

Proteine in mesoporösen Silicaten

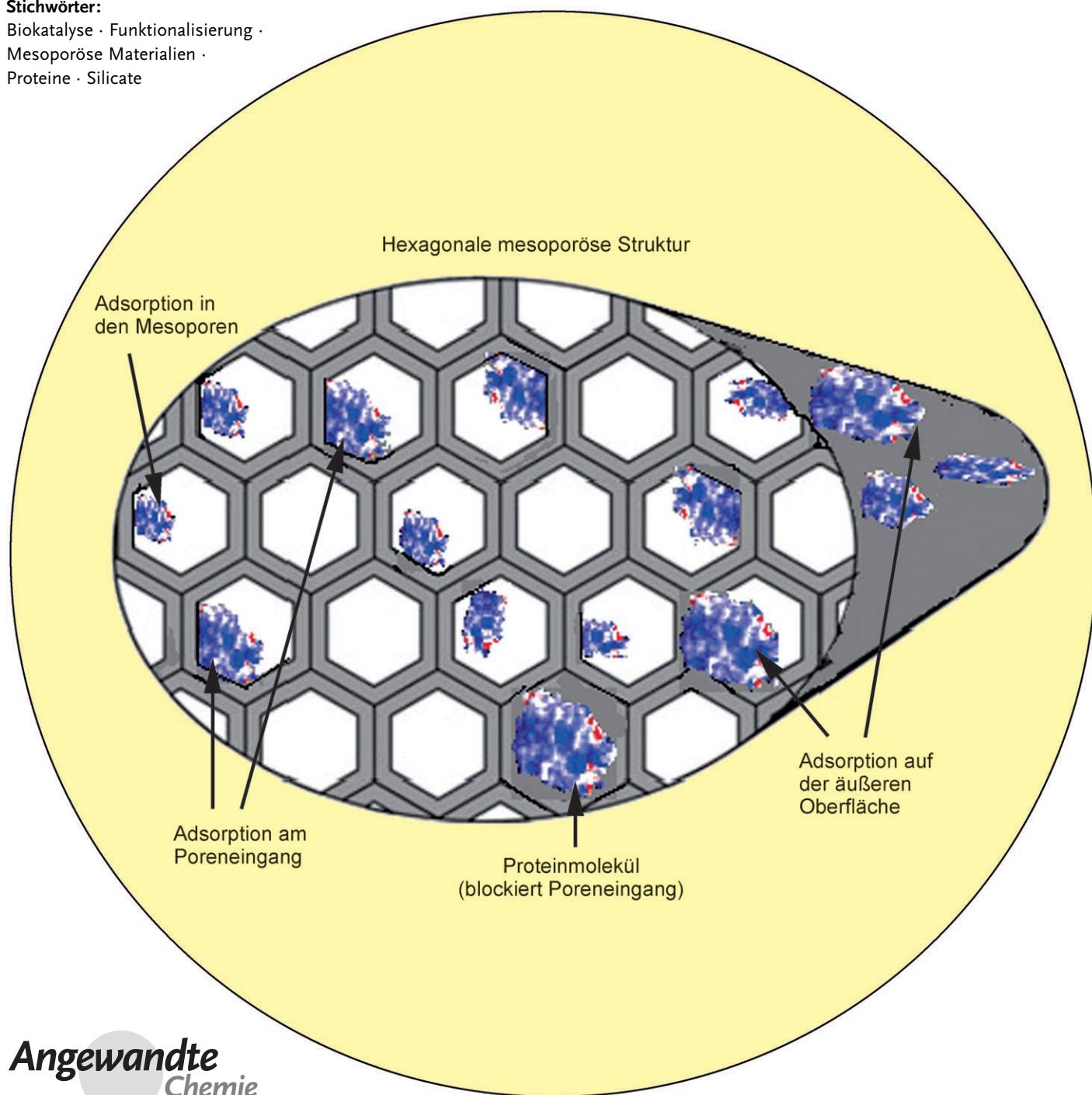
Sarah Hudson,* Jakki Cooney und Edmond Magner*

Stichwörter:

Biokatalyse · Funktionalisierung ·

Mesoporöse Materialien ·

Proteine · Silicate



Mesoporöse Silicate (MPS) haben eine geordnete Porenstruktur mit ähnlichen Abmessungen wie viele biologische Moleküle. Sie sind als Trägermaterialien für Proteine und Enzyme in biokatalytischen Anwendungen eingehend untersucht worden. Seit ihrer Entdeckung ist es gelungen, durch neue Syntheseverfahren die Größe und Struktur der Poren, die Teilchengröße und die chemische Zusammensetzung und Stabilität genau vorzugeben, sodass nun die Adsorption einer breiten Vielfalt biologischer Makromoleküle, z. B. Hämproteine, Lipasen, Antikörperfragmente und Proteasen, in ihren Strukturen möglich ist. In diesem Aufsatz wird die Anwendung geordneter funktionalisierter mesoporöser Silicate zur Immobilisierung von Proteinen für die Biokatalyse behandelt.

1. Einführung

Für die Anwendung von biologischen Einheiten wie Enzymen, Antikörpern oder sonstigen Proteinen sowie ganzer Zellen in der Biotechnologie muss die biologische Komponente oft unter Erhaltung von Funktion und Aktivität in einer unnatürlichen Umgebung stabilisiert werden. Eine solche Stabilisierung, wie sie oft durch Einschluss oder Immobilisierung in organischen oder anorganischen Strukturen erzielt wird, hat sich beim Abbau^[1] und Trennen^[2] von Proteinen, bei Biosensoren,^[3] der Biokatalyse,^[4] der Wirkstoffabgabe^[5-7] und beim Gewebe-Engineering^[8] bewährt.

Enzyme arbeiten im Allgemeinen unter milden Bedingungen und mit weitaus höheren Umsatzgeschwindigkeiten als synthetische Katalysatoren, und sie sind hoch enantioselektiv. Allerdings sind sie für industrielle Anwendungen nicht immer ideal geeignet.^[4,9] Viele Enzyme sind instabil und zeigen in organischen Lösungsmitteln oder bei hohen Temperaturen nur eine geringe Aktivität. Organische Lösungsmittel, Reagenzien, niedrige oder hohe pH-Werte, mechanische Beanspruchung und Wärme können die Denaturierung des Enzyms auslösen und so seine katalytische Aktivität aufheben. Auch das Extrahieren des Enzyms aus einem Reaktionsgemisch kann zu Denaturierung und Aktivitätsverlust führen. Dieses Problem lässt sich durch Immobilisieren des Proteins auf festen Strukturen überwinden, sodass eine Rückgewinnung möglich ist und die Stabilität verbessert wird.^[10-17] Ein solcher Ansatz kann auch die Fähigkeit von Enzymen zur Katalyse spezifischer Reaktionen unter milden Bedingungen verbessern. Ein gutes Beispiel ist die Herstellung von 6-Aminopenicillansäure, einer Vorstufe vieler halbsynthetischer Penicilline, durch immobilisierte Penicillin-Acylase im wässrigen Medium unter milden Bedingungen. Die chemische Synthese von 6-Aminopenicillansäure erfordert dagegen wasserfreie Bedingungen, tiefe Temperaturen, organische Lösungsmittel sowie den Umweltschadstoff Phosphorpentachlorid.^[10]

Durch Immobilisieren auf einem festen Träger können die Enzymstabilität verbessert und das Abtrennen und Rückgewinnen zur Wiederverwendung vereinfacht werden, ohne dabei Aktivität und Selektivität einzubüßen. Es sind verschiedenartige Träger für Proteine beschrieben worden, bei-

Aus dem Inhalt

1. Einführung	8711
2. Mesoporöse Silicate	8712
3. Immobilisierung von Proteinen in mesoporösen Silikaten	8714
4. Zusammenfassung und Ausblick	8721

spielsweise Sol-Gele,^[18-19] Hydrogele,^[6,20] organische Mikropartikel^[21] sowie nichtporöse^[22] und poröse^[23]

anorganische Feststoffe. Jeder dieser Träger hat bei der Verwendung für die Protein-Biokatalyse seine Vor- und Nachteile. Sol-Gel-Matrizes sind porös und wärmestabil und verhindern durch wirkungsvollen Einschluss ein Auswaschen des Enzyms. Ihre Strukturen sind jedoch spröde, und die Enzyme werden bereits während der Synthese des Sol-Gels eingeschlossen, wobei sie denaturiert werden können. Außerdem kann die Diffusion sperriger Substrate behindert sein,^[18] wenn auch Sol-Gel-Matrizes kürzlich durch den Zusatz von Tensiden porös gemacht und erfolgreich zum Einschluss von Lipase und Alkohol-Dehydrogenase verwendet werden konnten.^[24-25] Auch bestimmte poröse Gläser („controlled pore glass“, CPG) sind erfolgreich verwendet worden, entsprechende Verfahren erwiesen sich aber als kostspielig.^[23] Die spezifische Oberfläche nichtporöser Träger ist typischerweise klein, sodass nur wenig Protein angelagert wird.^[22] Die spezifische Oberfläche anorganischer poröser Materialien ist im Allgemeinen größer als bei nichtporösen Materialien. Uneinheitliche Porengrößen können allerdings zu Schwierigkeiten bei der Übertragung von Enzymen und ihren Substraten führen. Hydrogele und organische Mikropartikel, z. B. aus Polymilchsäure-co-glycolsäure (PLGA) und Eudragit (ein kationischer Methacrylat-Polyester), sind bislang kaum bei der Biokatalyse verwendet worden, da das Enzym oft durch Aufquellen der Trägermatrix und/oder Abbau des Trägers freigesetzt wird. Außerdem erschweren eine niedrige Enzymaktivität durch Denaturierung und Probleme bei der Übertragung die Verwendung dieser Materialien.^[4,6,21,26]

[*] Dr. S. Hudson, Prof. Dr. E. Magner
Department of Chemical and Environmental Sciences
Materials and Surface Science Institute
University of Limerick, Plassey, Co. Limerick IE (Irland)
Fax: (+353) 61-213-529
E-Mail: sarah.hudson@ul.ie
edmond.magner@ul.ie

Dr. J. Cooney
Department of Life Sciences
Materials and Surface Science Institute
University of Limerick, Plassey, Co. Limerick IE (Irland)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200705238> erhältlich.

Mesoporöse Silicate (MPS), die mit Tensiden als Templaten hergestellt werden, haben Strukturen mit geordneten Poren, einheitlichen Porengrößen und dicken Wänden mit guter Stabilität. Die regelmäßigen mesoporösen Wiederholungsstrukturen bieten die Möglichkeit zur Adsorption und zum Einschluss großer Biomoleküle an der äußeren Oberfläche oder in den Poren. Die ausgeprägte Ordnung der Kanäle und die Variierbarkeit von Porengröße und Struktur sowie der Zusammensetzung der Wand bringen wesentliche Vorteile gegenüber Sol-Gel- und nichtporösen Formulierungen. Die Enzyme werden üblicherweise erst nach der Synthese adsorbiert. Die geordnete poröse Struktur bildet dann eine geschützte Umgebung für Reaktionen mit ausgewählten Substraten. Seit der ersten Veröffentlichung von Diaz und Balkus^[27] im Jahr 1996 hat die Forschung auf diesem Gebiet rapide zugenommen,^[13,17] MPS haben sich allerdings bei der Biokatalyse noch nicht so nützlich gezeigt wie ursprünglich erhofft. Eines der Hauptprobleme ist das Auswaschen, das zu einem Aktivitätsverlust bei der Wiederverwendung führt, während die Immobilisierung großer Enzyme durch die kleinen Porenöffnungen vieler mesoporöser Materialien erschwert ist. Außerdem kann die Synthese der Materialien zeitaufwändig und kostspielig sein.

