

Funktionalisierte Kern-Schale-Partikel als Träger zur Enzymimmobilisierung und deren Anwendung

Anke Matura^{1,*}, Dorina Köpke¹, Claudia Marschelke^{2,3}, Julius Kramer¹, Alla Synytska^{2,3} und Marco Sallat⁴

DOI: 10.1002/cite.201900151

 This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mono- und bifunktionale hybride Kern-Schale-Partikel wurden für die Enzymimmobilisierung eingesetzt. An monofunktionalen Poly(2-dimethylamino)ethylmethacrylat-modifizierten Partikeln wurden die idealen Bedingungen für die Immobilisierung untersucht. Anschließend erfolgte die Übertragung auf bifunktionale Janus-Partikel-Systeme, mit denen gleichzeitig die schaltbare Abtrennung und der erneute Einsatz der Enzyme möglich waren. Abschließend wurde der mehrfache Einsatz der enzymbeladenen Partikel modellhaft am Beispiel der Prozesswasserentfärbung aus der Textilindustrie mit Laccase gezeigt und eine Kostenrechnung durchgeführt.

Schlüsselwörter: Enzymimmobilisierung, Kern-Schale-Partikel, Laccase, Prozesswasser, Textilindustrie

Eingegangen: 18. September 2019; *revidiert:* 12. Dezember 2019; *akzeptiert:* 18. Dezember 2019

Functional Core-Shell Particles for Enzyme Immobilization and Their Application

Mono- and bifunctional hybrid core-shell particles were used for enzyme immobilization. Ideal conditions for enzyme immobilization were evaluated based on monofunctional poly(2-dimethylamino)ethyl methacrylate-modified particles. Then, the obtained results were transferred to a bifunctional Janus particle system, which should simultaneously enable enzyme immobilization, switchable separation, and reuse of the enzyme. Finally, application of the system was exemplarily demonstrated by multiple discoloration of textile industry process water with laccase and a cost estimation is presented.

Keywords: Core-shell particles, Enzyme immobilization, Laccase, Textile industry, Wastewater

1 Einleitung

Der Einsatz von Enzymen kann wesentliche Vorteile zur Verbesserung von Umweltbilanzen bei industriellen Anwendungen bieten. Aus Kostengründen sollte dabei ein mehrfacher Einsatz von Enzymen realisiert werden, der u. a. durch Immobilisierung an festen Trägern, z. B. Polymerbasierten Materialien, möglich wird [1–4]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte eine hohe Beladung und Aktivität von Enzymen auf monofunktionalen Partikeln durch Bindung an flexible, pH-responsive Polymerbürsten erreicht werden. Für die Immobilisierung ist dabei die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen, die als schonendste Methode gilt, entscheidend, und über die Pflöpfungsdichte und Schichtdicke der Bürsten können die Eigenschaften des Polymers gezielt variiert werden. Janus-Partikel stellen hier eine neue Klasse von Trägern dar. Sie weisen eine einzigartige Architektur mit zwei verschiedenen funktionalisierten Hemisphären auf, die es ermöglichen, unterschiedliche

Funktionen und Eigenschaften, z. B. Oberflächenladungen und -polaritäten, zu vereinen. Dieses System wurde hier eingesetzt, um auf der einen Partikelseite eine optimale Enzymimmobilisierung zu erreichen und mit der anderen Partikelseite die Abtrennung, z. B. durch Aggregation und

¹Dr. Anke Matura, Dorina Köpke, Julius Kramer
anke.matura@tu-dresden.de

Technische Universität Dresden, Professur Technische Biochemie, Bergstraße 66, 01069 Dresden, Deutschland.

²Claudia Marschelke, Dr. habil. Alla Synytska
Leibniz-Institut für Polymerforschung Dresden e.V., Hohe Straße 6, Dresden, Deutschland.

³Claudia Marschelke, Dr. habil. Alla Synytska
Technische Universität Dresden, Professur für Physikalische Chemie polymerer Materialien, Hohe Straße 6, 01069 Dresden, Deutschland.

⁴Marco Sallat
Sächsisches Textilforschungsinstitut e.V., Annaberger Straße 240, 09125 Chemnitz, Deutschland.

Ausflockung, sowie den erneuten Einsatz der enzymbeladenen Partikel zu realisieren [5,6]. Die Textilveredlungsindustrie gehört zu den 15 abwasserintensivsten Industriezweigen in Deutschland und besitzt eine hohe Umweltrelevanz, daher wurde beispielhaft der Einsatz der enzymbeladenen Partikel für die Entfärbung textiler Abwässer mit Laccase gezeigt [7]. Durch Übertragung der Ergebnisse auf andere Enzyme, wie z. B. Peroxidasen, Cellulasen und Halogenasen, ist der Einsatz der beladenen Partikel auch in anderen Industriezweigen möglich.

