

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemie

**Interkalation der Enzyme Papain und Cellulase sowie von
Graphenoxid in Hydrotalcit- und Hydrocalumit-artige
Schichtstrukturen (LDHs)**

Nan Zou

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Johann P. Plank

2. apl. Univ.-Prof. Dr. Lerf Anton (i. R.)

Die Dissertation wurde am 24.06.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 04.08.2014 angenommen.

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum November 2010 bis Mai 2014 am Lehrstuhl für Bauchemie der Technischen Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. J. Plank angefertigt.

Für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die interessante Themenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen gilt mein besonderer Dank

Prof. Dr. Johann Plank

Frau Dr. Oksana Storcheva danke ich sehr herzlich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und die angenehmen Unterhaltungen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dagmar Lettrich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der TG-MS-Messungen.

Frau Ulrike Amari und ihren Mitarbeiterinnen am Mikroanalytischen Labor danke ich für die Durchführung zahlreicher Elementaranalysen.

Dr. Marianne Hanzlik danke ich herzlich für die Durchführung der TEM-Untersuchungen und die wissenschaftlichen Diskussionen.

Meinen ehemaligen Kollegen Dipl.-Chem. Friedrich v. Hoessle, Dr. Mirko Gruber, Dr. Markus Gretz, Frau Dr. Hang Bian, Frau Dr. Bin Yu, Frau Dr. Elina Dubina, Frau Dr. Geok Bee Serina Ng, Dr. Christof Schröfl und Dr. Tobias Kornprobst sowie Herrn Richard Beiderbeck danke ich für die freundschaftliche Unterstützung zu Beginn und während meiner Promotion.

Mein Dank gilt weiterhin den folgenden Mitgliedern des Lehrstuhls:

Dr. Ahmad Habbaba, Frau Dr. Mei Zhang-Preße, Dipl.-Chem. Thomas Pavlitschek, Dipl.-Chem. Johanna de Reese, M.Sc. Alex Lange, M.Sc. Lei Lei, M.Sc. Julia Pickelmann, M.Sc. Vipasri Kanchanason, M.Sc. Markus Schönlein, M.Sc. Constantin Tiemeyer, M.Sc. Huiqun Li, M.Sc. Thomas Hurnaus, M.Sc. Timon Echt, M.Sc. Markus Meier, M.Sc. Stefan Baueregger, M.Sc. Somruedee Klaithong und Frau Dr. Teresa Piqué für die Hilfsbereitschaft und das hervorragende Arbeitsklima.

Meinem Mann danke ich herzlich für sein Verständnis, seine Unterstützung und seine Geduld. Bedanken will ich mich besonders bei meiner Familie, meiner Großmutter Frau Xian, meinen Onkeln Jingwei Han und Jingyan Han, meinen Schwiegereltern Yanqi Lu und Haihong Sun, sowie meinen Eltern Yongguang Zou und Fang Sun für die Ermöglichung meines Studiums, das Verständnis, die Geduld und jegliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zusammenfassung

Interkalationsverbindungen spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zum Einbau und Austausch einer Vielzahl von Anionen in die Zwischenschichten sowohl in biotechnologischen und pharmazeutischen als auch in elektronischen Anwendungen (z. B. als Biosensor) und als Speichermaterial eine große Rolle. In dieser Arbeit wurden der Einbau, die kristallchemischen und thermischen Eigenschaften von Interkalationsverbindungen der Enzyme Papain und Cellulase in Hydrotalcit-artige sowie von Graphenoxid in Hydrocalumit-artige Layered Double Hydroxides (LDHs) untersucht.

Für die Enzyme Papain bzw. Cellulase wurden Hydrotalcit-artige LDHs als Wirtsstrukturen gewählt, da Magnesium und Aluminium natürliche Bestandteile des menschlichen Körpers sind und keine Schwermetalle mit möglichen toxischen Auswirkungen darstellen. Die wasserlöslichen Enzyme Papain bzw. Cellulase sind im Alkalischen negativ geladen. Mittels Kopräzipitation von Magnesiumnitrat und Aluminiumnitrat bei pH = 9,0 bzw. 9,6 wurden die negativ geladenen Enzyme als Gastanionen in die Zwischenschichten von Mg₂Al-LDH eingelagert. Bei der Mg₂Al-Papain-LDH-Interkalationsverbindung beträgt der Schichtabstand 5,3 nm, und beim Mg₂Al-Cellulase-LDH 5,0 nm. Elementaranalysen zeigen, dass die Interkalationsverbindungen einen hohen Gehalt an Papain (27,3 Gew. %) bzw. Cellulase (37,3 Gew. %) aufweisen. Der Einbau in die LDH-Strukturen verbessert die thermische Stabilität der Enzyme deutlich. Mittels Anionenaustausch mit Sulfat können die Enzyme aus der Interkalationsverbindung freigesetzt werden. Anhand von dynamischer Lichtstreuung (DLS) und von Enzym-Aktivitätsmessungen wurde festgestellt, dass die Enzyme als Folge der Interkalation nicht denaturiert oder abgebaut werden. Nach Deinterkalation aus der LDH-Gerüststruktur zeigen die freigesetzten Enzyme ihre ursprüngliche hydrodynamische Größe und Enzym-Aktivität.

Das Mineral Hydrocalumit bildet sich während der Hydratation von Portlandzement. Es wurde gefunden, dass dieses Mineral eine geeignete Wirtsstruktur für den Einbau von Graphenoxid darstellt. Für die Synthese wurden zunächst einzelne Folien von Graphenoxid (GO) durch Oxidation von Graphit (*Hummers'sches* Verfahren) hergestellt. Die erfolgreiche Synthese der Interkalationsverbindung GO-LDH hängt entscheidend von der Fragmentierung des Graphits in wesentlich kleinere Bruchstücke und einzelne Folien während des Oxidationsprozesses ab. Durch Wasserstoffbrückenbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen Graphenoxid und den positiv geladenen $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ -Hauptschichten entstehen die Ca_2Al -Graphenoxid-LDH-Einlagerungsverbindungen. Darin sind einzelne Graphenoxid-Folien von zwei $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ -Hauptschichten gedeckelt, wobei der Schichtabstand 1,05 nm beträgt. Anionenaustausch-Experimente zeigten, dass das interkalierte Graphenoxid durch Sulfat-Anionen leicht aus den Zwischenschichten freigesetzt werden kann.

Die synthetisierten Interkalationsverbindungen wurden mittels Pulver-Röntgendiffraktometrie, Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) und Infrarot-Spektroskopie charakterisiert. Ihre chemische Zusammensetzung wurde anhand von Elementaranalyse, Thermogravimetrie und Massenspektroskopie bestimmt. Ca_2Al -GO-LDH zeigt einen hohen GO-Gehalt von 25,0 Gew. %. Mittels Elektronenmikroskopie (REM und TEM) wurden Morphologie und Schichtstruktur der Interkalationsverbindungen ermittelt.

Alle Synthesen erfolgten unter Stickstoffatmosphäre, um die Bildung der sehr stabilen Carbonat-LDH-Verbindung zu vermeiden. Vor den Synthesen wurde der optimale pH-Wert für die Bildung der Interkalate mittels Ladungsdichtemessungen ermittelt. Eine Alterung der anfänglich als nanoskopische Kolloidpartikel anfallenden Interkalate ergibt besser kristalline Produkte.

Summary

Due to the exchangeability of a large variety of anions in the interlayer region, intercalation compounds of the layered double hydroxide (LDH) type have registered great attention in the biotechnological and pharmaceutical industry as well as for electronic applications. In this work, intercalation of the enzymes papain and cellulase into layered double hydroxide (LDH) structures of the hydrotalcite type and of graphene oxide into the hydrocalumite-type LDH structures were studied.

For the synthesis of intercalates from papain and cellulase enzymes, the hydrotalcite-type LDH was chosen as the framework, because magnesium and aluminum present natural constituents of the human body and do not represent heavy metals or cause toxic effects.

The enzymes papain and cellulase are water soluble and exhibit a negative charge at high pH value. Upon co-precipitation with magnesium nitrate and aluminum nitrate in sodium hydroxide solution, the negatively charged enzymes are intercalated into the interlayer region of the Mg_2Al -LDH. For Mg_2Al -papain-LDH, an interlayer spacing of 5.3 nm and for Mg_2Al -cellulase-LDH, an interlayer spacing of 5.0 nm was found. The intercalation compounds exhibited a high organic content, namely 27.3 wt. % for Mg_2Al -papain-LDH and 37.3 wt. % for Mg_2Al -cellulase-LDH.

The inorganic framework improves the thermal stability of the enzymes. It was found that the enzymes can be exchanged rapidly and completely with sulfate via an anion exchange mechanism. When released, the enzymes are not denatured or decomposed as a result of intercalation. After deintercalation, the enzymes retained their initial hydrodynamic size and

enzymatic activity. Both enzyme intercalates contained minor amounts of $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3\text{-LDH}$ as by-product.

Hydrocalumite, $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+ \cdot (\text{OH}^-) \cdot n\text{H}_2\text{O}$ presents a mineral which is formed during the hydration of cement. It was found that hydrocalumite is a suitable host structure for the intercalation of graphene oxide nanosheets. First, single nanosheets of graphene oxide (GO) were prepared by strong oxidation of graphite. The successful synthesis of the GO intercalation compounds much depends on the effective fragmentation of the graphite during the oxidation process. In the resulting Ca_2Al -graphene oxide-LDH compound individual graphene oxide sheets are sandwiched by two $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ main sheets, with an interlayer spacing of 1.05 nm. Anion exchange experiments with sulfate demonstrated that the intercalated graphene oxide can be released easily from the host layer structure.

The intercalation compounds produced were characterized via powder X-ray diffraction, small angle X-ray scattering (SAXS) and infrared spectroscopy. The chemical composition of the products was assessed using elemental analysis, thermogravimetry and mass spectroscopy. According to elemental analysis, $\text{Ca}_2\text{Al-Go-LDH}$ contains 25.0 wt. % GO. From electron microscopy (SEM and TEM), the morphology and layered structure of the hybrids was determined. All syntheses were carried out under nitrogen atmosphere, in order to avoid the formation of the highly stable $\text{Mg}_2\text{Al-carbonate-LDH}$. The optimal pH value for the synthesis was determined via charge density measurements of the enzymes and of GO. Aging of the initially nanosized colloidal LDH products produced particles of higher crystallinity.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen in der Zementchemie

In dieser Arbeit wird die chemische Zusammensetzung der Mineralphasen nicht in der dem Chemiker vertrauten Formelsprache, sondern in Form einer Kurzschreibweise angegeben. Diese beruht auf Abkürzungen für die Oxide der Elemente und nicht auf den bekannten Elementensymbolen. Da diese Schreibweise seit Jahrzehnten in der relevanten Fachliteratur verwendet wird, ist sie im Folgenden erläutert. Sie wurde in der Arbeit nur soweit sinnvoll und unumgänglich verwendet.

Abkürzung	Chemische Formel	Bezeichnung
Mg ₂ Al-X-LDH	[Mg ₂ Al(OH) ₆] ⁺ · X ⁻ · n H ₂ O	Hydrotalcit-artige LDH
Ca ₂ Al-X-LDH	[Ca ₂ Al(OH) ₆] ⁺ · X ⁻ · n H ₂ O	Hydrocalumit-artige LDH

Abkürzung	Chemische Formel	Abkürzung	Chemische Formel
A	Al ₂ O ₃	M	MgO
C	CaO	N	NaO
F	Fe ₂ O ₃	S	SiO ₂
H	H ₂ O	\bar{S}	SO ₄

Abkürzung	Chemische Formel	Bezeichnung
C_3S	Ca_3SiO_5	Tricalciumsilikat, Alit
C_2S	Ca_2SiO_4	Dicalciumsilikat, Belit
C_3A	$Ca_3Al_2O_6$	Tricalciumaluminat (Aluminat)
C_4AF	$Ca_4Al_2Fe_2O_{10}$	Tetracalciumaluminatferrit (Ferrit)
CAH_{10}	$CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 10 H_2O$	Calciumaluminathydrat
C_2AH_8	$2 CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 8 H_2O$	Calciumaluminathydrat
C_3AH_6	$3 CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 6 H_2O$	Katoit
C_4AH_{13}	$4 CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 13 H_2O$	Calciumaluminathydrat
C_4AH_{19}	$4 CaO \cdot Al_2O_3 \cdot 19 H_2O$	Calciumaluminathydrat
$C_3A \cdot 3\overline{CS} \cdot H_{32}$	$[Ca_6Al_2(OH)_{12}](SO_4)_3 \cdot 26H_2O$	Trisulfat-Aluminat-Hydrat, Ettringit, AF_t
$C_3A \cdot 3\overline{CS} \cdot H_{12}$	$[Ca_4Al_2(OH)_{12}](SO_4) \cdot 6H_2O$	Monosulfat-Aluminat-Hydrat, AF_m

Allgemeine Abkürzungen

θ	Beugungswinkel
λ	Wellenlänge
a.u.	Arbitrary units (relative Einheiten)
D ₅₀	50 % aller Partikel haben einen kleineren, 50 % einen größeren Durchmesser als der D ₅₀ -Wert
c	Konzentration
d	Abstand der Netzebenen
DADMAC	Diallyldimethylammoniumchlorid
Da	Dalton
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DLS	dynamische Lichtstreuung
d-Wert	Netzebenenabstand
EA	Elementaranalyse
ESEM	Environmental scanning electron microscope (atmosphärisches Rasterelektronenmikroskop)
eq	Äquivalent
FG	Feststoffgehalt
FT	Fourier-Transformation
h	Stunde
I	Intensität
IR	Infrarot
L	Korrelationslänge
LDH	Layered double hydroxide (Mischmetallhydroxide)
M.-%	Massenprozent

m	Masse
M_w	Molekulargewicht (Gewichtsmittel)
M	Molarität
MALDI	Matrix-assisted laser desorption / ionization
MS	Massenspektrometrie
μ	Mikro
min	Minute
n	Nano
nm	Nanometer
NMR	Nuclear magnetic resonance (magnetische Kernresonanz)
PCD	Partikelladungsdetektor
REM	Rasterelektronenmikroskop
RT	Raumtemperatur
R_G	Gyrationsradius
R_{XC}	Radius des Querschnitts
SAXS	Small-angle X-ray scattering (Röntgenkleinwinkelstreuung)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TOF	Time - of - flight (mass spectrometer)
TG	Thermogravimetrie
UHV	Ultrahochvakuum
UV/VIS	Ultraviolet-visible
WAXS	Wide-angle X-ray scattering (Röntgenweitwinkelstreuung)
XRD	X-ray diffraction (Röntgendiffraktometrie)

Liste der Publikationen

Die Arbeit umfasst folgende Publikationen:

(1) Nan Zou, Johann Plank

„Intercalation of Papain Enzyme into Hydrotalcite Type Layered Double Hydroxide“

Journal of Physics and Chemistry of Solids, 73 (2012) 1127-1130.

(2) Johann Plank, Nan Zou, Zongbin Zhao, Imre Dekany

„Preparation and Properties of a Graphene Oxide Intercalation Compound Utilizing Hydrocalumite Layered Double Hydroxide as Host Structure“

Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, Article first published online: 19. Feb. 2014, DOI: 10.1002/zaac.201300584

Eingereichtes Manuskript:

(3) Nan Zou, Johann Plank

„Intercalation of Cellulase Enzyme into a Hydrotalcite Layer Structure“

eingereicht am 08. Mai 2014 beim Journal of Physics and Chemistry of Solids.

Konferenzbeiträge:

(4) Nan Zou, Johann Plank

„Intercalation of Papain Enzyme into Hydrotalcite Type Layered Double Hydroxide“

16th International Symposium on Intercalation compounds (ISIC16), Sec-Ústupy (Czech Republic), May 22 - 27, **2011**, Compilation of Abstracts p. 51.

(5) Nan Zou, Johann Plank, Friedrich v. Hoessle

„Intercalation of Sulfanilic Acid-Phenol-Formaldehyde Polycondensate into Hydrocalumite Type Layered Double Hydroxide“

16th International Symposium on Intercalation Compounds (ISIC16), Sec-Ústupy (Czech Republic), May 22 - 27, **2011**, Compilation of Abstracts p. 198.

(6) Johann Plank, Nan Zou, Zongbin Zhao

„Intercalation of Graphite Oxide into a Hydrocalumite type layered double hydroxide“

17th International Symposium on Intercalation Compounds (ISIC17), Sendai (Japan), May 12 - 16, **2013**, Compilation of Abstracts p. 53.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Aufgabenstellung	3
3	Theoretischer Hintergrund	5
3.1	Layered double hydroxides.....	5
3.2	Hydrotalcit-artige LDH.....	8
3.3	Hydrocalumit-artige LDH im Zement.....	9
3.4	Interkalation.....	11
3.5	Synthesemethoden.....	13
3.5.1	Anionenaustausch.....	13
3.5.2	Kopräzipitation.....	14
3.5.3	Rehydratation.....	15
3.6	Enzyme.....	16
3.6.1	Papain.....	17
3.6.2	Cellulase.....	18
3.7	Kohlenstoff -Nanomaterialien.....	22
3.7.1	Graphen.....	22
3.7.2	Graphenoxid.....	23
4	Analytische Methoden	25
4.1	Röntgenkleinwinkelstreuung.....	25
4.2	Pulver-Röntgendiffraktometrie.....	30
4.3	Thermogravimetrie und Massenspektroskopie.....	30
4.4	Elektronenmikroskopie.....	31
5	Experimenteller Teil	33
5.1	Allgemeine Arbeitstechniken.....	33
5.2	Synthese von C ₃ A.....	33

5.3	Synthese der Graphenoxid.....	33
5.4	Synthese von LDH mittels Rehydratation.....	34
5.5	Synthese von LDH mittels Kopräzipitation.....	35
5.6	Aktivitätsmessung von Papain.....	36
5.7	Aktivitätsmessung von Cellulase.....	36
5.8	Materialien und Chemikalien.....	37
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	39
7.1	Zusammenfassung.....	39
7.2	Ausblick.....	43
7	Literaturverzeichnis.....	44
8	Publikationen	
8.1	„Intercalation of Papain Enzyme into Hydrotalcite Type Layered Double Hydroxide“	
8.2	„Intercalation of Cellulase Enzyme into a Hydrotalcite Layer Structure“	
8.3	„Preparation and Properties of a Graphene Oxide Intercalation Compound Utilizing Hydrocalumite Layered Double Hydroxide as Host Structure“	

1 Einleitung

Seit Jahrtausenden sind Interkalationsverbindungen (abgeleitet von lat. *intercalare* = einbauen) bekannt und besitzen wegen ihren herausragenden Eigenschaften großen technischen Nutzen.

Als erstes Beispiel für den gezielten Einsatz solcher Einlagerungsverbindungen tauchte die Veredelung von Porzellan schon im antiken China auf [1]. Nach heutiger Kenntnis kann das zu dieser Zeit verwendete Verfahren auf eine Interkalation zurückgeführt werden. Hierbei wurde Harnstoff in die Zwischenschichten des Ausgangsstoffes Kaolinit interkaliert, wodurch die Trennung der einzelnen Kaolinit-Plättchen begünstigt wurde. Die so hergestellten Porzellane erreichen eine höhere Transparenz.

Im Jahre 1842 entdeckte der *Geologe Carl Hochstetter* das Mineral Hydrotalcit an einer Steatitprobe aus Snarum in Norwegen. Seitdem haben die Interkalationsverbindungen stark an Bedeutung gewonnen. Ab den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts spielten Interkalationsverbindungen im Bereich der Elektrochemie eine wichtige Rolle, und zwar für wieder aufladbare Batterien. Im Jahr 1977 wurde erstmals eine Interkalationsverbindung als Arzneimittel unter dem Markennamen Talcid[®] zur Bindung überschüssiger Magensäure produziert. Heute werden Einlagerungsverbindungen auch als Stabilisator für PVC, als Verdickungsmittel für kosmetische Produkte und als Speichermineral für Schadstoffe usw. eingesetzt.

Interkalationsverbindungen werden in drei verschiedene Arten unterteilt: Interkalate ohne Schichtladung, mit negativ geladenen Schichten oder mit positiv geladenen Schichten (**Abbildung 1**). In dieser Arbeit wurden nur die letztgenannte Gruppe untersucht, die auch als „Anionische Tone“ bzw. „Layered Double Hydroxides“ (LDHs) bezeichnet wird. Die Struktur dieser Interkalationsverbindungen leitet sich vom Mineral Brucit ab. Darin wird die positive Überschussladung der Hauptschicht durch Zwischenschichtanionen ausgeglichen [2].

Um unterschiedliche organische und anorganische Anionen in die Zwischenschicht der LDHs einzulagern, sind verschiedene Syntheserouten möglich. Kopräzipitation und Rehydratation stellen die gängigsten Synthesemethoden dar.

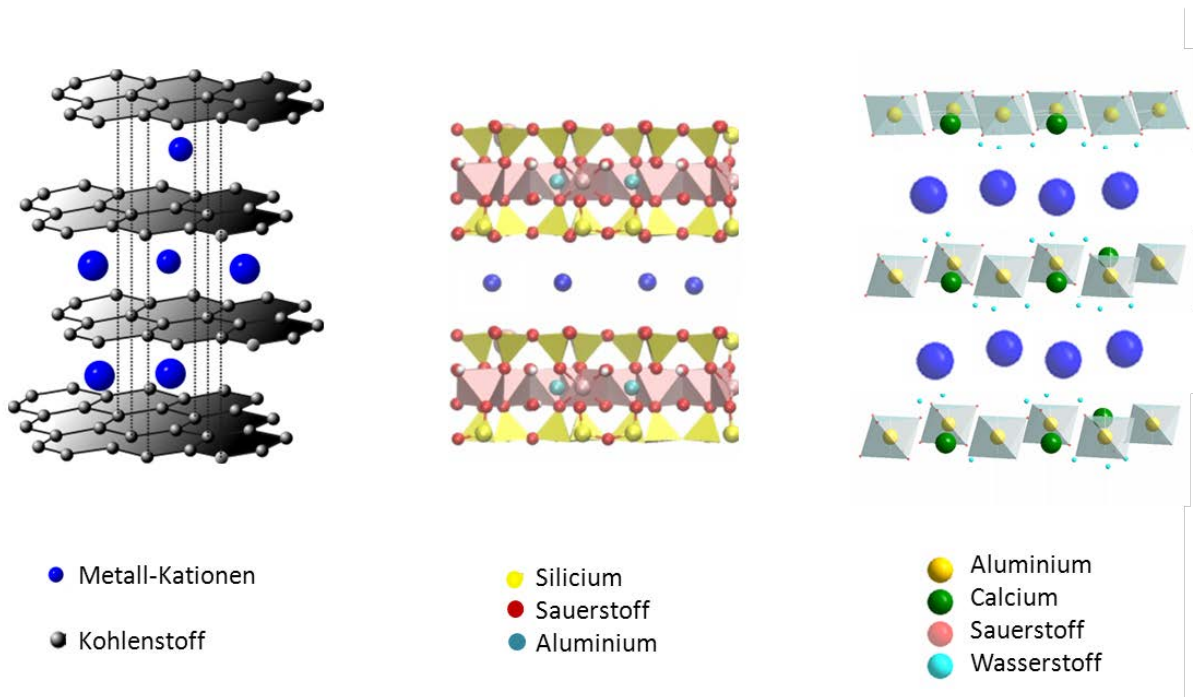


Abbildung 1: Die drei Arten von Interkalationsverbindungen: a) Interkalate ohne Schichtladung, z. B. Graphit-Interkalate (M z. B. Li); b) Interkalate mit negativ geladener Hauptschicht, z. B. Tonminerale (Montmorillonit); c) Interkalate mit positiv geladener Schicht, sog. Doppelschichthydroxide, z. B. Hydrotalcit [3, 4].

2 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Interkalationsfähigkeit von zwei hydrolytischen Enzymen (Papain und Cellulase) sowie von Graphenoxid in lamellare Magnesium-Aluminium- bzw. Calcium-Aluminium-LDH-Gerüststrukturen untersucht.

Die Arbeit besteht aus zwei Teilen. Im ersten Teil erfolgte die Synthese und Charakterisierung der Papain- bzw. Cellulase-Interkalationsverbindungen. Papain und Cellulase sind wasserlöslich und im Alkalischen negativ geladen. Mittels Kopräzipitation wurden die beiden Enzyme als Mg_2Al -Papain-LDH bzw. Mg_2Al -Cellulase-LDH ausgefällt. Struktur, chemische Zusammensetzung und thermische Stabilität der jeweiligen Verbindungen waren mittels kristallchemischer Untersuchungen zu bestimmen.

Mittels Anionenaustausch mit Sulfat wurde versucht, die Enzyme aus den jeweiligen LDH-Gerüststrukturen freizusetzen. Die hydrodynamischen Durchmesser der freigesetzten Papain- bzw. Cellulase-Enzyme waren mittels Dynamischer Lichtstreuung (DLS) zu bestimmen und dann mit denjenigen der reinen Enzyme zu vergleichen. Die Aktivitäten der Enzyme wurden vor und nach erfolgter Deinterkalation untersucht. Dabei wurde Papain durch Zugabe von DTT-Phosphatpuffer-Lösung aktiviert und nach Zusatz von L-BAPNA bei einer Wellenlänge von 410 nm mit UV/Vis-Spektroskopie gemessen [5, 6]. Die Aktivität von Cellulase wurde durch Filterpapieraktivitätsassay bei 540 nm mit UV/Vis-Spektroskopie bestimmt [7 - 9].

Im zweiten Teil wurden aus einem speziell hergestellten Graphenoxid Wirt-Gast-Verbindungen synthetisiert und anschliessend charakterisiert. Eine große Herausforderung stellte dabei die Herstellung von einzelnen Graphenoxid-Folien durch ein modifiziertes Verfahren nach *Hummers'* dar [10]. Dazu wurde Graphit mit Kaliumpermanganat, konzentrierter Schwefelsäure und Natriumnitrat oxidiert und gleichzeitig in wesentlich kleinere Bruchstücke fragmentiert. Anschließend wurde das erhaltene Graphenoxid

charakterisiert. Das Molekulargewicht der Graphitoxid-Probe wurde mittels MALDI-TOF ermittelt. Weiterhin wurde der Gehalt an Kohlenstoff im Graphenoxid (und damit der Oxidationsgrad) durch TOC-Analytik und die Ladungsmenge durch Strömungspotentialmessung bestimmt. Zu dem wurde die Struktur mittels ^{13}C Kernresonanzspektroskopie und Infrarotspektroskopie charakterisiert. Die Ergebnisse wurden anschließend durch elementaranalytische Daten verifiziert.

Im Anschluss daran wurde der Einbau des synthetisierten Graphenoxids in die Calciumaluminat-Struktur durch Rehydratation der Zementklinkerphase Tricalciumaluminat studiert. Bei der Hydratation dieses Aluminats entsteht ein lamellares Calciumaluminathydrat, welches als mögliche Gast-Struktur für GO in Frage kommt. Für den Nachweis einer erfolgreichen Interkalation und die Analyse des möglichen Interkalationsprodukts wurden aussagekräftige Charakterisierungsmethoden, insbesondere Röntgenpulverdiffraktometrie und Röntgenkleinwinkelstreuung herangezogen. Um Auskunft über weitere Eigenschaften wie chemische Zusammensetzung, Morphologie, strukturelle Merkmale und thermische Stabilität zu erhalten, wurden Elementaranalyse, IR-Spektroskopie, Thermoanalyse mit gekoppelter Massenspektrometrie und Elektronenmikroskopie (REM bzw. TEM) eingesetzt.