2. Mesoporöse Silicate

2.1. Hintergrund

1992 synthetisierten Kresge et al.^[28] mesoporöse Festkörper mit regelmäßig angeordneten gleichförmigen Kanälen, die als MCM-X („Mobil Composition of Matter“) bezeichnet wurden. Die Abmessungen der Kanäle konnten nach einem hypothetischen Flüssigkristall-Templat-Mechanismus (liquid crystal templating, LCT) durch die Wahl des verwendeten Tensids, von Additiven und über die Reaktionsbedingungen eingestellt werden.^[29] Der LCT-Mechanismus beruht auf der Entstehung von Flüssigkristallen in dem Reaktionsgemisch. Flüssigkristalle bilden sich in Gemischen von polaren Lösungsmitteln (wie Wasser) und Tensiden. Die hydrophoben Schwanzgruppen der Tenside lagern sich aneinander, und die hydrophilen Kopfgruppen weisen zur wässrigen Umgebung hin. Solche Tensidmicellen entstehen jedoch nur oberhalb der kritischen Micellenkonzentration einer bestimmten Temperatur.



Sarah Hudson studierte Chemie am Trinity College Dublin und promovierte anschließend an der University of Limerick. Gegenwärtig ist sie Marie-Curie-Stipendiatin am Massachusetts Institute of Technology. Ihre Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Biokatalyse und der Entwicklung von Biomaterialien zum Wirkstofftransport.

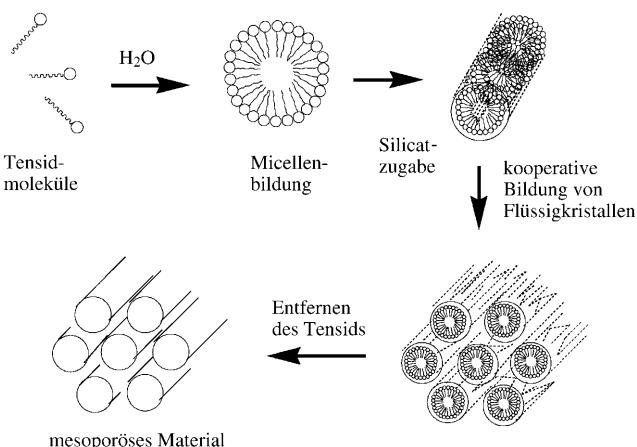


Abbildung 1. Vermuteter Bildungsmechanismus mesoporöser Materialien.

ratur. Es wurde vorgeschlagen, dass die Zugabe der anorganischen Spezies das Zusammenlagern der Flüssigkristalle vermittelt (Abbildung 1). Die Gesamtstruktur wird von der Organisation der Tensidmoleküle zu micellaren Flüssigkristallen bestimmt, die ihrerseits als Template für die Bildung der mesoporösen Silicate dienen. Die Flüssigkristallstrukturen sind jedoch sehr empfindlich gegen die Lösungsbedingungen. Struktur- und Phasenverhalten des anorganisch-organischen Kompositen werden von der Beschaffenheit der anorganischen Spezies und deren elektrostatischen und räumlichen Wechselwirkungen mit den organischen Spezies vorgegeben.^[29] Kooperative Wechselwirkungen zwischen anorganischen und organischen Spezies können zu einer Vielfalt von Strukturen führen, wie sie in einem grenzflächenaktiven System oder einem anorganischen System allein nicht gefunden werden könnte.^[30] So können zahlreiche Tenside (neutrale Blockcopolymere, kationische und Zwillings tenside) und Additive (Trimethylbenzol, Alkohole, Salze) verwendet werden, um etwa hexagonale, kubische oder lamellare mesoporöse Strukturen mit verschiedenen Porengrößen zu erhalten.^[31–38] Die Adsorptionseigenschaften jedes Materials hängen von der Kristallinität, der spezifischen Oberfläche, Porendurchmesser und -volumen, Teilchenform und -größe sowie den chemischen Eigenschaften der Oberflächen ab. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Strukturen hängen wiederum von dem verwendeten Tensid,



Jakki Cooney studierte Biochemie am Trinity College Dublin und promovierte dort in molekulärer Mikrobiologie. Nach Postdoktoraten an der Lund University, der University of Victoria und der Massey University kehrte sie 2002 nach Irland zurück, wo sie zurzeit Lecturer in Zell- und Strukturbioologie an der University of Limerick ist. Zu ihren Forschungsinteressen zählen die Struktur und Funktion von Proteinen sowie die Protein-katalyse.

den Synthesebedingungen (pH-Wert, Temperatur, Konzentrationsverhältnisse, Röhren), dem Salzgehalt, den Lösungsmitteln, den organischen Additiven und der Siliciumdioxidquelle ab.

Mesoporöse anorganisch-organische Hybridmaterialien bieten die Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung der Oberfläche auf gewünschte Eigenschaften hin einzustellen. Es sind drei allgemeine Herstellungsverfahren für funktionalisierte Materialien bekannt, nämlich die direkte Funktionalisierung, die Funktionalisierung nach der Synthese, und der Einbau organischer Einheiten in Porenwände unter Verwendung verbrückter Silesquioxane als Siliciumdioxidquelle.^[37] Mithilfe dieser Verfahren sind viele funktionelle Gruppen in mesoporösen Materialien eingeführt worden, z.B. Thiol-, Amino-, Chlor-, Carboxy- und Cyangruppen, Oxiranringe, Alkyl- und Arylreste sowie *N*-(Trimethoxysilylpropyl)ethylendiamintriessigsäure-Einheiten.^[37,39-46] Die Entwicklung mesoporöser Siliciumdioxidstrukturen,^[36] anorganisch-organischer Hybridmaterialien^[37] und mesoporöser dünner Filme^[38] seit der Entdeckung von MCM-41 im Jahr 1992 ist bereits in Übersichten ausführlich behandelt worden und wird daher hier nicht in Einzelheiten dargestellt. Zur Bestimmung der physikalisch-chemischen Eigenschaften eines mesoporösen Materials muss dessen Struktur jedoch sorgfältig charakterisiert werden.

2.2. Charakterisierung mesoporöser Strukturen

Nach der Synthese eines MPS wird zur Aufklärung seiner Eigenschaften eine Reihe von Analyseverfahren benötigt, von denen wir hier einige herausheben.

- 1) Die Stickstoffadsorptionsanalyse^[47] liefert Informationen über die spezifische Oberfläche, den Porendurchmesser, die Porengrößenverteilung und das Porenvolumen. Die Stickstoffadsorptionsanalyse ist zwar wichtig für die Beschreibung mesoporöser Materialien, die entsprechenden Theorien (BET,^[48] BJH,^[49] NLDFT,^[50] t-Plots und α_s -Plots^[51]) haben jedoch alle ihre Nachteile, insbesondere weil viele mesoporöse Materialien Mikroporen, Makroporen und Mesoporen zugleich aufweisen. Einige Beispiele dieser Beschränkungen sind: a) Nach der BET-Theorie berechnete spezifische Oberflächen hängen stark vom gewählten Datenbereich ab.^[52] b) Die Werte der Po-

rengrößen variieren abhängig davon, ob der Adsorptions- oder der Desorptionszweig der Isotherme verwendet wird; so unterschätzen BJH-Rechnungen für den Desorptionszweig die Größe der Porenöffnungen von Materialien wie SBA-15.^[53] c) Die NLDFT-Theorie kann bei stark fehlgeordneten Materialien nicht verwendet werden.^[54] d) t-Plots und α_s -Plots liefern keine Werte für die äußeren Oberflächen großporiger Materialien, da die Stickstoffadsorptionsisotherme bei hohen Drucken zu unendlichen Werten strebt.

- 2) Die Kleinwinkelröntgenbeugung liefert Informationen über die dreidimensionale Struktur, die Ordnung und den Parameter a_0 der Elementarzelle eines mesoporösen Materials. Im Allgemeinen sind mesoporöse Materialien amorph mit einer allenfalls geringen Fernordnung. Wenn das Material jedoch ein geordnetes Netz von Kanälen enthält, zeigt die Kleinwinkelröntgenbeugung ein charakteristisches Röntgenbeugungsmuster, sodass auf eine hexagonale, kubische, lamellare oder fehlgeordnete Struktur geschlossen werden kann.^[55] Durch Kombination mit dem durch Stickstoffadsorptionsanalyse erhaltenen Porendurchmesser kann die Wanddicke der Poren des mesoporösen Materials abgeschätzt werden.
- 3) Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) liefert Informationen über die Nah- und Fernordnung von mesoporösen Materialien sowie Hinweise auf die Weite der Kanäle und der Porenöffnungen; bei der Vermessung von Porenkanälen aus TEM-Bildern ist jedoch Vorsicht angebracht, da *d*-Abstände und nicht Porenweiten beobachtet werden. Direkte Vermessungen der Porenöffnungen aus TEM-Bildern sind aufgrund unterschiedlicher Orientierungen der Teilchenflächen inkonsistent. An einem hexagonal geordneten mesoporösen Material wurden *d*-Abstände zwischen den 100- und 110-Ebenen gemessen, die bis auf 7 % an die aus XRD abgeleiteten Werte herankamen.^[56]

Mesoporöse Materialien mit Porengrößen von 10 nm oder weniger und charakteristischen Stickstoffadsorptionsisothermen (Hysteresen), Kleinwinkelröntgenbeugungsmustern und TEM-Bildern wurden beschrieben (Abbildung 2). Es scheint jedoch, dass mit größeren Mesoporen ein solcher Ordnungsgrad nur schwer zu erzielen ist. Um dieses Problem zu umgehen, sind kürzlich bimodal poröse Materialien hergestellt worden. Diese Materialien bestehen aus makroporösen Käfigen mit einer mesoporösen Wandstruktur und können mit vielfältigen Tensiden und Templanen erhalten werden.^[57]

Weitere Charakterisierungsverfahren^[12,13] für mesoporöse Silicate umfassen die Rasterelektronenmikroskopie, Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR), Resonanz-Raman-Spektroskopie, Festkörper-NMR-Spektroskopie, Thermogravimetrie (TGA), temperaturprogrammierte Ammoniakdesorption und C,H,N-Analyse. Diese Verfahren liefern Informationen über die Teilchengröße und -morphologie, das Ausmaß der Beseitigung des Templatzs, die Anbindung funktioneller Gruppen und die Dichte von Silanol- und anderen Oberflächengruppen.



Edmond Magner studierte am University College Cork und promovierte an der University of Rochester. Nach Postdoktoraten am Imperial College und am Massachusetts Institute of Technology arbeitete er bei MediSense und Abbott Laboratories, Massachusetts, an der Entwicklung elektrochemischer Biosensoren. Er kehrte 1997 nach Irland zurück, um eine akademische Stelle an der University of Limerick anzunehmen, an der er gegenwärtig Direktor des Instituts für Material- und Oberflächenwissenschaften ist. Seine Forschungsinteressen liegen auf dem Gebiet der Bioelektrochemie und der Biokatalyse.