2 Material und Methoden

Es wurden die folgenden Chemikalien und Materialien genutzt: Tetraethylorthosilikat (TEOS; Fluka, 99 %), Ammoniak (Acros, 28–30 % wässrige NH_3 -Lösung), Wasserstoffperoxid (H_2O_2 ; VWR, 30 %), Ethanol abs. (EtOH; VWR, 99.9 %), 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS, ABCR, 97 %), α -Bromoisobuttersäurebromid (Aldrich, 98 %), Propansäurebromid (Aldrich, 97 %), Dichlormethan (DCM; Fluka), Triethylamin (Fluka), Kupfer(II)-bromid (CuBr_2 ; Aldrich, 99.999 %), Zinn(II)-2-ethylhexanoat (Aldrich, 95 %), Tris(2-pyridylmethyl)amin (TPMA; Aldrich, 98 %), N,N,N',N'',N''' -Pentamethyldiethylentriamin (PMDTA; Aldrich, 99 %), Ethyl- α -bromoisobutyrate (EBiB; Aldrich, 98 %), Methansulfonsäure (Sigma-Aldrich, 99.5 %), Carboxyl-terminiertes Poly(*tert*-butylacrylat) (PtBA; $M_n = 42\,000\text{ g mol}^{-1}$, 90 %, Polymer Source), Carboxyl-terminiertes Poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAM; $M_n = 62\,000\text{ g mol}^{-1}$, Polymer Source), 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS; AppliChem), Violsäure-Monohydrat (Sigma-Aldrich), Laccase aus *Trametes versicolor* (EC 1.10.3.2., Sigma-Aldrich), Remazol Brilliantrot BB; Remazol Bordo B; Remazol Brilliantorange FR und Remazol Schwarz A (DyStar), Cibacron Blau P-3R (Ciba). 2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat (DMAEMA; Aldrich, 98 %) und *tert*-Butylacrylat (tBA; Aldrich, 98 %) wurden vor Gebrauch durch basisches, neutrales und saures Aluminiumoxid gefiltert.

2.1 Bestimmung der Laccaseaktivität in freier und immobilisierter Form

Die Laccaseaktivität wurde in 10 mM Na-Acetatpuffer pH 4,0 mit 1 mM ABTS bei 420 nm erfasst ($\epsilon_{420\text{nm}} = 36\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Aktivität der immobilisierten Laccase wurde nach 1 min bestimmt. Zu 10 μL beladenen Partikeln wurden 990 μL 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 und 1 mL 2 mM ABTS-Lösung gegeben. Nach 45 s wurden die Partikel für 10 s bei 15 700 g zentrifugiert, nach exakt 1 min der Überstand abgenommen und bei 420 nm vermessen. 500 μL ABTS mit 500 μL Puffer wurden als Blind- und Startwert vermessen.

2.2 Laccaseproduktion und -reinigung

T. versicolor wurde zunächst in drei Minimalmedien (A: Kirk-II-Medium (5 g Glukose, 2 g K_2HPO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g CaCl_2 , 2,7 g Natriumacetat, 0,5 g Diammoniumtartrat, 0,025 g MnCl_2 , 0,3 g Hefeextrakt, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 6,0); B: Malzmedium (18 g Malzextrakt, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 6,0); C: Malzextrakt Pepton Agar (MEPA)-Medium (18 g Malzextrakt, 3 g Soytone, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 5,6)) und drei Komplettdien (D: Peptonmedium (11 g Glucose, 5 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 2 g Ammoniumtartrat, 1 g KH_2PO_4 , 0,25 g MgSO_4 , 0,5 g KCl, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 6,0); E: Kartoffelmedium (20 g Kartoffelextrakt, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 6,0); F: Kjalkemedium (20 g Glukose, 2 g KH_2PO_4 , 0,024 g MgSO_4 , 0,38 g CaCl_2 , 10 g Hefeextrakt, 1 mL Spurenelementlösung auf 1 L, pH 6,0)) in 500 mL Medium im 2-L-Erlenmeyerkolben bei 23 °C und 150 rpm kultiviert. Zu allen Kolben erfolgte an Tag 1 der Kultivierung die Zugabe von 400 mg Cellulose, an Tag 4 von 2,5-Xylidin (0,2 mM) und an Tag 5 von CuSO_4 (1 mM). Die Laccaseproduktion wurde in Peptonmedium (D) mit weiteren Zusätzen unter den gleichen Kultivierungsbedingungen optimiert. Dabei erfolgte die Zugabe von Tween 80 (0,5 Vol.-%) an Tag 1 und Remazol Red 3B (150 mg L^{-1}) an Tag 4, zusätzlich wurden Anwuchshilfen aus Kunststoff und Baumwolle und eine Spirale im Kolben angebracht. Jeder Kultivierungsversuch erfolgte mindestens in Doppelbestimmung. Nach 11–15 Tagen wurde geerntet, 30 min bei 12 400 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei –20 °C gelagert. Nach Auftauen der Probe wurde erneut bei 2450 g für 30 min zentrifugiert. Auf eine Q-Sepharose-FF-Säule wurde mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 die Enzymprobe aufgetragen und durch einen linearen Gradienten von 10 mM Kaliumphosphatpuffer + 1 M NaCl, pH 7,0, eluiert. Die aktiven Fraktionen wurden über Nacht dialysiert (Ausschlussgrenze (molecular weight cut-off, MWCO) 12 000–14 000 Da), konzentriert (Amicon, 3 kDa) und bei –20 °C gelagert.

