

**Funktionale anorganisch/organische Hybridmaterialien für
ultrasteife Hydrogele und antimikrobielle
Lotusoberflächen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Dr. rer. nat.

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

vorgelegt von

M.Sc. Dipl.-Ing. (FH) Jan Nicolas Rauner

aus

Wuppertal

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2017

1. Gutachter/-in: Prof. Dr. Jörg C. Tiller

2. Gutachter/-in: Prof. Dr. Jörg Kreßler

Dortmund 2017

“[...] we cannot predict the future, but we can invent it [...]”

***Nigel Calder**, New Scientist, Books: How to be dignified though useless [Review of “Inventing the future” by Dennis Gabor] No. 3325, S.712, Spalte 2, Reed Business Information, 1963.*

Die Anfertigung dieser Arbeit erfolgte im Zeitraum von Februar 2012 bis Januar 2017 am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften der Fakultät Bio- und Chemieingenieurwesen an der Technischen Universität Dortmund.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen Dank aussprechen.

Mein größter Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jörg C. Tiller für die Möglichkeit, über ein spannendes und abwechslungsreiches Thema zu promovieren, bei dem ich meine eigenen Stärken einbringen konnte. Der freundschaftliche Umgang und sein stetes Interesse waren ein großer Antrieb für den Fortschritt dieser Arbeit.

Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Kreßler für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie den Professoren Herrn Prof. Dr. David W. Agar und Herrn Prof. Dr. Rolf Wichmann als Mitgliedern der Prüfungskommission.

Einen großen Dank schulde ich Herrn Dr. Frank Katzenberg, der mein Interesse für die Polymerwissenschaften an der TU Dortmund geweckt hat und mit seiner fachlichen Expertise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Monika Meuris danke ich für die technische und fachliche Unterstützung bei allen Arten der Mikroskopie und Thermogravimetrie sowie ihre unermüdliche Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Frau Kristine Katzmarczyk danke ich für ihre stete Hilfsbereitschaft, besonders in allen verwaltungstechnischen Lagen.

Meinem Büronachbarn Herrn Dr. Christian Krumm und mit ihm den anderen Doktoranden/-innen des Lehrstuhls Herrn Arne Straßburg, Frau Ramona Plothe, Herrn Martin Schmidt, Herrn Montasser Hijazi, Frau Melanie Leurs, Herrn Thomas Raidt und Frau Lena Richter möchte ich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in allen Lebenslagen und das kollegiale Arbeitsklima danken.

Außerdem danke ich meinen Diplomarbeitern Herrn Marc Nölke und Herrn Christoph Müller, Masterarbeiter/-innen Herrn Julian Schulte-Steffens, Frau Sarah Böhle und Frau Sabine Ring, Bachelorarbeiter/-innen Frau Carmen Schöneweiß, Frau Lea Bünger, Frau Mirjana Zoric und Herrn Pantelis Georgopoulos sowie Praktikanten/-innen Herrn Marko Milovanovic, Herrn Juri Lichtner, Frau Anna Jameljanova und Frau Stefanie Schuller ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Katharina Andre-Rauner für ihre unermüdliche Unterstützung und Ermutigung auch in schwierigen Zeiten und ihr unendliches Verständnis, wenn es im Labor mal wieder etwas länger gedauert hat.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern sowie meinen Schwiegereltern für ihre Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und ihr Interesse danken.

Publikationen

1. Nicolas Rauner, Monika Meuris, Stephan Dech, Julia Godde, Jörg C. Tiller, "Urease-induced calcification of segmented polymer hydrogels - a step towards artificial biomineralization", *Acta Biomaterialia* **2014**, 10 (9), 3942-3951
2. Nicolas Rauner, Jörg C. Tiller, „Enzyme-induced production of shell-like composite materials“, *Scientific Highlights 2013, TU Dortmund* **2014**, 19
3. Nicolas Rauner, Lea Buenger, Stephanie Schuller, Jörg C. Tiller, "Post-Polymerization of Urease-Induced Calcified, Polymer Hydrogels", *Macromolecular Rapid Communications* **2015**, 36 (2), 224-230
4. Nicolas Rauner, Jörg C. Tiller, "Selective CaCO₃ formation within Hydrogels", *Conference Paper, Polymer Chemistry* **2014**, 248th ACS National Meeting, San Francisco
5. Nicolas Rauner, Jörg C. Tiller, „Toughening of artificial, shell-like composite materials using post polymerization process “, *Scientific Highlights, TU Dortmund* **2014**, 20
6. Nicolas Rauner, Christoph Müller, Sabine Ring, Sara Böhle, Arne Strassburg und Jörg C. Tiller, „Combining Lotus-Effect with antimicrobial contact-activity“, *Scientific Highlights 2015, TU Dortmund* **2016**, 18
7. Nicolas Rauner, Monika Meuris, Mirjana Zoric, Jörg. C. Tiller, „ Tough, ultrastiff, and fully transparent hydrogels“, *Scientific Highlights 2016, TU Dortmund* **2017**,
8. Nicolas Rauner, Monika Meuris, Mirjana Zoric, Jörg. C. Tiller, "Enzymatic mineralization generates ultrastiff and tough hydrogels with tunable mechanics", *Nature* **2017**, 543, 407-410

Vorträge

1. Nicolas Rauner, Monika Meuris, Stephan Dech, Julia Godde, Jörg. C. Tiller, "Bio-induced bulk calcification", Biomin 12, **28.08.2013**, Freiberg (Deutschland)
2. Nicolas Rauner, Jörg C. Tiller, "Bioactive polymer networks for enzymatically induced mineralization within a matrix", EPF 2015, **25.06.2015**, Dresden (Deutschland)
3. Nicolas Rauner, Jörg C. Tiller, "Combining Lotus-Effect with antimicrobial contact-activity", ICAR 2016, **30.06.2016**, Torremolinos (Spanien)

Poster

1. N. Rauner, M. Meuris, S. Dech, J. Godde, J.C. Tiller, "Selective CaCO₃ formation within Hydrogels", 248th ACS National Meeting, Polymer Material Science, **12.08.2014**, San Francisco (USA)
2. M. Hijazi, M. Schmidt, A. Strassburg, N. Rauner, C. Krumm, and Joerg C. Tiller, "Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces", ICAR 2016, **30.06.2016**, Torremolinos (Spanien)

Patente

1. Jörg C. Tiller, Nicolas Rauner, Christoph Müller, Sabine Ring, „Verfahren zum Herstellen derivatisierter Siliziumdioxidnanopartikel“,
Deutsche Patentanmeldung, **12.06.2014**, DE 102014108278, veröffentlicht 17.12.2015;
Internationale Patentanmeldung, **12.06.2015**, WO 2015/189405
2. Jörg C. Tiller, Nicolas Rauner, Mirjana Zoric, „Hydrogel composite material“,
Europäische Patentanmeldung, **01.12.2016**, EP 16201806

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XI
1 KURZZUSAMMENFASSUNG / ABSTRACT	1
2 EINLEITUNG UND MOTIVATION	3
2.1 Biomimetische Verbundwerkstoffe.....	4
2.1.1 Natürliche anorganische/organische Hybridmaterialien	5
2.1.2 Polymere-Hydrogele	8
2.1.3 Enzymimmobilisierung	11
2.1.4 Reproduktion natürlicher Hybridmaterialien.....	13
2.1.5 Enzyminduzierte Mineralisierung von Hydrogelen	17
2.2 Funktionelle Oberflächen.....	19
2.2.1 Der Lotus-Effekt	19
2.2.2 Antimikrobielle Oberflächen	23
3 AUFGABENSTELLUNG.....	29
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	30
4.1 Urease-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen	30
4.1.1 Aktivität immobilisierter Urease in verschiedenen Hydrogelen	30
4.1.2 Calcifizierung der bioaktiven Hydrogele mit CaCO ₃	32
4.1.3 Variation des Vernetzungsgrades	37
4.1.4 Variation der Ureasemenge im Netzwerk.....	39
4.1.5 Einfluss der Temperatur auf die Mineralisierung	40
4.1.6 Stabilisierung des pH-Werts während der Calcifizierung.....	44
4.1.7 Einbau ionischer Gruppen in die Polymermatrix	47
4.1.8 Urease-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen auf Basis von N,N'- Dimethylacrylamid	49
4.1.9 Mechanische Eigenschaften der CaCO ₃ - Komposite	51
4.1.10 Einfluss der Grenzfläche auf die Mechanik der CaCO ₃ -Komposite	54
4.1.11 Mineralisation unter Dehnung	62
4.2 Alkalische Phosphatase-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen.....	70
4.2.1 Aktivität der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Hydrogelen	71
4.2.2 Calcifizierung der bioaktiven Hydrogele mit Calciumphosphat	74

4.2.3	Hydrogele mit EDPOA als Additiv.....	85
4.2.4	Alternative Substrate für die AP-induzierte Calcifizierung	87
4.2.5	Mechanische Eigenschaften der gequollenen CaP-Komposite.....	88
4.2.6	Mechanische Eigenschaften der getrockneten CaP-Komposite	100
4.3	Enzyminduzierte Silifizierung von Hydrogelen	102
4.3.1	Silifizierung in Lösung.....	103
4.3.2	Silifizierung im Netzwerk.....	106
4.3.3	Einbau ionischer Gruppen und Vorbeladung der Netzwerke	108
4.4	Kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen mit Lotus-Effekt.....	111
4.4.1	Partikelsynthese	113
4.4.2	Partikelmodifizierung	116
4.4.3	Partikelfunktionalisierung	121
4.4.4	Antimikrobielle Eigenschaften	125
4.4.5	Mischungen verschiedener Partikelgrößen	126
5	ZUSAMMENFASSUNG	129
5.1	Enzym-induzierte Mineralisierung von Polymer-Netzwerken	129
5.2	Kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen mit Lotus-Effekt.....	133
6	EXPERIMENTELLER TEIL.....	135
6.1	Chemikalienliste	135
6.2	Darstellung der Calciumcarbonat (CaCO₃)-Calcifizierungslösungen	138
6.2.1	Entgasen des bidestillierten Wassers.....	138
6.2.2	Herstellung des TRIS-Puffers.....	138
6.3	Darstellung der Calciumphosphat (CaP)-Calcifizierungslösungen	138
6.3.1	Herstellung des Triethanolamin-Puffers	138
6.4	Darstellung der SiO₂-Mineralisierungslösungen.....	139
6.5	Aufbereitung der Monomere per Vakuumdestillation.....	139
6.6	Synthese acrylatterminierter Polyethyloxazolin-Vernetzer.....	139
6.7	Herstellung der Polymernetzwerke	141
6.7.1	Herstellung der Enzymlösungen	142
6.7.2	Herstellung der Polyglutaraldehyd-Stammlösung und -Pufferlösung	143
6.7.3	Bau der Polymerisationsformen	143

6.7.4	Zusammensetzung der Polymer-Hydrogele auf Basis der Monomere HEA, DMA oder Acrylamid.....	144
6.8	Mineralisierung der Polymernetzwerke	145
6.8.1	Calcifizierung unter Dehnung.....	146
6.9	Post-Polymerisation und Trocknung der calcifizierten Netzwerke	147
6.10	Silber-Staining von Hydrogelen mit immobilisierter alkalischer Phosphatase	147
6.11	Analytische Methoden zur Charakterisierung von Hybridmaterialien.....	148
6.12	Kontaktaktiv-antimikrobielle Beschichtungen mit Lotus-Effekt	154
6.12.1	Partikelsynthese	154
6.12.2	Modifizierung der Nanopartikeloberfläche	155
6.12.3	Abtrennung der modifizierten Partikel	155
6.13	Beschichtung von Glasobjektträger mit Silikon	156
6.14	Formulierung der Partikelsuspension und Auftragung.....	156
6.15	Bakteriensprühtest	157
6.16	Analytische Methoden zur Charakterisierung der Partikelbeschichtungen	158
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	160
8	ANHANG	174
8.1	Tabellenverzeichnis	174
8.2	Abbildungsverzeichnis	175
8.3	Lebenslauf	182

Abkürzungsverzeichnis

-/	-linked by- (-vernetzt durch-)
A	Additiv
AAM	Acrylamid
AgNO ₃	Silbernitrat
Alg	Alginat
AMA	N-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamid
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATR	Abgeschwächte Totalreflektion (<i>engl. attenuated total reflection</i>)
Bidestilliert	Zweifach destilliert
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Rinderserumalbumin
BuOH	Butanol
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaCO ₃	Calciumcarbonat
CaP	Calciumphosphat
CaGP	Calcium-2-Glycerolphosphat
CHCl ₃	Chloroform
CPV	CaCO ₃ /Polymer-Massenverhältnis
DBpX	α, α' -Dibromo-p-Xylol
DCM	Dichlormethan
DMA	N,N-Dimethylacrylamid
DOW 5700	Trimethoxysilylpropyldimethyloctadecylammoniumchlorid
E	E-Modul
EtOH	Ethanol
EtOx	2-Ethylloxazolin
EDPOA	Ethyl-2-[4-(Dihydroxyphosphoryl)-2-Oxabutyl]-Acrylat
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie (<i>engl. energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>)
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
E'	Speichermodul
E''	Verlustmodul
G6P	Glucose-6-Phosphat
Gew%	Gewichtsprozent
HCl	Salzsäure
HEA	2-Hydroxyethylacrylat
I	Initiator

m	Masse
M	Monomer
MBAm	N,N'-Methylen-bis-Acrylamid
MeOH	Methanol
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₃	Ammoniak
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (<i>engl. nuclear magnetic resonance</i>)
PAAm	Polyacrylamid
PDMA	Poly-N,N-Dimethylacrylamid
PEtOx	Poly-2-Ethyloxazolin
PGL	Polyglutaraldehyd-Lösung
PHEA	Poly-2-Hydroxyethylacrylat
pI	Isoelektrischer Punkt
PP	Post-Polymerisation
QuAAc	2-(Methacryloyloxyethyl)trimethylammoniumchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie (<i>engl. scanning electron microscopy</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Quellgrad
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung
t	Zeit
TEA	Triethanolamin
TED	Transmissionselektronendiffraktometrie
TEG	Tetraethylglycoldimethacrylat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
T	Temperatur
T _g	Glasübergangstemperatur
TGA	Thermogravimetrischer-Analysator
THF	Tetrahydrofuran
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Urea	Harnstoff
V	Volumen
VN	Vernetzer
Vol%	Volumenprozent
w	Gewichtsanteil
XRD	Röntgendiffraktometrie

1 Kurzzusammenfassung / Abstract

Die Natur macht vor, dass durch die Kombination anorganischer und organischer Komponenten Materialien mit außergewöhnlichen Eigenschaften, wie Perlmutter und Knochen, erzeugt werden können. Diesen Vorbildern nacheifernd ist es das Ziel dieser Arbeit neuartige Kompositmaterialien und Beschichtungen herzustellen, die über ähnliche Eigenschaften verfügen oder diese sogar noch übertreffen.

Mittels homogener Immobilisierung von Enzymen in Polymer-Hydrogelen konnten bei milden Temperaturen neuartige anorganisch/organische Hybridmaterialien auf Basis von Calciumcarbonat und Calciumphosphat entwickelt werden. Durch Urease-induzierte Calcifizierung ist es erstmals gelungen Hydrogele selektiv im Inneren zu mineralisieren. Die auf diese Weise mit kristallinem Calciumcarbonat gefüllten Netzwerke können bis zu einem Anteil von 93 Gew% mineralisiert werden, welcher dem des natürlichen Vorbildes, des Perlmutter, entspricht. Die so erzeugten Hybridmaterialien weisen Steifigkeiten von bis zu 4 GPa im getrockneten Zustand auf. Nach demselben Prinzip können Hydrogele enzymatisch mit bis zu 75 Gew% Calciumphosphat mineralisiert werden. Die dabei mit amorphen Strukturen gefüllten Hybridmaterialien zeigen außergewöhnliche, mechanische Eigenschaften im wassergequollenen Zustand bei dem die anorganischen Strukturen gerade einmal 15 Vol% ausmachen. Die Hydrogel-Komposite weisen Steifigkeiten von bis zu 440 MPa auf, was die E-Module bisher bekannter, synthetischer Hydrogele um das 44-fache übertrifft. Zudem können die strukturellen Eigenschaften der anorganischen Phase bei ihrer Bildung über die Einführung anionischer, funktioneller Gruppen in der Matrix verändert werden, wodurch z.B. die mechanischen Eigenschaften eingestellt und gleichzeitig vollkommen transparente Komposite erhalten werden können. Ein Einsatz dieser biokompatiblen Materialien ist in der regenerativen Medizin, im Leichtbau und in der Trenn- und Membrantechnik denkbar.

Des Weiteren konnten Beschichtungen auf Basis organisch modifizierter, anorganischer SiO₂-Nanopartikel entwickelt werden, die erstmals eine einfache kontaktaktiv-antimikrobielle Beschichtung auf Silikon unter Erhalt der hydrophoben Oberflächeneigenschaften ermöglichen. Zudem führt die Selbstordnung dieser Partikel bei der Auftragung aus verschiedenen Lösungsmitteln dazu, dass die Oberfläche einen Lotus-Effekt aufweist. Auf diese Weise können erstmals Oberflächenbeschichtungen erzeugt werden, die einen kontaktaktiv-antimikrobiellen mit einem Selbstreinigungs-Effekt kombinieren.

Nature reveals that the combination of inorganic and organic components facilitates materials with extraordinary properties, such as nacre or bone. Following these idols, the goal of this work was the development of new materials and coatings with similar qualities or properties, which even exceed those.

The homogeneous immobilization of enzymes inside polymeric hydrogels allows the development of new inorganic/organic hybrid materials based on calcium carbonate or calcium phosphate. Urease-induced calcification affords bulk mineralization of hydrogels for the first time and results in the growth of up to 95 wt% crystalline calcium carbonate inside the networks, which is equal to nacre. These new biomimetic hybrid materials offer excellent mechanical properties and show Young's moduli of up to 4 GPa in the dried state. Following the same approach with alkaline phosphatase, the precipitation of up to 75 wt% calcium phosphate is induced inside the hydrogels. The inorganic structures grow to spherical or scaffold-like shapes, which grant the composites extraordinary stiffness and toughness in the water-swollen state. These hydrogels exhibit Young's moduli of up to 440 MPa, which is 44-times higher than every known synthetic hydrogel today. Thereby the mechanical stress is carried by less than 15 vol% mineral in the swollen material. In addition, the structural properties of the inorganic phases are changeable by the introduction of anionic groups to the matrix, whereby fully transparent composites with increased toughness result. These biocompatible materials may be interesting candidates for regenerative medicine, lightweight design, membrane and separation technique.

Furthermore, coatings based on organically modified inorganic SiO₂ nanoparticles were developed, which allow readily equipment of silicone surfaces with contact-killing antimicrobials preserving its hydrophobic surface properties. The application of the modified particles from organic solvents leads to coatings exhibiting a lotus effect. These novel particle coatings so combine contact-killing with self-cleaning properties.

2 Einleitung und Motivation

Die Evolution hat im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Materialien hervorgebracht, deren einzigartige Eigenschaften durch einen unglaublich komplexen Aufbau bedingt werden. Dieser macht ihre exakte Reproduktion bis heute nahezu unmöglich. Allerdings dienen ihre Prinzipien und Strukturen immer wieder als Vorbilder, welche die Entwicklung neuer Technologien vorantreiben. Diese Kombination von Biologie und Technik wird heute in einer eigenen Wissenschaftsdisziplin, der sogenannten Bionik, zusammengefasst.¹

Die Disziplin der Bionik, auch Biomimetik genannt, beschäftigt sich mit der Abstraktion und Übertragung natürlicher Konzepte, um sie technisch in Industrie und Forschung nutzbar zu machen. Dabei konnten verschiedene Konzepte identifiziert werden, um die Eigenschaften von Oberflächen zu verändern. Bekannte Anwendungsbeispiele hierfür sind z.B. Langlaufskibeschichtungen, die auf dem Prinzip der Schuppen einer Bodenschlange (*Leimadorphys spec.*) beruhen², antimikrobiell wirksame Polymere nach dem Vorbild des natürlichen Magainin, welche aus dem Sekret eines afrikanischen Frosches (*Xenopus laevis*) gewonnen werden³ und als sicherlich bekanntestes Beispiel selbstreinigende Anstriche⁴, die auf Basis der Oberfläche eines Lotus-Blattes⁵ entwickelt wurden. Besonders sogenannte membranaktiv-antimikrobielle Substanzen, die nach dem Vorbild des Magainins entwickelt wurden, besitzen ein großes Potential als Nachfolger klassischer Antibiotika, um der zunehmenden Resistenzbildung von Mikroorganismen entgegenzuwirken. Werden solche Verbindungen auf Oberflächen aufgebracht, sind diese in der Lage Mikroorganismen erst bei Kontakt mit der Beschichtung abzutöten.⁶ Als problematisch erweist sich dabei jedoch, dass abgetötete Zellen von der Oberfläche entfernt werden müssen, um die kontaktaktive-antimikrobielle Wirkung dauerhaft zu erhalten.⁷ Im Gegensatz dazu ermöglichen Lotus-Effekt-Oberflächen zwar eine leichte Entfernung von Verunreinigungen, allerdings bieten sie nach erfolgreicher Anhaftung von Mikroorganismen keinen Schutz vor deren Vermehrung. Eine Kombination dieser funktionellen Oberflächeneigenschaften und den sich daraus eventuell ergebenden Synergieeffekten wurden bis jetzt kaum untersucht.

Großes Potential im Bereich der Bionik bietet die Reproduktion natürlicher anorganisch/organischer Hybrid-Werkstoffe, wie Muscheln, Schalen, Frusteln, Knochen oder Zähne. Diese weisen hervorragende Werkstoffeigenschaften bei einer geringen Dichte auf⁸ und würden sich daher für Konstruktionen z.B. im Leichtbau eignen. Zudem erfolgt ihre Herstellung unter milden Bedingungen, mit sehr geringem Energieaufwand und die Bestandteile sind in großen Mengen auf der Erde verfügbar. Aufgrund ihrer Biokompatibilität ist ihr Einsatz zudem auch in der regenerativen Medizin denkbar.⁹ Aus diesen Gründen sind diese komplexen Materialien Objekte zahlreicher Untersuchungen¹⁰, allerdings ist es bis jetzt jedoch nicht gelungen vergleichbare

Komposite mit ähnlichen Eigenschaften jenseits des Mikromaßstabs zu reproduzieren.¹¹ Problematisch sind dabei vor allem die hierarchischen Strukturen der natürlichen Komposit-Materialien.⁸ Diese werden bei ihrer Bildung im Organismus stark durch Enzyme und andere sie umgebende Polymere kontrolliert.¹² Insbesondere die Induktion und die Einflüsse von Enzymen in Hinblick auf die Bildung biomimetischer Komposite in polymerkontrollierten Umgebungen, wurden bis jetzt nicht hinreichend untersucht. Eine Nachahmung der natürlichen Herstellung würde Zugang zu einer neuen Klasse energetisch effizient hergestellter, natürlicher Kompositmaterialien ermöglichen.

Von besonderem Interesse in dieser Arbeit ist daher die technologische Übertragung der einzigartigen Baupläne und -prinzipien natürlicher Materialien, wie die der Muscheln, Knochen, Zähne oder des Lotusblattes, um anorganisch/organische Hybridmaterialien mit neuartigen Eigenschaften zu erzeugen.

2.1 Biomimetische Verbundwerkstoffe

Die Materialwissenschaften beschäftigen sich im klassischen Sinne mit den drei großen Feldern der Metalle, Polymere und Keramiken. Zwischen diesen Hauptklassen können die interdisziplinären Verbundwerkstoffe, die sogenannten Komposite, eingeordnet werden. Für diese Verbundmaterialien werden zwei der Komponenten gemischt, um deren Eigenschaften zu kombinieren oder durch Synergien zu verbessern. Ziel einer solchen Kombination ist eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, der thermischen oder korrosiven Beständigkeit, die Verringerung des Gewichts sowie eine Reduzierung der Kosten des Werkstoffes.¹³ Viele natürliche Materialien sind Verbundmaterialien aus einer Hart- und Weichphase, welche mechanische Eigenschaften besitzen, die weit besser sind als die Kombination der einzelnen Komponenten erahnen lässt.¹⁴ Dieser Unterschied ist insofern überraschend, da die mechanischen Eigenschaften der einzelnen, in biologischen Systemen eingesetzten Komponenten im Vergleich zu technischen Werkstoffen eher als schwach zu bezeichnen sind. Der Grund für die außergewöhnliche Mechanik biologischer Verbundmaterialien liegt in ihrem bemerkenswert komplexen Aufbau, der über Millionen von Jahren im Laufe der Evolution für den jeweiligen Anwendungszweck optimiert wurde. Das Interesse der Materialwissenschaften an den Designkonzepten biologischer Komposit-Materialien wurde zwar erst in den 1980er bis 90er Jahren geweckt, zeigt jedoch seitdem Materialwissenschaftlern neue Wege für die Werkstoffentwicklung auf. Dabei gibt es eine Menge von der Natur zu lernen. In vielen Fällen werden die gleichen Anforderungen an Materialien in der Natur und Technik gestellt (z.B. Steifigkeit und Zähigkeit), jedoch werden diese Eigenschaften dabei oft auf unterschiedliche Weise erzeugt.¹⁵ Ein Ingenieur zum Beispiel verwendet eine Vielzahl chemisch unterschiedlicher Materialien, um verschiedene Eigenschaften zu erhalten. Ein Auto

besteht deshalb in der Regel aus über 30 Werkstoffen.¹⁶ Natürliche Materialien (**Abbildung 2.1**) sind aus einer nur geringen Zahl an Basiskomponenten aufgebaut, die jedoch sehr stark in ihren mechanischen Eigenschaften variiert werden können. Typ I Kollagen zum Beispiel dient als strukturgebendes Element in einer Vielzahl an Geweben im menschlichen Körper, wie in Knochen, Knorpeln, Zähnen, Arterien und Haut. Dabei kann über eine unterschiedliche Morphologie und die Kombination mit Hart-Komponenten, wie Keramiken, das Eigenschaftsprofil in einem weiten Bereich eingestellt werden.¹⁷

2.1.1 Natürliche anorganische/organische Hybridmaterialien

Natürliche Verbundwerkstoffe, die eine anorganische Hart- mit einer organischen Weichkomponente verbinden, werden von Organismen vor allem als strukturgebende Elemente gebildet, z.B. als Knochen, Muschelschalen oder Zellhüllen. Abhängig von der jeweiligen anorganischen Komponente können diese in die drei Hauptklassen der Calciumcarbonat-, Calciumphosphat- und Silikat-basierten-Materialien unterteilt werden. Seltener kommen in der Natur auch andere Metalloxide, wie zum Beispiel Magnetit zum Einsatz (**Tabelle 2.1**).

Tabelle 2.1 | Auflistung wichtiger Biomineralien mit ihrer jeweiligen Summenformel und Ursprungsorganismus/-en (nach EPPLE¹⁸)

Mineral	Alternativname	Summenformel	Organismen
Calcit	Calciumcarbonat	CaCO ₃	Molluskenschalen
Aragonit	Calciumcarbonat	CaCO ₃	Molluskenschalen
Apatit	Calciumphosphat	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	Zähne, Knochen von Wirbeltieren
Kieselsäure	Opal, Silica	SiO ₂ · n H ₂ O	Skelette von Diatomeen und Schwämmen
Magnetit	Eisen-II,III-oxid	Fe ₃ O ₄	Zähne von Schnecken, Bakterien

Die Herstellung der Verbundwerkstoffe erfolgt dabei stets unter milden Bedingungen. Zudem weisen die anorganisch-organischen Hybridmaterialien eine geringe Dichte auf, die nur selten 3 g/cm³ überschreitet⁸, wodurch sie bezogen auf die Dichte über sehr gute mechanische Eigenschaften verfügen. Der in **Abbildung 2.1** dargestellte ASHBY-Plot¹⁹ gibt eine Übersicht über die Zähigkeit sowie den E-Modul der wichtigsten biologischen Materialien. Die beiden reinen Minerale Calcit (Calciumcarbonat) und Hydroxylapatit (Calciumphosphat) besitzen E-Module von etwa 100 GPa⁸, zeigen dabei jedoch ein sehr sprödes Verhalten. Durch die Kombination mit einer polymeren Phase vermindert sich der E-Modul in der Muschelschale auf bis zu 70 GPa beim Knochen auf 8 bis 24 GPa^{8, 20}. Mit dieser vergleichsweise kleinen Verringerung des E-Moduls geht allerdings gleichzeitig ein deutlicher Anstieg der Zähigkeit um bis zu drei Größenordnungen einher.

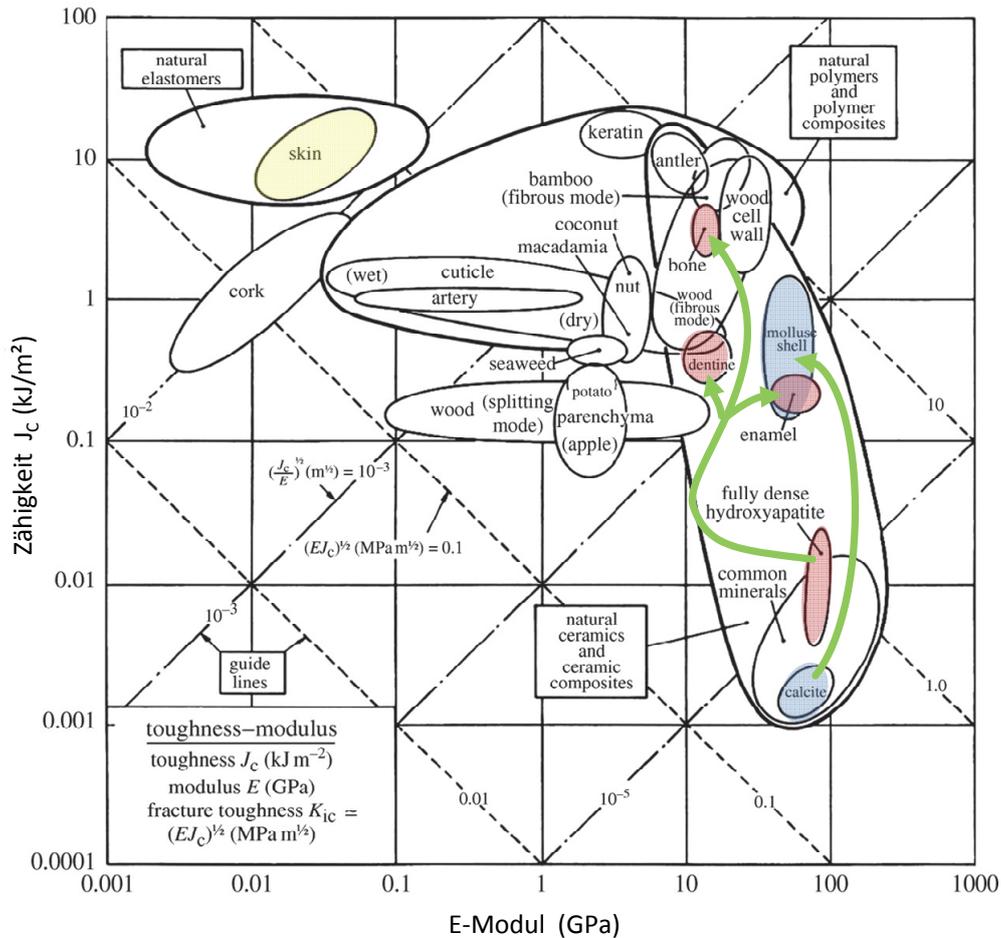


Abbildung 2.1 | Übersicht der mechanischen Eigenschaften verschiedener natürlicher Keramiken, Gewebe und ihrer Komposite. Die vertikale Achse beschreibt den Widerstand des Materials gegen eine Rissausbreitung (Zähigkeit), während auf der x-Achse die Steifigkeit des Werkstoffes (E-Modul) aufgetragen ist. (nach WEGST und ASHBY^{16, 19})

Der Grund für diese synergetische Verbesserung der Eigenschaften ist im komplexen Aufbau der Hybridmaterialien zu finden, der sich aus hierarchisch geordneten Strukturen zusammensetzt und im Folgenden anhand von Knochen, Muschelschalen und Kieselalgen kurz dargestellt werden soll (**Abbildung 2.2**).²¹

Ein Knochen besteht im Wesentlichen aus Kollagenketten, die eine Trippelhelix mit einem Durchmesser von etwa 1,5 nm bilden (**Abbildung 2.2 a**). Diese Tropokollagen-Moleküle sind helikal in unterschiedlicher Richtung angeordnet und bilden sogenannte Fibrillen. Zwischen diesen ist eine Mineralphase aus plattenförmigen Hydroxylapatit-Kristallen eingelagert, die einen Durchmesser von je 70 bis 100 nm und eine Dicke von nur ca. 1 nm besitzen. Ihre Bildung erfolgt durch Nukleation zwischen den Fibrillen. Diese Einheiten werden als Osteone bezeichnet und bilden die Grundbausteine des Knochens. Dabei machen die Volumenanteile der organischen Matrix etwa 60%, die des Minerals etwa 40% aus.⁸

Das Perlmutter der Muschelschale verdankt seine mechanischen Eigenschaften einem Aufbau der oft mit dem einer Ziegelmauer verglichen wird (**Abbildung 2.2 b**). Bei entsprechender Vergrößerung

des Querschnittes lassen sich Platten aus Aragonit, einer Kristallmodifikation des CaCO_3 , mit einer Dicke von 0,5 bis 10 μm erkennen, welche die Mikrostruktur bilden (Ziegel). Diese sind verbunden über eine dazwischenliegende, organische Schicht mit einer Dicke von 20 bis 30 nm aus Polychitin und verschiedenen Proteinen (Mörtel). Zusammen bilden sie die sogenannten Mesostrukturen: größere, schichtartige Strukturen mit einem Durchmesser von ungefähr 0,3 mm. Der anorganische Anteil bei diesem Aufbau ist, verglichen mit dem Knochen, deutlich höher und beträgt bis zu 95 Gew% (ca. 88 Vol%) CaCO_3 .⁸

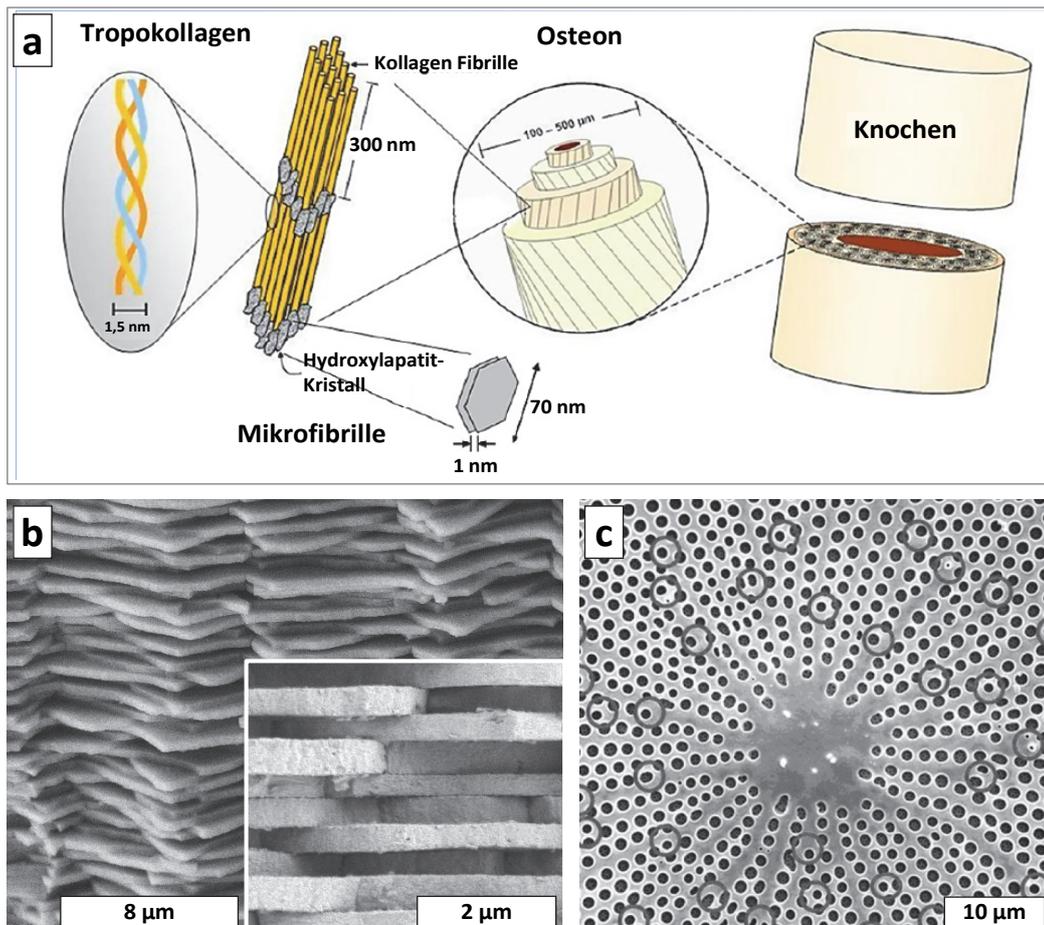


Abbildung 2.2 | (a) Schema des hierarchischen Aufbaus von Knochen.⁸ (b) Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) - Aufnahmen des Perlmutts einer Abalone-Muschelschale im Querschnitt in unterschiedlichen Vergrößerungen. (c) Ausschnitt des Zentrums einer zylindrischen Kieselalge mit radial verlaufenden Strukturen (Die Kreise kennzeichnen auftretende Dislokationen in der Struktur).⁸

Einzellige Kieselalgen (Diatomeen) sind Meeresorganismen, die in der Lage sind eine charakteristische 3-dimensionale Zellwand aus amorphem Siliziumdioxid (SiO_2) zu bilden, welche als Frustel bezeichnet wird und deren Form, je nach Spezies, unterschiedlich ausfallen kann. Normalerweise ist SiO_2 ein sehr steifes (ca. 70 GPa) und sprödes Material. Nach der Bildung durch die Kieselalge hingegen zeigt es eine deutlich verbesserte Zähigkeit bei einem verbliebenen E-Modul von bis zu 20 GPa.²² Als Grund wird auch hier der poröse, nanostrukturierte Aufbau in Kombination mit verschiedenen organischen Komponenten vermutet. Dabei ziehen sich

regelmäßig, radial angeordnete Öffnungen beginnend vom Zentrum nach außen (**Abbildung 2.2 c**). Sowohl die Größe mit etwa 2 μm als auch die Anordnung der Löcher ist dabei auffallend gleichmäßig. Jedes Loch besitzt zudem einen Grat an der Kante, der die Struktur weiter verstärkt.⁸ An der Strukturausbildung sind verschiedene Enzyme und Proteine beteiligt²³.

Die Natur zeigt an diesen Beispielen, wie anorganisch/organische Hybridmaterialien aufgebaut sein sollten, um möglichst gute mechanische Eigenschaften zu erhalten. Zusammenfassend ist dabei neben Kristallstruktur, -morphologie und -ausrichtung auch die Grenzflächenhaftung zwischen Polymer und Mineral sowie die Zusammensetzung der organischen Phase von großer Bedeutung. Ohne die Kontrolle eines Organismus ist die Reproduktion solcher nanostrukturierten, hochkomplexen Materialien im Labor mit gleicher Perfektion bis heute nicht möglich. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse Methoden zu entwickeln, die eine möglichst einfache und effiziente Herstellung dieser Materialien ermöglichen.

2.1.2 Polymere-Hydrogele

Gele bezeichnen formbeständige, viskoelastische Systeme aus einem vernetzten Feststoff (Matrix) und einer flüssigen Phase, wobei letztere mit über 50 Vol% die Hauptkomponente darstellt. Die feststoffartige Erscheinung eines Gels wird durch den Einschluss und die Adhäsion der Flüssigkeit in der Matrix hervorgerufen. Bei Verwendung organischer Flüssigkeiten spricht man von Lyogelen, während wässrige Systeme als Hydrogele bezeichnet werden. Die Ausbildung eines Gels ist durch das Erreichen einer unendlich hohen, dynamischen Viskosität (η) sowie die Angleichung des Speicher- (E') und des Verlustmoduls (E'') des Materials gekennzeichnet. Dies kann in wässrigen Systemen mittels niedermolekularer Hydrogelatoren, wie z.B. N,N'-Dibenzoyl-L-Cystin²⁴ erreicht werden, die in der Lage sind durch Selbstorganisation supramolekulare Überstrukturen und schließlich ein Gel auszubilden.²⁵ Eine weitere Möglichkeit bieten Polymere-Hydrogele, die durch Vernetzung hydrophiler Polymerketten hergestellt werden. Die Vernetzung kann dabei durch kovalente, sowie Wasserstoffbrücken-Bindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, van der Waals-Kräfte oder Kettenverschlaufungen erfolgen (**Tabelle 2.2**).²⁶

Tabelle 2.2 | Beispiele für chemisch und physikalisch vernetzte Polymere-Hydrogele

	Vernetzung durch	Beispiele
Chemische Hydrogele 27-28	Kovalente Bindung	Polyacrylsäure, Polyacrylate und Derivate, Polyacrylamide und Derivate
Physikalische Hydrogele 29-30	Ionische Bindung	Alginat und Polyacrylsäure mit Calciumsalzen
	H-Brücken	Polyvinylalkohol, Polyacrylsäure, Polyacrylamide
	Assoziation/ Kristalle	Poly-N-Isopropylacrylamid, Methylcellulose, Gelatine, Carrageen
	Verschlaufungen	Polyethylenglykol ³¹

Es sind viele verschiedene, natürliche Polymere, wie z.B. Gelatine und Alginat, bekannt mit denen Hydrogele hergestellt werden können. Eine Synthese von Hydrogelen auf Basis synthetischer Polymere ist grundsätzlich mit Hilfe jeder erdenklichen Art der Polymersynthese möglich. Meist erfolgt ihre Darstellung jedoch über freie-radikalische Polymerisation hydrophiler, nicht-ionischer Monomere mit einer geringen Menge eines Vernetzers.³²

Aufgrund ihrer bemerkenswerten Eigenschaften wurden Polymere-Hydrogele in den letzten Jahrzehnten in immer mehr Bereichen, wie z.B. in der Medizin, in Sanitärprodukten und in der Separierungstechnik eingesetzt. Dabei werden sie als Membranen in unterschiedlichen Trennverfahren eingesetzt³³⁻³⁵, sind in der Lage Wirkstoffe in ihrem Innern zu transportieren³⁶ und aufgrund ihrer guten Zellkompatibilität können sie sogar als Gewebeersatz verwendet werden³⁷. Die sehr gute Biokompatibilität von Hydrogelen³⁸ ermöglicht zudem eine Immobilisierung aktiver biologischer Strukturen, wie z.B. Enzymen, in ihrem Inneren. Als Superabsorber zeigen sie ein bemerkenswertes Wasseraufnahmevermögen³⁹⁻⁴⁰ und können so große Mengen Wasser bis zum 99-fachen ihres Eigengewichtes aufnehmen. Diese Fähigkeit resultiert aus ihren hydrophilen, funktionellen Gruppen im oder am Polymerrückgrat, die eine leichte Solvatisierung der Makromoleküle im Wasser ermöglichen. Zugleich verhindern Vernetzungen zwischen den Hauptketten jedoch, dass sich diese in Wasser lösen können. Innerhalb des Hydrogels können das Wasser und die darin gelösten Bestandteile frei diffundieren, wobei die polymere Matrix das Wasser lediglich zusammenhält. Durch seine Vernetzungen besteht ein Gel im Idealfall nur aus einem einzigen Molekül. Aufgrund dieses molekularen Aufbaus besitzen gequollene Hydrogele Eigenschaften, die zwischen denen eines Feststoffes und einer Flüssigkeit liegen.³²

Die Wasseraufnahme von Hydrogelen führt dazu, dass sie ihr Volumen vergrößern.⁴¹ Dies kann durch den sogenannten Quellgrad charakterisiert werden. Dabei wird zwischen dem Massenquellgrad (S_m) und dem Volumenquellgrad (S_v) unterschieden. Der Massenquellgrad wird durch Division des Gewichts des gequollenen (m_q) durch das getrocknete Netzwerk (m_t) ermittelt, während der Volumenquellgrad durch Division der Volumina des gequollenen (v_q) durch das getrocknete Hydrogel (v_t) ermittelt wird.

$$S_m = \frac{m_t}{m_q} \quad \text{Gleichung 2.1}$$

$$S_v = \frac{v_t}{v_q} \quad \text{Gleichung 2.2}$$

Bei Kenntnis der Dichten des Polymers und des Wassers können die beiden Quellgrade ineinander umgerechnet werden. Da die Dichten von Wasser ($\rho_{\text{Wasser}} = 1 \text{ g/cm}^3$) und des Polymers ($\rho_{\text{Polymer}} = 1,0$ bis $1,3 \text{ g/cm}^3$) in der Regel sehr ähnlich sind und letztere zudem ein Vielfaches ihres Eigengewichtes

an Wasser aufnehmen, ist es zulässig diese näherungsweise gleichzusetzen.⁴² In dieser Arbeit wird daher der einfacher zu bestimmende Massenquellgrad verwendet.

Durch die Einführung kovalent gebundener, ionischer Gruppen innerhalb eines Hydrogels kann sein Bestreben Wasser aufzunehmen noch einmal gesteigert werden. Die verstärkte Quellung wird durch die Erhöhung der Zahl an Ionen innerhalb des Netzwerks verursacht, die aufgrund ihrer Bindung an die Matrix nicht diffundieren können und somit einen zusätzlichen osmotischen Druck verursachen.⁴³ Dieser Effekt kann durch die Zugabe von Salzen zur Lösung jedoch unterdrückt werden, da so die Konzentrationsdifferenz der Ionen in Lösung innerhalb und außerhalb des Gels vermindert wird.⁴⁴ Die mechanischen Eigenschaften von Gelen werden durch ihren Speicher- (E') und Verlust-Modul (E'') charakterisiert. Ein Gel definiert sich durch einen ausgeprägten Plateaubereich in Abhängigkeit der Schwingungsfrequenz. Dabei ist der Verlustmodul in diesem Bereich immer wesentlich kleiner als der Speichermodul.⁴⁵ Der E-Modul (E) des Gels kann daraus berechnet werden (**Kapitel 6.11**). Die Mechanik eines Hydrogels ist maßgeblich abhängig von dessen Struktur und damit von den gegebenen Herstellungsbedingungen. Sowohl die Initiator- und Vernetzer-Konzentration als auch die Art der Monomere spielen dabei eine wichtige Rolle. Da viele zur Herstellung von Hydrogelen geeignete Monomere als Feststoff vorliegen, müssen sie in wässriger Lösung polymerisiert werden, was durch die Verdünnung der Reaktionsmischung während der Polymerisation ebenfalls Auswirkungen auf die Eigenschaften des Hydrogels hat. Trotz Optimierung dieser Parameter besitzen Hydrogele im Vergleich zu klassischen Werkstoffen meist schlechte mechanische Eigenschaften. Zudem verhalten sie sich aufgrund des hohen Wassergehalts und der damit verminderten Dichte an Polymerketten im Inneren meist spröde.⁴⁶ In den letzten Jahren konnten jedoch Fortschritte bei den mechanischen Eigenschaften verschiedener Hydrogele erzielt werden, wodurch auch einzelne Parameter verbessert werden konnten. Insbesondere bei der Risszähigkeit von Gelen konnten Werte natürlicher Materialien wie Knorpel⁴⁷ und Haut⁴⁸⁻⁴⁹ von 1000 J/m^2 und 9000 J/m^2 erreicht werden. Dies gelang durch die Verwendung sogenannter Doppel-Netzwerk-Hydrogele, bei dem sich ein kovalentes Netzwerk aus Polyacrylamid ein ionisches Netzwerk aus Alginat und Ca^{2+} gegenseitig durchdringen⁵⁰. Durch die Vernetzung von Polyacrylamid mit anorganischen Montmorillonit-Blättchen gelang es sogar Hydrogele mit einer Bruchzähigkeit von bis zu 50.000 J/m^2 herzustellen, welche die Eigenschaften der natürlichen Materialien deutlich übertreffen.⁵¹ Die hohe Risszähigkeit ist jedoch einer außergewöhnlich hohen Dehnbarkeit der Hydrogele geschuldet, da diese nur über vergleichsweise geringe E-Moduln deutlich unter 1 MPa verfügen. Im Gegensatz dazu weist Haut mit bis zu 100 MPa ¹⁹ eine für ein Hydrogel extrem hohe Steifigkeit auf, die auf synthetischem Wege bis heute nicht reproduziert werden konnte. Auch mit Hilfe gefüllter Hydrogele in denen eine anorganische Komponente eingelagert wurde, konnten keine Materialien hergestellt werden, die einen E-Modul von 10 MPa im vollständig

wassergequollenen Zustand überschreiten würden.⁵²⁻⁵⁷ KILLION gelang es durch den Einbau von Bioglaspulver in eine hochvernetzte Matrix aus Polyethylenglykoldimethacrylat ein Material mit einem Wasseranteil von 60 Gew% und einem E-Modul von 8 MPa zu produzieren.⁵⁵ Xu konnte durch die pH-induzierte Ausfällung von Hydroxylapatit in einem Acrylnitril-1-Vinylimidazol-Netzwerk aus einer $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{CaCl}_2$ -Lösung ein Kompositmaterial mit einem Wassergehalt von ebenfalls 60 Gew% herstellen und gibt dafür einen E-Modul von 17,4 MPa an. Die Messung der Steifigkeit erfolgte jedoch bei einer erhöhten Temperatur von 60°C, weshalb das Material wahrscheinlich nicht mehr vollständig gequollen war und so eventuell ein zu hoher E-Modul gemessen wurde.⁵⁸ Die Mineralisation von Hydrogelen verspricht dennoch großes Potential, um in erster Linie ihre mechanischen Eigenschaften und dabei insbesondere die Steifigkeit zu verbessern. Hochsteife und reißfeste Hydrogele besäßen eine Vielzahl potentieller Einsatzgebiete, wie z.B. druckstabile Membranen für Entsalzungsanlagen³³ oder stabile Protonenaustauscher-Membranen für Brennstoffzellen³⁴. Zudem sind auch medizinische Anwendungen als Gewebeersatz in der regenerativen Medizin⁵⁹ und zur Zellkultivierung⁶⁰ denkbar. Vor allem für die Vermehrung und Entwicklung von Zellen auf Hydrogelen spielt dessen E-Modul eine entscheidende Rolle. Dabei konnte beobachtet werden, dass steifere Hydrogele verbesserte Vermehrungsbedingungen für Zellen bieten.⁶¹⁻⁶²

2.1.3 Enzymimmobilisierung

Enzyme sind Proteine, die über eine katalytische Wirkung verfügen. Diese übernehmen wichtige Aufgaben im Stoffwechsel eines jeden Lebewesens. Dabei beschleunigen sie chemische Reaktionen durch die Verminderung der Aktivierungsenergie, beeinflussen aber das thermodynamische Gleichgewicht nicht. Zudem besitzen sie Aktivitäten und Selektivitäten, die anorganischen Katalysatoren meist weit überlegen sind.⁶³ Viele Enzyme können heute biotechnologisch hergestellt und isoliert werden. Daher sind viele kommerziell erhältlich und werden in verschiedenen Prozessen eingesetzt, in denen vor allem ihre geringe notwendige Aktivierungsenergie sowie ihre hohe Stereoselektivität von Vorteil ist.⁶⁴ Zumeist sind sie jedoch immer noch sehr teuer. Um Enzyme daher nicht kontinuierlich mit dem Produkt zu entfernen, wie bei einer homogenen Katalyse üblich, ist es sinnvoll sie an einen Träger zu binden. Dieser Vorgang wird als heterogene Katalyse bezeichnet. Dadurch kann das Enzym kontinuierlich eingesetzt werden, wodurch dessen Effektivität gesteigert und zudem eine Verunreinigung des Endproduktes vermieden wird. Allerdings finden bei der heterogenen Katalyse die Reaktionen nur an der Grenzfläche statt, wodurch diese einer Diffusionslimitierung unterliegen können.⁶³

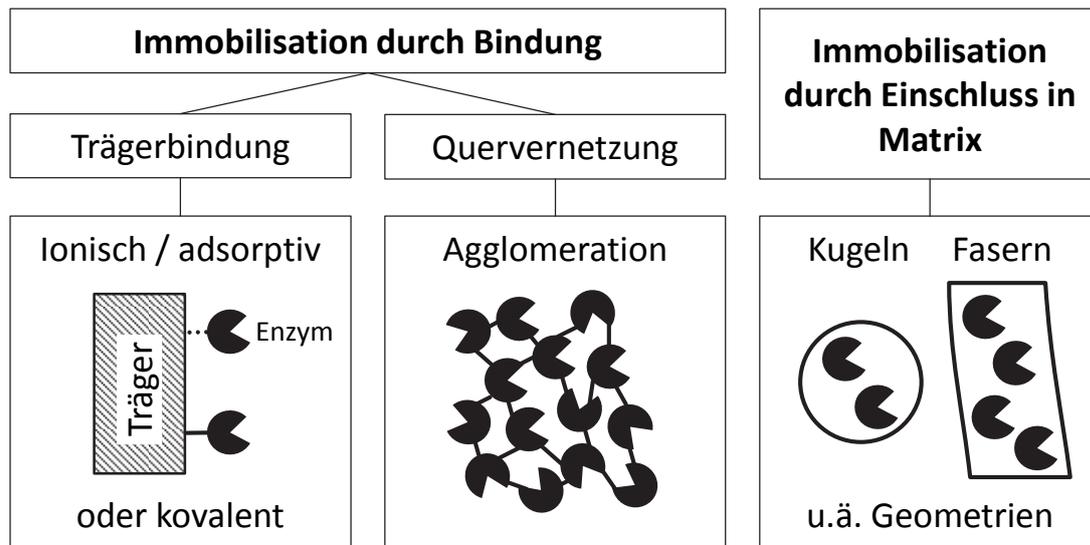


Abbildung 2.3 | Übersicht verschiedener Immobilisierungsmethoden von Enzymen (nach HARTMEIER⁶³).

Die erste erfolgreiche Immobilisierung von Invertase durch Adsorption auf Aktivkohle gelang NELSON im Jahr 1916⁶⁵. Seitdem haben sich verschiedene Methoden etabliert, um Enzyme zu trägern (**Abbildung 2.3**). Neben der Adsorption durch physikalische Wechselwirkungen, wie van-der-Waals-Kräfte oder Wasserstoffbrückenbindungen, können Enzyme auch durch ionische Wechselwirkungen oder kovalente Bindungen an einen Träger gebunden werden. Zudem besteht die Möglichkeit Enzyme durch Einschließen in einer Matrix sowie durch Quervernetzungen (Cross-linking) zu immobilisieren. Eine Quervernetzung ist mit mindestens bifunktionellen Reagenzien, wie z.B. Glutaraldehyd, einfach durchzuführen, wodurch unlösliche Enzymaggregate entstehen. Diese haben jedoch den Nachteil, dass sich viel aktives Enzym im Inneren der Aggregate befindet und somit für das Substrat schlechter zu erreichen ist. Zudem können die Vernetzungen die Konformation der Proteinketten beeinflussen, wodurch das Enzym an Aktivität verlieren kann.

Der Einschluss von Enzymen in einer Matrix erfolgt in der Regel in einem vernetzten synthetischen oder natürlichen Polymer, welches im eingesetzten Medium (z.B. Wasser) über eine gelartige Struktur verfügt. Das Substrat sowie die Produkte müssen durch das Gel zum Enzym und wieder hinaus diffundieren können, während die Diffusion des Enzyms selber im Netzwerk verhindert werden muss.⁶³ Um die Enzyme in der Matrix zurückzuhalten, ist die mittlere Maschenweite des gequollenen Netzwerks (ξ) im Verhältnis zum Volumen des Enzyms entscheidend, der durch den Anteil des vernetzenden Monomers bestimmt wird. Diese kann mit Hilfe der folgenden Gleichungen abgeschätzt werden.^{41, 66}

$$\xi = r \cdot S_v^{1/3}$$

Gleichung 2.3

r = Abstand zweier Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand

S_v = Volumenquellgrad des Hydrogels

Der Abstand der Vernetzungspunkte im ungequollenen Netzwerk (r) kann mit Hilfe der folgenden Gleichung bestimmt werden.

$$r = l \cdot C_N^{1/2} \cdot \left[\frac{2M_c}{M} \right]^{1/2} \quad \text{Gleichung 2.4}$$

r = Abstand zweier Vernetzungspunkte im ungequollenen Zustand

l = Bindungsabstand der CC-Bindung (1,54 Å)

C_N = Steifigkeitsfaktor / Flory Verhältnis (abhängig von Polymer und Lösungsmittel)⁶⁷

C_N (Acrylate) = 6,9

M_c = Netzkettenmolekulargewicht (Verhältnis von Vernetzer zu Monomer)

M = Molmasse des Monomers

Als Matrixmaterial zur Enzymimmobilisierung im wässrigen Medium werden in der Regel Hydrogele eingesetzt. Durch die dabei meistens zur Gelherstellung verwendete, radikalische Polymerisation wird eine Verteilung der Maschenweite erhalten, sodass Maschen unterschiedlicher Größe im Netzwerk entstehen. Dies hat in der Praxis zur Folge, dass trotz passender Maschenweite eingeschlossene Enzyme aus dem Netzwerk entkommen können und so eine Abschätzung des geeigneten Vernetzungsgrades erschwert wird.^{66, 68-69}

Mit Hilfe amphiphiler Polymer-Co-Netzwerke, die gleichzeitig aus kovalent verbundenen hydrophoben und hydrophilen Polymeren bestehen und sowohl in Wasser als auch in organischen Medien quellen können, ist es zudem möglich Enzyme auch in organischen Lösungsmitteln einzusetzen, indem diese in der hydrophilen Phase des Netzwerks eingeschlossen werden.⁷⁰⁻⁷¹

2.1.4 Reproduktion natürlicher Hybridmaterialien

Verschiedene Forschergruppen haben sich bereits mit den in **Kapitel 2.1.1** vorgestellten Strukturen beschäftigt, um ihren Aufbau zu verstehen und um die Vorgänge bei ihrer Bildung aufzuklären.²¹ Aufbauend auf den natürlichen Bauplänen konnten so eine Vielzahl neuer „bioinspirierter“ Kompositmaterialien auf Basis verschiedenster, synthetischer Materialien entwickelt werden⁷²⁻⁷³, die ähnliche Synergieeffekte wie ihre natürlichen Vorbilder aufweisen. Zum Beispiel konnten durch einen hierarchischen Schichtaufbau von Aluminiumoxidplatten mit Polymethylmethacrylat nach dem Vorbild des Perlmuttermaterials mit ähnlicher Steifigkeit, jedoch im Vergleich zum Vorbild deutlich gesteigerter Festigkeit und Zähigkeit, hergestellt werden.⁷⁴

Die biomimetische Reproduktion der modellstehenden, natürlichen Hybridmaterialien hingegen ist bis heute von großem wissenschaftlichem Interesse, da deren großtechnische Verfügbarkeit einen Durchbruch in der regenerativen Medizin sowie neue Möglichkeiten z.B. im Leichtbau eröffnen würde. Der maßgebliche Faktor bei der synthetischen Herstellung der Calciumsalz- oder Silikat-

basierten Komposite liegt in der Kontrolle über die Kristallisation bei der Erzeugung der anorganischen Phase, wie sie durch den jeweiligen Organismus ausgeübt wird. Am Beispiel der Muschel konnte durch Auflösung der anorganischen Phase des Bioverbundmaterials und der anschließenden Remineralisierung mit CaCO_3 gezeigt werden, dass die übriggebliebene polymere Matrix für die Kontrolle des Kristallwachstums eine entscheidende Rolle spielt.⁷⁵ Um diese Einflüsse genauer zu untersuchen, wurde die Mineralisation in wässriger Lösung unter Anwesenheit verschiedener Polymere als auch niedermolekularer Substanzen untersucht. Am Beispiel des CaCO_3 konnte gezeigt werden, dass mittels entsprechender Additive Einfluss auf die Kristall-Morphologie als auch den -Habitus genommen werden kann.¹² BELCHER et al. z.B. zeigte, dass durch eine Zugabe löslicher, polyanionischer Proteine aus der Muschelschale eine Veränderung des thermodynamisch-stabileren Calcits hin zum Aragonit erreicht werden konnte.⁷⁶

Neben der Ausfällung der Minerale aus gesättigten Lösungen ist ebenfalls möglich Enzyme in einem geeigneten Substratsystem zu verwenden, um Minerale direkt in der Lösung zu produzieren.⁷⁷ Diese Proteine üben zudem Einfluss auf die Kristallmorphologie aus. Die Anwesenheit von Urease in einer Lösung aus Harnstoff (Urea) und CaCl_2 führt zu einer Ausfällung von Calciumcarbonat durch die hydrolytische Spaltung von Urea zu Ammoniumcarbonat. Dabei entstehen bevorzugt Sphären aus Vaterit⁷⁸⁻⁷⁹, einer metastabilen Kristallmorphologie des CaCO_3 . Ohne die Anwesenheit der Urease kommt es hingegen zur Bildung der thermodynamisch stabileren Calcit-Struktur. Auch mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP), die eine Spaltung von Monophosphorsäureestern katalysiert, kann die Bildung von Calciumphosphat aus einer Lösung mit Calcium-2-Glycerolphosphat und CaCl_2 gesteuert werden. Durch die Variation der Menge des Enzyms und des pH-Werts kann Einfluss auf die Anteile an Hydroxylapatit und Calcium-defizitärem-Hydroxylapatit sowie deren Partikelgröße im gebildeten Niederschlag genommen werden.⁸⁰

Dank der Forschung zum Einfluss von Polymeren auf die Bildung von CaCO_3 , CaP und Silikat ist es mittlerweile möglich in Lösung komplexe, anorganische Strukturen ähnlich den Vorbildern aus der Natur nachzubilden.^{10, 12, 81-84}

Durch die Bindung funktioneller Gruppen an eine Oberfläche können zudem gezielt oberflächliche Mineralschichten aus CaCO_3 ⁸⁵⁻⁸⁷, CaP⁸⁸ und Silica⁸⁹⁻⁹⁰ erzeugt werden, die eine verbesserte Biokompatibilität und Zelladhäsion durch eine erhöhte Proteinaffinität dieser Beschichtungen zur Folge haben.⁹¹ Wiederholt man ein solches Verfahren nach dem „Layer-by-Layer“ Prinzip ist es auf diese Weise möglich, sehr regelmäßige Schichtaufbauten zu erzeugen.^{11, 92} WEI et al. gelang es durch die wiederholte Beschichtung eines Siliziumwafers mit löslichen geladenen Polymeren sowie CaCO_3 (mittels einer Gasdiffusionsmethode) regelmäßige Schichten abzuscheiden, die sowohl mechanisch als auch optisch denen von Perlmutter ebenbürtig waren. Auf diese Weise konnten Beschichtungen

bis 1,2 µm Dicke hergestellt werden.⁹² Der Weg bis zur Fertigstellung der Strukturen mit dem Layer-by-Layer Verfahren ist jedoch sehr langwierig und aufwändig, weshalb eine wirtschaftliche Erzeugung von Materialien mit Dimensionen außerhalb des Mikrometermaßstabes schwierig ist.

Um auf ökonomische Weise biomimetische Kompositmaterialien mit größeren Dimensionen zu erzeugen, bietet es sich an zuerst die polymere Matrix herzustellen und diese im Anschluss in ihrem Inneren, dem sogenannten Bulk, zu mineralisieren.⁹³ Im Gegensatz zum umgekehrten Prozess, bei dem ein bereits hergestellter anorganischer Füllstoff vor der Vernetzung mit einem Polymer oder Monomer vermischt wird⁹⁴⁻⁹⁷, bietet die Mineralisation im Netzwerk den Vorteil durch das Polymer die Bildung des Minerals gezielt beeinflussen zu können. Zwischen diesen beiden Prinzipien angesiedelte Verfahren fällen das Mineral vor oder während der Vernetzungsreaktion des Hydrogels aus.^{90, 98-99} SUN et. al. gelang es so in Anwesenheit von Polyacrylsäure CaCO₃ auszufällen, indem zu einer wässrigen Lösung des Polymers und CaCl₂ eine wässrige Na₂CO₃-Lösung zugegeben wurde. Dies führt durch die Anwesenheit des Polymers neben der Bildung von amorphen CaCO₃-Partikeln von wenigen Nanometern Größe ebenfalls zu einer Vernetzung der Polyacrylsäure über die Ca²⁺-Ionen, wodurch ein mineralisiertes Hydrogel (siehe **Kapitel 2.1.2**) entsteht.⁹⁸ Hydrogele als solche bieten aufgrund ihrer definierten Porenstruktur ein optimales Gerüst zur Herstellung von Hybridmaterialien durch Abscheidung einer mineralischen Phase in ihrem Inneren. Dabei spielen die Interaktion zwischen Polymer und Anorganik sowie die unterdrückte Konvektion und die verlangsamte Diffusion innerhalb des Hydrogels eine entscheidende Rolle. Diese Einschränkungen führen meist zu einem komplexen, nicht klassischen und kinetisch kontrollierten Kristallaufbau, wodurch sich grundsätzlich die Struktur und der Habitus von in Lösung entstandenen Kristallen unterscheiden. Zudem kann über die Änderung der Zusammensetzung des Hydrogels, wie z.B. Variation der Monomere, des Vernetzungsgrads oder auch über den pH-Wert sowie die Temperatur während der Mineralisation weiterer Einfluss auf die sich im Netzwerk bildenden anorganischen Strukturen genommen werden.¹⁰

In einer Vielzahl von Arbeiten wurde daher versucht verschiedene Arten synthetischer und natürlicher Hydrogele mit CaCO₃¹⁰⁰⁻¹⁰¹, CaP¹⁰² und Silikat¹⁰³⁻¹⁰⁵ zu mineralisieren. Darunter finden sich natürliche Gele auf Basis von Agar¹⁰⁶⁻¹⁰⁷, Collagen bzw. Gelatine^{104, 108-111}, Carragenan^{99, 112}, Chitosan¹¹³⁻¹¹⁴, Polypeptiden¹¹⁵, Polyethylenimin¹⁰⁵ sowie synthetische Gele aus Polyacrylsäure^{98, 116}, Polyacrylaten^{103, 117}, Polyacrylamid¹¹⁸⁻¹²¹, Silica¹²², Acrylnitril-1-Vinylimidazol-Copolymer⁵⁸ und andere¹²³⁻¹²⁴.

Zur nachträglichen Mineralisation bereits vernetzter, wasserquellbarer Polymernetzwerke wurden verschiedene Methoden in der Literatur verwendet:¹⁰⁰

Die *Gasdiffusions-Methode* ermöglicht die Mineralisierung eines Netzwerkes mit CaCO_3 .^{106-107, 110-111, 113, 123} Dazu wird das Hydrogel in eine wässrige Lösung, die Ca^{2+} -Ionen enthält, eingelegt. Aus einer zweiten Ammoniumcarbonat-Lösung diffundieren Ammoniak und CO_2 über die Gasphase in die calciumhaltige Lösung, wodurch sowohl das Anion für die Calcifizierung geliefert wird als auch eine pH-Verschiebung ins Basische stattfindet, die eine Mineralisation beschleunigt.

Bei der *Doppel-Diffusions-Methode* wirkt das Hydrogel als Trennschicht zwischen zwei wässrigen Lösungen, die jeweils das Anion bzw. das Kation zur Bildung von CaCO_3 ¹¹⁸⁻¹²² oder CaP ^{108, 112} enthalten. Die Mineralisation findet im Gel statt, wo die beiden diffundierenden Flüssigkeiten aufeinandertreffen.

Mit Hilfe der *Kitano-Methode* ist die Mineralisierung von Hydrogelen in gesättigten CaCO_3 -Lösungen möglich. Dabei wird der Effekt genutzt, dass ähnlich wie bei der Gasdiffusions-Methode CO_2 aus der Lösung ausdampft. Die dadurch hervorgerufene Verschiebung des pH-Wertes in den basischen Bereich verringert die Löslichkeit des CaCO_3 ¹¹⁴, wodurch das Mineral ausfällt.

Bei der *Soaking-Methode* werden die Hydrogele abwechselnd in einer Lösung des Anions und des Kations gequollen oder in Anwesenheit des Hydrogels, z.B. durch eine Änderung des pH-Wertes, ausgefällt. Auf diese Weise können sowohl CaCO_3 ^{114, 124} als auch CaP ^{58, 124-125} abgeschieden werden. Eine Mineralisierung von Hydrogelen mit Silikat¹⁰³⁻¹⁰⁵ ist mit dieser Methode ebenfalls möglich, indem das Netzwerk in einer Substratlösung, wie z.B. Tetraethoxysilan in Ethanol und Wasser, gequollen wird. Nach einiger Zeit fällt auf diese Weise SiO_2 auch im Hydrogel aus. Durch Wiederholung des jeweiligen Vorgangs kann die Menge des abgeschiedenen Minerals vergrößert werden.

Zudem existieren Arbeiten zur Abscheidung von Mineralien in peptidbasierten Hydrogelen, deren Ausfällung durch eine spezifische Aminosäuresequenz induziert wird.^{115, 126} Außerdem ist es möglich ein Hydrogel durch den Einbau anionischer Gruppen zu mineralisieren, da diese eine anziehende Wirkung auf Calcium-Ionen ausüben und so eine Nukleation von CaP an dieser Stelle begünstigen.¹¹⁷

Die mit den aufgeführten Methoden mineralisierten Hydrogele zeigen die Gemeinsamkeit, dass diese in den meisten Fällen nur zu einem geringen Teil in ihrem Inneren mineralisiert sind, da die Mineralisation besonders in der Nähe der Oberfläche verstärkt stattfindet. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den aufgeführten Fällen die schwerlöslichen Komponenten aus der Lösung in das Hydrogel hineindiffundieren müssen. Aus diesem Grund ist ein Ausfallen des Minerals bereits in der umgebenden Lösung sowie im Bereich der Netzwerkoberfläche bevorzugt. Dies führt im weiteren Verlauf dazu, dass die entstehende Schicht die Diffusionswege in das Hydrogel

verschließt, wodurch die weitere Diffusion der gelösten Salze in das Hydrogel blockiert und eine Mineralisierung der Gele im Bulk verhindert wird.

2.1.5 Enzyminduzierte Mineralisierung von Hydrogelen

Im Gegensatz zu den im Vorkapitel vorgestellten, synthetischen Hydrogel-Mineralisierungsmethoden sind Organismen in der Lage neben der Kristallmorphologie auch den Ort der Mineralentstehung zu bestimmen, indem sie lokal eine Übersättigung der Lösung hervorrufen können. Dies geschieht z.B. durch den gezielten Transport und die Freisetzung von Ionen bei der Knochenmineralisierung mit Hilfe von Vesikeln und Enzymen.¹²⁷ Durch die Steuerung der Nukleation sowie des Habitus und der Morphologie entstehender Kristalle durch Polymere ist es Organismen möglich eine für den jeweiligen Anwendungszweck optimierte Mikrostruktur zu erzeugen.

Das Aufkonzentrieren von Ionen in einer wässrigen Lösung, sodass nur lokal das Löslichkeitsprodukt überschritten wird, ist in synthetischer Umgebung jedoch praktisch nicht möglich, da Konzentrationsunterschiede bestrebt sind sich schnell wieder auszugleichen. Daher ist auch der aktive Transport eines schwerlöslichen Salzes in ein ebenfalls in der Lösung befindliches Hydrogel zur gezielten Ausfällung nicht ohne weiteres möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurde nach dem natürlichen Vorbild in Arbeiten versucht die Ionen durch Einschluss in Vesikeln in die Gelmatrix zu transportieren und dort freizusetzen. Liu et al. gelang es zum Beispiel durch Anlegen eines elektrischen Feldes Vesikelstrukturen, die sowohl Ca^{2+} als auch PO_4^{3-} enthielten, in ein Hydrogel aus Polyacrylamid migrieren zu lassen. Dabei entstanden im Gel sphärische Mikrostrukturen mit einem Durchmesser von ca. 1 μm aus Hydroxylapatit.^{102, 128} Eine weitere Möglichkeit besteht darin, das schwerlösliche Salz bzw. eine Komponente davon mit Hilfe eines Katalysators erst im Hydrogel zu erzeugen. Für letzteres ist ein im Netzwerk eingeschlossener Katalysator notwendig, der die Bildungsreaktion des Salzes, im Vergleich zur umgebenden Lösung, um ein Vielfaches beschleunigt. Eine vielversprechende Möglichkeit besteht in der Verwendung von Enzymen. Dazu existieren zahlreiche Arbeiten, die Systeme beschreiben, mit denen es möglich ist schwerlösliche Salze mit Hilfe der Biokatalysatoren aus stabilen Lösungen auszufällen.⁷⁷ Durch Immobilisation der Enzyme in einem Polymernetzwerk sollte es dadurch möglich sein diese Fällungsreaktionen gezielt auf das Innere eines Hydrogels zu konzentrieren. Zur Erzeugung biomimetischer Materialien auf Basis von Carbonat, Phosphat und Silikat bieten sich daher die Enzyme Urease, alkalische Phosphatase sowie Silikatein an (**Tabelle 2.3**).

Tabelle 2.3 | Liste der für eine Mineralisation von polymeren Hydrogelen mit Calciumcarbonat, Calciumphosphat und Silikat in Frage kommender Enzyme, ihrer katalysierten Reaktionen und der daraus fakultativ abzuscheidenden Mineralien (nach UNUMA⁷⁷)

Enzym	Reaktion	Keramische Produkte
<i>Urease</i>	Harnstoffhydrolyse zu Ammonium und Carbonat	CaCO ₃ , SrCO ₃ , BaCO ₃ , Calciumphosphat, ZnO, Magnetit
<i>Alkalische Phosphatase</i>	Hydrolyse von Monophosphorsäureestern (z.B. Calcium-2-Glycerolphosphat)	Calciumphosphat (z.B. Hydroxylapatit)
<i>Silikatein</i>	Kondensation gelöster Kieselsäure	SiO ₂ , TiO ₂ , ZrO ₂

Es sind verschiedene Möglichkeiten bekannt ein Enzym in einem wasserquellbaren Polymernetzwerk zu immobilisieren (**Kapitel 2.1.3**). Eine Möglichkeit besteht darin das Hydrogel in einer Lösung des Enzyms zu quellen, wodurch der Katalysator in das Netzwerk hineindiffundiert, wenn die Maschenweite dies zulässt. Dies hat den Nachteil, dass das Enzym bestenfalls adsorptiv gebunden ist und sehr leicht auch wieder hinausdiffundieren kann. Dadurch findet eine Mineralisierungsreaktion nach einiger Zeit unkontrolliert in der Lösung statt und ist nicht mehr nur auf das Hydrogel beschränkt. Zusätzlich kann eine homogene Verteilung des Enzyms im Inneren nicht sichergestellt werden. Um ein Enzym daher homogen in der Netzwerkstruktur einzuschließen, ist es sinnvoll dieses vor der Polymerisation des Netzwerks homogen im Monomer zu lösen. Dech et. al gelang es Lipase in einer Mischung aus 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) und einem telechelen, methacrylatterminierten Poly-2-Ethyloxazolin (PEtOx) zu lösen.⁷⁰ Die nach diesem Prinzip mittels radikalischer Fotopolymerisation erzeugten, amphiphilen Polymernetzwerke enthalten aktives Enzym. Durch die Immobilisierung des Enzyms im freien Volumen des Netzwerks bleibt dessen spezifische Aktivität sogar in organischen Lösungsmitteln¹²⁹ und überkritischem CO₂¹³⁰ erhalten oder wird je nach Netzwerkzusammensetzung sogar verbessert. Daher finden solche Systeme mittlerweile für die Biokatalyse⁷¹ und als Biosensoren¹³¹ Anwendung. Mit Hilfe ähnlicher Polymernetzwerke auf Basis von Poly-2-Hydroxyethylmethacrylat¹³²⁻¹³³, Alginat¹³⁴, Proteinen¹³⁵, Kollagen¹³⁶⁻¹³⁸ und verschiedenen PEG Derivaten^{136, 139} konnte bereits alkalische Phosphatase (AP) erfolgreich immobilisiert werden. Durch Einlegen der AP-beladenen Netzwerke in eine Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) - Lösung gelang es eine Ausfällung von Hydroxylapatit im Netzwerk zu induzieren. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass die Hydrolyse des Phosphorsäureesters durch die AP im Netzwerk schneller abläuft als in der umgebenden Lösung und sich so im Netzwerk eine erhöhte Phosphatkonzentration einstellt. Da sich gleichzeitig Ca²⁺-Ionen in der Lösung befinden, fällt das Phosphat an seinem Bildungsort aufgrund der Überschreitung des Löslichkeitsprodukts als schwerlösliches Salz aus. Insgesamt war das Verhältnis des anorganischen Materials im Bulk jedoch

vergleichsweise gering und die Abscheidung stark auf die oberflächennahen Regionen der Hydrogele konzentriert. Ein möglicher Grund dafür ist das in vielen Fällen auftretende Herausdiffundieren (engl. leaching) der AP aus dem Netzwerk, was zu einer unkontrollierten Ausfällung von Calciumphosphat in der Lösung führt und so die Effektivität der Netzwerkmineralisation stark mindert.¹³⁶ Die selektive Mineralisierung des Bulk eines Hydrogels mit Hilfe geeigneter, im Netzwerkinnen immobilisierter Enzyme, wie Urease oder Silikatein, wurde bis heute noch nicht untersucht.

Aufgrund der potentiell vielen Einfluss- und Steuerungsmöglichkeiten der Abscheidung anorganischer Strukturen innerhalb eines Hydrogels bietet das Prinzip der enzym-induzierten Mineralisation großes Potential zur Erzeugung von anorganisch/organischen Hybridmaterialien mit maßgeschneiderten Mikrostrukturen, wenn es gelänge die Mineralisierung auf das Innere eines Hydrogels zu konzentrieren.

2.2 Funktionelle Oberflächen

Die Natur verfügt neben der Fähigkeit Werkstoffe mit herausragenden Eigenschaften zu erzeugen ebenfalls über die Fähigkeit ihre Eigenschaften an deren Oberfläche wieder zu verändern. Durch Funktionalisierung und Strukturierung werden in der Natur Oberflächen geschaffen, die z.B. über selbstreinigende, reibungsmindernde, adhäsive, antimikrobielle und viele weitere Eigenschaften verfügen. In den vergangenen Jahrzehnten konnten basierend auf diesen Vorbildern eine Vielzahl neuartiger Oberflächenbeschichtungen entwickelt werden, die in der Lage sind diese Eigenschaften auf synthetische Materialien zu übertragen.¹⁴⁰ Die für diese Arbeit wichtigen Effekte sollen im Verlauf des Kapitels vorgestellt werden.

2.2.1 Der Lotus-Effekt

Der Effekt der Selbstreinigung von Oberflächen, benannt nach seinem bekanntesten Vertreter dem Lotus-Blatt⁵ (*Nelumbo nucifera*), wird durch das Zusammenspiel einer speziellen Oberflächentopographie und einer geringen Oberflächenenergie hervorgerufen. Dabei findet durch einen Flüssigkeitstropfen quasi keine Benetzung der Oberfläche statt, wodurch er seine Kugelform behält und daher bei geringer Neigung der Oberfläche von dieser abrollt und Verunreinigungen mitgerissen werden. Die Topographie der Lotusblatt-Oberfläche setzt sich aus einer Kombination zweier verschiedener, regelmäßiger Rauigkeiten zusammen. Die größeren Strukturen bestehen aus 10 bis 20 µm großen Erhebungen, auf denen weitere Unterstrukturen mit einer Größe von 0,1 bis 1 µm zu finden sind.¹⁴¹⁻¹⁴²

Die Form eines Tropfens auf einer Oberfläche wird durch jene Kräfte bestimmt, die an der Dreiphasengrenze auf den Tropfen wirken. Werden diese Kräfte auf ihre Grenzflächen bezogen, erhält man die Grenzflächenspannungen γ (γ_{sg} : fest/gasförmig, γ_{sl} : fest/flüssig, γ_{lg} : flüssig/gasförmig), deren Gleichgewicht die Beschreibung des Benetzungsverhaltens von Flüssigkeiten auf einer Oberfläche mit Hilfe der Young'schen-Gleichung¹⁴³ ermöglichen:

$$\gamma_{sg} - \gamma_{sl} = \gamma_{lg} \cdot \cos \theta \quad \text{Gleichung 2.5}$$

Ist ein Tropfen entsprechend klein, sodass die Schwerkraft vernachlässigbar ist, beschreibt diese die Abhängigkeit des Kontaktwinkels θ , den ein Tropfen auf einer in Wechselwirkung stehenden Oberfläche einnimmt. Ein Tropfen, der die Gleichung erfüllt, zeigt eine partielle Benetzung des Substrats. Ausgehend von der Young'schen-Gleichung hat sich eine Unterteilung abhängig vom Kontaktwinkel in hydrophile ($\theta < 90^\circ$) und hydrophobe ($\theta > 90^\circ$) Oberflächen etabliert (**Abbildung 2.4**). Neuere Arbeiten, welche sich mit den Wechselwirkungen zwischen Wasser und Oberflächen beschäftigen, setzen die Grenze zwischen hydrophil und hydrophob bei ca. 65° .¹⁴⁴⁻¹⁴⁵ Für den Fall, dass die Summe der Oberflächenspannungen der flüssig/fest und flüssig/gasförmig Grenzflächen gleich der Spannung der fest/gasförmig Grenzfläche ist, resultiert daraus ein Kontaktwinkel nahe 0° und der Tropfen spreitet als Film auf der Oberfläche. Dies wird als einfache Benetzung bezeichnet und gilt für Substrate mit einer hohen Oberflächenenergie.

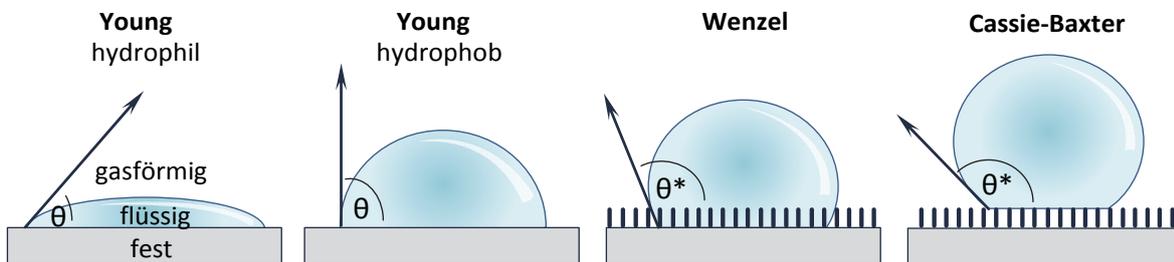


Abbildung 2.4 | Schema der Benetzung einer hydrophilen und hydrophoben Oberfläche nach YOUNG sowie einer hydrophoben Oberfläche mit zunehmender Feinstrukturierung.

Verfügt die Feststoffoberfläche hingegen über eine nur geringe Oberflächenenergie, so würde der Kontaktwinkel theoretisch bis zu einem Winkel von 180° ansteigen und es fände keine Benetzung der Oberfläche statt.¹⁴⁶ Ein derart hoher Kontaktwinkel kann in der Praxis durch die rein chemische Modifizierung einer Oberfläche jedoch nicht erreicht werden. Im besten Fall konnten auf glatten Polytetrafluorethylen-Oberflächen Kontaktwinkel von bis zu 120° realisiert werden.¹⁴⁷ Um höhere Werte zu erzielen, ist eine Strukturierung der Oberfläche Voraussetzung. Der Einfluss der Substratraugigkeit wird dabei durch die WENZEL-Gleichung beschrieben:¹⁴⁸

$$\cos \theta^* = r \cdot \cos \theta \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Diese setzt den beobachteten Kontaktwinkel des rauhen Substrats θ^* ins Verhältnis mit dem Winkel einer glatten Oberfläche θ nach Young. Der Wert r gibt das Verhältnis der rauhen Fläche zur glatten Fläche an. Daraus ergibt sich, dass eine strukturierte Oberfläche die Eigenschaften einer glatten Oberfläche verstärkt. Eine hydrophile Oberfläche ($\theta^* < \theta$) wird also hydrophiler, wohingegen eine hydrophobe Oberfläche ($\theta^* > \theta$) noch hydrophober wird. Ein Tropfen auf einem Substrat mit hoher Oberflächenenergie wird daher die Strukturen auch in den Vertiefungen vollständig benetzen. Bei hydrophoben Materialien kann es vorkommen, dass die freie Energie der trockenen Oberfläche geringer ist als die der Flüssigkeitsoberfläche, woraus kein Energiegewinn bei der Benetzung resultieren würde. In diesem Fall zieht sich der Tropfen von den rauhen Bereichen soweit es möglich ist zurück und benetzt diese nicht. CASSIE und BAXTER¹⁴⁹ beschrieben dieses Verhalten unter der Annahme einer heterogenen Oberfläche bestehend aus Lufttaschen und dem Festkörper:

$$\cos \theta^* = \varphi_s \cdot (1 + \cos \theta) - 1 \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Der Wert φ_s gibt den Oberflächenanteil des Festkörpers an. Daraus folgt, dass für sehr raue Oberflächen φ_s extrem klein wird und θ^* gegen 180° tendiert. Ein Wassertropfen auf solch einer Oberfläche benetzt diese dadurch praktisch nicht mehr (**Abbildung 2.5**).

