

Heterogene chemo-enzymatische dynamisch kinetische Racematspaltung symmetrischer und asymmetrischer α -Hydroxyketone

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Bereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Annika Petrenz-Beck (geboren Petrenz)

aus Berlin

Berichter: Prof. Dr. Marion B. Ansorge-Schumacher

Berichter: Prof. Dr. Ulf Hanefeld

Tag der Verteidigung: 07.06.2018

Dresden 2018

Danksagung

Diese Dissertation entstand im Rahmen meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Technischen Universität Dresden in der Arbeitsgruppe Molekulare Biotechnologie unter Leitung von Frau Prof. Marion B. Ansorge-Schumacher.

Zunächst möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Prof. Ansorge-Schumacher für die Überlassung dieses interessanten Themas, das in mich gesetzte Vertrauen und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Prof. Ulf Hanefeld möchte ich mich bedanken für die Übernahme des zweiten Gutachtens, sowie die Bereitstellung des Zr-TUD-1 und die Unterstützung bei der Synthese des Selbigen.

Für die Finanzierung des Projektes möchte ich mich bei der AiF bedanken (KF3068202AJ4).

Bei Dr. Selin Kara möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung während ihrer Zeit an der TU Dresden bedanken. Ihre Ideen und ihr Engagement haben diese Arbeit ein entscheidendes Stück weitergebracht.

Bei meinen Projektpartnern Dr. Ralf Zuhse, Dr. Ulf Menyes und Jasmin Kühn möchte ich mich für die Zusammenarbeit und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen bedanken.

Bei Dr. Anand Ramanathan und Dr. Oliver Busse bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Synthese der Racemisierungskatalysatoren.

Ein großer Dank geht an meine Studenten Sarah Loderer, Julius Kramer, Robert Röllig, Anne Neubauer und Paul Körner, die mich in Form von Abschlussarbeiten, als studentische Hilfskraft oder als Praktikant unterstützt haben.

Allen meinen lieben Arbeitskollegen möchte ich für die schöne Arbeitsatmosphäre und die Aktivitäten außerhalb der Arbeitszeit danken. Dies gilt im Speziellen für Frances Morgenstern, Dr. Christoph Loderer, Dr. Selin Kara, Eugen Schell und Christoph Plikat.

Bei Dr. Max Steinhagen möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit im gemeinsamen Projekt und die stetige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein wahrscheinlich größter Dank geht an meine Familie für den Rückhalt während der letzten Jahre. Insbesondere danke ich meinen Mann Benjamin für sein Vertrauen und Unterstützung und meiner Tochter Mira, die sich in unser Leben und in unsere Herzen geschlichen hat.

Für Ben

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Alpha-Hydroxyketone.....	1
1.2 Dynamisch kinetische Racematspaltung.....	4
1.2.1 Prinzip	4
1.2.2 Lipase TL	6
1.2.3 Zr-TUD-1	8
1.3 Enzyme in nicht-wässrigen Reaktionsmedien	9
1.3.1 Organische Lösungsmittel	9
1.3.2 Ionische Flüssigkeiten.....	11
1.3.3 Stark eutektische Lösungsmittel	12
1.3.4 Wasseraktivität in nicht-wässrigen Systemen.....	14
1.4 Stabilisierung von Enzymen	15
1.4.1 Methodenübersicht.....	15
1.4.2 Sol-Gele	18
1.5 Zielsetzung.....	21
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Träger.....	24
2.1.3 Enzyme und Proteine	25
2.1.4 Spezielle Geräte	25
2.2 Bereitstellung von Biokatalysatoren	25
2.2.1 Bereitstellung der rekombinaten Benzaldehydlyase.....	25
2.2.2 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mittels adsorptiver Bindung.....	26
2.2.3 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mit freien Aminogruppen.....	27
2.2.4 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mit freien Epoxidgruppen	27
2.2.5 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mittels ionischer Bindung	28
2.2.6 Immobilisierung der Lipase TL in ein Sol-Gel.....	28
2.3 Charakterisierung von Biokatalysatoren und Chemo-Katalysatoren.....	29

2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976).....	29
2.3.2	Proteinbestimmung nach einer Bradford-Variation.....	29
2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test (P. K. Smith <i>et al.</i> , 1985)	30
2.3.4	Wasseraktivitätseinstellung.....	30
2.3.5	Bestimmung der spezifischen Aktivität, der Substratspezifität und Enantioselektivität.....	31
2.3.6	Racemisierung von (<i>R</i>)-Benzoin.....	31
2.3.7	Dynamisch kinetische Racematspaltung.....	32
2.3.8	Wiederholung der dynamisch kinetische Racematspaltung	32
2.4	Bestimmung von Stabilitäten	33
2.4.1	Mechanische Stabilität der Trägermaterialien	33
2.4.2	Desorptionsstabilität der Immobilisate	33
2.4.3	Aufbau und Charakterisierung eines CSTR's für die Prozessstabilität	33
2.4.4	Prozessstabilität der Immobilisate	34
2.5	Synthesen	35
2.5.1	Synthese von stark eutektischen Lösungsmitteln	35
2.5.2	Synthese von (<i>R</i>)-2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on.....	35
2.5.3	Synthese von (<i>S</i>)-Benzoinbutyrat und (<i>R</i>)-Benzoin.....	35
2.5.4	Synthese von Benzoinbutyrat	36
2.5.5	Synthese Zr-TUD-1 (25).....	36
2.5.6	Synthese von Zr-SBA-1 (25)	37
2.5.7	Synthese von modifiziertem Zr-TUD-1	37
2.6	Analytik.....	37
2.6.1	Rasterelektronenmikroskopie	37
2.6.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	38
3	Ergebnisse und Diskussion	40
3.1	Immobilisierung der Lipase TL	40
3.1.1	Methodenauswahl	40
3.1.2	Adsorptive Immobilisierung der Lipase TL	40
3.1.3	Kovalente Immobilisierung über Träger mit Aminogruppen	47
3.1.4	Kovalente Immobilisierung über Träger mit Epoxidgruppen.....	50
3.1.5	Ionische Immobilisierung	53
3.1.6	Einschluss der LipTL in Sol-Gele.....	57
3.1.7	Mechanische Stabilität der Trägermaterialien	62

3.1.8	Desorptionsstabilität der Immobilisate	64
3.1.9	Prozessstabilität der Immobilisate	65
3.1.10	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	71
3.2	Einfluss der Wasseraktivität	73
3.2.1	Methodenetablierung	73
3.2.2	Einfluss auf die spezifische Aktivität der immobilisierten Lipase TL	77
3.2.3	Einfluss auf die Prozessstabilität der immobilisierten Lipase TL	80
3.2.4	Einfluss auf den Racemisierungskatalysator Zr-TUD-1	81
3.2.5	Einfluss der Substratkonzentration auf das Wasseraktivitätsprofil	82
3.2.6	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	84
3.3	Optimierung des Reaktionsmediums	85
3.3.1	Auswahl der Lösungsmittel	85
3.3.2	Organische Lösungsmittel	85
3.3.3	Ionische Flüssigkeiten.....	90
3.3.4	Stark eutektischen Lösungsmittel	92
3.3.5	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	98
3.4	Kinetische Racematspaltung symmetrischer und asymmetrischer α - Hydroxyketone.....	99
3.4.1	Auswahl der α -Hydroxyketone	99
3.4.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität der immobilisierten Lipase TL	100
3.4.3	Analyse der Hauptprodukte der kinetischen Racematspaltung	102
3.4.4	Alternative Lipase für die kinetische Racematspaltung von HPP	104
3.4.5	Einfluss der Wasseraktivität auf die spezifische Aktivität der immobilisierten CALB.....	105
3.4.6	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	106
3.5	Dynamisch kinetische Racematspaltung der α -Hydroxyketone.....	107
3.5.1	Synthese und Charakterisierung verschiedener heterogene Racemisierungskatalysatoren.....	107
3.5.2	Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von Benzoin.....	109
3.5.3	Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von Furoin	109
3.5.4	Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von PAC	111
3.5.5	Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von HPP.....	114
3.5.6	Untersuchung der Umlagerung von PAC und HPP durch den Zr-TUD-1	116
3.5.7	Wiederholung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von PAC.....	117
3.5.8	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	119

3.6	Co-Immobilisierung von Bio- und Chemokatalysator.....	120
3.6.1	Auswahl der Methoden.....	120
3.6.2	Modifizierung der Oberfläche des Zr-TUD-1.....	121
3.6.3	Immobilisierung der LipTL und Charakterisierung der Immobilisate	122
3.6.4	Dynamisch kinetischen Racematspaltung mit Hybridkatalysator	124
3.6.5	Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse	127
4	Zusammenfassung.....	129
5	Literaturverzeichnis	132
Anhang A: Publikationen		141
Anhang B: Versicherungen		142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pharmazeutische Produkte aus α -Hydroxyketonen als Grundbausteine.	1
Abbildung 2 Prinzip der KR eines racemischen Substrates; S: Substrat, P: Produkt, k: Geschwindigkeitskonstante.	4
Abbildung 3 Prinzip der DKR eines racemischen Substrates; S: Substrat, P: Produkt, k: Geschwindigkeitskonstante.	5
Abbildung 4 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der LipC beziehungsweise der Lipase TL mit Benzoin als Substrat in Rot (Maraite <i>et al.</i> , 2013).	7
Abbildung 5 Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion eines Ketons mit Zr-TUD-1 als Katalysator und 2-Propanol als zweites Edukt.	9
Abbildung 6 Auswahl typischer Kationen und Anionen ionischer Flüssigkeiten.....	11
Abbildung 7 Auswahl quartärer Ammoniumsalze und Wasserstoffbrückenbindungsdonoren zur Bildung von DESs.....	13
Abbildung 8 Exsikkator als Beispiel für ein geschlossenes System zur Einstellung einer gewählten Wasseraktivität in einem Stoff über einer gesättigten Salzlösung.....	15
Abbildung 9 Gängige Immobilisierungsmethoden; A: adsorptive Immobilisierung, B: kovalente Immobilisierung, C: trägerlose Quervernetzung, D: Einschluss in eine Matrix, E: Einhüllung in eine Membran.	17
Abbildung 10 Herstellung eines Sol-Gels aus TMOS.....	19
Abbildung 11 DKR eines α -Hydroxyketons am Beispiel von Benzoin als Substrat mittels der Katalysatoren Lipase TL und Zr-TUD-1.	21
Abbildung 12 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate mit adsorptiv gebundener LipTL.	42
Abbildung 13 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate mit adsorptiv gebundener LipTL nach Optimierung durch Entfernung oder Zugabe von Ethanol während der Immobilisierung.	45
Abbildung 14 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate nach Inkubation der getrockneten Träger mit CPME und anschließender Immobilisierung der LipTL.	46
Abbildung 15 Proteinbeladung der Träger mit Aminogruppen und spezifische Aktivität der Immobilisate.	48

Abbildung 16 Optimierung der spezifischen Aktivität der Immobilisate durch Variation der Konzentration des Inkubationspuffers.....	49
Abbildung 17 Proteinbeladung der Träger mit Epoxidgruppen und spezifische Aktivität der Immobilisate.	51
Abbildung 18 Optimierung der spezifischen Aktivität des ECR8214-Immobilisates durch Variation der Konzentration des Inkubationspuffers und der Inkubationszeit.....	53
Abbildung 19 Proteinbeladung und spezifische Aktivität der Immobilisate auf Trägern mit Carboxygruppen bei unterschiedlichen pH-Werten des Immobilisierungspuffers.	54
Abbildung 20 Proteinbeladung und spezifische Aktivität der anionischen Träger mit quartären Ammoniumgruppen bei unterschiedlichen pH-Werten des Immobilisierungspuffers.	55
Abbildung 21 Sol-Gele nach Färbung mit einer Variante der Bradford-Methode, links: unbeladenes Sol-Gel, rechts: beladenes Sol-Gel.....	58
Abbildung 22 Färbung der Überstände nach BCA-Test, links: unbeladenes Sol-Gel, rechts: beladenes Sol-Gel.....	59
Abbildung 23 Proteinbeladung der Sol-Gele der Zusammensetzung TMOS/RTMS (1:1), R=Alkylrest.	60
Abbildung 24 Spezifische Aktivität und spezifische Proteinaktivität der Sol-Gele der Zusammensetzung TMOS/RTMS (1:1), R=Alkylrest.....	61
Abbildung 25 Mechanische Stabilität ausgewählter Trägermaterialien.....	63
Abbildung 26 Schematischer Aufbau des CSTR (©Christiana Sperling, TU Dresden)	66
Abbildung 27 Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ im CSTR in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).....	68
Abbildung 28 Verweilzeitverteilung $E(t)$ im CSTR bei einer Rührgeschwindigkeit von A: 500 rpm und B: 1250 rpm (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).....	69
Abbildung 29 Halbwertszeit ausgewählter Immobilisate im CSTR bei 50 °C.....	70
Abbildung 30 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Toluol und 2-MeTHF nach Lagerung des Immobilisates bei 25 °C und 50 °C bei einer Wasseraktivität von 0,113.....	75
Abbildung 31 Zunahme der Wasseraktivität von getrockneten 2-MeTHF (Ausgangswasseraktivität von 0,02) über die Zeit während der	

Lagerung über einer gesättigten LiCl-Lösung (Zielwasseraktivität von 0,113) bei 25 °C.	76
Abbildung 32 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität in 2-MeTHF bei A) 25 °C und B) 50 °C (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).....	77
Abbildung 33 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität in Toluol bei A) 25 °C und B) 50 °C (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).....	78
Abbildung 34 Einfluss der Wasseraktivität auf die Prozessstabilität der immobilisierten LipTL in 2-MeTHF und Toluol (Petrenz <i>et al.</i> , 2015)..	80
Abbildung 35 Abnahme des <i>ee</i> von (<i>R</i>)-Benzoin in Abhängigkeit der Wasseraktivität in A) 2-Me-THF und B) Toluol (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	81
Abbildung 36 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität bei einer Benzoinkonzentration von 50 mg/mL und 100 mg/mL.	83
Abbildung 37 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	87
Abbildung 38 Halbwertszeit der immobilisierten LipTL im CSTR in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	88
Abbildung 39 Abnahme des <i>ee</i> von (<i>R</i>)-Benzoin über die Zeit in unterschiedlichen Lösungsmittel mit Zr-TUD-1 als Katalysator (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	89
Abbildung 40 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in verschiedenen ILs. 91	
Abbildung 41 Umsatz der KR von Benzoin über die Zeit in ChCl:Iso (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	97
Abbildung 42 Für die DKR ausgewählte α -Hydroxyketone.	100
Abbildung 43 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Abhängigkeit des Substrates in 2-MeTHF und CPME.....	101
Abbildung 44 Orientierung der α -Hydroxyketone A: (<i>S</i>)-Benzoin, B: (<i>S</i>)-Furoin, C: (<i>S</i>)-HPP und D: (<i>S</i>)-PAC im aktiven Zentrum der LipTL entgegen der Kazlauskas-Regel. Kleiner Kreis: kleine Bindetasche, großer Kreis: große Bindetasche.....	102
Abbildung 45 Mögliche Ausrichtungen des HPP A) entgegen der Kazlauskas-Regel und B) nach der Kazlauskas-Regel im aktiven Zentrum der Lipase TL.	

<p>Kleiner Kreis: kleine Bindetasche, großer Kreis: große Bindetasche, A: (<i>S</i>)-HPP, B: (<i>R</i>)-HPP.....</p>	104
<p>Abbildung 46 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der CALBip von der eingestellten Wasseraktivität in CPME.</p>	106
<p>Abbildung 47 Racemisierung von (<i>R</i>)-Benzoin mit den Racemisierungskatalysatoren Zr-TUD-1-Delft, Zr-TUD-1 und Zr-SBA-15.</p>	108
<p>Abbildung 48 Entwicklung der Ausbeute und <i>ee</i> von (<i>S</i>)-Furoinbutyrat während der DKR von Furoin bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten LipTL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.</p>	110
<p>Abbildung 49 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (<i>S</i>)-Furoinbutyrat während der DKR von Furoin bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.....</p>	111
<p>Abbildung 50 Entwicklung der Ausbeute und <i>ee</i> von (<i>S</i>)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten LipTL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.....</p>	112
<p>Abbildung 51 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (<i>S</i>)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.....</p>	112
<p>Abbildung 52 Entwicklung der Ausbeute und <i>ee</i> von (<i>S</i>)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 40 g/mL des Zr-TUD-1 und variierenden Massenkonzentrationen der immobilisierten LipTL.....</p>	113
<p>Abbildung 53 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (<i>S</i>)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 40 g/mL des Zr-TUD-1 und variierenden Massenkonzentrationen der immobilisierten LipTL.....</p>	114
<p>Abbildung 54 Entwicklung der Ausbeute und <i>ee</i> von (<i>R</i>)-HPP-Butyrat während der DKR von HPP bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten CALB und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.....</p>	115

Abbildung 55 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (<i>R</i>)-HPP-Butyrat während der DKR von HPP bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten CALB von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.....	115
Abbildung 56 Vorgeschlagener Racemisierungsmechanismus des (<i>R</i>)-PAC durch den Zr-TUD-1.....	116
Abbildung 57 Konzentrationsanteile der Regioisomere in der Racemisierung von A: PAC und B: HPP mit dem Zr-TUD-1.....	117
Abbildung 58 Wiederholung der PAC-DKR mit Ausbeute und <i>ee</i> des (<i>S</i>)-PAC- Butyrates über sechs Zyklen.	118
Abbildung 59 Modifizierung der Zr-TUD-1-Oberfläche mittels APTES.	122
Abbildung 60 Aktivierung der AP-Zr-TUD-1-Oberfläche mit Glutardialdehyd und anschließender kovalenter Immobilisierung der LipTL.	122
Abbildung 61 Beladung und Desorptionsstabilität der Immobilisat der LipTL auf den Trägern AP-Zr-TUD-1 und Zr-TUD-1.	123
Abbildung 62 DKR von Benzoin mit den Hybridkatalysatoren Zr-TUD-1-LipTL und AP-Zr-TUD-1-LipTL. Kreis: Umsatz bezogen auf Benzoin, Rechteck: Ausbeute an (<i>S</i>)-Benzoinbutyrat.	124
Abbildung 63 Ausbeute von Benzil in der DKR von Benzoin mit den Hybridkatalysatoren Zr-TUD-1-LipTL und AP-Zr-TUD-1-LipTL.....	126
Abbildung 64 Verlauf des <i>ee</i> von (<i>S</i>)-Benzoinbutyrat während der DKR von Benzoin mit dem Hybridkatalysator AP-Zr-TUD-1-LipTL.....	126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Gängige chemische Methoden zur Herstellung von α -Hydroxyketonen.	2
Tabelle 2 Gängige biokatalytische Methoden zur Herstellung von α - Hydroxyketonen.	3
Tabelle 3 Spezialchemikalien.	23
Tabelle 4 Träger.	24
Tabelle 5 Enzyme und Proteine.	25
Tabelle 6 Spezielle Geräte.	25
Tabelle 7 Zusammensetzung des TB-Mediums.	26
Tabelle 8 HPLC-Methoden und Parameter: Laufmittelverhältnis, Durchfluss, Säulentemperatur und Detektionswellenlänge.	38
Tabelle 9 Analyten und Retentionszeiten der Benzoin-Methoden.	38
Tabelle 10 Analyten und Retentionszeiten der Furoin-Methode.	38
Tabelle 11 Analyten und Retentionszeiten der PAC/HPP-Methode.	39
Tabelle 12 Träger für die adsorptive Immobilisierung mit den zugehörigen Trägereigenschaften.	41
Tabelle 13 Träger für die kovalente Immobilisierung an Aminofunktionen mit den zugehörigen Trägereigenschaften.	47
Tabelle 14 Träger für die kovalente Immobilisierung an Epoxidgruppen mit den zugehörigen Trägereigenschaften.	50
Tabelle 15 Träger für die ionische Immobilisierung mit den zugehörigen Trägereigenschaften.	54
Tabelle 16 Proteinbeladung ausgewählter Träger und Menge an desorbiertem Protein nach Rühren für 1 h in MeOH:H ₂ O (1:1) bei 50 °C.	65
Tabelle 17 Zusammenfassung und Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener LipTL-Präparat. Der Aktivierungsfaktor ist auf die spezifische Proteinaktivität des LipTL-Lyophilisates bezogen.	72
Tabelle 18 Wasseraktivitäten gesättigter Salzlösungen bei 25 °C und 50 °C, KAc: Kaliumacetat.	74
Tabelle 19 Benzoinlöslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmittel bei 25 °C und 50 °C.	86
Tabelle 20 Zusammensetzung der ausgewählt ILs und ihre Löslichkeit von 94 mM Benzoin bei 50 °C.	90

Tabelle 21 Log P (Cho <i>et al.</i> , 2011), normierte Polarität ETN (Reichardt, 2005) und Viskosität (D. Han & Row, 2010; Huddleston <i>et al.</i> , 2001) der ILs bei 25 °C.....	91
Tabelle 22 Zusammensetzung und Bildung der in dieser Arbeit synthetisierten DESs, +: Synthese war erfolgreich, -: Bildung eines DES wurde nicht beobachtet.	93
Tabelle 23 Wasseraktivität der DESs vor und nach dem Trocknen.	94
Tabelle 24 Untersuchung der Benzoinlöslichkeit der DESs (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).....	95
Tabelle 25 Spezifische Aktivität der LipTL als Lyophilisat und Immobilisat in DESs. z: zerkleinert; 2PrOH: 2-Propanol (Petrenz <i>et al.</i> , 2015).	96
Tabelle 26 Hauptprodukte und deren <i>ee</i> nach Durchführung der KRs bis zum vollständigen Umsatz des bevorzugten Substratenantiomeres.	103
Tabelle 27 Spezifische Aktivität der CALBip in der KR von HPP in CPME und 2-MeTHF, sowie Hauptprodukt und dessen <i>ee</i>	105
Tabelle 28 Umsatz und <i>ee</i> des (<i>S</i>)-Benzoinbutyrates in der DKR von Benzoin in CPME im Vergleich zu Toluol und 2-MeTHF nach 5 h (Petrenz <i>et al.</i> , 2015); a: Nieguth <i>et al.</i> (2014).	109
Tabelle 29 Zusammenfassung der optimierten DKR der α -Hydroxyketone.....	120

Abkürzungsverzeichnis

2-MeTHF	2-Methyltetrahydrofuran
BAL	Benzaldehydlyase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
BTMS	Butyltrimethoxysilan
CALB	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>
CALBip	CALB immo plus
CPME	Cyclopentylmethylether
CSTR	Rührkesselreaktor (<i>continuous stirred-tank reactor</i>)
DDTMS	Dodecyltrimethoxysilan
DES	Stark eutektischen Lösungsmittel (<i>deep eutetic solvents</i>)
DKR	Dynamisch kinetische Racematspaltung
DTMS	Decyltrimethoxysilan
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
ETMS	Ethyltrimethoxysilan
HDTMS	Hexadecyltrimethoxysilan
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HPP	2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on
HTMS	Hexyltrimethoxysilan
<i>i</i> BTMS	<i>iso</i> -Butyltrimethoxysilan
IL	Ionische Flüssigkeit (<i>ionic liquid</i>)
KR	Kinetische Racematspaltung
LipTL	Lipase TL [®]
MCF	Mesozellulärer Schaum (<i>mesocellular foam</i>)
MTMS	Methyltrimethoxysilan
n. b.	Nicht bestimmt
ODTMS	Octadecyltrimethoxysilan
PAC	Phenylacetylcarbinol
RT	Raumtemperatur
TMOS	Tetramethoxysilan

1 Einleitung

1.1 Alpha-Hydroxyketone

Die als Acyloine bezeichnete Verbindungsklasse der α -Hydroxyketone hat insbesondere für den Feinchemikaliensektor als auch für die Pharmazie eine wichtige Bedeutung unter anderem als Synthesebausteine für verschiedene Medikamente (Hoyos *et al.*, 2009). Einige Beispiele sind in Abbildung 1 dargestellt. Sehr bekannt sind beispielsweise Ephedrin und Bupropion. Ephedrin kann als Sympathomimetikum in der Behandlung von Bronchitis und Asthma eingesetzt werden (Sehl *et al.*, 2015). Bupropion kommt als Antidepressivum oder zur Raucherentwöhnung zum Einsatz (Demir *et al.*, 2001). Aber auch Medikamente zur Behandlung von Alzheimer und Tumoren können aus α -Hydroxyketonen hergestellt werden (Hoyos *et al.*, 2009).

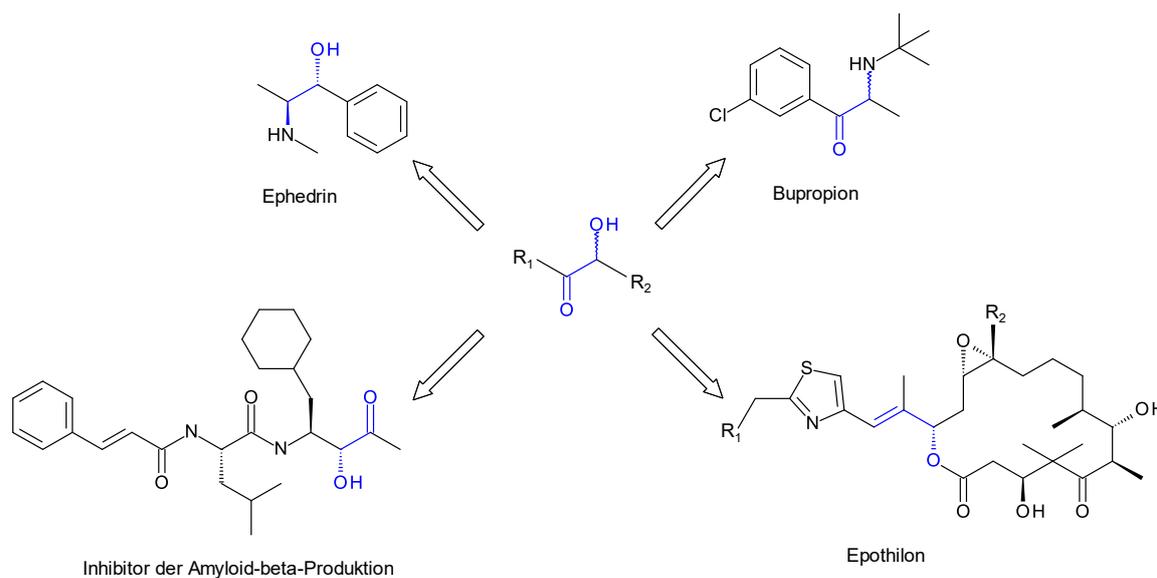
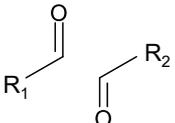
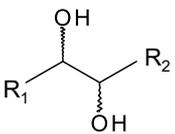
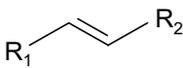
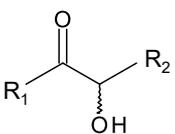
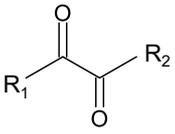
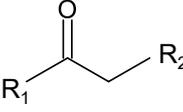


Abbildung 1 Pharmazeutische Produkte aus α -Hydroxyketonen als Grundbausteine.

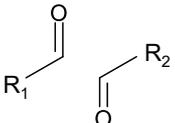
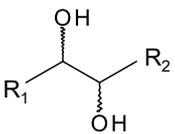
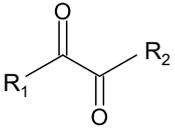
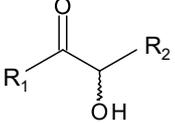
Wie aus Abbildung 1 ersichtlich, handelt es sich in der Regel bei den Wirkstoffen um chirale Verbindungen. Daher ist die Bereitstellung von enantiomerenreinen α -Hydroxyketonen als Grundbausteine von zentraler Wichtigkeit für die weiteren Syntheseschritte. Für die Herstellung chiraler α -Hydroxyketone existieren eine Vielzahl an etablierten Methoden. Hierbei kann zwischen den chemischen und den biokatalytischen Wegen unterschieden werden (Hoyos *et al.*, 2009). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die chemischen Wege.

Tabelle 1 Gängige chemische Methoden zur Herstellung von α -Hydroxyketonen.

Reaktion	Edukt	Katalysator
Asymmetrische Benzoinkondensation		Chirales Thiazoliumsalz
Asymmetrische Oxidation		n-Bromsuccinimid und chiraler Cu-Katalysator
Ketohydroxylierung		RuO ₄
Oxidative kinetische Racematspaltung		Chiraler Fe- oder Co-Katalysator
Stereoselektive Reduktion		Pt-Katalysator
α -Hydroxylierung		Cu-Piperazin-Hybridpolymer

Die wohl am häufigsten beschriebene Methode ist die α -Hydroxylierung über das korrespondierende Keton (Arai *et al.*, 2006). Aber auch die stereoselektive Reduktion des Diketons, beispielsweise über Platinkatalysatoren (Toukoniitty *et al.*, 2001) und die Ketohydroxylierung von Olefinen (Plietker, 2005) finden Anwendung. Weitere Möglichkeiten ergeben sich durch die asymmetrische Oxidation des korrespondierenden Diols (Onomura *et al.*, 2007), sowie die oxidative kinetische Racematspaltung des Racemats eines α -Hydroxyketons (Kumar Alamsetti *et al.*, 2009; Muthupandi *et al.*, 2009). Die klassische Benzoinkondensation durch Verwendung chiraler Thiazoliumsalze ist ebenfalls möglich (Enders & Kallfass, 2002). Nachteile der genannten chemischen Methoden sind in der Regel die vielen Reaktionsschritte, welche mit einer hohen Menge an Nebenprodukten und Abfall einhergehen, sowie die in den meisten Fällen geringen Enantiomerenreinheiten der Produkte (Hoyos *et al.*, 2009). Daher wurden neben den chemischen Methoden unterschiedliche biokatalytische Strategien entwickelt. Diese beruhen im Prinzip auf den gleichen Ausgangsstoffen unter Verwendung von Enzymen als Katalysatoren. Die wichtigsten Möglichkeiten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2 Gängige biokatalytische Methoden zur Herstellung von α -Hydroxyketonen.

Reaktion	Substrat	Biokatalysator
Carboligation		Lyasen
Asymmetrische Oxidation		Oxidoreduktasen
Asymmetrische Reduktion		Oxidoreduktasen
Kinetische Racematspaltung		Hydrolasen

Ein sehr verbreiteter Ansatz ist die Synthese symmetrischer und asymmetrischer chiraler α -Hydroxyketone mittels thiamindiphosphatabhängiger Lyasen. Sie katalysieren die Umpolungsreaktion bzw. die Carboligation zweier Aldehyde, wobei ein Aldehyd als Akzeptor und eins als Donor fungiert. Bei den gewählten Aldehyden kann es sich um unterschiedliche Aldehyde handeln. Geeignete Lyasen sind unter anderem die Benzaldehydlyase, die Benzoylformiardecarboxylase und die Pyruvatcarboxylase (Hoyos *et al.*, 2009). Durch Mutationen der nativen Enzyme kann ein breites Spektrum an verschiedenen symmetrischen und asymmetrisch α -Hydroxyketonen in (*R*)- und (*S*)-Konfiguration als Produkte hergestellt werden (Hailes *et al.*, 2013). Nachteilig an der Verwendung von Lyasen ist der in stöchiometrischen Mengen benötigte Cofaktor. Außerdem können durch Selbstkondensation Nebenprodukte bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Aldehyden auftreten (Hoyos *et al.*, 2009).

