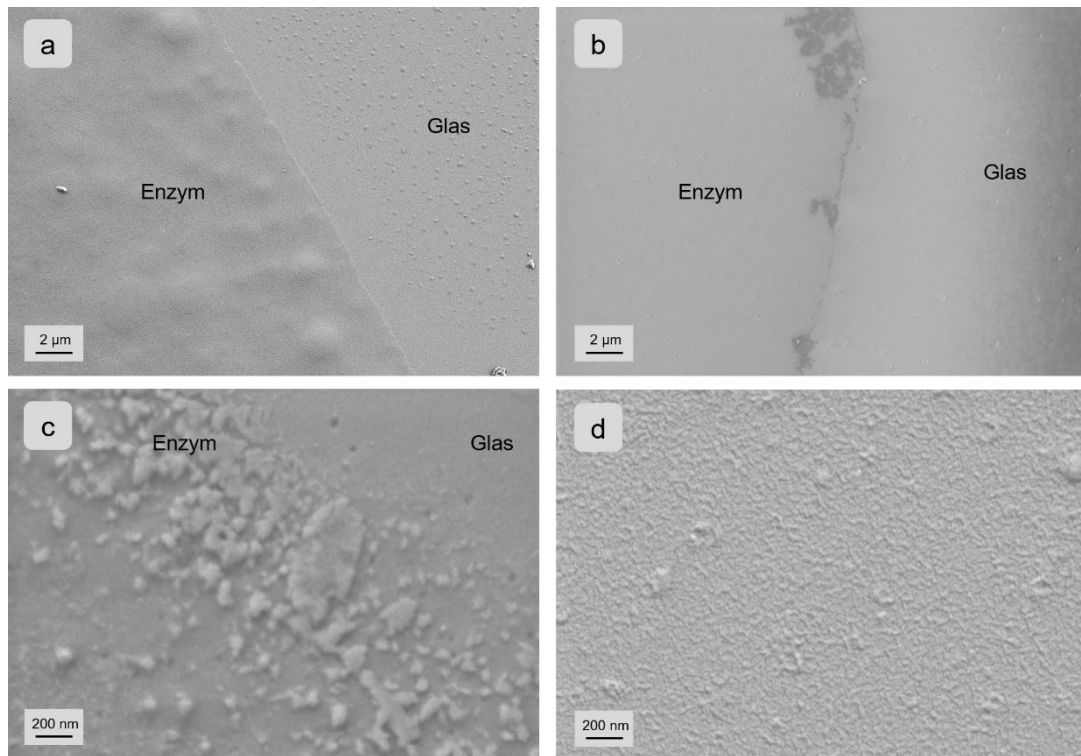
**Abbildung 43: Schematischer Ablauf der Adsorption der Lipase auf Glasträgern.**

Die Glasträger (18 mm x 18 mm) wurden erst basisch und dann sauer vorgereinigt. Dies führt zum einen zur Entfernung von Unreinheiten, führt zum anderen jedoch auch zur Aktivierung der Oberfläche. Für die saure Reinigung

wurde ein Gemisch aus 35 wt% Wasserstoffperoxid, konzentrierter Salzsäure in VE-Wasser genutzt. Die basische Reinigung erfolgte mit einem Gemisch aus 35 wt% Wasserstoffperoxid, 25 wt% Ammoniak und VE-Wasser. Die Glasträger wurden bei ca. 80 °C für eine definierte Zeitspanne zum Sieden gebracht und anschließend gründlich mit VE-Wasser abgespült. Näheres hierzu im Kapitel 5.2.3.1. Die gereinigten Glasträger wurden in einem geschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur bis zum Einsatz gelagert.

Die Lipase wurde in ultrareinem Wasser mit einer Konzentration von 500 Units/mL gelöst. Mithilfe einer Eppendorf Pipette wurden 80 µL der Enzymlösung auf den gereinigten Glasträger aufgetropft. Das aufgetropfte Enzym wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Während dieses Trocknungsvorgangs startet die Adsorption. Auffällig ist, dass bei diesem Verfahren durch das Zusammenziehen des dünnen Enzymfilms eine Aufkonzentrierung am Trocknungsrand entsteht. Der Trocknungsrand ist mit bloßem Auge bereits sichtbar.

Da die Adsorption des Enzyms an der Grenzfläche zur Glasoberfläche stattfindet, liegt ein großer Teil des Enzyms nicht adsorbiert vor. Dieser Teil wird im nächsten Schritt gründlich mit VE-Wasser abgespült. Die Proben wurden ausführlich mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht (s. **Abbildung 44**).



**Abbildung 44: REM-Aufnahmen am Trocknungsrand: aufgetrocknete Lipase (a) nach dem Waschvorgang (b) und starke Vergrößerung an der scharfen Grenzfläche nach dem Waschvorgang (c) sowie adsorbierte Lipase in bei starker Vergrößerung im Inneren des Trocknungsbereiches nach dem Waschvorgang (d).**

Um die Unterschiede zum reinen Glassubstrat zu verdeutlichen, sind die Aufnahmen direkt an der Grenzfläche, also am Trocknungsrand des Enzyms, aufgenommen. Die Lipase belegt nach dem Auftrocknen der Enzymlösung die Glasoberfläche und bildet einen dünnen Film (s. Abbildung 44 a). Beim Zusammenziehen des Enzyms kommt es wie zu erwarten zu einer Aufkonzentrierung am Trocknungsrand. Die unmittelbar davorliegende Glasoberfläche weist noch kleinere Enzymagglomerate auf. Da die Adsorption lediglich an der Grenzfläche stattfindet, ist davon auszugehen, dass der Großteil durch die Wasserlöslichkeit der Lipase wieder abgewaschen werden kann. Abbildung 44 b zeigt, dass nach dem Waschvorgang am Trocknungsrand, an dem zuvor die größte Enzymkonzentration vorlag, weiterhin Enzymagglomerate verweilen. Innerhalb des Trocknungsbereiches liegt lediglich adsorbiertes Enzym vor (s. Abbildung 44 d). Einzelne Lipase-Moleküle besitzen einen Durchmesser von 5 bis 6 nm (vgl. Abbildung 37). Aufgrund der Sputterschicht von ca. 2,5 nm

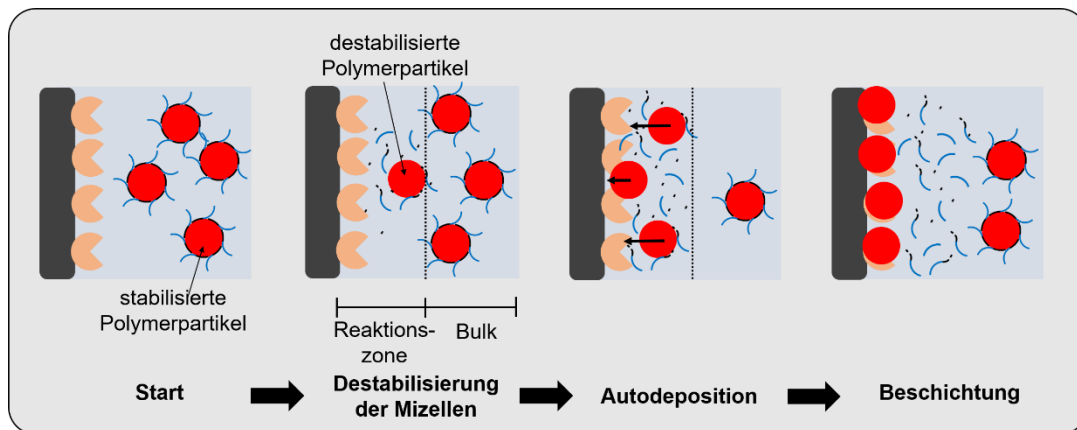
und der Unschärfe bei noch stärkeren Vergrößerungen, sind diese kaum einzeln auflösbar. Sie finden sich in der Rauigkeit in Aufnahme (s. Abbildung 44 c) am unteren linken Bildrand wieder, die sich erheblich von der reinen Glasoberfläche am oberen rechten Bildrand unterscheidet.

Die Adsorptionsversuche der Lipase führten zu dem gewünschten Ergebnis. Innerhalb des Trocknungsbereichs liegt lediglich adsorbierte Lipase vor. Die nichtadsorbierte Lipase konnte erfolgreich abgewaschen werden, lediglich am Trocknungsbereich liegen weiterhin größere Enzymagglomerate vor. Diese bilden eine scharfe Grenzschicht zum Bereich ohne Enzym. Dies stellt prinzipiell sogar die Möglichkeit von ortsspezifische Abscheideversuchen in Aussicht.



### 3.3.3.2 EMA der Polystyrolpartikel nach Adsorption der Lipase

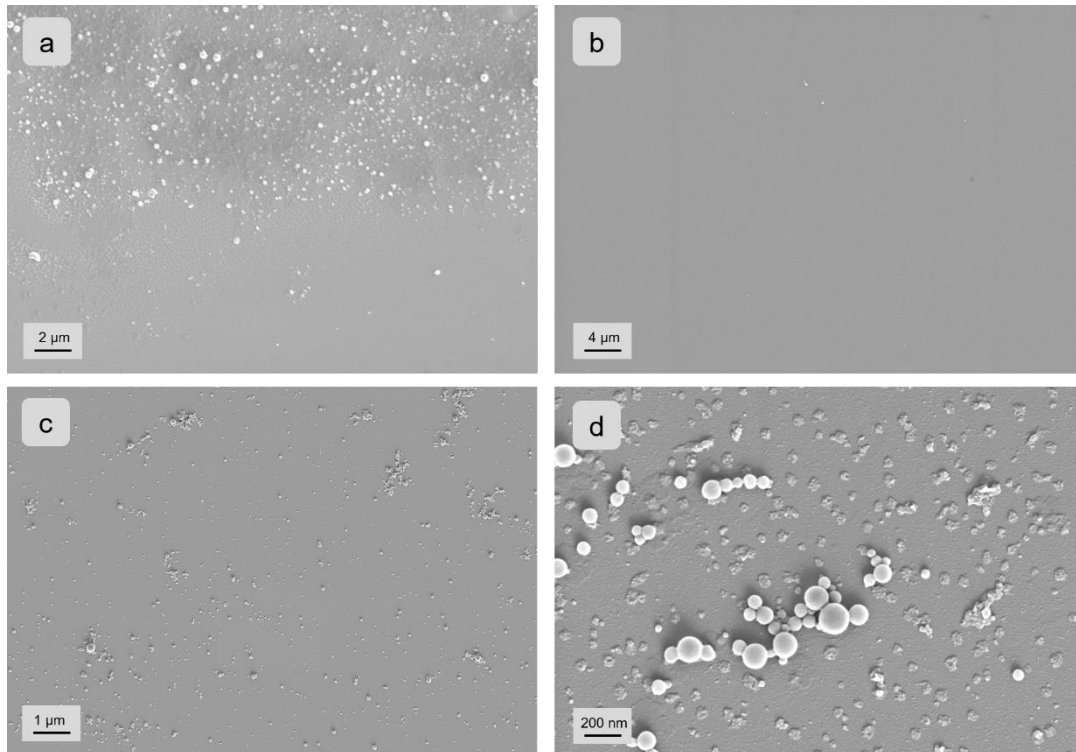
Die enzymmoderierte Adressierung der synthetisierten Polymerpartikel (s. **Abbildung 45**) ist, wie bereits erwähnt, von dem im Kapitel 2.4 mit Chymosin und Casein dargestellten Mechanismus inspiriert. Im Gegensatz zu diesem läuft die Spaltung kontinuierlich an der hydrophoben Polycaprolactonkomponente des Blockcopolymerstabilisators statt an einer einzelnen spezifischen Aminosäuresequenz ab.



**Abbildung 45: Adaption der EMA auf mit dem enzymatisch spaltbaren Stabilisator stabilisierte Polymerpartikel.**

Die Abscheidungen wurden in 50 mL Rollrandgläschen durchgeführt. Die Aktivität von Enzymen ist von vielen Faktoren, wie z. B. der Temperatur abhängig. Von der verwendeten *Pseudomonas Cepacia Lipase* ist bekannt, dass diese ihr Temperaturoptimum für Spaltungsreaktionen bei ca. 40 °C liegt (vgl. Kapitel 2.2.2 Lipasen). Der Glasträger mit der adsorptiv immobilisierten Lipase wird daher für 24 h bei 40°C in die stabile wässrige Polystyrolpartikeldispersion getaucht. Die Polystyrolpartikeldispersion wurde dabei auf ¼ verdünnt. Durch den verwendeten Phosphatpuffer wird der pH-Wert auf pH 7 gehalten. Dadurch wird weiterhin eine autokatalytische hydrolytische Spaltung des PCL-Anteils auf ein Minimum reduziert. Diese Parameter wurden zunächst gewählt, da dies die Kosten für ein derartiges Beschichtungsverfahren ohne ein notwendiges Aufheizen des Bades minimieren würde (vgl. Kapitel 2.1 Klassische Tauchbeschichtungen). Die Fixierung der Glasträger mit immobilisiertem Enzym erfolgt über eine in den Deckel eingebaute Pinzettenhalterung.

Um der Abscheidung genug Zeit zu geben, wurden die Glasträger nach der definierten Zeitspanne (24 h) wurden die Glasträger aus der Dispersion entfernt und abgespült. Zeitgleich wurden Blindproben mit gereinigten Glasträgern ohne Enzymimmobilisierung durchgeführt. Diese wurden analog in die Polymerdispersion gehalten und anschließend mit VE-Wasser angespült. Die zugehörigen REM-Aufnahmen sind in **Abbildung 46** dargestellt.

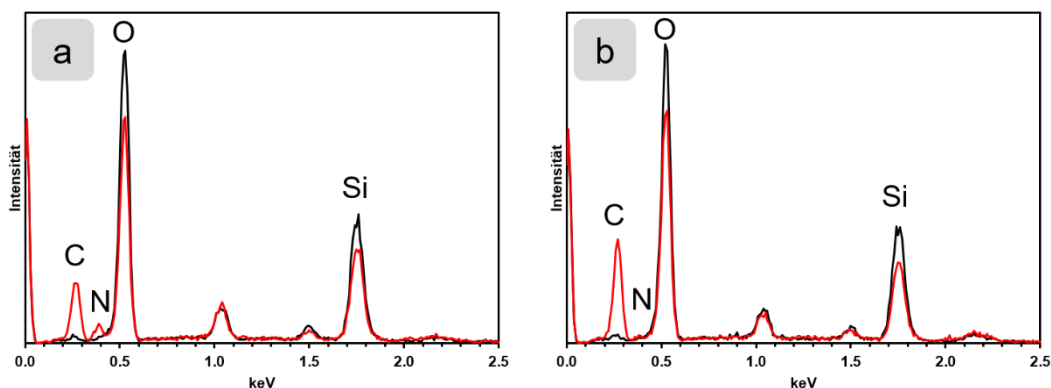


**Abbildung 46: REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung von Polystyrolpartikeln nach 24 h am Randbereich (a), die zugehörige Blindprobe ohne Lipase (b) und die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel im Innenbereich (c) sowie die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel im Innenbereich bei starker Vergrößerung (d).**

Abbildung 46 a zeigt eine REM-Aufnahme nach der Abscheidung am ursprünglichen Trocknungsrand des adsorbierten Enzyms. In der oberen Hälfte befinden sich die Polystyrolpartikel auf der Enzymschicht. In der unteren Hälfte, ergo dem Bereich ohne Enzym, befinden sich keine Polystyrolpartikel. Dementsprechend erfolgt die Abscheidung ortsspezifisch. Aus der Blindprobe (s. Abbildung 46 b) wird deutlich, dass nach dem Spülvorgang lediglich geringfügig Partikel auf der Oberfläche verweilen. Dies steht jedoch in keinem

Verhältnis zu der Gegenprobe. Im Innenbereich (s. Abbildung 46 c und d) wird deutlich, dass weniger Partikel abgeschieden werden als im Randbereich mit höherer Enzymkonzentration (s. Abbildung 46 a).

Im Folgenden werden sowohl die abgeschiedenen Partikel als auch die reine Lipase mittels EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie) punktuell analysiert (s. **Abbildung 47**). EDX bietet die Möglichkeit direkt am Rasterelektronenmikroskop die untersuchten Stellen auf ihre elementare Zusammensetzung hin zu untersuchen. So soll festgestellt werden, dass es sich bei den abgeschiedenen Partikeln um Polystyrol handelt.



**Abbildung 47:** EDX-Spektren der der Oberfläche der immobilisierten Lipase (a, rot), der reinen Glasoberfläche (a, schwarz) sowie der abgeschiedenen Polystyrolpartikel (b, rot) und der zugehörigen reinen Glasoberfläche (b, schwarz).

Die Messungen werden jeweils auf den abgeschiedenen Partikeln und zur Vergleichbarkeit auf einer danebenliegenden Freifläche im gleichen Bildausschnitt durchgeführt. Die EDX-Spektren zeigen den erwarteten Verlauf. Aufgrund der dünnen Schicht sind die Signale des Untergrunds (Glas bzw.  $\text{SiO}_2$ ) vergleichsweise stark. In allen Spektren stellen daher Si und O den größten Anteil, dabei ist der Sauerstoff-Peak entsprechend der molekularen Zusammensetzung jeweils ca. doppelt so intensiv wie der Si-Peak. Die reine Lipase (s. Abbildung 47 a, rot) weist im Unterschied zum Untergrund ein deutliches Kohlenstoff- und Stickstoff-Signal aus. Aufgrund der darin enthaltenen Aminosäuren ist dieses signifikante Stickstoff-Signal für Enzymen und Proteine so zu erwarten. Bei den Polystyrolpartikeln ergibt sich ein starkes

Kohlenstoffsignal und ein minimal vom Untergrund abweichendes Stickstoff-Signal, welches auf die darunterliegenden Enzyme zurückzuführen ist. Aufgrund des signifikanten Unterschieds in der Intensität wird eindeutig gezeigt, dass die abgeschiedenen Partikel kein Enzym sind und sind somit eindeutig dem Polystyrol zuzuordnen.

Zusätzlich zur EDX werden die Beschichtungen auch mithilfe eines DSA (Drop Shape Analyzer) untersucht. Hierbei wird der Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf der Oberfläche ausgemessen. Die angegebenen Kontaktwinkel sind für diese und folgende Kontaktwinkelangaben jeweils Mittelwerte aus 20 Messpunkten. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 2** dargestellt.

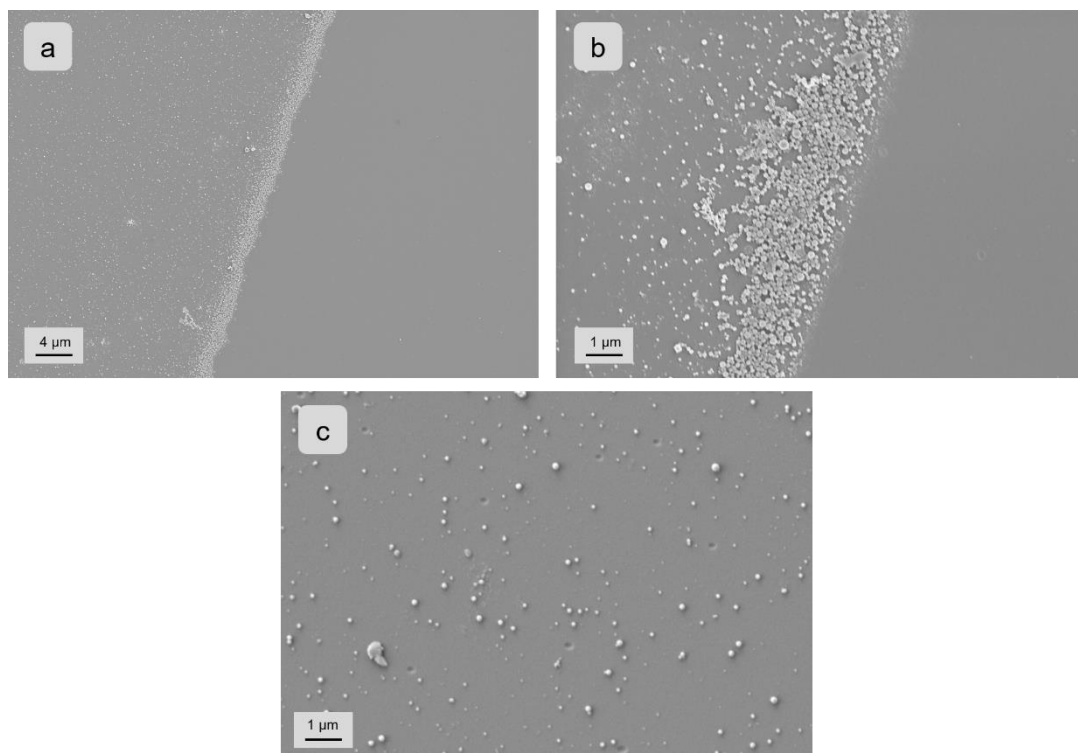
**Tabelle 2: Kontaktwinkel und freie Oberflächenenergien zu unterschiedlichen Stufen des EMA-Verfahrens mit Lipase und Polystyrol.**

Probe	Kontaktwinkel in °
Unbehandelter Glasträger	104,69 ± 1,27
Sauer gereinigter Glasträger	20,32 ± 0,18
Adsorbierte Lipase	21,97 ± 3,54
Abgeschiedene Polystyrolpartikel	50,63 ± 1,61

Der unbehandelte Glasträger weist durch Fette und Öle einen hohen Wasserkontaktwinkel von über 104 ° auf. Die Benetzbarkeit wird durch die saure Reinigung des Objektträgers wird die Benetzbarkeit des Substrats deutlich gesteigert. Dies ist neben der Entfernung der Verunreinigungen auf die eingebrachten Oxidschichten und der damit einhergehenden Steigerung der Polarität zurückzuführen. Sichtbar wird dies durch den deutlich erniedrigten Kontaktwinkel des liegenden Wassertropfens, was ebenfalls die Adsorptionsfähigkeit des Enzyms signifikant erhöht.

Diese ersten Versuche weisen somit Bestandteile des postulierten Wirkungsprinzips (vgl. Abbildung 45) auf. Die Enzyme rufen durch den zuvor nachgewiesenen Abbau des PEG-PCL-Stabilisators (vgl. Abbildung 38) eine Destabilisierung der Polymerpartikel hervor. Dies geschieht in unmittelbarer Nähe zur Oberfläche, dem Wirkungsbereich der adsorbierten Enzyme. Daher findet die Abscheidung im Trocknungsbereich, ergo der Schicht mit einer großen Anzahl an verbleibenden adsorbierten Enzymmolekülen verstärkt statt. Die

Abscheidung findet dabei nahezu ausschließlich dort statt wo Enzym auf der Oberfläche immobilisiert vorliegt. Dies spricht für eine sehr hohe Ortsspezifität. Die Abscheidung im Innenbereich führt zu keiner durchgehenden Monolage an Partikeln. Um die Abscheidung zu steigern, wurde die Polymerpartikellösung im Folgenden nicht mehr verdünnt. Da so näher an einer maximalen Sättigung gearbeitet wird, soll die Destabilisation der Partikel durch die Lipase begünstigt werden.

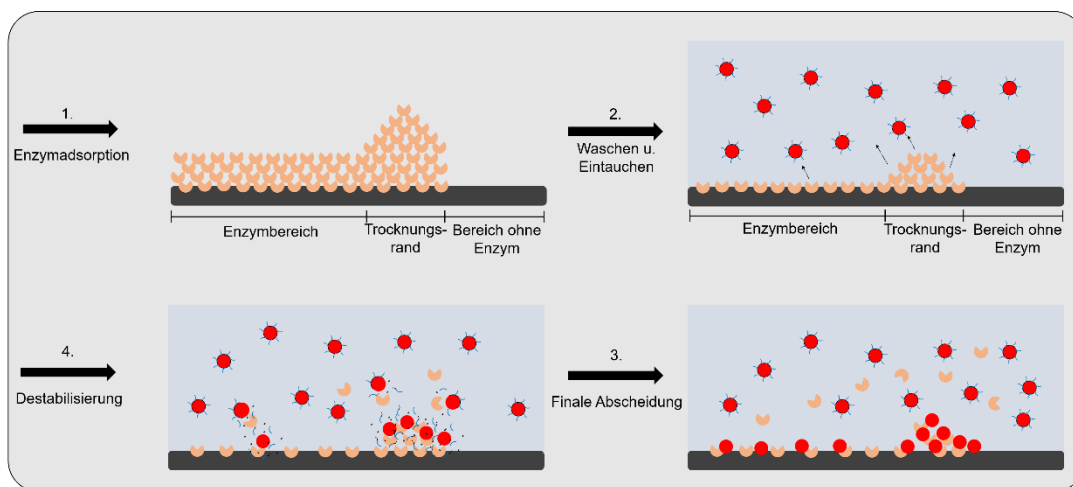


**Abbildung 48: REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung auf Glas durch adsorbierte Lipase bei 40 °C am Trocknungsrand des Enzymbereichs nach 24 Stunden bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a) und (b) sowie eine Aufnahme aus dem Innenbereich der Abscheidung (c).**

Die Abscheidung bei der erhöhten Partikelkonzentration (s. **Abbildung 48**) verdeutlicht die klare Trennlinie zum Bereich ohne Enzym (jeweils rechts im Bild) nach dem Waschvorgang. Es ist erkennbar, dass die Anzahl der abgeschiedenen Partikel im Vergleich zur verdünnten Probe zugenommen hat. Am Randbereich, dem Bereich mit der größten verbliebenen Enzymkonzentration, wurde eine Multilage an Partikeln abgeschieden. Im Innenbereich bleibt es jedoch bei einer sporadischen Abscheidung. Aus diesen Ergebnissen wird folgender Schluss gezogen: Mit der erhöhten Enzymkonzentration liegt man näher an einer

gesättigten Lösung, wodurch die Partikel bei Kontakt mit dem Enzym besser destabilisiert und somit abgeschieden werden. Durch die erhöhte Konzentration und damit einhergehende Anzahl an Partikeln ist zudem ein Kontakt des Enzyms an der Oberfläche mit den Partikeln in der Lösung wahrscheinlicher. Im Innenbereich bleibt es jedoch bei einer sporadischen Abscheidung. Es wird keine durchgehende Monolage erzielt.

**Abbildung 49** veranschaulicht den aus den Ergebnissen übertragenen Wirkungsmechanismus mit adsorbierter Lipase.

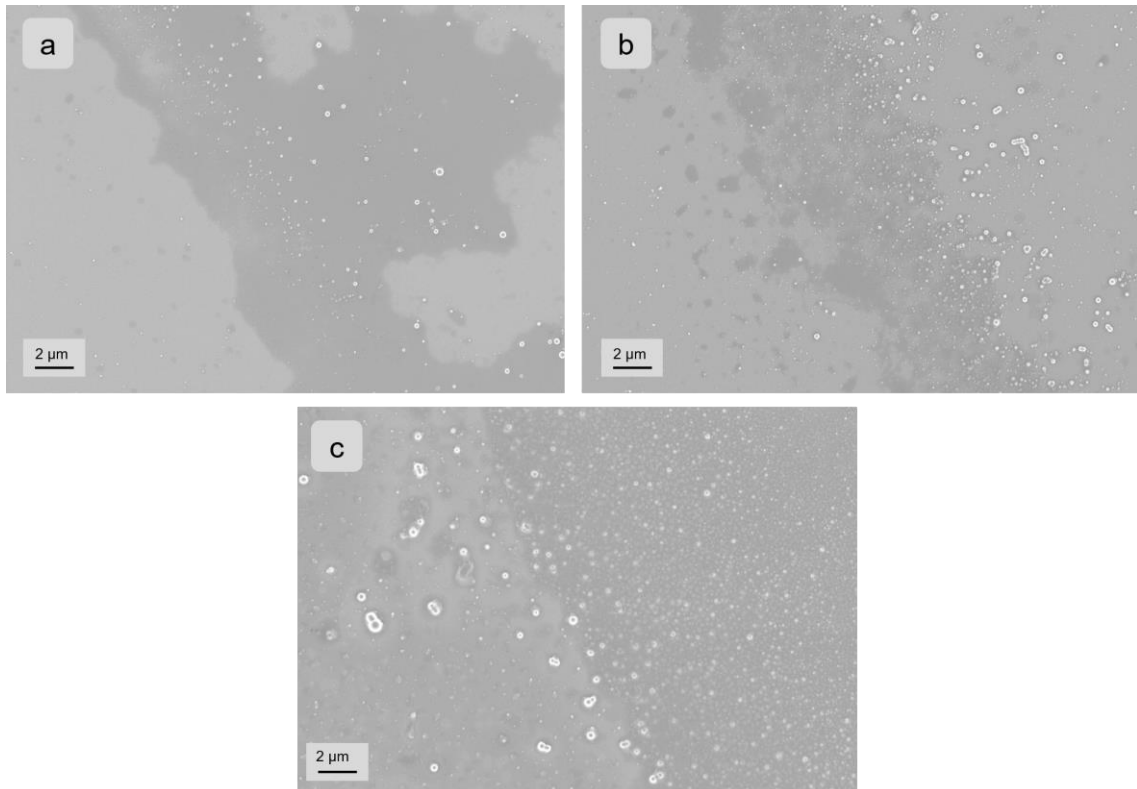


**Abbildung 49: Postulierter Abscheidemechanismus der Polymerpartikel mit adsorbierter Lipase.**

Als Fazit wird aufgenommen, dass nach dem Auftropfen des Enzyms an der Grenzfläche wie üblich bei Trocknungsvorgängen eine Aufkonzentration am Trocknungsrand entsteht. Die lediglich an der Oberfläche stattfindende Adsorption führt dazu, dass der Waschvorgang im Hauptbereich des entstandenen Enzymfilms die nicht adsorbierten Enzyme abgewaschen werden können, während die festeren Agglomerate im Trocknungsrand schwerer abgewaschen werden können. Adsorbierte Enzyme besitzen in wässrigen Lösungen aufgrund der lediglich adsorptiven Wechselwirkung mit der Substratoberfläche weiterhin Freiheitsgrade (vgl. 2.3.2 Übersicht verschiedener Immobilisierungstechniken). Die höhere Konzentration an Enzymen am Trocknungsrand führt zu einer erheblich verstärkten Abscheidung in diesem Bereich.

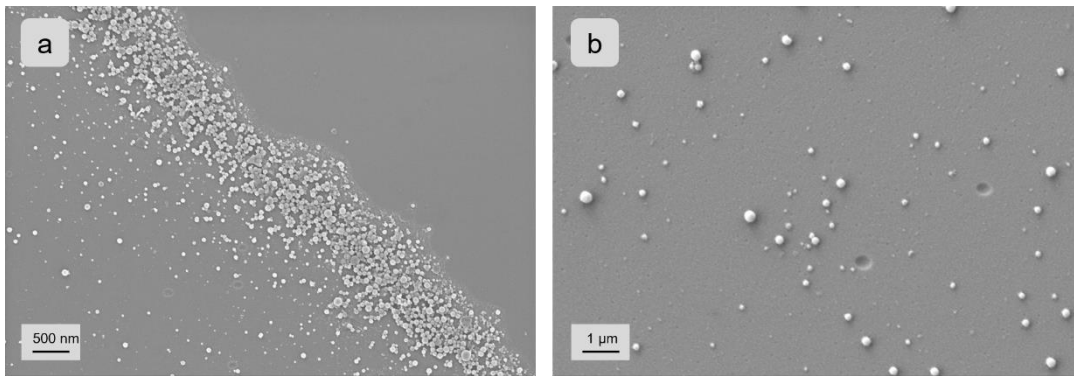
### 3.3.3.3 Einfluss der Abscheidedauer

Im Folgenden wird der zeitliche Verlauf der Abscheidung untersucht (s. **Abbildung 50**). Zunächst wird deutlich, dass bereits nach einer Stunde Partikel erfolgreich am Trocknungsrand des Enzyms abgeschieden wurden. Die Anzahl und Belegungsdichte der abgeschiedenen Partikeln steigt mit der Zeit (4 und 8 Stunden) kontinuierlich an.



**Abbildung 50: REM-Aufnahmen am Trocknungsrand der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln bei 40 °C nach 1 h (a); 4 h (b) und 8 h (c)**

Im nächsten Punkt wird untersucht, ob eine Erhöhung der Abscheidezeit einen weiteren Einfluss auf die Menge an abgeschiedenen Partikeln besitzt. Hierfür wurde die Abscheidezeit bei 40 °C auf 72 h erhöht. Die zugehörigen REM-Bilder sind in **Abbildung 51** dargestellt.



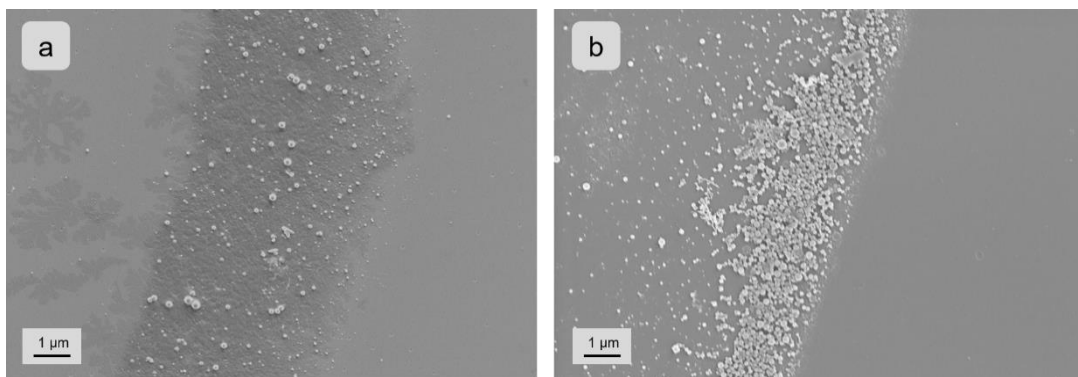
**Abbildung 51: REM-Aufnahmen der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln nach 72 h bei 40 °C am Trocknungsrand (a) und im Innenbereich des adsorbierten Enzyms (b).**

Wie in der Abbildung zu sehen, ergibt eine weitere Steigerung der Reaktionszeit über 24 h hinaus keine signifikante Verbesserung hinsichtlich des Abscheideverhaltens. Dies gibt einen weiteren starken Hinweis auf die Richtigkeit des oben postulierten Mechanismus. Da die adsorptive Wechselwirkung der Enzymimmobilisierung reversibel ist, wird zudem durch eine Erhöhung der Zeit ein Inlösungsgehen des Enzyms erleichtert.



### 3.3.3.4 Einfluss der Abscheidungstemperatur

Die Aktivität von Enzymen ist von vielen Faktoren, wie z. B. der Temperatur abhängig. Von der verwendeten *Pseudomonas Cepacia Lipase* ist bekannt, dass diese ihr Temperaturoptimum für Spaltungsreaktionen bei ca. 40 °C liegt (vgl. Kapitel 2.2.2 Lipasen). Im Folgenden wurde die Abscheidung bei Raumtemperatur (20 °C) durchgeführt. Der pH-Wert wird durch den Puffer weiterhin konstant bei 7 gehalten, um eine säure- oder baseinduzierte Spaltung des stabilisierenden PCL-Esters zu vermeiden. Die zugehörigen REM-Bilder sind in **Abbildung 52** dargestellt.



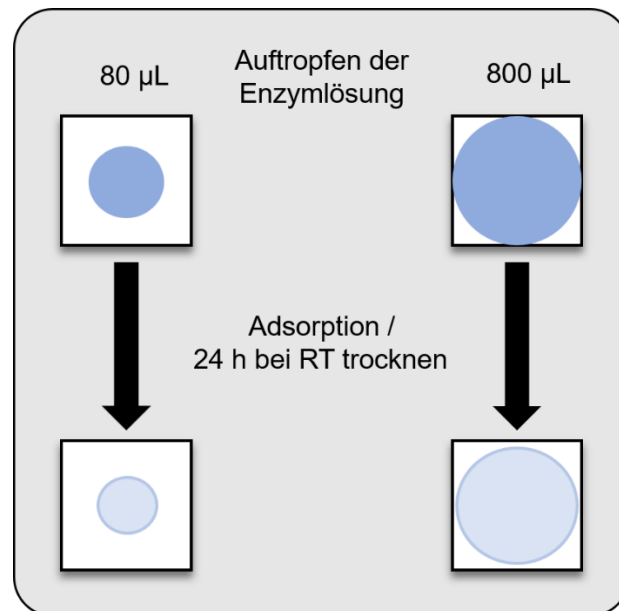
**Abbildung 52: Vergleich der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln am Trocknungsrand nach 24 h bei 20 °C (a) und 40 °C (b).**

Die Aktivität bei 20 °C beträgt nur noch ca. 20 % des Optimums bei 40 °C.<sup>237</sup> Die REM-Aufnahmen bei 20 °C zeigen daher den aufgrund des Aktivitätsverlusts erwarteten Verlauf. Im Vergleich zu der Abscheidung bei 40 °C werden deutlich weniger Partikel abgeschieden. Die Breite des Trocknungsrandes ist in beiden Fällen ähnlich mit einer Breite von ca. 3 bis 5 µm. Ebenfalls auffällig ist, dass unterhalb der Partikel bei geringerer Temperatur deutlich mehr Enzym sichtbar bleibt. Dieser Unterschied ist ebenfalls durch den Temperaturunterschied zu begründen. Der Immobilisierungsprozess per Adsorption ist per se reversibel, hier spielt jedoch vor allem die Löslichkeit von Enzymen eine große Rolle. Bekanntermaßen steigt die Löslichkeit von Enzymen in Wasser mit der Temperatur<sup>238</sup>, bei 40 °C werden die Enzymagglomerate am Trocknungsrand daher während der Aussetzung in Wasser deutlich leichter wieder angelöst als bei 20 °C.

### 3.3.3.5 Einfluss der Enzymkonzentration

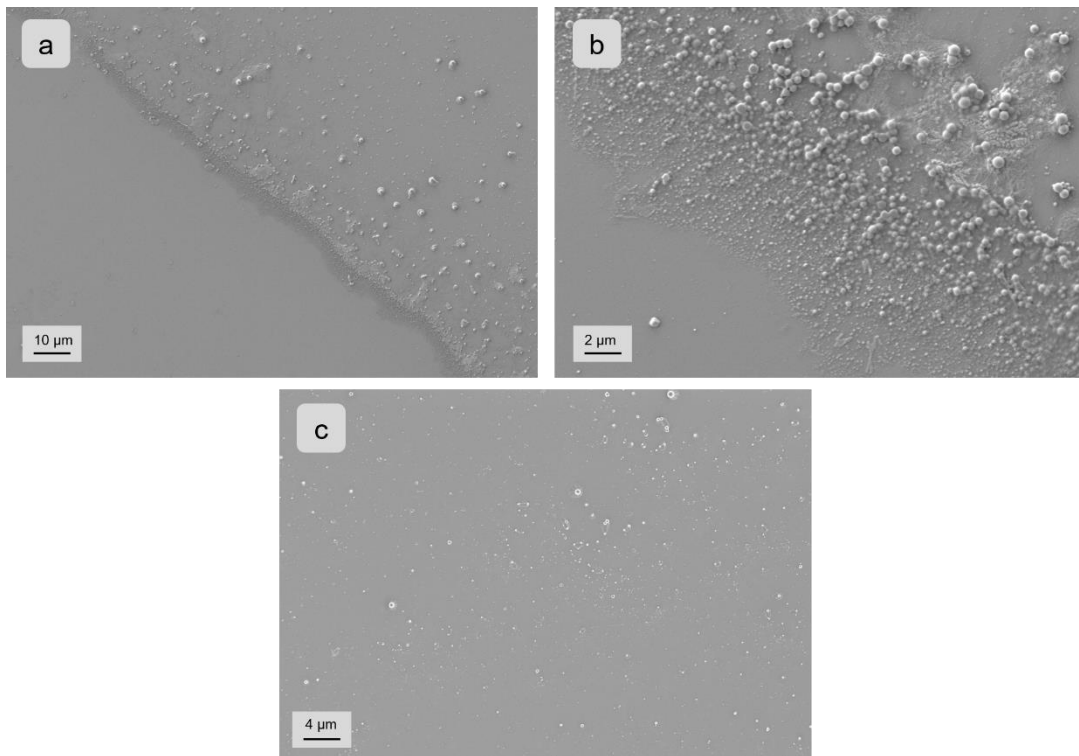
Wie die vorherigen Ergebnisse zeigen, findet im Trocknungsrand des Enzymbereichs eine die deutlich größte Abscheidung statt. Daher wird in diesem Kapitel untersucht, ob eine signifikante Erhöhung an aufgetragenem Enzym zu einer besseren Adsorption und somit höheren Enzymkonzentration auch im Innenbereich sorgt. Im nächsten Schritt wird evaluiert, ob die signifikante Erhöhung der adsorbierten Enzymunits einen Einfluss auf die Qualität der Abscheidung der Polystyrolpartikel im EMA-Prozess besitzt.

Zu diesem Zweck wird die zehnfache Enzymmenge (800  $\mu\text{L}$ ) mit der üblichen Konzentration von 500 Units/mL auf den Glasträger (18x18 mm) aufgetrocknet (s. **Abbildung 53**).



**Abbildung 53: Schematischer Ablauf der Adsorption der Lipase mit der standard- und der zehnfachen Menge an Enzymlösung auf dem Glasträger.**

Durch die erhöhte Auftragsmenge ist der Glasträger zu fast 90 % bedeckt, im Gegensatz zur vorherigen Bedeckung von ca. 30 %. Stark vereinfacht kann in diesem Versuch daher von einer ca. dreimal so hohen Anzahl an Units, die prinzipiell pro Flächeneinheit zur Adsorption zur Verfügung stehen, ausgegangen werden. Die zugehörigen REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung von Polystyrolpartikeln ist in **Abbildung 54** dargestellt.

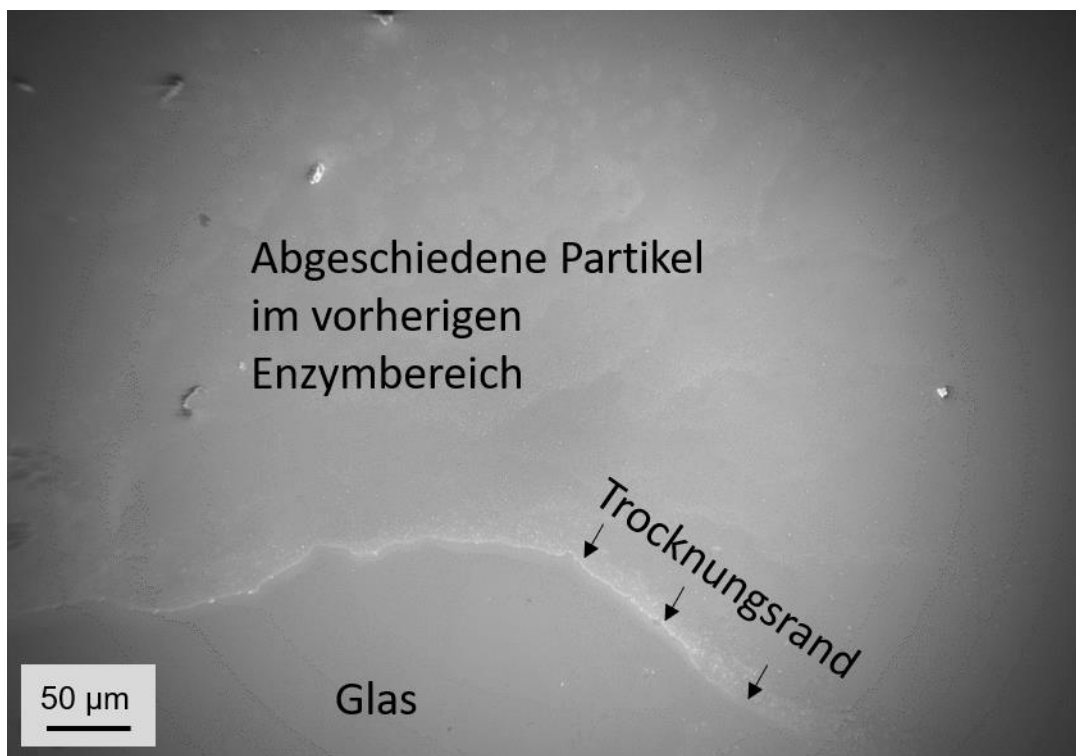


**Abbildung 54: Enzymmoderierte Abscheidung von Polystyrolpartikeln durch erhöhte Unitzahl an Lipase. Aufnahmen am Trocknungsrand (a) und (b) sowie im Innenbereich (c).**

Die Versuche mit der erhöhten Enzymkonzentration führen im Vergleich zu vorherigen Versuchen (vgl. Abbildung 52) zu einer deutlich breiteren Abscheidung von bis zu 10 µm im Randbereich der vorherigen Enzymschicht. Im Inneren führt die erhöhte Enzymkonzentration jedoch zu keinem signifikant anderen Ergebnis als die vorherigen. So werden zwar über den gesamten Innenbereich des aufgetragenen Enzyms Polystyrolpartikel erfolgreich abgeschieden (s. Abbildung 54 c), jedoch geht diese auch nicht über die einer Monolage hinaus. Zu erklären ist der breitere Randbereich mit typischen Trocknungserscheinungen. Vereinfacht: Da mehr Enzym vorhanden ist, zieht es sich auf einem breiteren Bereich beim Trocknen zusammen. Die Abscheidung der Polystyrolpartikel erfolgt weiterhin ortsspezifisch wodurch auch ihr Abscheidungsgebiet verbreitert wurde.

### 3.3.4 Teilkapitelzusammenfassung

Zusammenfassend wird festgehalten, dass das Optimum für den Destabilisierungs-EMA-Prozess via adsorbierter Lipase für mit PCL(5000)-b-PEG(5000)-Blockcopolymeren stabilisierte Polystyrolpartikel bei einer Abscheidezeit von 24 h bei 40 °C liegt, da hier auch die Enzymaktivität am größten ist. Gerade am Trocknungsrand des Enzyms, ergo dem Bereich mit der höchsten Enzymkonzentration wird eine signifikante Abscheidung erzielt, die ebenfalls die hohe Strukturkontrolle dieses Prozesses belegt, da es außerhalb des Enzymbereichs zu keiner signifikanten Abscheidung kommt. Dieser Zusammenhang wird in der Fernansicht in **Abbildung 55** verdeutlicht.



**Abbildung 55:** REM-Fernansicht der durch EMA abgeschiedenen Polystyrolpartikel auf Glas.

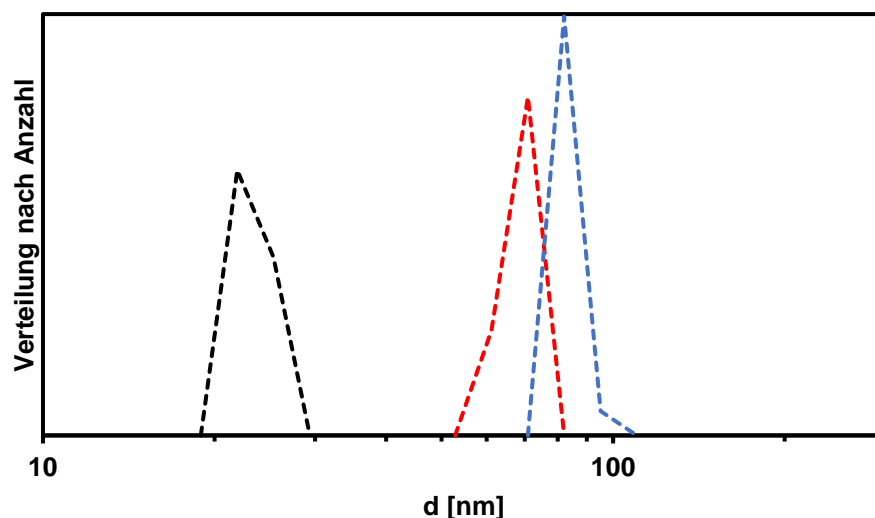
Nach dem erfolgreichen Machbarkeitsnachweis und dem Etablieren der EMA von eigens stabilisierten Polystyrolpartikeln durch adsorptiv gebundene Lipase wird in den folgenden Abschnitten auf die Variationsmöglichkeiten dieses Prozesses eingegangen. Die folgenden Unterkapitel beinhalte die Variationsmöglichkeiten im mittels Lipase-katalysierten EMA-Destabilisierungsprozess. Dazu zählen die Steuerung der Partikelgröße, die Enzymimmobilisierungstechnik, die Nutzung

anderer vinylhaltiger Monomere und die daraus steuerbaren, neuartigen Oberflächenstrukturen. Ebenso werden Silbernanopartikel in den Mizellen synthetisiert und mittels EMA-Prozess abgeschieden.

### 3.3.5 Steuerung der Partikelgröße

In diesem Abschnitt wird die mögliche Steuerung der Partikelgrößen untersucht. Die zugrundeliegende Idee ist, durch unterschiedliche Kettenlängen des stabilisierenden PCL-*b*-PEG-Blockcopolymer unterschiedlich große Polymerpartikel zu synthetisieren und im Anschluss über die EMA mittels Lipase abzuscheiden.

Untersucht wurden neben dem bisher verwendeten PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer ein PCL(2000)-*b*-PEG(2000)- sowie ein PCL(10000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer. Zunächst wurden die verschiedenen Blockcopolymere in Wasser mittels DLS analysiert (s. **Abbildung 56**).

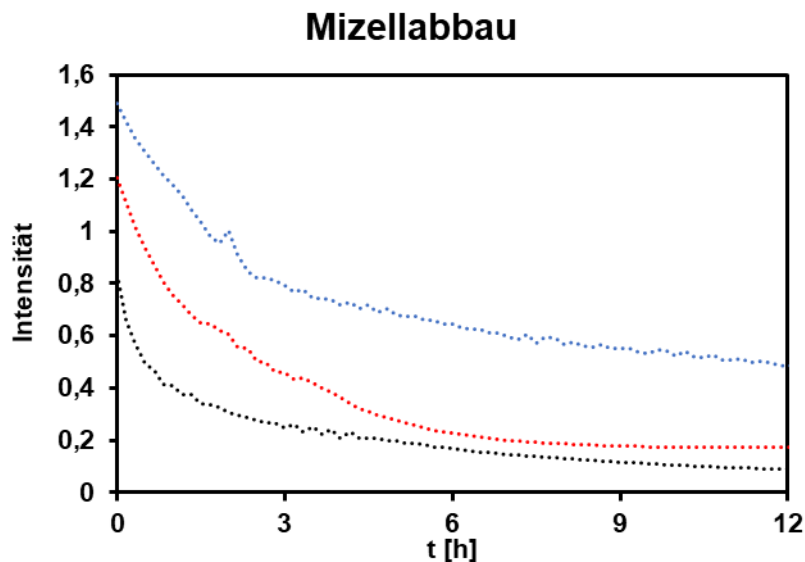


**Abbildung 56:** Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der PCL-PEG-Blockcopolymere. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (blau)

Durch die unterschiedlichen Molmassen und damit einhergehenden Kettenlängen ergeben sich wie erwartet verschiedene spezifische Durchmesser der Mizellen in wässrigem Medium. Die Copolymermizellen mit einer durchschnittlichen Gesamtmolmasse von 4.000 g/mol besitzen einen Durchmesser von ca. 22-25 nm.