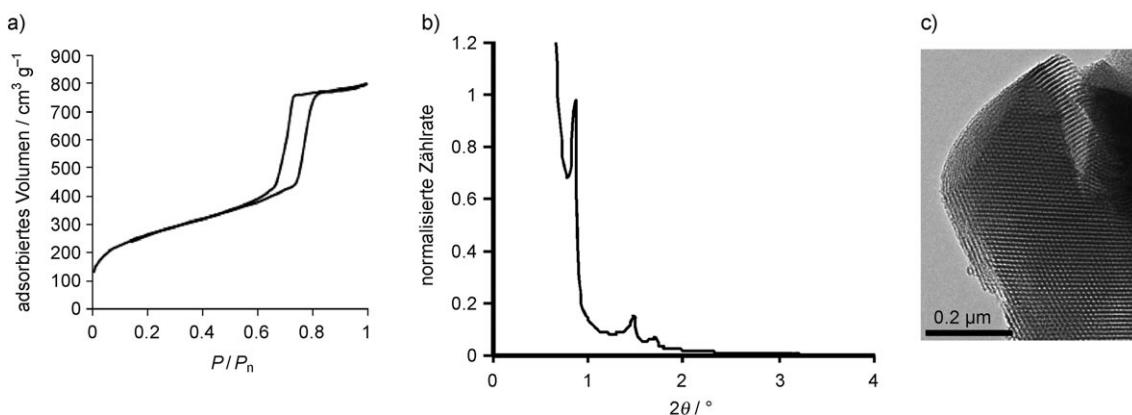


Abbildung 2. Typische Analyseergebnisse eines geordneten MPS-Materials. a) Stickstoffsorptionsisotherme, b) Röntgenpulverbeugungsspektrum, c) TEM-Bild eines mesoporösen Silicats mit hexagonaler Ordnung und 6 nm großen Poren.

3. Immobilisierung von Proteinen in mesoporösen Silikaten

Die Immobilisierung von Proteinen wurde erstmals 1916 beschrieben, als Invertase auf Kohle verankert wurde und dabei die Aktivität des nativen Enzyms behielt.^[58] Das Ziel der Immobilisierung ist es, die Stabilität zu verbessern und die Rückgewinnung und Wiederverwendung des Enzyms bei gleichbleibender katalytischer Aktivität zu vereinfachen. So wurden etliche Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen auf zahlreichen Trägern untersucht.^[4,11–26] In Tabelle 1 sind einige Eigenschaften von Proteinen und mesoporösen Strukturen zusammengefasst, die zur Herstellung von Biokatalysatoren verwendet worden sind. Ein logischer Ansatz bei der Wahl eines mesoporösen Trägermaterials für ein bestimmtes Protein umfasst das Abgleichen der physikalisch-chemischen Eigenschaften des Trägers mit jenen der Proteinoberfläche (Abbildung 3).^[59] Bei einem günstigen Immobilisierungsprozess wird das Protein derart adsorbiert, dass das aktive Zentrum von der mesoporösen Oberfläche weg orientiert ist. Das Auswaschen soll gering gehalten werden, und die Beweglichkeit muss dennoch groß genug sein, um die katalytische Aktivität aufrechtzuerhalten. In den folgenden Abschnitten wird die Bedeutung der in Abbildung 3 gezeigten Faktoren anhand von Veröffentlichungen über Proteine, die in MPS immobilisiert wurden, erläutert. Dabei werden die Schlüsseleigenschaften aufgezeigt, die bei der Suche nach einem mesoporösen Träger für ein bestimmtes Protein berücksichtigt werden sollten.

3.1. Relative Größe der Mesoporen und des Proteins

Wenn ein Protein kleiner als die Porenöffnung ist, hat es Zugang zu der großen inneren Oberfläche des mesoporösen Trägers. Andernfalls wird es ohne den Schutz der Mesoporen an der Außenseite des Materials adsorbiert. So konnten Diaz et al.^[27] nachweisen, dass Meerrettich-Peroxidase (mittlerer Kugeldurchmesser ca. 4.6 nm) von MCM-41 (Poredurchmesser ca. 4 nm) nicht erfolgreich immobilisiert wird, da sie zu groß ist, um in die Poren des Materials einzudringen. Ähnlich wurde auf MCM-41 bei 4.5 nm großen Poren 8 μmol

Cytochrome c pro Gramm Träger adsorbiert, bei kleineren Poren (2.8 nm) und sonst gleichen Adsorptionsbedingungen jedoch weniger als 1 μmol g⁻¹.^[60] Dies zeigt, dass der hydrodynamische Durchmesser des Proteins und der Poredurchmesser übereinstimmen müssen, um große Beladungen zu erzielen. Die Beladung wird jedoch auch von dem verfügbaren Porenvolumen und der spezifischen Oberfläche beeinflusst. Die Verwendung von MPS zur Immobilisierung von Antikörpern für Biosensoren wird durch die Porengröße eingeschränkt, wenn auch Hu et al.^[3] ein Antikörperfragment, das gute Bindungseigenschaften für ein starkes Muscheltoxin zeigte, in einem MPS immobilisieren konnten. Der direkte Beweis für das Eintreten von Proteinmolekülen in die mesoporösen Strukturen muss noch erbracht werden, beispielsweise durch unzweifelhafte Abbildungen von Enzymen oder Proteinen im Inneren der Poren.^[61] Das Eintreten von Proteinen in ausreichend große Poren ist jedoch aus erhöhten Beladungen und einer verbesserten Stabilität und Aktivität abgeleitet worden.

Zur Frage, ob die Porenweite wesentlich größer als das Protein sein sollte, um die Diffusion von Protein und Substrat entlang der Pore zu ermöglichen, oder von einer ähnlichen Größe, um die Stabilität des Proteins zu verbessern und es vor der äußeren Umgebung zu schützen, gibt es widersprüchliche Antworten. So berichteten Takahashi et al.,^[62] dass für eine verbesserte Aktivität in organischen Lösungsmitteln und eine verbesserte hydrothermale Stabilität von immobilisierter Meerrettich-Peroxidase die Poren gerade groß genug sein sollten, um das Protein aufzunehmen – die Größen sollten also übereinstimmen. Dagegen wurde angenommen, dass das Enzym in zu großen Poren weniger gut geschützt wäre. Der Standpunkt, dass ein enges Einpassen in die Poren wünschenswert ist, wurde auch von anderen vertreten.^[63–66] Außerdem können kleine Porenöffnungen durch geringes Auswaschen die katalytische Gesamtaktivität verbessern. Ein Beispiel hierfür ist ein Antikörper, dessen Immobilisierung in MCF-Materialien mit kleinen Porenöffnungen zu einer besseren Stabilität, Aktivität und Wiedergewinnung in organischen Lösungsmitteln führt als in solchen mit großen Öffnungen.^[67] Es muss jedoch genügend Raum zur Verfügung stehen, um den Zugang des Substrats zum Protein zu gewährleisten, da Beschränkungen der Diffusionsgeschwindig-

Tabelle 1: Immobilisierung von Proteinen in mesoporösen Materialien.

Protein	pl	Größe [nm]	mesoporöse Träger	Porengrößen ^[b] [nm]
Cytochrom c ^[5, 64, 73, 123]	10.7	2.6 × 3.2 × 3.3	MCM-41, COS, CNS, MPS-F127, MAS-9, Al-MCM-41, Al-MCM-48, PMO	2.5–13
Mikroperoxidase-11 ^[118]	4.7	3.3 × 1.75	PMO, MCM-41, SBA-15	2.7–5.5
Lysozym ^[70, 71, 74, 84, 89, 124, 125]	11.3	1.5 × 2.5 × 4.3	SBA-15, CMK, CKT, Al-MCM-41, Al-SBA-15, MCM-48, MCM-41, PMO	3.2–9.1, 24
Trypsin ^[1, 41, 89, 112, 114, 126, 127]	8–10.5	ca. 3.8	CNS, COS, MCM-41, MCM-48, SBA-15, FDU-12, MCF, (bimodale MPS)	2.8–18, (100–1000)
Organophosphorhydrolase ^[45, 91, 92]	8.3	9.2 × 5.6 × 4.0	MPS, FMS	30
α-Chymotrypsin ^[57, 63, 116]	8.6	4.0 × 4.0 × 5.0	MCM-41, (bimodale HMMS)	4, (13,37)
Meerrettich-Peroxidase ^[27, 62, 73]	ca. 7.2	4.0 × 4.4 × 6.8	MCM-41, SBA-15, FSM-16, CNS	2.7–13
Chlorperoxidase ^[65, 90, 93, 94, 106]	4.0	ca. 6.5	SBA-16, MCF, SBA-15, MCM-48, PMO-PA	3–14
Manganperoxidase ^[66]	–	–	FSM-16	3–9
Papain ^[27, 117]	8.75	3.7 × 3.7 × 5.0	MCM-41, MCM-48	4, 6.2
Pepsin ^[73]	< 1	33 kDa ^[a]	CNS	13
Rinderserumalbumin ^[69–71, 73]	4.9	5.0 × 7.0 × 7.0	CNS, MCM-41, SBA-15, Al-MCM-41	2.5–24
Subtilisin ^[62, 73]	10.4	30 kDa ^[a]	FSM-16, CNS	2.7–13
Myoglobin ^[71, 127]	7.1	ca. 17.6	SBA-15, FDU-12, MCF	3.8–24
Metmyoglobin ^[128]	–	ca. 17.6	FSM-16, FSM-22	2.7, 4
Hämoglobin ^[109, 110]	6.8–7.0	5.3 × 5.4 × 6.5	SBA-15, FSM	3–10
Conalbumin ^[2, 127]	6.0	5.0 × 5.6 × 9.5	SBA-15, MCF, FDU-12	5.9–18
Ovalbumin ^[2]	4.9	4.0 × 5.0 × 7.0	SBA-15, MCF	5.9, 16
Trypsininhibitor-Protein ^[2]	5.2	14 kDa ^[a]	SBA-15, MCF	5.9, 16
α-Amylase ^[101]	–	ca. 7–10	MCM-41, SBA-15, MCF	2.6–33.5
Cytochrom P450 CYP2C9 ^[81]	–	ca. 9.0	MCM-41, Al-MCM-41	4–5
Cytochrom P450 CYP2B4 ^[81]	–	ca. 5.2	MCM-41, Al-MCM-41	4–5
Penicillinacylase ^[98, 99, 104, 107]	7.0	7.0 × 5.0 × 5.5	MCM-41, Al-MCM-41, SBA-15, KIT-6	3.3, 6–9
Glucoseoxidase ^[85, 92, 100]	4.6	7.0 × 5.5 × 8.0	MCF, CMK, MSCF, FMS, (bimodales MSU-F-C)	17–34, 3.9, (5.6, 21)
Candida-antarctica-Lipase B ^[97, 113, 119]	6.0	3.0 × 4.0 × 5.0	HMS, MS-3030, MCF, FDU-12	3.6, 20–50, 10–15
Schweinepankreaslipase ^[61, 75, 82]	–	4.6 × 2.6 × 1.1	MCM-41, SBA-15	4.5–6.6
Mucor-javanicus-Lipase ^[102, 116]	ca. 6.2	–	SBA-15, (bimodale HMMS)	6.7, (13,37)
Pseudomonas-cepacia-Lipase ^[122]	–	ca. 5	MCM-41, MCM-48, SBA-15	1.6–6.2
Newlase F-Lipase ^[129]	–	–	SBA-15	7.5
α-L-Arabinofuranosidase ^[87]	3.5	3.9 × 9.7 × 14.4	(bimodales UCM-7)	(3.6, 28)
Fumarase ^[126]	–	ca. 7.8	SBA-15, (bimodale MPS)	(100,1000)
Schweineleberesterase ^[126]	–	ca. 7.3	SBA-15, (bimodale MPS)	(100,1000)
Glucoseisomerase ^[92, 103]	4.0	173 kDa ^[a]	SBA-Typ, FMS	30
Acetylcholinesterase ^[130]	–	4.6 ± 5	MCM-41, FSM-16	4–7
Invertase ^[105]	–	–	MCF	12–14
Glucoamylase ^[105]	–	–	MCF	12–14
Polyphenoloxidase ^[131]	–	–	mesoporöse Kohle	2–3.5
Thermolysin ^[132]	4.5	34.6 kDa ^[a]	SBA-15, MSU, MCF	9–32
Aldolase-I-Antikörper 84G3 ^[67]	–	8	MCF	15–20
scFv-Antikörperfragment ^[3]	8.73	5.0 × 4.0 × 4.0	SBA-15, CNS, MSE, MCM-41	6–24

[a] Keine geometrischen Abmessungen angegeben. [b] Zahlen in Klammern geben die Porengröße von bimodalen Materialien.

keit des Substrats die Gesamtaktivität des immobilisierten Enzyms verringern.^[64, 68] Die hydrophobe oder hydrophile Beschaffenheit und die Größe des Substrats haben einen großen Einfluss auf die katalytische Aktivität eines immobilisierten Enzyms.^[46, 64, 66] Wenn das Substrat hydrophob ist, kann die Diffusion durch die Kanäle einer hydrophilen mesoporösen Silicatstruktur verlangsamt sein. Dies kann durch größere Poren ausgeglichen werden, in denen die Diffusionsgeschwindigkeiten größer sind als in kleinen Poren. Andererseits könnte ein hydrophiles Substrat leicht durch die Poren diffundieren, während kleinere Poren die spezifische Aktivität des immobilisierten Enzyms besser schützen.