Als zweiter Ansatz können Oxidoreduktasen eingesetzt werden. Hierbei können sowohl die korrespondierenden Dirole oxidiert werden, also auch die entsprechenden Diketone reduziert werden. Die Reaktionen werden in der Regel unter Verbrauch von Nicotinamidadenindinukleotid in der oxidierten oder reduzierten Form durchgeführt (Hoyos *et al.*, 2009). Bekannte Vertreter sind unter anderem die Carbonylreduktase 2 aus *Candida parapsilosis* (Loderer & Ansorge-Schumacher, 2015) oder die Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus ruber* (Edegger *et al.*, 2006). Der für die Katalyse benötigte Cofaktor in stöchiometrischen Mengen ist für diese Enzymklasse ähnlich den Lyasen nachteilig. Eine

Herausforderung ist hier eine effektive Regeneration des Cofaktors bereitzustellen, die parallel zur eigentlichen Reaktion abläuft (Hoyos *et al.*, 2009).

Die letzte hier vorgestellte Möglichkeit zur Synthese chiraler α -Hydroxyketone ist die kinetische Racematspaltung eines racemischen Gemisches des jeweiligen α -Hydroxyketons durch die Verwendung von Hydrolasen als Biokatalysator (Hoyos *et al.*, 2009). Diese Methode beruht auf der spezifischen Umsetzung nur eines Enantiomers durch das Enzym durch Hydrolysen, Veresterungen oder Umesterungen. Die Weiterentwicklung dieses Konzeptes ist die dynamisch kinetische Racematspaltung. Da Hydrolasen keine Cofaktoren benötigen und insbesondere Lipasen in der Regel eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen, ist diese Methode für einen industriellen Einsatz sehr interessant. Daher bildet dieser Reaktionstyp die Grundlage dieser Arbeit und das Konzept wird im nächsten Kapitel genauer vorgestellt.

1.2 Dynamisch kinetische Racematspaltung

1.2.1 Prinzip

Die dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) setzt sich im Allgemeinen aus zwei Schritten zusammen, der kinetischen Racematspaltung (KR) und einer *in situ* Racemisierung eines Enantiomers des racemischen Eduktes. Die KR eines racemischen Gemisches beruht zunächst auf der Bevorzugung eines Enantiomers durch ein gewähltes Enzym. Das bedeutet, dass die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion des bevorzugten Enantiomers wesentlich höher als die Geschwindigkeitskonstante der Umsetzung des zweiten Enantiomers sein muss (Abbildung 2) (El Gihani & Williams, 1999).

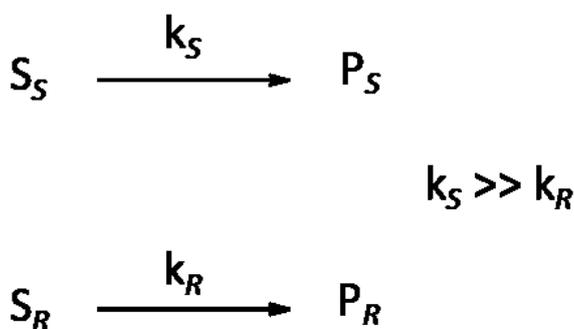


Abbildung 2 Prinzip der KR eines racemischen Substrates; S: Substrat, P: Produkt, k: Geschwindigkeitskonstante.

Durch die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften des Produktes und des nicht bevorzugten Enantiomeres ist eine folgende Trennung der Substanzen möglich. Nachteil dieser Methode ist eine Umsatzlimitierung von 50% bezogen auf die eingesetzte Menge an racemischem Substrat. Zudem fällt das nicht umgesetzte Enantiomer als weiterer Abfall an. Die Beseitigung dieser Limitierung kann durch die Kombination der KR mit einer *in situ* Racemisierung des nicht umgesetzte Enantiomers erreicht werden. Somit kann theoretisch ein maximaler Umsatz von 100% generiert werden. Voraussetzung ist, dass die Racemisierungsreaktion eine höhere Geschwindigkeitskonstante als die enzymatische Umsetzung des bevorzugten Enantiomers aufweist, sodass jeder Zeit ausreichend Substrat für den enzymatischen Schritt zur Verfügung steht (Abbildung 3) (El Gihani & Williams, 1999).

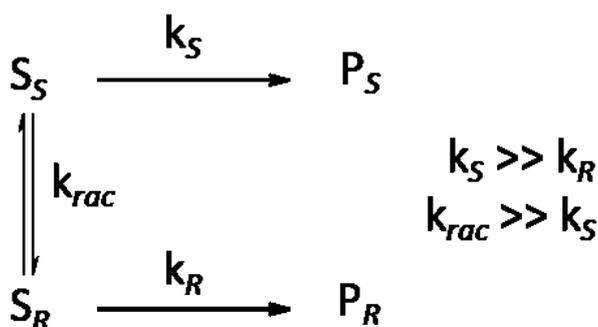


Abbildung 3 Prinzip der DKR eines racemischen Substrates; S: Substrat, P: Produkt, k: Geschwindigkeitskonstante.

Eine Racemisierung kann durch chemische und biokatalytische Methoden erreicht werden. Einige Beispiele für chemische Methoden sind thermische Racemisierung, Redoxreaktionen, die Bildung von Schiff'schen Basen oder die Racemisierung über ein Meso-Intermediat (Ebbers *et al.*, 1997). Eine biokatalytische Racemisierung mittels einer Redoxreaktion wurde für α -Hydroxyketone durch verschiedene Bakterienstämme demonstriert (Nestl *et al.*, 2007). Mit der Mandelatracemase aus *Pseudomonas putida* konnten Mandelsäure und Mandelsäurederivate racemisiert werden (Stecher *et al.*, 1997). Neben den genannten Methoden ist eine spontane Racemisierung des Substrates möglich. Dies konnte beispielsweise in der DKR von Mandelonitril demonstriert werden (Yamamoto *et al.*, 1991). Die Wahl der Racemisierungsmethoden sollte je nach Substrat individuell gefällt werden. So ist beispielsweise die Bildung von Schiff'schen Basen für primäre Aminogruppen geeignet, während Redoxreaktionen für chirale Alkoholgruppen gängig sind.

Für die Hydrolase-katalysierte DKR hat sich in den letzten Jahren die *in situ* Racemisierung unter Verwendung von Übergangsmetallen (El Gihani & Williams, 1999; Hoyos et al., 2009). Als Metalle wurden bisher unter anderem Palladium (Reetz & Schimossek, 1996), Palladiumsalze (Allen & Williams, 1996), verschiedene Rutheniumspezies (Agrawal et al., 2014; Hoyos et al., 2006; Hoyos, Pace, et al., 2011; Larsson et al., 1997), sowie Aluminium und Zirkonium eingesetzt (Nieguth et al., 2014). Für die DKR von Benzoin und Benzoinderivaten wird häufig ein homogener Rutheniumkatalysator beispielsweise der Shvo-Katalysator in Kombination mit der kommerziellen Lipase TL in lyophilisierter oder immobilisierter Form eingesetzt (Aires-Trapote *et al.*, 2015; Hoyos *et al.*, 2008; Hoyos, Pace, *et al.*, 2011) etabliert. In einer anderen Studie konnte die Verwendung eines heterogenen Zirkoniumkatalysator, Zr-TUD-1 (25), demonstriert werden (Nieguth et al., 2014). Dieser weist aufgrund der Möglichkeit des Katalysatorrecycling einen wesentlichen Vorteil gegenüber den üblichen Rutheniumkatalysatoren auf.

Ein Nachteil aller genannten Metallkatalysatoren ist, dass durch den Reaktionsmechanismus der Redoxreaktion über die korrespondierenden Diketone bei asymmetrischen Substraten auch die Regioisomere gebildet werden können (Hoyos, Pace, et al., 2011; Hoyos et al., 2009). Die Kombination der Lipase TL in heterogener Form mit dem Zr-TUD-1 bildet die Grundlage dieser Arbeit, da neben den genannten Vorteilen in der Verwendung von Lipasen die Möglichkeit des gleichzeitigen Recyclings der Katalysatoren für einen industriellen Einsatz interessant ist. Die kommerzielle Verfügbarkeit der LipTL und damit der Verzicht auf eine aufwendige rekombinante Proteinexpression, macht diese Lipase weiterhin sehr attraktiv.

1.2.2 Lipase TL

Bei der Lipase TL handelt es sich um ein von der Firma Meito Sangyo Co., Ltd. (Nagoya, Japan) vertriebenes kommerzielles Produkt. Nach Angabe des Herstellers handelt es sich dabei um eine Lipase aus *Pseudomonas stutzeri*. Im Zuge der Herstellung von chiralen Aminoalkoholen über die Verwendung von (*R*)-Benzoin wurde die Lipase erstmal von Aoyagi *et al.* (2000) für die KR von racemischem Benzoin beschrieben. Dabei konnte eine Selektivität der Lipase hinsichtlich des (*S*)-Benzoins mit einem Enantiomerenverhältnis von >99:1 nachgewiesen werden. Die Weiterentwicklung der KR von Benzoin hin zu der DKR von Benzoin und Benzoinderivaten wurde in den folgenden Jahren insbesondere von Hoyos *et al.* weitergeführt. So konnte die erfolgreiche Verwendung der Lipase TL in organischen Lösungsmitteln wie Tetrahydrofuran für verschiedene α -Hydroketone gezeigt werden. Bei

ausreichend großen Substituenten konnte dabei stets die Bevorzugung des (*S*)-Enantiomers beobachtet werden. Durch die Kombination der Lipase TL mit dem Shvo-Katalysatoren konnten Umsätze von bis zu >99% erreicht werden (Hoyos *et al.*, 2006; Hoyos, Pace, *et al.*, 2011). Zur Aufklärung der aktiven Komponente der kommerzieller Lipase TL und ihrer Enantioselektivität wurde eine umfangreiche Studie von Maraite *et al.* (2013) durchgeführt. Dabei wurde auf Basis von Homologiestudien postuliert, dass es sich um ein als LipC annotiertes, bislang nicht weiter beschriebenes Enzym handelt. Aus dem 3D-Homologiemodell konnte eine schematische Darstellung des aktiven Zentrums generiert werden (Abbildung 4). Aufgrund des Modells wurde das Vorhandensein von der für viele Lipasen typischen katalytischen Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure und zwei Liden zur Abdeckung des aktiven Zentrums beschrieben. Außerdem wurde im Modell ein Tyrosin in der kleinen hydrophoben Tasche gefunden, was vermutlich maßgeblich für die Bindung und Ausrichtung der Substrate im aktiven Zentrum verantwortlich ist. Durch das Vorhandensein dieser Aminosäure wurde die strikte Selektivität hinsichtlich der Umsetzung der (*S*)-Substrate bei ausreichend großen Substituenten, sowie die fehlende Reaktivität bei Substraten mit geblockter Carbonylfunktion erklärt.

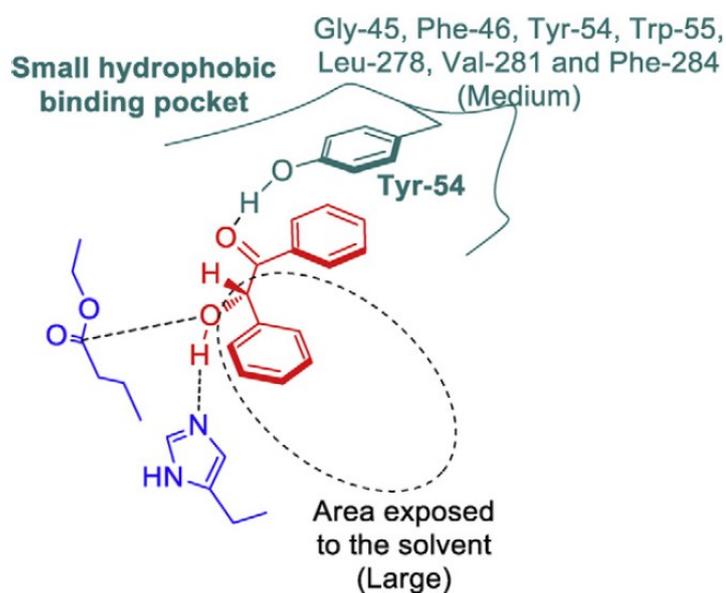


Abbildung 4 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der LipC beziehungsweise der Lipase TL mit Benzoin als Substrat in Rot (Maraite *et al.*, 2013).

In dem beschriebenen Einsatz der LipTL für die DKR wurde das Enzym als Lyophilisat und als Immobilisat eingesetzt. Durch die Immobilisierung sollten die festgestellte Thermolabilität und die Aktivität der Lipase verbessert werden. Untersucht wurden Sol-Gele, Silikonspähren und statischen Emulsionen für eine Einbettung des Enzyms

(Hoyos *et al.*, 2008). Für die trägerbasierende Immobilisierung wurden bisher einige verschiedene kommerzielle Träger für eine adsorptive (Fauré & Illanes, 2011; Nieguth *et al.*, 2014), sowie zwei Träger für eine kovalente Immobilisierung verwendet (Aires-Trapote *et al.*, 2015). Die näher in Kapitel 1.4 beschriebenen Vorteile einer Enzymimmobilisierung konnten in den meisten Beispiele demonstriert werden. Mit der auf dem SepabeadsTM-Träger EC-OD immobilisierten LipTL wurde eine Aktivitätssteigerung von 100% in der Umesterung von Sterinen aus Holz festgestellt (Fauré & Illanes, 2011). Mittels der Immobilisierung in Silikonsphären konnte die Aktivität der LipTL in der KR von Benzoin um 120% und mittels eines Sol-Gels um 40% gegenüber dem Lyophilisat gesteigert werden (Hoyos *et al.*, 2008). Durch die Verwendung des Polypropylenträgers Accurel MP1001 für eine adsorptive Immobilisierung konnte die spezifische Aktivität mehr als vervierfacht werden (Nieguth *et al.*, 2014). Die kovalente Immobilisierung der LipTL auf Träger mit Epoxidgruppen führte zu keiner Erhöhung der hydrolytischen Aktivität. Es wurde dafür eine Erhöhung der Thermostabilität der LipTL im wässrigen Medium erreicht (Aires-Trapote *et al.*, 2015). Die verschiedenen Varianten der immobilisierte LipTL wurden im Weiteren für die DKR von Benzoin eingesetzt. Auch ein wiederholter Einsatz der Immobilisate in mehreren Zyklen wurde demonstriert (Aires-Trapote *et al.*, 2015; Hoyos *et al.*, 2008; Nieguth *et al.*, 2014).

Im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen Trägern und den in der Literatur entwickelten Immobilisierungsmethoden wurde bisher nur ein geringer Teil untersucht. Eine generelle Aussage, welches Trägermaterial bzw. welche Immobilisierungsmethode am geeignetsten für die LipTL ist, kann daher nicht getroffen werden. Auch wurden bisher kaum Studien zur mechanischen Stabilität der Immobilisate durchgeführt. Diese wären insbesondere für einen industriellen Ansatz von Wichtigkeit. Zudem ist die Verwendung der DKR bisher auf Benzoin und Benzoinderivate limitiert. Andere industriell interessante Substrate wurden kaum untersucht.

1.2.3 Zr-TUD-1

Der Zr-TUD-1 wurde erstmals von Ramanathan *et al.* (2006) als neuer Katalysator für die Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion beschrieben. Die Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion wird für die Reduktion von Aldehyden und Ketonen zu den korrespondierenden Alkoholen unter Oxidation von 2-Propanol eingesetzt (Abbildung 5).

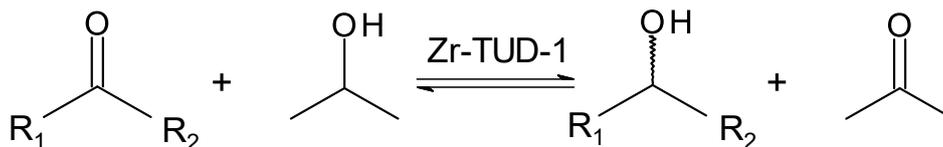


Abbildung 5 Meerwein-Ponndorf-Verley-Reduktion eines Ketons mit Zr-TUD-1 als Katalysator und 2-Propanol als zweites Edukt.

Der Zr-TUD-1 beruht auf dem dreidimensionalen, mesoporösen Silica TUD-1, in dessen Struktur bereits andere Metalle, wie Eisen und Kupfer, erfolgreich eingebaut wurden. Vorteil dieses Katalysators ist unter anderen die höhere Porengröße des Silica-Materials im Vergleich anderen Silicas, beispielsweise dem SBA-15. Dadurch können größere Edukte mit dem Zr-TUD-1 umgesetzt werden. Es wurde festgestellt, dass das Zirkonium in der Oxidationsstufe Zr(IV) tetraedrisch in der Struktur eingebaut wurde und der Katalysator dominierend lewissäuer ist. Der Zr-TUD-1 konnte erfolgreich für die Reduktion verschiedener Ketone unter Verwendung von 2-Propanol eingesetzt werden. Der erneute Einsatz nach einem Recycling des Katalysators wurde ebenso demonstriert (Ramanathan *et al.*, 2006).

Aufgrund der Fähigkeit zur Reduktion und Oxidation wurde der Zr-TUD-1 neben Al-TUD-1 und W-TUD-1 für die Racemisierung von α -Hydroxyketonen am Beispiel von (*R*)-Benzoin in der Studie von Nieguth *et al.* (2014) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unter allen getesteten Katalysatoren der Zr-TUD-1 mit einem Verhältnis von Silicium zu Zirkonium von 25 zur schnellsten Racemisierung führte und auch in der DKR des racemischen Benzoin in Kombination mit der Lipase TL zu den besten Ergebnissen führte. Aufgrund des heterogenen Charakters dieses Katalysators, konnte er zusammen mit der immobilisierten Lipase TL recycelt werden und über fünf Zyklen erneut eingesetzt werden. Eine Studie zur Eignung des Katalysators zur Racemisierung von weiteren Substraten ist bisher nicht erfolgt.

1.3 Enzyme in nicht-wässrigen Reaktionsmedien

1.3.1 Organische Lösungsmittel

Für die chemische Industrie ist die Verwendung von Enzymen als Katalysatoren aufgrund ihrer Selektivitäten von großen Interesse. In der Natur arbeiten Enzyme überwiegend in wässriger Umgebung. Wasser als Lösungsmittel ist nur bedingt für chemische Synthesen

geeignet. Problematisch können geringe Löslichkeiten der Substrate und durch die hohe Nucleophilie des Wassers verursachte Nebenreaktionen, beispielsweise Hydrolysen, sein (Bell *et al.*, 1995). Daher wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv am Einsatz von Enzymen in nicht-wässrigen bzw. unkonventionellen Lösungsmitteln geforscht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Enzyme in organischen Lösungsmitteln, in ionischen Flüssigkeiten, in stark eutektischen Lösungsmitteln und in überkritischen Fluiden Aktivitäten aufweisen können.

Auf dem Gebiet der Anwendung von organischen Lösungsmitteln für die Biokatalyse, stellen die Arbeiten von Zaks und Klibanov die möglicherweise wichtigsten Fundamente dar. Sie konnten zeigen, dass verschiedene Lipasen in der Lage sind, in reinen organischen Lösungsmitteln aktiv zu sein. Zudem konnte die Thermostabilität der Lipasen in getrockneter Form in den organischen Lösungsmitteln bei 100 °C deutlich erhöht werden (Zaks & Klibanov, 1984, 1985). Aus der Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Reaktionsmedium anstatt Wasser ergeben sich eine Reihe von Vorteilen. So sind Reaktionstypen möglich, die in Wasser als Lösungsmittel nicht durchführbar sind. Beispiele sind Veresterungen oder Umesterungen. Durch Hydrolysen verursachte Nebenreaktionen können unterdrückt werden. Durch die verbesserte Löslichkeit von hydrophoben Substraten in organischen Lösungsmitteln werden häufig die Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich erhöht. Die niedrigeren Siedepunkte der meisten organischen Lösungsmittel im Vergleich zum Wasser können die Produktgewinnung vereinfachen. Ebenso ist die Rückgewinnung des Biokatalysators durch die Unlöslichkeit von Enzymen in diesen Medien möglich, wodurch ein erneuter Einsatz des Katalysators durchführbar ist. Zuletzt kann die Thermostabilität einiger Enzyme in nahezu wasserfreien organischen Lösungsmitteln deutlich erhöht sein (Carrea & Riva, 2000; Ogino & Ishikawa, 2001). Neben diesen vielfältigen Vorteilen existieren auch einige Nachteile, die bei der Wahl des organischen Lösungsmittels für eine Reaktion beachten werden sollten. So kann die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln im Gegensatz zum Wasser stark reduziert sein oder das Enzym vollständig inaktiviert werden. Gründe hierfür können in einer Entfaltung des Enzyms durch Änderung der Hydrophobizität des Mediums im Vergleich zum Wasser liegen oder in der Entfernung des essentiellen Wassers aus der Hydrathülle des Enzyms. Des Weiteren kann je nach Enzym oder Reaktionsart eine Einstellung oder Kontrolle des Wassergehaltes im Reaktionssystem notwendig sein (siehe 1.3.4). Durch eine hohe Viskosität des Lösungsmittels können zudem Massentransferlimitierungen auftreten, die zu geringeren Reaktionsgeschwindigkeiten führen können (Doukyu & Ogino, 2010).

Ein weit verbreitetes Konzept zur Korrelation von Enzymaktivitäten bzw. -stabilitäten zum verwendeten organischen Lösungsmittel stellt das log P-Konzept dar. Der log P ist der dekadische Logarithmus des Verteilungskoeffizienten eines Stoffes in einem Wasser/Octanol-Gemisch (Doukyu & Ogino, 2010). Die Anwendung dieses Konzeptes ist dabei auf Lösungsmittel der gleichen Funktionalität begrenzt (Khmelnitsky *et al.*, 1991). In der Regel wird davon ausgegangen, dass Lösungsmittel mit einem hohen log P-Wert aufgrund ihres hydrophoben Charakters enzymverträglich sind. Dennoch konnte gezeigt werden, dass das Konzept in der Regel allein nicht ausreichend ist, um die Zusammenhänge zwischen der Natur des Lösungsmittels und der Enzymaktivität und -stabilität zu erklären (Doukyu & Ogino, 2010; Kvittingen, 1994).

1.3.2 Ionische Flüssigkeiten

Neben den konventionellen organischen Lösungsmitteln, wurde in den letzten Jahren die Lösungsmittelklasse der ionischen Flüssigkeiten (engl. *ionic liquid*, IL) für den Einsatz in der Biokatalyse erforscht. Ionische Flüssigkeiten sind Salze, die in der Regel bereits bei unter 100 °C oder sogar bei Raumtemperatur flüssig sind. Sie bestehen aus jeweils einem Kation und einem Anion, die nur schwach koordiniert sind. Durch die unterschiedlichen Größen der Ionen wird eine Kristallisierung des Salzes verhindert (Gorke *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2014). Eine Auswahl an typisch verwendeten Ionen ist in Abbildung 6 gezeigt.

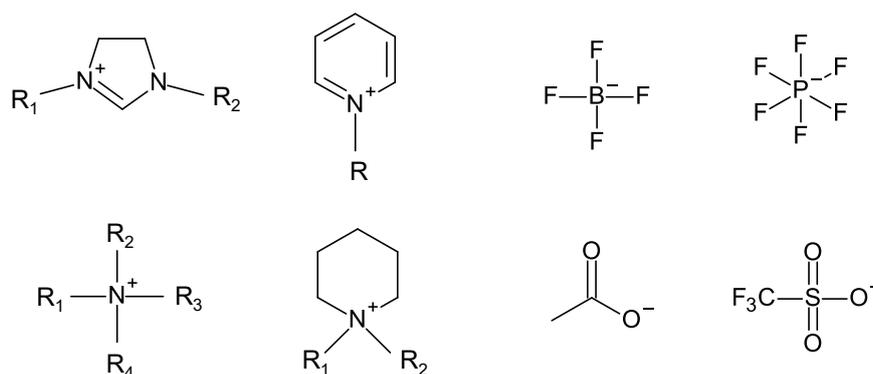


Abbildung 6 Auswahl typischer Kationen und Anionen ionischer Flüssigkeiten.

Neben dem geringen Schmelzpunkt zeichnen sie die ILs durch eine geringe Toxizität, einen geringen Dampfdruck, hohe chemische und thermische Stabilität und eine hohe Polarität aus. Aufgrund dieser Vorteile und einer geringen Gefährdung der Umwelt wird diese Lösungsmittelklasse auch als grüne Lösungsmittel bezeichnet (Patel *et al.*, 2014). Durch die Kombinationsmöglichkeit der Kationen und Anionen lassen sich die Eigenschaften der ILs

beeinflussen. So kann die Wahl des Kations die Viskosität, die Hydrophobizität, sowie die Dichte des IL verändern. Die Wahl des Anions kann wiederum Einfluss auf die Wasserlöslichkeit haben (Huddleston *et al.*, 2001). Anwendung finden die ILs heutzutage schon in verschiedenen Bereichen. So werden sie als alternative Lösungsmittel in verschiedenen Reaktionen, beispielsweise in C-C-Spaltungs- oder Kupplungsreaktionen, oder als direkter Ersatz für Säuren eingesetzt (D. Zhao *et al.*, 2002). Seit 2000 wurde der Einsatz von ILs auch für die Biokatalyse demonstriert. Erbdinger *et al.* (2000) präsentierten als erste eine Biokatalyse in ILs in der Synthese von Aspartam mittels Thermolysin und konnten eine vergleichbare Enzymaktivität bei einer gesteigerten Enzymstabilität im Vergleich zu den Ergebnissen in organischen Lösungsmitteln zeigen. Zur gleichen Zeit konnten Madeira Lau *et al.* (2000) die Eignung von ILs für die *Candida antarctica* Lipase B (CALB) in verschiedenen Reaktionstypen, unter anderem der Umesterung, demonstrieren. Auch in dieser Studie wurden ähnliche oder verbesserte Reaktionsgeschwindigkeiten im Vergleich zu denen in organischen Lösungsmitteln erreicht. In den folgenden Jahren konnte die Verwendung verschiedener ILs für weitere Lipasen bzw. Hydrolasen (J. K. Lee & Kim, 2002; Pavlidis *et al.*, 2009) und als Cosolventien für Oxidoreduktasen (de Gonzalo *et al.*, 2007; Herr *et al.*, 2013; Okrasa *et al.*, 2003) gezeigt werden.

1.3.3 Stark eutektische Lösungsmittel

Die Lösungsmittelgruppe der stark eutektischen Lösungsmittel (engl. *deep eutetic solvent*, DES) wird häufig als neue Klasse der ILs angesehen. Jedoch handelt es sich bei beiden Lösungsmitteln um zwei verschiedene Lösungsmitteltypen. Während ILs aus einer Mischung eines Kations und eines Anions bestehen, sind DESs eutektische Mischungen von Lewis- bzw. Brønstedsäuren und Basen (E. L. Smith *et al.*, 2014). Ähnlich den ILs zeichnen sie sich durch einen wesentlich geringeren Schmelzpunkt als ihre Ausgangsstoffe, einen geringen Dampfdruck, geringe Toxizität und hohe thermische Stabilität aus. Vorteile gegenüber den ILs sind eine bessere biologische Abbaubarkeit, eine vereinfachte Herstellung und geringere Produktionskosten (Abbott *et al.*, 2004; Durand *et al.*, 2013; E. L. Smith *et al.*, 2014). Erste Studien auf dem Gebiet der DESs wurden durchgeführt durch das Mischen von Ammoniumsalzen mit verschiedenen Metallsalzen. Abbott *et al.* (2001) konnten die Bildung verschiedener Flüssigkeiten durch das Erhitzen einer Reihe von quartären Ammoniumsalzen mit Zinkchlorid zeigen. Die Flüssigkeiten wiesen dabei einen geringeren Schmelzpunkt als die Ausgangsstoffe auf. In weiteren Studien konnte die

Verwendung verschiedener Wasserstoffbrückenbindungsdonoren an Stelle der Metallsalze demonstriert werden. Hierbei wurden Carbonsäuren, Alkohole und Amide eingesetzt (Abbott *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012). Die Verwendung von Aminosäuren, Zuckern oder bestimmten Säuren als Wasserstoffbrückenbindungsdonoren führte schlussendlich zur Entwicklung von so genannten natürlichen DES (NADES), welche als grüne Alternative zu konventionellen organischen Lösungsmitteln und zu den ILs gelten (Dai *et al.*, 2013; Paiva *et al.*, 2014). Einige Beispiele von quartären Ammoniumsalzen und Wasserstoffbrückenbindungsdonoren sind in Abbildung 7 dargestellt.

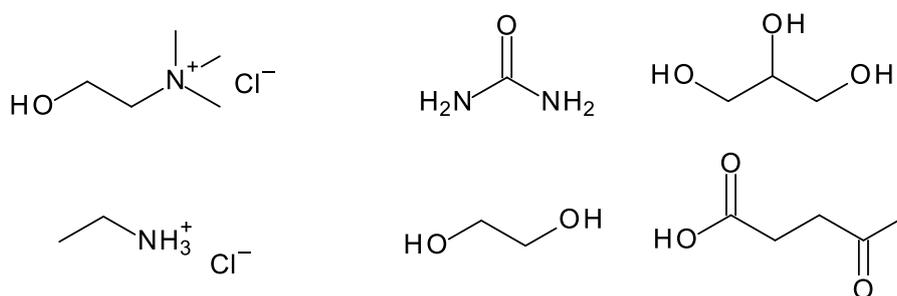


Abbildung 7 Auswahl quartärer Ammoniumsalze und Wasserstoffbrückenbindungsdonoren zur Bildung von DESs.

Anwendung finden DESs unter anderem in der Galvanisierung zur Erzeugung verschiedener Metallüberzüge, in der Elektropolitur metallischer Gegenständen, sowie als Lösungsmittel in Synthesen und Biotransformationen (E. L. Smith *et al.*, 2014). 2008 konnte zum ersten Mal eine Anwendung von DESs als Lösungsmittel in einer Biokatalyse demonstriert werden. Gorke *et al.* (2008) konnten die Eignung sowohl für die Umesterung von Ethylvalerat und 1-Butanol, als auch für die Aminolyse von Ethylvalerat mit 1-Butylamin zeigen. Von den getesteten Lipasen konnte insbesondere mit der CALB bzw. ihrer immobilisierten Variante gleichwertige oder bessere Aktivität in den genannten Reaktionen in einigen DESs im Vergleich zu Toluol oder ILs erreicht werden. In späteren Studien konnten DESs in der Produktion von Biodiesel (H. Zhao *et al.*, 2011; H. Zhao *et al.*, 2013) und in der Peptidsynthese (Maugeri *et al.*, 2013) eingesetzt werden. Auch für weitere Enzymklassen konnten in den letzten Jahre DESs erfolgreich verwendet werden, beispielsweise für die Benzaldehydlyase (Maugeri & Domínguez de María, 2014a) oder in der Reduktion von Ketonen mit Ganzzellen der Bäckerhefe (Maugeri & Domínguez de María, 2014b). Außerdem konnte eine Tandemreaktion mit verschiedenen Organokatalysatoren und der CALB in DESs demonstriert werden (Müller *et al.*, 2014).

1.3.4 Wasseraktivität in nicht-wässrigen Systemen

Für den Einsatz von Enzymen in nicht-wässrigen Reaktionen kann der Wassergehalt einen entscheidenden Faktor für die Aktivität der Enzyme ausmachen (Bell *et al.*, 1995). Es ist bekannt, dass Enzyme im Allgemeinen einen gewissen Wassergehalt zur Aufrechterhaltung ihrer Hydrathülle benötigen. So konnten Zaks und Klibanov (1988) zeigen, dass nicht der Gesamtwassergehalt, sondern die Menge an am Enzym gebundenem Wasser einen Einfluss auf die Aktivität hatte. Zudem konnten sie demonstrieren, dass die Menge an gebundenem Wasser nach der Zugabe einer gleichen Wassermenge in unterschiedliche organische Lösungsmittel variierte. So wurde in hydrophoben Lösungsmitteln eine geringere Wasserzugabe für die maximale Enzymaktivität benötigt als in hydrophilen Lösungsmitteln. Es hat sich daher durchgesetzt, die Menge an verfügbarem Wasser in einem System nicht über den Wassergehalt zu definieren, sondern über die thermodynamische Größe der Wasseraktivität (a_w). Diese definiert sich als das Verhältnis des Wasserdampfpartialdrucks über einem Stoff bzw. System zum Sättigungsdampfdruck von reinem Wasser bei einer konstanten Temperatur (Bell *et al.*, 1995).