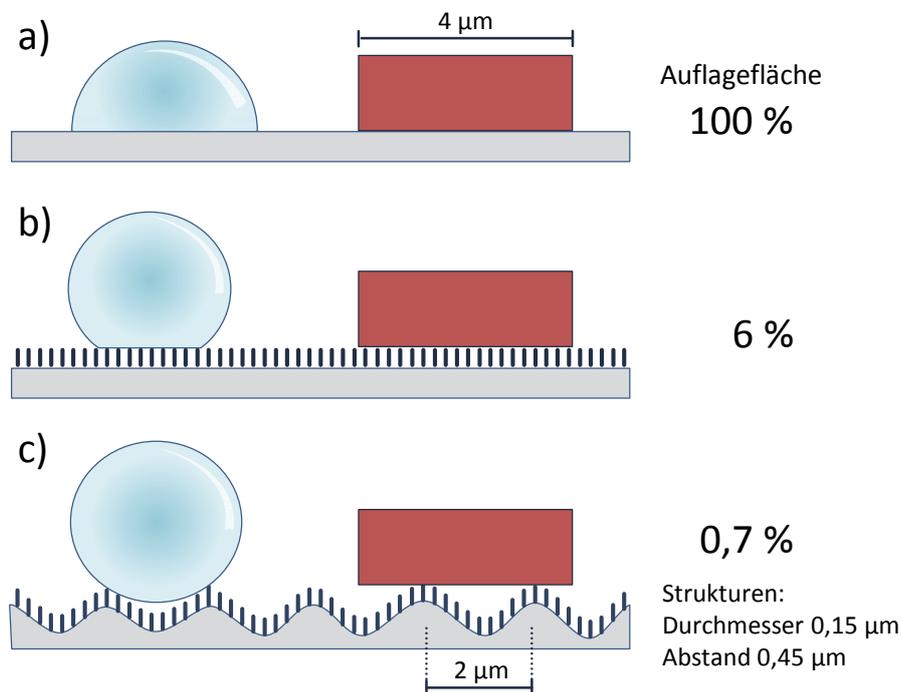


Abbildung 2.5 | Veränderung der Auflagefläche eines Wassertropfens und von Verschmutzungen auf einer (a) hydrophoben, glatten, sowie einer (b) strukturierten bzw. einer (c) doppelt strukturierten Oberfläche im Fall einer Benetzung nach CASSIE-BAXTER (nach BARTHLOTT¹⁵⁰).

Eine superhydrophobe (alias ultrahydrophobe) Oberfläche allein, die durch einen Kontaktwinkel größer 140° ¹⁵⁰ charakterisiert wird, ist für einen Lotus-Effekt jedoch nicht ausreichend. So können z.B. haarige Oberflächen hergestellt werden, die zwar über einen hohen Kontaktwinkel mit Wasser,

allerdings über keinen Selbstreinigungseffekt verfügen, da die Tropfen nicht abrollen.¹⁵¹ Um die Beweglichkeit eines Wassertropfens auf einer Oberfläche zu bestimmen ist die Kontaktwinkelhysterese (H) entscheidend. Diese setzt sich aus der Differenz zwischen dem Fortschritt- (θ_F) und dem Rückschreitwinkel (θ_R) zusammen.

$$H = \theta_F - \theta_R \quad \text{Gleichung 2.8}$$

Der Fortschrittwinkel ist der vordere Winkel bei der Bewegung eines Tropfens über eine Oberfläche, während der Rückschreitwinkel den hinteren bezeichnet. Um also einen Tropfen in Bewegung zu versetzen, muss dessen Adhäsion durch äußere Einwirkung z.B. durch Schwerkraft oder Wind überwunden werden. Dabei gilt: je größer der Kontaktwinkel, also desto geringer die Kontaktfläche sowie die Deformation des Tropfens bei der Benetzung ausfällt, desto kleiner ist die Hysterese (**Abbildung 2.5**). Ist die Hysterese also zu groß und die treibende Kraft nicht groß genug, wird der Tropfen haften bleiben oder über die Oberfläche verschmiert werden.¹⁵²

Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass der dynamische Kontaktwinkel sehr stark durch die Größe der Strukturen auf der Oberfläche beeinflusst wird. Trifft ein Wassertropfen auf Strukturen im oberen zweistelligen Mikrometerbereich, wird der Tropfen durch die Strukturen deformiert, obwohl dieser im direkten Vergleich viel größer ist. Aus diesem Grund sind in der Regel kleinere Strukturen notwendig, um Oberflächen mit Lotus-Effekt künstlich herzustellen.¹⁵³

Es wurden bis heute eine Vielzahl an Methoden entwickelt, um superhydrophobe Oberflächen mit Selbstreinigungseffekt durch Nachahmung der Strukturen des Lotusblattes herzustellen. Eine umfangreiche Auflistung findet sich in der Arbeit von WANG¹⁵⁴ und weiteren Reviews¹⁵⁵⁻¹⁵⁶. Bewährte Möglichkeiten sind zum Beispiel die Erzeugung von Mikro- und Nanostrukturen auf Siliziumoberflächen mit Hilfe von Lithographie-Methoden oder das Abformen von Pflanzenoberflächen mittels Silikon.¹⁵⁷ Außerdem kann eine Strukturierung durch Aufbringen von Polyacrylnitrilfasern oder fluoralkyl-beschichteter Kohlenstoff-Nanoröhrchen (ca. 60 nm Durchmesser) auf eine Oberfläche erfolgen.¹⁴¹ Eine weitere vielversprechende Möglichkeit stellen sogenannte „raspberry-like“ Partikel dar, deren Aussehen an das einer Himbeere erinnert. Um sie herzustellen, werden zwei Sorten von SiO₂-Nanopartikeln mit unterschiedlicher Größe gezielt aggregiert. Dazu wird die Oberfläche der kleinen Partikel mit Amino- und die der großen mit Epoxy-Gruppen funktionalisiert. Bringt man diese im entsprechenden Verhältnis zusammen bildet sich um die großen Partikel eine Hülle der kleineren Partikel. Durch Auftragung der funktionalisierten großen und kleinen Partikel auf eine Oberfläche wird eine gezielte Mikro- und Nanostrukturierung dieser erreicht. Nach einem anschließenden Hydrophobierungsschritt mit Polydimethylsiloxan konnte MING so Beschichtungen mit einem Kontaktwinkel von bis zu 165° (Wasser) und einer Hysterese von nur 3 ± 1° erzeugen.¹⁵⁸

2.2.2 Antimikrobielle Oberflächen

Neben der Entfernung von Schmutz ist es ebenfalls von großem Interesse Oberflächen vor einer Besiedlung mit Keimen zu bewahren. Gerade synthetische Werkstoffe, wie z.B. Kunststoffe oder Silikone stellen einen sehr guten Nährboden für Keime dar. Gelangen Mikroorganismen erst einmal auf eine solche Oberfläche, können sich diese ungehindert ausbreiten. Nach einer Zellvermehrung kommt es zudem in der Regel zur Ausbildung einer extrazellulären Polysaccharid-Matrix, dem sogenannten Biofilm, in den die Zellen eingebettet werden. Diese Matrix macht eine Kolonie um ein Vielfaches beständiger gegen Umwelteinflüsse und ebenfalls gegen die Wirkung von Desinfektionsmitteln und Antibiotika.¹⁵⁹⁻¹⁶⁰ Biofilme stellen in vielen Bereichen des täglichen Lebens, wie in der Lebensmittelindustrie¹⁶¹ oder im sanitären- und medizinischen Bereich¹⁶², eine ernstzunehmende gesundheitliche Gefahr dar. Auch bei technischen Anwendungen, wie an Schiffen und Gebäudefassaden, in Filteranlagen, Wärmetauschern, Pumpen und Rohrleitungen, führt Biofouling¹⁶² und -korrosion¹⁶³⁻¹⁶⁴ zu erheblichen Schäden, wodurch hohe Kosten verursacht werden. Die erhöhte Resistenz erschwert eine Entfernung eines ausgebildeten Biofilmes erheblich. Daher ist es notwendig die Besiedlung von Mikroorganismen auf einer Oberfläche und damit eine Biofilmbildung bereits vor ihrer Entstehung zu verhindern.

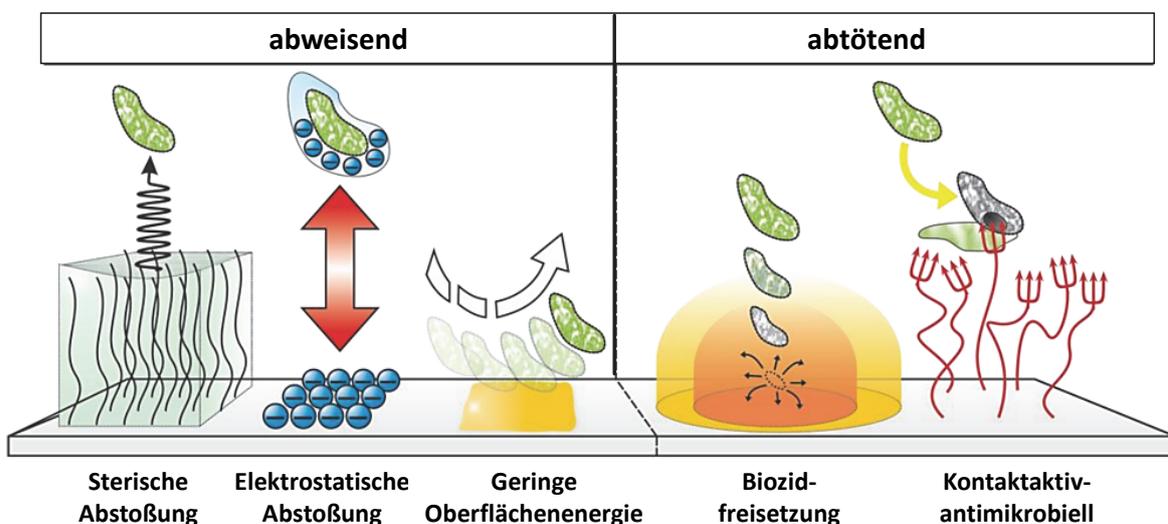


Abbildung 2.6 | Wirkungsweisen von antimikrobiell wirksamen Oberflächen.⁷

Um eine Oberfläche vor Mikroorganismen zu schützen, werden zwei grundlegende Strategien unterschieden (**Abbildung 2.6**): Mikroorganismen abweisende (anti-adhäsive) und abtötende Oberflächen.¹⁶⁵

Anti-adhäsive Oberflächen versuchen dabei bereits die Anhaftung eines Keims auf dem Substrat zu verhindern. Dieser Effekt kann auf verschiedene Art und Weise erzielt werden.

Eine Möglichkeit besteht z.B. in der dichten Modifizierung einer Oberfläche mit proteinabweisenden Polymeren wie Polyethylenglykol. Diese bilden eine wassergequollene Struktur auf der Oberfläche, deren geringe Wechselwirkungen keine Adhäsion der Mikroorganismen ermöglicht. Um doch an das Substrat binden zu können, müssen die Zellen die Polyethylenglykol-Schicht erst durchdringen, um die Bindungsstellen an der darunterliegenden Materialoberfläche zu erreichen.¹⁶⁶⁻¹⁶⁸

Des Weiteren können Oberflächen durch das Aufbringen negativer Ladungen geschützt werden. Diese sind in der Lage, Bakterien aufgrund ihrer ebenfalls negativen Oberflächenladungen abzustößen.¹⁶⁹ Dazu sind eine Vielzahl natürlicher und synthetischer Polymere¹⁶⁸, wie z.B. Albumin¹⁷⁰, geeignet. Zudem spielt auch die Oberflächenenergie für die Adhäsion von Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Je nach Art des Keims verfügen diese über ein hydrophobes oder hydrophileres Zelläußeres und können so am besten auf einer ähnlich gearteten Oberfläche adhären.¹⁷¹ Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Beschichtungen mit extrem geringer Oberflächenenergie grundsätzlich eine Anhaftung von Mikroorganismen vermindern. Solche Oberflächen können z.B. durch die Modifizierung mit verschiedenen fluorierten Polymeren erzeugt werden.¹⁷²⁻¹⁷³

Eine weitere Steigerung dieses Effekts ermöglicht die hydrophobe Beschichtung strukturierter Oberflächen, wodurch, wie im **Kapitel 2.2.1** beschrieben, der Kontaktwinkel von Wasser bis hin zur superhydrophoben Benetzung gesteigert werden kann. Untersuchungen zur Adhäsion von Mikroorganismen an Lotus-Blättern zeigen, dass diese natürlichen, superhydrophoben Oberflächen ebenfalls in der Lage sind effektiv einen Bakterienbefall zu verhindern.⁵

Um dies genauer zu erforschen, wurde die Zelladhäsion von Mikroorganismen an superhydrophoben, hierarchisch strukturierten Oberflächen untersucht.¹⁷⁴ Aufgrund ihrer geringen Oberflächenenergie und der kleinen Kontaktfläche durch die in der strukturierten Oberfläche eingeschlossenen Luft (Cassie-Baxter-Zustand) wird ein Anhaften von Mikroorganismen auf der Oberfläche weiter erschwert¹⁷⁵. Dieser Effekt konnte des Weiteren sowohl an natürlichen Substraten, wie Taro Blättern¹⁷⁵, als auch an synthetischen, strukturierten Oberflächen, wie PMMA¹⁷⁶, PDMS¹⁷⁷ und Titan¹⁷⁸, bestätigt werden. Dabei wiesen die Untersuchungen an laserstrukturierten Titanoberflächen von Fadeeva¹⁷⁸ (Kontaktwinkel zu Wasser von 166°) darauf hin, dass die Adhäsion an solchen Oberflächen zudem abhängig vom Organismus zu sein scheint. Während dem stabförmigen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) kein Adhärenz möglich war, konnten die kugelförmigen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) in großer Zahl die Oberfläche besiedeln. Dies zeigt beispielhaft, dass die Adhäsion von Mikroorganismen auf superhydrophoben Oberflächen durchaus komplex zu sein scheint.

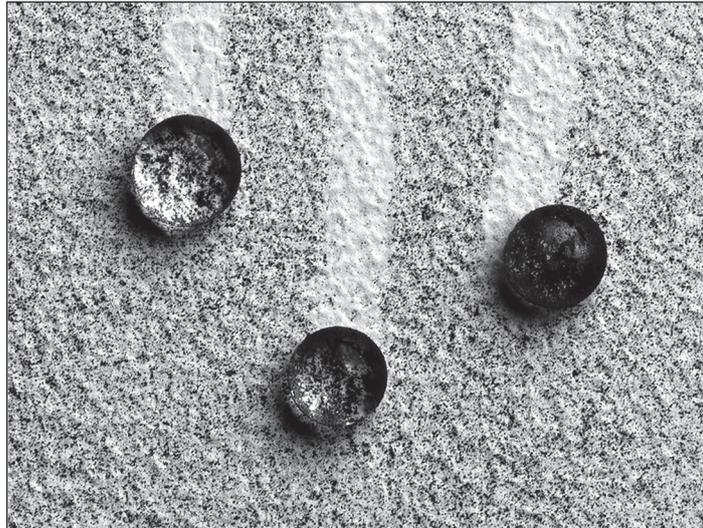


Abbildung 2.7 | Ausschnitt einer verschmutzten Fassade beschichtet mit der Fassadenfarbe Lotusan der Firma Sto SE & Co. KGaA bei Beregnung.¹⁴⁰

Als Grund dafür, warum es Mikroorganismen doch möglich ist auf abweisenden Materialien zu adhären, wird ihre uneinheitliche Oberfläche angenommen, die es schwer macht eine universelle Abwehrstrategie zu entwickeln.¹⁶⁵ Aus diesem Grund sind abweisende Oberflächen nicht dauerhaft in der Lage eine Besiedlung zu verhindern, sondern können dies nur hinauszögern. Um derartige Oberflächen dauerhaft frei von Zellen zu halten, wäre daher eine zusätzliche, regelmäßige Entfernung der adhären Mikroorganismen von der Oberfläche notwendig, wie es z.B. beim Lotus-Blatt erfolgt. Aus diesem Grund sollten hydrophobe, strukturierte Oberflächen, die zudem über eine geringe Kontaktwinkelhysterese verfügen, geeignet sein, um dauerhaft frei von Bakterien zu bleiben. In der Praxis zeigt sich jedoch, dass auch wenn all diese Voraussetzungen erfüllt sind, selbstreinigende Oberflächen nicht gänzlich vor Mikroorganismenbewuchs geschützt sind. Ein Beispiel dafür ist die Fassadenfarbe „Lotusan“, die wohl bekannteste, großtechnische Adaption des Lotus-Effekts, welche von der Firma Sto SE & Co. KGaA entwickelte wurde. Die Farbe erzeugt nach Auftragung einen Anstrich mit selbstreinigender Wirkung. „Voraussetzung für seine Wirksamkeit ist gelegentlich[e] Beregnung.“⁴. Dieser Satz stellt deutlich die Problematik solcher Fassadenfarben bzw. Oberflächen heraus, da nur der regelmäßige Kontakt mit größeren Mengen Wasser ein Abwaschen adhärerter Mikroorganismen von der Oberfläche ermöglicht und die Oberfläche so vor einer Besiedlung bewahrt werden kann (**Abbildung 2.7**). Dies ist jedoch in vielen Bereichen einer Fassade nicht der Fall, z.B. unter Dachüberständen, weshalb sich dort nach einiger Zeit trotz abweisender Beschichtung und Selbstreinigungseffekt Beläge bilden. Dieses Beispiel zeigt, dass auch der Lotus-Effekt alleine nicht ausreicht, um eine Oberfläche in allen Situationen vor Mikroorganismenbewuchs zu schützen, da ein aktiver Schutz gegen die Vermehrung von adhären Mikroorganismen fehlt.

Im Gegensatz zu Mikroorganismen abstoßenden Oberflächen sind abtötende Oberflächen in der Lage die Ausbreitung adhärierter Zellen aktiv zu verhindern. Die antimikrobielle Wirkung kann dabei durch die Freisetzung eines Biozids oder durch eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung erzielt werden (**Abbildung 2.6**).⁶

Bei Freisetzungssystemen wird, ausgehend von der Oberfläche, kontinuierlich ein Biozid abgegeben, das in der Nähe befindliche Mikroorganismen abtötet. Dies kann z.B. durch Einlagerung von Schwermetallen, Antibiotika, Halogenverbindungen, Stickoxiden sowie quartäre Ammonium-Verbindungen realisiert werden.^{7,179} Entscheidend für die Wirkung ist die Konzentration des Biozids an der Oberfläche. Dabei kann zwischen einer letalen Zone, in der die Konzentration des freigesetzten Stoffes ausreicht Mikroben abzutöten und einer Inhibierungszone, in der die Vermehrung der Mikroorganismen verhindert wird, unterschieden werden.¹⁶⁵ Das Biozid verbleibt nach dessen Freisetzung weiter in der Umwelt und kann dort zur Ausbildung von resistenten Mikroorganismen führen¹⁸⁰⁻¹⁸¹, wodurch seine Wirksamkeit sinkt. Zudem wird das Biozid bei diesem Vorgang kontinuierlich verbraucht, bis das Depot erschöpft ist. Der Effekt ist daher zeitlich limitiert. Eine Ausnahme bilden Systeme, die eine antimikrobielle Spezies katalytisch an der Oberfläche produzieren, wie z.B. TiO₂-Beschichtungen. Diese sind unter Anwesenheit von Wasser und UV-Strahlung in der Lage photokatalytisch Hydroxylradikale zu bilden, um Keime abzutöten.¹⁸² Sind diese Faktoren jedoch nicht vorhanden, bleibt eine antimikrobielle Wirkung dieser Beschichtung aus.

In den meisten Ländern ist heutzutage die Entwicklung und das Inverkehrbringen neuer, biozider Wirkstoffe mit hohen Kosten verbunden, da vor einer Zulassung zahlreiche Risikostudien durchgeführt werden müssen (siehe z.B. Europäische Verordnung über Biozidprodukte).¹⁸³ Im Gegensatz zu Biozid freisetzenden Beschichtungen zeichnen sich kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen dadurch aus, dass diese nur bei direktem Kontakt der Zelle mit der Oberfläche eine abtötende Wirkung besitzen. Die Zelle muss also zuerst auf der Oberfläche adhären und wird nicht bereits in der Nähe der Oberfläche in ihrem Wachstum eingeschränkt oder abgetötet. Aufgrund der fehlenden Freisetzung reichern sich daher keine Produkte in der Umwelt an. Die Unterscheidung, ob eine Oberfläche kontaktaktiv-antimikrobiell oder durch Freisetzung wirkt, ist ein experimentelles Problem. Einen Hinweis auf eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung gibt der sogenannte „Hemmhof Test“.⁶ Da bei kontaktaktiv-antimikrobiellen Oberflächen keine Freisetzung erfolgt, existiert kein Hemmhof um den abtötenden Bereich in dem die Vermehrung der Bakterien eingeschränkt ist. Bei einer kontaktaktiven Beschichtung ist daher die antimikrobielle Wirkung scharf auf die Auftragung begrenzt. Kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen besitzen meist starke, positive Ladungen, die durch eine hohe Dichte an kationischen Gruppen, wie alkylierte Pyridine, Imine oder andere quartäre Ammonium- bzw. Phosphoniumgruppen erzeugt werden.¹⁶⁵

Des Weiteren weisen geeignete Verbindungen meist einen amphiphilen Charakter auf, mittlerweile sind jedoch auch hydrophile bekannt.¹⁸⁴

Die Effektivität kontaktaktiv-antimikrobieller Oberflächen kann sich abhängig vom Mikroorganismus stark unterscheiden. Als Grund wird der unterschiedliche Aufbau der Zellhülle vermutet. Grampositive Bakterien zum Beispiel besitzen im Vergleich zu gramnegativen Keimen eine deutlich dickere Peptidoglykanschicht, wodurch ihre Zellen eine bessere mechanische Stabilität aufweisen. Allerdings verzichten diese dabei auf eine zweite, äußere Zellmembran, die gramnegative Bakterien deutlich resistenter gegen Antibiotika und Zersetzung durch Lysozym macht.¹⁸⁵

Wie genau kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen wirken, ist bis heute nicht eindeutig geklärt, jedoch werden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen. Diesen ist gemeinsam, dass eine Wechselwirkung der positiv geladenen Gruppen der Oberfläche mit der Membran der Mikroorganismen stattfindet. Dabei wird z.B. vermutet, dass die hohe Ladungsdichte das elektrochemische Potential der Membran stört.¹⁸⁶ Zudem wird diskutiert, dass die kationischen Gruppen negativ geladene Phospholipide aus der Zellmembran herausziehen und die Zelle dadurch abtöten.¹⁸⁷ Andere Arbeiten an Bakterien gehen davon aus, dass durch die positiven Ladungen eher andere Membranbestandteile, wie essentielle Calciumionen oder Lipopolysaccharide (gramnegativ) bzw. Teichonsäuren (grampositiv) austauschen, was zu einem Abbau der Membran führt.¹⁸⁸⁻¹⁸⁹ Zudem konnte gezeigt werden, dass auch der hydrophobe Bestandteil der kontaktaktiv-antimikrobiellen Verbindungen durch Adhäsion an der Zellmembran grampositiver Bakterien eine Deformation der Zelle bewirkt, was zum Zelltod führen kann.¹⁹⁰ Für kationische Gruppen, die über eine lange, bewegliche Polymerkette an die Oberfläche gebunden sind, wird zudem der Spacereffekt diskutiert durch den die antimikrobielle Gruppe die cytoplasmatische Membran erreichen und diese perforieren kann.¹⁹¹

Kontaktaktiv-antimikrobielle Beschichtungen sind ein wirksames Mittel viele Oberflächen dauerhaft frei von Bakterien zu halten. Aufgrund ihrer ausgeprägten Ladungsdichte weisen diese jedoch normalerweise hydrophile Oberflächeneigenschaften auf. Die Auftragung solcher Schichten auf eine ebenfalls hydrophile Oberfläche, wie Glas oder Keramik, ist unproblematisch, da Ihre Oberflächeneigenschaften dabei kaum verändert werden. Allerdings bieten derartige anorganische Oberflächen grundsätzlich keine gute Grundlage für die Vermehrung von Mikroorganismen und sind zudem mit klassischen Desinfektionsmitteln gut zu sterilisieren. Organische, hydrophobe Oberflächen hingegen, wie Kunststoffe oder Silikon, bieten einen deutlich geeigneteren Nährboden für die Vermehrung von Mikroorganismen. Diese schädigen zudem die Oberfläche durch ihren Bewuchs oft nachhaltig, weshalb es notwendig ist die betroffenen Oberflächen dauerhaft vor der

Anhaftung und Besiedlung von Mikroorganismen zu schützen. Bis jetzt ist es jedoch nicht gelungen unter Erhaltung der Hydrophobizität solche Oberflächen wirksam und dauerhaft mit kontaktaktiv-antimikrobiellen Substanzen auszustatten. Der Grund dafür ist, dass die hydrophoben Eigenschaften durch das Aufbringen der antimikrobiellen Substanzen verändert werden. Die mit der Beschichtung aufgebrauchten kationischen Ladungen führen dazu, dass die Oberfläche hydrophil wird. Dadurch verstärkt sich die Adsorption von Wasser, was den antimikrobiellen Eigenschaften entgegenwirkt, da so die Bedingungen für den Bewuchs mit Mikroorganismen verbessert werden. Die dadurch ermöglichte Zellvermehrung kann zudem dazu führen, dass kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen mit Mikroorganismen überwuchert werden, wodurch diese nicht mehr mit den lebenden Zellen in Kontakt kommen und die Oberfläche dadurch unwirksam wird. Um dies zu verhindern wäre eine Entfernung der anhaftenden Zellen notwendig.

Beispiele für diese Problematik stellen z.B. Silikonfugen und -oberflächen in Feuchträumen sowie Luftfilter in Autos, Flugzeugen, oder Klimaanlage dar. Letztere bestehen aus einem hydrophoben Polymerfließ (i.d.R. aus Polypropylen) und müssen aufgrund der Verschmutzungen und der guten Vermehrungsgrundlage des Materials für Mikroben jedes Jahr getauscht werden, da es sonst zur Bildung von unangenehmen Gerüchen oder gar zu einer Keimbelastung der gefilterten Luft kommen kann.¹⁹² Eine kontaktaktiv-antimikrobielle Modifizierung wird bis heute nicht durchgeführt, da eine hydrophile Beschichtung dazu führt, dass sich Feuchtigkeit im Filter ansammelt. Dies verschlimmert die Geruchsproblematik weiter und verringert zugleich die Filterwirkung, da die Poren im Fließ durch die anhaftende Feuchtigkeit verschlossen werden.

3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es durch die Kombination organischer und anorganischer Komponenten neuartige, funktionelle Materialien zu erzeugen.

Nach dem Vorbild strukturgebender Biomaterialien (wie Knochen, Zähne und Schalen), die über außerordentliche mechanische Eigenschaften verfügen, sollen basierend auf wasserquellbaren Polymernetzwerken nanostrukturierte, anorganisch/organische Hybridmaterialien synthetisch hergestellt und charakterisiert werden.

Die Synthese soll mit dem Blick darauf entwickelt werden solche Materialien möglichst einfach und effizient zu produzieren, indem fertige Polymere-Hydrogele in ihrem Inneren selektiv mineralisiert werden. Durch Immobilisierung von Enzymen soll dieser Vorgang unter milden Reaktionsbedingungen möglich gemacht werden. Dazu sind Systeme basierend auf Calciumcarbonat, Calciumphosphat und Silikat von besonderem Interesse. Des Weiteren soll über eine gezielte Beeinflussung der chemischen Struktur der Polymernetzwerke die anorganischen Strukturen im Inneren gesteuert werden. Die Kontrolle über die Nanostrukturen würde die Herstellung neuer Materialien ermöglichen, die den natürlichen Vorbildern gleichen oder sogar über völlig neue Eigenschaften verfügen.

Des Weiteren soll durch die Kombination funktioneller Eigenschaften auf Oberflächen die Entwicklung neuartiger Beschichtungen ermöglicht werden, die einen Lotus-Effekt mit einer antimikrobiellen Wirkung vereinen. Die nach ihrer Auftragung für einen Lotus-Effekt notwendige Mikro- und Nanostrukturierung der Schicht soll durch eine anorganische Komponente erzeugt werden. Gleichzeitig führt eine organische Funktionalisierung dazu, dass diese Schichten auch eine antimikrobielle Wirkung aufweisen.

Dazu sollen monodisperse SiO_2 -Nanopartikel hergestellt und auf ihrer Oberfläche mit einem kontaktaktiv-antimikrobiell wirksamen Silan funktionalisiert werden, das sowohl über eine quartäre Ammonium-Gruppe als auch über eine lange Kohlenstoffkette verfügt. Durch die Auftragung der Partikel auf Oberflächen aus einer Dispersion oder kolloidalen Lösung sollen auf diese Weise Materialien, wie Kunststoffe und insbesondere Silikone, die für die Besiedlung von Mikroorganismen besonders anfällig sind, geschützt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Kapiteln werden die Versuche und Ergebnisse zu den durch Enzym-induzierte Mineralisation hergestellten, anorganisch/organischen Hybridmaterialien vorgestellt und diskutiert. Im Anschluss werden zudem die neuen Erkenntnisse zur bifunktionell-antimikrobiellen Ausstattung von hydrophoben Silikonoberflächen durch Kombination von kontaktaktiv-antimikrobieller Wirkung mit Bakterien abweisender Wirkung mittels Lotus-Effekt präsentiert und diskutiert.

4.1 Urease-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen

Perlmutter erzeugende Organismen wie Muscheln oder Schnecken sind in der Lage die Kristallisation von Calciumcarbonat (CaCO_3) mittels Polymerstrukturen zu steuern, wodurch unter milden Reaktionsbedingungen Materialien mit komplexen Strukturen und sehr guten mechanischen Eigenschaften erzeugt werden (**Kapitel 2.1.1**). Auf Grundlage dieses Vorbilds ist es das Ziel in dieser Arbeit synthetische, bioaktive Hydrogele zu entwickeln, die selektiv in ihrem Inneren mineralisiert werden können. Außerdem soll untersucht werden in wie weit die Struktur sowie der Habitus der darin gebildeten CaCO_3 -Kristalle beeinflusst werden kann.

4.1.1 Aktivität immobilisierter Urease in verschiedenen Hydrogelen

In klassischen Fällungsreaktionen, bei denen eine Ca^{2+} und eine andere CO_3^{2-} beinhaltende Lösung zusammengegeben werden, kristallisiert das schwerlösliche CaCO_3 in der thermodynamisch stabilsten Calcit-Struktur. Der Ort dieser Kristallisation ist bei homogener Kristallbildung rein zufällig. Bieten sich jedoch Oberflächen mit affinen Bindungen an, so findet eine Kristallisation bevorzugt dort statt. Eine Ausfällung von CaCO_3 lässt sich ebenfalls durch das Enzym Urease induzieren.⁷⁹ Dazu wird eine Lösung, die sowohl Harnstoff (Urea) als auch Ca^{2+} -Ionen enthält, hergestellt. Die Hydrolyse von Harnstoff zu Carbonat und Ammoniak (**Abbildung 4.1**) läuft bei Raumtemperatur (RT) derart langsam ab, dass auch nach mehrmonatiger Lagerung einer Lösung aus CaCl_2 und Harnstoff keine Ausfällungen zu beobachten sind. Durch die Zugabe von Urease zur Lösung wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Harnstoffhydrolyse um den Faktor 10^{14} im Vergleich zur unkatalysierten Reaktion erhöht, wodurch es nach kurzer Zeit zur Ausbildung eines weißen CaCO_3 -Niederschlags in der Lösung kommt.¹⁹³ Die Proteinstruktur der Urease übt zudem auch Einfluss auf die Struktur der gebildeten CaCO_3 -Kristalle aus, wobei durch Untersuchungen mittels Röntgendiffraktometrie besonders instabile Kristallmodifikationen wie Vaterit nachgewiesen werden konnten. Dessen Anteil konnte zudem durch die Konzentration der Urease in der Lösung

beeinflusst werden.⁷⁸ Des Weiteren wurde festgestellt, dass durch die Immobilisierung der Urease auf Oberflächen auch amorphe CaCO₃-Strukturen gebildet werden können.¹⁹⁴

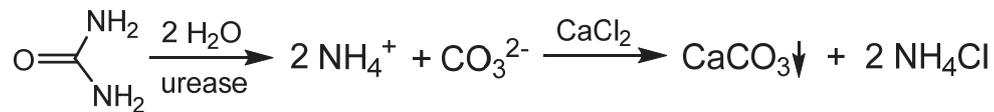


Abbildung 4.1 | Reaktionsgleichung der Hydrolyse von Harnstoff zu Carbonat und Ammoniak und dem Ausfallen von CaCO₃ bei Anwesenheit von Calciumchlorid.

Das Konzept der Urease-induzierten Fällung sollte im nächsten Schritt dazu verwendet werden, ein Hydrogel selektiv im Inneren zu calcifizieren. Da die Urease ein sehr hohes Molekulargewicht von ca. 590 kDa¹⁹⁵ besitzt, ist es problematisch diese in einem Polymernetzwerk zu immobilisieren. Es ist lediglich ein Beispiel in der Literatur bekannt, bei dem das Enzym in einer γ -Strahlen vernetzten Poylvinylalkohol/Polyacrylamid-Matrix eingeschlossen werden konnte.¹⁹⁶ Ein Grund dafür ist die Größe der Urease, die ein Hineindiffundieren des Enzyms in ein Netzwerk erschwert. Aus diesem Grund musste eine Möglichkeit gefunden werden, das Enzym bereits während der Polymerisation des Hydrogels homogen verteilt im Netzwerk zu immobilisieren. Dazu wurde die von DECH⁷⁰ et al. entwickelte Methode adaptiert (**Kapitel 2.1.5**), bei der das aktive Enzym homogen in einer Monomermischung gelöst und anschließend mittels UV-Polymerisation in das Hydrogel eingeschlossen wird. Das dabei verwendete Monomer 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) in Kombination mit einem telechelen, methacrylat-terminierten Poly-2-Ethylloxazolin (PEtOx) Vernetzer zeigte eine Enzymlöslichkeit. Auf Grundlage dieses Netzwerks wurde daher im ersten Schritt versucht, Urease in der Monomermischung aus HEA und PEtOx zu lösen. Neben dem Netzwerk mit langkettigem PEtOx-Vernetzer (ca. 5000 g/mol) sollte ebenfalls versucht werden, Urease in einer Mischung aus HEA und Tetraethylenglycoldimethacrylat (TEG, 330 g/mol) als oligomerem, kurzketzigem Vernetzer zu immobilisieren, um den Einfluss der Vernetzung auf die Ureaseaktivität zu untersuchen. Um die Urease in den Monomermischungen lösen zu können, muss diese jedoch zuvor in geringen Mengen Wasser gelöst werden. Diese Enzym-Wasser-Gemisch konnte dann zu den HEA/PEtOx (PEtOx 30 bis 70 Gew%) oder HEA/TEG (TEG 3 bis 30 Gew%) Mischungen gegeben werden, sodass eine Lösung entsteht in der weder eine Trübung noch ein Niederschlag erkennbar ist. Die maximale Löslichkeit der Urease in den Monomermischungen beträgt 5 Gew%. Als initiale Konzentration für die Versuche wurde eine Ureasemenge von 1 Gew% gewählt. Daher wurde eine Monomermischung, die 1 Gew% Urease enthielt, zwischen zwei Glasplatten mittels UV-Licht polymerisiert. Die dabei erzeugten Polymernetzwerke PolyHEA -linked by (vernetzt durch)- PEtOx und PHEA-/TEG wurden auf die verbliebene Aktivität der in ihnen immobilisierten Urease hin untersucht. Dazu wurde die pH-Wert Änderung der durch die Harnstoffhydrolyse erzeugten Produkte in Wasser verfolgt (**Abbildung 4.2**). Die spezifische Aktivität der in Wasser gelösten Urease

beträgt 18.8 U/mg. Die in einem PHEA-*I*-PEtOx Film mit 30 Gew% PEtOx immobilisierte Urease zeigt eine nahezu gleich große Aktivität. Durch die weitere Erhöhung des PEtOx-Anteils im Netzwerk kann die Aktivität im Vergleich zur Urease in Lösung sogar noch auf bis zu 150% gesteigert werden. Mit Hilfe der PHEA-*I*-TEG Netzwerke ist es ebenfalls möglich Urease in ihrer aktiven Form einzuschließen. Allerdings vermindert sich ihre Aktivität bei Verwendung von 3 Gew% TEG als Vernetzer auf etwa 50% des freien Enzyms. Die Erhöhung des TEG-Anteils auf 30 Gew% führt zu einem starken Verlust der Enzymaktivität von ca. 90%. Bei allen Filmen stoppte die Reaktion sofort, nachdem der Film aus der Lösung entfernt wird. Dies zeigt, dass kein Enzym aus dem Film herausdiffundiert.

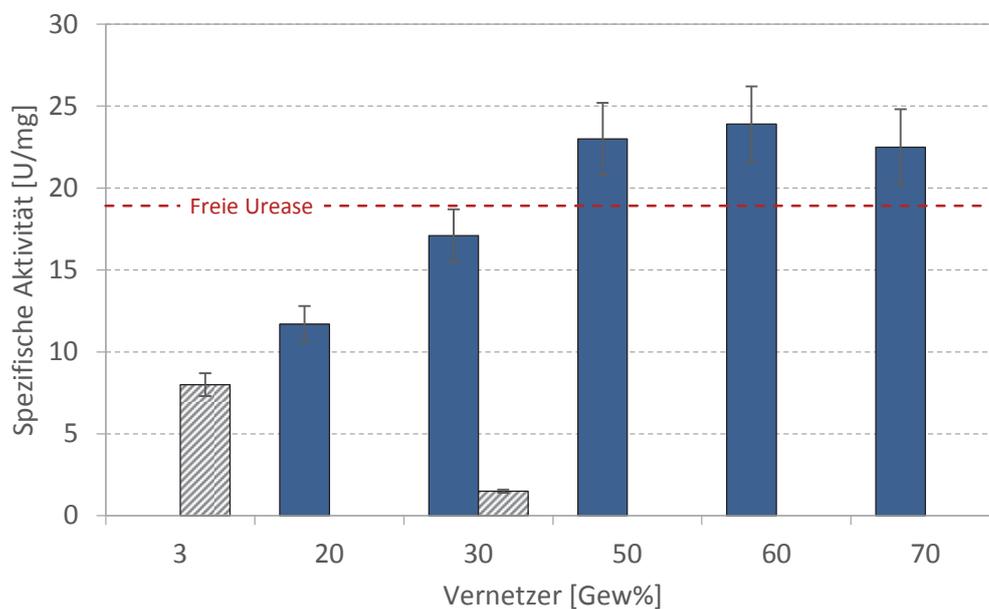


Abbildung 4.2 | Spezifische Aktivitäten der Urease in PHEA-*I*-PEtOx (dunkelblau) und PHEA-*I*-TEG Netzwerken (grau gestreift) mit unterschiedlichen Vernetzeranteilen bei RT. Die Enzymbeladung beträgt jeweils 1 Gew% Urease.¹⁹⁷

4.1.2 Calcifizierung der bioaktiven Hydrogele mit CaCO₃

Die zwei Netzwerktypen mit immobilisierter, aktiver Urease wurden im nächsten Schritt auf ihre Eignung für eine Enzym-induzierte Mineralisation hin untersucht. Dazu wurde als erstes ein PHEA-*I*-TEG Film (3 Gew% TEG/97 Gew% HEA, Filmgröße 6x6 mm, Filmdicke 250 ± 30 µm) mit 1 Gew% Urease beladen sowie ein Netzwerk ohne immobilisiertes Enzym in 5 ml einer wässrigen Harnstoff- (10 g/l, 0,17M) und CaCl₂-Lösung (30 g/l, 0,27 M) gegeben. Zusätzlich wurde ein PHEA-*I*-PEtOx Netzwerk mit 50 Gew% PEtOx und 0,3 Gew% Urease, sowie eine Probe ohne Enzym, auf dieselbe Art behandelt. Die geringe Urease-Konzentration bei Letzterem wurde gewählt, um die beiden Netzwerktypen bei ähnlicher Aktivität der Urease vergleichen zu können. Nach einiger Zeit in der Lösung trüben beide Filme, die immobilisierte Urease enthielten, ein (**Abbildung 4.3a**), wohingegen die Netzwerke ohne Enzym sich nicht veränderten. Die Trübung wurde bis etwa 30 Minuten sichtbar

stärker, danach waren die Netzwerke vollständig opak und verändern sich optisch nicht mehr. Es wurde eine Probe der Filme nach 30 Minuten entnommen, kurz in bidestilliertem Wasser gespült und sofort im Vakuum getrocknet. Danach wurde das Stück in flüssigem Stickstoff gebrochen und der Querschnitt im Rasterelektronenmikroskop (REM) betrachtet. Es zeigte sich, dass die Trübung der Filme durch sphärische Partikel hervorgerufen wird, die im Inneren der Netzwerke mit einer Größe von bis zu 1 μm homogen verteilt vorliegen (**Abbildung 4.3b**). Transmissionselektronendiffraktometrie- (TED) und Energiedispersive-Röntgenspektroskopie-Aufnahmen bestätigen die Annahme, dass es sich um amorphes CaCO_3 handelt. Die Sphären können jedoch nur zu Beginn der Reaktion innerhalb der ersten 30 Minuten durch sofortige Trocknung der Netzwerke isoliert werden, da sie sich danach in kristalline Strukturen umwandeln und beginnen zu agglomerieren (**Abbildung 4.3c**). Um sicherzustellen, dass die Reaktion vollständig abgelaufen war, wurden beide Netzwerke noch für weitere 48 h in der Lösung belassen. Die beiden nicht mit Urease beladenen Netzwerke wiesen auch nach 7 d keine Trübung auf, was wiederum ein Beleg dafür ist, dass die Trübung der Filme durch die Urease verursacht wird. **Abbildung 4.3d** und **Abbildung 4.3e** zeigen die Querschnitte der wassergequollenen PHEA-/TEG und PHEA-/PEtOx Netzwerke nach 48 h in Lösung. Dabei ist zu erkennen, dass beide Netzwerktypen im Inneren homogen modifiziert sind, dabei jedoch einige Unterschiede aufweisen. Der modifizierte PHEA-/PEtOx Film weist größere Strukturelemente im Inneren als der modifizierte PHEA-/TEG Film auf. Letzterer zeigt hingegen nahezu keine Kristallbildung auf der Oberfläche, was darauf schließen lässt, dass die Reaktion stärker auf das Filminnere beschränkt zu sein scheint.

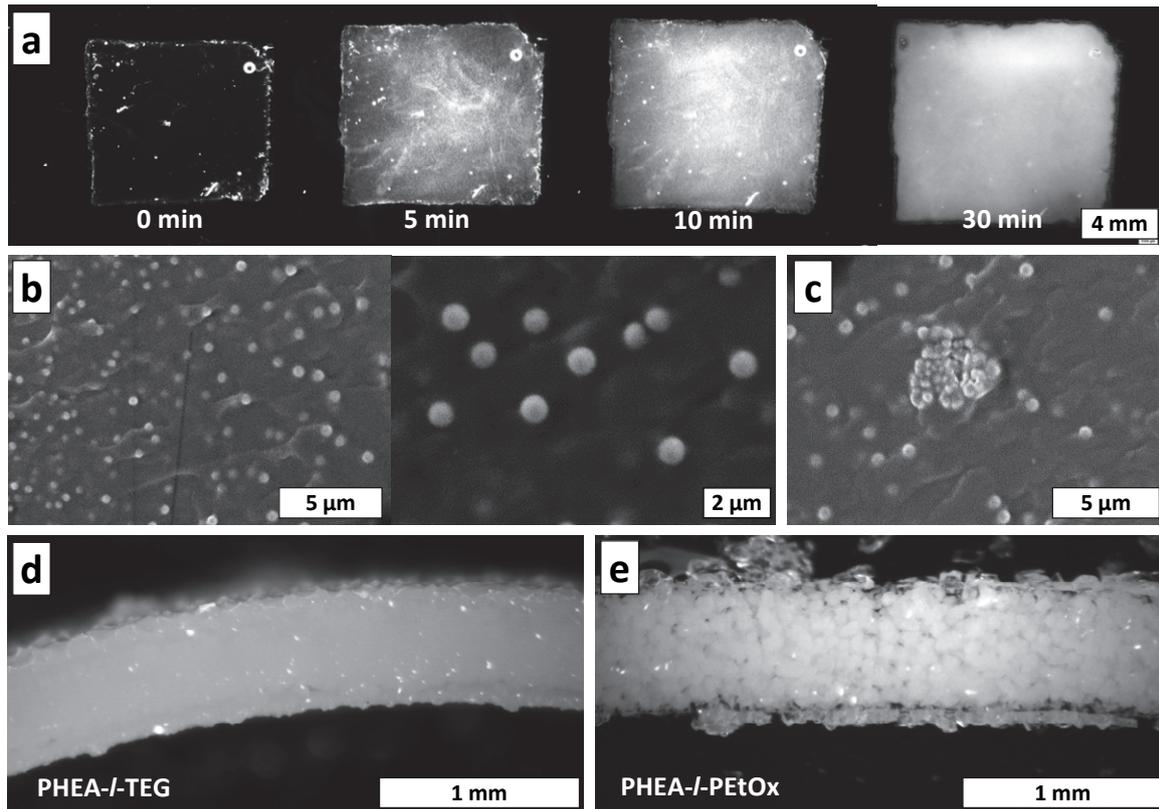


Abbildung 4.3 | (a) Lichtmikroskopische Aufnahmen eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Urease in einer Harnstoff- (10 g/l) und CaCl_2 -Lösung (30 g/l) bei Raumtemperatur (RT) nach verschiedenen Zeiten. Die REM-Aufnahmen zeigen vergrößerte Ausschnitte des Querschnitts der calcifizierten Filme nach (b) 5 Min und (c) 30 Min. Die Bilder (d) und (e) zeigen die Querschnitte der calcifizierten Hydrogele (d) PHEA-I-TEG (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) und (e) PHEA-I-PEtOx (50 Gew% PEtOx, 0,3 Gew% Urease) nach Calcifizierung in der gleichen Lösung bei RT für 48 h.¹⁹⁷

Die gebildeten Strukturen im Inneren der Netzwerke wurden im Folgenden mit Hilfe von Rasterelektronenmikroskopie (REM), energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Transmissionselektronendiffraktometrie (TED) und Röntgendiffraktometrie (XRD) charakterisiert. **Abbildung 4.4a** zeigt eine REM-Aufnahme eines eingetrübten PHEA-I-TEG Films, der sich 48 h bei RT in der Harnstoff/ CaCl_2 -Lösung befand. Darauf lassen sich isolierte, sphärische Strukturen innerhalb der Polymermatrix erkennen. Bei höheren Vergrößerungen (**Abbildung 4.4b**) zeigt sich, dass die Sphären aus beinahe parallel angeordneten, stabartigen Strukturen aufgebaut sind, die eine Dicke von weniger als 100 nm und eine Länge von bis zu mehreren µm aufweisen. Daneben kommen jedoch auch Strukturen kleiner als 50 nm mit schwer definierbarer Geometrie vor. Ein EDX-Mapping (**Abbildung 4.4c**) zeigt, dass sich Calcium nur in den sphärischen Strukturen und nicht im Polymernetzwerk wiederfindet, während kein Chlor nachgewiesen werden konnte. Daher lässt sich ausschließen, dass die Strukturen aus CaCl_2 bestehen und gleichzeitig zeigt es, dass der Waschvorgang mit bidestilliertem Wasser nach dem Entfernen der Netzwerke aus der Harnstoff/ CaCl_2 Lösung ausreicht, um das Chlorid vollständig aus dem Netzwerk zu entfernen. Um die offensichtlich kristallinen Strukturen genauer zu untersuchen, wurden XRD-Messungen durchgeführt (**Abbildung 4.4h**). Dabei zeigt sich, dass die meisten im

Diffraktogramm enthaltenen Peaks der CaCO_3 Kristallstruktur Aragonit zugeordnet werden können. Die kleineren nicht zu Aragonit gehörenden Banden lassen sich der „Calcit“ Struktur zuordnen. Die Ergebnisse zeigen, dass die angestrebte Urease-induzierte Calcifizierung eines Polymernetzwerks mit CaCO_3 erfolgreich war. Im Unterschied zu den mineralisierten PHEA-/TEG Netzwerken entstanden in den PHEA-/PEtOx Filmen mit gleicher Ureaseaktivität während der Calcifizierung deutlich größere Strukturen mit einem Durchmesser von 30-40 μm (**Abbildung 4.4d**), wie sie schon anhand der lichtmikroskopischen Aufnahmen zu erkennen waren (**Abbildung 4.3e**). Diese sind ebenfalls kristallin, bestehen aber laut XRD-Messungen nur aus Calcit (**Abbildung 4.4i**). Weitere Untersuchungen zu den in den PHEA-/TEG Netzwerken gefundenen Kristallen zeigten, dass den Nanostabstrukturen keine spezifische Kristallstruktur zugeordnet werden kann. Wie in den TED-Aufnahmen in **Abbildung 4.4f** und **g** zu erkennen ist, deuten die erhaltenen Reflexe der Stabstrukturen an einer Stelle auf Aragonit, an der einer anderen auf Calcit hin. Dieser Polymorphismus des stabförmigen Habitus von CaCO_3 findet sich auch in der Literatur wieder.¹⁹⁸⁻
¹⁹⁹ Die TED-Aufnahmen deuten zudem in allen Fällen auf polykristalline Strukturen hin. Da die Dünnschnitte für TEM-Untersuchungen eine Dicke von weniger als 100 nm besitzen, sind in den TEM-Bildern (**Abbildung 4.4e**) nur Bruchstücke erkennbar, die nicht die ursprüngliche Struktur wie im REM wiedergeben.

Um den Anteil des gebildeten Aragonits und Calcits in einem Film zu quantifizieren, wurde, wie in **Kapitel 6.11** beschrieben, mit Hilfe eines Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR) mit Abgeschwächter-Totalreflektions-Messeinheit (ATR) die Extinktion der charakteristischen Banden bei 699 cm^{-1} und $711\text{-}712\text{ cm}^{-1}$ bestimmt.²⁰⁰ Über das Verhältnis der Banden konnten dann die Anteile der beiden Kristallstrukturen im trockenen Komposit bestimmt werden. Die Gesamtmenge des im Inneren der Netzwerke bei der Calcifizierung entstandenen CaCO_3 wurde mit Hilfe eines Thermogravimetrischen-Analysators (TGA) bestimmt (**Kapitel 6.11**). Durch das Aufheizen der Komposite auf über 600 °C unter Sauerstoffatmosphäre wird ein vollständiges Verbrennen des organischen Netzwerkes sichergestellt, ohne dass die anorganischen Strukturen verändert werden. Der gemessene Mineralisationsgrad des für 48 h bei RT mineralisierten PHEA-/TEG Komposits (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) betrug 69,5 Gew%. Im Gegensatz dazu betrug der Anteil an CaCO_3 im auf die gleiche Art mineralisierten PHEA-/PEtOx Films (50 Gew% PEtOX, 0,3 Gew% Urease) nur 39,5 Gew%.

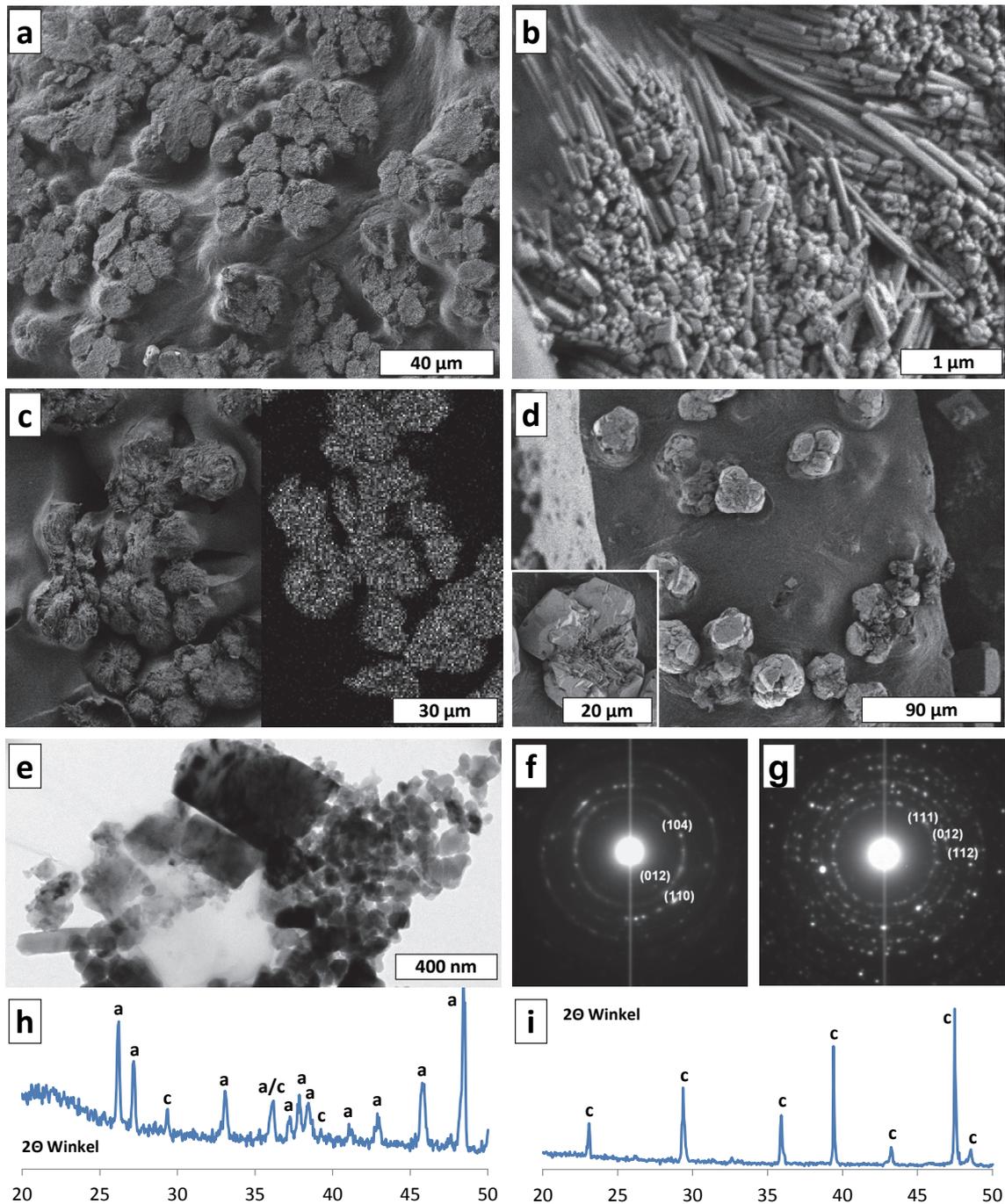


Abbildung 4.4 | (a, b) REM-Bilder des Querschnitts eines in Stickstoff gebrochenen PHEA-I-TEG (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) Netzwerks nach Calcifizierung für 48 h in einer Harnstoff- (10 g/l) und CaCl_2 -Lösung (30 g/l) bei RT. (c) REM-Aufnahme des calcifizierten PHEA-I-TEG Films mit zugehörigem EDX-Mapping, das die Calciumverteilung im Querschnitt mit den gewachsenen Strukturen zeigt. (d) Abbildung der erzeugten Strukturen in einem 48 h bei RT calcifizierten PHEA-I-PETox Netzwerk (50 Gew% PETox, 0,3 Gew% Urease) mittels REM. (e) Exemplarische TEM-Aufnahme von Bruchstücken der Strukturen aus einem calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerk mit (f, g) zugehörigen TED-Bildern. (h, i) Röntgendiffraktogramme (XRD) der Strukturen im Inneren der bei RT calcifizierten (h) PHEA-I-TEG und (i) PHEA-I-PETox Filme (a: Aragonit, c: Calcit).¹⁹⁷

Die bis hierhin erzielten Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist mit Hilfe der entwickelten Methode der Enzym-induzierten Mineralisation chemisch unterschiedliche Netzwerke mit ähnlichem Vernetzungs- und Quellgrad ($S \approx 3$) sowie gleicher Aktivität des eingeschlossenen Enzyms selektiv im Inneren zu calcifizieren. Abhängig vom chemischen Aufbau des Netzwerks und den

Umgebungsbedingungen verändert sich dabei jedoch die Kristallstruktur, der -habitus als auch der Mineralisierungsgrad. Um ein Komposite-Material mit möglichst guten mechanischen Eigenschaften aus einem Polymernetzwerk und CaCO_3 zu erhalten, ist eine möglichst homogene Verteilung der anorganischen Komponente sowie ein hoher Mineralisierungsgrad notwendig. Daher sind die PHEA-Netzwerke mit TEG-Vernetzer im Vergleich zum PEtOx-Vernetzer das vielversprechendere System, weshalb der Fokus der folgenden Untersuchungen, die sich mit dem Einfluss weiterer Parameter auf die CaCO_3 Calcifizierung beschäftigten, auf den PHEA-/TEG Filmen liegt.

4.1.3 Variation des Vernetzungsgrades

Zuerst wurde der Einfluss des Vernetzungsgrades auf die Mineralisation weiter untersucht. Dazu wurde die Menge des Vernetzers TEG im Bereich von 0,1 bis 8 Gew% variiert, die immobilisierte Ureasemenge mit 1 Gew% im PHEA-/TEG Netzwerk dabei aber konstant gehalten. Nach 48 h in je 5 ml der Harnstoff/ CaCl_2 -Lösung bei RT zeigte sich, dass mit abnehmendem Anteil an TEG im Netzwerk der Mineralisierungsgrad zunahm (**Tabelle 4.1**), da ein verringerter Vernetzungsgrad zu einem höheren Quellgrad der Netzwerke in Wasser und damit zu mehr freiem Volumen zwischen den Ketten für CaCO_3 führt. Nimmt man an, dass das gesamte freie Volumen des gequollenen Netzwerks mit CaCO_3 ($\rho = 2,74 \text{ g/cm}^3$) aufgefüllt wird, dann ergibt sich ein maximaler Calcifizierungsgrad von 84 Gew% für ein PHEA-/TEG Netzwerk mit 3 Gew% Vernetzer (Quellgrad $S = 3$), sowie 91 Gew% für das gleiche Netzwerk mit 0,1 Gew% Vernetzer (Quellgrad $S = 4,7$). Im realen Experiment konnte durch Verminderung der Vernetzung der Mineralisierungsgrad von 70 Gew% auf 82 Gew% erhöht werden. Die Auswirkungen auf die sich bei der Mineralisation im Netzwerk gebildeten Strukturen wurden mit Hilfe von REM und ATR-FTIR-Spektroskopie untersucht. Dabei können in allen Fällen die bereits bekannten nanostrukturierten, sphärischen Strukturen aus stabartigen und partikulären CaCO_3 -Kristallen beobachtet werden (**Abbildung 4.5a bis c**). Die Kristallstruktur ändert sich ebenfalls durch den Vernetzungsgrad, denn während bei Anteilen von 0,1, 0,5 sowie 1 Gew% TEG ausschließlich Calcit gefunden wird, entsteht bei höheren Vernetzungsgraden durch 3 und 8 Gew% TEG mehr Aragonit. Der größte Anteil Aragonit von 56 % weist das calcifizierte Netzwerk mit einem Anteil von 3 Gew% TEG auf. Die Erhöhung des TEG-Anteils auf 8 Gew% vermindert die Menge des Minerals im Netzwerk auf nur noch 14 Gew%, bei einem Anteil von 34% Aragonit.

Tabelle 4.1 | Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter dem Einfluss des Vernetzeranteils und der Enzymkonzentration. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO_3 angegeben ($w(\text{CaCO}_3) + w(\text{Polymer}) = 100 \text{ Gew\%}$).¹⁹⁷

TEG [mg]	HEA [mg]	T [°C]	Urease [mg]	Aragonit [%]	Calcit [%]	Anteil CaCO_3 [Gew%]
0,1	99,9	RT	1	< 25	> 75	82
0,5	95,5	RT	1	< 25	> 75	80
1	99	RT	1	< 25	> 75	69
3	97	RT	1	56	44	70
8	92	RT	1	34	66	14

Die Erhöhung des Vernetzungsgrades hat zudem nicht nur Auswirkungen auf die Menge des abgeschiedenen Minerals, sondern ebenfalls auf die Größe der gebildeten Strukturen. Filme mit geringem Vernetzungsgrad ($\leq 1 \text{ Gew\%}$) führen zu sphärischen Strukturen mit 15-35 μm Durchmesser (**Abbildung 4.5a**). Während sich diese in Netzwerken mit 3 Gew% TEG auf 5-15 μm verkleinern (**Abbildung 4.5b**), schrumpfen sie bei einem Vernetzeranteil von 8 Gew% TEG sogar auf nur 4-6 μm (**Abbildung 4.5c**). Dies zeigt, dass der Vernetzungsgrad nicht nur die Menge an abgeschiedenem Mineral steuert, sondern ebenfalls Einfluss auf die Kristall- und Mikrostruktur des CaCO_3 hat.

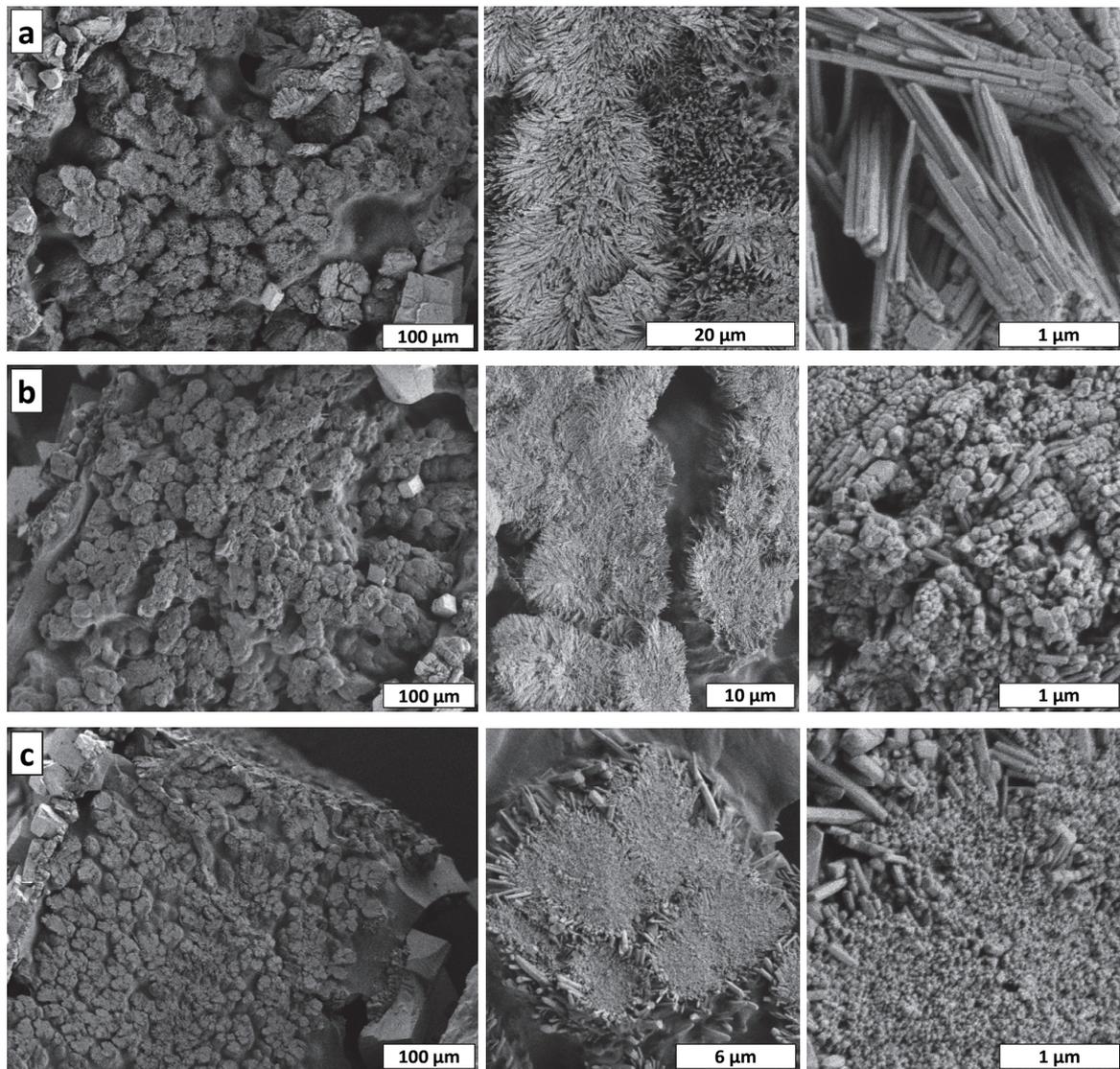


Abbildung 4.5 | Die REM-Bilder zeigen die Querschnitte calcifizierter PHEA-I-TEG Netzwerke mit 1 Gew% immobilisierter Urease und unterschiedlichen TEG-Vernetzeranteilen von (a) 0,1 Gew%, (b) 3 Gew% und (c) 8 Gew% in verschiedenen Vergrößerungen. Die Mineralisation erfolgte für eine Dauer von 7 Tagen bei RT in einer Urea/CaCl₂ Lösung.¹⁹⁷

4.1.4 Variation der Ureasemenge im Netzwerk

Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der Menge an Urease im Netzwerk die Calcifizierung weiter verbessern kann, wurden Netzwerke mit 2 und 3 Gew% immobilisierter Urease hergestellt. Nach 48 h bei RT in 5 ml einer wässrigen CaCl₂/Harnstoff-Lösung zeigte sich, dass die Filme zwar eingetrübt hatten, aber auch CaCO₃ in der Lösung ausgefallen war. Im Querschnitt der Hydrogele ist jedoch ersichtlich, dass diese nur auf ihrer Oberfläche kubische Calcit-Kristalle aufweisen und im Inneren praktisch nicht calcifiziert sind (**Abbildung 4.6**). Daher scheint es wahrscheinlich, dass die Spaltung des Harnstoffes zu Carbonat durch die hohe Enzymkonzentration schon in hohem Maße an der Oberfläche stattgefunden hat und daher dort bereits CaCO₃-Kristalle ausgefallen sind, welche die weitere Diffusion der Substrate in den Film behindern.

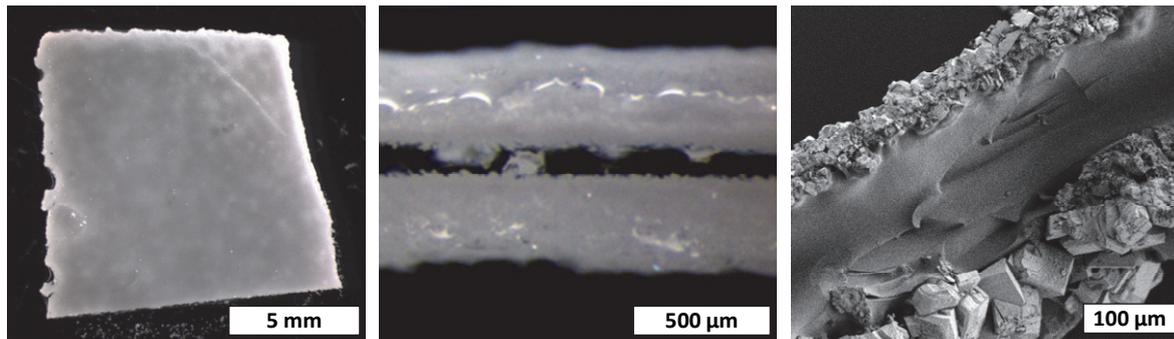


Abbildung 4.6 | Stereomikroskopische Aufnahmen eines für 48 h bei RT in einer wässrigen CaCl_2 /Harnstoff-Lösung calcifiziertes PHEA-I-TEG Netzwerks mit 3 Gew% TEG und 3 Gew% immobilisierter Urease in der Draufsicht (links), im Querschnitt (mittig) und als REM-Aufnahme des Querschnitts (rechts).

Da die Erhöhung der Enzymkonzentration zu einer extremen Verschlechterung der Calcifizierung führt, wurde ebenfalls eine Verringerung der Immobilisierung der Menge an Urease untersucht. Es zeigte sich, dass bereits bei einer Reduzierung der Enzymmenge auf 0,5 Gew% keine vollständige Eintrübung des Netzwerks nach der Calcifizierung mehr zu beobachten war. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Enzymmenge von 1 Gew% für die Calcifizierung bei RT in einer wässrigen Harnstoff/ CaCl_2 -Lösung optimal ist.

4.1.5 Einfluss der Temperatur auf die Mineralisierung

Die Erhöhung der Temperatur sollte sich auf viele Faktoren bei der enzym-induzierten Calcifizierung auswirken. Zum einen sollte sich die Kristallwachstumsrate erhöhen, zum anderen wird die Bildung von Carbonat durch Erhöhung der Enzymaktivität und Diffusionsgeschwindigkeit beschleunigt. Da das Temperaturoptimum der Urease bei ca. 60°C ²⁰¹ liegt, wurde das Enzym im nächsten Schritt in der Nähe seiner maximalen Aktivität, also bei 50, 60 und 70°C untersucht. Um die Effektivität der Calcifizierung bestimmen zu können, wurden dabei je 25 mg enzymbeladenes Netzwerk in 5 ml Urea/ CaCl_2 -Lösung gegeben. Wie in **Abbildung 4.7** zu erkennen ist, erhöht sich die Calcifizierungsgeschwindigkeit durch den Temperaturanstieg von RT auf 50°C maßgeblich. Während eine Calcifizierung bei RT nach ca. 24 h vollständig abgelaufen ist, ist bei 50°C der gleiche Mineralisierungsgrad nach etwa 5 h erreicht. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 60°C steigert die Geschwindigkeit noch etwas weiter, während bei 70°C Calcifizierungstemperatur keine weitere Erhöhung zu erkennen ist. In allen Fällen wurde ein Mineralisationsgrad von ungefähr 70 Gew% erreicht, was zeigt, dass der zur Verfügung stehende Harnstoff bei der Reaktion nahezu vollständig verbraucht wird und dabei praktisch keine Mineralisation in der umgebenden Lösung stattfindet. Die Urease-induzierte Calcifizierung ist daher ein extrem schneller und effektiver Prozess, um Hybridmaterialien herzustellen.

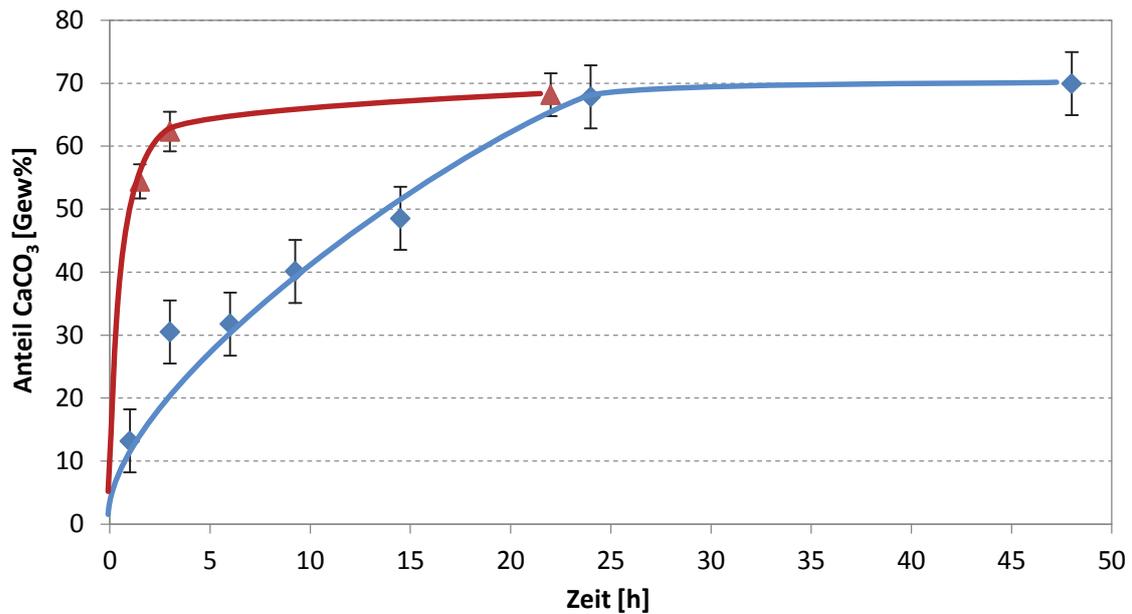


Abbildung 4.7 | Zunahme des anorganischen Anteils im Inneren der Netzwerke während der Calcifizierung in CaCl_2 /Harnstoff-Lösung (0,27/0,17 M) bei RT (blau) und 50 °C (rot). Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs.¹⁹⁷

Um gleiche Bedingungen sicherzustellen, wurden alle Proben für 48 h in den Calcifizierungslösungen belassen. Bei genauerer Betrachtung der Mikrostruktur calcifizierter Filme mittels REM fällt auf, dass die Temperatur neben der Bildungsgeschwindigkeit auch die Struktur sowie die Morphologie der im Inneren der Netzwerke gebildeten Kristalle beeinflusst. Während die bei RT calcifizierten Proben die bekannten sphärischen Strukturen aus stabartigen Kristallen aufweisen (**Abbildung 4.8a**), weisen diese bei 50 °C eine dendritische Anordnung auf (**Abbildung 4.8b**). Dendritische Strukturen werden in der Regel durch ein diffusionslimitiertes Kristallwachstum hervorgerufen²⁰², bei dem das Kristallwachstum schneller stattfindet als die Anlieferung der Ionen, bzw. in diesem Fall die Bildung von neuem Carbonat durch die Spaltung von Harnstoff. Eine weitere Erhöhung der Temperatur verstärkt diesen Effekt, wodurch auch die Größe der Dendriten zunimmt (**Abbildung 4.8c und d**).

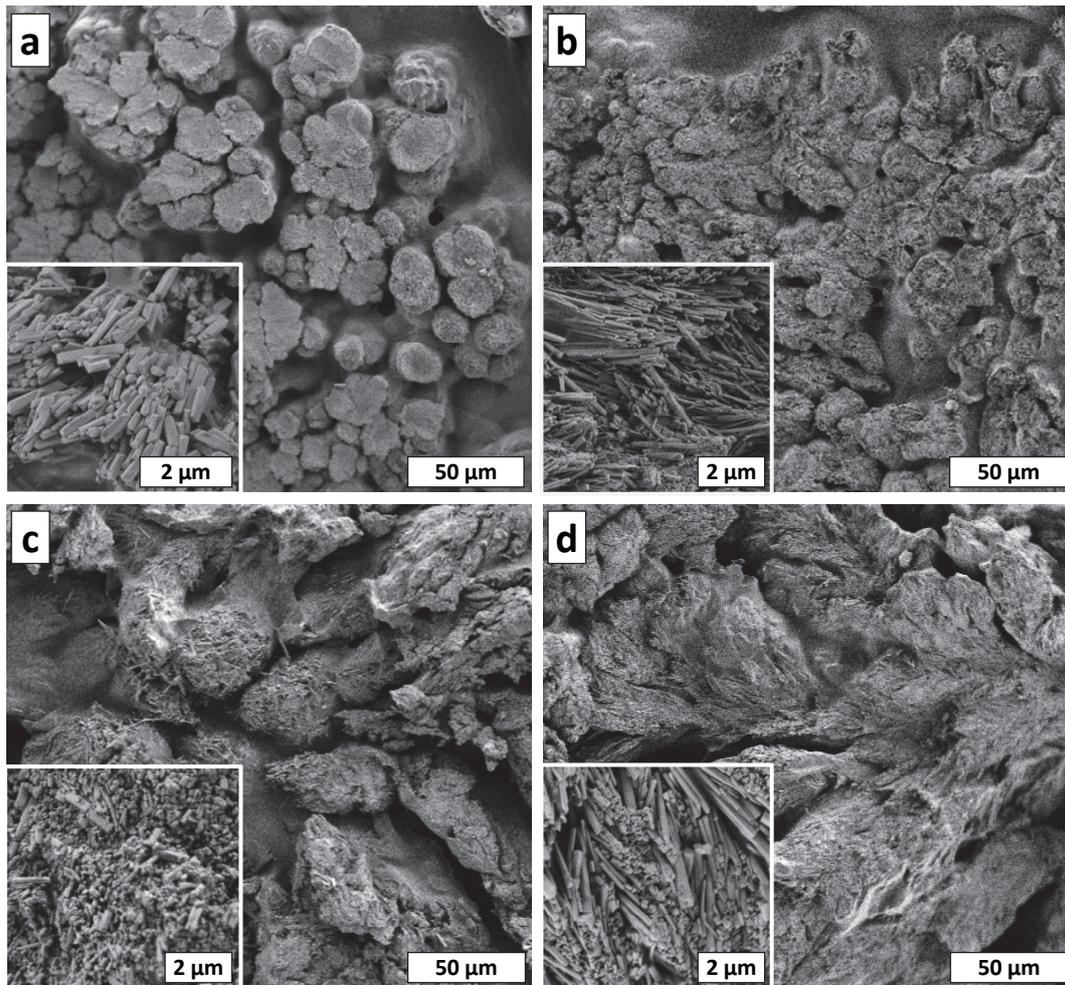


Abbildung 4.8 | REM-Aufnahmen des Querschnitts von mineralisierten PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG) nach 48 h in der Calcifizierungslösung bei (a) RT, (b) 50 °C, (c) 60 °C und (d) 70 °C jeweils mit vergrößerter Ansicht in der unteren linken Ecke.¹⁹⁷

Auch die dabei gebildeten Nanokristalle zeigen, abhängig von der Temperatur, ein anderes Aussehen. Während bei RT und 50 °C die stabartigen Nanokristalle dominieren, verringert sich bei 60 °C deren Aspektverhältnis, wohingegen bei 70 °C deutlich größere Kristalle zu erkennen sind. Die gebildeten Nanostrukturen können mit dem Anteil an gemessenem Aragonit in Verbindung gebracht werden. Der höchste Anteil an Aragonit von nahezu 100% konnte in Netzwerken gefunden werden, die bei 60 °C calcifiziert wurden. Dort werden beinahe nur Nanokristalle mit einem sehr kleinen Aspektverhältnis gefunden. In allen anderen Fällen, wo auch Kristalle mit hohem Aspektverhältnis vorhanden sind, ist der Anteil an Calcit-Kristallen höher (**Tabelle 4.2**).

Tabelle 4.2 | Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter dem Einfluss der Temperatur. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO_3 angegeben ($w(\text{CaCO}_3) + w(\text{Polymer}) = 100 \text{ Gew\%}$).¹⁹⁷

TEG [mg]	HEA [mg]	T [°C]	Urease [mg]	Aragonit [%]	Calcit [%]	Anteil CaCO_3 [Gew%]
3	97	RT	1	56	44	70
3	97	50	1	95	5	70
3	97	60	1	~ 100	0	75
3	97	70	1	56	44	67
3	97	50	0,3	32	68	18

Insgesamt scheinen die bei 50 °C bevorzugt gebildeten, stabartigen Nanokristalle mit hohem Aspektverhältnis, welche hauptsächlich aus Aragonit bestehen, am besten zur Herstellung eines Komposit-Werkstoffes geeignet zu sein, weshalb bei weiteren Versuchen die Netzwerke vorwiegend bei dieser Temperatur calcifiziert wurden.

Durch die gesteigerte Aktivität der Urease bei Temperaturen ab 50°C kann die zur Calcifizierung des Netzwerks mindestens notwendige Enzymkonzentration auf 0,3 Gew% verringert werden. Dies führt z.B. nach der Mineralisierung bei 50°C für 48 h zu einem Calcifizierungsgrad von nur 18 Gew%, was jedoch für eine homogene Mineralisation des Netzwerks ausreicht. Wie in **Abbildung 4.9** zu erkennen ist, bilden sich dabei millimetergroße, dendritische Kristalle, wobei im Querschnitt zu sehen ist, dass diese in der Mitte des Polymerfilms entstanden sind.

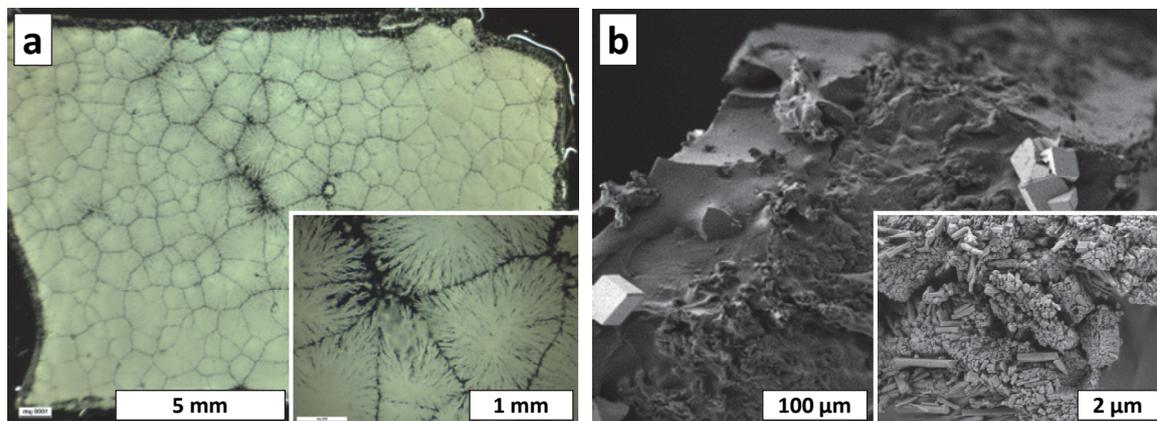


Abbildung 4.9 | REM-Bilder eines PHEA-I-TEG Netzwerks mit 3 Gew% TEG und 0,3 Gew% immobilisierter Urease calcifiziert in einer CaCO_3 / Harnstoff – Lösung (0,27 M/ 0,17 M), bei 50°C für 48 h. (a) Lichtmikroskopische Draufsichten und (b) eine REM-Aufnahmen des Querschnitts jeweils mit vergrößerter Ansicht in der unteren rechten Ecke.¹⁹⁷

4.1.6 Stabilisierung des pH-Werts während der Calcifizierung

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf die Calcifizierung ist der pH-Wert. Dieser wurde in den bis jetzt aufgeführten Untersuchungen in den Calcifizierungslösungen noch nicht kontrolliert. Um den pH-Wert während der Calcifizierung verfolgen zu können, wurde der Monomermischung vor der Polymerisation eines PHEA-*I*-TEG Netzwerks (1 Gew% Urease, 3 Gew% TEG) 0,1 Gew% Bromthymolblau zugegeben. Wie in **Abbildung 4.10** dargestellt, verschiebt sich der pH-Wert nach dem Eintauchen des Netzwerks in die Calcifizierungslösung sowohl im Film als auch in der Lösung in basische Richtung, erkennbar durch die Farbänderung des Indikators von gelb ($\text{pH} < 6$) über grün ($6 < \text{pH} < 8$) zu blau ($\text{pH} > 8$). Diese Änderung wird durch die enzymatisch katalysierte Spaltung von Harnstoff zu NH_4^+ und CO_3^{2-} verursacht, was dazu führt, dass der pH-Wert im Film sowie in der Lösung wenige Minuten nach Beginn der Calcifizierung auf über pH 9 steigt.

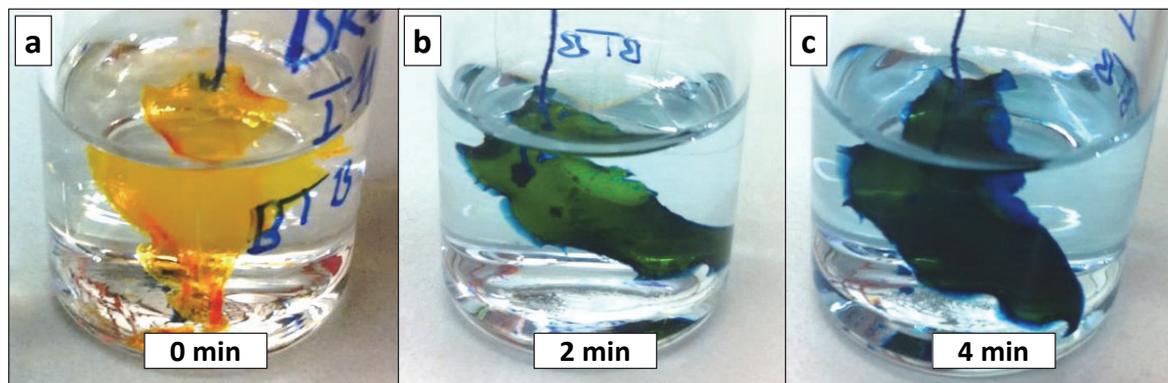


Abbildung 4.10 | PHEA-*I*-TEG Netzwerk (3 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Urease und 0,1 Gew% Bromthymolblau in einer wässrigen, nicht gepufferten CaCl_2 /Harnstoff Lösung (0,27 M/0,17 M) bei RT nach (a) 0 min, (b) 2 min und (c) 4 min.²⁰³

Um die Auswirkungen des pH-Wertes während der Calcifizierung einschätzen zu können, sollte dieser im Verlauf der Mineralisation möglichst konstant bleiben. Dazu wurde eine 0,1 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan(TRIS)-Puffer-Lösung hergestellt. TRIS wurde gewählt, da es auch in Anwesenheit von CaCl_2 in einer Lösung keine schwerlöslichen Salze bildet. Mit Hilfe des Puffers wurde eine Calcifizierungslösung hergestellt, deren pH-Wert nahe des Optimums der verwendeten Urease ($\text{pH} 7,5$)²⁰⁴ eingestellt wurde. Eine zweite Lösung wurde auf pH 9,3 eingestellt, da bei diesem pH-Wert ein Optimum zwischen möglichst großer Kristallisationsgeschwindigkeit bei gleichzeitig hoher verbliebener Enzymaktivität vermutet wurde. Um Unterschiede in den Mineralisierungsgraden der bei verschiedenen pH-Werten hergestellten Komposite deutlich erkennen zu können, muss die Menge an Lösung auf das 5-fache erhöht werden (100 ml Lösung pro 100 mg Film). Dadurch kann auch der Mineralisierungsgrad der Netzwerke in der ungepufferten Lösung auf 89 Gew% erhöht werden. Noch größere Mengen der Calcifizierungslösung führen zu keiner weiteren Steigerung der Mineralisierungsgrade. In beide gepufferte Lösungen wurde je ein PHEA-*I*-TEG (3 Gew% TEG) Netzwerk mit 1 Gew% Urease gelegt und 24 h bei 50°C mineralisiert. Die

dabei entstandenen Filme weisen mit 94 Gew% (pH 7,5) und 89 Gew% (pH 9,3) anorganischem Anteil einen sehr hohen Calcifizierungsgrad auf. Die Kristallstrukturen im Inneren der Netzwerke sind in **Abbildung 4.11a** (pH 7,5) und **b** (pH 9,3) zu sehen. In beiden Fällen sind wiederum stabartige Nanostrukturen zu erkennen. Diese scheinen sich jedoch abhängig vom pH-Wert zu unterschiedlichen Überstrukturen anzuordnen. Bei der pH 7,5 gepufferten Calcifizierungslösung bilden die stabartigen Nanokristalle im Inneren der Filme sphärische Formen, bei der die äußeren Kristalle mit ca. 500 nm sehr dick sind und wie ein Nadelkissen abstehen. Bei der pH 9,3 gepufferten Lösung wurden dendritische Anordnungen von Nadelkristallen und Partikeln mit einer Dicke von 200 bis 250 nm gebildet, die den in einer nicht gepufferten Calcifizierungslösung erzeugten Strukturen gleichen. Letzteres deckt sich damit, dass der pH-Wert in der nicht gepufferten Lösung während der Calcifizierung ebenfalls auf über pH 9 ansteigt, wodurch die Bildung ähnlicher Strukturen erfolgt. Es zeigt sich daher eine Abhängigkeit der aus den stabartigen Nanokristallen gebildeten Überstrukturen vom pH-Wert bei der Calcifizierung, nicht aber der Nadelkristalle selbst. Diese bestehen laut FTIR-Messungen sowohl bei pH 9,3 gepuffelter Calcifizierungslösung mit 94 bis 98 Gew% als auch bei pH 7,5 gepuffelter Urea/CaCl₂-Lösung mit 86 bis 90 Gew% vorwiegend aus Aragonit. Wie in **Kapitel 4.1.5** beschrieben, führt ein diffusionslimitiertes Kristallwachstum zur Bildung dendritischer Strukturen²⁰². Die Limitierung des Kristallwachstums wird durch die Geschwindigkeit der Carbonatbildung und damit der Enzymaktivität bestimmt. Eine hohe Enzymaktivität, wie sie nahe des pH-Optimums bei pH 7,5 vorliegt, führt daher zu einer verringerten Diffusionslimitierung der Kristallbildung und so tendenziell zu sphärischen Strukturen. Eine ungepufferte oder pH 9,3 gepufferte Lösung verringern durch die höheren pH-Werte während der Calcifizierung die Enzymaktivität, was die Bildung dendritischer Strukturen bevorzugt.

