



Doctoral Thesis

Anorganisch-biopolymere Nanokomposits als biomimetrische Immobilisierungsmatrizen

Author(s):

Schuleit, Michael

Publication Date:

1997

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001892190> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

**Anorganisch-biopolymere Nanokomposits als biomimetische
Immobilisierungsmatrizen**

Abhandlung
zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der
Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

vorgelegt von
Michael Schuleit
Dipl. Chem.
geboren am 3. Dezember 1963
in Karlsruhe

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. P. L. Luisi, Referent
Prof. Dr. P. Smith, Korreferent

Zürich 1997



Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Herstellung und Charakterisierung stabiler hydrophober Nanokomposits mit definierter Teilchengrösse, Porosität und Oberflächenbeschaffenheit und ihre Anwendung als adequate Immobilisierungsmatrizen für grenzflächenaktive Enzyme. Nanokomposits sind Materialien, die aus mehreren Komponenten aufgebaut sind, die organisch, anorganisch oder eine Kombination beider sein können und von denen mindestens eine feste Phase im Nanometerbereich zwischen 1-100 nm liegt. Die Basiseinheit unseres Nanokompositsystems bildeten Wasser-in-Öl Mikroemulsionen, deren strukturelle und dynamische Eigenschaften für die Formierung von hydrophoben Nanokomposits genutzt wurden. Dabei erfüllen die Mikroemulsionströpfchen auf der einen Seite die strukturellen Bedingungen für Nanokomposits; auf der anderen Seite besitzen sie biomimetische Grenzflächen, die für die Aktivität und Stabilität grenzflächenaktiver Enzyme von grosser Bedeutung sind. Die Mikroemulsionströpfchen wurden mittels Gelatine in eine definierte Gelstruktur, sogenannte Mikroemulsions-Organogele, überführt. Diese bildeten anschliessend das strukturierte Reaktionssystem für die Hydrolyse und Polykondensation von Metallalkoxiden.

Bislang wurden Mikroemulsions-Organogele ausschliesslich auf der Basis des negativ geladenen Tensids AOT in apolaren Lösungsmittel wie Isooktan oder Heptan hergestellt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass man die Herstellung dieser nützlichen Organogele auch auf andere Tensidsysteme ausdehnen kann, die sich im Phasenverhalten, Kopfgruppenladung der Tenside und Polarität des Lösungsmittel deutlich von denen in der Literatur beschriebenen Systeme unterscheiden. Dabei handelte es sich um AOT/Cyclohexan, CTAB/1-Hexanol/Cyclohexan und AOT/Caprylsäure w/o-Mikroemulsionen.

Detaillierte Untersuchungen am Phasenverhalten einer Gelatine enthaltenen AOT/Cyclohexan Mikroemulsion haben gezeigt, dass Gelatine die Funktion eines Kotensids übernimmt und die Mikroemulsionströpfchen stabilisiert. Dadurch entstehen Organogele mit hohen Gelatinekonzentrationen und

Stabilität, deren Grenzflächen aus einer Kombination von Tensid und Biopolymer zusammengesetzt sind.

Organogele auf der Basis von AOT/Cyclohexan und CTAB/1-Hexanol/Cyclohexan Mikroemulsion bildeten das strukturierte *in-situ* Reaktionssystem für die anorganische Polymerisation von Tetraethoxysilan (TEOS). Die während der Hydrolyse und Polykondensation gebildete freie oder teilweise kondensierte Kieselsäure wird durch die Gelatine stabilisiert, sodass erstmals transparente Nanokomposits hergestellt werden konnten.

Sowohl die Struktur der Materialien als auch der anorganische Vernetzungsgrad werden über die strukturellen bzw. dynamischen Eigenschaften des Mikroemulsions-Gelatinesystems gesteuert. Alle Parameter, welche die Struktur der Mikroemulsions-Gelatineaggregate und ihre Dynamik beeinflussen wie z.B. Temperatur, pH, Gelatinekonzentration führen zu unterschiedlichen anorganischen Vernetzungsgraden, Partikelgrößen (30-100 nm) oder Porenweiten. Die Basisgrößen der primären w/o-Mikroemulsion wie z.B. Aggregatsgrösse und Struktur bleiben jedoch im Nanokomposit erhalten.