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (1-1)$$

Die Messung der Wasseraktivität kann über die äquilibriert Gasphase über dem System erfolgen (Valivety *et al.*, 1992). Hierfür können Feuchtigkeitsmessgeräte verwendet werden. Für die Einstellung oder das Kontrollieren einer bestimmten Wasseraktivität haben sich verschiedene Methoden etabliert. Die möglicherweise verbreitetste Methode ist das Äquilibrieren einer einzelnen Komponente über einer gesättigten Salzlösung in einem geschlossenen System (Abbildung 8). Von den gesättigten Salzlösungen sind für definierte Bedingungen die Wasseraktivitäten bekannt, die sich in der Gasphase einstellen (Halling, 1994). Diese Methode wurde das erste Mal von Goderis *et al.* (1987) vorgestellt und eignet sich sowohl für Flüssigkeiten, als auch für Feststoffe (Halling, 1992).

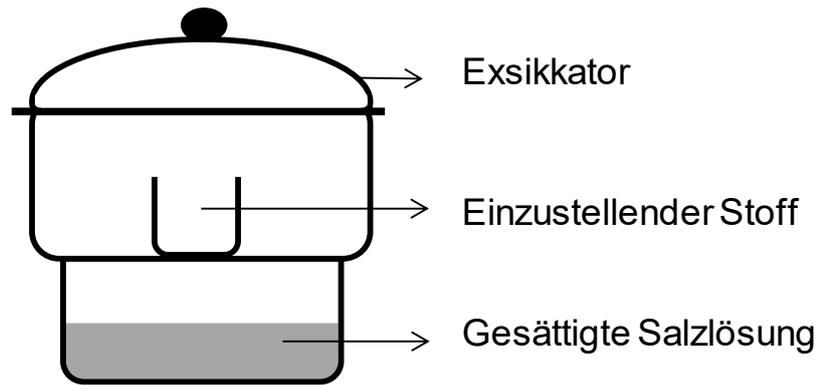


Abbildung 8 Exsikkator als Beispiel für ein geschlossenes System zur Einstellung einer gewählten Wasseraktivität in einem Stoff über einer gesättigten Salzlösung.

In Reaktionen, die Wasser verbrauchen oder erzeugen, ist das Kontrollieren der Wasseraktivität ein weiterer wichtiger Aspekt. Wehtje *et al.* (1993) verwendeten dafür einen Siliconschlauch, durch den eine gesättigte Salzlösung durch das Reaktionssystem gepumpt wurde. Durch das Schlauchmaterial konnte Wasser durch Diffusion sowohl abgegeben als auch aufgenommen werden. Als bekanntere Methode zum Kontrollieren der Wasseraktivität während einer Reaktion hat sich der Einsatz von Salzhydratpaaren, beispielsweise $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, im Reaktionssystem bewährt. Hierbei werden zwei verschiedene Hydrate des gleichen Salzes gemischt und zur Reaktion hinzugefügt. Sie fungieren als eine Art „Puffer“, der jeweils Wasser aufnehmen oder abgeben kann (Halling, 1992).

In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass für eine maximale Enzymaktivität die Einstellung einer bestimmten Wasseraktivität entscheidend ist. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die optimale Wasseraktivität von vielen Faktoren abhängt und nicht vorausgesagt werden kann. Sie ist abhängig von der Substratkonzentration, dem Reaktionstyp und vom Enzym selbst. So können beispielsweise Lipasen aus unterschiedlichen Organismen in der gleichen Reaktion verschiedene optimale Wasseraktivitäten aufweisen (Bovara *et al.*, 1993; Svensson *et al.*, 1994; Wehtje & Adlercreutz, 1997).

1.4 Stabilisierung von Enzymen

1.4.1 Methodenübersicht

Für den Einsatz von Enzymen in nicht-wässrigen Reaktionsmedien ist die wichtigste Voraussetzung, dass sie eine ausreichend hohe Stabilität in diesen Medien aufweisen. Ist

diese unzureichend, muss sie entsprechend erhöht werden. Dafür wurden in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von physikalischen und chemischen Methoden entwickelt (Ogino & Ishikawa, 2001). Neben verschiedenen Methoden zur Generierung von Mutanten durch einen Aminosäureaustausch im Enzym, hat sich die Immobilisierung von Enzymen als effektivste und am meisten untersuchte Methode insbesondere in der Industrie entwickelt. Vorteile bei der Verwendung von Immobilisaten gegenüber dem Einsatz von freiem Enzym sind neben der Erhöhung der Stabilität, die Möglichkeit zur Wiederverwendung des Biokatalysators, eine vereinfachte Produktaufarbeitung und weniger Aufreinigungsschritte. In einigen Fällen kann durch die Immobilisierung auch eine Erhöhung der Enzymaktivität erreicht werden. Nachteilig sind erhöhte Produktionskosten durch das Trägermaterial und die Herstellung der Immobilisate, sowie mögliche Massentransferlimitierungen durch das Trägermaterial (Eş *et al.*, 2015). Bei der Entwicklung eines Immobilisates eines Enzyms ist darauf zu achten, dass das Immobilisat sowohl den katalytischen als auch den nicht-katalytischen Zweck erfüllt. Der katalytische Zweck ist hierbei die Fähigkeit das ausgewählte Substrat umsetzen zu können. Der nicht-katalytische Zweck bezieht sich auf die Möglichkeit den Prozess zu vereinfachen, beispielsweise durch das Abtrennen des Biokatalysators (Cao, 2006).

Für die Immobilisierung von Enzymen stehen grundsätzlich die folgenden Methoden zur Verfügung (Abbildung 9): eine nicht-kovalente Bindung an eine Trägeroberfläche (A), eine kovalente Bindung an eine Trägeroberfläche (B), eine trägerlose und kovalente Quervernetzung (C), ein Einschluss in eine Matrix (D) und eine Einhüllung in eine Membran (E) (Eş *et al.*, 2015; Hanefeld *et al.*, 2009).

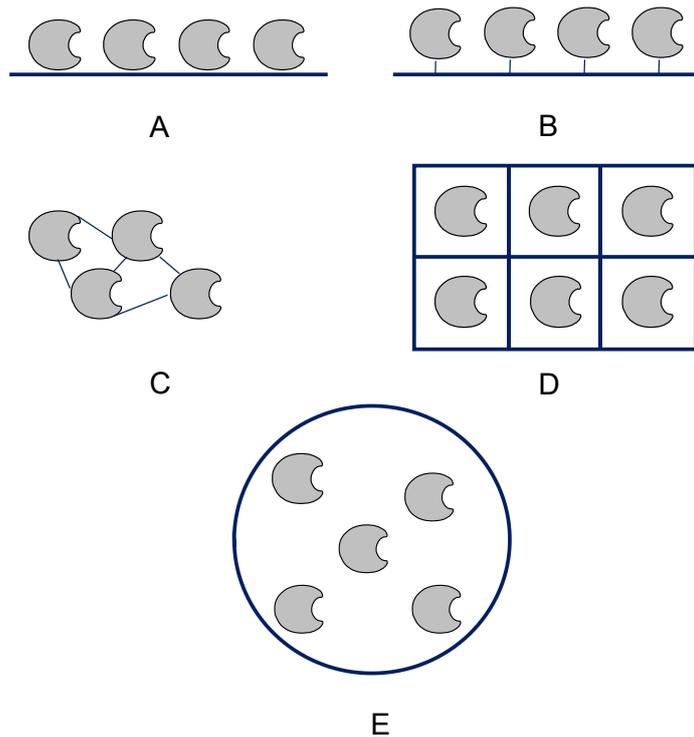


Abbildung 9 Gängige Immobilisierungsmethoden; A: adsorptive Immobilisierung, B: kovalente Immobilisierung, C: trägerlose Quervernetzung, D: Einschluss in eine Matrix, E: Einhüllung in eine Membran.

Die nicht-kovalente bzw. adsorptive Bindung von Enzymen an Trägeroberflächen gehört zu den einfachsten und mit als erstes durchgeführten Immobilisierungen. Die Immobilisierung kann aufgrund der Art der Bindung zwischen dem Enzym und der Trägeroberfläche weiter unterschieden werden. Die gängigsten Bindungen sind dabei hydrophobe oder hydrophile Wechselwirkungen, van-der-Waals-Bindungen, Wasserstoffbrückenbindungen oder ionische Wechselwirkungen (Cao, 2006). Die Methode ist im Vergleich zu anderen Methoden einfach und günstig in der Durchführung. Da chemische Modifikationen der Enzymoberfläche nicht notwendig sind, ist sie sehr schonend hinsichtlich der Enzymaktivität. Limitierend ist die geringe Desorptionsstabilität aufgrund der Bindungsart. Daher ist diese Art der Immobilisierung nicht für den Einsatz in wässrigen Reaktionssystemen, sondern für organischen Lösungsmitteln am besten geeignet (Brady & Jordaan, 2009).

Den nicht-kovalenten Immobilisierungen steht direkt die Verknüpfung eines Enzyms mit der Trägeroberfläche über eine chemische Bindung gegenüber. Hierfür werden am häufigsten die Lysine auf der Oberfläche verwendet. Diese können mit Epoxid-Gruppen oder Aldehyden auf der Trägeroberfläche reagieren. Für die Verknüpfung sind teilweise zusätzlich Quervernetzer wie Glutardialdehyd notwendig. Durch die kovalente Bindung der

Enzyme ist die Desorptionsstabilität deutlich erhöht, daher ist diese Methode insbesondere für wässrige Reaktionssysteme geeignet. Zudem kann die Stabilität gegenüber denaturierenden Faktoren deutlich erhöht werden, da das Enzym in seiner Flexibilität eingeschränkt ist und eine Entfaltung erschwert wird. Diese Einschränkung kann auf der anderen Seite zu einer Abnahme der Aktivität führen, insbesondere durch Mehrfachverknüpfungen zwischen dem Enzym und der Trägeroberfläche oder Konformationsänderungen (Hanefeld *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2007).

Eine kovalente Bindung der Enzymmoleküle untereinander ist ebenfalls möglich. Diese trägerlosen Enzymaggregate werden als CLEA (engl. *Cross Linked Enzyme Aggregate*) bezeichnet. Dabei wird im ersten Schritt zunächst das Enzym in Lösung aggregiert, beispielsweise durch Zugabe von Aceton und im zweiten Schritt werden die Enzymmoleküle mittels multifunktionaler Quervernetzer wie Glutardialdehyd verknüpft. Als Abstandhalter zwischen den Enzymmolekülen können weitere Proteine, beispielsweise Albumin, zur Verbesserung der Aktivität eingesetzt werden (Hanefeld *et al.*, 2009; Sheldon, 2007). Vorteil dieser Methode ist die Vermeidung der Nachteile der trägervermittelten kovalenten Immobilisierung. Jedoch bietet diese Methoden nicht die genannten Vorteile bei Verwendung eines Trägers, sodass keine ausreichende mechanische Stabilität der Aggregate gewährleistet werden kann (Hanefeld *et al.*, 2009; Murty *et al.*, 2002).

Der Einschluss eines Enzyms wird typischerweise erreicht durch Verwendung eines Polymers, das *in situ* um das Enzym gebildet wird. Das Enzym wird dabei in die Hohlräume des Polymers in seinem nativen Zustand eingebettet. Diese Methode ist sehr schonend, da die Konformation des Enzyms nicht verändert wird. Nachteilig können zusätzlich Massentransferlimitierungen durch die Polymermatrix auftreten (Eş *et al.*, 2015; Hanefeld *et al.*, 2009).

Bei der Einhüllung von Enzymen wird eine semipermeable Membran oder ein membranähnliches Gebilde verwendet, welche eine Diffusion der Edukte und Produkte ermöglichen. Ähnlich dem Einschluss ist diese Methode für das Enzym sehr schonend, jedoch können durch die Membran Massentransferlimitierungen auftreten (Eş *et al.*, 2015; Murty *et al.*, 2002).

1.4.2 Sol-Gele

Die Verwendung von Sol-Gelen zur Immobilisierung ist eine der bekanntesten und am häufigsten verwendeten Varianten für den Einschluss von Lipasen in eine Polymermatrix. Sol-Gele sind chemisch inerte Silicamaterialien, die *in situ* aus Präcursor-Molekülen durch

Hydrolyse und Kondensation gebildet werden (Abbildung 10). Als Präcursor können verschiedene Silane eingesetzt werden, typischerweise Tetramethoxysilan (TMOS) in Mischung mit Alkylsilanen. Die Eigenschaften des Gels, wie die Partikel- und Porengröße, lassen sich über die Polymerisierungsbedingungen beeinflussen. Das nach Abschluss der Gelierung erhaltene feuchte Gel, dessen Poren mit Wasser und Alkoholen gefüllt sind, wird als Aquagel bezeichnet. Zur Trocknung des Aquagels existieren zwei Möglichkeiten. Durch Trocknung bei Normaldruck wird das Xerogel erhalten. Die Methode ist relativ simpel, jedoch besitzt das Xerogel nicht mehr die dreidimensionale Struktur des Aquagels, da das Gel durch die dabei wirkenden Kapillarkräfte schrumpft. Zum Erhalt der Struktur kann als weitere Möglichkeit die Porenflüssigkeit durch überkritisches Kohlenstoffdioxid ersetzt werden. Nach Abdampfen des Gases verbleibt das Aerogel zurück, dessen dreidimensionale Struktur der des Aquagels entspricht (Brady & Jordaan, 2009; Cao, 2006; Hanefeld *et al.*, 2009).

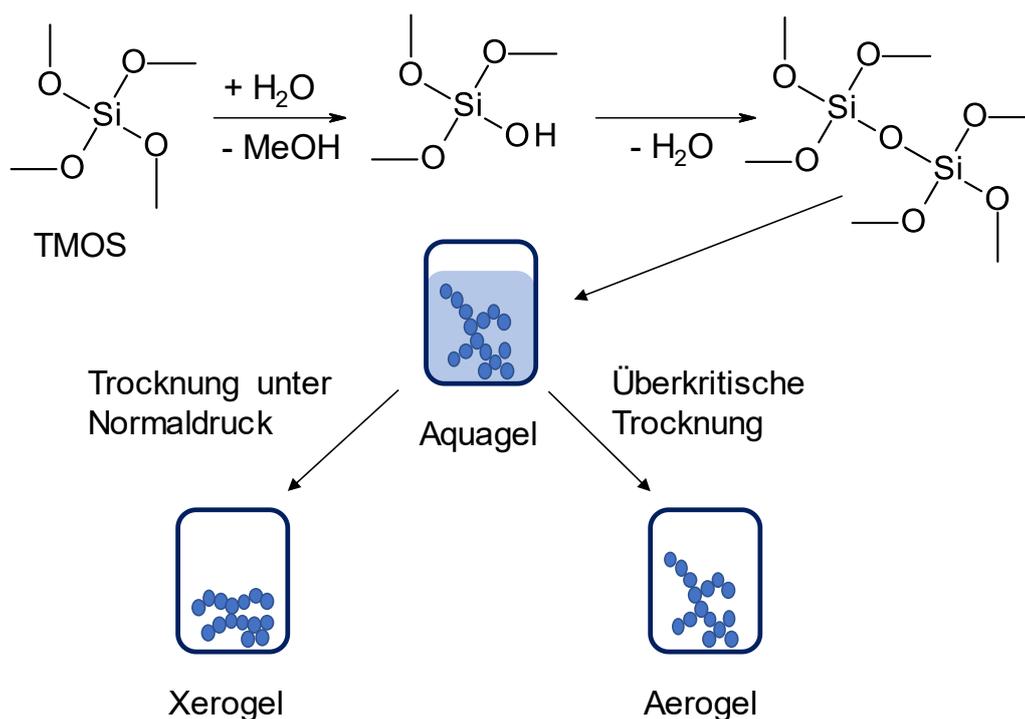


Abbildung 10 Herstellung eines Sol-Gels aus TMOS.

Der Einsatz der Sol-Gele für die Immobilisierung konnte sowohl für freie Enzyme als auch für Zellen demonstriert werden (Avnir *et al.*, 1994). Für Lipasen wurde festgestellt, dass das klassische Sol-Gel aus TMOS zu einem deutlichen Verlust der Aktivität führt (Reetz *et al.*, 1995). Durch eine Mischung aus TMOS und verschiedenen Alkylsilanen konnte ein Effekt der Kettenlänge der Alkylkette der Silanmonomere auf die Enzymaktivität beobachtet

werden. So konnte die Aktivität der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* deutlich gesteigert werden durch Erhöhung der Hydrophobizität des Sol-Gels (Reetz *et al.*, 1995). Jedoch wurde darauf hingewiesen, dass längere Alkylketten zu einer Verlangsamung des Gelierens führen (Reetz *et al.*, 2003). Die Aktivität konnte zudem durch das stöchiometrische Verhältnis von Wasser zu den Silanmonomeren (Reetz *et al.*, 1996) und durch die Anwesenheit von Additiven, beispielsweise Tween[®] 80 oder 18-Krone-6, beeinflusst werden (Reetz *et al.*, 2003; Reetz *et al.*, 1996). Die Eignung der Sol-Gele für die Immobilisierung konnte auch für weitere Lipasen gezeigt werden (Reetz *et al.*, 2003; Reetz *et al.*, 1996).

1.5 Zielsetzung

Für die Herstellung pharmazeutisch interessanter α -Hydroxyketone ist die DKR der korrespondierenden Racemate eine interessante und leistungsfähige Methode. Die dafür benötigten Lipasen zeichnen sich insbesondere durch ihre Aktivität und Stabilität in rein organischen Lösungsmitteln aus. Der Verzicht von Cofaktoren macht diese Enzymklasse für einen industriellen Einsatz besonders attraktiv. Für α -Hydroxyketone mit großen Seitenketten hat sich die Lipase TL aus *Pseudomonas stutzeri* als Biokatalysator als am geeignetsten gezeigt (Aoyagi *et al.*, 2000; Hoyos *et al.*, 2006). In vorherigen Studien wurde die Lipase TL erfolgreich mit dem homogenen Shvo-Katalysator für eine effektive DKR von Benzoin und Benzoinderivaten kombiniert und eine strikte (*S*)-Selektivität der Lipase TL festgestellt (Hoyos *et al.*, 2006; Hoyos, Pace, *et al.*, 2011). Die dabei festgestellte Thermolabilität der Lipase TL wurde durch eine Immobilisierung des Enzyms verbessert (Hoyos *et al.*, 2008). Um die Reaktion umweltfreundlicher zu gestalten, wurde 2-Methyltetrahydrofuran als Lösungsmittel vorgestellt (Hoyos, Quezada, *et al.*, 2011). In einer weiteren Studie von Nieguth *et al.* (2014) wurde eine komplett heterogene DKR etabliert. Hierbei wurde die Lipase TL adsorptiv auf dem Polypropylenträger Accurel MP1001 immobilisiert und der Shvo-Katalysator durch verschiedene Metallkatalysatoren ersetzt. Als Modellsubstrat wurde Benzoin verwendet. Das beste Ergebnis der DKR von Benzoin wurde mit dem Katalysator Zr-TUD-1 (25) (im Folgenden stets als Zr-TUD-1 bezeichnet) mit einem Verhältnis von Silicium zu Zirkonium von 25:1 im Lösungsmittel Toluol erreicht (Abbildung 11).

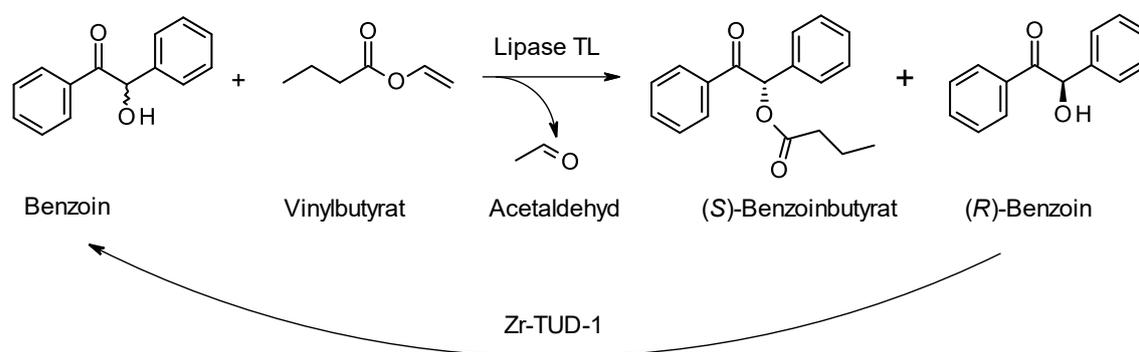


Abbildung 11 DKR eines α -Hydroxyketons am Beispiel von Benzoin als Substrat mittels der Katalysatoren Lipase TL und Zr-TUD-1.

Das Reaktionssystem von Nieguth *et al.* (2014) bildet den Stand der Forschung für diese Arbeit. Hauptziel sollte dabei die Übertragung der etablierten heterogenen DKR auf weitere pharmazeutisch relevante α -Hydroxyketone sein. Dafür sollte zunächst eine generelle Optimierung der DKR durchgeführt werden. Hauptaugenmerk lag bei den folgenden Teilzielen:

- Optimierung der Immobilisierung der Lipase TL durch Verwendung verschiedener trägerbasierter und trägerloser Methoden
- Charakterisierung der Wasseraktivitätsabhängigkeit der KR und der Racemisierung
- Untersuchung von alternativen Lösungsmitteln zur Erhöhung der Umweltfreundlichkeit der heterogenen DKR

Jeder Optimierungsschritt sollte dabei stets über die Aktivität des Biokatalysators und/oder des Racemisierungskatalysators und der Stabilität des Biokatalysators untersucht und bewertet werden. Als Modellsubstrat wurde zunächst Benzoin verwendet. Das optimierte Reaktionssystem sollte im Weiteren auf ausgewählte symmetrische und asymmetrische α -Hydroxyketone übertragen werden. Dafür wurden die folgenden Teilziele formuliert:

- Charakterisierung der KR mit der Lipase TL als Biokatalysator hinsichtlich der Aktivität und der Enantioselektivität
- Überprüfung weiterer alternativer Lipasen im Fall unzureichender Aktivität und/oder Enantioselektivität der Lipase TL
- Etablierung und Optimierung der DKR der ausgewählten α -Hydroxyketone

Als weiteres Ziel dieser Arbeit sollte die Co-Immobilisierung der Lipase TL und des Zr-TUD-1 als *proof of concept* untersucht werden mit den folgenden Teilzielen:

- Untersuchung etablierter Methoden aus der Literatur
- Charakterisierung des Co-Immobilisates hinsichtlich der Enzymbeladung und der Performance in der DKR

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht gesondert aufgelistet, mindestens analysenrein über die Zulieferer Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), Carl Roth (Karlsruhe, DE) oder VWR (Darmstadt, DE) bezogen.

Tabelle 3 Spezialchemikalien.

Chemikalie	Zulieferer	Reinheit
[BMIM][BF ₄]	Carl Roth, Karlsruhe, DE	≥99%
[BMIM][PF ₆]	Carl Roth, Karlsruhe, DE	≥99%
[OMIM][BF ₄]	Carl Roth, Karlsruhe, DE	>99%
[OMIM][PF ₆]	Carl Roth, Karlsruhe, DE	>99%
Butyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
Decyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	98%
Diacetoxyzirconiumoxid	TCI, Eschborn DE	20% in H ₂ O
Dodecyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	95%
Ethyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
Hexadecyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	90%
Hexyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
<i>iso</i> -Butyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
Methyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
Natriumfluorid	ABCR, Karlsruhe DE	99%
Octadecyltrimethoxysilan	ABCR, Karlsruhe DE	97%
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	-
Vinylbutyrat	TCI, Eschborn DE	>98%
Zirconiumpropoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA	70 wt% in 1-Propanol

2.1.2 Träger

Tabelle 4 Träger.

Trägerbezeichnung	Hersteller
EC-EA S	Resindion, Binasco, ITA
EC-EA M	Resindion, Binasco, ITA
EC-HA S	Resindion, Binasco, ITA
EC-HA M	Resindion, Binasco, ITA
EC-HFA S	Resindion, Binasco, ITA
EC-HFA M	Resindion, Binasco, ITA
ECR1090	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8804	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8806	Purolite, Llantrisant, UK
ECR1030	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8310	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8319	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8405	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8417	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8205	Purolite, Llantrisant, UK
ECR8214	Purolite, Llantrisant, UK
ECR4204	Purolite, Llantrisant, UK
IB-EC1	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-S861	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-S500	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-S60P	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-S60S	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-150A T1	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-150A T1-RS	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-150P	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-150A	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-D152	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-C435	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-A161	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-A171	Chiral Vision, Leiden, NED
IB-A369	Chiral Vision, Leiden, NED
Accurel MP1001	Membrana, Wuppertal, DE
Celite 503	Merck, Darmstadt, DE
Celite 545	Merck, Darmstadt, DE
Celite R632	Imerys Filtration Minerals, San José, CA, USA
Celite R633	Imerys Filtration Minerals, San José, CA, USA

2.1.3 Enzyme und Proteine

Tabelle 5 Enzyme und Proteine.

Bezeichnung	Zulieferer	Form
CALB immo plus	c-LEcta, Leipzig, DE	Immobilisat
Lipase TL	Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, JPN	Lyophilisat
BSA	Carl Roth, Karlsruhe, DE	Lyophilisat

2.1.4 Spezielle Geräte

Tabelle 6 Spezielle Geräte.

Gerät	Typ	Hersteller
Heißluftgebläse	HG 2310 LCD	Steinel, Herzebrock-Clarholz, DE
HPLC	Smartline	Knauer, Berlin, DE
HPLC-Pumpe	K-501	Knauer, Berlin, DE
Kontinuierlicher Rührkesselreaktor	-	Eigenanfertigung
Mehrstellenmagnetrührer	RT 15 power	IKA Werke, Staufen, DE
Mikrotiterplattenlesegerät	Infinite M200	Tecan, Männedorf, CH
Thermoschüttler	MHR 13	DITABIS, Pforzheim, DE
Feuchtemessgerät	HMT337	Vaisala, Vantaa, FIN

2.2 Bereitstellung von Biokatalysatoren

2.2.1 Bereitstellung der rekombinanten Benzaldehydlyase

Die Expression der Benzaldehydlyase (BAL) erfolgte in dem rekombinanten Stamm *Escherichia coli* SG13009 (pBAL-His6). Der Stamm wurde vom Lehrstuhl für Biotechnologie der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt.

Für die Vorkultur wurden 10 mL TB-Medium (siehe Tabelle 7), 10 µL Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) und 10 µL Kanamycin-Lösung (50 mg/mL) in einem 50 mL Erlenmeyerkolben vorgelegt und eine *E. coli*-Kolonie hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C bei 180 rpm. Für die Hauptkultur wurden 200 mL TB-Medium mit 200 µL Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) und 200 µL Kanamycin-Lösung (50 mg/mL) mit 10 mL Vorkultur inokuliert. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Das

Wachstum der Bakterien wurde photometrisch, durch Messung der OD600 verfolgt. Nach dem Erreichen eines OD600-Werts von 0,7 wurde die BAL-Expression durch Zugabe von 200 μ L IPTG-Lösung (800 mM) induziert. Die Kultur wurde für 3 h bei 27 °C und 180 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte für 10 min bei 8000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch eine Ultraschallbehandlung auf Eis mit 5 Zyklen mit 1 min Behandlung und 2 min Pause. Unlösliche Bestandteile wurden für 20 min bei 14.000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde bei -80 °C eingefroren und lyophilisiert. Das gewonnene Rohextraktlyophilisat der BAL wurde direkt weiterverwendet.

Tabelle 7 Zusammensetzung des TB-Mediums.

Medium	Volumen [L]	Substanz	Konzentration [g/L]
TB-Medium	0,9	Trypton	12,0
		Hefeextrakt	24,0
		Glycerol	5,0
10xTB-Salz	0,1	KH ₂ PO ₄	23,1
		K ₂ HPO ₄	125,4

2.2.2 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mittels adsorptiver Bindung

Aus dem LipTL-Präparat wurde eine 30 mg/mL Lösung in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) hergestellt. Die Suspension wurde dabei für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) und 900 rpm gerührt. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde die Suspension für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert und eine Probe des Überstands zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Pro Ansatz wurden 0,5 g Trägermaterial (Trockenmasse) in 15 mL Glasgefäßen mit Bördelrand vorgelegt. Bei einem Wassergehalt des gewählten Trägers <5% wurde dieser mit 3,79 mL Ethanol überschichtet und für 30 min inkubiert. Der Träger wurde anschließend entweder direkt weiterverwendet oder zweimal mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer gewaschen. Trägermaterialien mit einem Wassergehalt von >5% wurden mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM, pH 6,2) gespült und weiterverwendet. 10 mL der vorbereiteten LipTL-Lösung wurde zu den Trägern hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 4 h bis 24 h bei 40 °C auf einem Schüttler (340 rpm). Es wurde nach Ablauf der Inkubationszeit erneut eine Probe des Überstands zur Bestimmung der Beladung entnommen und die Immobilisate zweimal mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM, pH 6,2) gewaschen. Nach Filtration der Immobilisate

mithilfe einer Vakuumpumpe wurden sie in einem Exsikkator bei Normaldruck und RT über Silica Gel für mindestens 5 Tage getrocknet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

2.2.3 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mit freien Aminogruppen

Aus dem LipTL-Präparat wurde eine 30 mg/mL Lösung in 200 mM oder 20 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) hergestellt. Die Suspension wurde dabei für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) und 900 rpm gerührt. Zur Abtrennung unlösliche Bestandteile wurde die Suspension für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert und eine Probe des Überstands zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Pro Ansatz wurden 0,5 g Trägermaterial (Trockenmasse) in 15 mL Glasgefäßen mit Bördelrand vorgelegt, mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 20 mM, pH 6,2) gewaschen und mit 2 mL Glutardialdehydlösung (2% v/v im Kaliumphosphatpuffer) für 1 h bei RT geschüttelt (800 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, die Träger mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 20 mM, pH 6,2) gewaschen und 10 mL der vorbereiteten LipTL-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 18 h bei 30 °C auf einem Schüttler (150 rpm). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine weitere Probe des Überstands zur Bestimmung der Beladung entnommen und die Immobilisate nacheinander mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 20 mM, pH 6,2), 5 mL 0,5 M Natriumchloridlösung (im Kaliumphosphatpuffer gelöst) und 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 20 mM, pH 6,2) gewaschen. Nach Filtration der Immobilisate mithilfe einer Vakuumpumpe wurden sie in einem Exsikkator bei Normaldruck und RT über Silica Gel für mindestens 5 Tage getrocknet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

2.2.4 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mit freien Epoxidgruppen

Aus dem LipTL-Präparat wurde eine 30 mg/mL Lösung in 200 mM oder 1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) hergestellt. Die Suspension wurde dabei für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) und 900 rpm gerührt. Zur Abtrennung unlösliche Bestandteile wurde die Suspension für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert und eine Probe des Überstands zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Pro Ansatz wurden 0,5 g Trägermaterial (Trockenmasse) in 15 mL Glasgefäßen mit Bördelrand vorgelegt, mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 1 M, pH 6,2) gewaschen und 10 mL der vorbereiteten Lipase-TL-Lösung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte zunächst bei 30 °C für 18 h auf einem Schüttler (150 rpm) und weitere 20 h ohne Schütteln. Später wurde die Dauer auf 18 h unter Schütteln reduziert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine weitere Probe des

Überstands zur Bestimmung der Beladung entnommen und die Immobilisate nacheinander mit 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 1 M, pH 6,2), 5 mL 0,5 M Natriumchloridlösung (im Kaliumphosphatpuffer gelöst) und 5 mL Kaliumphosphatpuffer (200 mM oder 1 M, pH 6,2) gewaschen. Nach Filtration der Immobilisate mithilfe einer Vakuumpumpe wurden sie in einem Exsikkator bei Normaldruck und RT über Silica Gel für mindestens 5 Tage getrocknet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

2.2.5 Immobilisierung der Lipase TL auf Trägern mittels ionischer Bindung

Aus dem LipTL-Präparat wurden für die Träger mit Carboxygruppen unterschiedliche Lösungen mit einer Konzentration von 30 mg/mL in 200 mM Citratpuffer (pH 5,1 und 5,6) und 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,1) hergestellt. Für Träger mit quartären Aminogruppen wurden 30 mg/mL Lösungen in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (7,1 und 7,6) und 200 mM HEPES-Puffer (pH 8,1) vorbereitet. Die Suspension wurde dabei für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) und 900 rpm gerührt. Zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde die Suspension für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert und eine Probe des Überstands zur Proteinkonzentrationsbestimmung entnommen. Pro Ansatz wurden 0,5 g Trägermaterial (Trockenmasse) in 15 mL Glasgefäßen mit Bördelrand vorgelegt und mit 5 mL des gewählten Puffers gespült. 10 mL der vorbereiteten LipTL-Lösung wurden zu den Trägern hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei 40 °C auf einem Schüttler (340 rpm). Es wurde nach Ablauf der Inkubationszeit erneut eine Probe des Überstands zur Bestimmung der Beladung entnommen und die Immobilisate zweimal mit 5 mL des jeweiligen Puffers gewaschen. Nach Filtration der Immobilisate mithilfe einer Vakuumpumpe wurden sie in einem Exsikkator bei Normaldruck und RT über Silica Gel für mindestens 5 Tage getrocknet. Die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

2.2.6 Immobilisierung der Lipase TL in ein Sol-Gel

Der Einschluss der Enzyme in einem Sol-Gel erfolgte nach dem Protokoll von Reetz *et al.* (1996). Als Silankomponenten wurden Tetramethoxysilan (TMOS), Methyltrimethoxysilan (MTMS), Ethyltrimethoxysilan (ETMS), Butyltrimethoxysilan (BTMS), *iso*-Butyltrimethoxysilan (*i*BTMS), Hexyltrimethoxysilan (HTMS), Decyltrimethoxysilan (DTMS), Dodecyltrimethoxysilan (DDTMS), Hexadecyltrimethoxysilan (HDTMS) und Octadecyltrimethoxysilan (ODTMS) ausgewählt.