2.3 Synthese von hybriden, monofunktionalen, isotropen und bifunktionalen Janus-Partikeln

Die hybriden, isotropen, monofunktionalen und die bifunktionalen Janus-Partikel besitzen sphärische Silica-basierte Kern-Partikel mit einem kontrollierbaren Durchmesser von 100–800 nm, die in einem mehrstufigen Hydrolyse-Kondensations-Prozess (Stöber-Verfahren) hergestellt wurden [8]. Danach erfolgte die Präfunktionalisierung mit APS in 100 mL einer 5 Vol.-%igen Lösung in Ethanol. Die Reaktionslösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt, die Partikel durch Zentrifugation separiert, wiederholt mit Ethanol gereinigt und bei 60 °C im Vakuum getrocknet. Die mit APS modifizierten Partikel wurden dann mit dem

Brom-haltigen Initiator α -Bromoisobuttersäurebromid (BrIn) für die ATRP (atom transfer radical polymerization) modifiziert. Dazu wurden die Partikel in 50 mL DCM dispergiert, 1 mL BrIn sowie 2 mL Triethylamin hinzugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur gezielten Absenkung der Initiatordichte auf der Partikeloberfläche wurde der Initiator BrIn anteilig durch Propionylbromid ersetzt. Die Partikel wurden mittels Zentrifugation aus der Reaktionslösung separiert, mehrfach in DCM und Ethanol gewaschen und schließlich bei 60 °C im Vakuum getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Polymerisation der Polymerbürsten mittels SI-ARGET-ATRP [9]. Dazu wurden die mit BrIn funktionalisierten Partikel mit Monomer, Lösemittel, CuBr₂ und Ligand (TPMA für DMAEMA, PMDTA für tBA) versetzt. Unter Argonatmosphäre wurde das Reduktionsmittel Zinn(II)-2-ethylhexanoat hinzugegeben und die Polymerisation bei 700 rpm und 70 °C (für DMAEMA) bzw. 115 °C (für tBA) durchgeführt. Die Partikel wurden anschließend mittels Zentrifugation separiert, mehrfach gewaschen und bei 25 °C im Vakuum getrocknet. Die mit PtBA modifizierten Partikel wurden danach mit Methansulfonsäure behandelt, um PtBA zu Polyacrylsäure (PAA) zu hydrolysieren.

Die Janus-Partikel wurden ausgehend von APS-funktionalisierten Silica-Partikeln in einem kombinierten Grafting-from/Grafting-to-Verfahren hergestellt. Eine genaue Beschreibung der Synthese findet sich in der Literatur [10–12]. Der Erfolg aller Partikelsynthesen wurde jeweils mittels elektrokinetischer Zetapotenzialmessungen, Thermogravimetrie, Raster- und Transmissionselektronen-Mikroskopie überprüft.

2.4 Immobilisierung an hybride Kern-Schale-Partikel und Charakterisierung des Enzyms

Die Immobilisierung erfolgte an isotropen, hybriden Kern-Schale-Partikeln mit PAA- und Poly(2-dimethylamino)ethylmethacrylat (PDMAEMA)-Schale und an Janus-Partikeln mit PDMAEMA/PAA- und PDMAEMA/PNIPAM-Schale immer in Doppelbestimmung. 10 mg der Partikel wurden dreimal in 1 mL 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 gewaschen, anschließend in 0,5 mL des Puffers dispergiert, mit 1 mL einer Laccase-Lösung (ca. 50 U mL⁻¹, 10 mM Acetatpuffer pH 4,0) versetzt und im Anschluss für 30 min unter Rühren bei Raumtemperatur immobilisiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, die beladenen Polymerpartikel zehnmal mit je 1 mL Puffer gewaschen, die Aktivität der immobilisierten Laccase mindestens dreimal bestimmt und diese bei Bedarf bei -25 °C gelagert. Es wurden Partikel unterschiedlicher Größe (100–800 nm) eingesetzt und die Enzymmenge von 10–80 U mL⁻¹ variiert.

Sämtliche Untersuchungen zu den Eigenschaften des immobilisierten Enzyms wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und mit der gleichen Charge des freien Enzyms als Referenz verglichen. Bestimmt wurde die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität mit ABTS, die Tempera-

turstabilität bis 80 °C und die Langzeitstabilität über mehrere Wochen. Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität der freien Laccase (144 U mL⁻¹, bei Raumtemperatur) und der immobilisierten Laccase (43 U mL⁻¹, bei Raumtemperatur) wurden bei 10–80 °C in einem temperierbaren UV/Vis-Spektrometer mit 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 und ABTS bestimmt.

2.5 Farbstoffbleiche und mehrfacher Enzymeinsatz im Labormaßstab

Die Bleiche mit freier Laccase erfolgte mit 900 µL Farbstofflösung (0,1 mg mL⁻¹) und 100 µL Enzym (ca. 100 U mL⁻¹), detektiert wurden die Spektren von 400–700 nm. Es wurden Remazol Schwarz A, Remazol Brilliantrot BB (Reactive Red 21), Remazol Bordo B, Remazol Brilliantorange FR und Cibacron Blau P3-R als Substrate eingesetzt. Bei Bedarf wurde zusätzlich 0,05 mM Violursäure als Mediator genutzt. Für die Bleiche mit immobilisierter Laccase wurde der Farbstoff Remazol Brilliantrot BB ausgewählt. Dabei wurden 20 mg Laccase an 200-nm-PDMAEMA 50 % (ca. 118 U mL⁻¹) in ein 2-mL-Reaktionsgefäß gegeben und 1 mL Farbstofflösung (0,1 mg mL⁻¹ Remazol Brilliantrot BB; 0,05 mM Violursäure) addiert. Nach 10 min wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dessen Absorptionsspektrum bei 400–700 nm aufgenommen. Zu den Partikeln wurde erneut 1 mL Farbstofflösung zugegeben. Als Blindprobe wurden 20 mg PDMAEMA-Partikel mit immobilisierter, inaktivierter (15 min Hitzebehandlung bei 90 °C) Laccase eingesetzt und wie die Partikelprobe mit aktivem Enzym behandelt.