Bei der durchschnittlichen Gesamtmolmasse von 10.000 g/mol resultiert ein Durchmesser von ca. 60-70 nm. Das größte untersuchte Copolymer mit einer Gesamtmolmasse von 15.000 g/mol, von denen 10.000 g/mol zur hydrophoben PCL-Komponente zählen weist einen Durchmesser von ca. 82-95 nm auf.

Im nächsten Schritt wurde per UV-Vis-Messung (s. **Abbildung 57**) untersucht, ob die Blockcopolymere in wässriger Lösung mit Phosphatpuffer (pH 7) ebenfalls durch die Lipase hydrolytisch gespalten und somit abgebaut werden können. Hierzu wurde auf gleiche Weise verfahren wie bei der Messung mit dem zuvor genutzten 5000-5000-Blockcopolymer (vgl. Abbildung 38).

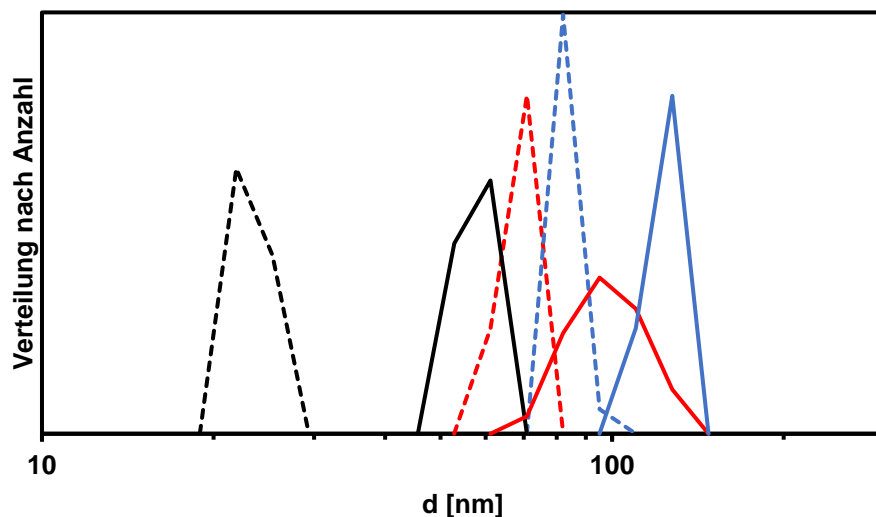


**Abbildung 57:** UV-Vis-Spektrum des zeitlichen Verlaufs des enzymatischen Abbaus der Dispersion der PCL-*b*-PEG-Blockcopolymermizellen (1 mg/mL) bei pH 7,0 nach Zugabe von 0,1 mg/mL Lipase. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (blau)

Die Lösungen unterscheiden sich je nach Molmassen in ihrem unterschiedlichen Lösungsverhalten. Die Lösung mit der größten Molmasse erweist sich als deutlich trüber als die Lösung mit den geringeren Molmassen, dies spiegelt sich in der Intensität wieder. Bei allen Blockcopolymeren kommt es in der Lösung zu einem enzymatischen Abbau der PCL-Komponente. Je nach Anteil verläuft die Spaltung und analog dazu der Intensitätsverlust annähernd proportional. Der Abbau des PCL-Anteils von 2.000 g/mol (blau) erfolgt größtenteils innerhalb der ersten Stunde. Der PCL-Anteil von 5.000 ist bei der gewählten

Enzymkonzentration größtenteils nach 2 Stunden und der von 10.000. g/mol ist nach über 3 Stunden größtenteils abgeschlossen.

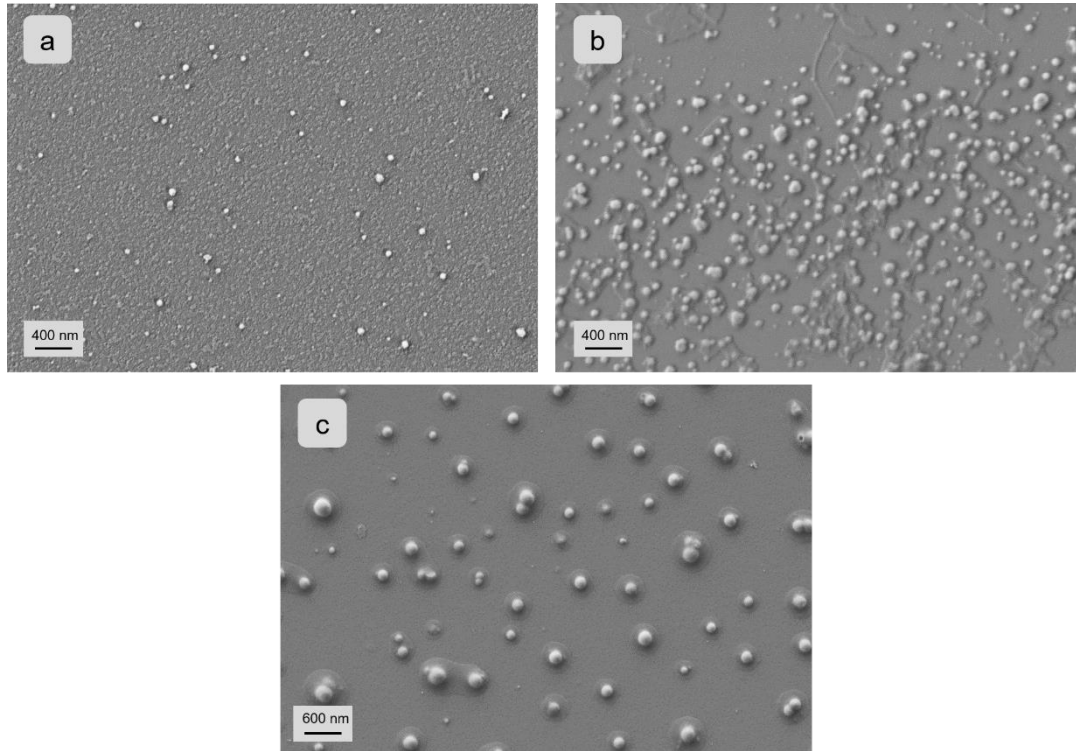
Die Versuche haben gezeigt, dass trotz unterschiedlicher Größen der Mizellen und molarer Massen die PCL-Komponenten abgebaut werden. Im nächsten Schritt werden mit den enzymatisch abbaubaren Blockcopolymermizellen Polystyrolpartikel synthetisiert. Die Synthese erfolgt unter analogen Bedingungen zur bisherigen Synthese (s. Abbildung 39). Die auf diese Weise synthetisierten Partikel sind im pH 7-Puffer stabil und wurden per dynamischer Lichtstreuung auf ihre Größe untersucht und mit den vorherigen Mizellgrößen verglichen (s. **Abbildung 58**).



**Abbildung 58:** Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der stabilisierten Polystyrolpartikel (durchgezogene Linie) und ihrer zugehörigen reinen PCL-PEG-Blockcopolymermizellen (gestrichelte Linie). PCL(2000)-b-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-b-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-b-PEG(5000): (blau)

In der Größenverteilung der synthetisierten Polystyrolpartikel ist ein klarer Trend zu erkennen. Je größer die umgebende Mizelle, desto größer der Polymerpartikel. Die Mizellgröße der stabilisierten Partikel wächst bei PCL(2000)-b-PEG(2000) von ca. 22 nm auf ca. 52 nm, bei PCL(5000)-b-PEG(5000) von ca. 76 nm auf 110 nm und bei PCL(10000)-b-PEG(5000) von ca. 82 nm auf ca. 128 nm.

Mit den verschieden großen Partikeln wurde die enzymatische Abscheidung durch adsorbierte Lipase analog zu den vorherigen Versuchen auf Glas durchgeführt. In **Abbildung 59** zeigt die abgeschiedenen Partikel.



**Abbildung 59: REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung der unterschiedlich stabilisierten Polystyrolpartikel im Innenbereich. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (a); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (b) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (c).**

Mit den mit unterschiedlicher Kettenlänge stabilisierten Polystyrolpartikeln funktioniert die enzymmoderierte Abscheidung auf die gleiche Art wie mit dem ursprünglichen System. Im Rasterelektronenmikroskop wird zudem die zuvor per DLS gemessene Größenordnung der Partikel von ca. 50 bis über 120 nm bestätigt.

Als Fazit wird festgehalten, dass die Kettenlänge der PCL-PEG-Blockcopolymeren die Größe der zu synthetisierenden spaltbaren Polymerpartikel bestimmt. Die quantitative Abscheidung der Partikel erfolgt bei den drei untersuchten Kettenlängen jeweils weiterhin sporadisch im Inneren des Enzymbereichs. Dies spricht dafür, dass selbst bei den kürzeren Kettenlängen die hydrolytische Spaltung des PCL-Blocks zu langsam erfolgt, um innerhalb der Expositionszeit ausreichend Polymerpartikel zu destabilisieren.



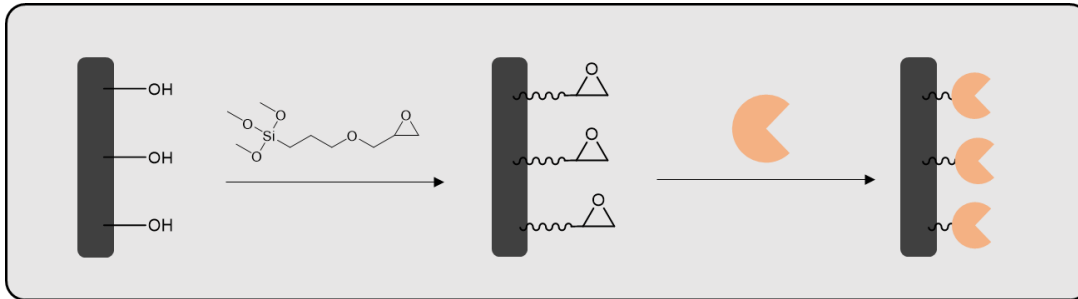
### 3.3.6 Variation der Enzymimmobilisierungstechnik

In diesem Abschnitt wird die Enzymimmobilisierung variiert. Die unterschiedlichen Möglichkeiten wurden bereits im theoretischen Teil (vgl. Kapitel 2.3.2) diskutiert.

#### 3.3.6.1 Abscheidungsversuche mit kovalenter Enzymimmobilisierung

Die Enzymimmobilisierung über kovalente Bindung eröffnet neue Möglichkeiten für die Methodik der enzymmoderierten Abscheidung der Partikel. Durch die kovalente Immobilisierung soll eine homogenere Abscheidung über die gesamte Glasoberfläche ermöglicht werden, da hier aufgrund der Methodik durch das Eintauchen der GOPS-funktionalisierten Glasoberfläche im Gegensatz zur Adsorption keine Trocknungsråder o.ä. entstehen, die zu Konzentrationsunterschieden der Enzyme auf der Oberfläche führen würden. Um die Lipase kovalent an ein Substrat zu binden, muss die Oberfläche zunächst funktionalisiert werden, damit die freien Aminogruppen des Enzyms entsprechend mit funktionalen Gruppen des Enzyms reagieren können.

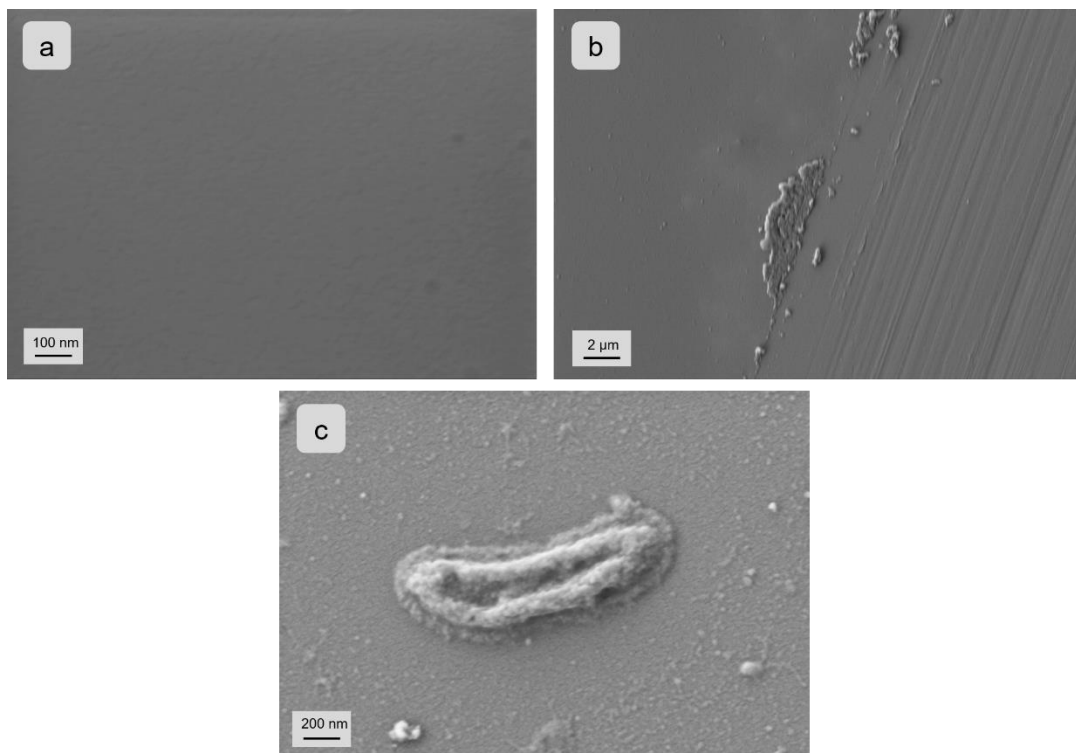
In dieser Arbeit wurde sich für Glas als Substrat entschieden, da hier bereits einige Methoden bekannt sind Epoxidgruppen auf der Oberfläche anzubringen. Die anschließende Reaktion der Epoxidgruppen mit den Aminogruppen wird für die kovalente Immobilisierung des Enzyms ausgenutzt. Hierfür werden die Hydroxylgruppen an der Glasoberfläche zunächst mit einem entsprechend funktionalisierten Silan silanisiert. Ausgewählt wurde Glycidoxypropyltrimethoxysilan (GOPS). Die Silanisierung der Glasträger findet über einen Zeitraum von 2 Stunden bei Raumtemperatur in einem 80:20 Gemisch (w/w) aus Ethanol und Wasser mit 10 wt% GOPS statt. Durch 1% TEA wird für basische Bedingungen gesorgt. Vorherige Arbeiten von Rüdiger haben die Wirksamkeit dieser Methode für das Enzym Chymosin bestätigt.<sup>184</sup> Nach erfolgter Silanisierung und einer Reinigung mit Ethanol werden die silanisierten Glasträger bei 100 °C eingebrannt und anschließend erneut mit Ethanol und Wasser gespült. Das Reaktionsschema der Enzymimmobilisierung ist vereinfacht in **Abbildung 60** dargestellt.



**Abbildung 60: Schematische Darstellung der Silanisierung der Glasträger durch GOPS und der anschließenden kovalenten Enzymimmobilisierung**

Die Enzymimmobilisierung, ergo die kovalente Anbindung über die Reaktion der Epoxid- mit den Aminogruppen findet über einen Zeitraum von 96 h in bei einer Konzentration von 3 mg Lipase /100 mL VE-Wasser statt. Neben den REM oder EDX-Messungen (weiter unten) kann die Anbindung zusätzlich über den Kontaktwinkel mit Wasser verfolgt werden.

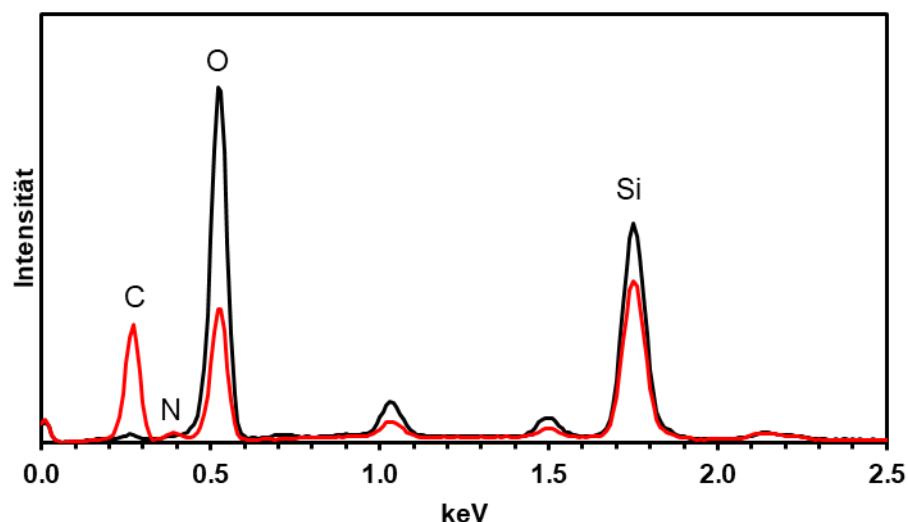
Vor und nach der Immobilisierung wurden die Proben mittels REM (s. **Abbildung 61**) analysiert. Zur besseren Unterscheidung vom Untergrund wurde bei der immobilisierten Probe mit einem Skalpell in die Oberfläche gekratzt.



**Abbildung 61: REM-Aufnahme der mittels GOPS funktionalisierten Glasoberfläche (a) und der kovalent auf einem Glasträger immobilisierten Lipase mit Skalpellschnitt (b) sowie einem Agglomerat der Lipase (c)**

Auf der mit GOPS funktionalisierten Oberfläche ist nur bei starker Vergrößerung eine Mikrostruktur zu erkennen (s. Abbildung 61 a). In Abbildung 61 b ist eine wenige Nanometer dünne Schicht auf dem Glasträger zu sehen. Abbildung 61 c zeigt ein abgeschiedenes Enzymagglomerat. Enzymagglomerate wurden auch in vorherigen Arbeiten mit kovalenter Enzymimmobilisierung z. B. von Chymosin vermehrt aufgefunden. Die Agglomerate der Lipase wurden unter dem Rasterelektronenmikroskop vermessen und weisen stets eine längliche wurm- oder bakterienartige Struktur auf. Ihr Durchmesser beträgt in der Höhe wie Breite ca. 300-400 nm und in der Länge.

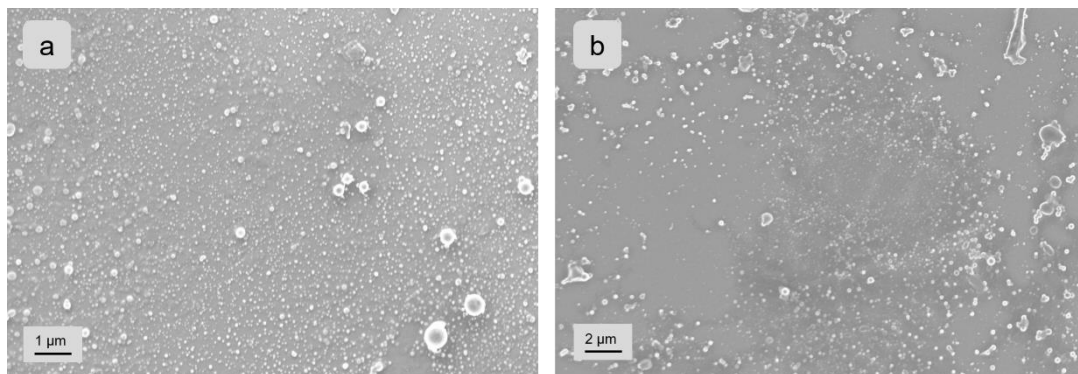
Zur Auflösung einzelner angebundener Enzyme reicht die Messauflösung nicht auf. Durch den Kratzer mit dem Skalpell wird die Schicht sichtbar und teilweise aufgeschoben (Bildmitte). Da die Röntgenstrahlen bei EDX-Messungen je nach angelegter Beschleunigungsspannung bis zu 0,5  $\mu\text{m}$  in die Oberfläche reichen, eignen sich dickere Schichten besser für eine qualitative Analyse. Ein Großteil der Signale wird je nach Untergrund jedoch bereits aus den ersten 100 nm erhalten.<sup>239</sup>. Der durch das Skalpell aufgeschobene Teil der Schicht ermöglicht daher aussagekräftigere Aussagen durch EDX-Messungen als die dünne Schicht des Enzyms selbst. Die zugehörigen EDX-spektren sind in **Abbildung 62** dargestellt.



**Abbildung 62:** EDX-Spektren der kovalent immobilisierten Enzymoberfläche (rot) und der silanisierten Oberfläche (schwarz)

Die EDX-Spektren zeigen den erwarteten Verlauf. Während auf der silanfunktionalisierten Oberfläche lediglich Signale der Elemente Silicium und Sauerstoff detektierbar sind, zeigt der aufgeschobene dünne Enzymfilm eindeutige Kohlenstoff- und Stickstoffsignale. Zudem ist diese Art der kovalenten Enzymimmobilisierung bereits in vorherigen Arbeiten des Arbeitskreises bereits ausführlich untersucht worden.<sup>184</sup>

Die Methodik der Partikelabscheidung verläuft ab diesem Zeitpunkt wie zuvor beschrieben. Dementsprechend wird der immobilisierte Glasträger für 24 h bei 40°C in die Lösung aus stabilisierten Polystyrolpartikel getaucht und nach Herausholen aus der Lösung mit VE-Wasser abgewaschen. Die Molmasse der PEG-*b*-PCL-Blockcopolymere beträgt für diese Versuche jeweils 5000 g/mol. Die REM-Aufnahmen der abgeschiedenen Polystyrolpartikel ist in **Abbildung 63** zu sehen.



**Abbildung 63: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der mittels kovalenter Immobilisierung abgeschiedenen Polystyrolpartikel in unterschiedlicher Vergrößerung.**

Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel mittels kovalent angebundener Enzymimmobilisierung funktioniert. Im Gegensatz zur adsorptiven Variante gibt es keine Aufkonzentrierung von Partikeln an bestimmten Stellen der Probenoberfläche (vgl. Trocknungsrand Abbildung 55). Die Abscheidung der Partikel führt daher zu einer etwas homogenen flächigen Verteilung, dennoch entstehen Fehlstellen. **Tabelle 3** zeigt, dass sich der Wasserkontaktwinkel im Laufe der Prozessschritte ändert. Nach Abscheiden der Polystyrolpartikel ist der Kontaktwinkel deutlich höher als der des Enzyms.

**Tabelle 3: Wasserkontaktwinkel der einzelnen Schritte der kovalenten Immobilisierung**

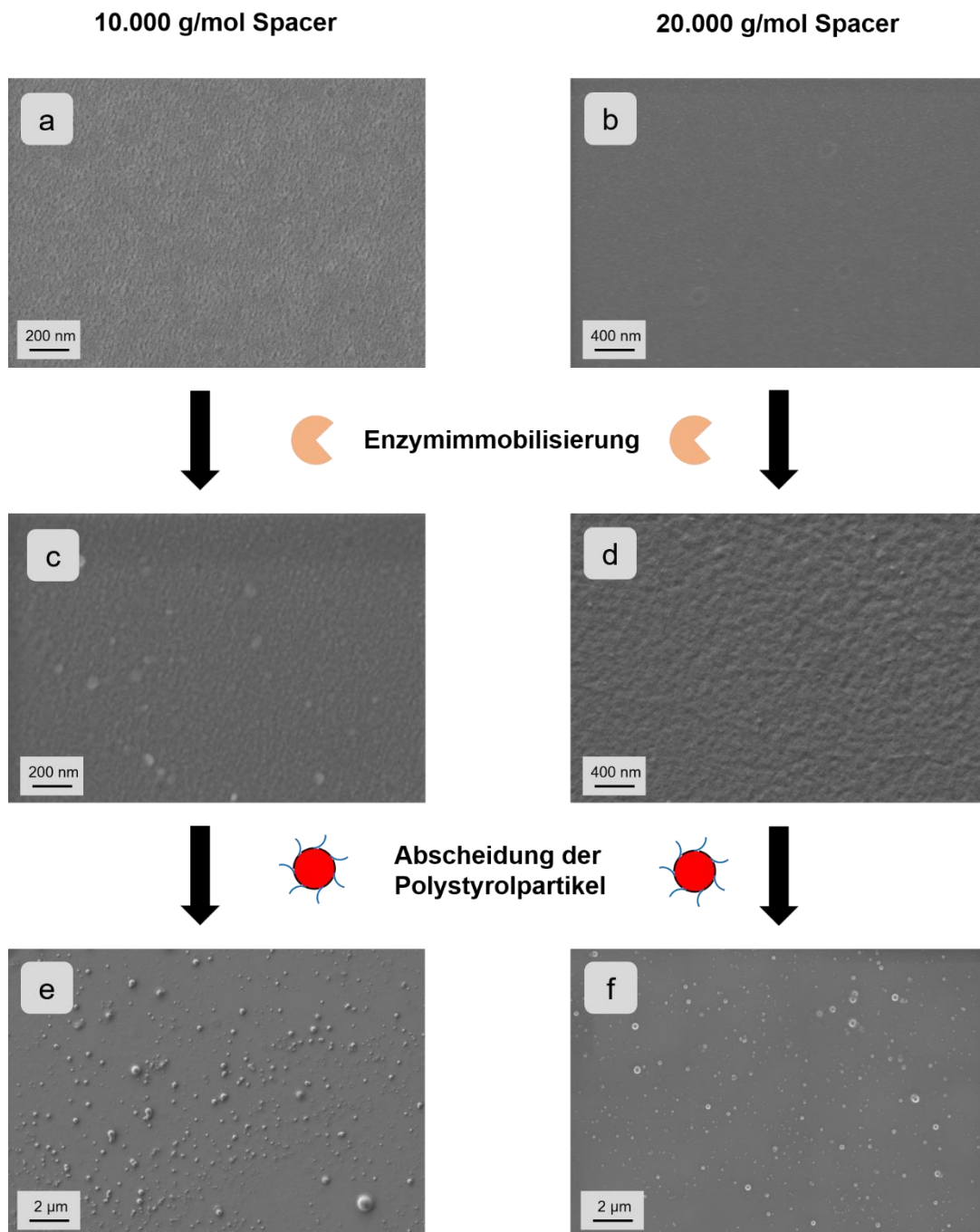
<b>Probe</b>	<b>Kontaktwinkel in °</b>
<b>Unbehandelter Glasträger</b>	104,69 ± 1,27
<b>Sauer gereinigter Glasträger</b>	20,32 ± 0,18
<b>GLYMO-fkt. Glasträger</b>	74,96 ± 2,50
<b>Kov. Geb. Lipase</b>	48,28 ± 0,54
<b>Abgeschiedene Polystyrolpartikel</b>	72,76 ± 0,79

Die Erklärung für den verbleibenden geringen Abstand zwischen den Partikeln ist die eingeschränkte Mobilität der Lipase durch die kovalente Anbindung. Aus diesem Grund erfolgt die Spaltung des Stabilisators der Partikel und die damit einhergehende Abscheidung nur unmittelbar an der Oberfläche, was die maximale Interaktionsmöglichkeiten mit diesen limitiert. Zusätzlich wird über die gewählte Form der kovalenten Anbindung die Orientierung des angebundenen Enzyms nicht festgelegt. Eine falsche Orientierung des aktiven Zentrums des Enzyms kann ebenfalls die katalytische Aktivität einschränken. (vgl. Kapitel 2.3)

### 3.3.6.2 Abscheidungsversuche mit kovalenter Enzymimmobilisierung über Abstandshalter

Ein möglicher Ansatz zur Steigerung der Anzahl bzw. Belegungsdichte an abgeschiedenen Polymerpartikeln ist die Immobilisierung der Lipase über Abstandshalter. Im theoretischen Teil wurden bereits grundlegende Verfahren dieser Immobilisierungstechnik dargestellt (vgl. Kapitel 2.3.2). Als Abstandshalter wurden in dieser Arbeit difunktionelle Diepoxy-PEG-Polymere unterschiedlicher Molmasse verwendet und der Glasträger zuvor mit APTES wie zuvor beschrieben (s. Abbildung 20) funktionalisiert. PEG wurde als Abstandshalter ausgewählt, da es über eine hervorragende Wasserlöslichkeit verfügt. Damit soll eine höhere Mobilität der angebundenen Enzyme in der Lösung ermöglicht werden. Durch hohe Konzentrationen soll eine doppelte Anbindung der difunktionellen Epoxy-PEG-Spacer verhindert werden. Im Anschluss soll idealerweise eine Epoxy-Funktionalität zur kovalenten Anbindung über eine Aminfunktion der Lipase zur Verfügung stehen. In dieser Arbeit geht es um Kettenlängen von 10.000 g/mol bzw. ca. 80 nm und 20.000 g/mol bzw. ca. 160 nm. Mithilfe der unterschiedlichen Kettenlängen sollen ggf. Einflüsse eines größeren Abstands zu untersucht werden. Der genaue Versuchsaufbau ist im experimentellen Teil (Kapitel 5.2.3.4) detailliert beschrieben.

Die REM-Aufnahmen ab der Anbindung des Spacers an die mit APTES silanierte Glasträgeroberfläche sind mit einem Schema in **Abbildung 64** dargestellt. Die abzuscheidenden Polystyrolpartikeln wurden erneut in 5000-5000 g/mol -PEG-PCL-Blockcopolymeren synthetisiert.



**Abbildung 64:** Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der verschiedenen kovalent angebundenen Spacer auf Glas (a und b), der daraufhin kovalent angebundenen Lipase-Moleküle (c und d) sowie der folgenden enzymmoderierten Abscheidung der zuvor stabilisierten Polystyrolpartikel.

Die REM-Aufnahmen (s. Abbildung 64) zeigen den Verlauf vom Anbringen des Spacers über die Enzymanbindung bis hin zur Abscheidung der Polystyrolpartikel. In den Aufnahmen Abbildung 64 a und b ist die Struktur des jeweiligen Diepoxy-PEG-Abstandshalters zu erkennen. Mit kovalenter

Anbindung des Enzyms bei hohem Puffergehalt, um ungewünschte Agglomeration zu verhindern, ist die Änderung dieser Struktur hin zu einer größeren Struktur durch die kovalente Anbindung des Enzyms klar zu sehen (s. Abbildung 64 c und d). Die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel über die durch Spacer-Moleküle angebundene Lipase funktioniert ebenfalls, wie in den Aufnahmen e und f deutlich wird. Die REM-Aufnahmen zeigen sowohl bei der 10.000er als auch der 20.000er Variante ein weitgehend homogenes Bild. Mit einem ähnlichen Abstand zueinander wurden Polystyrolpartikel erfolgreich abgeschieden. Der Abstand der Partikel untereinander ist etwas höher als bei der direkten kovalenten Anbindung der Lipase (vgl. Abbildung 63). Ein möglicher Grund für den erhöhten Abstand und damit einhergehenden geringeren quantitativen Abscheidung der Polystyrolpartikel liegt an den partikelabweisenden Eigenschaften des PEG-Abstandshalters (vgl. Abschnitt 2.4.) Obwohl die Anbindung sowohl in den REM-Aufnahme als auch im Kontaktwinkel bestätigt wurde (s. **Tabelle 4**), ist die Differenz der Änderung des Kontaktwinkels nicht so prägnant wie bei der kovalenten Anbindung (s. Tabelle 2).

**Tabelle 4: Kontaktwinkel der EMA über Spacer**

Probe	Kontaktwinkel in °
Unbehandelter Glasträger	104,69 ± 1,27
Sauer gereinigter Glasträger	20,32 ± 0,18
APTES-fkt. Glasträger	82,44 ± 0,36
10.000 g/ mol-Diepoxyspacer	57,04 ± 1,87
20.000 g/ mol-Diepoxyspacer	58,08 ± 1,29
Kov. geb. Lipase – 10.000 g/mol Spacer	61,90 ± 4,09
Kov. geb. Lipase – 20.000 g/mol Spacer	62,45 ± 1,97

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Abscheidung über das EMA-Verfahren von speziell stabilisierten Polystyrolpartikeln auch mithilfe von Diepoxy-PEG-Spacer-Molekülen gelingt. Eine effektive Verbesserung für eine homogenere und quantitativ stärkere Abscheidung stellt diese Variante jedoch nicht dar.



### 3.3.7 Variation der Partikel

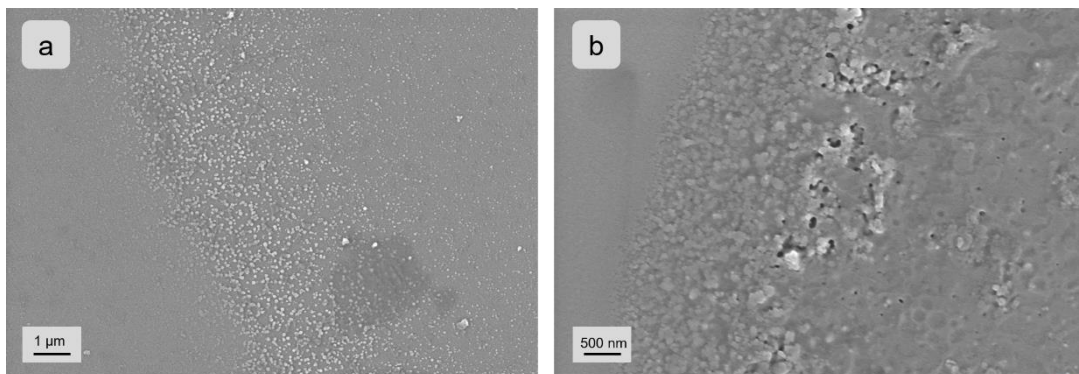
In diesem Abschnitt werden die abzuscheidenden Partikel variiert und ihr Abscheideverhalten über die EMA-Technik mittels Lipase untersucht. Hauptziel dieses Kapitels ist der Nachweis, dass die EMA-Technik mit verschiedenen Partikeltypen (organisch und anorganisch) funktioniert.

#### 3.3.7.1 EMA von Polycyclohexylacrylatpartikeln

Mit den vorherigen enzymmoderierten Abscheidungen Polystyrolpartikeln wurden quantitativ hohe Partikelabscheidungen realisiert, jedoch kann kein durchgehender Film in Form einer Polymerbeschichtung erreicht werden. Polycyclohexylacrylat wird als neues System ausgewählt, da es im Gegensatz zu Polystyrol eine Glasübergangstemperatur aufzeigt, die bei 19 °C und somit im Bereich der katalytischen Aktivität der Lipase liegt.<sup>240</sup> Idee ist es die Glasübergangstemperatur auszunutzen, um eine Verfilmung der Partikel zu ermöglichen und somit einen durchgehenden Polymerfilm auf dem Substrat zu erzeugen.

Die Partikelsynthese erfolgt analog zur vorherigen mit Polystyrol. Cyclohexylacrylat wird in den PEG-PCL-Blockcopolymermizellen radikalisch polymerisiert.

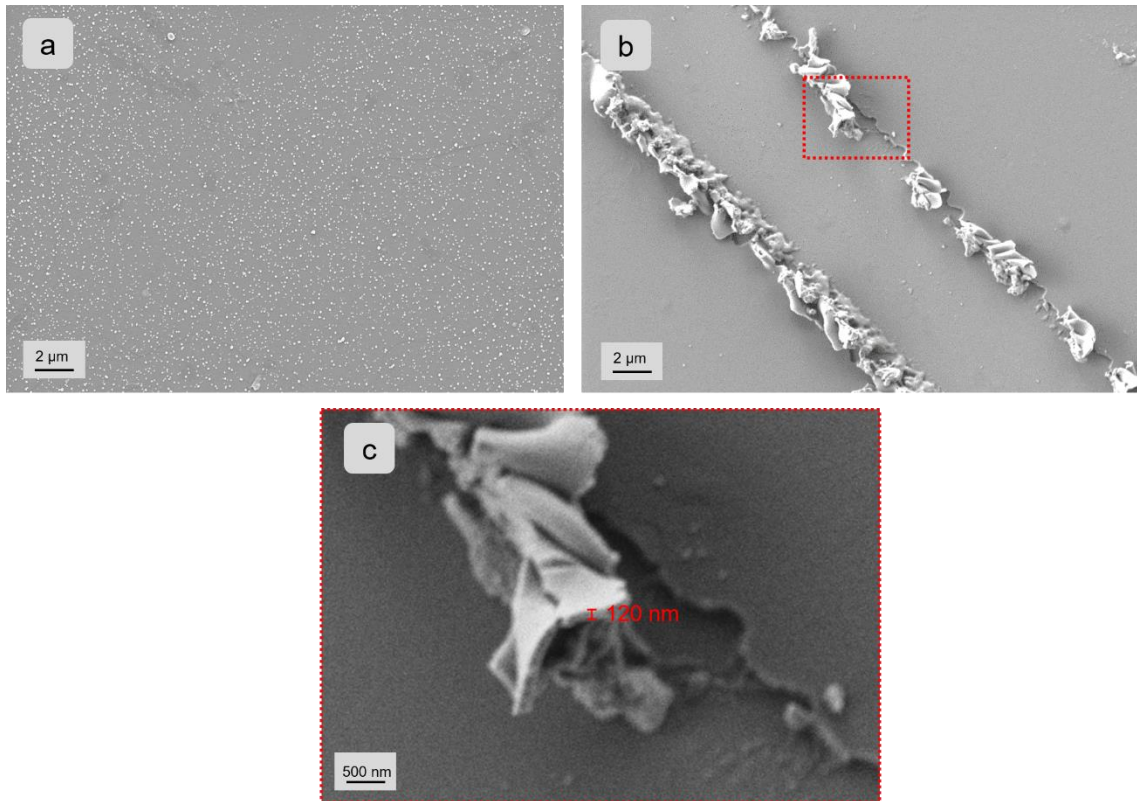
Die EMA über adsorptiv gebundene Lipase erfolgt wie zuvor beim Polystyrol sowohl bei Raumtemperatur (20 °C) als auch bei 40 °C. Die zugehörigen REM-Aufnahmen sind in **Abbildung 65** dargestellt.



**Abbildung 65:** REM-Aufnahmen der EMA von Polycyclohexylacrylat über adsorptiv gebundene Lipase bei 20 °C (a) und 40 °C (b)

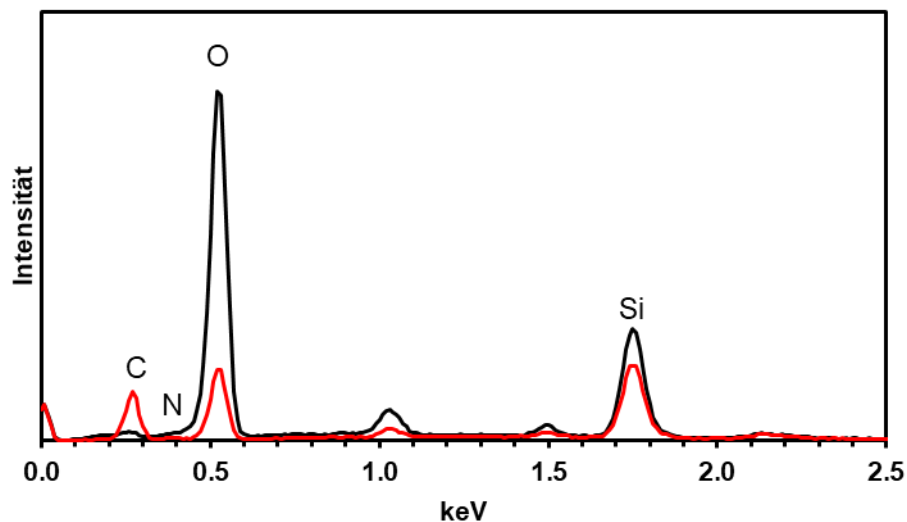
Unter dem Rasterelektronenmikroskop sind die abgeschiedenen Polycyclohexylacrylatpartikel gut zu erkennen. Beide Bilder zeigen Aufnahmen am Trocknungsrand des Enzyms, wobei der unbeschichtete Teil jeweils im linken Bildrand liegt. Abbildung 65 a zeigt die EMA bei 20 °C. Die Bilder ähneln den Abscheidungen von Polystyrol bei 20 °C. Die abgeschiedenen Partikel sind deutlich als solche zu erkennen und es existiert eine klare Grenze zum unbeschichteten Teil, also dem Teil, an dem kein Enzym adsorbiert vorlag. Abbildung 65 b zeigt die Abscheidung bei 40 °C und hier zeigt sich ein komplett anderes Abscheideverhalten. Statt einzelner Partikel erkennt man deutlich eine stattfindende Verfilmung ebendieser. Teilweise sind einzelne Partikel im Verbund noch leicht zu erkennen (mittig im Bild s. Abbildung 65 b). Auch die Anzahl der abgeschiedenen Partikel und damit einhergehend eine dickere Schicht im Vergleich zur Abscheidung bei Raumtemperatur ist auszumachen. Dies ist bereits aus Abscheidungen von Polystyrol bekannt, da auch hier bei 40 °C die Abscheidung mit Temperaturanstieg quantitativ erhöht wurde, welche in diesem Fall durch die Abscheidung oberhalb der Glasübergangstemperatur jedoch signifikant weiter gesteigert wurde. Neu ist zudem die eindeutige Koaleszenz und darauffolgende Filmbildung der Partikel, welche auf die Temperatur weit über der Glasübergangstemperatur zurückzuführen ist.

Im Anschluss an die EMA über Adsorption wurde die EMA von Polycyclohexylacrylat auch über kovalent gebundene Lipase durchgeführt. Die Durchführung erfolgt erneut analog zur kovalenten Abscheidung mit Polystyrol.



**Abbildung 66: EMA von Polycyclohexylacrylat über kovalent gebundene Lipase bei 20 °C (a), 40 °C mit Skalpellkratzer (b) und Bestimmung der Schichtdicke (c)**

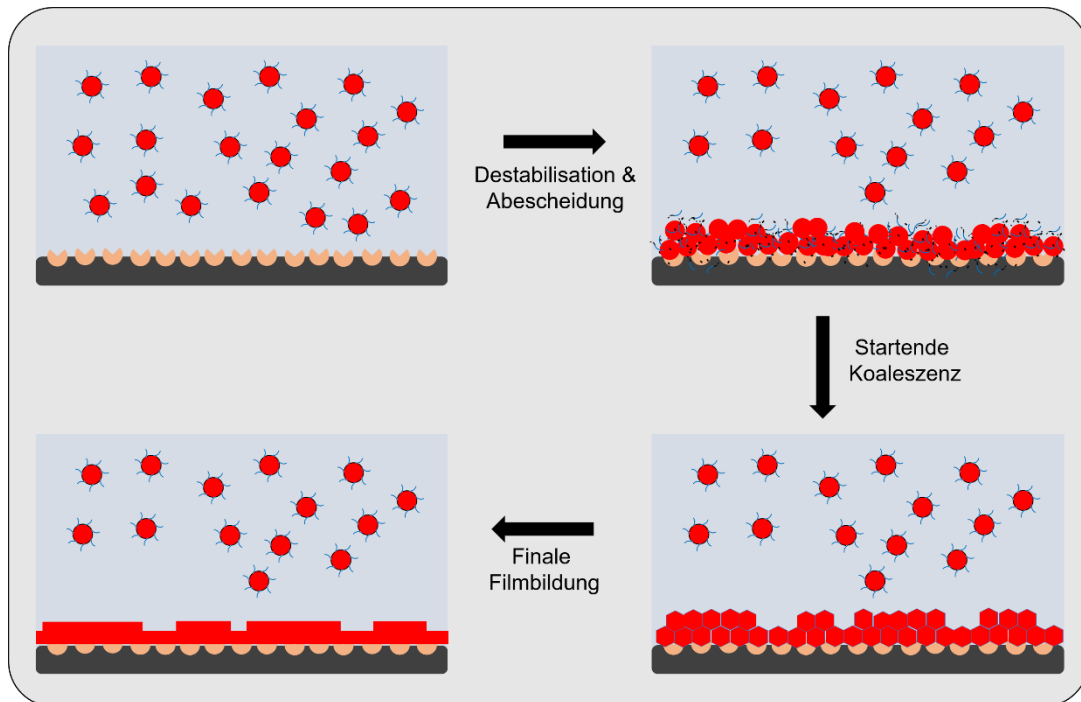
Die kovalente Abscheidung führt bei 20 °C (s. **Abbildung 66 a**) erneut zu einer rein partikulären Abscheidung, da die Temperatur mit nur einem Grad Celsius über der Glasübergangstemperatur nicht ausreicht, um eine Filmbildung zu erzeugen. Ebenfalls wurden quantitativ nicht genügend Partikel abgeschieden, um überhaupt nah genug beieinander zu liegen, damit es zu einer Koaleszenz der Partikel kommen kann. In **Abbildung 66 b** wird die Abscheidung bei 40 °C mit einem Skalpellkratzer gezeigt. Durch den Kratzer wird der homogen abgeschiedene Polymerfilm sichtbar. Die Schichtdicke liegt bei bis zu 120 nm (Auswertung mit ImageJ im Appendix **Abbildung A- 3**). Bei einer Partikelgröße von ca. 60 bis 70 nm folgt daraus, dass mehr als eine Monolage abgeschieden wurde. Zur Sicherstellung, dass es sich bei dem abgeschiedenen Film um Polycyclohexylacrylat handelt, wurden EDX-Messungen per „point and shoot“ durchgeführt (s. **Abbildung 67**).



**Abbildung 67:** EDX-Messungen am abgeschiedenen Polycyclohexylacrylatfilm (**rot**) und im Skalpellkratzer (**schwarz**)

Durch die EDX-Messungen wird bestätigt, dass es sich wie erwartet um einen Polymerfilm handelt. Die rote Kurve zeigt die Messung im Film. Hier ist ein eindeutiges Kohlenstoffsignal ohne Stickstoff, also ohne Enzympeak, zu sehen. Durch den Untergrund entstehen die zugehörigen Signale vom Glas (Si und O). Im Skalpellschnitt selbst wird der Untergrund aus  $\text{SiO}_2$  sichtbar und es besteht kein Polymerpeak mehr.

Ein vereinfachter schematischer Ablauf der Abscheidung und anschließenden Verfilmung ist in **Abbildung 68** dargestellt. Zur Vereinfachung geht das Schema von einer monodispersen Partikelgrößenverteilung aus.

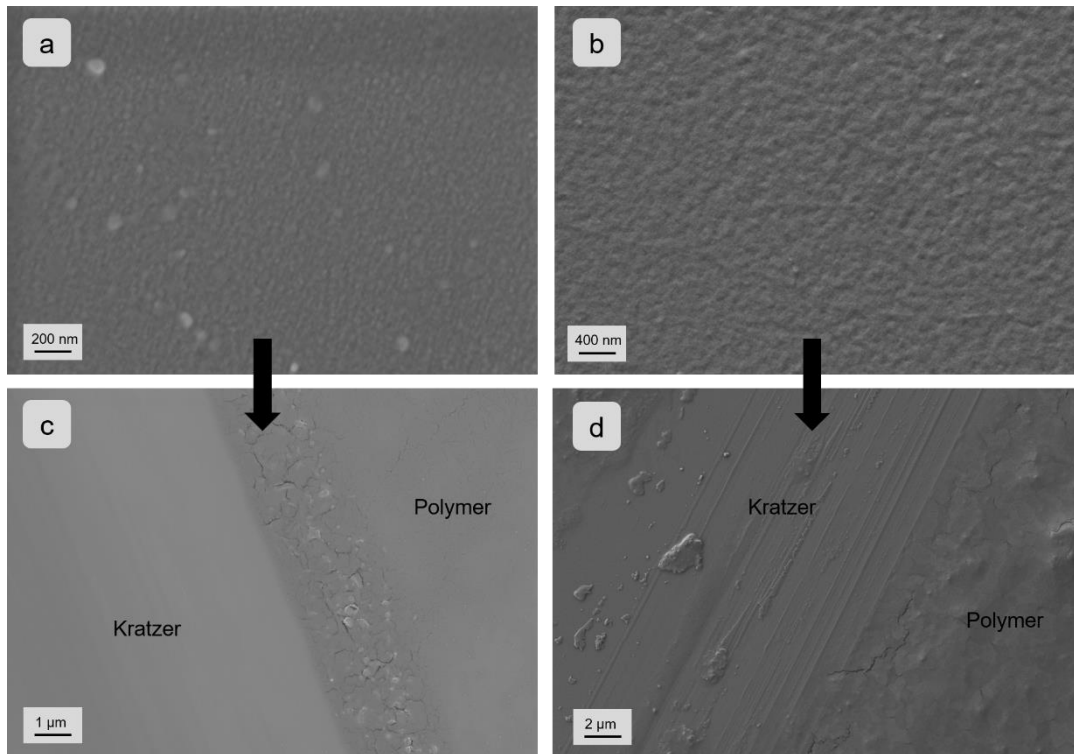


**Abbildung 68: Schematischer Ablauf der enzymatischen Abscheidung, Koaleszenz und Filmbildung von PCHA-Partikeln bei Temperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur**

Durch die durchgeführten Versuche lässt sich auf folgendes Schema schließen: Oberhalb der Glasübergangstemperatur erfolgt zunächst eine verstärkte Abscheidung von Partikeln bis hin zu einer Duolage. Oberhalb davon kann das auf der Oberfläche immobilisierte Enzym aufgrund der sterischen Belegung nicht mehr wirken. Dies führt zu einem selbstterminierenden Prozess. Nach erfolgter Abscheidung werden die abgeschiedenen Partikel nicht mehr durch ihre inzwischen abgespaltenen Stabilisatoren stabilisiert und beginnen miteinander zu koagulieren. Diese führt schließlich zu einer Filmbildung oberhalb der Glasübergangstemperatur.

Mithilfe der EMA oberhalb der Glasübergangstemperatur konnte somit erstmals erfolgreich ein synthetischer Polymerfilm mittels EMA abgeschieden werden.

Im nächsten Schritt wird die kovalente Immobilisierungstechnik auch für PCHA mithilfe von Spacermolekülen variiert. Ebenso wie in den vorherigen Versuchen mit Polystyrol werden erneut Diepoxy-PEG-Spacer mit Molmassen von 10.000 und 20.000 g/mol verwendet. Die Temperatur wird auf 40 °C belassen, damit möglichst Polymerfilme abgeschieden werden können (s. **Abbildung 69**).