Als Konsequenz der anorganischen Polymerisation konnten die Bedingungen für stabile Trägermaterialien wie beispielsweise thermische Stabilität oder Stabilität gegenüber Lösungsmitteln, Säuren und Wasser im Vergleich zu den Organogelen deutlich erhöht werden. Während die Organogele nur die biomimetischen und strukturellen Voraussetzungen für effiziente Immobilisierungsmatrizen erfüllen, besitzen die bio-anorganischen Nanokomposits auch die Bedingungen für stabile, hydrophobe Trägermaterialien.

Reaktive Übergangsmetallalkoxide wie beispielsweise Titaniumisopropoxid führten nicht zu einer Nanokompositbildung. In Gelatine-Organogelen auf der Basis von AOT/Caprylsäure Mikroemulsionen konnte die Hydrolysegeschwindigkeit der gebildeten Hydroxide jedoch herabgesetzt werden und es wurden transparente Titanium-Gelatine-Gele gebildet. Ursache für die Gelierung war die Komplexierung des Übergangsmetallalkoxids durch die Caprylsäure, was die Präzipitation der gebildeten Hydroxide und Gelatine verhinderte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass sich Nanokomposits auf der Basis von AOT/Cyclohexan (negative Oberflächenladung) und CTAB/1-Hexanol/ Cyclohexan (positive Oberflächenladung) als effiziente Immobilisierungsmatrizen für Proteine bzw. Enzyme eignen.

Zunächst wurde das Elektronentransportprotein Cytochrom c sowohl in AOT/Cyclohexan als auch CTAB/1-Hexanol/Cyclohexan Nanokomposits immobilisiert und seine Struktur spektroskopisch *in-situ* untersucht. Cytochrom c wechselwirkt stark mit der Grenzschicht mizellarer Systeme und seine Struktur ist von der Kopfgruppenladung der Tenside abhängig. In allen mizellaren Systemen auch in den Nanokomposits mit negativ geladenen Oberflächen (AOT) wurde die Proteinstruktur gestört; während in den Systemen Mikroemulsion, Organogel und Komposit auf der Basis des positiv geladenen Tensids CTAB die native Struktur erhalten blieb. Somit konnte gezeigt werden, dass anorganisch-biopolymere Nanokomposits eine ähnliche Oberflächenbeschaffenheit wie die primären w/o-Mikroemulsionen besitzen.

Grenzflächenaktive Enzyme wie beispielsweise Lipasen benötigen biomimetische Umgebungseigenschaften für effiziente Biokatalysen. In einem wasserarmen Milieu sind diese Enzyme in der Lage Estersynthesen zu katalysieren und eignen sich als Modellenzyme für katalytische Reaktionen in organischen Lösungsmitteln. Die Lipase Chromobakterium Viscosum (cv) wurde in AOT/Cyclohexan Nanokomposits immobilisiert. Anschliessend wurden die Trägermaterialien getrocknet und in Substrat enthaltenen Cyclohexan dispergiert.

Strukturuntersuchungen mittels Rasterelektronenmikroskopie und CP MAS ^{29}Si NMR zeigten, dass Lipase-Nanokomposits die strukturellen Bedingungen für effiziente Trägermaterialien wie z.B. hoher anorganischer Vernetzungsgrad, Partikelgrösse oder Porosität erfüllen. Aufgrund der biomimetischen Oberflächenbeschaffenheit der Nanokomposits (Tensid, Gelatine) wurden nicht nur sehr gute Umsätze erzielt, sondern das Enzym blieb auch über Monate hinweg stabil und katalytisch aktiv.

Abstract

This work describes the synthesis and characterisation of stable hydrophobic bio-inorganic nanocomposites with defined particle size, porosity and surface properties and their potential as adequate immobilisation matrices for interphase active enzymes.

Nanocomposites are defined as a combination of several components which could be organic, inorganic or both, where at least one solid phase is in the nanometer size range between 1-100 nm. The basic units of our nanocomposites were formed by w/o-microemulsions, which structure and dynamic properties were used for the nanocomposite formation. The aqueous microemulsion droplets contain not only the structure requirements for nanocomposites, they also possess biomimetic interphases, which are of great importance for the activity and stability of interphase active enzymes. These microemulsion droplets could be transformed into a defined gel network by the biopolymer gelatin. The so called microemulsion based organogels were subsequently used as a nanostructured reaction system for the hydrolysis and polycondensation of different metalalkoxides.