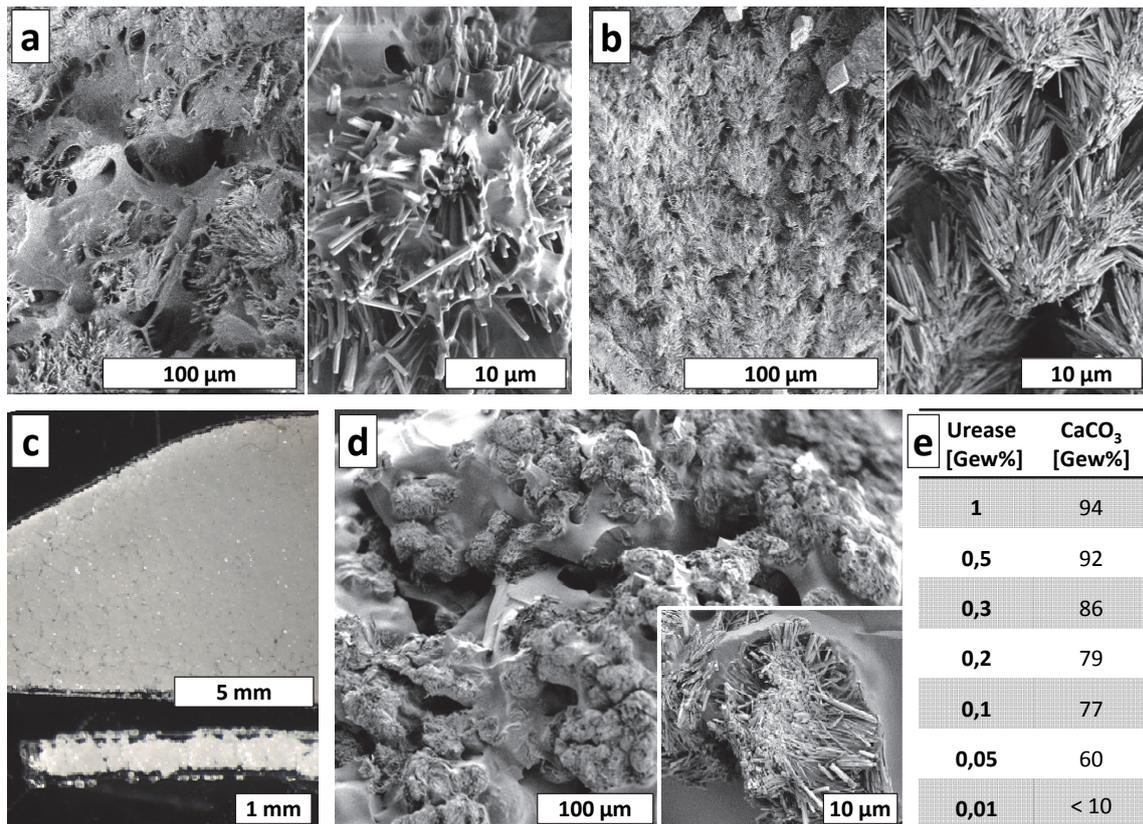


Abbildung 4.11 | REM-Aufnahmen des Querschnitts eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) calcifiziert für 24 h in TRIS-gepuffertter Urea/CaCl₂ Lösung mit (a) pH 7,5 (b) pH 9,3 bei 50 °C. (c) Stereomikroskop-Bilder in der Draufsicht und des Querschnitts eines für 24 h in TRIS-gepuffertter Urea/CaCl₂-Lösung (pH 7,5) calcifizierten PHEA-I-TEG Films mit 0,05 Gew% immobilisierter Urease sowie (d) die zugehörigen REM-Aufnahmen des Querschnitts. (e) Die Tabelle zeigt die CaCO₃-Anteile der PHEA-I-TEG Netzwerke mineralisiert in pH 7,5 TRIS-gepuffertter Calcifizierungslösung mit unterschiedlichen Urease-Gehalten.

Inwieweit die Effizienz der Urease durch das Puffern der Calcifizierungslösung bei pH 7.5 gesteigert wird, wurde im nächsten Schritt untersucht. Dazu wurden PHEA-I-TEG (3 Gew% TEG) Netzwerke mit 0,5 Gew% und weniger hergestellt (0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,01 Gew%). Wie in der Tabelle in **Abbildung 4.11e** zu erkennen ist, verringert sich die gebildete Menge an CaCO₃ im Netzwerk bei Halbierung der Enzymkonzentration auf 0,5 Gew% praktisch nicht. Eine weiter verminderte Ureasebeladung der Filme resultiert dann in einer Abnahme der Mineralisierung. Bis zu einer Enzymmenge von 0,05 Gew% ist jedoch noch eine intrinsische Mineralisierung zu erkennen (siehe **Abbildung 4.11c und d**), wobei immer noch ein Mineralisierungsgrad von 60 Gew% erreicht wird. In der ungepufferten Calcifizierungslösung beträgt diese Grenze 0,3 Gew% Urease bei einem deutlich geringeren Mineralisierungsgrad von nur 18 Gew%. Die gebildeten Strukturen im Inneren des Films weisen trotz der extrem niedrigen Enzymkonzentration eine sphärische Struktur auf. Eine Enzymmenge kleiner 0,05 Gew% im Film führt zu keiner vollständigen Mineralisierung innerhalb der Netzwerke. Die Ergebnisse zeigen, dass durch Verwendung von TRIS-gepufferten Calcifizierungslösungen der Grad der Netzwerkmineralisierung weiter gesteigert werden und zudem Einfluss auf die Strukturen im Netzwerk genommen werden kann. Die dadurch mögliche

Stabilisierung des pH-Wertes während der Calcifizierung nahe des pH-Optimums der Urease führt zu einer deutlichen Steigerung der Aktivität der Urease und damit eine sechsmal niedrigere, notwendige Konzentration an Urease, um eine Mineralisation innerhalb eines PHEA-/TEG Netzwerks zu ermöglichen.

4.1.7 Einbau ionischer Gruppen in die Polymermatrix

In vielen Arbeiten zum Kristallwachstum von CaCO_3 in wässriger Lösung werden zur Beeinflussung der Kristalle Polymere verwendet.^{10, 205} Dabei zeigt sich, dass vor allem ionische Gruppen einen starken Einfluss auf die Kristallmodifikation und den -habitus ausüben, da diese mit der CaCO_3 -Kristalloberfläche wechselwirken.¹² Allerdings existieren kaum Untersuchungen zum Einfluss geladener Gruppen auf CaCO_3 -Kristalle, welche innerhalb eines Polymernetzwerks gebildet werden. GRASSMANN beschäftigte sich mit dem Einfluss von SO_3H -¹¹⁸ und COOH -Gruppen¹¹⁹ auf die Abscheidung von CaCO_3 in Polyacrylamid-Netzwerken, wozu er einen Doppel-Diffusions-Aufbau nutzte. Dabei stellte er fest, dass der Einbau von 10 mol% Sulfonat-Gruppen in die Matrix keinen merklichen Einfluss auf die Mineralisation der Gele hat. Wie im reinen Polyacrylamid-Netzwerk werden etwa 300 μm große Calcit-Kristalle gebildet. Eine vergleichbare Menge an Carboxylgruppen führt jedoch zur Bildung deutlich kleinerer Partikel mit einem Durchmesser von wenigen μm aus Vaterit, die sich nach 28 Tagen zu 300 bis 500 μm großen Sphären aus Calcit entwickeln.

Um den Einfluss ionischer Gruppen auf das Kristallwachstum im PHEA-/TEG Netzwerk zu untersuchen, wurden Acrylsäure und 2-(Methacryloyloxyethyl)trimethylammoniumchlorid (QuAAc) verwendet, um sowohl negativ-geladene Carboxylat- als auch positiv geladene quartäre Ammonium-Gruppen in die Netzwerkstruktur einzubauen.

Der Einbau dieser Co-Monomere in das PHEA-/TEG (3 Gew% TEG) Netzwerk führt mit steigendem Anteil zu einer Zunahme des Quellgrades. Das reine Netzwerk weist dabei einen Quellgrad (S) von 3 in 0,1 M TRIS Puffer (eingestellt auf pH 9,3) auf. Durch die Substitution von HEA durch 1 Gew% Acrylsäure in der Monomermischung steigt der Quellgrad des resultierenden Netzwerkes auf 4,2, während 3 Gew% einen Quellgrad von 6,1 verursacht.

Wurde in die gleichen Filme 1 Gew% Urease immobilisiert, zeigte sich, dass Acrylsäure bereits in geringen Mengen von 1 Gew% die Mineralisierung stark verringert (kleiner 30 Gew% CaCO_3). Durch Lösen der Urease in 0,1 M TRIS-Puffer (pH 9,3) anstelle von bidestilliertem Wasser vor der Zugabe zur Monomermischung kann der Calcifizierungsgrad jedoch wieder deutlich gesteigert werden, sodass in den unterschiedlich gepufferten Harnstoff/ CaCl_2 -Lösungen wieder Mineralisierungsgrade nahe der Netzwerke ohne Acrylsäure von über 89 Gew% erreicht werden (Werte in **Abbildung 4.16a**). Die Acrylsäure scheint daher zur Denaturierung der Urease, bedingt durch eine

Absenkung des pH-Wertes in der Monomer/Enzym-Mischung, zu führen.²⁰⁴ Für Konzentrationen ab 2 Gew% Acrylsäure ist dieser Effekt auch durch Pufferzugabe zur Enzymmischung nicht mehr kompensierbar und es kommt zu keiner Mineralisation im Netzwerkinnern mehr. Die REM-Aufnahmen in **Abbildung 4.12a bis c** zeigen die nach 24 h bei 50 °C im PHEA-/TEG Netzwerk mit 1 Gew% Acrylsäure gebildeten Kristallstrukturen calcifiziert in den verschiedenen (gepufferten) Urea/CaCl₂-Lösungen. Vergleicht man diese mit den im Netzwerk ohne Acrylsäure gebildeten Strukturen (**Abbildung 4.11**), so bleiben die Struktur motive für die Calcifizierung in ungepufferten und TRIS pH 9,3 (dendritische Nanostab- und Partikel-Strukturen) sowie TRIS pH 7,5 gepufferten Lösung (größere sphärisch angeordnete Nanostab-Agglomerate) erhalten. Acrylsäure scheint in der einsetzbaren Menge weder einen großen Einfluss auf den Kristallhabitus oder die Agglomerat-Bildung noch auf die Kristallstruktur zu besitzen, da FTIR-Messungen bei allen Proben, wie bei den Kompositen ohne Acrylsäure, einen Anteil von mehr als 95% Aragonit ergaben.

Wurden in das gleiche PHEA-/TEG Netzwerk kationische Gruppen in Form von 1 Gew% QuAAc eingebaut, so zeigte sich, dass die Mineralisierungsgrade in der ungepufferten und TRIS-gepufferten Calcifizierungslösung (pH 7,5) mit 74 und 71 Gew% deutlich geringer ausfallen. Im Gegensatz dazu steigt der Mineralisierungsgrad des bei pH 9,3 calcifizierten Films wieder auf 91 Gew%. Die bei den jeweiligen pH-Werten gebildeten Kristallstrukturen und Agglomerate zeigen auch durch den Einfluss positiver Gruppen im Netzwerk im Gesamtbild keine strukturellen Änderungen (**Abbildung 4.12d bis f**) zu den Proben ohne ionische Gruppen oder mit Acrylsäure. FTIR-Messungen bestätigen zudem, dass die CaCO₃ Kristalle weiterhin zu über 93 Gew% aus Aragonit bestehen. Höhere Konzentrationen als 1 Gew% können auch in diesem Fall nicht verwendet werden, da Zugaben von 2 Gew% QuAAc und mehr keine homogenen Filme mehr ergeben, da die Netzwerke bei der Polymerisation unter UV-Licht eintrüben.

Es konnte also gezeigt werden, dass sowohl negative als auch positive Gruppen, die ins Netzwerk eingebaut werden, bis 1 Gew% keinen erkennbaren Einfluss auf die Kristallstruktur und die Agglomerat-Bildung der Nanokristalle haben. Vielmehr dominieren hier die Einflüsse des pH-Wertes auf die Enzymaktivität und damit auf die gebildeten Nanokristall-Strukturen.

Die Einflüsse der ionischen Gruppen auf die Adhäsion zwischen Ionenkristall und Matrix und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften werden in **Kapitel 4.1.9** genauer diskutiert.

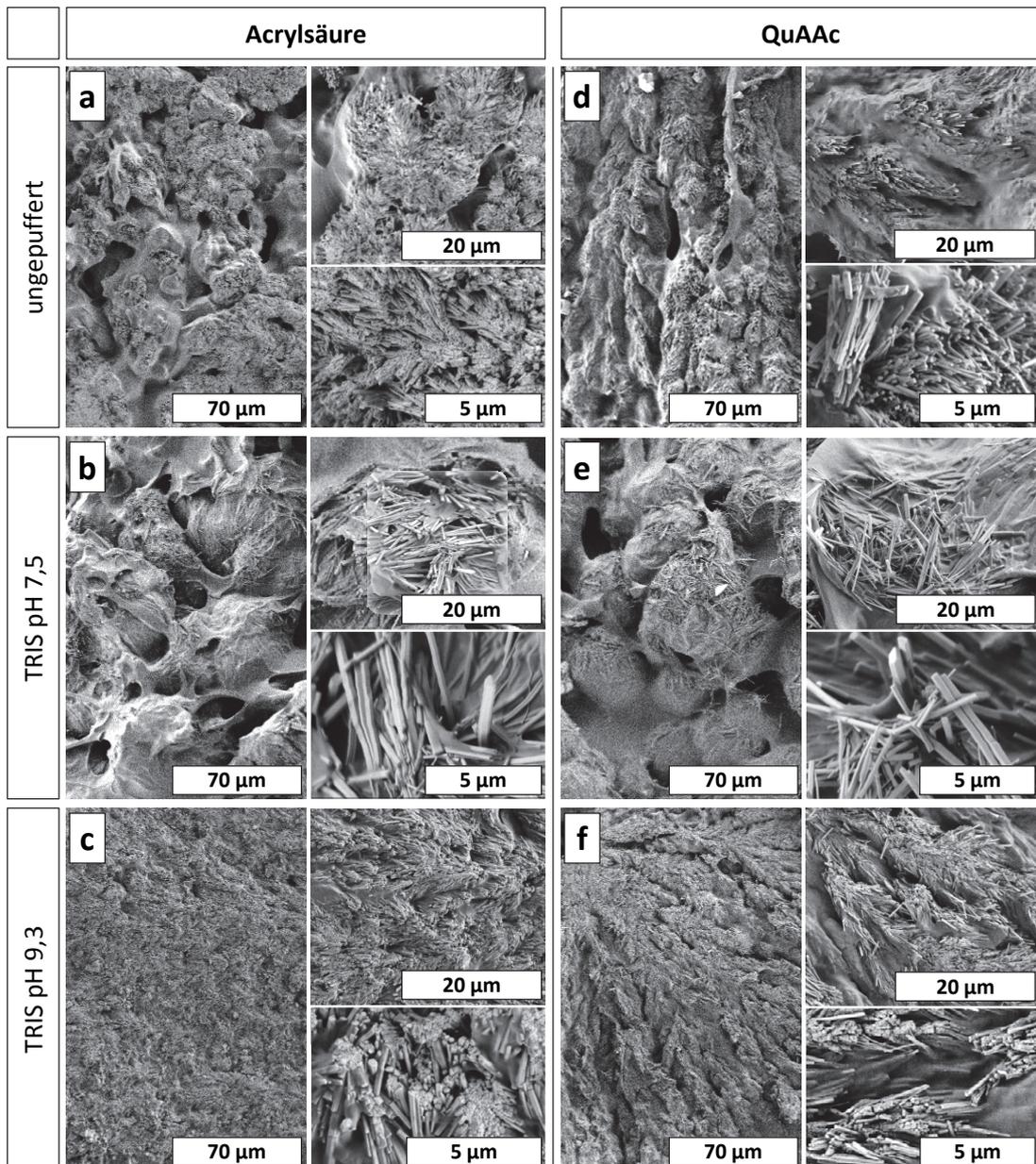


Abbildung 4.12 | REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen der Querschnitte von PHEA-I-TEG Netzwerken mit 3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease, und (a - c) 1 Gew% Acrylsäure bzw. (d - f) 1 Gew% QuAAc calcifiziert in (a, d) ungepufferten, (b, e) 0,1 M TRIS pH 7,5 und (c, f) 0,1 M TRIS pH 9,3 gepufferten Urea/CaCl₂-Lösungen bei 50 °C für 24 h.

4.1.8 Urease-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen auf Basis von N,N'-Dimethylacrylamid

Nach der erfolgreichen Mineralisierung HEA-basierter Netzwerke wurden weitere Monomere gesucht, in denen Urease homogen gelöst werden konnte, um den Einfluss des Monomers auf die intrinsische Kristallbildung zu untersuchen. Dabei wurde N,N-Dimethylacrylamid (DMA) als geeigneter Kandidat mit ähnlich guten Lösungseigenschaften für Enzyme wie HEA identifiziert. Das daraus mit TEG hergestellte Polymernetzwerk unterscheidet sich jedoch von PHEA, da es im trockenen Zustand eine deutlich höhere Steifigkeit aufweist. Dies ist auf die unterschiedliche Glasübergangstemperatur (T_g) der beiden Polymere zurückzuführen. Da PHEA eine T_g von etwa 6 °C

und damit unterhalb der RT aufweist, ist aufgrund der Kettenbeweglichkeit der E-Modul mit $1 \pm 0,1$ MPa gering, allerdings kann das Polymer deshalb auf bis zu 400 ± 50 % gedehnt werden. Im Gegensatz dazu weist Poly-DMA (PDMA) mit 106 °C eine T_g oberhalb der RT auf, wodurch die trockenen Polymernetzwerke (mit 3 Gew% TEG) zwar einen hohen E-Modul von bis zu 1666 ± 30 MPa aufweisen, jedoch eine geringe Bruchdehnung von nur 10 ± 3 % besitzen.

Die PDMA-/TEG Netzwerke (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) wurden mit den gleichen Parametern wie die PHEA-/TEG Filme hergestellt und in gepufferten und ungepufferten Urea/ CaCl_2 -Lösungen (0,17 M/ 0,27 M) bei 50 °C calcifiziert. In **Abbildung 4.13** sind beispielhaft REM-Aufnahmen des Querschnitts eines 48 h in einer ungepufferten Lösung calcifizierten PDMA-/TEG Films zu sehen. Dabei zeigte sich, dass sich die strukturellen Motive der im Bulk gebildeten CaCO_3 -Nanokristallagglomerate sehr stark ähneln. Verglichen mit den PHEA-/TEG Filmen können sowohl nadelartige als auch partikelartige Nanokristalle beobachtet werden, die sphärische bzw. dendritische Überstrukturen mit den gleichen pH-Abhängigkeiten bilden und laut FTIR-Messung zu mindestens 92% aus Aragonit bestehen. Die stabartigen Kristalle weisen dabei ähnliche Dimensionen wie in den HEA-basierten Kompositen auf. Der Mineralisierungsgrad im PDMA-/TEG Netzwerk jedoch liegt mit maximal erreichten 94 Gew% über dem der PHEA-/TEG Filme. Dies ist vermutlich durch die stärkere Quellung der PDMA-/TEG Netzwerke zu erklären. Der Quellgrad liegt mit 6,4 etwa doppelt so hoch wie der eines gleichvernetzten PHEA-/TEG Films mit 3,0, was in einem größeren freien Volumen resultiert, das mit CaCO_3 aufgefüllt werden kann.

Die Ergebnisse zeigen daher, dass sich DMA genauso für die Urease-induzierte Calcifizierung zu eignen scheint wie HEA und dabei durch seine gesteigerte Quellung sogar noch größere Mineralisierungsgrade ermöglicht. Die großen Ähnlichkeiten der gewachsenen CaCO_3 -Kristalle und der Struktur motive im Inneren der PDMA-/TEG Filme im Vergleich zu den PHEA-basierten Netzwerken lassen den Schluss zu, dass der Einfluss der beiden Monomere auf die Kristallisation gering ist.

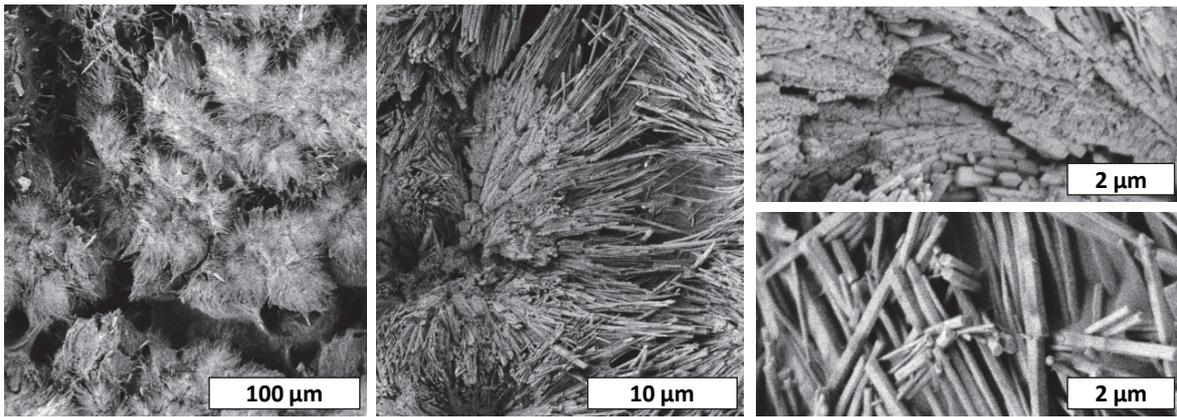


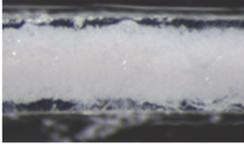
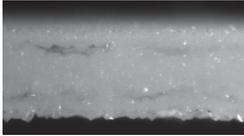
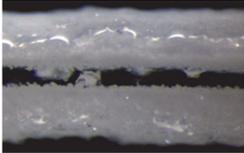
Abbildung 4.13 | REM-Aufnahmen in unterschiedlichen Vergrößerungen des Querschnitts eines PDMA-I-TEG Netzwerks mit 3 Gew% TEG und 1 Gew% Urease calcifiziert bei 50 °C für 48 h in einer ungepufferten Urea/CaCl₂-Lösung.

4.1.9 Mechanische Eigenschaften der CaCO₃ - Komposite

Das eigentliche Ziel bei der Urease-induzierten Mineralisation eines Hydrogels ist die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der weicherer, organischen Komponente. Die Steifigkeit als auch die Bruchfestigkeit eines Komposits werden maßgeblich durch die Menge, Form, Größe und Verteilung der anorganischen Komponente in der Matrix bestimmt. Des Weiteren ist die Adhäsion zwischen organischer und anorganischer Phase von großer Bedeutung. Damit ist es möglich, wie verschiedene Veröffentlichungen bereits gezeigt haben, durch homogen organisierte Strukturen in Komposite-Werkstoffen eine Perlmutter-ähnliche Mechanik erzeugen zu können (E-Modul von 10 bis 70 GPa).²⁰⁶

Die bloße PHEA-I-TEG Matrix besitzt im trockenen Zustand einen E-Modul von etwa $1 \pm 0,3$ MPa. Bei den bis hierhin durch die Calcifizierung in den Netzwerken erzeugten Strukturen aus stabförmigen CaCO₃-Nanokristallen in ungepufferten Urea/CaCl₂-Lösung können drei grundsätzliche Motive unterschieden werden: Hoch Urease beladene Netzwerke zeigen einen dichten Calcit-Film auf der Oberfläche. Filme mit einer mittleren Urease-Konzentration führen tendenziell zu sphärischen Strukturen aufgebaut aus stabartigen Nanokristallen. Bei geringen Enzymmengen wird die Bildung dendritischer Strukturen aus stabartigen Kristallen mit unterschiedlicher Länge bevorzugt. In allen Fällen kann durch das Mineral eine Zunahme der Steifigkeit der getrockneten PHEA-I-TEG Komposite beobachtet werden (**Tabelle 4.3**). Eine dichte Calcit-Schicht auf der Oberfläche führt bereits zu einer Erhöhung der Steifigkeit des Netzwerks um den Faktor 6 bis 15. Intrinsisch im Netzwerk erzeugte sphärische Strukturen sind in der Lage den E-Modul auf bis zu 134 ± 35 MPa zu erhöhen.

Tabelle 4.3 | Höchste erreichte E-Moduln der in einer ungepufferten Urea/CaCl₂-Lösung calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerke mit unterschiedlichen, gebildeten CaCO₃-Strukturen.¹⁹⁷

	Urease [Gew%]	PHEA-I-TEG [MPa]	PHEA-I-PETox [MPa]	PDMA-I-TEG [MPa]
Reines Netzwerk	0	1 ± 0,3	1,2 ± 0,3	1666 ± 30
Dendrite 	≤ 0,5	706 ± 50	12 ± 9*	426 ± 44
Sphären / Dendrite 	1	134 ± 35	7 ± 1*	292 ± 67
Oberfläche 	≥ 2	6 bis 15	7 ± 1	-

1 mm
* sphärische, monolithische Strukturen

Die dendritischen Strukturen weisen den größten Anstieg des E-Moduls auf und scheinen daher für die Verstärkung HEA-basierter Netzwerke am besten geeignet zu sein, da sich diese bei Deformation zudem wahrscheinlich ineinander verhaken und nicht einfach abgleiten können. In den zuvor diskutierten REM-Bildern und besonders in **Abbildung 4.8** ist auffällig, dass zwischen den CaCO₃ Strukturen hoch mineralisierter Netzwerke immer Hohlräume zu erkennen sind, welche vermutlich die Mechanik der Komposite verschlechtern. Um also Materialien mit den bestmöglichen mechanischen Eigenschaften zu erzeugen, müssen die Parameter so gewählt werden, dass ein dichter, homogener Werkstoff entsteht. Dazu eignet sich ein PHEA-I-TEG Netzwerk mit 3 Gew% TEG, in dem die Enzymmenge auf 0,5 Gew% gesenkt und gleichzeitig die Calcifizierungstemperatur auf 50 °C bzw. 60 °C erhöht wird. Ein so mineralisierter Film weist nach 48 h im Gegensatz zur Mineralisierung bei RT eine extrem homogene Mineralisierung auf. Allerdings fällt der Calcifizierungsgrad aufgrund der geringeren Menge an Enzym geringer aus. IR-Messungen dieser Filme zeigen, dass in den mineralisierten Netzwerken sowohl Calcit als auch Aragonit in ähnlichen Verhältnissen zu finden sind (**Tabelle 4.4**).

Tabelle 4.4 | Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter den optimierten Bedingungen für Temperatur und Enzymkonzentration. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO_3 angegeben ($w(\text{CaCO}_3) + w(\text{Polymer}) = 100 \text{ Gew\%}$).¹⁹⁷

TEG [mg]	HEA [mg]	T [°C]	Urease [mg]	Aragonit [Gew%]	Calcit [Gew%]	Anteil CaCO_3 [Gew%]
3	97	50	0,5	58	42	61
3	97	50	1	95	5	89
3	97	60	0,5	42	59	41

Der bei 50 °C hergestellte Komposit zeigt trotz des auf 61 Gew% verringerten Calcifizierungsgrads im kompletten Material annähernd perfekt verteilte, homogene Dendriten, aufgebaut aus stabartigen Nanostrukturen (**Abbildung 4.14a**). Trotz dieses sehr regelmäßigen Aufbaus erhöht sich der E-Modul des Komposits nur auf $10 \pm 1 \text{ MPa}$. Der Grund dafür findet sich vermutlich im porösen Aufbau der Kristallstrukturen, die nur sehr schlecht durch die Matrix miteinander verbunden sind.

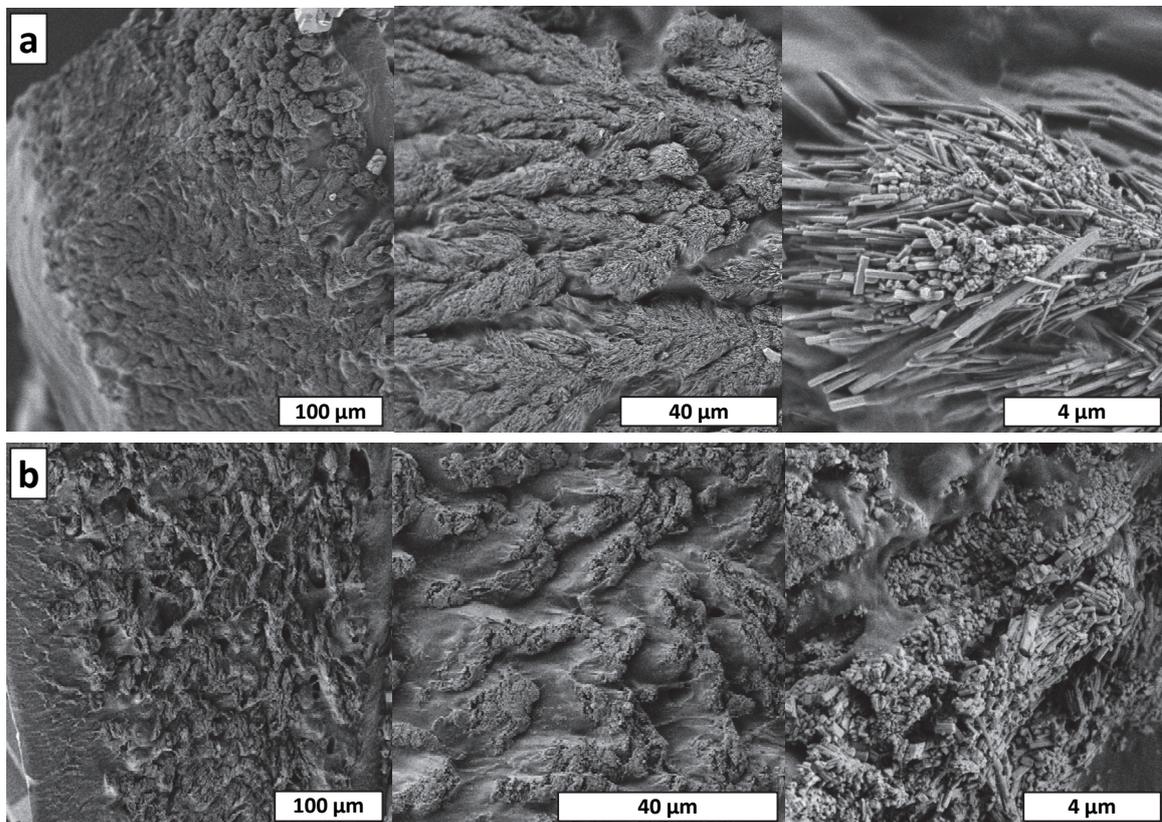


Abbildung 4.14 | REM-Aufnahmen des Querschnitts von zwei PHEA-I-TEG Netzwerken mit jeweils 3 Gew% TEG und 0,5 Gew% Urease calcifiziert für 48 h in einer ungepufferten Urea/ CaCl_2 -Lösung bei (a) 50°C (b) 60°C.¹⁹⁷

Durch eine Temperaturerhöhung auf 60 °C können noch dichtere dendritische Strukturen aus kleineren Nanokristallen erzeugt werden (**Abbildung 4.14b**), die sehr gut an die Matrix angebunden sind und einen Aufbau zeigen, der an die Ziegelmauerstruktur des Vorbilds Perlmutter erinnert. Die bessere Anbindung zwischen CaCO_3 und Matrix wird vermutlich durch den geringeren Calcifizierungsgrad erzeugt, der in diesem Fall nur noch 41 Gew% beträgt. Der Komposit zeigt im Spannungs-Dehnungsdiagramm (**Abbildung 4.15**) ein Verhalten, wie es von Verbundmaterialien mit Ziegelmauerstruktur (z.B. Perlmutter²⁰⁷) bekannt ist. Dabei weist die Probe bis zu einer Dehnung von 1% zuerst nur eine geringe Steifigkeit auf, steigt jedoch danach auf einen E-Modul von 706 ± 50 MPa an.

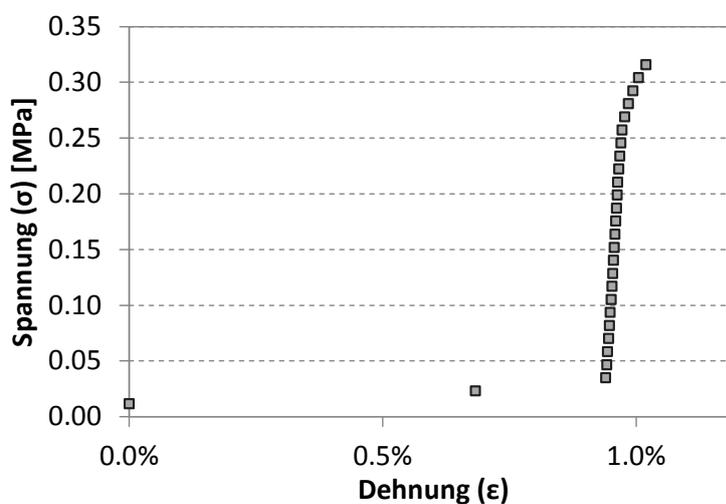


Abbildung 4.15 | Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG) mit 0,5 Gew% Urease calcifiziert in einer Urea/ CaCl_2 -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C für 24 h.¹⁹⁷

Im Gegensatz zu den PHEA-I-TEG Netzwerken führt die Mineralisierung der PDMA-I-TEG Filme unabhängig von den gebildeten Strukturen zu keiner Verbesserung des E-Moduls (**Tabelle 4.3**), sondern verringert diesen im besten Fall auf ein Viertel des reinen Netzwerks. Es wird deutlich, dass bei den bereits steifen, PDMA-basierten Netzwerken durch das Mineral kein Verstärkungseffekt erzeugt wird, da das Polymer aufgrund des hohen Calcifizierungsgrades nur noch zu einem geringen Teil die Steifigkeit des Films beeinflusst. Vielmehr wird der E-Modul durch die anorganische CaCO_3 -Komponente dominiert, weshalb sich die Steifigkeiten der calcifizierten PHEA- und PDMA-Komposite vermutlich in ähnlicher Größenordnung befinden.

4.1.10 Einfluss der Grenzfläche auf die Mechanik der CaCO_3 -Komposite

Auch wenn die Steifigkeit der mit Hilfe von Urease hergestellten Komposite noch deutlich geringer als die des natürlichen Vorbilds ist, zeigen die Ergebnisse dennoch das Potential der Methode, um perlmuttähnliche Komposite zu erzeugen und vor allem Netzwerke mit geringem E-Modul, wie PHEA-I-TEG, deutlich zu versteifen. Dabei ist jedoch die intrinsische Bildung von CaCO_3 in den

Netzwerken allein kein Garant für Komposite mit guten mechanischen Eigenschaften. Vielmehr muss bei der Calcifizierung eine möglichst homogene Anordnung der Kristalle erzeugt werden. Daneben ist bei Kompositen auch die Grenzfläche zwischen Matrix und Anorganik von großer Bedeutung.

Im nächsten Schritt sollte daher der Einfluss der Grenzflächenhaftung zwischen Netzwerk und Polymer bezüglich ihrer Bedeutung für die Mechanik der Komposite untersucht werden. Dazu wurden PHEA-/TEG (3 Gew% TEG) Netzwerke beladen mit 1 Gew% Urease verwendet. Um einen möglichst hohen Anteil an Aragonit in den Netzwerken bei gleichzeitig hoher Enzymaktivität zu erzeugen, wurde die Calcifizierungstemperatur auf 50°C festgelegt und die Filme für 24 h in der Urea/CaCl₂-Lösung (100 mg Netzwerk auf 100 ml Lösung) calcifiziert. Um den pH-Effekt zu untersuchen, wurden ebenfalls TRIS-gepufferte Lösungen (0,1 M) eingestellt auf pH 7,5 und 9,3 verwendet.

Abbildung 4.16a zeigt noch einmal, dass durch die Verwendung der bei pH 7,5 gepufferten Lösung der Mineralisierungsgrad der Filme auf 94 Gew% im Gegensatz zu den ungepufferten bzw. pH 9,3 gepufferten Lösungen mit jeweils 89 Gew%, erhöht wird. Diese „kleinen“ Änderungen der Calcifizierungsgrade bei hohen Prozentwerten führen jedoch zu großen Änderungen des CaCO₃/Polymer-Massenverhältnis (CPV). In diesem Fall vergrößerte sich der CPV von 8,1 (pH 9,3) auf 15,7 (pH 7,5), was einer Verdopplung der Menge an CaCO₃ im Film entspricht. Auch der E-Modul des getrockneten Komposits wird durch den extrem hohen Anteil an Mineral auf 295 ± 30 MPa erhöht. Dieser entspricht zwar dem Verhältnis in Perlmutter⁸, allerdings sind die mechanischen Eigenschaften immer noch nicht im Bereich des natürlichen Vorbilds. Es wird vermutet, dass die vergleichsweise geringe Verstärkung an einer schlechten Adhäsion zwischen Polymerphase und CaCO₃ Kristallen liegt. Um die Adhäsion zu verbessern, wurden ionische Gruppen in die Polymermatrix eingebaut, die mit der CaCO₃ Oberfläche wechselwirken sollen.¹² Der Anteil dieser Additiv-Monomere wurde bezüglich Löslichkeit und Stabilität der Urease in der Monomermischung hin in **Kapitel 4.1.7** optimiert. Quartäre Ammoniumgruppen wurden durch Zugabe von 1 Gew% QuAAc zur Monomermischung hinzugefügt. Durch Zugabe von 1 Gew% Acrylsäure konnten Carboxylgruppen in das Copolymernetzwerk eingebaut werden.

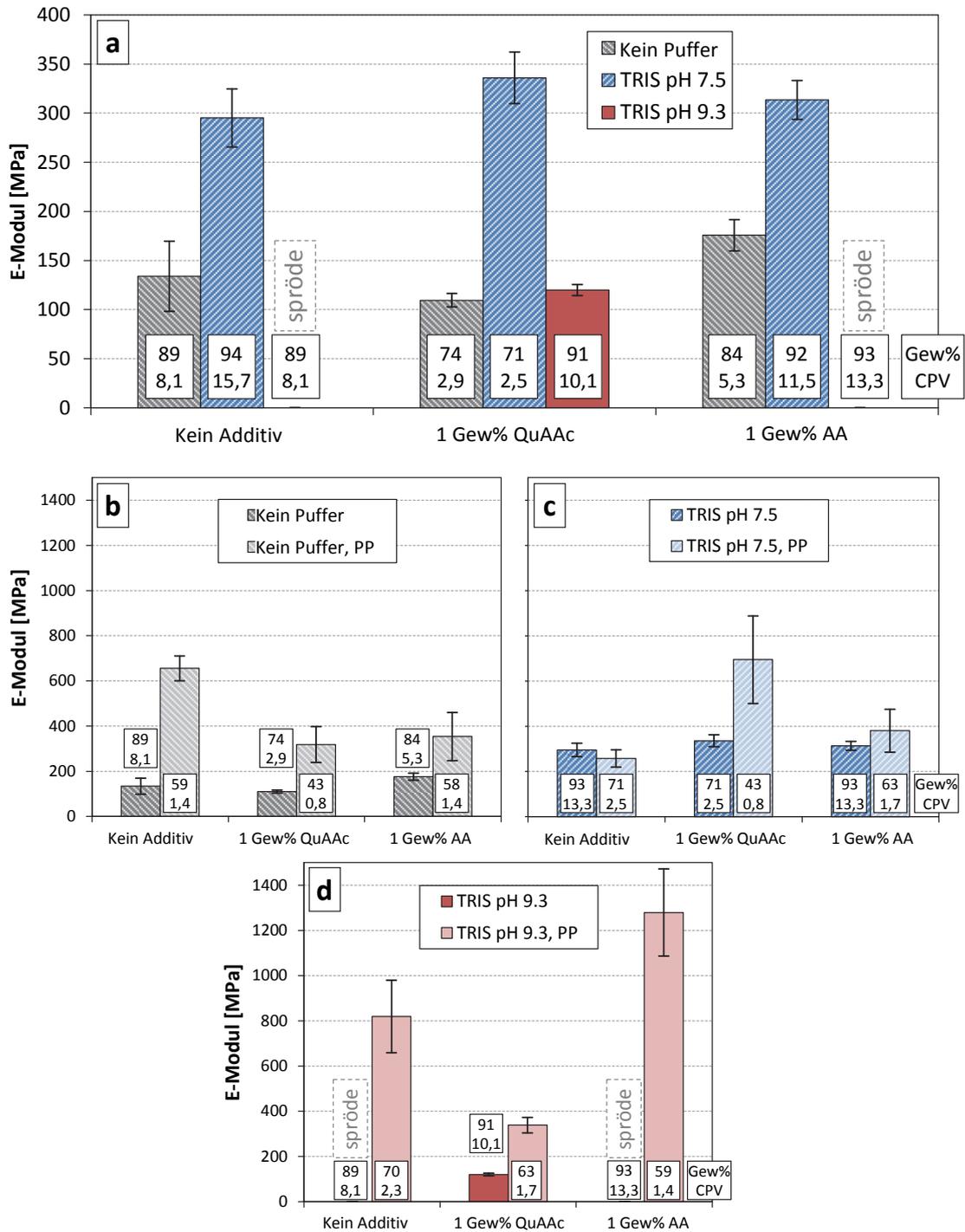


Abbildung 4.16 | (a) E-Moduln von PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG) mit 1 Gew% immobilisierter Urease und den zusätzlichen Monomeren 2-(Methacryloyloxyethyl)trimethylammoniumchlorid (QuAAc) sowie Acrylsäure calcifiziert in nicht gepufferten und TRIS-gepufferten wässriger Urea/CaCl₂-Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50 °C für 24 h. (b-d) E-Moduln der calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerke aus (a) verglichen mit den Messungen der E-Moduln nach der Post-Polymerisation. Proben deren E-Modul aufgrund ihrer Sprödigkeit nicht bestimmt werden konnte wurden mit „spröde“ markiert.²⁰³

Wie in **Abbildung 4.16a** zu erkennen ist, verringert sich durch Einbau der kationischen Gruppen in die Matrix der Calcifizierungsgrad der PHEA-I-TEG Netzwerke in der nicht gepufferten (74 Gew%, CPV 2,9) und der TRIS pH 7,5 gepufferten (74 Gew%, CPV 2,9) Urea/CaCl₂-Lösung deutlich. Durch Puffern der Lösung bei pH 9,3 hingegen erhöht sich der Calcifizierungsgrad auf ein sehr hohes CPV

von 10,1 (90,1 Gew%). Unglücklicherweise führt dieser hohe CPV zu einem sehr spröden Composite-Material, dessen Steifigkeit nicht zu bestimmen war, da die Probe ohne zu Brechen nicht zwischen den Klemmen des Messgeräts befestigt werden konnte. Die einzige erfolgreich eingespannte Probe zeigte keinen verbesserten E-Modul. Interessanterweise weist der bei pH 7,5 calcifizierte Film mit dem niedrigsten CPV den höchsten E-Modul von 336 ± 26 MPa auf. Bei der Urease-induzierten Calcifizierung der PHEA-/TEG Netzwerke mit copolymerisierter Acrylsäure findet man einen ähnlichen Trend des CPV sowie des E-Moduls wie bei den Netzwerken ohne ionische Gruppen. Dabei fällt auf, dass die bei pH 7,5 mineralisierten Composite die höchsten E-Moduln besitzen. Diese weisen, wie in **Abbildung 4.12** dargestellt ist, im Inneren sphärische Nanokristall-Agglomerate auf, während die bei höheren pH-Werten calcifizierten Proben über dendritisch gewachsene Strukturen verfügen. Die Optimierung des pH-Wertes der Calcifizierungslösung konnte den E-Modul der Composite mit 1 Gew% Urease noch einmal erhöhen. Die Ergebnisse bis hierhin zeigen jedoch, dass die chemische Modifizierung der Matrix mit ionischen Gruppen keinen maßgeblichen Einfluss auf die Grenzflächenhaftung und damit auf die Steifigkeit der Composite zu haben scheint. Der Grund hierfür könnte in der zu geringen Grenzfläche zwischen Matrix und CaCO_3 zu finden sein.

Wie die REM-Aufnahmen des Querschnittes eines PHEA-/TEG Netzwerks mit 1 Gew% Acrylsäure calcifiziert bei pH 7,5 zeigen (**Abbildung 4.17a**), weisen die gebildeten CaCO_3 -Sphären nur sehr wenige Verbindungen zur Matrix auf. Die mechanischen Eigenschaften der hoch calcifizierten Composite werden daher wahrscheinlich zum großen Teil nur von den ineinander verhakten Nanokristallen verursacht. Dies wird dadurch unterstützt, dass der geringer calcifizierte PHEA-/TEG Film mit 1 Gew% QuAAc (**Abbildung 4.17b**) über eine ähnliche Steifigkeit verfügt und dabei eine größere Grenzfläche im REM-Bild aufweist. Möglicherweise können die bei pH 7,5 gebildeten sphärischen Nanokristallcluster durch ihre geringere Oberfläche bei einem Mangel an Matrix immer noch besser miteinander verbunden werden als dendritische Strukturen, was ihre besseren mechanischen Eigenschaften erklären könnte.

Um zu untersuchen, wie die Grenzfläche die mechanischen Eigenschaften des Komposites beeinflusst, wurden die calcifizierten Hydrogele mit der gleichen Monomermischung (ohne Enzym) getränkt, die zu Herstellung der Netzwerke verwendet wurden. Die Proben wurden danach mit Hilfe eines Tuches von oberflächlich anhaftendem Monomer befreit und danach zwischen zwei Glasplatten durch Bestrahlung mit UV-Licht polymerisiert. Das daraus resultierende Material wurde wiederum mit dem REM untersucht (**Abbildung 4.17c**) und zeigte im Querschnitt eine große Grenzfläche zwischen Matrix und CaCO_3 sowie keine Hohlräume mehr. TGA-Messungen bestätigten zudem, dass die kompaktierten Composite durch diese Post-Polymerisation (PP) 25-35 Gew% Polymer aufgenommen hatten. Wie in **Abbildung 4.16b** gezeigt wird, führt der geringere CPV in

allen Fällen zu einem Material mit größerer Steifigkeit. Die calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerke mit zusätzlichen funktionellen Gruppen zeigten ein zwei- bis vierfach höheres E-Modul durch die Post-Polymerisation, wenn sie zuvor ohne Puffer calcifiziert wurden. Offensichtlich führt die größere Grenzfläche zu einer deutlichen Verbesserung des Verstärkungseffekts durch den anorganischen Füllstoff im Material. Dabei kann kein direkter Einfluss der an die Grenzfläche bindenden, funktionellen Gruppen in der Matrix festgestellt werden. Es ist anzunehmen, dass die Adhäsion zwischen den OH-Gruppen der PHEA-I-TEG Matrix und den CaCO_3 -Kristallen bereits stärker ist als die Kohäsion des Materials und in diesem Fall nicht mehr durch funktionelle Gruppen verbessert werden kann. Die Netzwerke, die bei pH 7,5 calcifiziert wurden (**Abbildung 4.16c**), profitieren am wenigsten von der Post-Polymerisation und zeigen fast gleiche mechanische Eigenschaften, was die zuvor aufgestellte Hypothese einer eventuell besseren Verbindung der sphärischen Nanokristallcluster durch weniger Matrix unterstützt.

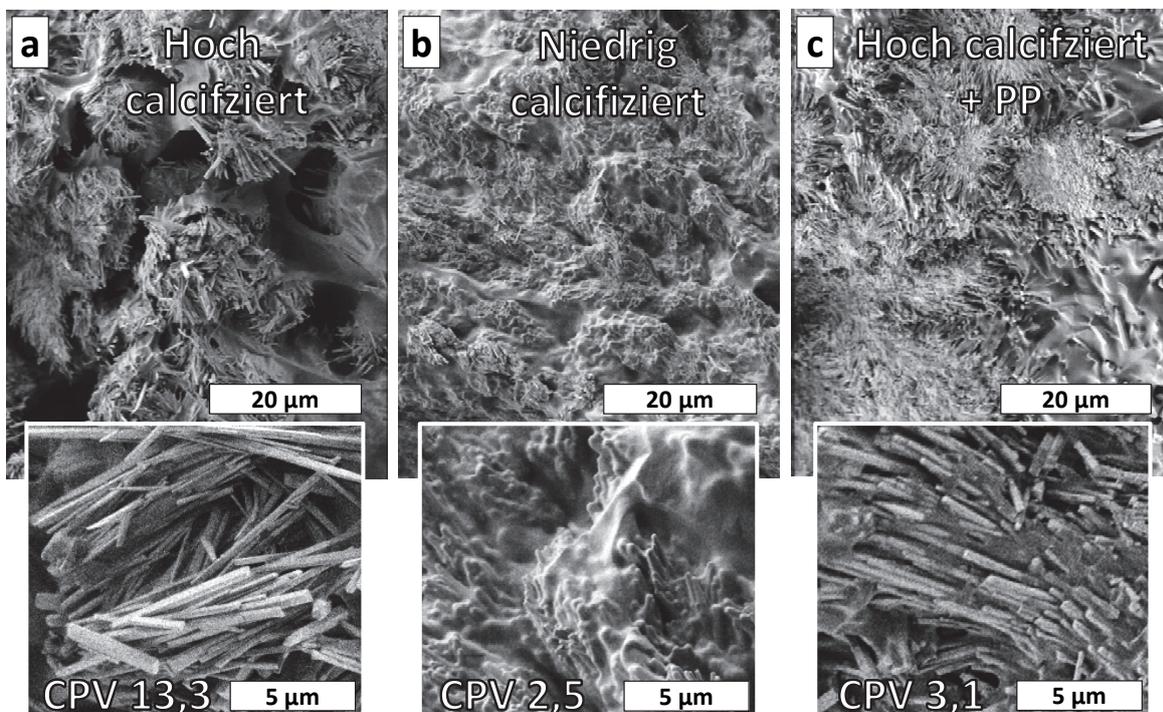


Abbildung 4.17 | Die REM- Aufnahmen zeigen die Querschnitte von PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit (a) 1 Gew% Acrylsäure und (b) 1 Gew% QuAAc. Probe (c) zeigt ein calcifiziertes PHEA-I-TEG Netzwerk mit 1 Gew% Acrylsäure, bei dem in einem nachfolgenden Schritt die bei der Mineralisierung entstandenen Hohlräume mit dem Matrix-Polymer durch Post-Polymerisation (PP) aufgefüllt wurden. Alle Proben wurden in einer bei pH 7,5 TRIS-gepufferten, wässrigen Urea/ CaCl_2 -Lösung für 24 h bei 50 °C calcifiziert. Die kleineren Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Bilder darüber.²⁰³

Eine Ausnahme bildet jedoch das Netzwerk, welches 1 Gew% QuAAc enthält. Dieses zeigt mit 700 ± 200 MPa bei einem Calcifizierungsgrad von nur 43 Gew% (CPV 0,8) eine deutliche Steigerung zum nicht kompaktierten Film. Ein anderes Bild zeigten die bei pH 9,3 hergestellten Komposite (**Abbildung 4.16d**). Diese zeigten nach der Post-Polymerisation eine verbesserte Zähigkeit, was es

möglich machte die vorher sehr spröden Proben zu vermessen. Die höchsten Steigerungen des E-Moduls auf 1280 ± 200 MPa erreichten die post-polymerisierten Komposite mit 1 Gew% Acrylsäure, calcifiziert bei pH 9,3. Die PHEA-/TEG Netzwerke, die nur OH- oder quartäre Ammoniumgruppen enthielten, wiesen geringere E-Module nach der Post-Polymerisation auf, allerdings lagen diese immer noch deutlich über den nicht kompaktierten Filmen.

Wie die Ergebnisse zeigen, spielt die Stärke der Adhäsion zwischen organischer und anorganischer Phase keine entscheidende Rolle für die mechanischen Eigenschaften, allerdings scheint die Anordnung der CaCO_3 -Kristalle in der Matrix einen größeren Einfluss zu haben. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die post-polymerisierten Komposite aus den PHEA-/TEG Netzwerken mit 1 Gew% Acrylsäure, welche bei pH 7,5 und pH 9,3 calcifiziert wurden, im REM noch einmal genauer betrachtet (**Abbildung 4.18**). Dabei zeigte sich noch einmal die durch den pH-Wert bei der Calcifizierung begründete, unterschiedliche Agglomeration der Nanokristalle im Film (siehe **Abbildung 4.12c**). Der bei pH 9,3 calcifizierte Komposit mit der höchsten Steifigkeit (1,3 GPa) zeigt wie sein nicht kompaktiertes Gegenstück geordnete, dendritische Agglomerate der CaCO_3 -Nanostrukturen. Diese Strukturen sind durch die Post-Polymerisation über die polymere Matrix miteinander verbunden (**Abbildung 4.18a**), was als Grund für die große Steigerung des E-Moduls angenommen werden kann. Im Gegensatz dazu zeigt der bei pH 7,5 hergestellte Komposit nach der Kompaktierung (E-Modul 380 MPa) eine eher ungeordnete Struktur, die durch das Auffüllen der Lücken zwischen den sphärischen Nanokristallagglomeraten zustande kommt (**Abbildung 4.18b**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, um mit Hilfe der Urease-induzierten Calcifizierung in einem PHEA-/TEG Netzwerk hoch-steife Komposite zu erzeugen, eine dichte und regelmäßige Anordnung der stabartigen Nanostrukturen im Inneren der Netzwerke notwendig ist. Diese kann über den pH-Wert während der Calcifizierung und durch ionische Gruppen in der Matrix gesteuert werden. Ein weiterer entscheidender Faktor ist eine möglichst große Grenzfläche zwischen Matrix und CaCO_3 Kristallen, die durch die Kompaktierung mittels Post-Polymerisation verbessert werden kann. Die Grenzflächenhaftung zwischen Matrix und CaCO_3 ist dabei kein limitierender Faktor, da diese auch ohne ionische Gruppen bereits ausreichend groß ist.

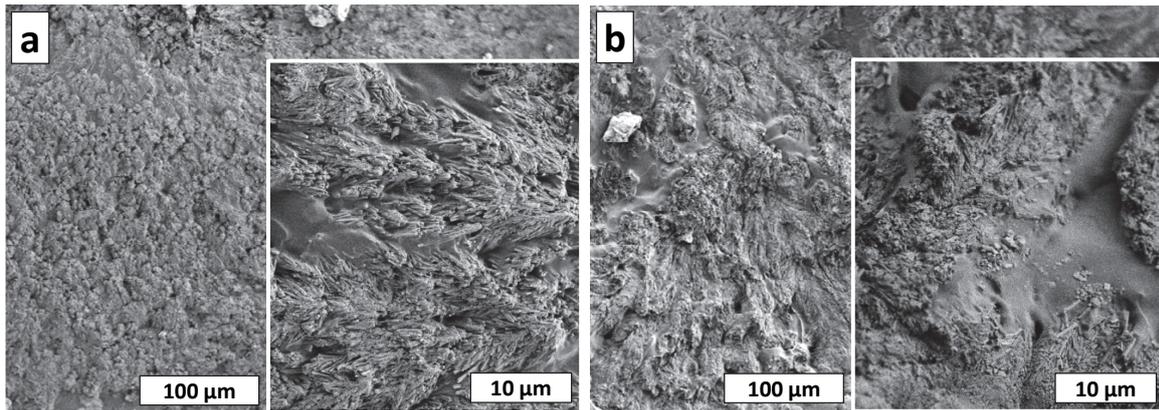


Abbildung 4.18 | REM-Aufnahmen der Querschnitte calcifizierter PHEA-I-TEG Netzwerke (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit 1 Gew% Acrylsäure, bei denen in einem nachfolgenden Schritt die bei der Mineralisierung entstandenen Hohlräume mit dem Matrix-Polymer durch Post-Polymerisation (PP) aufgefüllt wurden. Die Proben wurden in einer TRIS-gepufferten, wässrigen Urea/CaCl₂-Lösung eingestellt auf (a) pH 9,3 oder (b) pH 7,5 für 24 h bei 50 °C calcifiziert. Die kleineren Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Bilder daneben.²⁰³

Die erfolgreiche Verbesserung der Steifigkeit der PHEA-I-TEG basierten Komposite durch die PP sollte im nächsten Schritt auch auf die calcifizierten PDMA-I-TEG Filme übertragen werden, deren E-Modul zuvor durch die Mineralisation sogar verschlechtert wurde. Dazu wurde die PP auf die calcifizierten PDMA-I-TEG (3 Gew%) Filme angewendet, die mit den gleichen ionischen Monomeren wie die PHEA-I-TEG Systeme modifiziert und unter den gleichen Bedingungen hergestellt wurden.

Vor der PP konnten bei allen Kompositen unabhängig der Netzwerkzusammensetzung hohe Mineralisierungsgrade von 93 bis 94 Gew% (CPV 13,3 bis 15,7) mit einer Ausnahme ermittelt werden (**Abbildung 4.19**). Der PDMA-I-TEG Komposit mit 1 Gew% Acrylsäure weist sowohl in pH 9,3 gepufferter als auch in ungepufferter Urea/CaCl₂-Lösung einen verringerten Calcifizierungsgrad von 83 Gew% (CPV 4,9) bzw. 76 Gew% (CPV 3,1) auf. Dieser Effekt wurde bereits in **Kapitel 4.1.7** beobachtet, wobei als Grund eine Verringerung des pH-Wertes durch die Acrylsäure in der Monomermischung angenommen wird, die nicht durch den zugegebenen Puffer kompensiert werden kann. Dies führt wahrscheinlich zur Deaktivierung eines Teils der Urease.²⁰⁴ Der dadurch hervorgerufene Aktivitätsverlust kann nur in der pH 7,5 gepufferten Calcifizierungslösung kompensiert werden, während er sich in den anderen Lösungen in einem verringerten Calcifizierungsgrad äußert.

Die in **Abbildung 4.19a bis c** dargestellten Steifigkeiten der Komposite zeigen erneut, dass alle E-Module der calcifizierten PDMA-I-TEG Filme, auch die der modifizierten Netzwerke, unterhalb des Wertes des nicht mineralisierten Netzwerks liegen (1666 ± 30 MPa). Im Gegensatz zu den PHEA-I-TEG basierten Kompositen lässt sich wiederum keine Steigerung des E-Moduls durch die Calcifizierung feststellen. Die gemessenen E-Module befinden sich auch hier im Bereich der E-Module hoch calcifizierter PHEA-I-TEG Filme. Dies bestätigt, dass in stark calcifizierten

Netzwerken die mechanische Last vermutlich hauptsächlich durch die lose verhakten Kristalle getragen wird.

Nach der Kompaktierung der PDMA-/TEG Komposite mittels PP nimmt der E-Modul in allen Fällen zu. Den höchsten E-Modul von 3,1 bis 3,5 GPa weist der post-polymerisierte PDMA-/TEG Komposit mit QuAAc als Comonomer auf, wenn dieser in einer der beiden TRIS gepufferten Lösungen mineralisiert wurde (**Abbildung 4.19 b und c**). **Abbildung 4.19 d** zeigt REM-Aufnahmen des Querschnitts des bei pH 9,3 calcifizierten Komposits nach der Post-Polymerisation. Diese zeigen mit den HEA-basierten Netzwerken vergleichbare, dendritische CaCO_3 -Nanostrukturen sowie eine dichte Polymerfüllung der Zwischenräume.

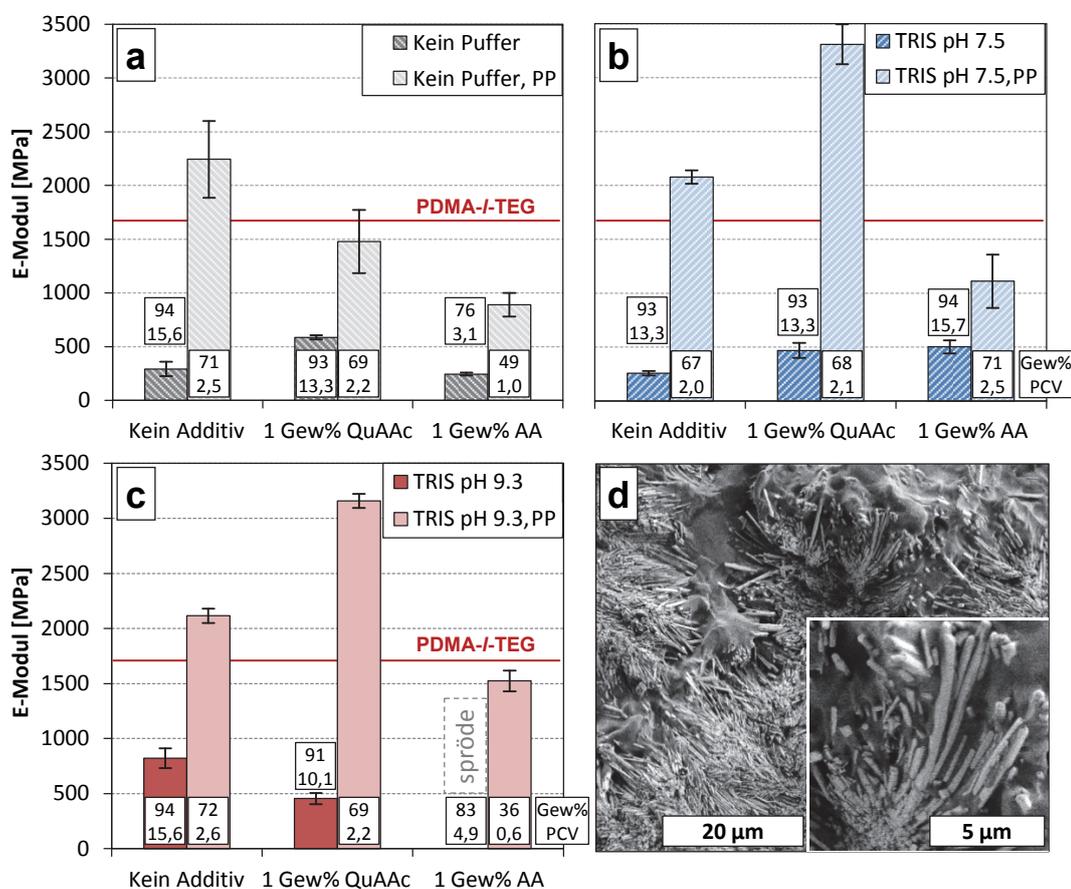


Abbildung 4.19 | (a - c) E-Moduln der PDMA-I-TEG Netzwerke (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit oder ohne ionische Monomere, calcifiziert in nicht gepufferter oder TRIS-gepufferter (pH 7,5 und 9,3) wässriger Urea/ CaCl_2 -Lösung bei 50°C für 24 h verglichen mit dem zugehörigen kompaktierten Komposit nach der Post-Polymerisation (PP). Die horizontale rote Linie markiert den E-Modul der uncalcifizierten PDMA-I-TEG Matrix. (d) REM-Aufnahmen des Querschnitts des bei pH 9,3 calcifizierten PDMA-I-TEG Netzwerks mit 1 Gew% QuAAc. Das kleine Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Hauptbildes. Proben deren E-Modul aufgrund ihrer Sprödigkeit nicht bestimmt werden konnte wurden mit „spröde“ markiert.²⁰³

Mit Hilfe der Post-Polymerisation ist es schließlich gelungen den E-Modul der Urease-induziert mineralisierten Komposite durch die Verwendung des steiferen PDMA als Haupt-Netzwerkkomponente noch einmal deutlich um den Faktor 3 zu steigern. Dennoch liegt dieser Wert immer noch unter dem E-Modul des natürlichen Vorbildes Perlmutter (70 GPa)⁸. Wie die Ergebnisse

zeigen, hat die Ordnung der Kristalle einen deutlichen Einfluss auf die gesteigerte Steifigkeit. Diese Ordnung scheint jedoch selbst in den besten Kompositen noch zu gering, was es den stabartigen Nanostrukturen durch ihre meist ungeordnete Ausrichtung nicht ermöglicht das Material parallel zur Spannungsrichtung zu verstärken. Mit Hilfe des Isostrain-Modells¹³ für Komposite-Werkstoffe kann berechnet werden, wie viele Fasern in Zugrichtung notwendig wären, um einen bestimmten E-Modul hervorzurufen. Dieses Modell geht dabei von den Annahmen aus, dass alle Fasern unendlich lang und in Zugrichtung orientiert sind. Der E-Modul eines Komposits berechnet sich aus den Volumenanteilen (v_x) der Einzelkomponenten und deren E-Modul (E_x) nach folgender Gleichung:

$$E_{Komposite} = v_{Polymer} \cdot E_{Polymer} + v_{Faser} \cdot E_{Faser} \quad \text{Gleichung 4.1}$$

Zur Bestimmung des notwendigen Faseranteils wird die Gleichung nach v_{Faser} umgestellt:

$$v_{Faser} = (E_{Komposite} - (v_{Polymer} \cdot E_{Polymer})) / E_{Faser} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

Daraus ergibt sich, dass der gleiche Verstärkungseffekt auch durch Zugabe von 3,8 Gew% paralleler Fasern beim PHEA-/TEG Netzwerk und durch 4,3 Gew% Fasern beim PDMA-/TEG Netzwerk hervorgerufen werden kann. Anhand der REM-Aufnahmen ist erkennbar, dass dies eine gute Näherung für die Zahl der Nanokristalle ist, die tatsächlich in Zugrichtung liegen. Um die mechanischen Eigenschaften also weiter zu verbessern, muss die Calcifizierungsmethode dahingehend optimiert werden, dass mehr Kristalle gebildet werden, welche parallel zur Zugrichtung orientiert sind. Eine Möglichkeit bestünde darin die Netzwerke unter großer Dehnung zu calcifizieren, sodass das freie Volumen im Polymer, in denen vermutlich die Kristallbildung stattfindet, in Zugrichtung deformiert wird, wodurch das Kristallwachstum in diese Richtung begünstigt wird.

4.1.11 Mineralisation unter Dehnung

Es zeigte sich, dass die bisher verwendeten PHEA-/TEG und PDMA-/TEG Netzwerke nicht für eine Mineralisation unter Dehnung geeignet sind, da sich diese im wassergequollenen Zustand spröde verhalten. Die Filme lassen sich im trockenen Zustand zwar dehnen, allerdings führt der Kontakt mit der Calcifizierungslösung zum Riss des gespannten Films innerhalb weniger Minuten. Aus diesem Grund mussten neue Netzwerke gesucht werden, die eine möglichst große mechanische Deformation sowie die anschließende Quellung in der Calcifizierungslösung überstehen und zudem in der Lage sind, Urease homogen zu immobilisieren.

Es existieren zahlreiche Arbeiten, die sich mit der Herstellung besonders dehnbarer Hydrogele beschäftigen.²⁰⁸ Die meisten Gele sind jedoch sehr anfällig gegenüber Rissen, was das Erreichen

großer Dehnungen erschwert. Eine Möglichkeit zur Entwicklung dehnbarer und rissunempfindlicher Hydrogele ist es, Mechanismen zu integrieren, welche die notwendige Bruchenergie vergrößern bei der es zum überkritischen Riss im Material kommt und so eine Rissausbreitung erschweren²⁰⁹. Dies kann entweder durch die Herstellung von Doppelnetzwerken²¹⁰⁻²¹¹, durch Einbau von (Nano)Partikeln²¹²⁻²¹³ oder über ionische Vernetzungen^{50, 214} realisiert werden.

Für letzteres werden oftmals semiinterpenetrierende Netzwerke verwendet, bei denen ein kovalentes Netzwerk, z.B. Polyacrylamid (PAAm), mit einem ionischen, langkettigen Polymer (z.B. Alginat) kombiniert wird.⁵⁰ Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Acrylamids zum bereits erfolgreich für die Urease-induzierte Mineralisation erprobten N,N-Dimethylacrylamid (DMA) wurde PAAm als eine vielversprechende Alternative zur Immobilisierung von Enzymen gesehen. PAAm ist wasserquellbar und gleichzeitig trotzdem dehnbar. Besonders in Kombination mit Alginat (Alg) erreichten gequollene Netzwerke eine hohe Zähigkeit sowie eine Dehnbarkeit auf bis zu 2100%.⁵⁰ Nach diesem Vorbild konnte die Rezeptur eines auf PAAm basierenden Netzwerks entwickelt werden, das den gegebenen Anforderungen entsprach. Als Vernetzer musste TEG jedoch Methyl-bis-Acrylamid (MBAm) weichen, da ersterer nicht im erforderlichen Maßstab wasserlöslich ist, um eine homogene Mischung mit Acrylamid in wässriger Lösung herzustellen. Auch der bis dato verwendete Initiator Irgacure 651 wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) ausgetauscht. Zudem wurde Alginat als zusätzliche Komponente eingeführt, um die Dehnbarkeit der Netzwerke auf ein möglichst hohes Maß zu steigern (Zusammensetzung in **Kapitel 6.7.4**). Das daraus durch UV-Polymerisation hergestellte semiinterpenetrierende Polymer-Netzwerk PAAm-/MBAm/Alg (0,06 Gew% MBAm, 11 Gew% Alg) konnte im gequollenen Zustand um 1500% gedehnt werden. Die Monomermischung wies zudem eine sehr gute Löslichkeit für Urease auf. Nach der UV-Polymerisation wurden auch bei Enzymbeladungen von 1 Gew% vollständig transparente Filme erhalten, die durch die immobilisierte Urease keine veränderte Dehnbarkeit zeigten.

Um die Calcifizierbarkeit der neuen Netzwerke zu testen, wurden drei je 1 x 1 cm² große Stücke des Films mit einer Dicke von 1 mm in je 200 ml einer ungepufferten sowie zwei mit 0,1 M TRIS gepufferte (pH 7,5 und pH 9,3) Urea/CaCl₂-Calcifizierungslösung (0,17 M / 0,27M) gegeben. Nach 24 h war der in der TRIS-gepufferten Lösung mit pH 7,5 eingelegte Film weiß, undurchsichtig und hart. Die Bestimmung des anorganischen Anteils mittels TGA nach Trocknung des Films ergab einen Calcifizierungsgrad von fast 99 Gew% (CPV 99) (**Abbildung 4.20a**). Im Querschnitt der Filme zeigt sich, dass sich mit bloßem Auge erkennbare, würfelförmige Kristalle gebildet haben (**Abbildung 4.20b und c**). Die Netzwerke, welche in der ungepufferten oder der bei pH 9,3 gepufferten Lösung calcifiziert wurden, trübten ebenfalls im Verlauf der Calcifizierung ein waren allerdings nach 24 h deutlich weicher. In ihrem Inneren sind kleinere und weniger dicht gepackte Würfelkristalle

gewachsen (**Abbildung 4.20d und e**, CaCO_3 -Gehalt < 30 Gew%). Mittels FTIR-Messungen konnten alle Kristalle als Calcit identifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die PAAm-/MBAm/Alg Netzwerke grundsätzlich für eine Urease-induzierte Calcifizierung geeignet sind, aufgrund der geringeren Mineralisierung der Filme in ungepuffert als auch pH 9,3 gepuffert. Calcifizierungslösung, wurden die folgenden Versuche in TRIS-Puffer bei pH 7,5 durchgeführt.

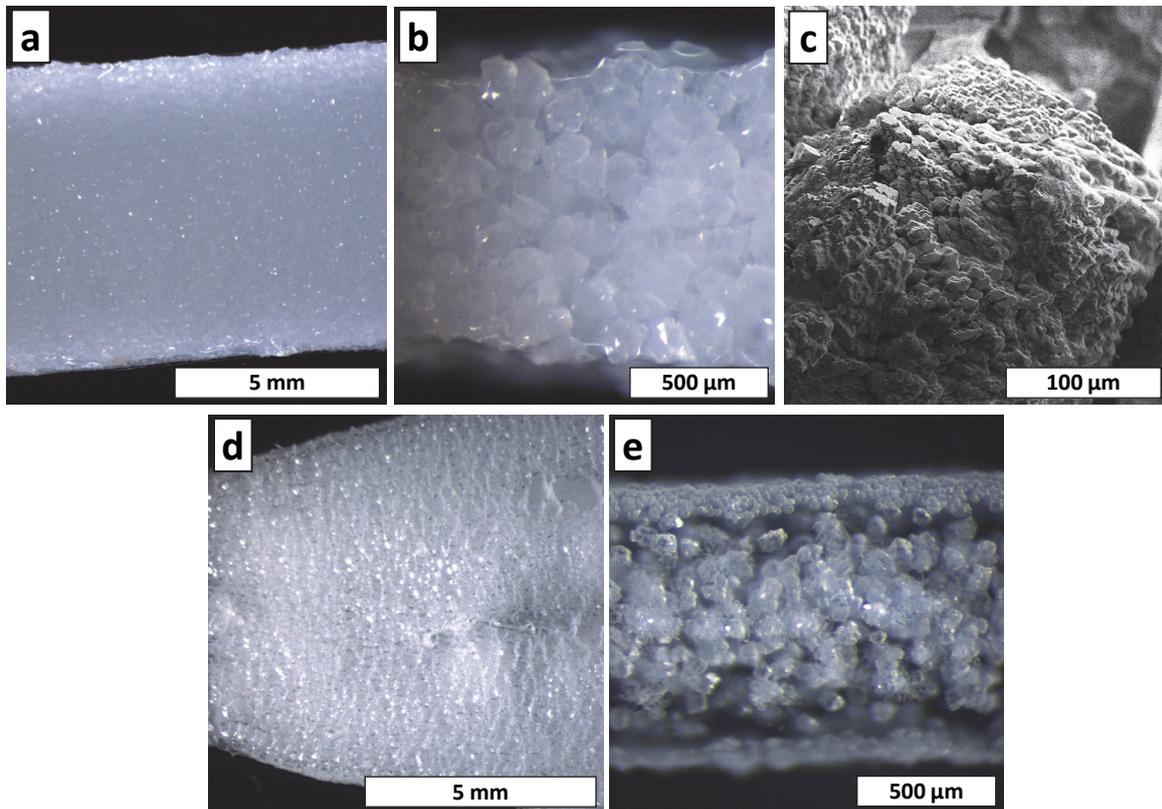


Abbildung 4.20 | Mikroskop-Aufnahmen der Polyacrylamid-I-Methylen-bis-Acrylamid / Alginate (PAAm-I-MBAm/Alg) Netzwerke calcifiziert in 0,1 M TRIS gepuffert Urea/ CaCl_2 -Lösung eingestellt auf (a, b, c) pH 7,5 und (d, e) pH 9,3 für 24 h bei 50°C. Die Stereomikroskop-Bilder (a) und (d) zeigen die Draufsicht auf die Komposite, während (b) und (e) Querschnitte der Filme darstellen. Bild (c) zeigt die REM-Aufnahme eines würfelförmigen Kristalls aus Bild (b) im Querschnitt.

Zur Untersuchung einer möglichen Calcifizierung unter Dehnung wurde je ein $1 \times 1 \text{ cm}^2$ großes sowie 1 mm dickes Stück des Films mit Hilfe zweier Pinzetten um 300%, 500%, 700%, 900% 1100% 1300% sowie 1500% gedehnt und in einen aus einer PVC-Platte gesägten Halter eingespannt, welcher die Dehnung fixierte (**Abbildung 4.21**). Da sich der Querschnitt der Netzwerke durch die große Dehnung stark verringerte, waren für diese Versuche Filme mit einer Dicke von 1 mm notwendig. Die eingespannten Netzwerke wurden dann in passende Schraubdeckel-Flaschen mit jeweils 200 ml auf 50°C temperierte, TRIS-gepufferte Urea/ CaCl_2 -Calcifizierungslösung (0,17 M/ 0,27M) gegeben (pH-Wert 7,5). Innerhalb von 10 Minuten trübten alle Filme sichtbar weiß ein.

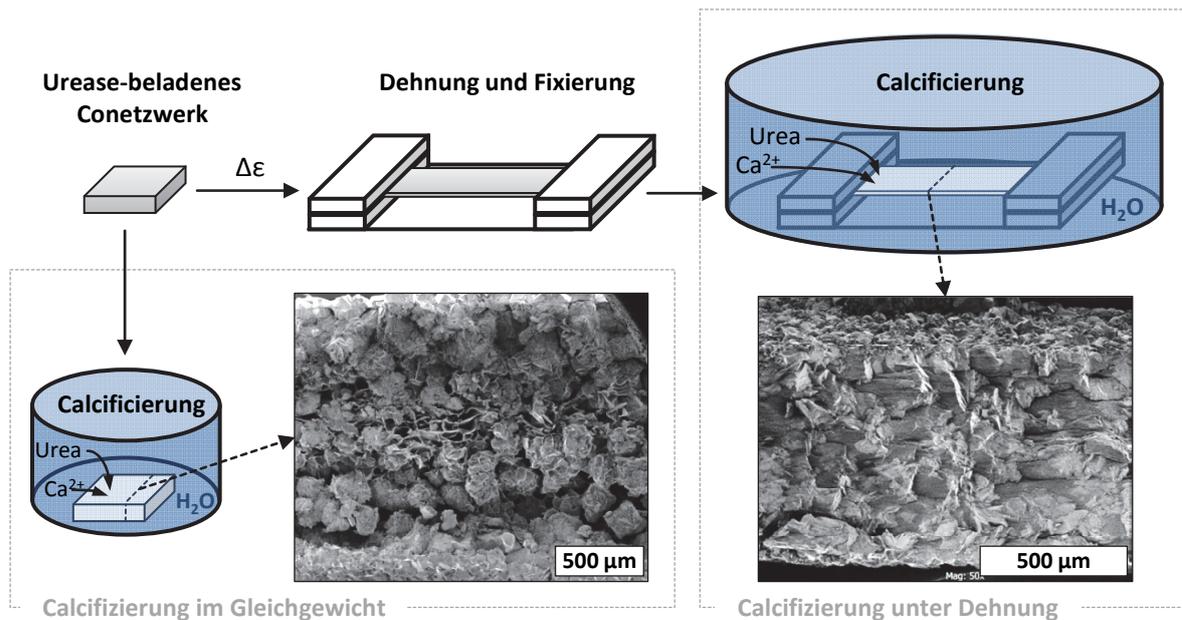


Abbildung 4.21 | Schema der Calcifizierung unter Dehnung im Vergleich zum nicht gedehnten Film. Die REM-Aufnahmen zeigen zwei semiinterpenetrierende PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerke, die mit 1600% Dehnung und im entspannten Zustand für 24 h in einer Urea/ CaCl_2 -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C calcifiziert wurden.

Nach 24 h in der Calcifizierungslösung waren alle Netzwerke vollständig opak. Die Querschnitte aller Filme wurden mit Hilfe des REM untersucht. Die Kontrollprobe, die ohne vorherige Dehnung (0%) eingespannt wurde, weist im Querschnitt würfelförmige CaCO_3 -Kristalle auf. Auf dem zugehörigen REM-Bild in **Abbildung 4.22** ist zudem zu erkennen, dass das Innere des Netzwerkes neben den Kristallen eine Vielzahl an Hohlräumen aufweist, während nahezu kein Polymer mehr zu erkennen ist. Der Blick auf die REM-Aufnahmen der unter Dehnung calcifizierten Proben lassen mit steigender Dehnung eine Veränderung der gebildeten Strukturen erkennen.

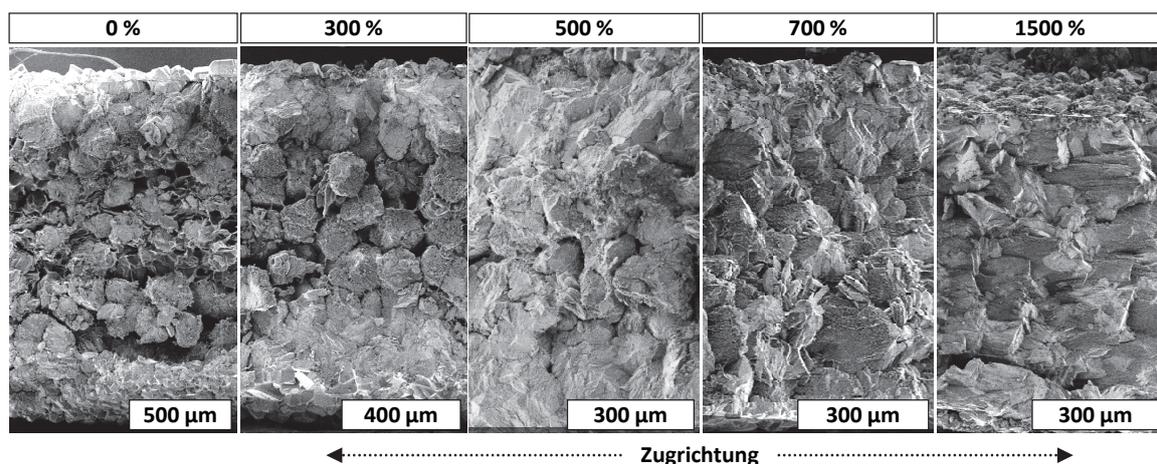


Abbildung 4.22 | REM-Aufnahmen der PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerke calcifiziert in 0,1 M TRIS gepufferter Urea/ CaCl_2 -Lösung eingestellt auf pH 7,5 für 24 h bei 50°C mit unterschiedlicher fixierter Dehnung des Hydrogels.

Während die Würfelstrukturen bei 0% Dehnung einen deutlichen Abstand zueinander besitzen, rücken diese mit zunehmender Dehnung während der Calcifizierung immer dichter zusammen, bis

sie bei 500 % Dehnung eine dichte Struktur erzeugen. Durch weitere Erhöhung der Dehnung auf 700% zeigt sich zudem, dass die Würfelstrukturen beginnen sich in Zugrichtung zu deformieren und auszurichten. Diese Vorzugsrichtung wird mit steigender Dehnung immer deutlicher und ist bei 1500% am stärksten ausgeprägt. Die Calcifizierungsgrade der Filme sind mit 98 bis 99 Gew% (CPV 48 bis 99) alle sehr hoch und auch die mittels FTIR ermittelten Kristallstrukturen ergeben in allen Fällen Calcit. Dies zeigt, dass durch die aufgebrachte Dehnung während der Mineralisierung lediglich die Wachstumsrichtung der Kristalle beeinflusst wird. Der Film mit der höchsten Dehnung von 1500%, bei dem die Ausrichtung der Kristalle in Zugrichtung am stärksten ausgeprägt ist, wird in **Abbildung 4.23** noch einmal vergrößert dargestellt. Dort ist zu erkennen, dass die Würfelstrukturen verschwunden sind und an ihrer Stelle plattenartige Kristalle gebildet wurden, die von ihrem Aussehen sehr stark an die Schichtstrukturen von Perlmutter erinnern. Aufgrund des hohen Mineralisationsgrades ist jedoch im Gegensatz zur perfekten, natürlich gewachsenen Struktur kaum noch Polymer vorhanden, weshalb kein Komposit entstanden ist und sich das Material spröde verhält. Aus diesem Grund war die Messung der mechanischen Eigenschaften nicht möglich, da das Material beim Einspannen in die Klemmen des Dynamisch-Mechanischen-Analysators bricht. Auch die Post-Polymerisation verbessert nicht die Zähigkeit des Materials, vermutlich da das Monomer nicht mehr zwischen die dicht angeordneten Kristallplatten eindringen kann.