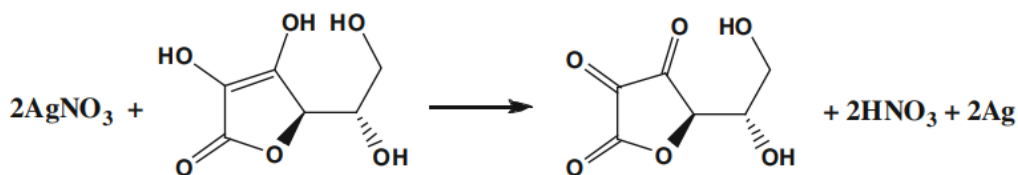
**Abbildung 69: REM-Aufnahme von kovalent gebundener Lipase über 10.000 g/mol Spacer (a) und anschließender EMA von PCHA bei 40 °C (c) sowie von kovalent gebundener Lipase über 20.000 g/mol Spacer (b) und anschließender EMA von PCHA bei 40 °C (d) mit Skalpellkratzern zur besseren Unterscheidung vom Untergrund.**

Die REM-Aufnahmen zeigen sowohl bei der EMA über 10.000 g/mol als auch 20.000 g/mol erfolgreich abgeschiedene Polymerfilme. Die Schichtdicke dieser Abscheidung liegt jeweils bei ca. 50 bis 150 nm und damit in einem ähnlichen Bereich wie bei der kovalenten Immobilisierung ohne Spacer zuvor(s. Abbildung 66). Die abgeschiedenen Filme weisen derweil mehr Fehlstellen mit weniger Polymer und mehrere Risse auf als die direkte kovalente Variante. Dies lässt sich erneut wahrscheinlich auf die geringere Zugänglichkeit und geringere Aktivität an Enzym auf der Oberfläche zurückführen, da bei der direkten kovalenten Immobilisierung die gesamte Oberfläche zur Enzymanbindung zur Verfügung steht, während durch den Spacer schon mehrere Stellen durch Doppelanbindung blockiert oder unzureichende Spaceranbindung gar nicht erst zur Verfügung stehen. An Stellen mit weniger Polymerabscheidung ist demnach mit einer geringeren Enzymanbindung zu rechnen. Dadurch ist festzuhalten, dass die kovalente Spaceranbindung auch in diesem Falle zwar zu einer Abscheidung

führt, jedoch in Punkten der Quantität und der Homogenität der direkten kovalenten Abscheidung unterliegt.

### 3.3.7.2 EMA von Silbernanopartikeln

Nach der erfolgreichen Filmabscheidung mithilfe von PCHA wird in diesem Kapitel untersucht, ob es Möglichkeiten gibt die EMA auch für nichtorganische Partikel zu nutzen. Zu diesem Zweck wurde Silber als Modellsystem ausgewählt. Silber eignet sich besonders als Modellsystem, da Silberpartikel zum einen die für den Prozess nötige Hydrophobie<sup>241</sup> aufweisen und sie u. a. aufgrund ihrer antibakteriellen Wirkung äußerst interessant für Beschichtungen sind.<sup>242</sup> Nötig ist hierfür eine Partikelsynthese innerhalb der PEG-PCL-Blockcopolymermizellen. Die zugrundeliegende Fällungsreaktion von Silbernitrat über Ascorbinsäure (Vitamin C) genutzt, deren Basisreaktion in **Abbildung 70** dargestellt ist.

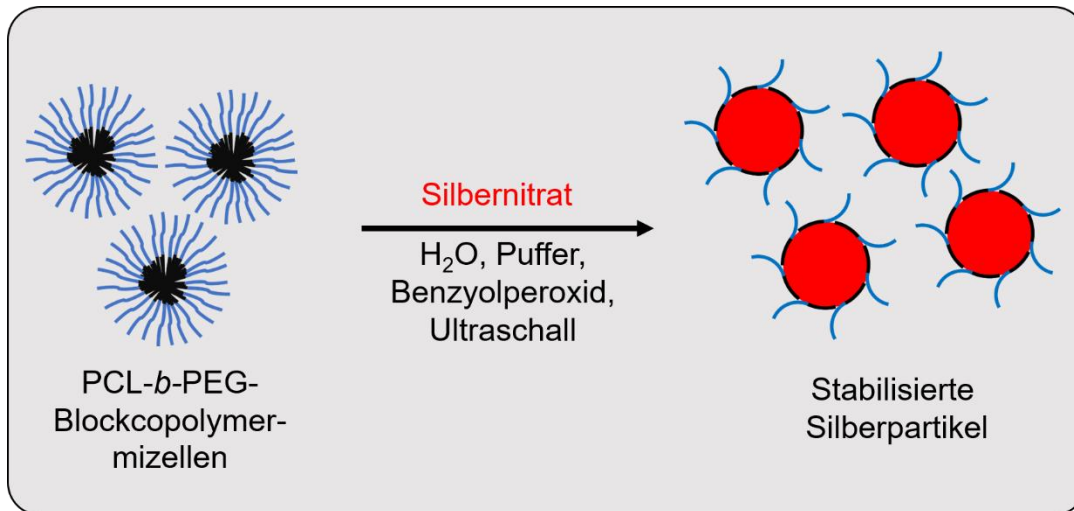


**Abbildung 70: Basisreaktion der Silberpartikelsynthese**

Diese bekannte Basisreaktion mit Ascorbinsäure zur Reduktion von Silbernitrat wird auf die PEG-PCL-Blockcopolymermizellen angepasst. Als Inspiration dient hierbei die Arbeit von Moghimi-Rad et al. Die Autoren nutzen Natriumdodecylbenzolsulfonat als Tensid bzw. Stabilisator zur Stabilisierung der entstehenden Silberpartikel. Die Reaktion findet dabei zur besseren Neuordnung der Tenside im Ultraschallbad statt.<sup>243</sup>

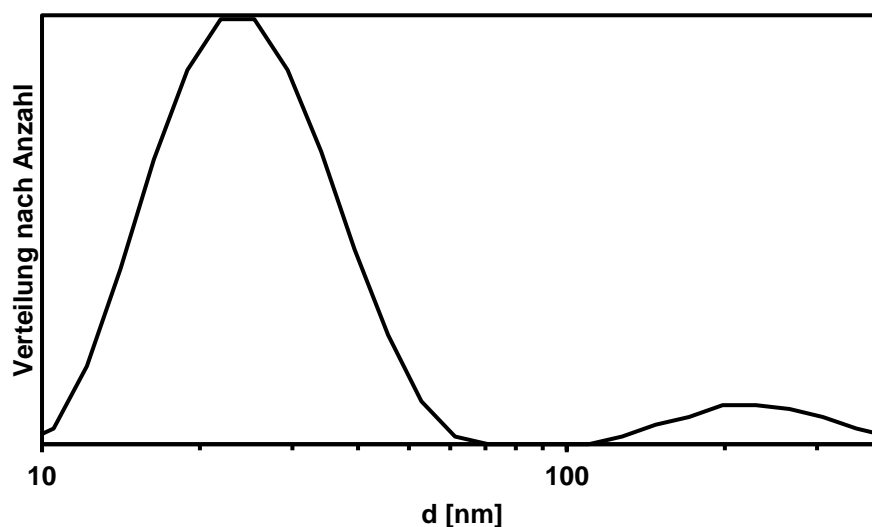
In der vorliegenden Arbeit werden als Stabilisator weiterhin die PEG-*b*-PCL-Blockcopolymere verwendet. Das Reaktionsschema ist in **Abbildung 71** dargestellt.





**Abbildung 71: Herstellung der stabilisierten Silberpartikel**

Die Herstellung der stabilisierten Silberpartikel gelingt nur mit dem PEG(2000)-*b*-PCL(2000)-Blockcopolymer. Größere Blockcopolymere führen zu einer Aggregation und damit einhergehendem Bodensatz in der Synthese. Dies führt zu einer nicht ausreichenden Stabilisierung und dadurch im Anschluss nicht möglichen EMA. Ein möglicher Grund ist die schwächere Wechselwirkung der anorganischen Silberpartikel mit dem PCL-Polymer im Vergleich zum organischen Polystyrol oder Polycyclohexylacrylat. Die Größenverteilung der mittels PEG(2000)-*b*-PCL(2000)-Blockcopolymer stabilisierten Silberpartikel ist in **Abbildung 72** dargestellt.

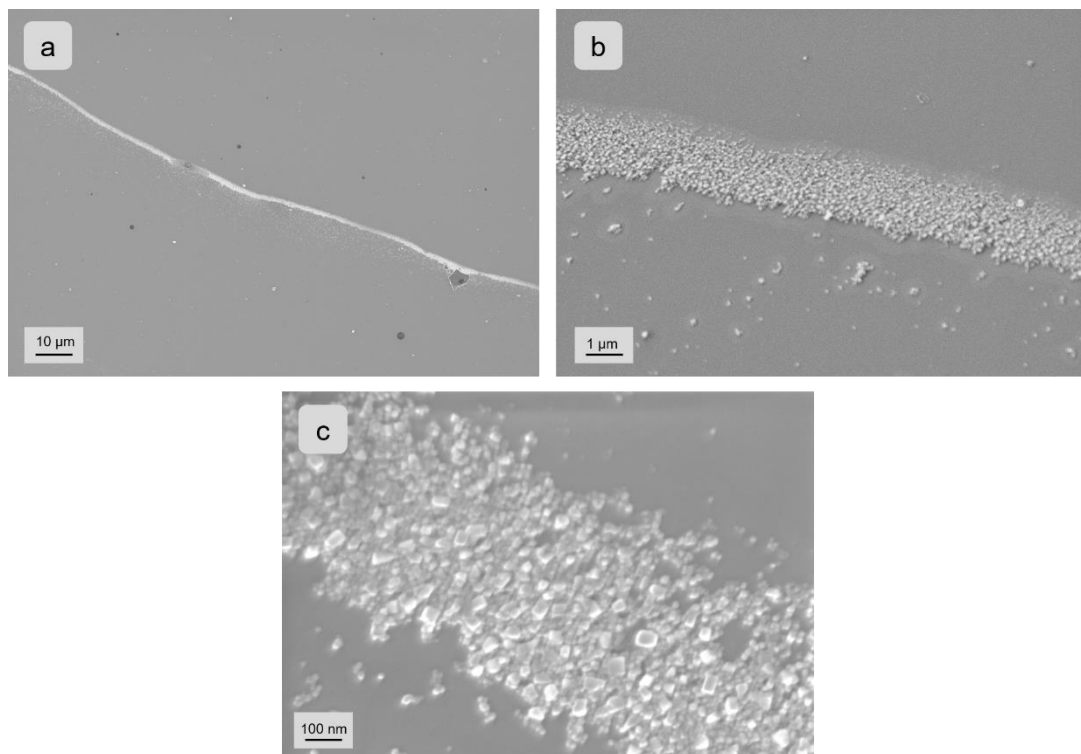


**Abbildung 72: DLS-Größenverteilung der mit PEG(2000)-*b*-PCL(2000)-Blockcopolymer stabilisierten Silberpartikel**



Die DLS-Messung zeigt, dass die große Mehrheit der Silberpartikel um die 30 nm groß ist, während eine kleine Anzahl auch größere Aggregate um die 250 nm bildet. Nach der erfolgreichen Partikelsynthese ist es möglich die üblichen EMA-Prozesse mithilfe der Lipase analog zu den vorherigen Versuchen durchzuführen, da der Stabilisator weiterhin durch die Polycaprolactonbasis von der Lipase abgebaut werden kann.

In den ersten Versuchen geht es erneut um die Abscheidung durch adsorptiv gebundene Lipase auf Glas. Als Abscheidetemperatur wurde 40 °C gewählt, um eine hohe Enzymaktivität zu erhalten. Die Abscheidungen erfolgen analog zu den vorherigen Versuchen über 24 Stunden. Die REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen sind in **Abbildung 73** zu sehen.

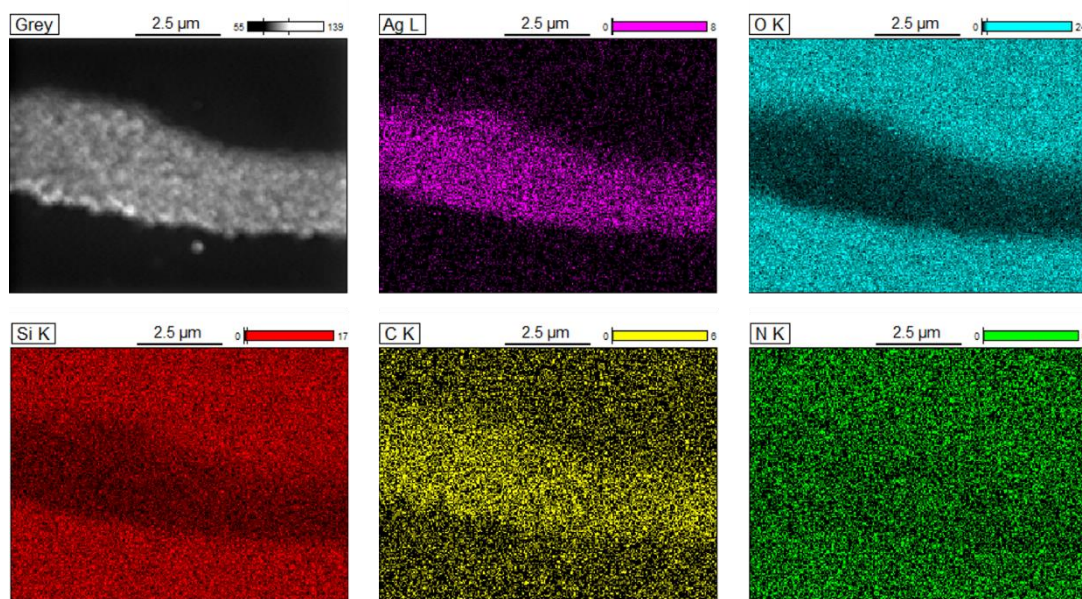


**Abbildung 73: REM-Aufnahmen der EMA von Silberpartikeln nach Lipaseadsorption auf Glas in verschiedenen Vergrößerungen am Trocknungsrand.**

Die Abscheidung der Silberpartikel nach Adsorption erfolgt analog zur Abscheidung von organischen Partikeln. Am Trocknungsrand ist die Konzentration des Enzyms am höchsten und damit werden dort erheblich mehr Silberpartikel abgeschieden als im Innenbereich. Bei starker Vergrößerung ist zudem zu sehen, dass sich dort Multilagenschichten an Partikeln bilden. Das adsorbierte

Enzym besitzt aufgrund der hohen Konzentration am Trocknungsrand also noch genügend Freiheiten, um teilweise wieder in Lösung zu gehen und nah an der Oberfläche auch nach Bedeckung der unteren Enzymteilchen weiterhin wirken zu können. Dies war bei Polystyrol ebenfalls zu beobachten (vgl. Kapitel 3.3.3). In der Abbildung 73 c ist zu sehen, dass die abgeschiedenen Partikel anders als die organischen Partikel keine exakt runde Struktur aufweisen, sondern auch Ecken und Kanten besitzen, ergo auch kristalline Strukturen zeigen. Dies ist zwar auch beim Verfahren von Moghimi Rad et al. teilweise so aufgetreten, jedoch werden zur Sicherstellung, dass es sich definitiv um elementare Silberpartikel und nicht um kristalline Silbernitratstrukturen handelt, zusätzlich EDX-Messungen zur Elementaranalyse vorgenommen.

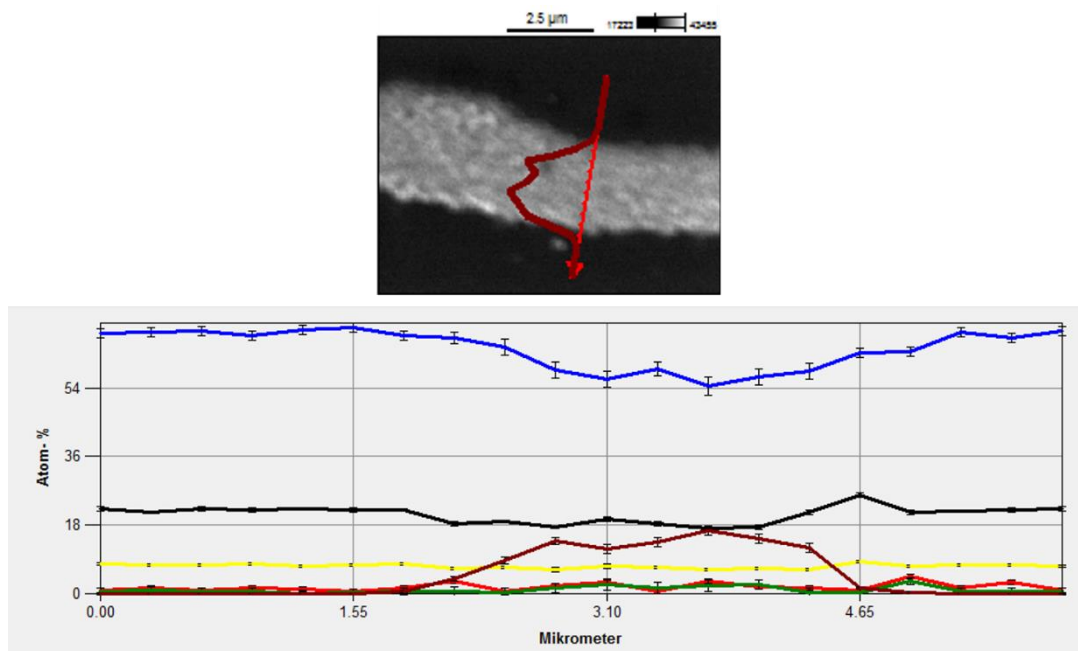
Die EDX-Messungen (s. **Abbildung 74**) wurden im „Mapping“-Modus am Trocknungsrand bei 8 kV durchgeführt.



**Abbildung 74: EDX-Messungen im Mapping-Modus der adsorptiv abgeschiedenen Silberpartikel farblich dargestellt.**

Die EDX-Messungen sind je nach Element farblich unterschiedlich dargestellt. Die Stärke der jeweiligen Farbe korreliert mit der gemessenen Intensität. Wie zu erwarten zeigt sich, dass die abgeschiedenen Partikel starke Signale von Silber und Kohlenstoff aufweisen, während Sauerstoff und Silizium lediglich neben den Partikeln und damit auf der direkten Glasoberfläche ( $\text{SiO}_2$ ) starke Signale zeigen. Der Kohlenstoffanteil entsteht durch verbleibende Reste des Stabilisators.

Besonders interessant ist, dass Stickstoff überall auf der Probe in gleichen Bestandteilen vorkommt. Für den Fall, dass die abgeschiedenen Partikel aus Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) bestehen würden, müssten sowohl Sauerstoff als auch Stickstoff hier starke Signale aufweisen. Für genauere Ergebnisse wurde zusätzlich eine 6  $\mu\text{m}$  breite Strecke quer über den Trocknungsrand detailliert vermessen (s. **Abbildung 75**).

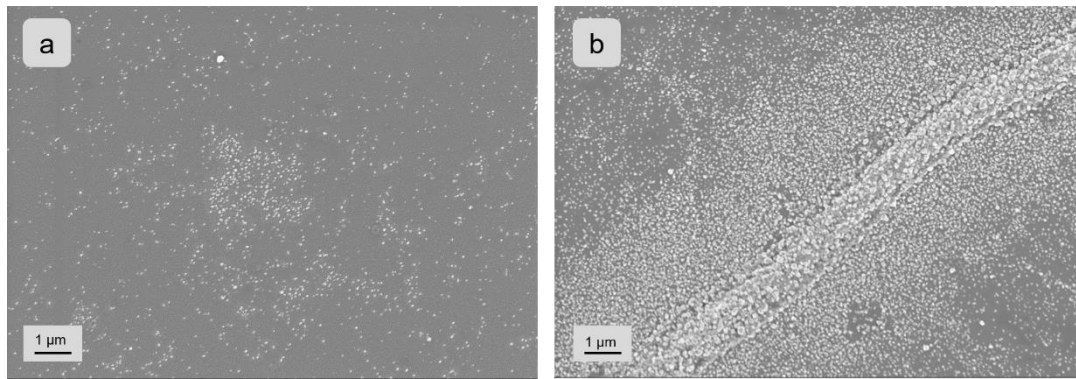


**Abbildung 75:** EDX-Messung quer über die abgeschiedenen Silberpartikel am Trocknungsrand mit folgenden Elementen: Kohlenstoff (rot), Stickstoff (grün), Sauerstoff (blau), Natrium (gelb) und Silber (braun).

Anhand der detaillierten Messung ist zu sehen, dass das starke Sauerstoffsignal bei den Partikeln eindeutig abnimmt, während Silber im gleichen Maße steigt und Stickstoff über die gesamte Probe gleichbleibt.

Somit ist eindeutig gezeigt, dass die abgeschiedenen Partikel wie gewünscht elementare Silberpartikel sind und somit erstmals auch anorganische Partikel mittels EMA erfolgreich abgeschieden wurden.

Im nächsten Teil wird die Abscheidung der Silberpartikel mittels kovalenter Immobilisierung betrachtet (s. **Abbildung 76**). Die Versuche wurden erneut bei 40 °C und über 24 Stunden durchgeführt.

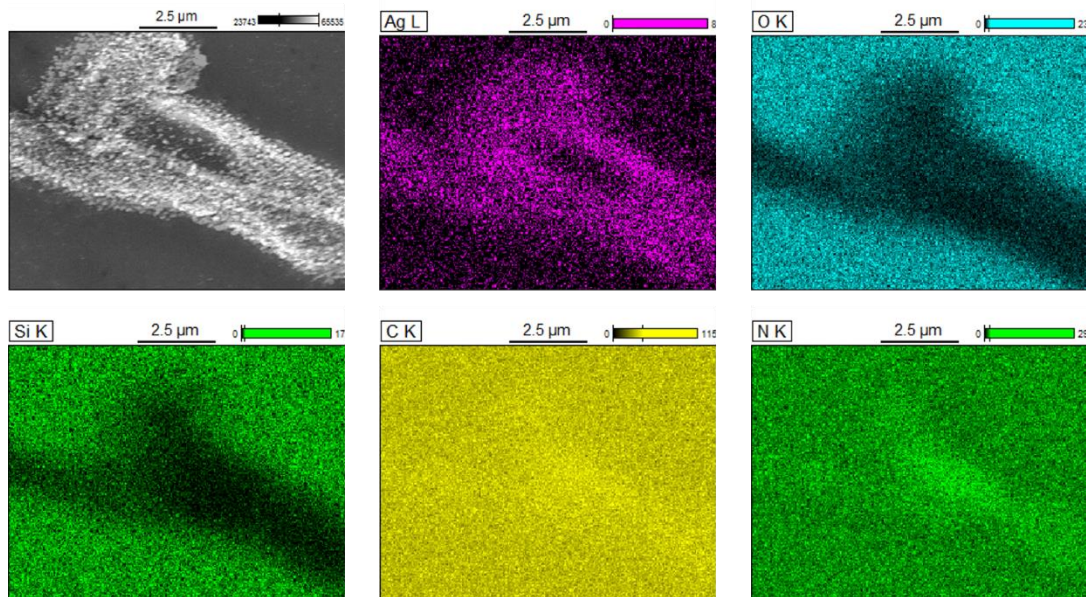


**Abbildung 76: REM-Aufnahmen enzymatischen Abscheidung von Silberpartikeln nach kovalenter Enzymimmobilisierung mittig in der Probe (a) und an einem Enzymaggregat (b).**

Die Abscheidung von Silberpartikeln nach kovalenter Immobilisierung (s. Abbildung 76 a) verläuft erneut analog zur Abscheidung von Polymerpartikeln: Die Abscheidung in Form einzelner Partikel ist homogener über die Probe verteilt als bei der adsorptiven Variante.

Bei der kovalenten Enzymimmobilisierung entstehen in geringer Anzahl Enzymaggregate. Diese sind für homogene Abscheidungen zwar unerwünscht, bieten jedoch interessante Analysemöglichkeiten (s. Abbildung 76 b). An den Enzymaggregaten ist die Enzymkonzentration extrem hoch und dies zeigt die hochspezifischen Eigenschaften des EMA-Prozesses sehr gut auf: Mittig auf dem Aggregat, also dem Punkt mit der höchsten Enzymaktivität werden sowohl die meisten als auch die größten Silberpartikel abgeschieden. Nach außen hin lässt die Anzahl der abgeschiedenen Partikel stetig nach, da die Enzymaktivität hier ebenfalls nachlässt. Auch an den Aggregaten wurden EDX-Messungen durchgeführt (s. **Abbildung 77**).





**Abbildung 77: EDX-Messungen im Mapping-Modus der EMA-Abscheidungen an Enzymaggregaten von Silberpartikeln nach kovalenter Immobilisierung.**

Die EDX-Messungen wurden an einer Stelle vorgenommen, an der mehrere Enzymaggregate aneinander liegen. Im Graubild sind die abgeschiedenen Partikel deutlich auf und neben den Enzymaggregaten zu erkennen. Die Messungen im Mapping-Modus zeigen die erwarteten Ergebnisse. Bei den Partikeln werden deutliche Silbersignale erfasst, während sowohl Sauerstoff als auch Silizium nur noch sehr schwache Signale vom Untergrund, bestehend aus Siliziumdioxid aufweisen. Kohlenstoff und Stickstoff zeigen zwar stärkere Signale auf den Enzymaggregaten als beim Untergrund, dies ist jedoch einfach zu begründen: Da die Enzymaggregate mehrere Hundert Nanometer dick sind, und diese aus Aminosäuren aufgebaut sind, lassen sich die Signale von Stickstoff und Kohlenstoff leicht auf diese zurückführen. Die eindeutigen Silbersignale in Verbindung mit fehlendem Sauerstoff zeigen eindeutig, dass die abgeschiedenen Partikel auch bei dieser EMA-Variante elementare Silberpartikel sind.

Anhand dieser Versuche wird gezeigt wie vielfältig die EMA im Destabilisierungsprozess einsetzbar ist, da auch anorganische Partikel mithilfe des gleichen Prozesses abgeschieden werden können wie organische Polymerpartikel. Auch das Abscheideverhalten lässt sich übertragen: Mithilfe der adsorptiven EMA-Variante werden die Partikel nur innerhalb des Enzymbereichs abgeschieden, wobei die größte Konzentration am Trocknungsrand des Enzyms

zu finden ist. Bei der kovalenten Variante ist die Abscheidung deutlich homogener über die gesamte Probe verteilt. Eine Aufkonzentration an Partikeln erfolgt hier lediglich bei den Enzymaggregaten.

### 3.3.8 Kapitelzusammenfassung

Die Variationsmöglichkeiten im EMA-Destabilisierungsprozess mittels Lipase sind vielfältig. Über die Wahl der Größe des PEG-*b*-PCL Blockcopolymers kann die Größe der abzuscheidenden Polymerpartikel direkt im Herstellungsprozess gesteuert werden. Die Partikelgrößen variieren je nach vorgegebenem Blockcopolymer zwischen 50 bis über 120 nm. Ebenso ist es möglich unterschiedliche Polymere innerhalb der Mizelle zu polymerisieren und anschließend enzymatisch abzuscheiden. Die Glasübergangstemperatur der Polymere entscheidet hierbei darüber, ob es zu einer partikulären Abscheidung oder einer Verfilmung der abgeschiedenen Partikel kommt: Liegt die  $T_g$  oberhalb der Abscheidetemperatur werden feste Polymerpartikel abgeschieden, liegt die  $T_g$  unterhalb der Abscheidetemperatur kommt es zu einer Verfilmung der Partikel auf der Oberfläche. Mithilfe von Polycyclohexylacrylat kann so ein dünner Film auf der Oberfläche erzeugt werden. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Destabilisierungsprozess mittels Lipase nicht auf organische Partikel begrenzt ist, sondern z. B. auch Silbernanopartikel innerhalb der gleichen Blockcopolymermizellen synthetisiert und anschließend enzymatisch abgeschieden werden können.

In diesem Kapitel wurde darüber hinaus die Art der Enzymimmobilisierung variiert. Die direkte kovalente Anbindung führt zu einer teilweise homogenen Abscheidung, bietet quantitativ jedoch keinen direkten Vorteil gegenüber der adsorptiven Variante aufgrund der geringeren Mobilität des gebundenen Enzyms. Die kovalente Abscheidung über Spacer geht mit einem Quantitätsverlust einher, welcher durch die PEG-Spacer zu begründen ist.

### 3.4 EMA als Aufbauvariante synthetischer Polymere

Dieses Kapitel befasst sich mit der Aufbauvariante der EMA. Im Gegensatz zur bisher thematisierten Destabilisierungsvariante werden die abzuscheidenden Polymere nicht in einem vorherigen Schritt polymerisiert und stabilisiert, sondern in situ durch das an der Oberfläche immobilisierte Enzym polymerisiert. Inspiriert ist der Teil dieser Arbeit durch die Arbeiten von Strube und Büngeler mit der EMA von Eumelanin Nanopartikeln. Diese Grundlagen wurde bereits im theoretischen Teil im Kapitel 2.5 „EMA als Aufbauvariante zur Abscheidung von Eumelanin“ behandelt.

Auf Grundlage dieser Arbeit mit der Abscheidung von Eumelanin wird ein neues EMA-Konzept zur Abscheidung von synthetischen Polymeren erstellt. Benötigt wird ein Enzym, welches in der Lage ist Polymerisationsreaktionen, vorzugsweise in wässrigem Milieu zu katalysieren. Zu diesem Zweck wurde die Meerrettichperoxidase (HRP) ausgewählt. HRP ist u. a. in der Lage *in vitro* über einen Mediator (meist ein Diketon) und Wasserstoffperoxid vinylhaltige Monomere radikalisch zu polymerisieren. Dieser Zusammenhang wurde bereits ausführlich im Kapitel 2.2.3 „Meerrettichperoxidase“ beschrieben.

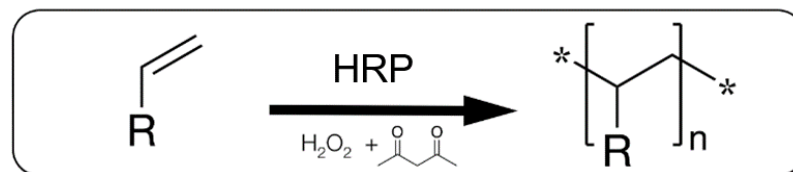
Inspiration für dieses Kapitel bieten die Arbeiten von Strube und Büngeler mit der EMA des Proteins Eumelanin durch immobilisierte Tyrosinase (s. Kapitel 2.5)



### 3.4.1 EMA von radikalisch polymerisierten Polymeren am Beispiel des Modellsystems PMMA

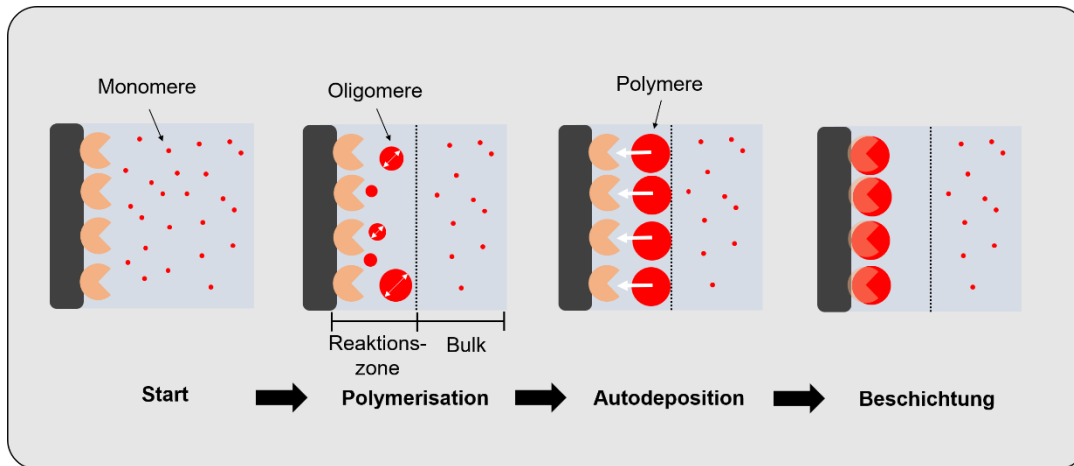
In diesem ersten Unterkapitel werden die Grundlagen des EMA-Prozesses mit HRP und Polymerpartikeln am Beispiel vom Modellsystem PMMA erläutert. PMMA wurde u. a. aufgrund seiner vielfältigen technischen Anwendungsmöglichkeiten<sup>244</sup>, seiner radikalischen Polymerisierbarkeit und vor allem aufgrund seiner Wasserlöslichkeit ausgewählt.<sup>245</sup>

Die zugrundeliegende Reaktionsgleichung der radikalischen Polymerisation vinylicher Monomere über HRP mit Wasserstoffperoxid und Acetylaceton als Mediator ist in **Abbildung 78** dargestellt.



**Abbildung 78: Schematischer Mechanismus der HRP-initiierten radikalischen Polymerisation<sup>2</sup>**

Die radikalische Polymerisation von PMMA und ähnlichen vinylhaltigen Monomeren im wässrigen Milieu mit HRP ist bereits gut erforscht. Im Bereich der EMA wird diese Reaktion nun mit auf dem Substrat immobilisierter HRP genutzt, um die Polymerisation ortsspezifisch nah an der Oberfläche stattfinden zu lassen. Mit steigender Kettenlänge des entstehenden Polymers wird das zuvor im Wasser lösliche MMA nach und nach hydrophober bis das entstehende Polymer nicht mehr im Wasser löslich ist und schließlich ausfällt. Dieser postulierte Mechanismus ist in **Abbildung 79** schematisch aufgezeigt.

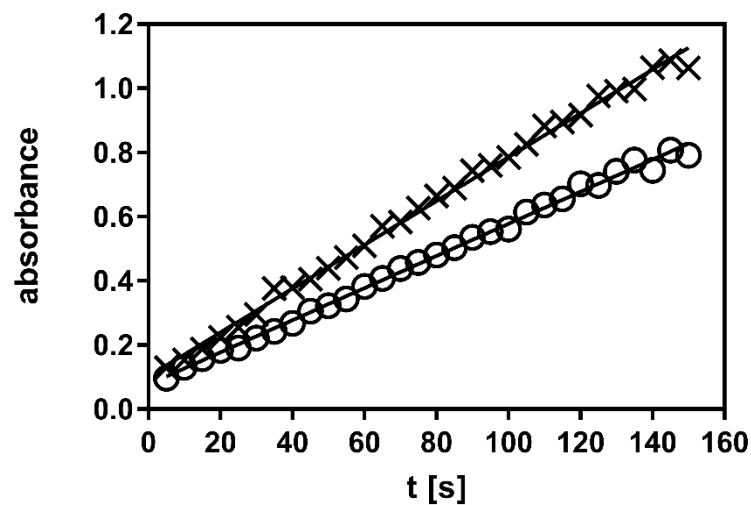


**Abbildung 79:** Postulierter schematischer Mechanismus der EMA von MMA mit immobilisierter HRP.

### 3.4.1.1 EMA von PMMA über adsorbierte HRP

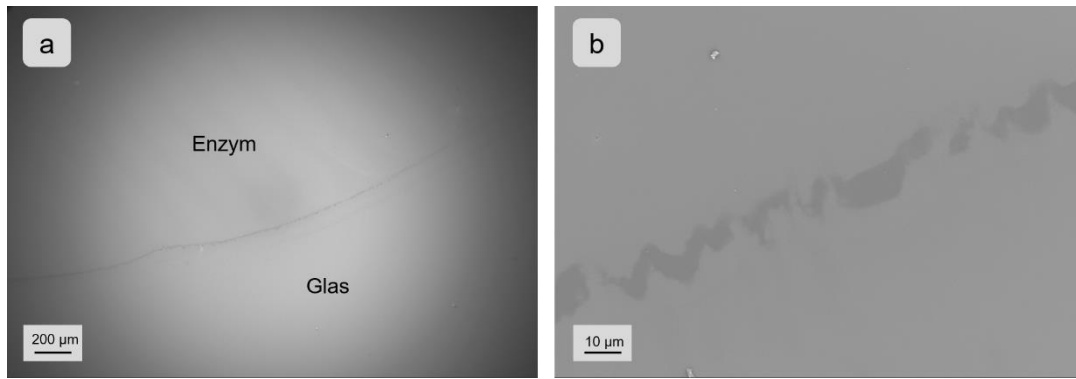
*Disclaimer: Teile der in diesem Unterkapitel 3.4.1.1 durchgeführten Arbeiten wurden gemeinsam mit Daniel Appel und Marco Lüther durchgeführt und bereits im Journal „Macromolecular Materials and Engineering“ unter dem Titel „Enzyme-Mediated In Situ Buildup and Site-Specific Addressing of Polymeric Coatings“ veröffentlicht.<sup>2</sup>*

Für die Abscheideversuche per Adsorption wurden 80  $\mu\text{L}$  einer 500 Units/mL HRP-Lösung in ultrareinem Wasser auf dem sauer und basisch gereinigten Glasträgern aufgetropft. Zunächst wurde bestimmt, wieviel Enzym auf der Oberfläche nach dem anschließenden Waschvorgang verbleibt. Dazu wurde die Aktivität der freien Enzymlösung mit der des abgewaschenen Enzyms verglichen (s. **Abbildung 80**).



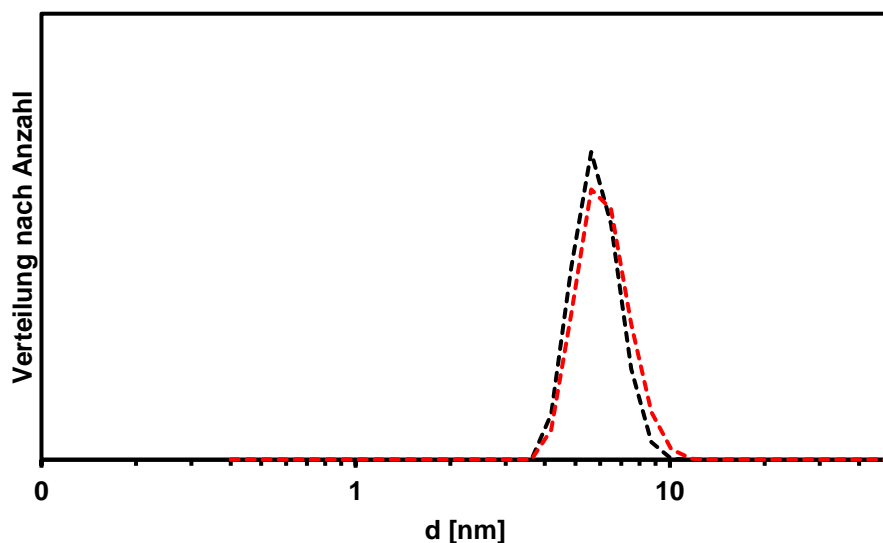
**Abbildung 80:** UV-Vis-Messungen der freien Enzymlösung (X) und dem nach der Adsorption abgewaschenen Gegenpart des adsorbierten Enzyms (O).

Die in den UV-Vis-Messungen bei der Wellenlänge von 405 nm nach einem standardisierten Testkit gezeigten Kurvenverläufe der Absorption pro Zeit sind proportional zur Enzymaktivität. Für die freie HRP-Lösung (X) entspricht das lineare Verhältnis 0.42 während es beim abgewaschenen Enzym 0.31 beträgt. Dies bedeutet, dass die abgewaschene Enzymlösung noch ca. 73 % der ursprünglichen Aktivität aufweist. Somit verbleiben 27 % der ursprünglich eingesetzten Aktivität adsorbiert auf der Probe. Wie hoch die tatsächliche wirksame Aktivität des adsorbierten Enzyms ist, kann nicht direkt bestimmt werden. Die Messungen zeigen jedoch einen guten Richtwert, dass weniger als ein Viertel des eingesetzten Enzyms tatsächlich an das Glasoberfläche adsorbiert und nicht mehr im üblichen Spülvorgang abgewaschen werden kann. Nach dem Waschvorgang ergibt sich für die Oberfläche unter dem REM folgendes Bild (s. **Abbildung 81**):



**Abbildung 81: REM-Aufnahmen der adsorbierten HRP auf Glas am Trocknungsrand in verschiedenen Vergrößerungen.**

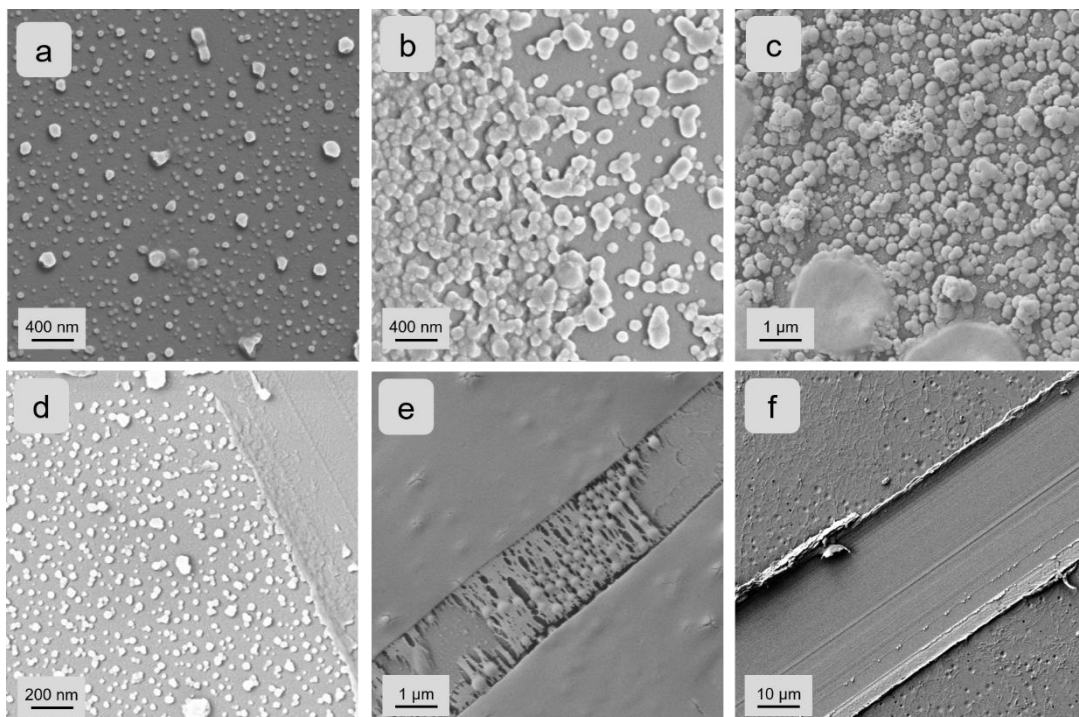
Die adsorbierte HRP ergibt nach dem Waschvorgang ein ähnliches Bild zur in den vorherigen Kapiteln genutzten Lipase: Es verbleibt ein schmaler Trocknungsrand (ca. 5- 10 µm) sichtbar unter dem REM, während im inneren der Beschichtung die adsorbierte HRP aufgrund der geringen Größe von ca. 4-8 nm (s. **Abbildung 82**) (Literaturwert für ein einzelnes Moleküls: ~ 5nm)<sup>246</sup>.



**Abbildung 82: DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Anzahl der Teilchen) von HRP (c=1 mg/mL) in Reinstwasser (schwarz) und Puffer (rot).**

Die nachfolgenden Abscheideversuche mit MMA werden mit dem Ziel einer quantitativ möglichst hohen Abscheidung, nahe einer gesättigten MMA-Lösung in Reinstwasser durchgeführt. Dies soll sicherstellen, dass genügend Monomere für die Polymerisation zur Verfügung stehen. Die Abscheidetemperatur wurde auf 40 °C für maximale Aktivität festgelegt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass

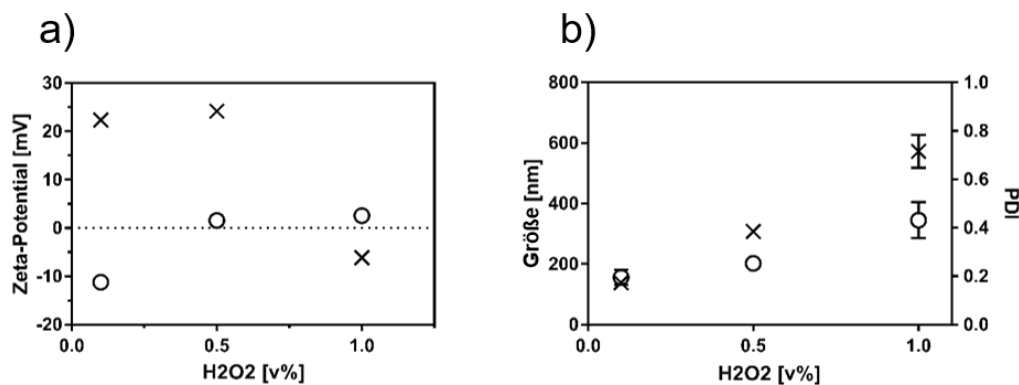
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwar nötig für die Katalyse der radikalischen Polymerisation ist, jedoch die HRP in die inaktive Oxyperoxidase umwandelt<sup>114</sup>, wird die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bei gleichbleibender Acetylacetonkonzentration (0,75 v-%) variiert, um die für die Abscheidung optimale Konzentration zu ermitteln. Vor der Abscheidung wird die Lösung im Ultraschallbad für eine optimale Verteilung behandelt. **Abbildung 83** zeigt die zugehörigen REM-Aufnahmen bei den pH-Werten 4 und 8 bei jeweils 0,1 %; 0,5 % und 1,0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration. Die Versuche haben gezeigt, dass die Reaktion nach ca. 24 h vollständig abgelaufen ist.



**Abbildung 83:** REM-Aufnahmen der PMMA-Abscheidungen nach Adsorption von HRP bei pH 4: 0,1 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a); 0,5 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b); 1,0 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c) und pH 8: 0,1 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d); 0,5 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (e); 1,0 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (f). Sichtbare Kratzer erfolgten mit einem Skalpell zur besseren Unterscheidung vom Untergrund.

Die REM-Aufnahmen bestätigen bei allen durchgeführten Versuchen sichtbar abgeschiedenes PMMA. Dabei zeigen sich sowohl bezüglich des pH-Wertes als auch bzgl. der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration deutliche Einflüsse auf das Abscheideverhalten von PMMA. Im sauren pH-Bereich ist eine partikuläre Abscheidung zu beobachten, die mit steigender H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration sowohl quantitativ als auch in Form der Größe der abgeschiedenen PMMA-Partikel ansteigt. Im basischen pH-Bereich ist für geringe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,1 v-%) ebenfalls eine partikuläre Abscheidung, während bei steigender

Konzentration ab 0,5 v-% Polymerfilme entstehen. Zur Klärung dieses Zusammenhangs wurden DLS-Messungen von in Lösung polymerisierten PMMA-Partikeln durchgeführt (s. **Abbildung 84**). Die Reaktion in Lösung lässt sich nicht 1:1 auf die Abscheidungsreaktion übertragen, lässt jedoch Rückschlüsse auf Tendenzen zu. Auch hier steigen sowohl die Partikelgrößen als auch der PDI korrelativ mit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration an (s. **Abbildung 84 b**). Durch den höheren Anteil an Wasserstoffperoxid steigt somit die Mengen an synthetisiertem PMMA. Die Partikelgröße beläuft sich auf ca. 150 bis 500 nm.

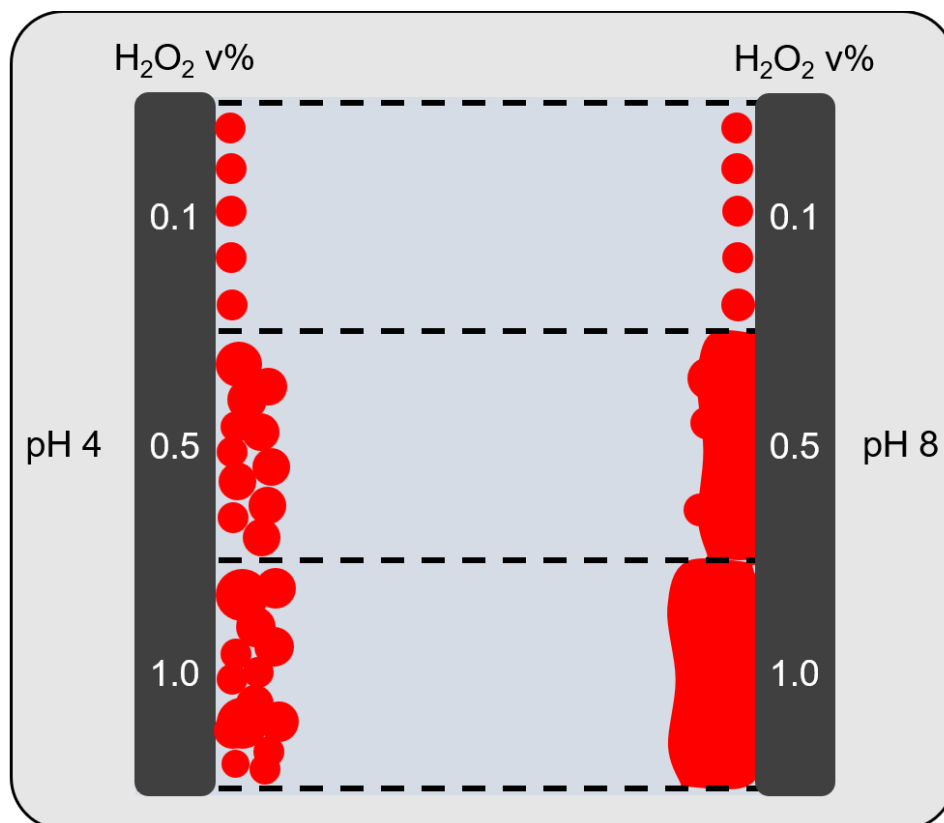


**Abbildung 84: DLS-Messungen von über HRP synthetisierten PMMA-Partikeln in Lösung**  
 a) Zeta-Potential in Bezug auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (X = pH 4, O = pH 8) und  
 b) Größe and PDI in Bezug auf die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (X = Größe, O = PDI).