Aus dem LipTL-Präparat wurde eine 30 mg/mL Lösung in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) hergestellt. Die Suspension wurde dabei für 1,5 h bei Raumtemperatur (RT) und

900 rpm gerührt. Zur Abtrennung unlösliche Bestandteile wurde die Suspension für 10 min bei 7500 rpm zentrifugiert. 400 µL LipTL-Lösung, 365 µL dest. Wasser und 6 mmol der gewählten Silankomponente wurden in einen 8 mL Glasgefäß vorgelegt und kräftig gemischt. Nach dem Erreichen einer homogenen Lösung wurde die Polymerisierung durch Zugabe von 100 µL NaF-Lösung (1 M) gestartet und die Lösung erneut kräftig gemischt. Aufgrund der Wärmeentwicklung wurde das Glasgefäß für 10 min in ein Eisbad gestellt. Zur vollständigen Auspolymerisierung des Sol-Gels wurde das Glasgefäß für 24 h geschlossen stehen gelassen. Die Trocknung des Gels erfolgte im geöffneten Glasgefäß für 4–14 Tage bei RT. Das Gel wurde anschließend gemörsert und jeweils mit 20 mL dest Wasser, 2-Propanol und Hexan gewaschen. Das Gel wurde erneut für 24 h getrocknet und die Lagerung erfolgte anschließend bei 4 °C.

2.3 Charakterisierung von Biokatalysatoren und Chemo-Katalysatoren

2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration und der Beladungen von Trägern wurde das kommerzielle Bradfordreagenz Roti®-Nanoquant genutzt. Die Kalibrierung wurde mit Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in destilliertem Wasser, im Konzentrationsbereich von 20 µg/mL bis 100 µg/mL vorgenommen. Das Bradfordreagenz wurde 1:5 und die Proben mit unbekannter Proteinkonzentration mit unterschiedlichen Volumina an destillierten Wasser verdünnt. In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µL Probe vorgelegt und 200 µL vorbereitete Bradfordlösung hinzugegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte nach Herstellervorgabe photometrisch bei 590 nm und bei 450 nm. Der Quotient der Wellenlängen $OD_{595/450}$ wurde zur Berechnung der Proteinkonzentration verwendet. Die Beladung der Träger wurde über die Abnahme der Proteinkonzentration während der Immobilisierung bezogen auf die Träger trockenmasse bestimmt.

2.3.2 Proteinbestimmung nach einer Bradford-Variation

Für die direkte Bestimmung der Proteinbeladung der Sol-Gele wurde eine Variante des Bradfordtest nach Bonde *et al.* (1992) eingesetzt. 1 mg Sol-Gel wurden vorgelegt und mit 400 µl dest. Wasser und mit 1,6 mL Roti®-Nanoquant (1x) überschüttet. Die Suspension wurde für 30 min bei RT inkubiert und bei 13400 rpm für 1 min zentrifugiert. 250 µL

wurden vom Überstand entnommen und die Absorption photometrisch bei 465 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 20 µg/mL bis 100 µg/mL.

2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Test (P. K. Smith *et al.*, 1985)

Der Test wurde für die Bestimmung der Beladung für Sol-Gele der LipTL verwendet. Es wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit benutzt. Die Kalibrierung erfolgte erneut mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 50 µg/mL bis 2 mg/mL. 30 mg wurden vorgelegt und mit 75 µL dest. Wasser überschichtet. Es wurde 600 µL BCA-Färbelösung hinzugefügt und die Suspension für 30 min bei 37 °C und 1400 rpm inkubiert. Die Suspension wurde 1 min bei 13400 rpm zentrifugiert und 225 µL vom Überstand in eine 96-Wellmikrotiterplatte transferiert. Die Messung der Absorption wurde bei 562 nm durchgeführt.

2.3.4 Wasseraktivitätseinstellung

Zur Wasseraktivitätseinstellung wurden neun Salzen mit bekannten Wasseraktivitätswerten (a_w) verwendet. Ausgewählt wurde LiCl, Kaliumacetat (KAc), MgCl₂, K₂CO₃, Mg(NO₃)₂, NaBr, NaCl, KCl und K₂SO₄. Aus den Salzen wurden gesättigte Salzlösungen mit zusätzlichem Bodensatz in dest. Wasser hergestellt. Die Suspensionen wurden in geschlossene Schottflaschen oder Exsikkatoren überführt und für mindestens 2 Tage bei 25 °C oder 50 °C gelagert. Im Fall einer vollständigen Auflösung aller Salzkristalle wurde weiteres Salz hinzugegeben.

Alle Reaktionsbestandteile wurden in den benötigten Mengen separat über den gesättigten Salzlösungen in geschlossenen Behältern gelagert. Ausnahme waren dabei die Feststoffe, welche gemeinsam inkubiert werden konnten. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C oder 50 °C. Die benötigte Zeit zum Erreichen des a_w -Wertes in den Bestandteilen wurde mit einem Feuchtemessgerät (HMT337) überprüft. Nach der Inkubation wurden entweder die spezifischen Aktivitäten (2.3.5), die Racemisierung von (*R*)-Benzoin (2.3.6) oder die Prozessstabilität (2.4.4) untersucht.

2.3.5 Bestimmung der spezifischen Aktivität, der Substratspezifität und Enantioselektivität

Die Untersuchung der spezifischen Aktivitäten, Substratspezifitäten und Enantioselektivitäten verschiedener Lipasenpräparate wurde über die Umesterung unterschiedlicher α -Hydroxyketone realisiert. Es wurden als Substrate Benzoin, Furoin, PAC und HPP verwendet. Als Acyldonor für die Umesterung wurde stets Vinylbutyrat verwendet.

Typischerweise wurden Lösungen der α -Hydroxyketone in unterschiedlichen Lösungsmitteln in Konzentrationen von 94 mM bis 471 mM hergestellt. Als Lösungsmittel wurden organische Lösungsmittel, ionische Flüssigkeiten (ILs) oder DESs verwendet. Im Fall einer nicht vollständigen Lösung der Substrate bei RT wurde das Gemisch mit einem Heißluftgebläse erwärmt oder einige Zeit (bis zu 1 h) bei 50 °C auf einem Thermoschüttler geschüttelt.

Pro Ansatz wurden 20 mg Lipasenimmobilisat, 10–20 mg Lipasenlyophilisat oder 100 mg Sol-Gel in 1,5 mL Reaktionsgefäße vorlegt und 1 mL (bei Immobilisaten oder Lyophilisaten) oder 0,5 mL (bei Sol-Gelen) der vorbereiteten Substratlösung hinzugefügt. Die Suspension wurde für 10 min bei 50 °C bei 1100 rpm geschüttelt. Durch Zugabe von 3 oder 6 eq Vinylbutyrat wurde die Reaktion gestartet und die Suspension weiterhin bei 50 °C und 1100 rpm geschüttelt. In regelmäßigen Zeitabständen wurden durch das Septum im Deckel der Reaktionsgefäße 10–30 μ L Probe mittels einer gasdichten Spritze entnommen. Die Proben wurden in 1 mL 2-Propanol verdünnt. Im Fall der Lipasenlyophilisate, Immobilisate mit sehr kleinen Durchmessern und Sol-Gele wurde die verdünnte Probe für 2 min bei 13400 rpm zentrifugiert und 950 μ L des Überstands entnommen. Bei Verwendung der ILs wurde die verdünnte Probe für einige Zeit gevortext und nach Absetzen der IL-Phase 900 μ L vom Überstand entnommen. Die fertigen Proben bzw. Überstände wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) untersucht. Die spezifische Aktivität, sowie das Hauptprodukt und dessen *ee* wurden bestimmt.

2.3.6 Racemisierung von (*R*)-Benzoin

Zur Charakterisierung der Racemisierungskatalysatoren unter verschiedenen Bedingungen wurde die Racemisierung von (*R*)-Benzoin untersucht. Hierbei wurde gereinigtes (*R*)-Benzoin verwendet (siehe 2.5.3). Typischerweise wurden die Racemisierungskatalysatoren mindestens 8 h bei 100 °C gelagert, um adsorbiertes Wasser aus den Poren zu entfernen. In

einem Schlenkkolben wurden 10–40 mg Katalysator und ein sternförmiger Magnetprüher vorgelegt und drei Schlenkzyklen vollzogen. Als Inertgas wurde Stickstoff verwendet. 500 μL (*R*)-Benzoinlösung (47 mM in 2-MeTHF, Toluol oder CPME) wurden im Stickstoffgegenstrom hinzugefügt. Der Kolben wurde in einem Wasserbad bei 50 °C bei 300 rpm gerührt und zu gewählten Zeitpunkten im Stickstoffgegenstrom 10 μL Proben entnommen. Die Proben wurden in 500 μL 2-Propanol verdünnt und für 2 min bei 13400 rpm zentrifugiert. 450 μL des Überstands wurde mittels HPLC analysiert und der *ee* des (*R*)-Benzoins bestimmt.

2.3.7 Dynamisch kinetische Racematspaltung

10–40 mg Zr-TUD-1 wurden in einen Schlenkkolben vorgelegt und für mindestens 8 h bei 100 °C getrocknet. Nach dem Abkühlen des Kolbens wurden 5–10 mg immobilisierte LipTL und ein sternförmiger Magnetprührstab hinzugefügt und an der Schlenklinie drei Schlenkzyklen vollzogen. Als Inertgas wurde Stickstoff verwendet. Im Fall der Hybridkatalysatoren wurde 20 mg des Katalysators in einen Schlenkkolben vorgelegt, ein sternförmiger Magnetprührstab hinzugefügt und drei Schlenkzyklen vollzogen. Im Stickstoffgegenstrom wurden 0,5 mL Substratlösung hinzugefügt. Typischerweise lag die Substratkonzentration bei 94 mM und es wurden die Substrate Benzoin, Furoin, PAC und HPP verwendet. Nach 10 min Inkubation wurden durch Zugabe von 6 eq. Vinylbutyrat im Stickstoffgegenstrom die Reaktion gestartet. Der Schlenkkolben wurde in einem Wasserbad bei 50 °C bei 300 rpm gerührt. Zu gewählten Zeitpunkten wurden 10 μL Probe im Stickstoffgegenstrom entnommen und mit 500 μL 2-Propanol verdünnt. Die Proben wurden für 2 min bei 13400 rpm zentrifugiert und 450 μL vom Überstand entnommen und der Umsatz und der *ee* des Hauptprodukts mittels HPLC analysiert.

2.3.8 Wiederholung der dynamisch kinetische Racematspaltung

Die DKR erfolgte in den einzelnen Zyklen analog zu 2.3.7. Zum Recycling der Katalysatoren wurde nach Beendigung eines Zyklus der Überstand vollständig entnommen. Dafür wurde eine Spritze mit angeschlossenem HPLC-Filter verwendet. Die Katalysatoren wurden zweimal mit 2 mL des Lösungsmittels der DKR gewaschen. Durch erneute Substratzugabe wurde ein neuer Zyklus gestartet. Die Reaktionszeit wurde in jedem Zyklus konstant gehalten.

2.4 Bestimmung von Stabilitäten

2.4.1 Mechanische Stabilität der Trägermaterialien

Die Bestimmung der mechanischen Stabilität der Träger für die Immobilisierung erfolgte in Anlehnung an Wiemann *et al.* (2009). 100 mg Träger wurden in einem 50 mL Becherglas vorlegt und mit 5 mL Laurinsäure überschichtet. Die Suspension wurde für 2 h bei 60 °C in einem Wasserbad gerührt. Die Partikel wurden filtriert und mit warmem 2-Propanol (rund 100 mL) gewaschen. Nach der Trocknung erfolgte die Analyse mittels Rasterelektronenmikroskop (REM, siehe 2.6.1).

2.4.2 Desorptionsstabilität der Immobilisate

Die Bestimmung des Desorptionsverhaltens von Enzymen in Abhängigkeit des verwendeten Trägers erfolgte nach einem Protokoll von Wiemann (2010). 100 mg Immobilisat wurde in einem 100 mL Becherglas vorgelegt und mit 25 mL eines Acetonitril-Wasser-Gemisches (1:1) überschichtet. Die Suspension wurde für 1 h bei 50 °C in einem Wasserbad gerührt. Nach definierten Zeitpunkten wurde 1 mL Probe entnommen, 1 min bei 13400 rpm zentrifugiert und der Überstand lyophilisiert. Der entstandene Feststoff wurde in 1 mL dest. Wasser resuspendiert und der Proteingehalt mittels Bradfordtest (2.3.1) bestimmt.

2.4.3 Aufbau und Charakterisierung eines CSTR's für die Prozessstabilität

Für Versuche unter kontinuierlichen Bedingungen wurde ein Rührkesselreaktor (*continuous stirred-tank reactor*, CSTR) realisiert. Dieser bestand aus einem 6 mL Glasreaktor angeschlossen an eine HPLC-Pumpe (K-501) (siehe Abbildung 26). Der Zulauf erfolgt durch eine Edelstahlkapillare im Deckel mit einem Innendurchmesser von 1 mm und der Ablauf durch eine Teflon-Kapillare mit einem Innendurchmesser von 1 mm. Vor den Ablauf wurde ein Edelstahlsieb mit einer Maschenweiten von 10 µm befestigt. Als Dichtungen wurden Teflonscheiben verwendet. Zur Durchmischung wurden sternförmige Magnetrührstäbchen verwendet. Die Probenentnahme erfolgte am Ablauf.

Zur Etablierung und Charakterisierung wurde der Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Durchmischung und damit auf die Verweilzeitverteilung untersucht. Dafür wurden Stoßmarkierungen bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten durchgeführt. Der Durchfluss wurde konstant bei 0,5 mL/min gehalten und Rührgeschwindigkeiten von 250–1500 rpm eingestellt. Zusätzlich wurde bei 1100 rpm 50 mg Immobilisat zusätzlich hinzugefügt. Der CSTR wurde mit reinem 2-MeTHF geflutet und die Pumpe gestoppt. Das

Zulaufgefäß wurde gewechselt und eine Benzoinlösung ($c_0 = 20 \text{ mg/mL}$) in 2-MeTHF wurde mit $0,5 \text{ mL/min}$ in den Reaktor gepumpt. Alle 5 min wurden $30 \mu\text{L}$ Probe am Ablauf entnommen und in 1 mL 2-Propanol verdünnt. Die Konzentration des Benzoin ($c(t)$) in den Proben wurde mittels HPLC untersucht. Die Zunahme der Benzoinkonzentration in Abhängigkeit der Zeit ergab die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$.

$$F(t) = \frac{c(t)}{c_0} \quad (2-1)$$

Aus dieser konnte die Verweilzeitverteilung $E(t)$ bestimmt werden.

$$E(t) = \frac{dF(t)}{dt} \quad (2-2)$$

2.4.4 Prozessstabilität der Immobilisate

Die Messung der Prozessstabilität wurde in dem unter 2.4.3 beschriebenen CSTR durchgeführt. Es wurde eine Rührgeschwindigkeit von 500 rpm festgelegt. Der Durchfluss betrug abhängig von der spezifischen Aktivität des zu untersuchenden Lipasenpräparates $0,5\text{--}1 \text{ mL/min}$. Dadurch wurde ein maximaler Umsatz von 10% gewährleistet, um einen Effekt der Abnahme der Substrate und Zunahme der Produkte auf die Stabilität zu verhindern. Alle CSTR-Versuche wurden mit Benzoin bei einer Konzentration von 10 mg/mL durchgeführt, um zu verhindern, dass das Benzoin, je nach dessen Löslichkeit im gewählten Lösungsmittel, in den Leitungen oder in der Pumpe auskristallisierte.

Typischerweise wurden 50 mg Immobilisat im Reaktor vorgelegt und eine Substratlösung an die Pumpe angeschlossen. Die Substratlösung bestand neben 10 mg/mL Benzoin gelöst in unterschiedlichen organischen Lösungsmitteln aus $3 \text{ eq. Vinylbutyrat}$. Der Reaktor wurde mit der Substratlösung geflutet unter Verdrängung des gesamten Luftvolumens. Der Reaktor wurde mittels eines Ölbad auf 50 °C temperiert und die Substratlösung mit der gewählten Durchflussrate durch den Reaktor gepumpt. Zu definierten Zeitpunkten wurden $30 \mu\text{L}$ Probe am Ablauf entnommen und mit $500 \mu\text{L}$ 2-Propanol verdünnt. Die Zu- bzw. Abnahme des Umsatzes wurde mittels HPLC analysiert. Nach Erreichen eines maximalen Umsatzes konnte die Prozessstabilität des Lipasenpräparats unter den gewählten Reaktionsbedingungen durch die Abnahme des Umsatzes über die Halbwertszeit bestimmt werden (siehe 3.1.9).

2.5 Synthesen

2.5.1 Synthese von stark eutektischen Lösungsmitteln

Für die Synthese unterschiedlicher stark eutektischer Lösungsmittel (*deep eutetic solvent*, DES) wurden als Ammoniumsalz Cholinchlorid und Ethylammoniumhydrochlorid gewählt. Als Wasserstoffdonor wurden Harnstoff, Glycerin, Stearinsäure, Benzoin, Oxalsäure, Isosorbid, Maleinsäure, Lävulinsäure und Phenylpropionsäure untersucht. Jeweils ein Ammoniumsalz und ein bis zwei Wasserstoffdonoren wurden in einem gewählten molaren Verhältnis in eine Schottflasche eingewogen. Für Cholinchlorid wurde ein Verhältnis von 1:2 bzw. 1:1:1 zum Wasserstoffdonor oder zu den Wasserstoffdonoren gewählt, für Ethylammoniumhydrochlorid 1:1,5. Die Mischung wurde für 1 h bis 24 h bei 100 °C gerührt bis zur Bildung einer einphasigen Lösung. Die Wasseraktivität wurde mit einem Feuchtigkeitssensor (HMT337) überprüft. Bei DESs mit Werte über $a_w > 0,05$ wurde am Rotationsverdampfer überschüssiges Wasser entfernt. Die weitere Trocknung aller DESs erfolgte in einem Exsikkator für 3 Tage über Silica Gel unter vermindertem Druck.

2.5.2 Synthese von (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on

Die Synthese von (*R*)-2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on ((*R*)-HPP) erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Stillger *et al.* (2006). 4 mg lyophilisierter BAL-Rohextrakt wurden in 800 μL Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 8, 2,5 mM MgSO_4 , 0,5 mM Thiaminpyrophosphat) gelöst und 200 μL Dimethylsulfoxid hinzugefügt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 1 μL Benzaldehyd und 3,4 μL Acetaldehyd. Die Lösung wurde bei 25 °C und 1000 rpm geschüttelt. Nach 8 h wurde eine Probe entnommen und mit 500 μL Ethylacetat extrahiert. Nach Trennung der Phasen wurden zur organischen Phase 500 μL 2-Propanol hinzugefügt und die Probe mittels HPLC analysiert.

2.5.3 Synthese von (*S*)-Benzoinbutyrat und (*R*)-Benzoin

Die Synthese von (*S*)-Benzoinbutyrat und (*R*)-Benzoin wurde zusammen realisiert. Dafür wurde die Ansatzgröße des Aktivitätstests (siehe 2.3.5) entsprechend vergrößert und das (*S*)-Benzoin vollständig umgesetzt.

Es wurden 100 mL Tetrahydrofuran vorgelegt und 3,1 g immobilisierte LipTL auf Accurel MP1001, sowie 3 g Benzoin (1 eq) hinzugefügt. Nach Zugabe von 5,4 mL (6 eq) wurde das Gemisch bei RT über Nacht gerührt. Der Umsatz des (*S*)-Benzoins wurde mittels HPLC überprüft. Nach Erreichen des vollständigen Umsatzes wurde die Reaktionslösung

gefiltert und die Lösung am Rotationsverdampfer eingeengt. Das erhaltende gelbliche Öl wurde in einer geringen Menge Dichlormethan aufgenommen. Zur Reinigung des Gemischs erfolgte eine Trennung mittels Kieselgelsäulenchromatographie. Als Laufmittel wurde Hexan/Ethylacetat in einem Verhältnis von 5:1 verwendet. Die Reinigung wurde mittels Dünnschichtchromatographie überprüft. Die Substanzen wurden mittels einer UV-Lampe sichtbar. Als Laufmittel wurde Hexan/Ethylacetat in einem Verhältnis von 5:1 verwendet. Die Fraktionen mit (*S*)-Benzoinbutyrat und (*R*)-Benzoin wurden jeweils getrennt gesammelt und am Rotationsverdampfer eingeengt. (*R*)-Benzoin wurde als leicht gelblicher Feststoff und (*S*)-Benzoinbutyrat als gelber Feststoff erhalten. Die Reinheit der beiden Substanzen wurde mittels HPLC und ¹H-NMR überprüft, dabei ergab sich in beiden Fällen eine Reinheit von >98%.

2.5.4 Synthese von Benzoinbutyrat

Die Synthese von racemischen Benzoinbutyrat erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Hoyos *et al.* (2006). 637 mg Benzoin (1 eq) wurden in 9 mL Dichlormethan gelöst. 334 mg Triethylamin (1,1 eq) und 479 mg Butyrylchlorid (1,1 eq) wurden hinzugegeben und die Lösung für 20 h bei RT gerührt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer eingeengt und in Dichlormethan aufgenommen. Die Reinigung erfolgte analog zu Kapitel 2.5.3. Das Produkt wurde als gelber Feststoff erhalten, dessen Reinheit von 98% mittels HPLC bestimmt wurde.

2.5.5 Synthese Zr-TUD-1 (25)

Die Synthese des Zr-TUD-1 erfolgte nach dem Protokoll von Ramanathan *et al.* (2006). In einem Becherglas wurden 2,98 g Zirconiumpropoxid (70% in 1-Propanol) in 25 mL 2-Propanol vorlegt und mit 33,8 g Tetraethylorthosilicat vermischt. Die Lösung wurde für 5 min gerührt und eine Mischung aus Triethanolamin (24,5 g) und dest. Wasser (18,5 mL) hinzugefügt. Zur gebildeten Emulsion wurden 20,1 g Tetraethylammoniumhydroxid unter starkem Rühren hinzugegeben. Nach 1 h Rühren wurde die klare Flüssigkeit für 24 h bei Raumtemperatur gealtert und bei 98 °C für 24 h getrocknet. Das gelbe Gel wurde in einem Teflonautoklaven bei 180 °C für 6 h hydrothermal behandelt und in der Anwesenheit von Luft zweimal bei 600 °C für 10 h mit einer Temperaturrampe von 1 k/min calciniert.

2.5.6 Synthese von Zr-SBA-1 (25)

16,7 g Pluronic 123 wurden in einem Becherglas vorgelegt und mit 275 mL entionisiertem Wasser gelöst. Nach Zugabe von 9,7 g konzentrierter Salzsäure wurde die Suspension 3 h bis zur vollständigen Auflösung des Feststoffes gerührt. Die Lösung wurde auf 40 °C erwärmt und 35,9 g Tetraethylthosilicat und 31,1 g Diacetoxyzirconium(IV)oxid (20% in H₂O) hinzugefügt. Die Mischung wurde für 20 h bei 35 °C gerührt und in einen Teflonautoklaven überführt. Die hydrothermale Behandlung unter autogenem Druck erfolgte für 24 h bei 100 °C. Der weiße Feststoff wurde mit 500 mL dest. Wasser gewaschen und über Nacht bei 100 °C getrocknet. Die Calcinierung erfolgte bei 540 °C für 8 h mit einer Temperaturrampe von 1 k/min.

2.5.7 Synthese von modifiziertem Zr-TUD-1

Um eine Immobilisierung der LipTL auf dem Racemisierungskatalysator Zr-TUD-1 zu ermöglichen, wurde dieser nach dem Protokoll von Shakeri *et al.* (2010) modifiziert. 200 mg Zr-TUD-1 wurden für 12 h bei 140 °C getrocknet und in einem Schlenkkolben vorgelegt. Es wurden 3 Schlenkzyklen mit N₂ als Inertgas vollzogen. 20 mL wasserfreies Toluol und 520 µL 3-Aminopropyltriethoxysilan wurden im Stickstoffgegenstrom hinzugefügt und die Lösung bei 120 °C bei 500 rpm für 12 h in einem Ölbad refluxiert. Die modifizierten Partikel wurden filtriert und zweimal mit 5 mL und einmal mit 5 mL Aceton gewaschen. Die Trocknung erfolgte für 12 h bei 140 °C. Die Immobilisierung erfolgte analog der Träger mit freien Aminogruppen (2.2.3).

2.6 Analytik

2.6.1 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Oberfläche und der Größenverteilung der zur Immobilisierung verwendeten Träger oder Immobilisate vor und nach mechanischer Belastung wurden REM-Aufnahmen am Institut für Botanik der Technischen Universität Dresden angefertigt. Die Partikel wurden auf einem Probenhalter mittels doppelseitiger Klebefolie befestigt und mit einer Schicht Gold besputtert.

2.6.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Analytik aller Reaktionen und Synthesen erfolgte per HPLC. Hierfür wurde eine Smartline-Anlage von Knauer (Berlin, DE) verwendet. Als Eluent wurde stets ein Gemisch aus Hexan und 2-Propanol in unterschiedlichen Verhältnissen genutzt. Die Detektion erfolgte mittels eines Diodenarray-Detektors bei einer von der zu analysierenden Substanz abhängigen Wellenlänge. Als Säule wurde bei allen Methoden die Chiralpak IA (250 mm x 4,6 mm) von Daicel (Tokyo, JPN) verwendet. Von allen Proben wurde stets 10 μ L eingespritzt. In Tabelle 8 bis Tabelle 11 sind alle verwendeten Methoden, sowie die zugehörigen Retentionszeiten der Analyten, zu finden.

Tabelle 8 HPLC-Methoden und Parameter: Laufmittelverhältnis, Durchfluss, Säulentemperatur und Detektionswellenlänge.

Methode	Verhältnis Hexan:2-Propanol	Durchfluss [mL/min]	Säulentemperatur [°C]	Detektions- wellenlänge [nm]
Benzoin	90:10	1,5	40	243
Furoin	90:10	2,0	15	270
PAC/HPP	95:5	1,5	15	206 und 243

Tabelle 9 Analyten und Retentionszeiten der Benzoin-Methoden.

Substanz	Retentionszeit [min]
Benzil	3,4
(<i>R</i>)-Benzoinbutyrat	3,7
(<i>S</i>)-Benzoinbutyrat	4,3
(<i>R</i>)-Benzoin	7,4
(<i>S</i>)-Benzoin	8,4

Tabelle 10 Analyten und Retentionszeiten der Furoin-Methode.

Substanz	Retentionszeit [min]
(<i>R</i>)-Furoinbutyrat	4
(<i>S</i>)-Furoinbutyrat	4,4
Furil	4,8
(<i>S</i>)-Furoin	8,6
(<i>R</i>)-Furoin	10,3

Tabelle 11 Analyten und Retentionszeiten der PAC/HPP-Methode.

Substanz	Retentionszeit 206 nm [min]	Retentionszeit 243 nm [min]
PPD	3,2	3,2
(<i>R</i>)-HPP-Butyrat	3,9	3,9
(<i>R</i>)-PAC-Butyrat	3,9	-
(<i>S</i>)-PAC-Butyrat	4,2	-
(<i>S</i>)-HPP-Butyrat	5,1	5,1
(<i>S</i>)-HPP	7,2	7,2
(<i>S</i>)-PAC	7,7	-
(<i>R</i>)-PAC	8,2	-
(<i>R</i>)-HPP	9,4	9,4

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Immobilisierung der Lipase TL

3.1.1 Methodenauswahl

Basierend auf den Ergebnissen der vorrausgegangenen Arbeiten (siehe 1.2.2) wurde der Fokus dieser Arbeit auf die Untersuchung der trägerbasierten und der Sol-Gel-Immobilisierung gelegt. Im Fall der trägerbasierten Immobilisierung wurde in den bisherigen Studien nur eine geringe Anzahl an verfügbaren Trägermaterialien untersucht. Für eine umfangreiche Studie wurden daher 37 verschiedene kommerzielle Träger bezogen, darunter Trägermaterialien für eine adsorptive, für eine kovalente und eine ionische Immobilisierung. Auch in der Verwendung von Sol-Gelen für die LipTL wurden bisher nur wenige Variationen untersucht. Diese wurden als Ausgangspunkt für weitere Optimierungen genutzt. Alle hergestellten Immobilisate sollten zunächst hinsichtlich ihrer Beladung und ihrer spezifischen Aktivität in der KR von Benzoin untersucht werden. Die Immobilisate mit den höchsten spezifischen Aktivitäten wurden im weiteren Schritt auf ihre Stabilität untersucht. Hierfür wurde die Stabilität der Trägermaterialien gegenüber mechanischer Belastung, die Desorptionsstabilität und die Prozessstabilität der Immobilisate ermittelt und bewertet.

3.1.2 Adsorptive Immobilisierung der Lipase TL

Grundlage für die Untersuchung der verschiedenen Träger für eine adsorptive Immobilisierung bildete die optimierte Methode auf Accurel MP1001 (Nieguth *et al.*, 2014). Diese wurde bereits optimiert für die Parameter Proteinkonzentration, Pufferkonzentration, pH-Wert des Puffers, Immobilisierungstemperatur und Immobilisierungsdauer. Für eine erste Durchmusterung der vorhandenen Träger und deren Vergleich untereinander wurden alle Immobilisierungen analog dieser Methode durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Träger für eine adsorptive Immobilisierung der LipTL, sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 12 aufgeführt. Der Accurel MP1001 wird im Folgendem stets als Accurel bezeichnet.