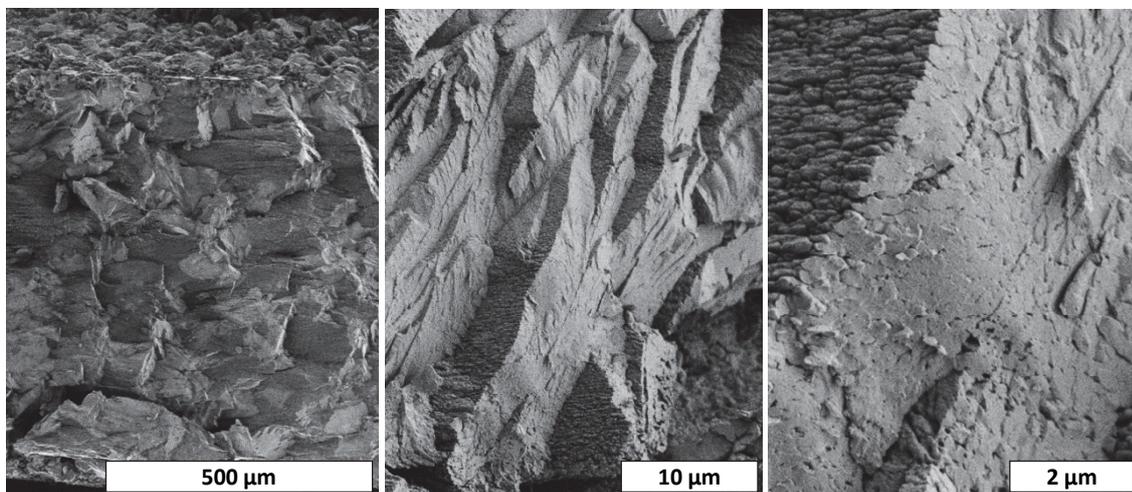


Abbildung 4.23 | REM-Aufnahmen der Bruchfläche eines semiinterpenetrierendes PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerks, das mit 1600% Dehnung und im entspannten Zustand für 24 h in einer 0,1 M TRIS-gepufferten (pH 7,5) Urea/CaCl₂-Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C calcifiziert wurde in verschiedenen Vergrößerungen.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass über die Dehnung eines Hydrogels während der Urease-induzierten Calcifizierung Einfluss auf die entstehende Kristallmorphologie genommen werden kann und die Methode damit großes Potential hat. Als problematisch zeigten sich allerdings die anscheinend notwendigen, sehr großen Dehnungen von mindestens 700% im gequollenen Zustand (beim PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerk), die mit den meisten Hydrogelen nicht zu realisieren sind.

Vergleicht man die intrinsisch gewachsenen Kristallstrukturen in den dehnbaren PAAm-/MBAm/Alg Netzwerken mit den zuvor verwendeten, nicht dehnbaren PHEA- bzw. PDMA-basierten Kompositen, so fällt auf, dass diese unterschiedlich sind. Während letztere stabartige Nanokristalle aufweisen, zeigen sich in den PAAm-/MBAm/Alg Netzwerken Würfel- oder Plattenstrukturen. Da es ursprünglich das Ziel war, die stabartige Nanokristalle auszurichten, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, warum diese im dehnbaren Netzwerk nicht mehr gebildet werden.

Die ab hier in diesem Kapitel vorgestellten Ergebnisse wurden zusammen mit MARC NOELKE im Rahmen seiner Masterarbeit erarbeitet. Dabei konnte das Alginat als entscheidende Komponente für die Bildung der massiven Calcit-Würfel im ungedehnten Film identifiziert werden. Wurde eine Rezeptur ohne Zugabe von Alginat angefertigt (PAAm-/MBAm), so konnten nach der Calcifizierung wieder stabartige Nanokristalle im Netzwerkinneren gefunden werden (**Abbildung 4.24a**). Diese aggregieren allerdings in einer für pH 7,5 TRIS-gepufferte Calcifizierungslösungen untypischen, dendritischen Form.

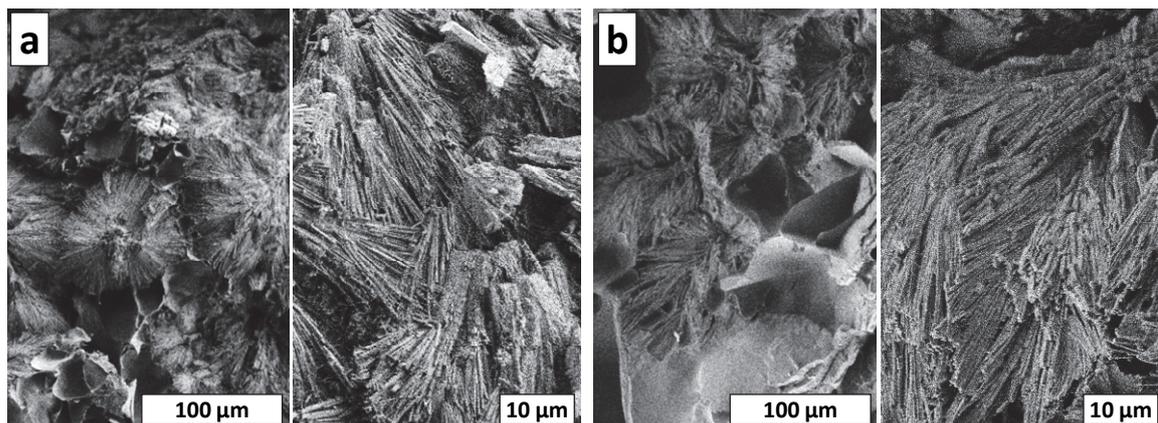


Abbildung 4.24 | REM-Aufnahmen der Querschnitte von (a) ungedehnten und (b) 400% gedehnten PAAm-I-MBAm Netzwerken calcifiziert für 24 h in einer 0,1 M TRIS-gepufferten (pH 7,5) Urea/CaCl₂-Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C.

Durch den Verzicht auf Alginat in der Rezeptur verringert sich auch die maximale Dehnbarkeit der Netzwerke nach deren Herstellung auf etwa 800%. Bei der Calcifizierung zeigte sich zusätzlich, dass PAAm-/MBAm Filme bei fixierten Dehnungen über 400% im Verlauf der Calcifizierung stets reißen. Bis einschließlich 400% Dehnung werden Calcifizierungsgrade von 93 bis 95 Gew% (CPV 13 bis 19) erreicht, wobei sich jedoch die gebildeten nadelartigen Nanokristalle und deren Überstrukturen im Inneren der Komposite zwischen ungedehnter und 400% gedehnter Probe nicht unterscheiden (**Abbildung 4.24**). Begründet durch den hohen Calcifizierungsgrad und die unregelmäßige Calcifizierung mit vielen Hohlräumen, verhalten sich die hergestellte Komposite weiterhin spröde, wodurch ihren mechanischen Eigenschaften nicht charakterisierbar sind. Dieser Effekt wurde durch die stofflichen Eigenschaften des getrocknete PAAm-/MBAm Netzwerks weiter verstärkt, da sich das Polymer aufgrund seiner hohen Glasübergangstemperatur von etwa 195 °C²¹⁵ ebenfalls spröde

verhält. Um die Dehnbarkeit des Netzwerks bei der Calcifizierung zu verbessern, gleichzeitig jedoch die negativen Auswirkungen des Alginat auf das Kristallwachstum zu verhindern, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob auch andere langkettige Polymere geeignet sein könnten, um mit PAAm-*l*-MBAm ein semiinterpenetrierendes Netzwerk zu bilden. Dazu wurden statt Alginat je 10 Gew% Methylcellulose, Polyethylenglycol (PEG), Polyethyloxazolin (PEtOx) und Gelatine in einer möglichst konzentrierten, wässrigen Lösung zur Monomermischung hinzugegeben. Die nach der UV-Polymerisation erhaltenen Filme wurden nach der Herstellung auf ihre maximale Dehnbarkeit hin untersucht. Dazu wurde zuerst ein Netzwerk vorsichtig gedehnt (5 mm/s) bis es riss und die ermittelte Dehnung notiert. Das nächste Netzwerk des gleichen Typs wurde auf 95% der Rissdehnung verstreckt und in der Kunststoffhalterung fixiert. Meist wurde das Erreichen dieser Dehnung begleitet von einer spürbaren Versteifung des Films. Konnte der Film die Dehnung erhalten ohne zu reißen, wurde dieser Wert als maximale Dehnung notiert.

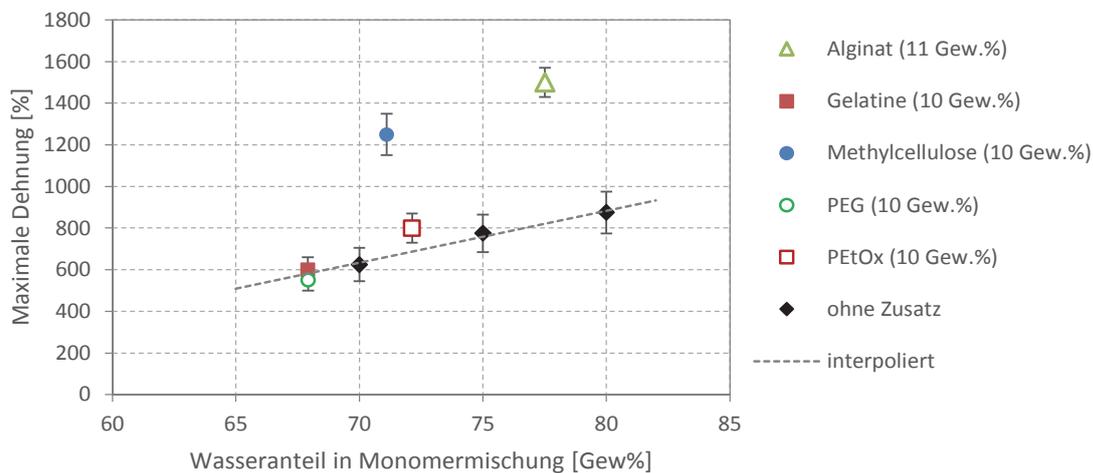


Abbildung 4.25 | Vergleich der maximalen Dehnung (Dehnrage 5 mm/s) in Abhängigkeit des Wassergehalts nach der Herstellung der reinen PAAm-*l*-MBAm Hydrogele sowie der wasserquollenen, PAAm-*l*-MBAm basierten, semiinterpenetrierenden Netzwerke mit unterschiedlichen, nicht-vernetzten Polymeren.

Abbildung 4.25 zeigt die ermittelten maximalen Dehnungen in Abhängigkeit der zum homogenen Lösen aller Bestandteile notwendigen Wasserkonzentration in der Monomermischung. Dabei fällt beim reinen PAAm-*l*-MBAm Netzwerk auf, dass dessen Dehnbarkeit mit steigendem Wassergehalt in der Monomermischung zunimmt, was vermutlich auf eine Verringerung des Vernetzungsgrades durch die höhere Verdünnung während der Polymerisation zurückzuführen ist. PEtOx, PEG und Gelatine verändern die Dehnbarkeit der Netzwerke nicht signifikant, da alle ermittelten Werte im Bereich der reinen PAAm-*l*-MBAm Co-Netzwerke liegen. Methylcellulose hingegen zeigt mit 1250% eine deutliche erhöhte maximale Dehnung, die nur knapp unter dem Wert von Alginat liegt und damit deutlich höher als die Dehnbarkeit des kovalenten Netzwerks allein ist. Das PAAm-*l*-MBAm/Methylcellulose Netzwerk wurde mit 1 Gew% immobilisierter Urease und fixierter

maximaler Dehnung für 24h bei 50 °C calcifiziert. Unglücklicherweise ist auch dieses Netzwerk nicht in der Lage die hohe Dehnung während der Calcifizierung zu stabilisieren und reißt daher nach wenigen Stunden. Versuche mit niedrigeren Dehnungen zeigten, dass der Film bereits bei einer Dehnung auf die 3-fache Ausgangslänge (200%) nicht unbeschadet die Calcifizierung übersteht. Um 100% gedehnte Netzwerke weisen einen Calcifizierungsgrad von 93 Gew% auf. REM-Aufnahmen zeigen, dass die im Inneren des zerklüfteten Netzwerks gewachsenen Nadelstrukturen eine starke Ähnlichkeit zu den calcifizierten reinen PAAm-/MBAm Netzwerken aufweisen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass eine hohe Dehnung der Hydrogele während der Calcifizierung nur unter Anwesenheit von Alginat im Netzwerk stabilisiert werden kann. Dies könnte auf den zusätzlichen ionischen Vernetzungsmechanismus des Alginats zurückzuführen sein, der in der Lage ist intermolekulare, ionische Vernetzungen zwischen den Carboxylgruppen des Alginats mit Hilfe der in Lösung befindlichen Ca^{2+} -Ionen auszubilden.⁵⁰ Im Gegensatz dazu sind die weiteren untersuchten semiinterpenetrierenden Netzwerke auf Basis von PAAm-/MBAm nicht in der Lage die notwendige Dehnung zu stabilisieren und so orientierte Nadelkristalle mittels der Urease-induzierten Calcifizierung zu erzeugen. Wie die Ergebnisse der PAAm-/MBAm/Alg Komposite jedoch zeigen, ist ein Einfluss auf die Kristallisation durch die Dehnung der Netzwerke während der Calcifizierung allerdings prinzipiell möglich. Zu Realisierung sind jedoch Hydrogele mit verbesserten mechanischen Eigenschaften notwendig, wie sie die Natur schon seit jeher einsetzt (z.B. Kollagen), die jedoch auf künstlichem Weg bis jetzt noch nicht in geeigneter Form synthetisiert werden können. Eine andere Möglichkeit, die mechanischen Eigenschaften der Komposite zu verbessern, bestünde in der Abscheidung isotroper, anorganischer Strukturen innerhalb der Netzwerke.

4.2 Alkalische Phosphatase-induzierte Calcifizierung von Hydrogelen

Wie in den vorherigen Kapiteln gezeigt wurde, können mit Hilfe der Urease-induzierten Calcifizierung im Polymernetzwerk in kurzer Zeit CaCO_3 /Polymer-Komposite bei milden Temperaturen hergestellt werden.

Diese ermöglichen eine bemerkenswerte Steigerung der Steifigkeit des polymeren Ausgangsmaterials, trotz ihres meist noch recht inhomogenen Aufbaus und der Anisotropie der verstärkenden Kristalle im Netzwerk. Zudem verschlechtern sich die mechanischen Eigenschaften der Komposite durch die Wasseraufnahme in feuchter Umgebung. Die Verringerung der mechanischen Eigenschaften synthetischer Komposite, die mit hydrophilen Polymeren hergestellt wurden, durch Kontakt mit Wasser ist ein generelles Problem dieser Materialklasse.^{116, 216} Zum Beispiel zeigen Gelatine/Alginat Hydrogele in die Hydroxylapatit-Partikel eingebracht wurden im trockenen Zustand einen E-Modul von 270 MPa, welcher sich jedoch auf 2 MPa im gequollenen Zustand verringert.¹¹⁶

Im Gegensatz zu synthetischen Hydrogelen ist die Natur in der Lage gequollene Materialien herzustellen, die trotz eines Wassergehalts von über 50 Gew% hoch-steif und zäh sind. Knorpel verfügt z.B. über einen E-Modul von 10 MPa²¹⁷ bei einer Zähigkeit von 1000 J/m²⁴⁷, während Haut diese Werte mit 100 MPa¹⁹ und 9000 J/m²⁴⁸ sogar noch übertrifft.

Wie in **Kapitel 2.1.2** beschrieben, konnten in den letzten Jahren einige Erfolge bei der Entwicklung synthetischer, zäher Hydrogele verbucht werden, die jedoch weiterhin nur geringe E-Module (kleiner 10 MPa) aufwiesen. Es wurde erwartet, dass die mechanischen Eigenschaften gequollener Hydrogele durch die homogene Bildung amorpher Nanopartikel im Inneren der Filme, aufgrund ihrer isotropen Eigenschaften, verbessert werden können. Da amorphes CaCO_3 bei der Calcifizierung im Netzwerk jedoch nicht stabil war und sich schnell in kristalline Nanostrukturen umwandelte, wurde untersucht, ob mit Hilfe des Prinzips der enzym-induzierten Calcifizierung andere Mineralien als stabile, amorphe Nanopartikel abgeschieden werden können.

Dafür bot sich in erster Linie Calciumphosphat (CaP) an, welches in der Natur z.B. als Strukturelement in Knochen und Zähnen in Form von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) vorkommt. Die mechanischen Eigenschaften, wie Härte, Zähigkeit und Steifigkeit, dieser Strukturelemente können zudem von Organismen über Ihren Aufbau für die beabsichtigte Anwendung angepasst werden.⁸ Mit Calciumphosphat modifizierte Hydrogele sind zudem von großem Interesse für die Forschung, da sie als biokompatibel gelten und in der Medizin als mögliche Gewebe, Knochen- sowie Zahnersatzmaterialien eingesetzt werden können.²¹⁸⁻²¹⁹

Calciumphosphat kommt in der Natur nicht in seiner reinen Form als Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) vor, da verschiedene Fremdionen (z.B. Chlorid, Hydroxid, Carbonat) in die sich bildenden Strukturen miteingebaut werden. Dadurch entstehen verschiedene Minerale (u.a. verschiedene Apatite) oder auch amorphe Strukturen deren Zusammensetzungen sehr unterschiedlich sein können.²²⁰ Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit die untersuchten Calciumphosphatstrukturen mit der Abkürzung CaP zusammengefasst.

Im den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der ersten, erfolgreichen, homogenen Calcifizierung eines Hydrogels unter Verwendung der AP-induzierten Mineralisation dargestellt.

4.2.1 Aktivität der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Hydrogelen

Eine Freisetzung von Phosphat kann über die Hydrolyse von Mono-Phosphorsäure-Ester, wie z.B. Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP), in wässriger Lösung erfolgen (**Abbildung 4.26**). Um diesen Vorgang zu beschleunigen, bietet sich der Einsatz der alkalischen Phosphatase (AP) an, die normalerweise bei der Bildung von Knochen die Spaltung von Organophosphaten katalysiert.²²¹ Nach der Abtrennung des Glycerins fällt Phosphat zusammen mit dem ebenfalls in der Lösung befindlichen Ca^{2+} als CaP aus.⁸⁰ Bis jetzt unternommene Anstrengungen nach diesem Prinzip AP in Hydrogelen zu immobilisieren, führten zwar zu einer signifikanten Calcifizierung der Netzwerkoberfläche, aber kaum zur Mineralisation im Inneren der Netzwerke.^{139, 222} Das steifste bekannte Hydrogel auf Basis von Gellan, das nach diesem Prinzip von DOUGLAS hergestellt wurde, erreichte nach der Calcifizierung einen E-Modul von 5 MPa.⁵⁷

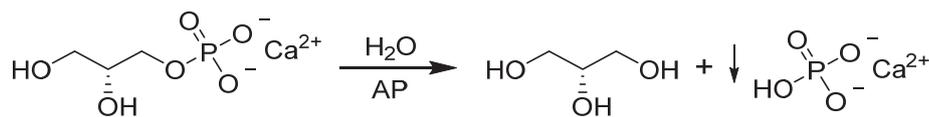


Abbildung 4.26 | Reaktionsgleichung der durch alkalische Phosphatase (AP) katalysierten Hydrolyse von Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) zu Glycerin und Phosphat, wobei letzteres zusammen mit Ca^{2+} ausfällt.

Die verwendete *bovine* AP (gewonnen aus dem Kälberdarm) ist ein homodimeres Metalloenzym, dessen Untereinheiten eine molekulare Masse von je ca. 80 kDa²²³ besitzen und verfügt über eine katalytische Triade bestehend aus zwei Zn^{2+} - und einem Mg^{2+} -Ion²²⁴. Die Aktivität des Enzyms ist sehr stark vom verwendeten Puffer und dem pH-Wert abhängig. Da das pH-Optimum der AP zwischen pH 9,8 und 10 liegt^{80, 225}, wurde ein 0,2 M Triethanolamin (TEA) - Puffer eingestellt auf pH 9,8 gewählt, der zum einen eine hohe Aktivität des Enzyms gewährleistet und zum anderen in Anwesenheit von Ca^{2+} stabil in Lösung bleibt.²²⁶ In diesem wurden die Löslichkeit und die Stabilität von CaGP über die Zeit untersucht (**Abbildung 4.27**). Dabei stellte sich heraus, dass bei RT und einer CaGP-Konzentration von bis zu 11 g/l (52 mM) die Lösung über eine Woche lang stabil bleibt. Bei höheren Konzentrationen war die Instabilität der Lösung durch eine deutliche Trübung schon nach

wenigen Tagen sichtbar. Die Stabilität der Lösung verbessert sich nicht, wenn statt Puffer bidestilliertes Wasser verwendet wird. Diese vermutlich durch die auch ohne Enzym langsam ablaufende Hydrolyse des CaGP verursachte Trübung tritt schneller auf, wenn die Temperatur erhöht wird. Bei 37°C sind nur Lösungen mit einer CaGP-Konzentration bis zu 6 g/l (29 mM) mindestens eine Woche lang stabil.

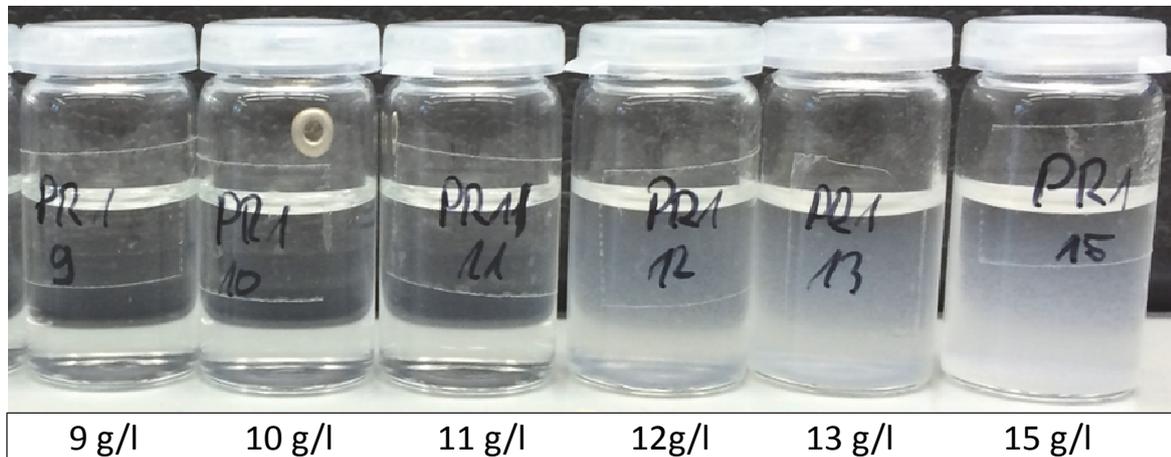


Abbildung 4.27 | Verschieden konzentrierte, wässrige Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) - Lösungen in einem 0,2 M Triethanolamin (TEA) - Puffer eingestellt auf pH 9,8 nach 7 d bei RT. Die Konzentration an CaGP in g/l ist unterhalb des jeweiligen Schnappdeckelglases angegeben.

Basierend auf den Netzwerken in denen erfolgreich Urease immobilisiert werden konnte, wurden drei Monomermischungen zur Immobilisierung der AP hergestellt: Poly-2-Hydroxyethylacrylat - *linked by*- Triethyleneglycoldimethacrylate (PHEA-*-*TEG, 1 Gew% TEG), Poly-N,N-Dimethylacrylamid -*-* TEG (PDMA-*-*TEG, 1 Gew% TEG) und Polyacrylamide -*-* N,N'-Methylenbisacrylamide (PAAm-*-*MBAm, 0,06 Gew% MBAm). Dabei zeigte sich, dass in der HEA-basierten Monomermischung maximal 0,4 Gew% AP gelöst werden können. Höhere Konzentrationen führen zur Eintrübung der Mischung. DMA und Acrylamid zeigen auch in Mischungen mit AP-Konzentrationen von bis zu 1 Gew% keine Trübung. Um die Netzwerke vergleichen zu können, wurden Mischungen mit 0,4 Gew% und 0,1 Gew% AP mittels UV-Licht zwischen zwei Objektträgern polymerisiert. Die so erhaltenen Polymerfilme sind alle vollständig transparent. Im Anschluss wurde überprüft, ob das Enzym die Prozedur aktiv überstanden hat.

Dazu wurde die Aktivität der immobilisierten AP in den Netzwerken bei Raumtemperatur (25°C) über die Verfolgung der Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat in TEA-Puffer bei pH 9,8 mittels UV-Vis-Spektroskopie bei 405 nm ermittelt (siehe **Kapitel 6.11**) und mit der freien AP in Lösung verglichen (**Abbildung 4.28**). Die freie AP weist eine spezifische Aktivität von $23,6 \pm 4,7$ U/mg auf. Die Netzwerke mit 0,4 Gew% AP zeigen im Vergleich dazu eine verminderte Aktivität. Das PAAm-*-*MBAm Netzwerk weist mit $9,0 \pm 0,4$ U/mg die höchste verbliebene Aktivität auf, während die Enzymaktivität im PHEA-*-*TEG Film am stärksten abfällt ($2,1 \pm 0,05$ U/mg). Die ermittelten

Enzymaktivitäten können mit dem Quellgrad der Netzwerke $S(\text{PAAm-}l\text{-MBAm}) \approx 8$, $S(\text{PDMA-}l\text{-TEG}) \approx 6$ und $S(\text{PHEA-}l\text{-TEG}) \approx 4$ korreliert werden. Eine größere Quellung resultiert in einem Anstieg des freien Volumens innerhalb der Netzwerke und beschleunigt die Diffusion.²²⁷ Dieses Verhalten würde auf eine Diffusionslimitierung der Enzymreaktion hindeuten. Um dies weiter zu untersuchen, wurden auch die spezifische Aktivität der Netzwerke mit 0,1 Gew% AP gemessen. Durch die verringerte Enzymkonzentration nimmt zwar die absolute Reaktionsgeschwindigkeit ab, jedoch wird die spezifische Aktivität der AP um den Faktor 2 bis 3 gesteigert und erreicht somit 48% der Aktivität des freien Enzyms im PDMA-*l*-TEG Film sowie 73% im PAAm-*l*-MBAm Netzwerk. Dieses Verhalten kann nur durch eine Transportlimitierung der Reaktion im Netzwerk erklärt werden.

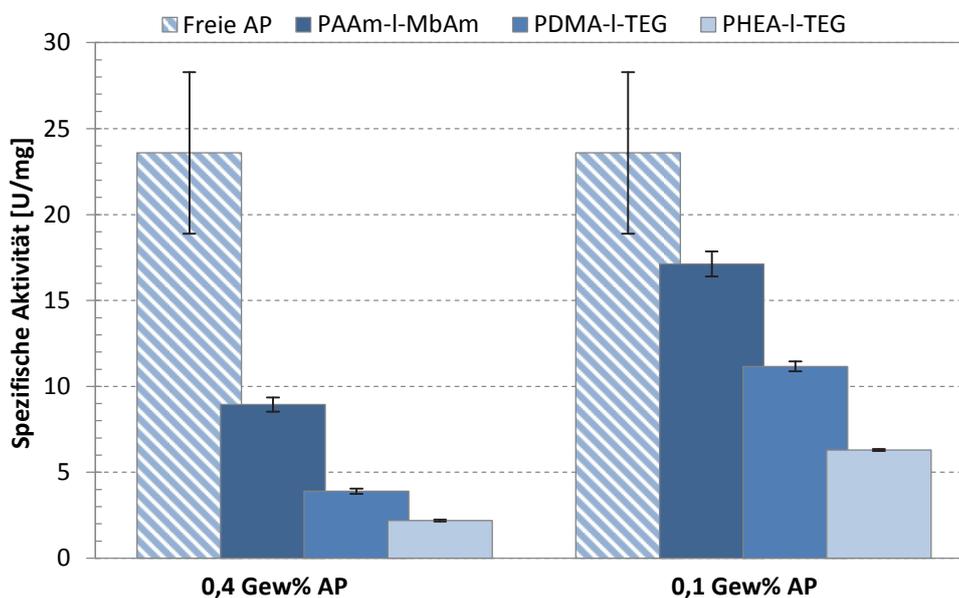


Abbildung 4.28 | Spezifische Aktivität der in unterschiedlichen Hydrogelen immobilisierten, alkalischen Phosphatase (AP) verglichen mit dem freien Enzym in Lösung. Die Messungen wurden mit einer wässrigen 0,125 M *p*-Nitrophenylphosphat-Lösung in 0,2 M Triethanolamin-Puffer (eingestellt auf pH 9,8) durchgeführt und die Änderung der Extinktion bei 405 nm über die Zeit mittels UV-Vis-Spektroskopie untersucht.²²⁸

Obwohl die Netzwerke mit 0,1 Gew% immobilisierter AP eine höhere spezifische Aktivität aufweisen, wurden 0,4 Gew% für die weiteren Experimente verwendet, da mit 0,4 Gew% AP eine deutlich schnellere Calcifizierung im Netzwerkinneren (42 Gew% nach 7 h) als mit 0,1 Gew% AP (22 Gew% nach 7 h) erreicht werden kann.

Da sich das Aktivitätsmaximum der verwendeten AP bei etwa 45 °C²²⁹ befindet, wurde untersucht, ob sich die Aktivität des immobilisierten Enzyms im Inneren der Netzwerke durch eine Temperaturerhöhung während der Reaktion weiter steigern lässt. Dazu wurde der Assay mit einem PDMA-*l*-TEG Netzwerk, das mit 0,4 Gew. AP beladenen war, bei 37 °C wiederholt. Wie in **Abbildung 4.29** zu erkennen ist, nimmt die spezifische Aktivität des freien Enzyms in Lösung durch die Temperaturerhöhung, wie zu erwarten war, von $23,6 \pm 4,7$ U/mg auf $39,7 \pm 2,9$ U/mg zu. Ein ähnlicher Anstieg ist allerdings nicht bei der immobilisierten AP im Netzwerk zu beobachten. Hier

sinkt die Aktivität sogar leicht von $3,9 \pm 0,1$ U/mg auf $3,7 \pm 0,1$ U/mg. Dieses Verhalten bestätigt erneut, dass die Reaktion durch die Diffusion des Substrats im Netzwerk und nicht durch die Geschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktion selbst bestimmt wird. Da die Diffusion im Hydrogel durch die Temperaturerhöhung jedoch nicht nennenswert zunimmt, ändert sich auch die Aktivität des Enzyms nicht. Es ist daher anzunehmen, dass eine Temperaturerhöhung wahrscheinlich nicht zur Beschleunigung der Calcifizierung führt.

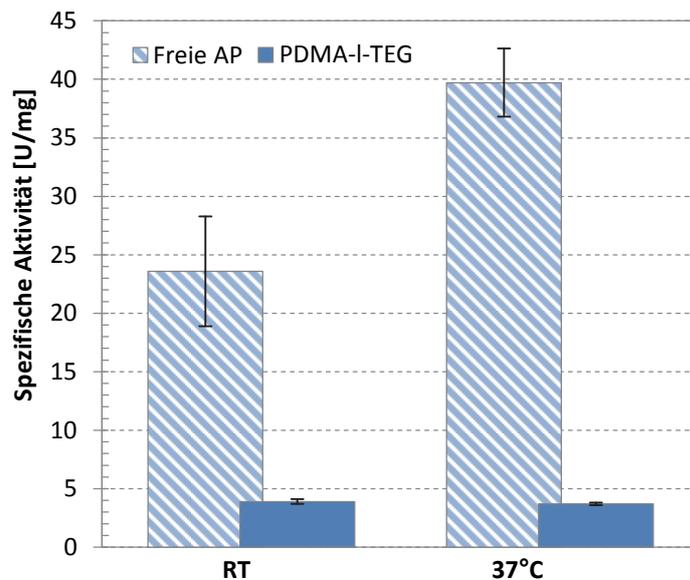


Abbildung 4.29 | Spezifische Aktivität der freien alkalischen Phosphatase (AP) sowie der in einem PDMA-I-TEG Netzwerk immobilisierten AP (0,4 Gew%) bei Raumtemperatur (RT, 25°C) und 37°C. Die Messungen wurden in einer wässrigen 0,125 M *p*-Nitrophenylphosphat-Lösung in 0,2 M Triethanolamin-Puffer (eingestellt auf pH 9,8) durchgeführt und die Änderung der Extinktion bei 405 nm über die Zeit mittels UV-Vis-Spektroskopie untersucht.²²⁸

4.2.2 Calcifizierung der bioaktiven Hydrogele mit Calciumphosphat

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die AP eine Immobilisation in den Netzwerken übersteht, sollte im nächsten Schritt versucht werden, die drei mit 0,4 Gew% AP beladenen PAAm-I-MBAm, PDMA-I-TEG und PHEA-I-TEG Netzwerke im Bulk zu mineralisieren. Dazu wurden die drei Hydrogele jeweils mit und ohne immobilisierter AP bei Raumtemperatur (RT) in je 200 ml einer Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) - Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (eingestellt auf pH 9,8) gegeben (**Abbildung 4.30**, 100 mg Polymer auf 200 ml Calcifizierungslösung).

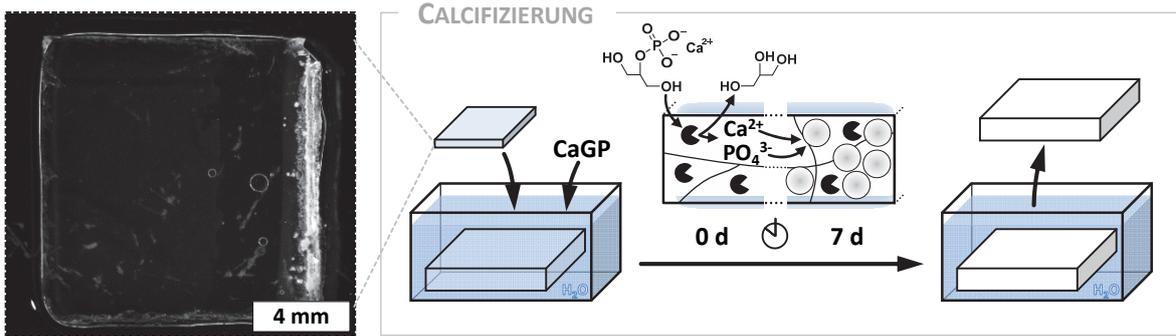


Abbildung 4.30 | (a) Schematische Darstellung des Calcifizierungs-Prozesses von mit alkalischer Phosphatase beladenen Netzwerken in einer Calcium-2-Glycerolphosphat-Lösung.²²⁸

Nach wenigen Minuten in der Lösung konnte bei den enzymbeladenen PAAM-/MBAm und PDMA-/TEG Netzwerken eine erste Trübung beobachtet werden. Diese intensivierte sich mit zunehmender Verweilzeit der Filme in der Mineralisierungslösung, sodass nach 1 h auch der AP beladene PHEA-/TEG Film eingetrübt war, während Netzwerke ohne immobilisiertes Enzym unverändert klar blieben. Wie in **Abbildung 4.31a** am Beispiel des PDMA-/TEG Netzwerks zu erkennen ist, erfolgt die Eintrübung homogen, was auch am Querschnitt der Filme bestätigt wird. Die REM-Aufnahmen der getrockneten Netzwerk-Querschnitte (**Abbildung 4.31b**) zeigen die Entwicklung der CaP-Strukturen im Inneren der Filme in den ersten 360 Minuten der Calcifizierung. Bei der beginnenden Eintrübung der Hydrogele (30 min) sind im Inneren bereits partikulär erscheinende Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 150 nm zu erkennen, die aus kleineren Untereinheiten bestehen. Im weiteren Verlauf wachsen diese innerhalb der nächsten Stunde auf eine Größe von etwa 300 nm an. Des Weiteren nimmt ihre Anzahl zu, wodurch der Film optisch immer stärker eintrübt, bis er nach 6 h undurchsichtig ist (**Abbildung 4.31c**). Die Zusammensetzung der im Querschnitt der Hydrogele gefundenen Strukturen wurden mittels EDX untersucht. Dabei konnte immer sowohl Calcium, Phosphor als auch Sauerstoff nachgewiesen werden, weshalb es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Strukturen aus CaP handelt (**Abbildungen 4.36c, 4.37c und 4.38c**).

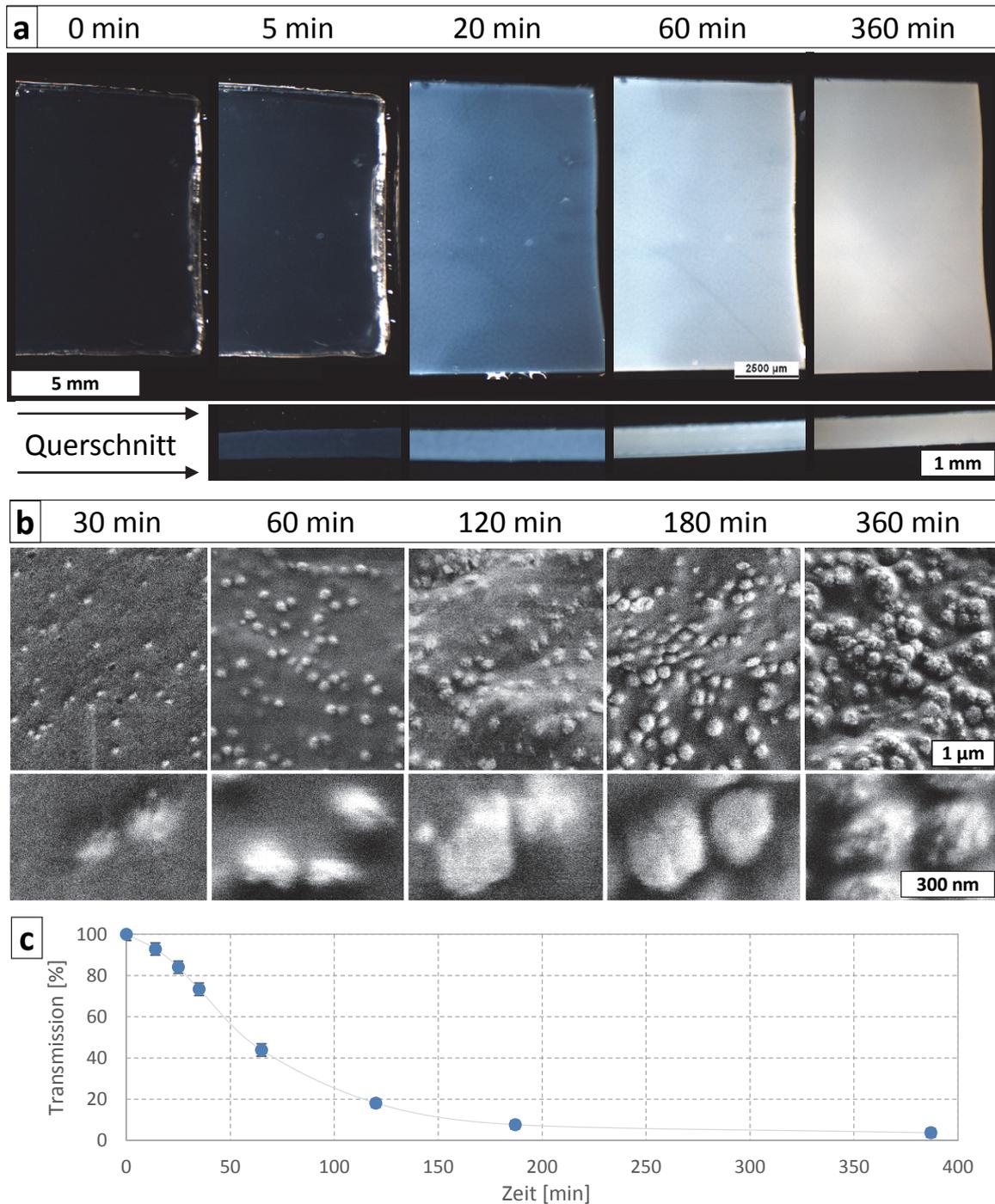


Abbildung 4.31 - PDMA-I-TEG Netzwerk beladen mit 0,4 Gew% AP, eingelegt in eine CaGP-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (0,2 M) eingestellt auf einen pH-Wert von 9,8 bei RT: (a) Stereomikroskop-Aufnahmen des Films in der Draufsicht und des Querschnittes des Netzwerks im gequollenen Zustand nach verschiedenen Zeiten in der Calcifizierungslösung. (b) REM-Aufnahmen des Querschnitts der für unterschiedliche Zeiten calcifizierte Proben im getrockneten Zustand. (c) Änderung der Transmission bei 700 nm über die Zeit durch die Eintrübung der Filme während der Calcifizierung.²²⁸

Die Netzwerke wurden für insgesamt 7 Tage in der Lösung belassen. Nach ca. 24 h waren alle Lösungen jedoch trüb und zudem war ein weißer Niederschlag am Gefäßboden erkennbar (**Abbildung 4.32**), der mit fortschreitender Calcifizierungszeit zunahm. Da die AP mit 140 000 bis 160 000 g/mol²²³ deutlich kleiner ist als die in den vorherigen Arbeiten¹⁹⁷ verwendete Urease mit 560 000 g/mol¹⁹⁵, kann diese in den Netzwerken schlechter immobilisiert werden. Das Resultat ist

ein Herausdiffundieren der AP aus dem Netzwerk in die Calcifizierungslösung und ein dortiges Ausfallen des CaP. Dies mindert die Effizienz der Calcifizierung innerhalb der Filme. Die Diffusion des Enzyms im Netzwerk kann durch die Erhöhung der Vernetzermenge und damit der Maschenweite im Netzwerk (siehe **Kapitel 2.1.3**) verringert werden (**Abbildung 4.32**, obere Reihe), allerdings verschwindet die Trübung dadurch nicht vollständig. Zudem nimmt der Calcifizierungsgrad der Hydrogele dadurch stark ab. Alternativ wurde zur AP enthaltenden Monomermischung vor der Polymerisation eine wässrige Polyglutaraldehyd-Lösung (PGL) zugegeben, um die Größe der Enzyme durch Bildung von Aggregaten zu steigern. Wie in **Abbildung 4.32** (untere Reihe) zu erkennen ist, zeigten die so hergestellten transparenten Netzwerke eine sehr gute Enzymretention, so dass die Lösungen bis zum Ende der Calcifizierung nach 7 d klar bleiben. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde fortwährend zu allen AP enthaltenden Monomermischungen PGL zugegeben. Die bessere Enzymrückhaltung steigert zudem den Mineralisierungsgrad der Netzwerke deutlich. Zum Beispiel weisen die PDMA-/TEG Netzwerke (1 Gew% TEG) ohne PGL nach 7 d einen CaP-Anteil von 55 Gew% auf, während dieser durch die Zugabe von PGL auf 72 Gew% gesteigert wird. Dies entspricht etwa einer Verdopplung der CaP-Masse im Filminneren.



Abbildung 4.32 | Die Bilder zeigen je eine 100 ml Schraubdeckelflasche, die mit einer Calcium-2-glycerolphosphat-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (0,2 M) eingestellt auf einen pH-Wert von 9,8. In jede Lösung wurde 24 h zuvor ein PDMA-I-TEG Netzwerk mit unterschiedlichem Vernetzergehalt (TEG: 1, 3, 5, 7, 10 Gew%) und 0,4 Gew% AP gegeben. Zu den in der unteren Reihe abgebildeten Filmen wurde bei der Herstellung noch Polyglutaraldehyd-Lösung zugegeben.²²⁸

Die Verläufe der Calcifizierung der drei mit PGL optimierten Netzwerke mit 0,4 Gew% immobilisierter AP über 7 Tage sind in **Abbildung 4.33** dargestellt. Dazu wurden Proben nach unterschiedlichen Zeiten aus den Calcifizierungslösungen entnommen. Nach dem Spülen mit Wasser wurden die Komposite unter reduziertem Druck getrocknet und ihr anorganischer Anteil mit Hilfe eines Thermogravimetrischen-Analysators (TGA) ermittelt. Wie im Diagramm zu erkennen ist, weisen die PAAm-/MBAm und PDMA-/TEG Netzwerke den schnellsten Anstieg des anorganischen Anteils von über 40 Gew% nach 7 h und einen maximalen Anteil von etwa 70 Gew% nach 4-5 Tagen auf. Im Vergleich dazu ist der Calcifizierungsgrad der PHEA-/TEG Netzwerke mit 8 Gew% nach 7 d gering.

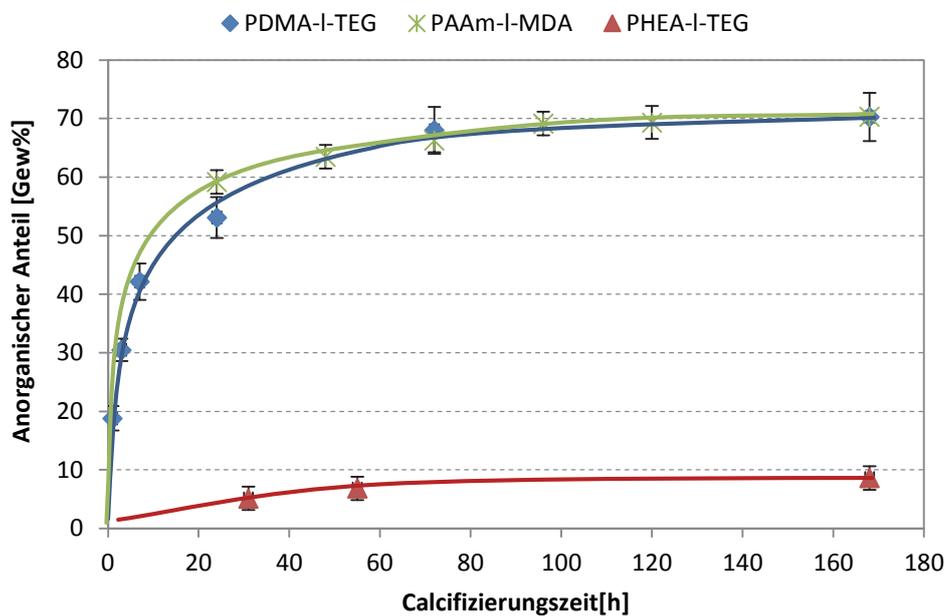


Abbildung 4.33 | Änderung des anorganischen Gewichtanteils während der Calcifizierung von PHEA-I-TEG (rot), PDMA-I-TEG (blau) und PAAm-I-MBAm Netzwerken (grün) mit jeweils 0,4 Gew% immobilisierter AP in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT. Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs.²²⁸

Um den Effekt der Temperatur auf die Calcifizierungsgrade im Film zu untersuchen, wurden die PGL-modifizierten Netzwerke auch bei 37°C mineralisiert. Aufgrund der Vorversuche mit p-Nitrophenylphosphat war wegen der dabei festgestellten Diffusionslimitierung keine Steigerung der Calcifizierung zu erwarten. Zudem musste, wie zuvor beschrieben, die CaGP-Konzentration in der Calcifizierungslösung auf 6 g/l gesenkt werden, da ansonsten bereits ohne Anwesenheit des Enzyms nach kurzer Zeit eine Trübung einsetzt. Interessanterweise resultiert die Calcifizierung bei 37°C in einer deutlichen Verringerung der Calcifizierungsgrade nach 7 d (54 Gew%, CPV 1,2) im Vergleich zur Calcifizierung bei RT (70 Gew%, CPV 2,3), was einer Verringerung des CaP-Anteils um fast 50% entspricht (**Abbildung 4.34**). Wie erwartet konnte zudem kein nennenswerter Unterschied bei der Anfangsgeschwindigkeit der Calcifizierung festgestellt werden. Aufgrund der deutlich

verringerten Effektivität der Calcifizierung bei 37°C, wurden die weiteren Versuche bei RT in der Calcifizierungslösung mit 11 g/l CaGP durchgeführt.

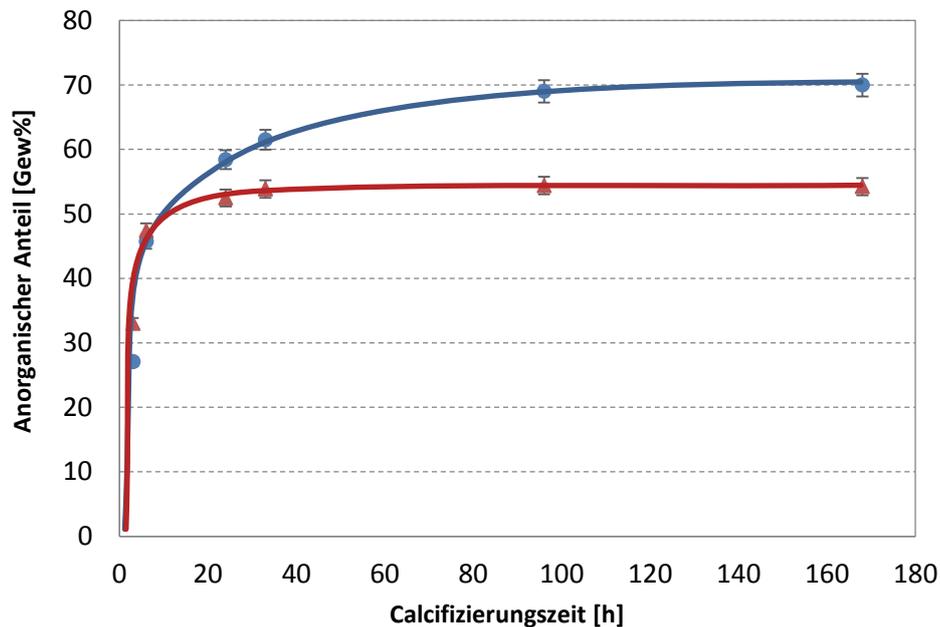


Abbildung 4.34 | Änderung des anorganischen Gewichtanteils während der Calcifizierung bei RT (blau) und 37°C (rot) von mit 0,4 Gew% AP beladenen PDMA-I-TEG Netzwerken, calcifiziert in einer CaGP-Lösung (6 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs.²²⁸

Die für 7 d bei RT calcifizierten Netzwerke sind in **Abbildung 4.35** dargestellt. Mittels optischer und rasterelektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass die Calcifizierung sich nur auf das Innere der Netzwerke beschränkt, da auch oberflächlich keine anhaftenden Kristalle erkennbar sind.

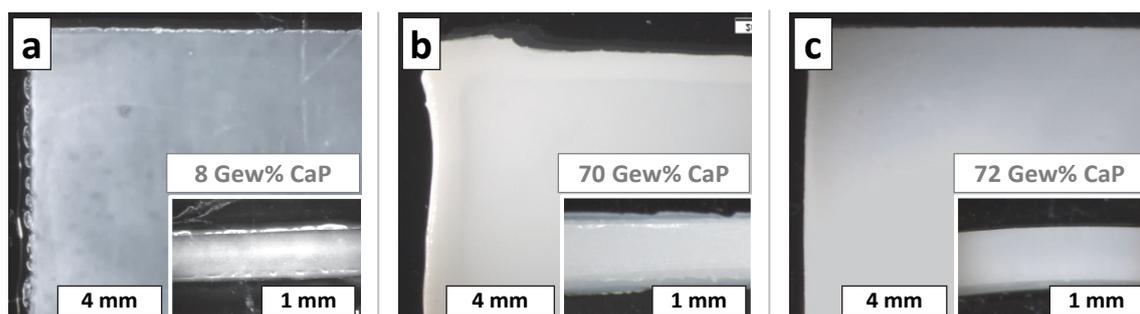


Abbildung 4.35 | Die Stereomikroskop-Aufnahmen zeigen jeweils die Draufsicht und den Querschnitt der (a) PHEA-I-TEG, (b) PDMA-I-TEG und (c) PAAm-I-MBAm Netzwerke mit 0,4 Gew% AP nach 7 d Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) sowie die zugehörigen CaP-Gewichtsanteile.

Die PHEA-I-TEG Filme machen nach der Calcifizierung äußerlich einen homogen trüben Eindruck, sind allerdings immer noch deutlich durchscheinend. Der Querschnitt zeigt, dass sich die Eintrübung hauptsächlich auf das Zentrum des Films konzentriert (**Abbildung 4.35a**). REM-Aufnahmen des Querschnitts enthüllen, dass sphärenartige Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 600 nm für die Trübung verantwortlich sind (**Abbildung 3.36a und b**). Die Strukturen scheinen aus kleineren

Untereinheiten mit einem Durchmesser von etwa 30 nm aufgebaut zu sein. Der geringe anorganische Anteil von 8 Gew% ist vermutlich das Resultat der stark verminderten Aktivität der AP im HEA-Netzwerk. Des Weiteren wurde versucht die Kristallstruktur der Sphären mittels Elektronenbeugung (TED) im TEM zu bestimmen. Im dabei erhaltenen Diffraktogramm (**Abbildung 4.36d**) ist jedoch nur ein breiter, diffuser Ring zu erkennen, was auf einen amorphen Aufbau der Sphären hindeutet. Die EDX-Analyse (**Abbildung 3.36c**) zeigt die elementare Zusammensetzung der Sphären, die aus Calcium, Phosphor und Sauerstoff bestehen.

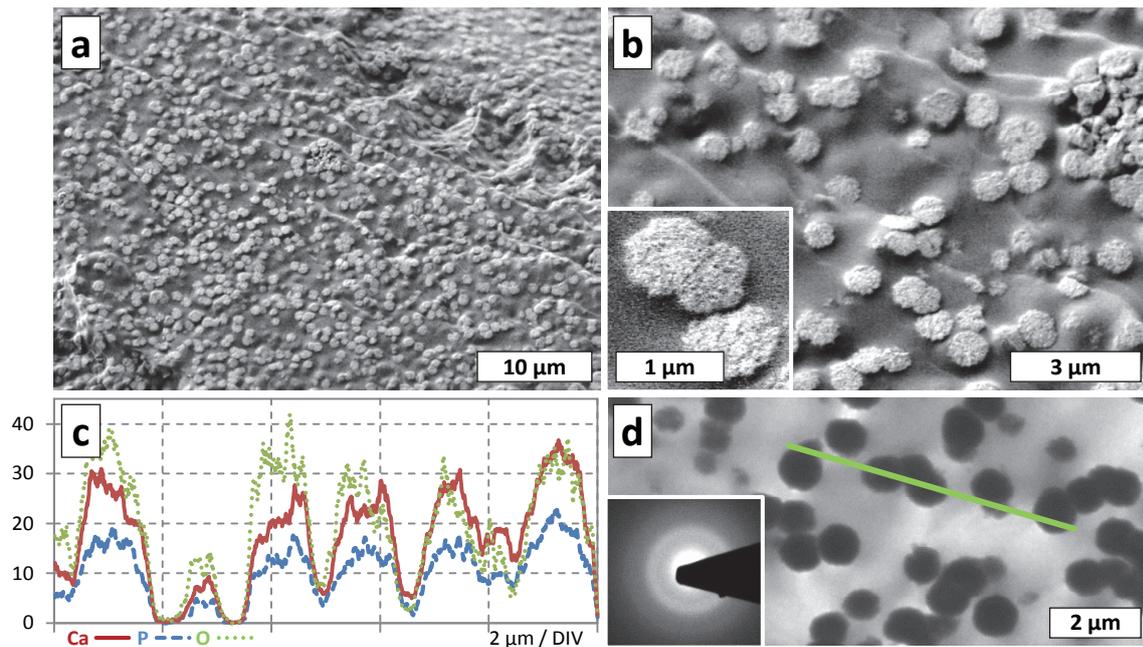


Abbildung 4.36 | PHEA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen. (c) Der TEM-EDX-Line-Scan des Querschnitts illustriert die relative Elementverteilung (Bereich der EDX-Messung in (d) angedeutet durch die grüne Linie). (d) TEM-Bild eines Dünnschnitts des Kompositquerschnitts (80 nm Dicke) sowie die zugehörige TED-Aufnahme.²²⁸

Die Calcifizierung der PAAm-I-MBAm Netzwerke hingegen führt nach 7 d zu einem weißen Film (**Abbildung 4.35b**). Im Querschnitt zeigt sich, dass der Film nicht nur im Zentrum, sondern homogen mineralisiert ist. Dafür verantwortlich ist der deutlich höhere Mineralisierungsgrad von 70 Gew%, der vermutlich auf die gesteigerte Aktivität der AP im PAAm-I-MBAm Netzwerk zurückzuführen ist. Die REM-Aufnahmen des Querschnitts weisen keine sphärischen Aggregate, sondern gerüstartige Strukturen mit etwa 400 nm großen Löchern auf (**Abbildung 4.37a und b**). Auch diese scheinen sich bei genauerer Betrachtung aus noch feineren Strukturen zusammensetzen, die laut den Ergebnissen der Elektronenbeugung im TEM (**Abbildung 4.37a**) ebenfalls amorph sind. Punktuelle EDX-Messungen (**Abbildung 4.37c**) bestätigen, dass die Strukturen aus Calcium, Phosphor und Sauerstoff in einem atomaren Verhältnis von 3:2:8 bestehen. Diese Zusammensetzung passt vom

Verhältnis zu Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), was der erwarteten Struktur entspricht, die sich bei der Ausfällung von Ca^{2+} und Phosphat aus der verwendeten CaGP-Lösung ergibt.

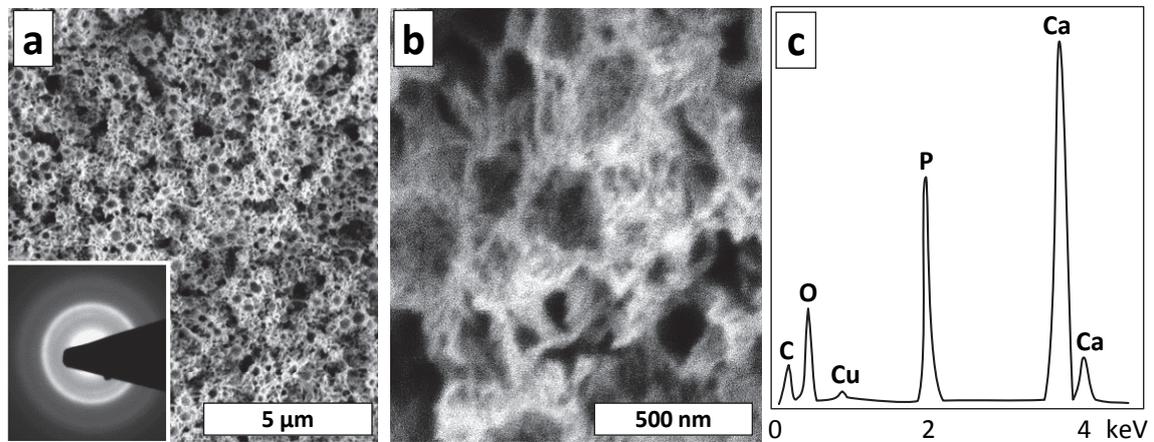


Abbildung 4.37 | PAAm-I-MBAm Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen und zusätzlich die zugehörige Elektronenbeugungs-Aufnahme (TED) eines Dünnschnitts (80 nm Dicke). (c) TEM-EDX-Aufnahme des Komposits aufgenommen auf einem Kupfergitter.²²⁸

Die calcifizierten Netzwerke auf Basis von PDMA-I-TEG weisen sehr große Ähnlichkeiten mit den PAAm-I-MBAm Filmen in Bezug auf Aussehen, Trübung und Mineralisierungsgrad (72 Gew% nach 7 Tagen) auf (**Abbildung 4.35c**). Unterschiede zeigen sich jedoch auf den REM-Aufnahmen der Querschnitte, wie in den **Abbildungen 4.38a und b** ersichtlich ist. Dort finden sich, ähnlich wie in den PHEA-I-TEG Filmen, sphärische Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 600 nm wieder, die aufgrund des hohen Mineralisierungsgrades jedoch deutlich dichter gepackt sind. In **Abbildung 4.38d** ist eine TEM-Aufnahme der PDMA-I-TEG Komposite zu erkennen, in denen die ebenfalls abgebildete TED-Messung der Strukturen durchgeführt wurde. Letztere zeigt wiederum keine scharf begrenzten Ringe, sodass anzunehmen ist, dass die Strukturen aus amorphem CaP bestehen. Die EDX-Messungen in **Abbildung 4.38c** zeigen, dass auch in diesem Fall die anorganischen Strukturen aus Calcium, Phosphor und Sauerstoff aufgebaut sind. Das Verhältnis der Elemente unterscheidet sich jedoch mit 3:4:12 von den PAAm-I-MBAm Kompositen und entspricht nicht dem von Tricalciumphosphat, da sowohl der Calcium- als auch der Sauerstoff-Anteil zu gering sind. Es ist denkbar, dass die EDX-Messungen im TEM je nach Probe einen gewissen Fehler bei der Elementbestimmung aufweisen und es daher zu Abweichungen der Elementverhältnisse kommen kann. Eine Theorie die ermittelten Verhältnisse zu erklären bieten die in der Literatur bekannten, sogenannten „calcium deficient“ Hydroxylapatite, die geringere Calcium-zu-Phosphor-Verhältnisse durch den Einbau von Hydrogenphosphaten aufweisen. Eventuell können daher auch amorphe Strukturen mit einem geringeren Calcium-Anteil durch den Einbau von Hydrogenphosphaten entstehen.²²⁰ Dies erklärt allerdings nicht das für Phosphat zu geringen Sauerstoff-zu-Phosphor-Verhältnis. Die EDX-Messungen könnten daher auch drauf hindeuten, dass sich eventuell andere

Phosphorspezies, wie Calciumphosphonat (CaPO_3) oder Calcium-Oligophosphate (z.B. Calciumtetraphosphat ($\text{Ca}_3\text{P}_4\text{O}_{13}$)), während der Calcifizierung gebildet haben. Da die genaue Zusammensetzung der amorphen Strukturen für die Zielsetzung dieser Arbeit nicht von Interesse war, wurden diese nicht weiter charakterisiert.

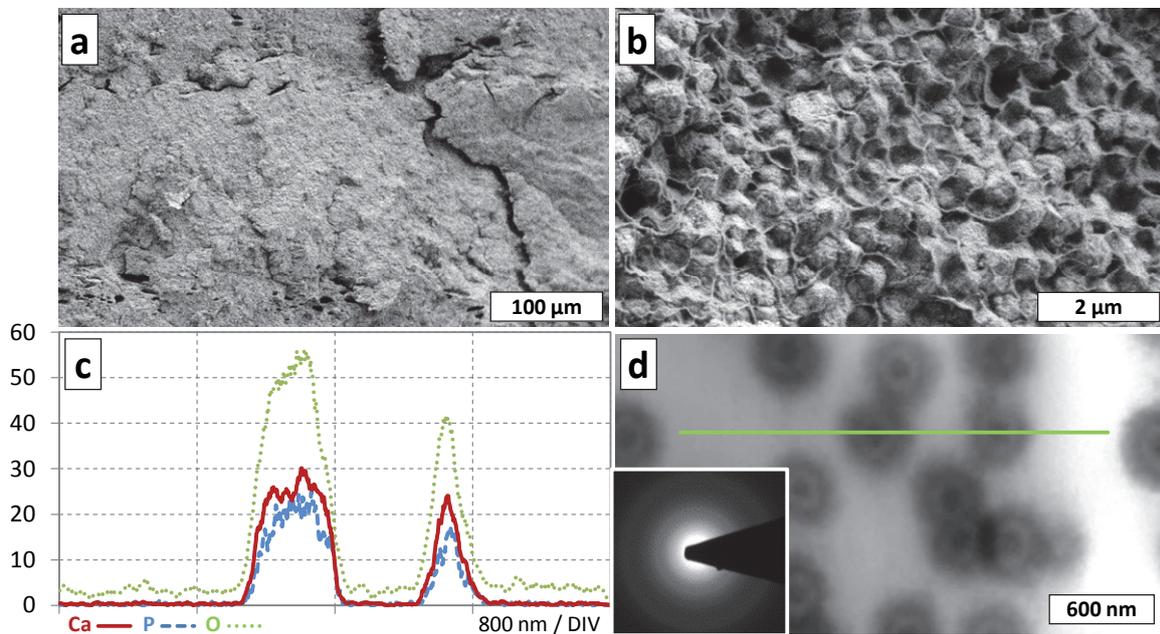


Abbildung 4.38 | PDMA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen. (c) TEM-EDX-Line-Scan des Querschnitts illustriert die relative Elementverteilung (Bereich der EDX-Messung in (d) angedeutet durch die grüne Linie). (d) TEM-Bild eines Dünnschnitts des Kompositquerschnitts (80 nm Dicke) sowie die zugehörigen TED-Aufnahme.²²⁸

Wie bereits bei den vorherigen Kompositen erwähnt, scheint es auch hier als wären die sphärischen Strukturen aus kleineren Untereinheiten mit einem Durchmesser kleiner 30 nm aufgebaut (**Abbildung 4.39a**). Mit Hilfe von Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) wurde versucht die Größe und die Verteilung der Untereinheiten zu bestimmen. Die Ergebnisse in **Abbildung 4.39 c und d** für einen calcifizierten PDMA-I-TEG Komposit zeigen in allen Fällen eine kontinuierlich abnehmende Intensität der gestreuten Strahlung mit zunehmendem Streuvektor (q). Das Fehlen von Peaks im Verlauf deutet darauf hin, dass die Untereinheiten ungeordnet vorliegen und über eine breite Größenverteilung verfügen. Dies erlaubt keine Bestimmung der Größe oder des Abstands der Nanostrukturen im Messbereich des verwendeten Geräts von 1 bis 125 nm. Da keine partikulären Strukturen nachgewiesen werden konnten, ist davon auszugehen, dass es sich eher um gerüstartige, amorphe Strukturen handelt, die sich möglicherweise spontan durch Ausfällung aus einem metastabilen, übersättigten Zustand bilden. Zudem wird vermutet, dass sich diese in den Maschen des Netzwerks bilden, da ihre Größe im Bereich der theoretischen, mittleren Maschenweite der PDMA-I-TEG Hydrogele von etwa 20 nm liegt (siehe **Gleichung 2.3**). Um den Einfluss der Maschenweite auf die CaP-Strukturen zu untersuchen, wurden PDMA-I-TEG Hydrogele

mit unterschiedlicher Maschenweite durch Einbau von 1 und 10 Gew% des Vernetzers TEG hergestellt und für 7 d bei RT calcifiziert. Der Theorie entsprechend müsste das Netzwerk durch den höheren Vernetzeranteil eine geringere mittlere Maschenweite von 7 nm aufweisen, was auch die Bildung kleinerer Strukturen zur Folge hätte. **Abbildung 4.39** stellt die gefundenen Strukturen im Querschnitt der beiden calcifizierten Hydrogele gegenüber. Darauf ist zu erkennen, dass der höhere Vernetzeranteil in der Tat kleinere sphärische Strukturen zur Folge hat (**Abbildung 4.39b**), deren kleinste Einheiten mit bis zu 15 nm ebenfalls deutlich feiner, als im niedriger vernetzten Hydrogel, ausfallen. Gleichzeitig sinkt mit einem höheren Vernetzungsgrad jedoch auch der Calcifizierungsgrad der Komposite von 72 Gew% (1 Gew% TEG) auf 52 Gew% (10 Gew% TEG), wahrscheinlich verursacht durch die geringe Quellung und das damit verbundene abnehmende, freie Volumen im Netzwerk.

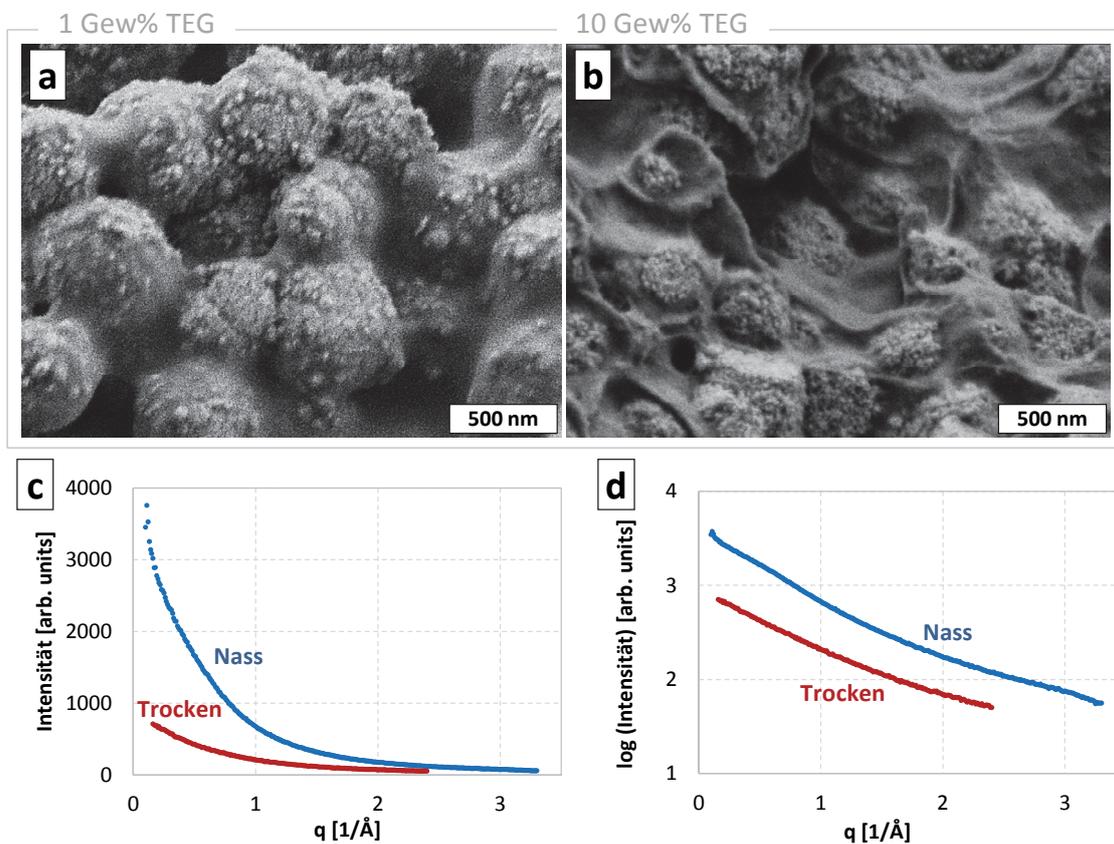


Abbildung 4.39 | REM-Aufnahmen der Querschnitte von PDMA-I-TEG Netzwerken mit (a) 1 Gew% und (b) 10 Gew% Vernetzer (TEG) und 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d bei RT. Die Diagramme (c) und (d) zeigen die Ergebnisse der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) eines 7 d calcifizierten PDMA-I-TEG Netzwerks. Dabei ist die Intensität der gestreuten Röntgenstrahlung in (c) bzw. dessen Logarithmus in (d) des nassen (blau) bzw. des getrockneten Komposits (rot) über den zugehörigen Streuvektor (q) aufgetragen.²²⁸

Unklar bis hierhin bleibt jedoch, wieso sich überhaupt unterschiedliche CaP-Strukturen innerhalb der verschiedenen Netzwerktypen bilden. Es wurde vermutet, dass die Verteilung der immobilisierten AP im Hydrogel sowohl für die Aktivität als auch für die Art der gebildeten

Strukturen eine wichtige Rolle spielt. Um dies zu belegen, wurde versucht nach der Herstellung der Netzwerke das darin immobilisierte Enzym mit Hilfe einer Silber-Staining-Methode²³⁰ (**Kapitel 6.10**) anzufärben. Dieses normalerweise zum Anfärben von Gelen bei der Gelelektrophorese verwendete Verfahren ermöglicht es, die Proteinverteilung im Netzwerk genauer nachzuvollziehen. Durch das Quellen der Netzwerke mit immobilisiertem Enzym in einer Silbernitratlösung akkumulieren die Ag^+ -Ionen in den argyrophilen Bereichen im Netzwerk. Dies sind insbesondere negativ geladenen Gruppen der Proteine. In einem folgenden Reduktionsschritt werden die Silber-Ionen mit Hilfe von Formaldehyd reduziert, wodurch elementares Silber an den immobilisierten Enzymen im Netzwerk entsteht. **Abbildung 4.40a bis c** zeigt die TEM-Aufnahmen der Mikrotom-Schnitte der drei angefärbten PHEA-/TEG, PDMA-/TEG und PAAm-/MBAm Hydrogele mit 0,4 Gew% eingeschlossener AP. Darauf ist zu erkennen, dass die Dispergierung des Proteins im Hydrogel stark vom jeweiligen Netzwerk abzuhängen scheint. Im PHEA-/TEG Netzwerk zeigen sich große Silberpartikelagglomerate, was auf eine Aggregation der AP schließen lässt (**Abbildung 4.40a**). Die dadurch verursachte, schlechtere Zugänglichkeit des zusammengeballten Enzyms für das Substrat würde die zuvor gemessene geringe spezifische Aktivität der AP im HEA-basierten Netzwerk erklären. Die Verkapselung dieser Zentren mit CaP während der Calcifizierung führt wahrscheinlich zu einer weiteren, massiven Verringerung der Zugänglichkeit der AP und damit der Enzymaktivität, weshalb nur vergleichsweise wenige CaP-Sphären entstehen können (**Abbildung 4.40d**). Innerhalb der PDMA-/TEG Netzwerke liegt das Enzym bereits deutlich feiner verteilt vor (**Abbildung 4.40b**), woraus wahrscheinlich die höhere spezifische Aktivität des Enzyms resultiert. Durch die steigende Zahl katalytischer Zentren wächst ebenfalls die Anzahl an gebildeten CaP-Sphären während der Mineralisation (**Abbildung 4.40e**). Eine noch feinere Enzymverteilung zeigen die PAAm-/MBAm Filme (**Abbildung 4.40c**), wodurch diese Netzwerke auch die höchste gemessene, spezifische Enzymaktivität aufweisen. Da gezeigt werden konnte, dass die Geschwindigkeit der Calcifizierung durch die Diffusion begrenzt wird, muss eine weitere Steigerung der Zahl an katalytisch aktiven Zentren unweigerlich zur Bildung einer steigenden Anzahl kleinerer Strukturen führen (**Abbildung 4.40f**). Diese können sich vermutlich nicht mehr zu größeren Partikeln zusammenlagern, wodurch es zur Bildung der gerüstartigen CaP-Strukturen kommt, welche die Enzymverteilung im Netzwerk abzubilden scheinen.

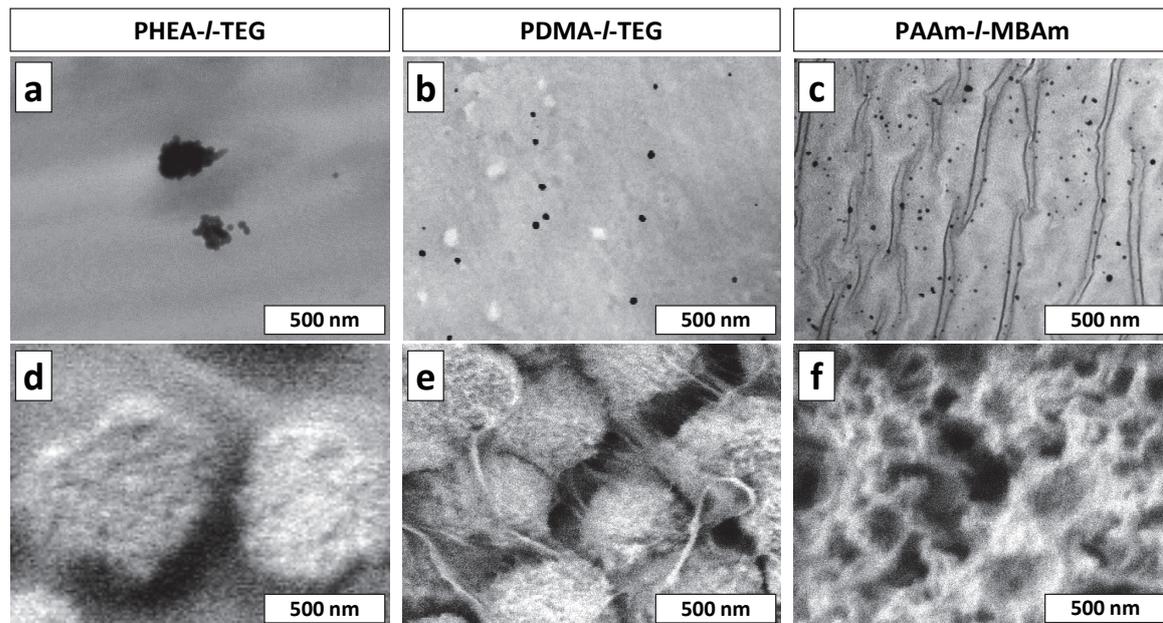


Abbildung 4.40 | TEM-Aufnahmen von Mikrotom-Dünnschnitten der (a) PHEA-*I*-TEG (70 nm Dicke), (b) PDMA-*I*-TEG (70 nm Dicke) und (c) PAAm-*I*-MBAm (110 nm Dicke) Filme mit 0,4 Gew% immobilisierter AP nach dem Anfärben mittels Silbernitrat-Staining. Die darunterliegenden REM-Aufnahmen (d-f) zeigen die Querschnitte der mineralisierten (d) PHEA-*I*-TEG, (e) PDMA-*I*-TEG und (f) PAAm-*I*-MBAm Hydrogele nach der Calcifizierung in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7d bei RT.²²⁸

Die Ergebnisse zur AP-Verteilung im Netzwerk lassen darauf schließen, dass CaP-Strukturen um die Enzyme herum entstehen, da an den katalytischen Zentren die Übersättigung der Lösung an CaP am höchsten ist. Die Änderung der Verteilung des Enzyms im Netzwerk über dessen Löslichkeit in der Monomermischung vor der Polymerisation stellt eine Möglichkeit dar, die bei der Calcifizierung gebildeten CaP-Strukturen zu steuern.

4.2.3 Hydrogele mit EDPOA als Additiv

Es ist bekannt, dass die Mineralisation von CaP in Lösung durch die Einführung ionischer funktioneller Gruppen beeinflusst werden kann¹², da diese aufgrund von Coulomb-Kräften mit den CaP-Oberflächen wechselwirken und es so zu einer verstärkten Adhäsion zwischen Matrix und Anorganik kommt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Phosphat wurde vermutet, dass der Einbau von Phosphonat-Gruppen in die Matrix einen Einfluss auf die im Netzwerk gebildeten CaP-Strukturen haben könnte, um eine Steuerung der mechanischen und optischen Eigenschaften der Komposite zu ermöglichen.⁸² Um die These im Netzwerk zu überprüfen, wurden PDMA-*I*-TEG und PAAm-*I*-MBAm Netzwerke mit Phosphonat-Gruppen hergestellt, indem als Comonomer verschiedene Mengen an Ethyl-2-[4-(Dihydroxyphosphoryl)-2-Oxabutyl]-Acrylat (EDPOA) der Monomer/Enzym-Mischung zugegeben wurden. Die daraus hergestellten Netzwerke weisen abhängig vom Hauptmonomer sehr unterschiedliche Calcifizierungsergebnisse auf. Während PDMA-*I*-TEG Filme auch mit EDPOA-Gehalten bis 10 Gew% hohe Mineralisierungsgrade zur Folge hatten, führt bei

PAAm-/MBAm Netzwerken ein Anteil von 2 Gew% bereits dazu, dass sich der maximal erreichbare Anteil an CaP auf 10 Gew% verringert. Zudem ändern sich mit steigendem Anteil an EDPOA im PDMA-/TEG Netzwerk auch die optischen Eigenschaften der Komposite nach der Calcifizierung (**Abbildung 4.41**). Der Einbau von EDPOA ins PDMA-/TEG Netzwerk führt mit steigender Zahl an Phosphonat-Gruppen (bis 10 Gew% EDPOA) zu immer transparenteren Kompositen für optisches Licht nach der Calcifizierung. Die Transmission bei 700 nm nimmt dabei von 3% für PDMA-/TEG Komposite ohne Zusätze auf 73% durch den Einbau von 5 Gew% EDPOA im Polymer zu. Dabei konnte ein direkter Zusammenhang der mittels REM im Querschnitt der Netzwerke erkennbaren Strukturen und dem EDPOA-Gehalt festgestellt werden. Wie auf den REM-Bildern in **Abbildung 4.41a bis c** zu erkennen ist, ändert sich mit steigender Menge an EDPOA im Netzwerk die Größe der gebildeten Agglomerate. Während ein geringer EDPOA-Gehalt von 1 Gew% zu einer Verringerung des Durchmessers der sphärischen Strukturen von 600 nm auf etwa 60 nm führt, werden bei einer Konzentration von 2 Gew% oder mehr nur noch Strukturen in der Größenordnung von 20 bis 30 nm gebildet. Der Grund für diesen Effekt könnte eine verlangsamte Migration der Primärpartikel im Hydrogel sein, da bekannt ist, dass ionische Gruppen in Netzwerken zu einer starken Verlangsamung der Diffusion entgegengesetzt geladener Moleküle führen.²³¹ Eine weitere Erhöhung des EDPOA Anteils führt zwar zu einer Verringerung des Calcifizierungsgrades von 70 Gew% (5 Gew% EDPOA) auf 48 Gew% (10 Gew% EDPOA), jedoch zu keiner weiteren Veränderung der Strukturen im Netzwerk.

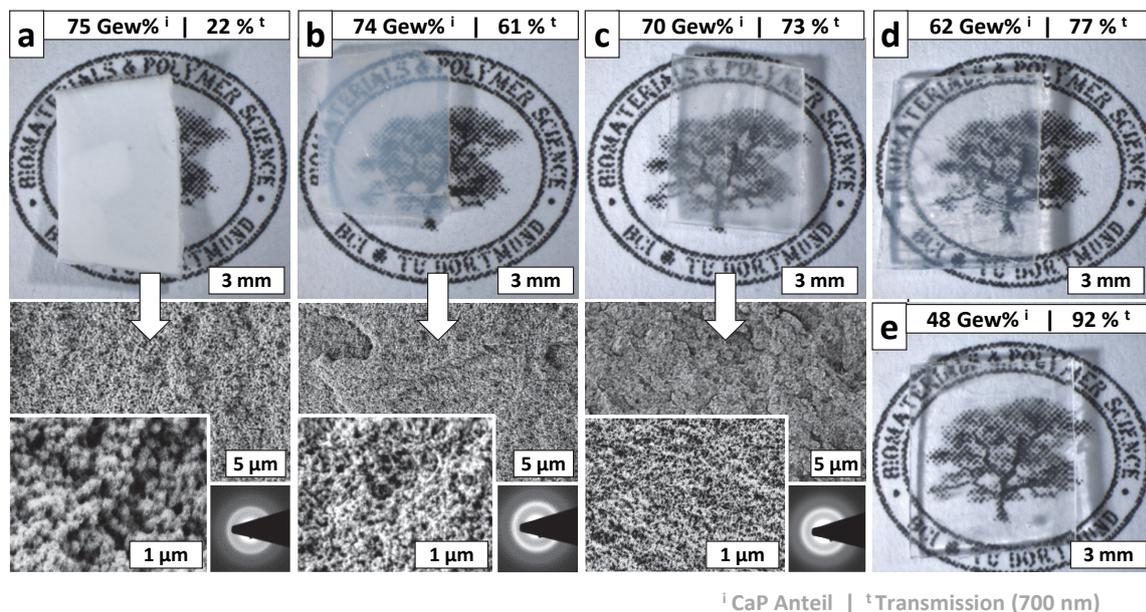


Abbildung 4.41 | Die Bilder zeigen die wassergequollenen PDMA-/TEG Netzwerke (1 Gew% TEG) mit (a) 1 (b) 2, (c) 5, (d) 7 und (e) 10 Gew% EDPOA nach der Calcifizierung für 7 d bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) mit den zugehörigen REM-Aufnahmen des Querschnitts und TED-Aufnahmen. Des Weiteren ist zu jeder Probe der Mineralisierungsgrad (i) sowie die Transmission bei 700 nm (t) angegeben.²²⁸

Daher ist wahrscheinlich die homogenere Verteilung und bessere Separation der Primärpartikel in der Matrix durch den geringeren Mineralisierungsgrad für die hohe Transmission von 92% bei 10 Gew% EDPOA verantwortlich.

4.2.4 Alternative Substrate für die AP-induzierte Calcifizierung

Es ist wahrscheinlich, dass neben CaGP auch andere Monophosphorsäureester für die AP-induzierte Mineralisation geeignet sind. Unter diesen wäre Glucose-6-Phosphat (G6P) aufgrund seiner physiologischen Unbedenklichkeit ein interessanter Kandidat für die AP-induzierte Mineralisation, um in Zukunft die Calcifizierung in vivo, z.B. in „Simulated-Bodyfluids“ durchführen zu können. Dazu wurde eine neue Calcifizierungslösung hergestellt, indem 13 g/l G6P und 5,55 g/l CaCl_2 (äquimolare Mengen zu CaGP) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) gelöst wurden. Ein PDMA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP wurde für 7 d bei RT in der Lösung calcifiziert. Vergleichbar mit der CaGP-Lösung trübt der Film nach wenigen Minuten ein und auch der weitere Verlauf der Calcifizierung unterscheidet sich nicht vom vorher verwendeten System. Nach 7 d wurde die Mikrostruktur im Querschnitt des getrockneten Komposits mittels REM untersucht. **Abbildung 4.42** zeigt die gewachsenen Strukturen, die ebenfalls aus agglomerierten Nanopartikeln mit etwa 30 nm Durchmesser bestehen. Die daraus gebildeten Agglomerate weisen jedoch eine dichtere Struktur auf, die einer Mischung der bisher mit CaGP als Substrat auftretenden Gerüst- und Partikelstrukturen gleicht. TGA-Messungen weisen einen CaP-Anteil von 65 Gew% auf und der Quellgrad in Wasser beträgt 2,1. Die Ergebnisse zeigen, dass G6P als Alternative für CaGP in Frage kommt und zudem auch das Trägermolekül des Phosphates einen Einfluss auf die gebildete CaP-Mikrostruktur zu haben scheint.