2.6 Abtrennung enzymbeladener Partikel

20 mg mL⁻¹ PDMAEMA-Partikel mit ca. 75 U mL⁻¹ immobilisierter Laccase und 20 mg mL⁻¹ PDMAEMA/PNIPAM-Partikel mit ca. 80 U mL⁻¹ immobilisierter Laccase wurden bei 15 700g für 7 min zentrifugiert, mit 10 mM Britton-Robinson Puffer pH 8,0 versetzt und die Ausflockung der Partikel bei Raumtemperatur und bei 40 °C beobachtet. Anschließend wurden die Partikel zentrifugiert, der wässrige Überstand abgenommen, die Partikel dreimal in 10 mM Acetatpuffer pH 4,0 gewaschen und resuspendiert. Im Überstand sowie auf den Partikeln wurde die Enzymaktivität bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Laccaseproduktion und -reinigung

Zunächst wurde die Pilzkultivierung optimiert. Von den drei untersuchten Minimal- und Komplettdmedien wurden die höchsten Aktivitäten (16 000 U L⁻¹) nach 11 Tagen in

den Komplettnährmedien, ergänzt durch die Additive Cellulose, 2,5-Xylidine und CuSO_4 , erzielt. Die Steigerung der Laccaseproduktion durch weitere Medienzusätze wurde nur in Peptonmedium getestet. Durch die weitere Zugabe von Tween 80 und Remazol Red 3B konnte die Laccaseproduktion auf $50\,000\text{ U L}^{-1}$ nach 14 Tagen gesteigert werden. Eingebraachte Anwachshilfen aus Kunststoff und Baumwolle brachten keinen zusätzlichen weiteren aktivitätssteigernden Effekt (Abb. 1). Es erfolgte ein Scale-up auf den 15-L-Fermenter, bei dem vergleichbare Laccaseaktivitäten von $45\,000\text{ U L}^{-1}$ nach 11 Tagen erreicht wurden.

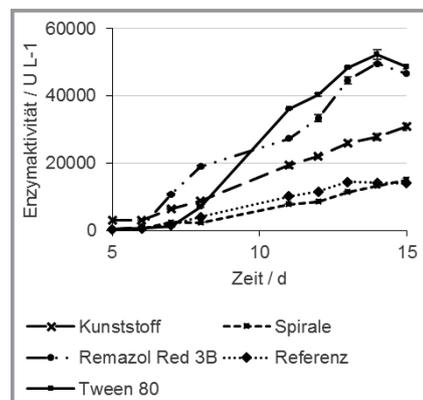


Abbildung 1. Kultivierung von *T. versicolor* im Schüttelkolben in Peptonmedium mit verschiedenen Induktoren, Wachstumshilfen und grenzflächenaktiven Substanzen; Ergebnisse aus Doppelbestimmung; Referenz: mit 2,5-Xylidin, CuSO_4 und Cellulose.

Die Aufarbeitung erfolgte durch Zentrifugation, Einfrieren und erneute Zentrifugation und Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose-FF mit anschließender Dialyse und Ultrafiltration. Dabei wurden nach Reinigung 67 % der ursprünglichen Aktivität erhalten und ein Reinigungsfaktor von 9,7 erreicht. Die zugehörige Reinigungstabelle zeigt Tab. 1.

3.2 Synthese von monofunktionalen isotropen Kern-Schale-Partikeln

Zunächst wurden hybride, monofunktionale Kern-Schale-Partikel mit definierter chemischer Funktionalität, Kerndurchmesser und polymerer Pfropfdichte hergestellt und als vereinfachte Modellsysteme eingesetzt. Der Erfolg der Partikelsynthese wurde mittels Elektronenmikroskopie überprüft. Abb. 2a zeigt beispielhaft eine Rasterelektronenmikroskop (REM)-Aufnahme von monodispersen, isotropen PDMAEMA-funktionalisierten Partikeln mit einem Kerndurchmesser von 200 nm. Der Kern-Schale-Charakter der Partikel hingegen konnte mithilfe von Kryo-TEM-Aufnahmen (TEM = Transmissionselektronenmikroskop) nachgewiesen werden (Abb. 2b).

3.3 Synthese von bifunktionalen Janus-Partikeln

Die Synthese der hybriden, bifunktionalen Janus-Partikel erfolgte ausgehend von sphärischen Silica-Partikeln aus dem Stöber-Verfahren, die mit 3-Aminopropyltriethoxysilan präfunktionalisiert wurden. Danach wurden die Partikel zunächst in einem Pickering-Emulsions-Verfahren nach Synytska et al. an der Wachsfläche immobilisiert und partiell maskiert [10–12]. Die freiliegenden Hemisphären der Partikel konnten so selektiv mit einem ATRP-Initiator modifiziert werden und nach Ablösung des Wachses erfolgte das Grafting-from von PDMAEMA mittels ARGET (activators regenerated by electron transfer)-ATRP und das thermische Grafting-to von carboxyterminiertem PAA oder PNIPAM auf der aminofunktionalisierten Seite. Anhand von transmissionselektronischen Aufnahmen (Abb. 2c) wurde der Janus-Charakter der Partikel visualisiert und überprüft. Die linke Seite des Partikels zeigt die PDMAEMA-Bürsten mit vergleichsweise hoher Pfropfdichte (ca. $0,2$ Ketten pro nm^2), auf der rechten Seite befinden sich die PNIPAM-Ketten, die mittels Grafting-to in sichtbar geringerer Dichte angebunden wurden.