All organogels described in literature are based on the negatively charged surfactant AOT in apolar solvents like isooctane or heptane. In this work the preparation of these useful materials could be expanded to other surfactant micellar systems, which significantly differ from those described in literature e.g. phase behaviour, head group charge of the surfactants and/or polarity of the solvent. The utilized micellar systems were AOT/cyclohexane, CTAB/1-hexanol/cyclohexane and AOT/caprylic acid w/o-microemulsions.

Detailed investigations of the phase behaviour of a gelatin containing AOT/ cyclohexane microemulsion have shown that hydrophobic parts of the biopolymer penetrate into the micellar interface and stabilize as a co-surfactant the microemulsion droplets. As a consequence gelatin-organogels with much higher biopolymer contents and stability could be prepared.

Organogels based on AOT/cyclohexane and CTAB/1-hexanol/cyclohexane were used as nanostructured reaction systems for the inorganic polymerisation of tetraethoxysilane (TEOS). The free or partly hydrolysed silic acid, which is formed during the hydrolysis and

VIII

polycondensation process, is stabilized by gelatin. The stabilisation of the hydrolysed inorganic precursor lead to highly transparent nanocomposites.

Both the morphology of the materials as well as the inorganic crosslinking is controlled by the structural and dynamic properties of the microemulsion-gelatin system. All parameters which influence the structure and dynamic of the aggregates e.g. temperature, pH, gelatin content, lead to different degrees of inorganic crosslinking, particle and pore size. However, the characteristic properties of the primary microemulsion like aggregate size and structure could be retained in the final nanocomposites.

As a consequence of the inorganic polymerisation a variety of important conditions for enzyme containing carrier materials e.g. thermal stability or stability against solvents, acids and water could be significantly increased compared to the the microemulsions organogels. Whereas the organogels possess the biomimetic and structure requirements for efficient immobilisation matrices, bio-inorganic nanocomposites contain also the conditions for stable hydrophobic carrier materials.

Highly reactive transition metalalkoxides like titanium isopropoxide do not form bio-inorganic nanocomposites. However, hydrolysis and polycondensation of the transition metal alkoxides in AOT/caprylic acid organogels lead to highly transparent materials. In this modified sol-gel process the transition metal was stabilized by caprylic acid, which prevent the precipitation of the preformed inorganic components and gelatin.

In the second part of this work nanocomposites based on AOT/cyclohexane (negatively charged micellar surface) and CTAB/1 hexanol/cyclohexane (positively charged micellar surface) were tested as efficient immobilisation matrices for proteins and enzymes. As a start the electron transfer protein cytochrome c was immobilized in transparent AOT/cyclohexane and CTAB/1-hexanol/cyclcohexane nanocomposites. The structure properties of the protein were investigated *in-situ* by spectroscopic methods.

Cytochrome c is known to interact strongly with micellar interfaces and its structure depend on the head group charge of the surfactants. In all micellar systems, including nanocomposites, stabilized by the negatively charged surfactant AOT, the native protein structure was disturbed. However, in microemulsion, organogel and nanocomposites based on the

positively charged surfactant CTAB the native protein structure could be retained. From these results could be concluded, that the surface properties of the bio-inorganic nanocomposites have to be similar compared to the primary w/o-microemulsion.

Interface active enzymes like lipases need a biomimetic environment for efficient biocatalysis. In water poor media these enzymes are able to catalyse ester synthesis in apolar solvents. In this work cv lipase was immobilized in AOT/cyclohexane nanocomposites. The enzyme containing carrier materials were air dried and dispersed in a substrate containing solvent.

Structure investigations by REM and CP MAS ^{29}Si NMR have shown that lipase containing nanocomposites possess the structural requirements for efficient carrier materials e.g. high crosslinking, small particle size, porosity. As a consequence of the biomimetic surface properties (surfactant/gelatin interface) high yields and stability of the enzymes could be observed.