Die pH-Abhängigkeit in der Abscheidung kann durch das Zeta-Potential erklärt werden. Das Zeta-Potential (s. **Abbildung 84 a**) gibt Rückschlüsse auf die Stabilität der Partikel in Lösung. Bei pH 4 ist das Zeta-Potential bei geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen hoch genug, um diese in der Lösung zu stabilisieren, dadurch stoßen sich die geladenen Partikel voneinander ab. Bei pH 8 liegt das Zeta-Potential schon bei 0,1 v-% deutlich niedriger, weshalb die Partikel nur schwach stabilisiert sind. Ab 0,5 v-% liegt das Potential nahe 0, wodurch die Partikel instabil sind und daher bei der Abscheidung nach Kontakt koagulieren können und somit einen Film bilden. Entscheidend für diese Unterschiede ist sehr wahrscheinlich der eingesetzte Mediator, das Acetylaceton. AcAc ist das erste und somit endständige Molekül in der Polymerkette, welches großen Einfluss auf die Stabilität bei pH-Änderung mit sich führt, da AcAc einen pKs-Wert von 8,99 aufweist<sup>247</sup>. AcAc liegt bei einem pH-Wert von 8 deprotoniert vor, wodurch es

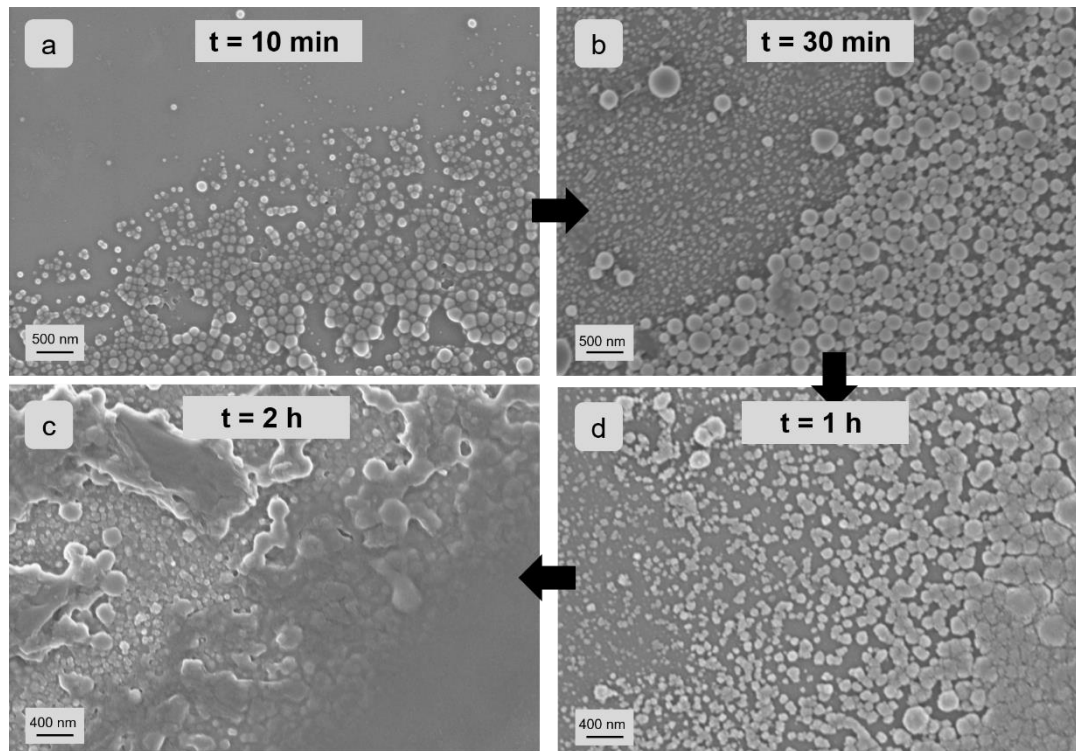
leicht negativ geladen ist, dies zeigt sich auch in Abbildung 84 a, während es bei pH 4 positiv geladen vorliegt.

Der pH-Wert und dem daraus resultierenden Zeta-Potential der Partikel führt gemeinsam mit der größeren Polymermenge bei größeren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen letztlich zu der gezeigten Filmbildung. Auch die nicht stattfindende Verfilmung bei geringen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen und pH 8, lässt sich zusätzlich mit dem Zeta-Potential besser erklären. Die Filmbildung bleibt nicht nur aufgrund der geringeren Anzahl an abgeschiedenen Partikeln aus, sondern das Zeta-Potential dieser Partikel ist höher als bei höheren Konzentrationen. Unter Inbezugnahme der Größe der Partikel (die Partikel sind kleiner bei geringerer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration) zeigt sich, dass die kleineren Partikel durch das AcAc noch besser stabilisiert werden können, als die größeren, welche direkt eine Filmbildung eingehen. Die Kombination dieser beiden Effekte ist schematisch in **Abbildung 85** aufgezeigt.



**Abbildung 85:** Schematische Unterschiede der EMA von PMMA mittels HRP bei unterschiedlichen Reaktionsparametern im Abscheideprozess.

Im nächsten Schritt wird die EMA von MMA bei den idealen Bedingungen (pH 8 und 1,0 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zeitaufgelöst am Trocknungsrand betrachtet (s. **Abbildung 86**).



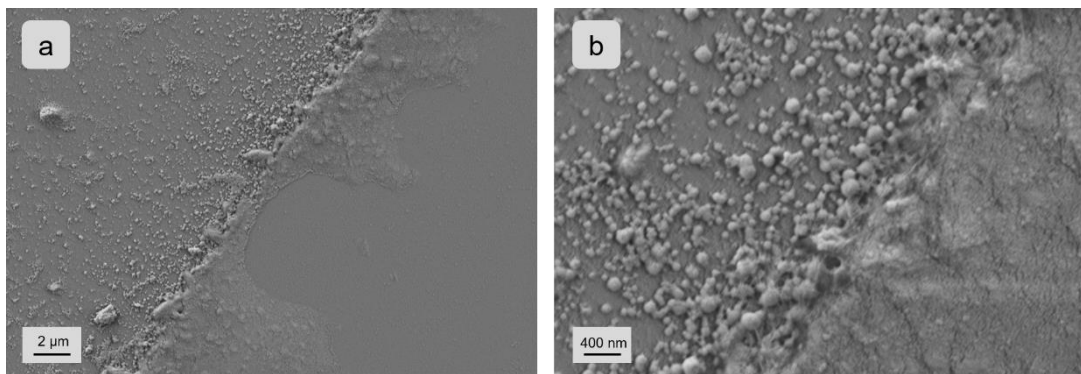
**Abbildung 86: REM-Aufnahmen der zeitaufgelösten Betrachtung der PMMA-Abscheidung via adsorbierter HRP.**

Bereits nach 10 Minuten ergibt sich am Trocknungsrand eine regelmäßige Abscheidung von Polymerpartikeln mit sporadischen Fehlstellen ohne Partikel. Die Partikel sind zwischen 50 und 150 nm groß. Vereinzelt ist bereits eine minimale Koagulation beobachtbar. Nach 30 Minuten ist die Zahl der Partikel deutlich gewachsen, die Größe der abgeschiedenen Partikel ist ebenfalls leicht angewachsen. Nach einer Stunde ist die Koagulation der Partikel sehr deutlich zu sehen. Die Partikel belegen den Untergrund fast vollständig und verschmelzen mehr und mehr miteinander. Nach 2 Stunden sind die koagulierten Partikel bereits zu einem Film zusammengewachsen. Ebenso wird deutlich, dass vereinzelt oberhalb der Partikel bereits weitere Partikel aus der Lösung abgeschieden wurden und ebenfalls mit den darunterliegenden Partikeln verfilmen.

Die abgeschiedenen Polymerfilme nach 24 Stunden (s. **Abbildung 87**) bieten dabei ein ähnliches Abscheidebild wie vorherige EMA im



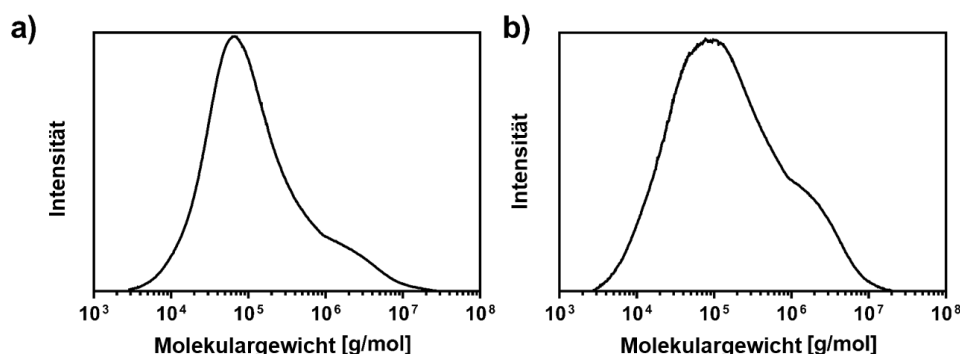
Destabilisierungsprozess mit adsorbierter Lipase: Auch bei der Aufbauvariante mit HRP bildet sich eine dickere Schicht am Trocknungsrand des adsorbierten Enzyms, ergo steigt mit höherer Enzymkonzentration lokal auch die abgeschiedene Polymermenge. Besonders interessant ist die starke Vergrößerung, knapp außerhalb des Trocknungsrandes bildet sich eine scharfe Trennlinie an der noch einzelne Polymerpartikel abgeschieden wurden, diese jedoch aufgrund des größer werdenden Abstands nicht mehr verfilmen. Zusätzlich unterstreichen diese Aufnahmen erneut die hohe Ortsspezifität im EMA-Prozess.



**Abbildung 87: REM-Aufnahmen des abgeschiedenen PMMAs nach 24 h am Trocknungsrand in unterschiedlichen Vergrößerungen.**

Die abgeschiedenen Filme wurden im nächsten Schritt mit Tetrahydrofuran (THF) gelöst und analytisch per Gelpermeationschromatographie (GPC) auf ihre Molmassenverteilung untersucht und mit in Lösung mittels HRP synthetisierten PMMA-Partikeln verglichen (s. **Abbildung 88**).

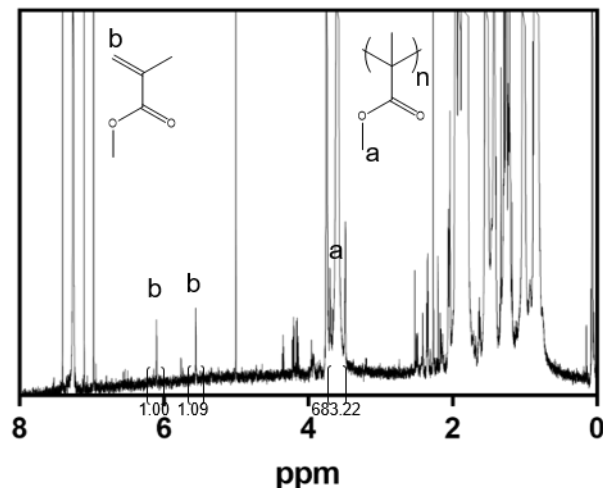
	PMMA (EMA)	PMMA in Lösung synthetisiert
$M_n$	56,900 g/mol	51,900 g/mol
$M_w$	447,000 g/mol	580,000 g/mol
PDI	7.85	11.17



**Abbildung 88: Molekulargewichtsverteilung des mittels auf einer Glasoberfläche adsorbierten HRP abgeschiedenen PMMA-Films (a) und der mittels HRP in Lösung synthetisierten PMMA-Partikel (a) jeweils bei pH 8 und 1.0 v%  $H_2O_2$ .**

Die GPC-Messungen zeigen für beide Systeme ähnliche Ergebnisse in Bezug auf ihr Molekulargewicht. Die zahlenmittlere Molmasse  $M_n$  liegt bei 56.900 g/mol für den PMMA-Film bzw. 51.900 g/mol für die in Lösung synthetisierten PMMA-Partikel. Beide Systeme sind polydispers und unterscheiden sich sowohl in der gewichtsmittleren Molmasse  $M_w$ , als auch in der Polydispersität. Die  $M_w$  ist beim mittels EMA hergestellten PMMA signifikant geringer als beim frei in Lösung synthetisierten PMMA. Dies weist darauf hin, dass der abgeschiedene Polymerfilm durch Koagulation der nah an der Oberfläche noch wachsenden, instabilen Partikel geschieht und nicht durch eine fortschreitende Polymerisation direkt an der Oberfläche. In diesem Fall müsste die Molmasse für den Polymerfilm sonst erheblich höher liegen. Der postulierte Mechanismus mit der Bildung von Partikeln nah der Oberfläche und der anschließenden Koagulation und Verfilmung aus Abbildung 79 wird dadurch verifiziert. Ein möglicher Grund für die geringere Polydispersität und geringe gewichtsmittlere Molmasse ist die geringere Reaktionszone nah an der Oberfläche. Durch die höhere Immobilität der adsorptiv gebundenen Enzyme, kommt es in einem geringeren Volumen zu einer Vielzahl an Kettenstarts. Diese gestarteten Ketten haben eine größere

Wahrscheinlichkeit aufeinander zu treffen und zu rekombinieren als in dem größeren Volumen bei der Polymerisation in Lösung. Dadurch entstehen im Mittel etwas weniger lange Ketten als in Lösung.



**Abbildung 89:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des per EMA auf einer Glasoberfläche abgeschiedenen Polymerfilms.

Durch <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie des Polymerfilms (s. **Abbildung 89**) wird bestätigt, dass der abgeschiedene Film aus PMMA besteht. Darüber hinaus zeigt sich durch quantitative Analyse der Flächenintegrale der Vinylfunktion ( $\delta H = 6.1028$ ;  $\delta H = 5.5603$ ) mit der Methoxyfunktion des Polymers ( $\delta H = 3.5990$ ), dass nur eine äußerst geringe Menge (ca. 0,22 %) an nicht polymerisierten monomeren MMA im Film verbleibt.

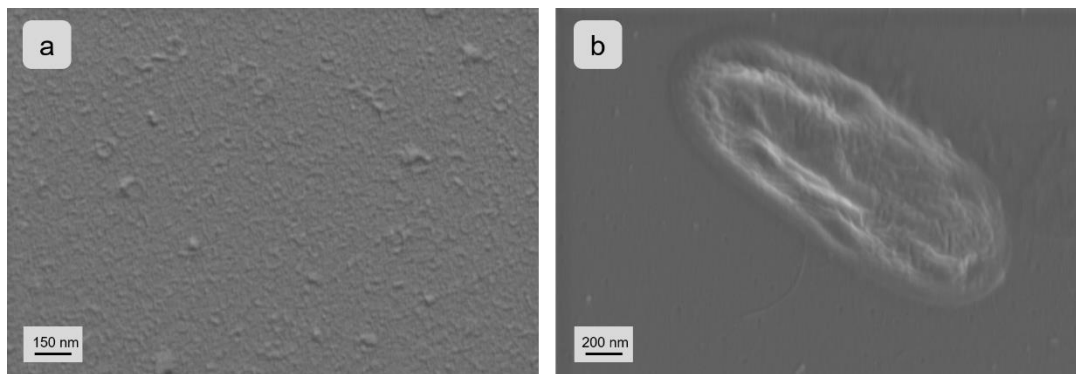
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit der Aufbauvariante der EMA über HRP und radikalisch polymerisierbaren, wasserlöslichen Monomere durchgehende Polymerfilme über 300 nm Schichtdicke erzielbar sind. Dadurch eröffnen sich gänzlich neue Möglichkeiten die EMA auch für synthetische Polymere zu nutzen, die eine hohe  $T_g$  mit sich bringen und somit nicht über die Destabilisierungsvariante mit Lipasen abgeschieden und anschließend verfilmt werden können.

### 3.4.1.2 Variation der Immobilisierungstechnik bei der EMA von PMMA

Nach dem erfolgreichen Proof-of-Concept können die bereits zuvor vorgestellten Immobilisierungsverfahren über kovalente Immobilisierung und kovalente Immobilisierung über Spacer ebenfalls auf die EMA von PMMA über HRP angewandt werden.

#### 3.4.1.2.1 EMA von PMMA über kovalente Immobilisierung von HRP

Die kovalente Immobilisierung von HRP auf Glasträgern verläuft analog zur zuvor vorgestellten Methode mit PCL (s. Kapitel 3.3.6.1). Zunächst erfolgt nach der sauren Reinigung die Silanisierung des Glasträgers mit GOPS. Über die eingebrachten Epoxidfunktionen wird die HRP mit ihren Aminfunktionen kovalent angebunden.



**Abbildung 90: REM-Aufnahmen der kovalenten Immobilisierung von HRP auf Glas mitten im Enzymbereich (a) und an einem Enzymaggregat (b)**

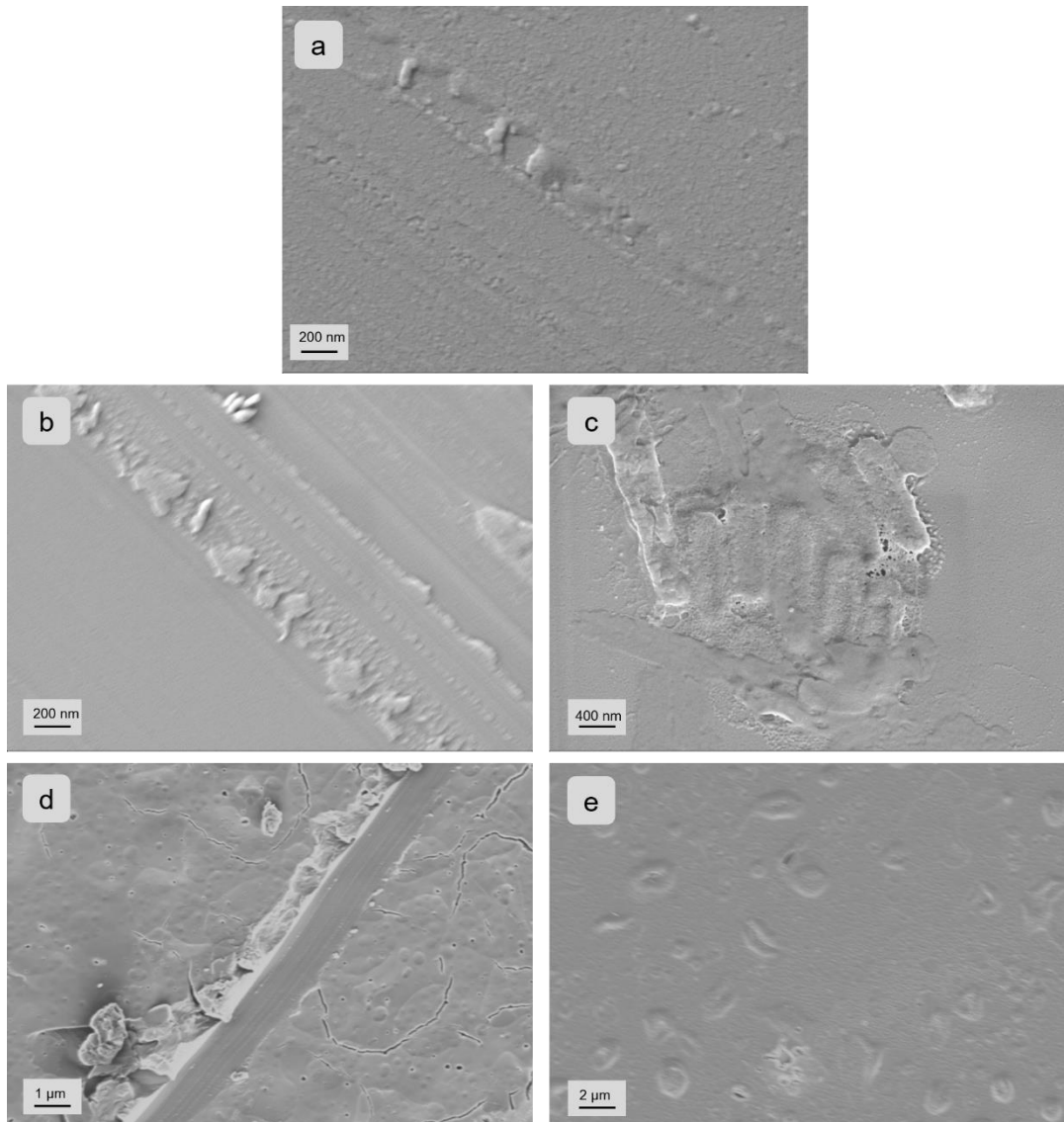
Die REM-Aufnahme **Abbildung 90 a** zeigt die ausgebildete immobilisierte Enzymstruktur auf der Oberfläche. Aufgrund der extrem dünnen Schicht bei der kovalenten Immobilisierung wurde zusätzlich der Kontaktwinkel von Wasser während des Prozesses verfolgt (s. **Tabelle 5**). Hier wird durch die Änderung des Kontaktwinkels von 74,96 ° (nach der Silanisierung) zu 48,77 ° die erfolgreiche Immobilisierung deutlich.

Bei der kovalenten Immobilisierung von HRP kommt es darüber hinaus ähnlich wie bei der PCL vereinzelt auch zur Ausbildung von Enzymaggregaten (s. **Abbildung 90 b**). Die Enzymaggregate weisen eine ungefähre Größe von 2,0 x 0,5 x 0,5 µm auf.

**Tabelle 5:      Kontaktwinkelmessungen der EMA von PMMA mittels kovalent gebundener HRP**

<b>Probe</b>	<b>Kontaktwinkel in °</b>
<b>Unbehandelter Glasträger</b>	<b>104,69 ± 1,27</b>
<b>Sauer gereinigter Glasträger</b>	<b>20,32 ± 0,18</b>
<b>GOPS-fkt. Glasträger</b>	<b>74,96 ± 2,50</b>
<b>Kovalent imm. HRP</b>	<b>48,77 ± 1,28</b>
<b>Abgeschiedener PMMA-Film</b>	<b>56,24 ± 0,87</b>

Im Anschluss an die erfolgreiche kovalente Enzymimmobilisierung folgen die EMA-Versuche mit MMA. Diese werden analog zu den vorherigen Versuchen bei 40 °C für 24 Stunden durchgeführt. Der pH-Wert liegt bei 8, um die Koagulation und Filmbildung zu begünstigen. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen werden erneut mit 0,1 v-%; 0,5 v-% und 1,0 v-% variiert.



**Abbildung 91:** REM-Aufnahmen der EMA von PMMA nach kovalenter HRP-Immobilisierung bei unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen: 0,1 v-% mittig in der Probe (a); 0,5 v-% mittig in der Probe (b); 0,5 v-% bei Enzymaggregaten (c); 1,0 v-% mittig in der Probe (d); 1,0 v-% bei Enzymaggregaten (e). Sichtbare Kratzer wurden zur besseren Unterscheidung vom Untergrund mit einem Skalpell erstellt.

Die REM-Aufnahmen (s. **Abbildung 91**) zeigen für eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 0,1 v-% so gut wie keine sichtbare Polymerabscheidung. Die geringe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration in Verbindung mit einer etwas eingeschränkteren Enzymaktivität aufgrund der Lokalisation direkt auf der Oberfläche hervorgerufen durch die kovalente Immobilisierung reichen nicht aus, um PMMA in Form von größeren Partikeln oder Filmen zu polymerisieren.

Bei 0,5 v-% wird erst durch Kratzer eine extrem dünne Schicht sichtbar (s. Abbildung 91 b). Ob diese Schicht synthetisiertes und abgeschiedenes PMMA darstellt, lässt sich aufgrund der dünnen Schicht nicht per EDX oder ähnliche Verfahren verifizieren. Jedoch wird an den Enzymaggregaten erfolgreich abgeschiedenes Polymer sichtbar (Abbildung 91 c). Direkt auf den Aggregaten ist ein Film klar sichtbar und außen herum liegen Polymerpartikel, die aufgrund des größeren Abstands zueinander nicht mehr koagulieren konnten. Die höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration führt demnach vor allem an den Enzymaggregaten zu einer dünnen Beschichtung.

Bei Betrachtung der höchsten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 1,0 v-% (s. Abbildung 91 d) fällt direkt ein poriger Polymerfilm auf, der äußerlich große Ähnlichkeiten mit dem abgeschiedenen PMMA-Film bei gleicher Konzentration mit der adsorptiven EMA-Variante aufweist (vgl. Abbildung 83 f). Die maximale Schichtdicke dieses Films beträgt ähnlich wie bei der adsorptiven Variante maximal ca. 400 nm, an mehreren Stellen jedoch auch deutlich weniger (s. **Abbildung A- 5**). Die hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration führt zu genügend Kettenstarts bei der radikalischen Polymerisation, dass ähnlich große Polymerpartikel entstehen, wie bei der adsorptiven Variante, und im Wachstumsprozess koagulieren können. Abbildung 91 ist besonders interessant, da hier wieder mehrere Enzymaggregate aufgezeigt sind. Die Enzymaggregate sind vollkommen in den Polymerfilm eingebettet. Da sie jedoch aufgrund der hohen lokalen Enzymkonzentration zu besonders viel Abscheidung führen, ist ihre Kontur durch überschichtetes Polymer immer noch zu erkennen. Der Polymerfilm wurde per EDX (s. **Abbildung 92**) als ein eben solcher bestätigt, da im Vergleich zum reinen Enzym (schwarz) keine signifikanten Stickstoffsignale erfasst werden.

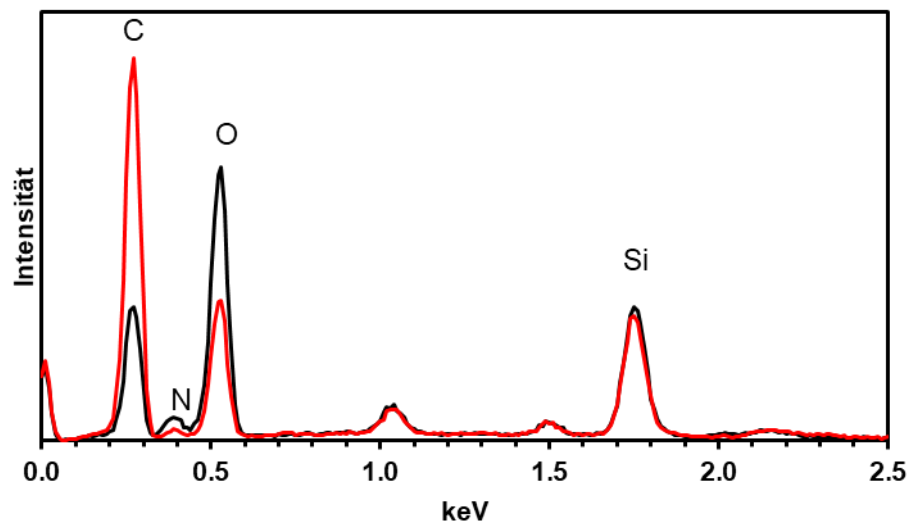


Abbildung 92: EDX-Messungen des PMMA-Films (rot) und des HRP-Films im Vergleich (schwarz).



### 3.4.1.2.2 EMA von PMMA über kovalente Immobilisierung von HRP mit Spacer-Molekülen

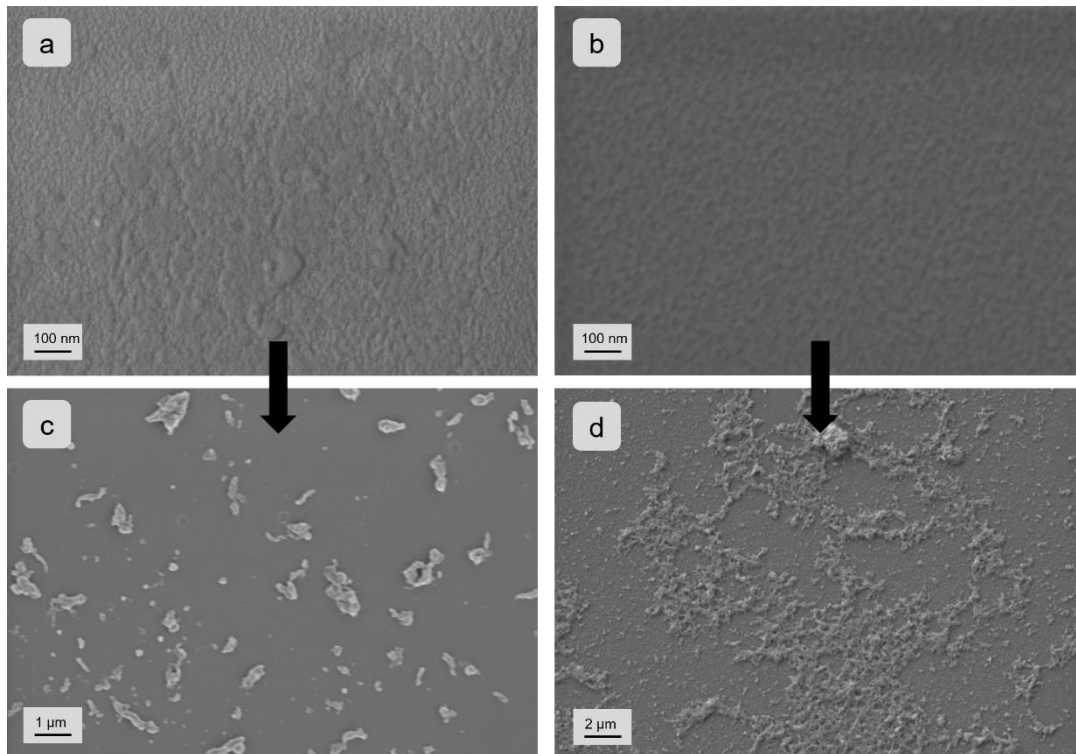
Im nächsten Schritt wird die EMA von PMMA über kovalente Immobilisierung von HRP mit Spacer-Molekülen betrachtet. Die Immobilisierung über Spacer verläuft analog zu der zuvor betrachteten Immobilisierung von PCL (vgl. 3.3.6.2). Nach der Silanisierung mittels APTES zur Aminfunktionalisierung der zuvor sauer gereinigten Glasoberfläche werden difunktionelle Epoxy-PEG-Spacer mit Kettenlängen von 10.000 g/mol und 20.000 g/mol im Überschuss eingesetzt, um mögliche Doppelanbindungen der Spacer zu verhindern. Über die verbleibende Epoxy-Funktionalität reagiert im Anschluss die HRP mit ihren Aminfunktionen kovalent an. Der Verlauf der Anbindung von HRP wurde u. a. per Kontaktwinkel verfolgt (s. **Tabelle 6**).

**Tabelle 6: Kontaktwinkel der verschiedenen Stufen der kovalenten Enzymimmobilisierung von HRP über Spacer-Moleküle**

Probe	Kontaktwinkel in °
APTES-fkt. Glasträger	82,44 ± 0,36
10.000 g/ mol-Diepoxyspacer	57,04 ± 1,87
20.000 g/ mol-Diepoxyspacer	58,08 ± 1,29
Kov. geb. HRP – 10.000 g/mol Spacer	46,53 ± 0,78
Kov. geb. HRP – 20.000 g/mol Spacer	45,56 ± 1,29

Durch die Änderung in den Kontaktwinkeln zu Wasser wird primär eine Oberflächeneigenschaftsveränderung detektiert, die zur Verifikation des Prozesses führt. Die Kontaktwinkel der über kovalente Spacer gebundenen HRP entsprechen mit 45,5 ° bzw. 46,5 ° in etwa dem der kovalent gebundenen HRP von 48,8 ° (vgl. Tabelle 5).

REM-Aufnahmen der Spacer-Anbindung wurden bereits in Abbildung 64 gezeigt. Die nun folgenden REM-Aufnahmen zeigen daher die kovalente HRP-Immobilisierung und die anschließende EMA von PMMA (s. **Abbildung 93**). Die Abscheidungen wurden erneut für 24 h bei einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 1,0 v-% und pH8 durchgeführt.



**Abbildung 93: REM-Aufnahmen des kovalent immobilisierten HRP über einen Spacer mit 10.000 g/mol (a) und der anschließenden EMA von PMMA (c) sowie des kovalent immobilisierten HRP über einen Spacer mit 20.000 g/mol (b) und die anschließende EMA von PMMA (d)**

Die REM-Aufnahmen der über Spacer angebondenen HRP zeigen in beiden Fällen auf der Oberfläche sichtbare Enzymstrukturen. Die anschließende EMA von PMMA führte jedoch nur zu einer sporadischen Abscheidung von dünnen PMMA-Strukturen. Sichtbar sind in Abbildung 93 c bei der Abscheidung über einen Spacer von 10.000 g/mol sowohl kleinere Partikel als auch größere Cluster, bei denen offensichtlich eine Koagulation eingesetzt hat. Die Strukturen in Abbildung 93 d bei der Abscheidung über einen Spacer von 20.000 g/mol sind eher netzartige Abscheidungen zu sehen. Ebenfalls sichtbar sind dabei erneut Polymerpartikel verschiedener Größen, die netzartig miteinander koagulieren. Aufgrund der sporadischen Abscheidung und der großen Abstände der Partikel zueinander bleibt eine vollständige Filmbildung aus.

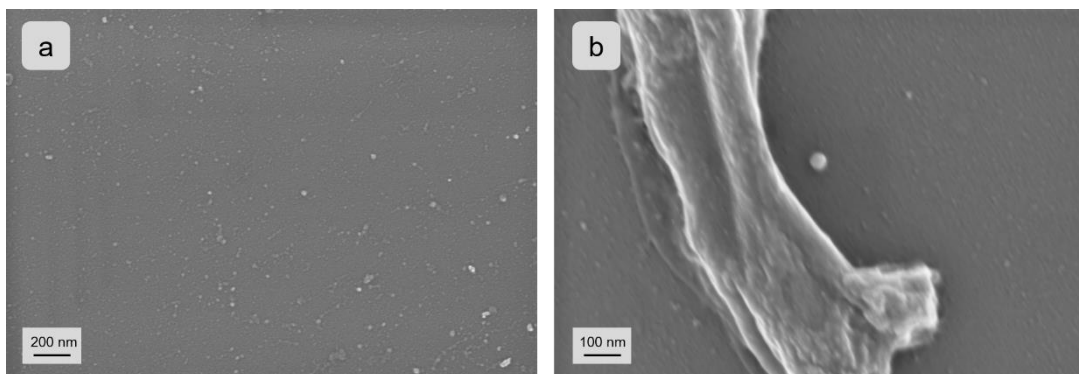
Dementsprechend führt die Abscheidung mit HRP über Spacermoleküle wie in den vorherigen Versuchen im Destabilisierungsverfahren zu keiner verbesserten Polymerabscheidung.

### 3.4.2 EMA im Aufbauverfahren über radikalische Polymerisation durch HRP mit nicht wasserlöslichen Monomeren

Nach der erfolgreichen Abscheidung von PMMA in wässriger Lösung wird in diesem Kapitel untersucht, inwiefern auch nicht wasserlösliche Polymere im EMA-Prozess mit HRP genutzt werden können. Damit soll die Reichweite der nutzbaren Polymere im EMA-Aufbauprozess erhöht werden. Die Auswahl fällt auf das Monomer Styrol, da sein Polymer ähnlich wie PMMA in der chemischen Industrie zu den absoluten Standardkunststoffen zählt und es daher vielfältige Anwendungsfelder gibt.<sup>248</sup> Im Gegensatz zu der hohen Wasserlöslichkeit des Monomers MMA (15 g/L)<sup>249</sup> besitzt Styrol jedoch nur eine Wasserlöslichkeit von 0,24 g/L<sup>250</sup>. Dadurch eignet sich hervorragend, um als Modellsystem für nicht wasserlösliche Monomere zu fungieren.

#### 3.4.2.1 EMA im Aufbauverfahren über radikalische Polymerisation von Styrol über adsorbiertes HRP

Versuche der EMA über den klassischen Weg in Wasser führen nach dem Ultraschallbad zu einem zweiphasigen System mit dem nicht löslichen Styrol oberhalb der wässrigen Phase. Die anschließende EMA bei optimalen Bedingungen (pH 8 und 40 °C sowie 1,0 v-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,75 v-% AcAc) mit dem minimalen Restanteil an gelöstem Styrol führt zu einer lediglich minimalen Abscheidung (s. **Abbildung 94**).



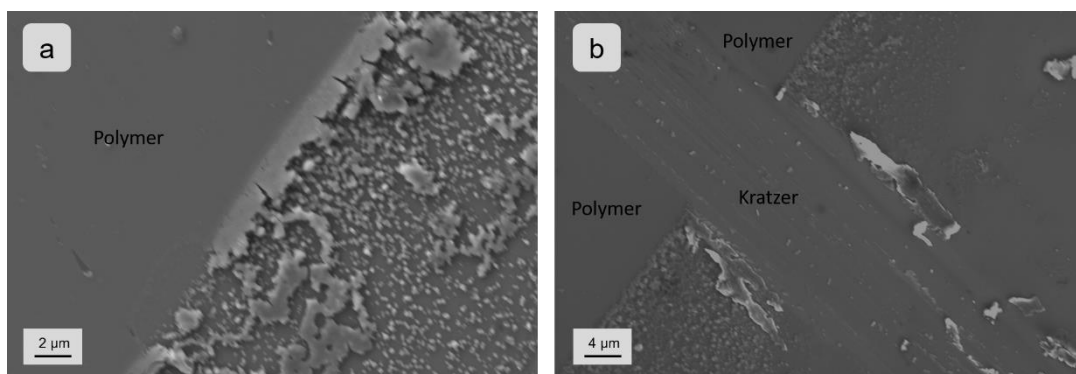
**Abbildung 94:** REM-Aufnahmen der EMA von Polystyrol über HRP in Wasser mittig in der Probe (a) und an einem Enzymaggregat (b)

Die REM-Aufnahmen zeigen sowohl mittig in der Probe als auch an Enzymaggregaten nur vereinzelt abgeschieden partikelförmige Abscheidungen.

Auf den Enzymaggregaten ist eine strukturierte Oberfläche zu erkennen. Dies ist ein Indiz dafür, dass hier eine minimale Verfilmung von Partikeln stattfindet, da die Enzymkonzentration hier deutlich höher ist. Quantitativ verbleibt die Abscheidung jedoch auch in direkter Umgebung des Aggregats auf sehr niedrigem Niveau. Auf der gesamten Fläche Probe reicht die Menge des in dem Wasser gelösten Styrols nicht aus, um signifikante Mengen abzuscheiden.

Aufgrund der schwachen Abscheidung im herkömmlichen EMA-Prozess müssen andere Wege gefunden werden, um nichtwasserlösliche Monomere wie Styrol erfolgreich abzuscheiden. Um nichtwasserlösliche Monomere einsetzen zu können, muss demnach ein Lösemittel gefunden werden, in dem sowohl Styrol löslich ist, als auch das Enzym HRP wirken kann, um eine radikalische Polymerisation auszulösen. Nach ausführlicher Recherche wird 1,4-Dioxan als Colösungsmittel genutzt, da es ein gutes Lösemittel für Styrol darstellt, nicht giftig ist und sich darüber hinaus in beliebigem Verhältnis mit Wasser mischen lässt<sup>251</sup>.

Abgrenzende Löslichkeitsversuche zeigen, dass das für die Abscheideversuche optimale Verhältnis von Dioxan zu Wasser 80:20 beträgt, da ab einem höheren Wasseranteil die nicht die vollständige Monomermenge gelöst werden kann. Für die folgende EMA wurden die üblichen Konzentrationen benutzt: pH 8, 40 °C Abscheidetemperatur sowie 1,0 v-% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,75 v-% AcAc. Die zugehörigen REM-Aufnahmen am Trocknungsrand sind in **Abbildung 95** dargestellt.

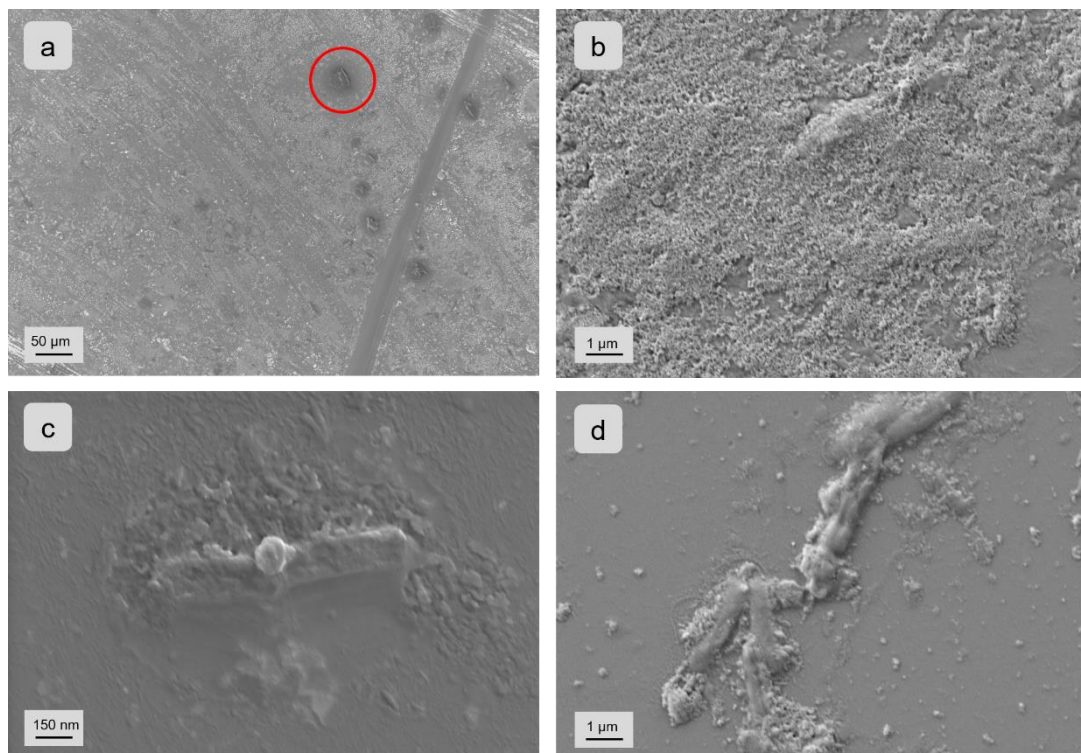


**Abbildung 95:** REM-Aufnahmen der EMA per Adsorption von Polystyrol im Wasser-Dioxangemisch am Trocknungsrand des vorherigen Enzyms. Kratzer wurden mit einem Skalpell zur besseren Unterscheidung vom Untergrund gemacht.

Die REM-Aufnahmen zeigen einen gut sichtbaren Polymerfilm Trocknungsrand. Der Film läuft am Trocknungsrand des Enzyms kontinuierlich aus und direkt hinter dem Polymerfilm sind einzelne Polymerpartikel zu sehen. Dies zeigt, dass wie zuvor beim PMMA der Filmbildungsprozess ebenfalls über eine Polymerisation in Partikelform nah an der Oberfläche abläuft und diese miteinander koagulieren, um den Film zu bilden.

#### 3.4.2.2 EMA in der Aufbauvariante über radikalische Polymerisation von Styrol über kovalent gebundenes HRP

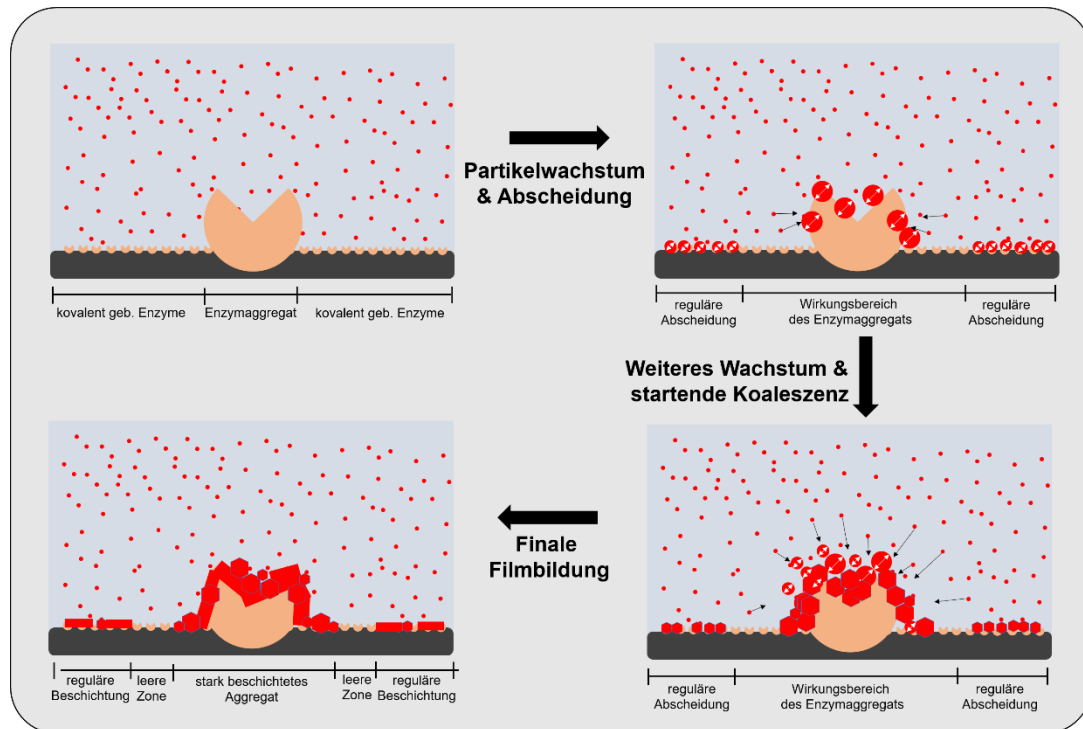
Nach der erfolgreichen EMA über Adsorption folgt die kovalente Variante im Wasser-Dioxangemisch bei gleichen Bedingungen. Betrachtet werden erneut sowohl die gesamte Fläche als auch einzelne Enzymaggregate (s. **Abbildung 96**):



**Abbildung 96:** REM-Aufnahmen der EMA von Polystyrol über kovalente Enzymanbindung im Wasser-Dioxangemisch in verschiedenen Vergrößerungen (a und b) sowie an Enzymaggregaten (c und d). Sichtbare Kratzer wurden mit einem Skalpell erstellt.

Durch Zugabe des Lösungsmittel Dioxan funktioniert die EMA von Polystyrol auch bei kovalenter Enzymimmobilisierung. Über die gesamte Fläche der Probe findet eine Polymerabscheidung statt (vgl. Abbildung 96 a). Das abgeschiedene Polymer koaguliert auch teilweise, es bildet sich jedoch kein komplett durchgehender Film, was in Abbildung 96 b sichtbar wird. Zudem gibt es ein paar kleinere Fehlstellen mit wenig Abscheidung.

Im rot markierten Kreis ist ein interessanter Zusammenhang zu sehen. In einer gewissen Entfernung um die Enzymaggregate herum findet wenig bis gar keine Abscheidung statt, jedoch direkt an den Enzymaggregaten umso mehr (s. Abbildung 96 c und d). Dies liegt zum einen an der extrem hohen Enzymkonzentration direkt am Aggregat, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass unmittelbar neben dem Enzymaggregat kein Enzym angebunden wird, da die Enzymteilchen vor der möglichen Anbindung aggregieren. Unmittelbar am Aggregat kommt es beim Abscheidungsprozess zu einer Vielzahl von Kettenstarts zur Polymerisation von Styrol, sodass dort besonders viel Polystyrol abgeschieden wird. Das sich in Lösung befindende Styrol wird dort extrem schnell verbraucht und in die entstehenden Polymerketten am Aggregat eingebaut. Die direkte Umgebung neben dem Aggregat verarmt demnach an Styrol, sodass über eine gewisse Distanz von ein paar Mikrometern weniger Abscheidung stattfindet als bei der regulären Abscheidung am Rest der Probe. Dieser Mechanismus ist schematisch in **Abbildung 97** dargestellt.



**Abbildung 97: Schematischer Abscheide - und Koagulationsmechanismus nahe einem Enzymaggregat (zur übersichtlicheren Darstellung wird das Enzymaggregat als ein großes Enzym dargestellt).**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EMA von nicht wasserlöslichen Monomeren wie z. B. Styrol über die Nutzung von Colösungsmitteln mit den üblichen Verfahren möglich ist. Die zu erzielenden Schichtdicken sind in den bisherigen Versuchen nicht auf dem gleichen Niveau wie bei MMA. Weitere Optimierungsversuche bzgl. des optimalen Dioxan-Wasser-Verhältnisses können in der Zukunft jedoch noch Verbesserungsmöglichkeiten bieten.

### 3.4.3 EMA in der Aufbauvariante über oxidative Kupplungspolymerisationen mit HRP

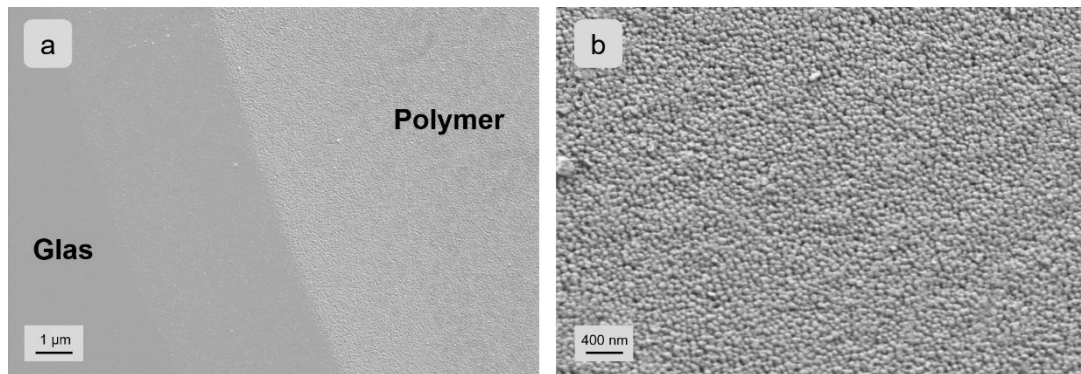
In diesem Unterkapitel wird die EMA mit HRP auf nicht vinyl- oder acrylatfunktionelle Monomere ausgeweitet. Genutzt wird erneut die Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  durch Katalyse von HRP. Diese läuft wie im theoretischen Teil besprochen über einen Wasserstoff-Donor ab (vgl. Kapitel 2.2.3). Zu den möglichen Wasserstoff-Donoren zählen neben den zuvor genutzten Mediatoren wie Acetylaceton auch verschiedene aromatische Systeme wie z. B. Phenole.<sup>252</sup> Phenolharze kommen seit über einhundert Jahren in verschiedensten Lackierungen vor und zählen bis heute zu den wichtigsten Duroplasten. Sie zeichnen sich vor allem durch ihre Temperaturbeständigkeit und Oberflächenhärte aus. Üblicherweise werden sie durch Polykondensation von Phenolen mit Aldehyden (vor allem Formaldehyd) hergestellt.<sup>253</sup> Neben der notwendigen Temperatur ist vor allem das giftige Formaldehyd ein Grund, warum die Industrie alternative Syntheserouten sucht.<sup>254,255</sup> Dies macht die EMA von Phenolen zu einem besonders spannenden Ansatz.