3.4 Immobilisierung an monofunktionale und bifunktionale Partikel

Partikel mit sauren (PAA) und basischen funktionellen Gruppen (PDMAEMA) an der Kette wurden für die Immobilisierung eingesetzt. Nur an die polykationischen, basischen, PDMAEMA-modifizierten Partikel konnte Laccase aktiv immobilisiert werden (Abb. 3). Bei Immobilisierung an PAA befand sich der größte Anteil der eingesetzten Aktivität im Überstand (60 %) und nicht auf den Partikeln. Die

Tabelle 1. Reinigungstabelle.

	Aktivität [U]	Protein [mg]	Spez. Aktivität [U mg ⁻¹]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor [-]
Rohextrakt	8900	245	36	100	1
IAC	6500	25	260	73	7,2
Ultrafiltration	5950	17	350	67	9,7

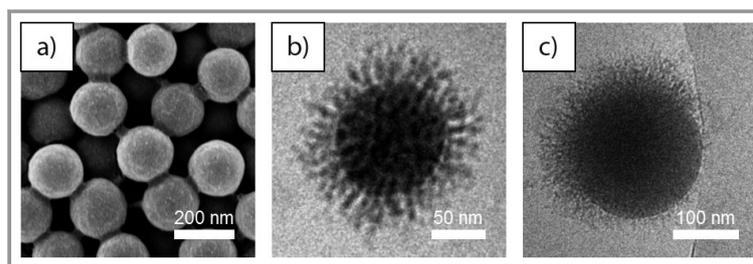


Abbildung 2. Repräsentative a) REM- und b) kryo-TEM-Aufnahme von isotropen, PDMAEMA-funktionalisierten Kern-Schale-Partikeln. c) Kryo-TEM-Aufnahme eines PDMAEMA/PNIPAM-Janus-Partikels.

weitere Optimierung wurde daher an PDMAEMA-Partikeln vorgenommen und umfasste die Bestimmung des idealen pH-Wertes (4,0), der erforderlichen Immobilisierungszeit (30 min) und des Mischungsregimes (rühren), ebenso wurden Partikel unterschiedlicher Größe und verschiedene Mengen Enzym für die Immobilisierung eingesetzt. Unter den optimierten Bedingungen war es bei Einsatz von 20 U mL^{-1} möglich, an Partikel mit einem Kerndurchmesser von 200 nm 100 % der eingesetzten Aktivität zu binden [13] (Abb. 3).

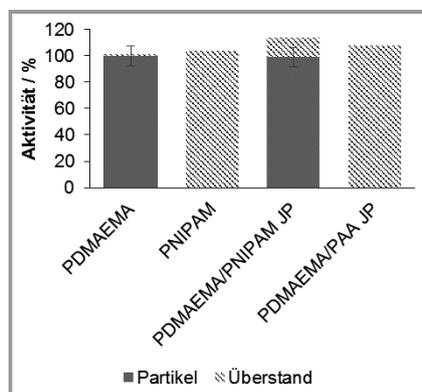


Abbildung 3. Vergleich des Immobilisierungserfolges von Laccase unter Verwendung von monofunktionalen Partikeln und bifunktionalen Janus-Partikeln. Alle Ergebnisse mindestens aus Doppelbestimmung.

Nachfolgend wurde die Immobilisierung an das Janus-System PDMAEMA/PAA mit einem Kerndurchmesser von 200 nm untersucht. Hier sollte die PDMAEMA-Seite für die Enzymbindung und die PAA-Seite zur Ausflockung und Abtrennung der beladenen Partikel durch Veränderung des pH-Wertes genutzt werden. Allerdings zeigte sich, dass bereits der erste Schritt, die Immobilisierung an PDMAEMA, nicht erfolgreich war: Es konnte nahezu kein Enzym an diese Partikel gebunden werden (Abb. 3). Daher wurde alternativ das Janus-System PDMAEMA/PNIPAM genutzt. PNIPAM ist ungeladen und kann kein Enzym binden. Gleichzeitig ist es temperatursensitiv und weist bei Temperaturen unterhalb 32°C einen hydrophilen Charakter auf. Dies erhöhte insgesamt die Dispergierbarkeit der Partikel und führte dazu, dass Laccase ($\text{max. } 50 \text{ U mL}^{-1}$) mit gleich guten Ergebnissen an die Januspartikel, wie an die monofunktionalen PDMAEMA-Partikel gebunden werden konnten (Abb. 3).