3 Theoretischer Hintergrund

3.1 Layered double hydroxides

Layered double hydroxides (LDH) sind seit über 150 Jahren bekannt, seitdem das Mineral Hydrotalcit entdeckt wurde. Unter dem Begriff „Layered double hydroxide“ (deutsch: Mischmetallhydroxide) bezeichnet man eine große Anzahl kristalliner Verbindung, die auch als „Doppelschichtstrukturen“ bezeichnet [11]. Diese sowohl natürlich vorkommenden als auch synthetisch hergestellten Verbindungen sind zumeist aus basischen Doppelsalzen von zwei- und dreiwertigen Metallen in der Hauptschicht und Anionen in der Zwischenschicht aufgebaut [2, 12]. Die Grundstruktur der LDHs basiert auf der Schichtstruktur von Brucit $\text{Mg}(\text{OH})_2$, welche zum CdI_2 -Typ gehört. Im Hydrotalcit koordinieren die Metall-Kationen der Hauptschichten jeweils sechs Sauerstoffatome und sind demnach oktaedrisch umgeben. Die Polyeder bilden durch Kantenverknüpfung zweier Sauerstoffatome zweidimensionale Schichten. Diese Schichten stapeln anschließend aufeinander und bilden so eine dreidimensionale Struktur (**Abbildung 2**).

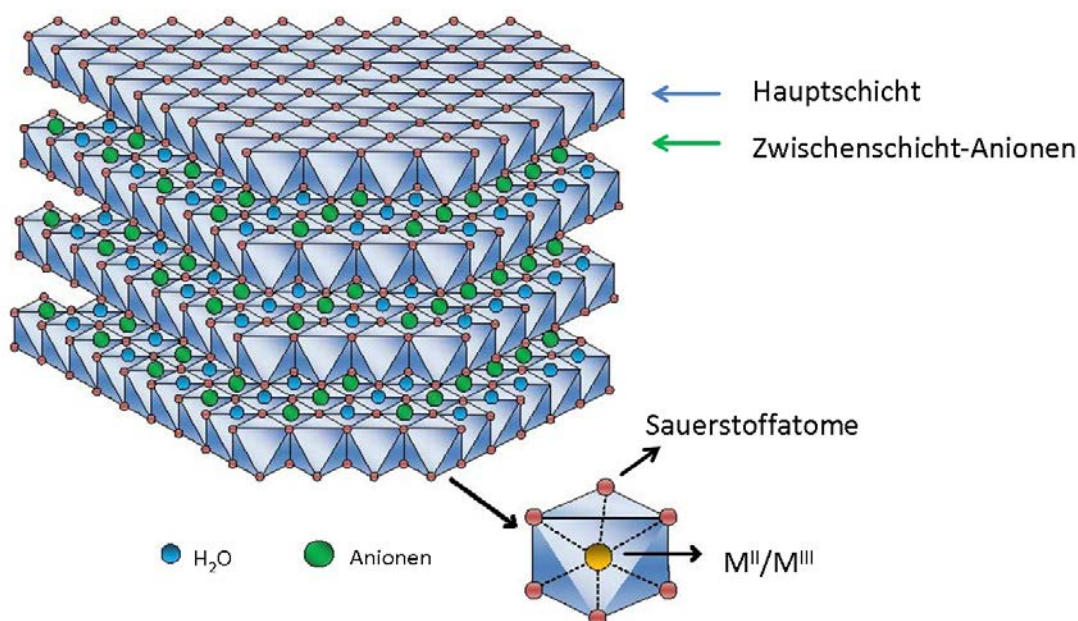
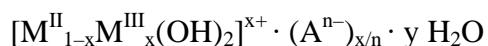


Abbildung 2: Schematische Darstellung der LDH-Struktur vom Typ Hydrotalcit [13].

Die allgemeine chemische Zusammensetzung eines LDHs kann wie folgt formuliert werden:



Dabei sind M^{II} zweiwertige Metallionen wie z. B. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} ; und M^{III} sind dreiwertige Metallionen wie z. B. Al^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Co^{3+} , Ni^{3+} und Mn^{3+} .

Die eingelagerten Anionen (z. B. OH^- , NO_3^- , Cl^- , ClO_4^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-}) werden mit A^{n-} bezeichnet. Der Wert für x kann prinzipiell im Bereich von 0,1 bis 0,5 liegen. Es wurden aber bei den bisher bekannten Verbindungen nur x-Werte von 0,2 bis 0,33 gefunden [14]. In die Zwischenschichten kann Kristallwasser leicht eingebaut und auch reversibel wieder entfernt werden, ohne dass sich die Kristallstruktur wesentlich ändert. Neben den soeben beschriebenen LDHs existieren auch solche mit einwertigen Lithiumionen. Sie weisen ähnliche Strukturen auf[15].

LDHs werden anhand ihrer Schichtstrukturen in drei Arten eingeteilt, nämlich den Pyroaurit-Sjögrenit-Typ, die laminaren Calcium-Aluminate (Hydrocalumit-Typ) sowie Doppelschichtstrukturen mit zwei Arten von Schichtionen, z. B. Chlorite, Lithiophorit, Vallerit.

Die beiden Typen hexagonaler Pyroaurit und rhomboedrischer Sjögrenit haben gleiche Summenformeln und unterscheiden sich nur in der Stapelung der Hauptschichten. In **Abbildung 3** ist die Stapelfolge der beiden Vertreter dargestellt [16]. Im hexagonalen Sjögrenit sind zwei Hauptschichten pro Elementarzelle gestapelt. Der Gitterparameter c ist demnach doppelt so groß wie der Zwischenschichtabstand, während der rhomboedrische Pyroaurit drei Hauptschichten pro Einheitszelle aufweist. Der Gitterparameter c entspricht in diesem Fall dem dreifachen Zwischenschichtabstand [17 - 19].

Die meisten natürlich vorkommenden Doppelschichthydroxide weisen eine rhomboedrische Symmetrie auf. Einige LDH-Verbindungen enthalten beiden Typen nebeneinander, z. B.

besteht $[\text{Mg}_6\text{Fe}_2(\text{OH})_6] \cdot \text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ aus einem inneren Kern von hexagonalem Sjögrenit und einer äußeren Hülle von rhomboedrischem Pyroaurit [20].

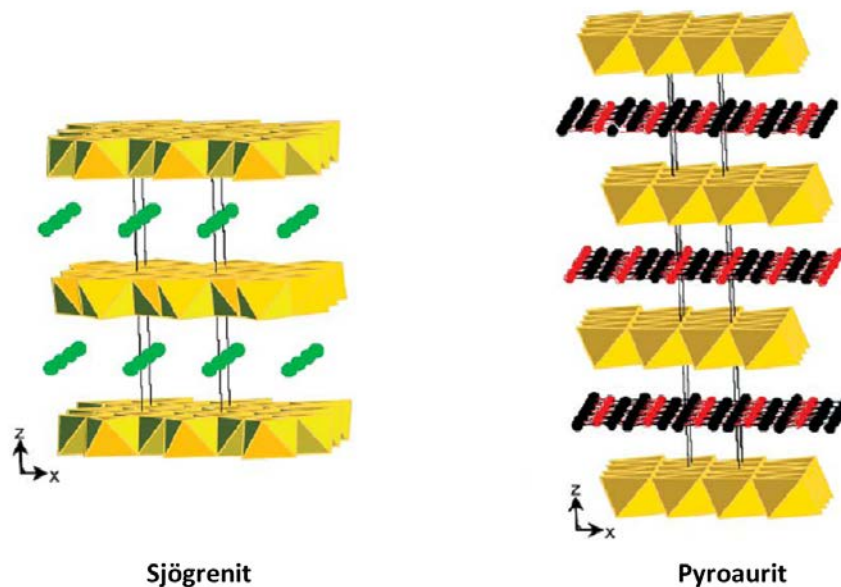


Abbildung 3: Schematische Strukturdarstellung der beiden Minerale Sjögrenit und Pyroaurit [16].

Sind die Kationen M^{II} und M^{III} ungefähr gleich groß, wie z. B. im Fall von Mg^{2+} und Al^{3+} , so können diese innerhalb der brucitähnlichen Hauptschicht statistisch geometrisch äquivalente Oktaederplätze besetzen. Unterscheiden sich M^{II} und M^{III} jedoch in ihrer Größe stärker, wie z. B. im Fall von Ca^{2+} und Al^{3+} , so sind die Geometrien der Kationenumgebung im Vergleich zu Pyroaurit oder Sjögrenit leicht verzerrt. Die Hauptschicht $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ kann demnach als eine Schicht aus $[\text{Al}(\text{OH})_6]^{3-}$ beschrieben werden, in deren Lücken Ca^{2+} -Ionen eingebaut sind. Die Umgebung der Ca^{2+} ist nicht oktaedrisch wie im Pyroaurit-Sjögrenit-Typ. Die Koordinationszahl von Ca^{2+} erhöht sich auf 7 [9].

Bei den Doppelschichtstrukturen von Pyroaurit-Sjögrenit- und Calcium-Aluminat-Typ besteht die Zwischenschicht nur aus einzelnen Anionen und Wassermolekülen. Daneben existiert

noch eine Gruppe von Brucit-ähnlichen Mineralien, bei denen die Zwischenschichten mit komplexen Schichtionen gefüllt sind, wie z. B. im Lithiophorit $[\text{Al}_2\text{Li}(\text{OH})_6]^+ \cdot [\text{Mn}_{2,5}\text{Mn}_{0,5}(\text{OH})_6]^-$. Diese Verbindungen weisen Oxoanionen in der Zwischenschicht auf.

3.2 Hydrotalcit-artige LDHs

Hydrotalcit, der prominenteste Vertreter der LDHs, besitzt die chemische Zusammensetzung $\text{Mg}_6\text{Al}_2[(\text{OH})_{16}\text{CO}_3] \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, mit $\text{M}^{\text{II}} = \text{Mg}^{2+}$ und $\text{M}^{\text{III}} = \text{Al}^{3+}$. Es kristallisiert im trigonalen Kristallsystem und weist meist durchsichtige, tafelförmige Kristalle mit seiden- bis wachsglänzenden Kristallflächen auf (**Abbildung 4**).

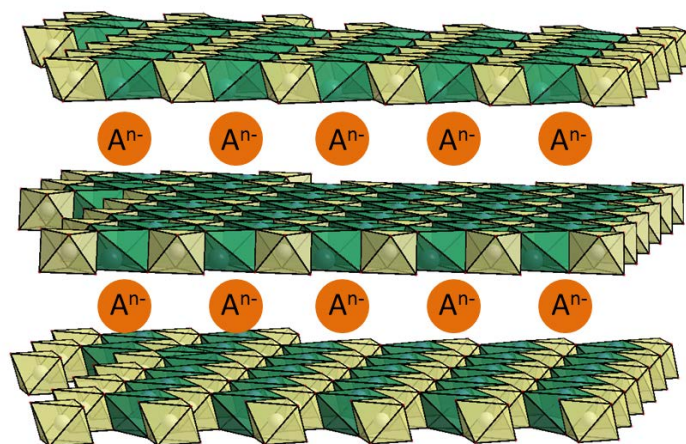


Abbildung 4: Struktureller Aufbau von Hydrotalcit [14].

Hydrotalcit findet vielfältigen Einsatz in technischen Anwendungen und als Arzneimittel. Es besitzt die Fähigkeit, Aluminiumhydroxid allmählich abzugeben. Deshalb verwendet man es bei Übersäuerung des Magens (Hyperazidität) zur Neutralisierung der Magensäure.

Hydrotalcit wird auch als Katalysator verwendet, um diverse organische Verbindungen herzustellen, oder um Schwermetalle z. B. in kontaminierten Boden zu binden.

3.3 Hydrocalumit-artige LDH-Verbindungen im Zement

Beim Abbinden von Zement bilden sich stets Calcium-Aluminium-Hydrate.

Zement ist ein hydraulisches Bindemittel und erhärtet im Gegensatz zu Gips-Bindemitteln auch bei Anwesenheit von Wasser [21]. Portlandzement besteht aus Portlandzementklinker und einem Sulfatzusatz. Durch Sinterung einer bestimmten Rohstoffmischung aus Kalk und Ton bei hoher Temperatur (1450°C) wird Klinker produziert. Portlandzementklinker besteht hauptsächlich aus den vier Klinkerphasen Alit (C_3S), Belit (C_2S), der Aluminat (C_3A) und der Ferrit-Phase (C_4AF). Nach DIN EN 197-1 besteht Normzement aus Haupt- und 0 - 5 % Nebenbestandteilen. Die möglichen Hauptbestandteile sind Portlandzementklinker, Hüttensand, Puzzolane, Flugasche, gebrannter Schiefer, Kalkstein, Silicastaub usw. [21]. Daneben enthält Zement noch Calciumsulfat ($CaSO_4 \cdot n H_2O$) sowie lösliche Alkalien in Form von Natrium- und Kaliumsulfaten (Na_2SO_4 , K_2SO_4).

Die feinkörnige Aluminatphase bildet sich bei der Abkühlung des Klinkers aus seiner Schmelze [8]. Chemisch besteht sie aus Tricalciumaluminat (C_3A , $Ca_3Al_2O_6$). Diese Klinkerphase besitzt eine hohe Reaktivität verglichen mit den anderen drei Klinkerphasen. Bei Wasserzugabe bilden sich augenblicklich Tricalciumaluminat-Hydrate, wobei eine erhebliche Wärmemenge freigesetzt wird.

Je nach Temperatur, Sulfat-Gehalt, Ca^{2+} - und Al^{3+} - Ionenkonzentration kann C_3A verschiedene Hydratationsprodukte bilden. In Anwesenheit von ausreichend Sulfat (Molverhältnis von SO_4^{2-} zu $C_3A \geq 3,0$), reagiert C_3A mit Wasser bevorzugt zu

nadelförmigem Ettringit, $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{12} \cdot (\text{SO}_4)_3 \cdot 26 \text{H}_2\text{O}$ [22 - 24]. Sobald die Konzentration von Sulfat-Ionen nicht mehr zur Ettringitbildung ausreicht (Molverhältnis von SO_4^{2-} zu $\text{C}_3\text{A} \geq 1,0$ and $\leq 3,0$), bildet sich Calciumaluminat-Monosulfat, $\text{Ca}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ (AF_m).

In Abwesenheit von Sulfat hingegen werden dünntafelige Kristalle (ebenfalls AF_m -Phasen, nämlich C_2AH_8 , C_4AH_{13} , C_4AH_{19} , usw.) gebildet. Sie gehören zur Klasse der Doppelschichtverbindungen (LDHs) [25]. Diese Verbindungen sind metastabil und wandeln sich je nach Temperatur mehr oder weniger rasch in die kubische Hydratphase C_3AH_6 (Katoit) um [26].

Bei der Hydratation von C_3A gehen Calcium- und Aluminium-Ionen in Lösung. In **Tabelle 1** sind verschiedene, zumeist im Zement bzw. Beton vorkommende Hydrocalumit-basierte LDHs aufgelistet [27 - 29].

Tabelle 1: Typische hydrocalumit-artige LDHs.

M^{2+}	M^{3+}	Zwischenschichtanion	chemische Zusammensetzung	<i>d</i> -Wert (nm)
Ca	Al	CO_3^{2-}	$[\text{Ca}_{0,66}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2] \cdot (\text{CO}_3)_{0,17} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0,75
Ca	Al	Cl^-	$[\text{Ca}_{0,66}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2] \cdot \text{Cl}_{0,33} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0,77
Ca	Al	OH^-	$[\text{Ca}_{0,66}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2] \cdot (\text{OH})_{0,33} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0,79
Ca	Al	NO_3^-	$[\text{Ca}_{0,66}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2] \cdot (\text{NO}_3)_{0,33} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0,84
Ca	Al	SO_4^{2-}	$[\text{Ca}_{0,66}\text{Al}_{0,33}(\text{OH})_2] \cdot (\text{SO}_4)_{0,17} \cdot n\text{H}_2\text{O}$	0,89

In der Hauptschicht von Hydrocalumit sind die Al^{3+} -Ionen von sechs Hydroxidionen verzerrt oktaedrisch umgeben, wobei die $\text{Al}(\text{OH})_6^{3-}$ -Oktaeder entlang der c-Achse gestaucht sind. Die Ca^{2+} -Ionen geben ihre Koordination zu einem OH-Ion auf und koordinieren stattdessen mit einem Wassermolekül der Zwischenschicht (**Abbildung 5**) [30].

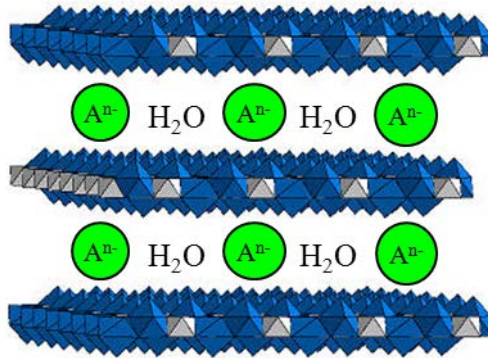


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kristallstruktur von Hydrocalumit [30].

3.4 Interkalation

Unter Interkalation versteht man die Einlagerung eines Gastes (Atome, Ionen oder Moleküle) in die Zwischenschichtregion von Schichtverbindungen, ohne dass sich die Kristallstruktur während des Einlagerungsprozesses wesentlich verändert [31 - 34]. Der Prozess der Interkalation verläuft oft unter milden Bedingungen wie z. B. Raumtemperatur und Normaldruck [35, 36].

Interkalation läuft häufig in Teilprozessen ab. Die Reaktion beginnt mit der Chemisorption der Gastspezies an den reaktiven Stellen der anorganischen Schichten. Diese reaktive Stelle befindet sich im Allgemeinen an den Kanten der Schichten. Auch Oberflächendefekte der anorganischen Schichten können als Ausgangspunkte für die Interkalation dienen. Zuerst werden die Elektronen der Gast-Ionen zu den Schichtstrukturen transferiert. Die

anorganischen Schichten werden deformiert und die Gast-Ionen werden in die Zwischenschichten eingebracht. Die Deformation (Aufbiegen und/oder Aufweiten) der Schichten ist eine wesentliche Voraussetzung für die Interkalation. Die Reaktion ist beendet, wenn die Schichtstrukturen elektronisch oder sterisch gesättigt sind. In **Abbildung 6** ist der Prozess schematisch dargestellt [37, 38]. Die dabei entstehenden, als Interkalate bezeichneten Verbindungen sind abwechselnd aus anorganischen Hauptschichten und eingelagerten Gast-Ionen aufgebaut.

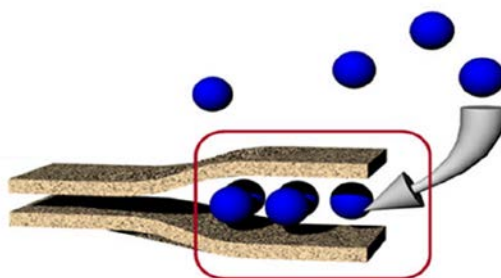


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Interkalationsprozesses [39].

Zahlreiche anorganische und organische Anionen, anionische Polyelektrolyte sowie Biomoleküle und Biopolymere können interkaliert werden [40 - 46]. Durch Einlagerung der Gast-Ionen verändern sich auch die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Verbindungen, die von ihrer elektronischen Struktur abhängig sind, wie z. B. Hydrophilie, Dispergierbarkeit, Wärme- und elektrische Leitfähigkeit, optische und magnetische Eigenschaften [26 - 28]. Teilchen mit speziellen Funktionalitäten können in die Zwischenschichten eindringen und neuartige multifunktionelle LDH-Materialien ergeben.

Als Syntheseroute können entweder Anionenaustausch oder direkte Synthesen wie Kopräzipitation und Rehydratation zum Einsatz kommen. Anhand geeigneter Charakterisierungsmethoden konnten die so synthetisierten LDHs nachgewiesen und ihre *d*-

Werte ermittelt werden. Nicht nur die äußeren Bedingungen (z. B. Druck, Temperatur und Gastkonzentration) können die Interkalation beeinflussen, sondern auch die anionische Ladungsmenge, das Molekulargewicht und die Molekülarchitektur der Anionen spielen eine herausragende Rolle.

In dieser Arbeit wurden die Enzyme Papain- und Cellulase sowie ein gezielt synthetisiertes Graphenoxid in den Zwischenschichtraum von Mg_2Al -LDH sowie von C_3A -Hydratationsprodukten eingebaut.

3.5 Synthesemethode

Interkalationsverbindungen können in großer Anzahl aus einer Vielzahl von M^{II}/M^{III} -Kation-Kombinationen und verschiedenen Anionen für die Zwischenschicht hergestellt werden. Viele Synthesetechniken wurden erfolgreich für die Herstellung von LDHs eingesetzt. Die am häufigsten verwendete Methode ist Kopräzipitation. Auch Anionenaustausch wird als eine einfache Synthesemethode benutzt. Die dritthäufigste Synthesetechnik ist die auf dem sogenannten „Memory-Effekt“ basierte Rekonstruktion (Rehydratation).

3.5.1 Kopräzipitation

Kopräzipitation ist das am häufigsten verwendete Verfahren für die Synthese von LDHs mit organischen Anionen, die schwierig auf andere Weise einzubauen sind [47, 48]. Diese Methode beruht auf der langsamen Zugabe einer gemeinsamen Lösung von M^{2+} - und M^{3+} -Metallsalzen zu einer alkalischen Lösung, wobei Co-Präzipitation der zwei Metallsalzkationen auftritt [49 - 51]. Es ist notwendig, die Kopräzipitationsreaktion bei hohem pH-Wert durchzuführen, bei dem die meisten Hydroxide ausfallen [52].

Der Mechanismus der Kopräzipitation beruht auf der Kondensation der Hexaaqua-Komplexe. Brucit-ähnliche Schichten aus den beiden Metallkationen werden mit den Anionen in der Zwischenschicht aufgebaut [53]. Es gibt zwei häufig verwendete Methoden: Co-Präzipitation bei geringer Übersättigung und bei hoher Übersättigung.

Im Allgemeinen wird die Kopräzipitation bei niedriger Übersättigung durch langsame Zugabe der gemischten Lösungen von M^{II} - und M^{III} -Salzen in einem bestimmten Verhältnis in einem Reaktor durchgeführt, in dem sich eine wässrige Lösung der gewünschten einzulagernden Anionen befindet. Gleichzeitig wird in den Reaktor eine alkalische Lösung gegeben, um den pH-Wert alkalisch zu halten [54].

Kopräzipitation bei hoher Übersättigung erfordert die Zugabe einer gemischten M^{II}/M^{III} -Salzlösung zu einer alkalischen Lösung der Anionen. In dieser Arbeit wurden die Synthesen der beiden Enzym-LDHs mit Kopräzipitation bei hoher Übersättigung durchgeführt.

3.5.2 Anionenaustausch

Das Ionenaustauschverfahren wird angewandt, wenn die Kopräzipitation nicht möglich ist, wie z. B. wenn die M^{II} - / M^{III} -Kationen oder die zu interkalierenden Anionen in alkalischer Lösung instabil sind, oder wenn eine direkte Reaktion zwischen den Metallionen und den Gast-Ionen schneller und günstiger ist als die Interkalation in eine LDH-Struktur.

Beim Anionenaustausch werden wie in **Abbildung 7** gezeigt die in den Zwischenschichten der LDH sich befindenden Anionen gegen die Gast-Ionen ausgetauscht, wobei eine neue LDH-Verbindung entsteht. Der Anionenaustausch findet in der Regel nur statt, wenn das einzubringende Anion eine höhere spezifische negative Ladungsmenge aufweist als das bereits in der Zwischenschicht befindliche Anionen. Daneben spielen u. U. Zusätzliche

hydrophobe Wechselwirkungen sowie die bei der Hydratation frei werdende Energie auch eine Rolle [55, 56].

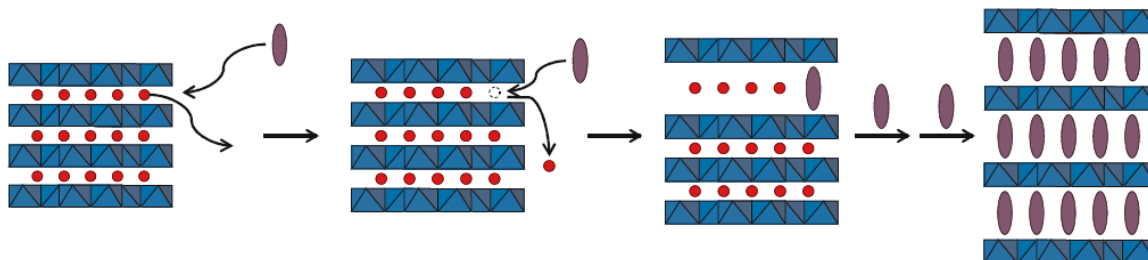


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Anionenaustauschs an einer LDH-Verbindung.

Mehrere Faktoren beeinflussen den Anionenaustausch. Dazu gehören Austauschmedium, pH-Wert, Temperatur und die chemische Zusammensetzung der Schichten. Die Anionenaustauschmethode ist besonders hilfreich für die Herstellung von Nichtkarbonat-LDHs.

3.5.3 Rehydratation

Die Umwandlung gemischter Metalloxide in LDHs wird auch als Rehydratation, Regeneration, Rekonstruktion, Restaurierung oder „Memory-Effekt“ bezeichnet [57].

Beim Kalzinieren von LDHs werden die in den Zwischenschichten eingelagerten Anionen und Wassermoleküle sowie die Hydroxylgruppen der anorganischen Hauptschichten entfernt. Die dadurch entstehenden gemischten Metalloxide können die ursprüngliche Schichtstruktur wieder zurückbilden, sobald ihnen Wasser und Anionen zugesetzt werden [58 - 61]. Dabei wird Wasser absorbiert, um die Hydroxylgruppen der Schichten zu bilden, und die Anionen werden in die Zwischengalerien eingebracht.

Interkalationsverbindungen mit Karbonatanionen in der Zwischenschicht bilden sich sehr leicht in Gegenwart von CO₂. Deshalb ist es empfehlenswert, bei der Rehydratation unter Stickstoffatmosphäre zu arbeiten, sofern ein Nichtkarbonat-Anion interkaliert werden soll.

Die Rehydratation wird bevorzugt eingesetzt, wenn die zu interkalierenden Gast-Ionen groß sind. Mit diesem Verfahren kann die Konkurrenzreaktion mit den Anionen der Metallsalze, die bei der Kopräzipitation verwendet werden, vermieden werden.

In dieser Arbeit wurde die Synthese der Ca₂Al-Graphenoxid-LDHs durch Rehydratation durchgeführt.

3.6 Enzyme

Enzyme, früher auch als Ferment bezeichnet, sind Stoffe, die eine oder mehrere biochemische Umsetzungen katalysieren können. Die Stoffe, die von Enzymen umgesetzt werden, bezeichnet man als Substrate [62]. Enzyme erleichtern Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie so weit herabsetzen, dass es zu einer Stoffumsetzung kommen kann.

Chemisch gehören Enzyme zu den Proteinen. Im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren kann ein bestimmtes Enzym nur ein bestimmtes Substrat umsetzen, was auch als Substratspezifität bezeichnet wird. Außerdem besitzen Enzyme Wirkungsspezifität, d. h. sie katalysieren nur eine bestimmte von zahlreichen möglichen chemische Reaktionen (z. B. Hydrolyse, Oxidation, Umlagerung usw.) [63].

Nach den von ihnen katalysierten Reaktionen lassen sich Enzyme gemäß internationalem Standard in sechs Klassen einteilen, nämlich in Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme gehören zur

Gruppe III (Hydrolasen), denen von der Enzyme Commission die EC-Nummer 3 zugeordnet ist [64, 65].

Für die katalytische Wirksamkeit ist das aktive Zentrum des Enzyms verantwortlich. An dieser Stelle bindet es das Substrat. Die Aktivität des Enzyms spielt bei der Enzymkinetik eine wichtige Rolle. Sie ist von äußeren Faktoren wie z. B. Temperatur oder pH-Wert abhängig.

3.6.1 Papain

Papain ist ein proteolytisches Enzym, welches in der Papaya-Frucht in hoher Konzentration vorkommt und daraus gewonnen wird. Papain wurde erstmals im späten 19. Jahrhundert beschrieben, als man seine proteolytische Wirkung im Latex der tropischen Papaya anerkannte [66]. Ab Mitte der 1950er Jahre konnte reines Papain mit Hilfe verbesserter Reinigungs- und Trennungstechniken in Substanz isoliert werden. In den 1980er Jahren wurden die Stereochemie des aktiven Zentrums von Papain sowie seine dreidimensionale Struktur bestimmt [67].