Tabelle 12 Träger für die adsorptive Immobilisierung mit den zugehörigen Trägereigenschaften.

Träger	Material	Funkt. Gruppen	Oberfläche [m ² /g]	Partikelgröße [μm]	Porengröße [nm]
Accurel	Polypropylen	-	35	400–1000	50–500
ECR1090	Polystyrol	-	>750	150–300	90–110
ECR8804	Methacrylat	Octadecyl	k. A.	150–300	35–45
ECR8806	Methacrylat	Octadecyl	>80	150–300	50–70
ECR1030	DVB/ Methacrylat	-	> 90	300–710	20–30
IB-EC1	Polyacrylat	-	k. A.	350–700	k. A.
IB-S861	Polystyrol	-	k. A.	350–700	k. A.
IB-S500	Polypropylen	-	k. A.	150–1500	k. A.
IB-S60P	Silica	-	k. A.	60–200	15
IB-S60S	Silica	-	k. A.	60–200	25
IB-150A T1	Polyacrylat	-	k. A.	150–300	45
IB-150A T1- RS	Polyacrylat	-	k. A.	150–300	45
Celite 503	Silica	-	k. A.	100	k. A.
Celite 545	Silica	-	k. A.	20–100	k. A.
Celite R632	Silica	-	k. A.	595–1410	7000
Celite R633	Silica	-	k. A.	297–595	6500

Neben dem Material und der Oberfläche der Träger, ist der Porendurchmesser ein entscheidender Faktor bei der Immobilisierung. In der Regel sollte er dreimal größer als der Durchmesser des Enzyms sein, um eine Diffusion in die Poren zu ermöglichen (Peper *et al.*, 2011). Von der LipTL ist der Durchmesser nicht bekannt, daher wurde als Vergleichslipase die Lipase B aus *Candida antarctica* (CALB) verwendet, deren molare Masse größer ist, als die der LipTL. Durch Kristallstrukturanalysen ist ein durchschnittlicher Durchmesser von 5 nm in Wasser für diese Lipase bekannt (Sate *et al.*, 2007). Bei den Trägern mit angegebenen Porendurchmessern sind alle Werte wenigstens fünffach größer. Für die übrigen Träger wurden ähnliche Dimensionen der Poren angenommen und somit alle Träger für die Immobilisierung der LipTL als geeignet erachtet. Zur Bewertung der Immobilisate wurde jeweils die Proteinbeladung der Träger, sowie die spezifische Aktivität der Immobilisate in der KR von Benzoin bestimmt. Abbildung 12 fasst die dabei erhaltenen Ergebnisse zusammen.

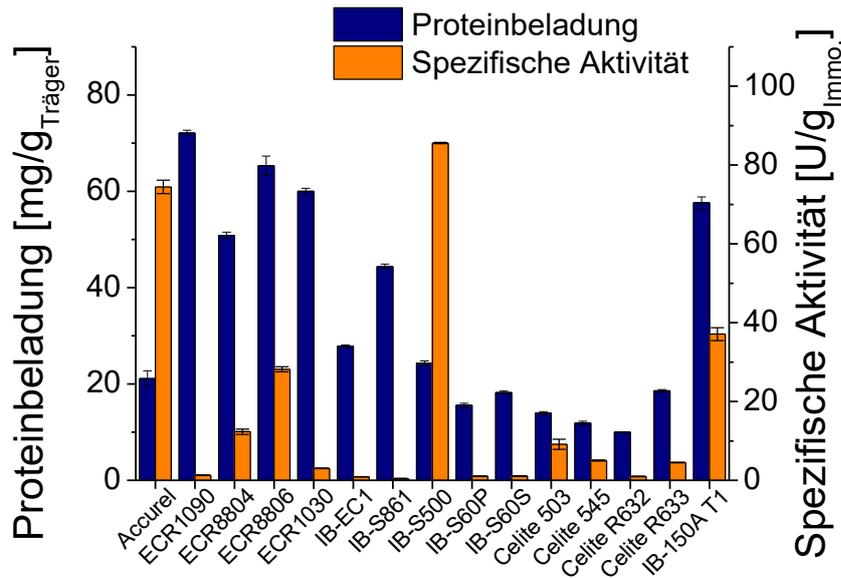


Abbildung 12 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate mit adsorptiv gebundener LipTL.

Beim Vergleich der Proteinbeladungen wurden die höchsten Werte auf Trägern aus Polystyrol, Methacrylat und Polyacrylat erreicht. Träger aus Polypropylen und Silica ergaben hingegen relativ niedrige Beladungen. Die höchsten spezifischen Aktivitäten der LipTL von 74,5 und 85,6 U/g_{Immo.} wurden wiederum auf den Trägern Accurel und IB-S500 aus Polypropylen, gefolgt von den Trägern aus Methacrylat, mit Ausnahme von IB-EC1, und Polyacrylat erreicht. Geringe bis kaum messbare Aktivitäten wurden mit Immobilisaten aus Polystyrol, Silica und aus dem Copolymer Divinylbenzol/Polyacrylat bestimmt. Es scheint somit ein direkter Zusammenhang zwischen dem Oberflächenmaterial und der Eignung eines Trägers für die Immobilisierung der LipTL zu existieren. Ein Erklärungsansatz ist die Polarität der verschiedenen Oberflächen. Für die LipTL konnte bereits eine Hyperaktivierung an hydrophoben bzw. unpolaren Oberflächen nachgewiesen werden (Hoyos *et al.*, 2008; Nieguth *et al.*, 2014). Als Grund wurde unter anderem eine Stabilisierung der aktiven Konformation der Lipase postuliert, durch eine Öffnung des Lids über dem aktiven Zentrum der Lipase. Von den hier getesteten Trägern sind die Materialien Polypropylen und Polystyrol am unpolarensten, gefolgt von den Trägern aus Methacrylat und Polyacrylat. Die höchste Polarität besitzen die Silica-Träger. Die spezifische Aktivität folgt tendenziell dieser Reihenfolge. Eine große Ausnahme bilden die Träger aus Polystyrol, die trotz ihrer unpolaren Oberfläche nicht geeignet scheinen. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Aktivität und verwendeten Trägern wurde ebenfalls für die CALB gefunden. Hier ergaben sich die höchsten Aktivitäten mit Immobilisaten auf Polypropylen-Trägern. Für die

Immobilisate auf Polystyrol und Polyacrylat wurden je nach Träger sehr unterschiedliche Ergebnisse erhalten, sodass keine allgemeine Tendenz aufgrund des Trägermaterials festgestellt werden konnte (Nakaoki *et al.*, 2005). Ein weiterer Grund kann trotz der Eignung in den unterschiedlichen Porengrößen gefunden werden. Durch einen zu geringen Porendurchmesser kann die Flexibilität der Lipase eingeschränkt sein, wodurch die Lipase zwar in die Poren diffundieren kann, aber die für die Katalyse notwendige Konformationsänderung nicht möglich ist (Cao, 2006). So konnte für die Lipase aus *Rhizomucor miehei* gezeigt werden, dass die Aktivität erst ab einer Porengröße von >100 nm unabhängig von dieser ist (Bosley & Clayton, 1994). Dieser Einfluss kann hier beispielsweise zwischen den Trägern ECR8804 und ECR8806 beobachtet werden, da der ECR8806-Träger nahezu doppelt so große Poren besitzt. Accurel auf der anderen Seite besitzt, neben den Celite-Trägern, die größten Poren gegenüber den restlichen Trägern, wodurch auch hier ein zusätzlicher positiver Einfluss neben dem Material auf die spezifische Aktivität denkbar ist. Jedoch unterscheiden sich die in der Literatur angebenen Werte der Porengröße dieses Trägers, weshalb hier der Bereich von 50-500 nm angenommen wurde (Findeisen *et al.*, 2014; Nieguth *et al.*, 2014; Sabbani *et al.*, 2006; Séverac *et al.*, 2011). Beim Vergleich der zwei in dieser Arbeit verwendeten Polypropylen-Träger Accurel und IB-S500 ist es auffällig, dass die LipTL auf dem IB-S500-Träger eine höhere spezifische Aktivität bezogen auf das Trägergewicht aufweist. Mit Beachtung der Beladung ergibt sich für beide Immobilisate eine annähernd gleiche spezifische Aktivität bezogen auf die Proteinmasse. So weist die LipTL auf dem Accurel eine Aktivität von 3527 U/g_{Protein} und auf dem IB-S500 von 3519 U/g_{Protein} auf. Die Aktivität ist bei den beiden Träger daher scheinbar lediglich abhängig von dem Trägermaterial und nicht von weiteren Parametern wie beispielsweise der Partikelgröße.

Die Höhe der Beladung und die Art der Beladung kann als weiterer Grund für die erhaltenen Ergebnisse der restlichen Immobilisate gefunden werden. Für die Immobilisierung auf dem Accurelträger wird in der Literatur aufgrund der Anwesenheit von Fremdproteinen in dem LipTL-Präparat eine Art Reinigungseffekt, durch die selektive Adsorption der LipTL, vermutet (Maraitte *et al.*, 2013; Nieguth *et al.*, 2014). Bei den Trägern mit wesentlich höheren Beladungen und polaren Oberflächen ist demnach eine Bindung der Fremdproteine nicht auszuschließen. Möglicherweise ist die Affinität dieser Proteine an polarere Oberflächen höher als die der LipTL, wodurch sich wesentlich geringere spezifische Aktivitäten ergeben würden. Ebenfalls nicht auszuschließen ist die Bildung von Multiproteinschichten durch die Bindung von größeren Mengen an LipTL und

Fremdproteinen. Diese Schichten könnten zu Diffusionsbarrieren und somit zu geringeren Aktivitäten bezogen auf die gebundene Proteinmenge geführt haben (Al-Duri & Yong, 2000). Auf die Bildung von Multiproteinschichten können insbesondere die Oberflächengröße und die Porengröße einen entscheidenden Einfluss haben. Da diese Werte aber nicht von allen Herstellern der Träger angegeben wurden, kann dieser Faktor hier nicht ausreichend diskutiert werden.

An dieser Stelle wurde stattdessen ein weiterer Zusammenhang in den unterschiedlichen Immobilisierungsmethoden vermutet. Zu trockenen Trägern wurde stets Ethanol hinzugefügt, da diese, im Fall von beispielsweise Accurel und IB-S500, aufgrund ihrer Hydrophobizität sonst nicht mit dem Immobilisierungspuffer benetzt werden konnten. Das Ethanol wurde vor der Zugabe der LipTL-Lösung nicht entfernt bzw. ausgewaschen. Alle weiteren Träger wurden bereits von den Herstellern in einem feuchten Zustand, so auch die hydrophoben Träger aus Polystyrol, ausgeliefert. Bisher wurde nicht untersucht, ob diese zusätzliche Anwesenheit von Ethanol während der Immobilisierung einen Einfluss auf die Beladung oder die spezifische Aktivität der Immobilisate hat. Für eine bessere Vergleichbarkeit und eine mögliche Optimierung der Immobilisierungsmethoden wurden daher an dieser Stelle unterschiedliche Ansätze verfolgt. Auf der einen Seite wurde das Ethanol nach der Inkubation mit den trockenen Trägern durch Spülen mit der Pufferlösung ohne LipTL wieder entfernt und die Immobilisierung durchgeführt. Als Beispielträger wurde hierfür der Accurelträger ausgewählt. Die Träger mit einer Feuchtigkeit $>5\%$ wurden auf der anderen Seite zunächst getrocknet und anschließend mit Ethanol inkubiert. Die Immobilisierung wurde anschließend ohne Entfernung des Ethanols durchgeführt. Für diesen Versuch wurden die Träger mit den höchsten spezifischen Aktivitäten, IB-150A T1 und ECR8806, sowie für den Polystyrolträger ECR1090 ausgewählt.

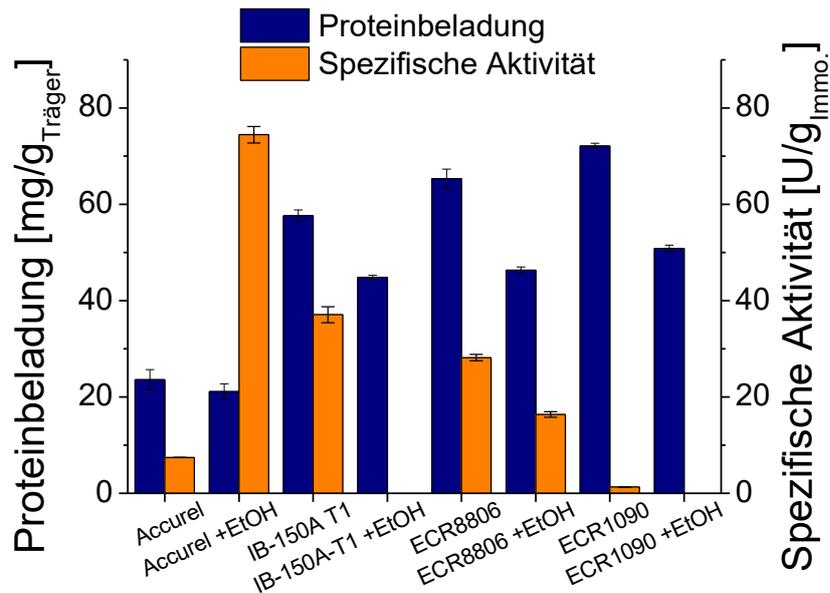


Abbildung 13 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate mit adsorptiv gebundener LipTL nach Optimierung durch Entfernung oder Zugabe von Ethanol während der Immobilisierung.

Abbildung 13 fasst die erhaltenen Ergebnisse dieser Optimierungsversuche zusammen. Überraschenderweise konnte tatsächlich ein positiver Effekt der Anwesenheit des Ethanols während der Immobilisierung auf die spezifische Aktivität im Fall des Accurel-Trägers nachgewiesen werden. Möglicherweise unterstützt das Ethanol das Vorliegen der LipTL in der aktivierten Konformation. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Basso *et al.* (2000) als verbesserte Immobilisierungsmethode für die Peptidsynthese mit Thermolysin vorgestellt. Hierbei wurde, statt Ethanol, Toluol für eine Benetzung der Trägeroberfläche vor Zugabe der Enzymlösung verwendet. Für die weiteren getesteten Träger konnte dieser positive Effekt des Ethanols nicht nachgewiesen werden. In allen Fällen erniedrigte sich die Aktivität oder war nicht mehr messbar. Auffällig ist zudem, dass sich die Beladung verringerte. Dies konnte beim Accurel-Träger nicht beobachtet werden. Es liegt die Vermutung nah, dass sich aufgrund der vorherigen Trocknung der feucht gelieferten Träger die Integrität verändert haben könnte, beispielsweise durch das Zusammenziehen des Materials, was zu einer Verkleinerung der Poren geführt haben könnte.

Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse wurde im nächsten Schritt die bereits vorgestellte Immobilisierungsmethode nach Basso *et al.* (2000) getestet und das Ethanol gegen ein hydrophobes Lösungsmittel ausgetauscht. Da sich in der weiteren Arbeit Cyclopentylmethylether (CPME) (siehe 3.3.2) als sehr geeignetes organisches Lösungsmittel für die LipTL präsentierte, wurde dieses anstatt Toluol ausgewählt. Die Immobilisierung wurde weiterhin nach der Standardmethode durchgeführt. Ausgewählt

wurden die beiden Polypropylen-Träger Accurel und IB-S500, sowie der ECR8806, da dieser mit Ethanol eine messbare Restaktivität aufwies. Alle Träger wurden erneut in der getrockneten Variante eingesetzt.

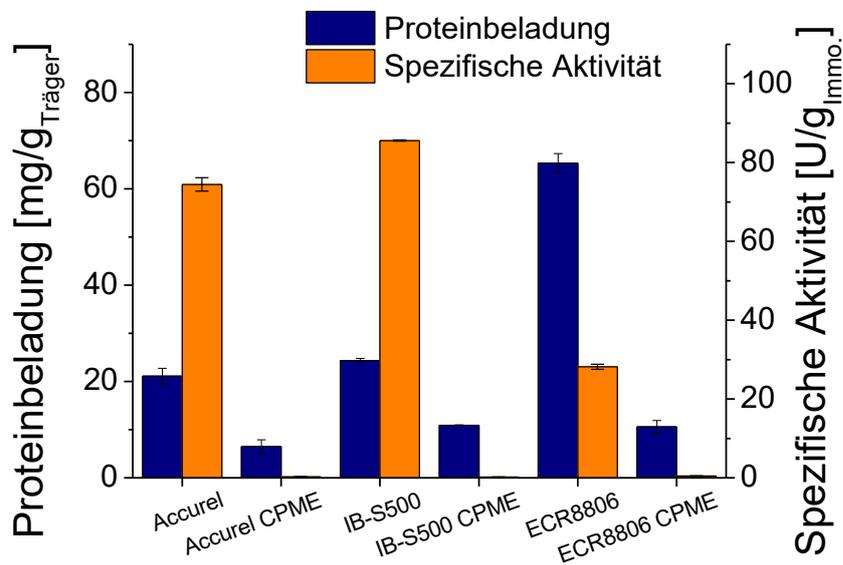


Abbildung 14 Proteinbeladung der Träger und spezifische Aktivität der Immobilisate nach Inkubation der getrockneten Träger mit CPME und anschließender Immobilisierung der LipTL.

In Abbildung 14 sind die erhaltenen Ergebnisse der Proteinbeladung und spezifischen Aktivitäten nach der Inkubation mit CPME im Vergleich zu den Standardimmobilisierungsmethoden aufgeführt. Die Eignung der in der Literatur vorgestellten Methode konnte in keinem Fall für die LipTL nachgewiesen werden. Für alle Immobilisate wurden eine verringerte Beladung sowie kaum messbare Aktivitäten ermittelt. Einen Grund für die Ergebnisse zu finden, gestaltet sich an dieser Stelle schwierig. Der Unterschied in der Verwendung von Ethanol oder CPME liegt in der Wassermischbarkeit. Während Ethanol und Wasser ohne Einschränkung mischbar sind, konnte bei CPME während des Experimentes die Bildung einer zweiten Phase bestehend aus einer Suspension aus dem CPME und dem Träger beobachtet werden. Daher war im Fall des CPME keine Dispersion des Trägers im Immobilisierungspuffer möglich. Dies könnte einen entscheidenden Einfluss auf die Immobilisierung durch die Verkleinerung der Kontaktfläche zwischen der Trägeroberfläche und dem Immobilisierungspuffer gehabt haben. Es kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass durch das CPME eine unbekannte Menge Protein, beispielweise das angesprochene Fremdprotein, denaturiert sein könnte. Durch die Bestimmung der Proteinbeladung über die Abnahme der Proteinkonzentration im Überstand, könnte die Beladung daher als zu hoch angesehen worden sein.

Schlussendlich wurden von den hier getesteten Trägern Accurel und IB-S500, aufgrund der überragenden spezifischen Aktivität der LipTL auf diesen Trägermaterialien, ausgewählt für weitere Untersuchungen.

3.1.3 Kovalente Immobilisierung über Träger mit Aminogruppen

In der Literatur wurde bisher die Immobilisierung über aminofunktionalisierte Träger für die LipTL nicht beschrieben. Daher wurde für die Etablierung der Methode eine Verbindung der Herstellerempfehlungen und der Methode für die adsorptive Immobilisierung auf dem Accurel gewählt. So wurde die Immobilisierungsdauer auf 18 h erhöht und die Immobilisierungstemperatur auf 30 °C erniedrigt. Der pH-Wert, die Puffersalzkonzentration sowie die Proteinkonzentration des Immobilisierungspuffers wurden von der Methode der adsorptiven Immobilisierung übernommen. Alle verwendeten Träger, sowie deren Eigenschaften, sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13 Träger für die kovalente Immobilisierung an Aminofunktionen mit den zugehörigen Trägereigenschaften.

Träger	Material	Funkt. Gruppen	Oberfläche [m ² /g]	Partikelgröße [μm]	Porengröße [nm]
EC-EA S	Methacrylat	Ethylamino	k. A.	100–300	10–20
EC-EA M	Methacrylat	Ethylamino	k. A.	200–500	10–20
EC-HA S	Methacrylat	Hexylamino	k. A.	100–300	10–20
EC-HA M	Methacrylat	Hexylamino	k. A.	200–500	10–20
ECR8310	Methacrylat	Ethylamino	>70	150–300	85–120
ECR8319	Methacrylat	Ethylamino	>50	150–300	160–200
ECR8405	Methacrylat	Hexylamino	>40	150–300	45–85
ECR8417	Methacrylat	Hexylamino	>50	150–300	160–220

Beim Vergleich der EC- und ECR-Träger fiel auf, dass sie sich im Trägermaterial sowie der funktionellen Gruppen nicht unterschieden. Der entscheidende Unterschied lag in der Größe des Porendurchmessers. So ist dieser bei den EC-Trägern von Resindion mit 10–20 nm deutlich kleiner, als die der ECR-Träger von Purolite. Daher war eine Eignung der EC-Träger an dieser Stelle bereits fraglich, da schon in der adsorptiven Immobilisierung ein Einfluss erkennbar war. Nichtsdestotrotz wurde die Immobilisierung der LipTL mit allen Trägern durchgeführt und die Beladung sowie die spezifische Aktivität bestimmt (Abbildung 15).

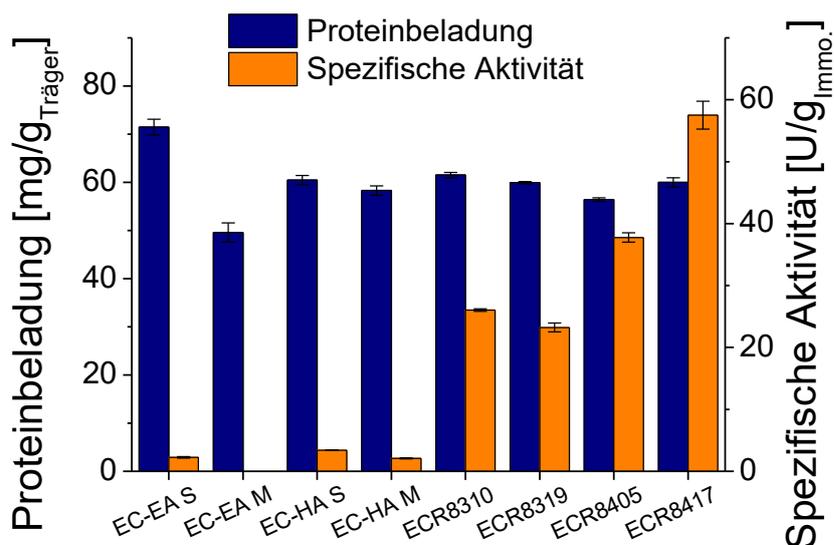


Abbildung 15 Proteinbeladung der Träger mit Aminogruppen und spezifische Aktivität der Immobilisate.

Bis auf den EC-EA S wurde auf allen Trägern eine sehr ähnliche Beladung zwischen 50–60 mg/g erhalten. Auf dem EC-EA S konnte eine maximale Beladung von 70 mg/g erreicht werden. Aufgrund der bereits erwähnten Anwesenheit von Fremdprotein, ist hier erneut eine Immobilisierung dieser sehr wahrscheinlich. Hinsichtlich der Aktivität ergaben sich auf allen EC-Träger sehr geringe spezifische Aktivitäten der immobilisierten LipTL. Für das EC-EA M-Immobilisat konnte sogar keine messbare Aktivität nachgewiesen werden. Wie bereits vermutet, wird hier der geringe Porendurchmesser dieser Träger den Hauptgrund darstellen. Für die ECR-Träger konnten Aktivitäten zwischen 23,2 und 57,5 U/g_{Immo.} ermittelt werden. Für die unterschiedlichen Aktivitäten dieser Träger können verschiedene Gründe gefunden werden. Zunächst scheint es einen Einfluss der Kettenlänge der funktionellen Gruppen zu geben. Die Träger ECR8405 und ECR8417 besitzen eine Hexylgruppe und deren Immobilisate wiesen eine höhere Aktivität auf, als die Immobilisate auf den Trägern ECR8310 und ECR8319, die eine Ethylgruppe besitzen. Der Grund liegt möglicherweise in einer erhöhten Flexibilität der Lipase, welche wiederum die für die Katalyse notwendige Konformationsänderung ermöglicht (Hanefeld *et al.*, 2009). Im Vergleich der Oberflächen wurden die höchsten Aktivitäten auf den Trägern mit der größeren Oberfläche, ECR8310 und ECR8417, bei gleichen funktionellen Gruppen erreicht. Zwischen den Trägern ECR8405 und ECR8417 kann zudem der wesentlich größere Porendurchmesser eine weitere Rolle gespielt haben. Bei den Trägern ECR8310 und ECR8319 wiederum besitzt der Träger mit der größeren Oberfläche die kleineren Poren. Möglicherweise erklärt dies, warum bei diesen beiden Trägern der Unterschied der Aktivität

geringer ausfällt. Ein weiterer Einflussfaktor könnte die Dichte der funktionalen Gruppen auf den Trägeroberflächen sein. Diese ist für keinen der hier verwendeten Träger bekannt. Daher kann hier nur spekuliert werden. Durch eine hohe Dichte der funktionellen Gruppen sind beispielsweise Mehrfachverknüpfungen zwischen der Lipase und dem Trägermaterial möglich. Diese können auf der einen Seite die notwendige Konformationsänderung unterbinden, auf der anderen Seite aber auch zu einer erhöhten Stabilität führen (Cao, 2006; Hanefeld *et al.*, 2009; Mateo *et al.*, 2007). Von der Lipase C, die die aktive Komponente in dem kommerziellen LipTL-Präparat ausmacht (siehe 1.2.2), ist zudem bekannt, dass eins der Lider ein Lysin beinhaltet (Maraita *et al.*, 2013). Daher könnte eine kovalente Immobilisierung dieses Lysins zu einer eingeschränkten Beweglichkeit des Lids führen, wodurch das aktive Zentrum für die Substrate nicht mehr zugänglich wäre.

Für die Optimierung der kovalenten Immobilisierung wurde im nächsten Schritt nur mit dem ECR-Träger weitergearbeitet, aufgrund der sehr niedrigen Aktivität der EC-Träger. Der Hersteller der ECR-Träger empfiehlt für eine effektive Immobilisierung Konzentrationen des Immobilisierungspuffers zwischen 10 mM und 50 mM. Daher wurde die Konzentration des Puffers auf 20 mM erniedrigt und die Immobilisierung erneut durchgeführt.

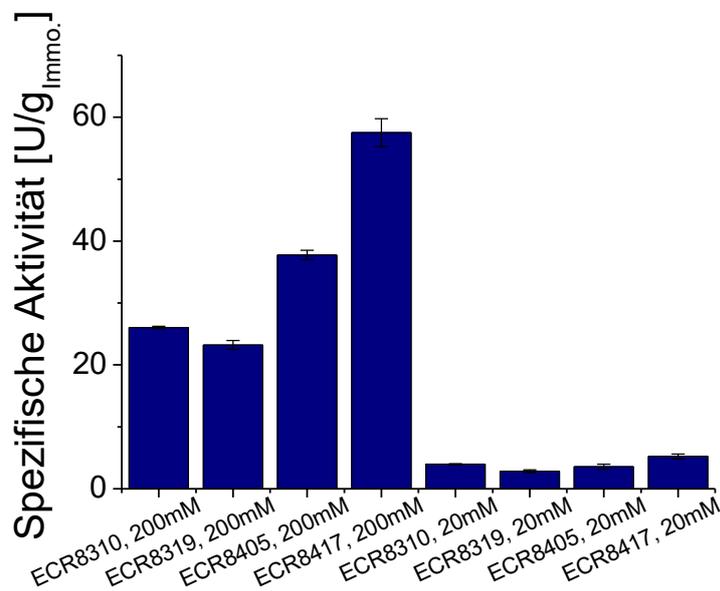


Abbildung 16 Optimierung der spezifischen Aktivität der Immobilisate durch Variation der Konzentration des Inkubationspuffers.

In Abbildung 16 sind die spezifischen Aktivitäten der Immobilisate auf den vier ECR-Träger in Abhängigkeit des Immobilisierungspuffers zusammengefasst. Hinsichtlich der Beladung konnte kein Unterschied festgestellt werden, weshalb die Daten nicht extra aufgeführt

werden. Beim Vergleich der Aktivitäten wurde eine deutliche Abnahme dieser für alle Träger durch Erniedrigung der Pufferkonzentration erhalten. Offensichtlich hat die Pufferkonzentration einen wesentlich höheren Einfluss auf die spezifische Aktivität als auf die Beladung der LipTL. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die adsorptive Immobilisierung der Lipase auf dem Accurel-Träger gefunden (Nieguth, 2013). Hierbei wurde entdeckt, dass die Aktivität nicht proportional mit der Beladung durch Erhöhung der Pufferkonzentration stieg, sondern erst bei einer Konzentration von 200 mM eine signifikante Steigerung der Aktivität beobachtet werden konnte. Es wurde daher ein Einfluss der Pufferkonzentration auf die aktive Konformation der LipTL vermutet. Für die weiteren Untersuchungen wurde aufgrund der Aktivität daher der ECR8417-Träger und als Pufferkonzentration der Immobilisierung 200 mM ausgewählt.

3.1.4 Kovalente Immobilisierung über Träger mit Epoxidgruppen

Neben der kovalenten Immobilisierung über Aminogruppen, wurde die kovalente Immobilisierung über Träger mit Epoxidgruppen auf der Oberfläche untersucht. Die LipTL wurde bisher aktiv auf dem kommerziellen Träger Eupergit C immobilisiert (Aires-Trapote *et al.*, 2015). Daher wurden weitere kommerziell erhältliche Träger für eine umfangreiche Studie bezogen (Tabelle 14). Für die Etablierung wurde, ähnlich den Trägern mit Aminofunktionen, eine Verbindung der Herstellerempfehlungen und der Immobilisierungsmethode für die adsorptive Immobilisierung verwendet. Es wurde eine Immobilisierungsdauer von 38 h ausgewählt, dabei wurde nach 18 h der Schüttler ausgestellt. Die Immobilisierungstemperatur wurde auf 30 °C erniedrigt. Die restlichen Parameter wurden analog der adsorptiven Immobilisierung gehalten.

Tabelle 14 Träger für die kovalente Immobilisierung an Epoxidgruppen mit den zugehörigen Trägereigenschaften.

Träger	Material	Funkt. Gruppen	Oberfläche [m ² /g]	Partikelgröße [µm]	Porengröße [nm]
EC-HFA S	Methacrylat	Amino-Epoxid	k. A.	100–300	10–20
EC-HFA M	Methacrylat	Amino-Epoxid	k. A.	200–500	10–20
ECR8205	Methacrylat	Epoxid	>80	150–300	45–60
ECR8214	Methacrylat	Epoxid	>60	150–300	120–180
ECR4204	Methacrylat/ Polystyrol	Epoxid	>140	150–300	28–45
IB-150P	Polyacrylat	Epoxid	k. A.	150–300	40
IB-150A	Polyacrylat	Epoxid	k. A.	150–300	45

Beim Vergleich der Träger fielen zunächst erneut die relativ kleinen Porendurchmesser, insbesondere bei den EC-Trägern, auf. Da bei der kovalenten Immobilisierung die EC-Träger mit Aminogruppen bereits eine sehr geringe Aktivität zeigten, lag die Vermutung nah, dass die EC-Träger mit Epoxidgruppen nicht geeignet sein könnten. Für alle Träger wurden die Beladung und die spezifische Aktivität ermittelt (Abbildung 17).