3.5 Charakterisierung der immobilisierten Laccase

Ein Vergleich der pH-Abhängigkeit der Aktivität, der Temperatur- und Langzeitstabilität des immobilisierten Enzyms mit denen des freien Enzyms ergab keine Veränderungen der Eigenschaften. Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Aktivität zeigte bei tieferen Temperaturen für beide Enzyme die gleichen Eigenschaften, bei Tempera-

turen über 40°C jedoch eine höhere Aktivität des immobilisierten Enzyms. Bei 80°C resultierte durch die Immobilisierung eine 30 % höhere Aktivität im Vergleich zur freien Laccase (Abb. 4).

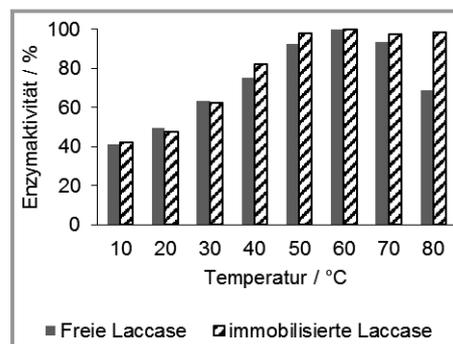


Abbildung 4. Vergleich der Enzymaktivität von freier und immobilisierter Laccase bei verschiedenen Temperaturen.

3.6 Einsatz der immobilisierten Laccase zur Entfärbung von Textilfarbstoffen und mehrfacher Einsatz des Systems

Zunächst wurde freie Laccase eingesetzt, um fünf Farbstoffe unterschiedlicher chemischer Struktur und Farbigkeit zu entfärben. Dies gelang für einige (v. a. blaue) Farbstoffe direkt, für andere, wie einige rote und schwarze Farbstoffe durch Zusatz von $0,05 \text{ mM}$ Violursäure als Mediator (Abb. 5).

Mit der auf PDMAEMA-Partikeln immobilisierten Laccase wurde der Farbstoff Remazol Brilliantrot BB mehrfach entfärbt. Dabei wurde eine Referenzprobe mitgeführt (immobilisierte, inaktive Laccase auf PDMAEMA-Partikeln), um die positive Ergebnisverfälschung durch Farbstoffadsorption an die Partikel während der ersten Reaktionszyklen (hier: 28) zu berücksichtigen. Mit der aktiven Laccase konnten weitere 33 Reaktionszyklen mit erfolgreicher Entfärbung erreicht werden, also insgesamt 61 Zyklen (Abb. 6). Neben dem Verlust an Enzymaktivität führte auch die Erhöhung der Hydrophobizität des Systems durch Farbstoffadsorption an die Partikel (geringere Dispergierbarkeit) zu schlechteren Entfärbeergebnissen.

3.7 Abtrennung enzymbeladener Partikel

Die Abtrennung der monofunktionalisierten PDMAEMA-Partikel basierte auf einer Flokkulation der Partikel durch Erhöhung des pH-Wertes auf 8,0 bei 40°C und erforderte mindestens 1 h. Bei den beladenen PDMAEMA/PNIPAM-Janus-Partikeln war bei gleichem pH-Wert und 40°C bereits nach 15 min die Ausflockung zu beobachten (Abb. 7). PNIPAM ist temperatursensitiv und oberhalb 32°C hydrophob und beschleunigt damit die Partikelabtrennung erheblich. Entgegen den Erwartungen wurde durch die Erhöhung des pH-Wertes bei allen Proben nur eine sehr geringe Enzymablösung von 2–5 % beobachtet.

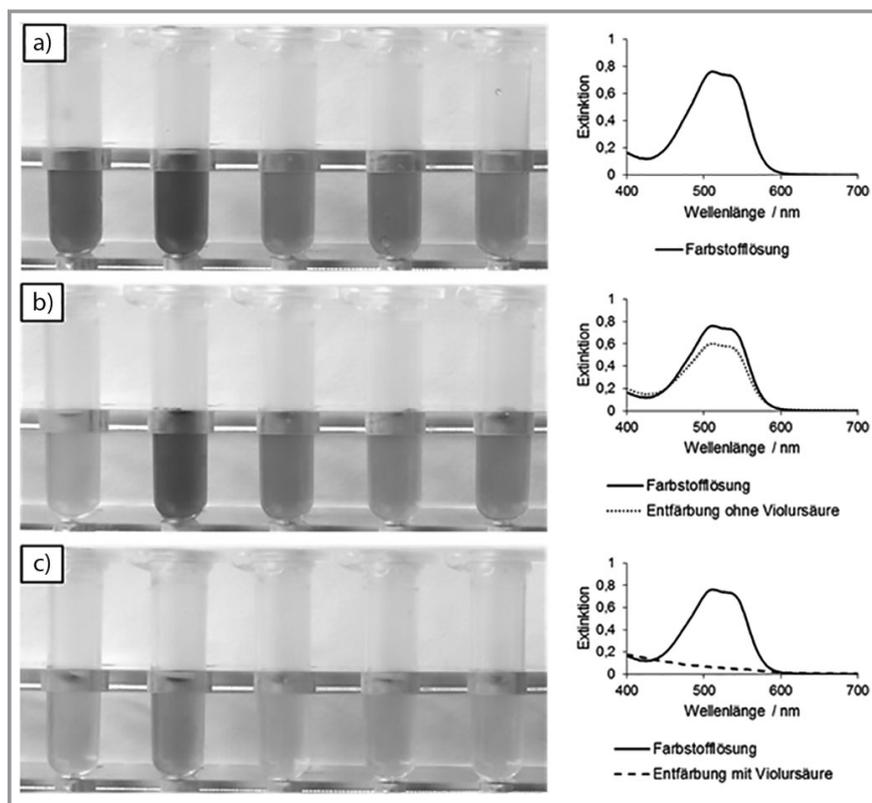


Abbildung 5. Entfärbung von Cibacron Blau P-3R, Remazol Schwarz A, Remazol Brilliantrot BB, Remazol Bordo B, Remazol Brilliantorange FR (von links nach rechts). a) Ohne Enzym, b) mit freier Laccase (10 U mL^{-1}) ohne Violursäure und c) mit freier Laccase (10 U mL^{-1}) und $0,05 \text{ mM}$ Violursäure. Die Vis-Spektren rechts zeigen die Entfärbung von Remazol Brilliantrot BB.