Papain hat die EC-Nummer 3.4.22.2 und gehört zu den Hydrolasen. Es besteht aus 345 Aminosäuren, die in drei Gruppen, nämlich einer Signalsequenz (1-18), einem Propeptid (19-133) und dem reifen Peptid (134-345) angeordnet sind. Die N-terminierten Aminosäuren 1-133 gehören nicht zum aktiven Zentrum des Enzyms [68]. Seine dreidimensionale Struktur besteht aus zwei Domänen, mit einem Zwischensegment zwischen beiden (**Abbildung 8**) [69]. Für die Aktivität von Papain sind drei Disulfidbrücken und eine Sulfhydrylgruppe verantwortlich. Die Aktivierung von Papain erfolgt in zwei Spaltungsschritten: der initialen Spaltung der Aminosäure 18 in der Signalsequenz und abschließend die Spaltung der glykosylierten Aminosäuren 114 [70 - 72].

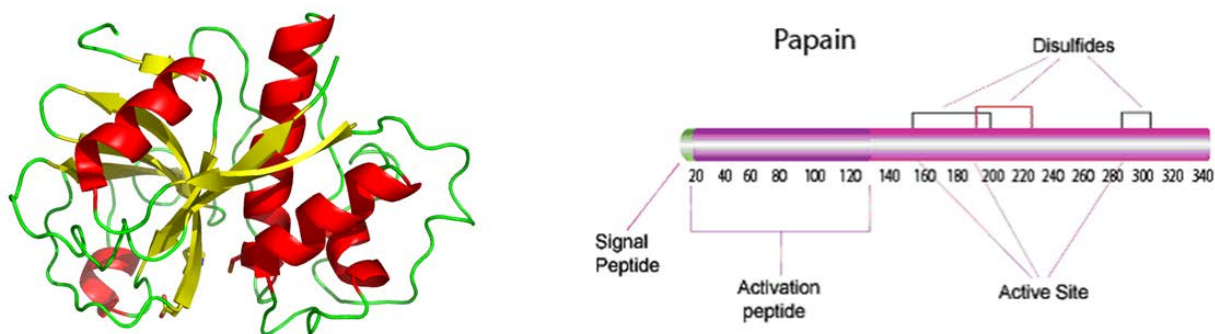


Abbildung 8: Darstellung der Tertiärstruktur (links) sowie des generellen Aufbaus (rechts) des Enzyms Papain [69].

Das Enzym hat eine ausgeprägte eiweißspaltende Wirkung und kann harte Fleischfasern abbauen. Es wird deshalb in der Lebensmittelindustrie als Zartmacher für Fleisch verwendet. In der Textilindustrie wird Papain als Hilfsmittel bei der Herstellung von Wolle und Seide verwendet, um Verfilzen und Schrumpfen zu verhindern. In der Transfusionsmedizin kann Papain zur Identifikation des sog. Duffy-Faktors genutzt werden. Daneben kann Papain Zellen schonender als andere Proteasen isolieren, weshalb es zur Dissoziation der Zellen in der ersten Stufe einer Zellkulturenpräparation verwendet wird.

3.6.2 Cellulase

Cellulose (auch Zellulose) ist der Hauptbestandteil von pflanzlichen Zellwänden und damit eine der wichtigsten organischen Verbindungen. Chemisch gesehen ist Cellulose ein Polysaccharid. Pflanzen benötigen das endogene Enzym Cellulase zum Umbau ihrer Cellulose-Zellwände, z. B. bei Wachstumsvorgängen. Deshalb stellt Cellulase das häufigste cellulolytische Enzym dar.

Cellulase wird hauptsächlich aus Pilzen, Bakterien und Protozoen produziert. Es besteht aus einer katalytischen Domäne (CD) und einem Kohlenhydratbindungsmodul (CBM), das mit der CD durch ein relativ langes (30 - 44 Aminosäuren), oft glykosyliertes Linker-Peptid verbunden ist (**Abbildung 9**) [73, 74].

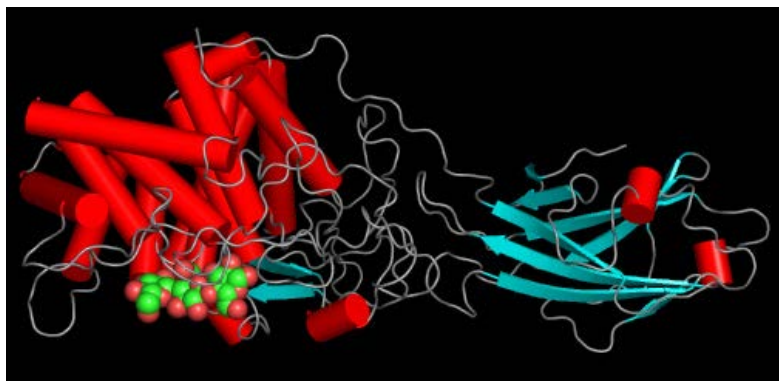


Abbildung 9: Darstellung der Tertiärstruktur von Cellulase [75].

Cellulasen werden in drei verschiedene Klassen eingeteilt: Endoglucanase (EC-Nummer 3.2.1.4, 1,4- β -D-Glucan-glucanohydrolase), Exoglucanase (EC-Nummer 3.2.1.91, 1,4- β -D-Glucan-cellobiohydrolase) und Cellobiase (oder β -Glucosidase). Das Zusammenwirken der drei Typen ermöglicht einen rationellen Abbau der riesigen Cellulosemoleküle, die aus 3000 - 15000 Anhydroglucoseringen bestehen.

Endoglucanasen spalten die Celluloseketten zunächst in größere Abschnitte, die Cello-Oligosaccharide. Die Exoglucanasen zersetzen die zerkleinerten Celluloseketten kontinuierlich in Disaccharid-Cellobiose. Anschließend hydrolysieren die Cellobiasen (oder β -Glucosidasen) die Doppelzucker zu Glucosen (**Abbildung 10**) [76]. Somit wirken alle drei Typen der Cellulase synergistisch, um Glucose als Endprodukt zu erhalten.

Cellulase wird aufgrund ihrer Fähigkeit, Cellulose in den Grundbaustein β -Glucose oder andere Oligosaccharidverbindungen abzubauen, in zahlreichen Anwendungsgebieten

eingesetzt. z. B. in der Nahrungsmittel- und Papierindustrie. Cellulasen sind in vielen Waschmitteln enthalten. In der Textilindustrie werden sie eingesetzt, um Jeans den beliebten „Used-Look“-Effekt zu verleihen. Sie werden auch beim Gefriertrocknen von Kaffee verwendet, um die Cellulose in den Bohnen aufzulösen. Des weiteren werden Cellulasen bei der Behandlung von Magen- oder Darmverschlüssen durch unverdautes Pflanzenmaterial und bei der Protoplastenisolierung aus Pflanzengewebe eingesetzt [77, 78].

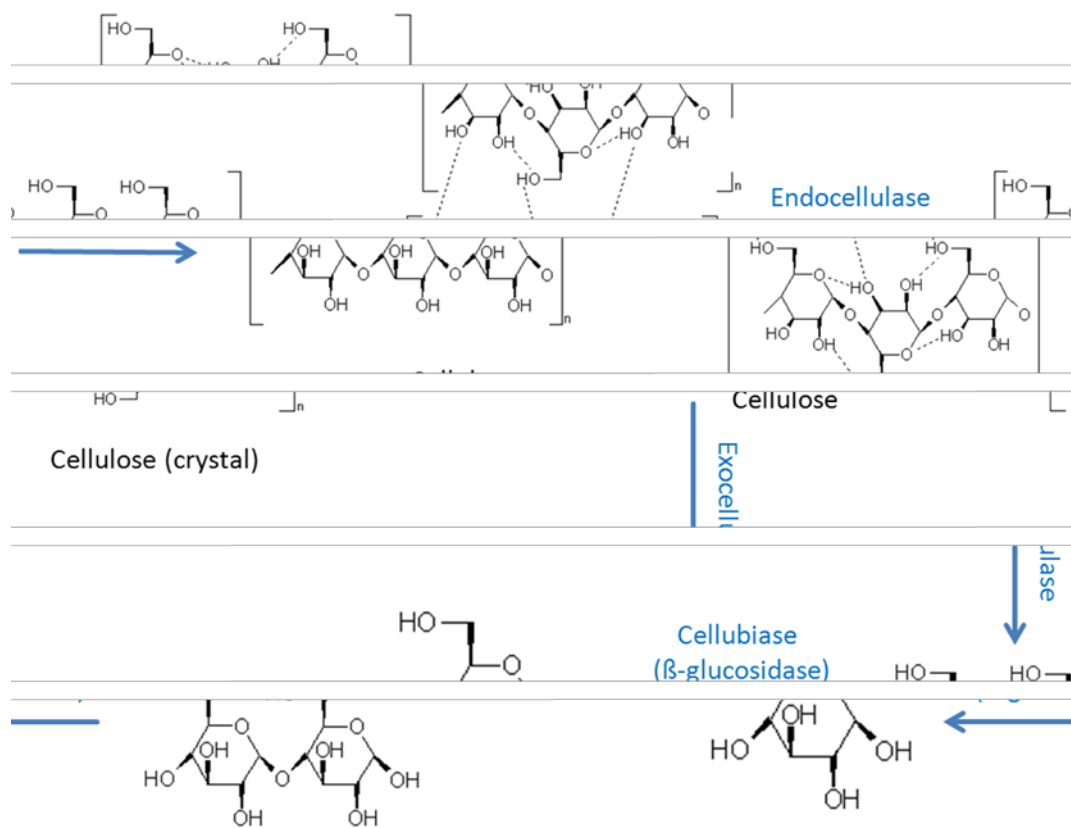


Abbildung 10: Wirkungsweise der verschiedenen Komponenten von Cellulase [79].

Die wichtigsten Kerngrößen der beiden Enzyme Papain und Cellulase sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Wichtige Kerngrößen der Enzyme Papain und Cellulase.

Enzym	chemische Formel	M _w (Da)	Stab. bereich pH-Wert		maximale Temperatur	Anzahl Aminosäuren
			optimal	maximal		
Papain	C ₁₇₅₆ N ₄₅₈ S ₁₃ O ₅₂₀ H ₂₅₅₈	38.922	6 - 7	10	90 °C	345
Cellulase	C ₂₀₆₄ N ₅₅₄ S ₂₈ O ₇₂₈ H ₃₁₁₀	48.178	5 - 7	11	70 °C	452

3.7 Kohlenstoff -Nanomaterialien

3.7.1 Graphen

Als Graphen bezeichnet man eine Kohlenstoffmodifikation, die aus einzelnen 2D-Atomschichten besteht, so dass sich eine zweidimensionale Struktur ergibt [80, 81].

Bereits im Jahr 1859 wurde eine lamellare Struktur für thermisch reduziertes Graphitoxid beschrieben [82]. Dieses und auch die Herstellung von Graphitoxidpapier wurden erst im Jahr 1918 intensiv untersucht [83]. Im Jahr 1962 wurden von *H. P. Boehm* erstmals einlagige Kohlenstofffolien beschrieben und später dafür der Begriff „Graphen“ geprägt [84, 85]. *Geim* und *Novoselov* stellten schließlich einschichtige Graphenkristalle her und wurden dafür im Jahr 2010 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet [79, 86].

In der zweidimensionalen Struktur von Graphen sind alle Kohlenstoffatome sp^2 -hybridisiert und von drei weiteren umgeben. Daraus resultiert ein bienenwabenförmiges Muster. Wie in **Abbildung 11** gezeigt, stellt Graphen das grundlegende Strukturelement aller anderen C-Allotrope dar, in denen sich einlagige Schichten der Kohlenstoffatome stapeln. Ein Beispiel dafür ist die dreidimensionale Struktur des Graphits [87]. Rollt man die Schichten auf, erhält man Kohlenstoffnanoröhren [88]. Wölbt sich die ebene Fläche von Graphen zu einer Kugelfläche, entstehen bei bestimmten Zahlenverhältnissen die Fullerene [89].

Graphen weist ungewöhnliche Eigenschaften auf, die es sowohl für die Grundlagenforschung als auch für Anwendungen interessant machen. Es kann künftig etwa in Superkondensatoren und Akkus oder in der Photovoltaik als Solarzelle eingesetzt werden.

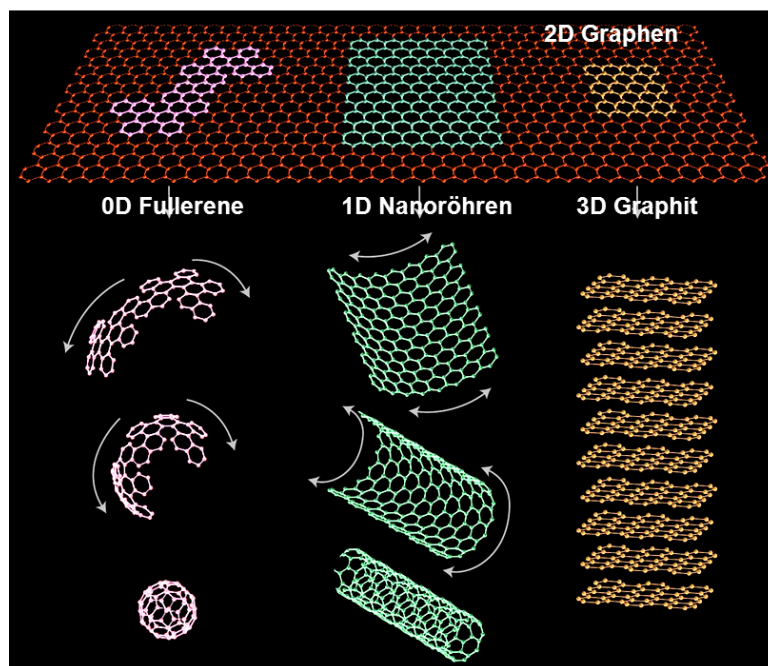


Abbildung 11: Graphen als Grundbaustein für andere Kohlenstoff-Nanomaterialien [79].

3.7.2 Graphenoxid

Als mögliche Vorstufe zur Herstellung von Graphen hat Graphenoxid seit kurzem großes Forschungsinteresse erfahren.

Graphitoxid, bei dem es sich im strengen Sinn nicht um ein Oxid handelt, kann durch Oxidation von Graphit gewonnen werden. Im Jahr 1957 wurde erstmals die heute übliche Synthese von Graphitoxid aus Graphit durch Behandlung mit Schwefelsäure, Natriumnitrat und Kaliumpermanganat berichtet [10]. In dieser Arbeit wurde Graphenoxid mittels einer modifizierten Synthese nach *Hummers* hergestellt, wobei ein besonders hoher Grad an Fragmentierung der Graphitfolien erreicht wurde, der wesentlich für die erfolgreiche Interkalation war.

Die Beziehungen „Graphitoxid“ und „Graphenoxid“ beschreiben zwei verschiedene Verbindungen. Unter „Graphitoxid“ versteht man Graphit, der i.w. an den Kanten

Oxogruppen wie z. B. Carboxyl- oder Hydroxyl-Gruppen aufweist und aus gestapelten Kohlenstoffschichten besteht. Im „Graphenoxid“ hingegen liegen einzelne Kohlenstoffschichten vor, die auch im Inneren einer Schicht Oxogruppen wie z. B. Epoxid aufweisen können.

Die Struktur des Graphitoxids wird durch die verwendete Synthesemethode und den Oxidationsgrad bestimmt. Nach Oxidation bleibt beim Graphitoxid die Schichtstruktur des Graphits erhalten, aber der Abstand der Schichten erhöht sich von 0,335 nm auf ~ 0,7 nm. Graphitoxid nimmt leicht Wasser auf. Dadurch kann der Abstand zwischen den einzelnen Schichten auf bis zu 1,2 nm ansteigen.

In **Abbildung 12** ist eine mögliche Struktur von Graphenoxid mit verschiedenen Oxogruppen vorgestellt. Neben Epoxid- wurden experimentell auch Carbonsäure-, Hydroxy- sowie Phenolgruppen nachgewiesen [90].

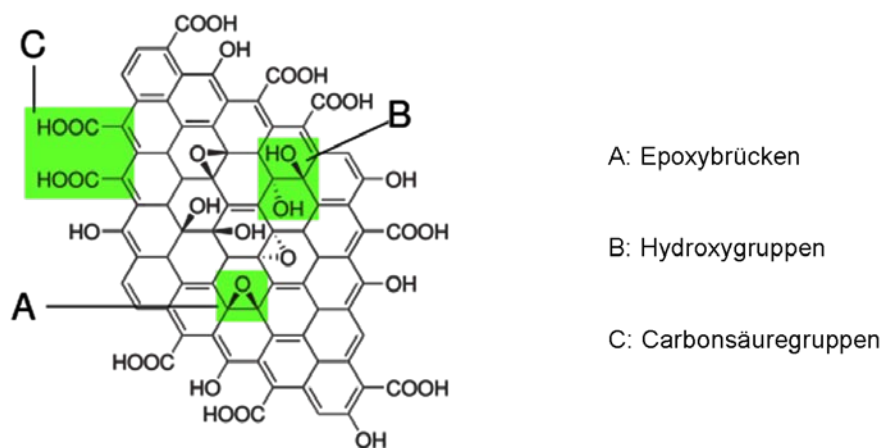


Abbildung 12: Strukturvorschlag für ein Graphenoxid.

Aufgrund der hydrophilen Oxogruppen ist Graphenoxid in Wasser leicht löslich. Durch chemische Reduktion des löslichen Graphenoxids z. B. mit Hydrazin kann eine Suspension aus Graphenflocken erhalten werden [91].

4 Analytische Methoden

4.1 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Röntgenkleinwinkelstreuung (engl. small-angle X-ray scattering, SAXS) ist ein physikalisches Analysenverfahren, das mit Hilfe des am Probenmaterial gestreuten kohärenten Röntgenlichts Informationen über Nanostrukturen mit einer Größe von unter 1 nm bis zu 200 nm liefert. SAXS eignet sich nicht nur zur Bestimmung der Teilchengröße bzw. Teilchensymmetrie, (sog. Formfaktoren; z. B. kugelförmige, lamellare oder zylindrische Form) von Nanopartikeln. Die Methode erlaubt auch, die Konformation oder die spezifische Oberfläche von Polymeren bzw. Biomolekülen zu bestimmen.

Röntgenweitwinkelstreuung (engl. wide-angle X-ray scattering, WAXS) stellt ein ähnliches Analysenverfahren wie SAXS dar, allerdings ist hier der Abstand zwischen der Probe und dem Detektor kürzer, wodurch das Streuungsmaximum bei größeren Winkeln beobachtet wird. Je nach Instrument ist es möglich, dass WAXS und SAXS in einer Messung gleichzeitig aufgenommen werden können. WAXS wird oft verwendet, um Kristallstrukturen im Bereich von 0,1 nm bis zu einigen Nanometern, der auch für die Röntgendiffraktometrie (XRD) zugänglich ist, zu untersuchen.

Das Phänomen der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) wurde erstmals im Jahr 1938 von *André Guinier* bei der Untersuchung von Aluminium-Kupfer-Legierungen beobachtet [92]. In den folgenden 20 Jahren haben *Otto Kratky*, *Günther Porod* und *Peter Debye* die Theorie und

Anwendung der Röntgenkleinwinkelstreuung entwickelt und den Grundstein für heutige Anwendungen gelegt [93 - 95].

SAXS ist eine zerstörungsfreie Methode, die eine sehr einfache Präparation erfordert. Bei Raumtemperatur sind die Proben sowohl als Feststoff als auch in Lösung in Kapillarröhrchen vermessbar. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Ganesha 300XL SAXS-WAXS-Instrument der Firma SAXSLAB ApS, Skovlunde/Dänemark verwendet. Ein vereinfachter schematischer Aufbau des verwendeten Instruments ist in **Abbildung 13** dargestellt. Das SAXS-WAXS-Instrument besteht aus einer GENIX-3D Röntgenquelle, einem Drei-Schlitz-Kollimationssystem, einer vollständig evakuierten Probenkammer und einem beweglichen 2D Pilatus 300K-Detektor.

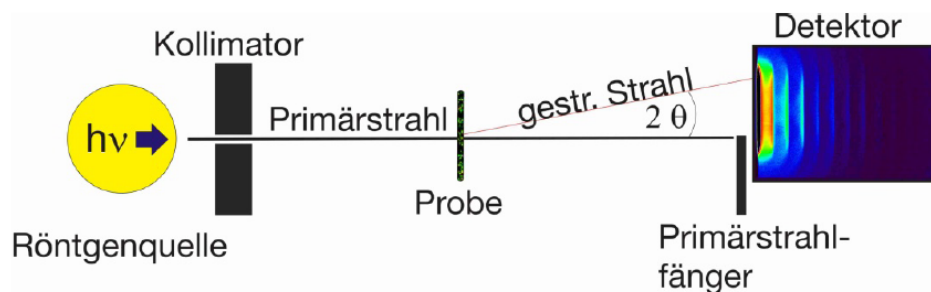


Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines SAXS-Geräts.

Die Röntgenquelle sendet eine monochromatische, mikrofokussierte Cu- K_{α} -Strahlung (50 kV/0.6 mA, $\lambda = 0,1542$ nm), die sog. *Thomson*-Streuung aus, die durch den Kollimator in ein nahezu paralleles Strahlenbündel umgewandelt wird. Ein Teil der Strahlung wird durch die sich im Strahlengang befindliche Probe gestreut. Der nicht gestreute Teil wird mittels des

„Primärstrahlfangern“ geblockt. Das gestreute Licht wird vom Detektor aufgenommen. Der Abstand zwischen Probe und Detektor kann mit entsprechenden Schlitzgrößen kontinuierlich variiert werden.

Die *Thomson*-Streuung regt die Elektronen der Probenmoleküle zu Schwingungen mit gleicher Frequenz an. Die daraufhin emittierten Photonen mit der gleichen Wellenlänge der Anregungsstrahlung werden in Form von Kugelwellen im Detektor erfolgt.

Die Intensität der Strahlung des angeregten Elektrons kann mit Hilfe der *Thomson*-Formel beschrieben werden (**Gleichung 1**):

$$I(\theta) = I_0 \cdot 7,9 \cdot 10^{-26} \cdot \frac{1}{R^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\theta}{2} \quad \text{Gleichung 1}$$

Hierbei sind I_0 die Intensität der Thomson-Strahlung und R (cm) der Abstand zwischen Probe und Detektor. Der winkelabhängige Term mit dem Streuwinkel 2θ ($\ll 1$) wird auch als Polarisationsfaktor bezeichnet. Das hier benutzte SAXS-Instrument kann Streuwinkel bis zu $\sim 0,05^\circ$ detektieren. Der Intensitätsverlauf der Streustrahlung $I(\theta)$ wird in Abhängigkeit von Streuwinkel bei verschiedenen Wellenlängen detektiert. Um einen Vergleich mit Intensitätskurven aus der Röntgenstrahlung zu ermöglichen, verwendet man den sogenannten Streuvektor q , der die Differenz zwischen Anregungsstrahlung und gestreuter Strahlung darstellt (**Abbildung 14**).

Mittels Fouriertransformation kann der Streuvektor q auch in Form von **Gleichung 2** dargestellt werden.

$$q = \frac{4 \cdot \pi \cdot \sin \theta}{\lambda} \quad \text{Gleichung 2}$$

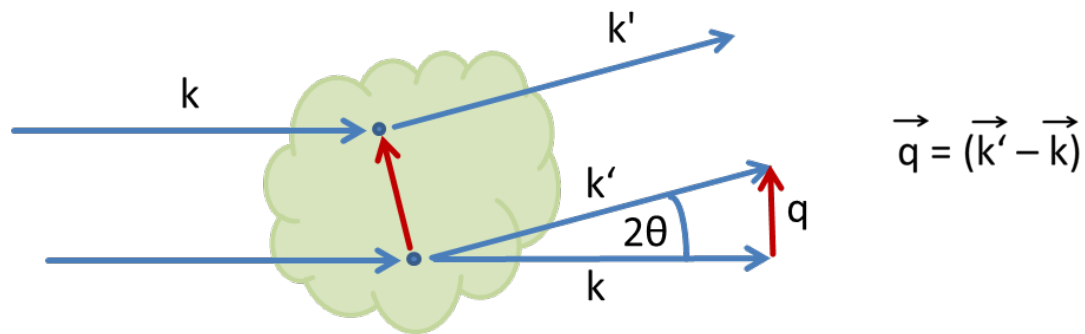


Abbildung 14: Schema zur Streuung von Röntgenstrahlen an einer Probe.

q hat typischerweise die Einheit nm^{-1} oder \AA^{-1} . Der Schichtabstand (d -Wert) kann nach Gleichung 2 und der *Bragg*-Gleichung (**Gleichung 3**) aus dem q -Wert abgeleitet werden (**Gleichung 4**).

$$2 \cdot d \cdot \sin \theta = n \cdot \lambda \quad \text{Gleichung 3}$$

$$d = 2 \cdot \pi / q \quad \text{Gleichung 4}$$

Aus den Streudaten kann auch der Streumassenradius auch bestimmt werden. Der Streumassenradius R_G , auch Gyration- oder *Guinier*-Radius beschreibt, charakterisiert die räumliche Ausdehnung unregelmäßig geformter Partikel. R_G ergibt sich aus der Wurzel der mittleren quadratischen Abstände aller Elektronen zum Schwerpunkt des Partikels.

Als *Guinier*-Analyse, die nach *André Guinier* benannt wurde, bezeichnet man die Analyse der SAXS-Streukurve bei sehr kleinen Streuwinkeln. Dabei wird die Intensität der Streuung gemäß der *Guinier*-Approximation als Funktion des Streuwinkels aufgetragen (**Gleichung 5**).

$$\ln [I(q)] = \ln [I_0] - q^2 \cdot R_G^2 / 3 \quad \text{Gleichung 5}$$

$I(q)$ ist die Intensität der detektierten streuvektorabhängigen Streustrahlung. Wie in **Abbildung 15** gezeigt, kann der *Guinier*-Radius R_G durch grafische Auftragung des *Guinier*-Plots ($\ln [I(q)]$ über q^2) im Bereich $0 < q < 1,3 \cdot R_G$ über die Neigung der Geraden ($- R_G^2 / 3$) ermittelt werden.

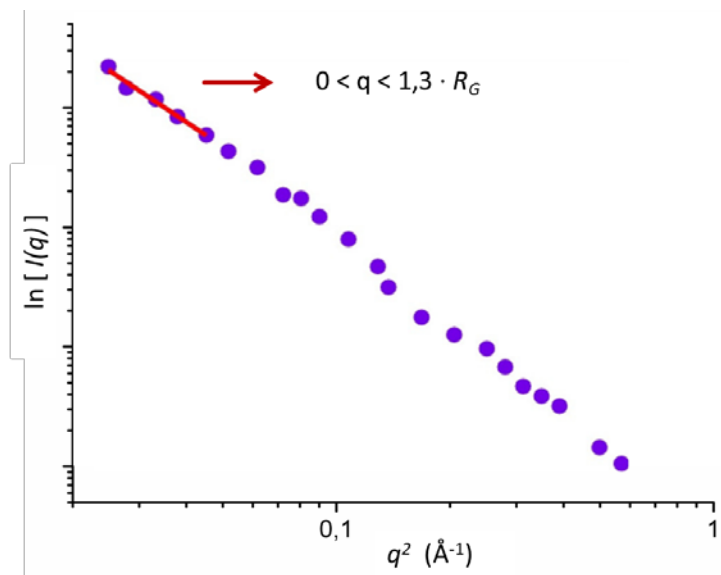


Abbildung 15: *Guinier*-Plots $\ln [I(q)]$ vs. q^2 zur Bestimmung des Gyrationradius R_G eines Nanopartikels bzw. Moleküls.