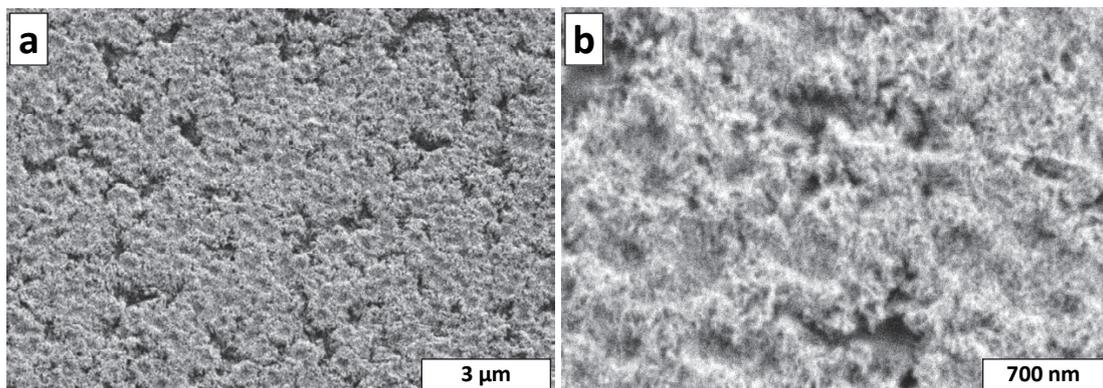


Abbildung 4.42 | (a, b) REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen eines PDMA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert für 7 d bei RT in einer Glucose-6-Phosphat- (13 g/l) und CaCl_2 -Lösung (5,55 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8).²²⁸

4.2.5 Mechanische Eigenschaften der gequollenen CaP-Komposite

Die zuvor hergestellten und in CaGP-Lösung calcifizierten Netzwerke wurden nun auf ihre mechanischen Eigenschaften hin untersucht. Dazu wurden die Proben nach der Calcifizierung bis zur Vermessung in bidestilliertem Wasser gelagert und nicht wie bei den CaCO₃-Kompositen nach der Herstellung getrocknet. Alle untersuchten Komposite enthalten zwischen 50 und 94 Gew% Wasser, was vergleichbar mit dem Gehalt in natürlichen Materialien wie Haut²³² oder Knorpel²³³ ist.

Der Quellgrad der Komposite gewinnt in Bezug auf ihre mechanischen Eigenschaften im hydratisierten Zustand stark an Bedeutung. Mit steigendem Wassergehalt im Film wird der effektive Querschnitt, der bei einer Messung die anliegende Zugspannung trägt, immer kleiner, da das Wasser keine Spannung überträgt und die Quellung noch zusätzlichen Stress auf das Netzwerk ausübt. Aus diesem Grund sind die in der Praxis ermittelten, mechanischen Kennwerte von Hydrogelen, die über den gequollenen Querschnitt bestimmt werden, deutlich kleiner als von Materialien, die kein Wasser aufnehmen können.

Tabelle 4.5 zeigt die Quellgrade aller untersuchten Hydrogele in Wasser vor (0 d) und nach 1 bis 7 d in der GaGP-Lösung. Die Quellgrade aller Filme nehmen dabei mit fortschreitender Calcifizierungszeit und damit zunehmendem CaP-Anteil ab. Die Änderung des Quellgrades im PHEA-/TEG Netzwerk durch die Calcifizierung ist gering, da nur ein sehr niedriger Mineralisierungsgrad in diesem Netzwerk erreicht werden konnte (8 Gew%). Die PAAm-/MBAm und PDMA-/TEG Netzwerke zeigen in den ersten 3 d der Mineralisierung den stärksten Abfall der Quellgrade von 8,4 bzw. 6,1 auf etwa $2,5 \pm 0,1$. In dieser Zeit ist auch die Zunahme des CaP-Anteils am größten. Im Gegensatz dazu ändern sich die Quellgrade der Filme in den letzten 4 d nur noch wenig. Nach 7 d weisen jedoch alle einen Quellgrad von über 2 und damit einen Wasseranteil von mindestens 50% auf.

Tabelle 4.5 | Gemessene Quellgrade der calcifizierten Netzwerke nach verschiedenen Zeiten in Wasser im Vergleich zu den nicht calcifizierten Hydrogelen.

Quellgrad	0 d	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	7 d
PHEA-/TEG	4,0	-	-	-	-	-	3,1
PDMA-/TEG	6,1	4,8	3,5	2,4	-	-	2,5
+1 Gew% EDPOA	7,2	3,5	2,8	2,7	-	-	2,4
+2 Gew% EDPOA	8,9	3,7	3,4	2,9	-	-	2,2
+5 Gew% EDPOA	12,0	5,2	4,3	3,3	-	-	2,3
+7 Gew% EDPOA	14,6	-	-	3,5	-	-	2,5
+10 Gew% EDPOA	16,6	15,2	11,9	11,1	-	-	3,6
PAAm-/MBAm	8,4	4,0	2,9	2,6	2,4	2,4	2,0

Der Einbau von EDPOA in die PDMA-/TEG Filme führt zu einem Anstieg des Quellgrades der uncalcifizierten Hydrogele mit zunehmender Zahl an Phosphonatgruppen von 6,1 auf bis zu 16,6.

Nach 7 d in der Calcifizierungslösung liegt der Quellgrad der Komposite mit EDPOA im Bereich der anderen Filme ohne ionisches Additiv bei 2,0 bis 2,5. Die Ausnahme bildet das Netzwerk mit 10 Gew% EDPOA dessen Quellgrad 3,6 beträgt. Letzteres zeigt jedoch auch einen deutlich geringeren Mineralisierungsgrad von nur 48 Gew% im Vergleich zu den anderen Kompositen (62 bis 75 Gew%). Wie aus **Abbildung 4.41** ersichtlich ist, scheinen die Quellgrade der Komposite stark abhängig vom Calcifizierungsgrad der Netzwerke zu sein, der über die Calcifizierungszeit steigt. Diese Zunahme des Anteils an CaP im Netzwerk geht mit der Abnahme des Quellgrades einher, wodurch die Eigenschaften immer stärker durch das CaP bestimmt werden. Um dem unterschiedlichen Wasseranteil in den Kompositen zu berücksichtigen, werden neben den CaP-Gewichtsanteilen im getrockneten Zustand auch die Volumenanteile (v_{CaP} , in Vol%) im gequollenen Zustand berücksichtigt. Letztere wurden mit Hilfe folgender Gleichungen berechnet:

$$v_{CaP} [vol\%] = \frac{V_{CaP}}{V_{CaP} + V_{Wasser} + V_{Polymer}} \quad \text{Gleichung 4.3}$$

$$V_{CaP} = \frac{m_{700^\circ C}}{\rho_{Ca_3(PO_4)_2}} \quad \text{Gleichung 4.4}$$

$$V_{Wasser} = \frac{m_{gequollen} - m_{110^\circ C}}{\rho_{Wasser}} \quad \text{Gleichung 4.5}$$

$$V_{Polymer} = \frac{m_{110^\circ C} - m_{700^\circ C}}{\rho_{Polymer}} \quad \text{Gleichung 4.6}$$

$$\rho_{CaP} = 3,14 \text{ g/cm}^3, \quad \rho_{Wasser} = 1 \text{ g/cm}^3,$$

$$\rho_{PDMA} = 1,21 \text{ g/cm}^3, \quad \rho_{PAAm} = 1,30 \text{ g/cm}^3, \quad \rho_{PHEA} = 1,29 \text{ g/cm}^3$$

$V_{CaP}, V_{Wasser}, V_{Polymer}$	Volumen von CaP, Wasser bzw. des Polymer im Komposite [cm ³]
$m_{gequollen}$	Masse des in Wasser gequollenen Films [g]
$m_{110^\circ C}$	Masse des bei 110°C getrockneten Films [g]
$m_{700^\circ C}$	Masse des bei 700°C in der TGA verbrannten Films [g]

In **Abbildung 4.43** sind die Quellgrade der calcifizierten Hydrogele über ihre Gewichtsanteile an CaP im getrockneten Netzwerk bzw. ihre Volumenanteile im wassergequollenen Zustand aufgetragen. Dabei zeigt sich, dass sowohl die Art des Netzwerks als auch der Anteil an ionischem Additiv keinen merklichen Einfluss auf die Quellgrade höher mineralisierter Netzwerke oberhalb von 30 Gew% CaP hat. Im gequollenen Komposit entspricht dies sogar nur einem Anteil von 2 Vol%. Der Quellgrad wird dabei ausschließlich durch die Menge an abgeschiedenem CaP diktiert. Unterhalb dieser Grenze wird der Einfluss der Matrix bei der Quellung jedoch wieder dominanter, weshalb bei kleinen Mineralisationsgraden die Quellung abhängig vom Netzwerk ansteigt. Dies ist besonders gut an den mit 10 Gew% EDPOA ergänzten PDMA-/TEG Netzwerken zu erkennen. Diese weisen bei

einem Calcifizierungsgrad von unter 1 Vol% einen vergleichsweise hohen Quellgrad von 11 bis 17 auf, der sich ab ca. 2 Vol% CaP allerdings auf den Quellgrad der anderen Netzwerktypen angleicht.

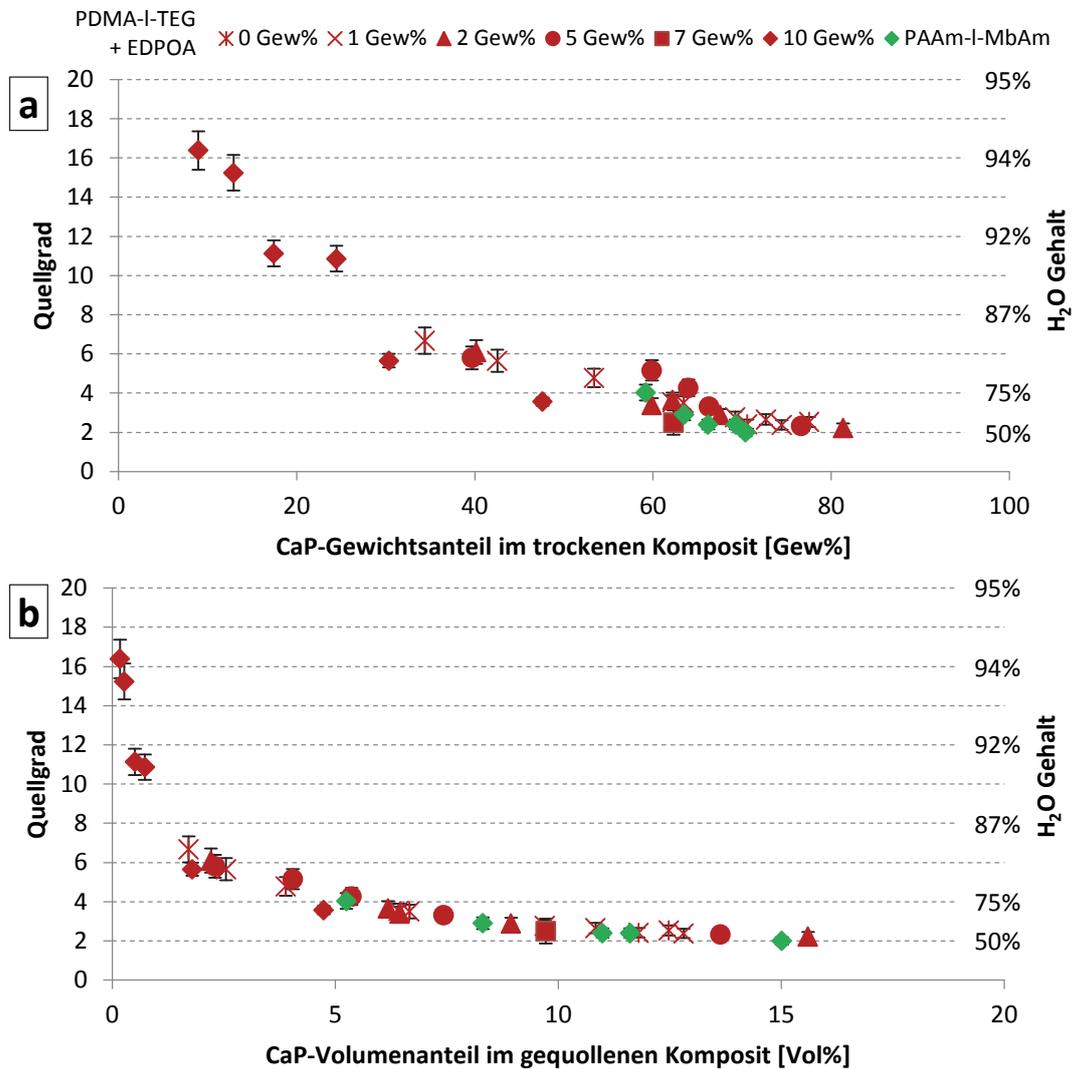


Abbildung 4.43 | Auftragung der Quellgrade der calcifizierten PAAm-I-MbAm und PDMA-I-TEG Netzwerke sowie letzteres mit verschiedenen Mengen an EDPOA über (a) ihrem anorganischen Gewichtsanteil im getrockneten Zustand und (b) dem Volumenanteil im gequollenen Zustand. Die Netzwerke mit 0,4 Gew% AP wurden 1 bis 7 Tage in einer CaP – Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert.²²⁸

Zur Charakterisierung der mechanischen Kennwerte wurden Spannungs-Dehnungs-Kurven der für 7 Tage calcifizierten, gequollenen Komposite mit Hilfe eines Dynamisch-Mechanischen-Analysators aufgenommen. Die PHEA-I-TEG Komposite weisen aufgrund ihres geringen Mineralisationsgrades (8 Gew% / 0,9 Vol%) ähnlich schlechte mechanische Eigenschaften wie das nicht calcifizierte Hydrogel von unter 1 MPa auf (**Abbildung 4.44a**, blaue Balken), da beide spröde und leicht zu zerreißen waren. Die PDMA-I-TEG Hybrid-Materialien mit einem CaP-Gehalt von 72 Gew% (15,9 Vol%) hingegen zeigen eine bemerkenswerte Steigerung ihrer Steifigkeit durch die AP-induzierte Calcifizierung, die sich in einem E-Modul von 73 ± 14 MPa im gequollenen Zustand äußert. Durch die Calcifizierung einer PAAm-I-MbAm Matrix (70 Gew% / 15,4 Vol% CaP) kann die Steifigkeit des

Komposits noch weiter auf 155 ± 15 MPa gesteigert werden. Gleichzeitig bewirkt das Acrylamid-basierte Netzwerk, dass die Komposite deutlich zäher sind, da sie vor dem Bruch deutlich weiter gedehnt werden können (**Abbildung 4.44b**).

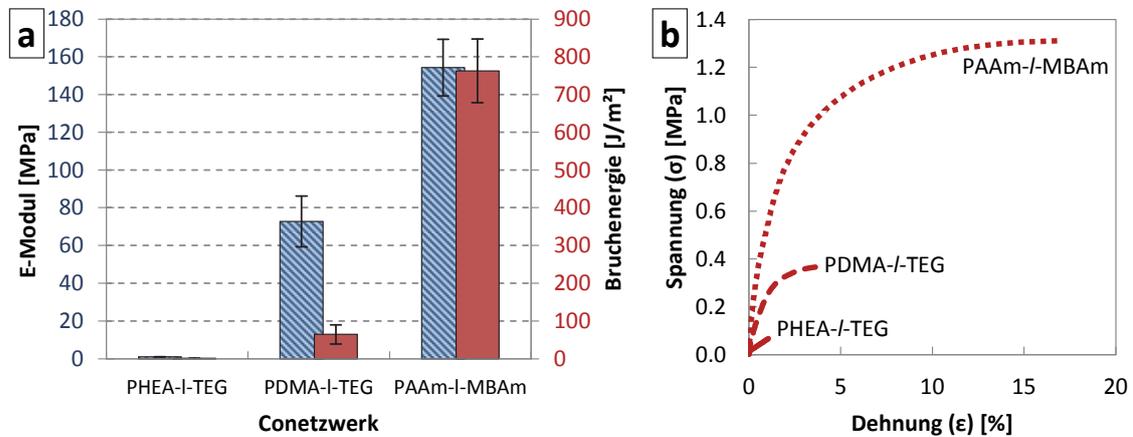


Abbildung 4.44 | (a) E-Moduln (blau gestreift) und Bruchenergien (rot) mit den zugehörigen (b) Spannungs-Dehnungs-Kurven der calcifizierten PHEA-I-TEG, PDMA-I-TEG und PAAm-I-MBAm Netzwerke mit den höchsten kombinierten Werten für E-Modul und Bruchenergie. Die Filme wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert.²²⁸

Die zur Charakterisierung der Zähigkeit von Hydrogelen verbreitete Kenngröße der „Bruchenergie“ wurde mittels einer Methode bestimmt, die erstmals von Rivlin und Thomas²³⁴ für Naturkautschuk entwickelt und als „Pure-Shear-Test“ für Hydrogele adaptiert wurde.^{46, 50} Dazu müssen zuerst mit Hilfe des Dynamisch-Mechanischen-Analysators Zug-Dehnungs-Kurven von mindestens 3 jeweils 8 x 8 mm großen Proben des Komposits aufgenommen werden. Danach werden drei Film-Proben mit derselben Geometrie mittels einer Rasierklinge in der Breite zu 50% eingeschnitten und ebenfalls gemessen. Zur Durchführung einer Messung wird eine Probe zwischen den zwei Klemmen des Messgeräts eingespannt und mit einer kontinuierlich ansteigenden Kraft von 0,5 N/min bis zum Bruch belastet. Während der Messung wird die Probe in 30 s Abständen mit Wasser besprüht, um einem Austrocknen im Verlauf der Messung entgegenzuwirken. Anhand der auf diese Weise erhaltenen Zug-Dehnungs-Kurven der eingeschnittenen Proben kann die Dehnung bestimmt werden, bei der es an der durch den Schnitt geschwächten Stelle zu einer überkritischen Rissausbreitung (dem Bruch der Probe) kommt.

Daraus werden mit Hilfe der folgenden Gleichung die Bruchenergien (Γ) in J/m^2 der unbeschädigten Proben ermittelt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4.44a** (rote Balken) dargestellt.

$$\Gamma = l_c \cdot \int_0^{\varepsilon_c} (\sigma \cdot d\varepsilon) \quad \text{Gleichung 4.7}$$

- σ Spannung [MPa]
- ε Dehnung [%]
- ε_c Bruchdehnung der eingeschnittenen Proben [%]
- l_c Klemmenabstand zu Beginn der Messung [mm]

Im Gegensatz zu den anderen beiden Netzwerktypen zeigt das calcifizierte PAAm-/MBAm Netzwerk durch die größere Dehnung mit $763 \pm 85 \text{ J/m}^2$ eine Risszähigkeit im Bereich von Knorpelgewebe (1000 J/m^2).⁴⁷ Erwähnenswert ist zudem, dass die Bruchdehnung von $10\% \pm 2,5\%$ sich durch das Einschneiden der Probe nicht verringert. Diese exzellenten mechanischen Eigenschaften verdanken die PAAm-/MBAm Komposite wahrscheinlich der Kombination aus homogener, hochporöser, anorganischer Struktur sowie der hohen Zähigkeit (Bruchenergie ca. 200 J/m^2).⁵⁰ Verfolgt man die Änderung der mechanischen Eigenschaften der PAAm-/MBAm Netzwerke über die Calcifizierungszeit, so zeigt sich, dass der E-Modul von $0,02 \pm 0,01 \text{ MPa}$ an Tag 0 auf $155 \pm 15 \text{ MPa}$ an Tag 7 ansteigt. Dies entspricht einer Steigerung der Steifigkeit durch die Mineralisierung um beinahe 4 Größenordnungen (**Abbildung 4.45a**).

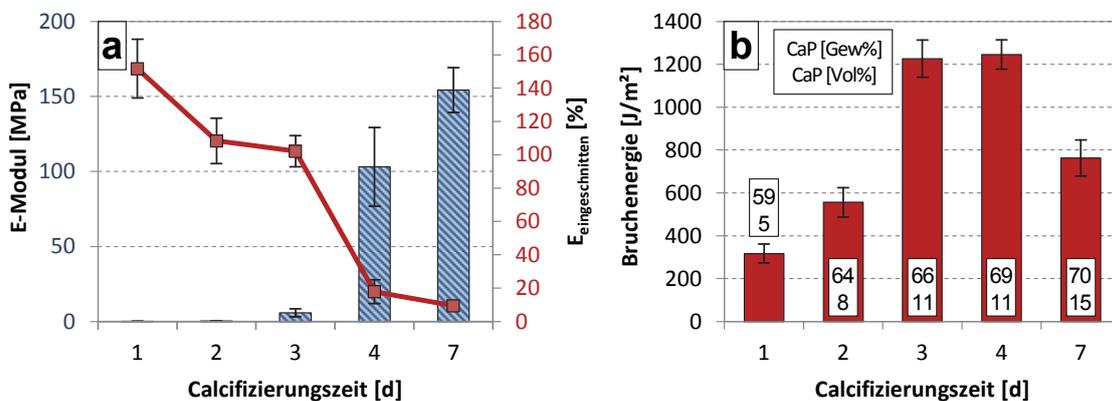


Abbildung 4.45 | (a) zeigt die Entwicklung der E-Moduln der PAAm-/MBAm Komposite (blau gestreifte Balken) sowie die Bruchdehnungen der eingeschnittenen Proben (rote Linie) nach unterschiedlich langer Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). In Grafik (b) werden die Bruchenergien (rote Balken) der PAAm-/MBAm Komposite mit ihren CaP-Anteilen (Kästen) im getrockneten (Gew%) und im gequollenen Zustand (Vol%) angegeben.²²⁸

Dabei finden die größten Änderungen in der Zeit zwischen dem 3. und 4. Tag statt, da dort der E-Modul von $6 \pm 2,7 \text{ MPa}$ auf $103 \pm 26 \text{ MPa}$ ansteigt. In derselben Zeit findet jedoch nur ein Anstieg des Calcifizierungsgrads im gequollenen Komposit von 11,3 Vol% (66 Gew%) auf (11,9 Vol%) (69 Gew%) statt. Es wird vermutet, dass diese starke Zunahme der Steifigkeit durch die vollständige Perkolation der gebildeten anorganischen Strukturen verursacht wird, wozu nur ein geringer

Anstieg des CaP-Anteils nötig ist. Die Bruchenergie der Komposite erreicht ein Maximum von $1246 \pm 68 \text{ J/m}^2$ nach 3 Tagen in der Calcifizierungslösung und bleibt am 4. Tag etwa gleich (**Abbildung 4.45b**). Dabei nimmt die Bruchdehnung von $100 \pm 9 \%$ auf $17 \pm 5 \%$ ab, was allerdings durch die stark angestiegene Steifigkeit kompensiert wird. Mit Hilfe der AP-induzierten Calcifizierung der PAAm-/MBAm Netzwerke ist es daher möglich, die Bruchenergie im Vergleich zum nicht calcifizierten Hydrogel um den Faktor 6 zu erhöhen und gleichzeitig den E-Modul in einem Bereich von 0,1 bis 150 MPa einzustellen.

Um die Theorie, dass die Perkolation der CaP-Strukturen die entscheidende Rolle bei Erzeugung der ultrasteifen Hydrogele spielt, weiter zu überprüfen, wurde versucht die Strukturen innerhalb der Komposite im wassergequollenen Zustand abzubilden. Da es nicht möglich ist, gequollene Proben im REM zu untersuchen, wurde das Wasser in den Netzwerken durch das jeweils verwendete Matrixmonomer ausgetauscht, mittels UV-Licht polymerisiert (Post-Polymerisation) und so der gequollene Zustand eingefroren. Alle untersuchten post-polymerisierten PDMA-/TEG und PAAm-/MBAm Hydrogele mit hoher Steifigkeit zeigen auf den REM-Aufnahmen perkolierte Strukturen (**Abbildung 4.46a**), da sich die Abstände der anorganischen Strukturen vor und nach der Post-Polymerisation nicht verändern. Allerdings zeigen auch Filme, die noch keinen sprunghaften Anstieg der Steifigkeit aufweisen, dieser aufgrund der Calcifizierungszeit jedoch kurz bevorsteht, ebenfalls scheinbar perkolierte Strukturen im Querschnitt (**Abbildung 4.46b**). Demgegenüber zeigt sich bei der Post-Polymerisation eines erst kurz mineralisierten PDMA-/TEG Netzwerks (1d), dass sich der Abstand der anorganischen Strukturen durch die Post-Polymerisation, im Vergleich zur getrockneten Probe, signifikant vergrößert (**Abbildung 4.46c**). Dies beweist, dass zumindest in diesem Fall die CaP-Partikel nicht perkoliert vorliegen. Die REM-Untersuchung des Querschnitts scheint jedoch nicht geeignet zu sein, um eine eindeutige Perkolation der anorganischen Strukturen bei hochmineralisierten Proben nachzuweisen, da die Änderung des Abstands zwischen den Partikeln am entscheidenden Punkt wahrscheinlich nur sehr gering ist und mit Hilfe dieser Methode nicht aufgelöst werden kann.

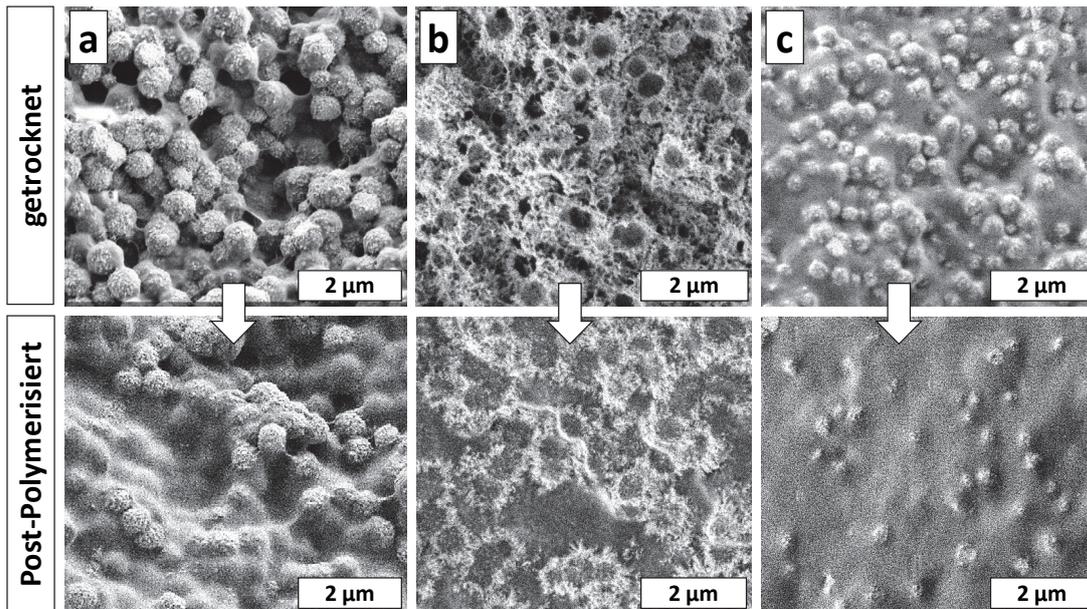


Abbildung 4.46 | Die REM-Bilder zeigen die Querschnitte unterschiedlicher, calcifizierter Hydrogele in getrocknetem und post-polymerisiertem Zustand: (a) PDMA-I-TEG (7d mineralisiert), (b) PAAm-I-MBAm (3d mineralisiert) und (c) PDMA-I-TEG (1d mineralisiert). Die Calcifizierung fand bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) statt.²²⁸

Um den Steifigkeitssprung durch die Perkolation zu beweisen, wurde versucht diesen bei einem 3 d mineralisierten PAAm-I-MBAm Hydrogel, das noch einen geringen E-Modul von ca. 6 MPa aufwies, zu induzieren. Dazu wurde der gequollene Komposit aus dem Wasserbad entnommen und langsam bei RT getrocknet. Der sich dabei verringernde Quellgrad sollte dazu führen, dass sich die nanostrukturierte anorganische Phase einander annähert, ähnlich wie es durch eine weitere Steigerung des Calcifizierungsgrads zu erwarten wäre. Während der Trocknung wurde der E-Modul in Abständen von 5 Minuten mit Hilfe des Dynamisch-Mechanischen-Analysators bestimmt. Die Ergebnisse der Messung sind in **Abbildung 4.47** dargestellt. Darauf zu erkennen ist ein plötzlicher Anstieg des E-Moduls der Probe nach 10 Minuten Trocknung. Dabei hat eine geringe Veränderung des Quellgrades von 2,47 auf 2,3 einen extremen Anstieg der Steifigkeit auf 101 MPa zur Folge. Dieser Sprung ist nur durch die eintretende Perkolation der anorganischen Strukturen zu erklären. Aus diesem Versuch lässt sich ableiten, dass die mechanischen Eigenschaften und dabei insbesondere die Steifigkeit, maßgeblich durch die Perkolation der mineralischen Phase im Inneren der Netzwerke verursacht werden.

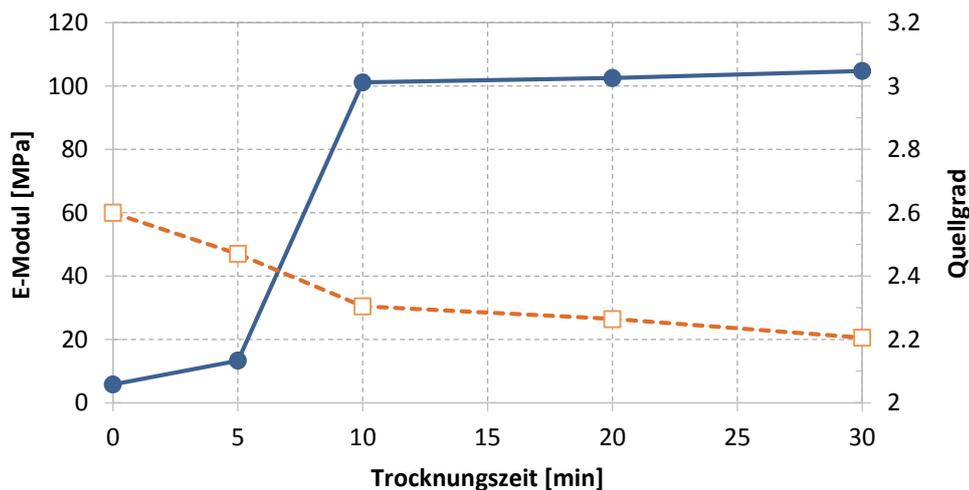


Abbildung 4.47 | Messungen des E-Moduls (blau) und des Quellgrades (orange, gestrichelt) während der Trocknung bei RT eines für 3 d in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifizierten PAAm-I-MBAm Hydrogels.²²⁸

Im Gegensatz zu den zähen PAAm-I-MBAm Kompositen weisen die gequollenen Hybridmaterialien auf Basis des PDMA-I-TEG Netzwerks bei ähnlicher Steifigkeit eine deutlich geringere Bruchenergie auf. Um dies zu verbessern, wurde untersucht ob EDPOA als ionisches Additiv durch den Einfluss auf die Kristallisation in der Lage ist, die mechanischen Eigenschaften, insbesondere die Zähigkeit, der Verbundmaterialien zu verbessern. Die resultierenden Strukturveränderungen durch Modifizierung der PDMA-I-TEG Matrix mit Phosphonat-Seitengruppen wurden in **Kapitel 4.2.3** diskutiert und zeigen bereits den starken Einfluss von EDPOA auf die Bildung von CaP-Strukturen, woraus transparente Komposite resultieren. Beim Vergleich der mechanischen Eigenschaften der Hybridmaterialien mit und ohne anionische Gruppen mit ähnlichen Steifigkeiten im Bereich von 50 bis 100 MPa, die durch unterschiedlich lange Calcifizierungszeiten erzeugt wurden (**Abbildung 4.48a**), zeigte sich, dass die Bruchenergie der Filme mit steigendem EDPOA-Gehalt im Netzwerk zunimmt. Der höchste Wert mit $485 \pm 23 \text{ J/m}^2$ wurde bei Netzwerken mit 10 Gew% EDPOA erhalten, was etwa dem 7-fachen Wert des calcifizierten Netzwerks ohne EDPOA entspricht und der Hälfte von Knorpelgewebe.

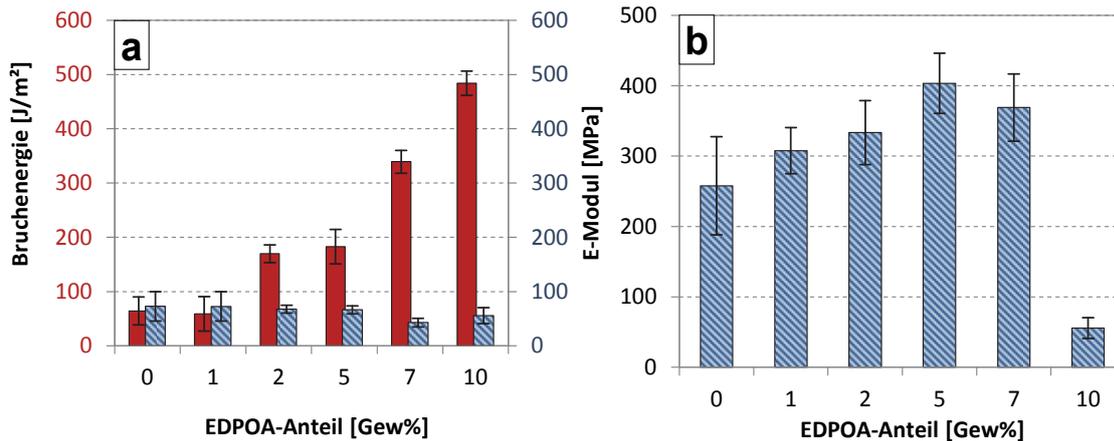


Abbildung 4.48 | Diagramm (a) zeigt die Bruchenergien (rote Balken) der PDMA-I-TEG Hybridmaterialien mit einem E-Modul zwischen 50 und 100 MPa und unterschiedlichen Mengen EDPOA in der Matrix (Calcifizierungszeiten: 4 Tage – 0 und 7 Gew% EDPOA, 3 Tage – 1, 2 und 5 Gew% EDPOA, 7 Tage – 10 Gew% EDPOA). In (b) sind die E-Moduln der PDMA-I-TEG Komposite mit maximalem CaP-Gehalt nach 7 d Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) mit 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) abgebildet.²²⁸

Um zu untersuchen, ob die Steifigkeit der PDMA-I-TEG Filme durch Verlängerung der Calcifizierungszeit weiter gesteigert werden kann, wurden alle Netzwerke mit EDPOA für 7 d in der Mineralisierungslösung belassen. Wie in **Abbildung 4.48b** zu erkennen ist, können so die E-Module der Komposite noch einmal auf bis zu 404 ± 43 MPa gesteigert werden, wobei die Netzwerke mit 5, 7 und 10 Gew% EDPOA trotz der hohen Steifigkeit immer noch transparent sind. Der PDMA-I-TEG Komposite mit 10 Gew% EDPOA und der höchsten Transparenz weist jedoch einen deutlich niedrigeren E-Modul nach 7 d auf, was vermutlich auf den geringeren Mineralisierungsgrad von nur maximal 4,5 Vol% (48 Gew%) zurückzuführen ist. Die Steigerung des E-Moduls ist trotzdem beachtlich, wie in **Abbildung 4.49a und b** ersichtlich ist. Die mit EDPOA ergänzten Komposite lassen sich trotz des hohen E-Moduls immer noch signifikant deformieren ohne unter der Last zu brechen (**Abbildung 4.49c und d**). Nach Entfernen des Gewichts nehmen sie zudem ihre ursprüngliche Form wieder ein.

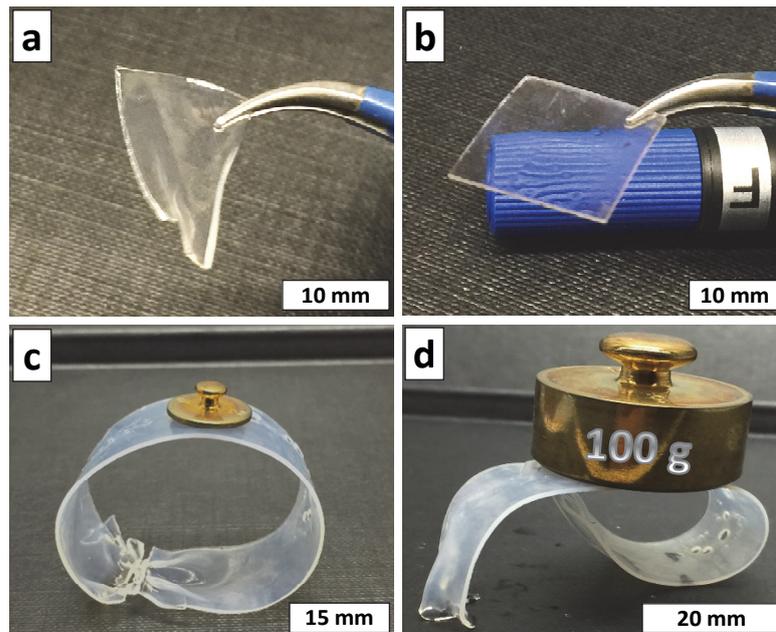


Abbildung 4.49 | (a, b) Bilder gequollener PDMA-I-TEG Netzwerke (1 Gew% TEG) mit 10 Gew% EDPOA nach 7 d bei RT (a) in Wasser und (b) in einer CaGP-Lösung (11 g/l) mit 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). (c, d) Bilder eines 7 d calcifizierten, gequollenen PDMA-I-TEG Films (1 Gew% TEG) mit 2 Gew% EDPOA, der in einer runden Form calcifiziert wurde, belastet mit (c) 2 g und (d) 100 g.²²⁸

In **Abbildung 4.50** ist die Veränderung der Zähigkeit und Steifigkeit der PDMA-I-TEG Komposite durch EDPOA in Form der Spannungs-Dehnungskurven der Proben mit 1 und 10 Gew% EDPOA sowie ohne Additiv abgebildet. Der Komposit ohne EDPOA erreicht nach 4 Tagen Calcifizierung ein Maximum der Bruchenergie für diesen Film sowie einen E-Modul von 73 ± 14 MPa. Die Bruchenergie beträgt dabei allerdings nur 65 ± 25 J/m², weshalb sich das Verbundmaterial im Vergleich zu Acrylamid-basierten Kompositen spröder verhält. Bereits die Calcifizierung der Matrix mit 1 Gew% EDPOA führt zu einem Anstieg des E-Moduls und der Bruchenergie bis zum 7. Tag der Calcifizierung. Trotz schlechterer Bruchdehnung kann aufgrund des hohen E-Moduls von 307 ± 36 MPa eine gesteigerte Rissenergie von 129 ± 32 J/m² gemessen werden. 7 Tage calcifizierte Netzwerke mit 10 Gew% EDPOA können bis zum Bruch dreimal stärker gedehnt werden als ohne Phosphonat-Gruppen, was ausschlaggebend für die hohe Bruchenergie von 485 ± 23 J/m² ist. Auch wenn der E-Modul dieser Probe bloß 56 ± 15 MPa betrug, ist bemerkenswert, dass die stark erhöhte Steifigkeit nur durch 4,5 Vol% CaP in der gequollenen Polymermatrix verursacht werden.

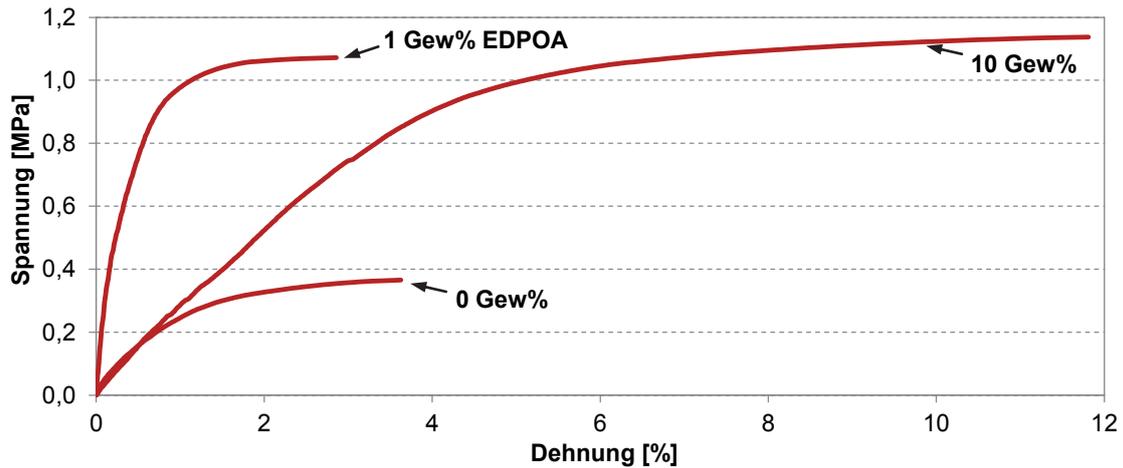


Abbildung 4.50 | Spannungs-Dehnungs-Kurven gequollener PDMA-I-TEG Netzwerke mit 1 Gew%, 10 Gew% und ohne EDPOA als Additiv. Die Netzwerke wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert.²²⁸

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Einbau der Phosphonat-Gruppen in das PDMA-I-TEG Netzwerk nicht nur die Bruchenergie der Composite, sondern ebenfalls ihr E-Modul gesteigert werden kann. Es ist anzunehmen, dass für die Erhöhung der Zähigkeit mit steigendem EDPOA-Gehalt im Netzwerk die ionischen Wechselwirkungen zwischen den Phosphonat-Gruppen der Matrix und dem CaP eine wichtige Rolle spielen. In Computersimulationen konnte bereits gezeigt werden, dass ionische Wechselwirkungen die plastische Verformbarkeit verbessern und so die Zähigkeit eines Materials erhöhen können.²³⁵ Durch Einbau der Phosphonat-Gruppen in das Netzwerk sollte die Adhäsion zwischen Matrix und CaP aufgrund der ionischen Wechselwirkungen zunehmen, was in einem Anstieg der Steifigkeit resultieren würde. Zudem sind ionische Bindungen in der Lage sich unter mechanischer Deformation zu öffnen und wieder neu zu verbinden, was eine Energiedissipation zur Folge hat. Viele Hydrogel-Netzwerke verdanken dieser Eigenschaft ihre außergewöhnliche Dehnbarkeit.⁵⁰⁻⁵¹ Dieses „Druckknopf“-Prinzip könnte hier ebenfalls dafür verantwortlich sein, dass die Zähigkeit als auch die Steifigkeit der Composite mit ansteigendem EDPOA-Gehalt zunimmt. Die Auswirkungen auf die Mechanik dieser veränderten Interaktion zwischen Matrix und CaP durch EDPOA sind in **Abbildung 4.51** dargestellt. Darin sind die E-Moduln der Composite über ihren anorganischen CaP-Anteil im getrockneten (**Abbildung 4.51a und b**) sowie im wassergequollenen Zustand (**Abbildung 4.51c und d**) aufgetragen. Wie in **Abbildung 4.51a** zu erkennen ist, liegen die höchsten E-Module der Composite mit 0, 1 und 2 Gew% EDPOA alle im gleichen Bereich (260 bis 330 MPa) und weisen dabei einen ähnlichen Gehalt an CaP im getrockneten Film auf. Daraus lässt sich schließen, dass bei hohen Calcifizierungsgraden der E-Modul stärker durch die anorganische Phase und weniger durch eine verstärkte Adhäsion dominiert wird. Berücksichtigt man zusätzlich die Quellung der Composite (**Abbildungen 4.51c**) so zeigt sich, dass sich die CaP-Volumenanteile im gequollenen Zustand für diese Proben unterscheiden. Dabei führt ein höherer Gehalt an CaP zu einer Steigerung des E-Moduls. Die Verringerung des

Calcifizierungsgrads führt in allen Fällen zu einer Abnahme der Steifigkeit. Betrachtet man die getrockneten Komposite, so führt bereits eine geringe Verminderung des maximalen CaP-Anteils dazu, dass die E-Moduln der Komposite einbrechen. Dieser Trend ist bei der Auftragung über den Volumenanteil ebenfalls erkennbar. Bei Calcifizierungsgraden unterhalb von 70 Gew% bzw. 12 Vol% zeigt sich ein Effekt der Phosphonatgruppen in der Matrix, da bei gleichen Mineralisierungsgraden der E-Modul des Komposits mit zunehmendem EDPOA Gehalt ansteigt. Als Grund für dieses Verhalten wird die zuvor beschriebene, veränderte Interaktion zwischen Matrix und CaP angesehen. Aufgrund der zunehmenden Grenzflächenadhäsion durch die Phosphonat-Gruppen kann bereits bei geringeren Mineralisierungsgraden mehr Spannung auf die anorganische Phase übertragen werden, was eine bessere Verstärkung zur Folge hat. Dieses Verhalten setzt sich fort, wenn der EDPOA-Anteil auf 5 Gew% und mehr erhöht wird (**Abbildungen 4.51b und d**). Daraus folgt, dass mit zunehmender Zahl an Phosphonat-Gruppen im Netzwerk weniger CaP nötig ist, um einen Komposit mit dem gleichen E-Modul herzustellen. Dies führte im effizientesten Fall zu einem Hybridmaterial mit einem E-Modul von 369 ± 48 MPa im gequollenen Zustand mit nur 12 Vol% an anorganischem Material.

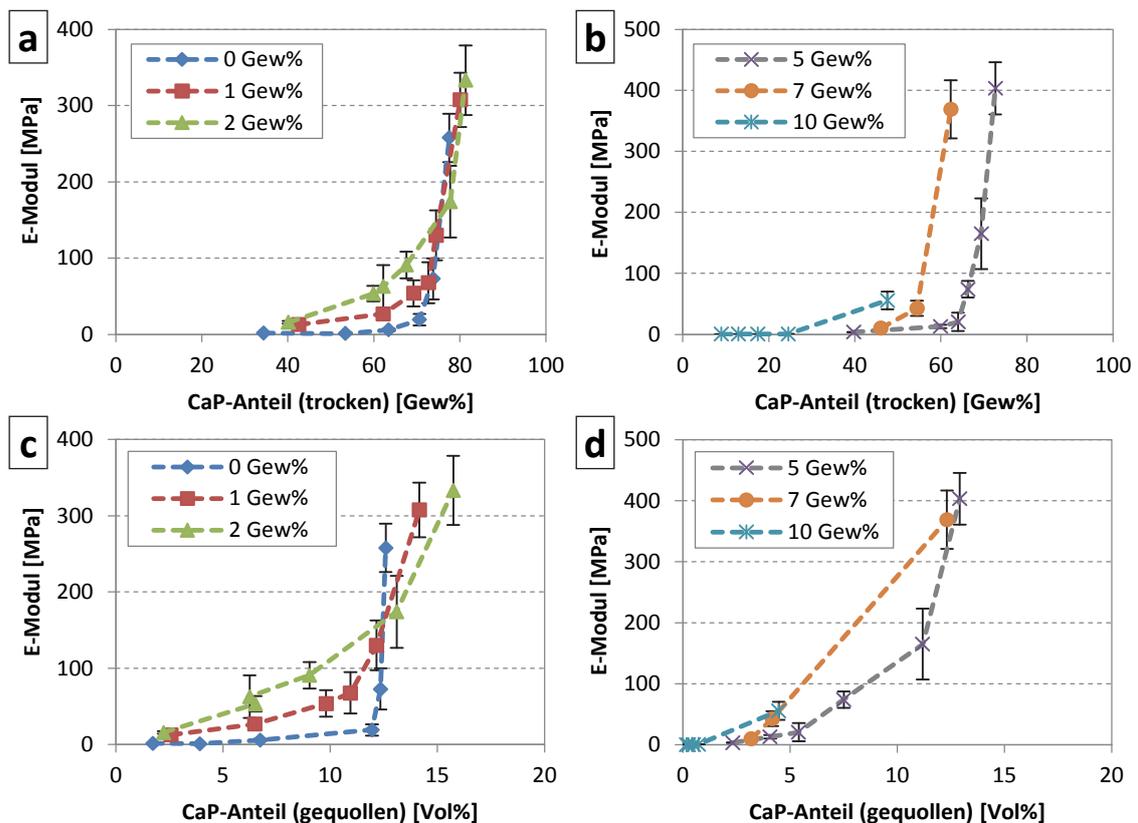


Abbildung 4.51 | Die gemessenen E-Moduln der für 1 bis 7 d calcifizierten PDMA-I-TEG Hydrogele mit unterschiedlichen Mengen EDPOA (in Gew%) sind gegen ihre jeweiligen CaP-Gehalte im (a, b) getrockneten (Gew%) und im (c, d) gequollenen Zustand (Vol%) aufgetragen. Die Komposite wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT mineralisiert.²²⁸

Mit Hilfe der AP-induzierten Mineralisation von Hydrogelen ist es erstmals gelungen, ultrasteife sowie transparente CaP-basierte Hybridmaterialien mit E-Moduln bis zu 440 MPa herzustellen, die gleichzeitig stark gequollen sind (50 bis 90 Gew% Wasser-Anteil). Die Steifigkeit kann zudem für die jeweilige Anwendung über 4 Größenordnungen variiert werden. Trotz der hohen E-Moduln weisen die Komposite zudem eine hohe Bruchenergie auf, die mit der von Knorpel (1000 J/m^2)⁴⁷ vergleichbar ist. Die hergestellten ultrasteifen Komposite eignen sich daher für eine Vielzahl der eingangs erwähnten Anwendungen, z.B. in der Membrantechnik. Dabei bieten sie die Vorteile, dass sie zum einen weniger Stützgewebe benötigen würden und zum anderen, im Gegensatz zu normalen Hydrogelen, Verunreinigungen auf der Oberfläche mechanisch entfernt werden könnten, ohne diese zu beschädigen.³³ Erste Versuche zur Eignung der wassergequollenen Komposite als Membran ergaben für die Wasserpermeanz eines 7 d mineralisierten PDMA-/TEG Netzwerks (100 nm Dicke) einen Wert von $96 \pm 16 \text{ l}/(\text{m}^2 \cdot \text{bar} \cdot \text{h})$, was einem guten Wert für eine Membran zur Wasserentsalzung entspricht.²³⁶ Da die verwendeten Hydrogele zudem als biokompatibel gelten³⁸ und neben CaGP auch G6P als biokompatibles Substrat zur Verfügung stehen, ist auch eine Anwendung für medizinische Zwecke vorstellbar.

4.2.6 Mechanische Eigenschaften der getrockneten CaP-Komposite

Die mechanischen Eigenschaften der Komposite wurden ebenfalls im trockenen Zustand untersucht. Die calcifizierten PHEA-/TEG Netzwerke verhalten sich aufgrund ihres geringen Mineralisationsgrades von 8 Gew% jedoch auch im trockenen Zustand wie das reine Netzwerk und zeigen mit ca. 1 MPa eine geringe Steifigkeit.

Aufgrund der Sprödigkeit der getrockneten PAAm-/MBAm konnten keine verlässlichen Kenngrößen zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der trockenen Hybridmaterialien bestimmt werden.

Die Trocknung der calcifizierten PDMA-/TEG Netzwerke (**Abbildung 4.52a**) führte ebenfalls zu einer Versprödung der Komposite, was mit zunehmendem CaP-Gehalt die Messung des E-Moduls erschwerte. Die 7 Tage calcifizierten und getrockneten Filme weisen einen E-Modul von $566 \pm 240 \text{ MPa}$ auf, was eine deutliche Verringerung im Vergleich zum reinen Netzwerk mit $1666 \pm 30 \text{ MPa}$ darstellt. Ein ähnliches Verhalten des E-Moduls war bereits durch die Urease-induzierte Calcifizierung mit CaCO_3 bei den PDMA-/TEG Filmen zu beobachten. Der Einbau des Additivs EDPOA, welches im gequollenen Zustand die Zähigkeit des Komposites verbessert, führte dazu, dass das Material mit steigendem Anteil noch spröder wurde und bei Konzentrationen oberhalb von 5 Gew% nach dem Trocknen bereits von sichtbaren Rissen durchzogen war. Dabei hatte der Einbau von EDPOA ins Netzwerk keine Erhöhung des E-Moduls zur Folge. Ein für 7 d calcifizierter PDMA-/

TEG Film mit 5 Gew% EDPOA wies nur einen E-Modul von 430 ± 206 MPa auf. Durch die Verkürzung der Calcifizierungszeiten konnte ebenfalls keine Verbesserung des E-Moduls im getrockneten Zustand erreicht werden. Bereits nach 24 h in der Calcifizierungslösung war der E-Modul vom Wert des reinen Netzwerks auf 316 ± 20 MPa abgesunken (CaP-Gehalt 53 Gew%).

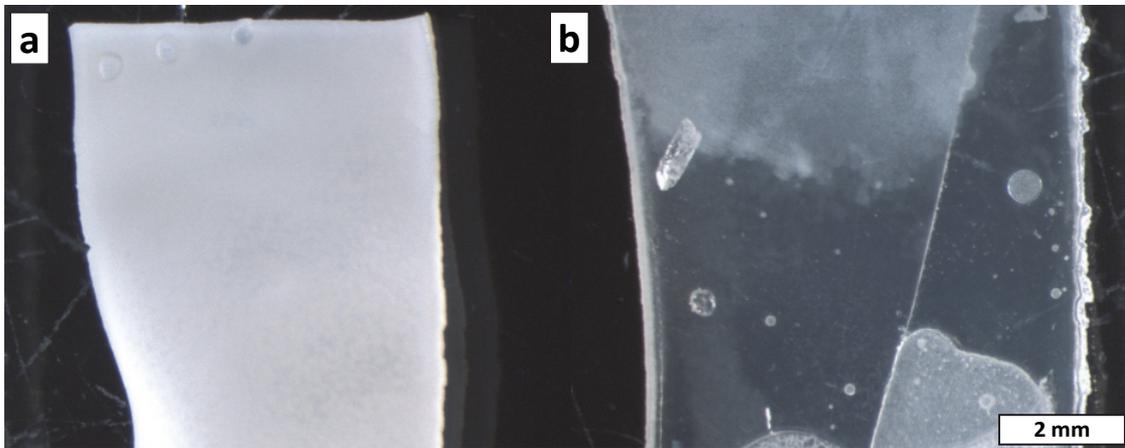


Abbildung 4.52 | (a) Bild eines getrockneten PDMA-I-TEG Netzwerks (1 Gew% TEG) nach 24 h in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) und (b) derselbe Film post-polymerisiert in der Monomermischung des Netzwerks.

Als Grund für die Abnahme der Steifigkeit werden die sich bei der Trocknung der Komposite bildenden Hohlräume zwischen den Nanostrukturen vermutet, da sich das Polymernetzwerk durch den Trocknungsprozess so weit zurückzieht, dass dieses die Sphären nicht mehr verbindet (**Abbildung 4.46a**). Da die ermittelten E-Module alle in einem ähnlichen Bereich wie die der CaCO_3 -Komposite liegen, ist davon auszugehen, dass auch hier die Last hauptsächlich durch die anorganischen Strukturen getragen wird. Aus diesem Grund wurden im Anschluss ebenfalls die post-polymerisierten Komposite untersucht. Als Nebeneffekt führt die Post-Polymerisation besonders im Fall des für 24 h calcifizierten PDMA-I-TEG Netzwerks (**Abbildung 4.52b**) dazu, dass die Komposite wiederum transparent werden. Die optische Güte ist dabei jedoch nicht so hoch, wie die der gequollenen Hybridmaterialien mit EDPOA. Der Transparenzeffekt ist stark abhängig von der Menge an CaP im Netzwerk vor der Post-Polymerisation. Netzwerke, die länger als 2 d mineralisiert wurden, gewinnen durch die Post-polymerisation nicht mehr merklich an Transparenz. Als Ursache für dieses Verhalten wird vermutet, dass die einzelnen Sphären durch die Quellung in der Monomermischung separiert und Agglomerate aufgelöst werden (**Abbildung 4.46c**), was bei zu großen Agglomeraten nicht mehr ohne weiteres gelingt. Wie bei den CaCO_3 -Kompositen zeigt auch hier die Post-Polymerisation einen positiven Einfluss auf die Mechanik der Komposite. Der höchste, ermittelte E-Modul des post-polymerisierten, 7 d mineralisierten PDMA-I-TEG Netzwerks liegt mit 1971 ± 595 MPa zwar tendenziell etwas höher als der des reinen Netzwerks, allerdings war der Verstärkungseffekt nicht so groß wie bei den CaCO_3 -basierten

Kompositen mit Nadelkristallstruktur, die im trockenen Zustand einen E-Modul von bis zu 3500 MPa aufweisen.

4.3 Enzyminduzierte Silifizierung von Hydrogelen

Als weiteres Material zur intrinsischen Mineralisierung von Polymer-Netzwerken bieten sich Silikate an. Diese liegen in der Natur im Gegensatz zu CaCO_3 und CaP in einer stabilen amorphen Form vor und sollten sich daher sehr gut für die homogene Mineralisierung von Polymernetzwerken eignen. Ideengeber für einen möglichen Mechanismus ist die biologische Silikatabscheidung (Biosilifizierung) verschiedener mariner Organismen. Diese sind in der Lage z.T. sehr eindrucksvolle Gebilde²³⁷ aus im Meerwasser gelöster Kieselsäure zu bilden (**Abbildung 2.2c**). Im Ozean liegt Kieselsäure in sehr geringen Konzentrationen von etwa $70 \mu\text{M}$ vor.²³⁸ Diatomeen (Kieselalgen), Radiolarien (Strahlentierchen) und Kieselschwämme besitzen die Fähigkeit diese aufzukonzentrieren und so Skelette aus hydratisiertem Siliziumdioxid ($\text{SiO}_2 \cdot x \text{H}_2\text{O}$) zu bilden, die ihnen als strukturgebende Elemente dienen.²³⁹ Kieselschwämme sind zudem in der Lage sogenannte Spiculae (Kieselnadeln) zu erzeugen, die sie vor Fressfeinden schützen.¹⁸ Die Synthese dieses amorphen Silikats erfolgt unter physiologischen Bedingungen (0 bis 37°C) und wird dabei durch verschiedene Proteine gesteuert.²⁴⁰

Grundsätzlich werden bei der Bildung zwischen einem biokatalytischen und einem Protein unterstützten Vorgang, an dem die Silikat-Ausfällung durch Amino-Gruppen und geladene Gruppen induziert wird, unterschieden.²⁴⁰ Bei letzterem sind insbesondere sogenannte Silaffine beteiligt. Diese phosphorylierten Peptide mit Oligopropylamin-Seitengruppen (4 bis 9 Wiederholungseinheiten) sind durch elektrostatische Wechselwirkungen in der Lage die Präzipitation von Silikaten auszulösen.

Die biokatalytische Kondensation von Kieselsäure wäre für die intrinsische Silifizierung eines Polymernetzwerkes, nach dem Vorbild der bereits vorgestellten Calcifizierungssysteme, besser geeignet. In verschiedenen Arbeiten konnten dazu sogenannte Silikateine isoliert werden, die z.B. im Kieselschwamm (*Tethya aurantia*) für den schichtartigen Aufbau der Kieselnadelhülle verantwortlich sind.²⁴⁰ Diese bestehen aus 3 Untereinheiten, die α -, β -, und γ -Silikatein genannt werden und besitzen jeweils Molekulargewichte zwischen 27 und 29 kDa.²⁴¹ α -Silikatein katalysiert die Kondensation von Silikatderivaten ohne Notwendigkeit eines Cofaktors. Zudem weist es strukturelle Ähnlichkeiten zu der Peptidase Cathepsin auf.²⁴² Unglücklicherweise ist Silikatein bis heute ohne wirtschaftliche Bedeutung und daher nicht kommerziell erhältlich. Diesem Fakt geschuldet wurden Alternativen zum Silikatein gesucht. In einer Vielzahl von Untersuchungen zur Interaktion von Proteinen und Silikaten konnten verschiedene kommerziell erhältliche Proteine

identifiziert werden, die eine Wirkung auf die Silikatabscheidung aus wässriger Lösung haben.^{83, 243-246} Dabei sind insbesondere Papain, Trypsin, Proteinase K²⁴⁴, Lysozym und Rinderserumalbumin (BSA)²⁴⁵ von Bedeutung. Papain, Trypsin und Proteinase K weisen als Proteasen eine gewisse Verwandtschaft mit Cathepsin auf, welches dem Silicatein ähnlich ist, was eine mögliche katalytische Wirkung vermuten lässt. Lysozym und BSA hingegen folgen aufgrund ihres Aufbaus eher dem Prinzip der Silaffine. Des Weiteren konnte eine Ausfällung von SiO₂ auch durch Polyamine, wie Polylysin oder -arginin induziert werden.²⁴⁶

4.3.1 Silifizierung in Lösung

Um auf Basis der laut Literatur geeigneten Proteine eine Silifizierung in wässriger Lösung zu induzieren, ist es zuerst notwendig ein geeignetes Substrat-System zu finden. Die gerne in der Sol-Gel-Chemie verwendeten Alkoxysilane Si(OR)₄ sind für diesen Zweck ungeeignet, da diese in Wasser nahezu unlöslich sind²⁴⁷ und nur in einem Gemisch aus Ethanol und Wasser gelöst werden können. Um 1 Gew% Tetraethoxysilan zu lösen sind mindestens 16 Gew% Ethanol notwendig. Diese Menge Ethanol reicht jedoch aus, um nahezu jedes Enzym zu denaturieren. Aus diesem Grund wurde auf eine Natriummetasilicat-Lösung (Wasserglas) zurückgegriffen in der Kieselsäure in stabilisierter Form in Wasser gelöst vorliegt. Da Wasserglas sehr hoch konzentriert ist, wurde es mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Durch den dabei sinkenden pH-Wert werden die Silikate jedoch destabilisiert und beginnen zu gelieren (**Abbildung 4.53**).

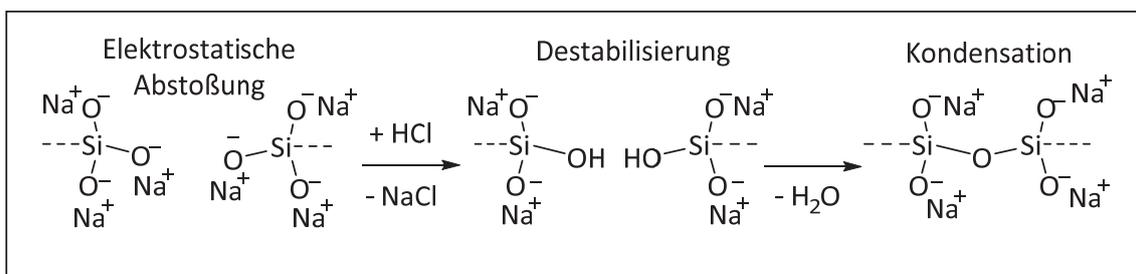


Abbildung 4.53 | Schematische Darstellung der elektrostatischen Stabilisierung von Natriumsilikaten in wässriger Lösung bei hohen pH-Werten sowie Destabilisierung und Kondensation durch Verringerung des pH-Wertes.

Um die Stabilität der Lösung zu untersuchen, wurde eine Konzentrationsreihe von 100 mM bis 6 mM Silikat hergestellt. Dabei zeigte sich, dass Lösungen mit einer Konzentration von 50 mM Silikat oder weniger über mehrere Tage nicht gelieren, während höhere Konzentrationen innerhalb eines Tages ein Gel ausbilden.

Der pH-Wert der hergestellten Lösungen befindet sich je nach Verdünnung in einem Bereich von 10 bis 11. Da dieser pH-Bereich für die meisten der untersuchten Enzyme außerhalb ihres Arbeitsbereichs liegt, wurden zudem Lösungen mit einem pH-Wert von 7 durch Zugabe von HCl hergestellt, wodurch eine Gelbildung deutlich schneller erfolgt. Die 100 mM Silikat-Lösung zeigt

nach wenigen Minuten eine Gelierung und auch die zuvor stabile Lösung mit einer Konzentration von 50 mM gelierte innerhalb von 24 h. Lösungen mit weniger als 30 mM Silikat bildeten trotz des niedrigen pH-Wertes für mehrere Tage kein Gel.

Um den Effekt der Proteine auf die Silikatausfällung zu untersuchen, wurde jedes der untersuchten Proteine (**Tabelle 4.6**) in je zwei 10 mM- Silikat -Lösungen (pH 7 und 10) gegeben. Die neutral bis leicht basischen pH-Werte wurden gewählt, um eine unterhalb von pH 7 bevorzugt ablaufende Gelbildung der Silikate zu verhindern und eine partikuläre Ausfällung zu bevorzugen (**Abbildung 4.61**). Dazu wurden jeweils 1 mg des Proteins in 10 ml Lösung gegeben. Die beobachteten Ergebnisse sind in **Tabelle 4.6** aufgelistet. Die Lösungen mit Trypsin, Proteinase K und Rinderserumalbumin (BSA) sind 24 h unverändert klar und flüssig. Lysozym und Papain hingegen führen zu einer Trübung der Lösung, die von einem feinpartikulären Niederschlag verursacht wird (**Abbildung 4.54**). Beim direkten Vergleich der Silikat-Lösungen mit Papain und Lysozym zeigt sich, dass die Trübung beim Papain nur sehr schwach ausgeprägt ist, wohingegen Lysozym sowohl bei pH 7 als auch pH 10 einen deutlich erkennbaren Niederschlag verursacht.

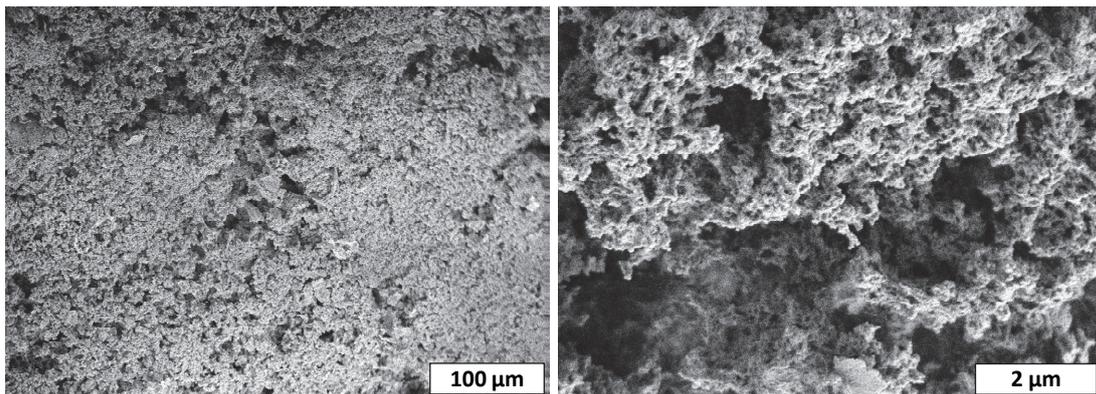


Abbildung 4.54 | REM-Aufnahmen des ausgefällten Feststoffs nach Zugabe von Lysozym in eine 10 mM Silikat-Lösung.

Das beobachtete Verhalten von Lysozym und Papain stimmt mit der Literatur überein. Im Falle von BSA wird eine Silikat-Ausfällung nur für saure pH-Werte und nicht für neutrale beschrieben, was ebenfalls den Beobachtungen entspricht.²⁴⁵ Eine in der Literatur beschriebene Ausfällung von Silikaten in Anwesenheit von Proteinase K und Trypsin konnte jedoch nicht beobachtet werden.²⁴⁴

Oft wird in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der Ausfällung von SiO_2 und dem Ladungszustand der Proteine beschrieben, der über den isoelektrischen Punkt (pI) der Moleküle in Lösung charakterisiert werden kann. Nach dem Vorbild der Silaffine können vor allem positive Ladungen eine Ausfällung von Silikaten begünstigen. Davon ausgehend sollte der pI daher möglichst hoch sein, um durch eine positive Nettoladung der Polypeptide bei neutralem oder leicht basischem pH-Wert eine Ausfällung zu erreichen.²⁴⁴ Betrachtet man die pI der untersuchten Proteine (**Tabelle 4.6**) so fällt auf, dass eine Trübung der Silikat-Lösungen von Proteinen mit einem pI größer 9,6

ausgelöst wird, was für eine positive Nettoladung der Polypeptide im untersuchten pH-Bereich spricht. Allerdings lässt dies auch vermuten, dass die Ausfällung nicht durch die angestrebte Katalyse der Silanol-Kondensation, sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den Proteinstrukturen erfolgt.

Tabelle 4.6 | Auflistung der untersuchten Proteine für eine proteininduzierte Ausfällung von SiO₂ in einer 10 mM Natriumsilikat-Lösung mit ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (pI) und der beobachteten Trübung der Lösung durch Zugabe des jeweiligen Polypeptids nach 24 h.

Enzyme	pI ²⁴⁴	pH-Optimum ²⁴⁸	Silikatlösung
Lysozym <i>Hühnereiklar</i>	11,0	5-7	Starke Trübung
Trypsin <i>Schweine Pankreas</i>	10,5	7,5-8,5	Keine Trübung
Proteinase K <i>Tritirachium album</i>	8,9	6,7-7,4	Keine Trübung
Papain <i>Carica papaya</i>	9,6	5-8	Schwache Trübung
Rinderserumalbumin (BSA)	4,8	-	keine Trübung

Die Präzipitation von Silikaten sollte zudem durch das Vorhandensein von freien Phosphaten in der Lösung verstärkt werden können.²⁴⁴ Aus diesem Grund wurde eine wässrige Lösung mit 10 mM Silikat und 40 mM Glucose-6-Phosphat (G6P) hergestellt und diese auf pH 7 eingestellt. Die Lösung ist klar und trübt auch nach 24 h nicht sichtbar ein. In jeweils 10 ml der Lösung wurden je 1 mg Lysozym, Lysozym und alkalische Phosphatase (AP) oder nur AP gegeben. Die Proben sind, kurz nach der Zugabe der Proteine, in **Abbildung 4.55** dargestellt. Auf der Aufnahme ist zu erkennen, dass die Lösung mit Lysozym als Referenz wie zuvor ohne G6P eintrübt ist. Zudem scheint die AP katalysierte Hydrolyse des G6P und die daraus resultierende Freisetzung von Phosphat bereits auszureichen, um ebenfalls einen Niederschlag zu induzieren. AP in einer Silikat-Lösung ohne G6P führte zu keiner Trübung. Durch Kombination der beiden Enzyme kann die Geschwindigkeit sowie die Intensität des Niederschlags allerdings noch einmal deutlich gesteigert werden.

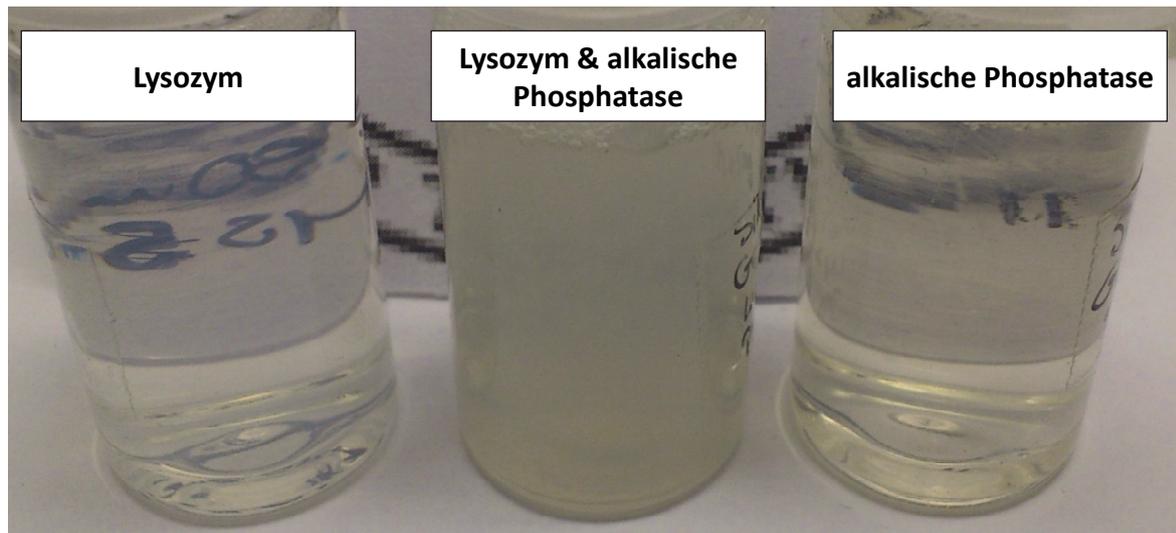


Abbildung 4.55 | Bilder von 3 Silikat/Glycerol-6-Phosphat-Lösungen (10 mM / 40 mM) kurz nach der Zugabe von nur Lysozym (links), Lysozym und alkalischer Phosphatase (Mitte) sowie nur alkalischer Phosphatase (rechts).

4.3.2 Silifizierung im Netzwerk

Nachdem im Vorkapitel mehrere potentielle Enzyme ermittelt werden konnten, die für die Silifizierung eines Polymernetzwerks in Frage kommen, ist das Ziel im nächsten Schritt diese in verschiedenen Polymernetzwerken zu immobilisieren und diese Filme im Anschluss zu silifizieren. Aus den Vorversuchen in Lösung geht hervor, dass Lysozym der vielversprechendste Kandidat zur Ausfällung von SiO_2 in einer Wasserglaslösung ist, weshalb versucht werden soll dieses in einem Netzwerk zu immobilisieren.

Dazu wurden die bei der Calcifizierung erfolgreich eingesetzten Netzwerke Poly-2-Hydroxyethylacrylat -linked by- Tetraethylglycoldimethacrylat (PHEA-/TEG, 1 Gew% TEG), Poly-N,N-Dimethylacrylamid-/TEG (PDMA-/TEG, 1 Gew% TEG) verwendet. In den Monomermischungen können bis zu 5 Gew% Lysozym gelöst werden. Aus diesen wurden Filme mit 0,1, 1, 2, 3,5 und 5 Gew% immobilisiertem Enzym sowie ohne Lysozym hergestellt und jeweils in 10 ml einer wässrigen Natriumsilikat-Lösung (50 mM, pH 7) überführt. Es zeigte sich nach 24 h, dass alle Lysozym-beladenen PHEA-/TEG und PDMA-/TEG Filme optisch trüb waren (**Abbildung 4.56a**). Dabei wurden die Filme mit zunehmender Lysozym-Menge im Netzwerk opaker. Der PHEA-/TEG Film ohne Lysozym blieb hingegen vollständig klar, wohingegen das PDMA-/TEG Netzwerk ohne immobilisiertes Enzym bereits eine minimale Eintrübung zeigte, die jedoch deutlich schwächer als die Trübung der Filme mit Lysozym ausfiel. Letzteres deutet darauf hin, dass auch Amid-Funktionen bereits in der Lage sind eine Ausfällung von Silikaten zu induzieren. Im Querschnitt der Netzwerke (**Abbildung 4.56b**) kann man jedoch erkennen, dass eine Abscheidung von Silikat ausschließlich auf der Oberfläche stattgefunden hat, was für die trübe Erscheinung der Filme verantwortlich ist. Dieser Eindruck konnte durch EDX-Messungen bestätigt werden (**Abbildung 4.56c**), bei denen

Silizium nur an den Oberflächen detektiert werden konnte. TGA-Messungen zur Quantifizierung des anorganischen Anteils lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse, da die anorganischen Mengen extrem gering waren (< 3 Gew%).

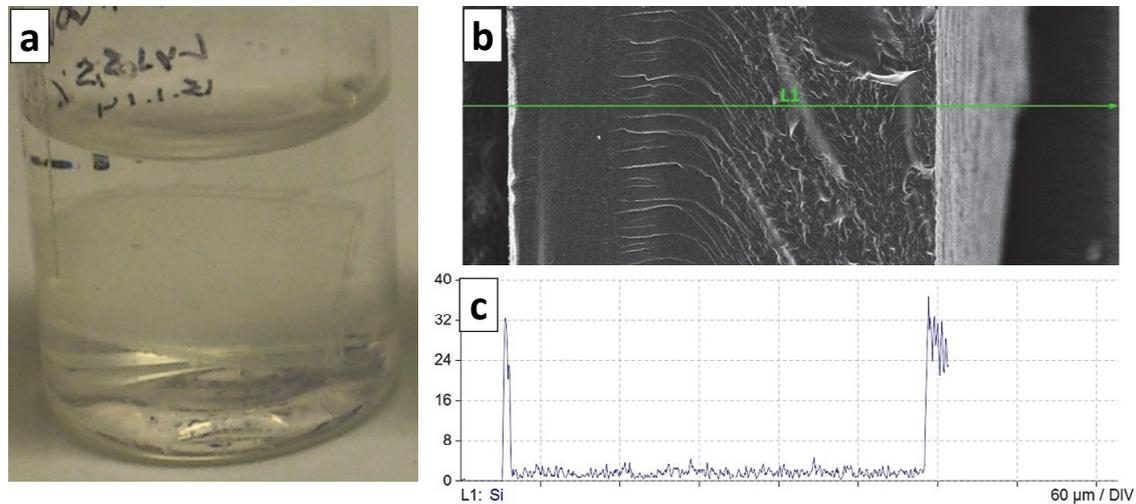


Abbildung 4.56 | (a) Foto eines PHEA-I-TEG Netzwerks (1 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Lysozym in einer 50 mM Natriumsilikat-Lösung (pH 7) nach 24 h. (b) REM-Aufnahme des Querschnitts des getrockneten Films, der in flüssigen Stickstoff gebrochen wurde mit dem zugehörigen (c) Silizium-EDX-Linescan. Die grüne Linie in (b) zeigt den mittels EDX vermessenen Bereich an.

Die Ausfällung übersättigter Lösungen an einer Grenzfläche ist ein typisches Verhalten, da an Oberflächen affine Bindungen vorliegen, die Abscheidungs- und Keimbildungsprozesse begünstigen, was in diesem Fall durch das wahrscheinlich vorhandene Lysozym an der Grenzfläche noch verstärkt wird. Aus diesem Grund findet auch bei klassischen Methoden zur Mineralisierung von Hydrogelen die Ausfällung gelöster Bestandteile bevorzugt an der Grenzfläche der Netzwerke statt. Dies führt meist zu einer dichten Schicht, die eine weitere Diffusion gelöster Stoffe in das Netzwerk verhindert. Dieser Effekt konnte bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Calcifizierung dadurch minimiert werden, dass eine Komponente zur Bildung des schwerlöslichen Salzes erst innerhalb des Hydrogels erzeugt wurde (siehe **Kapitel 4.1 und 4.2**). Bei der Silifizierung wird der Vorgang jedoch durch die gezielte Indizierung der Kondensation von nur einer Komponente (Silikat) hervorgerufen, weshalb in diesem Fall der Einfluss der Netzwerkoberfläche eine Silifizierung des Netzwerkinneren erschwert.

Um die Bildung einer dichten Grenzschicht zu verhindern, wurden die Netzwerke noch einmal in geringer konzentrierten Lösungen mit 25, 12,5 und 6,25 mM Silikat silifiziert. Es wurde erwartet, dass sich die allgemeine Geschwindigkeit der Ausfällung verringert, wodurch die Bildung einer dichten, diffusionshemmenden Grenzschicht verlangsamt sowie eine verbesserte Mineralisation im Bulk des Netzwerks erreicht wird. Bei den Filmen, die in einer 25 mM Silikat-Lösung eingelegt wurden, zeigt sich kein Unterschied in der Mineralisierung zu der 50 mM Lösung. Bei

Konzentrationen von 12,5 mM und weniger konnte nach 24 h unabhängig von der Enzymmenge im Netzwerk jedoch gar keine Silifizierung, weder innerhalb der Filme noch auf der Oberfläche, mehr nachgewiesen werden.

Um die Ausfällung von SiO₂ im Lysozym-beladenen Film zu verbessern, wurde im nächsten Schritt versucht, zusätzlich Phosphat-Ionen im Netzwerk zu erzeugen. Dazu wurde aufgrund der geringen Aktivität der AP in HEA-basierten Netzwerken (siehe **Kapitel 4.2.1**) nur das PDMA-/TEG Netzwerk untersucht. Dieses wurde mit 2 Gew% Lysozym sowie 0,5 bzw. 1 Gew% AP beladen. In 10 ml einer wässrigen 50 mM Silikat-Lösung, die außerdem eine Konzentration von 40 mM G6P enthielt, wurde je ein Film gegeben. Nach 1 h konnte eine erste Trübung der Filme beobachtet werden. Diese ist jedoch vergleichbar mit den Filmen ohne AP. Allerdings führt die Freisetzung von Phosphat anscheinend zur Ausbildung eines Niederschlags in der Silifizierungslösung. Nach 24 Stunden konnte zudem unabhängig von der AP-Menge eine Gelierung des Mediums beobachtet werden, da der pH-Wert durch die Freisetzung des Phosphates verringert wird. Der Versuch diese Gelierung zu verhindern, indem die Substratlösung während der Silifizierung alle 30 Minuten ausgetauscht wurde, verlief zwar erfolgreich, allerdings kann auch bei diesen Filmen keine verbesserte Mineralisation im Inneren der Netzwerke festgestellt werden.

4.3.3 Einbau ionischer Gruppen und Vorbeladung der Netzwerke

Es deutet vieles darauf hin, dass Lysozym nicht die Kondensation der Silikate katalysiert, sondern die Ausfällungen nur durch elektrostatische Wechselwirkungen der Proteinstruktur induziert werden. Um dies zu überprüfen, wurde ein Modell-Netzwerk hergestellt in dem kein Lysozym immobilisiert, dafür jedoch quartäre Ammoniumgruppen in ein PDMA-/TEG Netzwerk durch Polymerisation von 2-(Methacryloyloxyethyl)trimethylammoniumchlorid (QuAAc) mit 1 Gew% TEG als Vernetzer (PQuAAc-/TEG) eingebaut wurden. Durch die Verwendung des ionischen QuAAc wurde zudem eine verstärkte Quellung des Filmes erwartet, wodurch zum Start der Mineralisierung zudem mehr Substratlösung in das Netzwerk befördert werden sollte, was die Silifizierung evtl. weiter verbessern könnte.

Bei der Herstellung des Netzwerks wurden 25 Gew% DMA durch QuAAc ersetzt. Der durch UV-Licht polymerisierte Film wurde erneut in eine 50 mM Silikat-Lösung (pH 7) gegeben. Nach wenigen Minuten war eine starke Quellung ($S \approx 200$) des PDMA-/TEG mit QuAAc zu beobachten (PDMA-/TEG: $S = 6$). Nach 24 Stunden in der Lösung wurde ein deutlich getrübtetes Netzwerk mit einigen Agglomeraten auf der Oberfläche vorgefunden (**Abbildung 4.57**). Im Querschnitt des Filmes zeigt sich jedoch, dass auch hier keine Mineralisation im Inneren der Netzwerke, sondern nur auf der Oberfläche stattgefunden hat. Die Ergebnisse der Silifizierung des PDMA-/TEG mit QuAAc

Netzwerks unterscheiden sich daher kaum von den Ergebnissen der mit Lysozym beladenen Netzwerke. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass quartäre Ammoniumgruppen allein bereits ausreichen, um SiO_2 aus der Lösung auszufällen. Dies bestätigt die Vermutung, dass Lysozym nur durch elektrostatische Wechselwirkungen eine Silikatabscheidung induziert.

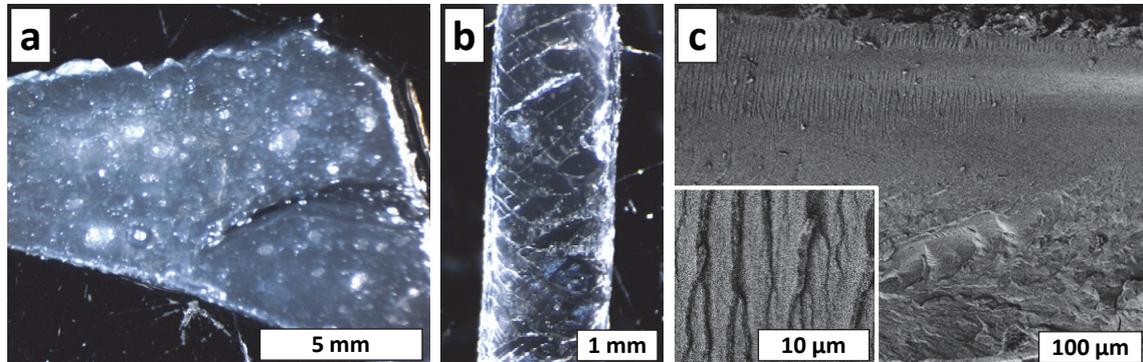


Abbildung 4.57 | Die Bilder zeigen ein PDMA-I-TEG Netzwerk mit 25 Gew% QuAAc (ohne Lysozym) nach Lagerung in einer 50 mM Natriumsilikat-Lösung (pH 7) bei RT für 24 h. Die mikroskopischen Aufnahmen (a) und (b) zeigen den gequollenen Film in der Draufsicht und im Querschnitt. Die REM-Aufnahmen (c) zeigen den Querschnitt des getrockneten Films nach Brechen in flüssigem Stickstoff bei verschiedenen Vergrößerungen.