3.8 Kostenschätzung

Die Immobilisierung von Enzymen führt zu zusätzlichen Kosten, die für das hier eingesetzte System abgeschätzt wurden (Tab. 2). Dabei wurde die Synthese von 4 g Janus-Partikeln, beladen mit $20\,000 \text{ U}$ Enzym zugrunde gelegt. Wann sich ein rechnerischer Vorteil der Immobilisierung (und damit der Wiederverwendung) des Enzyms ergibt, ist hauptsächlich vom Enzympreis abhängig. Bei dem hier (während der Arbeiten gezahlten) und in Tab. 2 zugrunde gelegten Preis hat sich schon nach zwei Zyklen die Immobilisierung amortisiert und es ergibt sich für alle folgenden Nutzungszyklen ein Wettbewerbsvorteil. Bei einem Enzympreis von 5 € pro 1000 U sind 10 Zyklen bis zum Ausgleich der Immobilisierungskosten erforderlich, bei einem Preis von 2 € pro 1000 U sind es 22 Zyklen. Bei den hier gezeigten 61 Zyklen für die Entfärbung (Abb. 6) verbleiben somit auch bei Enzymkosten von 2 € pro 1000 U 39 Anwendungszyklen mit Preisvorteil.

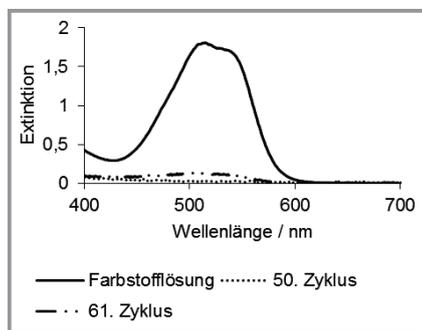


Abbildung 6. Entfärbung von Remazol Brilliantrot BB mit immobilisierter Laccase: Spektren von $400\text{--}700 \text{ nm}$ nach Abtrennung der Partikel.



Abbildung 7. Ausflockung der monofunktionalisierten PDMAEMA-Partikel (MP) und PDMAEMA/PNIPAM-Janus-Partikel (JP) bei $\text{pH } 8$ und 40°C nach 15 min .

Tabelle 2. Kostenschätzung Enzymimmobilisierung für 4 g Januspartikel (JP).

Material/Arbeitsschritt	Bedarf	Grundpreis	Spezifische Kosten
Laccase Enzym	5000 U/g JP	$57 \text{ €}/1000 \text{ U}$	$1140 \text{ €}/20\,000 \text{ U}$
Janus-Partikel (Material)	$0,2 \text{ g}/1000 \text{ U}$	37 € g^{-1}	$148 \text{ €}/4 \text{ g}$
Enzymimmobilisierung (Material)		$0,001 \text{ €}/1000 \text{ U}$	$0,02 \text{ €}/20\,000 \text{ U}$
Personalkosten JP-Synthese	$32 \text{ h}/\text{Ansatz}$	20 € h^{-1}	$640 \text{ €}/4 \text{ g}$
Personalkosten Enzymimmobilisierung	$2,25 \text{ h}/\text{Ansatz}$	20 € h^{-1}	$45 \text{ €}/20\,000 \text{ U}$
Gesamt			$1973 \text{ €}/20\,000 \text{ U}$

4 Zusammenfassung

Ziel der Arbeiten war die Entwicklung eines Systems von funktionalisierten Partikeln mit guter Eignung für die Immobilisierung von Enzymen, das gleichzeitig auch die Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch und damit den mehrfachen Enzymeinsatz ermöglicht. Die Produktion und Reinigung des Modellenzym Laccase aus *T. versicolor* gelang auch nach Scale-up auf den 15-L-Fermenter mit einer Menge von 45 000 U L⁻¹ (Abb. 1). Träger waren sphärische, hybride Kern-Schale-Partikel, die Polymerbürsten mit geladenen funktionellen Gruppen trugen. Die Synthese der nativen Silica-Partikel erfolgte dabei zunächst in einem mehrstufigen Stöber-Prozess. Die sich anschließende Modifizierung der Partikel mit Polymerbürsten unterschiedlicher chemischer Funktionalität, Pfropfdichte und Kettenlänge wurde mittels Grafting-from- und Grafting-to-Techniken erreicht (Abb. 2). Nachdem an isotrope Partikel mit negativer Ladung (PAA) die Enzymimmobilisierung nicht gelang, wurde diese an positiv geladene Polymerbürsten (PDMAEMA) erfolgreich gezeigt. Im optimierten Ansatz war hier eine 100%ige Immobilisierung der eingesetzten Laccaseaktivität möglich. Nachfolgend wurden bifunktionale Janus-Partikel eingesetzt und die Immobilisierung der Laccase mit ebenso hoher Effektivität an die temperatur-sensitiven PDMAEMA/PNIPAM-Janus-Partikel erreicht (Abb. 3). Die biochemischen Eigenschaften des immobilisierten Enzyms wurden im Vergleich zum freien Enzym nahezu nicht verändert, so dass die Immobilisierung zu keiner Inhibierung oder Denaturierung des Enzyms führte (Abb. 4).