Für gestreckte oder flexibel verknüpfte lineare Makromoleküle kann eine weitere wichtige Größe, der sog. Trägheitsradius des Querschnitts R_{XC} , aus den Streudaten ermittelt werden. Nach **Gleichung 6** wird R_{XC} mittels der Neigung der Geraden ($\ln [q \cdot I(q)]$ über q^2) berechnet.

$$\ln [q \cdot I(q)] = \ln [q \cdot I(0)] - q^2 \cdot R_{XC}^2 / 3 \quad \text{Gleichung 6}$$

Aus dem *Guinier*-Radius R_G und dem Trägheitsradius des Querschnitts R_{XC} kann gemäß **Gleichung 7** schließlich die Korrelationslänge (L) eines Teilchens berechnet werden.

$$L = [12 (R_G^2 - R_{XC}^2)]^{1/2} \quad \text{Gleichung 7}$$

4.2 Pulver-Röntgendiffraktometrie

Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie können Aussagen über kristalline und teilkristalline Phasen und Verbindungen getroffen werden [96]. Röntgenstrahlen wechselwirken mit den Elektronen der untersuchten Proben, der eindringende Strahl wird von den Elektronen in alle Richtungen gestreut. Durch diese Beugung der Strahlen an den Kristallnetzebenen ergeben sich für jeden Kristall unterschiedliche, charakteristische Beugungsmuster [97]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Röntgendiffraktometer der Firma Bruker, Karlsruhe verwendet (AXS D8 advance).

Die drei ganzzahligen Indizes h , k und l bilden das Zahlentriplett (hkl) und werden als *Miller'sche* Indizes bezeichnet. Die *Miller'schen* Indizes geben die Lage der Netzebenen und Richtungen im Koordinatensystem an. Somit kann die Kristallorientierung eindeutig beschrieben werden. Über eine Referenzdatei können Proben identifiziert werden.

Bei der röntgendiffraktometrischen Analyse von LDHs ist besonders störend, dass die Partikel oft nur im Nanoskalenmaßstab vorliegen und nicht genügend Reflexe ergeben. Außerdem liegt in einigen Fällen eine unregelmäßige Stapelfolge der Schichten vor, so dass nur bestimmte Reflexgruppen wie z. B. (001) , $(hk0)$ und $(0k0)$ scharf auftreten, während die übrigen Reflexe unscharf sind oder ganz fehlen.

4.3 Thermogravimetrie und Massenspektroskopie

Bei der Thermogravimetrie (TG) wird die Änderung der Masse einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Diese Masseänderung kann durch verschiedene chemische und physikalische Vorgänge auftreten, z. B. Verdampfung, Dehydratation, Zersetzung oder elektrische Umwandlungen. Anhand von TG-Kurven lassen sich Aussagen über die

Komposition der Probe bei verschiedenen Temperaturen treffen. Als Spülgas können inerte oder oxidierende Gase verwendet werden, z.B. Stickstoff, Helium, Argon bzw. Sauerstoff oder Luft.

Zur Identifizierung von Abspaltungsprodukten wird eine thermogravimetrische Untersuchung typischerweise mit Massenspektroskopie (MS) gekoppelt. Dazu wird ein Massenspektrometer an die Abgasleitung der Zersetzungsprodukte angeschlossen. In dieser Arbeit wurde das MS-Instrument „QMS 403 C Aëolos“ von Netzsch, Deutschland mit der TG-Anlage „STA 409 PC Luxx“ gekoppelt.

Die Proben werden verdampft und durch einen Elektronenstrahl ionisiert. Die geladenen Fragmente werden im magnetischen und elektrostatischen Feld beschleunigt und nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis im Analysator getrennt. Je nach Gewicht und Ladungen der Teilchen beschreiben diese unterschiedliche Flugbahnen innerhalb der Felder, welche dann detektiert werden können.

4.4 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopie ist eine Technik, mit deren Hilfe eine Vergrößerung der Oberfläche oder das Innere eines Objekts abgebildet werden kann. Beim Rasterelektronenmikroskop (REM, engl. scanning electron microscope, SEM) wird der zu untersuchende rechteckige Objektbereich durch einen feinen Elektronenstrahl zeilenweise gerastert.

Beim dem hier eingesetzten Gerät handelt es sich um ein „FEI XL 30“ ESEM-Gerät der Firma Philips/FEI, Eindhoven/Holland. In dieser Arbeit wurden die Interkalationsprodukte mit Hilfe des REM im Größenbereich von 0,01 μm bis 10 μm untersucht. Dabei wird ein fein

fokussierter Elektronenstrahl mit einer Energie von typischerweise 10 - 50 keV auf einen kleinen Punkt der zu untersuchenden Oberfläche gerichtet.

Von der Elektronenquelle wird der primäre Elektronenstrahl produziert, der dann in einem elektrischen Feld beschleunigt wird. Der Elektronenstrahl trifft auf die Probenoberfläche und emittiert sekundäre Elektronen. Diese Sekundärelektronen wandern zur positiv geladenen Detektorelektrode und bedingen Kollisionen zwischen den Sekundärelektronen und Gasmolekülen. Die Ionisierung der Gasmoleküle verstärkt das ursprüngliche Elektronensignal. Die positiv geladenen Gasmoleküle werden von der negativ geladenen Probenoberfläche neutralisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzungen auf den Probenoberflächen erhält man eine unterschiedliche Emittierung von Sekundärelektronen und Signalintensitäten, die letztendlich das Bild der Probe im REM erzeugen.

Für die Untersuchung der LDH-Verbindungen sollte die getrocknete pulverförmige Probe mit Isopropanol stark verdünnt und danach im Ultraschallbad dispergiert werden. Um eine bessere Bildqualität zu gewährleisten, wird der Probenträger mit einer sehr dünnen Schicht der Probelösung bedeckt, sodaß sich keine Agglomerate der untersuchten Probe bilden.

5 Experimenteller Teil

5.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden unter Verwendung von destilliertem Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore Synergy UV) durchgeführt. Das Reinstwasser wurde zusätzlich unter Rühren für 48 h mit Stickstoff gespült, um den Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt zu minimieren.

5.2 Synthese von C₃A

Das verwendete kubische Tricalciumaluminat (C₃A_c, Ca₃Al₂O₆) wurde nach einem Sol-Gel-Verfahren hergestellt [98]. Dazu wurde eine stöchiometrische Mischung von 3 mol CaO und 1 mol Al₂O₃ bei 1450 ° C für 3 Std. kalziniert.

Die resultierende Klinkerphase wurde mit einer Kugelmühle bis zu einer Teilchengröße (d₅₀) von 4 µm gemahlen. Die Teilchengröße des Produkts wurde mittels Lasergranulometrie bestimmt und die Reinheit durch XRD-Messung (JCPDS: 38-1429) bestätigt.

5.3 Synthese von Graphenoxid

Graphenoxid wurde durch Oxidation von natürlichem kommerziellen Graphit mit starken Oxidationsmitteln nach der Methode von *Hummers* und *Offeman* synthetisiert [10]. Um einen besonders hohen Grad an Fragmentierung des Graphits zu erreichen, der für die erfolgreiche Interkalation wesentlich ist, wurde der Reaktionsprozess nach *Hummers* jedoch wie folgt modifiziert.

3 g Naturflockengraphit (5000 mesh, 2.6 μm , Intersci, Jinan/China) und 1,5 g NaNO_3 wurden mit 150 mL konz. H_2SO_4 (95 Gew. %) unter Rühren in einem Eisbad versetzt. Nach 2 Std. wurden 15 g KMnO_4 langsam (2 Std.) und in gleichen Portionen von jeweils 1,25 g alle 10 min. zu der Suspension unter kräftigem Rühren zugesetzt. Die Zugabe von KMnO_4 wurde sorgfältig kontrolliert, um die Temperatur der Suspension unter 20 °C zu halten. Danach wurde das Eisbad entfernt und der Ansatz unter weiterem Rühren auf 35 °C erwärmt. Nach 30 min entsteht eine dickflüssige Suspension, weshalb 230 mL Wasser langsam über 1 Std. in gleichen Portionen alle 10 min. zugegeben werden müssen. Danach wurde auf 98 °C erhitzt und für 30 min gehalten. Die dunkelbraune viskose Suspension wurde anschließend mit 400 mL Wasser und 20 mL H_2O_2 (Konz. 10 Gew. %) verdünnt. Die Suspension wurde nach Zugabe von H_2O_2 gelbbraun. Der Feststoffgehalt des Endprodukts betrug ca. 10 ~ 12 Gew. %. Nach Abkühlung wurde die Suspension bei 8500 rpm für 15 min zentrifugiert und der Rückstand mit destilliertem Wasser bis zum Erreichen eines pH-Wert von 7 gewaschen. Das so hergestellte Graphenoxid besitzt eine nur geringe Wasserlöslichkeit von < 1 %.

Eine 0,05 Gew. %-ige wässrige Lösung des Graphenoxids zeigte einen Kohlenstoffgehalt von 259,5 mg/L (TOC) und einen deutlichen *Tyndall*-Effekt. Die spezifische anionische Ladungsmenge des Graphenoxids betrug - 77,2 C/g, gemessen in dest. Wasser bei pH-Wert 7.

5.4 Synthese von LDH mittels Rehydratation

Die Synthese des Ca_2Al -Graphenoxid-LDHs erfolgte mittels Rehydratation von C_3A in Gegenwart von Graphenoxid.

Zur Synthese wurde 1 g Tricalciumaluminat zu 100 mL einer kolloidalen Graphenoxid-Suspension (Konz. 0,05 Gew. %, pH = 11.0 mit NaOH) bei Raumtemperatur gegeben. Der Ansatz wurde stark gerührt, um eine feine Verteilung von C_3A zu gewährleisten, und mit

Stickstoff gespült, um eine unerwünschte Carbonatisierung während der Reaktion zu vermeiden.

Die Reaktion dauerte 48 Stunden. Die erhaltene bräunliche Suspension wurde mit 20 mL DI Wasser gewaschen, dann zentrifugiert und anschließend der Feststoff durch Dekantieren der überstehenden Lösung gewonnen. Der Feststoff wurden nach dreimaligem Waschen und Zentrifugieren im Exsikkator unter 30 mbar mehrere Tage getrocknet.

5.5 Synthese der Enzym-LDHs mittels Kopräzipitation

Die Synthese der Mg_2Al -Papain-LDH- und Mg_2Al -Cellulase-LDH-Interkalationsverbindungen erfolgte mittels Kopräzipitation von $Mg(NO_3)_2$ und $Al(NO_3)_3$ in Gegenwart der Enzyme.

Für die Synthese des Mg_2Al -Papain-LDHs wurden zuerst 100 mL einer wässrigen Lösung von 2,5 g Papain hergestellt. Der pH-Wert wurde auf 9,0 mit 50 Gew. %-iger Natronlauge eingestellt. Dann wurde eine Lösung von 1,888 g $Mg(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ ($8 \cdot 10^{-3}$ mol) und 1,5 g $Al(NO_3)_3 \cdot 9 H_2O$ ($4 \cdot 10^{-3}$ mol) in 40 mL Wasser hergestellt. Die $Mg(NO_3)_2$ bzw. $Al(NO_3)_3$ enthaltende Lösung war 0,2 bzw. 0,1 M. Diese Lösung wurde zusammen mit 40 mL einer 0,5 M Natronlauge zu der vorgelegten wässrigen Papain-Lösung innerhalb von 40 min zugetropft. Der pH-Wert wurde bei 9,0 gehalten. Der erhaltene gelbliche Niederschlag wurde bei 8500 rpm zentrifugiert, mit 20 mL destilliertem Wasser einmal gewaschen und der Rückstand im Exsikkator unter vermindertem Druck (20 mbar) bei Raumtemperatur über Silicagel getrocknet. Die Ausbeute betrug $1,5 \pm 0,3$ g.

Mg_2Al -Cellulase-LDH wurde in analoger Weise wie Mg_2Al -Papain-LDH hergestellt, jedoch wurden statt 2,5 g Papain 1,0 g Cellulase in 100 mL Wasser gelöst. Mit 50 Gew. %-iger

Natronlauge wurde der pH-Wert der Lösung auf 9.6 eingestellt. Der nach obigem Verfahren erhaltene weiße Niederschlag wurde zentrifugiert, gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute betrug $1,5 \pm 0,2$ g.

5.6 Aktivitätsbestimmung von Papain

Die Aktivität von Papain wurde nach Literaturangaben bestimmt [4, 5]. 40 mM Phosphatpufferlösung (pH = 7) wurde durch Zugabe von 1,167 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat und 3,093 g Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat in 500 ml Wasser hergestellt. 23 mg DL-Dithiothreitol (DTT) wurden in 50 mL dieses Phosphatpuffers gelöst. Papain wurde durch Zugabe von 10 mL der DTT-Phosphatpuffer-Lösung zu 20 mL der 2,5 Gew. %-igen Papain-Lösung aktiviert. Des Weiteren wurde eine L-BAPNA-Lösung in Dimethylsulfoxid (Konz. 32 mg/mL) angefertigt. 20 μ L der L-BAPNA-Lösung wurde zu 1 mL der aktivierten Papainlösung (1 mg/mL) zugesetzt, und die Lösung bei einer Wellenlänge von 410 nm mit UV/Vis-Spektroskopie vermessen.

5.7 Aktivitätsbestimmung von Cellulase

Die Aktivität von Cellulase wurde durch Filterpapieraktivität-Assay bestimmt [6 - 8]. 0,5 mL einer Cellulase-Lösung (Konz. 1.0 Gew. %) wurden zu 1 mL 0,05 mM Natriumzitat-Puffer (pH = 4.8) zugesetzt. Danach wird ein Filterpapier (1,0 \times 6,0 cm, ~ 50 mg) bei 50 °C gegeben. Nach 60 min Inkubation wurden 3,0 mL der flüssigen 3, 5-Dinitrosalicylsäure (DNS) zugegeben, um die Reaktion zu beenden. Die Lösung wurde für 5 min gekocht und mit 20 mL Wasser verdünnt.

Nach Abkühlung wurde die Mischung filtriert. Das Filtrat wurde bei 540 nm mit UV/Vis Spektroskopie vermessen. Als Kalibrierungsstandard wurde Glucose verwendet.

5.8 Materialien und Chemikalien

Das eingesetzte Enzym Papain wurde aus *Carica papaya* extrahiert (Sigma Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri/USA). Von der gleichen Firma wurden auch N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid (L-BAPNA) und DL-Dithiothreitol (DTT) bezogen und für die Aktivitätsbestimmung von Papain eingesetzt.

Das Enzym Cellulase (Sigma Aldrich) wurde aus *Aspergillus Niger* extrahiert. Das für die Cellulase-Aktivitätsmessung eingesetzte Filterpapier und die Glucose waren von Whatman (Maidstone/England) bzw. VWR (Darmstadt/Deutschland). 3, 5-Dinitrosalicylsäure und Zitronensäure-Monohydrat wurden von Sigma Aldrich bezogen.

Der bei der Graphenoxidsynthese verwendete natürliche Graphit (5000 mesh, 2,6 µm) wurde von der Firma Intersci (Jinan/China) erhalten.

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 3** aufgeführt. Sie wurden ausschließlich von der Firma Merck (Darmstadt/Deutschland) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

CAS-Nr.	Chemikalie
7784-27-2	Aluminiumnitrat-nonahydrat
13477-34-4	Calciumnitrat-tetrahydrat
67-68-5	Dimethylsulfoxid
7782-85-6	Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat
7722-64-7	Kaliumpermanganat
13446-18-9	Magnesiumnitrat- Hexahydrat
10049-21-5	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
1310-73-2	Natriumhydroxid
7631-99-4	Natriumnitrat
7757-82-6	Natriumsulfat
7647-01-0	Salzsäure (37 %)
7664-93-9	Schwefelsäure (95 %)
7722-84-1	Wasserstoffperoxid

6 Zusammenfassung und Ausblick

6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Synthese und Eigenschaften von Hydrotalcit-artigen bzw. Hydrocalumit-artigen LDHs mit negativ geladenen Enzymen oder Graphenoxid in der Zwischenschicht untersucht.

Die Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wurde die Interkalation der Enzyme Papain bzw. Cellulase in Hydrotalcit-artige Schichtstrukturen untersucht. Sowohl Papain als auch Cellulase sind wasserlöslich. Als erstes wurden die Ladungsdichten der Enzyme bei pH-Werten gemessen, bei denen sie noch aktiv sind. Es wurde gefunden, dass beide Enzyme bei $\text{pH} > 7$ negativ geladen sind. Verschiedene Synthesemethoden und Parameter wie Temperatur, pH-Wert, Reaktionszeit und -geschwindigkeit wurden dann untersucht, um die optimalen Bedingungen zur Herstellung möglichst reiner Interkalationsverbindungen zu ermitteln. Es wurde festgestellt, dass Kopräzipitation die beste Synthesemethode für Enzym-LDHs darstellt. Die Kopräzipitationsreaktionen wurden bei pH 9,0 (Papain) bzw. 9,6 (Cellulase) durchgeführt. Anschließend wurden die synthetisierten Interkalationsverbindungen gealtert und gewaschen. Zur Verhinderung der Karbonatisierung wurden die Synthesen unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt und die Reaktionsprodukte nach dem Waschen unter Vakuum im Exsikkator getrocknet. Trocknen im Ofen ist ungeeignet, da sich aus den LDHs bei hoher Temperatur u. U. kubischer Katoit bilden kann.

Die Mg_2Al -Enzym-LDHs wurden bezüglich Stabilität, Eigenschaften und Hydratwassergehalt untersucht. Ihre Zusammensetzung konnte mittels Röntgendiffraktometrie, Röntgenkleinwinkelstreuung, Infrarotspektroskopie und Elementaranalyse bestimmt werden. Infolge

Interkalation der relativ großen Enzyme-Moleküle kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Schichtabstände im LDH im Vergleich zum Mg_2Al-NO_3 -LDH, das als Nebenprodukt bei der Kopräzipitation von Magnesiumnitrat und Aluminiumnitrat anfällt. Die Synthesen der Enzym-LDHs ergaben mehr oder weniger kristalline Verbindungen mit z. T. breiten Reflexen in den Röntgendiffraktogrammen. Die aus den Röntgendiffraktogrammen abgeschätzten d -Werte der LDHs konnten anhand von SAXS-Messungen bestätigt werden.

Die Temperaturstabilität der Enzym-LDHs wurde mittels Thermogravimetrie untersucht. Das LDH-Gerüst bewirkt eine deutliche Erhöhung der thermischen Stabilität der Enzyme. Die in die Mg_2Al -LDH-Struktur interkalierten Enzyme zersetzen sich erst ab 400 °C. Im Gegensatz dazu begann der Abbau der reinen Enzyme bereits bei 250 °C.

Mittels Anionenaustausch (hier mit Sulfat-Anionen durchgeführt) können die Enzyme aus der LDH-Gerüststruktur freigesetzt werden. Die Enzyme werden durch Interkalation nicht denaturiert oder zerlegt. Nach Deinterkalation durch Sulfataustausch zeigen die freigesetzten Enzyme ihren ursprünglichen hydrodynamischen Durchmesser und weiterhin enzymatische Aktivität.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde Graphenoxid in Hydrocalumit-artige Schichtstrukturen interkaliert. Dazu wurde zunächst Graphenoxid durch Oxidation von Graphit mittels Schwefelsäure, Natriumnitrat und Kaliumpermanganat hergestellt. Die synthetisierten Graphenoxid-Lösungen wiesen Feststoffgehalte im Bereich von 10 - 12 Gew. % auf. Durch Variationen der Mengen an Oxidationsmitteln und Reaktionszeiten konnten die Farben der produzierten Graphenoxide von dunkelbraun über graugrün bis gelbbraun variiert werden, entsprechend den unterschiedlichen Oxidationsgraden. Elementaranalytische, elektronenmikroskopische und MALDI-TOF-Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Menge an Oxidationsmitteln und verlängerte Reaktionszeiten zu einem stärkeren Oxidationsgrad und zu einer deutlichen Fragmentierung der Graphitschichten führen.

Im getrockneten Produkt war die Schichtstruktur des Ausgangsstoffes Graphit erhalten, wie röntgendiffraktometrische Messungen zeigten. Dieses Produkt ist demnach als Graphitoxid zu bezeichnen. Der Schichtabstand ($\sim 0,7$ nm) betrug aber ungefähr das Doppelte von demjenigen im Graphit. IR- und NMR-spektroskopische Messungen zeigten, dass das Graphitoxid Oxogruppen wie Carbonsäure-, Hydroxy- sowie Phenolgruppen am Rand der Kohlenstoffschichten enthielt. Weiterhin wurden Epoxidgruppen beobachtet. In wässriger Lösung exfoliiert das Graphitoxid hingegen zu einzelnen Graphenoxid-Folien.

Anschließend sollte die Interkalationsfähigkeit des synthetisierten Graphenoxids in eine Hydrocalumit-artige Doppelschichtstruktur überprüft werden, wie sie bei der Hydratation von Tricalciumaluminat gebildet wird.

In alkalischer Lösung wird Graphenoxid deprotoniert und weist eine negative Ladung auf. Es zeigte sich, dass eine stärkere Fragmentierung der Graphitfolien während des Oxidationsprozesses stets eine höhere anionische Ladung bedingt. Besonders kleine Graphenoxide mit sehr hoher negativer Ladung zeigten die beste Interkalationsfähigkeit.

Ca_2Al -Graphenoxid-LDHs sind am besten durch Rehydratation von C_3A zugänglich. Bei Kopräzipitation und Anionenaustausch wurden nur geringe Umsätze und stattdessen zahlreiche Nebenprodukte wie $\text{Ca}_2\text{Al-NO}_3$ -LDHs beobachtet. Bei Durchführung der Rehydratation von C_3A in Gegenwart von Graphenoxid spielt die Temperatur eine wichtige Rolle. Bei Raumtemperatur oder niedrigeren Temperaturen ergaben sich die reinsten Produkte. Höhere Temperaturen führen bevorzugt zur Bildung von Katoit. Um bessere Kristallinität zu erreichen, sollten die Interkalationsprodukte mindestens 24 Stunden durch einfaches Stehenlassen bei Raumtemperatur gealtert werden.

Das Röntgendiffraktogramm der so erhaltenen Ca_2Al -Graphenoxid-LDHs zeigte ein gut kristallines Produkt mit klar erkennbaren (001)-Reflexen bei einem d -Wert (Zwischenschicht-

abstand) von 1,05 nm. Er wurde mittels SAXS-Messung bestätigt. Gemäß den SAXS-Messungen weisen die Graphenoxid-LDH-Partikel einen Trägheitsradius von 36 nm, einen Querschnittsradius von 17 nm und eine Korrelationslänge der Lamellenstruktur von 109 nm auf (= Formfaktoren der LDH-Partikel). Mittels IR-Spektroskopie wurde neben den LDH-Verbindungen auch CaCO_3 als Verunreinigung im Produkt identifiziert. Thermogravimetrische Untersuchungen bestätigen eine erhöhte thermische Stabilität des eingelagerten Graphenoxids. Schichtstruktur und folienartige Morphologie der Graphenoxid-LDHs wurden mittels Elektronenmikroskopie (REM, TEM) bestimmt. Mit Hilfe der TEM-Aufnahmen konnten die d-Werte aus der Röntgendiffraktometrie bestätigt werden.

6.2 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verhalten der Enzyme Papain bzw. Cellulase und von Graphenoxid bezüglich Interkalation in LDH-Strukturen nur hinsichtlich einiger Aspekte untersucht.

Zukünftige Arbeiten könnten z. B. mehr anwendungsorientiert sein. So verdient die Fähigkeit der Cellulase, Polysaccharide abzubauen, besonderes Interesse. So könnte Cellulase beispielsweise das Biopolymer Guar (Guar gum, ein Polysaccharid auf Galactomannan-Basis, welches als Verdickungsmittel beim Fracking eingesetzt wird), nach dem Ende des Einpressens abbauen und damit die Viskosität der Frac-Flüssigkeit reduzieren. Durch zeitlich gesteuerte Freisetzung der Cellulase aus Interkalationsverbindungen könnte eine kontrollierte Zersetzung des Guargels erfolgen.

Die Interkalationsverbindung von Graphenoxid in Hydrocalumit-artige LDHs könnte als Betonzusatzmittel interessant sein. Das im Zement stets enthaltene Sulfat könnte das Graphenoxid freisetzen und dieses evt. eine deutliche Erhöhung der Druckfestigkeit des erhärteten Betons herbeiführen – eine Nanoarmierung sozusagen, als Alternative zur Stahl- oder Faserarmierung. Schließlich sollte die ungewöhnliche Chemie und Struktur des stark oxidierten Graphenoxids Möglichkeiten in elektrochemischen Anwendung bieten.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Weiss, A., "A Secret of Chinese Porcelain Manufacture", *Angew. Chem. internat. Edit.*, 2, **1963**, 697 - 703.
- [2] Evans, D. G., Slade, R. C. T., "Structural Aspects of Layered Double Hydroxides", *Struct. Bond*, 119, **2006**, 1 - 87.
- [3] Lipson, H., Stokes, A. R., "A New Structure of Carbon", *Nature*, 149, **1942**, 328.
- [4] Walley, P., Zhang, Y., Evans, J. R., „Self-assembly of montmorillonite platelets during drying“, *Bioinspir. Biomim.* 7, **2012**, 046004.
- [5] Kamphuis, I.G., Drenth, J., Baker, E.N., "Thiol proteases. Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain", *J. Mol. Biol.*, 182, **1985**, 317 - 329.
- [6] Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., "The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin", *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, **1961**, 271 - 278.
- [7] Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., "Measurement of saccharifying cellulase", *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, **1976**, 21 - 33.
- [8] Eveleigh, D.E., Mandels, M., Andreotti, R., Roche, C., "Measurement of saccharifying cellulase", *Biotechnol. Biofuels.*, 2, **2009**, 21.
- [9] Ghose, T.K., "Measurement of cellulase activities", *Pure Appl. Chem.* 59, **1987**, 257 - 268.
- [10] Hummers, W.S., Offeman, R.E., "Preparation of Graphitic Oxide", *J. Am. Chem. Soc.*, 80, **1958**, 1339 - 1340.
- [11] Feitknecht, W., "Über die Bildung von Doppelhydroxiden zwischen zweiwertigen und dreiwertigen Metallen", *Helv. Chim. Acta*, 25, **1942**, 555-569.

-
- [12] Allmann, R., "Doppelschichtstrukturen mit brucitähnlichen Schichtionen $[\text{Me}^{(\text{II})}_{1-x}\text{Me}^{(\text{III})}_x(\text{OH})_2]^{x+}$ ", *Chimia*, 24, **1970**, 99 - 108.
- [13] Tronto, J., Bordonal, A.C., Naal, Z., Valim, J.B., "Conducting Polymers / Layered Double Hydroxides Intercalated Nanocomposites", *Materials Science - Advanced Topics*, **2013**.
- [14] Weir, M.R., Moore, J., Kydd, R.A., "Conducting Polymers/Layered Double Hydroxides Intercalated Nanocomposites", *Microporous and Mesoporous Materials*, 20, **1998**, 339 - 347.
- [15] Besserguenev, A.V., Fogg, A.M., Francis, R.J., Price, S.J., O'Hare, D., Isupov, V.P., Tolochko, B.P., "Synthesis and Structure of the Gibbsite Intercalation Compounds $[\text{LiAl}(\text{OH})_6]\text{X}$ {X = Cl, Br, NO_3 } and $[\text{LiAl}_2(\text{OH})_6]\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ Using Synchrotron X-ray and Neutron Powder Diffraction", *Chem Mater*, 9, **1997**, 241 - 247.
- [16] Khan, A., O'Hare, D., "Intercalation chemistry of layered double hydroxides: recent developments and applications", *J. Mat. Chem.*, 12, **2002**, 3191 - 3198.
- [17] Allmann, R., "The crystal Structure of Pyroaurite and Sjogrenite", *Acta Crystallogr. B*, 24, **1968**, 972 - 977.
- [18] Allmann, R., Jepsen, H.P., "Die struktur des hydrotalkits", *Neues Jb. Min. Mh.*, **1969**, 544-551.
- [19] Ingram, L., Taylor, H.F.W., "The Crystal Structures of Sjögrenite and Pyroaurite", *Mineral. Mag.*, 36, **1967**, 465 - 479.
- [20] Frondel, C.F., "The System of Mineralogy of James Dwight Dana and Edward Salisbury Dana", *Amer. Mineral.*, 26, **1951**, 295 - 301.
- [21] Plank, J., Stephan, D., Hirsch, C., "Chemische Technik – Prozesse und Produkte", *Bauchemie*, Sonderdruck, Band 7: Industrieprodukte, Winnacker/Küchler, 5. Auflage, **2004**.