Während des Reduktionsschritts von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  bilden sich an den Phenolen Radikale über die sie im nachfolgenden Schritt miteinander radikalisch koppeln können und dadurch dimerisieren. Mit Wiederholungen dieser Schritte bilden sich phenolische Polymere. Der genaue Mechanismus ist ebenfalls in Kapitel 2.2.3 dargestellt (Abbildung 15). Mögliche Lösungsmittelgemische sind z. B. Aceton-Wasser, Methanol-Wasser oder Dioxan-Wasser.<sup>256,257</sup> Da im vorherigen Kapitel gute Ergebnisse mit Dioxan und Styrol erzielt wurden und Methanol aufgrund seiner Giftigkeit<sup>258</sup> und Aceton aufgrund des hohen Dampfdrucks<sup>259</sup> nicht nachhaltig wären, wird die EMA mit einem Dioxan-Wassergemisch durchgeführt.



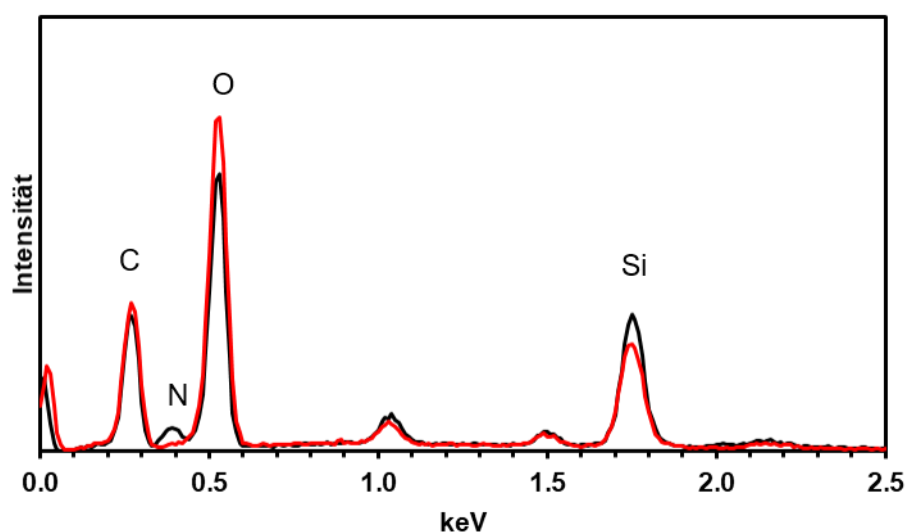
### 3.4.3.1 EMA von Phenolpolymeren über adsorptiv gebundene HRP

In diesem Unterkapitel wird die EMA von Phenol nach Adsorption des Enzyms auf Glasträgern behandelt. Zunächst wird bei Raumtemperatur und neutralen Bedingungen bei pH 7 (der höchsten Enzymaktivität) und 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration gearbeitet. Diese Abscheidungen zeigen bereits das große Potential hinter der phenolischen EMA (s. **Abbildung 98**).



**Abbildung 98:** REM-Aufnahmen der EMA von Phenol bei pH 7; 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration für 24 h im Dioxan-Wassergemisch am Rand der Probe (a) und mitten in der Probe (b)

Die REM-Aufnahmen der EMA nach HRP-Adsorption auf basisch gereinigten Glasträgern weisen durchgängig, über den vorherigen Enzymbereich, engmaschige partikelartige Abscheidungen auf. Am Trocknungsrand des Enzyms besteht eine klare Grenze zum Glas mit lediglich einer dünnen Zone an „Ausläufern“ was auch in diesem Prozess die hohe Spezifität des EMA-Prozesses aufzeigt. Die Auslaufzone ist auf Schrumpfeffekte des sich zusammenziehenden Enzymtropfens vor der Abscheidung zurückzuführen. Die in einer Monolage abgeschiedenen Polymerpartikelstrukturen weisen eine enge Größenverteilung von ca. 40 bis 50 nm auf. Die EDX-Messungen (s. **Abbildung 99**) belegen aufgrund des Kohlenstoffanteils im Vergleich zum Stickstoffsignals, dass es sich um abgeschiedene phenolische Strukturen handelt und nicht um Enzymstrukturen.



**Abbildung 99: EDX-Messungen des Phenolpolymerfilms (rot) und eines HRP-Films im Vergleich (schwarz).**

Die Abscheidung weist aufgrund der aromatischen Polymerstruktur des Phenolpolymers hydrophobere Eigenschaften auf als die zuvor erwähnten EMA-Abscheidungen, was durch Messung des Kontaktwinkels von  $72,01$  bestätigt wird (s. **Tabelle 7**). Diese Änderung im Kontaktwinkel zeigt die erfolgreiche Abscheidung der Phenolpolymere. Mit der Berücksichtigung des Kontaktwinkels zu Diiodmethan ergibt sich einer Oberflächenspannung von  $40,7 \pm 2,57$  mN/m. Dies entspricht in etwa dem Literatur angegebenen Wert von  $42$  mN/m für ein Standardphenolharz.<sup>260</sup> Screenshots der Messung sind in **Abbildung A- 7** zu sehen.

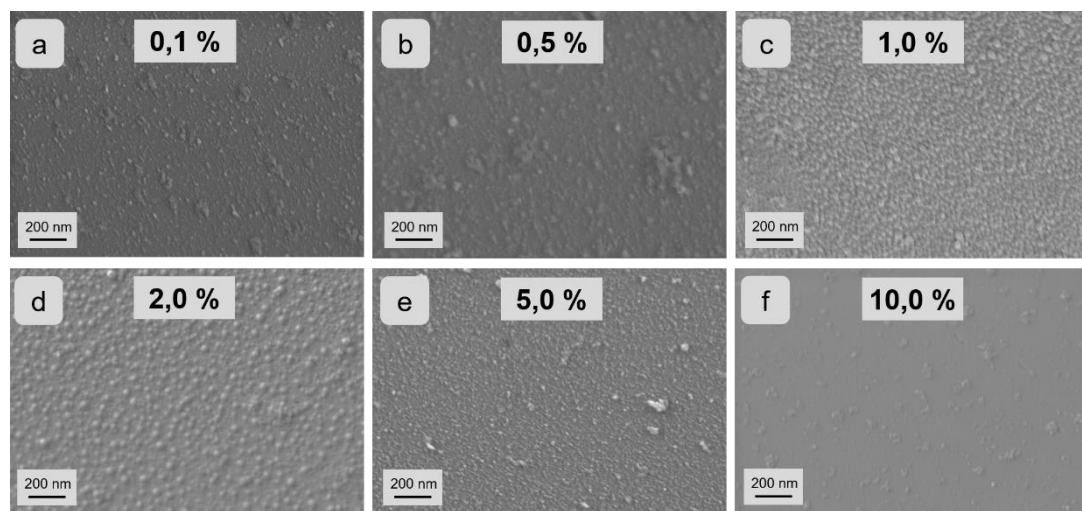
**Tabelle 7: Kontaktwinkel der verschiedenen Stufen der EMA von Phenol-Polymeren über HRP**

Probe	Kontaktwinkel Wasser in °	Kontaktwinkel Diiodmethan in °
Adsorbiertes HRP	$19,63 \pm 3,99$	$63,06 \pm 0,66$
Abgeschiedenes Phenol-Polymer	$72,01 \pm 0,57$	$54,40 \pm 3,37$

Die enge Größenverteilung der Partikel zeigt den selbstterminierenden Prozess der EMA auf. Da das Enzym an jedem Kupplungsschritt indirekt durch die Radikalbildung beteiligt ist, ist kein weiteres Wachstum mehr möglich sobald die Enzymteilchen vollständig bedeckt sind. Die Einflussfaktoren auf die

Abscheidung und der genaue Mechanismus Entstehung der partikelartigen Strukturen wird im Folgenden näher untersucht.

Bei der EMA durch oxidative Kupplungspolymerisation wird kein Mediator wie Acetylaceton bei der radikalischen Polymerisation mehr benötigt, da das Phenol selbst als Wasserstoff-Donor fungiert. Daher kann das im vorherigen Kapitel ermittelte Wissen über den optimalen pH-Wert zur Destabilisation der entstehenden Polymerpartikel mit Acetylaceton als Kettenstarter nicht weiterverwendet werden. Erste Versuche werden daher mit einem pH-Wert von 7,0, also der höchsten Enzymaktivität und einem entsprechenden Phosphatpuffer bei Raumtemperatur nach Adsorption von HRP auf Glaträgern für 6 h durchgeführt. Variiert wird die Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,1 bis 10,0 v-% (s. **Abbildung 100**). Da Wasserstoffperoxid an jedem Kupplungsschritt indirekt doppelt beteiligt ist, wird ein höherer Bedarf im Vergleich zur Variante mit MMA oder Styrol erwartet.

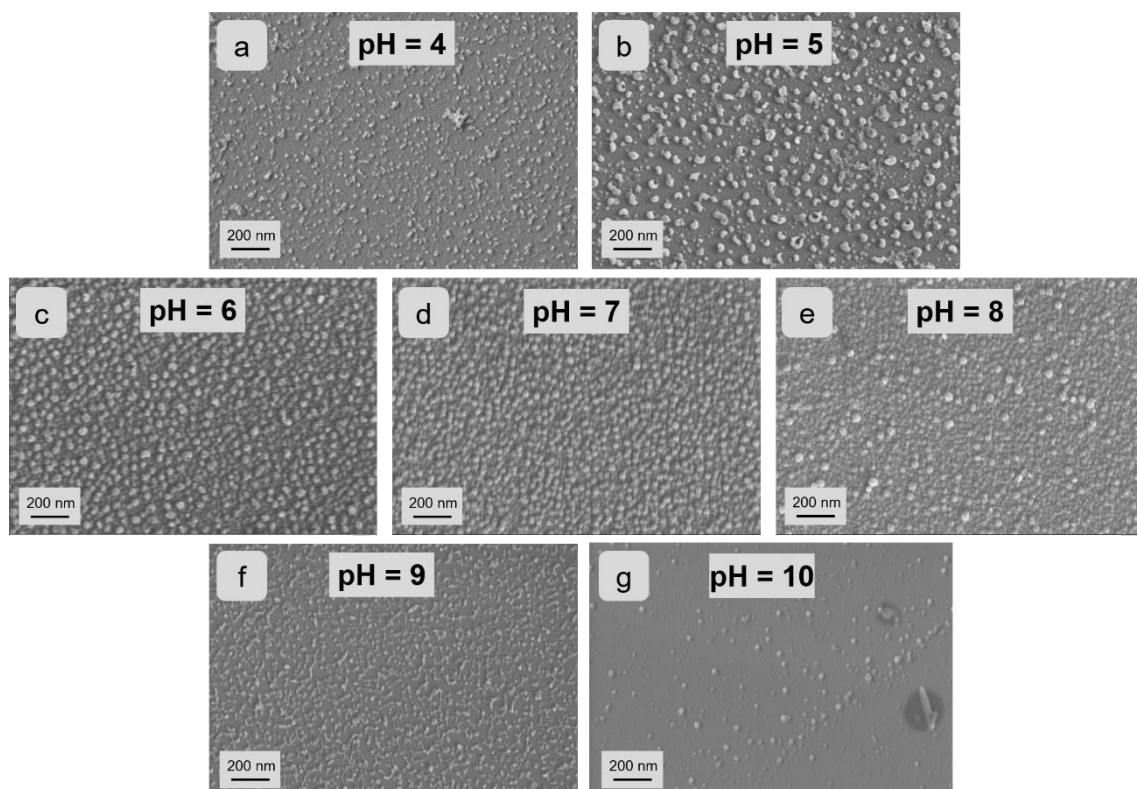


**Abbildung 100: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach adsorbiertem HRP bei Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,1 bis 10,0 v-%.**

Die Konzentrationsreihe mit Wasserstoffperoxid 0,1 bis 10,0 v-% zeigt eine klare Tendenz. Bei 0,1 und 0,5 v-% findet nur wenig Abscheidung statt, bei 1,0 und 2,0 v-% kommt es zu der Ausbildung von partikelartigen Monolagen, wobei die Dichte bei 1,0 v-% am höchsten ist. Bei 5,0 v-% kommt es zu Abscheidungen im sehr dünnen Maßstab und bei 10,0 v-% ist die Abscheidung nur noch sehr sporadisch.

Die Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  in hohen Konzentrationen zur Deaktivierung von HRP führt. Bei 5,0 v-% kommt es zwar zu sehr starken Radikalbildung auf der Oberfläche, jedoch brechen die Reaktionen durch die Inaktivierung ein und es können keine vollständigen Partikel mehr ausgebildet werden. Bei zu geringen Konzentrationen (0,1 bis 0,5 v-%) kommt es zu wenigen Radikalen, weshalb auch dort nur geringe Abscheidungen zu erkennen sind. Bei 1,0 bis 2,0 v-% ist die Wasserstoffperoxidkonzentration gerade richtig, um zu vielen Radikalen zu führen und somit eine ausreichend große Anzahl an Kupplungsreaktionen zu ermöglichen, um vollständige Partikel zu bilden.

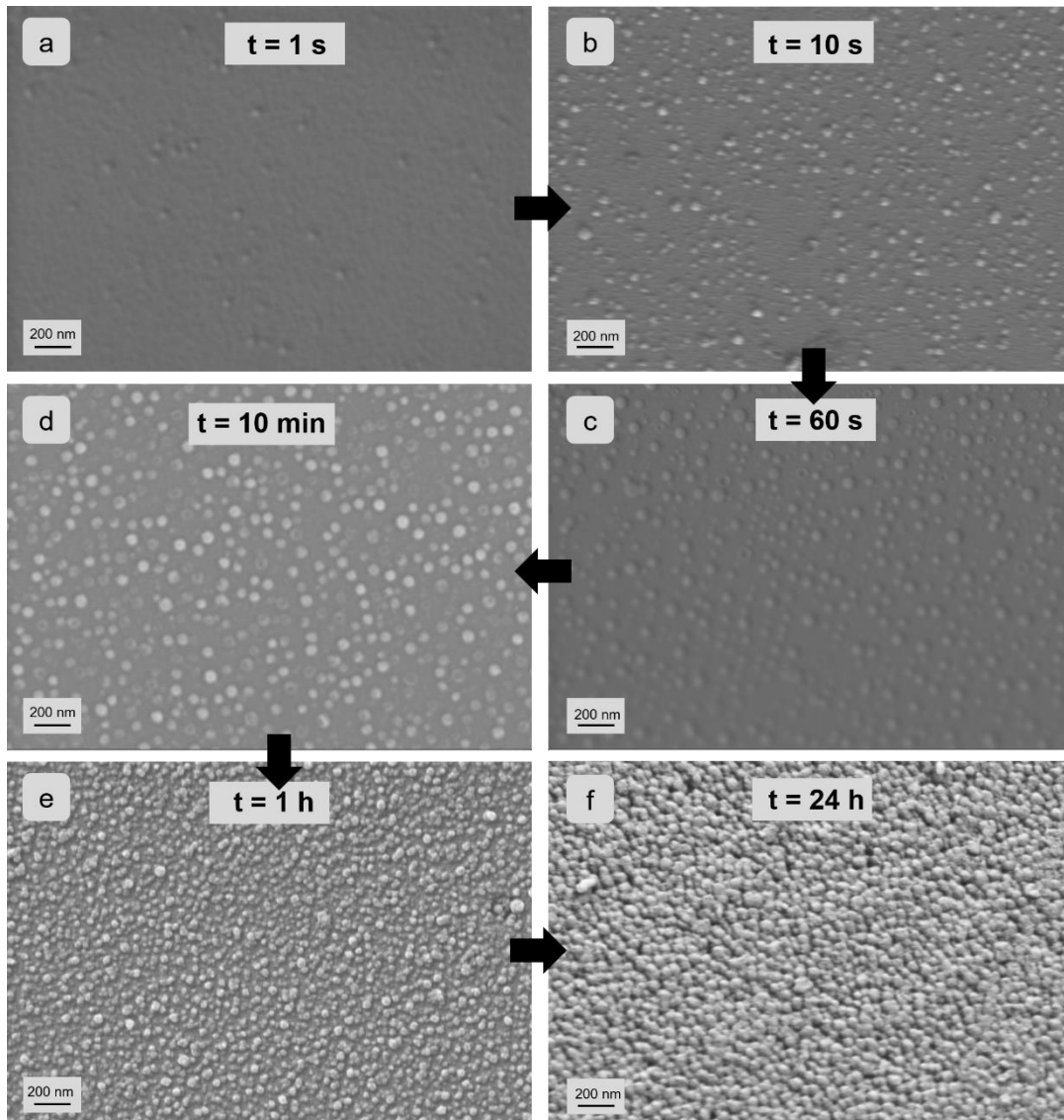
Nach der Ermittlung des Einflusses der Wasserstoffperoxidkonzentration wird im nächsten Schritt der Einfluss des pH-Wertes ermittelt. Der pH-Wert wird mithilfe von verdünnter Salzsäure ( $c(\text{HCl}) = 0.1 \text{ mol / L}$ ) bzw. Ammoniak (25%) zwischen 4 und 10 eingestellt (s. **Abbildung 101**). Zur besseren Unterscheidung betragen die Abscheidezeiten jeweils eine Stunde.



**Abbildung 101:** REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach adsorbierter HRP bei verschiedenen pH-Werten (4-10) und 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$

Die REM-Aufnahmen der pH-Reihe zeigen jeweils bei sauren und basischen pH-Werten deutlich weniger Polymerabscheidung als im neutralen Bereich (pH 6 bis 8). Gerade im Basischen (pH 9 bis 10) ist die Abscheidung besonders niedrig und findet bei pH 10 (s. Abbildung 101 g) nur noch äußerst sporadisch statt. Die dichteste Polymerabscheidung mit voll ausgebildeten Polymerpartikelstrukturen entsteht zwischen pH 6 und 7 (s. Abbildung 101 c und d). Dies hat eine einfache Erklärung, da dies, wie schon im theoretischen Teil berichtet, genau den pH-Bereich mit der höchsten Enzymaktivität darstellt (ca. 6,5).<sup>109,110</sup> Die pH-Reihe zeigt damit, dass die EMA von phenolischen System rein von der Enzymaktivität abhängt.

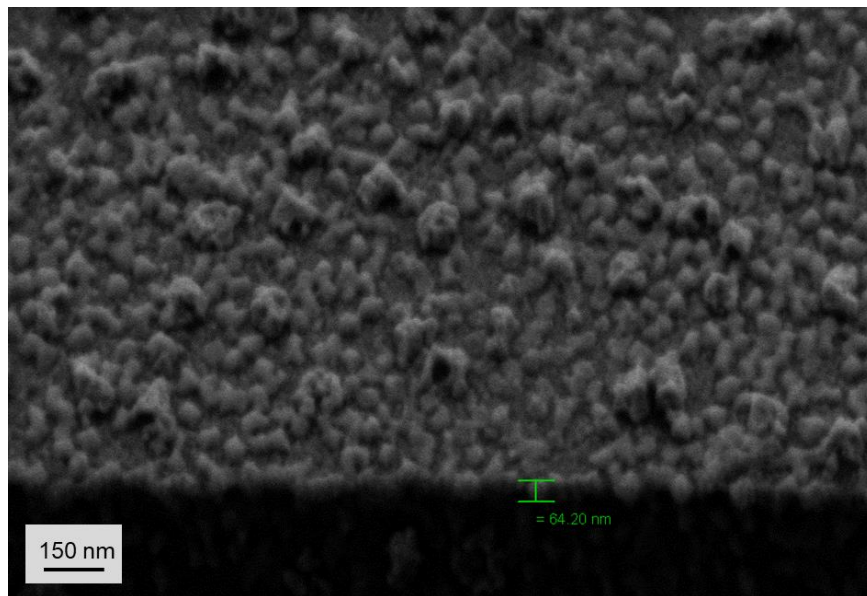
Nach der Feststellung, dass die optimalen Parameter für die EMA von Phenolen bei einem pH-Wert 6 bis 7 und einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 1 bis 2 v-% liegen, wird darauffolgend der Mechanismus der Abscheidung untersucht. Dazu wird die Abscheidung zeitaufgelöst betrachtet: Bei pH 7 und einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 1,0 v-% werden die Glasträger mit adsorbiertem Enzym für verschieden Zeitfenster in die Lösung getaucht und nach der Entnahme direkt gründlich abgewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Vorversuche haben gezeigt, dass die Reaktion sehr schnell abläuft, daher wird mit sehr kurzen Zeitfenstern von 1 s, 10 s, 60 s gestartet und anschließend auf 10 min, 60 min und 24 h erhöht (s. **Abbildung 102**).



**Abbildung 102: REM-Aufnahmen der Zeitreihe der EMA von Phenol nach adsorbierter HRP.**

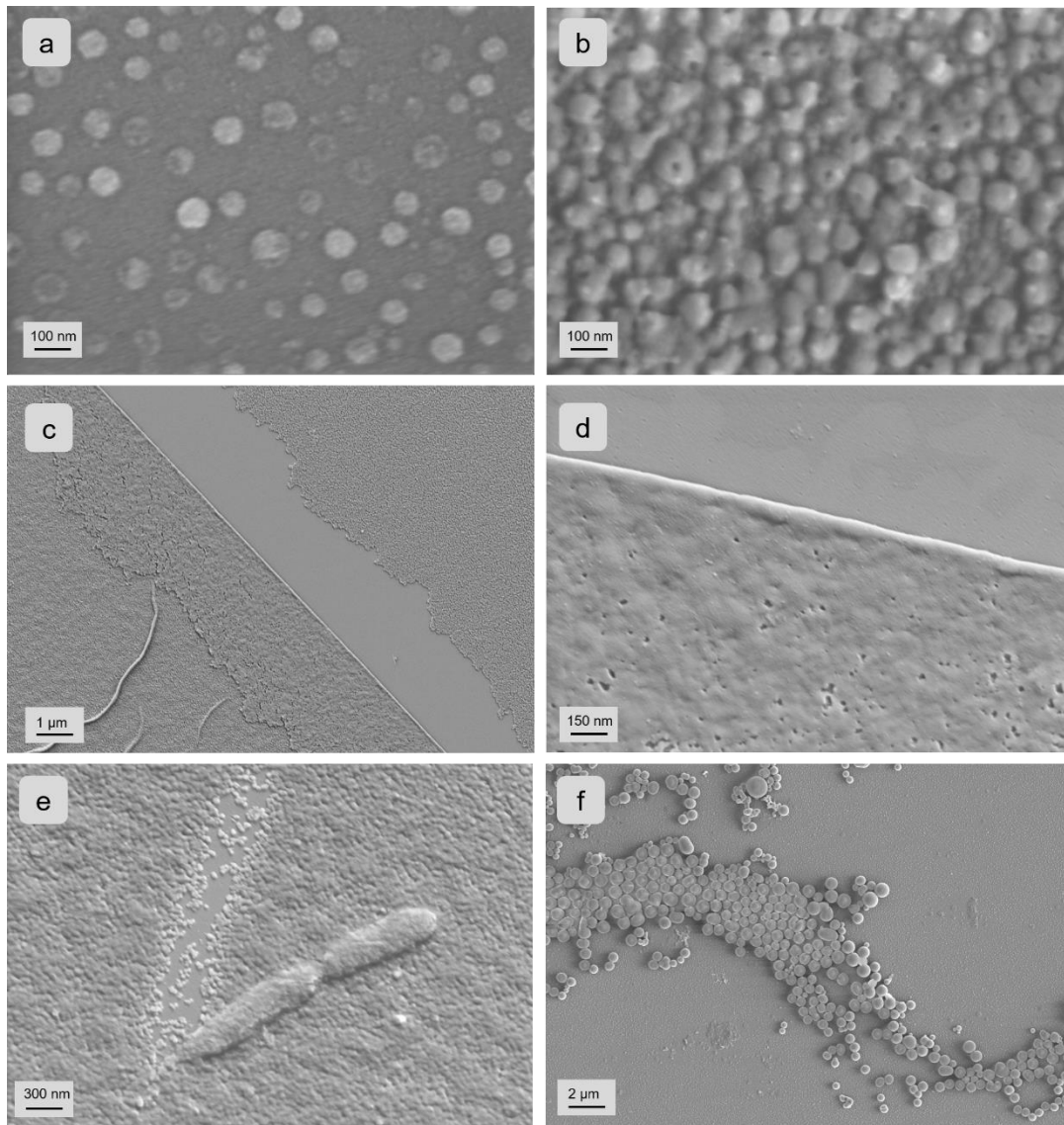
Die Zeitreihe zeigt die extrem schnell startende Polymerisierung von Phenol. Auffällig ist, dass bereits nach ca. einer Sekunde vereinzelt erste Partikelstrukturen geringer Größe von unter 20 nm zu erkennen sind. Nach 10 Sekunden sind diese sowohl in Anzahl als auch Größe angewachsen. Bei einer Minute setzt sich dieser Trend fort und einzelne Partikel weisen teilweise bereits einen Durchmesser von bis zu 40 nm auf. Auffällig ist, dass an der Oberfläche der Partikeln teilweise Löcher unter dem Rasterelektronenmikroskop zu erkennen sind. Bei ca. 10 Minuten ist bereits der Großteil der Glasoberfläche mit Partikeln belegt und die neu entstehenden Partikel zeigen fast ringförmige Strukturen aufweisen (s. Abbildung 102 c und d). Bei einer Stunde füllen sich

auch die Zwischenräume nach und nach mit Polymer, sodass nach 24 Stunden die Oberfläche gleichmäßig mit vollständig ausgebildeten Partikeln um die 40 bis 50 nm dicht an dicht belegt ist. Eine REM-Aufnahme einer kryogebrochenen Probe zeigt die Monolage bei einer ungefähren Schichtdicke von 60 nm (s. **Abbildung 103**).



**Abbildung 103: REM-Aufnahmen einer kryo-gebrochenen Probe bei einem Beobachtungswinkel von 70 °.**

Um den Bildungsmechanismus dieser Polymerpartikelstrukturen besser analysieren zu können, werden sich im nächsten Schritt zwei verschiedene Besonderheiten genauer untersucht, die auf Proben vorkommen: Zum einen die Löcher an den Partikeln und zum anderen eine Ablösung der geformten Strukturen durch Wasser oder Kratzer und aus der Lösung heraus abgeschiedene, deutlich größere Phenolpartikel (s. **Abbildung 104**).



**Abbildung 104: Auffälligkeiten im EMA-Prozess von Phenol mit adsorbiertem HRP: Entstehende Partikel mit Ringstruktur (a) und Partikel gegen Ende des Bildungsprozesses mit Löchern (b) sowie Ablösung der geformten Struktur (c und d), im Waschvorgang verschobene beschichtete Enzymaggregate (e) und aus der Lösung heraus abgeschiedene Partikel (f).**

Bei starker Vergrößerung (s. Abbildung 104 a) sind ringförmige Strukturen der sich bildenden Partikel erkennbar, während in Abbildung 104 b nur noch kleinere Löcher im Bildungsprozess der Partikelstrukturen deutlich zu sehen sind. Ebenso sind feste Verbindungsbrücken zwischen vielen Partikeln sichtbar.

Besonders interessant ist zudem die Betrachtung der Ablösung durch Kratzer in Abbildung 104. Nach dem Abspülen der Probe mit Wasser um nicht reagiertes



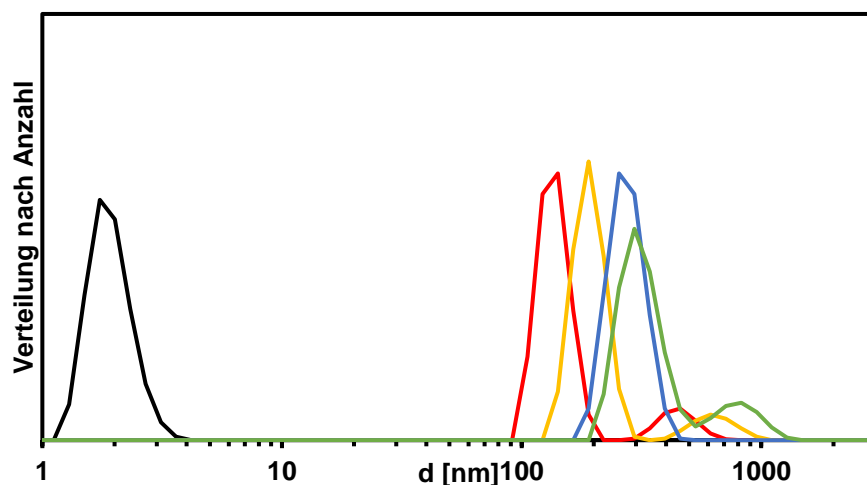
Phenol abzuspülen, wurden die Proben häufig mit einem Skalpell angekratzt, um die entstehenden Strukturen besser vom Untergrund unterscheiden zu können. Bei den noch nassen und - im Falle von dem Phenolpolymer – extrem dünnen Proben kommt es dabei vereinzelt zu Ablösungen durch Unterspülung des wasserlöslichen Enzyms unmittelbar auf der Glasoberfläche. Dies ist zwar nicht erwünscht, jedoch bietet es hervorragende Möglichkeiten die Struktur genauer zu untersuchen, da die Polymerstrukturen dabei wie in Abbildung 104 c teilweise „umgeklappt“ werden und dadurch der Untergrund der Beschichtung zu erkennen ist (s. Abbildung 104 d): Es zeigt sich, dass die abgeschiedenen Strukturen nicht wie es auf den ersten Blick scheint aus der Lösung heraus abgeschiedenen Partikeln besteht, sondern diese Partikel unmittelbar am Untergrund einen durchgängigen extrem dünnen Film bilden. Nimmt man dazu die ringförmigen Strukturen der sich bildenden Partikel aus der Zeitreihe zeigt sich, dass die Partikel anders als in vorherigen EMA-Prozessen nicht in der Reaktionszone in der Lösung nah an der Oberfläche gebildet werden, sondern unmittelbar auf den adsorbierten Enzymen an der Oberfläche. Dies liegt daran, dass die Enzyme an jedem neuen Schritt der Kupplungspolymerisation direkt beteiligt sind.

Bei den Systemen zuvor war die HRP lediglich für den Kettenstart verantwortlich, wodurch die PMMA- und Polystyrolpartikel anschließend innerhalb der Lösung wachsen und danach auf der Oberfläche abgeschieden wurden und verfilmten.

Die Ringstrukturen der entstehenden Polyphenolpartikel zeigen genau das Gegenteil: Unmittelbar um die Enzyme herum bilden sich die Partikel aus und überwachsen diese schließlich, wenn nach und nach mehr Phenole radikalisiert werden und mit den bereits oligomerisierten Strukturen um die Enzyme herum reagieren und diese Ringstrukturen zum Wachsen bringen, bis diese sich nach und nach um das Enzym herum schließen und nur noch kleine Löcher zu erkennen sind (s. Abbildung 104 b). Durch Diffusion von Phenolen zum aktiven Zentrum wächst der Partikel stetig weiter. Nach bis zu 24 Stunden ist dieser Prozess endgültig abgeschlossen. In den Zwischenräumen der Partikel kommt es dabei unmittelbar an der Oberfläche zu Verfilmungen des Untergrunds in extrem dünnen Schichten. Abbildung 104 e zeigt die im Waschvorgang verschobenen beschichteten Enzymaggregate. Damit wird deutlich, dass die

Enzymschicht deutlich leichter angelöst werden kann als die feste Polymerschicht.

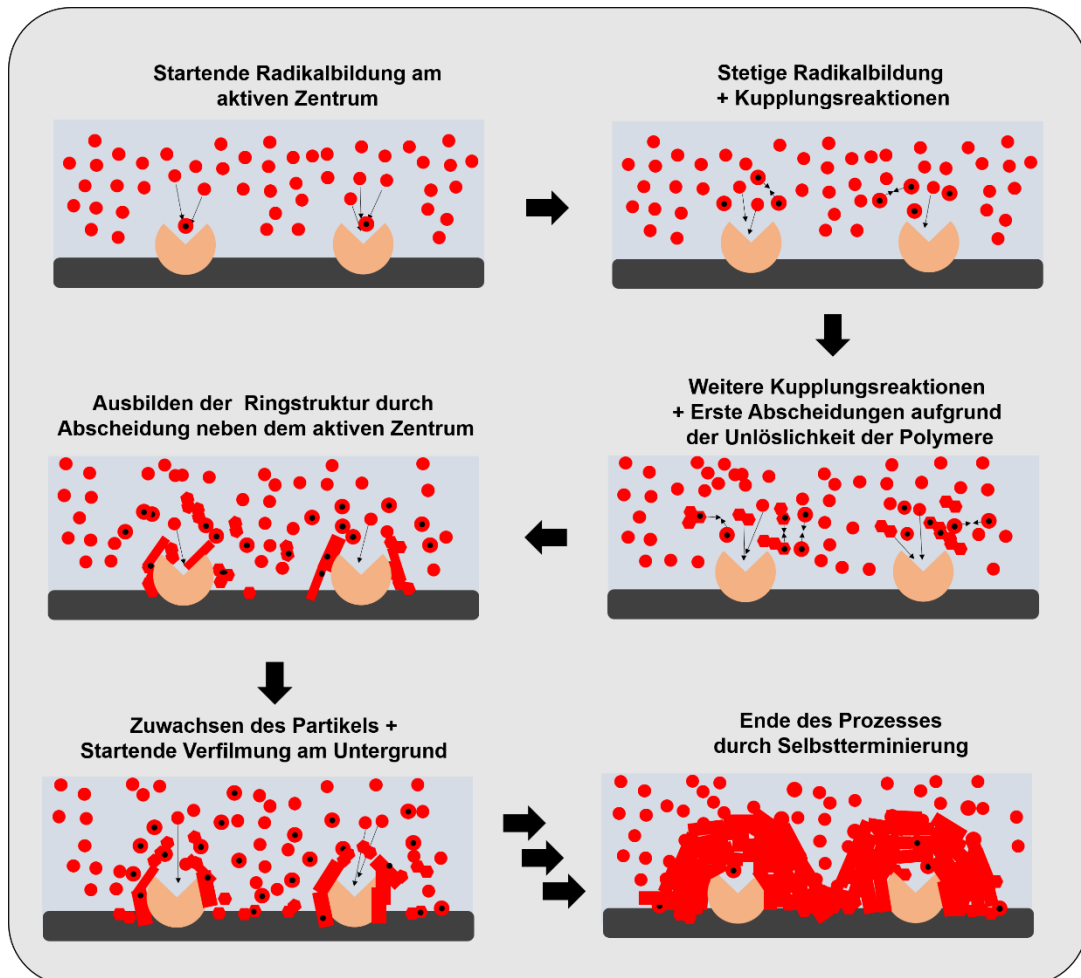
Abbildung 104 f zeigt eine weitere Besonderheit auf, die an manchen Proben im Bereich der vorherigen Pinzettenhalterung vorkommt. An diesen Stellen kommt es vereinzelt zur Ablagerung großer Phenolpolymerpartikeln (teilweise größer als 500 nm). Dieser Zusammenhang ist auf die Pinzette zurückzuführen, da sie die adsorbierten Enzyme aufschiebt und somit dazu führt, dass hier vermehrt Enzyme in Lösung gehen und nicht mehr adsorptiv an die Oberfläche gebunden sind. Diese in Lösung polymerisierten Partikel erreichen klar runde Strukturen und viel größere Partikelgrößen, da das Enzym hier durch Bedeckung nicht selbst den Prozess unterbindet, sondern weiterhin in Lösung an der Polymerisation teilnehmen kann. Zur Kontrolle wurde eine Zeitreihe von der Phenolpolymerisation in Lösung durch HRP bei Raumtemperatur durchgeführt und die Größen der entstehenden Partikel via DLS gemessen (s. **Abbildung 105**).



**Abbildung 105:** Zeitaufgelöste DLS-Größenverteilung der Phenolpolymerisierung über HRP im Wasser-Dioxangemisch (2:1) bei pH 7. (schwarz – vor HRP-Zugabe; rot – 3 min; orange – 30 min; blau – 60 min; grün – 4 Stunden).

Die Phenolpolymerpartikel überschreiten bei Polymerisation in Lösung schon nach wenigen Minuten die 150 nm und liegen nach 4 Stunden bei 300 bis 1000 nm Größe.

Durch all diese Besonderheiten wird der in **Abbildung 106** dargestellte und zuvor beschriebene Bildungsmechanismus mit einer maximalen Größe von 40 bis 50 nm bei der EMA von Phenol bestätigt.

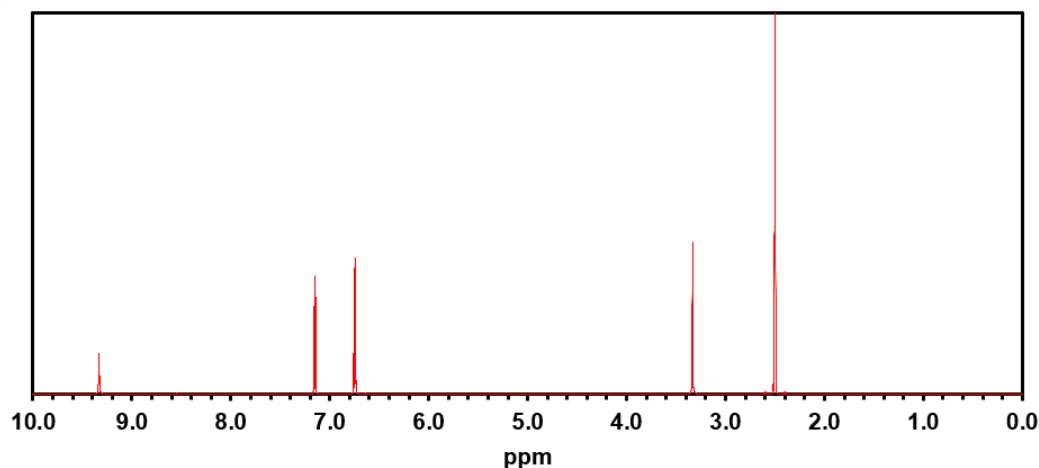


**Abbildung 106: Mechanismus der EMA von Phenol mit HRP (Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Enzymteilchen größer gezeichnet als bei den bisherigen Schaubildern).**

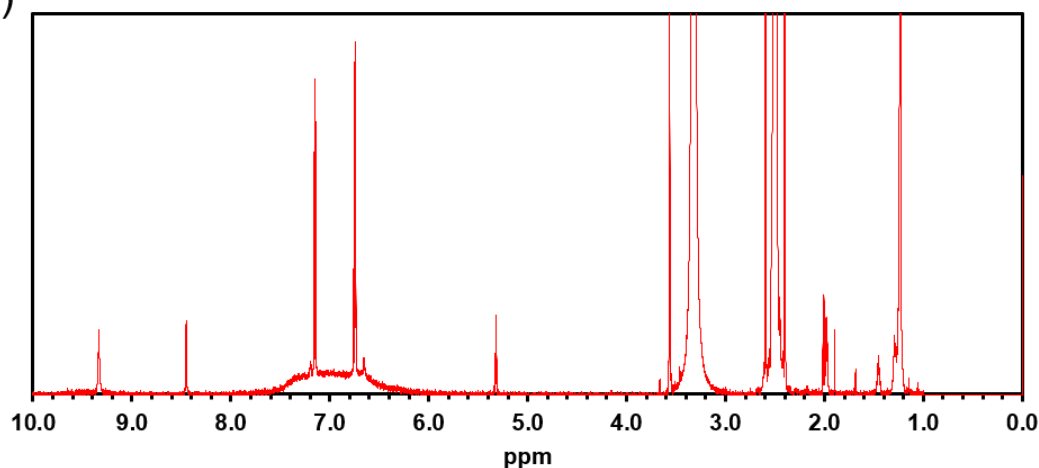
Das erfolgreich per EMA abgeschiedene Polyphenol wird im nächsten Schritt näher analysiert. Die Abscheidungen sind unlöslich in gängigen Lösungsmitteln wie THF, DMF, DMSO oder Chloroform. Ähnliches wurde bereits für Polymerisationen über HRP von phenolischen Monomeren aus der Lösung heraus ohne EMA berichtet.<sup>261,262</sup> Dies erschwert die Analytik, da für die gängigen Verfahren wie NMR, MS oder GPC idealerweise in Lösung gearbeitet wird.<sup>263–265</sup> Die Unlöslichkeit gibt jedoch bereits einen Hinweis auf eine mögliche Quervernetzung der Polymere. Lediglich ein geringer niedermolekularer Teil des

Polymers wurde erfolgreich in deuteriertem DMSO gelöst. Das zugehörige  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Monomers und Polymers ist in **Abbildung 107** dargestellt.

a)

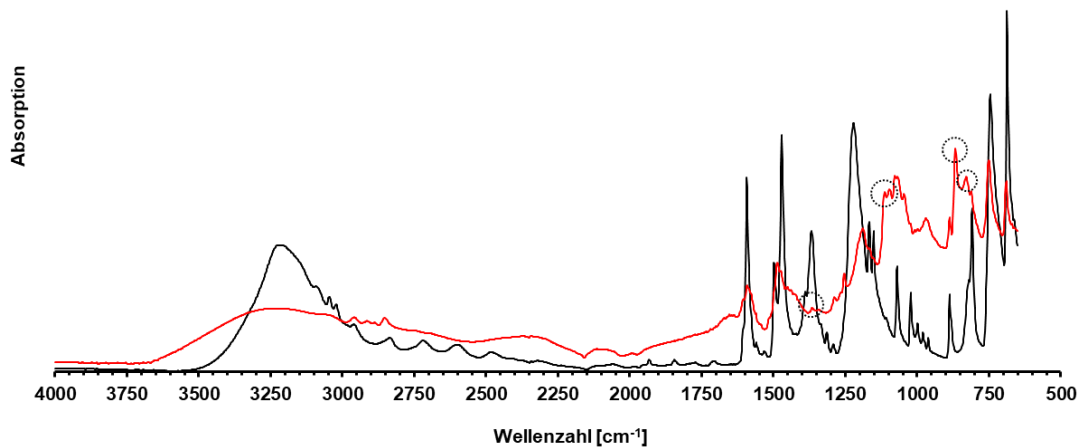


b)



**Abbildung 107:**  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Phenol-Monomers (a) und des löslichen Teil des Phenolpolymers (b)

Das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des löslichen Teils des Polymers in deuteriertem DMSO zeigt unter den Signalen des Phenylrings ( $\delta\text{H} = 7.15$ ;  $\delta\text{H} = 6.74$ ;  $\delta\text{H} = 6.76$ ) eine deutliche Peakverbreiterung, was auf eine Polymerisation hinweist. Ebenso sind weitere zusätzliche Signale entstanden. Um die chemische Struktur des Polymers detaillierter zu untersuchen wurde die FTIR-ATR (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion) verwendet, die sich auch für Festkörper eignet (s. **Abbildung 108**).

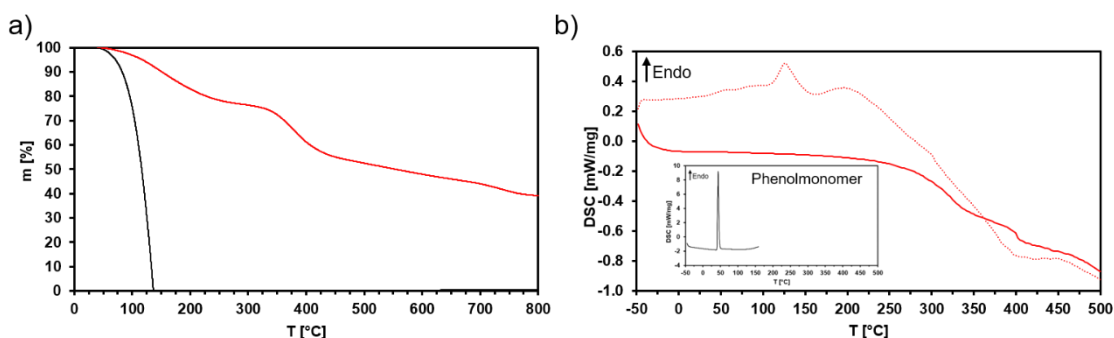


**Abbildung 108: FTIR-ATR-Spektrum des Phenolmonomers (schwarz) und des Phenolpolymers (rot) mit markierten Banden.**

Abbildung 108 zeigt die Spektren des Phenolmonomers (schwarz) und des Phenolpolymers (rot). Das Polymerspektrum zeigt eine Bandenverbreiterung und verringerte Hydroxylbanden um  $3000\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$  (Streckung) und  $1360\text{ cm}^{-1}$  (Biegung). Zusätzlich entstehen neue CO-Streckschwingungsbanden bei etwa  $1110\text{ cm}^{-1}$ , die charakteristisch für Etherbindungen sind. Während kleine Verschiebungen in den aromatischen Schwingungen entstehen ( $650\text{ bis }800\text{ cm}^{-1}$ ), ist ein neues breites Signal bei etwa  $830\text{ cm}^{-1}$  zu sehen. Diese Bande ist charakteristisch für di- und/oder trisubstituierte Phenylringe.<sup>266,267</sup> Außerdem liegt ein charakteristisches Signal für einen tetrasubstituierten Phenylring bei etwa  $870\text{ cm}^{-1}$ .<sup>268–270</sup> Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IR-Spektren eindeutig auf eine Quervernetzung hinweisen, die hauptsächlich auf Verschiebungen in den Phenylschwingungen und die Entstehung neuer Banden für mehrfach substituierte aromatische Ringe zurückzuführen ist. Darüber hinaus zeigen die Verringerung der OH-Signale zusammen mit zunehmenden C-O-Streckbanden, dass eine Polymerisation stattgefunden hat.

Im nächsten Schritt werden Polymere thermisch analysiert. Hierzu werden sowohl die Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC – „Differential Scanning Calorimetry“)<sup>271</sup> als auch die Thermogravimetrische Analyse (TGA) durchgeführt. Mithilfe der DSC können über thermische Analyse von aufgenommenen Wärmemengen Phasenübergänge wie Schmelzpunkte und

Glasübergangstemperaturen bestimmt werden. Die TGA gibt den Verlauf der Masse mit steigender Temperatur unter Stickstoffatmosphäre an. Die durchgeführten des über EMA abgeschiedenen Phenolpolymers, und des reinen Phenol-Edukts sind in **Abbildung 109** dargestellt.



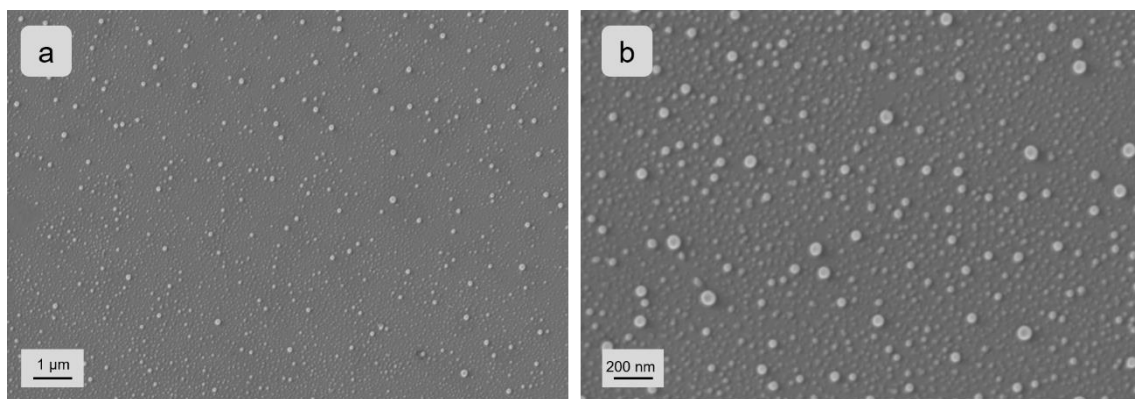
**Abbildung 109: TGA-Messung des Phenolpolymers (rot) und Phenolmonomers (schwarz) von 0 bis 800 °C (a) und DSC-Messung des Phenolpolymers im ersten (rot gestrichelt) und zweiten Durchlauf (rot) jeweils von -50 bis 500 °C (b).**

Die TGA-Kurve des Phenolpolymers (s. Abbildung 109 a) zeigt drei relevante Bereiche. Erstens wird ein Masseverlust von etwa 20 Gew.-%. in einem Temperaturbereich von 100 bis 250 °C beobachtet. Diese Menge kann auf verbleibende Monomere und andere niedermolekulare Spezies, wie z. B. dimere Varianten, zurückgeführt werden. Als Referenz dient das Thermogramm des Phenolmonomers, dessen Siedepunkt in der Literatur 181 °C beträgt. Die zweite Zersetzung beginnt bei etwa 250 °C und dauert bis weit über 400 °C. Dieser Massenverlust hängt höchstwahrscheinlich mit der thermischen Labilität des vernetzten Polymers zusammen, das sich immer weiter zersetzt. Schließlich verbleiben bei 800 °C noch mehr als 40 % des Ausgangsgewichts als verkohlte Spezies. Insgesamt kann aus dem Thermogramm abgeleitet werden, dass der Polymeranteil der Probe etwa 80 Gew.-%, beträgt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die thermische Stabilität des Polymers bei mindestens 250 °C liegt. Dies macht die von EMA abgeschiedenen Polyphenolbeschichtungen für mögliche Hochtemperaturanwendungen sehr interessant, was der Literatur ähnelt, die bereits andere Phenolmonomere für die enzymatische Polymerisation berichtet wurde.<sup>268</sup>

Während der DSC-Messungen (Abbildung 109 b) wurden die Proben von -50 °C bis 500 °C erhitzt. Während des ersten Wärmezyklus zeigt das Phenolpolymer kleine endotherme Signale bei etwa 50 °C, 125 °C und 200 °C, während das reine Monomer bei 42 °C schmilzt. Im Allgemeinen ist die Wärmekapazität von Phenolpolymeren sehr gering, was auf ihren hohen Vernetzungsgrad zurückzuführen ist.<sup>272</sup> Dies erschwert die Bestimmung eines Glasübergangs. Darüber hinaus ergab die TGA einen Verlust von 20 Gew.-% bis 200 °C aufgrund von Verunreinigungen, so dass es sich bei diesen Signalen auch um Phasenübergänge oligomerer Verunreinigungen handeln könnte. Dies ist umso wahrscheinlicher, als in einem zweiten Wärmezyklus keine solchen Phasenübergänge mehr nachweisbar sind. Die Bestimmung des Schmelzpunkts mit dem Schmelzpunktgerät Modell „Büchi B-545“ führte ebenfalls zu keinem Schmelzen des Polymers, da selbst bei 415 °C, der Temperatur wo der Abbau bereits stattfand, das Polymer optisch seinen Zustand nicht änderte.

### 3.4.3.2 EMA von Phenolpolymeren über kovalente Anbindung und Abscheidung bei Enzymaggregaten

Nach der erfolgreichen enzymatischen Abscheidung von Phenolpolymeren mittels Adsorption behandelt dieses Kapitel die Abscheidung mittels kovalent angebundenem Enzym. Die Vorgangsweise der kovalenten Anbindung von HRP erfolgt auf die gleiche Art und Weise wie zuvor. Die anschließende Abscheidung per EMA findet bei den zuvor für die Adsorption als optimal herausgefundenen Bedingungen bei pH 7 (mit Phosphatpuffer); 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration und für 24 h bei Raumtemperatur einem Wasser-Dioxangemisch (2:1) statt. Die Abscheidungen wurden wie üblich mit dem REM analysiert (s. **Abbildung 110**).