Für den mehrfachen Einsatz des immobilisierten Enzyms wurde eine Anwendung aus der Textilindustrie gewählt. Nach der Farbstoffbleiche mit freiem Enzym wurde die mehrfache Entfärbung mit immobilisierter Laccase getestet. Unter Berücksichtigung der unspezifischen Farbstoffadsorption an die Partikel in einer Referenz konnten 33 Reaktionszyklen ausschließlich enzymatische Entfärbung gezeigt werden, insgesamt jedoch 61 Zyklen, da neben der Farbstoffadsorption an enzymbeladenen Partikeln gleichzeitig auch eine enzymatische Bleiche stattfand (Abbn. 5, 6). Die Abtrennung der enzymbeladenen Partikel aus dem Reaktionsgemisch gelang durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 8,0 bei gleichzeitiger Temperaturerhöhung auf 40 °C. Bedingt durch die temperatursensitive PNIPAM-Seite der Janus-Partikel agglomerierten diese viermal schneller als monofunktionalisierte PDMAEMA-Partikel, was deren Vorteil für den mehrfachen Einsatz von Enzymen unterstreicht (Abb. 7). Im Vergleich zum einmaligen Einsatz von Enzymen amortisieren sich die Kosten für die Enzymimmobilisierung in Abhängigkeit vom Grundpreis für die Enzyme nach wenigen Zyklen.

Wir danken der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen (AiF) für die finanzielle Förderung des Projektes 18195BR. Dieses IGF-Vorhaben der Forschungsvereinigung Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA) wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Energie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
APS	3-Aminopropyltriethoxysilan
ARGET	activators regenerated by electron transfer
ATRP	atom transfer radical polymerization
BrIn	α -Bromoisobuttersäurebromid
DCM	Dichlormethan
DMAEMA	2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat
EBiB	Ethyl- α -bromoisobutytrat
IAC	Ionenaustausch-Chromatographie
JP	Janus-Partikel
MEPA	Malzextrakt Pepton Agar
MP	monofunktionalisierte PDMAEMA-Partikel
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (molecular weight cut-off)
PAA	Polyacrylsäure (polyacrylic acid)
PDMAEMA	Poly(2-dimethylamino)ethylmethacrylat
PMDTA	<i>N,N,N',N'',N'''</i> -Pentamethyldiethylentriamin
PNIPAM	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)
PtBA	Poly(<i>tert</i> -butylacrylat)
REM	Rasterelektronenmikroskop
SI	oberflächeninitiiert (surface-initiated)
tBA	<i>tert</i> -Butylacrylat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEOS	Tetraethylorthosilikat
TPMA	Tris(2-pyridylmethyl)amin

Literatur

- [1] R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernandez-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6290–6307. DOI: <https://doi.org/10.1039/C2CS35231A>
- [2] R. DiCosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulouse, G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (15), 6437–6474. DOI: <https://doi.org/10.1039/C3CS35506C>
- [3] P. Valencia, S. Flores, L. Wilson, A. Illanes, *New Biotechnol.* **2012**, *29* (2), 218–226. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2011.09.002>
- [4] S. Schachschaal, H.-J. Adler, A. Pich, S. Wetzel, A. Matura, K.-H. van Pée, *Colloid Polym. Sci.* **2011**, *289* (5), 693–698. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00396-011-2392-1>

- [5] A. Kirillova, C. Marschelke, A. Synytska, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (10), 9643–9671. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b17709>
- [6] A. Walther, A. H. E. Müller, *Chem. Rev.* **2013**, *113* (7), 5194–5261. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr300089t>
- [7] J. Schüchel, A. Matura, K.-H. van Pée, *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48* (3), 278–284. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.12.002>
- [8] S. Berger, L. Ionov, A. Synytska, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21* (12), 2338–2344. DOI: <https://doi.org/10.1002/adfm.201100155>
- [9] C. Marschelke, I. Raguzin, A. Matura, A. Fery, A. Synytska, *Soft Matter* **2017**, *13*, 1074–1084. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6sm02380k>
- [10] S. Berger, A. Synytska, L. Ionov, K.-J. Eichhorn, M. Stamm, *Macromolecules* **2008**, *41* (24), 9669–9676. DOI: <https://doi.org/10.1021/ma802089h>
- [11] A. Synytska, A. Kirillova, L. Isa, *ChemPlusChem* **2014**, *79* (5), 656–661. DOI: <https://doi.org/10.1002/cplu.201400020>
- [12] A. Kirillova, L. Ionov, I. V. Roisman, A. Synytska, *Chem. Mater.* **2016**, *28* (19), 6995–7005. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b02765>
- [13] C. Marschelke, M. Müller, D. Köpke, A. Matura, M. Sallat, A. Synytska, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11* (1), 1645–1654. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsami.8b17703>