-
- [22] Gartner, E.M., Young, J.F., Damidot, D., Jawed, I., “Hydration of Portland cement; Structure and Performance of Cements”, 2nd Edition, Bensted, J., Barnes, P., Spon Press, London, **2002**, 25 - 56.
- [23] Stein, H.N., “Some characteristics of the hydration of $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$ with water in the presence of $\text{CaSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ”, *J. Appl. Chem.*, 15, **1965**, 314 - 325.
- [24] Fierens, P., Verhaegen, A., Verhaegen, J. P., “Thermoluminescence by the hydration of tricalcium aluminate”, *Com. Concr. Res.*, 4, **1974**, 381 - 387.
- [25] Colleparidi, M., Baldini, G., Pauri, M., Corradi, M., “Tricalcium aluminate hydration in the presence of lime, gypsum or sodium sulphate”, *Cem. Concr. Res.*, 8, **1978**, 571 - 580.
- [26] Feldman, R.F., Ramachandran, V.S., “Character of hydration of $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$ ”, *J. Amer. Cer. Soc.*, 49, **1966**, 268 - 273.
- [27] Leroux, F., Besse, J.P., “Polymer Interleaved Layered Double Hydroxide: A New Emerging Class of Nanocomposites”, *Chem. Mater.*, 13, **2001**, 3507 - 3515.
- [28] Meyn, M., Beneke, K., Lagaly, G., “Anion-exchange reactions of layered double hydroxides”, *Inorg. Chem.*, 29, **1990**, 5201 - 5207.
- [29] Millange, F., Walton, R. I., Lei, L., O’Hare, D., “Efficient Separation of Terephthalate and Phthalate Anions by Selective Ion-Exchange Intercalation in the Layered Double Hydroxide $\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6\cdot\text{NO}_3\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ”, *Chem. Mater.*, 12, **2000**, 1990 - 1994.
- [30] Sacerdoti M., Passaglia E., “Hydrocalumite from Latium, Italy: its crystal structure and relationship with related synthetic phases”, *Neues Jahrbuch für Mineralogie Monatshefte*, **1988**, 462 - 475.
- [31] Alberti, G., Constantino, U., “Solid-State Supramolecular Chemistry: Two- and Three-Dimensional Inorganic Networks”, *Comprehensive supramolecular chemistry*, 7, Pergamon-Elsevier, Oxford, **1996**, 1 - 23.

-
- [32] Bruce, D.W., O'Hare, D., *Inorganic Materials*, 2nd Edition, **1996**.
- [33] Whittingham, M.S., Jacobsen, A.L., *Intercalation Chemistry*, Academic Press, New York, **1982**.
- [34] Lévy, F.A., *Schichtverbindungen: Intercalated Layered Materials*, D. Reidel Publishing, Dordrecht, **1979**.
- [35] Schöllhorn, R., "Reversible Topotactic Redox Reactions of Solids by Electron/Ion Transfer", *Angew. Chem., Int. Ed.*, 19, **1980**, 983 - 1003.
- [36] Schöllhorn, R. "Intercalation chemistry", *Physica B+C*, 99, **1980**, 89 - 99.
- [37] Evans, J.S.O., Price, S.J., Wong, H., O'Hare, D., "Kinetic Study of the Intercalation of Cobaltocene by Layered Metal Dichalcogenides using Time-Resolved In-Situ X-ray Powder Diffraction", *J. Am. Chem. Soc.* 120, **1998**, 10837 - 10846.
- [38] O'Hare, D., Evans, J.S.O., Fogg, A., O'Brien, S., "Time-resolved, in situ X-ray diffraction studies of intercalation in lamellar hosts", *Polyhedron*, 19, **2000**, 297 - 305.
- [39] Williams, G.R., Khan, A.I., O'Hare, D., "Kinetics and mechanistic Studies of Intercalation in Layered Double Hydroxides using Time-Resolved, in-Situ Powder Diffraction", *Struct. Bond*, 119, **2006**, 161 - 192.
- [40] Leroux, F., Taviot-Guého, C., "Fine tuning between organic and inorganic host structure: new trends in layered double hydroxide hybrid assemblies", *Mater. Chem.*, 15, **2005**, 3628 - 3642.
- [41] Renaudin, G., and François, M., "The lamellar double-hydroxide (LDH) compound with composition $3\text{CaO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3\cdot\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ", *Acta Cryst.*, C55, **1999**, 835-838.
- [42] Choy, J.H., Kwak, S.Y., Jeong, Y.J., Park, J.S., "Inorganic Layered Double Hydroxides as Nonviral Vectors", *Angew. Chem. Int.*, 39, **2000**, 4041 - 4045.

-
- [43] Desigaux, L., Belkacem, M.B., Richard, P., Cellier, J., Léone, P., Cario, L., Leroux, F., Taviot-Guého, C., Pitard, B., “Self-assembly and characterization of layered double hydroxide/DNA hybrids”, *Nano Lett.*, 6, **2006**, 199 - 204.
- [44] Plank, J., Hoessle, F., “Formation of an inorganic-organic host-guest material by intercalation of acetone formaldehyde sulfite polycondensate into a hydrocalumite structure”, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 636, **2010**, 1533 - 1537.
- [45] Plank, J., Yu, B., Bian, H., “Self-assembly and characterization of Ca-Al-LDH nanohybrids containing casein proteins as guest anions”, *J. Phys. Chem. Sol.*, 71, **2010**, 468 - 472.
- [46] Mudhivarathi, V.K., Bhambhani, A., Kumar, C.V., “Novel enzyme/DNA/inorganic nanomaterials: a new generation of biocatalysts”, *Dalton Trans.*, 47, **2007**, 5483 - 5497.
- [47] Messersmith P.B., Stupp S.I., “Synthesis of Nanocomposites - Organoceramics”, *J. Mater. Res.*, 7, **1992**, 2599 - 2611.
- [48] Perrotta, A.J., Williams, F., “Hydrocalumite formation in Bayer liquor and its promotional effect on oxalate precipitation”, *Light Metals.*, 201, **1995**, 77 - 87.
- [49] De Roy, A., Forano, C., El Malki, K., Besse, J.P., “Anionic clays: Trends in pillaring chemistry”, *Synth. Microporous Mater.*, **1992**, 108 - 169.
- [50] Reichle, W.T., “Synthesis of anionic clay minerals (mixed metal hydroxides, hydrotalcite)”, *Solid State Ionics*, 22, **1986**, 135 - 141.
- [51] Frost, R.L., Musumeci, A.W., “Nitrate absorption through hydrotalcite reformation”, *J. Colloid Interface Sci.*, 302, **2006**, 203 - 206.
- [52] Messersmith, P.B., Giannelis, E.P., “Synthesis and Characterization of Layered Silicate-Epoxy Nanocomposites”, *Chem. Mater.*, 6, **1994**, 1719 - 1725.

-
- [53] De Roy, A., Forano, C., Besse, J.P., Layered Double Hydroxides: Present and Future. Nova Science Publishers Inc, New York, **2001**.
- [54] Choi, M.H., Chung, I.J., Lee, J.D., "Morphology and curing behaviors of phenolic resin-layered silicate nanocomposite prepared by melt intercalation", *Chem. Mater.*, **12**, **2000**, 2977 - 2983.
- [55] Morel-Desrosiers, N., Pisson, J., Israëli, Y., Taviot-Guého, C., Besse, J.P., Morel, J.P., "Intercalation of dicarboxylate anions into a Zn-Al-Cl layered double hydroxide: Microcalorimetric determination of the enthalpies of anion exchange", *J. Mater. Chem.*, **13**, **2003**, 2582 - 2585.
- [56] Israëli, Y., Taviot-Guého, C., Besse, J.P., Morel, J.P., Morel-Desrosiers, N., "Thermodynamics of anion exchange on a chloride-intercalated zinc-aluminum layered double hydroxide: a microcalorimetric study", *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2000**, 791 - 796.
- [57] He, J., Wei, M., Li, B., Kang, Y., Evans, D.G., Duan, X., "Preparation of Layered Double Hydroxides", *Struct. Bond.*, **119**, **2006**, 89 - 119.
- [58] Erickson, K.L., Bostrom, T.E., Frost, R.L., "A study of structural memory effects in synthetic hydrotalcites using environmental SEM", *Mater. Lett.*, **59**, **2005**, 226 - 229.
- [59] Stanimirova, T.S., Kirov, G., "Mechanism of hydrotalcite regeneration", *J. Mater. Sci. Lett.*, **20**, **2001**, 453 - 455.
- [60] Marchi, A.J., Apesteguía, C.R., "Impregnation-induced memory effect of the thermally activated layered double hydroxides", *Appl. Clay. Sci.*, **13**, **1998**, 35 - 48.
- [61] Rocha, J., del Arco, M., Rives, V., Ulibarri, M.A., "Reconstruction of layered double hydroxides from calcined precursors: a powder XRD and ^{27}Al MAS NMR study", *J. Mater. Chem.*, **9**, **1999**, 2499 - 2503.

-
- [62] Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J., *Biochemie*, 14. Auflage, New York, **1994**, 47 - 71.
- [63] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin, **2003**.
- [64] Webb, E.C., *Enzyme nomenclature*, Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, San Diego, **1992**.
- [65] Bairoch, A., "The ENZYME database in 2000". *Nucleic. Acids. Res.*, 28, **2000**. 304 - 305.
- [66] Wurtz, A., Bouchut, E., "Sur le ferment digestif du Carica papaya", *CR Acad Sci Paris*, 89, **1879**, 425 - 428.
- [67] Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B., Drenth, J., "Structure of papain refined at 1.65 Å resolution", *J. Mol. Biol.*, 179, **1984**, 233 -256.
- [68] Cohen, L.W., Coghlan, V.M., Dihel, L.C., "Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA", *Gene*, 48, **1986**, 219 - 228.
- [69] Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G., "Structure of Papain", *Nature*, 218, **1968**, 929 - 932
- [70] Vernet, T., Berti, P.J., de Montigny, C., Musil, R., Tessier, D.C., Ménard, R., "Processing of the papain precursor. The ionization state of a conserved amino acid motif within the Pro region participates in the regulation of intramolecular processing", *J. Biol. Chem.* 270, **1995**, 10838 - 10846.
- [71] Taylor, M.A., Pratt, K.A., Revell, D.F., Baker, K.C., Sumner, I.G., Goodenough, P.W., "Active papain renatured and processed from insoluble recombinant propapain expressed in *Escherichia coli*", *Protein Eng.*, 5, **1992**, 455 - 459.
- [72] Revell, D.F., Cummings, N.J., Baker, K.C., Collins, M.E., Taylor, M.A., Sumner, I.G., Pickersgill, R.W., Connerton, I.F., Goodenough, P.W., "Nucleotide sequence and

-
- expression in *Escherichia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*”, *Gene*, 7, **1993**, 221 - 225.
- [73] Zverlov, V., Mahr, S., Riedel, K., “Properties and gene structure of a bifunctional cellulolytic enzyme (celA) from the extreme thermophile *Anaerocellum thermophilum* with separate glycosyl hydrolase family 9 and 48 catalytic domains”, *Microbiology*, 144, **1998**, 457 - 465.
- [74] Gibbs, M.D., Saul, D.J., Luthi, E., Bergquist, P.L., “The β -mannanase from ‘*Caldocellum saccharolyticum*’ is part of a multidomain enzyme”, *App. Environ. Microbiol.* 58, **1992**, 3864 - 3867.
- [75] Sulzenbacher, G., Shareck, F., Morosoli, R., Dupont, C., Davies, G.J. “The *Streptomyces lividans* family 12 endoglucanase: construction of the catalytic cre, expression, and X-ray structure at 1.75 Å resolution”. *Biochemistry* 36, **1997** 16032 - 16039
- [76] Wood, T.M., McCrae, S.I., “Synergism between Enzymes Involved in the Solubilization of Native Cellulose”, *Adv. Chem. Ser.*, 181, **1979**, 181 - 209.
- [77] Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G., “Structure of papain”, *Nature*, 218, **1968**, 929 - 932.
- [78] Chellapandi, P., Jani, H.M., “Production of endoglucanase by the native strains of *Strptomyces* isolates in submerged fermentation”, *Bra. J. Microbiol.*, 39, **2008**, 122 - 127.
- [79] Karmakar, M., Ray, R.R., “Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases”, *Res. J. Microbiol.*, 6, **2011**, 41 - 53.
- [80] Geim, A.K., Novoselov, K.S., “The rise of grapheme”, *Nat. Mater.*, 6, **2007**, 183 - 191.
- [81] Boehm, H.P., Clauss, A., Fischer, G.O., Hofmann, U., “Das Adsorptionsverhalten sehr dünner Kohlenstoffolien”, *ZAAC*, 316, **1962**, 119 - 127.

-
- [82] Brodie, B.C., "On the Atomic Weight of Graphite", *Proceedings of the Royal Society of London*. 10, **1859**.
- [83] Kohlschütter, V., Haenni, P., "Zur Kenntnis des Graphitischen Kohlenstoffs und der Graphitsäure", *ZAAC*, 105, **1918**, 121 - 144.
- [84] Boehm, H.P., Setton, R., Stumpp, E., "Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds", *Pure Appl. Chem.*, 66, **1994**, 1893 - 1901.
- [85] Schniepp, H.C., Li, J.L., McAllister, M.J., Sai, H., Herrera-Alonso, M., Adamson, D.H., Prud'homme, R.K., Car, R., Saville, D.A., Aksay, I.A., "Functionalized Single Graphene Sheets Derived From Splitting Graphite Oxide", *J. Phys. Chem. B.*, 110, **2006**, 8535 - 8539.
- [86] Geim, A.K., Novoselov, K.S., The Nobel Prize in Physics 2010, Nobel Foundation Announcement, **2010**.
- [87] Wallace, P.R., "The Band Theory of Graphite", *Phys. Rev.*, 71, **1947**, 622 - 634.
- [88] Iijima, S., "Helical microtubules of graphitic carbon", *Nature*. 354, **1991**, 56 - 58.
- [89] Fujita, M., Saito, R., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M.S., "Formation of general fullerenes by their projection on a honeycomb lattice", *Phys. Rev. B.*, 45, **1992**, 13834 - 13836.
- [90] Hea, H., Klinowska, J., Forsterb, M., Lerf, A., "A new structural model for graphite oxide", *Chem. Phys. Lett.*, 287, **1998**, 53 - 56.
- [91] Stankovich, S., Piner, R.D., Chen, X., Wu, N., Nguyen, S.T., Ruoff, R.S., "Stable Aqueous Dispersions of Graphitic Nanoplatelets via the Reduction of Exfoliated Graphite Oxide in the Presence of Poly(Sodium 4-Styrenesulfonate) ", *J. Mater. Chem.*, 16, **2006**, 155 - 158.
- [92] Guinier, A., *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*, 206, **1938**, 1374 - 1376.

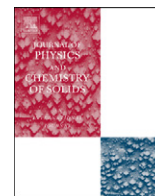
-
- [93] Glatter, O., Kratky, O., *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**.
- [94] Kratky, O., Porod, G., "Diffuse small-angle scattering of X-rays in colloid systems", *J. Colloid Sci.*, 4, **1949**, 35 - 70.
- [95] Debye, P., Bueche, A.M., "Scattering by an Inhomogeneous Solid", *J. Appl. Phys.*, 20, **1949**, 518 - 525.
- [96] West, A.R., *Grundlagen der Festkörperchemie*, VCH Weinheim, **1992**, 131 - 224.
- [97] Weller, M.T. *Anorganische Materialien*, VCH Weinheim, **1996**, 20 - 50.
- [98] Wesselsky, A., Jensen, O.M., "Synthesis of pure Portland cement phases", *Cem. Concr. Res.*, 39, **2009**, 973 - 980.

Paper 1

**Intercalation of Papain Enzyme into Hydrotalcite Type Layered Double
Hydroxide**

Nan Zou, Johann Plank

Journal of Physics and Chemistry of Solids, 73 (2012) 1127-1130.



Intercalation of papain enzyme into hydrotalcite type layered double hydroxide

N. Zou, J. Plank*

Technische Universität München, Lehrstuhl für Bauchemie, Lichtenbergstr. 4, 85747 Garching bei München, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 November 2011

Received in revised form

26 April 2012

Accepted 28 April 2012

Available online 19 May 2012

Keywords:

A. Nanostructures

B. Chemical synthesis

B. Electron microscopy

C. Thermogravimetric analysis (TGA)

C. X-ray diffraction

ABSTRACT

Intercalation of proteolytic enzyme papain into hydrotalcite type LDH structure was achieved by controlled co-precipitation at pH=9.0 in the presence of papain. Characterization of the MgAl–papain–LDH phase was carried out using X-ray powder diffraction (XRD), elemental analysis, infrared spectroscopy (IR) and thermogravimetry (TG). According to XRD, papain was successfully intercalated. The *d*-value for the basal spacing of MgAl–papain–LDH was found at ~5.3 nm. Consequently, original papain (hydrodynamic diameter ~7.2 nm) attains a compressed conformation during intercalation.

Formation of MgAl–papain–LDH was confirmed by elemental analysis and transmission electron microscopy (TEM). Under SEM, MgAl–papain–LDH phases appear as nanothin platelets which are intergrown to flower-like aggregates. Steric size and activity of the enzyme was retained after deintercalation from MgAl–LDH framework, as was evidenced by light scattering and UV/vis measurements. Thus, papain is not denatured during intercalation, and LDH is a suitable host structure which can provide a time-controlled release of the biomolecule.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Papain is a proteolytic enzyme contained in the latex from the fruit of the papaya tree. It is used in many diverse applications, e.g. to decompose tough meat fibers, protein toxins in the venom and also to dissociate cells in the first step of cell culture preparations. Papain is made of 345 amino acid residues and possesses a molecular weight of ~23 kDa. Its three-dimensional structure consists of two distinct domains with a cleft between them. The protein contains signal sequence (1–18), a propeptide (19–133) and the mature peptide (134–345). It consists of 7 helix, 9 strands and 2 turns [1].

Layered double hydroxides (LDHs) are antitypes of clay minerals. Opposite to clays, they are composed of positively charged inorganic layers and exchangeable interlayer anions. As such, simple inorganic anions like Cl^- , CO_3^{2-} , NO_3^- and SO_4^{2-} , but also larger anions such as polyelectrolytes or biopolymers can intercalate into the inorganic framework [2,3]. The general composition of LDHs can be described as $[[\text{M}_1^{II-x}\text{M}_x^{III}](\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot y\text{H}_2\text{O}$, whereby M^{II} are divalent, M^{III} are trivalent cations and A presents the intercalated anion. Hydrotalcite is a layered double hydroxide of the composition $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}]\text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [4]. Its structure derives from brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$). In the interlayer space

between the cationic main sheets, both CO_3^{2-} anions and H_2O molecules are intercalated.

Recently, intercalates prepared from biomolecules such as amino acids [5], DNA [6], nucleoside monophosphate [7] and enzymes [8,9] found considerable interest in medicine as drug delivery systems [10,11] and in biosensor applications.

2. Experimental

2.1. Starting materials

The papain used in the experiments was extracted from *Carica papaya*. It was obtained from Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri/USA). For enzyme activity testing, N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (L-BAPNA) and dithiothreitol (DTT) again from Sigma Aldrich were used. Magnesium nitrate, aluminum nitrate, sodium sulfate and sodium hydroxide were of analytical grade (Merck KGaA, Darmstadt/Germany).

2.2. Synthesis of MgAl–papain–LDH

MgAl–papain–LDH was synthesized by the co-precipitation method. Papain was dissolved at room temperature in 100 mL of distilled water (conc. 2.5 wt%). pH was adjusted to 9.0 using aqueous 50 wt% NaOH. Next, within 40 min 40 mL of a solution containing 0.1 M $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ and 0.05 M $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, and 40 mL of 0.5 M NaOH solution were fed into the enzyme solution

* Corresponding author.

E-mail addresses: sekretariat@bauchemie.ch.tum.de, johann.plank@bauchemie-tum.de (J. Plank).

simultaneously and dropwise. The synthesis was carried out under nitrogen blanket to avoid carbonation. The white precipitate was centrifuged and dried using a freeze dryer (-50°C , 0.01 mbar).

2.3. Activity measurement of MgAl-papain-LDH

500 mL of a 40 mM phosphate buffer (pH=7) were prepared by adding 1.167 g monosodium phosphate monohydrate and 3.093 g disodium phosphate heptahydrate to 500 mL of water to provide a constant pH at which papain is stable. Then 23 mg of DTT was added to 50 mL of the phosphate buffer. Papain (1 mg/mL) and MgAl-papain-LDH (2 mg/mL) were dissolved in the DTT phosphate buffer and added to 0.2 mL of a saturated Na_2SO_4 solution (170 g/L) which was combined with 20 μL of an L-BAPNA solution (conc. 32 mg/mL) in dimethyl sulphoxide. Enzyme activity was measured using UV/vis spectroscopy (wavelength 410 nm).

2.4. Characterization of Mg-Al-papain-LDH

XRD patterns were obtained on a BRUKER AXS D8 diffractometer. The X-ray tube (Cu $K\alpha_1$, α_2) was operated at 2θ angles between 0.6° and 60° at 30 kV and 30 mA. Elemental composition was determined by conventional CHNS analysis (Hekatech Euro EA, Wegberg/Germany). Mg and Al contents were measured by atomic absorption spectroscopy (VARIAN AA 280 FS). FT-IR spectra were recorded on a Fourier Transform Infrared Spectrometer from BRUKER (Vertex 70) using KBr pellets in the $350\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ range. TG measurements were conducted using a Netzsch TG STA 409 PC (LUXX) instrument equipped with a mass spectrometer (Netzsch QMS 403C AEOLOS). TEM micrographs were recorded on a JEOL JEM 2011 microscope equipped with a LaB_6 cathode. SEM pictures were taken on a FEI XL 30 FEG environmental scanning electron microscope. The hydrodynamic diameter of dissolved papain was measured by dynamic light scattering (LB-550 from HORIBA). UV/vis spectroscopy (VARIAN CARY 50 Scan) was used for enzyme activity measurement.

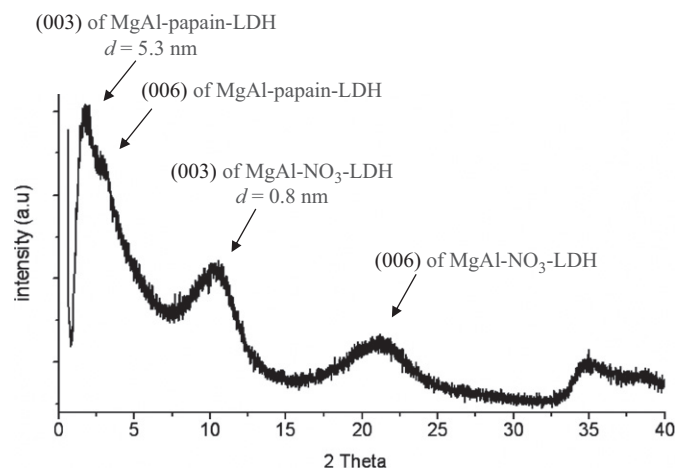


Fig. 1. XRD pattern of the reaction product containing MgAl-papain-LDH and MgAl- NO_3 -LDH as by-product.

3. Results and discussion

3.1. XRD analysis

Fig. 1 shows the X-ray diffraction pattern of the reaction product obtained in the co-precipitation. The first and very intensive signal at about 1.5° can be assigned to the (003) reflection of the crystallographic planes of MgAl-papain-LDH. The corresponding basal spacing (d value) was found at 5.3 nm. As a consequence of enzyme intercalation, the interlayer distance increases substantially (e.g. in MgAl- NO_3 -LDH it is 0.8 nm only [12]) to 5.3 nm for the MgAl-papain-LDH. Additionally, the (006) reflection of the hydrocalcite nanohybrid was detected at about 3.0° . The XRD pattern also indicates that the MgAl-papain-LDH precipitate is slightly contaminated by minor quantities of MgAl- NO_3 -LDH as by-product. The signals at 11.5° and 23.0° can be attributed to the (003) and (006) harmonic reflections of MgAl- NO_3 -LDH.

3.2. Elemental composition

In order to evaluate the amount of papain present in the LDH structure, the chemical composition of the hybrid material was calculated from the results of elemental analysis (Table 1). The molar ratio of magnesium to aluminum was found at 2.0:1. From this, the charge per unit of LDH frame became known. The carbon content was used to calculate the papain content present in the LDH, assuming that MgAl- NO_3 -LDH was formed as a by-product. To satisfy the hydrogen analysis, water molecules were incorporated.

The high overall organic content found in the reaction product MgAl-papain-LDH (27.3 wt%) further confirms successful intercalation of the papain protein. The molar ratio between the inorganic part ($[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$) and the intercalated organic part (papain) is 1:0.004. This stems from the molecular composition of papain enzyme which bears ~ 250 negative charges per molecule at pH=9.0.

3.3. IR spectroscopy

The FT-IR spectra of pure papain, MgAl- NO_3 -LDH and the reaction product containing the papain nanohybrid are presented in Fig. 2.

In all of these three spectra, between 3700 and 3200 cm^{-1} the valence vibration of water can be observed as a broad peak. It can be associated with the stretching modes of hydroxyl groups present in both the LDH sheets and interlayer water. The peaks of alkyl C-H stretches are observed in the 2900 cm^{-1} region. Nitrate absorptions from MgAl- NO_3 -LDH and MgAl-papain-LDH were detected at 2852, 2426 and 1394, and 1095 cm^{-1} . The peaks occurring at ~ 1650 and 1400 cm^{-1} are assigned to asymmetric and symmetric C=O stretches in the amide. The lattice vibrations of the inorganic layers present in the MgAl-LDH structure appear at 800 cm^{-1} (Mg-OH and Al-OH) and at 430 cm^{-1} (Al-O and Mg-O octahedral).

Thus, presence of the characteristic vibrational bands of papain in the reaction product provides positive evidence for successful intercalation.

Table 1
Elemental analysis and chemical composition of pure papain enzyme and of MgAl-papain-LDH.

Sample	Mg (wt%)	Al (wt%)	C (wt%)	N (wt%)	H (wt%)	Mg/Al	Chemical composition	Organic part (wt%)
Papain	–	–	54.3	16.5	6.6	–	$\text{C}_{1756}\text{N}_{458}\text{S}_{13}\text{O}_{520}\text{H}_{2558}$	–
MgAl-papain-LDH	16.1	9.1	12.4	5.0	3.6	2:1	$[\text{Mg}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+ \cdot (\text{papain})_{0.004} \cdot 0.4\text{H}_2\text{O}$	27.3

3.4. Thermal stability

Thermogravimetry (TG) was used to study the temperature stability of MgAl–papain–LDH. The TG and mass spectrometric curves of pure papain enzyme are shown in Fig. 3. Release of water occurs in the temperature ranges between 50 to 115 °C and 115 to 220 °C, as indicated by the MS curves. The first release accounts for a weight loss of approximately 2.7% and stems from removal of physisorbed surface water. The second step releases a mass of 7.8% of intercalated structural water which is strongly bound in the interlayer. Next, ~40% weight loss occurs in the temperature range between 200 and 600 °C. There, the first steep drop results from release of carbon (220–580 °C), nitrogen (250–550 °C) and sulfur (220–400 °C) (not shown in graph) from

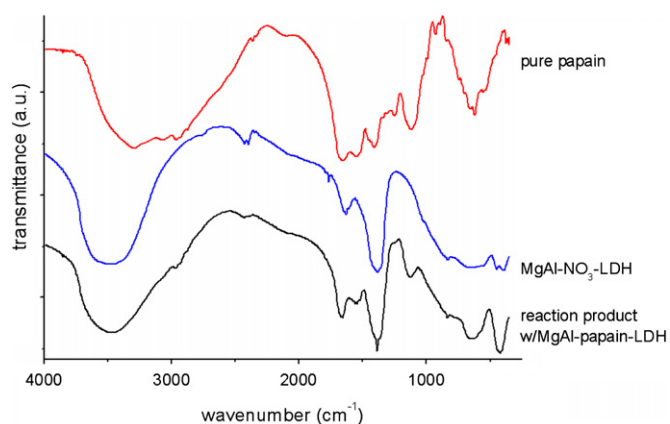


Fig. 2. FT-IR spectra of papain, MgAl–NO₃–LDH and reaction product containing MgAl–papain–LDH.