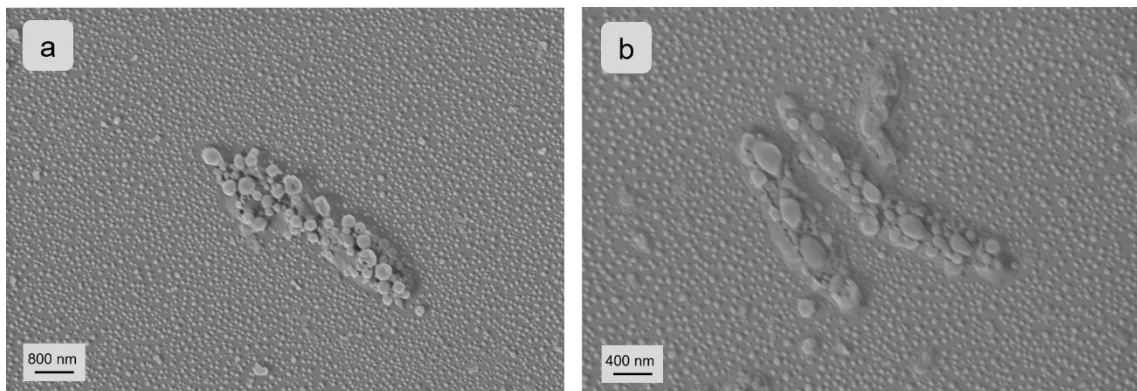


**Abbildung 110: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach kovalent gebundenem HRP in unterschiedlichen Vergrößerungen.**

Die REM-Aufnahmen zeigen gleichmäßig auf der Probe abgeschiedene Phenolpolymere in Partikelform. Diese erreichen eine maximale Größe von ca. 40 bis 50 nm, ergo die gleiche Größe wie bei der Abscheidung mittels adsorptiv gebundener HRP. Dies spricht belegt erneut den zuvor postulierten Mechanismus des Wachstums des Partikels um das Enzymmolekül herum (vgl. Abbildung 106). Der Abstand unter den Partikeln ist jedoch deutlich größer als bei der adsorptiven Variante. Dies spricht für weniger zugängliche Enzyme, da die Orientierung der kovalent gebundenen Enzyme nicht direkt im Prozess gesteuert wird und somit nicht alle gebundenen Enzyme für die Reduktion  $\text{H}_2\text{O}_2$  und somit die anschließende Kupplungspolymerisation zur Verfügung stehen. Ebenso ist ein von einem größeren Abstand der Enzymmoleküle auf der Oberfläche auszugehen.



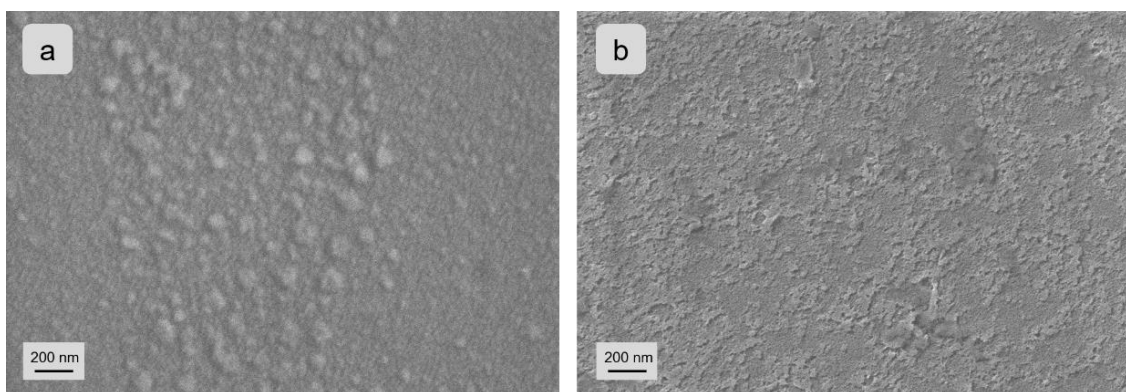
**Abbildung 111** zeigt die Abscheidung an Enzymaggregaten.



**Abbildung 111: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol bei Enzymaggregaten.**

Es sind unterschiedlich große Enzymaggregate zu sehen, auf denen jeweils größere Partikel von maximal bis zu 250 nm polymerisiert wurden. Die Erklärung hierzu liegt, wie bei den Enzymaggregaten bei anderen Systemen zuvor, in der größeren zugänglichen Enzymmenge. Die aggregierten Enzymmoleküle an der Oberfläche können weiterhin in Lösung diffundieren und ohne weitere sterische Hinderung deutlich größere Partikel entstehen lassen.

Die kovalente Enzymimmobilisierung über Spacer und die anschließende Abscheidung über EMA erfolgt wie zuvor beschrieben ebenfalls unter den optimalen Bedingungen. Dabei ergeben sich folgende REM-Aufnahmen (s. **Abbildung 112**):



**Abbildung 112: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach kovalent über einen Spacer gebundener HRP (a: Spacer = 10.000 g/mol; b: Spacer = 20.000 g/mol).**

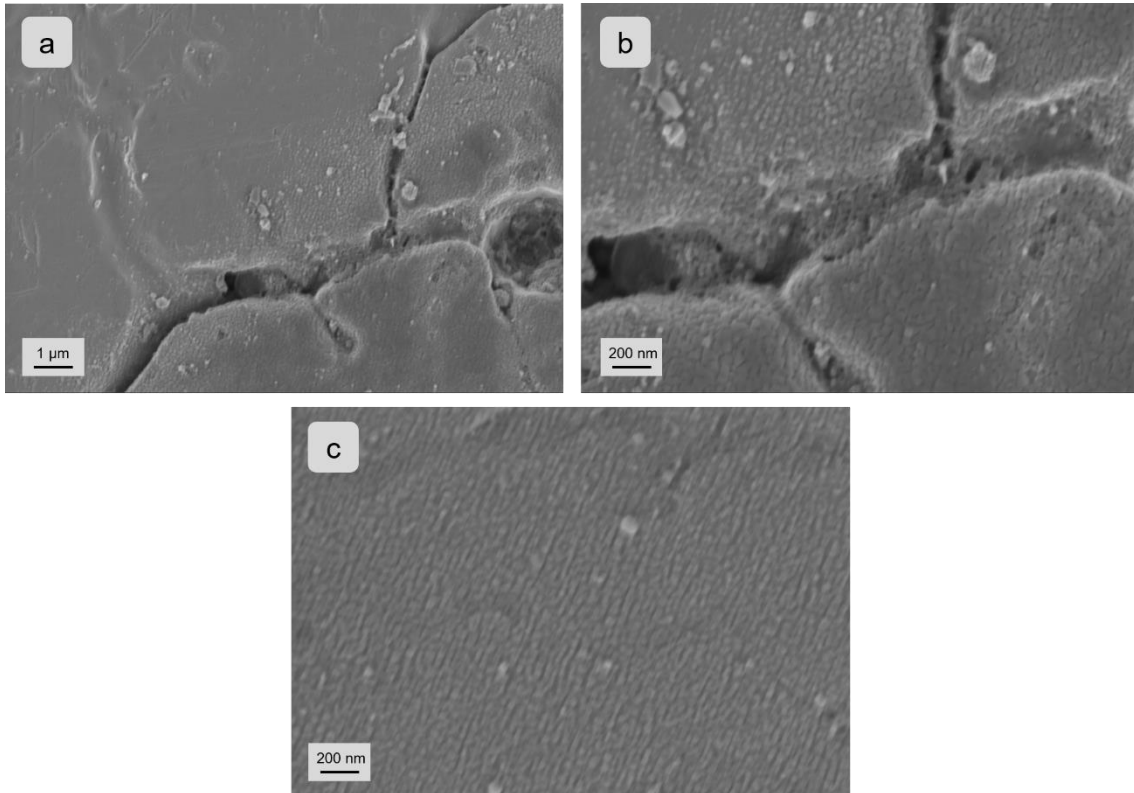
Die Abscheidung über Spacer ergibt in beiden Fällen spärlichere Abscheidungen als die direkte kovalente oder adsorptive Variante. Bei 10.000 g/mol bilden sich zwar vereinzelt partikelartige Strukturen, jedoch verteilen sich die spärlich über

die Oberfläche und schwinden mit der Zeit unter dem REM, was für einen niedrigen Polymerisationsgrad spricht. Bei dem Spacer von 20.000 g/mol ergeben sich keine partikelartigen Strukturen, sondern lediglich extrem dünner, löchriger Film, was ebenfalls für eine stark verringerte Enzymaktivität spricht. Mit der Spacer-Variante werden dementsprechend erneut keine Verbesserungen erzielt. Lediglich die direkt kovalente Variante führt zu einer regelmäßigen Abscheidung, die jedoch auch quantitativ der adsorptiven Variante unterliegt.

### 3.4.3.3 EMA von Phenolpolymeren auf unterschiedlichen Materialoberflächen

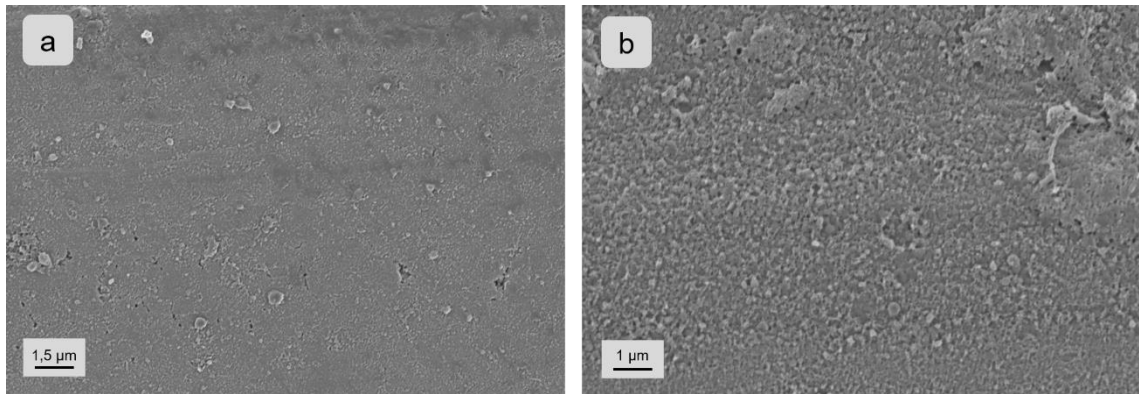
Ein Nachteil klassischer Tauchlackierungen wie der KTL oder der Autophorese liegt in der begrenzten Oberflächenauswahl. Diese Verfahren beruhen entweder darauf, dass entweder Strom im Material fließen muss oder Metallionen aus der Oberfläche entweichen. Daher sind diese Verfahren auf metallische Substrate begrenzt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Abscheidungen über die EMA erfolgten bisher auf Glas. Dies liegt zum einen an der homogenen Oberflächenstruktur als auch der guten Modifizierbarkeit der Oberfläche durch die Silanchemie. In diesem Abschnitt wird die Abscheidung von Phenolpolymeren durch die EMA auf unterschiedliche Materialien erweitert. Zunächst werden die Metalle Edelstahl, Aluminium und Messing betrachtet. Die untersuchten Abscheidungen finden ausschließlich nach adsorbierter HRP statt. Die Adsorption erfolgt analog zum Glas, die Materialien werden jedoch lediglich mit Ethylacetat gereinigt, bzw. entfettet. Die Parameter der Abscheidung liegen bei 1-v%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH 7 und Raumtemperatur für 24 Stunden im Dioxan/Wasser/Phenolgemisch. **Abbildung 113** zeigt die REM-Aufnahmen auf Edelstahl.



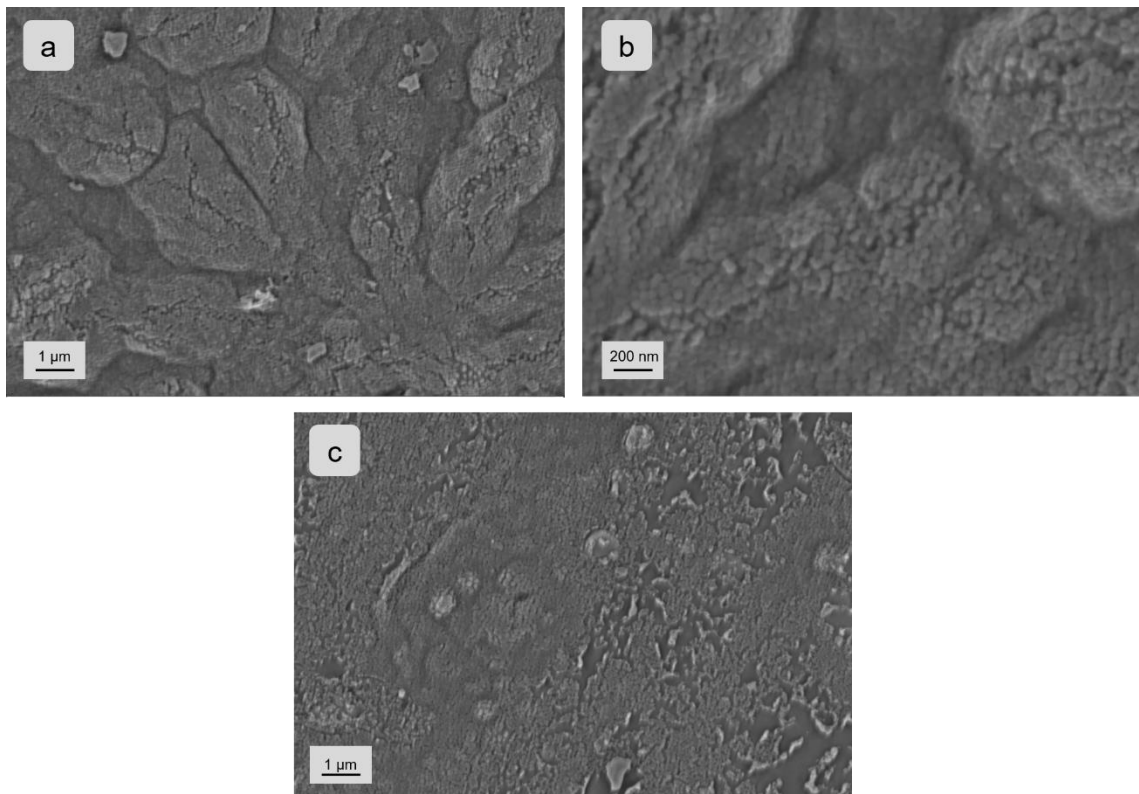
**Abbildung 113: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Edelstahl in verschiedenen Vergrößerungen.**

Die EMA von Phenolpolymeren auf Edelstahl erfolgt äquivalent zu den bisherigen Abscheidungen auf Glas. Abbildung 113 a und b zeigen den Trocknungsrand und die abgeschiedene Monolage von Phenolpolymeren und die klare Abgrenzung zum äußeren Bereich ohne Enzym. Die Partikel der Monolage weisen die gleiche Größenverteilung von ca. 40 bis 50 nm wie die auf Glas abgeschiedenen Phenolpolymere auf. Die im Bild sichtbaren Risse sind Mikrokrater im Untergrund des Edelstahls. Auch innerhalb der Krater findet eine Abscheidung statt, da die Enzymteilchen auch hier adsorbieren. Abbildung 113 c zeigt die Aufnahme mit Monolagenstruktur im Inneren der Beschichtung.



**Abbildung 114: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Aluminium in verschiedenen Vergrößerungen.**

**Abbildung 114** zeigt die Abscheidung auf Aluminium. Das Aluminium weist im Vergleich zum Edelstahl eine rauere Oberflächenstruktur auf. Die per EMA abgeschiedenen Phenolpolymere werden ebenfalls in partikelartiger Monolagenstruktur abgeschieden. Über den Verlauf der Probe sind jedoch mehr Fehlstellen zu erkennen als beim Edelstahl.

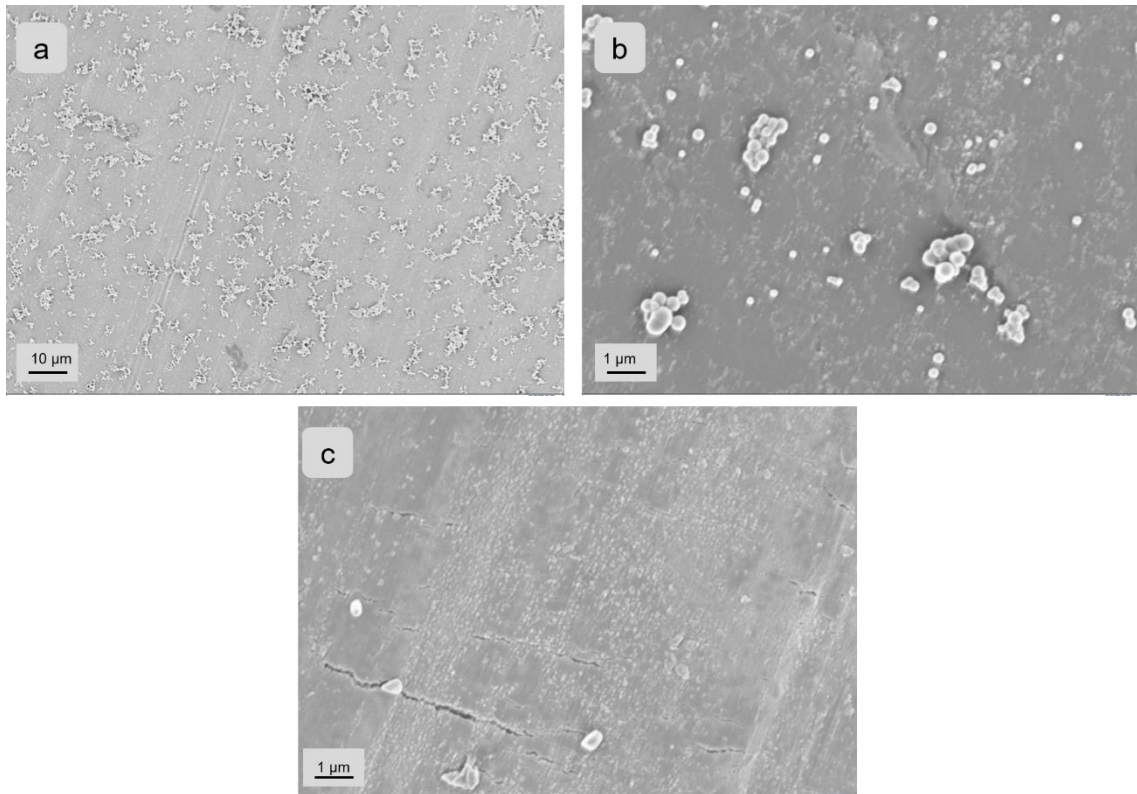


**Abbildung 115: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Aluminium in verschiedenen Vergrößerungen.**

In **Abbildung 115** ist die EMA von Phenolpolymeren auf Messing gezeigt. Die Abscheidung von Phenolpolymeren weist auch auf dem unruhigen Messinguntergrund eine klar erkennbare Monolage auf. Die Monolage passt sich dem Untergrund dabei deutlich an. Die partikelartige Struktur ist besser zu erkennen als beim Aluminium und ist bis auf ein paar Fehlstellen (s. Abbildung 115 c) homogen auf der Oberfläche zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EMA von Phenolpolymeren auch auf Metallen ähnlich erfolgreich wie beim Glas funktioniert. Die abgeschiedenen Strukturen sind identisch und homogen. Lediglich Fehlstellen durch den unruhigen Untergrund treten etwas häufiger auf. Eventuell lassen sich diese in Zukunft durch eine bessere Reinigung/Entfettung der Materialoberfläche verhindern.

Nach der erfolgreichen Abscheidung auf Metallen wird die Abscheidung auf Kunststoffen, die i.d.R. aufgrund der niedrigen Oberflächenspannung (Literaturwert:  $34 \text{ N/m}^{273}$ ) schwer zu beschichten sind, untersucht. Als Modellsystem wurde Polyethylen (PE) ausgewählt. Die zugehörigen EMA-Versuche sind in **Abbildung 116** dargestellt.



**Abbildung 116: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Polyethylen in verschiedenen Vergrößerungen.**

Die EMA von Phenolpolymeren auf Polyethylen ist nicht erfolgreich. Zwar werden Phenolpolymere in Partikelform abgeschieden (s. Abbildung 116 a und b), jedoch sind dies hauptsächlich größere Agglomerate bestehend aus Partikeln mit einer Größenordnung von ca. 200 bis 500 nm. Dies spricht aufgrund der Größe und Agglomeration nicht für durch an der Oberfläche immobilisierte HRP polymerisierte Phenolpartikel, sondern für eine Polymerisation und Abscheidung aus der Lösung heraus. Die bekannte Monolagenstruktur mit Partikeln um die 40 nm findet sich nur sporadisch in der Probe, vor allem in der Nähe von kleinen Kratzern. Die EMA-Versuche auf Polyethylen lassen darauf schließen, dass die Adsorption des Enzyms aufgrund der niedrigen Oberflächenspannung nur sehr schwach ausfällt. Durch die Reversibilität der nur schwach adsorptiv gebundenen Enzyme, gehen während des Beschichtungsvorgangs viele Enzymteilchen wieder in Lösung und polymerisieren hier Phenol zu größeren Partikeln, die irgendwann agglomerieren und ausfallen. Das Vorhandensein von vereinzelt Monolagen an Kratzern, weist daraufhin, dass an rauen Stellen im Material die Adsorption stärker ausfällt und die HRP hier zur gewohnten Abscheidung führt.

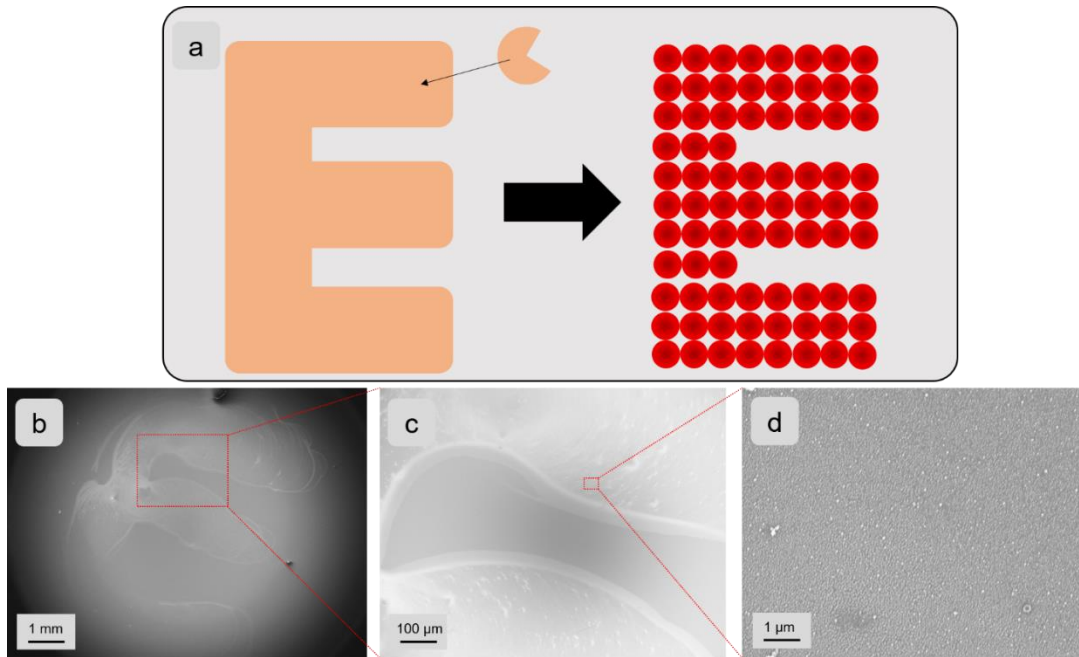
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die EMA auch auf anderen Materialoberflächen analog wie beim Glas funktioniert, solange das Enzym ausreichend auf dieser adsorbiert.



#### 3.4.4 EMA als Methode der Mikrostrukturierung

In diesem Abschnitt wird die Möglichkeit der Mikrostrukturierung mittels EMA überprüft. Die EMA stellt eine ortsspezifische Abscheidung dar, da das Enzym je nach Variante entweder die Abscheidung oder die Polymerisation und anschließende Abscheidung durch entstehende Unlöslichkeit aus dem umgebenden Medium heraus triggert. Bei der Aufbauvariante werden Polymere mithilfe der HRP aus Monomeren durch radikalische Kettenpolymerisation oder durch Kupplungspolymerisation erzeugt und mit steigender Molmasse unlöslich. Bei der Destabilisierungsvariante hingegen werden Mizellen von der Lipase nach und nach gespalten und damit abgebaut, woraufhin die in den Mizellen befindlichen organischen oder anorganischen Partikel durch die sich abbauende Stabilisierung abgeschieden werden. Dieser Prozess findet zwar innerhalb der Lösung, jedoch unmittelbar nah an der Oberfläche in der Reaktionszone des Enzyms statt. Die bisherigen Abscheidungen haben zwar gezeigt, dass prinzipiell dort wo viel Enzym (Trocknungsrand und Enzymaggregate) auch vermehrt Partikel abgeschieden werden, jedoch ist bei der Aufbauvariante mit Phenolpolymeren aufgrund der Beteiligung an jedem Kupplungsschritt die höchste Ortsspezifität zu erwarten. Daher wird das Phenolpolymersystem als Modellsystem zur Mikrostrukturierung ausgewählt.

Hierzu wird das jeweilige Enzym in Form des Buchstaben „E“ (für Enzym) auf die Oberfläche aufgetragen. Die Auftragung der Enzymlösung auf den basisch gereinigten Glasoberflächen erfolgt mit einem einzelnen Haar eines Borstenpinsels, um möglichst scharfe Muster erzeugen zu können. Die gezeichnete Pinselbreite beträgt ca. 800 µm. Um die Ortsspezifität des Prozesses zu bestätigen, muss die folgende Abscheidung ausschließlich in der enzymfunktionalisierten Zone erfolgen. Die Durchführung der Abscheidung erfolgt ansonsten analog zu den vorherigen Abscheidungen. Ein Schema dieses Prozesses und die zugehörigen REM-Aufnahmen sind in **Abbildung 117** dargestellt.



**Abbildung 117: a) Schematische Darstellung des Strukturierungsansatzes; b-d) REM-Aufnahmen der ortspezifischen Abscheidung der Phenolpolymere in verschiedenen Vergrößerungen.**

Nach dem enzymatischen Abscheidungsprozess ist der aus Phenolpolymeren aufgebaute Buchstabe „E“ klar sichtbar. Außerhalb des Buchstaben erfolgt nahezu keinerlei Abscheidung. Das Phenolpolymer weist zudem die bekannte Partikelstruktur auf. Eine hohe Ortsspezifität und damit die mögliche Nutzbarkeit der EMA als Methode zur Mikrostrukturierung wird damit bestätigt und zeigt einmal mehr die hohe Breite der möglichen Nutzung der EMA als Abscheidungs- bzw. Beschichtungsmethode.

### 3.4.5 Kapitelzusammenfassung

Mit diesem Abschnitt wurde der EMA-Prozess von Polymeren, um die Aufbauvariante über HRP erweitert. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass die zuvor ermittelten Kenntnisse über Immobilisierungstechniken von der Lipase auch für die HRP angewendet werden kann. Der Abscheidungsprozess unterscheidet sich vor allem dadurch, dass das Enzym sowohl an der Synthese des Polymers als auch an der Abscheidung ebendieses beteiligt ist. In wässrigem Milieu können mithilfe von Wasserstoffperoxid und eines Mediators wie Acetylaceton wasserlösliche vinylische oder acrylatische Monomere (in diesem Fall MMA) radikalisch polymerisiert und ortsspezifisch auf der zuvor immobilisierten HRP abgeschieden werden. Die Abscheidung erfolgt durch die zunehmende Unlöslichkeit des wachsenden Polymers. Durch die adsorptive Variante wurden quantitativ erneut die besten Resultate erzielt. Durch Steuerung des pH-Wertes und des Anteils an Wasserstoffperoxid kann die Art der Abscheidung, ergo ob Partikel oder durchgängige Filme abgeschieden werden, direkt gesteuert werden. Die Schichtdicken des durchgängigen PMMA-Films betragen bis zu 400 nm. Hohe Enzymkonzentrationen wie bei Aggregaten führen zu einer erhöhten Abscheidung. Durch Hinzunahme eines Colösungsmittel wie z.B. Dioxan lässt sich der Prozess auch auf nichtwasserlösliche Monomere wie z.B. Styrol übertragen. Im letzten Teil wird der EMA-Prozess über HRP mit der oxidativen Kupplungspolymerisation von Phenol um ein weiteres Kapitel erweitert. Im Gegensatz zum vorherigen Prozess, bei dem HRP lediglich den Start der Kettenpolymerisation bildet, ist das Enzym bei der oxidativen Kupplungspolymerisation an jedem Teilschritt beteiligt. Dadurch entsteht eine direkte Nanostrukturierung der Oberfläche mit homogenen Partikelstrukturen von ca. 40 bis 50 nm. Der Mechanismus dieses Prozesses konnte durch eine zeitaufgelöste Nachverfolgung aufgelöst werden. Das zugehörige Polymer wurde analysiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die EMA auch auf andere Materialien als Glas in gleicher Weise funktioniert, solange das zugehörige Enzym auf der Oberfläche adsorbiert. Ebenso wurde die hohe Ortsspezifität der EMA genutzt, um sie als Mikrostrukturierungsmethode zu verwenden.

## 4 Zusammenfassung & Ausblick

### 4.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Prozess der EMA um synthetische Polymere erweitert. Durch die Enzyme Lipase und HRP können sowohl Polymerpartikel als auch Silbernanopartikel mit unterschiedlichen Abscheidemechanismen adressiert werden. Die Abscheidung begrenzt sich dabei nicht nur auf partikuläre Strukturen. Es sind auch durchgängige Polymerfilme mit einer Schichtdicke von bis zu 400 nm erreichbar. Die Abscheidungen weisen dabei eine hohe Ortsspezifität auf, da die Abscheidung durch das immobilisierte Enzym unmittelbar an der Grenzfläche der Oberfläche stattfindet. Die Schlüsselparameter der jeweiligen Prozesse wurden ermittelt und die zugrundeliegenden Abscheidemechanismen verstanden. Durch Änderung der Parameter, Temperatur, Abscheidezeit, pH-Wert oder Konzentration der beteiligten Stoffe lässt sich die Form der Abscheidung direkt beeinflussen.

Bei der Destabilisierungsvariante können mithilfe einer immobilisierten Lipase und dem durch sie spaltbaren PEG-*b*-PCL Blockcopolymers sowohl Polystyrol- als auch Polycyclohexylacrylat- oder elementare Silbernanopartikel in wässrigem Milieu abgeschieden werden. Die jeweiligen Partikel werden zuvor aus Monomeren bzw. Silbernitrat synthetisiert und durch die Blockcopolymermizellen stabilisiert. Generell führt die Erhöhung der Abscheidetemperatur bis zum Maximum von 40 °C zu einer quantitativ höheren Abscheidung. Die Größe der Polymerpartikel lässt sich durch die Größe des stabilisierenden Blockcopolymers direkt steuern. Durch Abscheidetemperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur verfilmen die Partikel im Abscheideprozess zu einem durchgängigen Film. Dies ist aufgrund der notwendigen niedrigen spezifischen  $T_g$  von unter 40 °C für die vorliegenden Systeme nur mit Polycyclohexylacrylat möglich.

Die Aufbauvariante der EMA ist u. a. mit auf einer Glasoberfläche immobilisierter HRP sowie  $H_2O_2$ , einem Diketon als Mediator und einem wasserlöslichen vinyl- oder acrylfunktionellen Monomer wie z.B. MMA im wässrigen Milieu möglich. Bei dieser Methode fungiert die HRP in Kombination mit dem Wasserstoffperoxid und

dem Mediator als Initiator für eine anschließende Kettenpolymerisation. Unter optimalen Bedingungen (pH 8 und 1,0-v%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) sind durchgängige Polymerfilme von bis zu 400 nm Schichtdicke möglich. Der zugrundeliegende Mechanismus der partikulären Abscheidung und anschließenden Verfilmung durch weitere Reaktionen wurde mit Zeitreihen nachverfolgt und ist innerhalb von 2 Stunden abgeschlossen. Abweichungen von diesen optimalen Bedingungen führen zu einer partikulären Abscheidung und hindern die Verfilmung. Die Abscheidung von Polymeren, die aus nichtwasserlöslichen Monomeren wie z.B. Styrol aufgebaut sind, ist mithilfe eines Lösungsmittels wie z.B. Dioxan möglich.

Anders ist es bei phenolischen Monomeren, die nicht durch Kettenpolymerisation polymerisierbar sind, sondern durch oxidative Kupplungspolymerisation. Hier ist die HRP an jedem Kupplungsschritt direkt durch Radikalbildung am  $\text{H}_2\text{O}_2$  beteiligt. Dadurch ist eine noch höhere Ortsspezifität der Abscheidung des Phenolpolymers möglich, da sich das Polymer direkt um das immobilisierte Enzym herum bildet. Der Prozess ist selbstterminierend, da das jeweilige Enzymteilchen nach und nach vom Polymer belegt wird und nicht mehr für Katalyse zur Verfügung steht. Die abgeschiedenen Strukturen bilden sich bereits bei Raumtemperatur und optimalen Bedingungen (pH 7 und 1,0-v%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aus. Sie bilden eine homogene Monolage mit einheitlicher Partikelgröße von 40 bis 50 nm. Die EMA lässt sich hierbei auch auf metallischen Untergründen durchführen.

Basierend auf den Versuchsergebnissen lässt sich festhalten, dass bzgl. der Enzymimmobilisierung die Variante der Adsorption aufgrund der höheren Flexibilität des Enzyms zur quantitativ größten Abscheidung führt. Die kovalente Immobilisierung führt bzgl. der Lipase zu einer quantitativ geringeren Abscheidung. Die kovalente Anbindung über Abstandshaltermoleküle führt aufgrund der Wechselwirkungen mit dem hydrophilen PEG-Anteil zu der quantitativ geringsten Abscheidung. Die hohe Ortsspezifität des EMA-Prozesses führt zu der Möglichkeit auch definierte Mikrostrukturen auf einer Oberfläche zu generieren. Dies konnte am Beispiel des hochspezifischen Prozesses der Phenolpolymerisierung mittels Mikropinselauftrags gezeigt werden.

## 4.2 Ausblick

In dieser Arbeit konnten die Vorteile der EMA als vielseitig einsetzbare Abscheidemethode (Tauchverfahren) aufgezeigt werden. Der Prozess ist aufgrund des an der Oberfläche angebrachten Gerades die hohe Ortsspezifität führt zu einem großen Einsatzpotential als Methode der Mikrostrukturierung. Die Abscheidebedingungen von 20 bis 40 °C und nahezu neutralem pH-Wert sind für industrielle Prozesse ideal, da auf kostenintensive äußere Faktoren verzichtet werden kann. Gerade für die Formaldehydproblematik ist die EMA von Phenol eine spannender Ansatz. Hier sollte mit anderen, weniger bedenklichen phenolischen Monomeren weiter geforscht werden. Die hier ausgewählten Enzyme Lipase und HRP sind aufgrund anderer technischer Nutzbarkeit bereits vergleichsweise kostengünstig zu erwerben. Lediglich bei der Nutzung nicht wasserlöslicher Monomere ist es nötig ein Lösungsmittel wie z.B. Dioxan hinzuzufügen.

Anders als bei konventionellen Tauchverfahren, bei denen häufig leitfähige Oberflächen benötigt werden, ist bei der EMA lediglich die Adsorption des Enzyms notwendig. In Zukunft sollte der Fokus daher auf der Beschichtung weiterer Oberflächen liegen. Besonders interessant sind die metallischen Substrate z.B. für Implantate. Erste Ergebnisse bezüglich der Beschichtung von Metallen mit dem Phenolpolymer zeigen bereits vielversprechendes Potential.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Materialien

Gefriergetrocknete *Pseudomonas Cepacia* Lipase (41.3 U/mg, analysenrein) wurde von VWR bestellt und genutzt wie geliefert. PEG-*b*-PCL Blockcopolymere mit verschiedenen Molekulargewichten wurden von Creative PEGWorks erhalten. Das Octapeptid LSFMAIPP wurde bei CASLO ApS gekauft. Der genutzte Phosphatpuffer (500 mM, pH 7.0) wurde von Cayman Chemical Company erhalten. Gefriergetrocknete HRP (241 U/mg, analysenrein) wurde von VWR erhalten. Acetylaceton wurde vor Benutzung bei 60 °C (30 mbar) destilliert, um Unreinheiten zu entfernen. Alle anderen Chemikalien sind von technischer Qualität und sind ohne weitere Aufbereitung genutzt worden.

### 5.2 Experimentelle Prozeduren und Synthesen

#### 5.2.1 Herstellung eines Chymosinspaltbaren Stabilisators

Zur Herstellung des Stabilisators werden drei verschiedene Ansätze verfolgt:

- a) Äquimolare Mengen Octapeptid LSFMAIPP und BADGE in DMF bei 40 °C gelöst und 1 wt% Dimethylbenzylamin als Katalysator hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird für 5 Stunden gerührt.
- b) Äquimolare Mengen des Octapeptids und Isophorondiisocyanats werden bei 60 °C in DMF gelöst. Das Reaktionsgemisch wird drei Stunden gerührt.
- c) Im Anschluss wird äquimolar Jeffamine M-1000 zur Lösung hinzugegeben und drei Stunden gerührt.

#### 5.2.2 Untersuchung der Eigenschaften der PEG-PCL-Blockcopolymere

Zunächst wurden die reinen PEG-PCL-Blockcopolymeren verschiedener Molmassen und daraus resultierenden unterschiedlichen Kettenlängen

hinsichtlich ihrer Größenverteilung mittels DLS in wässriger Lösung analysiert. Konzentration der Blockcopolymere beträgt 0,1 %.

### 5.2.2.1 Synthese und Untersuchung der mit dem Blockcopolymer stabilisierten Polymerpartikel

Die Synthesen der stabilisierten organischen Polymerpartikel erfolgen mittels radikalischer Emulsionspolymerisation. Hierzu wurden für die Emulsionspolymerisation die PEG-PCL-Blockcopolymere als amphiphile Stabilisatoren verwendet.

**Tabelle 8:** Übersicht über die verwendeten Blockcopolymere

Stabilisator	Mw(PEG):Mw(PCL)	Mw (Gesamt)
PEG- <i>b</i> -PCL	2000:2000	4000
PEG- <i>b</i> -PCL	5000:5000	10000
PEG- <i>b</i> -PCL	5000:10000	15000

In einem 100 mL Rundkolben werden jeweils 40 mg des jeweiligen Blockcopolymers (s. **Tabelle 8**) in 50 mL VE-Wasser vorgelegt. Das Gemisch wurde eine Stunde lang bei Raumtemperatur bis zum Erhalt einer homogenen Dispersion mit  $800 \frac{U}{min}$  gerührt. Anschließend wurden 40 mg Benzoylperoxid und 2 mL Natriumhydrogenphosphatpuffer (pH 7) hinzugegeben. Im letzten Schritt wurden von dem zu polymerisierenden vinylhaltigen Monomer 0,007 mol mit einer Eppendorfpipette hinzugegeben. Unter Beibehaltung der Rührgeschwindigkeit wurde die Dispersion für fünf Stunden auf über 73 °C unter Rückfluss erhitzt. **Tabelle 9** zeigt die eingesetzten Vinylmonomere.



**Tabelle 9: Übersicht über die genutzten Vinylmonomere und deren eingesetzten Volumina**

<b>Vinylmonomere</b>	<b>Molare Masse [g/mol]</b>	<b>Dichte [g/cm<sup>3</sup>]</b>	<b>Volumen [mL]</b>
Styrol	104,15	0,91	0,80
Cyclohexylacrylat	154,21	0,975	1,11

Die hergestellten Polymerdispersionen wurden mehrfach mit VE-Wasser gewaschen und hinsichtlich der Größenverteilung ihrer Polymerpartikel mittels DLS-Messungen untersucht. Die Dispersionen wurden im Verhältnis 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und vor den DLS-Messungen mit einem 5 µm Filter filtriert, um Staub und andere Verunreinigungen zu entfernen. Die untersuchten Größenverteilungen beziehen sich auf die Auswertungsmethode der „Number size distributions“.

#### 5.2.2.2 Herstellung und Synthese der anorganischen Partikel

In der Fachliteratur sind verschiedene Verfahren beschrieben, um kolloidale Silberpartikel zu synthetisieren.<sup>274</sup> Nanoskalige Silberpartikel wurden durch gezielte Reduktion von Silbernitrat durch Ascorbinsäure in Mizellen durch Ultraschallbehandlung hergestellt. Dazu wurde ein von Moghimi-Rad et al. Vorgestellter Syntheseweg<sup>243</sup> modifiziert und auf die PEG-PCL-Mizellsysteme angepasst.

Für eine typische Synthese wurden in ein 50 mL Schnappdeckelglas 2 mg Ascorbinsäure, 1,25 mL Natriumhydrogenphosphatpufferlösung und 20 mg des jeweiligen PEG-PCL-Copolymers (s. Tabelle 8) in 25 mL VE-Wasser gegeben. Das Gemisch wurde für 30 Minuten mit dem Ultraschallbad behandelt. Nach der Ultraschallbadbehandlung wurden 2 mg AgNO<sub>3</sub> in 12,5 mL VE-Wasser gelöst und dem Gemisch hinzugefügt. Nach weiteren 10 Minuten Ultraschallbehandlung wurden die Partikel erhalten. Die hergestellten Silberpartikel wurden hinsichtlich ihrer Größenverteilung mittels DLS untersucht.

### 5.2.2.3 Interaktionen der Lipase mit den Partikeln

Von dem Enzym *Pseudomonas Cepacia* Lipase wurde eine Stammlösung von 500 Units/mL angesetzt.

Den unter Punkt 5.2.2.1 hergestellten organischen Partikeldispersionen wurden 10 mL entnommen und in ein Schnappdeckelglas gefüllt. Dieser Dispersion wurde bei Raumtemperatur 1 mL der Enzym-Stammlösung hinzugegeben.

### 5.2.2.4 HRP

Zur Aktivitätsbestimmung der HRP wurden mithilfe eines standardisierten Test Kits von Sigma Aldrich verschiedene Stammlösungen (A-E) angesetzt:

**A:** 100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 5

1,3602 g Kaliumphosphat wurden in 100 mL VE-Wasser gelöst und der pH-Wert mit 1,0 molarer KOH auf pH 5 eingestellt.

**B:** 9,1 mM 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)-Substratlösung (ABTS)

In 12 mL Stammlösung A wurden 60 mg 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonsäure)-Diammoniumsalz gelöst.

**C:** 0,3 % (w/w) Wasserstoffperoxidlösung

In 50 mL Reinstwasser wurden 429 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %) gelöst.

**D:** Als Enzymverdünnungsmittel wurden 40 mM Kaliumphosphatpuffer mit 0.25 % (w/w) Bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin) und 0,5 % (v/v) Triton X-100 bei pH 6,8 angesetzt.

**E:** HRP-Enzymlösung

z. B. 500 Units/ml HRP in Reinstwasser (unmittelbar vor der Messung)

Unterschiedlich stark konzentrierte Enzymlösungen wurden in folgendem Mischungsverhältnis (s. **Tabelle 10**) gegen eine Nullreferenz mittels UV/VIS-Spektroskopie bei konstanter Wellenlänge von 405,00 nm im „Time drive“-

Modus vermessen. Die Wasserstoffperoxidlösung (Lösung C) wurde erst unmittelbar vor Messbeginn hinzugegeben.

**Tabelle 10: Mischungsverhältnisse für die Aktivitätsbestimmung von HRP**

	<b>Test</b>	<b>Nullreferenz</b>
<b>Lösung B (ABTS)</b>	2,90	2,90
<b>Lösung D (Enzymverdünnungsmittel)</b>	-----	0,05
<b>Lösung E (Enzymlösung)</b>	0,05	-----
<b>Lösung C (unmittelbar vor Messbeginn)</b>	0,10	0,10

### 5.2.3 Enzymimmobilisierung

Zur Immobilisierung der jeweiligen Enzyme (Lipase oder HRP) wurden Mikroskopdeckgläser (18 mm x 18 mm) als Substrat verwendet. In späteren Versuchsreihen wurden auch verschiedene Metalle, Kunststoffe und weitere Materialien als Substrat untersucht.

#### 5.2.3.1 Vorbehandlung der Glasträger

Zur Entfernung von organischen und anorganischen Kontaminationen wurden die Mikroskopdeckgläser in einem ersten Schritt mithilfe von Ethylacetat und VE-Wasser von organischen und anorganischen Kontaminationen gereinigt. Zusätzlich erfolgte eine Vorbehandlung in saurer und basischer Lösung. Dies ist notwendig, um eine polare Oberfläche zu erzeugen, welche eine Adhäsion der Enzyme auf die Oberfläche ermöglicht. Die Reihenfolge der sauren oder basischen Reinigungsschritte kann je nach Experiment variieren. Die Deckgläser werden dabei in eine Kristallisierschale mit der jeweiligen Lösung gelegt. Die saure Lösung besteht aus 35 wt% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, konz. HCl und VE-Wasser im Verhältnis von 1:1:5. Das Gemisch wurde bis zum Siedepunkt bei ca. 80 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 5 Minuten gerührt. Die Deckgläser wurden anschließend erneut intensiv mit VE-Wasser gereinigt. Die basische Lösung besteht aus

35 wt%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 25 wt%  $\text{NH}_3$  und VE-Wasser in einem Verhältnis von 1:1:5. Das Gemisch wurde bis zum Siedepunkt bei ca. 80 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 5 Minuten gerührt. Die Deckgläser wurden anschließend erneut intensiv mit VE-Wasser gereinigt.

Die Nicht-Glas-Substrate wurden lediglich mit Ethylacetat und VE-Wasser gereinigt.

### 5.2.3.2 Immobilisierung via Adsorption

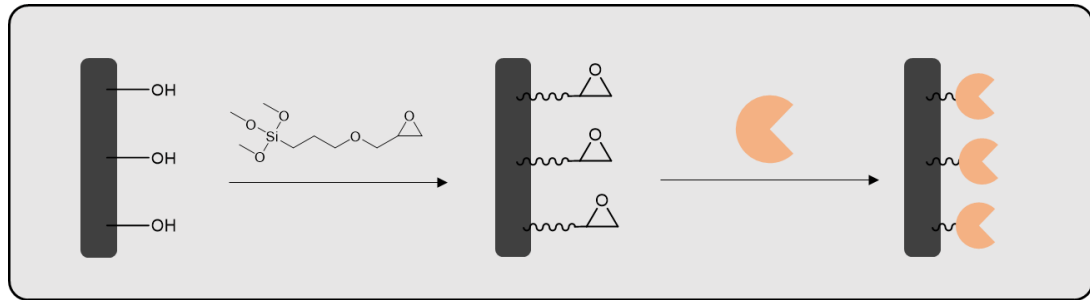
Zur Immobilisierung durch Adsorption wurden Enzymlösungen mit Konzentrationen von 500 Units/mL mit Reinstwasser frisch zubereitet. Mithilfe einer Eppendorf Pipette wurde ein Tropfen (80  $\mu\text{L}$ ) auf den vorbehandelten Glasträger aufgetropft und für ca. 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Nichtadsorbiertes Enzym wurde mit Reinstwasser abgewaschen. Die immobilisierten Glassubstrate wurden bei 5°C gelagert.

Mit den weiteren Substraten wurde auf gleiche Weise verfahren.

Nach der Immobilisierung wurden die Proben mittels EDX auf ihre atomare Zusammensetzung analysiert.

### 5.2.3.3 Kovalente Immobilisierung

Für die kovalente Anbindung der Enzyme wurden die sauer gereinigten Glasträger zunächst silanisiert (s. **Abbildung 118**). Dazu wurde ein 80:20 Gemisch (w/w) aus Ethanol und Wasser 10 wt% Glycidoxypyltrimethoxysilan (GOPS) in eine Kristallisierschale aus Teflon gegeben. Zum Erreichen basischer Bedingungen wurde zusätzlich 1 wt% Triethylamin (TEA) beigelegt. Die Glasträger wurden vorsichtig hineingelegt und das System für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verweilen die Glasträger noch 10 Minuten ohne Rühren in der Lösung. Die silanisierten Glasträger wurden gründlich mit Ethanol gespült und bei 110 °C für 60 Minuten im Ofen eingebrannt. Nach dem Einbrennen wurden sie erneut gründlich mit Ethanol und VE-Wasser gereinigt.



**Abbildung 118: Schematische Darstellung der Silanisierung der Glasträger und der anschließenden kovalenten Enzymimmobilisierung**

In einem zweiten Schritt wurde das jeweilige Enzym kovalent an den silanisierten Glasträger gebunden. Hierzu wurden jeweils 3 mg des Enzyms unter Rühren in 100 mL VE-Wasser gelöst. Die silanisierten Deckgläser wurden anschließend in einer Kristallisierschale vorsichtig hinzugegeben. Unter langsamem Rühren verweilen die Deckgläschen für 96 Stunden in der mit einem Urgals abgedeckten Lösung. Nach der Immobilisierung wurden die Deckgläser mit VE-Wasser gespült und zum Trocknen im Abzug belassen. Die darauffolgende Lagerung erfolgte bei 5 °C.

Nach der Immobilisierung wurden die Proben mittels EDX auf ihre atomare Zusammensetzung analysiert.

#### 5.2.3.4 Kovalente Immobilisierung über Abstandhaltermoleküle

Die sauer gereinigten Glasträger wurden zunächst in einem Gemisch aus Ethanol/VE-Wasser von 80:20 (w/w) und 10 wt% APTES silanisiert. Da APTES die Hydrolysereaktion und folgende Kondensationsreaktion selbst durch seine Aminfunktion katalysieren kann, wird im Gegensatz zur zuvor erwähnten Silanisierung mit GLYMO keine Base mehr hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wird wie beim GLYMO für zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Ruhestellung für 10 Minuten werden die Glasträger gründlich mit Ethanol und VE-Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Glasträger für eine Stunde bei 110 °C eingebrannt und erneut gewaschen und getrocknet. An die Aminfunktionen wird eine 400 µL Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer des jeweiligen Diepoxy-PEG-Abstandshalters (0.25 g/L für den 20.000 g/mol Abstandshalter und 0.125 g/L des 10.000 g/mol Abstandshalter) für 24 Stunden getrocknet.