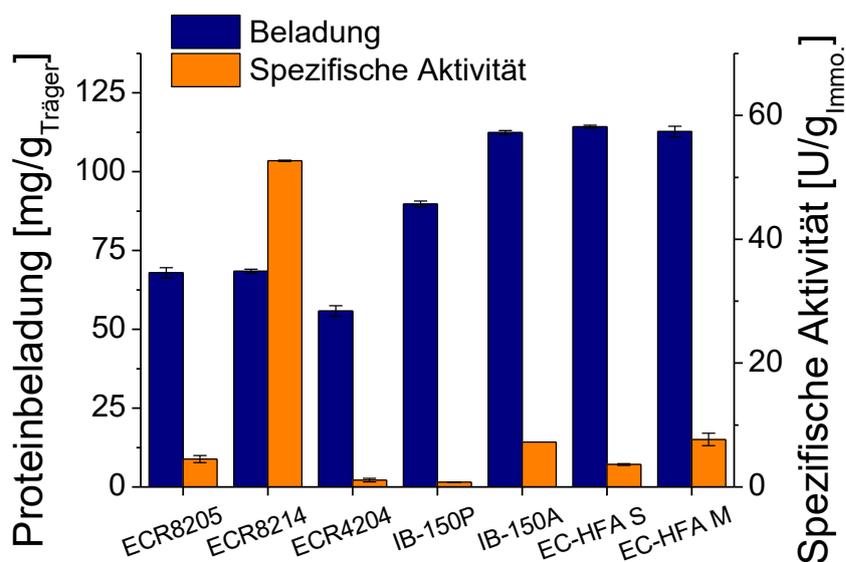


Abbildung 17 Proteinbeladung der Träger mit Epoxidgruppen und spezifische Aktivität der Immobilisate.

Die höchsten Beladungen konnten auf den IB- und EC-Trägern ermittelt werden. Aufgrund fehlender Angaben zu den Oberflächengrößen, kann an dieser Stelle keine hinreichende Erklärung für den Unterschied zu den ECR-Trägern gefunden werden. Möglicherweise kann erneut eine unterschiedliche Anzahl an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche für den Trend verantwortlich sein. Auch ist die Immobilisierung von Fremdproteinen nicht auszuschließen. Die höchste Aktivität von 52,7 U/g_{Immo} wurde mit dem Immobilisat auf dem Träger ECR8214 erreicht. Im Vergleich der Porengrößen der untersuchten Träger ist auffällig, dass der Träger ECR8214 die größte Porengröße aufweist. Eine zu geringe Porengröße kann, wie bereits diskutiert (siehe 3.1.2), die Flexibilität der Lipase zu stark einschränken. Bei den verwendeten Trägern ist nicht bekannt, wie hoch die Dichte der funktionellen Gruppen auf der Trägeroberfläche ist. So können auch hier mehrfache kovalente Knüpfungen zwischen dem Träger und der Lipase, insbesondere über das Lysin des großen Lids, möglich sein, was wiederum zu einer Verringerung der Aktivität führen würde. Bei den Trägern EC-HFA S und M ist zudem die Epoxidgruppe an eine relativ lange Kette mit unterschiedlichen Funktionen, wie Ether, einer Hydroxylfunktion und einer

sekundären Aminogruppe gekoppelt. Aufgrund der Kettenlänge sind ebenfalls Mehrfachverknüpfungen denkbar. Ein zusätzlicher Einfluss der weiteren funktionellen Gruppen kann nicht ausgeschlossen werden. In der Literatur konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Verwendung des Trägers EC-HFA mit Amino-Epoxid-Gruppe gegenüber anderen kommerziellen Trägern mit Epoxid-Gruppe, zu einer schnelleren Immobilisierung führte. Zudem wurde eine wesentlich geringere Pufferkonzentration benötigt und die Stabilität von mehreren getesteten Enzymen konnte verbessert werden. Jedoch wurden keine Angaben zu den Aktivitäten auf den verschiedenen Trägern gemacht (Mateo *et al.*, 2003). Beim Vergleich der Trägermaterialien fällt zudem auf, dass der Träger ECR4204 eine Polystyrolmatrix besitzt, welche bei der adsorptiven Immobilisierung schon zu inaktiven Immobilisaten geführt hat. Ein Einfluss dieses Materials auf die Ausrichtung oder Konformation der kovalent immobilisierten Lipase ist somit denkbar.

Ein direkter Vergleich mit der Arbeit von Aires-Trapote *et al.* (2015) ist an dieser Stelle schwierig. Für die Immobilisate der LipTL auf dem synthetisierten Trägermaterial Poly(GMA-co-HDDMA) wird eine maximale Beladung von 18 mg/g angegeben, welche deutlich niedriger ausfällt, als die hier bestimmten Beladungen. Die spezifische Aktivität wurde wiederum nur für die Hydrolyse von 4-Nitrophenylpalmitat bestimmt und diese auf die Aktivität des Lyophilisates bezogen. Dabei konnte keine verbesserte Aktivität ermittelt werden. Für das Immobilisat auf dem Träger Eupergit C konnte zudem nur 45% der katalytischen Effizienz des freien Enzyms festgestellt werden.

Für eine Optimierung der hier hergestellten Immobilisate wurde erneut die Konzentration des Immobilisierungspuffers variiert. Vom Hersteller Purolite wird für eine effiziente Immobilisierung auf Trägern mit Epoxidgruppen ein hochmolarer Puffer von 1 M oder höher empfohlen. Als weitere Optimierung wurde die Immobilisierungsdauer auf 18 h reduziert.

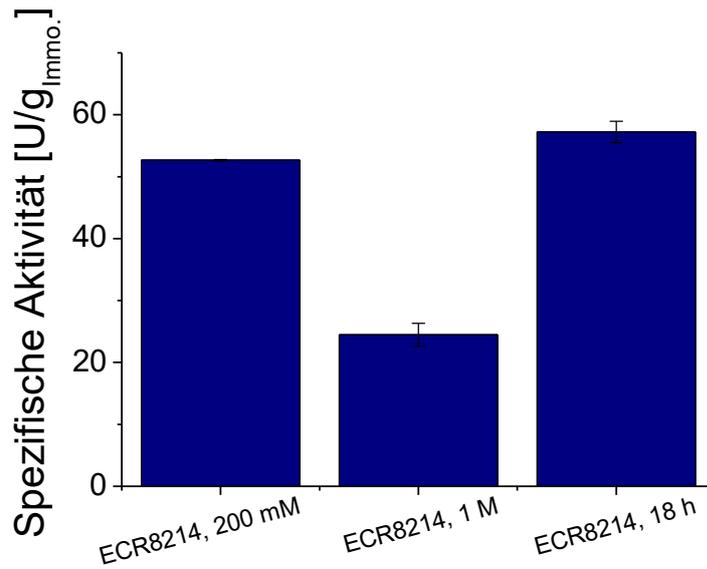


Abbildung 18 Optimierung der spezifischen Aktivität des ECR8214-Immobilisates durch Variation der Konzentration des Inkubationspuffers und der Inkubationszeit.

Abbildung 18 fasst die spezifischen Aktivitäten der optimierten Immobilisate zusammen. Durch die Variation der Pufferkonzentration konnte keine Verbesserung der Aktivität erreicht werden. Eine zu hohe Pufferkonzentration kann unter anderem zu einem Entzug des Wassers von der Enzymoberfläche führen (J. H. Lee *et al.*, 2010). Eine Verringerung der Inkubationszeit hingegen führte zu einer erhöhten Aktivität, was auf die Thermostabilität der LipTL in einem wässrigen Puffersystem zurück zu führen ist (Aires-Trapote *et al.*, 2015). In Bezug auf die Beladung konnte ähnlich zu den Ergebnissen der Träger mit Aminogruppen in keinem Fall eine merkbare Veränderung der Beladung ermittelt werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde das Immobilisat auf dem ECR8214-Träger mit einer Immobilisierungszeit von 18 h und einer Pufferkonzentration von 200 mM ausgewählt.

3.1.5 Ionische Immobilisierung

Als letzte trägerbasierte Methode wurde die Immobilisierung mittels ionischer Wechselwirkungen untersucht. Diese Immobilisierung wurde noch nicht für die LipTL beschrieben. Entscheidend für den Erfolg dieser Methode sind die Oberflächenladung des Enzyms und die funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägers. Die Ladung des Enzyms kann ausgehend von seinem isoelektrischen Punkt (pI-Wert) durch den pH-Wert des Puffers beeinflusst werden (Hanefeld *et al.*, 2009). Für die Etablierung der Methode wurden daher, abhängig vom Träger, der Puffer und der pH-Wert des Puffers variiert. Die

weiteren Parameter wurden von der adsorptiven Immobilisierung übernommen. Die verwendeten Träger sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15 Träger für die ionische Immobilisierung mit den zugehörigen Trägereigenschaften.

Träger	Material	Funkt. Gruppen	Oberfläche [m ² /g]	Partikelgröße [μm]	Porengröße [nm]
IB-D152	Polyacrylat	Carboxy	k. A.	350–700	k. A.
IB-C435	Polyacrylat	Carboxy	k. A.	350–700	k. A.
IB-A161	Polystyrol	Quart. Ammonium	k. A.	350–700	k. A.
IB-A171	Polystyrol	Quart. Ammonium	k. A.	350–700	k. A.
IB-A369	Polystyrol	Quart. Ammonium	k. A.	350–700	k. A.

Der pI-Wert der LipTL liegt laut Hersteller bei pH 6,6. Ausgehend von diesem Wert wurde der pH-Wert in Schritten von 0,5 erniedrigt oder erhöht. Für Träger mit Carboxygruppen wurde somit im Säuren und für Träger mit quartären Ammoniumgruppen im Basischen immobilisiert. Aufgrund des Pufferbereichs des Kaliumphosphatpuffers von pH 6–8 wurden für pH-Werte <6 ein Citratpuffer und für pH-Werte >8 ein HEPES-Puffer verwendet.

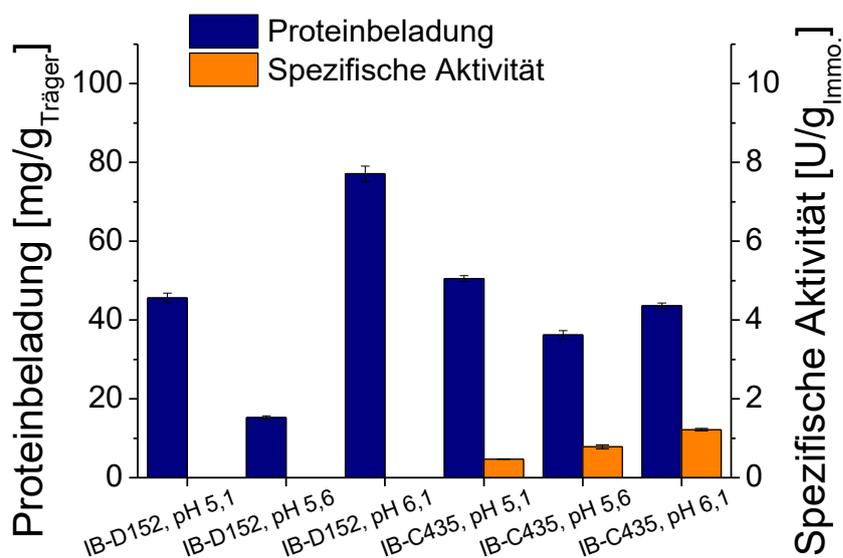


Abbildung 19 Proteinbeladung und spezifische Aktivität der Immobilisate auf Trägern mit Carboxygruppen bei unterschiedlichen pH-Werten des Immobilisierungspuffers.

Die Ergebnisse der Beladung und der spezifischen Aktivität der Immobilisate auf den Trägern mit Carboxygruppen ist in Abbildung 19 gezeigt. Die niedrigste Beladung wurde

bei beiden Trägern bei pH 5,6 bestimmt. Die Änderung von pH 6,1 zu 5,6 könnte durch den Wechsel des Puffersystems bedingt sein. Durch eine weitere Erniedrigung auf pH 5,1 konnte die Beladung wieder erhöht werden, vermutlich durch die Zunahme der geladenen Aminosäuren auf der Enzymoberfläche. Auffällig ist, dass hinsichtlich der Aktivität nur die Immobilisate auf dem Träger IB-C435 eine messbare Aktivität zeigten. Je höher dabei der pH-Wert des Puffers war, desto höher war die ermittelte Aktivität. Dies kann auf die pH-Stabilität der LipTL zurückgeführt werden. Vom Hersteller wird ein Bereich von pH 6–9 für die Stabilität angegeben. Eine Erniedrigung des pH-Werts unter 6 kann somit einen Aktivitätsverlust bedingen. Für die fehlende Aktivität der Immobilisate auf dem IB-D152-Träger kann kein hinreichender Grund gefunden werden. Aufgrund fehlender Informationen zu den Eigenschaften der zwei Träger kann hinsichtlich der Ursachen für die Unterschiede in den Beladungen und Aktivitäten zwischen den Immobilisaten nur spekuliert werden.

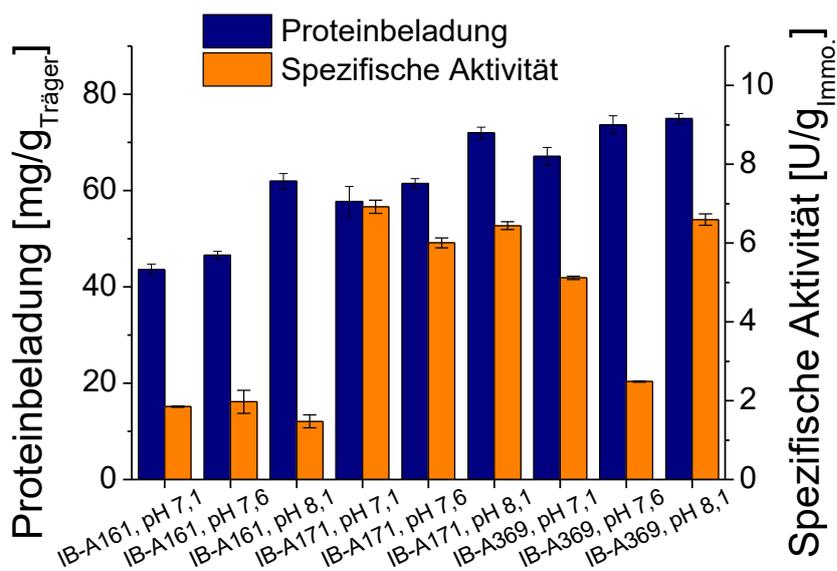


Abbildung 20 Proteinbeladung und spezifische Aktivität der anionischen Träger mit quartären Ammoniumgruppen bei unterschiedlichen pH-Werten des Immobilisierungspuffers.

Abbildung 20 fasst die Beladungen und spezifischen Aktivität der Immobilisate auf Trägern mit quartären Ammoniumgruppen zusammen. Für alle drei Träger konnte eine Zunahme der Proteinbeladung durch eine Erhöhung des pH-Werts festgestellt werden. Dies lässt sich erneut auf die Zunahme geladener funktionellen Gruppen auf der Enzymoberfläche zurückführen. Für die spezifische Aktivität konnte dieser Trend nicht beobachtet werden. Aufgrund fehlender Informationen zu den Unterschieden der drei Träger, können keine ausreichenden Gründe für diese Ergebnisse aufgrund dieser Eigenschaften gefunden werden.

Bekannt ist, dass die Träger aus Polystyrol bestehen. Da Träger aus diesem Material bereits in der adsorptiven Immobilisierung zu sehr niedrigen Aktivitäten geführt haben, kann auch bei der ionischen Immobilisierung dieser Effekt nicht ausgeschlossen werden. Die Verwendung des HEPES-Puffers für die Immobilisierung bei pH-Wert 8,1 kann einen weiteren Einfluss auf die Aktivität gehabt haben. Dennoch zeigten sich bei allen drei Trägern sehr unterschiedliche Trends. Beim Immobilisat auf dem IB-A369 konnte die Aktivität trotz ähnlicher Beladung deutlich verbessert werden zwischen pH 7,6 und pH 8,1. Beim IB-A171-Immobilisat konnte nur eine geringe Verbesserung der Aktivität durch eine Erhöhung der Beladung erreicht werden. Beim IB-A161 wiederum wurde eine Erniedrigung der Aktivität gemessen, trotz deutlicher Erhöhung der Beladung. Es kann somit festgehalten werden, dass die Einflüsse von pH-Wert, Pufferzusammensetzung und Art des Trägers ein sehr komplexes Zusammenspiel bilden und daher keine pauschalisierte Aussage zu dem optimierten Parameter für eine ionische Immobilisierung auf Träger mit quartären Aminogruppen gemacht werden kann.

Ein direkter Vergleich der hier erhaltenen Ergebnisse mit Literaturdaten ist an dieser Stelle aufgrund fehlender Vergleichsstudien schwierig. Beispielsweise wurde für die Lipase aus *Candida rugosa* auf zwei Träger für eine ionische Immobilisierung höhere Aktivitäten festgestellt als für Immobilisate auf Trägern für die adsorptive Immobilisierung. Jedoch wurden für die Immobilisierungen keine Optimierungen bezüglich des pH-Wertes oder anderer Parameter vorgenommen (Minovska *et al.*, 2005). In einer weiteren Studie konnten für die CALB eine Verbesserung der Aktivität und der Enantioselektivität durch Erhöhung des pH-Werts des Immobilisierungspuffers bei einer ionischen Immobilisierung auf einer aminofunktionalisierten Agaroseoberfläche nachgewiesen werden. Die Beladung wurde dabei konstant gehalten. In dieser Studie wiederum wurde keine Angabe über einen Wechsel des Puffers für die getesteten pH-Werte gemacht, obwohl neben pH 7 auch pH 5 und pH 9 für die Immobilisierung gewählt wurden und dies außerhalb der Pufferkapazität eines Kaliumphosphatpuffers liegt. Der Grund für die Erhöhung der Aktivität wurde wiederum in der Immobilisierung unterschiedlicher Konformationen der Lipase vermutet (Torres *et al.*, 2006).

Zusammenfassend wurde mit den in diesem Teil getesteten Trägern für eine ionische Immobilisierung der LipTL wesentlich geringere Aktivität erreicht als im Vergleich mit den ausgewählten Trägern für eine adsorptive und kovalente Immobilisierung. Daher wurden alle Träger für die ionische Immobilisierung von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

3.1.6 Einschluss der LipTL in Sol-Gele

Neben den vorgestellten trägerbasierten Methoden wurde im Folgenden der Einschluss der LipTL in ein Sol-Gel untersucht. Die Sol-Gele wurden dabei auf Grund der einfacheren Trocknung in Form von Xerogelen hergestellt. In der Vorarbeit von Hoyos *et al.* (2008) wurden zwei unterschiedliche Sol-Gele hergestellt und untersucht. Als Silanmonomere wurden *iso*-Butyltrimethoxysilan (*i*BTMS), Propyltrimethoxysilan und Tetramethoxysilan (TMOS) verwendet. Zur Erhöhung der Hydrophobizität wurde ein zweites Sol-Gel aus den Monomeren *i*BTMS und TMOS hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass mit dem hydrophoberen Sol-Gel eine höhere Aktivität der LipTL erreicht werden konnte.

Aufbauend auf diesem Wissenstand wurden Sol-Gele mit unterschiedlichen Kettenlängen der Alkylsilane angelehnt an das Protokoll von Reetz *et al.* (1996) hergestellt. Die Sol-Gele bestanden dabei aus einer Mischung aus TMOS und dem jeweiligem Alkylsilan, wobei TMOS als zusätzlicher Netzwerkbildner verwendet wurde. Das Verhältnis von TMOS zum Alkylsilan beträgt in allen Fällen 1:1 und das Verhältnis von Wasser zu den Silanen 8:1. Die Trocknungstemperatur wurde wiederum auf 25 °C erniedrigt um eine Desaktivierung der LipTL durch die erhöhte Zeit zum Gelieren und Trocknen der Gele bei Verwendung von langkettigen Alkylsilanen zu vermeiden. Als Proteinkonzentration wurde 30 mg/mL des Lyophilisates gewählt, da dies rund 5 mg/mL Protein entsprach und damit direkt vergleichbar mit den Versuchen von Hoyos *et al.* (2008) war. In ersten Vorversuchen erwies sich die Bestimmung der Proteinbeladung der Sol-Gele als problematisch. In der Literatur wurde die Beladung bisher über den Proteingehalt des Waschschriffs mit Wasser mittels der Bradford-Methode (Hoyos *et al.*, 2008) oder der BCA-Methode (Reetz *et al.*, 2003) bestimmt. Diese Vorgehensweise setzt das Wissen der Gesamtmasse des hergestellten und getrockneten Gels voraus. In den hier durchgeführten Vorversuchen zeigte sich, dass durch die verschiedenen Aufarbeitungs- bzw. Waschschriffe eine nicht zu vernachlässigende Menge an dem sehr feinen Sol-Gel verloren ging. Daher konnten keine reproduzierbaren Proteinbeladungen auf diesem Weg bestimmt werden. Somit wurde nach weiteren Möglichkeiten zur direkten Bestimmung von Proteinbeladungen von Feststoffen gesucht. Bonde *et al.* (1992) beschrieben dafür eine interessante Variation der Bradford-Methoden. Dabei wurden auf unterschiedlichen Trägermaterialien BSA oder IgG immobilisiert und die Immobilisate direkt mit der Färbelösung gemischt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in diesem Fall über die Abnahme der Absorption bei 465 nm im Überstand. Dies entsprach der Abnahme der Konzentration der ungebundenen Variante des Coomassie-Brillant-Blaus, da der Farbstoff mit den am Träger adsorbierten Proteinen

einen Komplex bildete. Dadurch wurde eine Blaufärbung der Immobilisate beobachtet. Für den Erfolg dieser Methode war es aber notwendig, dass das Trägermaterial selber keinen Farbstoff binden konnte (Bonde *et al.*, 1992). Für immobilisierte Alkoholdehydrogenasen konnte die Methode ebenfalls angewendet werden (Trivedi *et al.*, 2005). Die in der Literatur beschriebene Vorgehensweise wurde zunächst für ein beispielhaftes Sol-Gel durchgeführt. Als Referenz diente ein Sol-Gel gleicher Zusammensetzung ohne immobilisierte LipTL. Nach der Durchführung der genannten Bradford-Variante konnte bei 465 nm keine Abnahme der Absorption beider Sol-Gele im Vergleich zu einem dritten Ansatz ohne Sol-Gel gemessen werden. Jedoch färbten sich beide Sol-Gele blau (Abbildung 21) und es konnte eine Abnahme der Absorption bei 595 nm nachgewiesen werden.



Abbildung 21 Sol-Gele nach Färbung mit einer Variante der Bradford-Methode, links: unbeladenes Sol-Gel, rechts: beladenes Sol-Gel

Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass das Sol-Gel-Material einen gewissen Anteil der vorhandenen blauen Varianten des Farbstoffs binden kann, aber der Farbstoff scheinbar nicht in der Lage ist in die Poren des Trägermaterials einzudringen, um einen Komplex mit den Proteinen zu bilden. Somit konnte keine Abnahme der roten, unkomplexierten Farbvariante bei 465 nm bestimmt werden. Dementsprechend war die vorgestellte Bradford-Variante nicht geeignet zur direkten Bestimmung der Proteinbeladung von Sol-Gelen. Daher wurde im nächsten Schritt der BCA-Test in Erwägung gezogen, da bei der Methode die Änderung der Absorption nicht durch die Komplexbildung eines Farbstoffs mit den Proteinen selbst herbeigeführt wird, sondern über die Reduktion eines Cu-(II)-Ions. Das Cu-(I)-Ion bildet daraufhin mit Bicinchoninsäure einen violetten Komplex, der bei 562 nm photometrisch im Überstand gemessen werden kann. Der BCA-Test wurde leicht modifiziert

und erneut für ein mit LipTL beladenes Sol-Gel und für ein unbeladenes Sol-Gel durchgeführt. Dabei konnte eine deutliche violette Färbung des Überstandes für das beladene Sol-Gel beobachtet werden (Abbildung 22). Ebenso konnte eine Zunahme bei 562 nm nur bei dem ungeladenen Sol-Gel nachgewiesen werden. Daher wurde für die Bestimmung der Beladung von Sol-Gelen im Folgenden stets der BCA-Test durchgeführt.



Abbildung 22 Färbung der Überstände nach BCA-Test, links: unbeladenes Sol-Gel, rechts: beladenes Sol-Gel.

Nach der erfolgreichen Etablierung wurden Sol-Gele mit steigender Alkylkettenlänge der Silanmonomere hergestellt und zunächst die Proteinbeladung bestimmt. Bei der Synthese konnte dabei bestätigt werden, dass die Zeit zum Gelieren und zum Trocknen des Gels deutlich mit steigender Kettenlänge zunahm. So bildete sich beispielsweise das Gel aus TMOS/ODTMS erst nach 5 min und musste für 14 Tage getrocknet werden.

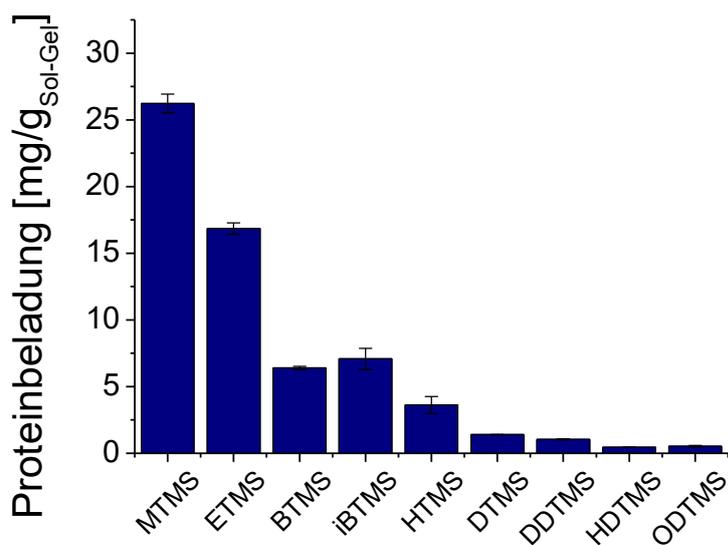


Abbildung 23 Proteinbeladung der Sol-Gele der Zusammensetzung TMOS/RTMS (1:1), R=Alkylrest.

Mit steigender Kettenlänge konnte hinsichtlich der Proteinbeladung eine deutliche Abnahme dieser ermittelt werden (Abbildung 23). Dies kann auf verschiedene Gründe zurück zu führen sein. Es ist bekannt, dass mit steigender Kettenlänge die Oberfläche und das Porenvolumen der Gele deutlich abnimmt (Reetz, 1997). Da bei allen Gelen dennoch die gleiche Proteinmenge vor der Synthese hinzugefügt wurde, weist dies auf unzugängliches Protein im Netzwerk hin, dass im BCA-Test nicht nachweisbar ist. Ein weiterer Grund kann in der Herstellungsmethode gefunden werden. Während des Geliervorgangs musste für eine ausreichende Durchmischung der wässrigen und organischen Komponenten der Sol-Gele gesorgt werden, jedoch kam es gleichzeitig zu einer starken Wärmeentwicklung. Daher wurden die Sol-Gele nach jeweils einer Minute Durchmischung auf Eis gestellt. Wie bereits erwähnt, bildete sich das Gel bei Alkylsilanen mit höherer Kettenlänge erst nach mehr als einer Minute. Daher ist eine Entmischung der Komponenten nicht auszuschließen, wodurch möglicherweise nicht der komplette Proteingehalt in die Sol-Gele eingeschlossen wurde.

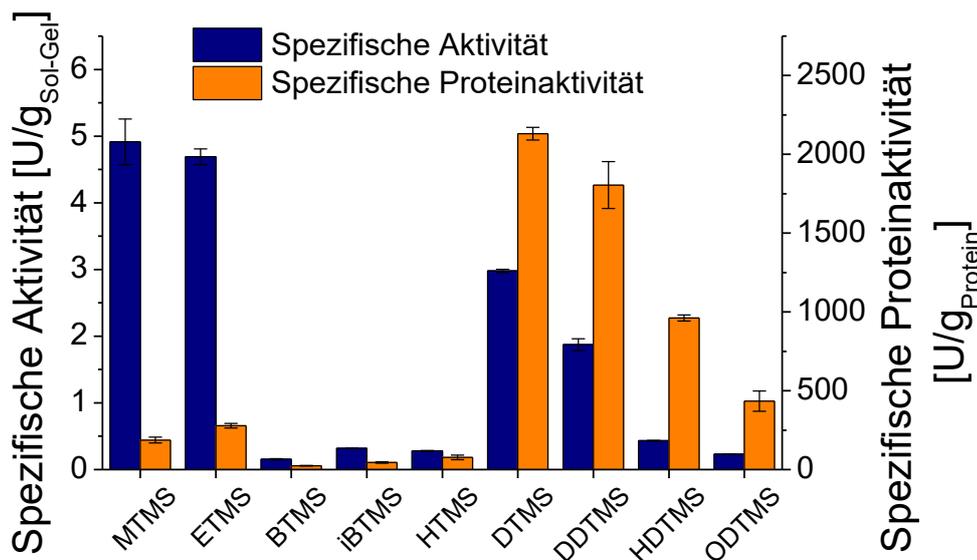


Abbildung 24 Spezifische Aktivität und spezifische Proteinaktivität der Sol-Gele der Zusammensetzung TMOS/RTMS (1:1), R=Alkylrest.

Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität bezogen auf die Sol-Gel-Menge wurde die höchste Aktivität mit dem Sol-Gel TMOS/MTMS erreicht (Abbildung 24). Diese verringerte sich zunächst und stieg ab einer Kettenlänge von 10 bei dem Sol-Gel von TMOS/DTMS deutlich an. Eine weitere Erhöhung der Kettenlänge führte erneut zu einer Verringerung der Aktivität. Es wird daher vermutet, dass sich ab dieser Kettenlänge der aktivierende Effekt durch die gestiegene Hydrophobizität auf die Lipasenaktivität auswirkt. Unter Beachtung der Beladung der Sol-Gele und damit der spezifischen Aktivität bezogen auf die Proteinmenge kann die hohe Aktivität der Sol-Gele TMOS/MTMS und TMOS/ETMS auf die hohe Beladung zurückgeführt werden. Bei dem Sol-Gel TMOS/DTMS ist wiederum deutlich die Aktivierung erkennbar. In der Literatur wird des Weiteren erwähnt, dass ab einer bestimmten Kettenlänge eine Sättigung der Aktivität erreicht wird und durch eine weitere Erhöhung der Kettenlänge nur noch geringe Verbesserungen der Aktivität erhalten werden (Reetz *et al.*, 1995). Dies wurde hier nicht nachgewiesen. Die hier erhaltene Abnahme der Aktivität mit steigender Kettenlänge kann auf die geringe Proteinbeladung und Diffusionslimitierungen aufgrund der benannten Abnahme der Porengröße zurückgeführt werden.

Von allen hergestellten Sol-Gelen erwies sich das Sol-Gel TMOS/DTMS als interessante Alternative zu den trägerbasierten Immobilisaten. Jedoch wurde das Immobilisat für die weiteren Versuche ausgeschlossen. Dies lag zum einen an der langwierigen Herstellungsmethode und der wesentlich erhöhten Trocknungsdauer von mehr

als einer Woche. Zum anderen erschienen die sehr feinen Sol-Gelpartikel als nicht geeignet für einen möglichen industriellen Einsatz, da sowohl der Rückhalt der Partikel in einem kontinuierlichen Prozess als auch deren Recycling als schwierig bewertet wurden.

3.1.7 Mechanische Stabilität der Trägermaterialien

Neben der Proteinbeladung und der spezifischen Aktivität sind insbesondere die Stabilitäten eines Immobilisates für den Einsatz in einem industriellen Prozess von Bedeutung. Zu unterscheiden sind dabei die Stabilität des Trägermaterials an sich und die Stabilität des Enzyms über die Zeit des Prozesses.