Bis hierhin wurden verschiedene Möglichkeiten gefunden eine Ausfällung von SiO_2 zu ermöglichen, die jedoch für eine Bulk-Mineralisation nicht erfolgreich waren. Dies lässt vermuten, dass die Hauptproblematik bei der Silifizierung eines Hydrogels im Transport der gelösten Silikate über die Grenzfläche des Netzwerks hinweg in die Bulk-Phase besteht, ohne zuvor bereits auszufallen. Um diese Schwelle zu überwinden wurden PDMA-I-TEG Netzwerke hergestellt, die bereits Kieselsäure enthalten. Dazu wurde vor der Polymerisation reine Kieselsäure in Pulverform in der Monomermischung gelöst und diese dann unmittelbar UV-polymerisiert. Um keine vorzeitige Ausfällung der Kieselsäure zu verursachen, wurde für diesen Reaktionsansatz kein Wasser und kein Lysozym zugegeben, sondern stattdessen 25 Gew% des DMA durch QuAAc ersetzt. Es zeigte sich, dass sich bis zu 15 mg Kieselsäure leicht in 100 mg Monomermischung lösen lassen. Nach der Zugabe des fertigen Polymers in eine 50 mM Natriumsilikatlösung (pH 7) trübten die Netzwerke nach wenigen Minuten ein. Nach 24 h zeigte das Netzwerk eine deutliche Trübung (**Abbildung 4.58a und b**), die mit keinem der anderen Netzwerke zuvor erreicht wurde. Diese war nicht nur oberflächlich, sondern zog sich ebenfalls durch den Querschnitt. Auf den REM-Aufnahmen der Bruchfläche des Netzwerks (**Abbildung 4.58c und d**) sind deutlich Strukturen von einigen Mikrometern im Bulk erkennbar, die über eine feinporöse Unterstruktur ähnlich dem amorphen CaP verfügen. Mit Hilfe der TGA konnte ein anorganischer Anteil von 12 Gew% im Film ermittelt werden, der jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die Mechanik hat. Zum Vergleich wurde ein mit Kieselsäure beladenes Netzwerk für 24 h in reines Wasser eingelegt. Der dabei erzeugte Film zeigte keine Unterschiede gegenüber dem in 50 mM Silikatlösung mineralisierten Film. Dies

verdeutlich noch einmal die Problematik, dass eine Diffusion von Kieselsäure über die Grenzfläche des Netzwerks praktisch nicht möglich zu sein scheint, da die Anwesenheit funktioneller Gruppen einen schnellen Ausfall in Lösung befindlicher Silikate induzieren. Dies lässt schlussfolgern, dass es auf die untersuchte Weise nicht möglich ist ein Netzwerk in hohem Umfang mit Hilfe eines elektrostatisch induzierten Abscheidungsmechanismus zu mineralisieren. Um eine direkte Enzym-induzierte Silifizierung eines Hydrogels nach dem Vorbild von CaCO_3 und CaP zu ermöglichen, ist daher der aktuellen Erkenntnis nach ein die Kondensation von Silikat katalysierendes Enzym wie Silikatein in einem für die Silikat-kondensation inerten Netzwerk wie z.B. PHEA-*l*-TEG unumgänglich.

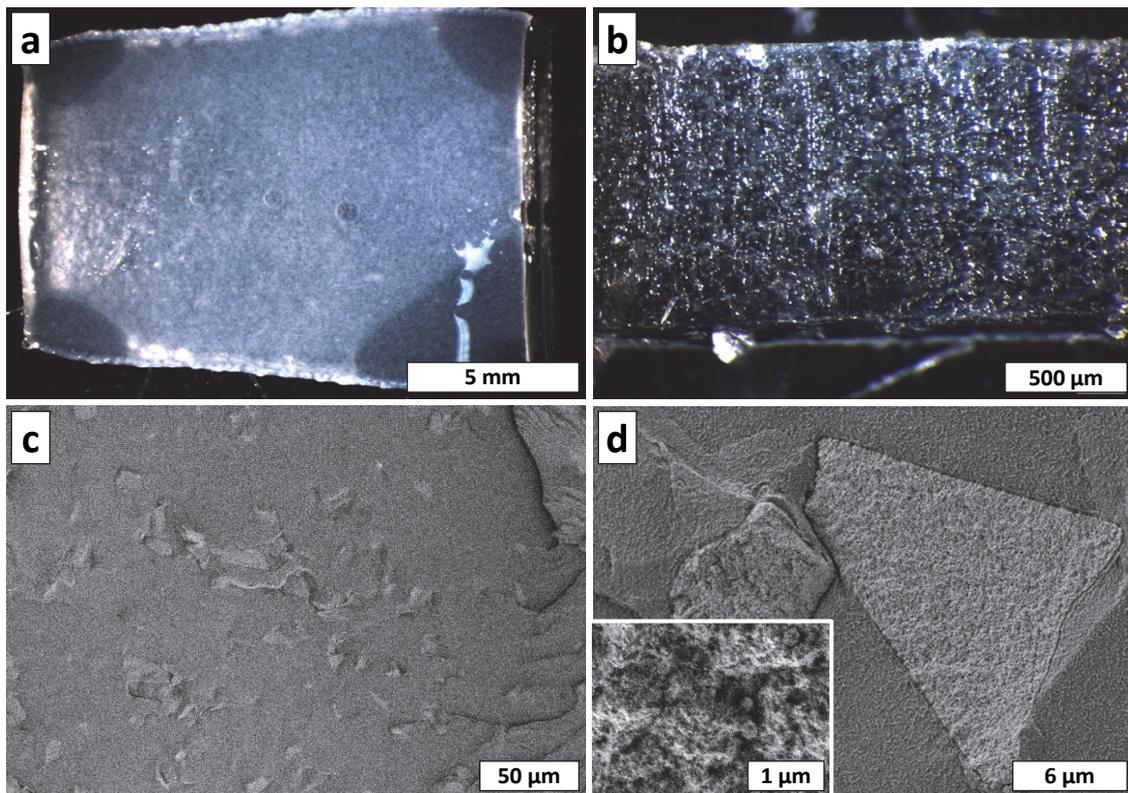


Abbildung 4.58 | Die Stereomikroskop-Bilder zeigen (a) die Draufsicht und (b) den Querschnitt eines mit 5 Gew% Kieselsäure vorbeladenen, PDMA-*l*-TEG Netzwerks mit 25 Gew% QuAAc, eingelegt in eine 50 mM Silikat-Lösung mit pH 7 bei RT nach 24 h. Die REM-Aufnahmen (c) und (d) stellen den Querschnitt des getrockneten Filmes in verschiedenen Vergrößerungen dar.

4.4 Kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen mit Lotus-Effekt

Die Modifizierung hydrophober Polymeroberflächen, wie Silikon oder organischer Kunststoffe, mit kontaktaktiv-antimikrobiellen Wirkstoffen geht aufgrund ihrer polaren Gruppen in der Regel mit dem Verlust ihrer hydrophoben Eigenschaften einher. Es sind zudem nur wenige kontaktaktiv-antimikrobiell wirksame Verbindungen bekannt, die nach einer Beschichtung zu einer hydrophoben Oberfläche führen können. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung von Substanzen, wie 3-Trimethoxysilylpropyldimethyloctadecylammoniumchlorid, welches auch unter dem Handelsnamen DOW 5700 bekannt ist (**Abbildung 4.59**).

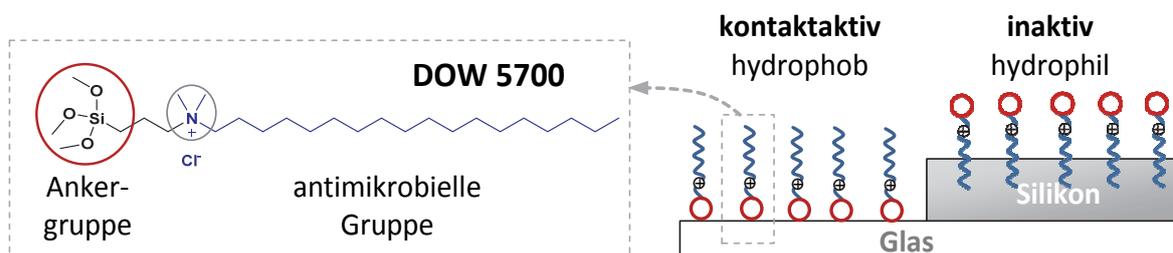


Abbildung 4.59 | Chemische Struktur von 3-Trimethoxysilylpropyldimethyloctadecylammoniumchlorid (DOW 5700) mit der Funktion der Molekülteile sowie die schematische Anlagerung der Moleküle auf Glas- und Silikonoberflächen.

Die kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung dieses Stoffes ist bereits seit Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts bekannt und für diesen Einsatzzweck erprobt und zugelassen.²⁴⁹ Es besitzt ein breites Wirksamkeitsspektrum gegen verschiedene Keime und ist besonders effektiv z.B. gegen *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).²⁵⁰ Das Molekül besteht zum einen aus einer Ankergruppe, die eine Anbindung an Silikat-Oberflächen ermöglicht und zum anderen aus einer antimikrobiellen Gruppe, bei der eine lange Alkylkette die positive Ladung des quartären Ammonium-Ions wirksam abschirmt. Durch eine Beschichtung von hydrophilem Glas mit DOW 5700, wird durch den Aufbau des Moleküls eine hydrophobe Oberfläche erzeugt, die in der Lage ist Mikroorganismen bei Kontakt abzutöten. In der Theorie stellt diese Verbindung eine optimale Möglichkeit dar, um auch hydrophobe Oberflächen, wie Silikon, antimikrobiell auszustatten. Dies wurde in Rahmen der Diplomarbeit von Frau LINDA BEN LARBI untersucht.²⁵¹ Dabei bestätigte sich, dass nur durch eine aufwändige und in der Praxis schwer durchführbare Vorbehandlung der Oberfläche, wie eine Oxidation des Silikons durch ein Argon-Plasma, eine Bindung des DOW 5700 an die Oberfläche erreicht werden konnte, wie sie z.B. von GOTTENBOS durchgeführt wurde.²⁵² Ohne diese Behandlung konnte nach dem Aufbringen von DOW 5700 auf Silikon keine antimikrobielle Wirkung festgestellt werden und die Oberfläche wurde zudem hydrophiler als die des nicht beschichteten Silikons. Als Grund für dieses Verhalten wird die Anlagerungscharakteristik des DOW 5700 auf der Oberfläche vermutet (**Abbildung 4.59**). Da der Wirkstoff einen amphiphilen Charakter aufweist, lagert er sich auf Glas mit der hydrophileren Anker-Gruppe in Richtung des Substrats an, worauf eine kovalente

Bindung an die Oberfläche unter Methanolabspaltung erfolgen kann. Auf hydrophoben Oberflächen, wie Silikon, findet jedoch genau der inverse Fall statt. Dabei dringt der chemisch ähnliche, hydrophobe C₁₈-Rest der antimikrobiellen Gruppe in die Oberfläche ein, weshalb die hydrophile Anker-Gruppe von der Oberfläche weg zeigt. Da die antimikrobielle Gruppe so in das Material zeigt, ist eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung nicht mehr gegeben. Aus diesem Grund werden solche Verbindungen bis heute nicht kommerziell zur antimikrobiellen Ausstattung hydrophober Polymeroberflächen verwendet.

Um DOW 5700 doch auf Silikon verwenden zu können, wurde ein neues Konzept verfolgt, bei dem die Silikonoberfläche nicht direkt modifiziert, sondern zuerst SiO₂-Nanopartikel mit DOW 5700 beschichtet werden sollten. Diese können dann im Anschluss auf das Silikonsubstrat appliziert werden. Da zwischen SiO₂-Nanopartikel und Glas chemisch gesehen kein Unterschied besteht, sollte die Oberfläche der Partikel mit DOW 5700 antimikrobiell funktionalisierbar sein. Wie in **Abbildung 4.60** skizziert, sollte die DOW 5700 Schicht auf den Partikeln zwei Aufgaben übernehmen. Einerseits führt die der Silikonschicht zugewandten Seite dazu, dass die Partikel aufgrund hydrophober Wechselwirkungen gut auf der Oberfläche haften sollten. Die Partikel könnten so nicht einfach abgespült werden und die Beschichtung sollte auch gegen mechanischen Abrieb resistenter sein. Andererseits erhält die der Oberfläche abgewandte Partikelseite weiterhin die kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung des DOW 5700. Zudem wird durch die Partikelschicht die wirksame Oberfläche vergrößert, was eine verbesserte antimikrobielle Wirkung zur Folge haben sollte. Aufgrund der durch die Schicht verursachten topografischen Strukturierung, abhängig von Partikelgröße und -anordnung, könnte die Beschichtung neben einer durch die Hydrophobie verursachten mikroorganismenabweisenden Wirkung ebenfalls einen Lotus-Effekt aufweisen.

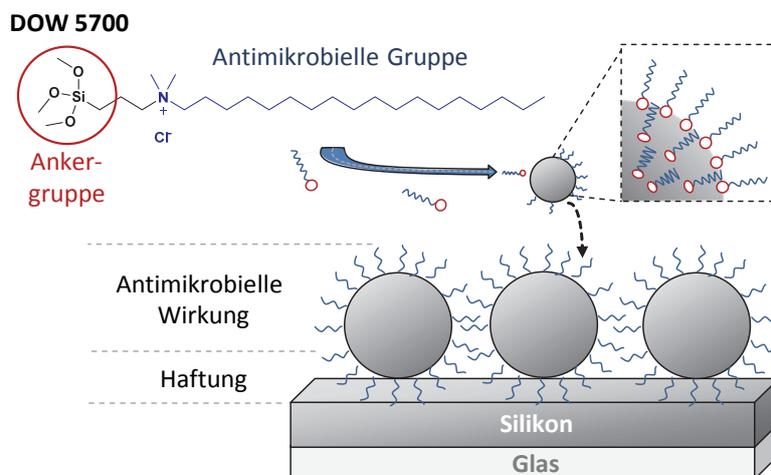


Abbildung 4.60 | Konzept der Wirkungsweise von DOW 5700 funktionalisierten SiO₂-Nanopartikeln auf einer Silikonoberfläche. Die Partikelbeschichtung zeigt eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung, auf der Oberfläche abgewandten und eine Haftwirkung auf der zugewandten Seite.

Der Versuch einer Beschichtung von SiO₂-Nanopartikeln mit DOW 5700 wurde bereits in der Literatur von SONG et al.²⁵³ beschrieben. Die funktionalisierten Partikel wurden darin hergestellt ohne das Potential zur antimikrobiellen Ausstattung hydrophober Oberflächen erkannt zu haben, weshalb die Partikel nur auf Glasoberflächen untersucht wurden. Zudem konnte von SONG anhand der aufgeführten Ergebnisse keine wirkliche Funktionalisierung der Partikel nachgewiesen werden, vor allem, da nach der Synthese durch eine Aufreinigung der Partikel mit Wasser keine Abtrennung des überschüssigen DOW 5700 erfolgte. Zum Test der antimikrobiellen Wirksamkeit wurde dann die Mischung aus SiO₂-Nanopartikeln und freiem Wirkstoff auf eine Glasoberfläche aufgebracht, wobei das DOW 5700 auf dieser auch alleine wirksam ist. Auf diese Weise ist keine Differenzierung zwischen der antimikrobiellen Aktivität der modifizierten Partikel und der DOW 5700 Beschichtung auf dem Glas möglich. Auf Grundlage dieser Erkenntnis wurde ein eigenes Syntheseverfahren entwickelt mit dem DOW 5700 funktionalisierte Nanopartikel hergestellt werden können. Dieses wurde in Zusammenarbeit mit Herrn CHRISTOPH MÜLLER²⁵⁴, Frau SABINE RING²⁵⁵ und Frau SARAH BÖHLE²⁵⁶ im Rahmen ihrer Diplom- und Masterarbeiten entwickelt. Eine Zusammenfassung der Verfahren soll in den nächsten Unterkapiteln vorgestellt und die Ergebnisse der Untersuchungen diskutiert werden.

4.4.1 Partikelsynthese

Die Darstellung monodisperser SiO₂-Partikel erfolgte nach Vorlage einer von STÖBER *et al.* im Jahr 1968 beschriebenen Synthesevorschrift bei der Kieselsäurederivate, wie z.B. Tetraalkoxysilane (TEOS), unter kontrollierten Bedingungen kondensiert werden.²⁵⁷ Die dabei gebildeten Strukturen sind stark abhängig vom pH-Wert des Reaktionsgemisches. Unter sauren Bedingungen läuft die Kondensationsreaktion am langsamsten ab, wodurch es zur Bildung verzweigter SiO_x-Oligomere (Gelbildung) kommt. Im basischen Milieu stellt die Hydrolysereaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar, woraus ein homogenes Nanopartikelwachstum durch Bildung von Nanokeimen resultiert (**Abbildung 4.61**).²⁵⁸

Die Reaktion wurde daher in einem Gemisch aus Wasser, Alkohol (Ethanol oder Butanol) und Ammoniak als Katalysator durchgeführt, um das Partikelwachstum unter basischen Bedingungen zu begünstigen. Der Alkohol übernimmt dabei die Aufgabe eines Lösungsvermittlers, da TEOS in reinem Wasser nahezu unlöslich ist.²⁵⁹

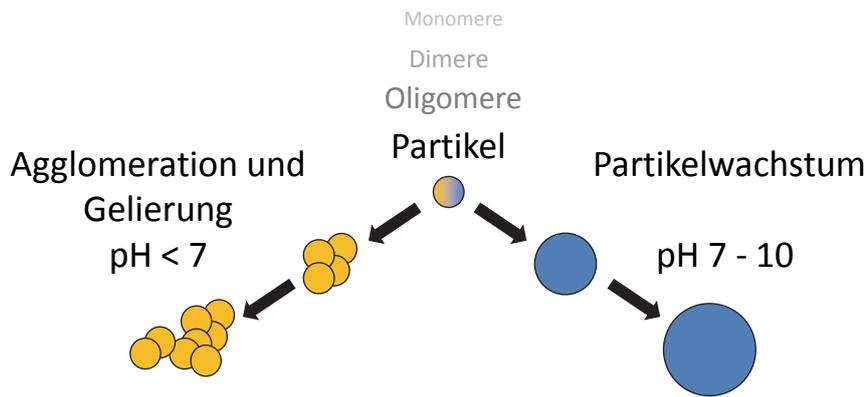


Abbildung 4.61 | Schematische Darstellung der sich durch Hydrolyse und Kondensation von TEOS bildenden SiO_2 -Strukturen in Abhängigkeit des pH-Werts. Nach BRINKER²⁴⁷.

Die Anwesenheit von OH^- -Ionen im Reaktionsgemisch führt zur Hydrolyse des monomeren Alkoxysilans unter Bildung einer reaktiven Silanolverbindung (**Abbildung 4.62a**). Dabei erfolgt der nukleophile Angriff eines OH^- -Ions am Silizium unter Abspaltung eines Alkohols. Die so gebildeten Spezies sind reaktiv und können über intermolekulare Reaktionen, sogenannte Siloxanbrücken, ausbilden. In diesem Kondensationsschritt greift die Silanolat-Gruppe ein anderes TEOS-Molekül an und bindet über eine Siloxanbindung unter Abspaltung eines Alkoholats (**Abbildung 4.62b**). Die dabei ablaufenden nukleophilen Angriffe auf das Silizium erfolgen nach einem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Mechanismus.²⁵⁹

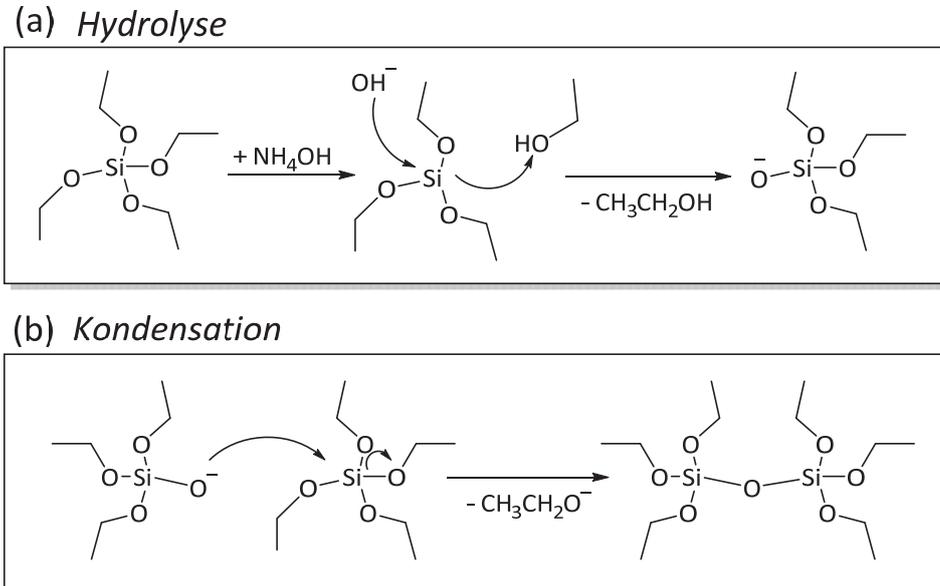


Abbildung 4.62 | (a) Hydrolyse- und (b) Kondensationsreaktion von Alkoxysilanen am Beispiel von Tetraethoxysilan (TEOS). Nach SEPEUR²⁶⁰.

Durch die fortschreitenden Hydrolyse- und Kondensationsreaktionen in der Lösung steigt im weiteren Verlauf der Anteil an gelösten Kieselsäurederivaten. Überschreiten diese eine kritische Grenze findet im übersättigten Medium eine spontane Keimbildung statt, wodurch es überall in der Lösung zu einer Bildung von Primärpartikeln mit einem Durchmesser von wenigen Nanometern

kommt. Durch diesen Vorgang sinkt die Konzentration der Kieselsäurederivate unter die kritische Löslichkeitsgrenze. Aufgrund der unter basischen Bedingungen langsamen Hydrolyse- und schnellen Kondensationsreaktion werden neu gebildete, hydrolysierte Spezies durch Anlagerung an bereits gebildete Keime schnell verbraucht. Die Konzentration an Kieselsäurederivaten kann so nicht mehr die kritische Löslichkeitsgrenze übersteigen, wodurch keine weitere Nukleation stattfinden kann und so ein homogenes Wachstum der Partikel resultiert. Die Deprotonierung der oberflächlichen Silanolgruppen unter basischen Bedingungen stabilisiert zudem die Partikel in der Lösung und führt zu einem elektrostatischen Abstoßungseffekt, der eine Agglomeration verhindert (**Abbildung 4.53**).²⁶¹⁻²⁶²

Die Eigenschaften der erhaltenen Partikel bezüglich Größe und Porosität werden stark von den gegebenen Reaktionsbedingungen, wie Rührgeschwindigkeit, Alkohol-, Katalysator- oder Wassergehalt, beeinflusst. Bereits geringe Schwankungen der Temperatur während der Reaktionsführung sowie die Charge des verwendeten Silans zeigen starke Auswirkungen auf die Größe und die Verteilung der erhaltenen Partikel.^{257, 263}

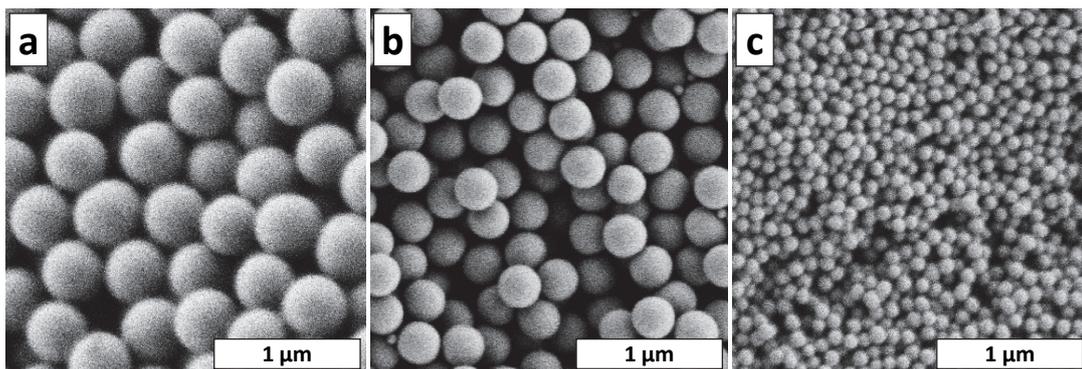


Abbildung 4.63 | REM-Aufnahmen der durch Stöbersynthese hergestellten, monodispersen SiO_2 -Partikel mit (a) 450 nm, (b) 300 nm und (c) 100 nm Durchmesser.

Bei den durchgeführten Synthesen wurden monodisperse Nanopartikel mit gemittelten Durchmessern von ungefähr 100 und 300 nm in Ethanol synthetisiert (**Abbildung 4.63b und c**). Dazu wurde TEOS in Ethanol zusammen mit einer wässrigen Ammoniaklösung bei Temperaturen zwischen 42 und 50 °C kondensiert (Ansätze siehe **Kapitel 6.12.1**). Durch Verwendung von Butanol statt Ethanol für die Stöbersynthese können monodisperse Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 450 nm erhalten werden (**Abbildung 4.63a**). In Butanol ist der Einfluss der Temperatur auf die Größe der Partikel geringer, da die Synthesen bei 42 und 50 °C zu gleich großen Partikeln geführt haben.

4.4.2 Partikelmodifizierung

Im Anschluss an die Synthese sollte die Oberfläche der hergestellten Nanopartikel mit DOW 5700 funktionalisiert werden, um kontaktaktiv-antimikrobiell wirksame Partikel zu erzielen. SiO₂-Partikel werden in der Regel vor einer Funktionalisierung zuerst aus der Reaktionslösung abgetrennt und gereinigt, da sich noch Reaktanden in und an den Partikeln befinden. Zudem besitzen die mittels Stöber-Synthese hergestellten Partikel keine dichte Struktur.²⁶⁴⁻²⁶⁵ Daher werden die Partikel oft im Anschluss bei Temperaturen von bis zu 1200 °C getempert, um sicherzustellen, dass möglichst alle Silanol- und Alkoxygruppen im Partikelinneren kondensiert sind und möglichst dichte Partikel entstehen. Das Tempern führt jedoch auch dazu, dass die für die Funktionalisierung notwendigen, oberflächlichen Silanolgruppen miteinander unter Wasserabspaltung kondensieren, wodurch diese nicht mehr für eine Modifizierung zur Verfügung stehen. Diese müssen dann in einem weiteren Vorgang, der sogenannten Rehydroxylierung wiederhergestellt werden.²⁶⁶⁻²⁶⁷ Zusätzlich entstehen dabei Partikelagglomerate, die aufwändig durch Dispergieren im Lösungsmittel vor der Rehydroxylierung sowie Funktionalisierung zerstört werden müssen.

Das Tempern und die Rehydroxylierung der Partikel hat sich in den durchgeführten Versuchen zur Funktionalisierung der Oberfläche mit DOW 5700 als nicht zweckmäßig erwiesen, da über diesen Syntheseweg zwar modifizierte Partikel hergestellt werden können, diese aber aufgrund der Vielzahl an Schritten und Einflussfaktoren bei diesem Verfahren nur sehr schlecht und mit viel Aufwand reproduzierbar sind (siehe Arbeiten von MÜLLER²⁵⁴ und RING²⁵⁵). Es wurde ein neuer Syntheseweg entwickelt bei dem die bereits stabilisierten und dispergierten Partikel, wie sie nach der Stöber-Synthese vorliegen, im Anschluss in derselben Lösung funktionalisiert werden. Dies soll durch die Zugabe des DOW 5700 in das Reaktionsgefäß nach der Stöber-Synthese der Partikel erfolgen, wodurch das Verfahren auch großtechnisch leichter in einem Batch-Reaktor umsetzbar wäre.

Um die zur Modifizierung der Partikel notwendige Menge an DOW 5700 zu berechnen, musste zuerst die spezifische Oberflächenkonzentration an Silanolgruppen Γ_{OH} , also die Menge funktionalisierbarer OH-Gruppen auf deren Oberfläche, abgeschätzt werden. Dies ist mit Hilfe der Kiselev-Zhuravlev-Konstante möglich, welche die durchschnittliche Oberflächenkonzentration von OH-Gruppen auf Kieselgel-Materialien angibt. Sie beträgt 4,9 OH-Gruppen pro nm² oder 8,14 $\mu\text{mol OH/m}^2$.²⁶⁶ Die Modifizierung der Partikel wurde mit einem 4-fachen Überschuss an DOW 5700 bezogen auf die theoretische Anzahl der oberflächlichen Silanolgruppen durchgeführt (siehe **Kapitel 6.12.2**).

Die Oberflächen-Funktionalisierung der Partikel erfolgt nach den gleichen Mechanismen, wie die Bildung der Partikel (**Abbildung 4.62**). Es wird angenommen, dass die Methoxy-Gruppen des DOW

5700 in der wässrigen, alkoholischen Lösung quantitativ hydrolysiert werden. Aufgrund der favorisierten Kondensationsreaktion im basischen Milieu sollte die Alkoxysilan-Gruppe des DOW 5700 im nächsten Schritt mit den Silanol-Gruppen der Partikel reagieren, wodurch das Molekül kovalent an die Oberfläche gebunden wird (**Abbildung 4.64**).²⁵⁹ Eine weitere Möglichkeit besteht in der Reaktion mit einem anderen DOW 5700 Molekül unter Bildung einer löslichen, oligomeren Spezies, deren Bindung an die Partikeloberfläche jedoch ebenfalls im weiteren Verlauf der Reaktion möglich bleibt. Durch Kondensation der gebundenen Moleküle untereinander sollte so im Idealfall eine dichte, monomolekulare Schicht entstehen.

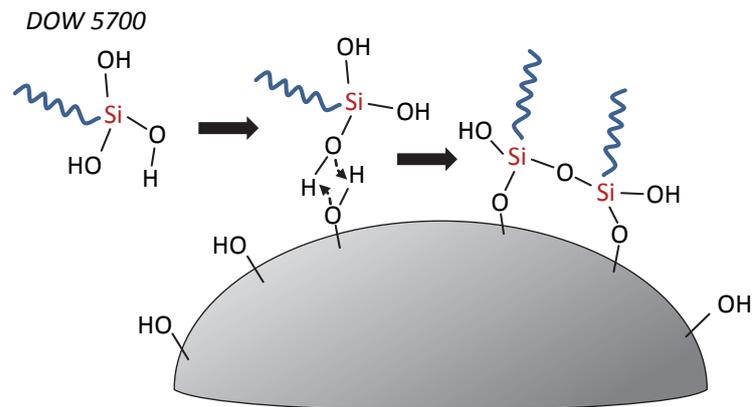


Abbildung 4.64 | Schematische Darstellung der Funktionalisierung von SiO₂-Partikeloberfläche mit DOW 5700

Um die modifizierten Partikel nach der Synthese vom überschüssigen Reaktionsmedium und nicht funktionalisierten Partikeln zu trennen, mussten diese einem Reinigungsschritt unterzogen werden. Da Partikel aus einer Dispersion leicht durch Sedimentation abgetrennt werden können²⁵³, wurden die Partikel nach der Synthese zuerst zentrifugiert und das überstehende Reaktionsgemisch dekantiert. Zum weiteren Entfernen von Verunreinigungen wurden die Partikel jeweils 2-mal in Methanol, Ethanol und Wasser dispergiert und die Abtrennung wiederholt.



Abbildung 4.65 | DOW 5700 modifizierte Partikel, hergestellt in Ethanol bei 42°C, mit einem Durchmesser von ca. 100 nm dispergiert in verschiedenen Lösungsmitteln (Partikelkonzentration 10 mg/ml). Lösungsmittel von links nach rechts: Aceton, Chloroform, Diethylether, Dichlormethan, Ethanol, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol, Tetrahydrofuran, Toluol.²⁵⁶

Die so erhaltenen Partikel wurden im nächsten Schritt auf ihre Dispergierbarkeit in Lösungsmitteln hin untersucht. Dazu wurden die 100 nm großen Partikel in verschiedenen Lösungsmitteln mit einer Konzentration von 10 mg/ml suspendiert. Wie in **Abbildung 4.65** ersichtlich, ergaben sich in den meisten untersuchten Lösungsmitteln trübe Mischungen, in denen die Partikel zügig sedimentieren. In Chloroform jedoch waren die Partikel mit bloßem Auge nicht mehr zu erkennen, was die Bildung einer kolloidalen Lösung vermuten lässt. Zudem war bei den Partikelmischungen mit Dichlormethan (DCM) und Tetrahydrofuran (THF), nur eine vergleichsweise schwache Trübung und praktisch kein Niederschlag zu beobachten. Wurde die Partikelkonzentration auf 5 mg/ml gesenkt, waren auch in diesen beiden Lösungsmitteln die Partikel nicht mehr zu erkennen.

Um die Dispergierung der Partikel und eine eventuelle Aggregatbildung in den Lösungsmitteln weiter zu charakterisieren, wurden dynamische Lichtstreuungsmessungen (DLS) durchgeführt. Dazu wurde der Lösungsmittelüberstand nach der Sedimentation der großen Aggregate (nach 1h) sowie nach Zentrifugation des Überstandes untersucht. Dabei konnten bei allen Proben Partikel mit einer engen Verteilung mit einem mittleren Durchmesser von 103 ± 31 nm detektiert werden, was auf das Vorliegen vorwiegend einzelner Partikel in den Lösungsmitteln hindeutet (**Abbildung 4.66**). Eine Messung in Diethylether war nicht möglich. Dies zeigt, dass in allen untersuchten Lösungsmitteln eine gewisse Menge der modifizierten Partikel dispergierbar zu sein scheint. Die Menge ist stark vom verwendeten Lösungsmittel abhängig; die überschüssigen Partikel sedimentieren in Form von Aggregaten.

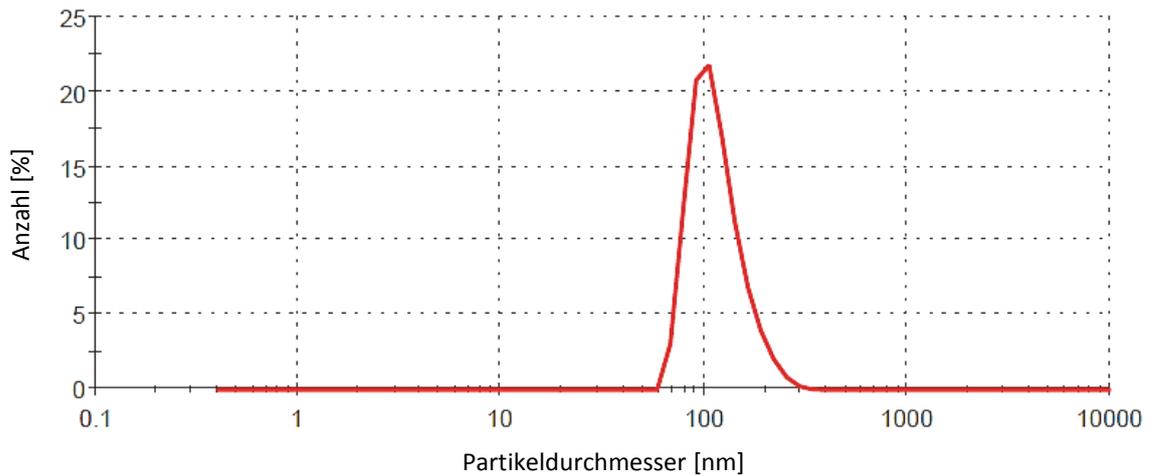


Abbildung 4.66 | Größenverteilung (aus DLS-Messung) der DOW 5700 modifizierten Nanopartikel mit 100 nm Durchmesser in Chloroform (Partikelkonzentration 10 g/l) nach Zentrifugation der Mischung.

Das verbesserte Dispergierungsverhalten der DOW 5700 modifizierten Nanopartikel in Chloroform konnte bei allen hergestellten Partikelgrößen (bis 450 nm) beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die Partikelaggregate durch den sehr ähnlichen Brechungsindex von Chloroform²⁶⁸ ($n = 1,44$) und amorphem Silizium²⁶⁹ ($n = 1,47$) nicht sichtbar sind ($\lambda = 589 \text{ nm}$), wurde die gleiche Menge nicht DOW 5700 modifizierter Partikel mit Chloroform vermischt. Die entstandene Dispersion der 100 nm Partikel ist in **Abbildung 4.67** zu sehen. Auf dem Foto ist eine deutliche Trübung erkennbar, was darauf schließen lässt, dass die mit DOW 5700 modifizierten Partikel tatsächlich kolloidal gelöst vorliegen. Die gute Löslichkeit der Partikel in Chloroform gibt zudem einen ersten Hinweis darauf, dass die Modifizierung der Partikeloberfläche nach der neuen Vorschrift erfolgreich ist.

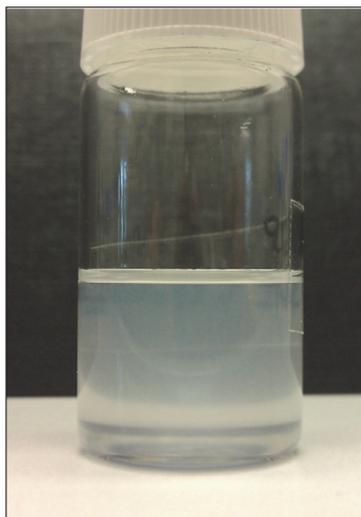


Abbildung 4.67 | Mittels Stöber-Synthese hergestellte SiO_2 -Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm dispergiert in Chloroform (Partikelkonzentration 10 mg/ml).²⁵⁶

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die gute Löslichkeit der Nanopartikel in Chloroform dazu genutzt werden kann, die Aufarbeitung der Partikel nach der Synthese zu vereinfachen. Dazu wurde

die Reaktionsmischung nach der Modifizierung zuerst einmalig zentrifugiert, das überstehende Medium dekantiert und die sedimentierten Partikel in Chloroform redispersiert. Die Mischung wurde dann in einen Scheidetrichter überführt, die gleiche Menge Wasser hinzugefügt und geschüttelt. Alle hydrophoben, DOW 5700 modifizierten Partikel sollten dabei in die Chloroform-Phase übergehen sowie alle hydrophilen Bestandteile, wie unmodifizierte Partikel und hydrolysierte Alkoxysilane, sollten sich in der Wasserphase lösen oder an der Grenzfläche absetzen. Nach dem Schütteln bilden sich 3 Phasen aus: eine leicht eingetrübte obere, eine milchig-weiße mittlere und eine klare untere (**Abbildung 4.68**). Die milchige mittlere Phase, die eine Emulsion der Chloroform- und der Wasserphase darstellt, entmischt sich mit der Zeit, sodass nach 48 h nur noch zwei Phasen übrig sind. Zudem sedimentieren die Teilchen in der oberen, wässrigen Phase auf die Grenzfläche, sodass diese nach 48 h ebenfalls klar ist. Die Chloroform- und die Wasserphase wurden getrennt aus dem Scheidetrichter entnommen und das jeweilige Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt. Die dabei übrig gebliebenen Rückstände wurden mit Hilfe des REM untersucht. Es zeigt sich, dass in der Chloroform-Phase ausschließlich Partikel gefunden wurden, während sich in dem Rückstand aus der Wasserphase wenige Partikel und große Mengen amorphes Feststoffe gefunden werden konnten.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Aufreinigung der Partikel mit Hilfe von Chloroform und Wasser zu einer effektiven Trennung der modifizierten Partikel von den sonstigen Verunreinigungen führt.

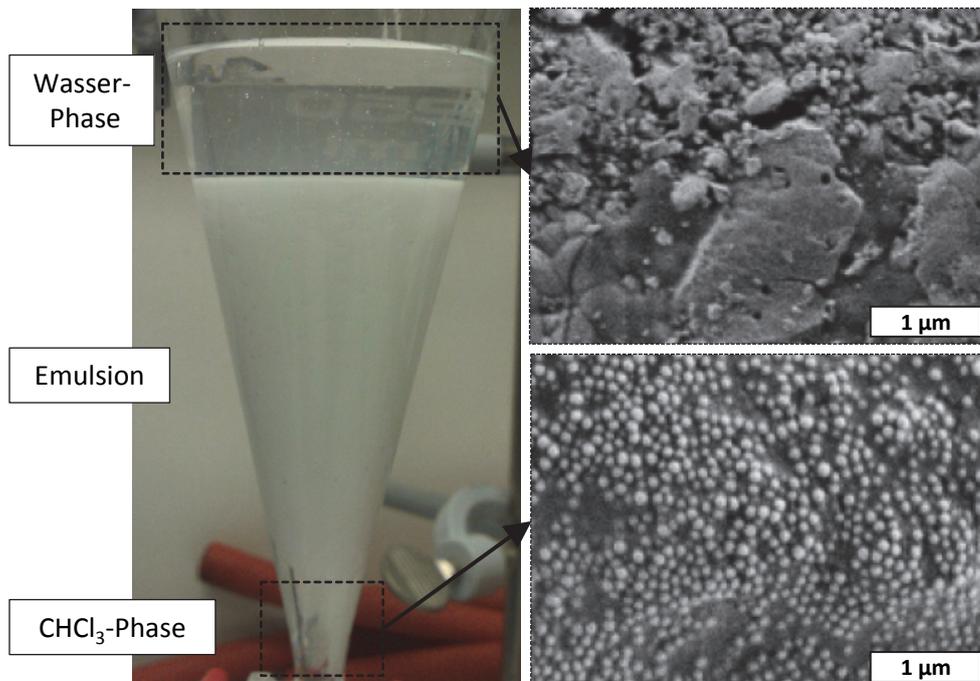


Abbildung 4.68 | Foto eines 250 ml Scheidetrichters mit einer 1:1 Mischung aus Wasser, Chloroform und DOW 5700 modifizierten SiO₂-Nanopartikeln (100 nm, hergestellt in Ethanol bei 50°C) 1 min nach dem Schütteln. Die REM-Aufnahmen zeigen die Rückstände in den beiden Phasen nach Entfernungen des jeweiligen Lösungsmittels.²⁵⁶

4.4.3 Partikelfunktionalisierung

Die Oberflächenmodifizierung der Partikel mit einer Größe von ca. 100, 300 und 450 nm sollten im nächsten Schritt weiter charakterisiert werden. Die Dispergierbarkeit der Partikel in Chloroform nach der Modifizierung zeigt nur indirekt, dass eine Modifizierung der Partikeloberfläche mit DOW 5700 erfolgreich war. Ein direkter Nachweis der Modifizierung erweist sich jedoch als schwierig, da die Schicht auf der Oberfläche extrem dünn zu sein scheint und ihr Signal im Verhältnis zum Signal der SiO₂-Nanopartikel im Rauschen der jeweiligen Methode untergeht (Infrarotspektroskopie, TGA, Lichtstreuung, REM). Auch mit Hilfe des Transmissions-Elektronen-Mikroskops (TEM) ist es nicht möglich die Oberflächenschichten auf den Partikeln nachzuweisen (**Abbildung 4.69a und b**). Allerdings wurde beobachtet, dass die modifizierten im Vergleich zu den unmodifizierten Partikeln stärker aggregieren, was ihre Abbildung im TEM weiter erschwert. Die Analyse der 100 nm Partikel mittels REM-EDX liefert jedoch einen Hinweis auf eine erfolgreiche Modifizierung. In **Abbildung 4.69c** werden die EDX-Spektren der DOW 5700 modifizierten und unmodifizierten Partikel verglichen. Dabei ist ersichtlich, dass die Höhe des Kohlenstoffpeaks im Verhältnis zum Siliziumpeak der Partikel durch die Modifizierung vergrößert wird, was wiederum indirekt auf eine erfolgreiche Funktionalisierung der Partikel mit DOW 5700 schließen lässt. Bei größeren Partikeln (300 und 450 nm) ist der Kohlenstoffpeak, deutlich schwächer ausgeprägt. Dies ist durch das geringere Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis der größeren Partikel begründet, da mit steigendem Durchmesser das Volumen kubisch, die Oberfläche jedoch nur quadratisch zunimmt. Aus diesem Grund ist die modifizierbare Oberfläche der Partikel mit 100 nm Durchmesser 4,5-mal größer als die der gleichen Masse 450 nm großer Partikel, was sich in der Signalintensität der EDX-Messung wiederfindet.

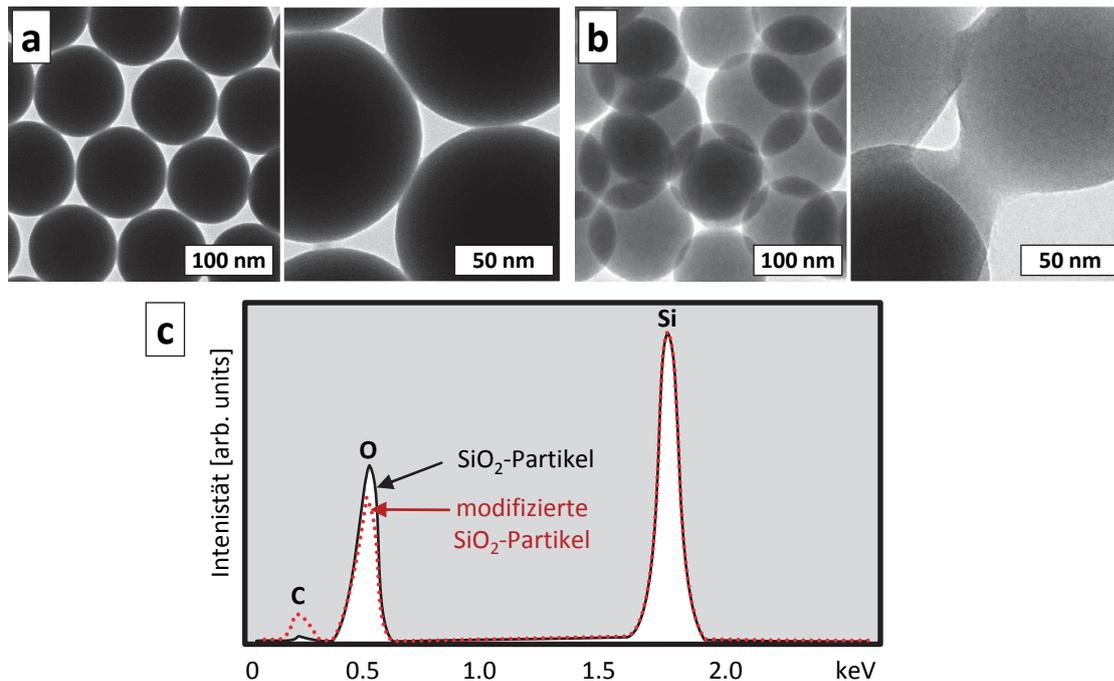


Abbildung 4.69 | TEM-Bilder der (a) unmodifizierten und (b) DOW 5700 modifizierten SiO₂-Nanopartikel (100 nm) sowie die zugehörigen REM-EDX-Spektren (c) der beiden Proben.

Leider ist es mit dieser Methode nicht möglich die Funktionalisierung der Oberfläche zu quantifizieren. Auch die im Folgenden vorgestellten Untersuchungen des Kontaktwinkels und der -Hysterese mit Wasser sowie der antimikrobiellen Wirksamkeit der Partikelschichten (mit und ohne Funktionalisierung) ermöglichen nur qualitative Rückschlüsse auf eine erfolgreiche und ausreichende Funktionalisierung.

Zur Herstellung der Beschichtungen wurden die Partikel in Chloroform gelöst (10 mg/ml), 50 μ l auf mit Silikon (Sylgard 184) beschichtete Glasobjektträger aufgetropft und bei RT getrocknet. Die Silikonschicht ist notwendig, da die Partikel, wenn sie direkt auf Glas aufgetragen werden, kaum Haftung aufweisen. Wird ein direkt mit Partikeln beschichteter Glasobjektträger in Wasser getaucht, so lösen sich die Partikel ab und schwimmen auf der Grenzfläche. Im Gegensatz dazu haften die Partikel auf einer Silikonoberfläche auch unter Wasser und lösen sich nicht ab. Die Schicht der Partikel durch Auftragung aus Chloroform ist jedoch sehr inhomogen, da diese durch die gute Löslichkeit der Partikel beim Abdampfen des Lösungsmittels mitgeschleppt werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, wie eine Schichtbildung aus anderen Lösungsmitteln erfolgt, um eine möglichst gleichmäßige Beschichtung zu erzielen. In **Abbildung 4.70** sind die Ergebnisse dieser Untersuchung mit 100 nm großen Partikeln dargestellt. Dabei wurden die gleichen Lösungsmittel wie in der Löslichkeitsuntersuchung verwendet. Es zeigte sich, dass Lösungsmittel, wie Chloroform, DCM und THF, die die Partikel in Lösung gut stabilisieren, zu eher inhomogenen Beschichtungen führen (**Abbildung 4.70a**). Besser für eine optisch homogenere Auftragung eignen sich Methanol,

Aceton und Ethylacetat. In diesen liegen die Partikel als suspendierte Agglomerate vor, die direkt nach der Auftragung auf die Oberfläche sedimentieren.



Abbildung 4.70 | (a) Die Bilder zeigen Partikelschichten von mit DOW 5700 modifizierten SiO_2 -Nanopartikeln (100 nm). Diese wurden aus Suspensionen der Partikel im jeweils angegebenen Lösungsmittel (10 mg/ml) durch Drop-Coating von jeweils 50 μl auf einen mit Silikon beschichteten Objektträger aufgetragen. (b) REM-Aufnahmen der Beschichtungen aus (a). Lösungsmittel erste Reihe von links nach rechts: Aceton, Chloroform, Dichlormethan (DCM) Diethylether, Ethylacetat; zweite Reihe: Ethanol (EtOH), Isopropanol, Methanol (MeOH), Tetrahydrofuran (THF), Toluol.²⁵⁶

Mit Diethylether oder Toluol hergestellte Schichten sind im Gegensatz dazu kaum erkennbar, was auf eine gleichmäßigere Beschichtung mit kleineren Agglomeraten hindeuten könnte. Die weiter durchgeführten REM-Aufnahmen zeigen die Defekte und Unregelmäßigkeiten der Partikel-Beschichtungen (**Abbildung 4.70b**). Bei den Lösungsmitteln Chloroform, DCM, Diethylether und THF sind Poren in der Schicht mit einigen Mikrometern im Durchmesser zu erkennen. Eine Auftragung der Partikel aus Ethanol zeigt hingegen gar keine Schichten, sondern hauptsächlich Ansammlungen von Partikelagglomeraten auf der Oberfläche. Die Schichten mit der homogensten Mikrostruktur ergeben sich aus den Lösungsmitteln Aceton, Ethylacetat, Isopropanol und Toluol. Die dabei zum Teil zu erkennenden Trocknungsrisse in der Schicht können, ähnlich wie Poren, jedoch kontraproduktiv für die antimikrobielle Wirkung sein, da diese bei Isopropanol und Toluol

groß genug sind, um in den Defektstellen eine Bakterienbesiedlung der typischerweise 1 bis 3 μm großen Zellen zu ermöglichen.

Die DOW 5700 modifizierten SiO_2 -Partikelschichten wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf ihre Benetzungseigenschaften mit Wasser geprüft. Dabei zeigte sich, dass alle Beschichtungen einen Kontaktwinkel in einem Bereich von $138^\circ \pm 7^\circ$ aufweisen. Dies ist eine deutliche Steigerung zu Silikon mit einem Kontaktwinkel von $110^\circ \pm 5^\circ$. Die nicht modifizierten SiO_2 -Partikel aus der STÖBER-Synthese weisen aufgetragen auf Silikon hingegen nur einen Kontaktwinkel von $50^\circ \pm 5^\circ$ auf. Auffällig ist zudem, dass einige Beschichtungen mit 5° bis 10° eine sehr niedrige Kontaktwinkelhysterese zeigen. Dies ist insbesondere bei Aceton, Methanol und Ethylacetat der Fall, die zu den homogensten Schichten führen. Die geringe Hysterese weist auf einen „Lotus-Effekt“ der Beschichtungen hin, bei dem keine Benetzung der Oberfläche durch einen Wassertropfen stattfindet und dieser so leicht von der Oberfläche abrollen kann. Dies ist beispielhaft mit einer aus Aceton-Suspension aufgetragenen Partikelschicht in **Abbildung 4.71** dargestellt. Auf den Bildern ist zu erkennen, dass bereits ein leichtes Kippen des Objektträgers von etwa 5° ausreicht, damit der Tropfen von der Partikeloberfläche rollt und sofort bei Benetzung der umgebenen Silikonoberfläche zum Stehen kommt.

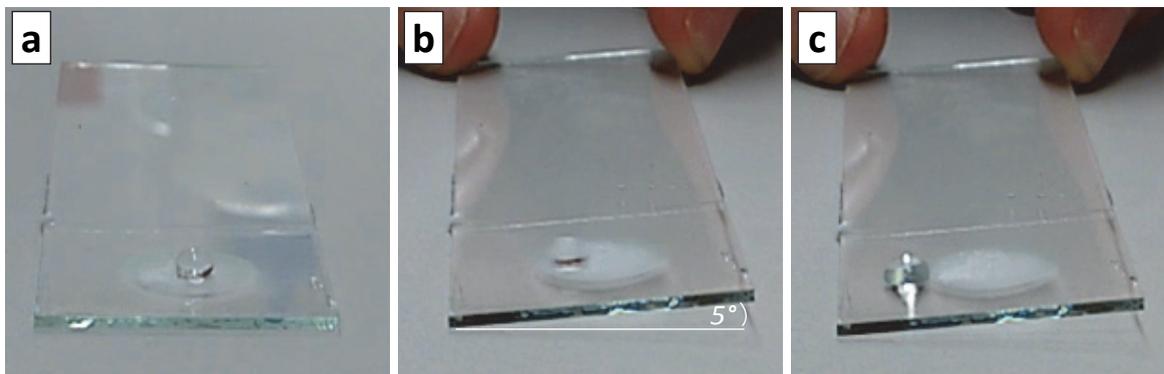


Abbildung 4.71 | Die Bilder zeigen einen im vorderen Bereich mit Silikon beschichteten Objektträger, auf den aus einer Aceton-Suspension mit DOW 5700 modifizierte SiO_2 -Nanopartikel (ca. 300 nm) per Drop-Coating aufgetragen und getrocknet wurden. (a) Es wird ein Wassertropfen auf die Partikelschicht gesetzt. (b) Der Objektträger wird langsam gekippt und der Wassertropfen beginnt bei ca. 5° sich in Bewegung zu setzen. (c) Der Wassertropfen kommt, sobald er sich nicht mehr auf der Partikelschicht befindet, zum Stehen.

Abbildung 4.72 zeigt zur Verdeutlichung den Querschnitt einer aus Aceton aufgetragenen Partikelbeschichtung mit Lotus-Effekt im REM. Darauf ist die Strukturierung der Oberfläche zu erkennen, die ähnlich wie ein Lotus-Blatt über eine Mikro- und Nanostruktur durch die einzelnen Partikel und deren Agglomerate verfügt, was als Grund für die geringe Kontaktwinkel-Hysterese anzusehen ist. Die Strukturierung scheint das Resultat der Suspendierung der Partikel in einem schlechten Lösungsmittel zu sein, was zu einer Selbstorganisation bzw. Agglomeration der Partikel und einer homogenen Sedimentation auf die Silikonoberfläche führt.

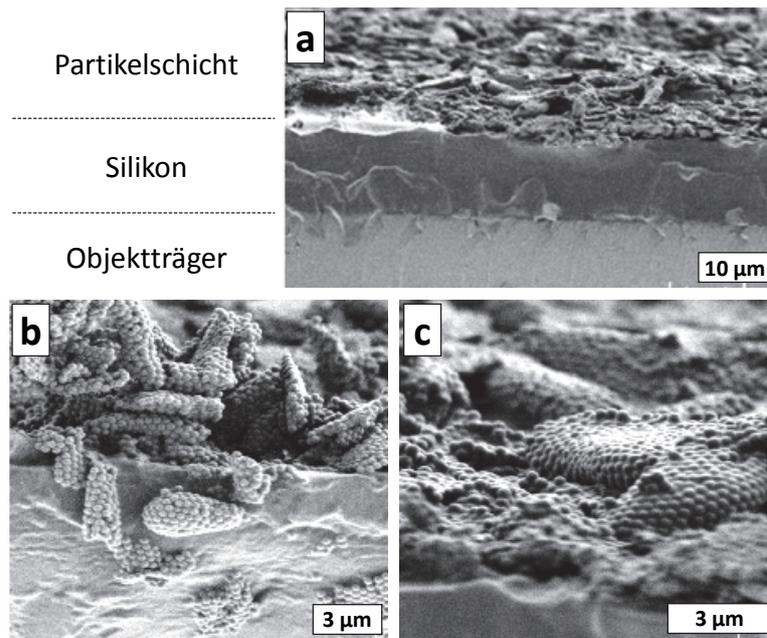


Abbildung 4.72 | REM-Aufnahmen des Querschnitts einer mit modifizierten Nanopartikeln beschichteten Silikonschicht auf einem Glas-Objektträger. Die DOW 5700 funktionalisierten Partikel wurden aus einer Dispersion (10 mg/ml) in Aceton per Drop-Coating aufgetragen.²⁵⁶

4.4.4 Antimikrobielle Eigenschaften

Zur Charakterisierung der antimikrobiellen-Eigenschaften wurden die beschichteten Oberflächen mit dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) besprüht. Anschließend wurden diese nach kurzer Trockenzeit mit Nährlösung überschichtet, für 16 h bei 37°C inkubiert und zum Schluss die dabei gebildeten Kolonien angefärbt (siehe **Kapitel 6.15**). Anhand der gewachsenen Kolonien kann so überprüft werden, ob die Oberflächenbeschichtung die Bakterien bei Kontakt abtötet oder ihr Wachstum zumindest einschränken konnte. In **Abbildung 4.73** sind die Ergebnisse dieses Bakterienprüfetestes für die Auftragung aus unterschiedlichen Lösungsmitteln dargestellt. Die Schichten wurden nach verschiedenen Bewuchsgraden zusammengefasst. Dabei fällt auf, dass der Bewuchs der Oberfläche je nach Lösungsmittel sehr unterschiedlich ausfällt. Die Partikelbeschichtungen aus Ethylacetat sowie Methanol, die auch in der REM-Untersuchung die besten schichtbildenden Eigenschaften zeigten, konnten die Vermehrung der Bakterien auf der Oberfläche vollständig verhindern und weisen daher sehr gute kontaktaktiv-antimikrobielle Eigenschaften auf. Dies wird an der kreisrunden nicht bewachsenen Partikelbeschichtung deutlich, die zum umgebenden, stark besiedelten Silikonfilm scharf abgegrenzt ist. Auch alle anderen Lösungsmittel ermöglichen Oberflächenschichten, die den Bewuchs mit *S. aureus* vermindern können. Selbst bei der Verwendung von THF sind die auf der Partikelschicht gewachsenen Kolonien kleiner und klarer voneinander abgegrenzt, als auf dem umgebenden Silikon.

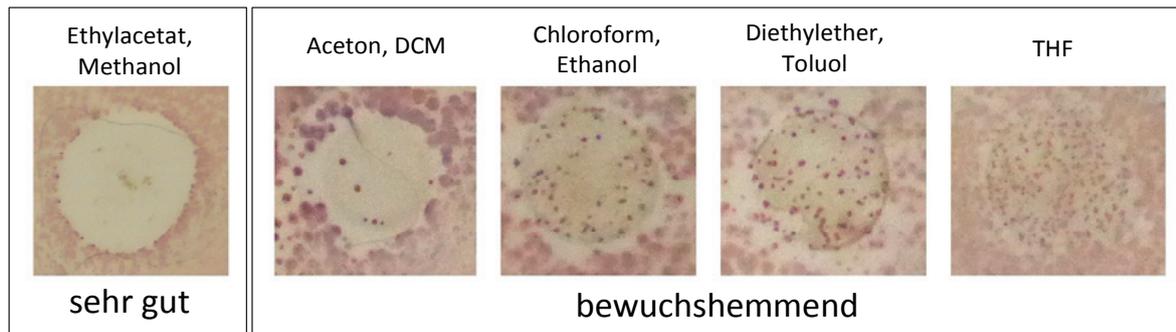


Abbildung 4.73 | Aufnahmen von mit DOW 5700 modifizierten SiO_2 -Partikelschichten (100 nm Partikeldurchmesser), aufgetragen aus verschiedenen Lösungsmitteln, auf einem mit silikonbeschichteten Glasobjektträger nach Besprühen der Oberfläche mit einer *Staphylococcus aureus* Suspension, die 10^6 Zellen pro ml enthält. Die Objektträger wurden nach dem Aufsprühen der Bakterien in einer Petrischale mit Nähragar überschichtet, für 16 h bei 37°C inkubiert und angefärbt.²⁵⁶

Um die antimikrobielle Wirksamkeit der größeren, in Ethanol (300 nm) und Butanol (450 nm) hergestellten Partikel zu charakterisieren, wurden diese ebenfalls aus Aceton auf einen silikonbeschichteten Objektträger aufgetragen. Die so erhaltenen homogenen Schichten wurden ebenfalls mit *S. aureus* besprüht und weisen ebenfalls eine sehr gute antimikrobielle Wirksamkeit auf, die mit denen der 100 nm Partikel vergleichbar ist.

Die Ergebnisse belegen die kontaktaktiv-antimikrobielle Wirksamkeit der DOW 5700 modifizierten Partikel gegen *S. aureus* und bestätigen zudem die erfolgreiche Modifizierung der Partikel mit DOW 5700. Es zeigt zudem, dass die Effektivität der Beschichtung maßgeblich von der Homogenität der Partikelschicht und damit der Auftragung abhängt.

4.4.5 Mischungen verschiedener Partikelgrößen

Wie im vorherigen Unterkapitel gezeigt werden konnte, ist die bei der Aggregation der modifizierten Nanopartikel ablaufende Selbstorganisation ein entscheidender Faktor für die Mikrostrukturierung der beschichteten Oberfläche und dem daraus resultierenden Lotus-Effekt. Um die schwer kontrollierbare Aggregatbildung auf die Oberflächeneigenschaften auszuschalten, sollte diese durch die Verwendung von Chloroform verhindert und eine Mikrostrukturierung der Oberfläche durch Mischung der 100 nm Partikel mit größeren DOW 5700 modifizierten Nanopartikeln (300 und 450 nm), ähnlich sogenannter „raspberry-like“ Partikel, erzeugt werden. Durch die gezielte Aggregation hydrophob modifizierter großer und kleiner SiO_2 -Nanopartikel konnten bereits Schichten mit superhydrophoben Eigenschaften erzeugt werden, die jedoch nicht über eine antimikrobielle Wirkung verfügen.^{158, 270}

Jeweils eine Sorte der funktionalisierten, größeren Partikel wurde in Chloroform mit den DOW 5700 modifizierten Partikeln mit 100 nm Durchmesser gemischt (Verhältnis 1:1) und diese auf einen silikonbeschichteten Objektträger per Drop-Coating aufgetragen. Die so erhaltenen

Partikelschichten sind ähnlich inhomogen wie zuvor, sodass sich die Partikel am Rand und Innenbereich besonders stark aufschichten. REM-Aufnahmen der Beschichtungen der Partikel verschiedener Größen im Verhältnis 1:1 (**Abbildung 4.74a**) zeigen, dass keine raspberry-like Partikel entstanden sind. Die kleinen Partikel sammeln sich zwischen oder unterhalb der Partikel und nicht wie angestrebt darauf an, da diese scheinbar kein Bestreben besitzen, mit Partikeln einer anderen Größe zu agglomerieren. Der erhaltene Kontaktwinkel entspricht mit $135^\circ \pm 5^\circ$ dem Wert der aus Chloroform aufgetragene Partikelschichten mit einheitlicher Größe. Zudem hafteten Wassertropfen sehr gut auf der Partikelbeschichtung. Um eine oberflächliche Schicht kleinerer Partikel auf den größeren Partikeln zu erzeugen, wurde der Anteil der 100 nm Partikel in der Mischung erhöht. Ab einem Verhältnis der Partikel von 1:4 werden die größeren Partikel von den kleineren Partikeln zum Teil bedeckt (**Abbildung 4.74b**). Leider verschwindet dadurch die durch die größeren Partikel verursachte Mikrostrukturierung, weshalb auch in diesem Fall kein Lotus-Effekt beobachtet werden kann. Zum Vergleich wurden die 100 nm Partikel zusammen mit den 450 nm Partikeln aus Methanol auf eine Silikonoberfläche aufgetragen. Die REM-Aufnahmen in **Abbildung 4.74c** zeigen die erhaltenen Agglomerate auf der Oberfläche nach dem Abdampfen des Lösungsmittels. Interessanterweise scheinen auch hier nur Partikel derselben Größe miteinander zu Überstrukturen zu aggregieren. Die dadurch verursachte Mikrostruktur führte erneut zu Beschichtungen, die einen Lotus-Effekt aufweisen.

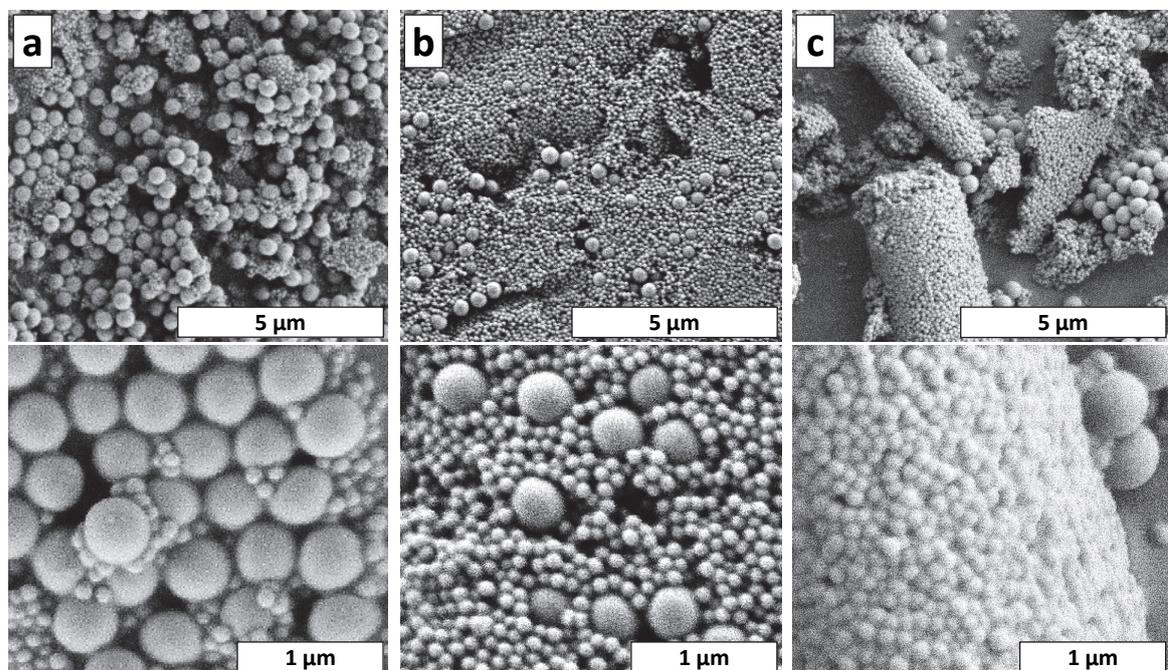


Abbildung 4.74 | REM-Aufnahmen von Partikelschichten (Draufsicht) aus Mischungen von DOW 5700 modifizierten SiO_2 -Nanopartikeln mit 450 nm und 100 nm Durchmesser im Verhältnis (a) 1:1 (b, c) 1:4 aufgetragen aus (a, b) Chloroform und (c) Methanol auf einen mit Silikon beschichteten Objektträger. Die Partikelkonzentration betrug immer insgesamt 10 mg/ml.

Die Untersuchungen zeigen, dass es mit DOW 5700 modifizierten Partikeln nicht ohne weiteres möglich ist durch Mischen unterschiedlicher Partikelgrößen „raspberry-like“ Partikel zu erzeugen.

5 Zusammenfassung

5.1 Enzym-induzierte Mineralisierung von Polymer-Netzwerken

Die in dieser Arbeit entwickelte Methode der enzym-induzierten Calcifizierung von Hydrogelen ermöglicht erstmals eine selektive Bildung großer Mengen eines Minerals innerhalb eines Polymernetzwerks durch Quellung in einer geeigneten, wässrigen Calcifizierungslösung. Dies gestattet es, gezielt Einfluss auf die Kristallisation innerhalb der Hydrogele zu nehmen und so Verbundmaterialien mit maßgeschneiderten Eigenschaften zu erzeugen. Verschiedene Faktoren, unter anderem die Aktivität und Verteilung des im Netzwerk immobilisierten Enzyms, die Art und der Zustand der polymeren Matrix, die Temperatur sowie der pH-Wert während der Mineralisation ermöglichen eine gezielte Einflussnahme auf die abgeschiedenen Strukturen. Die Technik besitzt das Potential biologische Komposite, wie Perlmutter, Knochen und andere Biomaterialien unter milden Reaktionsbedingungen und mit sehr geringem Energieeinsatz zu erzeugen.

Durch die Immobilisation von Urease in 2-Hydroxyethylacrylat (HEA)- und N,N-Dimethylacrylamid (DMA)-basierten Polymernetzwerken konnten erstmals hochgefüllte Calciumcarbonat (CaCO_3)-Komposite hergestellt werden, indem ein Hydrogel im Inneren selektiv calcifiziert wurde. Dazu wird das Hydrogel mit immobilisiertem Enzym in einer wässrigen Harnstoff- (Urea) und CaCl_2 -Lösung gequollen. Die katalysierte Harnstoffhydrolyse verursacht dabei im Film sphärisch oder dendritisch angeordnete, kristalline Nadel- oder Partikelstrukturen aus Aragonit oder Calcit, woraus Komposite mit einem einstellbaren Mineralgehalt von bis zu 93 Gew% resultieren. Durch die hohen Mengen an CaCO_3 ist es möglich den E-Modul der HEA-basierten Netzwerke von 1 MPa um den Faktor 310 zu steigern (**Abbildung 5.1a**). Neben der Steifigkeit nimmt jedoch durch die Mineralisierung auch die Sprödigkeit der Komposite stark zu, da der geringe Anteil an Polymer nicht mehr alle Bereiche zwischen den anorganischen Strukturen ausfüllt. Es zeigte sich, dass auf Basis der HEA-basierten Netzwerke Komposite mit einem höheren E-Modul von bis zu 706 ± 50 MPa erzeugt werden können, indem ein verringerter CaCO_3 -Anteil von nur 41 Gew% im Hydrogel abgeschieden wurde (**Abbildung 5.1b**). Grund dafür ist die dabei gebildete schichtartige Anordnung von Aragonit-Kristallen im Netzwerk, die von Polymer umhüllt vorliegen. Dies wird durch die Optimierung der immobilisierten Enzymmenge und der Temperatur bei der Calcifizierung erreicht. Aufgrund dieser Erkenntnis wurden die Zwischenräume der Filme mit hohem CaCO_3 -Gehalt mit Polymer aufgefüllt. Die Vergrößerung der Grenzfläche durch diese Post-Polymerisation ermöglicht es den E-Modul der hoch calcifizierten, HEA-basierten Hybridmaterialien auf bis zu 1480 MPa und die Steifigkeit der DMA-basierten Komposite sogar bis auf 3500 MPa zu steigern. Trotz dieses Anstiegs liegt die Steifigkeit der Komposite immer noch deutlich unter dem Wert des natürlichen Vorbildes Perlmutter

mit etwa 80 GPa. Als Grund für diesen Unterschied wird die extrem geordnete Schichtstruktur des Perlmutts vermutet. Zur weiteren Steigerung des E-Moduls war es daher notwendig, die Ordnung der Kristalle im Netzwerk zu erhöhen.

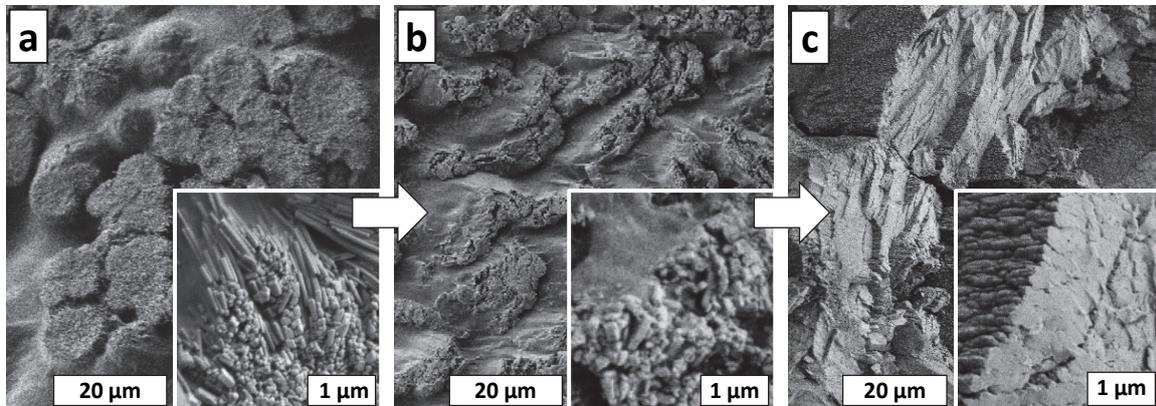


Abbildung 5.1 | REM-Aufnahmen der durch Urease-induzierte Calcifizierung hergestellten CaCO_3 -Strukturen im Innern der Polymernetzwerke: (a, b) HEA-basiertes Netzwerk (a) mit 1 Gew% Urease und Calcifizierung bei Raumtemperatur (RT) sowie (b) mit 0,5 Gew% Urease calcifiziert bei 60°C. (c) Semiinterpenetrierendes Netzwerk auf Basis von Acrylamid und Alginat mit 1 Gew% Urease calcifiziert bei 60°C. Die Mineralisierung fand jeweils in einer (a, b) nicht gepufferten bzw. (c) bei pH 7,5 Tris(hydroxymethyl)aminomethan gepufferten Harnstoff/ CaCl_2 -Lösung statt.

Die Urease-induzierte Calcifizierung eines gedehnten Hydrogels bietet das Potential, ein gerichtetes Kristallwachstum im Netzwerk in Zugrichtung zu induzieren. Durch die Verwendung eines semiinterpenetrierenden Netzwerks aus Polyacrylamid und Alginat gelang es durch eine auf das Hydrogel aufgebrachte Dehnung von 1500% bei der Mineralisierung in Zugrichtung orientierte, plattenartige Strukturen zu erzeugen (**Abbildung 5.1c**). Dabei konnte Alginat als entscheidender Faktor für die Bildung der dichten Plattenstrukturen anstelle der sonst im Netzwerk gebildeten Nadelstrukturen ausgemacht werden. Die Plattenstrukturen weisen aufgrund ihres hohen Mineralisierungsgrades von bis zu 99 Gew% und der damit verbundenen, geringen Grenzfläche zur Matrix ein sprödes Verhalten, auch nach der Post-Polymerisation, auf. Der Versuch, gerichtete Nadelkristalle mit größerer Grenzfläche durch Austausch des Alginats mit anderen Polymeren zu erzeugen, scheiterte daran, dass die gedehnten Filme eine Calcifizierung ohne Alginat nicht überstehen, da sie während der Calcifizierung reißen. Auch wenn sich die Mechanik noch nicht auf dem Niveau des natürlichen Originals befindet, so zeigen die Ergebnisse das Potential der Urease-induzierten Calcifizierung für die Erzeugung perlmuttähnlicher Strukturen und damit künstlicher, biomimetischer Verbundmaterialien.

Die intrinsische Mineralisierung eines Netzwerks konnte ebenfalls mit Calciumphosphat (CaP) erfolgreich durchgeführt werden. Dazu wurde die alkalische Phosphatase (AP) in den gleichen Netzwerken wie die Urease immobilisiert und diese in einer Calcium-2-Glycerolphosphat-Lösung mineralisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Aktivität der AP nur in den DMA- und Acrylamid-basierten Netzwerken für eine Calcifizierung ausreichend hoch ist. Zudem können nach der

Calcifizierung in diesen beiden Netzwerken, verglichen mit CaCO_3 , vollkommen andere anorganische Strukturen beobachtet werden. Während sich innerhalb der Netzwerke aus DMA sphärische Strukturen mit 400 bis 600 nm Durchmesser entwickeln, entstehen in Acrylamid-basierten Netzwerken gerüstartige Gebilde mit etwa 400 nm großen Löchern. Beide Strukturen sind aus kleineren, Untereinheiten aufgebaut, die amorph sind. Durch Bestimmung der Verteilung des Enzyms im Netzwerk mittels einer Silber-Färbemethode konnte gezeigt werden, dass die anorganischen Strukturen maßgeblich von der Verteilung der AP in der Matrix gesteuert werden. Auf diese Weise können Mineralisationsgrade von bis zu 75 Gew% CaP erreicht werden. Die getrockneten Komposite weisen nach der Post-Polymerisation einen E-Modul von bis zu 2500 MPa auf und liegen damit trotz der geänderten Mikrostruktur im Bereich der CaCO_3 -Komposite.

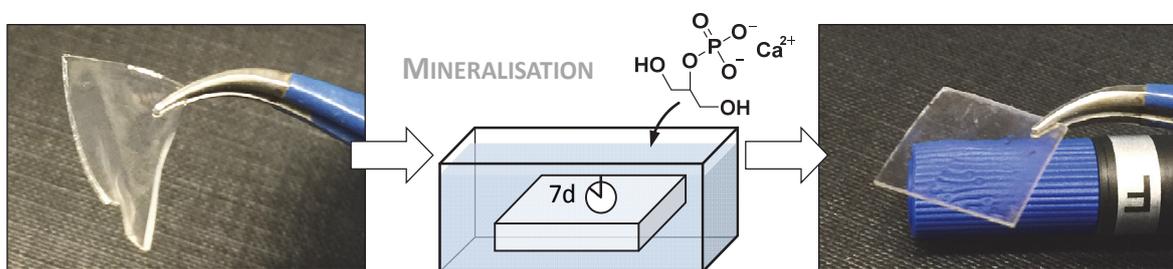


Abbildung 5.2 | Bilder eines wassergequollenen, DMA-basierten Netzwerks mit 7 Gew% EDPOA sowie 0,4 Gew% immobilisierter, alkalischer Phosphatase nach 5 min (links) und nach 7 d (rechts) Calcifizierung in einer Calcium-2-Glycerolphosphat-Lösung (11 g/l) in Triethanolamin-Puffer (pH 9,8) bei Raumtemperatur (RT).

Deutlich anders verhält sich jedoch ihre Mechanik im wassergequollenen Zustand. Die Komposite sind trotz der Mineralisierung noch in der Lage, zwischen 50% und 90% Wasser aufzunehmen. Dennoch weisen die calcifizierten Acrylamid-basierten Netzwerke einen extremen Anstieg ihrer Steifigkeit auf (**Abbildung 5.2**). Anstelle der für die reinen Hydrogele typischen 20 kPa weist der gequollene Komposit einen E-Modul von 155 ± 15 MPa auf. Dies übertrifft bisher bekannte, steife Hydrogele oder -komposite bereits um den Faktor 15. Gleichzeitig verfügen diese wassergequollenen Komposite auch über eine hohe Zähigkeit von bis zu 1246 ± 68 J/m² (reines Acrylamid 200 J/m²), die mit Knorpelgewebe (1000 J/m²)⁴⁷ vergleichbar ist. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Eigenschaftssprung durch die Perkolation der gebildeten anorganischen Phase in der Matrix hervorgerufen wird, wodurch sich ein anorganisches in einem organischen Netzwerk ausbildet. Der anorganische Anteil macht dabei nur 15 Vol% im gequollenen Querschnitt aus. Auch bei den DMA-basierten Netzwerken ist eine ähnliche Verbesserung der Steifigkeit durch die Mineralisierung zu beobachten, allerdings bleibt hier die Zähigkeit mit einer Bruchenergie von 65 ± 25 J/m² auf einem geringeren Niveau. Durch Einbau von bis zu 10 Gew% Phosphonatgruppenhaltigem Ethyl-2-[4-(Dihydroxyphosphoryl)-2-Oxabutyl]-Acrylat (EDPOA) in die DMA-basierte Matrix kann die Zähigkeit der Komposite bis um das 8-fache gesteigert werden. Zudem steigert die Zugabe von bis zu 7 Gew% EDPA den E-Modul des gequollenen Komposits weiter auf bis zu 440

MPa. Die gequollenen Hybridmaterialien weisen mit zunehmendem Phosphonat-Gehalt nach der Calcifizierung eine immer stärkere Transparenz auf, ohne dass der anorganische Anteil signifikant abnimmt. Der Grund dafür ist die Verringerung der Größe der im Hydrogel gebildeten sphärischen Strukturen mit steigender Zahl an Phosphonatgruppen im Netzwerk. Ein 10 prozentiger Anteil des Phosphonatmonomers führt schließlich zu einer hohen Transparenz des Verbundmaterials, die jedoch mit einer Abnahme des E-Moduls auf 56 ± 15 MPa verbunden ist. Dabei ist jedoch bemerkenswert, dass die immer noch stark erhöhte Steifigkeit dieses Komposits nur durch 4,5 Vol% CaP in der gequollenen Polymermatrix verursacht wird. Die AP-induzierte Mineralisierung ist daher die erste Methode, um transparente, zähe und ultrasteife Hydrogele mit einer perkolierten anorganischen Struktur zu erzeugen.

Als drittes System kommen in der Natur neben CaCO_3 - und CaP-Hybridmaterialien auch Komposite auf Basis von SiO_2 vor. Daher wurde ebenfalls untersucht, ob die Enzym-induzierte Silifizierung in einem Hydrogel ebenfalls realisierbar ist. Es konnten dazu die Enzyme Lysozym und Papain identifiziert werden, die es ermöglichen SiO_2 aus einer wässrigen, silikathaltigen Lösung auszufällen. Die homogene Immobilisierung von Lysozym in HEA- und DMA-basierten Netzwerken verlief erfolgreich, jedoch führte ihre Quellung in einer Silikat-Lösung nur zu einer Silifizierung der Netzwerkoberflächen. Durch weitere Versuche konnte gezeigt werden, dass auch ohne Enzym bereits die Anwesenheit von Amid- oder quartären Ammoniumgruppen im Netzwerk ausreicht, um die Ausfällung des Silikats auf ähnliche Weise zu induzieren. Dies zeigt, dass wahrscheinlich kein enzymatischer Prozess für die Ausfällung von SiO_2 verantwortlich ist, sondern dieser nur durch elektrostatische Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Dass grundsätzlich eine Silifizierung der Netzwerke möglich ist, konnte durch die Vorbeladung der Matrix mit Kieselsäure gezeigt werden. Dies führt zur Ausbildung anorganischer Strukturen innerhalb der Polymermatrix mit einem Anteil von 12 Gew% ohne dadurch jedoch die Mechanik signifikant zu beeinflussen. Dabei ist der Silifizierungsgrad unabhängig davon, ob als Substratlösung Silikat-Lösung oder Wasser verwendet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass es dem gelösten Substrat nicht möglich ist, innerhalb der Hydrogele zu diffundieren, da das Silikat beim ersten Kontakt mit dem Netzwerk ausfällt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Enzym-induzierte Silifizierung grundsätzlich möglich ist, jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig sind, um ein geeignetes Enzym- sowie Substratsystem zu finden.

5.2 Kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen mit Lotus-Effekt

DOW 5700 ist ein kontaktaktiv-antimikrobieller Wirkstoff, der z.B. für eine antimikrobielle Ausstattung von Glas verwendet wird. Eine solche Beschichtung weist dabei zudem hydrophobe Oberflächeneigenschaften auf. Der Wirkstoff ist jedoch unglücklicherweise nicht geeignet, um bereits hydrophobe Oberflächen wie Silikon vor Mikroorganismenbewuchs zu bewahren, da er sich im Gegensatz zu Glas invers auf der Oberfläche anlagert und so nicht mehr antimikrobiell wirksam ist (**Abbildung 5.3**).

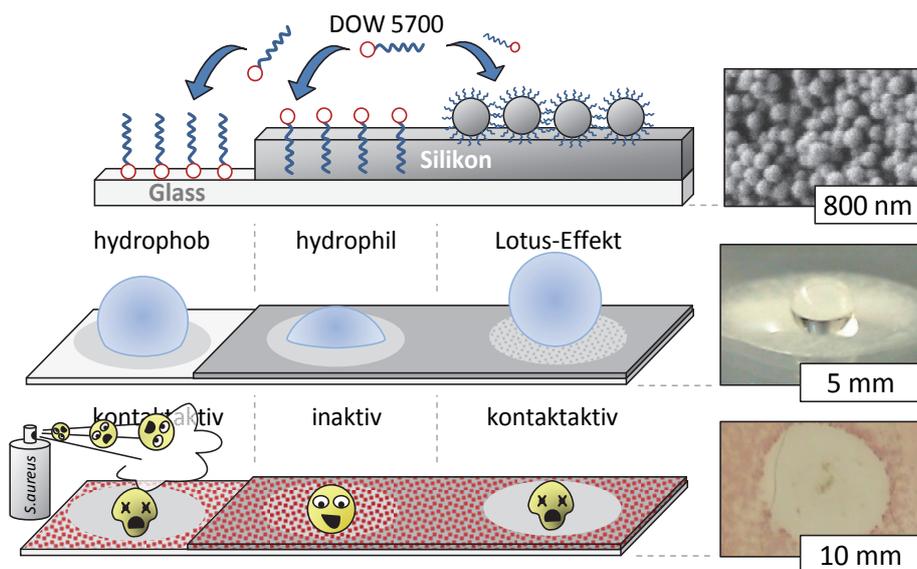


Abbildung 5.3 | Schema der Auftragung von DOW 5700 und mit DOW 5700 modifizierten Siliziumdioxid-Nanopartikeln auf Glas- und Silikonoberflächen (obere Reihe), sowie die daraus resultierenden Wasserkontaktwinkel (mittlere Reihe) und antimikrobiellen Wirksamkeiten gegen *Staphylococcus aureus* (untere Reihe).

Zudem weisen kontaktaktiv-antimikrobielle Oberflächen die Problematik auf, dass die Wirksamkeit durch die Anhaftung toter Zellen auf der Oberfläche abnimmt, wenn diese nicht entfernt werden. Auf Basis der Stöber-Synthese konnte ein Verfahren entwickelt werden, bei dem die dabei hergestellten anorganischen Siliziumdioxid-Nanopartikel (aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Glas) in einem darauffolgenden Schritt mit dem kontaktaktiv-antimikrobiellen Wirkstoff DOW 5700 modifiziert werden können. Die in verschiedenen Größen (100, 300 und 450 nm) hergestellten, modifizierten Partikel zeigen, im Gegensatz zu den nicht modifizierten Partikeln, eine kolloidale Löslichkeit in Chloroform. Die modifizierten Partikel lassen sich auf Glas aufgetragen leicht von der Oberfläche entfernen, wohingegen sie auf Silikon, auch nach dem Eintauchen in Wasser, eine sehr gute Haftung aufweisen. Die Auftragung der Partikel per Drop-Coating aus Methanol, Aceton und Ethylacetat führt zu defektfreien Beschichtungen. Der Kontaktwinkel von Wasser auf diesen Partikelschichten beträgt $138^\circ \pm 7^\circ$ (Silikon $110^\circ \pm 5^\circ$), wodurch sie als superhydrophob bezeichnet werden können. Zudem konnte eine sehr geringe Kontaktwinkel-Hysterese gemessen werden. Ein

Kippen der Beschichtungen um 5° führt bereits dazu, dass ein aufgegebener Wassertropfen von der Oberfläche abrollt. Dies zeigt, dass so beschichtete Oberflächen über einen Selbstreinigungseffekt (Lotus-Effekt) verfügen. Die Bewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit wurde mit Hilfe eines Bakteriensprühtests durchgeführt. Dabei konnte eine sehr gute Wirkung der auf Silikon aufgetragenen Partikel gegen *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden.