Auch die äußere Oberfläche kann die Proteinbeladung stark beeinflussen.^[7b, 69–71] Deere et al.^[72] leiteten aus dünn-schichtellipsometrischen Untersuchungen ab, dass sich auf

der äußeren Oberfläche mesoporöser Materialien 6–10 Schichten Cytochrom c abscheiden können. Die Analyse des Porenvolumens vor und nach der Enzymadsorption liefert keinen sicheren Beleg für das Eintreten in die Poren, da auch ein Blockieren der Mesoporenöffnungen das Porenvolumen und die Porenoberfläche verringert, ohne dass die Proteinmoleküle vollständig in die Pore eindringen müssen.^[73–77] Auf eine Adsorption ausschließlich an der äußeren Oberfläche des mesoporösen Materials kann man jedoch dann schließen, wenn es zu keiner Verringerung des Mesoporenvolumens kommt.^[78–80] Eine XRD-Analyse vor und nach der Adsorption eines Proteins kann über die Intensitätsverringerung der Reflexionsmaxima einen Einschluss des Proteins in den Mesoporen nachweisen.^[74, 75, 78, 81–83]

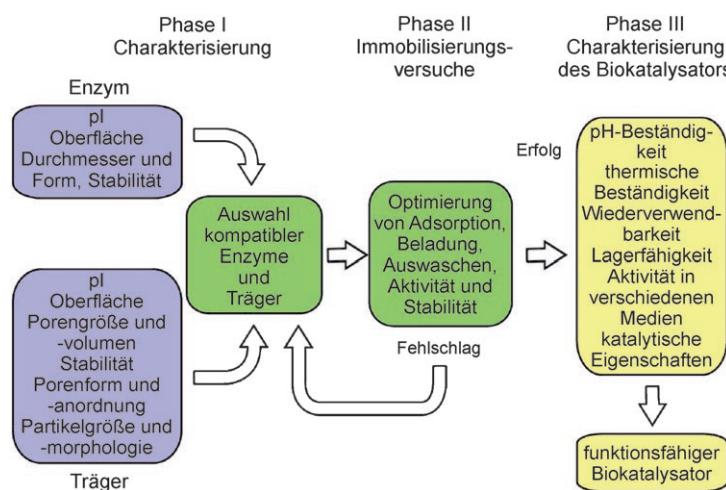


Abbildung 3. Wichtige Faktoren bei der Herstellung neuer Biokatalysatoren mit immobilisierten Proteinen.^[59]

3.2. Teilchengröße und -morphologie

Das Porenvolumen mesoporöser Träger ist nach der Proteinimmobilisierung aufgrund blockierter Poren oft viel stärker verringert als es dem geschätzten Volumen an immobilisiertem Protein entspricht.^[73,78] Materialien mit kürzeren mesoporösen Kanälen (kleinere Teilchen) können bei gleichem Gesamtvolumen der Mesoporen eine größere Beladungskapazität haben (ca. 37 gegenüber ca. 5 µmol Lysozym pro Gramm SBA-15), weil ein geringeres Porenvolumen blockiert wird.^[83] Beim Vergleich der Adsorption in mesoporösen Materialien sollten daher die Teilchengrößenverteilung und die Morphologie berücksichtigt werden, die einen starken Einfluss auf die Eigenschaften der Adsorptionsisotherme, die Adsorptionskinetik und die spezifische Aktivität von Proteinen auf mesoporösen Materialien ausüben.^[83–88]

3.3. Stabilität des mesoporösen Materials

Zur Wiederverwendung eines auf einem mesoporösen Träger immobilisierten Enzyms muss das Trägermaterial unter den Arbeitsbedingungen stabil sein, denn eine Zersetzung würde das Enzym freisetzen und so zu einem Aktivitätsverlust bei der Wiederverwendung führen. Wenn das Material zum Binden und Freigeben eingesetzt werden soll, muss es seine Struktur beibehalten.^[89] Es wurde berichtet, dass SBA-Materialien aufgrund ihrer dickeren Wände hydrothermal stabiler sind als MCM-Materialien.^[31,74] Allerdings kamen andere Studien, die sich in erster Linie in Bezug auf die Synthesebedingungen unterschieden, zu widersprüchlichen Ergebnissen. So fanden Ji et al.^[69] in Einklang mit Beobachtungen von Katiyar et al.,^[70] dass Al-MCM-41 nur bei pH-Werten über 9 instabil ist. Hernandez et al.^[81] beobachteten dagegen die Zersetzung von MCM-41 bei einem pH-Wert von 7.4. Einige Arbeitsgruppen verwendeten besondere Synthesestrategien, um die hydrothermale Stabilität von MCM-41-Materialien zu verbessern; beispielsweise

wurden zeolithische Cluster als Siliciumdioxidquelle mit zahlreichen Tensiden kombiniert.^[64] Ein periodisches mesoporöses Organosilicat mit verbrückenden Aminogruppen (PMO-PA) war für sich bei pH 4–10 instabil, durch Variation des Tensids und der Synthesebedingungen wurden aus den gleichen Organosilikat-Vorstufen jedoch stabilere PMO-PA-Materialien hergestellt, mit deren Hilfe Chlorperoxidase immobilisiert und ohne Aktivitätsverlust zurückgewonnen werden konnte.^[90]

3.4. Isoelektrische Punkte von MPS und Protein

Der isoelektrische Punkt eines Teilchens oder Enzyms bezeichnet den pH-Wert, bei dem die Gesamtladung verschwindet. Ober- oder unterhalb dieses pH-Werts trägt das Protein eine negative bzw. positive Gesamtladung, wobei die Ladungen vorzugsweise an der Moleküloberfläche angeordnet sind. Die Bedeutung des isoelektrischen Punkts (pI) von Enzymen ist oft betont worden, denn man ging davon aus, dass die Adsorption auf einen Träger stattfinden wird, wenn der pH-Wert des Immobilisierungspuffers unter dem pI des Enzyms und über jenem des Trägers liegt.^[27] Bei einem pH-Wert der Lösung unter dem pI des Enzyms weist das Enzym eine positive Netto-Oberflächenladung auf, deren Wechselwirkung mit einem Silicaträger, dessen Oberfläche bei pH > 3 negative Ladungen trägt, günstig ist.^[60,73] Cytochrom c und Trypsin haben ähnliche isoelektrische Punkte und zeigen dennoch bei pH 7 sehr verschiedene Oberflächenpotentiale (Abbildung 4).

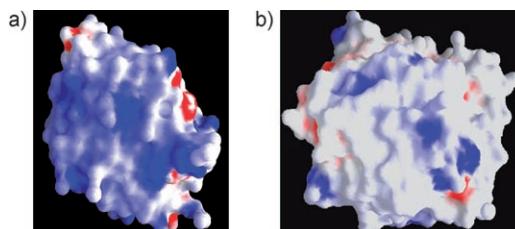


Abbildung 4. Mit GRASP^[96] berechnete elektrostatische Oberflächenpotentiale (rot negativ, blau positiv) für a) Cytochrome c (PDB-Nummer 1HRC, pI = 10.7^[59]) und b) Trypsin (PDB-Nummer 1S0Q, pI = 10.5).

Zur Enzymimmobilisierung scheinen also vereinbare Größen und isoelektrische Punkte notwendig zu sein.^[3,91,92] Diese Merkmale stellen die Adsorption aber nicht immer sicher: Beispielsweise ist Subtilisin klein genug, um in die Poren eines cyanmodifizierten MPS (CNS) zu passen, und die Wechselwirkung ist bei einem pH-Wert von 6.5 elektrostatisch günstig – und dennoch konnten nur geringe Beladungen erzielt werden.^[73]

Die Wechselwirkungen zwischen den beiden Oberflächen werden von der Dichte und Verteilung der Oberflächenladungen auf dem Enzym beeinflusst. Diese Größen werden durch den isoelektrischen Punkt allein nicht angemessen beschrieben und sollten genauer ermittelt werden, um die Oberflächeneigenschaften des Trägermaterials besser zu verstehen. Für den isoelektrischen Punkt von mesoporösem

Siliciumdioxid wird oft ein Wert von 2 angenommen,^[89,93,94] wie er auch für amorphes Siliciumdioxid gefunden wird.^[95] Isoelektrische Punkte mesoporöser Materialien wurden erstmals von Deere et al.^[73] gemessen, die für MCM-41 und CNS Werte von 3.6 bzw. 3.7 fanden. Die Werte für handelsübliches Kieselgel und ein mit F127 hergestelltes mesoporöses Material waren etwas niedriger, nämlich 2.9 bzw. 2.8. Die Funktionalisierung von reinem mesoporösem Siliciumdioxid mit organischen funktionellen Gruppen wird den pI verändern und damit auch die elektrostatischen Wechselwirkungen mit Proteinen beeinflussen.

3.5. Funktionelle Gruppen an den Oberflächen von MPS und Protein

Bei Betrachtung der funktionellen Gruppen an der Oberfläche eines Enzymmoleküls könnte eine komplementäre funktionelle Gruppe an der Oberfläche des Trägers eine starke Wechselwirkung zur Immobilisierung ermöglichen. Mesoporöse Silicate sind mit zahlreichen Gruppen funktionalisiert worden.^[37] Das Verfahren und das Ausmaß der Funktionalisierung können die letztlich erzielte Beladung und Aktivität des immobilisierten Proteins beeinflussen.^[90,91] Allerdings können verbleibende Lösungsmittelmoleküle aus einem Funktionalisierungsschritt nach der Synthese die Proteinaktivität verringern. Zudem kann eine weitgehende Funktionalisierung die Poren blockieren oder verengen. Funktionalisierungsschritte nach der Immobilisierung des Proteins können die Hydrophobie und/oder die Amphiphilie des Trägers erhöhen, um für eine wirkungsvolle Substratdiffusion durch die Poren zu sorgen.^[82,97] Das bei dieser Reaktion verwendete Lösungsmittel kann allerdings die Aktivität des immobilisierten Proteins beeinträchtigen.^[41]

Die kovalente Verknüpfung von Aminogruppen an der Oberfläche des Trägers über Glutaraldehyd mit Aminogruppen des Enzyms kann die Stabilität des immobilisierten Enzyms verbessern, das Ausmaß des Auswaschens wesentlich verringern und eine Wiederverwendung ermöglichen. Auf diese Weise sind verschiedenartige Enzyme wie Penicillin-G-Acylase,^[98b,99] Glucoseoxidase,^[100] α -Amylase,^[101] *Mucor-javanicus*-Lipase,^[102] Glucoseisomerase,^[103] Trypsin,^[41] Invertase^[105] und Glucoamylase^[105] kovalent an MPS immobilisiert worden. Aminopropylethylcarbodiimid wurde verwendet, um Chlorperoxidase^[65,106] und α -L-Arabinofuranosidase^[87] durch Verknüpfung von Aminogruppen des Trägers mit Carbonsäuregruppen des Enzyms kovalent zu binden. Penicillinacylase wurde auch über Epoxygruppen des Trägers, die mit Aminogruppen des Enzyms reagieren können, kovalent an MPS immobilisiert.^[104] Die erhöhte Steifigkeit des Enzyms, die durch das kovalente Anbinden bedingt wird, kann allerdings die Aktivität verringern, z.B. bei Penicillinacylase^[98b] und Glucoseisomerase.^[103]

Die Auswirkungen der Einführung von Metallionen in MPS auf das Adsorptionsvermögen für Proteine und Enzyme sind ebenfalls untersucht worden. So sind aluminiumsubstituierte mesoporöse Silicate verwendet worden, um Enzyme wie Cytochrom c,^[64] Rinderserumalbumin,^[69] Lysozym^[74] und Cytochrom P450^[81] zu adsorbieren. Aburto et al.^[65] impräg-

nierten ein SBA-16-Material mit Cs⁺ und verbesserten so die Beladung an Chlorperoxidase. Xue et al.^[107] funktionalisierten MCM-48-Materialien mit Co²⁺ und erhöhten so die Zahl schwach saurer Zentren an der Materialoberfläche und damit die Beladung mit Penicillin-G-Acylase.