Nach dem gründlichen Abwaschen nicht angebundener Abstandshaltermoleküle mit VE-Wasser erfolgt die kovalente Enzymimmobilisierung auf die gleiche Art wie in Abschnitt 5.2.3.3.

#### **5.2.4 Abscheideversuche**

In diesem Abschnitt wird auf die verschiedenen Abscheidevorgänge der EMA eingegangen. Grundsätzlich wird dabei zwischen den verschiedenen Systemen der Destabilisierungsvariante (mit dem Enzym Lipase) und der Aufbauvariante (mit dem Enzym HRP) unterschieden.

##### **5.2.4.1 Destabilisierungsprozess via Lipase**

Bei der Destabilisierungsmethode wird zwischen den anorganischen und organischen Partikelsystemen unterschieden. Nach deren Herstellung erfolgt die Abscheidemethode jedoch auf gleiche Weise.

Die unter 5.2.2.1 hergestellten Partikeldispersionen wurden in verschiedenen Verhältnissen mit VE-Wasser in verschiedenen Verhältnissen verdünnt und der pH-Wert kontrolliert. Bei Abweichungen vom Zielwert (pH 7) wurde dieser mit 0,1 molarer Salzsäure bzw. 0,1 molarer Kaliumhydroxidlösung entsprechend eingestellt. 20 mL der jeweiligen Dispersion werden in ein 40 mL Schnappdeckelglas gegeben und mit 0,2 mL Puffer versetzt.

Das Substrat mit der immobilisierten Lipase wurde an einer Pinzette befestigt und durch eine spezielle Haltevorrichtung senkrecht in die Dispersion gehalten, sodass die Oberfläche vollständig in die Partikeldispersion eintaucht. Die Depositionsreaktionen wurden bei pH 7 in verschiedenen Temperaturen (RT und 40 °C) und variierenden Konzentrationen und Reaktionszeiten durchgeführt.

Die Versuchsanordnung der Depositionsreaktionen ist für die unterschiedlichen Immobilisierungstechniken und Substrate jeweils identisch.

Nach Erreichung der zuvor festgelegten Reaktionszeit (i. d. R. 24 Stunden) wurden die Substrate aus dem Reaktionsmedium entfernt und gründlich mit

VE-Wasser gespült, um ungespaltene Partikel- und Mizellablagerungen zu entfernen.

#### 5.2.4.2 Aufbauvariante über HRP

Bei der Aufbaumethode mittels HRP wird zwischen acrylat- bzw. vinylhaltigen Monomeren und phenolischen Monomertypen unterschieden.

Die Präkursorlösung für Methylmethacrylat besteht aus 64 mL Reinstwasser, 0.1 – 1,0 v%  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( 35 wt-%), 830  $\mu\text{L}$  Acetylaceton als Mediator und 4 mL des jeweiligen Monomers. Der pH-Wert wurde mit 0,1 molarer  $\text{NH}_3$  oder 0,1 molarer  $\text{HCl}$  angepasst. Die Präkursorlösung wurde für 15 Minuten mit dem Ultraschallbad behandelt, um die wässrige Phase mit dem Monomer anzureichern. Anschließend wurde sie für 15 Minuten mit Stickstoff gespült, um Sauerstoff aus der Lösung zu entfernen.

Die Präkursorlösungen mit Styrol wurde zusätzlich mit einem 80:20 Gemisch aus Dioxan und Wasser hergestellt. Sie bestand aus 12,8 mL Reinstwasser, 51,2 mL 1,4-Dioxan, 830  $\mu\text{L}$  Acetylaceton, 330  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ( 35 wt-%) und 4 mL Styrol. Der pH-Wert wurde mit 0,1 molarer  $\text{NH}_3$  oder 0,1 molarer  $\text{HCl}$  angepasst. Die weitere Behandlung erfolgt analog zur MMA-Präkursorlösung.

Die Präkursorlösungen für Phenol wurde in einem 1:2 Gemisch aus Dioxan und Wasser hergestellt. Sie beinhalten 42 mL Reinstwasser, 21 mL Dioxan, 0.1 bis 2.0 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( 35 wt-%), 4 g Phenol und 2 mL Pufferlösung bzw. Die weitere Behandlung erfolgt analog zur MMA-Präkursorlösung.

Die Abscheideversuche erfolgen identisch zu Versuchen mit der Lipase.

Die Löslichkeitsversuche des Phenolpolymers wurden 10 mg des Polymers in 2 mL DMSO, DMF und THF gelöst für 30 Minuten gerührt. Anschließend erfolgte eine Ultraschallbehandlung, die auch nicht zur Lösung führte.

## **5.3 Analytische Methoden**

### **5.3.1 Rasterlektronenmikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgenanalyse (EDX)**

Die REM- und EDX-Analytik wurde am „Zeiss Neon 40 EsB CrossBeam“ durchgeführt. Die Proben wurden zuvor mit einer Schichtdicke von 4 nm gesputtert. Übliche Aufnahmen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 2 kV per Inlens oder SE2-Detektor aufgenommen. Bei den EDX-Messungen variiert die Beschleunigungsspannung je nach Messung im „Mapping-Mode“ oder per „Point and Shoot“ zwischen 5 und 8 kV.

### **5.3.2 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und Zeta-Potential**

Die DLS- und Zeta-Potential-Messungen wurden auf dem Zetasizer Nano-ZS von Malvern durchgeführt. Die DLS-Messungen fanden bei einem Streuwinkel von 90 ° und einer Temperatur von 20 °C statt. Die Wellenlänge des Lasers beträgt 632.8 nm. Die Größenverteilungen wurden durch die „Number Plot Autocorrelation“-Funktion ermittelt, die der Malvern Zetasizer-Software unterliegt.

### **5.3.3 UV/Vis-Spektroskopie**

Die UV/Vis-Spektroskopie wurde mit einem Thermo Scientific Evolution 600 spectrometer mit einer 10-minütigen Cycle Time durchgeführt. Die Bandbreite der eingesetzten Lichtquelle wurde zwischen 325 und 700 nm eingestellt. Als Basislinie wurde das Spektrum von VE-Wasser benutzt.

### **5.3.4 Kernresonanzspektroskopie**

Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden von einem Bruker Ascent 700 Kernresonanzspektrometer durchgeführt. Die Messungen wurden im entsprechenden deuterierten Lösemittel durchgeführt und die Signale zum jeweiligen deuterierten Lösemittel kalibriert.



### 5.3.5 Gelpermeationschromatographie

GPC-Messungen der PMMA Polymere wurden mit einer Jasco 880-PU Pumpe und einer Säule mit folgenden Eigenschaften durchgeführt: Partikelgröße 5  $\mu\text{m}$ : PSS-SDV guard 5  $\mu\text{m}$  + PSS-SDV 106 Å, PSS-SDV 105 Å, PSS-SDV 103 Å, PSS-SDV 102 Å von Polymer Standard Service (PSS). Ein Shodex RI 101 refractive index Detektor und ein Merck UV L-4000 Detektor wurden genutzt. Als Standardkalibrierung wurden PMMA-Standards benutzt. Als Eluent wurde  $\text{CHCl}_3$  bei einer Säulentemperatur von 30 °C und einer Flussrate von 0.75 mL/min verwendet.

### 5.3.6 Dynamische Differenzkalorimetrie

Die DSC-Messungen wurden an einem Netzsch DSC 204 F1 Phönix mit einer Heizrate von 10 K / min unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt.

### 5.3.7 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Experimente wurden an einem Waters SYNAPT G2 Massenspektrometer mit einer Elektronensprayionisation (ESI) durchgeführt.

### 5.3.8 Thermogravimetrische Analyse

TGA-Messungen wurden auf einer Mettler Toledo TGA/DSC1 bei einer Heizrate von 10 K/min unter Stickstoffatmosphäre von 40 bis 800 °C durchgeführt.

### 5.3.9 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie

Für die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) des Polymers wurde ein Agilent Cary 630 FTIR verwendet, der mit einem Diamond ATR-Probenahmezubehör ausgestattet ist. Die letzte Grafik zeigt den Durchschnitt von 256 Messungen, die in einem Bereich von 650 – 4000  $\text{cm}^{-1}$  und einer Auflösung von 4  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen wurden.

### **5.3.10 Kontaktwinkelmessung**

Die Kontaktwinkelmessung erfolgt mit einem Drop Shape Analyzer (DSA 25E) der Firma Krüss. Die angegebenen Werte bilden den Mittelwert aus 20 Einzelmessungen.

### **5.3.11 Bildauswertungssoftware**

Die Bildauswertung erfolgt mit der freierwerblichen ImageJ-Software (<https://imagej.net/ij/>). Die Kalibrierung des Maßstabs erfolgt über die Einlesung des direkt vom REM ausgegeben Maßstabs.

## Appendix

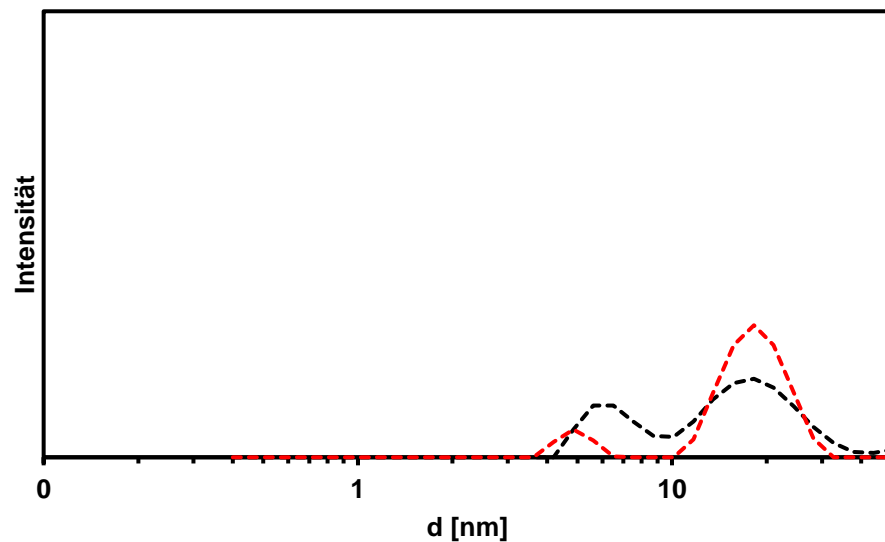


Abbildung A- 1: DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Anzahl) der *Pseudomonas Cepacia* Lipase (1 mg/ml) in Pufferlösung (**rot**) und destilliertem Wasser (schwarz)

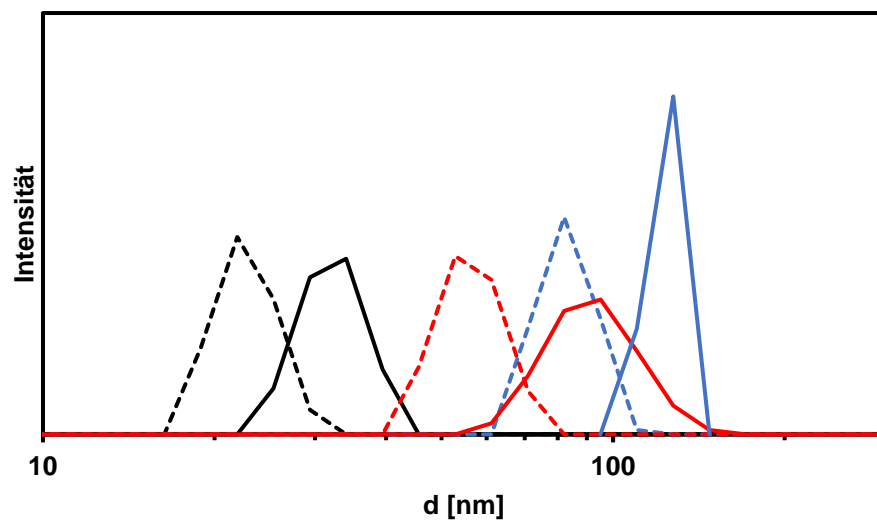
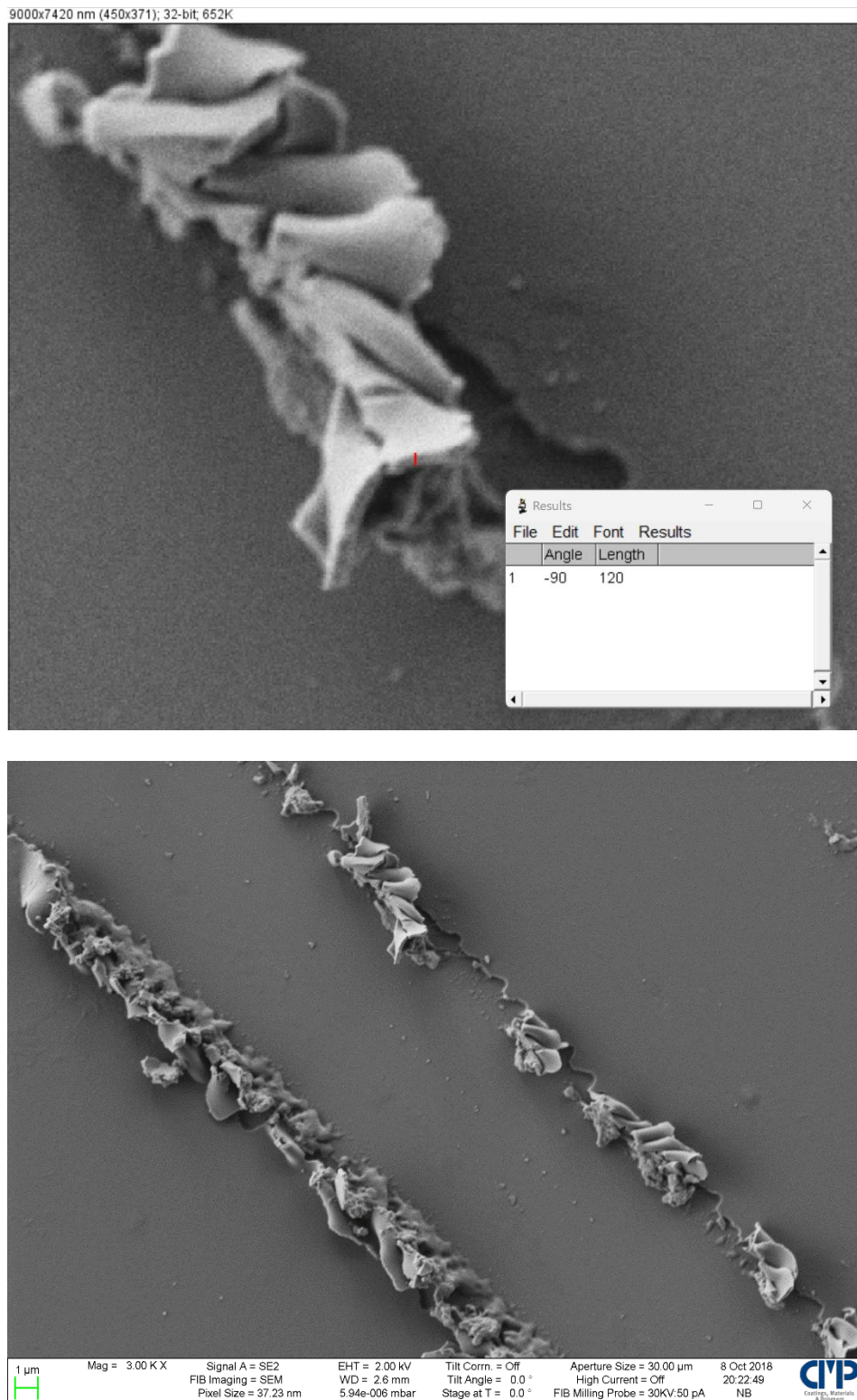
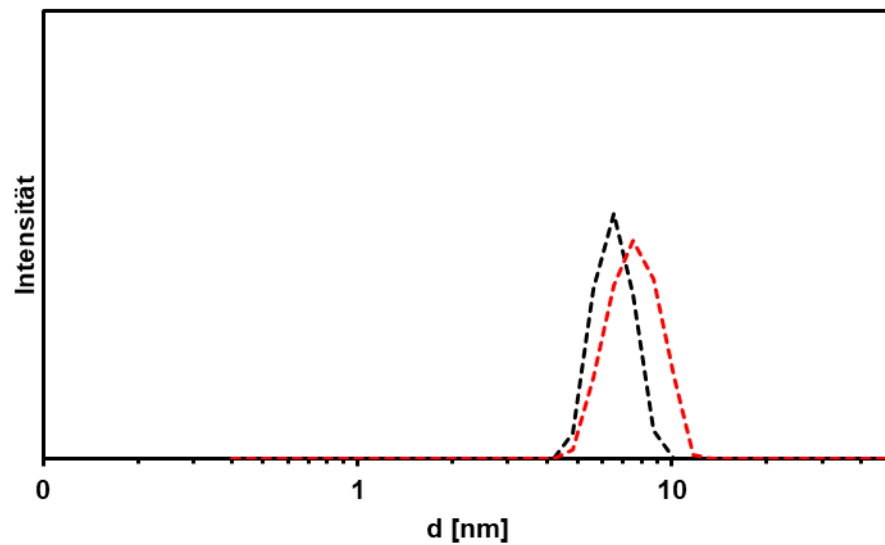


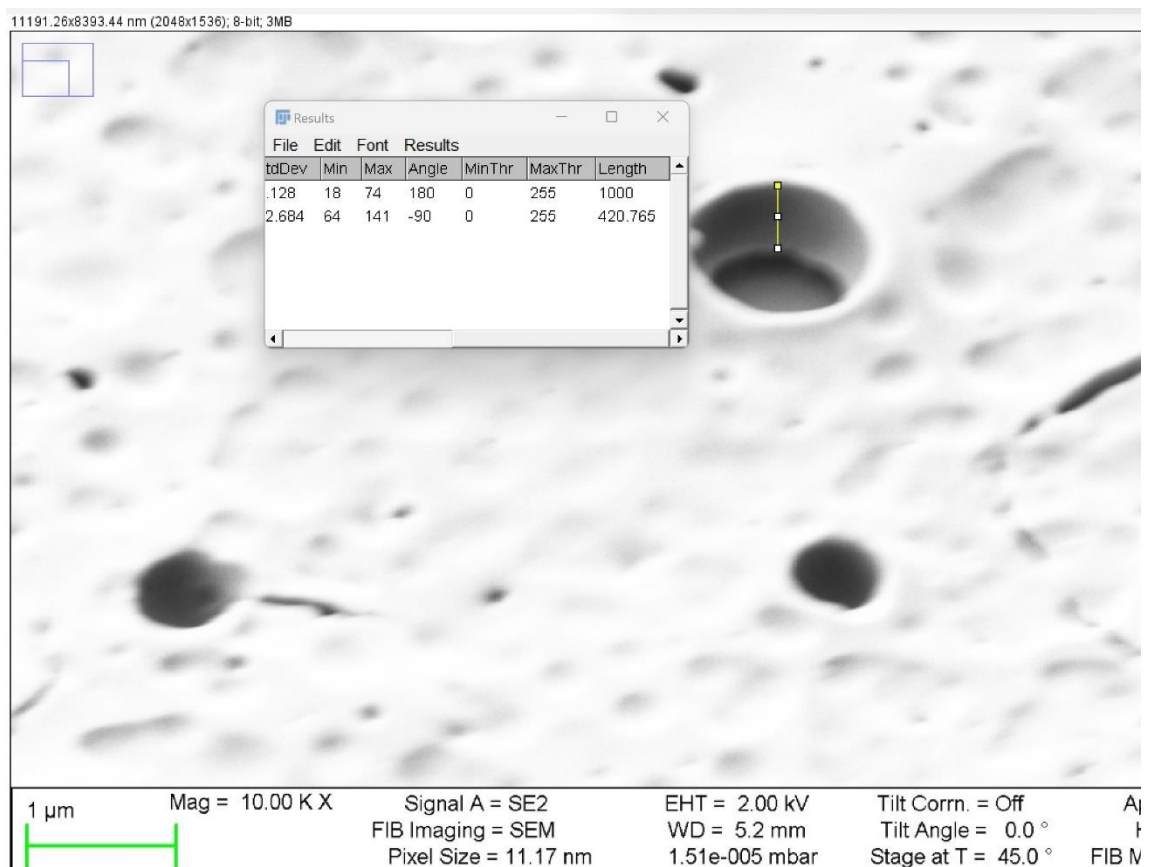
Abbildung A- 2: Größenverteilung (nach Intensität) der stabilisierten Polystyrolpartikel (durchgezogene Linie) und ihrer zugehörigen reinen PCL-PEG-Blockcopolymermizellen (gestrichelte Linie). PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (**rot**) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (**blau**)



**Abbildung A- 3: Auswertung der Schichtdicke ander Bruchkante der Polycyclohexylacrylatprobe mittels ImageJ-Software(oben) und die Original-REM-Aufnahme (unten). Der Maßstab wurde mit der 1000 nm (1 $\mu$ m) Längenskala der REM-Aufnahme kalibriert. Ergebnis: 120 nm**



**Abbildung A- 4: DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Intensität) von HRP ( $c=1$  mg/mL) in Reinstwasser (schwarz) und Puffer (rot).**



**Abbildung A- 5: Auswertung der maximalen Schichtdicke mit ImageJ. Die Größe wurde auf 1000 nm mit der im Bild befindlichen Skalierung skaliert. Ergebnis: 420.7 nm.**

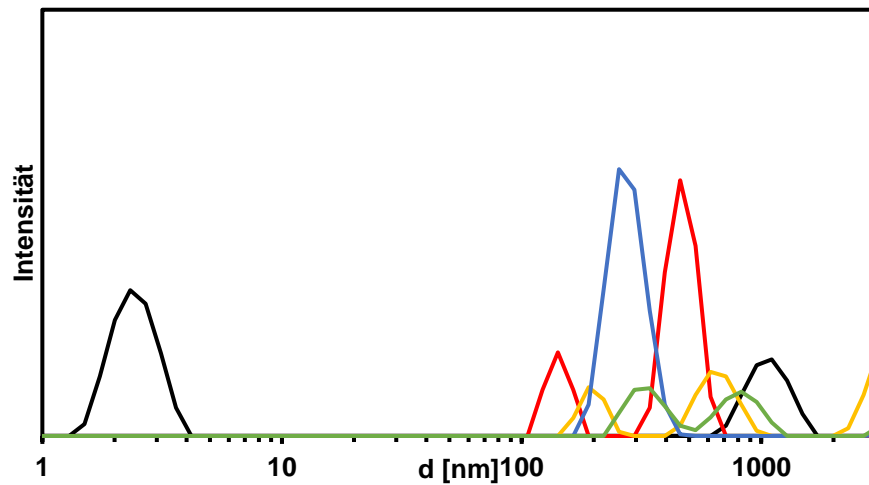


Abbildung A- 6: Zeitaufgelöste DLS-Größenverteilung (nach Intensität) der Phenolpolymerisierung über HRP im Wasser-Dioxangemisch (2:1) bei pH 7. (schwarz – vor HRP-Zugabe; rot – 3 min; orange – 30 min; blau – 60 min; grün – 4 Stunden).

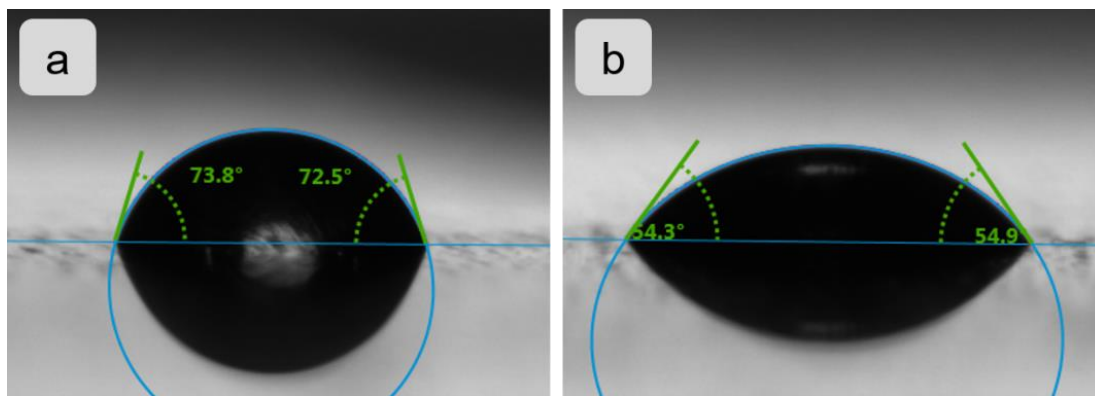


Abbildung A- 7: Screenshot der Kontaktwinkelmessung auf per EMA abgeschiedenen Phenolpolymeren. Kontaktwinkel Wasser (a) und Kontaktwinkel Diiodmethan (b)

---

## Abkürzungsverzeichnis

AcAc	Acetylaceton
ATL	Anodische Tauchlackierung
ATR-FTIR	Infrarotspektroskopie
BADGE	Bisphenol A Diglycidylether
BPA	Bisphenol A
d	Tage
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSC	Dynamische Differenzkalorimetrie
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EMA	Enzymmoderierte Adressierung
ESI	Elektronensprayionisation
h	Stunden
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase)
KTL	Kathodische Tauchlackierung
Min.	Minuten
MS	Massenspektrometrie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PCL	Polycaprolacton
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
s	Sekunden

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Kurzübersicht der beiden EMA-Varianten	7
Abbildung 2:	Vereinfachte schematische Abbildung der Elektrotauchlackierung. (a) Kathodische Tauchlackierung und (b) Anodische Tauchlackierung. In Anlehnung an L. BESRA, M. LIU, <i>Progress in Materials Science</i> 2007, 52, 1. <sup>9</sup>	4
Abbildung 3:	Schematisch vereinfachte Reaktionsführung beim Aufbau der kationischen Dispersion	6
Abbildung 4:	Lösereaktion von kathodisch abscheidbaren Filmbildnern. (In Anlehnung an A. Goldschmidt, H.-J. Streitberger, <i>BASF Handbuch Lackiertechnik</i> , Vincentz Network, 2014. <sup>6</sup> )	6
Abbildung 5:	Abscheidereaktion von kathodischen Filmbildnern mittels KTL. In Anlehnung an A. Goldschmidt, H.-J. Streitberger, <i>BASF Handbuch Lackiertechnik</i> , Vincentz Network, 2014. <sup>6</sup>	7
Abbildung 6:	Schematischer Ablauf des KTL-Prozesses	8
Abbildung 7:	Beispielhafter Zusammenhang zwischen Schichtdicke und Beschichtungszeit der KTL bei verschiedenen Spannungen (a): 20 V, (b): 60 V und (c): 100 V. (Frei nach Yuan-Chung Wang, Ing-Chi Leu, Min-Hsiung Hon, <i>Journal of the American Ceramic Society</i> 2004, 87, 84.) <sup>12</sup>	8
Abbildung 8:	Beispielhafter Zusammenhang zwischen Schichtdicke und Badtemperatur im KTL-Prozess. Angelehnt an BASF Coatings, <i>Elektrotauchlacke. Elektrotauchlacke für industrielle Anwendungen</i> , 2002. <sup>8</sup>	10
Abbildung 9:	Reaktionsgleichungen der Elektrolyse bei der KTL	10
Abbildung 10:	Morphologie kathodisch abgeschiedener Elektrotauchfilme <sup>6</sup>	11
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der Abscheidung beim Autophoreseverfahren <sup>6</sup>	11
Abbildung 12:	Schematisches Mizellaufbaumodell von Casein nach D. S. Horne, <i>Current Opinion in Colloid &amp; Interface Science</i> 2006, 11, 148. <sup>56</sup>	17



Abbildung 13: Kurze Übersicht ausgewählter Katalysiemöglichkeiten von Lipasen <sup>67</sup>	19
Abbildung 14: Vereinfachter Katalysiemechanismus der HRP nach A. Henriksen, A. T. Smith, M. Gajhede, <i>Journal of Biological Chemistry</i> 1999, 274, 35005. <sup>87</sup>	21
Abbildung 15: Mechanismus der Oxidation und anschließenden Polymerisation von Phenol durch peroxidasekatalysierte Reaktionen nach Torres-Duarte. <sup>95</sup>	22
Abbildung 16: Verkürzter schematischer Reaktionsweg der Oxidation von Bisphenol-A mittels HRP frei nach Huang und Weber sowie Torres-Duarte und Vazquez-Duhalt. <sup>95,103</sup>	23
Abbildung 17: Generelles Reaktionsschema für die radikalische Polymerisation von Vinylmonomeren. Frei nach Kohri, Uzawa et al. <sup>107</sup>	24
Abbildung 18: Mögliche Auswirkungen verschiedener Substrateigenschaften auf die Enzymkonformation nach Secundo. <sup>127</sup>	27
Abbildung 19: Überblick verschiedener Immobilisierungstechniken nach Nguyen und Kim <sup>120</sup>	29
Abbildung 20: Substratmodifizierung mit APTES zur Verbesserung der Enzymimmobilisierung durch Adsorption. Frei nach Jesionowski, Zdarta et al. <sup>144</sup>	31
Abbildung 21: Schematische Darstellung kovalenter Enzymimmobilisierung über epoxidfunktionelle Substrate. Nach Mateo et al. <sup>178</sup>	33
Abbildung 22: Schematische Darstellung des EMA-Prozesses an Caseinmizellen. Frei nach Ruediger und Strube.	35
Abbildung 23: Nanostrukturierung von Caseinpartikeln mittels EMA-Prozess nach lithographischer Vorstrukturierung. Nach Ruediger, Brassat et al. <sup>195</sup>	36
Abbildung 24: Vereinfachter und verkürzter Mechanismus der in vivo Polymerisation von L-Tyrosin mittels Tyrosinase zu Eumelanin. Nach Strube et al. <sup>218</sup>	39

- Abbildung 25: EMA-Prozess mit immobilisierter Tyrosinase und in Wasser gelöstem L-DOPA als Präkursor. Eumelaninabscheidung. Frei nach Strube 40
- Abbildung 26: Schematische Darstellung der Methodik der enzymmoderierten Adressierung mittels Destabilisierungs- und Aufbauvariante inklusive der Schlüsselparameter. 41
- Abbildung 27: Strukturformel des genutzten Octapeptids Lysin, Serin, Phenylalanin, Methionin, Alanin, Isoleucin, Prolin und Prolin. Die spezifische Spaltung durch Chymosin erfolgt an der Peptidbindung zwischen Phenylalanin und Methionin (rot markiert). 43
- Abbildung 28: MS-Spektrum des gespaltenen Octapeptids mit der Zuordnung der Massen-Ladungsverhältnisse 366 und 528. 44
- Abbildung 29: Möglicher Aufbau des enzymatisch spaltbaren Tensids mit dem Peptidlinker (gelb markiert) im Zentrum, inkl. dessen schematischer Spaltung durch Chymosin. 45
- Abbildung 30: Screeningphase zur Modifizierung des Peptid-Linkers mit den niedermolekularen Epoxiden BADGE und Glycidylisopropylether in verschiedenen Lösungsmitteln bei wechselnden Reaktionsbedingungen. 46
- Abbildung 31: MS-Spektrum der Umsetzung des Octapeptids mit Glycidylisopropylether 47
- Abbildung 32: Umsetzung des Octapeptids mit Isophorondiisocyanat 48
- Abbildung 33: MS-Spektrum der Umsetzung von Isophorondiisocyanat und dem Octapeptid. Die Produktpeaks sind rot markiert. 49
- Abbildung 34: Schematischer Ablauf der hydrolytischen Spaltung des PEG-*b*-PCL-Blockcopolymers. Die Spaltung erfolgt in Form eines kontinuierlichen Abbaus des hydrophoben Polyesters. 51
- Abbildung 35: Ausbildung einer mizellaren Struktur des PCL-*b*-PEG-Blockcopolymer mit der hydrophoben Phase im Zentrum der Mizelle. 52
- Abbildung 36: Größenverteilung des 5000-5000 PCL-*b*-PEG-Blockcopolymers gewichtet nach der Anzahl 53

Abbildung 37: DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Anzahl) der *Pseudomonas Cepacia* Lipase (1 mg/ml) in Pufferlösung (rot) und destilliertem Wasser (schwarz) 53

Abbildung 38: UV-Vis-Spektrum des zeitlichen Verlaufs des enzymatischen Abbaus der Dispersion der PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymermizellen (1 mg/mL) bei pH 7,0 nach Zugabe von 0,1 mg/mL Lipase. 54

Abbildung 39: Schematischer Reaktionsverlauf der Herstellung der stabilisierten Polystyrolpartikel über eine Emulsionspolymerisation mit Benzoylperoxid als Initiator und den PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymermizellen als Stabilisator. 57

Abbildung 40: Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der synthetisierten Polystyrolpartikeldispersion (durchgezogene Linie) im Vergleich zum reinen PCL(5000)-*b*-PEG(5000)-Blockcopolymer (gestrichelte Linie). 58

Abbildung 41: Rasterelektronenmikroskopaufnahme der aufgetropften Polystyrol-partikeldispersion. 59

Abbildung 42: Fotoaufnahmen der stabilisierten Polystyrolpartikeldispersion im Rollrandglas (a) und der durch die Lipase destabilisierten, verdünnten Dispersion (b) 60

Abbildung 43: Schematischer Ablauf der Adsorption der Lipase auf Glasträgern. 61

Abbildung 44: REM-Aufnahmen am Trocknungsrand: aufgetrocknete Lipase (a) nach dem Waschvorgang (b) und starke Vergrößerung an der scharfen Grenzfläche nach dem Waschvorgang (c) sowie adsorbierte Lipase in bei starker Vergrößerung im Inneren des Trocknungsbereiches nach dem Waschvorgang (d). 63

Abbildung 45: Adaption der EMA auf mit dem enzymatisch spaltbaren Stabilisator stabilisierte Polymerpartikel. 65

Abbildung 46: REM-Aufnahmen der enzymmoderierte Abscheidung von Polystyrolpartikeln nach 24 h am Randbereich (a), die zugehörige Blindprobe ohne Lipase (b) und die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel im

Innenbereich (c) sowie die enzymmoderierte Abscheidung der Polystyrolpartikel im Innenbereich bei starker Vergrößerung (d). 66

Abbildung 47: EDX-Spektren der der Oberfläche der immobilisierten Lipase (a, rot), der reinen Glasoberfläche (a, schwarz) sowie der abgeschiedenen Polystyrolpartikel (b, rot) und der zugehörigen reinen Glasoberfläche (b, schwarz). 67

Abbildung 48: REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung auf Glas durch adsorbierte Lipase bei 40 °C am Trocknungsrand des Enzymbereichs nach 24 Stunden bei unterschiedlichen Vergrößerungen (a) und (b) sowie eine Aufnahme aus dem Innenbereich der Abscheidung (c). 69

Abbildung 49: Postulierter Abscheidemechanismus der Polymerpartikel mit adsorbierter Lipase. 70

Abbildung 50: REM-Aufnahmen am Trocknungsrand der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln bei 40 °C nach 1 h (a); 4 h (b) und 8 h (c) 71

Abbildung 51: REM-Aufnahmen der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln nach 72 h bei 40 °C am Trocknungsrand (a) und im Innenbereich des adsorbierten Enzyms (b). 72

Abbildung 52: Vergleich der enzymatischen Abscheidung von Polystyrolpartikeln am Trocknungsrand nach 24 h bei 20 °C (a) und 40 °C (b). 73

Abbildung 53: Schematischer Ablauf der Adsorption der Lipase mit der standard- und der zehnfachen Menge an Enzymlösung auf dem Glaträger. 74

Abbildung 54: Enzymmoderierte Abscheidung von Polystyrolpartikeln durch erhöhte Unitzahl an Lipase. Aufnahmen am Trocknungsrand (a) und (b) sowie im Innenbereich (c). 75

Abbildung 55: REM-Fernansicht der durch EMA abgeschiedenen Polystyrolpartikel auf Glas. 76

Abbildung 56: Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der PCL-PEG-Blockcopolymere. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (blau) 77

Abbildung 57: UV-Vis-Spektrum des zeitlichen Verlaufs des enzymatischen Abbaus der Dispersion der PCL-*b*-PEG-Blockcopolymermizellen (1 mg/mL) bei pH 7,0 nach Zugabe von 0,1 mg/mL Lipase. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (blau) 78

Abbildung 58: Größenverteilung (Gewichtung nach Anzahl der Teilchen) der stabilisierten Polystyrolpartikel (durchgezogene Linie) und ihrer zugehörigen reinen PCL-PEG-Blockcopolymermizellen (gestrichelte Linie). PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (schwarz); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (rot) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (blau) 79

Abbildung 59: REM-Aufnahmen der enzymmoderierten Abscheidung der unterschiedlich stabilisierten Polystyrolpartikel im Innenbereich. PCL(2000)-*b*-PEG(2000): (a); PCL(5000)-*b*-PEG(5000): (b) und PCL(10000)-*b*-PEG(5000): (c). 80

Abbildung 60: Schematische Darstellung der Silanisierung der Glasträger durch GOPS und der anschließenden kovalenten Enzymimmobilisierung 82

Abbildung 61: REM-Aufnahme der mittels GOPS funktionalisierten Glasoberfläche (a) und der kovalent auf einem Glasträger immobilisierten Lipase mit Skalpellchnitt (b) sowie einem Agglomerat der Lipase (c) 82

Abbildung 62: EDX-Spektren der kovalent immobilisierten Enzymoberfläche (rot) und der silanisierten Oberfläche (schwarz) 83

Abbildung 63: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der mittels kovalenter Immobilisierung abgeschiedenen Polystyrolpartikel in unterschiedlicher Vergrößerung. 84

Abbildung 64: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der verschiedenen kovalent angebundenen Spacer auf Glas (a und b), der daraufhin kovalent angebundenen Lipase-Moleküle (c und d) sowie der folgenden enzymmoderierten Abscheidung der zuvor stabilisierten Polystyrolpartikel. 87

- Abbildung 65: REM-Aufnahmen der EMA von Polycyclohexylacrylat über adsorptiv gebundene Lipase bei 20 °C (a) und 40 °C (b) 89
- Abbildung 66: EMA von Polycyclohexylacrylat über kovalent gebundene Lipase bei 20 °C (a), 40 °C mit Skalpellkratzer (b) und Bestimmung der Schichtdicke (c) 91
- Abbildung 67: EDX-Messungen am abgeschiedenen Polycyclohexylacrylatfilm (rot) und im Skalpellkratzer (schwarz) 92
- Abbildung 68: Schematischer Ablauf der enzymatischen Abscheidung, Koaleszenz und Filmbildung von PCHA-Partikeln bei Temperaturen oberhalb der Glasübergangstemperatur 93
- Abbildung 69: REM-Aufnahme von kovalent gebundener Lipase über 10.000 g/mol Spacer (a) und anschließender EMA von PCHA bei 40 °C (c) sowie von kovalent gebundener Lipase über 20.000 g/mol Spacer (b) und anschließender EMA von PCHA bei 40 °C (d) mit Skalpellkratzern zur besseren Unterscheidung vom Untergrund. 94
- Abbildung 70: Basisreaktion der Silberpartikelsynthese 95
- Abbildung 71: Herstellung der stabilisierten Silberpartikel 96
- Abbildung 72: DLS-Größenverteilung der mit PEG(2000)-b-PCL(2000)-Blockcopolymer stabilisierten Silberpartikel 96
- Abbildung 73: REM-Aufnahmen der EMA von Silberpartikeln nach Lipaseadsorption auf Glas in verschiedenen Vergrößerungen am Trocknungsrand. 97
- Abbildung 74: EDX-Messungen im Mapping-Modus der adsorptiv abgeschiedenen Silberpartikel farblich dargestellt. 98
- Abbildung 75: EDX-Messung quer über die abgeschiedenen Silberpartikel am Trocknungsrand mit folgenden Elementen: Kohlenstoff (rot), Stickstoff (grün), Sauerstoff (blau), Natrium (gelb) und Silber (braun). 99
- Abbildung 76: REM-Aufnahmen enzymatischen Abscheidung von Silberpartikeln nach kovalenter Enzymimmobilisierung mittig in der Probe (a) und an einem Enzymaggregat (b). 100

- Abbildung 77: EDX-Messungen im Mapping-Modus der EMA-Abscheidungen an Enzymaggregaten von Silberpartikeln nach kovalenter Immobilisierung. 101
- Abbildung 78: Schematischer Mechanismus der HRP-initiierten radikalischen Polymerisation<sup>2</sup> 105
- Abbildung 79: Postulierter schematischer Mechanismus der EMA von MMA mit immobilisierter HRP. 106
- Abbildung 80: UV-Vis-Messungen der freien Enzymlösung (X) und dem nach der Adsorption abgewaschenen Gegenpart des adsorbierten Enzyms (O). 107
- Abbildung 81: REM-Aufnahmen der adsorbierten HRP auf Glas am Trocknungsrand in verschiedenen Vergrößerungen. 108
- Abbildung 82: DLS-Größenverteilung (gewichtet nach Anzahl der Teilchen) von HRP (c=1 mg/mL) in Reinstwasser (schwarz) und Puffer (rot). 108
- Abbildung 83: REM-Aufnahmen der PMMA-Abscheidungen nach Adsorption von HRP bei pH 4: 0.1 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a); 0.5 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (b); 1.0 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (c) und pH 8: 0.1 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (d); 0.5 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (e); 1.0 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (f). Sichtbare Kratzer erfolgten mit einem Skalpell zur besseren Unterscheidung vom Untergrund. 109
- Abbildung 84: DLS-Messungen von über HRP synthetisierten PMMA-Partikeln in Lösung a) Zeta-Potential in Bezug auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (X = pH 4, O = pH 8) und b) Größe and PDI in Bezug auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (X = Größe, O = PDI). 110
- Abbildung 85: Schematische Unterschiede der EMA von PMMA mittels HRP bei unterschiedlichen Reaktionsparametern im Abscheideprozess. 111
- Abbildung 86: REM-Aufnahmen der zeitaufgelösten Betrachtung der PMMA-Abscheidung via adsorbierter HRP. 112
- Abbildung 87: REM-Aufnahmen des abgeschiedenen PMMA nach 24 h am Trocknungsrand in unterschiedlichen Vergrößerungen. 113
- Abbildung 88: Molekulargewichtsverteilung des mittels auf einer Glasoberfläche adsorbierten HRP abgeschiedenen PMMA-Films (a) und der

mittels HRP in Lösung synthetisierten PMMA-Partikel (a) jeweils bei pH 8 und 1.0 v% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 114

Abbildung 89: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des per EMA auf einer Glasoberfläche abgeschiedenen Polymerfilms. 115

Abbildung 90: REM-Aufnahmen der kovalenten Immobilisierung von HRP auf Glas mitten im Enzymbereich (a) und an einem Enzymaggregat (b) 116

Abbildung 91: REM-Aufnahmen der EMA von PMMA nach kovalenter HRP-Immobilisierung bei unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen: 0,1 v-% mittig in der Probe (a); 0,5 v-% mittig in der Probe (b); 0,5 v-% bei Enzymaggregaten (c); 1,0 v-% mittig in der Probe (d); 1,0 v-% bei Enzymaggregaten (e). Sichtbare Kratzer wurden zur besseren Unterscheidung vom Untergrund mit einem Skalpell erstellt. 118

Abbildung 92: EDX-Messungen des PMMA-Films (rot) und des HRP-Films im Vergleich (schwarz). 120

Abbildung 93: REM-Aufnahmen des kovalent immobilisierten HRP über einen Spacer mit 10.000 g/mol (a) und der anschließenden EMA von PMMA (c) sowie des kovalent immobilisierten HRP über einen Spacer mit 20.000 g/mol (b) und die anschließende EMA von PMMA (d) 122

Abbildung 94: REM-Aufnahmen der EMA von Polystyrol über HRP in Wasser mittig in der Probe (a) und an einem Enzymaggregat (b) 123

Abbildung 95: REM-Aufnahmen der EMA per Adsorption von Polystyrol im Wasser-Dioxangemisch am Trocknungsrand des vorherigen Enzyms. Kratzer wurden mit einem Skalpell zur besseren Unterscheidung vom Untergrund gemacht. 124

Abbildung 96: REM-Aufnahmen der EMA von Polystyrol über kovalente Enzymanbindung im Wasser-Dioxangemisch in verschiedenen Vergrößerungen (a und b) sowie an Enzymaggregaten (c und d). Sichtbare Kratzer wurden mit einem Skalpell erstellt. 125



- Abbildung 97: Schematischer Abscheide - und Koagulationsmechanismus nahe einem Enzymaggregat (zur übersichtlicheren Darstellung wird das Enzymaggregat als ein großes Enzym dargestellt). 127
- Abbildung 98: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol bei pH 7; 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration für 24 h im Dioxan-Wassergemisch am Rand der Probe (a) und mitten in der Probe (b) 129
- Abbildung 99: EDX-Messungen des Phenolpolymerfilms (rot) und eines HRP-Films im Vergleich (schwarz). 130
- Abbildung 100: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach adsorbiertem HRP bei Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration von 0,1 bis 10,0 v-%. 131
- Abbildung 101: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach adsorbierter HRP bei verschiedenen pH-Werten (4-10) und 1,0 v-%  $\text{H}_2\text{O}_2$  132
- Abbildung 102: REM-Aufnahmen der Zeitreihe der EMA von Phenol nach adsorbierter HRP. 134
- Abbildung 103: REM-Aufnahmen einer kryo-gebrochenen Probe bei einem Beobachtungswinkel von 70 °. 135
- Abbildung 104: Auffälligkeiten im EMA-Prozess von Phenol mit adsorbiertem HRP: Entstehende Partikel mit Ringstruktur (a) und Partikel gegen Ende des Bildungsprozesses mit Löchern (b) sowie Ablösung der geformten Struktur (c und d), im Waschvorgang verschobene beschichtete Enzymaggregate (e) und aus der Lösung heraus abgeschiedene Partikel (f). 136
- Abbildung 105: Zeitaufgelöste DLS-Größenverteilung der Phenolpolymerisierung über HRP im Wasser-Dioxangemisch (2:1) bei pH 7. (schwarz – vor HRP-Zugabe; rot – 3 min; orange – 30 min; blau – 60 min; grün – 4 Stunden). 138
- Abbildung 106: Mechanismus der EMA von Phenol mit HRP (Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Enzymteilchen größer gezeichnet als bei den bisherigen Schaubildern). 139

- Abbildung 107:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Phenol-Monomers (a) und des löslichen Teil des Phenolpolymers (b) 140
- Abbildung 108: FTIR-ATR-Spektrum des Phenolmonomers (schwarz) und des Phenolpolymers (rot) mit markierten Banden. 141
- Abbildung 109: TGA-Messung des Phenolpolymers (rot) und Phenolmonomers (schwarz) von 0 bis 800 °C (a) und DSC-Messung des Phenolpolymers im ersten (rot gestrichelt) und zweiten Durchlauf (rot) jeweils von -50 bis 500 °C (b). 142
- Abbildung 110: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach kovalent gebundenem HRP in unterschiedlichen Vergrößerungen. 144
- Abbildung 111: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol bei Enzymaggregaten. 145
- Abbildung 112: REM-Aufnahmen der EMA von Phenol nach kovalent über einen Spacer gebundener HRP (a: Spacer = 10.000 g/mol; b:Spacer =20.000 g/mol). 145
- Abbildung 113: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Edelstahl in verschiedenen Vergrößerungen. 148
- Abbildung 114: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Aluminium in verschiedenen Vergrößerungen. 149
- Abbildung 115: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Aluminium in verschiedenen Vergrößerungen. 149
- Abbildung 116: REM-Aufnahmen der EMA von Phenolpolymeren auf Polyethylen in verschiedenen Vergrößerungen. 151
- Abbildung 117: a) Schematische Darstellung des Strukturierungsansatzes; b-d) REM-Aufnahmen der ortsspezifischen Abscheidung der Phenolpolymere in verschiedenen Vergrößerungen. 154
- Abbildung 118: Schematische Darstellung der Silanisierung der Glasträger und der anschließenden kovalenten Enzymimmobilisierung 165

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vereinfachte Übersicht der Einteilung der verschiedenen Enzymklassen nach der systematischen Nomenklatur der IUBMB <sup>30</sup>	14
Tabelle 2: Kontaktwinkel und freie Oberflächenenergien zu unterschiedlichen Stufen des EMA-Verfahrens mit Lipase und Polystyrol.	68
Tabelle 3: Wasserkontaktwinkel der einzelnen Schritte der kovalenten Immobilisierung	85
Tabelle 4: Kontaktwinkel der EMA über Spacer	88
Tabelle 5: Kontaktwinkelmessungen der EMA von PMMA mittels kovalent gebundener HRP	117
Tabelle 6: Kontaktwinkel der verschiedenen Stufen der kovalenten Enzymimmobilisierung von HRP über Spacer-Moleküle	121
Tabelle 7: Kontaktwinkel der verschiedenen Stufen der EMA von Phenol-Polymeren über HRP	130
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Blockcopolymere	160
Tabelle 9: Übersicht über die genutzten Vinylmonomere und deren eingesetzten Volumina	161
Tabelle 10: Mischungsverhältnisse für die Aktivitätsbestimmung von HRP	163

## Literaturverzeichnis

1. Wedegärtner, D. & Strube, O. I. Site-Specific Addressing of Particles and Coatings via Enzyme-Mediated Destabilization. *Catalysts* **9**, 354; 10.3390/catal9040354 (2019).
2. Appel, D., Wedegärtner, D., Lüther, M. & Strube, O. I. Enzyme-Mediated In Situ Buildup and Site-Specific Addressing of Polymeric Coatings. *Macromol. Mater. Eng.* **304**, 1800536; 10.1002/mame.201800536 (2019).
3. Wedegärtner, D. & Strube, O. I. Enzyme-mediated and formaldehyde-free formation of phenolic resin coatings. *Progress in Organic Coatings* **186**, 108078; 10.1016/j.porgcoat.2023.108078 (2024).
4. Vincent, J. F. V. Biomimetics--a review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine* **223**, 919–939; 10.1243/09544119JEIM561. (2009).
5. Marchetti, L. & Levine, M. Biomimetic Catalysis. *ACS Catal.* **1**, 1090–1118; 10.1021/cs200171u (2011).
6. Goldschmidt, A. & Streitberger, H.-J. *BASF Handbuch Lackiertechnik* (Vincentz Network, 2014).
7. Svejda, P. *Prozesse und Applikationsverfahren in der industriellen Lackiertechnik* (Vincentz, Hannover, 2003).
8. BASF Coatings. Elektrottauchlacke. Elektrottauchlacke für industrielle Anwendungen, 2002.
9. BESRA, L. & LIU, M. A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD). *Progress in Materials Science* **52**, 1–61; 10.1016/j.pmatsci.2006.07.001 (2007).
10. Prof. Dr. Wolfgang Bremser & Oliver Seewald. 11. *Kathodische Tauchlackierung. Vorlesung Lacksysteme 1 - Universität Paderborn* (WS 2021/22).
11. Kanani, N. *Electroplating. Basic Principles, Processes and Practice* (Elsevier, 2004).