Eine ausreichende mechanische Stabilität des Trägermaterials ist notwendig für den Einsatz in Reaktoren mit erhöhten Leistungseinträgen beispielsweise durch verschiedene Rührwerke und/oder viskose Medien (Nieguth *et al.*, 2011). Durch eine zu geringe Stabilität kann es im Lauf des Prozesses zum Abrieb von Trägermaterial kommen, wodurch je nach Prozessführung aktives Enzym verloren gehen kann oder Filterelemente zur Zurückhaltung des Immobilisates verstopft werden können. Zur Überprüfung der mechanischen Stabilität ausgewählter Trägermaterialien wurde in dieser Arbeit ein Protokoll von Wiemann *et al.* verwendet (2009). Dieses simuliert eine hohe mechanische Beanspruchung durch Rühren mit einem Magnetrührer in hochviskoser Laurinsäure bei 60 °C für zwei Stunden. Die Methode wurde ausgewählt, da sie der Vorgehensweise der DKR am ähnlichsten war, da auch hier ein Magnetrührer eingesetzt wird (siehe 2.3.7). Die Untersuchung wurde für die Träger durchgeführt mit denen die höchsten spezifischen Aktivitäten erreicht wurden. Diese waren Accurel, IB-S500, ECR8214 und ECR8417. Von allem Träger wurden REM-Aufnahmen vor und nach der mechanischen Belastung angefertigt (Abbildung 25).

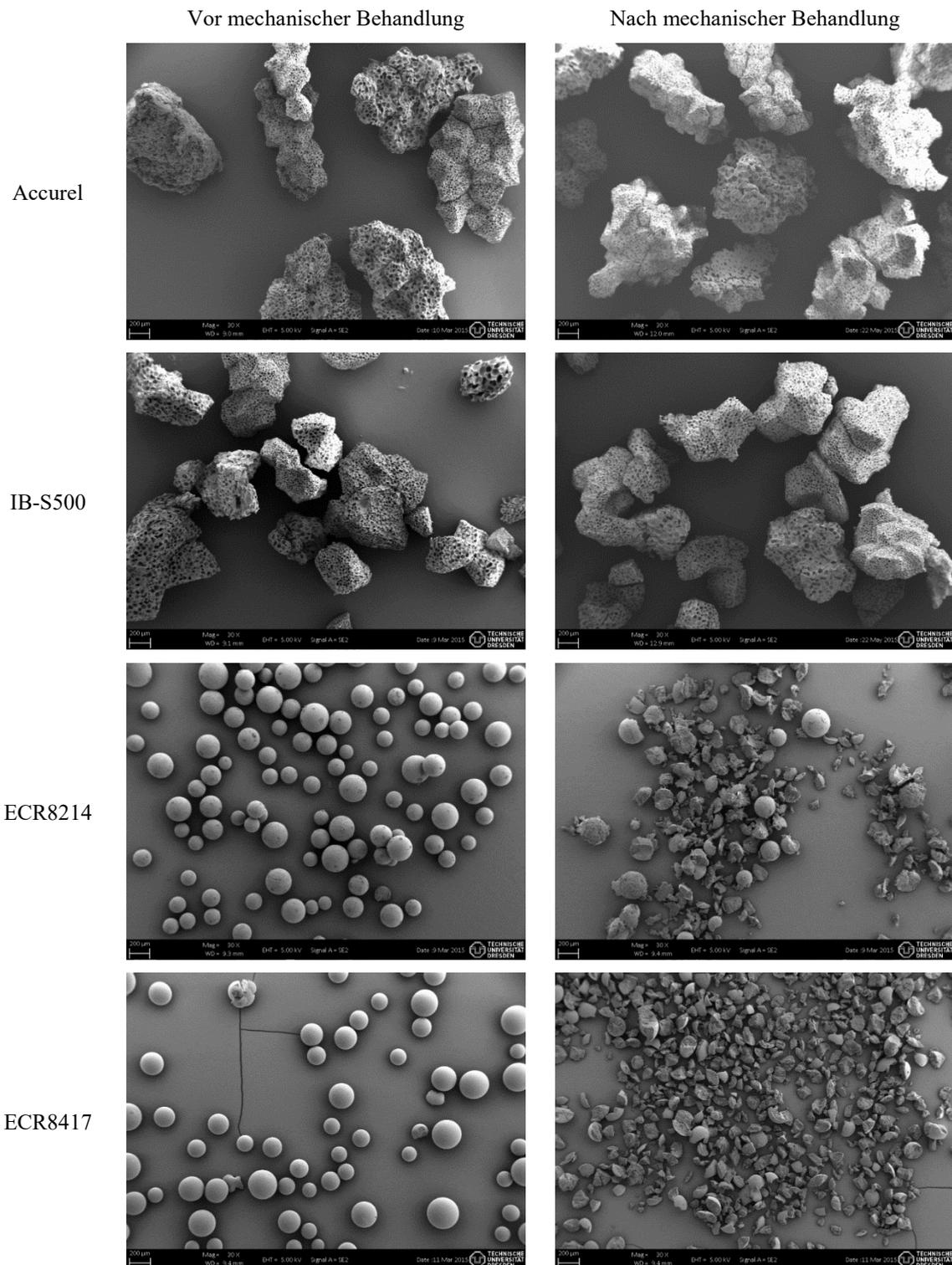


Abbildung 25 Mechanische Stabilität ausgewählter Trägermaterialien.

Im Fall der Träger Accurel und IB-S500 waren keine sichtbaren Veränderungen der Trägeroberfläche oder der Partikelgröße nach der Behandlung sichtbar. Aufgrund der nicht sphärischen Form sind kleinere Schädigungen in Form von Abrieb aber nicht gänzlich auszuschließen. Gegenteilig dazu verhielten sich die Träger ECR8214 und ECR8417. Beim ECR8214-Träger konnten nach der Behandlung nur noch wenige intakte sphärische Partikel

gefunden werden. Der Träger ECR8417 verlor seine gesamte Integrität. Es konnte somit ein direkter Zusammenhang zwischen dem Material der Träger und der mechanischen Stabilität festgestellt werden. Accurel und IB-S500 bestehen aus Polypropylen, ECR8214 und ECR8417 wurden aus Methacrylat mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen hergestellt. Daher scheint Polypropylen wesentlich stabiler gegenüber mechanischen Kräften zu sein als Methacrylat. In der Literatur wird des Weiteren neben der Schädigung durch den Magnetrührer das Quell- und Schrumpfverhalten der Trägermaterialien in Laurinsäure als Grund benannt (Wiemann *et al.*, 2009). Daraus resultierende Schädigungen, beispielsweise Risse, könnten neue Angriffspunkte für weitere Schädigungen durch den Magnetrührer darstellen. Es ist denkbar, dass Methacrylat ein unterschiedlicheres Quell- und Schrumpfverhalten als Polypropylen besitzt und somit der komplette Verlust der Integrität des Materials möglich war. Aufgrund der Ergebnisse scheinen Träger aus Polypropylen eher geeignet für einen großtechnischen Einsatz mit hohen Scherkräften.

3.1.8 Desorptionsstabilität der Immobilisate

Zur Bestimmung der Enzymstabilität der Immobilisate wurde zunächst die Desorption des an den Trägern gebunden Enzyms untersucht. Je nach Prozess kann eine ungewollte Desorption zu einem Verlust der Enzymaktivität und damit einer Desaktivierung von Immobilisaten über die Zeit führen. Ebenso kann dies weitere Produktreinigungsschritte notwendig machen infolge einer zusätzlichen Verunreinigung durch das Protein. Insbesondere für adsorptiv immobilisiertes Enzym kann dies zu einer Limitierung des Einsatzes führen (Wiemann, 2010). Die Bestimmung der Desorptionsstabilität wurde nach Literaturangabe in einer Methanol/Wasser-Mischung (1:1) durchgeführt (Wiemann, 2010). Die Untersuchung wurde für die Immobilisate auf den Trägern Accurel, IB-S500, ECR8214 und ECR8417 durchgeführt. Die zwei Immobilisate mit einer kovalenten Bindung der LipTL wurden aus dem Grund auch untersucht, da es nicht ausgeschlossen werden konnte, dass sich auch adsorbiertes Protein auf der Trägeroberfläche befand.

Tabelle 16 Proteinbeladung ausgewählter Träger und Menge an desorbiertem Protein nach Rühren für 1 h in MeOH:H₂O (1:1) bei 50 °C.

Träger	Beladung [mg/g _{Träger}]	Desorbiertes Protein [mg/g _{Immo.}]
Accurel	21,1	9,8
IB-S500	24,3	10,2
ECR8214	68,5	3,7
ECR8417	60,0	0,5

Für jedes untersuchte Immobilisat konnte desorbiertes Protein nachgewiesen werden. Dennoch unterschied sich die Menge deutlich je nach verwendeter Immobilisierungsart. Vom Accurel-Immobilisat desorbierten 9,8 mg Protein pro Gramm Immobilisat. Dies entsprach 46,4% der bestimmten Proteinbeladung. Ähnlich verhielt sich das IB-S500-Immobilisat. Hierbei desorbierten 10,2 mg/g_{Immo.}, was 42,4% der Beladung entsprach. Die Verwendung von Trägern für eine kovalente Immobilisierung konnte wie erwartet die Proteindesorption deutlich reduzieren. Die Desorption von 5,4% Protein beim ECR8214 und 0,8% beim ECR8417 deutet auf adsorptiv gebundenes Protein hin. Es liegt daher die Vermutung nah, dass der zusätzliche Waschschrift mit NaCl-Lösung nicht ausreichend war, um das gesamte adsorptiv gebundene Protein zu entfernen. Dennoch ist die geringe Menge an desorbierten Protein als vernachlässigbar für die Immobilisate auf ECR8214 und ECR8417 einzuschätzen. Die weitere Verwendung aller getesteten Träger für die KR bzw. DKR von α -Hydroxyketonen wurde an dieser Stelle nicht als problematisch bewertet, da es im Allgemeinen bekannt ist, dass Proteine unlöslich in reinen organischen Lösungsmitteln sind und somit keine Desorption zu erwarten ist (Doukyu & Ogino, 2010; Hanefeld *et al.*, 2009; Singer, 1963).

3.1.9 Prozessstabilität der Immobilisate

Etablierung eines Systems zur Bestimmung der Prozessstabilität

Zur weiteren Untersuchung der Stabilität der Immobilisate wurde die Prozessstabilität oder auch Betriebsstabilität bestimmt. Diese Stabilität steht dabei für die Stabilität eines Enzyms unter andauernder Katalyse und unterscheidet sich dadurch deutlich von der Lagerstabilität oder der Enzymstabilität in wiederholten Batch-Versuchen. Die Lagerstabilität eines Enzyms wird meist durch Messung der Restaktivität nach einer Inkubation bei festgelegten Parametern bestimmt. Bei dieser Methode können lediglich einzelne desaktivierende Parameter bestimmt werden, ohne dass das Enzym während der Inkubation eine Reaktion katalysiert. In wiederholten Batch-Versuchen wird das Enzym mehrmals hintereinander

unter gleichen Bedingungen in einer Reaktion eingesetzt und die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit gemessen. Problem dieser Methode kann eine fehlende Reproduzierbarkeit, aufgrund der Änderung der Substrat- und Produktkonzentration und dadurch sich ändernde stabilisierende oder destabilisierende Effekte, sein. Dem gegenüber steht die Messung der Prozessstabilität unter einem konstanten Umsatz der Substrate. Geeignet für diese Methoden sind Festbettreaktoren oder CSTR-Systeme (*continuous stirred-tank reactor*, engl. für kontinuierlich gerührter idealer Rührkessel) (Bommarius *et al.*, 1992).

Grundlage für die Bestimmung der Prozessstabilität bildete ein von Nieguth etabliertes CSTR-System. Mit diesem konnten bereits erfolgreich Prozessstabilität der LipTL auf dem Accurel-Träger in Abhängigkeit vom verwendeten Lösungsmittel oder Modifikation der Enzymoberfläche bestimmt werden (Nieguth, 2013). Bei den ersten Versuchen mit diesem System in dieser Arbeit fiel auf, dass das Septum zum Verschließen des Reaktors unter schnellen Verschleißerscheinungen litt. Diese führte zur einer häufigen Undichtigkeit des Reaktors, wodurch keine Reproduzierbarkeit der Versuche gewährleistet werden konnte. Daher wurde zunächst das Reaktordesign überarbeitet (Abbildung 26) und ein neues Verschlussystem vom Labor- und Versuchsfeldverbund der Fakultät Maschinenwesen der Technischen Universität Dresden anfertigen lassen. Die dazu passenden Glasreaktoren wurden in der Glasbläserei der Fachrichtung Chemie und Lebensmittelchemie der Technischen Universität Dresden neu angefertigt.

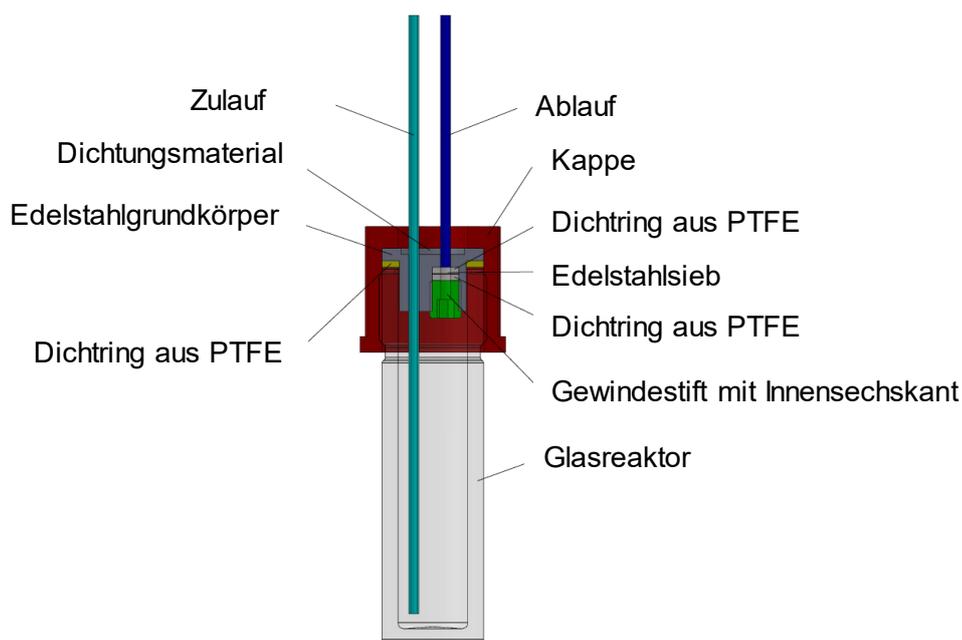


Abbildung 26 Schematischer Aufbau des CSTR (©Christiana Sperling, TU Dresden)

Festlegung der Prozessparameter

Für die weitere Etablierung mussten zunächst die Parameter des Reaktorsystems festgelegt werden. Aus den Vorarbeiten von Nieguth (2013) war bereits bekannt, dass zur Vermeidung der bereits benannten Einflüsse der Konzentrationsänderung von Substraten und Produkten der maximale Umsatz bei 10% liegen sollte. Daher musste die Durchflussrate entsprechend der Aktivität des eingesetzten Enzyms angepasst werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass für eine Vergleichbarkeit der Versuche stets mit der gleichen Benzoinkonzentration gearbeitet werden muss, da eine Erhöhung der Prozessstabilität durch Erhöhung der Benzoinkonzentration, trotz ähnlicher Umsätze, messbar war.

Ein weiterer bisher nicht untersuchter Parameter ist die Durchmischung im Reaktorraum. Diese hat einen direkten Einfluss auf die hydrodynamische Verweilzeit bzw. auf das Verweilzeitverhalten der Reaktionsbestandteile im Reaktor. Für einen idealen kontinuierlichen Reaktor wird eine sofortige Durchmischung des eintretenden Stoffes angenommen. Dem gegenüber können in einem realen Reaktor Totzonen und Kurzschlussströmungen auftreten, die eine Durchmischung erschweren und durch die Rührgeschwindigkeit beeinflusst werden können (Baerns *et al.*, 2013). Zur Charakterisierung der Durchmischung in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit wurde die Verweilzeitverteilung $E(t)$ bei unterschiedlichen Rührgeschwindigkeiten bestimmt. Zur Bestimmung von $E(t)$ wurden Stoßmarkierungsexperimente durchgeführt und daraus zunächst die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ ermittelt. Dafür wurde die Benzoinkonzentration am Reaktoreingang abrupt von 0 mg/mL auf 20 mg/mL (c_0) erhöht und die Konzentration ($c(t)$) am Reaktorausgang gemessen. Das Experiment wurde für Rührgeschwindigkeiten zwischen 250 und 1500 rpm durchgeführt. Der Einfluss von 50 mg Immobilisat wurde ebenfalls bei 1100 rpm getestet. Der Durchfluss wurde konstant bei 0,5 mL/min gehalten. Durch Auftragung des Quotienten $c(t)/c_0$ über die Zeit ergab sich die Verweilzeitsummenkurve $F(t)$ (siehe Gleichung (2-1)).

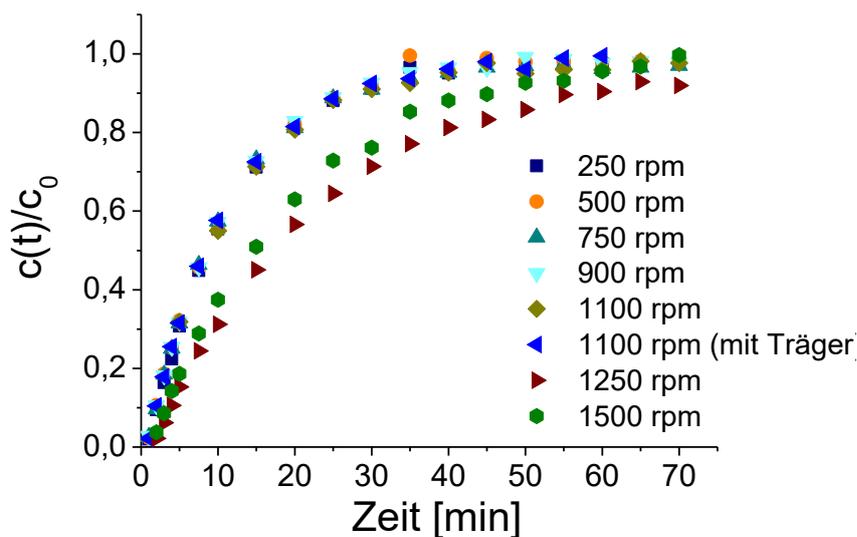


Abbildung 27 Verweilzeitssummenkurve $F(t)$ im CSTR in Abhängigkeit der Rührgeschwindigkeit (Petrenz *et al.*, 2015).

Abbildung 27 zeigt die erhaltenen Verweilzeitssummenkurven in Abhängigkeit der eingestellten Rührgeschwindigkeiten. Bei Rührgeschwindigkeiten zwischen 250 und 1110 rpm konnte die maximale Benzoinkonzentration und damit der Gleichgewichtszustand nach 45 min erreicht werden. Dies entsprach dem 3,8fachen der eingestellten Verweilzeit. Mit einer Rührgeschwindigkeit von 1250 rpm konnte der Gleichgewichtszustand innerhalb der vermessenen Zeit (70 min) nicht erreicht werden. Dies deutete auf Totzonen innerhalb des Reaktorraums hin. Durch die Erhöhung auf 1500 rpm konnte die Durchmischung erneut verbessert werden. Der Gleichgewichtszustand wurde erst nach 65 min erreicht und damit später als bei den Rührgeschwindigkeiten zwischen 250 und 1100 rpm. Die Anwesenheit von Immobilisat hat des Weiteren keinen Einfluss auf die Durchmischung.

Aus den Verweilzeitssummenkurven $F(t)$ wurden im Anschluss die Verweilzeitverteilungen $E(t)$ bestimmt. Dafür wurde $F(t)$ nach t abgeleitet und gegen die Zeit aufgetragen (Gleichung (2-2)).

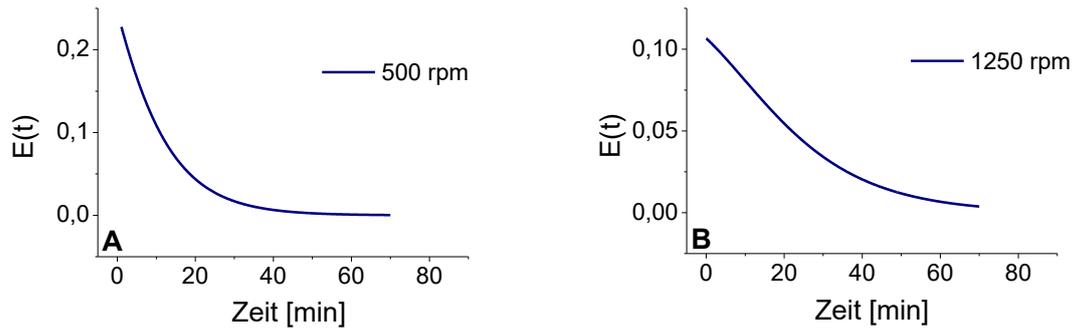


Abbildung 28 Verweilzeitverteilung $E(t)$ im CSTR bei einer Rührgeschwindigkeit von A: 500 rpm und B: 1250 rpm (Petrenz *et al.*, 2015).

In Abbildung 28 sind beispielhaft die Verweilzeitverteilungen bei Rührgeschwindigkeiten von 500 rpm und 1250 rpm abgebildet. Für beide Rührgeschwindigkeiten ergab sich eine für einen CSTR typische Verweilzeitverteilung. Es wurde daher davon ausgegangen, dass sich das etablierte CSTR-System tatsächlich nahezu ideal verhielt. Im Vergleich der Verweilzeitverteilungen beider Rührgeschwindigkeiten bestätigt sich erneut das Ergebnis, dass die Durchmischung bei 500 rpm besser ist, da der Gleichgewichtszustand früher erreicht werden konnte. Für die anderen Rührgeschwindigkeiten zwischen 250 und 1100 rpm wurden die gleichen Verweilzeitverteilungen erhalten (Daten nicht gezeigt). Somit konnten für die weiteren Experimente Rührgeschwindigkeiten zwischen 250 und 1100 rpm verwendet werden und 500 rpm wurde daraufhin festgelegt.

Messung der Prozessstabilität ausgewählter Immobilisate

Nach der Etablierung des CSTR-Systems und Festlegung der Parameter wurden die Prozessstabilitäten ausgewählter Immobilisate bestimmt. Dafür wurde der Umsatz bzw. der Umsatzabfall über die Zeit gemessen und daraus die Halbwertzeit als Maß für die Stabilität bestimmt. Zur Berechnung der Halbwertzeit wurde ein exponentieller Abfall des Umsatzes angenommen.

$$X_t = X_0 e^{-k_{\text{des}} t} \quad (3-1)$$

Durch Auftragung des negativen natürlichen Logarithmus der Umsätze über die Zeit t ergibt sich eine Gerade, deren Steigung der Desaktivierungskonstante k_{des} entspricht.

$$-\ln X_t = -\ln X_0 + k_{\text{des}} t \quad (3-2)$$

Die Halbwertzeit $t_{1/2}$ wird definiert als die Zeit, nachdem ein Ausgangswert (z.B. Umsatz oder Aktivität) auf die Hälfte des Wertes gesunken ist.

$$X_{t_{1/2}} = \frac{X_0}{2} \quad (3-3)$$

Aus Gleichung (3-1) und (3-3) ergibt sich für die Halbwertszeit $t_{1/2}$ die folgende Berechnung.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{\text{des}}} \quad (3-4)$$

Die Halbwertszeit wurde im Folgenden für die Immobilisate auf den Trägern Accurel, IB-S500, ECR8314 und ECR8417 bestimmt. Aufgrund der Verwendung eines Edelstahlsiebs von 10 μm Maschenweite konnte auch das Lyophilisat im CSTR verwendet werden und dessen Halbwertszeit wurde als direkter Vergleich ermittelt. Als Prozessparameter wurden 2-MeTHF mit einer Benzoinkonzentration von 10 mg/mL, ein Durchfluss von 0,5 mL/min und eine Rührgeschwindigkeit von 500 rpm festgelegt. Wie bei den Aktivitätstests wurden die Messungen der Prozessstabilität bei 50 °C durchgeführt.

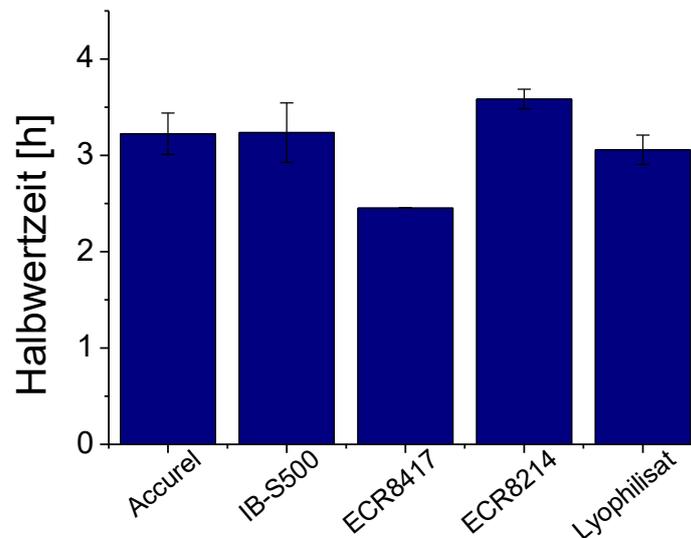


Abbildung 29 Halbwertszeit ausgewählter Immobilisate im CSTR bei 50 °C.

Wie aus Abbildung 29 hervorgeht lagen alle ermittelten Halbwertszeiten in einem Bereich von 2,5 bis 3,6 h. Die höchste Halbwertszeit von 3,6 h konnte für das Immobilisat auf dem Träger ECR8214 erreicht werden und damit eine Verbesserung von 17,3% gegenüber dem Lyophilisat. Insgesamt konnte für alle Immobilisate, bis auf das ECR8417-Immobilisat, eine Erhöhung der Halbwertszeit gegenüber dem Lyophilisat der LipTL festgestellt werden. Jedoch fiel diese Erhöhung entgegen den Erwartungen relativ gering aus. Das könnte unter anderem an vermutlich zugesetzten Stabilisatoren (Nieguth, 2013) im Lyophilisat liegen. Die Unterschiede in der Halbwertszeit zwischen der kovalent immobilisierten LipTL und der

adsorptiv immobilisierten LipTL zeigt zudem, dass die kovalente Knüpfung des Enzyms an eine Trägeroberfläche nicht ausreichend war, um eine erhöhte Stabilisierung in einem kontinuierlichen Prozess zu gewährleisten. Da der Desaktivierungsmechanismus der LipTL in einem organischen Lösungsmittel nicht bekannt ist, kann an der Stelle nur spekuliert werden, ob die kovalenten Bindungen auch im Bereich der Entfaltung ausgebildet wurden. Bisher wurde, wie bereits erwähnt, nur gezeigt, dass durch eine kovalente Immobilisierung die Thermostabilität in Puffer bei verschiedenen Temperaturen erhöht werden konnte. Es wurde nicht erwähnt, ob die unlöslichen Bestandteile des Lyophilisates, die möglicherweise einen Teil der Stabilisatoren enthalten, vor dem Experiment entfernt wurden (Aires-Trapote *et al.*, 2015). Ein anderer Grund für die Prozessstabilitäten kann in der mechanischen Stabilität der Träger gefunden werden. Wie unter 3.1.7 gezeigt, verlieren die Träger ECR8417 und ECR8214 nahezu ihre gesamte Integrität bei Anwesenheit eines Magnetrührers. Daher ist es möglich, dass trotz des feinen Edelstahlsiebs vor dem Ablauf, kleinste Teile der Träger und damit ein Teil des Enzyms aus dem Reaktor entfernt wurden und somit die Aktivität bzw. der Umsatz stärker sanken, als durch die Entfaltung der LipTL. Hinsichtlich der Desorptionsstabilität der Immobilisate (siehe 3.1.8) gegenüber den bestimmten Halbwertzeiten kann kein Zusammenhang gefunden werden, da auch die Immobilisate mit hoher Desorptionsstabilität ähnliche Halbwertzeiten aufwiesen wie die Immobilisate mit geringerer Desorptionsstabilität. Somit wird die Annahme bestätigt, dass die Desorption in reinen organischen Lösungsmitteln keine Rolle spielen sollte.

3.1.10 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Für die Immobilisierung der LipTL wurden unterschiedliche Methoden getestet. Für die trägerbasierte Immobilisierung wurden 37 Trägermaterialien hinsichtlich ihrer Beladung und der spezifischen Aktivität der LipTL untersucht. Dafür wurden sowohl Träger für eine adsorptive, eine kovalente und eine ionische Immobilisierung ausgewählt. Als zweite Methode wurde der Einschluss in ein Sol-Gel ausgewählt. Hierbei wurden verschiedene Sol-Gele durch Verwendung von Alkylsilanmonomeren mit steigender Alkylkettenlänge hergestellt. Nach der Optimierung der Methoden zur direkten Bestimmung der Beladung der Sol-Gele wurde die spezifische Aktivität der eingeschlossenen LipTL in Abhängigkeit der Kettenlänge bestimmt. In Tabelle 17 sind die spezifischen Aktivitäten bezogen auf die Präparatmasse sowie auf die Proteinmasse der Immobilisate, die in den jeweiligen Immobilisierungsmethoden die höchsten Aktivitäten aufwiesen, zusammengefasst. Die Immobilisate die mittels ionischer Immobilisierung gewonnen wurden, wurden hier

aufgrund der sehr geringen Aktivität nicht in die Tabelle aufgenommen. Zur Bewertung der Immobilisate wurden die Aktivitäten auf die Aktivität der nativen LipTL bzw. des Lyophilisates bezogen und somit der Aktivierungsfaktor berechnet.

Tabelle 17 Zusammenfassung und Vergleich der spezifischen Aktivitäten verschiedener LipTL-Präparat. Der Aktivierungsfaktor ist auf die spezifische Proteinaktivität des LipTL-Lyophilisates bezogen.

Präparat	Spezifische Aktivität [U/g _{Präparat}]	Spezifische Proteinaktivität [U/g _{Protein}]	Aktivierungsfaktor
Lyophilisat	148,5	890,8	1,0
Accurel	74,5	3527	4,0
IB-S500	85,6	3518,6	3,9
ECR8214	52,7	769,3	0,9
ECR8417	57,5	958,8	1,1
TMOS/DTMS	3,0	2130,8	2,4

Für drei Immobilisate konnte eine Aktivierung bzw. eine Hyperaktivierung der LipTL nachgewiesen werden. So konnte durch die Immobilisierung der LipTL auf den Polypropylenträgern eine Erhöhung der spezifischen Proteinaktivität um das Vierfache erreicht werden. Der bereits publizierte Aktivierungsfaktor für Immobilisat auf dem Accurelträger (Nieguth *et al.*, 2014) wurde somit bestätigt. Mit dem Einschluss der LipTL in das Sol-Gel TMOS/DTMS konnte mehr als eine Verdopplung der Proteinaktivität bestimmt werden. Jedoch wurde dieses Immobilisat aufgrund der Herstellungsmethode und der unpraktikablen Partikelgröße nicht weiter untersucht. Für die zwei kovalent immobilisierten Varianten der Lipase TL konnte dagegen interessanterweise eine annähernd gleiche Proteinaktivität wie das Lyophilisat nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, dass hier die LipTL auf den Träger in ihrer nativen Form gebunden wurde und keine Hyperaktivierung stattgefunden hat.

Für die trägergebundenen Immobilisate wurde im nächsten Schritt die Stabilität bestimmt. Dabei wurde sowohl die mechanische Stabilität des Trägermaterials, also auch die Desorptions- und Prozessstabilität der Immobilisate untersucht. Die höchsten mechanischen Stabilitäten wurde für die Polypropylenträger gefunden. Die Träger ECR8214 und ECR8417 verloren im Gegenteil dazu ihre nahezu komplette Integrität. Die höchsten Desorptionsstabilitäten wurden wiederum für die kovalent immobilisierte LipTL auf den beiden Trägern bestimmt. Hinsichtlich der Prozessstabilität konnte eine Erhöhung derer für alle Immobilisate, bis auf das Immobilisat auf dem ECR8417-Träger, gegenüber dem Lyophilisat erreicht werden.