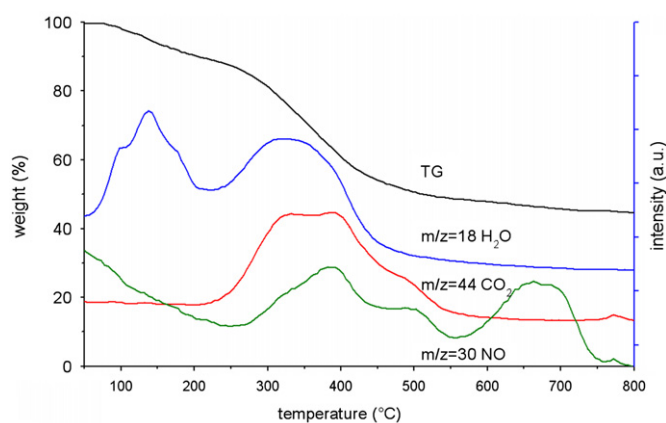


Fig. 3. TG and MS analysis of reaction product containing MgAl–papain–LDH.

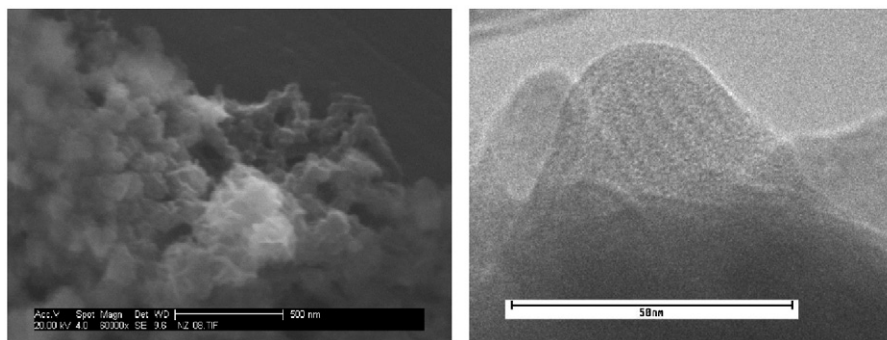


Fig. 4. SEM (left-hand side, magnification 115,000 ×) and TEM (right-hand side) micrographs of MgAl–papain–LDH.

the enzyme. The residual nitrogen present in the by-product MgAl–NO₃–LDH is released between 550 and 750 °C. The remaining 43.0% is attributed to the residual oxidized LDH framework (MgO and Al₂O₃).

3.5. SEM and TEM investigation

SEM micrographs (Fig. 4 left-hand side) show ultrathin sheets (thickness ~25 nm) intergrown into flower-like aggregates. Such aggregates are characteristic for LDHs containing large organic molecules such as casein protein [3] or AFS polycondensate [13] while LDHs incorporating simple inorganic anions such as NO₃⁻, CO₃²⁻ or SO₄²⁻ typically consist of plates well over 0.1 μm thick. Identity of the sample to be MgAl–papain–LDH also was confirmed by EDX analysis which revealed presence of S which is a marker for papain enzyme.

Fig. 4(right-hand side) presents a TEM image of the nano-hybrid. The sample shows a typical lamellar structure (black: inorganic LDH frame; white: organic interlayer containing papain). Based on this image, the basal spacing was estimated at 5.3 nm. This is in good accordance with the *d* value of 5.3 nm obtained from XRD result.

3.6. Steric size of intercalated and deintercalated enzyme

The hydrodynamic diameters of pure papain and papain released after deintercalation from MgAl–papain–LDH using anion exchange were measured by dynamic light scattering. The hydrodynamic size (*d*₅₀ value) of papain before intercalation was 7.2 nm. In the MgAl–papain–LDH intercalate, the interlayer distance is only 4.8 nm. After release from the LDH structure, the biomolecule attains its original size again (~7.1 nm were found). This signifies that the papain biomolecule is compressed and deformed, but returns to its original size after release from the LDH host structure (see Fig. 5). The consistency in the steric size of papain before and after intercalation provides an indication that the tertiary structure of the enzyme remains intact during the intercalation process.

3.7. Enzyme activity after deintercalation

First, papain was activated by addition of dithiothreitol [14]. Then, this activated papain was used to cleave the substrate L-BAPNA [15], thereby releasing p-nitro aniline as a chromophore. Time-dependent evolution of p-nitro aniline concentration and hence of enzyme activity was monitored using UV/vis spectroscopy (see Fig. 6). Measurement was carried out at a wavelength of 410 nm. For pure papain, absorption increased rapidly and after 300 min attained an almost constant value because transformation of the substrate to product was nearly complete.

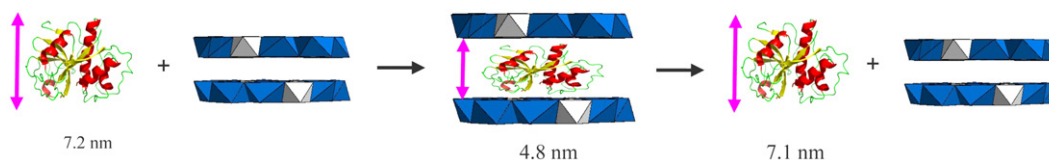


Fig. 5. Schematic illustration of the changes in the steric size of papain occurring during intercalation and deintercalation.

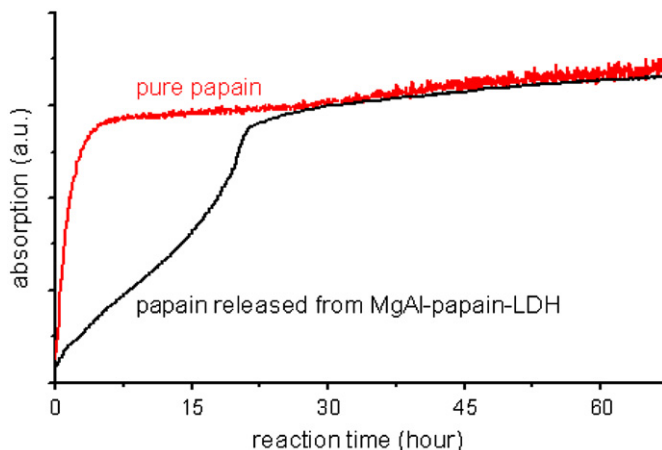


Fig. 6. Enzyme activity measurement, performed at 410 nm.

When MgAl–papain–LDH in combination with Na_2SO_4 was used, then absorption first increased slowly, indicating a gradual release of papain from its LDH host structure. The release is mostly finished after ~ 70 h, and activity comparable to that of pure, non-intercalated enzyme is attained. Accordingly, the enzyme is not denatured or decomposed during the intercalation process.

4. Conclusions

Layered double hydroxides are suitable host structure for the intercalation of biomolecules such as enzymes. Additionally, they offer the potential of a time-controlled slow release effect which might be of interest in drug delivery and biosensor applications.

References

- [1] J. Drenth, J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen, B.G. Wolthers, *Nature* 218 (1968) 929–932.
- [2] J. Plank, Z. Dai, P. Andres, *Mat. Lett.* 60 (2006) 3614–3617.
- [3] J. Plank, B. Yu, H. Bian, *J. Phys. Chem. Solids* 71 (2010) 468–472.
- [4] E. Manasse, *Atti Soc. Toscana Sci. Nat.* 24 (1915) 92.
- [5] S. Aisawa, S. Takahashi, W. Ogasawara, Y. Umetsu, E. Narita, *J. Solid State Chem.* 162 (2001) 52–62.
- [6] J.H. Choy, S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park, *Angew. Chem. Int.* 39 (2000) 4041–4045.
- [7] S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park, J.H. Choy, *Solid State Ionics* 151 (2002) 229–234.
- [8] C. Forano, S. Vial, C. Mousty, *Curr. Nanosci.* 2 (2006) 283–294.
- [9] F. Li, X. Duan, *Struct. Bonding* 119 (2006) 193–223.
- [10] V. Ambrogi, G. Fardella, G. Grandolini, M. Nocchetti, L. Peroli, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 1407–1418.
- [11] T. Posati, F. Bellezza, L. Tarpani, S. Perni, L. Latterini, V. Marsili, A. Cipiciani, *Appl. Clay Sci.* 55 (2012) 62–69.
- [12] N.T. Whilton, P.J. Vickers, S. Mann, *J. Mater. Chem.* 7 (1997) 1623–1629.
- [13] J. Plank, F. v. Hoessle, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 636 (2010) 1533–1537.
- [14] I.G. Kamphuis, J. Drenth, E.N. Baker, *J. Mol. Biol.* 182 (1985) 317–329.
- [15] B.F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen, *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271–278.

Paper 2

Intercalation of Cellulase Enzyme into a Hydrotalcite Layer Structure

Nan Zou, Johann Plank

Journal of Physics and Chemistry of Solids, Accepted for publication: 8-AUG-2014

Preparation and Properties of a Graphene Oxide Intercalation Compound Utilizing Hydrocalumite Layered Double Hydroxide as Host Structure

Johann Plank,^{*,[a]} Nan Zou,^[a] Zongbin Zhao,^[b] and Imre Dekany^[c]

Keywords: Carbon materials; Graphene oxide; Layered double hydroxide; Intercalations; Calcium aluminate

Abstract. Particularly small graphene oxide (GO) nano sheets were synthesized and intercalated into a hydrocalumite type layered double hydroxide (Ca₂Al-LDH) host structure. Synthesis of the GO intercalation compound was performed via controlled rehydration of tricalcium aluminate (Ca₃Al₂O₆) in the presence of GO. Formation of Ca₂Al-GO-LDH was evidenced from elemental, thermogravimetric, IR spectroscopy, XRD, and SAXS analysis. From the latter, an interlayer distance of 1.05 nm (*d* value) was found, indicating that one GO sheet is sandwiched by [Ca₂Al(OH)₆]⁺ main sheets. SAXS analysis revealed

a length of the lamellar structure of 109 nm and presence of agglomerates of randomly stacked nanosized LDH fragments. The carbon content of the Ca₂Al-GO-LDH particles (thickness ca. 30 nm) was significantly higher than that found for Ca₂Al-OH-LDH holding surface adsorbed GO only (14 wt% vs. < 2 wt%). GO can be released easily from the inorganic host structure by anion exchange, e.g. with sulfate. The novel compound could present an interesting precursor for electronic applications after chemical reduction of GO to graphene.

1 Introduction

Graphene presents a single-layer carbon material with extraordinary electronic properties.^[1,2] Recently, graphene oxide (GO) has attracted intense research interest as a viable source for graphene and because of its highly insulating properties. Normally, GO is obtained by Hummers' method whereby graphite is treated with strong oxidants (e.g. potassium permanganate) in concentrated sulfuric acid.^[3] During oxidation, the graphitic structures are fragmented into smaller parts whereby epoxy, carbonyl, carboxyl, and especially hydroxide functionalities are formed.^[4,5] These oxygen-containing functional groups cause the interlayer distance of graphite to increase from 0.335 nm to 0.7–1.0 nm in GO. The increase depends on the extent of oxidation and the interlamellar water content.^[6]

Layered double hydroxides (LDHs) are composed of positively charged inorganic layers (the framework) and exchangeable interlayer guest anions.^[7] Numerous previous work has demonstrated that a large variety of anions can be intercalated in between the cationic main sheets of LDH. Examples for suitable guest anions are simple inorganic anions such as chlor-

ide, sulfate, carbonate or nitrate, but also larger anions including biomolecules (DNA, proteins, enzymes) or various kinds of anionic polyelectrolytes (e.g. polystyrene sulfonate, polycarboxylates, polysaccharides) can intercalate.^[8–13]

During hydration, tricalcium aluminate present in cement can form lamellar hydrates of the hydrocalumite type, which are generally denominated as Ca₂Al-A-LDH.^[14] Of them, several compositions occur in hardened cement, the most common ones are [Ca₂Al(OH)₆](OH)·3H₂O (or C₄AH₁₃ according to cement chemistry nomenclature) and [Ca₂Al(OH)₆]₂(SO₄)·14H₂O (abbreviated as monosulfo aluminate). The Ca₂Al-LDH structure consists of positively charged [Ca₂Al(OH)₆]⁺ main sheets with Ca²⁺ exhibiting a seven-fold and Al³⁺ an octahedral coordination to oxygen.^[15–17] GO can be considered as a nearly 2D, negatively charged carbon material because of its content of carboxylate and hydroxyl groups. Nano composites prepared from GO have been described before in the literature. For example, a Ni₂Al-LDH/GO nano composite was prepared by coprecipitation of Ni(NO₃)₂ and Al(NO₃)₃ in GO solution.^[18] This nano composite consists of large GO sheets decorated with LDH crystals. Furthermore, intercalation compounds of GO in α -hydroxides were synthesized from cetyl trimethylammonium graphene oxide and dodecylsulfate intercalated α -hydroxides of Ni(OH)₂ and Co(OH)₂ via a metathesis reaction.^[19] The only GO-LDH intercalation compounds reported so far were obtained via anion exchange from *p*-aminobenzoate-intercalated Ni₂Zn-LDH, which was treated with an aqueous GO solution^[20] or from Mn^{II}-Al^{III}-LDHs via a complicated anion exchange, exfoliation, and hydrazine reaction process.^[21]

In this paper, intercalation of GO into a Ca₂Al-LDH framework is reported. Preparation of the nano composite was performed by using GO sheets obtained from particularly strong oxidative degradation of graphite. The synthesis was carried

* Prof. Dr. J. Plank

Fax: +49-89289-13152

E-Mail: sekretariat@bauchemie.ch.tum.de

[a] Chair for Construction Chemicals
Technische Universität München
Lichtenbergstr. 4,
85747 Garching, Germany

[b] Carbon Research Laboratory
Dalian University of Technology
No. 2 Ling Gong Road
116024 Dalian, P. R. China

[c] Department of Physical Chemistry and Materials Sciences
University of Szeged
Aradi vértanúk tere 1
6720 Szeged, Hungary

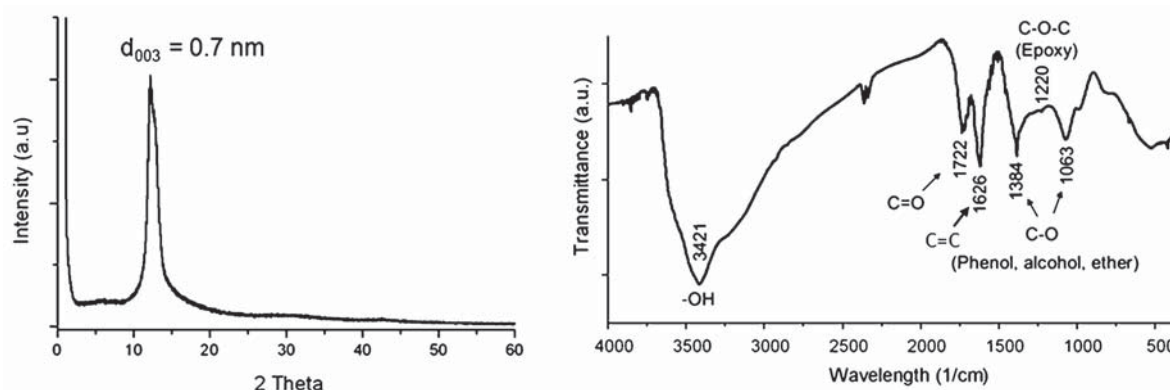


Figure 1. XRD pattern (left) and FT-IR spectrum (right) of the dried GO sample.

out by rehydration of tricalcium aluminate in an aqueous solution of GO. The $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ was characterized by XRD and SAXS technique, elemental, IR, thermogravimetric analysis as well as transmission and scanning electron microscopic imaging.

2 Results and Discussion

2.1 Composition of GO

Figure 1 (left) shows the XRD pattern of the synthesized dry GO. The peak at ca. $12.2^\circ 2\theta$ can be assigned to the (001) reflection of GO.^[22] It corresponds to an interlayer distance d of about 0.7 nm. In the literature, thicknesses of 0.7–1.0 nm are reported for GO sheets.^[23,24] Furthermore, from the full width at half maximum (FWHM) of the signal in the XRD diagram and the Scherrer equation [Equation (1)],^[25,26] an average size of 7 nm was calculated for the ordered domains, indicating that the dried material consists of stacks of ca. 10 GO sheets. Thus, the dried material is best described as graphite oxide, whereas in aqueous, diluted GO solutions, single sheets of graphene oxide exist, as was evidenced there by the absence of the diffraction peak at ca. $12.2^\circ 2\theta$.

$$\tau = (K\lambda) / (\beta \cdot \cos\theta) \quad (1)$$

To identify the particular groups resulting from oxidation, a FT-IR spectrum of the GO was recorded (Figure 1 right).

There, the hydrogen bonded O–H stretch of water can be observed as a broad peak at 3421 cm^{-1} , while the C=O stretching bands appear at 1722 cm^{-1} , thus signifying the presence of carboxyl and / or carbonyl groups. Furthermore, C–O stretching bands characteristic for phenol, alcohol, or ether groups are present at 1384 and 1063 cm^{-1} , whereas a weak absorption at 1220 cm^{-1} indicates epoxy groups.^[27]

Next, a chemical formula was developed for the synthesized GO by using elemental analysis data (Table 1). There, the carbon content had decreased from 97.5 wt% for the starting material graphite to 51.5 wt% for GO while the oxygen content had increased from 2.4 wt% (graphite) to 42.3 wt% (GO).

Utilizing a MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight) mass spectrometer, the molecular weight distribution of the GO was determined and was found to range between 1.000 and $4.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, with a weight average molecular mass M_w at ca. $2.100 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Such value signifies that extremely strong fragmentation of the graphite layers had occurred. Combining the information from FT-IR spectroscopy, elemental and MALDI-TOF analysis, an approximated chemical formula of $\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}$ was developed for the GO sample. Based on bond lengths and bond angles, a length of ca. 2 nm was calculated for this GO molecule.

According to our experience, particularly high fragmentation of graphite into GO sheets possessing a relatively low molecular weight and a small size is critical to achieve successful intercalation into LDH. In early experiments, where we

Table 1. Elemental analysis of graphite, GO, $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ intercalation compound and of GO adsorbed on $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$.

Sample	Ca /wt%	Al /wt%	C /wt%	O /wt%	H /wt%	S /wt%	C/O /molar ratio	Ca/Al /molar ratio
Graphite (found)	–	–	97.5	2.4*	–	0.1	40.6:1	–
GO (found)	–	–	51.5	42.3	2.2	0.9	1.2:1	–
$\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}$ (calcd.)	–	–	54.8	43.1	2.1	–	1.3:1	–
$[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^{+}(\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}^{18-})_{0.055}$ (calcd.)	25.1	8.4	18.8	45.0	2.7	–	–	2.0:1
$\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ (found)	27.5	9.3	13.7	46.1	3.4	0.3	–	2.0:1
$[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^{+}(\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}^{18-})_{0.039} \cdot \text{OH}^-_{0.3} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (calcd.)	25.9	8.7	13.7	48.5 ^{a)}	3.2	–	–	2.0:1
Adsorption product of GO on $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$ (found)	33.6	11.4	1.2	41.0 ^{a)}	2.3	10.5	–	2.0:1

a) Oxygen content calculated as difference to 100%.

used large GO sheets ($l \sim 1 \mu\text{m}$), no intercalation was accomplished. Instead, large GO sheets decorated with inorganic hexagonal $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ crystals were observed under the SEM, as described elsewhere.^[16]

A structural representation of the GO sheet incorporating all functional groups identified by FT-IR and according to the analytical data is shown in Figure 2. Owing to the substantial oxygen content (42 wt %, Table 1) it can be assumed that the GO sheets no longer are planar, but have attained a bent confirmation. Fully deprotonated, a GO molecule exhibits a charge of -18 .

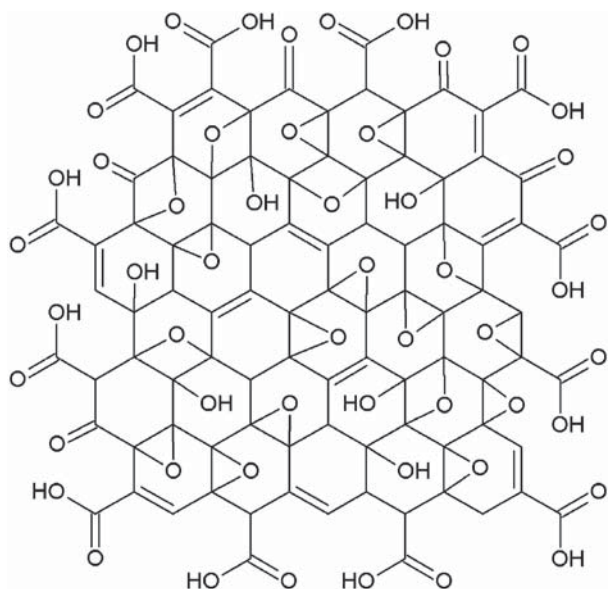


Figure 2. Proposed chemical structure of synthesized $\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}$ graphene oxide.

2.2. Characterization of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$

Figure 3 (left) displays the powder X-ray diffraction patterns of GO, $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ ($\text{C}_4\text{AlH}_{13}$), and $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$. The GO intercalation compound exhibits the typical diffraction patterns of layered compounds. There, the most intensive reflec-

tion at 8.3° 2θ can be attributed to the (001) reflection of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$. It corresponds to an interlayer repeat distance d of 1.05 nm. Additionally, more peaks from the harmonic series of the (001) reflections are detected, indicating a fairly ordered layered system. For comparison, the $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ exhibits a strong (001) reflection at 11.2° 2θ , corresponding to a d value of 0.79 nm only. From the FWHM of the XRD signal an average size of 25 nm was calculated for the ordered domains of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ which is significantly larger than that for dry GO of ca. 7 nm.

The GO intercalation compound was further analyzed by small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments (Figure 3 right). SAXS allows to determine structural as well as form factors of colloidal particles.^[28,29] There, from the two intensive reflections at $q = 0.6$ and 0.8 \AA^{-1} interlayer repeat distances d of 1.05 and 0.79 nm, respectively, were calculated using the Scherrer Equation (2). Considering a thickness of 0.7 nm for one GO sheet (as derived from XRD) and of 0.48 nm for the inorganic LDH sheet,^[30] the d value of 1.05 nm corresponds to one GO sheet sandwiched by two $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ main sheets while the d value of 0.79 nm can be assigned to the by-product $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$.^[14]

Next, the form factors were retrieved from the scattering data. First, the radius of gyration of the LDH particles (R_G) was obtained from the innermost part of the scattering curve using the Guinier approximation [Equation (3)]. Furthermore, the cross sectional radius of gyration (R_{XC}) was calculated from the scattered intensity of the cross-section [Equation (4)]. Following this method, a radius of gyration of 36 nm and a cross-sectional radius of gyration of 17 nm were found. Also, using Equation (5) the length (L) of the lamellar structure was found at 109 nm. Based on these data, a model for the GO intercalation compound as is shown in Figure 4 is proposed.

$$d = 2\pi / q \quad (2)$$

$$\ln[I(q)] = \ln[I(0)] - q R_G^2 / 3 \quad (3)$$

$$\ln[qI(q)] = \ln[qI(0)] - q^2 R_{XC}^2 / 3 \quad (4)$$

$$L = [12(R_G^2 - R_{XC}^2)]^{1/2} \quad (5)$$

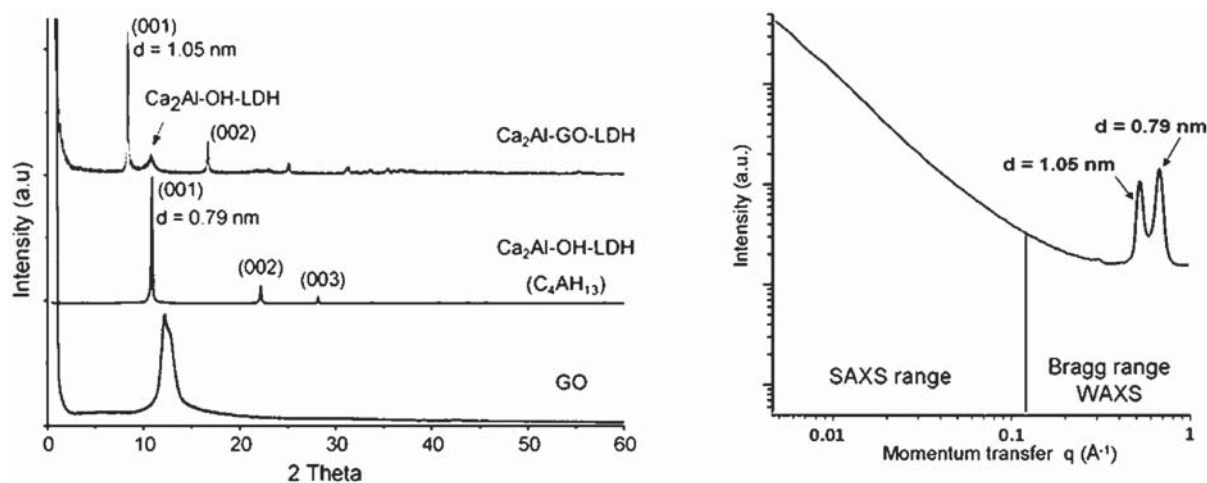


Figure 3. XRD patterns of GO, $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$, and $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ (left) and SAXS patterns of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ (right).

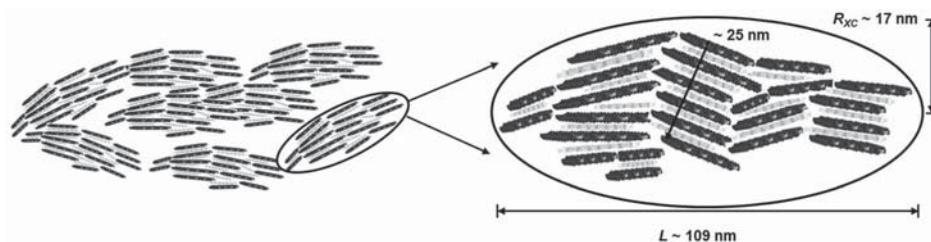


Figure 4. Model illustrating the domains occurring in the $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ particles, as derived from SAXS and XRD analysis.

Based on elemental analysis data of GO and the intercalation compound (Table 1), a chemical formula was developed for $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$. For Ca:Al, a molar ratio of 2.0:1 was found, confirming the principle composition of the main layer as $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$.^[31] The carbon content present in the intercalation compound was found at 13.7 wt%, which is lower than the value of 18.8 wt% calculated for complete charge compensation by GO only. From this carbon content, a molar ratio between $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ and GO ($\text{C}_{91}\text{H}_{38}\text{O}_{53}^{18-}$) of 1:0.039 was determined. The remaining positive charges of the inorganic frame are balanced with OH^- , resulting from the high pH conditions during the synthesis, yielding the sum formula exhibited in Table 1. The organic part and the water content present in the interlayer region were derived from this chemical formula. According to this calculation, $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ contains 25.0 wt% GO and 5.8 wt% water.