3.6. Optimale Bedingungen der Immobilisierung

Unter optimalen Bedingungen führen Immobilisierungen zu den größten Beladungen und den höchsten spezifischen Aktivitäten. Die Auswirkung des pH-Werts und der Anfangskonzentration auf die Proteinbeladung wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht.^[27,89,108] Ohne vollständige Isotherme können allerdings nur schwer Schlüsse auf die Beladungskapazität gezogen werden, da die Beladungen von der Anfangskonzentration und dem pH-Wert bei der Immobilisierung beeinflusst werden.^[78] Die allgemeinen Kapazitätsbereiche mesoporöser Silicate für Proteine sind in Tabelle 2 anhand von Beispielen veranschaulicht.

Tabelle 2: Ausgewählte Beladungskapazitäten von MPS für Proteine.

Protein	MPS	Beladung [$\mu\text{mol g}^{-1}$]
Cytochrom c ^[78]	SBA-15	41.5
Schweinepankreaslipase ^[61]	SBA-15	3.7
<i>Pseudomonas-cepacia</i> -Lipase ^[111]	MCM-41	0.14
Chlorperoxidase ^[90]	PMO	0.95
Lysozym ^[83]	SBA-15	37
Glucoseoxidase ^[100]	MCF	6.36

Es muss darauf hingewiesen werden, dass ein bestimmter Träger für ein bestimmtes Enzym auch nur deshalb keine hohe Beladungskapazität bieten könnte, weil die Immobilisierungsfaktoren nicht optimiert worden sind. Beispielsweise erhielten Liu et al.^[109] eine Beladung von 3.9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ Hämoglobin auf SBA-15 mit einer Porengröße von 10.6 nm, während Urabe et al.^[110] eine etwas geringere Beladung von 3.3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ für MPS mit einer Porengröße von 7.5 nm erhielten. Zunächst scheint es, dass das Material mit den größeren Poren mehr Protein aufnehmen kann. Die Beladungen sind jedoch nicht vergleichbar, da verschiedene Hämoglobin-Anfangskonzentrationen (0.258 mg mL⁻¹ bei pH 7.2^[109] bzw. 5 mg mL⁻¹ bei pH 6.8^[110]) bei verschiedenen MPS-Konzentrationen (5 mg mL⁻¹ bzw. 10 mg mL⁻¹) verwendet wurden. Auf der Grundlage der veröffentlichten Daten kann daher nicht sicher beurteilt werden, ob SBA-15 tatsächlich mehr Hämoglobin adsorbiert.

Die Zeit, die ein System zum Erreichen des Gleichgewichts benötigt, variiert für jedes Protein und jeden Träger, wobei die Adsorptionsgeschwindigkeit von der relativen Größe der Poren und der Proteine,^[110] der Kanallänge und der Neuanordnung des adsorbierten Proteins nach der Adsorption abhängt.^[70,78,86] Bei langen Adsorptionszeiten sollte sichergestellt werden, dass eine Abnahme der freien Konzentration tatsächlich durch die Adsorption des Proteins und nicht durch Denaturierung oder Ausfallen des Proteins aus der Lösung verursacht ist.

Für die größtmögliche Beladung und Aktivität ist der pH-Wert bei der Adsorption sehr bedeutsam.^[74, 76, 78, 93, 94, 98, 102, 112, 113] Die größtmögliche Beladung und spezifische Aktivität fallen nicht immer zusammen (siehe Abschnitt 3.8). Der pH-Wert kann die Konformation beeinflussen, in der das Protein adsorbiert wird, sowie die Stärke der Wechselwirkung zwischen dem Protein und der Oberfläche, die sich ihrerseits stark auf die Aktivität auswirkt.^[98, 112] Vinu et al.^[74] stellten fest, dass der Puffer und pH-Wert (insbesondere bei hohen pH-Werten), die bei der Adsorption verwendet werden, eine Proteinaggregation verursachen können, was sich auf die Adsorbatbeladung auswirken kann. Durch Anpassung von L- oder S-Kurven an die Adsorptionskurven können die Monoschichtkapazität (d.h. die Menge an Protein, die zum Bedecken der gesamten verfügbaren Teilchenoberfläche mit einer Schicht von Proteinmolekülen notwendig ist) und die Stärke der Wechselwirkung abgeschätzt werden.^[74, 86] In den meisten Fällen wird allerdings nicht diskutiert, ob die Verwendung des Langmuir-Modells für Protein-Träger-Isothermen auch wirklich angemessen ist. Die mit diesem Modell verbundenen Annahmen sind für viele Proteinimmobilisierungsprozesse jedoch nicht zutreffend. Beispielsweise unterscheiden sich die Bindungsenergien für Adsorptionsstellen im Inneren der Mesoporen und außerhalb, es kann zu einer Mehrschichtadsorption kommen, bevor die Monoschicht vollständig ist, und die adsorbierten Proteinmoleküle können miteinander wechselwirken.

Die Auswirkungen der Temperatur, des Drucks und der Enzymreinheit auf die Adsorbatbeladung wurden von anderen Arbeitsgruppen untersucht. So berichteten Lei et al.,^[86] dass die Adsorptionsgeschwindigkeit für Lysozym von der Anfangskonzentration unabhängig war, eine Temperaturerhöhung jedoch zu einer schnelleren Adsorption und höheren Beladungen führte. Einer der Schritte, von denen ein Einfluss auf die Adsorptionsgeschwindigkeit eines Proteins in einem mesoporösen Material angenommen wird, ist die Bewegung von adsorbierten Proteinmolekülen entlang der Kanäle (Neuanordnung). Dadurch werden die Poren in geringerem Ausmaß in der Nähe der Eingänge blockiert, sodass mehr Proteinmoleküle in die Kanäle eintreten können. Dies erfordert den Bruch der ersten Wechselwirkung zwischen dem Protein und der Trägeroberfläche, einen endothermen Vorgang, der bei höheren Temperaturen leichter stattfindet. Kürzlich fanden Han et al.,^[97b] dass die Beladung großsporiger, hydrophob funktionalisierter Materialien mit hydrophilen CALB-Molekülen durch hohe Drücke erhöht wird, wobei höhere Beladungen mit geringerem Auswaschen erzeugt werden als durch Immobilisieren unter herkömmlichem Rühren. Die Autoren merkten an, dass die Lipase CALB zwar bei solchen hohen Drücken stabil ist, andere Proteine jedoch möglicherweise nicht. Auch die Reinheit kann die Proteinbeladung beeinflussen. Adsorptionsisothermen für reines und verunreinigtes Trypsin auf MCM-41 zeigten, dass bei der Verwendung von reinem Trypsin typischerweise fünfmal mehr Protein adsorbiert wurde (ca. 5 µmol g⁻¹). Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit CNS erhalten.^[114, 115]

3.7. Wechselwirkungen zwischen Protein und Träger

Es ist schwierig, aus einer unter bestimmten Bedingungen beobachteten Beladung die genaue Beschaffenheit der Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Träger zu ermitteln. Meist ist jedoch klar, ob kovalente Bindungen oder physikalische Adsorption zugrundeliegen. Um zu ermitteln, ob die Wechselwirkung eines physikalisch adsorbierten Proteins mit einem Träger hydrophil, hydrophob oder elektrostatisch ist, können verschiedene Experimente durchgeführt werden. Solche Experimente umfassen die Verwendung von Desorptionsmitteln wie Polyethylenglycol (PEG), Methanol und Ammoniumsulfat oder eine Veränderung der Ionenstärke des Immobilisierungspuffers.^[73, 92, 114] Beispielsweise scheint Cytochrom c an unterschiedliche Materialien nicht immer auf die gleiche Weise zu adsorbieren. Balkus et al.^[27] zogen den Schluss, dass zwischen Cytochrom c und MCM-41 hydrophile Wechselwirkungen vorliegen. Untersuchungen von Deere et al.^[73] mit Desorptionsmitteln und verschiedenen Ionenstärken zeigten, dass zwischen Cytochrom c und CNS elektrostatische Wechselwirkungen überwiegen, mit Kieselgel dagegen hydrophobe Wechselwirkungen. In einer anderen Untersuchung wurde gefunden, dass Cytochrom c mit SBA-15 elektrostatisch wechselwirkt, mit einem PMO mit Ethylenbrücken (MSE) dagegen hydrophob/hydrophil.^[59]

Sowohl für SBA-15 als auch für MSE wurden bei pH-Werten nahe dem pI des Proteins höhere Beladungen mit Cytochrom c erhalten. Nahe dem pI ist die Nettoladung jedes Proteins beinahe Null, sodass die Abstoßung zwischen Cytochrom-c-Molekülen gering ist und daher höhere Beladungen erhalten werden.^[59] Bei pH-Werten weit unter dem pI ist die Abstoßung zwischen den Proteinmolekülen stärker als die elektrostatische Anziehung an die Oberfläche des mesoporösen Trägers, was die Beladung verringert. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Adsorption von Lysozym auf MCM-41 und SBA-15 gemacht.^[71, 74, 78] Bei der Immobilisierung von Lysozym auf ein ethylenverbrücktes PMO wurden die höchsten Beladungen nahe des pI des Enzyms beobachtet, bei dem hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den unpolaren Seitenketten des Enzyms und den hydrophoben Ethylengruppen des Trägers überwiegen.^[84] BSA und Myoglobin zeigten bei der Adsorption auf SBA-15 ein ähnliches Verhalten.^[71] Goradia et al.^[114] konnten bei Desorptionsuntersuchungen zeigen, dass bei der Immobilisierung von Trypsin auf CNS hydrophobe/hydrophile Wechselwirkungen überwiegen.