Die Beschichtung von Silikon mit DOW 5700 modifizierten SiO₂-Nanopartikeln ermöglicht erstmals die wirksame Ausstattung von Silikonoberflächen mit kontaktaktiv-antimikrobiellen Verbindungen ohne dabei ihre hydrophoben Oberflächeneigenschaften zu verlieren. Diese werden durch die Partikelschicht sogar noch weiter verbessert und ermöglichen zudem die Kombination einer kontaktaktiv-antimikrobiellen Wirkung mit einem Lotus-Effekt.

6 Experimenteller Teil

6.1 Chemikalienliste

Tabelle 6.1 | Monomere, Vernetzer, Polymere und Initiatoren für Netzwerke zur Immobilisation der Enzyme.

Name	Abkürzung	CAS-Nr.	Bemerkungen	Zulieferer
Acrylamid	AAM	79-06-1	≥99%	Sigma-Aldrich
Acrylsäure	-	79-10-7	99%	Sigma-Aldrich
Natrium-Alginat	Alg	9005-38-3	<i>Braunalge</i>	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat	APS	7727-54-0	>98%	Roth
N,N-Dimethylacrylamid	DMA	2680-3-7	99%	Sigma-Aldrich
Ethyl-2-[4-(Dihydroxyphosphoryl)-2-Oxabutyl]-Acrylat	EDPOA	-	-	Ivoclar Vivadent
2-Ethyl-2-oxazolin	EtOx	10431-98-8	99%	TCI Europe
Gelatine	-	9000-70-8	<i>Schweinehaut, Typ A</i>	VWR
2-Hydroxyethylacrylat	HEA	818-61-1	97%	TCI Europe
IRGACURE 651 / 2,2-Dimethoxy-1,2-diphenylethan-1-on	IG651	24650-42-8	>98%	Ciba
IRGACURE 2959 / 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenone	IG2959	106797-53-9	>98%	TCI Europe
2-(Methacryloyloxyethyl) trimethylammoniumchlorid	QuAAc	5039-78-1	72 Gew% in H ₂ O	VWR
Methylcellulose	-	9004-67-5	Visk. 400 cP in 2%iger wässriger Lösung	Acros
N,N'-Methylen-bis-Acrylamid	MBAm	110-26-9	99%	Merck
Poly-2-Ethyl-2-Oxazolin	PEtOx	25805-17-8	500 000 g/mol	Acros
Polyethylenglykol	PEG	25322-68-3	6 000 g/mol	Merck
Tetraethylenglycoldimethacrylat	TEG	109-17-1	95%	Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	-	110-18-9	99%	Sigma-Aldrich

Experimenteller Teil

Tabelle 6.2 | Enzyme und Chemikalien für die Calcifizierungslösung.

Name	Abkürzung	CAS-Nr.	Bemerkungen	Zulieferer
Alkalische Phosphatase (36,8 U/mg)	AP	9001-78-9	Grade II / Kalbsdarm Proteingehalt: 40%	AppliChem
Lysozym	-	9001-63-2	Hühnereiklar	AppliChem
Papain	-	9001-73-4	Carica papaya	Sigma-Aldrich
Proteinase K	-	39450-01-6	Tritirachium album	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin	BSA	9048-46-8	Fraktion V	Roth
Trypsin	-	9002-07-7	Schweine Pankreas	Sigma-Aldrich
Urease (35 U/mg)	-	9002-13-5	Canavalia ensiformis (Jackbohne) Proteingehalt: 10 %	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid	CaCl ₂	10043-52-4	97%	ABCR
Calcium-2-glycerolphosphat	CaGP	58409-70-4	80% β- und 20% rac-α-Isomer	Sigma-Aldrich
D-Glucose-6-Phosphat	G6P	3671-99-6		AppliChem
Glutaraldehyd	-	111-30-8	50 Gew% in H ₂ O	Merck
Harnstoff (Urea)	-	57-13-6	zur Analyse	Merck/ABCR
Kieselsäure	-	1343-98-2	99,9%	Sigma-Aldrich
Natrium-Silikat-Lösung (Wasserglas)	-	13472-30-5 Prod.13729	≥ 10% NaOH, ≥ 27% SiO ₂	Sigma-Aldrich
Triethanolamin	TEA	102-71-6	reinst (p.a.)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan	TRIS	77-86-1	99,3%	Roth

Tabelle 6.3 | Sonstige Chemikalien für die Calcifizierung.

Name	Abkürzung	CAS-Nr.	Bemerkungen	Zulieferer
Butylhydroxytoluol	BHT	128-37-0	>99%	Sigma-Aldrich
Chloroform	-	865-49-6	>99,9%	AppliChem
Deuteriertes Chloroform	-	865-49-6	wasserfrei	Roth
α,α'-Dibromo-p-Xylol	DBpX	623-24-5	97%	Acros
Diethylether	-	60-29-7	>99,5%	VWR
N-[3-(Dimethylamino)- propyl]methacrylamid	AMA	5205-93-6	99%	Sigma-Aldrich
Eisessig	-	64-19-7	>99%	VWR
Ethanol	EtOH	64-17-5	technisch	VWR
Formaldehyd (Formalin)	-	50-00-0	37% in H ₂ O	Merck
Kaliumcarbonat	-	584-08-7	>99%	VWR
Salzsäure	HCl	7647-01-0	37% in H ₂ O	Merck
Silbernitrat	AgNO ₃	7761-88-8	>99%	VWR
Natriumthiosulfat	-	7772-98-7	99% (wasserfrei)	Roth

Tabelle 6.4 | Chemikalien für die SiO₂-Partikelsynthese und Modifizierung.

Name	Abkürzung	CAS-Nr.	Bemerkungen	Zulieferer
Aceton	-	67-64-1	technisch	Merck
Ammoniak-Lösung	NH ₃	1336-21-6	25 Gew%	Merck
Butanol	BuOH	71-36-3	99%	Alfa Aesar
Chloroform	CHCl ₃	865-49-6	zur Synthese	Applichem
Calciumhydrid	-	7789-78-8	95%	Sigma-Aldrich
Dichlormethan	DCM	1975-09-02	zur Synthese	VWR
Diethylether	-	60-29-7	>99,5%	VWR
Dimethyloctadecyl[3-trimethoxysilylpropyl]-ammoniumchlorid	DOW5700	27668-52-6	60 Gew%	Acros
Essigsäure	-	64-19-7	99%	VWR
Ethanol	EtOH	64-17-5	technisch	VWR
Ethylacetat	-	141-78-6	99%	VWR
Isopropanol	-	67-63-0	technisch	Sigma-Aldrich
Methanol	MeOH	67-56-1	technisch	Applichem
Molekularsieb	-	-	Porengröße 4 Å	Merck
Natriumhydroxid	NaOH	1310-73-2	-	Merck
Salzsäure	HCl	7647-01-0	37% in H ₂ O	Merck
Sylgard 184	-	-	2K-Sillikon	Merck
Tetraethoxysilan	TEOS	78-10-4	99%	Sigma-Aldrich
Tetrahydrofuran	THF	109-99-9	99%	VWR
Toluol	-	108-88-3	zur Synthese	VWR

Alle technischen Lösungsmittel wurden vor der Verwendung mit Hilfe eines Rotationsverdampfers destilliert.

Tabelle 6.5 | Bakterien und Chemikalien für den Bakterienprüftest.

Name	Abkürzung	CAS-Nr.	Bemerkungen	Zulieferer
Agar	-	9002-18-0	bacteriology grade	AppliChem
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>	-	-	DSMZ
Natriumchlorid	NaCl	7647-14-5	99,9%	Fischer
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	7558-80-7	wasserfrei	Merck
Standard-I-Nährbouillon	-	-	-	AppliChem
2,3,5-Triphenyltetraazoliumchlorid	-	298-96-4	≥95%	AppliChem

6.2 Darstellung der Calciumcarbonat (CaCO_3)-Calcifizierungslösungen

In eine 1 l Schraubdeckelflasche wurden 10 g Harnstoff (0,17 mol/l) und 30 g CaCl_2 (0,27 mol/l) eingewogen. Die Feststoffe wurden in entweder entgastem, bidestilliertem Wasser (**Kapitel 6.2.1**) oder TRIS Puffer (**Kapitel 6.2.2**) mit pH 7,5 oder pH 9,3 gelöst und zum Schluss auf 1 l aufgefüllt.

6.2.1 Entgasen des bidestillierten Wassers

2 l bidestilliertes Wasser wurden in einen 2 l Zweihals-Rundkolben gefüllt und mit Hilfe einer Heizhaube auf höchster Stufe zum Kochen gebracht. Auf einem der Hälse wurde, sobald das Wasser über eine Minute kochte, eine Schliffolive mit Argon-Anschluss befestigt und mit einer Schliffklemme gesichert. Im Anschluss wurde die Heizhaube ausgeschaltet und ein leichter Argon-Strom in den Kolben geleitet. Der zweite Hals wurde nach etwa 1 Minute mit einem Glasstopfen verschlossen und mit einer Schliffklemme gesichert. Unter leichtem Argonüberdruck wurde das Wasser abgekühlt, bis es Raumtemperatur (RT) erreicht hatte. Zum Schluss wurde das entgaste Wasser in eine mit Argon gefüllte 2 l Schraubdeckelflasche unter Zufuhr eines kontinuierlichen Argonstroms umgefüllt und dicht verschlossen.

6.2.2 Herstellung des TRIS-Puffers

Für den Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Puffer wurden 12,1 g (0,1 mol/L) in eine Argon-gefüllte 1 l Schraubdeckelflasche gegeben und mit 900 ml entgastem, bidestilliertem Wasser unter Rühren mit einem Rührfisch auf einer Heizplatte gelöst. Unter Kontrolle des pH-Wertes mittels eines pH-Meters wurde danach so lange 32%ige HCl zugetropft, bis sich ein konstanter pH-Wert von 7,5 bzw. 9,3 eingestellt hatte.

6.3 Darstellung der Calciumphosphat (CaP)-Calcifizierungslösungen

In eine 1 l Schraubdeckelflasche wurden 11 g Calcium-Glycerol-Phosphat (0,052 mol/L) eingewogen. Der Stoff wurde durch Zugabe von 0,2 M Triethanolamin (TEA)-Puffers (**Kapitel 6.3.1**) mit pH 9,8 gelöst und zum Schluss auf 1 l aufgefüllt.

6.3.1 Herstellung des Triethanolamin-Puffers

Zur Herstellung des TEA-Puffers wurden 29,84 g (0,2 mol) in eine 1 l Schraubdeckelflasche gegeben und mit 900 ml bidestilliertem Wasser unter Rühren mit einem Rührfisch auf einer Heizplatte gelöst. Unter Kontrolle des pH-Wertes mittels eines pH-Meters wurde danach so lange 1 M HCl zugetropft, bis sich ein konstanter pH-Wert von 9,8 eingestellt hatte. Der Rührfisch wurde im Anschluss entfernt und das Volumen in der Flasche mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

6.4 Darstellung der SiO₂-Mineralisierungslösungen

Eine konzentrierte Natriummetasilikat-Lösung (Wasserglas, $\rho = 1,36 \text{ g/cm}^3$) mit einer Ausgangskonzentration von 27 Gew% SiO₂ (6,1 mol/l) wurde zur Herstellung einer Ausgangslösung mit bidestilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 mmol/l SiO₂ verdünnt. Dazu wurden 1640 μl Wasserglas in eine 100 ml Schraubdeckelflasche pipettiert und das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 90 ml aufgefüllt. Unter Kontrolle des pH-Wertes mittels eines pH-Meters wurde so lange 1 M HCl zugetropft bis sich ein pH-Wert von 7 bzw. 10 eingestellt hatte. Im Anschluss wurde das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Niedrigere Silikat-Konzentrationen wurden durch Verdünnung der 100 mM Ausgangslösung mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

6.5 Aufbereitung der Monomere per Vakuumdestillation

Die Monomere N,N-Dimethylacrylamid (DMA), Acrylsäure und 2-Hydroxyethylacrylat (HEA) für die Netzwerksynthese wurden vor der Verwendung immer frisch mit Hilfe einer Mikro-Destillationsapparatur destilliert und damit vom Stabilisator und eventuell vorhandenen polymeren Bestandteilen getrennt. Dazu wurden 20 ml des jeweiligen Monomers in einem 25 ml Kolben mit Rührfisch vorgelegt und das Ölbad mittels einer Heizplatte auf die angegebene Temperatur erwärmt (**Tabelle 6.6**). Im Anschluss wurde der Kolben an die Mikro-Destillationsapparatur angeschlossen, der Druck eingestellt und der Kolben im temperierten Ölbad erwärmt, sodass die Destillation startete. Etwa 5 % des Destillats wurden als Vorfraktion verworfen und dann die Hauptfraktion aufgefangen. Als noch etwa 10 % im Kolben verblieben waren, wurde die Destillation gestoppt, die Apparatur mit Argon belüftet, der Kolben mit dem Destillat abgenommen und mit einem Septum verschlossen. Die anschließende Lagerung der Monomere bis zu ihrem Einsatz erfolgte bei -25°C. Alle sonstigen verwendeten Monomere wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet.

Tabelle 6.6 | Parameter zur Destillation der Monomere.

Chemikalie	Ölbad-Temperatur	Druck
2-Hydroxyethylacrylat	58°C	minimal
N,N-Dimethylacrylamid	80°C	11 mbar
Acrylsäure	60°C	21 mbar

6.6 Synthese acrylatterminierter Polyethyloxazolin-Vernetzer

Die Synthese des 2-Ethyl-2-oxazolin (EtOx) basierten Vernetzers ($M_n \sim 5000 \text{ g/mol}$) wurde nach einer von DECH beschriebenen Methode⁷⁰ durchgeführt. Dazu wurde der Initiator α, α' -Dibromo-p-xylo

(DBpX) zuerst von Verunreinigungen befreit, indem in einem 100 ml Kolben 2 g Initiator mit 70 ml wasserfreiem Chloroform gemischt und durch Schütteln bei RT gelöst wurde. Im Anschluss wurde das Lösungsmittel soweit mittels eines Rotationsverdampfers entfernt, bis ein erster leichter Niederschlag am Boden des Kolbens zu erkennen war. Der Kolben wurde dann über Nacht im Tiefkühlschrank bei -18 °C gelagert. Am nächsten Tag konnte der auskristallisierte Feststoff über eine Filternutsche abgetrennt werden. Dieser wurde erneut in einem 100 ml Kolben in 60 ml wasserfreiem Chloroform gelöst und die Prozedur noch einmal wiederholt. Der am nächsten Tag erhaltene Feststoff wurde wiederum über eine Nutsche abgetrennt und im Feinvakuum getrocknet. Es erfolgt eine Kontrolle mittels ^1H -NMR in deuteriertem Chloroform.

Das EtOx wurde vor der Verwendung mittels Destillation von Verunreinigungen befreit. Dazu wurde die Destillationsapparatur mit einer Vigreux-Kolonne und Liebigkühler bei 160 °C über Nacht im Ofen ausgeheizt, heiß zusammengebaut und während des Abkühlvorgangs mit Argon gespült. 25 ml EtOx wurden in einen ausgeheizten mit Argongas befüllten 50 ml Kolben vorgelegt und mehrere Spatelspitzen Calciumhydrid sowie ein Rührfisch zugegeben. Der Kolben wurde dann an die mit Argon gespülte Apparatur angeschlossen. Die Mischung wurde für 1 h bei RT mit 600 U/min unter Argon-Atmosphäre gerührt. Im Anschluss wurde der Druck auf 25 mbar gesenkt und die Temperatur des Kolbens mit Hilfe eines Ölbad und einer Heizplatte auf 50 °C erhöht. Etwa 10 % des Destillats wurden als Vorfraktion verworfen, während die Hauptfraktion auf ausgeheiztem Molekularsieb mit einer Porengröße von 4 Å aufgefangen wurde. Als noch etwa 10 % im Kolben verblieben waren, wurde die Destillation gestoppt, die Apparatur mit Argon belüftet, der Kolben mit dem Destillat abgenommen und mit einem Septum verschlossen. Die Reinheit des Destillats erfolgte durch eine Kontrolle mittels ^1H -NMR in deuteriertem Chloroform.

N-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamid (AMA) wurde vor Verwendung mit Hilfe einer Mikro-Destillationsapparatur destilliert. Die Apparatur wurde bei 160 °C über Nacht ausgeheizt, heiß zusammengebaut und zum Abkühlen mit Argon gespült. Das Acrylamid wurde in einem ausgeheizten 50 ml Kolben mit Rührfisch und 2 Spatelspitzen Butylhydroxytoluol (BHT) vorgelegt und an die Apparatur angeschlossen. Der Druck der Destille wurde mit der maximalen Pumpenleistung auf etwa 1 mbar reduziert und das Ölbad auf 130 °C erhitzt. Etwa 10 % des Destillats wurden zu Beginn als Vorfraktion verworfen und anschließend die Hauptfraktion aufgefangen. Die Destillation wurde beendet, nachdem weniger als 20 % des Stoffes im Sumpf verblieben waren. Der Kolben mit Destillat wurde unter Argonatmosphäre abgenommen und mit einem Septum verschlossen. Die Reinheit der Destillate wurden mittels NMR in deuteriertem Chlorofom kontrolliert.

Die Synthese des Vernetzers erfolgte in einer bei 160 °C ausgeheizten 50 ml Schraubdeckelflasche mit temperaturbeständigem Deckel (rot) und einem Magnetrührer. Diese wurde heiß in ein mit Argon gefülltes 5 l Becherglas gestellt und 0,27 g (1,02 mmol) DBpX sowie 15 ml wasserfreies Chloroform zugegeben. Über eine mit Argon gespülte Spritze konnten dann 5,2 ml (51,5 mmol) EtOx zugegeben werden. Die Schraubdeckelflasche wurde daraufhin dicht verschlossen und mit Hilfe einer Labormikrowelle für 4 h auf 120 °C erhitzt. Nach Ablauf der Zeit wurde das Reaktionsgefäß zum Abkühlen wieder in ein Argon gefülltes 5 l Becherglas gestellt, geöffnet und 9,29 ml (51,5 mmol) AMA sowie eine Spatelspitze BHT zugegeben. Das Gefäß wurde wieder geschlossen und für 48 h in einem auf 45 °C temperierten Ölbad gerührt (500 U/min). Nach der Terminierung wurde das Gemisch in einen 250 ml Kolben mit 200 ml mit Diethylether und Magnetrührer gegeben und für 20 min bei 500 U/min gerührt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Nach Abschalten des Rührers wurde gewartet, bis der Feststoff vollständig auf dem Boden sedimentiert war, wonach die klare Flüssigkeit dekantiert wurde. Der verbliebene Rest konnte wieder in 10 ml Chloroform gelöst und erneut (wie beschrieben) in Diethylether ausgefällt werden. Dieser Vorgang wurde insgesamt 6-mal durchgeführt. Zum Schluss wurde das Polymer am Feinvakuum für mehrere Stunden getrocknet.

NMR des synthetisierten AMA-PEtOx-DBpX-PEtOx-AMA:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 6.96 - 7.16 (m, 4 H, -C₆H₄-) 5.72 - 5.94 (m, 2 H, H₂C=C-) 5.31 (br. s., 2 H, H₂C=C-) 4.37 - 4.65 (m, 4 H, -CH₂-C₆H₄-CH₂-) 3.10 - 4.01 (m, 242 H, -N-CH₂-CH₂-N-, -HN-CH₂-CH₂-CH₂-N-, -N-CH₃) 2.01 - 2.62 (m, 118 H, -CH₂-CH₃, -N-CH₂-CH₂-CH₂-N-) 1.91 (br. s., 6 H, H₃C-C=) 0.75 - 1.34 (m, 172 H, -CH₂-CH₃)

6.7 Herstellung der Polymernetzwerke

Die enzybeladenen Netzwerke wurden immer nach dem gleichen Prinzip (**Abbildung 6.1**) hergestellt, die genauen Zusammensetzungen und Einwaagen sind den Tabellen in **Kapitel 6.7.4** zu entnehmen. Dazu wurden zuerst die Monomere [M] bzw. Vernetzer [VN] in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß zusammen mit dem Initiator [I] eingewogen und mittels Schütteln auf einem Vortex homogen vermischt. Die Enzymlösung wurde zeitgleich, separat hergestellt (**Kapitel 6.7.1**), und die benötigte Menge kurz vor der Polymerisation der Monomermischung zugegeben. Danach wurde alles mittels Schütteln auf einem Vortex vermischt. Voraussetzung für die Weiterverwendung der hergestellten Mischung war, dass sich diese vollständig transparent zeigte, also das Enzym gelöst vorlag. Die Mischung wurde dann in eine Polymerisationsform (**Kapitel 6.7.3**) mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette überführt und mit einem mit Klebeband-beschichteten Objektträger abgedeckt. Die Polymerisation erfolgte in einer UV-Kammer mit einem Strahlungsmaximum bei 340 nm

(Heraeus Kulzer, Typ Heraflash: 3 Intervalle a 180 s oder Emmi-Nail Premium: 4 Intervalle a 120 s), wobei nach jedem Intervall die Polymerisationsform gewendet wurde. Es wurde zudem darauf geachtet, dass die Filme sich während des Bestrahlungsintervalls nicht zu sehr aufheizten, weshalb bei Bedarf die Polymerisation unterbrochen und die Form auf einer kalten Platte abgekühlt wurde. Nach Ende der Bestrahlungszeit konnte die Form geöffnet und das Netzwerk entnommen werden. Diese wurden bis zu Ihrer Verwendung bei -25 °C zwischengelagert.

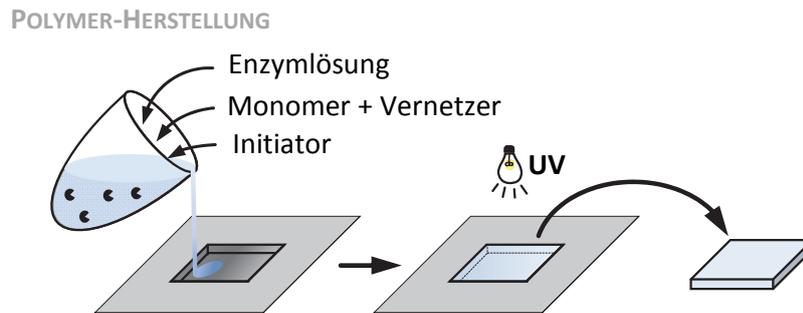


Abbildung 6.1 | Schematischer Ablauf der Herstellung eines Enzym-induziert mineralisierbaren Polymernetzwerks.

6.7.1 Herstellung der Enzymlösungen

Das für den jeweiligen Ansatz verwendete Enzym (**Kapitel 6.7.4**) wurde in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß eingewogen und bidestilliertes Wasser oder eine Pufferlösung zugeben, sodass die jeweilige Konzentration eingestellt wurde. Im Anschluss wurden die Komponenten durch Schütteln auf einem Vortex vermischt, bis sich das Enzym vollständig gelöst hatte.

Calcifizierung mit Calciumcarbonat (CaCO_3)

Die Urease wurde entweder direkt in entgastem bidestilliertem Wasser oder in 0,1 M TRIS-Puffer mit pH 9,3 (bei Verwendung von Acrylsäure oder QuAAc) gelöst. Normalerweise wurden Lösungen mit einer Konzentration von 1 mg Urease (1 Gew%, bezogen auf die Gesamtmenge an Monomer) pro 20 μl Flüssigkeit (50 g/l) verwendet. Bei einer Veränderung der Enzymkonzentration (0,05 bis 3 Gew%) wurde die Flüssigkeitsmenge von 20 μl stets beibehalten und nur die gelöste Enzymmenge variiert.

Calcifizierung mit Calciumphosphat (CaP)

Die alkalische Phosphatase (AP) wurde in der Regel mit einer Konzentration von 0,4 mg (0,4 Gew%, bezogen auf die Gesamtmenge Monomer) pro 20 μl (20 g/L) in 0,2 M TEA-Puffer mit pH 9,8 oder in einer Mischung aus 0,2 M TEA-Puffer und Polyglutaraldehyd (PGL)-TEA-Pufferlösung (**Kapitel 6.7.2**) gelöst. Für letztere Lösung wurde das Enzym zuerst mit TEA-Puffer (10 μl) vorgelöst und danach die PGL-TEA-Pufferlösung (10 μl) zugeben. Bei einer Veränderung der Enzymkonzentration wurde die Flüssigkeitsmenge von 20 μl stets beibehalten und nur die gelöste Enzymmenge variiert.

Mineralisierung mit Siliziumdioxid (SiO₂)

0,1 bis 5 mg des Enzyms Lysozym wurden einzeln oder in Kombination mit 0,5 bzw. 1 mg AP in 20 µl bidestilliertem Wasser gelöst. Bei einer Veränderung der Enzymkonzentration wurde die Flüssigkeitsmenge von 20 µl stets beibehalten und nur die gelöste Enzymmenge variiert.

6.7.2 Herstellung der Polyglutaraldehyd-Stammlösung und -Pufferlösung

Die Herstellung der Polyglutaraldehyd (PGL)-Stammlösung erfolgte nach den Vorgaben von *TANRISEVEN*²⁷¹ durch die Polymerisation von Glutaraldehyd. Dazu wurden 10 ml einer wässrigen 50 Gew%-igen Glutaraldehyd-Lösung in ein 25 ml Schraubdeckelglas mit Polyethylen-Dichtung vorgelegt. Ferner wurden 10 ml bidestilliertes Wasser und ein Rührfisch hinzugefügt. Unter ständigem Rühren bei 200 U/min auf einem Magnetrührer wurde der pH-Wert der 25 Gew%-igen Lösung durch Zugabe von 0,6 ml einer wässrigen 1 M NaOH-Lösung auf 10,5 eingestellt, was mittels pH-Elektrode kontrolliert wurde. Die Lösung wurde für 30 Minuten bei RT gerührt. Nach Ablauf der Zeit erfolgte die Neutralisierung der Lösung durch Zugabe von 0,6 ml einer wässrigen, 1 M HCL-Lösung. Die Lagerung der PGL-Stammlösung erfolgte im Kühlschrank.

Im Anschluss wurden 848 µl der PGL-Stammlösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in 9152 µl 0,2 M TEA-Puffer eingestellt auf pH 9,8 (siehe **Kapitel 6.3.1**) in einem 25 ml Schraubdeckelglas mit PE-Dichtung gemischt. Die Haltbarkeit der PGL-TEA-Pufferlösung war begrenzt, da sie nach einigen Tagen eintrübte, weshalb sie jeden Tag frisch angesetzt wurde.

6.7.3 Bau der Polymerisationsformen

Als Polymerisationsform wurden zwei Glasobjektträger (25 mm x 75 mm) als Boden und Deckel blasenfrei mit Klebeband beschichtet. Als Abstandshalter wurden auf dem Boden mehrere Streifen Klebeband übereinander geklebt, um einen definierten Abstand einstellen zu können. Dabei wurden so viele Schichten verwendet, dass ein 275 ± 25 µm Abstand zwischen Deckel und Boden bestand. Nur zur Herstellung von Filmen für die Calcifizierung unter Dehnung (**Kapitel 4.1.11**) kamen 1 mm Abstandshalter zum Einsatz. Die Form wurde geschlossen, indem der Deckel auf die Bodenplatte mit dem Abstandshalter gelegt wurde.

6.7.4 Zusammensetzung der Polymer-Hydrogele auf Basis der Monomere HEA, DMA oder Acrylamid

Alle Rezepturen der in dieser Arbeit untersuchten Polymernetzwerke sind in den folgenden Tabellen beschrieben. Die Zusammensetzung eines Netzwerks ist immer auf 100 Gew% der Monomere (ohne Wasser, Enzym und Initiator) normiert. Diese setzt sich wie folgt zusammen:

$$\text{Monomer [M]} + \text{Additivmonomere [A]} + \text{Vernetzer [VN]} = 100 \text{ mg bzw. } 100 \text{ Gew\%}$$

Bei der Variation der Menge des Vernetzers oder Additivmonomers muss die Monomermenge dementsprechend angepasst werden.

Tabelle 6.7 | Grundnetzwerk-Rezepturen der HEA-, DMA- und Acrylamid-basierten Netzwerke

	PHEA-I-TEG	PDMA-I-TEG	PAAm-I-MBAm
2-Hydroxyethylacrylat [M]	99 mg	–	–
N,N-Dimethylacrylamid [M]	–	99 mg	–
Acrylamid-Lsg. (500 g/l) [M]	–	–	199,88 ml
Triethylenglycoldimethacrylat [V]	1 mg	1 mg	–
N,N'-Methylen-bis-Acrylamid (MBAm)-Lsg. (10 g/l) [VN]	–	–	6 µl
Irgacure 651 [I]	0,5 mg	0,5 mg	–
Irgacure 2959 [I]	–	–	2 mg
Enzymlösung	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 6.8 | Zusammensetzungen HEA-, DMA- und Acrylamid-basierter Netzwerke mit Additiv-Monomeren

	Acrylsäure [A]	QuAAc [A]	EDPOA [A]
2-Hydroxyethylacrylat / N,N-Dimethylacrylamid [M]	99 mg - x mg	99 mg - x mg	99 mg - x mg
Acrylamid-Lösung (500 g/l) [M]	–	–	199,88 µl - 2x µl
Triethylenglycoldimethacrylat [VN]	1 mg	1 mg	1 mg
Methylenbisacrylamid-Lösung (10 g/l) [VN]	–	–	6 µl
Additivmonomer	x mg	x mg	x mg
Irgacure 651	0,5 mg	0,5 mg	0,5 mg
Irgacure 2959	–	–	2 mg
Enzymlösung	20 µl	20 µl	20 µl

Bei der Herstellung dehnbarer semiinterpenetrierender Netzwerke (**Tabelle 6.9**) wird zur Monomermischung noch eine entsprechende Menge eines wasserlöslichen **Polymers** [P] hinzugegeben und so lange mittels eines Vortex geschüttelt, bis das Polymer vollständig gelöst ist.

Tabelle 6.9 | Zusammensetzung semiinterpenetrierender, dehnbare Netzwerke auf Basis von Acrylamid

	Alginate [P]	PEG [P]	PEtOx [P]	Methylcellulose [P]	Gelatine [P]
Acrylamid (500 g/l) [M]	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl
H ₂ O	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl	199,88 µl
Methylen-Bis-acrylamid-Lösung (10 g/l) [V]	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
N,N,N',N' Tetramethylethyldiamin-Lsg. (10 g/l) [I]	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (100 g/l) [I]	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Enzymlösung	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Polymer [P]	11 mg	–	–	–	–
Polymer-Lösung [P]	–	50 µl (200 g/l)	100 µl (100 g/l)	100 µl (100 g/l)	50 µl (200 g/l)

6.8 Mineralisierung der Polymernetzwerke

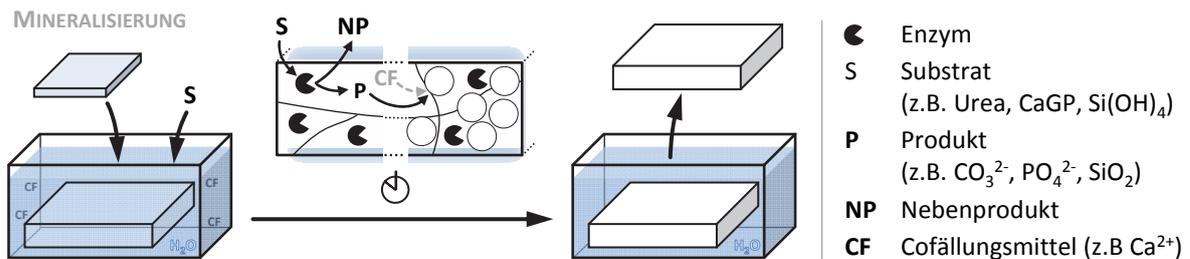


Abbildung 6.2 | Schematischer Ablauf der Mineralisierung eines Polymer-Netzwerkes

Die Mineralisierung der Polymernetzwerke lief nach dem in **Abbildung 6.2** beispielhaft dargestellten Prinzip ab. Dazu wurde immer ein enzymbeladener Polymerfilm in eine Schraubdeckelflasche mit Calcifizierungslösung gegeben. Für eine möglichst vollständige Mineralisierung wurden auf 100 mg Polymer, wenn nicht anders angegeben, jeweils 100 ml Lösung gegeben. Für eine Mineralisierung mit Calciumcarbonat wurde ein mit Urease beladenes Netzwerk (**Kapitel 6.6**) in eine Lösung aus Harnstoff (S) und CaCl₂ (CF) in Wasser oder TRIS-Puffer (**Kapitel 6.2**) eingelegt. Die Calciumphosphat Mineralisierung mittels eines Netzwerkes mit immobilisierter AP erfolgte in einer CaGP-Lösung in TEA-Puffer (**Kapitel 6.3**) und zur Abscheidung von Siliziumdioxid wurde ein mit Lysozym beladenes Netzwerk in eine Natriumsilikat-Lösung (**Kapitel 6.4**) gegeben. Die Temperatur der Lösung wurde vor Zugabe des Polymernetzwerkes eingestellt, indem diese in einem geregelten Ofen oder temperierten Wasserbad auf die gewünschte Temperatur erwärmt wurde. Die Temperatur wurde auf dieselbe Weise über die Dauer der Mineralisierung konstant gehalten. Die notwendige Zeit bis die maximale mögliche Calcifizierung erreicht wurde kann **Tabelle 6.10** entnommen werden (kürzere Zeiten führen zu geringeren Mineralisierungsgraden). Während der Mineralisation konnten jederzeit von den Filmen Proben entnommen werden und der Film im

Anschluss weiter mineralisiert werden. Nach Ende der Mineralisationszeit erfolgte die Entnahme der calcifizierten Netzwerke aus der Schraubdeckelflasche. Durch Abspülen und Quellen in bidestilliertem Wasser wurden die verbliebenen Reste der Lösung im Netzwerk entfernt. Die mineralisierten Filme wurden dann in mit bidestilliertem Wasser gefüllten Schnappdeckelgläsern bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 6.10 | Calcifizierungszeiten der Polymernetzwerke bei unterschiedlichen Temperaturen

	RT	37 °C	50 °C	60 °C	70 °C
CaCO ₃	48 h	–	24 h	24 h	24 h
CaP	7 d	7 d	–	–	–
SiO ₂	24 h	–	–	–	–

6.8.1 Calcifizierung unter Dehnung

Für die Calcifizierung unter Dehnung wurden hauptsächlich die semiinterpenetrierenden Polyacrylamid-basierten Netzwerke verwendet (siehe **Tabelle 6.9**). Da die Filmdicke durch starke Dehnung abnahm, wurden bei der Polymerisation der Filme größere Abstandhalter zwischen den Glasplatten von ca. 1 mm verwendet. Die hergestellten, enzymbeladenen Netzwerke wurden mit einer Rasierklinge in ca. 10 mm breite Streifen geschnitten. Ein Streifen wurde mit Hilfe zweier Pinzetten auf die beabsichtigte Länge gedehnt und dann vor der Mineralisation in eine Halterung eingespannt, die es ermöglichte die aufgebrachte Dehnung zu fixieren. Die dazu notwendige Vorrichtung (**Abbildung 6.3**) wurde aus einer PVC-Platte gesägt. Eine Halterung aus Metall, wie z.B. Messing, ist ungeeignet, da es durch die bei ihrer Korrosion in der Lösung freigesetzten Ionen zu einer Störung der Calcifizierung kommt. Die Klemmen zum Halten des gedehnten Films konnten durch Kabelbinder dauerhaft fixiert werden. Die Halterung sollte so groß sein, dass sie noch in ein 200 ml Schraubdeckelglas passte. Die komplette Apparatur mit eingespanntem Film wurde dann in die zuvor im Ofen oder Wasserbad temperierte CaCl₂/Urea- Calcifizierungslösung in einem 200 ml Schraubdeckelglas getaucht und mineralisiert.



Abbildung 6.3 | Kunststoffvorrichtung zum Fixieren der Dehnung eines Polymer-Hydrogels während der Calcifizierung.

6.9 Post-Polymerisation und Trocknung der calcifizierten Netzwerke

Nach der Mineralisierung konnten die Netzwerke für die weitere Charakterisierung entweder direkt im Vakuum über Nacht getrocknet oder vor der Trocknung noch einem Post-Polymerisationsprozess unterzogen werden.

Für die Post-Polymerisation wurden die noch feuchten Netzwerke für 10 Minuten in einer Monomer-, Vernetzer- und Initiator-Mischung gequollen, die der Zusammensetzung ihrer jeweiligen Netzwerkrezeptur entsprach. Nach dieser Zeit wurde der Film mittels zwei Klammern zwischen zwei mit Klebeband beschichteten Glasobjektträgern fixiert und die in den Film eingedrungene Monomermischung mittels UV-Licht in einer UV-Kammer mit einem Strahlungsmaximum bei 340 nm (Heraeus Kulzer - Typ Heraflash: 3 Intervalle a 180 s oder Emmi-Nail Premium: 4 Intervalle a 120 s) polymerisiert. Nach jedem Intervall wurde die Polymerisationsform dabei gewendet. Die post-polymerisierten Hybridmaterialien wurden im Anschluss im Vakuum über Nacht getrocknet.

6.10 Silber-Staining von Hydrogelen mit immobilisierter alkalischer Phosphatase

Zum Nachweis der Verteilung der alkalischen Phosphatase innerhalb der Polymernetzwerke wurden enzymbeladene Netzwerke nach ihrer Herstellung mit Silber gestaint. Dazu wurden verschiedene Lösungen basierend auf der „short silver nitrate staining“ Methode von CHEVALLET²³⁰ in 100 ml Schraubdeckelflaschen hergestellt.

1. **Fixierer:** 30 ml unvergälltes Ethanol, 10 ml Eisessig, 60 ml bidestilliertes Wasser
2. **Spüllösung:** 20 ml unvergälltes Ethanol, 80 ml bidestilliertes Wasser
3. **Wasser:** 100 ml bidestilliertes Wasser
4. **Sensitivierer:** 12,75 mg Natriumthiosulfat (wasserfrei), 100 ml bidestilliertes Wasser
5. **AgNO₃-Lösung:** 204 mg AgNO₃, 100 ml bidestilliertes Wasser
6. **Entwickler:** 3 g Kaliumcarbonat, 250 µl Formaldehydlösung (37%, Formalin), 125 µl einer 10 Gew% Natriumthiosulfat-Lösung, mit bidestilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen
7. **Stop-Lösung:** 4 g TRIS, 2 ml Eisessig, mit bidestilliertes Wasser auf 100 ml auffüllen

Alle Lösungen können vorbereitet und im Kühlschrank gelagert werden. Nur der Entwickler (6.) sollte erst kurz vor der Verwendung hergestellt werden und war ab diesem Zeitpunkt ca. 1 h haltbar.

Von einem zu stainenden Netzwerk wurde je ein etwa 10 x 5 mm breiter Streifen mit Hilfe einer Rasierklinge abgeschnitten. Die raumtemperierten Lösungen wurden in 10 ml Schnappdeckelgläser gefüllt und in einer Färbestraße hintereinander aufgebaut. Wie in der **Tabelle 6.11** aufgeführt,

wurden die Netzwerke mit einer Pinzette in der beschriebenen Reihenfolge (A bis N) in die Lösungen gegeben und für die angegebene Zeit dort belassen. Dabei wurde das Rollrandglas nach Möglichkeit geschüttelt.

Tabelle 6.11 | Ablauf der verwendeten Silbernitrat-Staining-Prozedur zur Anfärbung von alkalischer Phosphatase in einer Polymermatrix.

Reihenfolge	Lösung	Zeit	Bemerkung
A	1. Fixierer	30 min	bis auf 24 h verlängerbar
B	2. Spüllösung	10 min	-
C	2. Spüllösung	10 min	-
D	3. Wasser	10 min	-
E	3. Wasser	10 min	-
F	4. Sensitivierer	1 min	-
G	3. Wasser	1 min	-
H	3. Wasser	1 min	-
I	5. AgNO ₃ -Lösung	20 min	verlängerbar für intensivere Färbung
J	3. Wasser	10 sec	-
K	6. Entwickler	5 min	bis auf 45 min verlängerbar
L	7. Stop-Lösung	30 min	minimale Zeit
M	3. Wasser	30 min	minimale Zeit
N	3. Wasser	30 min	minimale Zeit

Nach erfolgreichem Staining sollte das Netzwerk eine hellbraune bis schwarze Färbung aufweisen. Die gestainten Netzwerke wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff gefroren und im Vakuum gefriergetrocknet. Die weitere Analyse wurde mit dem TEM, wie im nachfolgenden Kapitel angegeben, durchgeführt.

6.11 Analytische Methoden zur Charakterisierung von Hybridmaterialien

Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgendiffraktometrie (EDX)

Die mineralisierten Hydrogele wurden im Vakuum getrocknet und in flüssigem Stickstoff gebrochen. Die Proben wurden dann mit den Bruchflächen nach oben zeigend auf einem Aluminiumteller mit einem leitfähigen Klebepad befestigt. Zur Stabilisierung der Hybridmaterialien wurde zusätzlich leitfähige Kohlenstoffknetmasse verwendet. Die elektronenmikroskopischen Sekundärelektronen-Bilder wurden in einem Hitachi S-4500 mit Oxford Link ISIS System bei 1 keV mit einem Arbeitsabstand von 8 mm aufgenommen, EDX-Untersuchungen zur Elementanalyse wurden mit 10 keV und einem Arbeitsabstand von 15 mm durchgeführt.

**Transmissionselektronen Mikroskopie (TEM), Elektronendiffraktometrie (TED) und
Energiedispersive Röntgendiffraktometrie (EDX)**

Zur Vorbereitung wurden mit Hilfe eines Mikrotoms (Reichert Ultracut S) dünne Schnitte der Proben (50 bis 150 nm) mittels eines Diamantmessers hergestellt, die auf einem mit Kohlenstoff bedampften Kupfergitter abgelegt wurden. Die TEM- und TED-Aufnahmen wurden mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop von Philips (CM200) bei 200 keV aufgenommen. Die EDX-Untersuchungen zur Elementanalyse wurden mit einem Detektor der Firma SAMX mit den gleichen Parametern durchgeführt.

Bestimmung der Kristallstruktur von CaCO₃ mittels Infrarotspektroskopie

Die Bestimmung und Quantifizierung der Kristallstrukturen des in den Polymernetzwerken gebildeten Calciumcarbonats erfolgte mit Hilfe eines Bruker Alpha Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer (FTIR) mit ATR-Einheit (abgeschwächte Totalreflektion) über den Vergleich der Extinktion spezifischer Infrarot-Banden. Dabei zeigte reines Aragonit Signale bei 699 cm⁻¹ als auch 714 cm⁻¹, während Calcit nur eine Bande bei 712 cm⁻¹ aufweist.²⁰⁰ Die Erstellung einer Kalibriergraden mit Hilfe bekannter Mischungen von Aragonit und Calcit lieferte die folgende Formel zur Berechnung des Anteils an Aragonit:

$$\text{Aragonit [Gew\%]} = \frac{E_{699 \text{ nm}}}{0,0052 \cdot E_{712 \text{ nm}}} \quad \text{Gleichung 6.1}$$

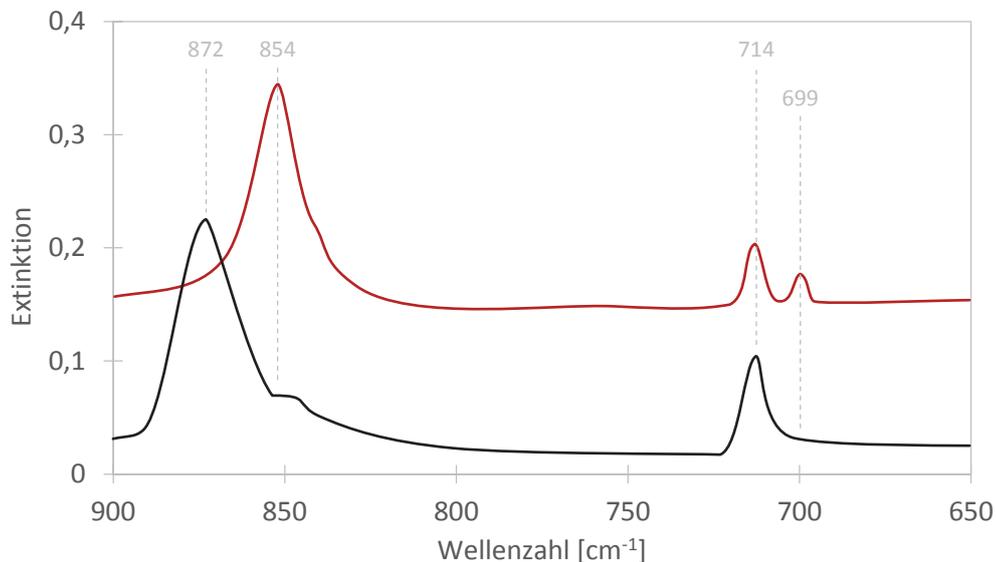


Abbildung 6.4 | Ausschnitte aus den ATR-FTIR-Spektren von zwei PHEA-I-TEG Netzwerken einmal mit hohem Aragonit- (rot) und einmal mit hohem Calcit-Anteil (schwarz) im Komposit.

Bestimmung der Enzym-Proteingehalte mittels UV-Vis-Spektroskopie

Die Bestimmung der Anteile an Protein in den vom Hersteller gelieferten Urease- bzw. AP-Enzympräparaten erfolgte mit einem Specord 210 BU UV-Vis-Spektrometer.

Der Proteingehalt wurde nach dem Prinzip des Bradford-Tests unter Verwendung von Roti-Nanoquant der Firma Roth bestimmt. Dazu wurde eine Kalibrationsreihe unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) mit Konzentrationen von 100 µg/mL bis 1 µg/mL und eine Nullprobe ohne Albumin hergestellt. Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die Roti-Nanoquant-Stammlösung 5-fach verdünnt (20 ml + 80 ml H₂O). Jeweils 200 µl jeder Probe der Kalibrationsreihe wurden mit 800 µl Arbeitslösung in einer Küvette vermischt und deren Extinktion gegen bidestilliertes Wasser bei 450 nm und 590 nm vermessen. Der Quotient $E_{590\text{nm}} / E_{450\text{nm}}$ wurde dann über die Konzentration aufgetragen und die Kalibrationsgerade bestimmt. Von den untersuchten Enzymen wurden Lösungen mit einer Konzentration von 100 µg/ml hergestellt und davon jeweils 200 µl mit 800 µl Arbeitslösung in einer Küvette gemischt. Wiederum wurden die Extinktion gegen bidestilliertes Wasser bei 450 nm und 590 nm vermessen und aus den Quotienten mit Hilfe der Kalibrationsgerade die Proteingehalte ermittelt.

Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase mittels UV-Vis-Spektroskopie

Die spezifische Aktivität der freien sowie der in Netzwerke eingeschlossenen AP wurde mit Hilfe eines Specord 210 BU UV-Vis-Spektrometers bestimmt. Zur Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten von p-Nitrophenol bei 25°C und 405 nm ($\epsilon_{405\text{nm}} = 16,8 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$) wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 0,1 mM bis $2,5 \cdot 10^{-3}$ mM in 0,2 M TEA-Puffer mit pH 9,8 (**Kapitel 6.3.1**) hergestellt. Die Extinktion der Lösungen bei 405 nm wurde über die Konzentration an p-Nitrophenol aufgetragen und daraus die Steigung ermittelt.

Des Weiteren wurden $4 \cdot 10^{-3}$ mg der freien AP oder 2 mg eines mit AP beladenen Polymernetzwerks in eine auf 25 °C temperierte Küvette mit 3 ml einer 0,125 M p-Nitrophenylphosphat Lösung in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) gegeben. Die Extinktion bei 405 nm wurde sofort nach der Zugabe des Enzyms kontinuierlich im Abstand von 30 s aufgezeichnet, bis ein Wert größer eins erreicht wurde. Mit Hilfe der Steigung der ermittelten Extinktion über die Zeit konnte die spezifische Aktivität in U/mg der AP bestimmt werden.

Bestimmung der Aktivität der Urease mittels Autotitrator

Die Aktivität der Urease wurde mittels eines Autotitrators (Schott TitroLine alpha plus) bestimmt. Dazu wurden 0,1 mg des freien Enzyms oder etwa 10 mg eines mit Urease beladenen Polymernetzwerks in 20 ml einer 0,115 M Harnstofflösung gegeben. Die Titration erfolgte mit verdünnter Salzsäure (0,1 M) auf pH 7,5 bis sich ein konstanter Verbrauch an Titrationslösung

einstellte. Aus dem konstanten Verbrauch in ml pro Zeit wurde die spezifische Aktivität der Urease in U/mg berechnet.

Dynamisch Mechanische Analyse

Die mechanischen Eigenschaften der Netzwerke wurden mit Hilfe eines Dynamisch-Mechanischen-Analysators (DMA 2980, TA Instruments, Inc.) bei RT charakterisiert. Dazu wurde der Film Tension Aufsatz verwendet und die untersuchten Proben zwischen den zwei Klemmen eingespannt. Zum Aufnehmen einer Spannungs-Dehnungskurve wurde der „Constant Force Mode“ gewählt. Durch die bewegliche Klemme wirkte eine kontinuierlich ansteigende Kraft (0,5 N/min) auf die Probe ein. Die anliegende Spannung und die Dehnung wurden kontinuierlich aufgezeichnet und daraus die mechanischen Kennwerte wie E-Modul, Bruchspannung, Bruchzähigkeit und Bruchenergie ermittelt. Des Weiteren konnte mit Hilfe des „Multi-Frequency Mode“ bei 1 Hz der Speicher- (E') sowie der Verlustmodul (E'') der Komposite bestimmt werden. Mit Hilfe folgender Gleichung konnte daraus ebenfalls der komplexe E-Modul (E) bestimmt werden:

$$E = \sqrt{E'^2 + E''^2} \quad \text{Gleichung 6.2}$$

Stereomikroskop-Aufnahmen

Lichtmikroskopische Bilder der mineralisierten Polymernetzwerke in dieser Arbeit wurden mit Hilfe eines Leica Stereomikroskops (Leica NZ9.5) aufgenommen. Um die Polymernetzwerke und die darin enthaltenen anorganischen Strukturen möglichst gut erkennen zu können, wurden die Filme und deren Querschnitte im nassen, gequollenen Zustand im Dunkelfeld mit einer zusätzlichen Beleuchtung von oben aufgenommen.

Röntgendiffraktometrie (XRD)

Die Röntgendiffraktogramme wurden mit Hilfe eines Bruker D8 Advance oder Philips PW 1080 unter Verwendung von Kupfer-Anoden aufgezeichnet. Dazu wurden die getrockneten mineralisierten Proben mit doppelseitigem Kleband auf einer Saphirglasscheibe befestigt und die an den Netzebenen gebeugte Strahlung in Transmission und Reflektion gemessen.

Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Der Füllgrad der mineralisierten Polymernetzwerke mit anorganischen Strukturen konnte mit Hilfe des Thermo-Gravimetrischen-Analysators Netzsch STA 409 C oder TA Instruments TGA 2950 bestimmt werden. Dazu wurden getrocknete Proben der Hybridmaterialien von ca 10 bis 30 mg in Aluminiumoxid- oder Platintiegeln unter konstantem Luftstrom mit einer Heizrampe von 10 K/min auf 700°C erhitzt und dabei die Gewichtsveränderung der Probe aufgezeichnet. Das Gewicht des anorganischen Anteils der Probe konnte oberhalb einer Temperatur von 600 °C abgelesen werden.

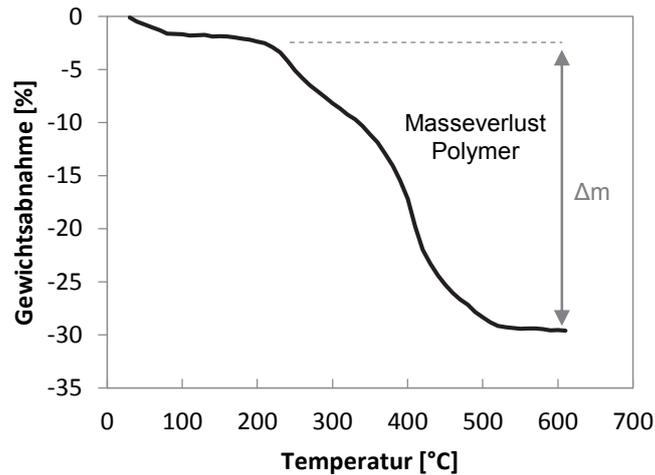


Abbildung 6.5 | TGA-Beispielmessung: Gewichtsverlust eines mit CaCO_3 mineralisierten PHEA-I-TEG Films (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) bei kontinuierlicher Erhitzung (10 K/min) bis 600°C.

Quellungsmessungen

Der Quellgrad (S) eines Netzwerkes wurde durch die Bestimmung der Massenzunahme in Wasser nach 24 h (m_q) im Verhältnis zum trockenen Zustand (m_t) nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$S = \frac{m_q}{m_t} \quad \text{Gleichung 6.3}$$

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Alle kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen wurden am Interdisziplinären Zentrum für Magnetresonanz an der TU Dortmund von Dr. WOLF HILLER und Mitarbeitern durchgeführt. Dort kommen Geräte der Firma Bruker und Varian mit Frequenzen von 200 bis 500 MHz zum Einsatz.

Messung der Membran-Permeanz durch Osmose

Die Messung der Wasserpermeanz durch die gequollenen CaP-Komposite wurden mit Hilfe einer Diffusionskammer durchgeführt (**Abbildung 6.6**). Dazu wurde ein ca. 15 x 15 mm großes Stück des calcifizierten Hydrogels zwischen die beiden geschliffenen Glasflächen in der Mitte der beiden Kammern geklemmt, sodass ausreichend Film in alle Richtungen überstand und mittels der drei Schrauben fixiert. In die rechte Kammer wurden vorsichtig 150 ml bidestilliertes Wasser eingefüllt und im Anschluss die Dichtigkeit der Apparatur sowie der Membran geprüft. Die linke Kammer wurde nach erfolgreicher Prüfung mit 150 ml einer wässrigen NaCl-Lösung (0,6 M oder 3 M) aufgefüllt und die Flüssigkeitsstände in beiden Gefäßen mit einem dünnen Filzstift markiert. Nach 24 Stunden wurden die Flüssigkeitsstände erneut markiert und die Volumendifferenz (V) in beiden Kolben bestimmt.

Anhand folgender Formel konnte damit die Permeanz (P) für Wasser bestimmt werden:

$$P = \frac{Q}{\pi \cdot A}$$

Gleichung 6.4

- Q Volumenstrom [l/h] ($Q = V / t$)
- Π Osmotischer Druck [bar]
- A Fläche der Membran $\approx 10^{-2} \text{ m}^2$

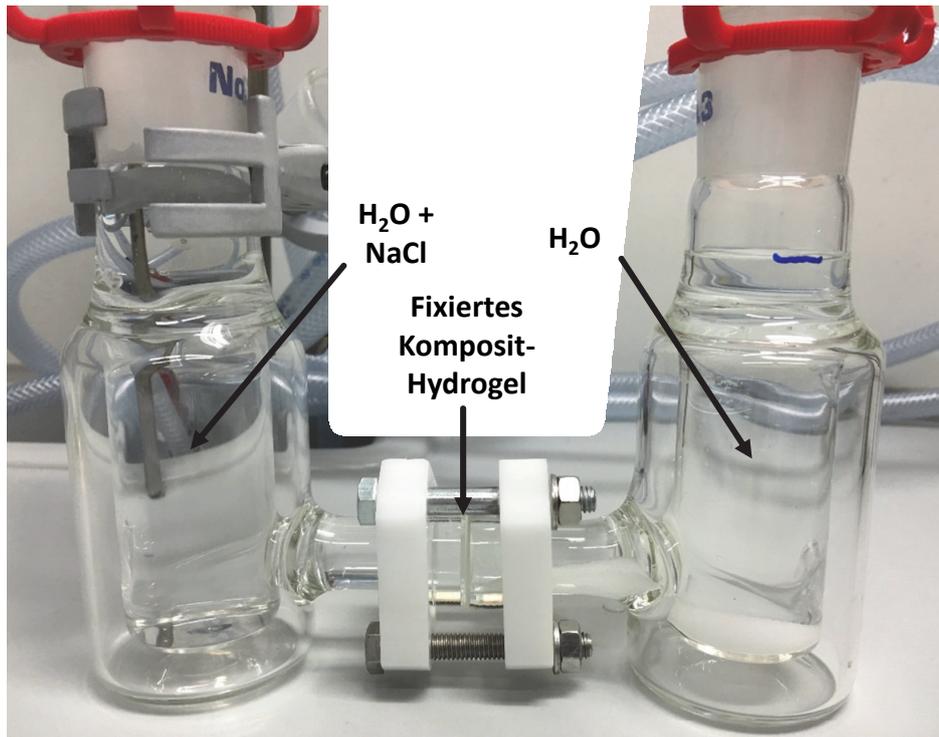


Abbildung 6.6 | Aufbau der für die Bestimmung der Membranpermeanz verwendeten Diffusionskammer.

Kleinwinkel-Röntgensteuung (SAXS)

Die Messung der Größe sowie Verteilung der Calciumphosphat-Unterstrukturen in den calcifizierten Netzwerken erfolgte mittels eines Bruker Nanostar bei Wellenlängen von 1,54184 Å, 1,54056 Å und 1,54439 Å. Dazu wurden in Wasser gelagerte oder getrocknete Komposite mit Hilfe von doppelseitigem Klebeband auf einem Messaufbau befestigt und in die Messkammer eingeführt. Die gequollenen Komposite wurden zuvor noch in eine Polyimid-Folie eingeschlagen und die Kanten mit Klebeband versiegelt, um das Austrocknen der Filme während der Messung zu verhindern. Jede Probe wurde im trockenen und feuchten Zustand für 60 Minuten vermessen.

6.12 Kontaktaktiv-antimikrobielle Beschichtungen mit Lotus-Effekt

Die in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführten Versuchsvorschriften zur Herstellung von DOW 5700 modifizierten SiO_2 -Nanopartikel sind in Zusammenarbeit mit den Studenten/-innen CHRISTOPH MÜLLER²⁵⁴, SABINE RING²⁵⁵ und SARA BÖHLE²⁵⁶ im Rahmen ihrer Diplom- bzw. Masterarbeiten entwickelt und optimiert worden. Dementsprechend sind viele verschiedene Versuchsvorschriften entstanden, die in den jeweiligen Arbeiten nachgelesen werden können. Hier sind daher nur die Wege dargestellt, die zu den besten Ergebnissen geführt haben.

Grundsätzlich kann jede der Synthesen in die in **Abbildung 6.7** dargestellten drei Schritte eingeteilt werden, die in den folgenden Unterkapiteln im Einzelnen ausgeführt werden:

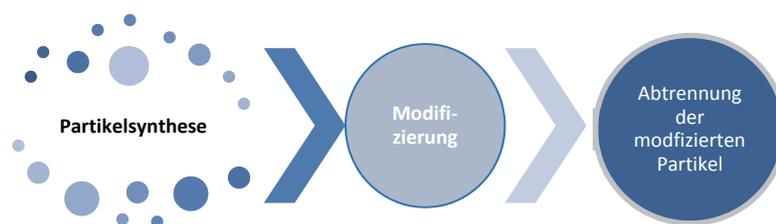


Abbildung 6.7 | Schema der Herstellung und Modifizierung von SiO_2 Nanopartikeln mit DOW 5700

6.12.1 Partikelsynthese

In einem 100 ml Dreihalskolben mit Rührfisch, Rückflusskühler und Thermometer wurden 33,4 ml Alkohol (Ethanol oder Butanol) sowie je nach gewünschter Partikelgröße die in der **Tabelle 6.12** angegebene Menge einer 25 Gew% Ammoniaklösung und eventuell Wasser vorgelegt. Das Gemisch wurde unter starkem Rühren (700 U/min) auf die in der **Tabelle 6.12** angegebene Temperatur mit Hilfe eines Ölbadens auf einer Heizplatte erwärmt und die Temperatur der Lösung im Inneren mit Hilfe des Thermometers kontrolliert. blieb die Temperatur konstant, wurden 1,07 ml Tetraethoxysilan (TEOS) mittels einer Eppendorf-Pipette und einer Geschwindigkeit von etwa einem Tropfen pro Sekunde zugegeben. Je nach Ansatz trübte das Gemisch nach 15 bis 45 Minuten bläulich-weiß ein. Das Gemisch wurde dann für 4 h bei der angegebenen Temperatur und im Anschluss weitere 16 h ohne Temperierung (mit ausgeschalteter Heizplatte) gerührt.

Tabelle 6.12 | Einwaagen und Parameter für die SiO_2 -Partikelsynthese mit unterschiedlichen Durchmessern.

Synthese	Partikelgröße [nm]	Temperatur [°C]	Alkohol [ml]	Base [ml]	TEOS [ml]
EtOH/ NH_3 -Lsg.	95 ± 20	42	33,4	2,8	1,07
	305 ± 30	50	33,4	3,1 (+2,9 H_2O)	4,15
BuOH/ NH_3 -Lsg.	450 ± 30	50	33,4	2,8	4,80

6.12.2 Modifizierung der Nanopartikeloberfläche

Die Modifizierung der Nanopartikel erfolgte direkt im Anschluss an die Herstellung. Zuerst wurden weitere 8,5 ml des jeweils verwendeten Alkohols zugegeben, sowie 0,7 ml 25 Gew% Ammoniak-Lösung. Die Partikelsuspension wurde dann auf 70 °C erwärmt. Nachdem die Temperatur konstant blieb, wurden 0,7 ml (0,80 mmol) der DOW 5700-Lösung (60 Gew% in Methanol) innerhalb von 10 s zugetropft, wonach sich die Eintrübung des Gemisches weiter intensivierte. Dabei konnte z.T. die Bildung eines weißen Niederschlags im Gemisch beobachten werden. Abschließend wurde die Suspension für weitere 24 h bei 70°C gerührt.

6.12.3 Abtrennung der modifizierten Partikel

Im Anschluss an die Synthese wurden die modifizierten Nanopartikel von den anderen Bestandteilen im Reaktionsgemisch abgetrennt. Dazu wurden die beiden im Folgenden beschriebenen Verfahren verwendet.

Abtrennung und Aufreinigung mittel Zentrifugation

Die Reaktionsmischung wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mittels einer Zentrifuge 15 bis 30 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Die klare überstehende Phase wurde danach vorsichtig dekantiert und der verbliebene Niederschlag mit Ethanol wieder aufgefüllt. Die Partikel wurden dann mit Hilfe eines Ultraschallbads 30 min und im Anschluss noch weitere 30 s mit einem Ultraschall-Homogenisator der Firma Bandelin (Sonopuls HD 2070) dispergiert. Danach wurden die Partikel wieder mit der Zentrifuge abgetrennt und der Reinigungsprozess noch ein weiteres Mal mit EtOH, zweimal mit MeOH und zweimal mit Wasser wiederholt. Die nach diesem Prozess erhaltenen Partikel wurden dann durch Anlegen eines Vakuums bei Raumtemperatur getrocknet.

Extraktion in Chloroform

Zunächst wurde die Reaktionsmischung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt und mittels einer Zentrifuge 15 bis 30 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig dekantiert und der weiße Niederschlag in 60 ml CHCl_3 mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators der Firma Bandelin (Sonopuls HD 2070) dispergiert und die Suspension in einen Scheidetrichter mit einem Volumen von 250 ml überführt. Dazu wurden 60 ml H_2O gegeben, der Scheidetrichter mit einem Stopfen verschlossen und dieser für 1 Minute geschüttelt. Danach wurde das weiße, milchige Gemisch für 12 h in Ruhe gelassen. Nach dieser Zeit konnten drei Phasen unterschieden werden. Die oberste, wässrige Phase sowie die unterste CHCl_3 -Phase zeigten sich beide klar, wohingegen die mittlere Phase immer noch einen milchig, weißen Eindruck machte. Der Scheidetrichter wurde so lange stehen gelassen, bis sich die mittlere Phase vollständig aufgelöst hatte (bis zu 48 h). Danach

wurden die beiden Phasen entnommen. Das Lösungsmittel der CHCl_3 -Phase wurde im Anschluss verdampft und die darin enthaltenen Partikel im Vakuum getrocknet.

6.13 Beschichtung von Glasobjektträger mit Silikon

Auf einem Glasobjektträger (25 x 75 mm) wurde zuerst mit zwei Lagen Klebeband (Dicke 40-50 μm) ein ca. 25 x 25 mm^2 großes Feld abgeklebt. Zur Beschichtung des Feldes wurde das 2-Komponenten-PDMS-Elastomer Sylgard 184 verwendet. 5 g des viskosen Silikons wurden dazu mit 0,5 g Härter (Verhältnis 10:1) in einem Rollrandglas eingewogen und mit Hilfe eines Spatels vorsichtig vermischt. Bei der Verarbeitung ist eine Topfzeit von 2 h zu beachten. Um die beim Mischen eingetragenen Luftblasen zu entfernen, wurde das Rollrandglas in einen 100 ml Kolben gestellt, mit einer Schliffolive verschlossen und ein Vakuum angelegt. Der Druck wurde vorsichtig in 10 mbar Schritten bis auf 1 mbar abgesenkt, um ein Übersäumen des Silikons zu vermeiden. Waren keine Blasen im Silikon mehr zu erkennen, wurde der Kolben belüftet und das Rollrandglas entnommen. Ein Teil der entgasten Mixtur wurde dann auf den Objektträger gegeben und über das abgeklebte Feld mit einem Rakel möglichst homogen verteilt. Danach konnte das Klebeband entfernt werden. Eine vollständige Vernetzung der Silikonschicht konnte bei Raumtemperatur für 48 h erfolgen. Erhöhte Temperaturen in einem Trockenschrank verkürzten die zur Vernetzung notwendige Zeit deutlich (24h bei 50 °C oder 60 min bei 100°C), weshalb diese bevorzugt gewählt wurde.

6.14 Formulierung der Partikelsuspension und Auftragung

50 mg der hergestellten modifizierten Partikel aus **Kapitel 6.12** wurden in je ein Reagenzglas gegeben und je 5 ml Aceton, Chloroform, Diethylether, Dichlormethan, Ethanol, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol, Tetrahydrofuran und Toluol hinzugegeben (Konzentration der Partikel 10 g/l). Nach einer Dispergierung für 60 s mit dem Ultraschall-Homogenisator der Firma Bandelin (Sonopuls HD 2070) wurden die Partikelsuspensionen auf die in **Kapitel 6.13** hergestellten silikonbeschichteten Glasobjektträger aufgetragen. Dazu wurden mit einer Eppendorfpipette je 50 μl der suspendierten Partikel als Tropfen (Drop-Coating) auf eine Oberfläche gegeben und abgewartet, bis das Lösungsmittel verdampft war.

Zur Herstellung von „raspberry-like“ Partikelschichten wurden Partikel mit 100 nm Durchmesser zusammen mit 450 bzw. 900 nm großen Partikeln im entsprechenden Verhältnis (1:1, 2:1, 4:1) eingewogen, sodass die Gesamtmenge wiederum 50 mg entsprach. Die Partikelmischung wurde dann wie zuvor beschrieben mit Lösungsmittel gemischt, dispergiert und aufgetragen.

6.15 Bakteriensprühtest

Für den Bakteriensprühtest wurde das Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) kultiviert. Dazu wurden 25 g Standard-I-Nährbouillon in 1 Liter bidestilliertem Wasser gelöst und für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Mit Hilfe sterilfiltrierter 1 M wässriger Natriumhydroxid-Lösung konnte im Anschluss der pH-Wert der Lösung auf 7,3 (bei 37 °C) eingestellt werden. Der Stamm wurde danach dem Gefrierfach entnommen und aufgetaut. Unter inerten Bedingungen wurden 50 µl der Bakteriensuspension in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und 25 ml der zuvor hergestellten Nährlösung zugegeben. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Aluminium-Folie abgedeckt und 16 h bei 37 °C auf einer Schüttelplatte inkubiert. Nach dieser Zeit sollte eine Zellkonzentration von etwa 10⁹ Bakterien pro ml vorliegen.

Eine zweite Agar-Nährlösung wurde hergestellt, indem 7 g Standard-I-Nährbouillon und 3 g Agar in einer 250 ml Schraubdeckelflasche mit 200 ml bidestilliertem Wasser gelöst wurden. Das Medium wurde dann 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde es verschlossen bei 45 °C im Wasserbad gelagert, um zu verhindern, dass es sich verfestigt.

Ein Phosphatpuffer (PBS-Puffer) wurde hergestellt, indem 8,77 g NaCl und 1,56 g NaH₂PO₄ in einer 1 l Schraubdeckelflasche mit 1 l bidestilliertem Wasser gelöst wurden. Der Puffer wurde dann 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert. In Anschluss wurde mit sterilfiltrierter, wässriger 0,1 M NaOH-Lösung der pH-Wert des Puffers auf 7,0 eingestellt.

Die Bakteriensuspension muss vor dem Sprühen auf eine Konzentration von 10⁶ Bakterien pro ml verdünnt werden. Dazu wurde die Konzentration an *S. aureus* im Nährmedium mittels eines UV-Vis Spektrometers (Specord 210 BU) bestimmt. 200 µl der Bakteriensuspension wurden mit 1800 µl Nährlösung in eine Küvette gefüllt und die Extinktion gegen die Nährlösung bei 504 nm bestimmt. Das benötigte Volumen der Bakteriensuspension für eine Verdünnung auf 10⁷ Zellen/ml konnte mit Hilfe folgender Gleichung berechnet werden.

$$V(\text{Bakteriensuspension})[\mu\text{l}] = \frac{100}{\text{Extinktion}} \mu\text{l} \quad \text{Gleichung 6.5}$$

Das berechnete Volumen wurde dann in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und mit PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt. In ein zweites Röhrchen wurde 1 ml der verdünnten Bakteriensuspension mit 9 ml sterilem Wasser gemischt, wodurch eine Bakterienkonzentration von 10⁶ Zellen/ml erhalten wurde. Der Suspension wurde in den sterilen Fließbecher einer Airbrush-Pistole der Firma Revell gegeben. Damit werden die beschichteten Objektträger besprüht, sodass möglichst fein verteilte Tröpfchen auf der Oberfläche erzeugt werden. Nach 30 s sollten diese getrocknet sein, worauf die Objektträger in eine sterile Petri-Schale gegeben und vorsichtig mit dem flüssigen, temperierten Agar-Nährmedium übergossen wurden. Anschließend wurden die Proben für ca. 17 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Petrischalen mit einer

wässrigen 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung (1 g/l) rot gefärbt. Dazu wurden je 4 ml der TTC Lösung mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette auf der Oberfläche der erstarrten Agar-Nährlösung verteilt. Die Proben wurden im Anschluss inkubiert, bis eine deutliche Färbung der Kolonien zu erkennen war (ca. 30 bis 60 Minuten). Die Dokumentation erfolgte durch Fotografieren der Proben auf einem Durchlichttisch.

6.16 Analytische Methoden zur Charakterisierung der Partikelbeschichtungen

Rasterelektronen-Mikroskopie (REM) und Energiedispersive Röntgendiffraktometrie (EDX)

Eine Spatelspitze der getrockneten Partikel wurde auf einem Aluminiumteller mit einem leitfähigen Klebeband gegeben und mit dem Spatel verteilt. Die elektronenmikroskopischen Sekundärelektronen-Bilder wurden in einem Hitachi S-4500 mit Oxford Link ISIS System bei 1 keV mit einem Arbeitsabstand von 8 mm aufgenommen, EDX-Untersuchungen zur Elementanalyse wurden bei 10 keV und einem Arbeitsabstand von 15 mm durchgeführt.

Transmissionselektronen Mikroskopie (TEM)

2 µl einer Suspension der SiO₂-Nanopartikel in Aceton (10 mg/ml) wurde auf ein Kupfergitter getropft. Die Bilder wurden mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop von Philips (CM200) bei 200 keV aufgenommen.

Kontaktwinkelmessung

Die Messung des Kontaktwinkels erfolgte mit Hilfe des Kontaktwinkel-Goniometers G40 der Firma Krüss. Dazu wurden die mit Partikeln beschichteten Glasobjektträger auf den Probentisch gelegt und die Kapillare einer Spritze dicht über der Probenoberfläche fixiert. Mittels eines Elektroantriebs konnte dann ein definierter Wassertropfen aus der Kapillare auf der Probe platziert werden (statischer Kontaktwinkel). Der mittlere Kontaktwinkel zwischen Wasser und Probenoberfläche wurde mit Hilfe einer Kameraoptik erfasst und auf einem Bildschirm dargestellt. Durch den kontinuierlichen Zustrom von Wasser, der den Tropfen stetig vergrößerte, konnte der Fortschrittswinkel, sowie durch kontinuierliches Zurücksaugen in die Spritze der bei der Entnetzung auftretende Rückschreitwinkel ermittelt werden (dynamischer Kontaktwinkel). Aus der Differenz dieser beiden Winkel, konnte die sogenannte Kontaktwinkelhysterese bestimmt werden.

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Bestimmung der Partikelgrößen der dispergierten Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung erfolgte mit Hilfe des Malvern Zetasizer Nano S. Dazu wurden 50 mg der modifizierten SiO₂-Nanopartikel in ein Reagenzglas eingewogen und mit 5 ml des jeweiligen Lösungsmittels mit Hilfe

eines Ultraschall-Homogenisators des Typs Sonopuls HD 2070 der Firma Bandelin für 30 s dispergiert. Nach 60 Minuten wurde die überstehende Lösung vom sedimentierten Bodensatz getrennt. 2 ml des Überstands wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und dieses bei 13.500 U/min für 15 Minuten zentrifugiert um möglichst alle dispergierten Bestandteile abzutrennen. 2 ml des zentrifugierten sowie des nicht zentrifugierten Überstands wurden jeweils in eine Küvette gefüllt. Im Anschluss wurden die Partikelgrößen der Überstände bestimmt.

Thermogravimetrische Analyse (TGA)

Die Bestimmung der flüchtigen Partikelbestandteile erfolgte mit Hilfe des Thermogravimetrischen-Analysators Netzsch STA 409 C oder TA Instruments TGA 2950. Dazu wurden getrocknete Proben der Hybridmaterialien von ca. 10 bis 30 mg in Aluminiumoxid- oder Platintiegeln unter konstantem Luftstrom mit einer Heizrampe 10 K/min auf 700°C erhitzt und dabei die Gewichtsveränderung der Probe aufgezeichnet. Das Gewicht des anorganischen Anteils der Probe konnte durch den Gewichtsverlust oberhalb einer Temperatur von 600 °C ermittelt werden.

Infrarotspektroskopie

Zum Nachweis der DOW 5700 modifizierten Nanopartikel wurde das Bruker Alpha FTIR-Spektrometer mit ATR-Einheit verwendet. Dazu wurden die getrockneten modifizierten sowie nicht modifizierten Partikel auf den ATR-Kristall aufgebracht und mit einem Stempel fixiert.

7 Literaturverzeichnis

1. Nachtigall, W., *Bionik: Grundlagen und Beispiele für Ingenieure und Naturwissenschaftler*. Springer Berlin Heidelberg: 2002.
2. Nachtigall, W., *Bionik Als Wissenschaft*. Springer Berlin Heidelberg: 2010.
3. Zasloff, M., Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84* (15), 5449-5453.
4. Nachtigall, W.; Wissler, A., *Bionik in Beispielen: 250 illustrierte Ansätze*. Springer Berlin Heidelberg: 2013.
5. Barthlott, W.; Neinhuis, C., Purity of the sacred lotus, or escape from contamination in biological surfaces. *Planta* **1997**, *202* (1), 1-8.
6. Krumm, C.; Tiller, J. C., Antimikrobielle Oberflächen - Kontaktaktiv oder durch Biozide. *Nachrichten aus der Chemie* **2014**, *62* (10), 984-987.
7. Siedenbiedel, F.; Tiller, J. C., Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers* **2012**, *4* (1).
8. Meyers, M. A.; Chen, P. Y.; Lin, A. Y. M.; Seki, Y., Biological materials: Structure and mechanical properties. *Prog. Mater. Sci.* **2008**, *53* (1), 1-206.
9. Almeida, A. C. d.; Silva, A. R. P. d.; Nakamura Filho, A.; Carvalho, M. D. d.; Cardoso, A. V., Nacre Compared to Aragonite as a Bone Substitute: Evaluation of Bioactivity and Biocompatibility. *Materials Research* **2015**, *18*, 395-403.
10. Meldrum, F. C.; Colfen, H., Controlling Mineral Morphologies and Structures in Biological and Synthetic Systems. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4332-4432.
11. Finnemore, A.; Cunha, P.; Shean, T.; Vignolini, S.; Guldin, S.; Oyen, M.; Steiner, U., Biomimetic layer-by-layer assembly of artificial nacre. *Nat Commun* **2012**, *3*, 966.
12. Song, R. Q.; Colfen, H., Additive controlled crystallization. *Crystengcomm* **2011**, *13* (5), 1249-1276.
13. Askeland, D.; Fulay, P.; Wright, W., *The Science and Engineering of Materials*. Sixth Edition ed.; Cengage Learning, Boston: 2011.
14. Srinivasan, A. V.; Haritos, G. K.; Hedberg, F. L., Biomimetics: Advancing Man-Made Materials Through Guidance From Nature. *Applied Mechanics Reviews* **1991**, *44* (11), 463-482.
15. Vincent, J. F. V.; Bogatyreva, O. A.; Bogatyrev, N. R.; Bowyer, A.; Pahl, A.-K., Biomimetics: its practice and theory. *Journal of The Royal Society Interface* **2006**, *3* (9), 471-482.
16. Barthelat, F., Biomimetics for next generation materials. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **2007**, *365* (1861), 2907-2919.
17. Sanchez, C.; Arribart, H.; Giraud Guille, M. M., Biomimetism and bioinspiration as tools for the design of innovative materials and systems. *Nat Mater* **2005**, *4* (4), 277-288.
18. Epple, M., *Biomaterialien und Biomineralisation: Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden: 2003.
19. Wegst, U. G. K.; Ashby, M. F., The mechanical efficiency of natural materials. *Philosophical Magazine* **2004**, *84* (21), 2167-2186.
20. Ashman, R. B.; Cowin, S. C.; Van Buskirk, W. C.; Rice, J. C., A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomech* **1984**, *17* (5), 349-61.

-
21. Dunlop, J. W. C.; Fratzl, P., Biological Composites. *Annual Review of Materials Research* **2010**, *40* (1), 1-24.
 22. Hamm, C. E.; Merkel, R.; Springer, O.; Jurkojc, P.; Maier, C.; Pechtel, K.; Smetacek, V., Architecture and material properties of diatom shells provide effective mechanical protection. *Nature* **2003**, *421* (6925), 841-843.
 23. Hildebrand, M., Prospects of Manipulating Diatom Silica Nanostructure. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2005**, *5* (1), 146-157.
 24. Gortner, R. A.; Hoffman, W. F., Colloid gel. *J. Am. Chem. Soc.* **1921**, *43*, 2199-2202.
 25. Du, X.; Zhou, J.; Shi, J.; Xu, B., Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (24), 13165-13307.
 26. Laftah, W. A.; Hashim, S.; Ibrahim, A. N., Polymer Hydrogels: A Review. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* **2011**, *50* (14), 1475-1486.
 27. Kizilay, M. Y.; Okay, O., Effect of Initial Monomer Concentration on Spatial Inhomogeneity in Poly(acrylamide) Gels. *Macromolecules* **2003**, *36* (18), 6856-6862.
 28. Hamidi, M.; Azadi, A.; Rafiei, P., Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60* (15), 1638-1649.
 29. Omidian, H.; Park, K., Hydrogels. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Siepmann, J.; Siegel, R. A.; Rathbone, M. J., Eds. Springer US: New York, 2012; pp 75-106.
 30. Ruel-Gariépy, E.; Leroux, J.-C., In situ-forming hydrogels—review of temperature-sensitive systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58* (2), 409-426.
 31. Fu, Y.; Kao, W. J., In Situ forming poly(ethylene glycol)-based hydrogels via thiol-maleimide Michael-type addition. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2011**, *98* (2), 201-211.
 32. Gerlach, G.; Arndt, K. F., *Hydrogel Sensors and Actuators: Engineering and Technology*. Springer Berlin Heidelberg: 2009.
 33. Razmjou, A.; Simon, G. P.; Wang, H., Effect of particle size on the performance of forward osmosis desalination by stimuli-responsive polymer hydrogels as a draw agent. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *215–216*, 913-920.
 34. Yuan, S. S.; Tang, Q. W.; He, B. L., Three-dimensional hydrogel frameworks for high-temperature proton exchange membrane fuel cells. *J. Mater. Sci.* **2014**, *49* (15), 5481-5491.
 35. Tobis, J.; Boch, L.; Thomann, Y.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks as chiral separation membranes. *Journal of Membrane Science* **2011**, *372* (1–2), 219-227.
 36. Langer, R., Drug delivery and targeting. *Nature* **1998**, *392* (6679), 5-10.
 37. Barbucci, R., *Hydrogels: Biological Properties and Applications*. Springer Milan: 2010.
 38. Lee, K. Y.; Mooney, D. J., Hydrogels for Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **2001**, *101* (7), 1869-1880.
 39. Dubrovskii, S. A.; Afanas'eva, M. V.; Lagutina, M. A.; Kazanskii, K. S., Comprehensive characterization of superabsorbent polymer hydrogels. *Polymer Bulletin* **1990**, *24* (1), 107-113.
 40. Buchholz, F. L., Superabsorbent Polymers. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken: 2002.
 41. Ganji, F.; Vasheghani-Farahani, S.; Vasheghani-Farahani, E., Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iran Polym J* **2010**, *19* (5), 375-398.
 42. Abe, T.; Egawa, H.; Ito, H.; Nitta, A., Synthesis and characterization of thermo-sensitive polymeric beads. *Journal of Applied Polymer Science* **1990**, *40* (7-8), 1223-1235.

43. Flory, P. J., *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, New York: 1953.
44. Durmaz, S.; Okay, O., Acrylamide/2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid sodium salt-based hydrogels: synthesis and characterization. *Polymer* **2000**, *41* (10), 3693-3704.
45. Almdal, K.; Dyre, J.; Hvidt, S.; Kramer, O., What is a 'gel'. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* **1993**, *76*, 49-51.
46. Long, R.; Hui, C.-Y., Fracture toughness of hydrogels: measurement and interpretation. *Soft matter* **2016**, *12* (39), 8069-8086.
47. Simha, N. K.; Carlson, C. S.; Lewis, J. L., Evaluation of fracture toughness of cartilage by micropenetration. *Journal of materials science. Materials in medicine* **2004**, *15* (5), 631-9.
48. Koutroupi, K. S.; Barbenel, J. C., Mechanical and failure behaviour of the stratum corneum. *Journal of Biomechanics* **1990**, *23* (3), 281-287.
49. Purslow, P. P., Measurement of the fracture toughness of extensible connective tissues. *J. Mater. Sci.* **1983**, *18* (12), 3591-3598.
50. Sun, J.-Y.; Zhao, X.; Illeperuma, W. R. K.; Chaudhuri, O.; Oh, K. H.; Mooney, D. J.; Vlassak, J. J.; Suo, Z., Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature* **2012**, *489* (7414), 133-136.
51. Gao, G.; Du, G.; Sun, Y.; Fu, J., Self-healable, tough, and ultrastretchable nanocomposite hydrogels based on reversible polyacrylamide/montmorillonite adsorption. *ACS applied materials & interfaces* **2015**, *7* (8), 5029-37.
52. Calvert, P., Hydrogels for Soft Machines. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (7), 743-756.
53. Lin, S.; Cao, C.; Wang, Q.; Gonzalez, M.; Dolbow, J. E.; Zhao, X., Design of stiff, tough and stretchy hydrogel composites via nanoscale hybrid crosslinking and macroscale fiber reinforcement. *Soft matter* **2014**, *10* (38), 7519-27.
54. Li, J.; Illeperuma, W. R. K.; Suo, Z.; Vlassak, J. J., Hybrid Hydrogels with Extremely High Stiffness and Toughness. *ACS Macro Letters* **2014**, *3* (6), 520-523.
55. Killion, J. A.; Kehoe, S.; Geever, L. M.; Devine, D. M.; Sheehan, E.; Boyd, D.; Higginbotham, C. L., Hydrogel/bioactive glass composites for bone regeneration applications: synthesis and characterisation. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **2013**, *33* (7), 4203-12.
56. Zhao, L. Z.; Zhou, C. H.; Wang, J.; Tong, D. S.; Yu, W. H.; Wang, H., Recent advances in clay mineral-containing nanocomposite hydrogels. *Soft matter* **2015**, *11* (48), 9229-46.
57. Douglas, T. E. L.; Wlodarczyk, M.; Pamula, E.; Declercq, H. A.; de Mulder, E. L. W.; Bucko, M. M.; Balcaen, L.; Vanhaecke, F.; Cornelissen, R.; Dubruel, P.; Jansen, J. A.; Leeuwenburgh, S. C. G., Enzymatic mineralization of gellan gum hydrogel for bone tissue-engineering applications and its enhancement by polydopamine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2014**, *8* (11), 906-918.
58. Xu, B.; Zheng, P.; Gao, F.; Wang, W.; Zhang, H.; Zhang, X.; Feng, X.; Liu, W., A Mineralized High Strength and Tough Hydrogel for Skull Bone Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, *27* (4), in print.
59. Costa, A. M. S.; Mano, J. F., Extremely strong and tough hydrogels as prospective candidates for tissue repair – A review. *European Polymer Journal* **2015**, *72*, 344-364.
60. Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y.-I., Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* **2005**, *310* (5751), 1139-1143.
61. Jaiswal, M. K.; Xavier, J. R.; Carrow, J. K.; Desai, P.; Alge, D.; Gaharwar, A. K., Mechanically Stiff Nanocomposite Hydrogels at Ultralow Nanoparticle Content. *ACS Nano* **2016**, *10* (1), 246-256.