Presence of GO in the intercalation compound was further confirmed by FT-IR spectroscopy. In all spectra for GO, $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ and $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ (Figure 5), the hydrogen bonded O–H stretch of water can be observed as a broad peak between 3700 and 3300 cm^{-1} . In the reference sample $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ and in $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$, the absorptions at 1450 cm^{-1} signify the bending vibrations of water molecules present in the inorganic layer, and the bands at 530 and 420 cm^{-1} are characteristic for the lattice vibrations of Al–O and Ca–O in the inorganic frame. For GO and $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$, the absorptions at 1722 cm^{-1} represent stretching vibrations of C=O double bonds, while the bands at 1384 and 1063 cm^{-1} belong to C–O functionalities present in GO. The

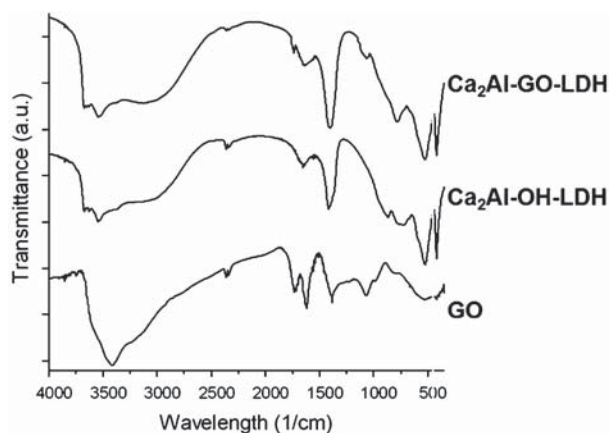


Figure 5. FT-IR spectra of GO, $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$, and $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$.

deformation vibration of C–H can be observed at 780 cm^{-1} . Thus, in the spectrum of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ all absorptions characteristic for GO as well as the inorganic $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ framework were detected.

Morphology of the $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ particles was visualized utilizing SEM imaging (Figure 6a,b). There, $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ appears as ultra-thin intergrown nanofoils (thickness ca. 30 nm). Such morphology differs completely from that of purely inorganic $\text{Ca}_2\text{Al-OH-LDH}$ which typically forms large hexagonal crystals with $0.5\text{--}1\text{ }\mu\text{m}$ in thickness.^[32]

TEM images of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ taken along the (00l) direction confirm lamellar assembly with a d value of 1 nm (Figure 6c,d) which is in good accordance with the value obtained from XRD and SAXS analysis.

2.3 Anion Exchange Experiment

Stability of the GO intercalation compounds was assessed by an anion exchange experiment with sulfate ions (Na_2SO_4). After submersion of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ for 6 h in aqueous 1.2 wt% Na_2SO_4 solution, the reaction product was analyzed with XRD (Figure 7).

It was found that GO is exchanged rapidly and completely ($> 95\%$) against sulfate as confirmed by TOC measurement in the supernatant. Surprisingly, not the LDH compound incorporating sulfate which is isomorphous to GO-LDH, $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$ (in cement chemistry denominated as monosulfo aluminate), but instead $\text{Ca}_6\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3(\text{OH})_{12}\cdot 26\text{H}_2\text{O}$ (ettringite), a sulfate-rich mineral with pillared structure was obtained. We assume that in the anion exchange process monosulfo aluminate is formed only as an intermediate which in the sulfate-rich solution rapidly converts to the more stable ettringite (Figure 8).^[32] This finding suggests that the anion exchange reaction occurred via a dissolution-reprecipitation mechanism and not pototactically.

2.4 Surface Adsorption of GO on $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$

To investigate the tendency of GO to adsorb onto the positive surface of a hydrocalumite type LDH, elemental analysis, XRD and thermogravimetric (TG) measurements were performed on the product obtained after stirring $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$ (monosulfo aluminate, $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]_2(\text{SO}_4)\cdot 8\text{H}_2\text{O}$) in GO solution. The X-ray diffraction patterns clearly confirm that GO did not exchange against SO_4^{2-} present in the interlayer space (XRD patterns not shown herein).

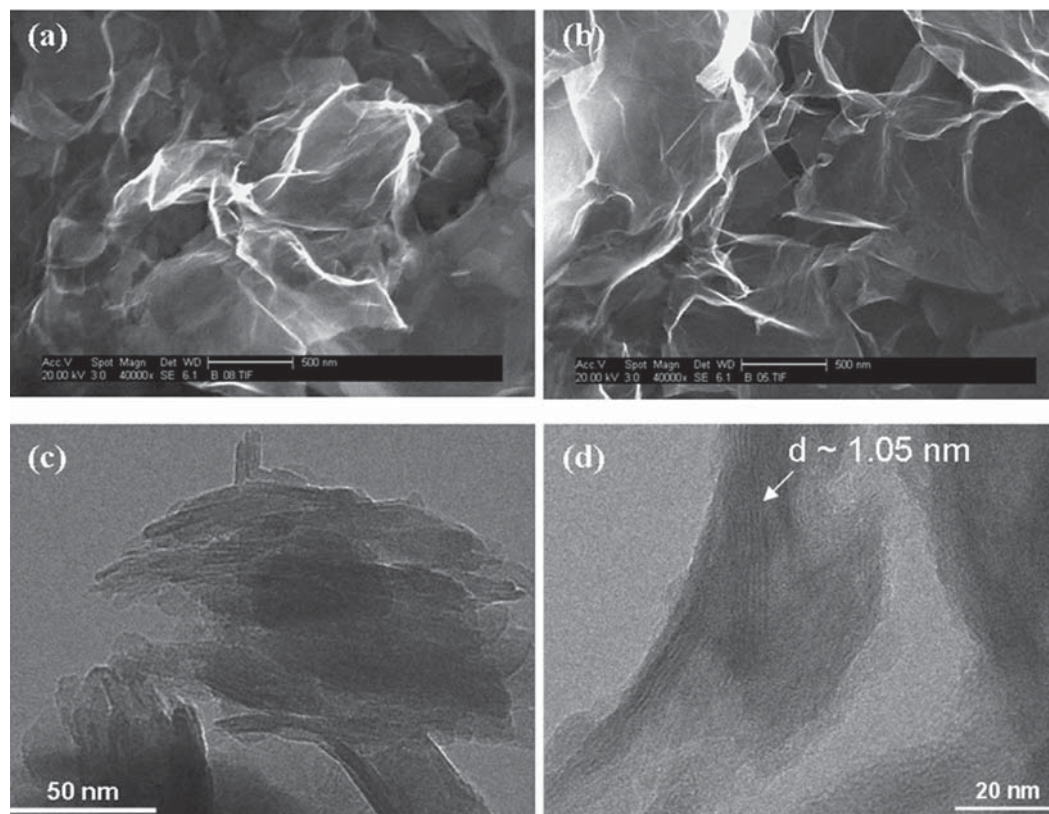


Figure 6. SEM (a, b) and TEM (c, d) images of the $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ intercalation compounds.

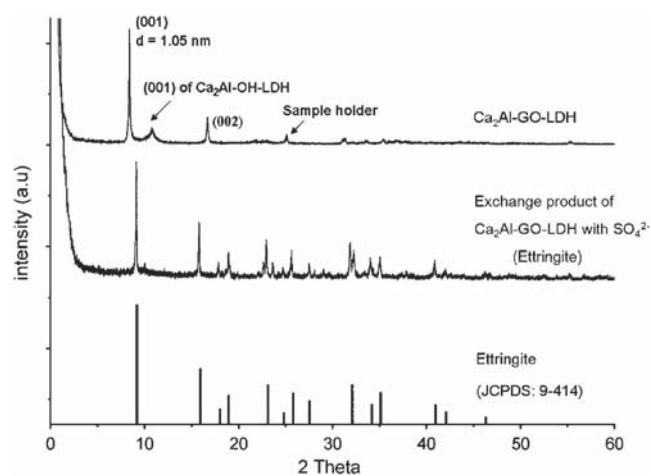


Figure 7. XRD patterns of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ and its anion exchange product with Na_2SO_4 .

The intercalation and adsorption products were further compared by using elemental analysis (Table 1). For the adsorption product, a carbon content of only 1.2 wt% was found, which is significantly less than that for the intercalation compound (13.7 wt%). This result signifies that only a minor amount of GO is anchored on the surface of the $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$.

Thermogravimetric and mass spectroscopic (TG/MS) results of GO, $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$, and the adsorption product are displayed in Figure 9. For all three samples, an initial mass loss occurred between room temperature and 200 °C which is owed to the release of physisorbed and intercalated water. The remaining ca. 60 wt% (intercalation product) and ca. 50 wt% (adsorption product) can be assigned to the oxidized LDH framework containing CaO and Al_2O_3 . For pure GO, the first release of CO_2 occurs at 250 °C which stems from carbon present in functional groups at the edge of GO sheets.^[33] The second release of carbon begins at 500 °C, which results from the skeleton of GO. The adsorption product releases CO_2 at

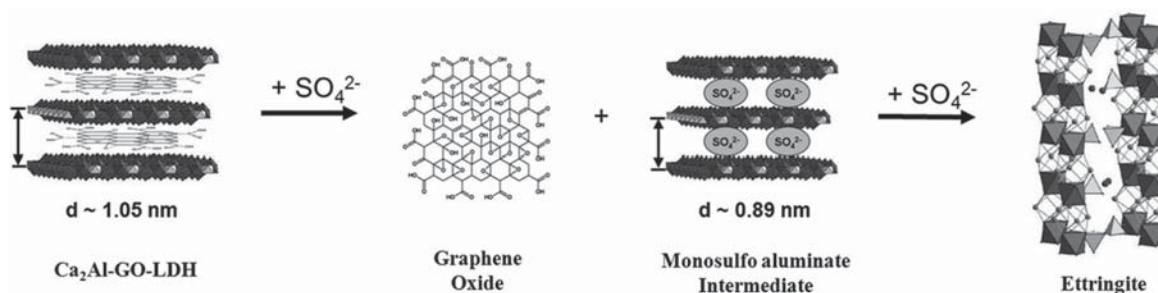


Figure 8. Reactions occurring in the anion exchange process between $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ and SO_4^{2-} .

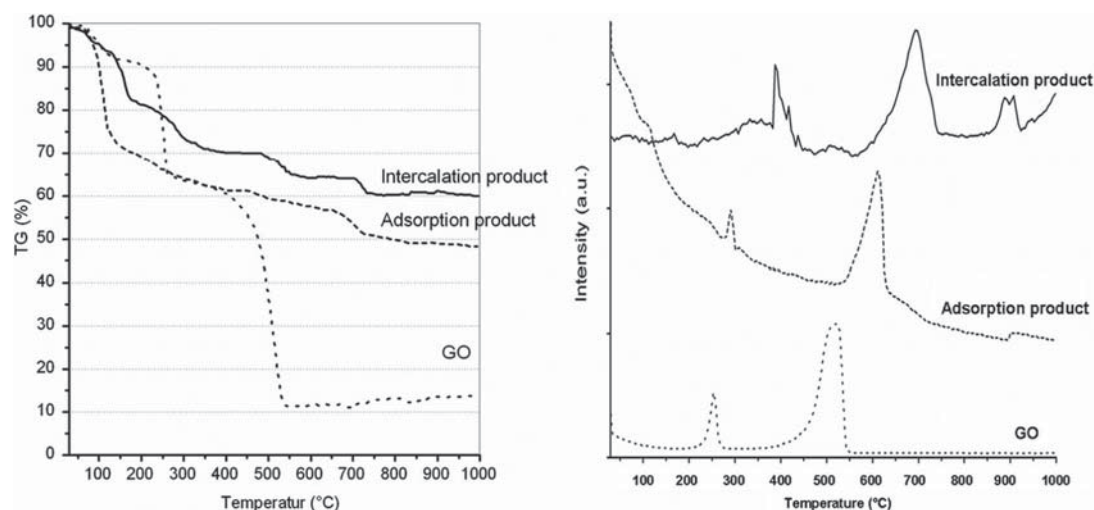


Figure 9. TG/MS ($m/z = 44$) curves of GO, $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$, and GO adsorption product on $\text{Ca}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$.

higher temperatures than pure GO, namely at 300 °C and 600 °C vs. 250 °C and 500 °C for pure GO. The intercalation compound shows even higher releasing temperatures for CO_2 , namely at 400 °C for fragmentation of functional groups in GO and at 700 °C and 900 °C, respectively, for the skeleton carbon of GO. These results signify that the inorganic LDH framework effectively shields GO from thermal degradation.

3 Conclusions

Individual nanosheets of graphene oxide were intercalated into the inorganic framework of a hydrocalumite type layered double hydroxide. Successful synthesis of the intercalation compound highly depends on effective fragmentation of the graphite sheets during the oxidation process used in preparation of the graphene oxide. In the $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ compounds individual GO sheets are sandwiched by two $[\text{Ca}_2\text{Al}(\text{OH})_6]^+$ main sheets at an interlayer distance of 1.05 nm. Thermogravimetric experiments demonstrate that the inorganic framework can protect GO against thermal degradation.

The $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ nano composite described here might be a versatile precursor for the preparation of graphene-inorganic nano composites, which could be of interest in electronic applications.

4 Experimental Section

4.1 Starting Materials

Natural graphite (5000 mesh, 2.6 μm) used in the synthesis of graphene oxide was obtained from Intersci (Jinan/China).

Cubic tricalcium aluminate (C_3A , $\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{O}_6$) was prepared according to a literature description via stoichiometric mixing of CaO (3 mol) and Al_2O_3 (1 mol) and subsequent calcination at 1450 °C for 3 h.¹³⁴ The resulting clinker phase was ground until it reached a particle size (D_{50} value) of 4 μm . Purity was confirmed by XRD measurement (JCPDS: 38–1429).

Monosulfo aluminate used in the adsorption experiment was synthesized by intercalation of sodium sulfate into layered calcium aluminate hydrate. Pure C_3A (1.8 g) were suspended in aq. Na_2SO_4 solution (0.7 wt %, 100 mL) and stirred for 6 h at room temperature in a nitrogen atmosphere. The white product was centrifuged, washed, and dried in a desiccator at room temperature. X-ray powder diffraction identified the product as pure $[\text{Ca}_4\text{Al}_2(\text{OH})_{12}(\text{SO}_4)\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (XRD pattern not shown here).

4.2 Preparation of GO

Graphene oxide was synthesized by oxidation of a natural graphite sample with strong oxidizers following the principle method of *Hummers* and *Offeman*.¹³¹ However, to achieve a particularly high degree of fragmentation of the graphite sheets, which is essential for successful intercalation, the modifications as follows were performed: The natural flake graphite (3 g) and NaNO_3 (1.5 g) were mixed with conc. H_2SO_4 (150 mL, 95 wt %) whilst stirring in an ice water bath for 2 h. Maintaining vigorous agitation, KMnO_4 (15 g) was slowly added to the suspension within 2 h. The ice water bath was removed and the temperature increased to 35 °C. After 30 min, 230 mL of water were slowly added to the paste (1 h). Afterwards, temperature was brought to 98 °C and maintained for 30 min. The dark brown suspension was further diluted with 400 mL of DI water and 20 mL of H_2O_2 (10 wt %) in this order. Upon H_2O_2 addition, the suspension first turned yellow and then brownish. After cooling, the GO suspension (solid content ca. 25 wt %) was centrifuged for 15 min at 8500 rpm and washed with DI water until its pH value was 7.

An aqueous solution of GO (conc. 0.05 wt %) exhibits a carbon content of 259.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and shows strong light scattering (Tyndall effect). The specific anionic charge amount of the GO was found at $-77.2 \text{ C}\cdot\text{g}^{-1}$ (pH = 7) using polyelectrolyte titration employing a streaming current charge detector (PCD 03 pH; Mütek Analytic, Herrsching, Germany).

4.3 Synthesis of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$

Preparation of $\text{Ca}_2\text{Al-GO-LDH}$ was performed by rehydration of 1 g of pure cubic tricalcium aluminate in 100 mL of aq. 0.05 wt % GO solution (pH 11.0) and stirring for 48 h at room temperature in a nitro-

gen atmosphere. The brownish product (yield 70.0%) was centrifuged, washed three times, and dried in a desiccator at room temperature.

4.4 Anion Exchange Experiment

Ca₂Al-GO-LDH (2 g) was added to aq. Na₂SO₄ solution (100 mL, 1.2 wt%; SO₄²⁻ conc. 0.8 wt%) and stirred for 6 h at room temperature in a nitrogen atmosphere. The brownish precipitate produced was centrifuged, washed, and dried in a desiccator at room temperature.

4.5 Preparation of GO Adsorption Product

Monosulfo aluminate (1.5 g) was added to aq. GO solution (300 mL, 0.05 wt%) and stirred for 6 h at room temperature in a nitrogen atmosphere. The product was centrifuged and dried in a desiccator at room temperature.

4.6 Characterization of Ca₂Al-GO-LDH and GO Adsorption Product

XRD patterns were recorded with a BRUKER AXS D8 diffractometer. The X-ray tube (Cu-K_{α1,α2}) was operated at 2θ angles between 0.6° and 60° with a step size of 0.008384° at a voltage of 30 kV and a current of 30 mA. SAXS measurements were carried out with a Ganesha 300XL SAXS-WAXS system (SAXSLAB ApS, Copenhagen/Denmark) equipped with a GENIX 3D microfocus X-ray source (50 kV/0.6 mA, Cu-K_α, λ = 0.1542 nm) and optic, a three (scatterless)-slit collimation system, a fully evacuated sample chamber and beam path, and a movable 2D Pilatus 300K detector. Sample-to-detector distance was 1056 mm. Elemental composition was determined with conventional CHNS analysis (Hekatech Euro EA). Ca and Al contents were obtained by atomic absorption spectroscopy (VARIAN AA 280 FS). FT-IR samples were prepared as KBr pellets and the spectra were recorded from 350–4000 cm⁻¹ with a Fourier Transform Infrared Spectrometer (BRUKER, Vertex 70). TG measurements were conducted with a Netzsch TG STA 409 PC (LUXX) instrument equipped with a mass spectrometer (Netzsch QMS 403 C AEOLOS) to identify decomposition products. SEM images were taken with a FEI XL 30 FEG environmental scanning electron microscope, whereas TEM investigation was conducted with a JEOL JEM 2010 instrument equipped with a LaB₆ cathode.

Acknowledgements

Prof. Z. Zhao and Prof. I. Dekany wish to thank the Institute For Advanced Study (IAS) of Technische Universität München for financing their stay in Munich under a Visiting Scientist scholarship. Furthermore, the authors are greatly indebted to Dr. Ezzeldin Metwalli and Prof. Müller-Buschbaum for performing and discussing the SAXS experiments.

References

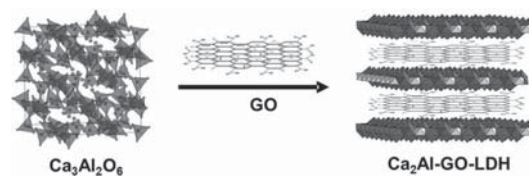
- [1] A. K. Geim, K. S. Novoselov, *Nat. Mater.* **2007**, *6*, 183–191.
- [2] H. P. Boehm, A. Clauss, G. O. Fischer, U. Hofmann, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1962**, *316*, 119–127.
- [3] W. S. Hummers, R. E. Offeman, *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 1339–1340.

- [4] M. J. McAllister, J. L. Li, D. H. Adamson, H. C. Schniepp, A. A. Abdala, J. Liu, A. Herrera-Alonso, D. L. Milius, R. Car, P. K. Prud'homme, I. A. Aksay, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 4396–4404.
- [5] J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y. S. Shon, T. R. Lee, D. T. Colbert, R. E. Smalley, *Science* **1998**, *280*, 1253–1256.
- [6] H. K. Jeong, Y. P. Lee, R. J. W. E. Lahaye, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1362–1366.
- [7] D. G. Evans, R. C. T. Slade, *Struct. Bonding (Berlin)* **2006**, *119*, 1–87.
- [8] J. H. Choy, S. Y. Kwak, Y. J. Jeong, J. S. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4041–4045.
- [9] L. Desigaux, M. B. Belkacem, P. Richard, J. Cellier, P. Léone, L. Cario, F. Leroux, C. Taviot-Guého, B. Pitard, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 199–204.
- [10] J. Plank, B. Yu, H. Bian, *J. Phys. Chem. Sol.* **2010**, *71*, 468–472.
- [11] J. Plank, F. von Hoessle, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2010**, *636*, 1533–1537.
- [12] M. Darder, M. López-Blanco, P. Aranda, F. Leroux, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1969–1977.
- [13] J. Plank, S. Ng, S. Foraita, *Z. Naturforsch.* **2012**, *67b*, 479–487.
- [14] H. F. W. Taylor, *Cement Chemistry*, Academic Press, London, **1990**.
- [15] Z. P. Liu, R. Z. Ma, M. Osada, N. Iyi, Y. Ebina, K. Takada, T. Sasaki, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4872–4880.
- [16] F. Leroux, C. Taviot-Guého, *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 3628–3642.
- [17] G. Renaudin, J. P. Rapin, E. Elkaim, M. François, *Cem. Concr. Res.* **2004**, *34*, 1845–1852.
- [18] M. X. Li, J. E. Zhu, L. L. Zhang, X. Chen, H. M. Zhang, F. Z. Zhang, S. L. Xu, D. G. Evans, *Nanoscale* **2011**, *3*, 4240–4246.
- [19] C. Nethravathi, M. Rajamathi, N. Ravishankar, L. Basit, C. Felser, *Carbon* **2010**, *48*, 4343–4350.
- [20] C. Nethravathi, J. T. Rajamathi, N. Ravishankar, C. Shivakumara, M. Rajamathi, *Langmuir* **2008**, *24*, 8240–8244.
- [21] S. Werner, V. W. Lau, S. Hug, V. Duppel, H. Clausen-Schaumann, B. Lotsch, *Langmuir* **2013**, *29*, 9199–9207.
- [22] C. T. Hsieh, W. Y. Chen, *Surface Coatings Technol.* **2011**, *205*, 4554–4561.
- [23] S. Stankovich, D. A. Dikin, R. D. Piner, K. A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S. B. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Carbon* **2007**, *45*, 1558–1565.
- [24] S. Gilje, S. Han, M. Wang, K. L. Wang, R. B. Kaner, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 3394–3398.
- [25] P. Scherrer, *Göttinger Nachrichten Gesell.* **1918**, *2*, 98–100.
- [26] A. Patterson, *Phys. Rev.* **1939**, *56*, 978–982.
- [27] S. Stankovich, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Carbon* **2006**, *44*, 3342–3347.
- [28] O. Glatter, O. Kratky, *Small Angle X-ray Scattering*, Academic Press, London, **1982**.
- [29] C. D. Putnam, M. Hammel, G. L. Hura, J. A. Tainer, *Q. Rev. Biophys.* **2007**, *40*, 191–285.
- [30] J. R. Smyth, D. L. Vish, *Allen & Unwin*, London, **1988**.
- [31] F. Millange, R. I. Walton, L. Lei, D. O'Hare, *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1990–1994.
- [32] I. Odler, *Hydration, Setting and Hardening of Portland Cement*, in: *Lea's Chemistry of Cement and Concrete*, Arnold, London, **1998**.
- [33] K. Haubner, J. Murawski, P. Olk, L. M. Eng, C. Ziegler, B. Adolph, E. Jaehne, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 2131–2139.
- [34] A. Wesselsky, O. M. Jensen, *Cem. Concr. Res.* **2009**, *39*, 973–980.

Received: November 15, 2013

Published Online: ■

J. Plank, N. Zou, Z. Zhao, I. Dekany* 1–8
Preparation and Properties of a Graphene Oxide Intercalation Compound Utilizing Hydrocalumite Layered Double Hydroxide as Host Structure



Paper 3

Preparation and Properties of a Graphene Oxide Intercalation Compound Utilizing Hydrocalumite Layered Double Hydroxide as Host Structure

Johann Plank, Nan Zou, Zongbin Zhao, Imre Dekany

Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, 640 (2014) 1413-1419.

**INTERCALATION OF CELLULASE ENZYME INTO A
HYDROTALCITE LAYER STRUCTURE**

N. Zou, J. Plank*

Technische Universität München, Lehrstuhl für Bauchemie, Lichtenbergstr. 4,

85747 Garching bei München, Germany

** Prof. Dr. J. Plank*

E-Mail: sekretariat@bauchemie.ch.tum.de

Tel: 0049-89289 13151

Fax: 0049-89289 13152

Keywords: A. nanostructures, A. multilayers, C. X-ray diffraction, C. electron microscopy, B. chemical synthesis

Abstract: A new inorganic-organic hybrid material whereby cellulase enzyme is incorporated into a hydrotalcite type layered double hydroxide (LDH) structure is reported. The Mg₂Al-cellulase-LDH was synthesized via co-precipitation from Mg/Al nitrate at pH = 9.6. Characterization was performed using X-ray powder diffraction (XRD), small angle X-ray scattering (SAXS), elemental analysis, infrared spectroscopy (IR) and thermogravimetry (TG). From XRD and SAXS measurements, a *d*-value of ~ 5.0 nm was identified for the basal spacing of the Mg₂Al-cellulase-LDH. Consequently, the cellulase enzyme (hydrodynamic diameter ~ 6.6 nm) attains a slightly compressed conformation when intercalated.

Formation of the LDH hybrid was also confirmed via scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Mg₂Al-cellulase-LDH phases appear as ~ 20 nm thin foils which are intergrown to flower-like aggregates. Activity of the enzyme was retained after deintercalation from the Mg₂Al-LDH framework using anion exchange.

Accordingly, cellulase is not denatured during the intercalation process, and LDH presents a suitable host structure for time-controlled release of the biomolecule.

Introduction

Cellulase is cellulolytic enzyme which is produced by fungi, bacteria, or protozoans. It is able to degrade cellulose to its basic building block, β -glucose, or other oligosaccharides. For this reason, cellulases are used in many diverse applications, e.g. in the textile industry, in laundry detergents or in the pulp and paper industry ^[1, 2]. Cellulase consists of one catalytic domain (CD) and one carbohydrate binding module (CBM) which is connected to the CD by a relatively long (30 - 44 amino acids), often glycosylated linker peptide ^[3, 4]. Cellulases are classified into two types, namely *exo*-1, 4- β -D-glucanases (EC number 3.2.1.91) and *endo*-1, 4- β -D-glucanases (EC number 3.2.1.4).

The general structure of layered double hydroxides (LDHs) is exemplified by that of brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$). There, the positive charge of the inorganic $\text{Mg}(\text{OH})^+$ layers is balanced via intercalation of OH^- anions contained in the interlayer galleries ^[5, 6]. Hydrotalcite (its exact formula being $[\text{Mg}_6\text{Al}_2(\text{OH})_{16}] \cdot \text{CO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) was the first LDH described in the literature ^[7]. There, carbonate anions as well as water molecules occupy the interlayer space.

In recent years, many publications have been dedicated to LDH chemistry. Intercalates prepared from biomolecules such as biopolymers ^[8], amino acids ^[9], nucleoside monophosphate ^[10], DNA ^[11], glycolaldehyde phosphate ^[12], milk proteins ^[13] and papain enzyme ^[14] found a wide range of applications in biosensing, industrial biocatalysis, biotechnology and medicine as drug delivery systems ^[15 - 17]. In the work here, intercalation of the enzyme cellulase into an LDH framework was attempted. It was hoped that the enzyme will exhibit longer shelf-life and increased temperature stability in this bio composite.

Experimental procedure

Starting materials and reagents

The *endo*-cellulase sample ($C_{2064}N_{554}S_{28}O_{728}H_{3110}$, $M_w = 48,178$ g/mol) extracted from *aspergillus niger* was supplied by Sigma Aldrich Corporation (St. Louis, Missouri/USA). For enzyme activity testing, filter paper from Whatman (Maidstone/England), glucose from VWR (Darmstadt/Germany) and 3,5-dinitrosalicylic acid and citric acid monohydrate from Sigma Aldrich were used. The Mg_2Al -cellulase-LDH was synthesized from magnesium nitrate, aluminum nitrate and sodium hydroxide which were of analytical grade (Merck KGaA, Darmstadt/Germany).

Properties of cellulase

Using polyelectrolyte titration and a streaming current charge detector (PCD 03 pH; Müttek Analytic, Herrsching/Germany), a specific anionic charge amount of -256.7 C/g (pH = 9.6) was found for the cellulase sample. Accordingly, at pH of 9.6 the cellulase molecule exhibits a negative charge of -130 .

Preparation of Mg_2Al -cellulase-LDH

Mg_2Al -cellulase-LDH was synthesized at room temperature applying the co-precipitation method. 1 g cellulase was dissolved in 100 mL of distilled water. Using 50 wt. % NaOH solution, the pH value was adjusted to 9.6. Then 40 mL of 0.5 M aqueous sodium hydroxide solution and 40 mL of an aqueous solution containing 0.2 M $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ and 0.1 M

$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ were simultaneously and dropwise fed over 40 min into the enzyme solution. The synthesis was carried out under a nitrogen blanket to avoid carbonation of the LDH. At the end of the co-precipitation the pH value was 9.6, the same as was kept throughout the synthesis. The precipitated white solid was centrifuged and dried for 2 days using a desiccator.