3.8. Aufrechterhaltung der enzymatischen Aktivität nach der Immobilisierung

Die Aktivität des immobilisierten Enzyms kann durch die Wechselwirkung mit der mesoporösen Oberfläche beeinträchtigt werden.^[41, 99] Es ist schwer, eine ausgewogene Wechselwirkung zu erzielen, die stark genug ist, um ein Auswaschen zu verhindern, und dabei schwach genug, um dem Enzym noch ausreichende Flexibilität zu gewähren, sodass es seine katalytische Aktivität behält. Wenn ein Enzym während der Untersuchung vom Träger gewaschen wird, ist es

schwer zu beurteilen, ob das immobilisierte Enzym seine Aktivität behalten hat oder ob es das ausgewaschene Enzym ist, das die Reaktion katalysiert. Wenn die Reaktion auch nach Entfernen eines immobilisierten Enzyms abläuft, ist das Enzym wahrscheinlich vom Träger gewaschen worden.^[94] Ähnlich wie durch Vernetzen des Enzyms oder Proteins mit dem Träger kann das Auswaschen verringert werden, indem die Enzymmoleküle nach der Adsorption auf einer mesoporösen Oberfläche oder im Inneren einer Mesopore ihrerseits zu Enzymaggregaten vernetzt werden (cross-linked enzyme aggregates, CLEAs). Bei α -Chymotrypsin und *Mucor-javanicus*-Lipase führte das Vernetzen zu einem Material, bei dem die Aktivität erhalten blieb und eine verbesserte Stabilität gegen Schütteln und Trypsinabbau beobachtet wurde.^[57,116] Ähnlich wurde Papain nach der Adsorption auf MCM-48 mit Glutaraldehyd vernetzt, was die Aktivität um 30 % gegenüber dem freien Protein verringerte. Es zeigte aber eine verbesserte Temperatur- und pH-Stabilität und konnte ohne weiteren Aktivitätsverlust über einen Zeitraum von 12 Tagen zurückgewonnen werden.^[117] Ein solches Vernetzen kann jedoch die spezifischen Proteinaktivitäten senken.^[57]

Deere et al.^[73,108] berichteten, dass Cytochrom c nach dem Immobilisieren auf mesoporösen Materialien eine höhere Aktivität zeigt als das freie Enzym in Lösung; dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass im immobilisierten Zustand High-spin-Fe³⁺-Zentren vorhanden sind. Die höchste Aktivität wurde bei geringen Cytochrom-c-Beladungen beobachtet, vermutlich weil bei höheren Beladungen der Zugang zu den Proteinmolekülen durch blockierte Poren oder Mehrschichtadsorption erschwert war. Eine höhere Aktivität bei niedrigen Beladungen wurde auch für immobilisierte Glucoseoxidase,^[85,92] Mikroperoxidase-11^[118] und *Candida-antarctica*-Lipase (CALB) beobachtet.^[119] Im Ganzen variiert die Aktivität des immobilisierten Proteins mit dem speziellen Protein, dem mesoporösen Träger, dem Substrat und dem Immobilisierungsverfahren. Beispielsweise war Organophosphorhydrolase (OPH) nach der Immobilisierung in einem carboxyfunktionalisierten mesoporösen Silicat zweimal so aktiv wie das freie Enzym.^[91,92] Auf MCF immobilisierte Chlorperoxidase war nur halb so aktiv wie das freie Enzym,^[93] während auf SBA-16 kovalent immobilisiertes CPO aktiver war als das physikalisch adsorbierte Enzym.^[65] Chong et al.^[98] fanden, dass die meisten der zum Immobilisieren von Penicillinacylase (PA) verwendeten funktionalisierten SBA-15-Materialien die Aktivität des Enzyms verringerten; nur PA auf vinylfunktionalisiertem SBA-15 war doppelt so aktiv wie freie PA. Auf SBA-15 immobilisierte Schweinepankreaslipase zeigte eine mehr als doppelt so hohe Aktivität wie die freie Lipase, wenn nach der Immobilisierung des Enzyms silaniert wurde, um den Zugang von unlöslichen Substraten zu der Lipase zu erleichtern.^[82]

Bei einigen Proteinen und Antikörpern, z.B. α -Chymotrypsin^[63] und Aldolase-I-Antikörper,^[67] wurde die Enantioselektivität durch die Immobilisierung auf mesoporösen Materialien nicht beeinträchtigt. Jedes System aus Protein und mesoporösem Träger verhält sich also unterschiedlich, sodass die relative Aktivität des Biokatalysators jeweils neu ermittelt werden muss.

3.9. Aktivität immobilisierter Proteine in organischen Medien

Native Proteine zeigen in organischen Lösungsmitteln oft eine nur geringe Aktivität,^[120] die jedoch durch Immobilisieren auf anorganischen Trägern verbessert werden kann. Dies kann zu ungewöhnlichen Anwendungen bei der organischen Synthese führen.^[4,9,121] Als Vorteil der Verwendung von immobilisierten Enzymen in organischen Lösungsmitteln kann das Auswaschen verringert sein, vorausgesetzt, die Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem Träger ist hydrophil oder elektrostatisch.^[102] Takahashi et al.^[62] konnten zeigen, dass in mesoporösen MCM- und FSM-Materialien immobilisierte Meerrettich-Peroxidase in organischen Lösungsmitteln eine erhöhte Aktivität aufweist. Deere et al.^[46] berichteten, dass in mesoporösen Materialien immobilisiertes Cytochrome c in organischen Lösungsmitteln peroxidierend wirkt und dass in den Poren von MCM-41 immobilisiertes Cytochrome c in wässrigen und nichtwässrigen Lösungsmitteln über einen breiten Temperaturbereich aktiver war, als wenn das Enzym an der äußeren Oberfläche eines MCM-41-Materials mit kleineren Poren immobilisiert wurde. Goradia et al.^[112] berichteten, dass auf verschiedenen MPS immobilisiertes Trypsin in vielen organischen Lösungsmitteln aktiver und stabiler war als lyophilisiertes Trypsin. Weitere Beispiele sind in Tabelle 3 gesammelt. So blieb die Enantioselektivität von Lipasen bei der Acetylierung sekundärer^[77] und primärer^[113] Alkohole nach der Adsorption auf mesoporösen Materialien erhalten, wobei die Aktivität für immobilisierte Lipasen in manchen Fällen sogar höher war als für das freie Enzym.^[101] Dies zeigt, dass der begrenzte Raum in mesoporösen Trägern den eingeschlossenen Proteinen die notwendige Stabilität verleiht, damit sie ihre Aktivität und Selektivität in organischen Lösungsmitteln behalten können.

3.10. Wiederverwendbarkeit und verbesserte Stabilität des immobilisierten Proteins

Bei der Biokatalyse ist die dauerhafte Immobilisierung des Enzyms auf dem Träger sehr wichtig. Wenn das Enzym zu leicht vom Träger abgewaschen wird, kann es aus dem Reaktionsgemisch nur schwer zurückgewonnen werden. Für eine erfolgreiche Immobilisierung ist es entscheidend, dass der Träger das Enzym während des Aktivitätstests festhält und so eine Wiederverwendung bei nur geringem Aktivitätsverlust ermöglicht. Die Immobilisierung in den Mesoporen kann auch die Stabilität des Proteins gegen Wärme, extreme pH-Werte, Denaturierungsmittel und organische Lösungsmittel verbessern. So berichteten Zheng et al.^[122] über eine erhöhte Wärmestabilität immobilisierter *Pseudomonas-cepacia*-Lipase unter den optimalen Bedingungen ihres Tests (bei pH 8 in Gegenwart des Tensids CTAB). Die immobilisierte Lipase wurde achtmal wiederverwendet, und der Aktivitätsverlust um 50 % wurde dem Auswaschen und/oder mechanischen Verlusten bei der Reaktion und der Rückgewinnung zugeschrieben. In MCM-41 immobilisiertes α -Chymotrypsin wurde innerhalb einer Woche über 100-mal wiederverwendet.^[63] Auf Octatriethoxysilan-funktionalisiertem mesoporösem Siliciumdioxid immobilisiertes CALB zeigte

Tabelle 3: Eigenschaften ausgewählter Proteine nach der Adsorption auf MPS.

Protein	Auswaschen	Aktivität ^[a]	Stabilität ^[b]	Wieder-verwendung
Cytochrom c ^[64, 73, 108]	nein	höher	verbessert	–
Mikroperoxidase-11 ^[118]	nein	geringer	–	–
Lysozym ^[84, 86]	nein	–	–	–
Trypsin ^[41, 112, 114, 126, 127]	nein	höher höher ^[c]	verbessert verbessert ^[c]	ja
Organophosphorhydrolase ^[45, 91, 92]	nein	höher	verbessert	–
α-Chymotrypsin ^[57, 63, 116]	nein	weniger	verbessert	ja
Meerrettich-Peroxidase ^[62, 73]	–	höher ^[c]	verbessert	–
Chlorperoxidase ^[65, 90, 93, 94, 106]	nein	weniger ^[c]	verbessert	ja
Manganperoxidase ^[66]	–	aktiv	verbessert	ja
Papain ^[27, 117]	nein	weniger	verbessert	ja
Pepsin ^[73]	–	–	–	–
Rinderserumalbumin ^[71, 73]	–	–	–	–
Subtilisin ^[62, 73]	–	höher ^[c]	verbessert	–
Myoglobin ^[71, 127]	–	–	–	–
Metmyoglobin ^[128]	–	höher ^[c]	–	–
Hämoglobin ^[109, 110]	–	höher ^[d]	verbessert	ja ^[c]
Conalbumin ^[2, 127]	ja	–	–	–
Ovalbumin ^[2]	ja	–	–	–
Trypsininhibitorprotein ^[2]	ja	–	–	–
α-Amylase ^[101]	nein	weniger	verbessert	–
Cytochrom P450 CYP2C9 ^[81]	–	weniger	–	–
Cytochrom P450 CYP2B4 ^[81]	–	weniger	–	–
Penicillinacylase ^[98, 99, 104]	nein	höher	verbessert	ja
Glucoseoxidase ^[85, 92, 100]	nein	höher	verbessert	ja
Candida-antarctica-Lipase B ^[97, 113, 119]	nein	höher ^[c]	verbessert	ja
Schweinepankreaslipase ^[75, 82]	nein	höher	–	ja
Mucor-javanicus-Lipase ^[102, 116]	nein	aktiv	verbessert	–
Pseudomonas-cepacia-Lipase ^[122]	ja	höher	verbessert	ja
Newlase-F-Lipase ^[129]	–	höher	–	–
α-L-Arabinofuranosidase ^[87]	–	weniger	verbessert	–
Fumarase ^[126]	nein	weniger	verbessert	ja
Schweineleberesterase ^[126]	nein	weniger	verbessert	ja
Glucoseisomerase ^[103]	–	höher	verbessert	–
Acetylcholinesterase ^[130]	ja	weniger	–	–
Invertase ^[105]	–	aktiv	–	–
Glucoamylase ^[105]	–	weniger	–	–
Polyphenoloxidase ^[131]	–	weniger	gut	–
Thermolysin ^[132]	–	aktiv	–	–
Aldolase-Antikörper 84G3 ^[67]	nein	höher ^[c]	verbessert ^[c]	ja ^[c]
scFV-Antikörperfragment ^[3]	nein	–	gut	–

[a] Im Vergleich zu freiem Enzym in Lösung. [b] Hydrothermal, gegenüber Denaturierungsmittel oder bei Lagerung. [c] In organischen Lösungsmitteln. [d] Elektroaktivität. –: nicht bestimmt.

bei 15 Zyklen in einem organischen Medium keinen Aktivitätsverlust.^[119] Chlorperoxidase wurde durch Immobilisierung in den Poren von SBA-15 stabiler gegen Wasserstoffperoxid,^[94] und nach Immobilisierung auf einem aminfunktionalisierten PMO (PMO-PA) wurde sie mit nur geringem Aktivitätsverlust 20-mal wiederverwendet.^[90]