12. Yuan-Chung Wang, Ing-Chi Leu & Min-Hsiung Hon. Kinetics of Electrophoretic Deposition for Nanocrystalline Zinc Oxide Coatings. *Journal of the American Ceramic Society* **87**, 84–88; 10.1111/j.1551-2916.2004.00084.x (2004).
13. Mischke, P. *Filmbildung in modernen Lacksystemen* (Vincentz, Hannover, 2007).
14. *Human Biochemistry* (Elsevier, 2018).
15. Litwack, G. Enzymes. In *Human Biochemistry* (Elsevier 2018), Vol. 315, pp. 95–129.
16. Uhlig, H. & Linsmaier-Bednar, E. M. *Industrial enzymes and their applications* (Wiley, New York, 1998).
17. MacDonald, N. *What did the ancient Israelites eat? Diet in biblical times* (William B. Eerdmans Pub. Co, Grand Rapids, Mich, 2008).
18. Chapman, J., Ismail, A. & Dinu, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* **8**, 238; 10.3390/catal8060238 (2018).
19. Sun, H., Zhang, H., Ang, E. L. & Zhao, H. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. *Bioorganic & medicinal chemistry* **26**, 1275–1284; 10.1016/j.bmc.2017.06.043 (2018).
20. Siddheshwar Kshirsagar *et al.* Composition of Synthesized Cellulolytic Enzymes Varied with the Usage of Agricultural Substrates and Microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol* **191**, 1695–1710; 10.1007/s12010-020-03297-8 (2020).
21. Pellis, A., Cantone, S., Ebert, C. & Gardossi, L. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. *New biotechnology* **40**, 154–169; 10.1016/j.nbt.2017.07.005 (2018).
22. Pratima Bajpai. Application of Enzymes in the Pulp and Paper Industry. *Biotechnology Progress* **15**, 147–157; 10.1021/bp990013k (1999).
23. Yasmin Khambhaty. Applications of enzymes in leather processing. *Environ Chem Lett* **18**, 747–769; 10.1007/s10311-020-00971-5 (2020).

24. Patel, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. *Bioorganic & medicinal chemistry* **26**, 1252–1274; 10.1016/j.bmc.2017.05.023 (2018).
25. Dwevedi, A. *Enzyme Immobilization. Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment* (Springer, 2016).
26. McDonald, A. G. & Tipton, K. F. Fifty-five years of enzyme classification: advances and difficulties. *The FEBS journal* **281**, 583–592; 10.1111/febs.12530 (2014).
27. Choi, J.-M., Han, S.-S. & Kim, H.-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnology advances* **33**, 1443–1454; 10.1016/j.biotechadv.2015.02.014 (2015).
28. Prasad, S. & Roy, I. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. *Recent patents on biotechnology* **12**, 33–56; 10.2174/1872208311666170612113303 (2018).
29. Liébecq, C. (ed.). *Biochemical nomenclature and related documents. A compendium*. 2nd ed. (Portland Press, London, 1992).
30. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. Available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/>.
31. Soetaert, W. & Vandamme, E. J. *Industrial Biotechnology. Sustainable Growth and Economic Success* (John Wiley & Sons, 2010).
32. Chancharonpong, C., Hsieh, P.-C. & Sheu, S.-C. Enzyme Production and Growth of *Aspergillus oryzae* S. on Soybean Koji Fermentation. *APCBEE Procedia* **2**, 57–61; 10.1016/j.apcbee.2012.06.011 (2012).
33. Rodríguez Couto, S. & Sanromán, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* **22**, 211–219; 10.1016/j.bej.2004.09.013 (2005).

34. Viniegra-González, G. *et al.* Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal* **13**, 157–167; 10.1016/S1369-703X(02)00128-6 (2003).
35. Muller dos Santos, M., Souza da Rosa, A., Dal'Boit, S., Mitchell, D. A. & Krieger, N. Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource technology* **93**, 261–268; 10.1016/j.biortech.2003.11.007 (2004).
36. Chmiel, H. (ed.). *Bioprozesstechnik*. 3rd ed. (Spektrum Akademischer Verl., Heidelberg, 2011).
37. Kuddus, M. *Enzymes in Food Biotechnology. Production, Applications, and Future Prospects* (Academic Press, 2018).
38. Palit, S. Industrial vs Food Enzymes: Applications and Future Prospects. In *Enzymes in Food Technology*, edited by M. Kuddus (Springer Singapore, Singapore, 2018), Vol. 4, pp. 319–345.
39. IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 3.4.23.4. chymosin. Available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/4/23/4.html> (2021).
40. Braunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA). Information on EC 3.4.23.4 - chymosin. Available at <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4>.
41. Uniacke-Lowe, T. & Fox, P. F. Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties. In *Cheese* (Elsevier 2017), Vol. 113, pp. 69–113.
42. Palmer, D. S. *et al.* Bovine chymosin: a computational study of recognition and binding of bovine kappa-casein. *Biochemistry* **49**, 2563–2573; 10.1021/bi902193u (2010).
43. Donnelly, W. J., Carroll, D. P., O'Callaghan, D. M. & Walls, D. Genetic polymorphism of bovine chymosin. *The Journal of dairy research* **53**, 657–664; 10.1017/S0022029900033185 (1986).

44. Rampilli, M., Larsen, R. & Harboe, M. Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal* **15**, 1130–1137; 10.1016/j.idairyj.2004.10.003 (2005).
45. Reid, J. R., Coolbear, T., Ayers, J. S. & Coolbear, K. P. The action of chymosin on  $\kappa$ -casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis. *International Dairy Journal* **7**, 559–569; 10.1016/S0958-6946(97)00062-9 (1997).
46. Malay Mundle. Are transgenic food crops safe for human consumption? *Journal of Comprehensive Health* **2**, 8–17 (2014).
47. Cardoza, R. E. *et al.* Expression of a synthetic copy of the bovine chymosin gene in *Aspergillus awamori* from constitutive and pH-regulated promoters and secretion using two different pre-pro sequences. *Biotechnology and bioengineering* **83**, 249–259; 10.1002/bit.10666 (2003).
48. van den Brink, H. J. M., Petersen, S. G., Rahbek-Nielsen, H., Hellmuth, K. & Harboe, M. Increased production of chymosin by glycosylation. *Journal of biotechnology* **125**, 304–310; 10.1016/j.jbiotec.2006.02.024 (2006).
49. Exterkate, F. A., Lagerwerf, F. M., Haverkamp, J. & van Schalkwijk, S. The selectivity of chymosin action on  $\alpha$ s1- and  $\beta$ -caseins in solution is modulated in cheese. *International Dairy Journal* **7**, 47–54; 10.1016/S0958-6946(96)00047-7 (1997).
50. Mohanty, A., Mukhopadhyay, U., Grover, S. & Batish, V. Bovine chymosin. *Biotechnology advances* **17**, 205–217; 10.1016/S0734-9750(99)00010-5 (1999).
51. O'Mahony, J. A., Lucey, J. A. & McSweeney, P. Chymosin-Mediated Proteolysis, Calcium Solubilization, and Texture Development During the Ripening of Cheddar Cheese. *Journal of dairy science* **88**, 3101–3114; 10.3168/jds.S0022-0302(05)72992-1 (2005).
52. Rogelj, I., Perko, B., Francky, A., Penca, V. & Pungerčar, J. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production. *Journal of dairy science* **84**, 1020–1026; 10.3168/jds.S0022-0302(01)74561-4 (2001).



53. Kawasaki, K. & Weiss, K. M. Mineralized tissue and vertebrate evolution: the secretory calcium-binding phosphoprotein gene cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4060–4065; 10.1073/pnas.0638023100 (2003).
54. Audic, J.-L., Chaufer, B. & Daufin, G. Non-food applications of milk components and dairy co-products: A review. *Lait* **83**, 417–438; 10.1051/lait:2003027 (2003).
55. Holt, C., Kruif, C. de, Tuinier, R. & Timmins, P. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **213**, 275–284; 10.1016/S0927-7757(02)00520-4 (2003).
56. Horne, D. S. Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 148–153; 10.1016/j.cocis.2005.11.004 (2006).
57. Farrell, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M. & Qi, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **11**, 135–147; 10.1016/j.cocis.2005.11.005 (2006).
58. Schmidt, D. G. Colloidal aspects of casein. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 42-64 ref.156 (1980).
59. Holt, C. Structure and Stability of Bovine Casein Micelles. In *Advances in protein chemistry*, edited by C. B. Anfinsen (Academic Press, San Diego, 1992), Vol. 43, pp. 63–151.
60. Creamer, L. K., Plowman, J. E., Liddell, M. J., Smith, M. H. & Hill, J. P. Micelle Stability:  $\kappa$ -Casein Structure and Function. *Journal of dairy science* **81**, 3004–3012; 10.3168/jds.S0022-0302(98)75864-3 (1998).
61. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations - EC 3.1.1. Carboxylic Ester Hydrolases. Available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC3/1/1/>.

62. Javed, S. *et al.* Bacterial lipases: A review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology* **132**, 23–34; 10.1016/j.pbiomolbio.2017.07.014 (2018).
63. Patel, N., Rai, D., Shivam, Shahane, S. & Mishra, U. Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. *Recent patents on biotechnology* **13**, 45–56; 10.2174/1872208312666181029093333 (2019).
64. Pohanka, M. Biosensors and Bioassays Based on Lipases, Principles and Applications, a Review. *Molecules (Basel, Switzerland)* **24**; 10.3390/molecules24030616 (2019).
65. Wong, H. & Schotz, M. C. The lipase gene family. *Journal of lipid research* **43**, 993–999; 10.1194/jlr.r200007-jlr200 (2002).
66. Contesini, F. J. *et al.* Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. *Catalysts* **10**, 1032; 10.3390/catal10091032 (2020).
67. Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. & Marty, A. Lipases: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **861**, 3–30; 10.1007/978-1-61779-600-5\_1 (2012).
68. Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L. & Wang, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology advances* **28**, 628–634; 10.1016/j.biotechadv.2010.05.012 (2010).
69. Bajaj, A., Lohan, P., Jha, P. N. & Mehrotra, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **62**, 9–14; 10.1016/j.molcatb.2009.09.018 (2010).
70. Vial, L., Chapalain, A., Groleau, M.-C. & Déziel, E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute to adaptation. *Environmental microbiology* **13**, 1–12; 10.1111/j.1462-2920.2010.02343.x (2011).
71. Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S. & Gupta, M. N. Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C.

25609. *Biotechnology and applied biochemistry* **51**, 23–31; 10.1042/BA20070186 (2008).
72. Sasso, F. *et al.* Burkholderia cepacia lipase is a promising biocatalyst for biofuel production. *Biotechnology journal* **11**, 954–960; 10.1002/biot.201500305 (2016).
73. Pencreac'h, G., Leullier, M. & Baratti, J. C. Properties of free and immobilized lipase from Pseudomonas cepacia. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 181–189; 10.1002/(sici)1097-0290(19971020)56:2%3C181::aid-bit7%3E3.0.co;2-l (1997).
74. Mohammadi Ziarani, G., Gholamzadeh, P., Asadiatouei, P. & Lashgari, N. The role of Pseudomonas cepacia lipase in the asymmetric synthesis of heterocyclic based compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **122**, 93–116; 10.1016/j.molcatb.2015.08.022 (2015).
75. Gan, Z., Yu, D., Zhong, Z., Liang, Q. & Jing, X. Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(dl-lactide) blends in phosphate buffer solution. *Polymer* **40**, 2859–2862; 10.1016/S0032-3861(98)00549-7 (1999).
76. Kulkarni, A., Reiche, J., Hartmann, J., Kratz, K. & Lendlein, A. Selective enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) containing multiblock copolymers. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* **68**, 46–56; 10.1016/j.ejpb.2007.05.021 (2008).
77. IUBMB Enzyme Nomenclature. EC 1.11.1.7. Available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>.
78. Delincée, H. & Radola, B. J. Fractionation of horseradish peroxidase by preparative isoelectric focusing, gel chromatography and ion-exchange chromatography. *European journal of biochemistry* **52**, 321–330; 10.1111/j.1432-1033.1975.tb04000.x (1975).
79. Hermanson, G. T. Enzyme Modification and Conjugation. In *Bioconjugate Techniques*, edited by G. T. Hermanson. 3rd ed. (Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, op. 2013), pp. 951–957.

80. Lavery, C. B. *et al.* Purification of peroxidase from Horseradish (*Armoracia rusticana*) roots. *Journal of agricultural and food chemistry* **58**, 8471–8476; 10.1021/jf100786h (2010).
81. Shannon, L. M., Kay, E. & Lew, J. Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots. *Journal of Biological Chemistry* **241**, 2166–2172; 10.1016/S0021-9258(18)96680-9 (1966).
82. Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, A., Smith, A. T. & Poulos, T. L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nature structural biology* **4**, 1032–1038; 10.1038/nsb1297-1032 (1997).
83. Targovnik, A. M., Cascone, O. & Miranda, M. V. Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme c from insect larvae in aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology* **98**, 199–205; 10.1016/j.seppur.2012.08.004 (2012).
84. Dunford, H. On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coordination Chemistry Reviews* **19**, 187–251; 10.1016/S0010-8545(00)80316-1 (1976).
85. Passardi, F. *et al.* PeroxiBase: the peroxidase database. *Phytochemistry* **68**, 1605–1611; 10.1016/j.phytochem.2007.04.005 (2007).
86. Trivedi, V., Chand, P., Maulik, P. R. & Bandyopadhyay, U. Mechanism of horseradish peroxidase-catalyzed heme oxidation and polymerization (beta-hematin formation). *Biochimica et biophysica acta* **1723**, 221–228; 10.1016/j.bbagen.2005.02.005 (2005).
87. Henriksen, A., Smith, A. T. & Gajhede, M. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 35005–35011; 10.1074/jbc.274.49.35005 (1999).
88. Rodríguez-López, J. N. *et al.* Mechanism of reaction of hydrogen peroxide with horseradish peroxidase: identification of intermediates in the catalytic cycle. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 11838–11847; 10.1021/ja011853+ (2001).

- 89.Hesse, W. Phenolic Resins. In *Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*, edited by F. Ullmann. 7th ed. (John Wiley & Sons, [Hoboken, N.J.], 2005-).
- 90.Huang, Q. & Weber, W. J. Interactions of soil-derived dissolved organic matter with phenol in peroxidase-catalyzed oxidative coupling reactions. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 338–344; 10.1021/es0304289 (2004).
- 91.Mohd, A. Presence of phenol in wastewater effluent and its removal: an overview. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **243**, 1–23; 10.1080/03067319.2020.1738412 (2020).
- 92.Cooper, V. A. & Nicell, J. A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research* **30**, 954–964; 10.1016/0043-1354(95)00237-5 (1996).
- 93.Liu, S. *et al.* Nanocapsulation of horseradish peroxidase (HRP) enhances enzymatic performance in removing phenolic compounds. *International journal of biological macromolecules* **150**, 814–822; 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.043 (2020).
- 94.Bódalo, A., Gómez, J. L., Gómez, E., Bastida, J. & Máximo, M. F. Comparison of commercial peroxidases for removing phenol from water solutions. *Chemosphere* **63**, 626–632; 10.1016/j.chemosphere.2005.08.007 (2006).
- 95.Torres-Duarte, C. & Vazquez-Duhalt, R. *Applications and Prospective of Peroxidase Biocatalysis in the Environmental Field*. Available at [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-12627-7_8) (Springer Berlin Heidelberg, 2010).
- 96.Yu, J., Taylor, K. E., Zou, H., Biswas, N. & Bewtra, J. K. Phenol Conversion and Dimeric Intermediates in Horseradish Peroxidase-Catalyzed Phenol Removal from Water. *Environmental Science & Technology* **28**, 2154–2160; 10.1021/es00061a025 (1994).
- 97.Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N. & Bewtra, J. K. A model for the Protective Effect of Additives on the Activity of Horseradish Peroxidase in the Removal

- of Phenol. *Enzyme and Microbial Technology* **22**, 315–322; 10.1016/S0141-0229(97)00197-X (1998).
98. Huixian, Z. & Taylor, K. E. Products of oxidative coupling of phenol by horseradish peroxidase. *Chemosphere* **28**, 1807–1817; 10.1016/0045-6535(94)90028-0 (1994).
99. Cheng, W. & Harper, W. F. Chemical kinetics and interactions involved in horseradish peroxidase-mediated oxidative polymerization of phenolic compounds. *Enzyme and Microbial Technology* **50**, 204–208; 10.1016/j.enzmictec.2011.12.005 (2012).
100. Guo, Z., Salamonczyk, G. M., Han, K., Machiya, K. & Sih, C. J. Enzymatic Oxidative Phenolic Coupling. *J. Org. Chem.* **62**, 6700–6701; 10.1021/jo970995c (1997).
101. Sakuyama, H., Endo, Y., Fujimoto, K. & Hatana, Y. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**, 227–231; 10.1016/s1389-1723(03)80186-x (2003).
102. Kobayashi, S. *et al.* Enzymatic oxidative polymerization of bisphenol-A to a new class of soluble polyphenol. *Macromol. Chem. Phys.* **199**, 777–782; 10.1002/(SICI)1521-3935(19980501)199:5<777::AID-MACP777>3.0.CO;2-8 (1998).
103. Huang, Q. & Weber, W. J. Transformation and removal of bisphenol A from aqueous phase via peroxidase mediated oxidative coupling reactions: efficacy, products, and pathways. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 6029–6036; 10.1021/es050036x (2005).
104. Derango, R. A., Chiang, L., Dowbenko, R. & Lasch, J. G. Enzyme-mediated polymerization of acrylic monomers. *Biotechnol Tech* **6**, 523–526; 10.1007/BF02447825 (1992).
105. Kalra, B. & Gross, R. A. Horseradish peroxidase mediated free radical polymerization of methyl methacrylate. *Biomacromolecules* **1**, 501–505; 10.1021/bm005576v (2000).

- 
106. Shan, J., Kitamura, Y. & Yoshizawa, H. Emulsion polymerization of styrene by horseradish peroxidase-mediated initiation. *Colloid Polym Sci* **284**, 108–111; 10.1007/s00396-005-1354-x (2005).
107. Kohri, M. *et al.* Enzymatic emulsifier-free emulsion polymerization to prepare polystyrene particles using horseradish peroxidase as a catalyst. *Polym J* **45**, 354–358; 10.1038/pj.2012.129 (2013).
108. Amarjit Singh & David L. Kaplan. Enzyme-Based Vinyl Polymerization. *Journal of Polymers and the Environment* **10**, 85–91; 10.1023/A:1021168029840 (2002).
109. Barman, T. E. *Enzyme Handbook* (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1991).
110. Lemos, M. A., Oliveira, J. C. & Saraiva, J. A. Influence of pH on the Thermal Inactivation Kinetics of Horseradish Peroxidase in Aqueous Solution. *LWT - Food Science and Technology* **33**, 362–368; 10.1006/fstl.2000.0694 (2000).
111. Bayramoğlu, G. & Arica, M. Y. Enzymatic removal of phenol and p-chlorophenol in enzyme reactor: horseradish peroxidase immobilized on magnetic beads. *Journal of hazardous materials* **156**, 148–155; 10.1016/j.jhazmat.2007.12.008 (2008).
112. Lai, Y.-C. & Lin, S.-C. Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. *Process Biochemistry* **40**, 1167–1174; 10.1016/j.procbio.2004.04.009 (2005).
113. Mogharrab, N., Ghourchian, H. & Amininasab, M. Structural stabilization and functional improvement of horseradish peroxidase upon modification of accessible lysines: experiments and simulation. *Biophysical journal* **92**, 1192–1203; 10.1529/biophysj.106.092858 (2007).
114. Nicell, J. A. & Wright, H. A model of peroxidase activity with inhibition by hydrogen peroxide. *Enzyme and Microbial Technology* **21**, 302–310; 10.1016/S0141-0229(97)00001-X (1997).

115. Dequaire, M., Limoges, B., Moiroux, J. & Savéant, J.-M. Mediated electrochemistry of horseradish peroxidase. Catalysis and inhibition. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 240–253; 10.1021/ja0170706 (2002).
116. Gurung, N., Ray, S., Bose, S. & Rai, V. A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed research international* **2013**, 329121; 10.1155/2013/329121 (2013).
117. Gonçalves, M. C. P. *et al.* Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. *Process Biochemistry* **76**, 95–110; 10.1016/j.procbio.2018.09.016 (2019).
118. Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**, 1–9; 10.1007/s13205-012-0071-7 (2013).
119. Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society reviews* **38**, 453–468; 10.1039/b711564b (2009).
120. Nguyen, H. H. & Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Conver. Technol.* **26**, 157–163; 10.5757/ASCT.2017.26.6.157 (2017).
121. DiCosimo, R., McAuliffe, J., Poulouse, A. J. & Bohlmann, G. Industrial use of immobilized enzymes. *Chemical Society reviews* **42**, 6437–6474; 10.1039/C3CS35506C (2013).
122. V, R. R. *Advances in Food Biotechnology* (John Wiley & Sons, 2015).
123. Dwevedi, A. *Enzyme Immobilization. Advances in Industry, Agriculture, Medicine, and the Environment* (Springer, 2016).
124. Halling, P. J. *Proteins: Structures and molecular properties* (2nd edition). by Thomas E. Creighton, W. H. Freeman, New York, 1992, xiii + 512 pp, price £22.95. ISBN 0-7167-7030-X. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **62**, 105; 10.1002/jctb.280620121 (1995).



125. Li, W. F., Zhou, X. X. & Lu, P. Structural features of thermozymes. *Biotechnology advances* **23**, 271–281; 10.1016/j.biotechadv.2005.01.002 (2005).
126. Rao, S. V., Anderson, K. W. & Bachas, L. G. Oriented immobilization of proteins. *Mikrochim Acta* **128**, 127–143; 10.1007/bf01243043 (1998).
127. Secundo, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. *Chemical Society reviews* **42**, 6250–6261; 10.1039/c3cs35495d (2013).
128. Malinin, A. S., Rakhnyanskaya, A. A., Bacheva, A. V. & Yaroslavov, A. A. Activity of an enzyme immobilized on polyelectrolyte multilayers. *Polym. Sci. Ser. A* **53**, 52–56; 10.1134/S0965545X10121041 (2011).
129. Xie, Y., Zhou, J. & Jiang, S. Parallel tempering Monte Carlo simulations of lysozyme orientation on charged surfaces. *The Journal of chemical physics* **132**, 65101; 10.1063/1.3305244 (2010).
130. Koutsopoulos, S., Patzsch, K., Bosker, W. T. E. & Norde, W. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **23**, 2000–2006; 10.1021/la062238s (2007).
131. Koutsopoulos, S., van der Oost, J. & Norde, W. Structural features of a hyperthermostable endo-beta-1,3-glucanase in solution and adsorbed on "invisible" particles. *Biophysical journal* **88**, 467–474; 10.1529/biophysj.104.043323 (2005).
132. Czeslik, C., Jackler, G. & Royer, C. Driving forces for the adsorption of enzymes at the water/silica interface studied by total internal reflection fluorescence spectroscopy and optical reflectometry. *Spectroscopy* **16**, 139–145 (2002).
133. Talbert, J. N. & Goddard, J. M. Enzymes on material surfaces. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **93**, 8–19; 10.1016/j.colsurfb.2012.01.003 (2012).
134. Thörn, C. *et al.* Understanding the pH-dependent immobilization efficacy of feruloyl esterase-C on mesoporous silica and its structure–activity

- changes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **93**, 65–72; 10.1016/j.molcatb.2013.04.011 (2013).
135. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1451–1463; 10.1016/j.enzmictec.2007.01.018 (2007).
136. Garcia-Galan, C., Berenguer-Murcia, Á., Fernandez-Lafuente, R. & Rodrigues, R. C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2885–2904; 10.1002/adsc.201100534 (2011).
137. Magner, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. *Chemical Society reviews* **42**, 6213–6222; 10.1039/C2CS35450K (2013).
138. Salis, A. *et al.* Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance. *ChemCatChem* **2**, 322–329; 10.1002/cctc.200900288 (2010).
139. Lee, S. H., Doan, T. T. N., Won, K., Ha, S. H. & Koo, Y.-M. Immobilization of lipase within carbon nanotube–silica composites for non-aqueous reaction systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **62**, 169–172; 10.1016/j.molcatb.2009.10.004 (2010).
140. Kramer, M., Cruz, J. C., Pfromm, P. H., Rezac, M. E. & Czermak, P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of biotechnology* **150**, 80–86; 10.1016/j.jbiotec.2010.07.018 (2010).
141. Messing, R. A. Adsorption of proteins on glass surfaces and pertinent parameters for the immobilization of enzymes in the pores of inorganic carriers. *Journal of Non-Crystalline Solids* **19**, 277–283; 10.1016/0022-3093(75)90093-9 (1975).
142. Reshmi, R., Sanjay, G. & Sugunan, S. Enhanced activity and stability of  $\alpha$ -amylase immobilized on alumina. *Catalysis Communications* **7**, 460–465; 10.1016/j.catcom.2006.01.001 (2006).

143. Putzbach, W. & Ronkainen, N. J. Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: a review. *Sensors (Basel, Switzerland)* **13**, 4811–4840; 10.3390/s130404811 (2013).
144. Jesionowski, T., Zdarta, J. & Krajewska, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption* **20**, 801–821; 10.1007/s10450-014-9623-y (2014).
145. Liu, Q., Kong, X., Zhang, C., Chen, Y. & Hua, Y. Immobilisation of a hydroperoxide lyase and comparative enzymological studies of the immobilised enzyme with membrane-bound enzyme. *Journal of the science of food and agriculture* **93**, 1953–1959; 10.1002/jsfa.5997 (2013).
146. Erhardt, F. A. & Jördening, H.-J. Immobilization of dextranase from *Chaetomium erraticum*. *Journal of biotechnology* **131**, 440–447; 10.1016/j.jbiotec.2007.07.946 (2007).
147. Zaidan, U. H. *et al.* Biocatalytic production of lactose ester catalysed by mica-based immobilised lipase. *Food Chemistry* **131**, 199–205; 10.1016/j.foodchem.2011.08.060 (2012).
148. Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**, 126–139; 10.1016/j.enzmictec.2003.12.013 (2004).
149. Verma, M. L., Kumar, S., Das, A., Randhawa, J. S. & Chamundeeswari, M. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environ Chem Lett* **18**, 315–323; 10.1007/s10311-019-00942-5 (2020).
150. Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T. & Pinelo, M. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* **8**, 92; 10.3390/catal8020092 (2018).
151. Hwang, E. T. & Gu, M. B. Enzyme stabilization by nano/microsized hybrid materials. *Eng. Life Sci.* **13**, 49–61; 10.1002/elsc.201100225 (2013).

152. Liu, Y. & Chen, J. Y. Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **31**, 553–567; 10.1177/0883911516637377 (2016).
153. Kim, H. J. *et al.* Biocompatible cellulose nanocrystals as supports to immobilize lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **122**, 170–178; 10.1016/j.molcatb.2015.09.007 (2015).
154. Bilal, M. & Iqbal, H. M. N. Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *International journal of biological macromolecules* **130**, 462–482; 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152 (2019).
155. Sirisha, V. L., Jain, A. & Jain, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in food and nutrition research* **79**, 179–211; 10.1016/bs.afnr.2016.07.004 (2016).
156. Kumari, A. & Kayastha, A. M. Immobilization of soybean (Glycine max)  $\alpha$ -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **69**, 8–14; 10.1016/j.molcatb.2010.12.003 (2011).
157. Abdel-Naby, M. A. Immobilization of Paenibacillus macerans NRRL B-3186 cyclodextrin glucosyltransferase and properties of the immobilized enzyme. *Process Biochemistry* **34**, 399–405; 10.1016/S0032-9592(99)00017-5 (1999).
158. Silva, C., Silva, C. J., Zille, A., Guebitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres. *Enzyme and Microbial Technology* **41**, 867–875; 10.1016/j.enzmictec.2007.07.010 (2007).
159. Silva, M. F. *et al.* Evaluation of enzymatic activity of commercial inulinase from *Aspergillus niger* immobilized in polyurethane foam. *Food and Bioproducts Processing* **91**, 54–59; 10.1016/j.fbp.2012.08.003 (2013).
160. Sassolas, A., Blum, L. J. & Leca-Bouvier, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances* **30**, 489–511; 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003 (2012).

- 
161. Liu, K., Li, X., Li, X., He, B. & Zhao, G. Lowering the cationic demand caused by PGA in papermaking by solute adsorption and immobilized pectinase on chitosan beads. *Carbohydrate Polymers* **82**, 648–652; 10.1016/j.carbpol.2010.05.028 (2010).
162. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology, biotechnological equipment* **29**, 205–220; 10.1080/13102818.2015.1008192 (2015).
163. Joshi, K. *et al.* A Disposable Biosensor for Organophosphorus Nerve Agents Based on Carbon Nanotubes Modified Thick Film Strip Electrode. *Electroanalysis* **17**, 54–58; 10.1002/elan.200403118 (2005).
164. Girelli, A. M. & Scuto, F. R. Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of biotechnology* **325**, 241–249; 10.1016/j.jbiotec.2020.10.016 (2021).
165. Stine, K. J. Enzyme Immobilization on Nanoporous Gold: A Review. *Biochemistry insights* **10**, 1178626417748607; 10.1177/1178626417748607 (2017).
166. Hernandez, K. & Fernandez-Lafuente, R. Control of protein immobilization: coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology* **48**, 107–122; 10.1016/j.enzmictec.2010.10.003 (2011).
167. Shi, L. *et al.* ZIF-67 Derived Porous Carbon from Calcination and Acid Etching Process as an Enzyme Immobilization Platform for Glucose Sensing. *Electroanalysis* **30**, 466–473; 10.1002/elan.201700678 (2018).
168. Güleç, H. A. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto polymeric membrane surfaces: effect of surface characteristics. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **104**, 83–90; 10.1016/j.colsurfb.2012.11.039 (2013).

169. Kahoush, M. *et al.* Surface modification of carbon felt by cold remote plasma for glucose oxidase enzyme immobilization. *Applied Surface Science* **476**, 1016–1024; 10.1016/j.apsusc.2019.01.155 (2019).
170. Herman S. Mansur *et al.* Adsorption/Desorption Behavior of Bovine Serum Albumin and Porcine Insulin on Chemically Patterned Porous Gel Networks. *Adsorption* **7**, 105–116; 10.1023/A:1011687706161 (2001).
171. Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F. & Ghoshal, S. K. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. *Reactive and Functional Polymers* **152**, 104613; 10.1016/j.reactfunctpolym.2020.104613 (2020).
172. Iyer, P. V. & Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry* **43**, 1019–1032; 10.1016/j.procbio.2008.06.004 (2008).
173. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *Journal of chemical biology* **6**, 185–205; 10.1007/s12154-013-0102-9 (2013).
174. Betancor, L. *et al.* Glutaraldehyde in Protein Immobilization. In *Immobilization of Enzymes and Cells*, edited by J. M. Walker & J. M. Guisan (Humana Press, Totowa, NJ, 2006), Vol. 22, pp. 57–64.
175. Betancor, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme and Microbial Technology* **39**, 877–882; 10.1016/j.enzmictec.2006.01.014 (2006).
176. López-Gallego, F., Guisán, J. M. & Betancor, L. Glutaraldehyde-mediated protein immobilization. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1051**, 33–41; 10.1007/978-1-62703-550-7\_3 (2013).
177. Mateo, C. *et al.* Immobilization of enzymes on heterofunctional epoxy supports. *Nature protocols* **2**, 1022–1033; 10.1038/nprot.2007.133 (2007).

- 
178. Mateo, C. *et al.* Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization-stabilization. *Biochemical Society transactions* **35**, 1593–1601; 10.1042/BST0351593 (2007).
179. Cantone, S. *et al.* Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chemical Society reviews* **42**, 6262–6276; 10.1039/C3CS35464D (2013).
180. Manta, C. *et al.* Polyethylene glycol as a spacer for solid-phase enzyme immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* **33**, 890–898; 10.1016/S0141-0229(03)00221-7 (2003).
181. Alagöz, D., Tükel, S. S. & Yildirim, D. Immobilization of pectinase on silica-based supports: Impacts of particle size and spacer arm on the activity. *International journal of biological macromolecules* **87**, 426–432; 10.1016/j.ijbiomac.2016.03.007 (2016).
182. Gopinath, S. & Sugunan, S. Enzymes immobilized on montmorillonite K 10: Effect of adsorption and grafting on the surface properties and the enzyme activity. *Applied Clay Science* **35**, 67–75; 10.1016/j.clay.2006.04.007 (2007).
183. Strube, O. I., Rüdiger, A. A. & Bremser, W. Enzymatically controlled material design with casein--from defined films to localized deposition of particles. *Journal of biotechnology* **201**, 69–74; 10.1016/j.jbiotec.2014.10.019 (2015).
184. Rüdiger, A. A. The enzyme mediated autodeposition of casein. UB-PAD - Paderborn University Library, 2017.
185. Barbosa, O. *et al.* Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. *Biomacromolecules* **14**, 2433–2462; 10.1021/bm400762h (2013).
186. David, A. E., Wang, N. S., Yang, V. C. & Yang, A. J. Chemically surface modified gel (CSMG): an excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of biotechnology* **125**, 395–407; 10.1016/j.jbiotec.2006.03.019 (2006).

187. Ruediger, A. A., Bremser, W. & Strube, O. I. The enzyme-mediated autodeposition of casein: effect of enzyme immobilization on deposition of protein structures. *J Coat Technol Res* **13**, 597–611; 10.1007/s11998-015-9757-1 (2016).
188. Fox, P. F. & Brodkorb, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. *International Dairy Journal* **18**, 677–684; 10.1016/j.idairyj.2008.03.002 (2008).
189. Kruif, C. G. de. Supra-aggregates of Casein Micelles as a Prelude to Coagulation. *Journal of dairy science* **81**, 3019–3028; 10.3168/jds.S0022-0302(98)75866-7 (1998).
190. Ruediger, A. A., Terborg, E., Bremser, W. & Strube, O. I. Influences on the film thickness in the enzymatic autodeposition process of casein. *Progress in Organic Coatings* **94**, 56–61; 10.1016/j.porgcoat.2016.02.002 (2016).
191. Strube, O. I., Rüdiger, A. A. & Bremser, W. Buildup of biobased adhesive layers by enzymatically controlled deposition on the example of casein. *International Journal of Adhesion and Adhesives* **63**, 9–13; 10.1016/j.ijadhadh.2015.08.001 (2015).
192. Ruediger, A. A., Bremser, W. & Strube, O. I. Nanoscaled Biocoatings via Enzyme Mediated Autodeposition of Casein. *Macromol. Mater. Eng.* **301**, 1181–1190; 10.1002/mame.201600034 (2016).
193. Alcantar, N. A., Aydil, E. S. & Israelachvili, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 343–351; 10.1002/1097-4636(20000905)51:3%3C343::AID-JBM7%3E3.0.CO;2-D (2000).
194. Gogel, D., Weini, M., Lindner, J. & Stritzker, B. Plasma modification of nanosphere lithography masks made of polystyrene beads. *JOURNAL OF OPTOELECTRONICS AND ADVANCED MATERIALS* **12** (2010).
195. Rüdiger, A. A., Brassat, K., Lindner, J. K. N., Bremser, W. & Strube, O. I. Easily Accessible Protein Nanostructures via Enzyme Mediated Addressing.



- Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **34**, 4264–4270; 10.1021/acs.langmuir.7b04089 (2018).
196. Büngeler, A., Hense, D. & Strube, O. I. Compatibility study of support materials within the enzyme-mediated addressing of proteins. *J Coat Technol Res* **16**, 963–969; 10.1007/s11998-019-00200-x (2019).
197. Strube, O. I., Büngeler, A. & Bremser, W. Site-specific in situ synthesis of eumelanin nanoparticles by an enzymatic autodeposition-like process. *Biomacromolecules* **16**, 1608–1613; 10.1021/acs.biomac.5b00187 (2015).
198. BRAunschweig ENzyme DAtabase (BRENDA). Information on EC 1.14.18.1 - tyrosinase. Available at <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=1.14.18.1>.
199. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). EC 1.14.18.1. tyrosinase. Available at <https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/enzyme/EC1/14/18/1.html>.
200. Nosanchuk, J. D. & Casadevall, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular microbiology* **5**, 203–223; 10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x (2003).
201. Meredith, P. & Sarna, T. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment cell research* **19**, 572–594; 10.1111/j.1600-0749.2006.00345.x (2006).
202. Thody, A. J. *et al.* Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. *The Journal of investigative dermatology* **97**, 340–344; 10.1111/1523-1747.ep12480680 (1991).
203. Ito, S. & Wakamatsu, K. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment cell research* **16**, 523–531; 10.1034/j.1600-0749.2003.00072.x (2003).
204. Schweitzer, A. D. *et al.* Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *International journal of*

- radiation oncology, biology, physics* **78**, 1494–1502;  
10.1016/j.ijrobp.2010.02.020 (2010).
205. Plonka, P. M. & Grabacka, M. Melanin synthesis in microorganisms--  
biotechnological and medical aspects. *Acta Biochim Pol* **53**, 429–443;  
10.18388/abp.2006\_3314 (2006).
206. Borges, C. R., Roberts, J. C., Wilkins, D. G. & Rollins, D. E. Relationship  
of melanin degradation products to actual melanin content: application to  
human hair. *Analytical biochemistry* **290**, 116–125; 10.1006/abio.2000.4976  
(2001).
207. Roy, S. & Rhim, J.-W. New insight into melanin for food packaging and  
biotechnology applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1–  
27; 10.1080/10408398.2021.1878097 (2021).
208. Butler, M. J. & Day, A. W. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.*  
**44**, 1115–1136; 10.1139/w98-119 (1998).
209. Panzella, L. *et al.* Atypical structural and  $\pi$ -electron features of a melanin  
polymer that lead to superior free-radical-scavenging properties.  
*Angewandte Chemie (International ed. in English)* **52**, 12684–12687;  
10.1002/anie.201305747 (2013).
210. Kim, B. G., Kim, S., Lee, H. & Choi, J. W. Wisdom from the Human Eye:  
A Synthetic Melanin Radical Scavenger for Improved Cycle Life of Li–O 2  
Battery. *Chem. Mater.* **26**, 4757–4764; 10.1021/cm501578v (2014).
211. Rózanowska, M., Sarna, T., Land, E. J. & Truscott, T. Free radical  
scavenging properties of melanin. *Free Radical Biology and Medicine* **26**,  
518–525; 10.1016/S0891-5849(98)00234-2 (1999).
212. Nighswander-Rempel, S. P., Riesz, J., Gilmore, J., Bothma, J. P. &  
Meredith, P. Quantitative fluorescence excitation spectra of synthetic  
eumelanin. *The journal of physical chemistry. B* **109**, 20629–20635;  
10.1021/jp053704+ (2005).

213. Strube, O. I., Büngeler, A. & Bremser, W. Enzyme-Mediated In Situ Synthesis and Deposition of Nonaggregated Melanin Protoparticles. *Macromol. Mater. Eng.* **301**, 801–804; 10.1002/mame.201500315 (2016).
214. Teuchner, K. *et al.* Femtosecond Two-photon Excited Fluorescence of Melanin\*. *Photochem Photobiol* **70**, 146–151; 10.1111/j.1751-1097.1999.tb07982.x (1999).
215. Nosanchuk, J. D., Stark, R. E. & Casadevall, A. Fungal Melanin: What do We Know About Structure? *Frontiers in microbiology* **6**, 1463; 10.3389/fmicb.2015.01463 (2015).
216. WHITE, L. P. Melanin: a naturally occurring cation exchange material. *Nature* **182**, 1427–1428; 10.1038/1821427a0 (1958).
217. Ito, S. The IFPCS presidential lecture: a chemist's view of melanogenesis. *Pigment cell research* **16**, 230–236; 10.1034/j.1600-0749.2003.00037.x (2003).
218. Büngeler, A., Hämisch, B. & Strube, O. I. The Supramolecular Buildup of Eumelanin: Structures, Mechanisms, Controllability. *International journal of molecular sciences* **18**; 10.3390/ijms18091901 (2017).
219. Carta, R. & Tola, G. Solubilities of L-Cystine, L-Tyrosine, L-Leucine, and Glycine in Aqueous Solutions at Various pHs and NaCl Concentrations. *J. Chem. Eng. Data* **41**, 414–417; 10.1021/je9501853 (1996).
220. Tang, S., Martinez, L. J., Sharma, A. & Chai, M. Synthesis and characterization of water-soluble and photostable L-DOPA dendrimers. *Organic letters* **8**, 4421–4424; 10.1021/ol061449l (2006).
221. Visser, S., van Rooijen, P. J., Schattenkerk, C. & Kerling, K. Peptide substrates for chymosin (Rennin). Kinetic studies with peptides of different chain length including parts of the sequence 101–112 of bovine  $\kappa$ -casein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **438**, 265–272; 10.1016/0005-2744(76)90242-4 (1976).
222. Dornbusch, M., Christ, U. & Rasing, R. *Epoxidharze* (Vincentz Network, Hannover, 2017).

223. Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews* **65**, 1357–1369; 10.1016/j.addr.2012.09.039. (2013).
224. Sonnenschein, M. F. *Polyurethanes. Science, technology, markets, and trends* (Wiley, Hoboken, New Jersey, 2015).
225. Mohamed, R. M. & Yusoh, K. A Review on the Recent Research of Polycaprolactone (PCL). *AMR* **1134**, 249–255; 10.4028/www.scientific.net/AMR.1134.249 (2015).
226. D'souza, A. A. & Shegokar, R. Polyethylene glycol (PEG): a versatile polymer for pharmaceutical applications. *Expert opinion on drug delivery* **13**, 1257–1275; 10.1080/17425247.2016.1182485 (2016).
227. Raffa, P., Broekhuis, A. A. & Picchioni, F. Polymeric surfactants for enhanced oil recovery: A review. *Journal of Petroleum Science and Engineering* **145**, 723–733; 10.1016/j.petrol.2016.07.007 (2016).
228. Yokoyama, M., Opanasopit, P., Okano, T., Kawano, K. & Maitani, Y. Polymer design and incorporation methods for polymeric micelle carrier system containing water-insoluble anti-cancer agent camptothecin. *Journal of drug targeting* **12**, 373–384; 10.1080/10611860412331285251 (2004).
229. Su, F., Li, G., Fan, Y. & Yan, Y. Enhanced performance of lipase via microcapsulation and its application in biodiesel preparation. *Scientific reports* **6**, 29670; 10.1038/srep29670 (2016).
230. Mabey, W. & Mill, T. Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **7**, 383–415; 10.1063/1.555572 (1978).
231. Shou, Q., Uto, K., Iwanaga, M., Ebara, M. & Aoyagi, T. Near-infrared light-responsive shape-memory poly( $\epsilon$ -caprolactone) films that actuate in physiological temperature range. *Polym J* **46**, 492–498; 10.1038/pj.2014.48 (2014).

232. Asua, J. M. Emulsion polymerization: From fundamental mechanisms to process developments. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **42**, 1025–1041; 10.1002/pola.11096 (2004).
233. Chern, C. S. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. *Progress in Polymer Science* **31**, 443–486; 10.1016/j.progpolymsci.2006.02.001 (2006).
234. Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. GESTIS-Stoffdatenbank: Styrol. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=010110>.
235. Lane, W. H. Determination of Solubility of Styrene in Water and of Water in Styrene. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **18**, 295–296; 10.1021/i560153a009 (1946).
236. Thormann, E., Simonsen, A. C., Hansen, P. L. & Mouritsen, O. G. Interactions between a polystyrene particle and hydrophilic and hydrophobic surfaces in aqueous solutions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **24**, 7278–7284; 10.1021/la8005162 (2008).
237. Gaëlle Pencreac'h, Marion Leullier & Jacques C. Baratti. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and bioengineering* **56**, 181–189; 10.1002/(SICI)1097-0290(19971020)56:2<181::AID-BIT7>3.0.CO;2-L (1997).
238. Bisswanger, H. Enzyme assays. *Perspectives in Science* **1**, 41–55; 10.1016/j.pisc.2014.02.005 (2014).
239. Goldstein, J. I. *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis. Third Edition* (Springer, Boston, MA, 2003).
240. Sigma Aldrich. Thermal Transitions of Homopolymers: Glass Transition & Melting Point. Available at <https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/polymer-synthesis/thermal-transitions-of-homopolymers>.
241. Kimura, K., Yao, H. & Sato, S. Self-Assembling of Gold and Silver Nanoparticles at a Hydrophilic/Hydrophobic Interface: A Synthetic Aspect

- and Superstructure Formation. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry (formerly Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chem* **36**, 237–264; 10.1080/15533170600595982 (2006).
242. Noda, I. *et al.* Development of novel thermal sprayed antibacterial coating and evaluation of release properties of silver ions. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **89**, 456–465; 10.1002/jbm.b.31235 (2009).
243. Moghimi-Rad, J. *et al.* Shape-controlled synthesis of silver particles by surfactant self-assembly under ultrasound radiation. *Appl Nanosci* **1**, 27–35; 10.1007/s13204-011-0004-5 (2011).
244. Ali, U., Karim, K. J. B. A. & Buang, N. A. A Review of the Properties and Applications of Poly (Methyl Methacrylate) (PMMA). *Polymer Reviews* **55**, 678–705; 10.1080/15583724.2015.1031377 (2015).
245. Preda, N. *et al.* Effect of aqueous comonomer solubility on the surfactant-free emulsion copolymerization of methyl methacrylate. *J Polym Res* **18**, 25–30; 10.1007/s10965-009-9387-3 (2011).
246. Leung, C., Xirouchaki, C., Berovic, N. & Palmer, R. E. Immobilization of Protein Molecules by Size-Selected Metal Clusters on Surfaces. *Adv. Mater.* **16**, 223–226; 10.1002/adma.200305756 (2004).
247. SAKAMOTO, I., MASUDA, K., OKAZAKI, S. & FUJINAGA, T. Acid-base equilibria in acetylacetone: Dissociation of some weak acids and the autoprotolysis constant of the solvent. *BUNSEKI KAGAKU* **31**, E49-E52; 10.2116/bunsekikagaku.31.E49 (1982).
248. Wünsch, J. R. *Polystyrene. Synthesis, Production and Applications* (iSmithers Rapra Publishing, 2000).
249. GESTIS-Stoffdatenbank. Methylmethacrylat. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=013350>.
250. GESTIS-Stoffdatenbank. Styrol. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=010110>.

251. GESTIS-Stoffdatenbank. 1,4-Dioxan. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=031770>.
252. Kobayashi, S. & Higashimura, H. Oxidative polymerization of phenols revisited. *Progress in Polymer Science* **28**, 1015–1048; 10.1016/S0079-6700(03)00014-5 (2003).
253. Hirano, K. & Asami, M. Phenolic resins—100years of progress and their future. *Reactive and Functional Polymers* **73**, 256–269; 10.1016/j.reactfunctpolym.2012.07.003 (2013).
254. Foyer, G., Chanfi, B.-H., Boutevin, B., Caillol, S. & David, G. New method for the synthesis of formaldehyde-free phenolic resins from lignin-based aldehyde precursors. *European Polymer Journal* **74**, 296–309; 10.1016/j.eurpolymj.2015.11.036 (2016).
255. Sarika, P. R., Nancarrow, P., Khansaheb, A. & Ibrahim, T. Bio-Based Alternatives to Phenol and Formaldehyde for the Production of Resins. *Polymers* **12**; 10.3390/polym12102237 (2020).
256. Kurioka, H., Uyama, H. & Kobayashi, S. Peroxidase-Catalyzed Dispersion Polymerization of Phenol Derivatives. *Polym J* **30**, 526–529; 10.1295/polymj.30.526 (1998).
257. Uyama, H., Maruichi, N., Tonami, H. & Kobayashi, S. Peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of bisphenols. *Biomacromolecules* **3**, 187–193; 10.1021/bm0101419 (2002).
258. GESTIS-Stoffdatenbank. Methanol. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=011240>.
259. GESTIS-Stoffdatenbank. Aceton. Available at <https://gestis.dguv.de/data?name=011230>.
260. Thébault, M. *et al.* Impact of phenolic resin preparation on its properties and its penetration behavior in Kraft paper. *European Polymer Journal* **104**, 90–98; 10.1016/j.eurpolymj.2018.05.003 (2018).

261. H Sakuyama, Y Endo, K Fujimoto, Y Hatana. Oxidative degradation of alkylphenols by horseradish peroxidase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**, 227–231; 10.1016/S1389-1723(03)80186-X (2003).
262. Akita, M., Tsutsumi, D., Kobayashi, M. & Kise, H. Structural change and catalytic activity of horseradish peroxidase in oxidative polymerization of phenol. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **65**, 1581–1588; 10.1271/bbb.65.1581 (2001).
263. Friebolin, H. *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung* (John Wiley & Sons, 2013).
264. Budzikiewicz, H. & Schäfer, M. *Massenspektrometrie. Eine Einführung* (John Wiley & Sons, 2012).
265. G. Meyerhoff. Zur Gelpermeationschromatographie in organischen Lösungsmitteln. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **69**, 866–874; 10.1002/bbpc.19650690920 (1965).
266. Dorothy Tobias. Infrared Absorption Spectra of Trisubstituted Phenol Derivatives (1963).
267. Smith, B. C. Distinguishing Structural Isomers: Mono- and Disubstituted Benzene Rings. *Spectroscopy*, 36–39.
268. Bouldin, R. M., Xia, Z., Klement, T. J., Kiratitanavit, W. & Nagarajan, R. Bioinspired flame retardant polymers of tyrosol. *J of Applied Polymer Sci* **134**; 10.1002/app.45394 (2017).
269. Grasel, F. d. S., Ferrão, M. F. & Wolf, C. R. Development of methodology for identification the nature of the polyphenolic extracts by FTIR associated with multivariate analysis. *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **153**, 94–101; 10.1016/j.saa.2015.08.020 (2016).
270. Dyer, J. R. Applications of absorption spectroscopy of organic compounds. (*No Title*) (1965).
271. Frick, A. & Stern, C. *DSC-Prüfung in der Anwendung* (Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, 2013).



- 
272. Ravichandran, S. *et al.* Halogen-free ultra-high flame retardant polymers through enzyme catalysis. *Green Chem.* **14**, 819; 10.1039/c2gc16192c (2012).
273. Starkweather, H. W. The surface tension of polyethylene. *Polym. Eng. Sci.* **5**, 5–6; 10.1002/pen.760050102 (1965).
274. Kvítek, L. *et al.* The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis. *J. Mater. Chem.* **15**, 1099–1105; 10.1039/b417007e (2005).