Characterization techniques

Powder X-ray diffraction (XRD) patterns were collected using a BRUKER AXS D8 diffractometer (30 kV/30 mA, Cu $K_{\alpha 1, \alpha 2}$). The X-ray tube was operated at 2θ angles between 0.6° and 60° with a step size of 0.008384° . SAXS measurements were performed on a Ganesha 300XL SAXS/WAXS instrument (SAXSLAB ApS, Copenhagen/Denmark) equipped with a GENIX 3D microfocus X-ray source (50 kV/0.6 mA, Cu K_α , $\lambda = 0.1542$ nm) and a three-slit collimation system, a fully evacuated sample chamber and beam path, and a movable 2D Pilatus 300K detector. Sample-to-detector distance was 1056 mm. Furthermore, FT-IR spectra were taken in the range of $350 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ on a BRUKER Vertex 70 instrument using KBr pellets. Elemental composition was determined via conventional CHNS analysis (Hekatech Euro EA, Wegberg/Germany). Thermogravimetry (TG) and mass spectrometry (MS) measurements were conducted using Netzsch TG STA 409 PC (LUXX) and Netzsch QMS 403 C AËOLOS instruments. ^{27}Al MAS NMR spectroscopy was performed on a Bruker AV 300 NMR spectrometer operating at 78.205 MHz using 4 mm rotors. SEM images were recorded on a FEI XL 30 FEG environmental scanning electron microscope (ESEM). TEM micrographs were taken on a JEOL JEM 2011 microscope equipped with a LaB_6 cathode. Enzyme activity was measured using a UV/Vis spectrophotometer (VARIAN CARY 50 Scan).

Anion exchange experiment

1 g of Mg₂Al-cellulase-LDH were dispersed in 100 mL of a 1.2 wt. % aqueous Na₂SO₄ solution (SO₄²⁻ conc. 0.8 wt. %). The dispersion was stirred for 1 hour at room temperature under nitrogen atmosphere. The suspension was then centrifuged, washed three times with 40 mL of DI water and dried for 24 hour in a desiccator.

Measurement of enzyme activity

Cellulase activity was assessed using the filter paper activity assay^[18-20]. There, 0.5 mL of an aqueous 1.0 wt. % cellulase solution were combined with 1 mL of a 0.05 mM Na citrate buffer (pH = 4.8) and heated to 50 °C. Next, a filter paper strip (1.0 × 6.0 cm, ~ 50 mg) was added and incubated for 60 min at 50 °C. The reaction was terminated by adding 3.0 mL of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). After boiling at 100 °C for 5 min, 20 mL of DI water were added and the remains of the filter paper were filtered off. The clear filtrate was measured at 540 nm using UV/Vis spectroscopy with glucose as standard.

Results and discussion

Structure of Mg₂Al-cellulase-LDH

XRD analysis revealed that the product from the co-precipitation reaction contained a mixture of Mg₂Al-NO₃-LDH and the cellulase nanohybrid (**Figure 1**). The *d* spacing of the Mg₂Al-cellulase-LDH composite was obtained from the first intense peak corresponding to the (003) reflection. The increase of the basal spacing from 0.8 nm for Mg₂Al-NO₃-LDH to 5.0 nm for the cellulase LDH confirms successful intercalation of the enzyme. The same *d* spacing was also found in SAXS measurements (**Figure 1**). From this *d* spacing, an interlayer distance of

4.52 nm can be calculated for the Mg_2Al -cellulase-LDH considering a thickness of 0.48 nm for the inorganic layer^[21]. The shoulder peak at $3.5^\circ 2\theta$ represents the (006) reflection of the cellulase nanohybrid while the two peaks at 10.5° and $21.0^\circ 2\theta$ can be attributed to the (003) and (006) harmonic reflections of $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH by-product. The (hk0) reflections of both LDHs appear at $\sim 35^\circ 2\theta$.

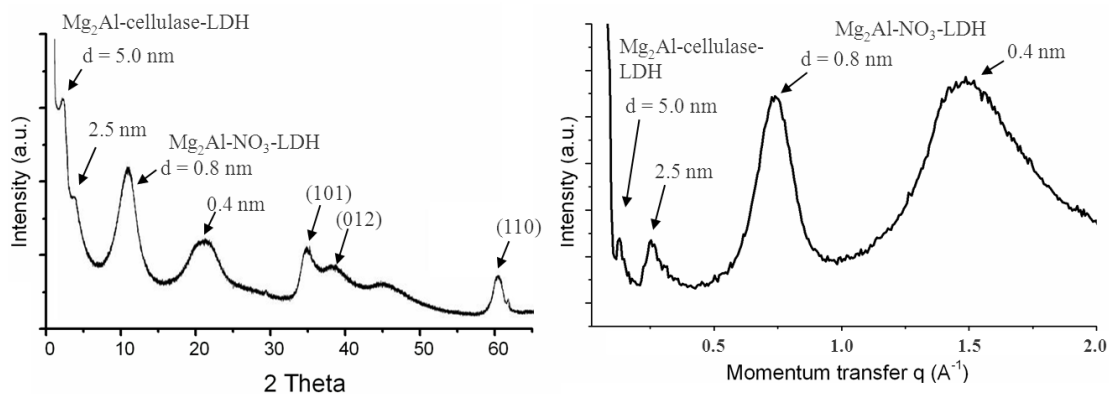


Fig. 1: XRD (left) and SAXS (right) patterns of the reaction product containing Mg_2Al -cellulase-LDH and the by-product $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH.

Figure 2 shows the FT-IR spectra of pure cellulase, $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH and the reaction product obtained in the co-precipitation process. In all three spectra, the IR bands between 3700 and 3200 cm^{-1} can be assigned to O-H and N-H vibrations from the LDH main layers and the intercalated enzyme. The band at 2930 cm^{-1} is owed to alkyl C-H stretching in pure cellulase and cellulase-LDH. Pure cellulase shows C-O vibrations at 1680 , 1410 and 1100 cm^{-1} respectively, which are shifted to 1650 , 1380 and 1050 cm^{-1} respectively in the composite, thus indicating an interaction between the enzyme and the LDH host structure. The bands occurring at 800 and 430 cm^{-1} can be assigned to Mg-O and Al-O lattice vibrations originating from the inorganic layers of the Mg_2Al -LDHs. Nitrate absorptions were detected at 1384 cm^{-1} in $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH and also in the reaction product from co-precipitation, thus confirming that the latter contained $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH as by-product.

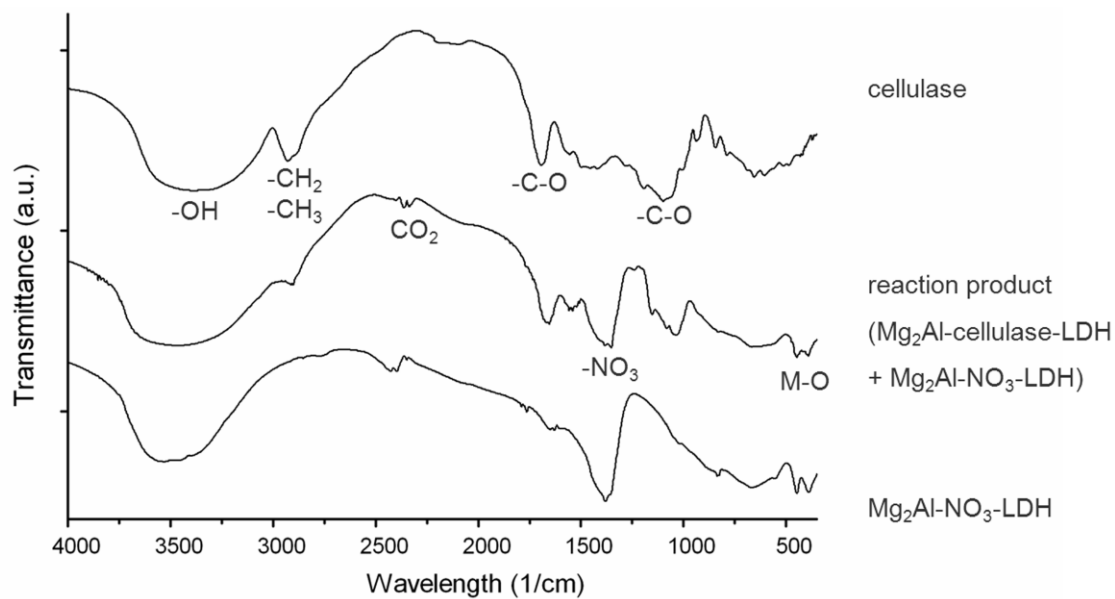


Fig. 2: FT-IR spectra of cellulase, the reaction product and pure Mg₂Al-NO₃-LDH.

From elemental analysis, the composition of the reaction product was calculated (**Table 1**). The yield of enzyme immobilization was 69.8 wt. %. The molar ratio of magnesium to aluminum was found at 2.0 : 1, thus conforming with the expected theoretical Mg/Al ratio. The reaction product exhibited a high organic content, namely 37.3 wt. %, which indicates that a significant amount of Mg₂Al-cellulase-LDH is present in the precipitate. This calculation assumes that at pH = 9.6 the cellulase molecule exhibits a negative charge of -130, as was found via streaming potential measurement.

Table 1: Elemental composition of pure cellulase, of the reaction product and of pure Mg₂Al-NO₃-LDH.

Sample	Mg (wt. %)	Al (wt. %)	C (wt. %)	N (wt. %)	H (wt. %)	Mg/Al ratio	Organic part (wt. %)
pure cellulase	-	-	42.8	1.6	6.4	-	-
reaction product	11.8	6.6	17.4	4.7	4.8	2.0 : 1	37.3
pure Mg ₂ Al-NO ₃ -LDH	20.1	11.3	-	5.9	2.5	2.0 : 1	-

The coordination state of aluminum in the intercalation compound was probed via ²⁷Al MAS NMR spectroscopy. There, for ²⁷Al only one sharp resonance peak occurred at 9 ppm, thus indicating octahedral coordination of aluminum. Accordingly, formation of Al(OH)₃ as a by-product which typically appears as a broad signal at lower chemical shift can be excluded.

Thermogravimetric analysis (TG) was carried out on samples of the pure cellulase and the co-precipitation product (**Figure 3**). Between 100 ° and 150 °C, the TG and mass spectrometric (MS) curves of the reaction product show a first mass loss (8 wt. %) stemming from physically adsorbed and intercalated water molecules in the LDH particles. The second weight loss of 18 wt. % between 400 ° and 530 °C can be attributed to the decomposition of the intercalated enzyme. The corresponding step in the TG curve of pure cellulase occurred at a significantly lower temperature, namely 270 ° - 320 °C, thus indicating a significant improvement of the thermal stability of the enzyme when sandwiched by the inorganic LDH layers. The mass loss between 350 ° and 500 °C is assigned to a release of nitrogen and oxygen from the by-product Mg₂Al-NO₃-LDH. The remaining ~ 52 wt. % are attributed to the remaining oxidized framework.

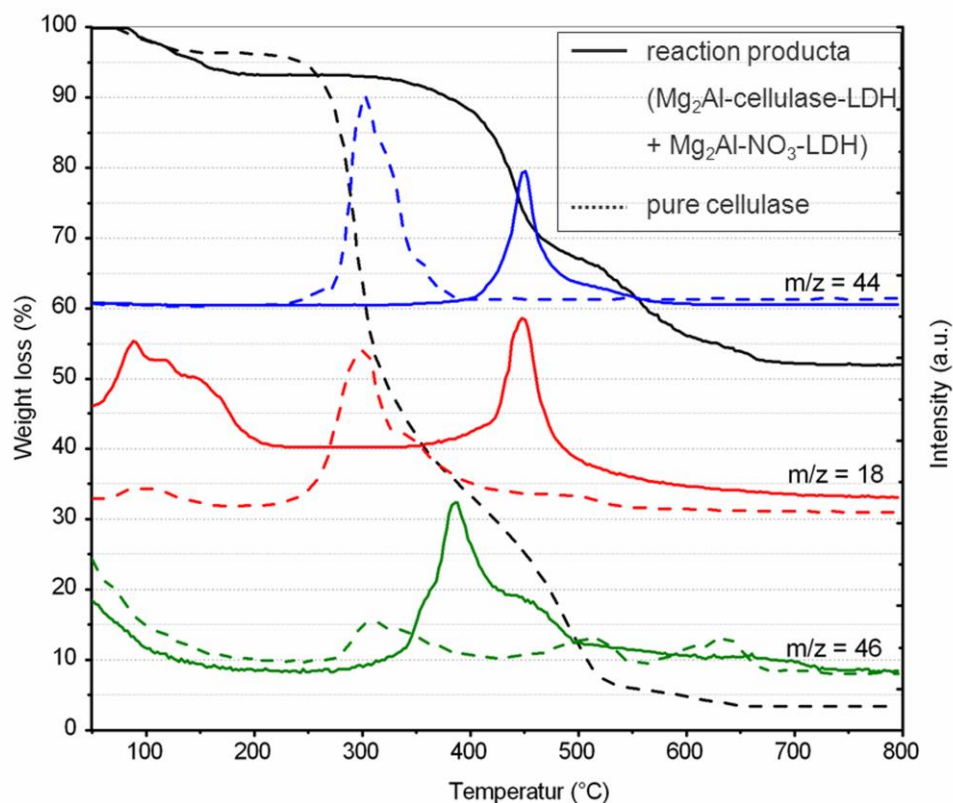


Fig. 3: TG and MS curves of the pure enzyme and the reaction product containing Mg_2Al -cellulase-LDH.

SEM micrographs of the reaction product confirm the presence of a mixture of cellulase and NO_3^- intercalated LDHs. The Mg_2Al -cellulase-LDH appears as ultra-thin, intergrown (“rose-like”) nanofoils with thicknesses of ~ 20 nm (**Figure 4a**). Such morphology is characteristic for LDHs incorporating large organic molecules or polymers [22 - 24]. Identity of the nanofoils as Mg_2Al -cellulase-LDH was confirmed by EDAX analysis which revealed a high carbon content and a molar ratio of Mg/Al of 2 which is in agreement with the results from elemental analysis. Furthermore, in the mixture large hexagonal platelets ($1 \sim 1 - 2 \mu\text{m}$, $d \sim 100$ nm) representing the characteristic appearance of $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ -LDH were visible as well (photo not shown here) [25, 26]. The lamellar structure of the nanohybrid was evidenced also via TEM

imaging (**Figure 4b**). Again, a basal spacing of ~ 5 nm was recorded, which is in good agreement with the d value of 5.0 nm obtained from XRD measurement.

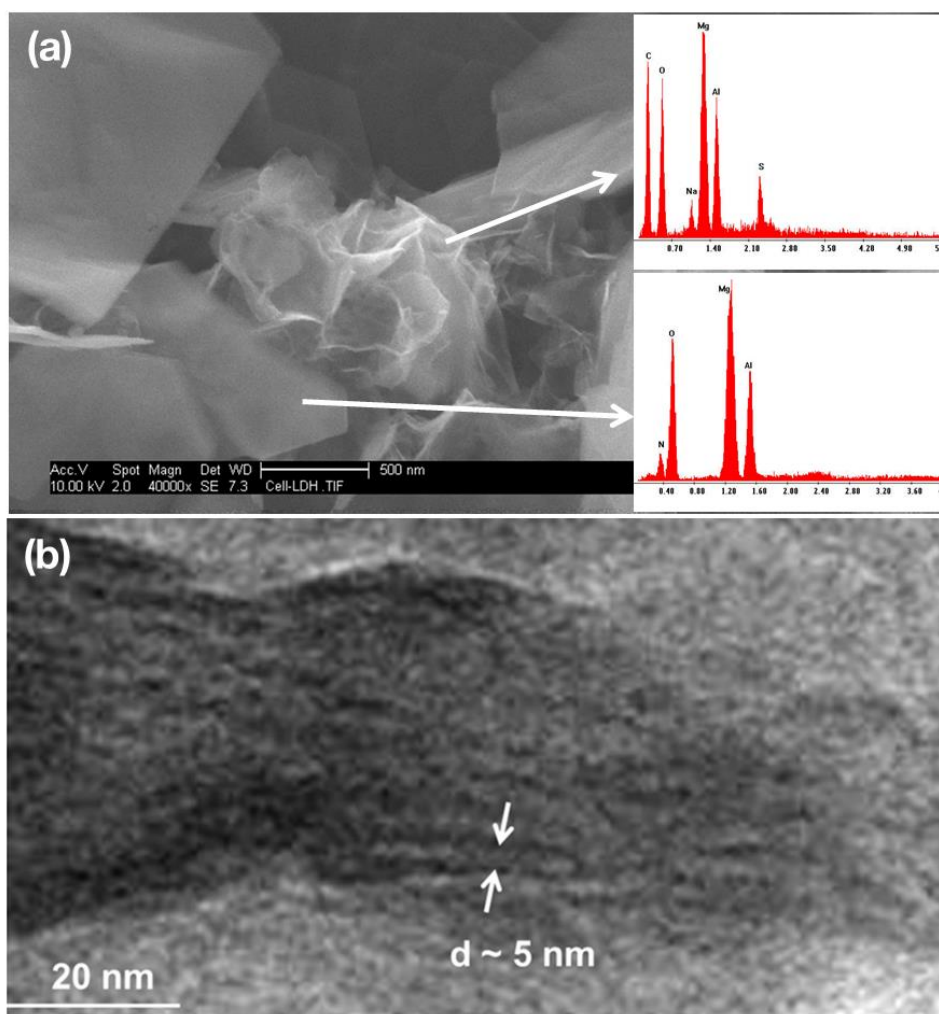


Fig. 4: SEM image (a) showing presence of a mixture of Mg₂Al-cellulose-LDH and Mg₂Al-NO₃-LDH particles, identified via EDX analysis; TEM micrograph (b) of a Mg₂Al-cellulose-LDH particle.

Anion Exchange Experiment

Stability of the cellulose intercalation compound against anions was assessed by an exchange experiment with sodium sulfate (Na₂SO₄). The exchange reaction was monitored via TOC content in the supernatant. It was found that an exchange equilibrium was established within one hour, and that ~ 90 % of the enzyme present in the LDH compound were released. The

reaction product formed was analysed using XRD (Figure 5) and was identified as poorly crystalline $\text{Mg}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$.

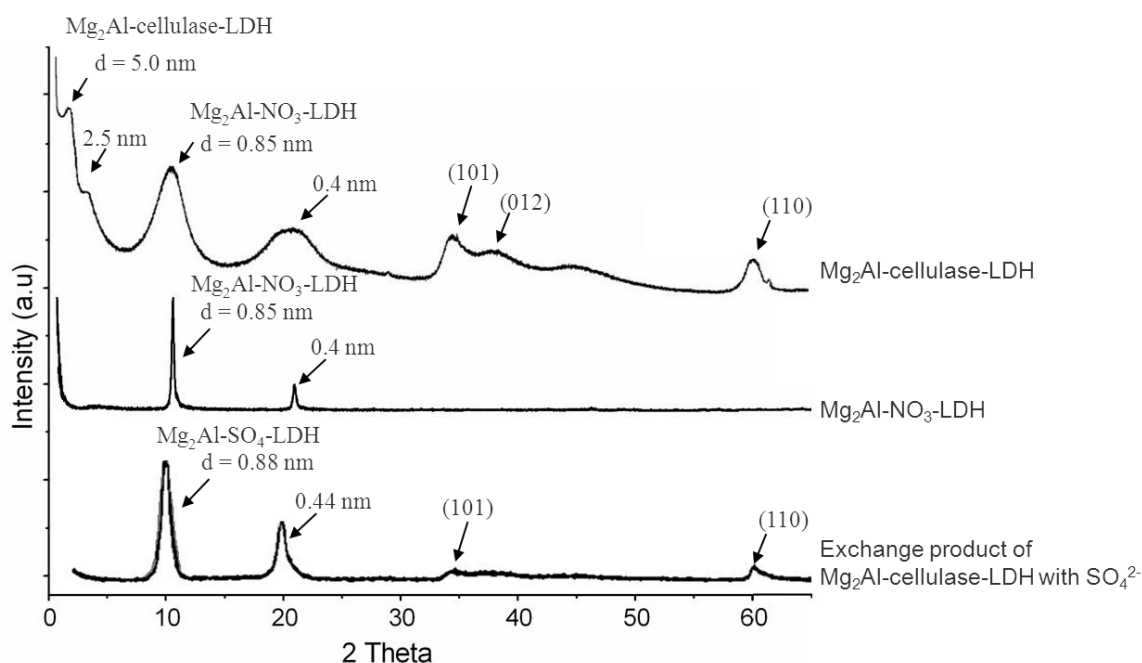


Fig. 5: XRD patterns of $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3\text{-LDH}$, $\text{Mg}_2\text{Al-cellulase-LDH}$ and $\text{Mg}_2\text{Al-SO}_4\text{-LDH}$ recovered from the anion exchange experiment.

Steric size and enzyme activity of cellulase

Dynamic light scattering (DLS) technique was used to assess the hydrodynamic diameter of pure cellulase and of the enzyme released from the LDH framework via anion exchange with sulfate. Before intercalation, the hydrodynamic size of cellulase solved in water was 6.6 nm (d_{50} value). When intercalated, the enzyme had to accommodate to an interlayer space of 4.5 nm only, signifying that when sandwiched between the LDH main layers, the cellulase molecule became compressed. After deintercalation from the LDH host structure, the cellulase reconstituted its original size, and a d_{50} value of 6.5 nm was found (**Fig. 6**).

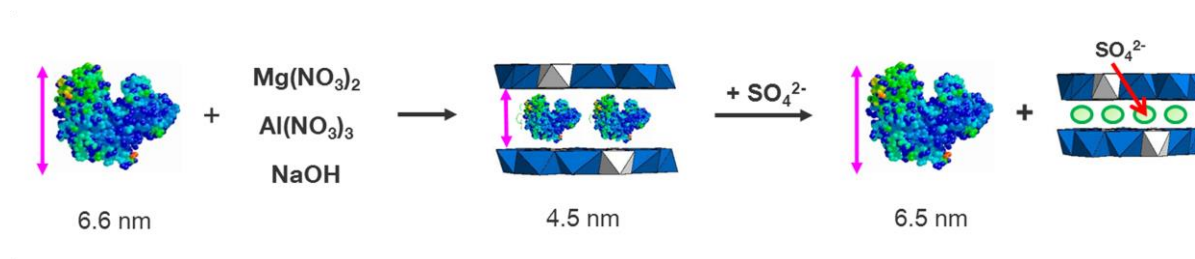


Fig. 6: Steric size (hydrodynamic radius) of cellulase enzyme before intercalation, when incorporated into the LDH framework and after release via anion exchange with sulfate.

To assess cellulase activity before and after intercalation, a filter paper assay (FPA) was performed. This method is based on quantification of reducing sugar, as cellulase decomposes cellulose to glucose in the assay ^[27]. A calibration curve for the glucose concentration was established by plotting glucose concentration against absorption at $\lambda = 540$ nm. In the test, 50 mg of filter paper were hydrolysed in 0.5 mL of an aqueous solution of pure cellulase (conc. 1.0 wt. %) into 17.0 mg glucose corresponding to an activity of 3.15 IU/mL. When the same test was repeated with an equivalent amount of deintercalated cellulase, 15.6 mg of glucose were detected (activity 2.89 IU/mL), thus indicating an activity retention of ~ 92 %. This result corroborates that during the intercalation process the enzyme was not denatured or degraded. The cellulase maintained its tertiary structure and enzyme activity after release from the LDH framework.

Conclusions

$\text{Mg}_2\text{Al-LDH}$ is a suitable host structure for the intercalation of negatively charged cellulase enzyme. Co-precipitation of $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ / $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ in aqueous cellulase solution at $\text{pH} = 9.6$ presents a viable synthesis method. The LDH framework improves the thermal stability of cellulase, and the enzyme is not denatured or decomposed when intercalated. This new biohybrid offers the possibility of a time-controlled release effect of the enzyme from the

LDH structure which could be useful in industrial manufacturing such as e.g. paper and food processing, in biotechnological and biosensing applications, and in the pharmaceutical industry.

Acknowledgement

The authors are greatly indebted to Dr. Ezzeldin Metwalli and Prof. Müller-Buschbaum for performing the SAXS experiments. We also thank Dr. M. Hanzlik for taking the TEM images and U. Ammari for carrying out the elemental analyses.

References

- [1] J. Drenth, J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen, B.G. Wolthers, *Nature* 218, **1968**, 929 - 932.
- [2] P. Chellapandi, H.M. Jani, *Bra. J. Microbiol.* 39, **2008**, 122 - 127.
- [3] V. Zverlov, S. Mahr, K. Riedel, *Microbiology*, 144, **1998**, 457 - 465.
- [4] M.D. Gibbs, D.J. Saul, E. Luthi, P.L. Bergquist, *App. Environ. Microbiol.* 58, **1992**, 3864 - 3867.
- [5] D.G. Evans, R.C.T. Slade, *Struct. Bond.* 119, **2006**, 1 - 87.
- [6] F. Leroux, J.-P. Besse, *Chem. Mater.* 13, **2001**, 3507-3515.
- [7] E. Manasse, *Atti Soc. Toscana Sci. Nat.*, 24, **1915**, 92 - 105.
- [8] M. Darder, M. López-Blanco, P. Aranda, F. Leroux, E. Ruiz-Hitzky, *Chem. Mater.* 17, **2005**, 1969 - 1977.
- [9] S. Aisawa, S. Takahashi, W. Ogasawara, Y. Umetsu, E. Narita, *J. Solid State Chem.*, 162, **2001**, 52 - 62.
- [10] S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park, J.H. Choy, *Solid State Ionics.*, 151, **2002**, 229 - 234.

- [11] J.H. Choy, S.Y. Kwak, Y.J. Jeong, J.S. Park, *Angew. Chem. Int.*, 39, **2000**, 4041- 4045.
- [12] S. Pitsch, A. Eschenmoser, B. Gedulin, S. Hui, G. Arrhenius, *Origins Life Evol. Biosphere*, 25, **1995**, 297 - 334.
- [13] J. Plank, B. Yu, H. Bian, *J. Phys. Chem. Sol.*, 71, **2010**, 468 - 472.
- [14] N. Zou, J. Plank, *J. Phys. Chem. Sol.*, 73, **2012**, 1127 - 1130.
- [15] V. Ambrogi, G. Fardella, G. Grandolini, M. Nocchetti, L. Perioli, *J. Pharm. Sci.*, 92, **2003**, 1407 - 1418.
- [16] F. Li, X. Duan, *Struct. Bonding*, 119, **2006**, 193 - 223.
- [17] T. Posati, F. Bellezza, L. Tarpani, S. Perni, L. Latterini, V. Marsili, A. Cipiciani, *Appl. Clay Sci.*, 55, **2012**, 62 - 69.
- [18] M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche, *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 6, **1976**, 21 - 33.
- [19] D. E. Eveleigh, M. Mandels, R. Andreotti, C. Roche, *Biotechnol. Biofuels.* 2:21, **2009**.
- [20] T. K. Ghose, *Pure Appl. Chem.* 59, **1987**, 257 - 268.
- [21] S. Miyata, *Clays Clay Miner.* 23, **1975**, 369.
- [22] E. M. Moujahid, J.-P. Besse, F. J. Leroux, *Mater. Chem.* 12, **2002**, 3324 - 3330.
- [23] J. Plank, Z. Dai, P. Andres, *Mat. Lett.*, 60, **2006**, 3614 - 3617.
- [24] J. Plank, F. v.Hoessle, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 636, **2010**, 1533 - 1537.
- [25] D. G. Evans, R. C. T. Slade, *Struct. Bond*, **2006**, 119, 1 - 87.
- [26] A. Khan, D. O'Hare, *J. Mat. Chem.*, **2002**, 12, 3191 - 3198
- [27] T.M. Wood, K.M.Bhat, *Biomass – A: Cellulose and hemicellulose*; San Diego: Academic Press, **1988**, 87 - 112.
- [28] J.S. Tolan, B. Foody, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 65, **1999**, 41 - 67.