Eine Möglichkeit zum Verringern des Auswaschens besteht im Verkleinern der Porenöffnungen durch Silanieren nach der Proteinadsorption.^[27, 75] Dieses Vorgehen kann jedoch auch zur Desaktivierung des Proteins führen. Als auf MCM-41 immobilisierte Schweinepankreaslipase (PPL) nach der Adsorption mit Vinyltrimethoxysilan silaniert wurde, verringerte sich zwar die Aktivität auf ungefähr 40% im Vergleich zu freier PPL, der fertige Biokatalysator zeigte aber

nach fünfmaliger Wiederverwendung keinen Aktivitätsverlust.^[75] Bei der Immobilisierung von PPL auf SBA-15, das größere Poren als MCM-41 aufweist, wurden dagegen die Porenöffnungen durch die Silanierung nicht ausreichend geschlossen, sodass ein Auswaschen möglich war. Dieses Problem wurde erst kürzlich überwunden, indem nach dem Silanieren Methacrylatgruppen auf dem Silicat polymerisiert wurden, um die Poreneingänge weiter zu verkleinern.^[61, 82]

Wie in Abschnitt 3.8 bereits für vernetzte Enzymaggregate erwähnt, kann durch Immobilisieren auch die Lagerfähigkeit verbessert werden. So war auf MCM-41 immobilisiertes Trypsin auch nach einer Woche bei 25 °C stabil, während freies Trypsin vollständig inaktiviert war,^[27] und auf CNS immobilisiertes Trypsin zeigte verbesserte Stabilität in wässrigen und organischen Lösungen.^[112, 114] Auf carboxyfunktionalisiertem mesoporösem Siliciumdioxid immobilisierte Organophosphorhydrolase (OPH) war nach 145 Tagen Lagerung aktiver als freie OPH.^[91] Für Biosensoren mit immobilisierten Proteinen ist die Lagerungsstabilität von großer Bedeutung. Hu et al.^[3] berichteten, dass die Antigen-Bindungsfähigkeit eines immobilisierten Antikörperfragments auch nach 42 Tagen Lagerung unverändert war.

Wenn das immobilisierte Enzym nicht vom mesoporösen Träger gewaschen wird, kann es zurückgewonnen werden. Selbst

wenn es eine geringere Aktivität als das freie Enzym zeigt, kann es wegen seiner einfachen Rückgewinnung aus dem Reaktionsgemisch und seiner Wiederverwendbarkeit der insgesamt bessere Katalysator sein und zahlreiche Anwendungen finden. In Tabelle 3 sind einige Eigenschaften mesoporöser Biokatalysatoren zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass sich nur durch eine erfolgreiche Rückgewinnung sicherstellen lässt, ob das Enzym während des Aktivitätstests immobilisiert bleibt. Von den in mesoporösen Materialien immobilisierten Enzymen ist nur etwa ein Drittel auf seine Rückgewinnbarkeit untersucht worden, und in vielen dieser Fälle treten bei jedem Zyklus Aktivitätsverluste auf.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Enzyme sind komplexe biologische Moleküle, die unter Verwendung von elektrostatischen, hydrophoben/hydrophilen und kovalenten Wechselwirkungen mit verschiedenen Graden an Stabilität, Aktivität und Wiederverwendbarkeit auf mesoporösen Materialien immobilisiert werden können. Die maximale Enzymmenge, die ein mesoporöses Material adsorbieren kann, variiert mit dem pH-Wert, der Ionenstärke, dem Porendurchmesser und -volumen, den Oberflächeneigenschaften, dem isoelektrischen Punkt, der Morphologie, der Teilchengröße und den Adsorptionsbedingungen. Bei vielen Enzymen kann die Immobilisierung die Lagerfähigkeit verbessern, die Oberfläche des Trägers muss jedoch derart funktionalisiert sein, dass sie eine ausreichende Beladung mit Protein in der richtigen Orientierung zulässt. Für Anwendungen bei der Biokatalyse muss das immobilisierte Enzym außerdem wiederverwendbar sein, d.h. der Träger muss das Enzym nicht nur beim Waschen mit Wasser oder Immobilisierungspuffern festhalten, sondern auch beim Waschen mit Arbeitslösungen. Für den Entwurf eines erfolgreichen Biokatalysators aus mesoporösem Träger und immobilisiertem Protein ist ein genaues Verständnis der Konformation und des aktiven Zentrums des Proteins notwendig. Aktuelle Arbeiten waren mit der Entwicklung funktionalisierter mesoporöser Silicatstrukturen^[37] als Träger befasst, deren geordnete Porositäten groß genug sind, um Proteine mit interessanten katalytischen Eigenschaften in ihre Kanäle aufzunehmen. Diese Arbeiten zeigen die Notwendigkeit von Modellproteinen wie Lysozym und Cytochrom c auf komplexere Enzyme überzugehen, die für Synthesen nützlich sein können (Tabelle 3). In Anbetracht der in Abbildung 3 dargestellten Faktoren und der Verfügbarkeit von MPS mit einstellbaren Oberflächenfunktionalitäten kann die Entwicklung stabiler und aktiver Biokatalysatoren aus einem großen Potenzial schöpfen.

Wir bedanken uns für finanzielle Unterstützung durch Enterprise Ireland (Grant Nr. SC/2003/0159) und das Programme for Research in Third Level Institutions. Wir danken Prof. B. Kieran Hodnett für seine Unterstützung und wertvolle Diskussionen.

Eingegangen am 14. November 2007
Online veröffentlicht am 2. Oktober 2008

Übersetzt von Dr. Thomas Steiner, Neu-Ulm

- [1] L. Qiao, Y. Liu, S. Hudson, P. Yang, E. Magner, B. Liu, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 151–157.
- [2] Y.-J. Han, G. D. Stucky, A. Butler, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9897–9898.
- [3] X. Hu, S. Spada, S. White, S. Hudson, E. Magner, J. G. Wall, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 18703–18709.
- [4] R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289–1307.
- [5] I. I. Slowing, B. G. Trewyn, V. S. Lin, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8845–8849.
- [6] K. Y. Lee, S. H. Yuk, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 669–697.
- [7] a) M. Vallet-Regi, A. Ramila, R. P. del Real, J. Perez-Pariente, *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 308–311; b) M. Vallet-Regi, F. Balas, D.

Arcos, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7692–7703; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.

- [8] H. Fan, Y. Hu, C. Zhang, X. Li, R. Lv, L. Qin, R. H. Zhu, *Biomaterials* **2006**, *27*, 4573–4580.
- [9] A. Schmid, J. S. Dordick, B. Hauer, A. Kiener, M. Wubbolts, B. Witholt, *Nature* **2001**, *409*, 258–268.
- [10] L. W. Powell in *Industrial Enzymology*, 2. Aufl. (Hrsg.: T. Godfrey, S. West), MacMillan, London, **1996**, S. 267.
- [11] *Proteins at Interfaces II: Fundamentals and Applications* (Hrsg.: T. A. Horbett, J. L. Brash), American Chemical Society, Washington, DC, **1995**.
- [12] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3690–3700.
- [13] M. Hartmann, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 4577–4593.
- [14] J. Kim, J. W. Grate, P. Wang, *Chem. Eng. Sci.* **2006**, *61*, 1017–1026.
- [15] X. S. Zhao, X. Y. Bao, W. Guo, F. Y. Lee, *Mater. Today* **2006**, *9*, 32–39.
- [16] J. H. Clark, D. J. Macquarrie, S. J. Taverner, *Dalton Trans.* **2006**, 4297–4309.
- [17] A. Vinu, M. Miyahara, K. Ariga, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 1510–1532.
- [18] I. Gill, A. Ballesteros, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8587–8598.
- [19] J. D. Brennan, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 827–835.
- [20] Y. Yi, S. Kermasha, L. L'Hocine, R. Neufeld, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *19–20*, 319–325.
- [21] E. S. Lee, M. J. Kwon, H. Lee, J. J. Kim, *Int. J. Pharm.* **2007**, *331*, 27–37.
- [22] I. Chibata, *Immobilised Enzymes*, Hastel, New York, **1978**.
- [23] H. H. Weetall, *Science* **1969**, *166*, 615.
- [24] M. Mureseanu, A. Galarneau, G. Renard, F. Fajula, *Langmuir* **2005**, *21*, 4648–4655.
- [25] J. L. Blin, C. Gerardin, C. Carteret, L. Rodehuser, C. Selve, M. J. Stebe, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1479–1486.
- [26] I. Roy, M. N. Gupta, *Methods Biotechnol.* **2006**, *22*, 87–95.
- [27] J. F. Diaz, K. J. Balkus, *J. Mol. Catal. B* **1996**, *2*, 115–126.
- [28] C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, *Nature* **1992**, *359*, 710–712.
- [29] J. S. Beck et al., *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 10834–10843; siehe die Hintergrundinformationen.
- [30] A. Firouzi et al., *Science* **1995**, *267*, 1138–1143; siehe die Hintergrundinformationen.
- [31] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6024–6036.
- [32] D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *Science* **1998**, *279*, 548–552.
- [33] S. Inagaki, A. Koiwai, N. Suzuki, Y. Fukushima, K. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 1449–1457.
- [34] P. Schmidt-Winkel, W. W. Lukens, D. Zhao, P. Yang, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 254–255.
- [35] J. Fan, C. Yu, J. Lei, Q. Zhang, T. Li, B. Tu, W. Zhou, D. Zhao, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10794–10795.
- [36] Y. Wan, D. Zhao, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2821–2860.
- [37] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell, M. Fröba, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 3290–3328; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 3216–3251.
- [38] V. V. Gulians, M. A. Carreon, Y. S. Lin, *J. Membr. Sci.* **2004**, *235*, 53–72.
- [39] X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, J. Liu, K. M. Kemner, *Science* **1997**, *276*, 923–926.
- [40] J. Liu, X. Feng, G. E. Fryxell, L.-Q. Wang, A. Y. Kim, M. Gong, *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 161–165.
- [41] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, N. P. Botting, *J. Mol. Catal. B* **2001**, *15*, 81–92.
- [42] Y. S. Cho, J. C. Park, B. Lee, Y. Kim, J. Yi, *Catal. Lett.* **2002**, *81*, 89–96.
- [43] R. J. P. Corriu, E. Lancelle-Beltran, A. Mehdi, C. Reye, S. Brandes, R. Guillard, *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 1355–1362.