-
62. Evans, N. D.; Minelli, C.; Gentleman, E.; LaPointe, V.; Patankar, S. N.; Kallivretaki, M.; Chen, X.; Roberts, C. J.; Stevens, M. M., Substrate stiffness affects early differentiation events in embryonic stem cells. *European cells & materials* **2009**, *18*, 1-13; discussion 13-4.
 63. Hartmeier, W., *Immobilisierte Biokatalysatoren: Eine Einführung*. Springer Berlin Heidelberg: 1986.
 64. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*. Wiley, Weinheim: 2006.
 65. Nelson, J. M.; Griffin, E. G., Adsorption of Invertase. *Journal of the American Chemical Society* **1916**, *38* (5), 1109-1115.
 66. Canal, T.; Peppas, N. A., Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks. *Journal of Biomedical Materials Research* **1989**, *23* (10), 1183-1193.
 67. Peppas, N. A.; Moynihan, H. J.; Lucht, L. M., The structure of highly crosslinked poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels. *J Biomed Mater Res* **1985**, *19* (4), 397-411.
 68. Peppas, N. A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H., Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2000**, *50* (1), 27-46.
 69. Gander, B.; Gurny, R.; Doelker, E.; Peppas, N. A., Effect of polymeric network structure on drug release from cross-linked poly(vinyl alcohol) micromatrices. *Pharmaceutical research* **1989**, *6* (7), 578-84.
 70. Dech, S.; Wruk, V.; Fik, C. P.; Tiller, J. C., Amphiphilic polymer conetworks derived from aqueous solutions for biocatalysis in organic solvents. *Polymer* **2012**, *53* (3), 701-707.
 71. Schoenfeld, I.; Dech, S.; Ryabenky, B.; Daniel, B.; Glowacki, B.; Ladisch, R.; Tiller, J. C., Investigations on Diffusion Limitations of Biocatalyzed Reactions in Amphiphilic Polymer Conetworks in Organic Solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **2013**, *110* (9), 2333-42.
 72. Wegst, U. G. K.; Bai, H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O., Bioinspired structural materials. *Nat Mater* **2015**, *14* (1), 23-36.
 73. Corni, I.; Harvey, T.; Wharton, J.; Stokes, K.; Walsh, F.; Wood, R., A review of experimental techniques to produce a nacre-like structure. *Bioinspir. Biomim.* **2012**, *7* (3), 031001.
 74. Munch, E.; Launey, M. E.; Alsem, D. H.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Ritchie, R. O., Tough, bio-inspired hybrid materials. *Science* **2008**, *322* (5907), 1516-1520.
 75. Gehrke, N.; Nassif, N.; Pinna, N.; Antonietti, M.; Gupta, H. S.; Colfen, H., Retrosynthesis of nacre via amorphous precursor particles. *Chem. Mat.* **2005**, *17* (26), 6514-6516.
 76. Belcher, A. M.; Wu, X. H.; Christensen, R. J.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E., Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* **1996**, *381* (6577), 56-58.
 77. Unuma, H.; Matsushima, Y.; Kawai, T., Enzyme-mediated synthesis of ceramic materials. *Journal of the Ceramic Society of Japan* **2011**, *119* (1392), 623-630.
 78. Sondi, I.; Salopek-Sondi, B., Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO₃ polymorphs: A comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases. *Langmuir* **2005**, *21* (19), 8876-8882.
 79. Sondi, I.; Matijevic, E., Homogeneous precipitation of calcium carbonates by enzyme catalyzed reaction. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *238* (1), 208-214.
 80. Hoffmann, C.; Zollfrank, C.; Ziegler, G., Enzyme-catalysed synthesis of calcium phosphates. *Journal of materials science. Materials in medicine* **2008**, *19* (2), 907-15.
 81. Xu, A. W.; Ma, Y. R.; Colfen, H., Biomimetic mineralization. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17* (5), 415-449.
 82. Schweizer, S.; Taubert, A., Polymer-controlled, bio-inspired calcium phosphate mineralization from aqueous solution. *Macromolecular bioscience* **2007**, *7* (9-10), 1085-99.

83. Patwardhan, S. V.; Clarson, S. J.; Perry, C. C., On the role(s) of additives in bioinspired silicification. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2005**, (9), 1113-21.
84. Patwardhan, S. V., Biomimetic and bioinspired silica: recent developments and applications. *Chem. Commun.* **2011**, 47 (27), 7567-7582.
85. Hosoda, N.; Kato, T., Thin-film formation of calcium carbonate crystals: Effects of functional groups of matrix polymers. *Chem. Mat.* **2001**, 13 (2), 688-693.
86. Ogomi, D.; Serizawa, T.; Akashi, M., Bioinspired organic-inorganic composite materials prepared by an alternate soaking process as a tissue reconstitution matrix. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2003**, 67A (4), 1360-1366.
87. Kim, Y. Y.; Douglas, E. P.; Gower, L. B., Patterning inorganic (CaCO₃) thin films via a polymer-induced liquid-precursor process. *Langmuir* **2007**, 23 (9), 4862-4870.
88. Banks, E.; Nakajima, S.; Shapiro, L. C.; Tilevitz, O.; Alonzo, J. R.; Chianelli, R. R., Fibrous apatite grown on modified collagen. *Science* **1977**, 198 (4322), 1164-6.
89. Brasack, I.; Böttcher, H.; Hempel, U., Biocompatibility of Modified Silica-Protein Composite Layers. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2000**, 19 (1), 479-482.
90. Heinemann, S.; Ehrlich, H.; Knieb, C.; Hanke, T., Biomimetically inspired hybrid materials based on silicified collagen. *International Journal of Materials Research* **2007**, 98 (7), 603-608.
91. Ruhé, P. Q.; Boerman, O. C.; Russel, F. G. M.; Spauwen, P. H. M.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A., Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo. *Journal of Controlled Release* **2005**, 106 (1-2), 162-171.
92. Wei, H.; Ma, N.; Shi, F.; Wang, Z. Q.; Zhang, X., Artificial nacre by alternating preparation of layer-by-layer polymer films and CaCO₃ strata. *Chem. Mat.* **2007**, 19 (8), 1974-1978.
93. Aparicio, C.; Ginebra, M. P., *Biomaterialization and Biomaterials: Fundamentals and Applications*. Elsevier Science, Amsterdam: 2015.
94. Sowmya, S.; Kumar, P. S.; Chennazhi, K.; Nair, S.; Tamura, H.; Rangasamy, J., Biocompatible β -chitin hydrogel/nanobioactive glass ceramic nanocomposite scaffolds for periodontal bone regeneration. *Artif. Organs* **2011**, 25 (1), 1-11.
95. Despang, F.; Börner, A.; Dittrich, R.; Tomandl, G.; Pompe, W.; Gelinsky, M., Alginate/calcium phosphate scaffolds with oriented, tube-like pores. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **2005**, 36 (12), 761-767.
96. Bongio, M.; Van Den Beucken, J.; Nejadnik, M.; Leeuwenburgh, S.; Kinard, L.; Kasper, F.; Mikos, A.; Jansen, J., Biomimetic modification of synthetic hydrogels by incorporation of adhesive peptides and calcium phosphate nanoparticles: in vitro evaluation of cell behavior. *European cells & materials* **2011**, 22, 359-376.
97. Nejadnik, M. R.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A.; Leeuwenburgh, S. C., Facilitating the mineralization of oligo (poly (ethylene glycol) fumarate) hydrogel by incorporation of hydroxyapatite nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, 100 (5), 1316-1323.
98. Sun, S.; Mao, L.-B.; Lei, Z.; Yu, S.-H.; Cölfen, H., Hydrogels from Amorphous Calcium Carbonate and Polyacrylic Acid: Bio-Inspired Materials for "Mineral Plastics". *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, 55 (39), 11765-11769.
99. Kosanovic, C.; Falini, G.; Kralj, D., Mineralization of Calcium Carbonates in Gelling Media. *Cryst. Growth Des.* **2011**, 11 (1), 269-277.
100. Munro, N. H.; McGrath, K. M., Hydrogels as biomimetic mineralisation scaffolds. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials* **2011**, 1 (BBN1), 26-37.

-
101. Asenath-Smith, E.; Li, H. Y.; Keene, E. C.; Seh, Z. W.; Estroff, L. A., Crystal Growth of Calcium Carbonate in Hydrogels as a Model of Biomineralization. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (14), 2891-2914.
 102. Gkioni, K.; Leeuwenburgh, S. C. G.; Douglas, T. E. L.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A., Mineralization of Hydrogels for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews* **2010**, *16* (6), 577-585.
 103. Plazas Bonilla, C. E.; Gómez-Tejedor, J. A.; Perilla, J. E.; Gómez Ribelles, J. L., Silica phase formed by sol-gel reaction in the nano- and micro-pores of a polymer hydrogel. *Journal of Non-Crystalline Solids* **2013**, *379*, 12-20.
 104. Mahony, O.; Tsigkou, O.; Ionescu, C.; Minelli, C.; Ling, L.; Hanly, R.; Smith, M. E.; Stevens, M. M.; Jones, J. R., Silica-Gelatin Hybrids with Tailorable Degradation and Mechanical Properties for Tissue Regeneration. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (22), 3835-3845.
 105. Johnson, J. R.; Spikowski, J.; Schiraldi, D. A., Mineralization of Clay/Polymer Aerogels: A Bioinspired Approach to Composite Reinforcement. *ACS applied materials & interfaces* **2009**, *1* (6), 1305-1309.
 106. Li, H. Y.; Xin, H. L.; Muller, D. A.; Estroff, L. A., Visualizing the 3D Internal Structure of Calcite Single Crystals Grown in Agarose Hydrogels. *Science* **2009**, *326* (5957), 1244-1247.
 107. Oaki, Y.; Hayashi, S.; Imai, H., A hierarchical self-similar structure of oriented calcite with association of an agar gel matrix: inheritance of crystal habit from nanoscale. *Chem. Commun.* **2007**, (27), 2841-2843.
 108. Azami, M.; Moosavifar, M. J.; Baheiraei, N.; Moztafzadeh, F.; Ai, J., Preparation of a biomimetic nanocomposite scaffold for bone tissue engineering via mineralization of gelatin hydrogel and study of mineral transformation in simulated body fluid. *J Biomed Mater Res A* **2012**, *100* (5), 1347-55.
 109. Zhan, J. H.; Lin, H. P.; Mou, C. Y., Biomimetic formation of porous single-crystalline CaCO₃ via nanocrystal aggregation. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (7-8), 621-623.
 110. Falini, G.; Fermani, S.; Gazzano, M.; Ripamonti, A., Polymorphism and architectural crystal assembly of calcium carbonate in biologically inspired polymeric matrices. *J. Chem. Soc.-Dalton Trans.* **2000**, (21), 3983-3987.
 111. Falini, G.; Fermani, S.; Gazzano, M.; Ripamonti, A., Oriented crystallization of vaterite in collagenous matrices. *Chem.-Eur. J.* **1998**, *4* (6), 1048-1052.
 112. Manjubala, I.; Scheler, S.; Bössert, J.; Jandt, K. D., Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique. *Acta Biomaterialia* **2006**, *2* (1), 75-84.
 113. Neira-Carrillo, A.; Retuert, J.; Martínez, F.; Arias, J. L., Effect of crosslinked chitosan as a constrained volume on the in vitro calcium carbonate crystallization. *Journal of the Chilean Chemical Society* **2008**, *53* (1), 1367-1372.
 114. Munro, N. H.; Green, D. W.; Dangerfield, A.; McGrath, K. M., Biomimetic mineralisation of polymeric scaffolds using a combined soaking and Kitano approach. *Dalton Trans.* **2011**, *40* (36), 9259-9268.
 115. Jan, J.-S.; Chen, P.-S.; Hsieh, P.-L.; Chen, B.-Y., Silicification of Genipin-Cross-Linked Polypeptide Hydrogels Toward Biohybrid Materials and Mesoporous Oxides. *ACS applied materials & interfaces* **2012**, *4* (12), 6865-6874.
 116. Luo, Y.; Lode, A.; Akkineni, A. R.; Gelinsky, M., Concentrated gelatin/alginate composites for fabrication of pre-designed scaffolds with a favorable cell response by 3D plotting. *RSC Advances* **2015**, *5* (54), 43480-43488.
 117. Song, J.; Saiz, E.; Bertozzi, C. R., A new approach to mineralization of biocompatible hydrogel scaffolds: an efficient process toward 3-dimensional bonelike composites. *J Am Chem Soc* **2003**, *125* (5), 1236-43.

118. Grassmann, O.; Lobmann, P., Morphogenetic control of calcite crystal growth in sulfonic acid based hydrogels. *Chem.-Eur. J.* **2003**, *9* (6), 1310-1316.
119. Grassmann, O.; Lobmann, P., Biomimetic nucleation and growth of CaCO₃ in hydrogels incorporating carboxylate groups. *Biomaterials* **2004**, *25* (2), 277-282.
120. Grassmann, O.; Neder, R. B.; Putnis, A.; Lobmann, P., Biomimetic control of crystal assembly by growth in an organic hydrogel network. *Am. Miner.* **2003**, *88* (4), 647-652.
121. Sethmann, I.; Helbig, U.; Worheide, G., Octocoral sclerite ultrastructures and experimental approach to underlying biomineralisation principles. *Crytengcomm* **2007**, *9* (12), 1262-1268.
122. Bella, S. D.; Garciaruiz, J. M., Banding structures in induced morphology crystal aggregates of CaCO₃. *J. Mater. Sci.* **1987**, *22* (9), 3095-3102.
123. Estroff, L. A.; Addadi, L.; Weiner, S.; Hamilton, A. D., An organic hydrogel as a matrix for the growth of calcite crystals. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (1), 137-141.
124. Shi, N.; Yin, G.; Han, M.; Xu, Z., Anions bonded on the supramolecular hydrogel surface as the growth center of biominerals. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2008**, *66* (1), 84-89.
125. Furuichi, K.; Oaki, Y.; Ichimiya, H.; Komotori, J.; Imai, H., Preparation of hierarchically organized calcium phosphate-organic polymer composites by calcification of hydrogel. *Science and Technology of Advanced Materials* **2006**, *7* (2), 219-225.
126. Chen, C.-L.; Rosi, N. L., Peptide-Based Methods for the Preparation of Nanostructured Inorganic Materials. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49* (11), 1924-1942.
127. Mann, S., *Biomineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, Oxford: 2001; Vol. 5.
128. Liu, G.; Zhao, D.; Tomsia, A. P.; Minor, A. M.; Song, X.; Saiz, E., Three-Dimensional Biomimetic Mineralization of Dense Hydrogel Templates. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (29), 9937-9939.
129. Savin, G.; Bruns, N.; Thomann, Y.; Tiller, J. C., Nanophase separated amphiphilic microbeads. *Macromolecules* **2005**, *38* (18), 7536-7539.
130. Bruns, N.; Bannwarth, W.; Tiller, J. C., Amphiphilic conetworks as activating carriers for the enhancement of enzymatic activity in supercritical CO₂. *Biotechnol Bioeng* **2008**, *101* (1), 19-26.
131. Hanko, M.; Bruns, N.; Rentmeister, S.; Tiller, J. C.; Heinze, J., Nanophase-Separated Amphiphilic Conetworks as Versatile Matrixes for Optical Chemical and Biochemical Sensors. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (18), 6376-6383.
132. Filmon, R.; Baslé, M. F.; Atmani, H.; Chappard, D., Adherence of osteoblast-like cells on calcospherites developed on a biomaterial combining poly(2-hydroxyethyl) methacrylate and alkaline phosphatase. *Bone* **2002**, *30* (1), 152-158.
133. Filmon, R.; Basle, M.; Barbier, A.; Chappard, D., Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: A composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2000**, *11* (8), 849-868.
134. Xie, M.; Olderoy, M. O.; Zhang, Z.; Andreassen, J.-P.; Strand, B. L.; Sikorski, P., Biocomposites prepared by alkaline phosphatase mediated mineralization of alginate microbeads. *RSC Advances* **2012**, *2* (4), 1457-1465.
135. Spoerke, E. D.; Anthony, S. G.; Stupp, S. I., Enzyme directed templating of artificial bone mineral. *Adv. Mater.* **2009**, *21* (4), 425-430.
136. Douglas, T. E. L.; Messersmith, P. B.; Chasan, S.; Mikos, A. G.; de Mulder, E. L. W.; Dickson, G.; Schaubroeck, D.; Balcaen, L.; Vanhaecke, F.; Dubrueel, P.; Jansen, J. A.; Leeuwenburgh, S. C.

-
- G., Enzymatic mineralization of hydrogels for bone tissue engineering by incorporation of alkaline phosphatase. *Macromolecular bioscience* **2012**, *12* (8), 1077-1089.
137. Horiguchi, T.; Moriwaki, Y.; Kitago, H.; Kajimoto, T.; Iwayama, Y., Formation of apatite - collagen complexes. *Journal of biomedical materials research* **1996**, *31* (1), 43-49.
138. Beertsen, W.; van den Bos, T., Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *Journal of Clinical Investigation* **1992**, *89* (6), 1974-1980.
139. Bongio, M.; Nejadnik, M. R.; Birgani, Z. T.; Habibovic, P.; Kinard, L. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G.; Jansen, J. A.; Leeuwenburgh, S. C. G.; van den Beucken, J. J. J. P., In Vitro and In Vivo Enzyme-Mediated Biomineralization of Oligo(poly(ethylene glycol) Fumarate Hydrogels. *Macromolecular bioscience* **2013**, *13* (6), 777-788.
140. Malshe, A.; Rajurkar, K.; Samant, A.; Hansen, H. N.; Bapat, S.; Jiang, W., Bio-inspired functional surfaces for advanced applications. *CIRP Annals - Manufacturing Technology* **2013**, *62* (2), 607-628.
141. Feng, L.; Li, S.; Li, Y.; Li, H.; Zhang, L.; Zhai, J.; Song, Y.; Liu, B.; Jiang, L.; Zhu, D., Super-Hydrophobic Surfaces: From Natural to Artificial. *Adv. Mater.* **2002**, *14* (24), 1857-1860.
142. Patankar, N. A., Mimicking the Lotus Effect: Influence of Double Roughness Structures and Slender Pillars. *Langmuir* **2004**, *20* (19), 8209-8213.
143. Young, T., An Essay on the Cohesion of Fluids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1805**, *95*, 65-87.
144. Vogler, E. A., Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, *74* (1-3), 69-117.
145. Chaowei, G.; Shutao, W.; Huan, L.; Lin, F.; Yanlin, S.; Lei, J., Wettability Alteration of Polymer Surfaces Produced by Scraping. *Journal of Adhesion Science & Technology* **2008**, *22* (3/4), 395-402.
146. Blossey, R., Self-cleaning surfaces [mdash] virtual realities. *Nat Mater* **2003**, *2* (5), 301-306.
147. Zisman, W. A., Relation of the Equilibrium Contact Angle to Liquid and Solid Constitution. In *Contact Angle, Wettability, and Adhesion*, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY: 1964; Vol. 43, pp 1-51.
148. Wenzel, R. N., Resistance of solid surfaces to wetting by water. *Industrial & Engineering Chemistry* **1936**, *28* (8), 988-994.
149. Cassie, A. B. D.; Baxter, S., Wettability of porous surfaces. *Transactions of the Faraday Society* **1944**, *40* (0), 546-551.
150. Barthlott, W.; Cerman, Z.; Stosch, A. K., Der Lotus-Effekt: Selbstreinigende Oberflächen und ihre Übertragung in die Technik. *Biologie in unserer Zeit* **2004**, *34* (5), 290-296.
151. Fik, C. P.; Meuris, M.; Salz, U.; Bock, T.; Tiller, J. C., Ultrahigh-Aspect Ratio Microfiber-Furs as Plant-Surface Mimics Derived from Teeth. *Adv. Mater.* **2011**, *23* (31), 3565-3569.
152. Miwa, M.; Nakajima, A.; Fujishima, A.; Hashimoto, K.; Watanabe, T., Effects of the Surface Roughness on Sliding Angles of Water Droplets on Superhydrophobic Surfaces. *Langmuir* **2000**, *16* (13), 5754-5760.
153. Öner, D.; McCarthy, T. J., Ultrahydrophobic Surfaces. Effects of Topography Length Scales on Wettability. *Langmuir* **2000**, *16* (20), 7777-7782.
154. Wang, S.; Liu, K.; Yao, X.; Jiang, L., Bioinspired Surfaces with Superwettability: New Insight on Theory, Design, and Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (16), 8230-8293.
155. Bhushan, B., Bioinspired Structured Surfaces. *Langmuir* **2012**, *28* (3), 1698-1714.
156. Sun, T.; Feng, L.; Gao, X.; Jiang, L., Bioinspired Surfaces with Special Wettability. *Accounts of Chemical Research* **2005**, *38* (8), 644-652.

157. Furstner, R.; Barthlott, W.; Neinhuis, C.; Walzel, P., Wetting and self-cleaning properties of artificial superhydrophobic surfaces. *Langmuir* **2005**, *21* (3), 956-61.
158. Ming, W.; Wu, D.; van Benthem, R.; de With, G., Superhydrophobic Films from Raspberry-like Particles. *Nano Letters* **2005**, *5* (11), 2298-2301.
159. Mah, T.-F.; Pitts, B.; Pellock, B.; Walker, G. C.; Stewart, P. S.; O'Toole, G. A., A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **2003**, *426* (6964), 306-310.
160. Tenke, P.; Riedl, C. R.; Jones, G. L.; Williams, G. J.; Stickler, D.; Nagy, E., Bacterial biofilm formation on urologic devices and heparin coating as preventive strategy. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2004**, *23*, Supplement 1, 67-74.
161. Srey, S.; Jahid, I. K.; Ha, S.-D., Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* **2013**, *31* (2), 572-585.
162. Bixler, G. D.; Bhushan, B., Biofouling: lessons from nature. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences* **2012**, *370* (1967), 2381-417.
163. Videla, H. A.; Herrera, L. K., Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* **2005**, *8* (3), 169-80.
164. Kip, N.; van Veen, J. A., The dual role of microbes in corrosion. *The ISME journal* **2015**, *9* (3), 542-51.
165. Tiller, J. C., Antimicrobial Surfaces. In *Bioactive Surfaces*, Börner, G. H.; Lutz, J.-F., Eds. Springer Berlin Heidelberg: 2011; pp 193-217.
166. Razatos, A.; Ong, Y.-L.; Boulay, F.; Elbert, D. L.; Hubbell, J. A.; Sharma, M. M.; Georgiou, G., Force Measurements between Bacteria and Poly(ethylene glycol)-Coated Surfaces. *Langmuir* **2000**, *16* (24), 9155-9158.
167. Humphries, M.; Nemcek, J.; Cantwell, J. B.; Gerrard, J. J., The use of graft copolymers to inhibit the adhesion of bacteria to solid surfaces. *FEMS Microbiology Ecology* **1987**, *3* (5), 297-304.
168. Tiller, J. C., Coatings for Prevention or Deactivation of Biological Contamination. In *Developments in surface contamination and cleaning*, Kohli, R.; Mittal, K., Eds. Norwich, New York: 2008; pp 1013-1065.
169. Jansen, B.; Kohnen, W., Prevention of biofilm formation by polymer modification. *Journal of industrial microbiology* **1995**, *15* (4), 391-396.
170. Pratt-Terpstra, I. H.; Weerkamp, A. H.; Busscher, H. J., Adhesion of oral streptococci from a flowing suspension to uncoated and albumin-coated surfaces. *Microbiology* **1987**, *133* (11), 3199-3206.
171. Grivet, M.; Morrier, J. J.; Benay, G.; Barsotti, O., Effect of hydrophobicity on in vitro streptococcal adhesion to dental alloys. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2000**, *11* (10), 637-642.
172. Thorpe, A. A.; Peters, V.; Smith, J. R.; Nevell, T. G.; Tsibouklis, J., Poly(methylpropenoxyfluoroalkylsiloxane)s: a class of fluoropolymers capable of inhibiting bacterial adhesion onto surfaces. *Journal of Fluorine Chemistry* **2000**, *104* (1), 37-45.
173. Yoshino, N.; Teranaka, T., Synthesis of silane coupling agents containing fluorocarbon chain and applications to dentistry: Plaque-controlling surface modifiers. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **1997**, *8* (8), 623-653.
174. Crawford, R. J.; Webb, H. K.; Truong, V. K.; Hasan, J.; Ivanova, E. P., Surface topographical factors influencing bacterial attachment. *Advances in Colloid and Interface Science* **2012**, *179-182*, 142-149.
175. Ma, J.; Sun, Y.; Gleichauf, K.; Lou, J.; Li, Q., Nanostructure on taro leaves resists fouling by colloids and bacteria under submerged conditions. *Langmuir* **2011**, *27* (16), 10035-10040.

-
176. Dickson, M. N.; Liang, E. I.; Rodriguez, L. A.; Vollereaux, N.; Yee, A. F., Nanopatterned polymer surfaces with bactericidal properties. *Biointerphases* **2015**, *10* (2), 021010.
177. Crick, C. R.; Ismail, S.; Pratten, J.; Parkin, I. P., An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition. *Thin Solid Films* **2011**, *519* (11), 3722-3727.
178. Fadeeva, E.; Truong, V. K.; Stiesch, M.; Chichkov, B. N.; Crawford, R. J.; Wang, J.; Ivanova, E. P., Bacterial Retention on Superhydrophobic Titanium Surfaces Fabricated by Femtosecond Laser Ablation. *Langmuir* **2011**, *27* (6), 3012-3019.
179. Lejars, M.; Margailan, A.; Bressy, C., Fouling Release Coatings: A Nontoxic Alternative to Biocidal Antifouling Coatings. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4347-4390.
180. Zhou, G.; Shi, Q. S.; Huang, X. M.; Xie, X. B., The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents. *International journal of molecular sciences* **2015**, *16* (9), 21711-33.
181. Mah, T.-F. C.; O'Toole, G. A., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **2001**, *9* (1), 34-39.
182. Nadtochenko, V.; Denisov, N.; Sarkisov, O.; Gumy, D.; Pulgarin, C.; Kiwi, J., Laser kinetic spectroscopy of the interfacial charge transfer between membrane cell walls of *E. coli* and TiO₂. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2006**, *181* (2-3), 401-407.
183. Pereira, M.; Ankjaergaard, C., 10 - Legislation affecting antifouling products A2 - Hellio, Claire. In *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*, Yebra, D., Ed. Elsevier, Amsterdam: 2009; pp 240-259.
184. Strassburg, A.; Kracke, F.; Wenners, J.; Jemeljanova, A.; Kuepper, J.; Petersen, H.; Tiller, J. C., Nontoxic, Hydrophilic Cationic Polymers-Identified as Class of Antimicrobial Polymers. *Macromolecular bioscience* **2015**, *15* (12), 1710-23.
185. Cypionka, H., *Grundlagen der Mikrobiologie*. Springer Berlin Heidelberg: 2010.
186. Mohorčič, M.; Jerman, I.; Zorko, M.; Butinar, L.; Orel, B.; Jerala, R.; Friedrich, J., Surface with antimicrobial activity obtained through silane coating with covalently bound polymyxin B. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2010**, *21* (10), 2775-2782.
187. Bieser, A. M.; Tiller, J. C., Mechanistic Considerations on Contact-Active Antimicrobial Surfaces with Controlled Functional Group Densities. *Macromolecular bioscience* **2011**, *11* (4), 526-534.
188. Kelly, A. M.; Kaltenhauser, V.; Mühlbacher, I.; Rametsteiner, K.; Kren, H.; Slugovc, C.; Stelzer, F.; Wiesbrock, F., Poly(2-oxazoline)-derived Contact Biocides: Contributions to the Understanding of Antimicrobial Activity. *Macromolecular bioscience* **2013**, *13* (1), 116-125.
189. Raafat, D.; von Bargaen, K.; Haas, A.; Sahl, H.-G., Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, *74* (12), 3764-3773.
190. Asri, L. A. T. W.; Crismaru, M.; Roest, S.; Chen, Y.; Ivashenko, O.; Rudolf, P.; Tiller, J. C.; van der Mei, H. C.; Loontjens, T. J. A.; Busscher, H. J., A Shape-Adaptive, Antibacterial-Coating of Immobilized Quaternary-Ammonium Compounds Tethered on Hyperbranched Polyurea and its Mechanism of Action. *Adv. Funct. Mater.* **2014**, *24* (3), 346-355.
191. Tiller, J. C.; Liao, C. J.; Lewis, K.; Klibanov, A. M., Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98* (11), 5981-5.
192. Maus, R.; Goppelsröder, A.; Umhauer, H., Survival of bacterial and mold spores in air filter media. *Atmospheric Environment* **2001**, *35* (1), 105-113.
193. Hausinger, R. P., Introduction. In *Biochemistry of Nickel*, Springer US: Boston, MA, 1993; pp 1-11.

194. Yeom, B.; Char, K., Nanostructured CaCO₃ Thin Films Formed on the Urease Multilayers Prepared by the Layer-by-Layer Deposition. *Chem. Mat.* **2010**, *22* (1), 101-107.
195. Dixon, N. E.; Hinds, J. A.; Fihelly, A. K.; Gazzola, C.; Winzor, D. J.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). IV. The molecular size and the mechanism of inhibition by hydroxamic acids. Spectrophotometric titration of enzymes with reversible inhibitors. *Canadian journal of biochemistry* **1980**, *58* (12), 1323-34.
196. Jha, S. K.; Topkar, A.; D'Souza, S. F., Development of potentiometric urea biosensor based on urease immobilized in PVA-PAA composite matrix for estimation of blood urea nitrogen (BUN). *J. Biochem. Biophys. Methods* **2008**, *70* (6), 1145-1150.
197. Rauner, N.; Meuris, M.; Dech, S.; Godde, J.; Tiller, J. C., Urease-induced calcification of segmented polymer hydrogels - a step towards artificial biomineralization. *Acta Biomater* **2014**, *10* (9), 3942-51.
198. Liu, D. X.; Yates, M. Z., Formation of rod-shaped calcite crystals by microemulsion-based synthesis. *Langmuir* **2006**, *22* (13), 5566-5569.
199. Chen, S. F.; Yu, S. H.; Jiang, J.; Li, F. Q.; Liu, Y. K., Polymorph discrimination of CaCO₃ mineral in an ethanol/water solution: Formation of complex vaterite superstructures and aragonite rods. *Chem. Mat.* **2006**, *18* (1), 115-122.
200. Andersen, F. A.; Brecevic, L., Infrared-spectra of amorphous and crystalline calcium-carbonate. *Acta Chemica Scandinavica* **1991**, *45* (10), 1018-1024.
201. Blakeley, R. L.; Zerner, B., Jack bean urease: the first nickel enzyme. *J. Mol. Catal.* **1984**, *23* (2-3), 263-92.
202. Bogoyavlenskiy, V. A.; Chernova, N. A., Diffusion-limited aggregation: A relationship between surface thermodynamics and crystal morphology. *Phys. Rev. E* **2000**, *61* (2), 1629-1633.
203. Rauner, N.; Buenger, L.; Schuller, S.; Tiller, J. C., Post-polymerization of urease-induced calcified, polymer hydrogels. *Macromolecular rapid communications* **2015**, *36* (2), 224-30.
204. Cesareo, S. D.; Langton, S. R., Kinetic properties of *Helicobacter pylori* urease compared with jack bean urease. *FEMS microbiology letters* **1992**, *78* (1), 15-21.
205. Meldrum, F. C., Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry. *Int. Mater. Rev.* **2003**, *48* (3), 187-224.
206. Corni, I.; Harvey, T. J.; Wharton, J. A.; Stokes, K. R.; Walsh, F. C.; Wood, R. J. K., A review of experimental techniques to produce a nacre-like structure. *Bioinspir. Biomim.* **2012**, *7* (3), 23.
207. Tang, Z. Y.; Kotov, N. A.; Magonov, S.; Ozturk, B., Nanostructured artificial nacre. *Nat. Mater.* **2003**, *2* (6), 413-418.
208. Peak, C. W.; Wilker, J. J.; Schmidt, G., A review on tough and sticky hydrogels. *Colloid and Polymer Science* **2013**, *291* (9), 2031-2047.
209. Kong, H. J.; Wong, E.; Mooney, D. J., Independent Control of Rigidity and Toughness of Polymeric Hydrogels. *Macromolecules* **2003**, *36* (12), 4582-4588.
210. Gong, J. P.; Katsuyama, Y.; Kurokawa, T.; Osada, Y., Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv. Mater.* **2003**, *15* (14), 1155-1158.
211. Liu, X. J.; Ren, X. Y.; Guan, S.; Li, H. Q.; Song, Z. K.; Gao, G. H., Highly stretchable and tough double network hydrogels via molecular stent. *European Polymer Journal* **2015**, *73*, 149-161.
212. Zhu, M.; Liu, Y.; Sun, B.; Zhang, W.; Liu, X.; Yu, H.; Zhang, Y.; Kuckling, D.; Adler, H.-J. P., A Novel Highly Resilient Nanocomposite Hydrogel with Low Hysteresis and Ultrahigh Elongation. *Macromolecular rapid communications* **2006**, *27* (13), 1023-1028.
213. Liu, R.; Liang, S.; Tang, X.-Z.; Yan, D.; Li, X.; Yu, Z.-Z., Tough and highly stretchable graphene oxide/polyacrylamide nanocomposite hydrogels. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22* (28), 14160-14167.

-
214. Zhong, M.; Liu, X.-Y.; Shi, F.-K.; Zhang, L.-Q.; Wang, X.-P.; Cheetham, A. G.; Cui, H.; Xie, X.-M., Self-healable, tough and highly stretchable ionic nanocomposite physical hydrogels. *Soft matter* **2015**, *11* (21), 4235-4241.
215. Janigová, I.; Csomorová, K.; Stillhammerová, M.; Bartoň, J., Differential scanning calorimetry and thermogravimetry studies of polyacrylamide prepared by free-radical polymerization in inverse microemulsion and in solution. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1994**, *195* (11), 3609-3614.
216. Song, J.; Xu, J.; Filion, T.; Saiz, E.; Tomsia, A. P.; Lian, J. B.; Stein, G. S.; Ayers, D. C.; Bertozzi, C. R., Elastomeric high-mineral content hydrogel-hydroxyapatite composites for orthopedic applications. *Journal of biomedical materials research. Part A* **2009**, *89* (4), 1098-1107.
217. Little, C. J.; Bawolin, N. K.; Chen, X., Mechanical properties of natural cartilage and tissue-engineered constructs. *Tissue engineering. Part B, Reviews* **2011**, *17* (4), 213-27.
218. Meyer, U., Meyer, Th., Handschel, J., Wiesmann, H.P., *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2009.
219. Chen, F.; Zhu, Y.-J., Multifunctional Calcium Phosphate Nanostructured Materials and Biomedical Applications. *Curr. Nanosci.* **2014**, *10* (4), 465-485.
220. Amjad, Z., *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*. Springer US, New York: 2013.
221. Orimo, H., The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi* **2010**, *77* (1), 4-12.
222. Filmon, R.; Basle, M. F.; Barbier, A.; Chappard, D., Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate)-alkaline phosphatase: a composite biomaterial allowing in vitro studies of bisphosphonates on the mineralization process. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **2000**, *11* (8), 849-68.
223. Neumann, H.; Lustig, A., The Activation of Alkaline Phosphatase by Effector Molecules. *European Journal of Biochemistry* **1980**, *109* (2), 475-480.
224. Stec, B.; Holtz, K. M.; Kantrowitz, E. R., A revised mechanism for the alkaline phosphatase reaction involving three metal ions. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *299* (5), 1303-1311.
225. Coleman, J. E., Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **1992**, *21*, 441-83.
226. Sekiguchi, S.; Hashida, Y.; Yasukawa, K.; Inouye, K., Effects of amines and aminoalcohols on bovine intestine alkaline phosphatase activity. *Enzyme and Microbial Technology* **2011**, *49* (2), 171-176.
227. Lowman, A. M.; Peppers, N. A., *Hydrogels*. Wiley, New York: 1999.
228. Rauner, N.; Meuris, M.; Zoric, M.; Tiller, J. C., Enzymatic mineralization generates ultrastiff and tough hydrogels with tunable mechanics. *Nature* **2017**, *543* (7645), 407-410.
229. Chaudhuri, G.; Chatterjee, S.; Venu-Babu, P.; Ramasamy, K.; Thilagaraj, W. R., Kinetic behaviour of calf intestinal alkaline phosphatase with pNPP. *Indian journal of biochemistry & biophysics* **2013**, *50* (1), 64-71.
230. Chevallet, M.; Luche, S.; Rabilloud, T., Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* **2006**, *1* (4), 1852-8.
231. Bettini, R.; Colombo, P.; Peppas, N. A., Solubility effects on drug transport through pH-sensitive, swelling-controlled release systems: Transport of theophylline and metoclopramide monohydrochloride. *Journal of Controlled Release* **1995**, *37* (1-2), 105-111.
232. Arimoto, H.; Egawa, M., Imaging wavelength and light penetration depth for water content distribution measurement of skin. *Skin Research and Technology* **2015**, *21* (1), 94-100.

233. Buckwalter, J. A.; Mankin, H. J., Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instructional course lectures* **1998**, *47*, 477-86.
234. Rivlin, R. S.; Thomas, A. G., Rupture of rubber. I. Characteristic energy for tearing. *Journal of Polymer Science* **1953**, *10* (3), 291-318.
235. Hartmann, M. A.; Fratzl, P., Sacrificial Ionic Bonds Need To Be Randomly Distributed To Provide Shear Deformability. *Nano Letters* **2009**, *9* (10), 3603-3607.
236. Geise, G. M.; Park, H. B.; Sagle, A. C.; Freeman, B. D.; McGrath, J. E., Water permeability and water/salt selectivity tradeoff in polymers for desalination. *Journal of Membrane Science* **2011**, *369* (1-2), 130-138.
237. Round, F. E.; Crawford, R. M.; Mann, D. G., *Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge: 1990.
238. Baeuerlein, E., *Biomineralization: Progress in Biology, Molecular Biology and Application*. Wiley-VCH, Weinheim: 2004.
239. Tacke, R., Meilensteine in der Biochemie des Siliciums: von der Grundlagenforschung zu biotechnologischen Anwendungen. *Angewandte Chemie* **1999**, *111* (20), 3197-3200.
240. Otzen, D., The Role of Proteins in Biosilicification. *Scientifica* **2012**, *2012*, 22.
241. Shimizu, K.; Cha, J.; Stucky, G. D.; Morse, D. E., Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95* (11), 6234-8.
242. Müller, W. E. G.; Schröder, H. C.; Burghard, Z.; Pisignano, D.; Wang, X., Silicateins—A Novel Paradigm in Bioinorganic Chemistry: Enzymatic Synthesis of Inorganic Polymeric Silica. *Chemistry – A European Journal* **2013**, *19* (19), 5790-5804.
243. Iler, R. K., *The colloid chemistry of silica and silicates*. Cornell University Press, New York: 1955.
244. Bassindale, A. R.; Taylor, P. G.; Abbate, V.; Brandstadt, K. F., Simple and mild preparation of silica-enzyme composites from silicic acid solution. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (41), 7606-7609.
245. Coradin, T.; Coupé, A.; Livage, J., Interactions of bovine serum albumin and lysozyme with sodium silicate solutions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2003**, *29* (2-3), 189-196.
246. Coradin, T.; Livage, J., Effect of some amino acids and peptides on silicic acid polymerization. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2001**, *21* (4), 329-336.
247. Brinker, C. J.; Scherer, G. W., *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing*. Academic Press, London: 1990.
248. Brenda Enzyme Database, [Online], URL <http://www.brenda-enzymes.com> [Aufgerufen am 28.07.2016].
249. Isquith, A. J.; Abbott, E. A.; Walters, P. A., Surface-Bonded Antimicrobial Activity of an Organosilicon Quaternary Ammonium Chloride. *Applied Microbiology* **1972**, *24* (6), 859-863.
250. Gottenbos, B.; van der Mei, H. C.; Klatter, F.; Nieuwenhuis, P.; Busscher, H. J., In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* **2002**, *23* (6), 1417-23.
251. Larbi, L. B., Antimikrobielle Beschichtung von Silikonfilmen. *Diplomarbeit, BMP, TU Dortmund* **2010**.
252. Gottenbos, B.; van der Mei, H. C.; Klatter, F.; Nieuwenhuis, P.; Busscher, H. J., In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* **2002**, *23* (6), 1417-1423.
253. Song, J.; Kong, H.; Jang, J., Bacterial adhesion inhibition of the quaternary ammonium functionalized silica nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* **2011**, *82* (2), 651-6.

-
254. Müller, C., Synthese und Charakterisierung von neuartigen bioaktiven Polymernetzwerken. *Diplomarbeit, BMP, TU Dortmund* **2014**.
255. Ring, S., Design antimikrobieller Nanopartikel. *Masterarbeit, BMP, TU Dortmund* **2015**.
256. Böhle, S., Synthese und Charakterisierung von kontaktaktiv-antimikrobiellen Nanopartikeln. *Masterarbeit, BMP, TU Dortmund* **2015**.
257. Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E., Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (1), 62-69.
258. Sakka, S.; Kamiya, K., Proceedings of the International Workshop on Glasses and Glass Ceramics from Gels The sol-gel transition in the hydrolysis of metal alkoxides in relation to the formation of glass fibers and films. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1982**, *48* (1), 31-46.
259. Iler, R. K., *The chemistry of silica : solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*. Wiley, New York: 1979.
260. Sepeur, S., *Nanotechnologie: Grundlagen und Anwendungen*. Vincentz Network, Hannover: 2008.
261. LaMer, V. K.; Dinegar, R. H., Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *Journal of the American Chemical Society* **1950**, *72* (11), 4847-4854.
262. Matsoukas, T.; Gulari, E., Dynamics of growth of silica particles from ammonia-catalyzed hydrolysis of tetra-ethyl-orthosilicate. *J. Colloid Interface Sci.* **1988**, *124* (1), 252-261.
263. Rao, K. S.; El-Hami, K.; Kodaki, T.; Matsushige, K.; Makino, K., A novel method for synthesis of silica nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289* (1), 125-131.
264. Giesche, H., Synthesis of monodispersed silica powders I. Particle properties and reaction kinetics. *Journal of the European Ceramic Society* **1994**, *14* (3), 189-204.
265. Yoshinaga, K., Surface modifications of inorganic particles. In *Fine Particles: Synthesis, Characterization, and Mechanisms of Growth*, Sugimoto, T., Ed. Taylor & Francis, New York: 2000; pp 626-646.
266. Zhuravlev, L. T., The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, *173* (1-3), 1-38.
267. Plumeré, N.; Ruff, A.; Speiser, B.; Feldmann, V.; Mayer, H. A., Stöber silica particles as basis for redox modifications: Particle shape, size, polydispersity, and porosity. *J. Colloid Interface Sci.* **2012**, *368* (1), 208-219.
268. Kedenburg, S.; Vieweg, M.; Gissibl, T.; Giessen, H., Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region. *Opt. Mater. Express* **2012**, *2* (11), 1588-1611.
269. Gao, L.; Lemarchand, F.; Lequime, M., Refractive index determination of SiO₂ layer in the UV/Vis/NIR range: spectrophotometric reverse engineering on single and bi-layer designs. *Journal of the European Optical Society - Rapid publications; Vol 8 (2013)* **2013**.
270. Tsai, H.-J.; Lee, Y.-L., Facile Method to Fabricate Raspberry-like Particulate Films for Superhydrophobic Surfaces. *Langmuir* **2007**, *23* (25), 12687-12692.
271. Tanriseven, A.; Oelcer, Z., A novel method for the immobilization of glucoamylase onto polyglutaraldehyde-activated gelatin. *Biochem. Eng. J.* **2008**, *39* (3), 430-434.

8 Anhang

8.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Auflistung wichtiger Biomineralien mit ihrer jeweiligen Summenformel und Ursprungsorganismus/-en (nach EPPLE ¹⁸)	5
Tabelle 2.2 Beispiele für chemisch und physikalisch vernetzte Polymere-Hydrogele	8
Tabelle 2.3 Liste der für eine Mineralisation von polymeren Hydrogelen mit Calciumcarbonat, Calciumphosphat und Silikat in Frage kommender Enzyme, ihrer katalysierten Reaktionen und der daraus fakultativ abzuscheidenden Mineralien (nach UNUMA ⁷⁷)	18
Tabelle 4.1 Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter dem Einfluss des Vernetzeranteils und der Enzymkonzentration. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO ₃ angegeben (w(CaCO ₃) + w(Polymer) = 100 Gew%). ¹⁹⁷	38
Tabelle 4.2 Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter dem Einfluss der Temperatur. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO ₃ angegeben (w(CaCO ₃) + w(Polymer) = 100 Gew%). ¹⁹⁷	43
Tabelle 4.3 Höchste erreichte E-Moduln der in einer ungepufferten Urea/CaCl ₂ -Lösung calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerke mit unterschiedlichen, gebildeten CaCO ₃ -Strukturen. ¹⁹⁷	52
Tabelle 4.4 Anteile von Calcit- und Aragonit-Kristallen in den calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerken unter den optimierten Bedingungen für Temperatur und Enzymkonzentration. Zudem ist der zugehörige prozentuale Massenanteil an CaCO ₃ angegeben (w(CaCO ₃) + w(Polymer) = 100 Gew%). ¹⁹⁷	53
Tabelle 4.5 Gemessene Quellgrade der calcifizierten Netzwerke nach verschiedenen Zeiten in Wasser im Vergleich zu den nicht calcifizierten Hydrogelen.	88
Tabelle 4.6 Auflistung der untersuchten Proteine für eine proteininduzierte Ausfällung von SiO ₂ in einer 10 mM Natriumsilikat-Lösung mit ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt (pI) und der beobachteten Trübung der Lösung durch Zugabe des jeweiligen Polypeptids nach 24 h.....	105
Tabelle 6.1 Monomere, Vernetzer, Polymere und Initiatoren für Netzwerke zur Immobilisation der Enzyme.	135
Tabelle 6.2 Enzyme und Chemikalien für die Calcifizierungslösung.	136
Tabelle 6.3 Sonstige Chemikalien für die Calcifizierung.	136
Tabelle 6.4 Chemikalien für die SiO ₂ -Partikelsynthese und Modifizierung.....	137
Tabelle 6.5 Bakterien und Chemikalien für den Bakteriensprühtest.	137
Tabelle 6.6 Parameter zur Destillation der Monomere.	139
Tabelle 6.7 Grundnetzwerk-Rezepturen der HEA-, DMA- und Acrylamid-basierten Netzwerke.....	144
Tabelle 6.8 Zusammensetzungen HEA-, DMA- und Acrylamid-basierter Netzwerke mit Additiv-Monomeren	144
Tabelle 6.9 Zusammensetzung semiinterpenetrierender, dehnbarer Netzwerke auf Basis von Acrylamid	145
Tabelle 6.10 Calcifizierungszeiten der Polymernetzwerke bei unterschiedlichen Temperaturen.....	146
Tabelle 6.11 Ablauf der verwendeten Silbernitrat-Staining-Prozedur zur Anfärbung von alkalischer Phosphatase in einer Polymermatrix.....	148
Tabelle 6.12 Einwaagen und Parameter für die SiO ₂ -Partikelsynthese mit unterschiedlichen Durchmessern.	154

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Übersicht der mechanischen Eigenschaften verschiedener natürlicher Keramiken, Gewebe und ihrer Komposite. Die vertikale Achse beschreibt den Widerstand des Materials gegen eine Rissausbreitung (Zähigkeit), während auf der x-Achse die Steifigkeit des Werkstoffes (E-Modul) aufgetragen ist. (nach WEGST und ASHBY ^{16, 19})	6
Abbildung 2.2 (a) Schema des hierarchischen Aufbaus von Knochen. ⁸ (b) Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) - Aufnahmen des Perlmutts einer Abalone-Muschelschale im Querschnitt in unterschiedlichen Vergrößerungen. (c) Ausschnitt des Zentrums einer zylindrischen Kieselalge mit radial verlaufenden Strukturen (Die Kreise kennzeichnen auftretende Dislokationen in der Struktur). ⁸	7
Abbildung 2.3 Übersicht verschiedener Immobilisierungsmethoden von Enzymen (nach HARTMEIER ⁶³).	12
Abbildung 2.4 Schema der Benetzung einer hydrophilen und hydrophoben Oberfläche nach YOUNG sowie einer hydrophoben Oberfläche mit zunehmender Feinstrukturierung.	20
Abbildung 2.5 Veränderung der Auflagefläche eines Wassertropfens und von Verschmutzungen auf einer (a) hydrophoben, glatten, sowie einer (b) strukturierten bzw. einer (c) doppelt strukturierten Oberfläche im Fall einer Benetzung nach CASSIE-BAXTER (nach BARTHLOTT ¹⁵⁰).	21
Abbildung 2.6 Wirkungsweisen von antimikrobiell wirksamen Oberflächen. ⁷	23
Abbildung 2.7 Ausschnitt einer verschmutzten Fassade beschichtet mit der Fassadenfarbe Lotusan der Firma Sto SE & Co. KGaA bei Beregnung. ¹⁴⁰	25
Abbildung 4.1 Reaktionsgleichung der Hydrolyse von Harnstoff zu Carbonat und Ammoniak und dem Ausfallen von CaCO ₃ bei Anwesenheit von Calciumchlorid.	31
Abbildung 4.2 Spezifische Aktivitäten der Urease in PHEA-I-PETox (dunkelblau) und PHEA-I-TEG Netzwerken (grau gestreift) mit unterschiedlichen Vernetzeranteilen bei RT. Die Enzymbeladung beträgt jeweils 1 Gew% Urease. ¹⁹⁷ 32	32
Abbildung 4.3 (a) Lichtmikroskopische Aufnahmen eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Urease in einer Harnstoff- (10 g/l) und CaCl ₂ -Lösung (30 g/l) bei Raumtemperatur (RT) nach verschiedenen Zeiten. Die REM-Aufnahmen zeigen vergrößerte Ausschnitte des Querschnitts der calcifizierten Filme nach (b) 5 Min und (c) 30 Min. Die Bilder (d) und (e) zeigen die Querschnitte der calcifizierten Hydrogele (d) PHEA-I-TEG (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) und (e) PHEA-I-PETox (50 Gew% PETox, 0,3 Gew% Urease) nach Calcifizierung in der gleichen Lösung bei RT für 48 h. ¹⁹⁷	34
Abbildung 4.4 (a, b) REM-Bilder des Querschnitts eines in Stickstoff gebrochenen PHEA-I-TEG (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) Netzwerks nach Calcifizierung für 48 h in einer Harnstoff- (10 g/l) und CaCl ₂ -Lösung (30 g/l) bei RT. (c) REM-Aufnahme des calcifizierten PHEA-I-TEG Films mit zugehörigem EDX-Mapping, das die Calciumverteilung im Querschnitt mit den gewachsenen Strukturen zeigt. (d) Abbildung der erzeugten Strukturen in einem 48 h bei RT calcifizierten PHEA-I-PETox Netzwerk (50 Gew% PETox, 0,3 Gew% Urease) mittels REM. (e) Exemplarische TEM-Aufnahme von Bruchstücken der Strukturen aus einem calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerk mit (f, g) zugehörigen TED-Bildern. (h, i) Röntgendiffraktogramme (XRD) der Strukturen im Inneren der bei RT calcifizierten (h) PHEA-I-TEG und (i) PHEA-I-PETox Filme (a: Aragonit, c: Calcit). ¹⁹⁷	36
Abbildung 4.5 Die REM-Bilder zeigen die Querschnitte calcifizierter PHEA-I-TEG Netzwerke mit 1 Gew% immobilisierter Urease und unterschiedlichen TEG-Vernetzeranteilen von (a) 0,1 Gew%, (b) 3 Gew% und (c) 8 Gew% in verschiedenen Vergrößerungen. Die Mineralisation erfolgte für eine Dauer von 7 Tagen bei RT in einer Urea/CaCl ₂ Lösung. ¹⁹⁷	39
Abbildung 4.6 Stereomikroskopische Aufnahmen eines für 48 h bei RT in einer wässrigen CaCl ₂ /Harnstoff-Lösung calcifiziertes PHEA-I-TEG Netzwerks mit 3 Gew% TEG und 3 Gew% immobilisierter Urease in der Draufsicht (links), im Querschnitt (mittig) und als REM-Aufnahme des Querschnitts (rechts).	40
Abbildung 4.7 Zunahme des anorganischen Anteils im Inneren der Netzwerke während der Calcifizierung in CaCl ₂ /Harnstoff-Lösung (0,27/0,17 M) bei RT (blau) und 50 °C (rot). Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs. ¹⁹⁷	41
Abbildung 4.8 REM-Aufnahmen des Querschnitts von mineralisierten PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG) nach 48 h in der Calcifizierungslösung bei (a) RT, (b) 50 °C, (c) 60 °C und (d) 70 °C jeweils mit vergrößerter Ansicht in der unteren linken Ecke. ¹⁹⁷	42

Abbildung 4.9 REM-Bilder eines PHEA-I-TEG Netzwerks mit 3 Gew% TEG und 0,3 Gew% immobilisierter Urease calcifiziert in einer CaCO_3 / Harnstoff – Lösung (0,27 M/ 0,17 M), bei 50°C für 48 h. (a) Lichtmikroskopische Draufsichten und (b) eine REM-Aufnahmen des Querschnitts jeweils mit vergrößerter Ansicht in der unteren rechten Ecke. ¹⁹⁷	43
Abbildung 4.10 PHEA-I-TEG Netzwerk (3 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Urease und 0,1 Gew% Bromthymolblau in einer wässrigen, nicht gepufferten CaCl_2 /Harnstoff Lösung (0,27 M/0,17 M) bei RT nach (a) 0 min, (b) 2 min und (c) 4 min. ²⁰³	44
Abbildung 4.11 REM-Aufnahmen des Querschnitts eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) calcifiziert für 24 h in TRIS-gepuffertes Urea/ CaCl_2 Lösung mit (a) pH 7,5 (b) pH 9,3 bei 50 °C. (c) Stereomikroskop-Bilder in der Draufsicht und des Querschnitts eines für 24 h in TRIS-gepuffertes Urea/ CaCl_2 -Lösung (pH 7,5) calcifizierten PHEA-I-TEG Films mit 0,05 Gew% immobilisierter Urease sowie (d) die zugehörigen REM-Aufnahmen des Querschnitts. (e) Die Tabelle zeigt die CaCO_3 -Anteile der PHEA-I-TEG Netzwerke mineralisiert in pH 7,5 TRIS-gepuffertes Calcifizierungslösung mit unterschiedlichen Urease-Gehalten.....	46
Abbildung 4.12 REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen der Querschnitte von PHEA-I-TEG Netzwerken mit 3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease, und (a - c) 1 Gew% Acrylsäure bzw. (d - f) 1 Gew% QuAAc calcifiziert in (a, d) ungepuffertes, (b, e) 0,1 M TRIS pH 7,5 und (c, f) 0,1 M TRIS pH 9,3 gepuffertes Urea/ CaCl_2 -Lösungen bei 50 °C für 24 h.	49
Abbildung 4.13 REM-Aufnahmen in unterschiedlichen Vergrößerungen des Querschnitts eines PDMA-I-TEG Netzwerk mit 3 Gew% TEG und 1 Gew% Urease calcifiziert bei 50 °C für 48 h in einer ungepuffertes Urea/ CaCl_2 -Lösung.....	51
Abbildung 4.14 REM-Aufnahmen des Querschnitts von zwei PHEA-I-TEG Netzwerken mit jeweils 3 Gew%. TEG und 0,5 Gew% Urease calcifiziert für 48 h in einer ungepuffertes Urea/ CaCl_2 -Lösung bei (a) 50°C (b) 60°C. ¹⁹⁷	53
Abbildung 4.15 Spannungs-Dehnungs-Diagramm eines PHEA-I-TEG Netzwerks (3 Gew% TEG) mit 0,5 Gew% Urease calcifiziert in einer Urea/ CaCl_2 -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C für 24 h. ¹⁹⁷	54
Abbildung 4.16 (a) E-Moduln von PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG) mit 1 Gew% immobilisierter Urease und den zusätzlichen Monomeren 2-(Methacryloyloxyethyl)trimethylammoniumchlorid (QuAAc) sowie Acrylsäure calcifiziert in nicht gepuffertes und TRIS-gepuffertes wässrige Urea/ CaCl_2 -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50 °C für 24 h. (b-d) E-Moduln der calcifizierten PHEA-I-TEG Netzwerke aus (a) verglichen mit den Messungen der E-Moduln nach der Post-Polymerisation. Proben deren E-Modul aufgrund ihrer Sprödigkeit nicht bestimmt werden konnte wurden mit „spröde“ markiert. ²⁰³	56
Abbildung 4.17 Die REM- Aufnahmen zeigen die Querschnitte von PHEA-I-TEG Netzwerken (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit (a) 1 Gew% Acrylsäure und (b) 1 Gew% QuAAc. Probe (c) zeigt ein calcifiziertes PHEA-I-TEG Netzwerk mit 1 Gew% Acrylsäure, bei dem in einem nachfolgenden Schritt die bei der Mineralisierung entstandenen Hohlräume mit dem Matrix-Polymer durch Post-Polymerisation (PP) aufgefüllt wurden. Alle Proben wurden in einer bei pH 7,5 TRIS-gepuffertes, wässrige Urea/ CaCl_2 -Lösung für 24 h bei 50 °C calcifiziert. Die kleineren Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Bilder darüber. ²⁰³	58
Abbildung 4.18 REM-Aufnahmen der Querschnitte calcifizierter PHEA-I-TEG Netzwerke (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit 1 Gew% Acrylsäure, bei denen in einem nachfolgenden Schritt die bei der Mineralisierung entstandenen Hohlräume mit dem Matrix-Polymer durch Post-Polymerisation (PP) aufgefüllt wurden. Die Proben wurden in einer TRIS-gepuffertes, wässrige Urea/ CaCl_2 - Lösung eingestellt auf (a) pH 9,3 oder (b) pH 7,5 für 24 h bei 50 °C calcifiziert. Die kleineren Bilder zeigen einen vergrößerten Ausschnitt der Bilder daneben. ²⁰³	60
Abbildung 4.19 (a - c) E-Moduln der PDMA-I-TEG Netzwerke (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) mit oder ohne ionische Monomere, calcifiziert in nicht gepuffertes oder TRIS-gepuffertes (pH 7,5 und 9,3) wässrige Urea/ CaCl_2 -Lösung bei 50°C für 24 h verglichen mit dem zugehörigen kompaktierten Komposit nach der Post-Polymerisation (PP). Die horizontal rote Linie markiert den E-Modul der uncalcifizierten PDMA-I-TEG Matrix. (d) REM-Aufnahmen des Querschnitts des bei pH 9,3 calcifizierten PDMA-I-TEG Netzwerks mit 1 Gew% QuAAc. Das kleine Bild zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Hauptbildes. Proben deren E-Modul aufgrund ihrer Sprödigkeit nicht bestimmt werden konnte wurden mit „spröde“ markiert. ²⁰³	61
Abbildung 4.20 Mikroskop-Aufnahmen der Polyacrylamid-I-Methylen-bis-Acrylamid / Alginate (PAAm-I-MBAm/Alg) Netzwerke calcifiziert in 0,1 M TRIS gepuffertes Urea/ CaCl_2 -Lösung eingestellt auf (a, b, c) pH 7,5 und (d, e) pH 9,3 für 24 h bei 50°C. Die Stereomikroskop-Bilder (a) und (d) zeigen die Draufsicht auf die Komposite, während (b) und (e)	

Querschnitte der Filme darstellen. Bild (c) zeigt die REM-Aufnahme eines würfelförmigen Kristalls aus Bild (b) im Querschnitt	64
Abbildung 4.21 Schema der Calcifizierung unter Dehnung im Vergleich zum nicht gedehnten Film. Die REM-Aufnahmen zeigen zwei semiinterpenetrierende PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerke, die mit 1600% Dehnung und im entspannten Zustand für 24 h in einer Urea/CaCl ₂ -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C calcifiziert wurden.....	65
Abbildung 4.22 REM-Aufnahmen der PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerke calcifiziert in 0,1 M TRIS gepufferter Urea/CaCl ₂ -Lösung eingestellt auf pH 7,5 für 24 h bei 50°C mit unterschiedlicher fixierter Dehnung des Hydrogels.....	65
Abbildung 4.23 REM-Aufnahmen der Bruchfläche eines semiinterpenetrierendes PAAm-I-MBAm/Alg Netzwerks, das mit 1600% Dehnung und im entspannten Zustand für 24 h in einer 0,1 M TRIS-gepufferten (pH 7,5) Urea/CaCl ₂ -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C calcifiziert wurde in verschiedenen Vergrößerungen.....	66
Abbildung 4.24 REM-Aufnahmen der Querschnitte von (a) ungedehnten und (b) 400% gedehnten PAAm-I-MBAm Netzwerken calcifiziert für 24 h in einer 0,1 M TRIS-gepufferten (pH 7,5) Urea/CaCl ₂ -Lösung (0,17 M/0,27 M) bei 50°C.	67
Abbildung 4.25 Vergleich der maximalen Dehnung (Dehnrates 5 mm/s) in Abhängigkeit des Wassergehalts nach der Herstellung der reinen PAAm-I-MBAm Hydrogele sowie der wassergequollenen, PAAm-I-MBAm basierten, semiinterpenetrierenden Netzwerke mit unterschiedlichen, nicht-vernetzten Polymeren.....	68
Abbildung 4.26 Reaktionsgleichung der durch alkalische Phosphatase (AP) katalysierten Hydrolyse von Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) zu Glycerin und Phosphat, wobei letzteres zusammen mit Ca ²⁺ ausfällt.....	71
Abbildung 4.27 Verschieden konzentrierte, wässrige Calcium-2-Glycerolphosphat (CaGP) - Lösungen in einem 0,2 M Triethanolamin (TEA) - Puffer eingestellt auf pH 9,8 nach 7 d bei RT. Die Konzentration an CaGP in g/l ist unterhalb des jeweiligen Schnappdeckelglases angegeben.	72
Abbildung 4.28 Spezifische Aktivität der in unterschiedlichen Hydrogelen immobilisierten, alkalischen Phosphatase (AP) verglichen mit dem freien Enzym in Lösung. Die Messungen wurden mit einer wässrigen 0,125 M p-Nitrophenylphosphat-Lösung in 0,2 M Triethanolamin-Puffer (eingestellt auf pH 9,8) durchgeführt und die Änderung der Extinktion bei 405 nm über die Zeit mittels UV-Vis-Spektroskopie untersucht. ²²⁸	73
Abbildung 4.29 Spezifische Aktivität der freien alkalischen Phosphatase (AP) sowie der in einem PDMA-I-TEG Netzwerk immobilisierten AP (0,4 Gew%) bei Raumtemperatur (RT, 25°C) und 37°C. Die Messungen wurden in einer wässrigen 0,125 M p-Nitrophenylphosphat-Lösung in 0,2 M Triethanolamin-Puffer (eingestellt auf pH 9,8) durchgeführt und die Änderung der Extinktion bei 405 nm über die Zeit mittels UV-Vis-Spektroskopie untersucht. ²²⁸	74
Abbildung 4.30 (a) Schematische Darstellung des Calcifizierungs-Prozesses von mit alkalischer Phosphatase beladenen Netzwerken in einer Calcium-2-Glycerolphosphat-Lösung. ²²⁸	75
Abbildung 4.31 - PDMA-I-TEG Netzwerk beladen mit 0,4 Gew% AP, eingelegt in eine CaGP-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (0,2 M) eingestellt auf einen pH-Wert von 9,8 bei RT: (a) Stereomikroskop-Aufnahmen des Films in der Draufsicht und des Querschnittes des Netzwerks im gequollenen Zustand nach verschiedenen Zeiten in der Calcifizierungslösung. (b) REM-Aufnahmen des Querschnitts der für unterschiedliche Zeiten calcifizierten Proben im getrockneten Zustand. (c) Änderung der Transmission bei 700 nm über die Zeit durch die Eintrübung der Filme während der Calcifizierung. ²²⁸	76
Abbildung 4.32 Die Bilder zeigen je eine 100 ml Schraubdeckelflasche, die mit einer Calcium-2-glycerolphosphat-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (0,2 M) eingestellt auf einen pH-Wert von 9,8. In jede Lösung wurde 24 h zuvor ein PDMA-I-TEG Netzwerk mit unterschiedlichem Vernetzergehalt (TEG: 1, 3, 5, 7, 10 Gew%) und 0,4 Gew% AP gegeben. Zu den in der unteren Reihe abgebildeten Filmen wurde bei der Herstellung noch Polyglutaraldehyd-Lösung zugegeben. ²²⁸	77
Abbildung 4.33 Änderung des anorganischen Gewichtanteils während der Calcifizierung von PHEA-I-TEG (rot), PDMA-I-TEG (blau) und PAAm-I-MBAm Netzwerken (grün) mit jeweils 0,4 Gew% immobilisierter AP in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT. Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs. ²²⁸	78
Abbildung 4.34 Änderung des anorganischen Gewichtanteils während der Calcifizierung bei RT (blau) und 37°C (rot) von mit 0,4 Gew% AP beladenen PDMA-I-TEG Netzwerken, calcifiziert in einer CaGP-Lösung (6 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). Die Linien dienen der besseren Erkennbarkeit des Kurvenverlaufs. ²²⁸	79

- Abbildung 4.35 | Die Stereomikroskop-Aufnahmen zeigen jeweils die Draufsicht und den Querschnitt der (a) PHEA-I-TEG, (b) PDMA-I-TEG und (c) PAAm-I-MBAm Netzwerke mit 0,4 Gew% AP nach 7 d Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) sowie die zugehörigen CaP-Gewichtsanteile 79
- Abbildung 4.36 | PHEA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen. (c) Der TEM-EDX-Line-Scan des Querschnitts illustriert die relative Elementverteilung (Bereich der EDX-Messung in (d) angedeutet durch die grüne Linie). (d) TEM-Bild eines Dünnschnittes des Kompositquerschnitts (80 nm Dicke) sowie die zugehörigen TED-Aufnahme.²²⁸ 80
- Abbildung 4.37 | PAAm-I-MBAm Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen und zusätzlich die zugehörige Elektronenbeugungs-Aufnahme (TED) eines Dünnschnittes (80 nm Dicke) . (c) TEM-EDX-Aufnahme des Komposits aufgenommen auf einem Kupfergitter.²²⁸.... 81
- Abbildung 4.38 | PDMA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7d: (a) und (b) zeigen REM-Aufnahmen des Netzwerkquerschnitts in verschiedenen Vergrößerungen. (c) TEM-EDX-Line-Scan des Querschnitts illustriert die relative Elementverteilung (Bereich der EDX-Messung in (d) angedeutet durch die grüne Linie). (d) TEM-Bild eines Dünnschnittes des Kompositquerschnitts (80 nm Dicke) sowie die zugehörigen TED-Aufnahme.²²⁸ 82
- Abbildung 4.39 | REM-Aufnahmen der Querschnitte von PDMA-I-TEG Netzwerken mit (a) 1 Gew% und (b) 10 Gew% Vernetzer (TEG) und 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7 d bei RT. Die Diagramme (c) und (d) zeigen die Ergebnisse der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) eines 7 d calcifizierten PDMA-I-TEG Netzwerks. Dabei ist die Intensität der gestreuten Röntgenstrahlung in (c) bzw. dessen Logarithmus in (d) des nassen (blau) bzw. des getrockneten Komposits (rot) über den zugehörigen Streuvektor (q) aufgetragen.²²⁸..... 83
- Abbildung 4.40 | TEM-Aufnahmen von Mikrotom-Dünnschnitten der (a) PHEA-I-TEG (70 nm Dicke), (b) PDMA-I-TEG (70 nm Dicke) und (c) PAAm-I-MBAm (110 nm Dicke) Filme mit 0,4 Gew% immobilisierter AP nach dem Anfärben mittels Silbernitrat-Staining. Die darunterliegenden REM-Aufnahmen (d-f) zeigen die Querschnitte der mineralisierten (d) PHEA-I-TEG, (e) PDMA-I-TEG und (f) PAAm-I-MBAm Hydrogele nach der Calcifizierung in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) für 7d bei RT.²²⁸..... 85
- Abbildung 4.41 | Die Bilder zeigen die wasserquellenen PDMA-I-TEG Netzwerke (1 Gew% TEG) mit (a) 1 (b) 2, (c) 5, (d) 7 und (e) 10 Gew% EDPOA nach der Calcifizierung für 7 d bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) mit den zugehörigen REM-Aufnahmen des Querschnitts und TED-Aufnahmen. Des Weiteren ist zu jeder Probe der Mineralisierungsgrad (i) sowie die Transmission bei 700 nm (t) angegeben.²²⁸..... 86
- Abbildung 4.42 | (a, b) REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen eines PDMA-I-TEG Netzwerk mit 0,4 Gew% immobilisierter AP calcifiziert für 7 d bei RT in einer Glucose-6-Phosphat- (13 g/l) und CaCl₂-Lösung (5,55 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8).²²⁸ 87
- Abbildung 4.43 | Auftragung der Quellgrade der calcifizierten PAAm-I-MBAm und PDMA-I-TEG Netzwerke sowie letzteres mit verschiedenen Mengen an EDPOA über (a) ihrem anorganischen Gewichtsanteil im getrockneten Zustand und (b) dem Volumenanteil im gequollenen Zustand. Die Netzwerke mit 0,4 Gew% AP wurden 1 bis 7 Tage in einer CaGP – Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert.²²⁸..... 90
- Abbildung 4.44 | (a) E-Moduln (blau gestreift) und Bruchenergien (rot) mit den zugehörigen (b) Spannungs-Dehnungs-Kurven der calcifizierten PHEA-I-TEG, PDMA-I-TEG und PAAm-I-MBAm Netzwerke mit den höchsten kombinierten Werten für E-Modul und Bruchenergie. Die Filme wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert.²²⁸ 91
- Abbildung 4.45 | (a) zeigt die Entwicklung der E-Moduln der PAAm-I-MBAm Komposite (blau gestreifte Balken) sowie die Bruchdehnungen der eingeschnittenen Proben (rote Linie) nach unterschiedlich langer Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). In Grafik (b) werden die Bruchenergien (rote Balken) der PAAm-I-MBAm Komposite mit ihren CaP-Anteilen (Kästen) im getrockneten (Gew%) und im gequollenen Zustand (Vol%) angegeben.²²⁸ 92
- Abbildung 4.46 | Die REM-Bilder zeigen die Querschnitte unterschiedlicher, calcifizierter Hydrogele in getrocknetem und post-polymerisiertem Zustand: (a) PDMA-I-TEG (7d mineralisiert), (b) PAAm-I-MBAm (3d mineralisiert) und (c) PDMA-

I-TEG (1 d mineralisiert). Die Calcifizierung fand bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) statt. ²²⁸	94
Abbildung 4.47 Messungen des E-Moduls (blau) und des Quellgrades (orange, gestrichelt) während der Trocknung bei RT eines für 3 d in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifizierten PAAm-I-MBAm Hydrogels. ²²⁸	95
Abbildung 4.48 Diagramm (a) zeigt die Bruchenergien (rote Balken) der PDMA-I-TEG Hybridmaterialien mit einem E-Modul zwischen 50 und 100 MPa und unterschiedlichen Mengen EDPOA in der Matrix (Calcifizierungszeiten: 4 Tage – 0 und 7 Gew% EDPOA, 3 Tage – 1, 2 und 5 Gew% EDPOA, 7 Tage – 10 Gew% EDPOA). In (b) sind die E-Moduln der PDMA-I-TEG Komposite mit maximalem CaP-Gehalt nach 7 d Calcifizierung bei RT in einer CaGP-Lösung (11 g/l) mit 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) abgebildet. ²²⁸	96
Abbildung 4.49 (a, b) Bilder gequollener PDMA-I-TEG Netzwerke (1 Gew% TEG) mit 10 Gew% EDPOA nach 7 d bei RT (a) in Wasser und (b) in einer CaGP-Lösung (11 g/l) mit 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8). (c, d) Bilder eines 7 d calcifizierten, gequollenen PDMA-I-TEG Films (1 Gew% TEG) mit 2 Gew% EDPOA, der in einer runden Form calcifiziert wurde, belastet mit (c) 2 g und (d) 100 g. ²²⁸	97
Abbildung 4.50 Spannungs-Dehnungs-Kurven gequollener PDMA-I-TEG Netzwerke mit 1 Gew%, 10 Gew% und ohne EDPOA als Additiv. Die Netzwerke wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT calcifiziert. ²²⁸	98
Abbildung 4.51 Die gemessenen E-Moduln der für 1 bis 7 d calcifizierten PDMA-I-TEG Hydrogele mit unterschiedlichen Mengen EDPOA (in Gew%) sind gegen ihre jeweiligen CaP-Gehalte im (a, b) getrockneten (Gew%) und im (c, d) gequollenen Zustand (Vol%) aufgetragen. Die Komposite wurden in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) bei RT mineralisiert. ²²⁸	99
Abbildung 4.52 (a) Bild eines getrockneten PDMA-I-TEG Netzwerks (1 Gew% TEG) nach 24 h in einer CaGP-Lösung (11 g/l) in 0,2 M TEA-Puffer (pH 9,8) und (b) derselbe Film post-polymerisiert in der Monomermischung des Netzwerks. ..	101
Abbildung 4.53 Schematische Darstellung der elektrostatischen Stabilisierung von Natriumsilikaten in wässriger Lösung bei hohen pH-Werten sowie Destabilisierung und Kondensation durch Verringerung des pH-Wertes.	103
Abbildung 4.54 REM-Aufnahmen des ausgefällten Feststoffs nach Zugabe von Lysozym in eine 10 mM Silikat-Lösung.	104
Abbildung 4.55 Bilder von 3 Silikat/Glycerol-6-Phosphat-Lösungen (10 mM / 40 mM) kurz nach der Zugabe von nur Lysozym (links), Lysozym und alkalischer Phosphatase (Mitte) sowie nur alkalischer Phosphatase (rechts).	106
Abbildung 4.56 (a) Foto eines PHEA-I-TEG Netzwerks (1 Gew% TEG) beladen mit 1 Gew% Lysozym in einer 50 mM Natriumsilikat-Lösung (pH 7) nach 24 h. (b) REM-Aufnahme des Querschnitts des getrockneten Films, der in flüssigen Stickstoff gebrochen wurde mit dem zugehörigen (c) Silizium-EDX-Linescan. Die grüne Linie in (b) zeigt den mittels EDX vermessenen Bereich an.	107
Abbildung 4.57 Die Bilder zeigen ein PDMA-I-TEG Netzwerk mit 25 Gew% QuAAc (ohne Lysozym) nach Lagerung in einer 50 mM Natriumsilikat-Lösung (pH 7) bei RT für 24 h. Die mikroskopischen Aufnahmen (a) und (b) zeigen den gequollenen Film in der Draufsicht und im Querschnitt. Die REM-Aufnahmen (c) zeigen den Querschnitt des getrockneten Films nach Brechen in flüssigem Stickstoff bei verschiedenen Vergrößerungen.	109
Abbildung 4.58 Die Stereomikroskop-Bilder zeigen (a) die Draufsicht und (b) den Querschnitt eines mit 5 Gew% Kieselsäure vorbeladenen, PDMA-I-TEG Netzwerks mit 25 Gew% QuAAc, eingelegt in eine 50 mM Silikat-Lösung mit pH 7 bei RT nach 24 h. Die REM-Aufnahmen (c) und (d) stellen den Querschnitt des getrockneten Filmes in verschiedenen Vergrößerungen dar.	110
Abbildung 4.59 Chemische Struktur von 3-Trimethoxysilylpropyldimethyloctadecylammoniumchlorid (DOW 5700) mit der Funktion der Molekülteile sowie die schematische Anlagerung der Moleküle auf Glas- und Silikonoberflächen.	111
Abbildung 4.60 Konzept der Wirkungsweise von DOW 5700 funktionalisierten SiO ₂ -Nanopartikeln auf einer Silikonoberfläche. Die Partikelbeschichtung zeigt eine kontaktaktiv-antimikrobielle Wirkung, auf der Oberfläche abgewandten und eine Haftwirkung auf der zugewandten Seite.	112
Abbildung 4.61 Schematische Darstellung der sich durch Hydrolyse und Kondensation von TEOS bildenden SiO ₂ -Strukturen in Abhängigkeit des pH-Werts. Nach BRINKER ²⁴⁷	114

Abbildung 4.62 (a) Hydrolyse- und (b) Kondensationsreaktion von Alkoxysilanen am Beispiel von Tetraethoxysilan (TEOS). Nach SEPEUR ²⁶⁰	114
Abbildung 4.63 REM-Aufnahmen der durch Stöbersynthese hergestellten, monodispersen SiO ₂ -Partikel mit (a) 450 nm, (b) 300 nm und (c) 100 nm Durchmesser.....	115
Abbildung 4.64 Schematische Darstellung der Funktionalisierung von SiO ₂ -Partikeloberfläche mit DOW 5700.....	117
Abbildung 4.65 DOW 5700 modifizierte Partikel, hergestellt in Ethanol bei 42°C, mit einem Durchmesser von ca. 100 nm dispergiert in verschiedenen Lösungsmitteln (Partikelkonzentration 10 mg/ml). Lösungsmittel von links nach rechts: Aceton, Chloroform, Diethylether, Dichlormethan, Ethanol, Ethylacetat, Isopropanol, Methanol, Tetrahydrofuran, Toluol. ²⁵⁶	118
Abbildung 4.66 Größenverteilung (aus DLS-Messung) der DOW 5700 modifizierten Nanopartikel mit 100 nm Durchmessern in Chloroform (Partikelkonzentration 10 g/l) nach Zentrifugation der Mischung.....	119
Abbildung 4.67 Mittels Stöber-Synthese hergestellte SiO ₂ -Nanopartikel mit einem Durchmesser von etwa 100 nm dispergiert in Chloroform (Partikelkonzentration 10 mg/ml). ²⁵⁶	119
Abbildung 4.68 Foto eines 250 ml Scheidetrichters mit einer 1:1 Mischung aus Wasser, Chloroform und DOW 5700 modifizierten SiO ₂ -Nanopartikeln (100 nm, hergestellt in Ethanol bei 50°C) 1 min nach dem Schütteln. Die REM-Aufnahmen zeigen die Rückstände in den beiden Phasen nach Entfernungen des jeweiligen Lösungsmittels. ²⁵⁶	120
Abbildung 4.69 TEM-Bilder der (a) unmodifizierten und (b) DOW 5700 modifizierten SiO ₂ -Nanopartikel (100 nm) sowie die zugehörigen REM-EDX-Spektren (c) der beiden Proben.	122
Abbildung 4.70 (a) Die Bilder zeigen Partikelschichten von mit DOW 5700 modifizierten SiO ₂ -Nanopartikeln (100 nm). Diese wurden aus Suspensionen der Partikel im jeweils angegebenen Lösungsmittel (10 mg/ml) durch Drop-Coating von jeweils 50 µl auf einen mit Silikon beschichteten Objektträger aufgetragen. (b) REM-Aufnahmen der Beschichtungen aus (a). Lösungsmittel erste Reihe von links nach rechts: Aceton, Chloroform, Dichlormethan (DCM) Diethylether, Ethylacetat; zweite Reihe: Ethanol (EtOH), Isopropanol, Methanol (MeOH), Tetrahydrofuran (THF), Toluol. ²⁵⁶	123
Abbildung 4.71 Die Bilder zeigen einen im vorderen Bereich mit Silikon beschichteten Objektträger, auf den aus einer Aceton-Suspension mit DOW 5700 modifizierte SiO ₂ -Nanopartikel (ca. 300 nm) per Drop-Coating aufgetragen und getrocknet wurden. (a) Es wird ein Wassertropfen auf die Partikelschicht gesetzt. (b) Der Objektträger wird langsam gekippt und der Wassertropfen beginnt bei ca. 5° sich in Bewegung zu setzen. (c) Der Wassertropfen kommt, sobald er sich nicht mehr auf der Partikelschicht befindet, zum Stehen.	124
Abbildung 4.72 REM-Aufnahmen des Querschnitts einer mit modifizierten Nanopartikeln beschichteten Silikonschicht auf einem Glas-Objektträger. Die DOW 5700 funktionalisierten Partikel wurden aus einer Dispersion (10 mg/ml) in Aceton per Drop-Coating aufgetragen. ²⁵⁶	125
Abbildung 4.73 Aufnahmen von mit DOW 5700 modifizierten SiO ₂ -Partikelschichten (100 nm Partikeldurchmesser), aufgetragen aus verschiedenen Lösungsmitteln, auf einem mit silikonbeschichteten Glasobjektträger nach Besprühen der Oberfläche mit einer Staphylococcus aureus Suspension, die 10 ⁶ Zellen pro ml enthält. Die Objektträger wurden nach dem Aufsprühen der Bakterien in einer Petrischale mit Nähragar überschichtet, für 16 h bei 37°C inkubiert und angefärbt. ²⁵⁶	126
Abbildung 4.74 REM-Aufnahmen von Partikelschichten (Draufsicht) aus Mischungen von DOW 5700 modifizierten SiO ₂ -Nanopartikeln mit 450 nm und 100 nm Durchmesser im Verhältnis (a) 1:1 (b, c) 1:4 aufgetragen aus (a, b) Chloroform und (c) Methanol auf einen mit Silikon beschichteten Objektträger. Die Partikelkonzentration betrug immer insgesamt 10 mg/ml.....	127
Abbildung 5.1 REM-Aufnahmen der durch Urease-induzierte Calcifizierung hergestellten CaCO ₃ -Strukturen im Innern der Polymernetzwerke: (a, b) HEA-basiertes Netzwerk (a) mit 1 Gew% Urease und Calcifizierung bei Raumtemperatur (RT) sowie (b) mit 0,5 Gew% Urease calcifiziert bei 60°C. (c) Semiinterpenetrierendes Netzwerk auf Basis von Acrylamid und Alginat mit 1 Gew% Urease calcifiziert bei 60°C. Die Mineralisierung fand jeweils in einer (a, b) nicht gepufferten bzw. (c) bei pH 7,5 Tris(hydroxymethyl)aminomethan gepufferten Harnstoff/CaCl ₂ -Lösung statt.	130
Abbildung 5.2 Bilder eines wassergequollenen, DMA-basierten Netzwerks mit 7 Gew% EDPOA sowie 0,4 Gew% immobilisierter, alkalischer Phosphatase nach 5 min (links) und nach 7 d (rechts) Calcifizierung in einer Calcium-2-Glycerolphosphat-Lösung (11 g/l) in Triethanolamin-Puffer (pH 9,8) bei Raumtemperatur (RT).	131

Abbildung 5.3 Schema der Auftragung von DOW 5700 und mit DOW 5700 modifizierten Siliziumdioxid-Nanopartikeln auf Glas- und Silikonoberflächen (obere Reihe), sowie die daraus resultierenden Wasserkontaktwinkel (mittlere Reihe) und antimikrobiellen Wirksamkeiten gegen Staphylococcus aureus (untere Reihe)	133
Abbildung 6.1 Schematischer Ablauf der Herstellung eines Enzym-induziert mineralisierbaren Polymernetzwerks ...	142
Abbildung 6.2 Schematischer Ablauf der Mineralisierung eines Polymer-Netzwerkes.....	145
Abbildung 6.3 Kunststoffvorrichtung zum Fixieren der Dehnung eines Polymer-Hydrogels während der Calcifizierung.	146
Abbildung 6.4 Ausschnitte aus den ATR-FTIR-Spektren von zwei PHEA-I-TEG Netzwerken einmal mit hohem Aragonit- (rot) und einmal mit hohem Calcit-Anteil (schwarz) im Komposit.....	149
Abbildung 6.5 TGA-Beispielmessung: Gewichtsverlust eines mit CaCO ₃ mineralisierten PHEA-I-TEG Films (3 Gew% TEG, 1 Gew% Urease) bei kontinuierlicher Erhitzung (10 K/min) bis 600°C.....	152
Abbildung 6.6 Aufbau der für die Bestimmung der Membranpermeanz verwendeten Diffusionskammer.	153
Abbildung 6.7 Schema der Herstellung und Modifizierung von SiO ₂ Nanopartikeln mit DOW 5700	154

8.3 Lebenslauf

Daten zur Person:

Name: Jan Nicolas Rauner
Geburtsdatum-/Ort: 02.10.1984 in Wuppertal
Nationalität: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung:

1991 – 1995 Grundschule Echoer Straße, Wuppertal
1995 – 2004 Gymnasium an der Siegesstraße, Wuppertal
01.06.2004 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

10.2005 – 03.2009 Studium der „Bio- und Nanotechnologie“ an der FH SWF in Iserlohn
03.2009 Abschluss: Dipl.-Ing. (FH), Schwerpunkt: Oberflächentechnik
Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helmut Fobbe
Titel: „Untersuchungen zur Schwarzfärbung von KTL-Lacken auf Siliziumbasis“
10.2009 – 12.2011 Masterstudiengang „Polymerwissenschaften“
12.2011 Abschluss: M.Sc. der Polymerwissenschaften
Masterarbeit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg C. Tiller
Titel: „Synthese und Charakterisierung von amphiphilen Stern-Block-Copolymeren“

Promotion:

02.2012 – 01.2017 Bei Prof. Dr. J. C. Tiller am Lehrstuhl für Biomaterialien und Polymerwissenschaften an der Fakultät für Bio- und Chemieingenieurwesen der TU Dortmund
Titel: „Funktionale anorganisch/organische Hybridmaterialien für ultrasteife Hydrogele und antimikrobielle Lotusoberflächen“