- [44] a) M. Alvaro, A. Corma, D. Das, V. Fornes, H. Garcia, *Chem. Commun.* **2004**, 956–957; b) W. Yan, B. Chen, S. M. Mahurin, E. W. Hagaman, S. Dai, S. H. Overbury, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 2793–2796; c) C.-M. Yang, B. Zibrowius, F. Schüth, *Chem. Commun.* **2003**, 1772–1773; d) Y.-H. Liu, H.-P. Lin, C.-Y. Mou, *Langmuir* **2004**, 20, 3231–3239.
- [45] C. H. Lei, M. M. Valenta, K. P. Saripalli, E. J. Ackerman, *J. Environ. Qual.* **2007**, 36, 233–238.
- [46] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19, 1238–1243.
- [47] S. Lowell, J. E. Shields, *Powder Surface Area and Porosity*, 3. Aufl., Chapman and Hall, London, **1991**.
- [48] S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, 60, 309.
- [49] E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda, *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, 73, 373.
- [50] P. I. Ravikovich, A. V. Neimark, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6817–6823.
- [51] a) M. Jaroniec, M. Kruk, J. P. Olivier, *Langmuir* **1999**, 15, 5410–5413; b) B. C. Lippens, J. H. de Boer, *J. Catal.* **1965**, 4, 319–323.
- [52] M. Kruk, V. Antochshuk, M. Jaroniec, A. Sayari, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10670–10678.
- [53] a) M. Kruk, M. Jaroniec, *Chem. Mater.* **2001**, 13, 3169–3183; b) M. Thommes, B. Smarsly, M. Groenewolt, P. I. Ravikovich, A. V. Neimark, *Langmuir* **2006**, 22, 756–764.
- [54] M. Thommes, *Nanoporous Materials: Science and Engineering* (Hrsg.: G. Q. Lu, X. S. Zhao), Imperial College Press, London, Kap. 11, **2004**.
- [55] A. Guinier, *The Structure of Matter*, Edward Arnold, London, **1984**.
- [56] S. P. Hudson, D. A. Tanner, W. Redington, E. Magner, B. K. Hodnett, S. Nakahara, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 3467–3474.
- [57] J. Lee et al., *Small* **2005**, 1, 744–753; siehe die Hintergrundinformationen.
- [58] J. M. Nelson, E. G. Griffin, *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 1109–1115.
- [59] S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, B. K. Hodnett, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 19496–19506.
- [60] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Catal. Lett.* **2003**, 85, 19–23.
- [61] J. He, Z. Song, H. Ma, L. Yang, C. Guo, *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 4307–4315.
- [62] a) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 3301–3305; b) H. Takahashi, B. Li, T. Sasaki, C. Miyazaki, T. Kajino, S. Inagaki, *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, 44–45, 755–762.
- [63] N. W. Fadnavis, V. Bhaskar, M. L. Kantam, B. M. Choudary, *Biotechnol. Prog.* **2003**, 19, 346–351.
- [64] C.-H. Lee, J. Lang, C.-W. Yen, P. C. Shih, T.-S. Lin, C.-Y. Mou, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 12277–12286.
- [65] J. Aburto, M. Ayala, I. Bustos Jaimes, C. Montiel, E. Terres, J. M. Dominguez, E. Torres, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 83, 193–200.
- [66] T. Sasaki, T. Kajino, B. Li, H. Sugiyama, H. Takahashi, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 2208–2212.
- [67] S. Seelan, A. K. Sinha, K. Kato, Y. Yokogawa, *Adv. Mater.* **2006**, 18, 3001–3004.
- [68] H. H. P. Yiu, P. A. Wright, N. P. Botting, *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, 44–45, 763–768.
- [69] L. Ji, A. Katiyar, N. G. Pinto, M. Jaroniec, P. G. Smirniotis, *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, 75, 221–229.
- [70] A. Katiyar, L. Ji, P. G. Smirniotis, N. G. Pinto, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 80, 311–320.
- [71] A. Katiyar, L. Ji, P. G. Smirniotis, N. G. Pinto, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1069, 119–126.
- [72] J. Deere, M. Serantoni, K. J. Edler, J. G. Wall, B. K. Hodnett, E. Magner, *Langmuir* **2004**, 20, 532–536.
- [73] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 7340–7347.
- [74] a) A. Vinu, V. Murugesan, M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 7323–7330; b) A. Vinu, M. Miyahara, K. Ariga, J. Phys. Chem. B **2005**, 109, 6436–6441.
- [75] H. Ma, J. He, D. G. Evans, X. Duan, *J. Mol. Catal. B* **2004**, 30, 209–217.
- [76] A. Vinu, C. Streb, V. Murugesan, M. Hartmann, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 8297–8299.
- [77] K. Kato, R. Irimescu, T. Saito, Y. Yokogawa, H. Takahashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2003**, 67, 203–206.
- [78] A. Vinu, V. Murugesan, O. Tangermann, M. Hartmann, *Chem. Mater.* **2004**, 16, 3056–3065.
- [79] M. E. Gimon-Kinsel, V. L. Jimenez, L. Washmon, K. J. Balikus, Jr., *Stud. Surf. Sci. Catal.* **1998**, 117, 373–380.
- [80] A. Macario, V. Calabro, S. Curcio, M. De Paola, G. Giordano, G. Iorio, A. Katovic, *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2002**, 142, 1561–1568.
- [81] M. C. R. Hernandez, J. E. M. Wejebe, J. I. V. Alcantara, R. M. Ruvalcaba, L. A. G. Serrano, J. T. Ferrara, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 80, 25–31.
- [82] J. He, Y. Xu, H. Ma, Q. Zhang, D. G. Evans, X. Duan, *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 298, 780–786.
- [83] J. Fan, J. Lei, L. Wang, C. Yu, B. Tu, D. Zhao, *Chem. Commun.* **2003**, 2140–2141.
- [84] S. Z. Qiao, H. Djokoputro, Q. Hu, G. Q. Lu, *Prog. Solid State Chem.* **2006**, 34, 249–256.
- [85] D. Lee et al., *Adv. Mater.* **2005**, 17, 2828–2833; siehe die Hintergrundinformationen.
- [86] J. Lei, J. Fan, C. Yu, L. Zhang, S. Jiang, B. Tu, D. Zhao, *Microporous Mesoporous Mater.* **2004**, 73, 121–128.
- [87] M. Tortajada, D. Ramon, D. Beltran, P. Amoros, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 3859–3868.
- [88] J. Sun, H. Zhang, R. Tian, D. Ma, X. Bao, D. S. Su, H. Zou, *Chem. Commun.* **2006**, 1322–1324.
- [89] J. M. Kisler, A. Dähler, G. W. Stevens, A. O'Connor, *Microporous Mesoporous Mater.* **2001**, 44–45, 769–774.
- [90] S. Hudson, J. Cooney, B. K. Hodnett, E. Magner, *Chem. Mater.* **2007**, 19, 2049–2055.
- [91] C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11242–11243.
- [92] C. H. Lei, Y. Shin, J. K. Magnuson, G. Fryxell, L. L. Lasure, D. C. Elliot, J. Liu, E. J. Ackerman, *Nanotechnology* **2006**, 17, 5531–5538.
- [93] Y.-J. Han, J. T. Watson, G. D. Stucky, A. Butler, *J. Mol. Catal. B* **2002**, 17, 1–8.
- [94] M. Hartmann, C. Streb, *J. Porous Mater.* **2006**, 13, 347–352.
- [95] R. K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, **1979**, S. 188.
- [96] A. Nicholls, K. A. Sharp, B. Honig, *Proteins* **1991**, 11, 281.
- [97] a) G. D. Yadav, S. R. Jadhav, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 86, 215–222; b) Y. Han, S. S. Lee, J. Y. Ying, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 643–649.
- [98] a) A. S. M. Chong, X. S. Zhao, *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 237, 398–404; b) A. S. M. Chong, X. S. Zhao, *Catal. Today* **2004**, 93–95, 293–299.
- [99] H. Jing, X. Li, D. G. Evans, X. Duan, C. Li, *J. Mol. Catal. B* **2000**, 11, 45–53.
- [100] X. Zhang, R.-F. Guan, D.-Q. Wu, K.-Y. Chan, *J. Mol. Catal. B* **2005**, 33, 43–50.
- [101] P. H. Pandya, R. V. Jasra, B. L. Newwalkar, P. N. Bhatt, *Microporous Mesoporous Mater.* **2005**, 77, 67–77.
- [102] A. Salis, D. Meloni, S. Ligas, M. Monduzzi, V. Solinas, E. Dumitriu, *Langmuir* **2005**, 21, 5511–5516.

- [103] C. Lei, Y. Shin, J. Liu, E. J. Ackerman, *Nanoletters* **2007**, *7*, 1050–1053.
- [104] Y. Lu, G. Lu, Y. Wang, Y. Guo, Y. Guo, Z. Zhang, Y. Wang, X. Liu, *Adv. Funct. Mater.* **2007**, *17*, 2160–2166.
- [105] K. Szymanska, J. Bryjak, J. Mrowiec-Bialon, A. B. Jarzebski, *Microporous Mesoporous Mater.* **2007**, *99*, 167–175.
- [106] C. Montiel, E. Terres, J. M. Dominguez, J. Aburto, *J. Mol. Catal. B* **2007**, *48*, 90–98.
- [107] P. Xue, G. Lu, Y. Guo, Y. Wang, Y. Guo, *J. Mol. Catal. B* **2004**, *30*, 75–81.
- [108] J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Chem. Commun.* **2001**, 465–466.
- [109] Y. Liu, Q. Xu, X. Feng, J. J. Zhu, W. Hou, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1553–1559.
- [110] Y. Urabe, T. Shiomi, T. Itoh, A. Kawai, T. Tsunoda, F. Mizukami, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 668–674.
- [111] E. L. Pires, E. A. Miranda, G. P. Valenca, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2002**, *98–100*, 963–976.
- [112] D. Goradia, J. Cooney, B. K. Hodnett, E. Magner, *Biotechnol. Prog.* **2006**, *22*, 1125–1131.
- [113] E. Dumitriu, F. Secundo, J. Patarin, I. Fechete, *J. Mol. Catal. B* **2003**, *22*, 119–133.
- [114] D. Goradia, J. Cooney, B. K. Hodnett, E. Magner, *J. Mol. Catal. B* **2005**, *32*, 231–239.
- [115] J. M. Gomez, J. Deere, D. Goradia, J. Cooney, E. Magner, B. K. Hodnett, *Catal. Lett.* **2003**, *88*, 183–186.
- [116] M. I. Kim et al., *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 210–218; siehe die Hintergrundinformationen.
- [117] B. Zhao, B. Shi, R. Ma, *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 436–441.
- [118] a) T. J. Pisklak, M. Macias, D. H. Coutinho, R. S. Huang, K. J. Balkus, Jr., *Top. Catal.* **2006**, *38*, 269–278; b) P. B. Zhang, M. T. Janicke, W. H. Woodruff, J. A. Bailey, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 19547–19549.
- [119] R. M. Blanco, P. Terreros, M. Fernandez-Perez, C. Otero, G. Diaz-Gonzalez, *J. Mol. Catal. B* **2004**, *30*, 83–93.
- [120] A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241–246.
- [121] a) A. M. Klibanov, *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 97–101; b) K. Griebel, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11695–11700.
- [122] L. Zheng, S. Zhang, L. Zhao, G. Zhu, X. Yang, G. Gao, S. Cao, *J. Mol. Catal. B* **2006**, *38*, 119–125.
- [123] S. Z. Qiao, C. Z. Yu, W. Xing, Q. H. Hu, H. Djojoputro, G. Q. Lu, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 6172–6176.
- [124] A. Vinu, M. Miyahara, T. Mori, K. Ariga, *J. Porous Mater.* **2006**, *13*, 379–383.
- [125] C. Li, J. Liu, X. Shi, J. Yang, Q. Yang, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 10948–10954.
- [126] X.-Y. Yang, Z. Q. Li, B. Liu, A. Klein-Hofmann, G. Tian, Y.-F. Feng, Y. Ding, D. Su, F.-S. Xiao, *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 410–414.
- [127] W. Shui, J. Fan, P. Yang, C. Liu, J. Zhai, J. Lei, Y. Yan, D. Zhao, X. Chen, *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4811–1819.
- [128] T. Itoh, R. Ishii, T. Ebina, T. Hanaoka, Y. Fukushima, F. Mizukami, *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 236–240.
- [129] Z.-Z. Chen, Y.-M. Li, X. Peng, F.-R. Huang, Y.-F. Zhao, *J. Mol. Catal. B* **2002**, *18*, 243–249.
- [130] M. C. Rosales-Hernandez, J. E. Mendieta-Wejebe, J. Correa-Basurto, J. I. Vazquez-Alcantara, E. Terres-Rojas, J. Trujillo-Ferrara, *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *40*, 444–448.
- [131] L. J. Kennedy, P. K. Selvi, A. Padmanabhan, K. N. Hema, G. Sekaran, *Chemosphere* **2007**, *69*, 262–270.
- [132] D. Moelans, P. Cool, J. Baeyens, E. F. Vansant, *Catal. Commun.* **2005**, *6*, 581–595.