Unter Beachtung aller Ergebnisse wurden die Polypropylen-träger Accurel und IB-S500 und damit die adsorptive Immobilisierung als am geeignetsten für die LipTL bewertet. Die kovalente Immobilisierung führte wie erwartet zu einer Verringerung der Aktivität. Dennoch konnte keine deutliche Erhöhung der Stabilität, insbesondere der Prozessstabilität, erreicht werden. Daher stellt die kovalente Immobilisierung auf den hier getesteten Trägern keine Alternative dar. Hinsichtlich der Verwendung des Accurelträgers oder des IB-S500-Trägers stellte sich im Laufe der Arbeit heraus, dass es sich beim IB-S500-Träger um eingekauften und gesiebten Accurel-Träger des gleichen Herstellers handelte (persönliche Kommunikation mit Michiel van Vliet, Biotrans 2015) und daher keine Unterschiede bis auf die Partikelgröße zwischen den Trägern existieren. Zudem wurde der IB-S500 aus dem Sortiment von ChiralVision genommen, sodass kein Nachschub erhalten werden konnte. Daher wurde für alle weiteren Untersuchungen der Accurel-Träger und die adsorptive Immobilisierung der LipTL ausgewählt. Sofern nicht anders angegeben, sind alle in der weiteren Arbeit angegebenen spezifischen Aktivitäten auf das Immobilisat auf dem Accurelträger bezogen.

3.2 Einfluss der Wasseraktivität

3.2.1 Methoden-etablierung

Erste Untersuchungen zum Einfluss der Wasseraktivität auf die spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in einem organischen Lösungsmittel wurden von Nieguth (2013) durchgeführt. Hierbei wurden definierte Volumina von Wasser zu vorher getrockneten THF hinzugefügt und die KR von Benzoin durchgeführt. Dabei ergab sich eine Verringerung der spezifischen Aktivität durch die Erhöhung der Wasseraktivität. Als Problem dieser Methode zeigte sich, dass keine genaue Aussage über die reale Wasseraktivität während der Reaktion gemacht werden konnte. Zum einen konnte die Anfangswasseraktivität des getrockneten Lösungsmittels nicht ermittelt werden und zum anderen erfolgte keine Wasseraktivitätseinstellung in den Edukten oder der immobilisierte LipTL. Zudem wurde als weiterer Nachteil benannt, dass diese Methode nicht geeignet für hydrophobe Lösungsmittel ist, da die hierfür benötigte Wassermenge relativ klein ist und somit eine Reproduzierbarkeit schwierig sein kann.

Zur genaueren Untersuchung wurde in dieser Arbeit die Inkubation über gesättigten Salzlösungen als Methode ausgewählt, da diese sowohl für Flüssigkeiten, als auch Feststoffe

geeignet ist. Um ein möglichst breites Spektrum zu untersuchen, wurden neun Salze mit Wasseraktivitäten zwischen 0,1 und 1 ausgewählt. In Tabelle 18 sind alle verwendeten Salze und die a_w -Werte gesättigter Lösungen dieser Salze bei 25 °C und 50 °C aufgeführt. Die a_w -Werte wurden von Greenspan (1977) übernommen. Der Wert von Kaliumacetat bei 50 °C wurde mit einem Feuchtemessgerät ermittelt.

Tabelle 18 Wasseraktivitäten gesättigter Salzlösungen bei 25 °C und 50 °C, KAc: Kaliumacetat.

Salz	a_w (25 °C)	a_w (50 °C)
LiCl	0,113	0,111
KAc	0,225	0,189
MgCl ₂	0,328	0,305
K ₂ CO ₃	0,432	0,432
Mg(NO ₃) ₂	0,529	0,454
NaBr	0,576	0,509
NaCl	0,753	0,744
KCl	0,843	0,812
K ₂ SO ₄	0,973	0,958

Wie aus Tabelle 18 hervorgeht, unterscheiden sich die Werte der Wasseraktivität der gesättigten Salzlösungen bei verschiedenen Temperaturen. Durch die Temperaturabhängigkeit der Wasseraktivität, musste die Inkubationstemperatur während der Wasseraktivitätseinstellung kontrolliert werden. In der Literatur wird in der Regel 25 °C für die Einstellung und die nachfolgenden Aktivitätstests verwendet (Eckstein *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Svensson *et al.*, 1994; Wehtje & Adlercreutz, 1997). Die optimierte Reaktionstemperatur der DKR von Benzoin beträgt allerdings 50 °C (Nieguth *et al.*, 2014). Daher wurde zunächst die Wasseraktivität in den Reaktionsbestandteilen bei 25 °C und bei 50 °C eingestellt und die Abhängigkeit der Aktivität von der Wasseraktivität bei beiden Temperaturen bestimmt und verglichen. Alle Experimente wurden in den Standardlösungsmitteln der DKR von Benzoin, Toluol und 2-MeTHF, durchgeführt.

Zur Methodenetablierung wurden die Feststoffe (Benzoin und immobilisierte LipTL) und das Lösungsmittel jeweils separat über den Salzlösungen inkubiert, um einen Effekt des Lösungsmittels während der Einstellung in einem abgeschlossenen Gefäß auf die LipTL zu verhindern. Vinylbutyrat wurde als einziger Reaktionsbestandteil von der Wasseraktivitätseinstellung ausgenommen, da eine Hydrolyse der Esterbindung bei den Bedingungen nicht ausgeschlossen werden konnte.

Bei einer Inkubationstemperatur von 50 °C lag die Vermutung nah, dass die Temperatur einen zusätzlichen Einfluss auf die Aktivität der Lipase hat. Daher wurde für diese Inkubationstemperatur zunächst dieser Einfluss untersucht. Hierfür wurde das Enzym bei 50 °C und als Vergleich bei 25 °C über einer gesättigten LiCl-Lösung inkubiert und die restlichen Reaktionsbestandteile bei 50 °C. Als Inkubationszeit wurde an dieser Stelle 72 h festgelegt, da dies die längste Zeit entsprach, die in der Literatur bisher verwendet wurde (Chowdary & Prapulla, 2002). Nach Beendigung der Inkubation wurde die spezifische Aktivität gemessen (Abbildung 30).

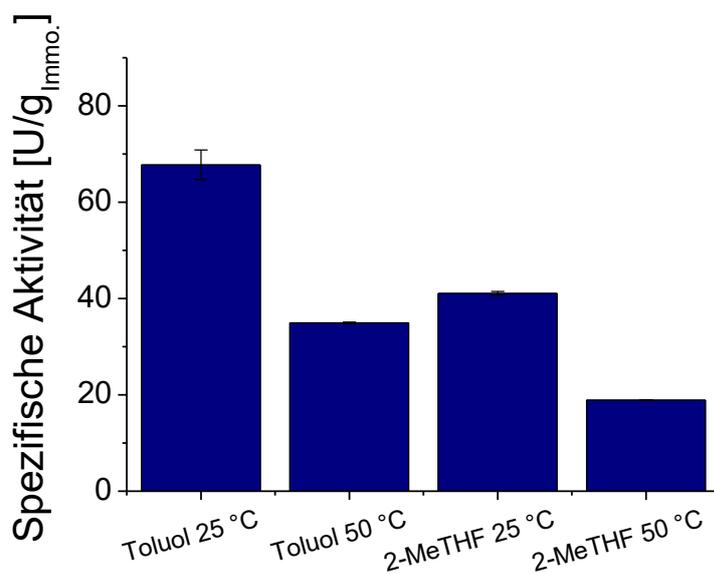


Abbildung 30 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Toluol und 2-MeTHF nach Lagerung des Immobilisates bei 25 °C und 50 °C bei einer Wasseraktivität von 0,113.

In beiden getesteten Lösungsmitteln war eine Abnahme der spezifischen Aktivität der LipTL durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50 °C messbar. In Toluol ergab sich ein Verlust der Aktivität von 51% und in 2-MeTHF von 54%. Hier bestätigte sich die bekannte Thermolabilität der LipTL bei 50 °C (Hoyos *et al.*, 2006). Aufgrund der Ergebnisse wurde 25 °C als Inkubationstemperatur für die LipTL festgelegt.

Neben der Temperatur hat die Inkubationszeit einen entscheidenden Einfluss auf die Einstellung der exakten Wasseraktivität. In der Literatur werden Zeiten von wenigstens 16 h (Ma *et al.*, 2002) über 2 Tage (Jakoblinnert *et al.*, 2011) bis zu 3 Tage (Chowdary & Prapulla, 2002) genannt, jedoch wurde in keiner Literatur überprüft, ob die gewählten Wasseraktivitäten in diesen Zeiten tatsächlich eingestellt werden konnten. Zur exakten Bestimmung der benötigten Zeit wurde in dieser Arbeit ein Feuchtemessgerät verwendet. Dieses kann in der Gasphase die relative Feuchte und damit den a_w -Wert messen. Für die

Untersuchung wurde von allen Reaktionsbestandteilen das Lösungsmittel ausgewählt, da dieses in der Regel das größte Volumen aufweist und daher die Vermutung nahelag, dass die Einstellung der Wasseraktivität hier die meiste Zeit benötigt. Als Lösungsmittel wurde 2-MeTHF, als Inkubationstemperatur 25 °C und ein Volumen von 250 mL festgelegt. Das Volumen entsprach der maximal benötigten Lösungsmittelmenge für die Bestimmung der Halbwertszeit der LipTL in Abhängigkeit der Wasseraktivität (siehe Kapitel 3.2.3). Als gesättigte Salzlösung wurde abermals LiCl verwendet. Während der ersten Durchführung konnte auch nach 120 h nur eine Wasseraktivität von 0,096 anstatt 0,113 erreicht werden. Daher wurde zur Vergrößerung der Oberfläche zwischen der Flüssig- und der Gasphase das Lösungsmittel bei 1000 rpm gerührt und nach gewählten Zeiträumen die Wasseraktivität des Lösungsmittels erneut gemessen.

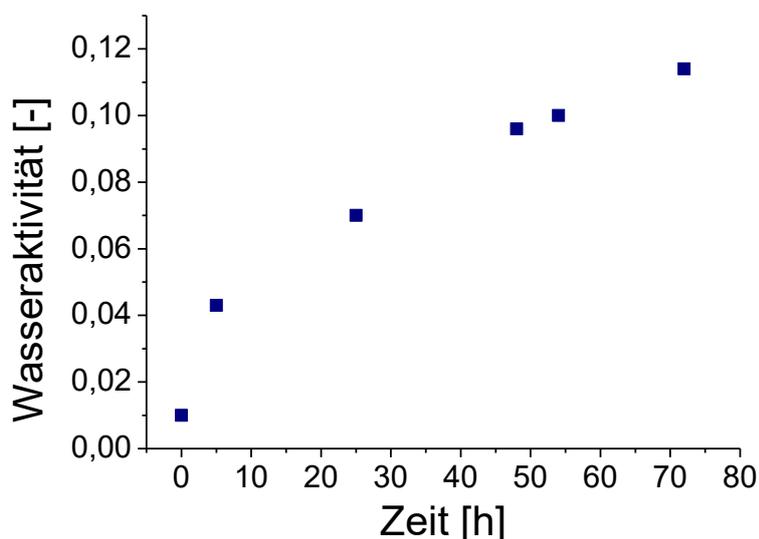


Abbildung 31 Zunahme der Wasseraktivität von getrockneten 2-MeTHF (Ausgangswasseraktivität von 0,02) über die Zeit während der Lagerung über einer gesättigten LiCl-Lösung (Zielwasseraktivität von 0,113) bei 25 °C.

Abbildung 31 zeigt den Verlauf der Wasseraktivität in Abhängigkeit der Inkubationszeit des gerührten Lösungsmittels. Die zu erzielende Wasseraktivität von 0,113 konnte nach 72 h Inkubation erreicht werden. Wie bereits erwähnt, ist davon auszugehen, dass die Einstellung der Wasseraktivität in diesem Volumen aufgrund der geringen Kontaktfläche die meiste Zeit benötigt. Daher wurde vermutet, dass die drei Tage Inkubation für alle weiteren Reaktionsbestandteile oder für geringere Volumina der Lösungsmittel ausreichend sind. Für die weiteren Experimente wurde somit eine Inkubationszeit von 72 h für alle Reaktionsbestandteile sowohl bei 25 °C, als auch bei 50 °C festgelegt.

3.2.2 Einfluss auf die spezifische Aktivität der immobilisierten Lipase TL

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der eingestellten Wasseraktivität wurde alle Reaktionsbestandteile, bis auf die LipTL und Vinylbutyrat, bei 25 °C und 50 °C über den ausgewählten Salzen für drei Tage inkubiert. Wie erwähnt wurde in der LipTL die Wasseraktivität in jedem Fall bei 25 °C eingestellt. Die spezifische Aktivität der KR von Benzoin wurde bei 25 °C und 50 °C als Reaktionstemperatur bestimmt. Für eine Wasseraktivität von annähernd 0 wurden alle Reaktionsbestandteile über Silica-Gel oder Molsieb getrocknet und mit dem Feuchtemessgerät eine Wasseraktivität von $\leq 0,02$ bestimmt. Während des Aktivitätstest wurde eine Benzoinkonzentration von 94 mM als Standard verwendet.

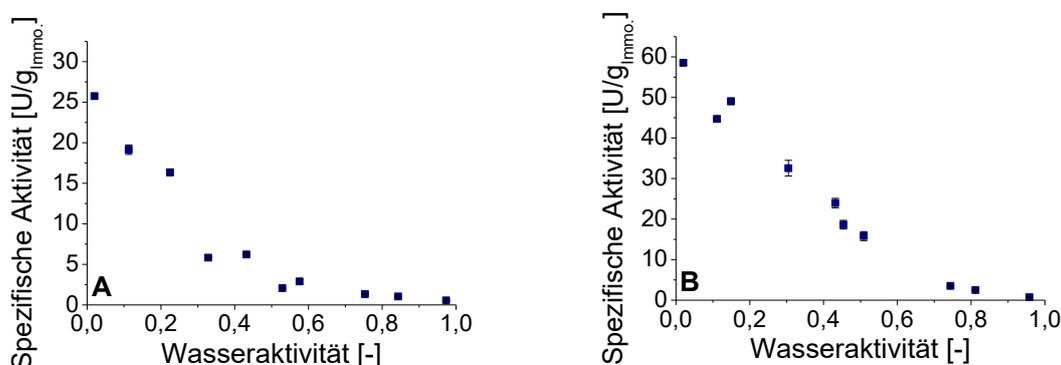


Abbildung 32 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität in 2-MeTHF bei A) 25 °C und B) 50 °C (Petrenz *et al.*, 2015).

In Abbildung 32 sind die spezifischen Aktivitäten in Abhängigkeit der eingestellten Wasseraktivitäten in 2-MeTHF abgebildet. Sowohl bei 25 °C, als auch bei 50 °C war eine Abnahme der spezifischen Aktivität durch die Zunahme der Wasseraktivität zu beobachten. Die höchste spezifische Aktivität wurde unter annähernd trockenen Bedingungen erhalten. Die spezifische Aktivität sank deutlich bis zu einer Wasseraktivität von $>0,74$ bei beiden Temperaturen auf unter 6% Restaktivität. Eine weitere Erhöhung der Wasseraktivität führte zu kaum nachweisbaren Aktivitäten.

In Toluol als Lösungsmittel ergaben sich bei 25 °C und 50 °C die in Abbildung 33 gezeigten spezifischen Aktivitäten bei den eingestellten Wasseraktivitäten. Aufgrund der geringeren Löslichkeit von Benzoin in Toluol musste die Benzoinkonzentration bei 25 °C auf 47 mM reduziert werden.

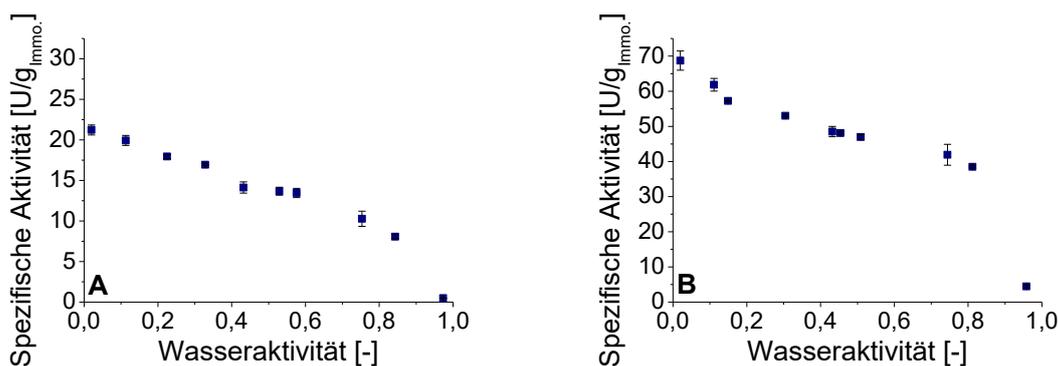


Abbildung 33 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität in Toluol bei A) 25 °C und B) 50 °C (Petrenz *et al.*, 2015).

In Toluol wurde ein ähnlicher Abfall der spezifischen Aktivität bei Zunahme der spezifischen Aktivität bei beiden Temperaturen erhalten. Die höchste Aktivität wurde erneut bei beiden Temperaturen bei einer Wasseraktivität von $\leq 0,02$ erreicht. Bis zu einer Wasseraktivität von $< 0,85$ sank die Aktivität auf 38% bei 25 °C und 56% bei 50 °C Restaktivität. Erst bei einer Wasseraktivität von $> 0,95$ konnten nur noch Restaktivitäten von 2,3% bei 25 °C und 6,5% bei 50 °C gemessen werden. Auffällig ist, dass bei beiden Temperaturen die Erniedrigung der Aktivität in Toluol wesentlich geringer ausfällt als in 2-MeTHF. Dies ist insoweit überraschend, da bei einer gleichen Wasseraktivität die gleiche Menge an frei verfügbarem Wasser im System vorliegen sollte. Daher wird ein weiterer Einfluss der Natur des Lösungsmittels vermutet, da beide Lösungsmittel sich hinsichtlich ihrer Hydrophobizität unterscheiden. Dies konnte nicht abschließend geklärt werden. Weiterhin auffällig ist, dass die jeweils höchsten Aktivitäten stets bei der geringsten Wasseraktivität erreicht wurden. Für viele andere Lipasen und auch andere Enzymklassen ist bekannt, dass es meist ein Maximum der Aktivität bei einer bestimmten Wasseraktivität gibt. Jedoch muss neben dem Enzym auch immer die Art der katalysierten Reaktion beachtet werden. Im Falle der Lipasen muss hier zwischen Veresterungen, Hydrolysen und Umesterungen unterschieden werden. So kann bei Umesterungsreaktionen, wie die hier durchgeführte Reaktion, Wasser als Konkurrenzreaktion zum Alkohol agieren, was zu einer Hydrolyse des Estersubstrates führt (Bovara *et al.*, 1993; Chowdary & Prapulla, 2002). Hier muss demnach die Wasseraktivität gefunden werden, bei der die Aktivität der Lipase hinsichtlich der Umesterungsreaktion maximal ist und die Aktivität hinsichtlich der Hydrolyse minimal ist. Je nach Lipase kann die optimale Wasseraktivität bei ganz unterschiedlichen Werten liegen. Ma *et al.* (2002) untersuchten die immobilisierten Lipasen aus *Rhizopus oryzae* und *Candida rugosa* in der Umesterung von Hexanol und

Ethyldecanoat. Sie konnten dabei zeigen, dass die *Candida*-Lipase die höchste Umesterungsaktivität bei einer Wasseraktivität von 0,33 zeigte, während die *Rhizopus*-Lipase die höchste Aktivität bei der geringsten getesteten Wasseraktivität von 0,06 aufwies. Für beide Lipasen wurde zudem eine Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit der Hydrolyse des Ethyldecanoates durch Erhöhung der Wasseraktivität beobachtet, wobei sich ein Maximum der Hydrolyse bei der *Rhizopus*-Lipase bei einer Wasseraktivität von 0,33 zeigte. In einer weiteren Studie wurden für die Umesterung von Ethylbutyrat und Butanol mit fünf verschiedenen Lipasen sehr unterschiedliche Abhängigkeit der Aktivität von der Wasseraktivität festgestellt, wobei hier keine Lipase die höchste Aktivität bei sehr geringen Wasseraktivitäten aufwies. Es konnte ebenfalls die Hydrolyse des Estersubstrates Ethylbutyrat zur Buttersäure nachgewiesen werden (Chowdary & Prapulla, 2002). Für die LipTL scheint der Einfluss der Hydrolyse schon bei einer Wasseraktivität von 0,11 einen entschiedenen Einfluss auf die Gesamtaktivität zu haben. Leider war es mit der vorhandenen Analytik nicht möglich nachzuweisen, dass durch die Erhöhung der Wasseraktivität die Hydrolyse des Vinylbutyrates zur Buttersäure erhöht wurde. Nini *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Vinylbutyrat durch verschiedene Lipasen hydrolysiert werden kann. Daher wurde stattdessen getestet, ob die LipTL auch eine Veresterungsreaktion von Benzoin mit dem Hydrolyseprodukt Buttersäure katalysieren kann. Es wurde der Aktivitätstest nach der Standardmethode durchgeführt und Vinylbutyrat durch Buttersäure als zweites Substrat ausgetauscht. Hierbei konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Parallel dazu wurde die Fähigkeit der LipTL zur Hydrolyse des Umesterungsprodukts (*S*)-Benzoinbutyrat untersucht. Hierfür wurde das Produkt mit und ohne LipTL in 2-MeTHF bei einer Wasseraktivität von 0,97 inkubiert und die Entstehung von Benzoin überprüft. Es konnten 0,6% des (*S*)-Benzoinbutyrats mit LipTL und 0,3% ohne Enzym innerhalb des Zeitraums des Standardaktivitätstests hydrolysiert werden. Daher wird die Hydrolyse des Vinylbutyrates als Hauptgrund der Aktivitätsabnahme bei Erhöhung der Wasseraktivität angesehen.

Auf Grundlage der ähnlichen Wasseraktivitätswerte bei 25 °C und 50 °C und der annähernd gleichen Abnahme der Lipasenaktivität bei Zunahme der Wasseraktivität bei beiden Temperaturen in den untersuchten Lösungsmitteln, wurde bei allen weiteren Experimenten die Wasseraktivität in allen Reaktionsbestandteilen bei 25 °C eingestellt und die Versuche bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C durchgeführt.

3.2.3 Einfluss auf die Prozessstabilität der immobilisierten Lipase TL

Neben der spezifischen Aktivität, ist ein Einfluss der Wasseraktivität auf die Stabilität von Enzymen möglich. So konnte schon gezeigt werden, dass die Stabilitäten von Enzymen durch Erniedrigung der Wasseraktivität verbessert werden konnten (Hahn-Hägerdal, 1986; Pirozzi & Greco, 2004; Zaks & Klibanov, 1984). Hierbei wurde in der Regel die Thermostabilität in Form der Lagerstabilität in einem oder mehreren Lösungsmitteln untersucht. Für die immobilisierte LipTL sollte im Gegensatz dazu die Prozessstabilität bestimmt werden. Der Einfluss der Wasseraktivität auf diese Stabilität wurde in 2-MeTHF und Toluol untersucht. Es wurden hierfür a_w -Werte ausgewählt, bei der mindestens eine Restaktivität von 70% gemessen wurde. Für 2-MeTHF wurden daher die a_w -Werte zwischen $\leq 0,02$ und $0,225$ und für Toluol von $\leq 0,02$ und $0,328$ festgelegt. Die Prozessstabilität in Abhängigkeit der Wasseraktivität wurde in dem etablierten CSTR-System über die Bestimmung der Halbwertzeiten untersucht (Abbildung 34).

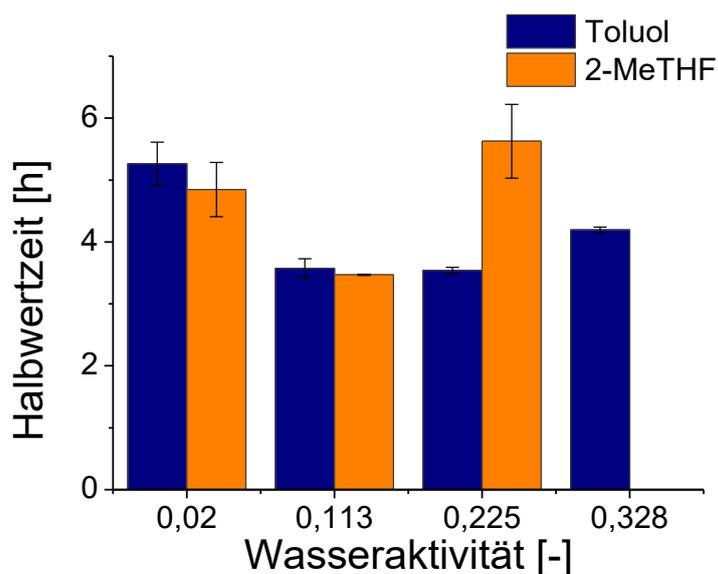


Abbildung 34 Einfluss der Wasseraktivität auf die Prozessstabilität der immobilisierten LipTL in 2-MeTHF und Toluol (Petrenz *et al.*, 2015).

In 2-MeTHF war zunächst eine Verringerung der Halbwertzeit von 4,8 h auf 3,5 h durch eine Erhöhung der Wasseraktivität zu beobachten. Bei einem a_w -Wert von $0,225$ stieg die Halbwertzeit wiederum um 16% auf einen Wert von 5,6 h. In Toluol ergab sich eine anfängliche Abnahme der Halbwertzeit von 5,3 h auf 3,5 h, welche bei einem a_w -Wert von $0,328$ wiederum auf 4,2 h steigt. Die in der Literatur beschriebene Abnahme der Stabilität durch Erhöhung der Wasseraktivität konnte im Falle der Prozessstabilität nur bedingt

bestätigt werden. Als Gründe für diesen Zusammenhang werden unterschiedliche Mengen von an das Enzym gebundenes Wasser (Hahn-Hägerdal, 1986) und ein Einfluss der Wasseraktivität auf die Desaktivierungskinetik (Pirozzi & Greco, 2004) angesehen. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, warum in 2-MeTHF die Halbwertszeit bei $a_w=0,328$ erneut anstieg. Jedoch sollte hier beachten werden, dass der Anstieg von 16% der Stabilität bei dieser Wasseraktivität mit einem deutlichen Verlust der Aktivität einhergeht (Abbildung 32). Konsistent zu den Ergebnissen der Abhängigkeit der Aktivität von der Wasseraktivität wurde daher für die zwei getesteten Lösungsmittel auch hinsichtlich der Stabilität eine Wasseraktivität $<0,02$ für das Reaktionssystem als am Geeigneten bewerten.

3.2.4 Einfluss auf den Racemisierungskatalysator Zr-TUD-1

Neben der Aktivität der Lipase bei unterschiedlichen Wasseraktivitäten wurde der Racemisierungskatalysator Zr-TUD-1 untersucht. Um einen Einfluss von Sauerstoff und Wasser auf den Katalysator bzw. die zu katalysierende Reaktion zu vermeiden, wird der Zr-TUD-1 in der Regel unter wasserfreien Bedingungen und einer Schutzgasatmosphäre verwendet (Nieguth *et al.*, 2014; Ramanathan *et al.*, 2008). Daher lag die Vermutung nahe, dass die Wasseraktivität einen Einfluss auf die Racemisierung des (*R*)-Benzoins während der DKR haben könnte. Zur genauen Untersuchung wurde die Racemisierung in Abhängigkeit der Wasseraktivität unabhängig von der lipasenkatalysierten Reaktion durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden erneut 2-MeTHF und Toluol ausgewählt und die gleichen a_w -Werte der Halbwertszeituntersuchung in den Reaktionsbestandteilen eingestellt.

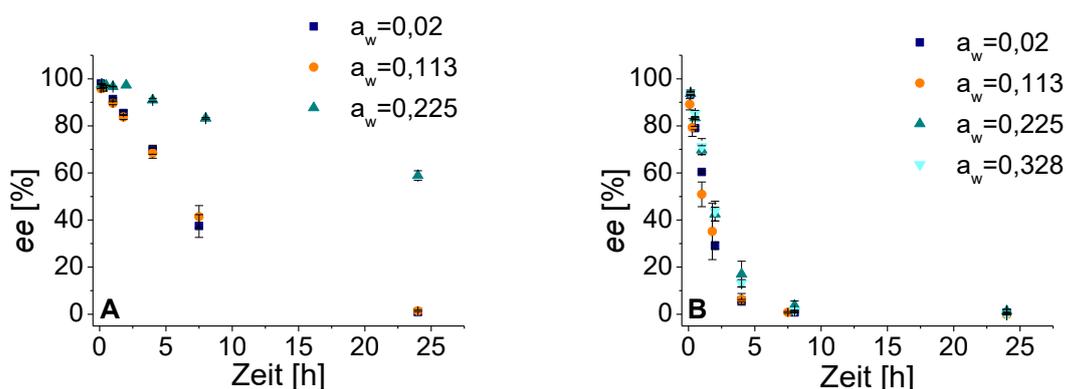


Abbildung 35 Abnahme des *ee* von (*R*)-Benzoin in Abhängigkeit der Wasseraktivität in A) 2-Me-THF und B) Toluol (Petrenz *et al.*, 2015).

Abbildung 35 zeigt die Abnahme des *ee* von (*R*)-Benzoin über die Zeit in 2-MeTHF und Toluol. Diese Abnahme entspricht dabei direkt der Aktivität des Zr-TUD-1. In 2-MeTHF

konnte kein Unterschied in der Aktivität zwischen den a_w -Werten $\leq 0,02$ und $0,113$ verzeichnet werden. Erst ab einer Wasseraktivität von $0,225$ war eine deutliche Abnahme der Aktivität messbar. In Toluol wurde durch die Erhöhung der Wasseraktivität keine signifikante Änderung der Zr-TUD-1-Aktivität beobachtet. Falls benötigt kann somit die DKR in 2-MeTHF bis zu einer Wasseraktivität von $0,113$ und in Toluol bis zu einem Wert von $0,328$ durchgeführt werden. Eine genaue Interpretation der Ergebnisse ist an dieser Stelle schwierig, da bisher in der Literatur keine weiteren Versuche durchgeführt wurden zum Einfluss von Wasser auf den Zr-TUD-1. Es ist daher möglich, dass sowohl der Katalysator an sich, als auch die Reaktion von der Wasseraktivität beeinflusst wird. Wie bereits erwähnt, wird der Zr-TUD-1 in der Regel unter wasserfreien Bedingungen eingesetzt, wobei adsorbiertes Wasser entweder durch Calcinierung bei 600 °C (Ramanathan *et al.*, 2006) oder Inkubation bei 100 °C für mindestens 8 h (Nieguth, 2013) entfernt wird. Daher kann vermutet werden, dass das im Reaktionssystem vorhandene Wasser erneut auf der Oberfläche adsorbierte. Je höher die eingestellte Wasseraktivität, desto höher ist somit die Menge an adsorbierten Wasser, wodurch möglicherweise die aktiven Zr-Zentren für eine Reaktion nicht mehr zu Verfügung stehen.

3.2.5 Einfluss der Substratkonzentration auf das Wasseraktivitätsprofil

Neben den bisher gezeigten Parametern kann die Substratkonzentration einen Einfluss auf die optimale Wasseraktivität haben. In der Literatur sind einige Beispiele zu finden, bei denen durch Erhöhung der Substratkonzentration das Optimum der Aktivität verschiedener Lipasen zu höheren Wasseraktivitäten in Umesterungen (Chowdary & Prapulla, 2002), Veresterungen und Hydrolysen (Wehtje & Adlercreutz, 1997) verschoben werden konnte. Für die Untersuchung des Einflusses wurde die Benzoinkonzentration von 20 mg/mL (94 mM) auf 50 mg/mL und 100 mg/mL erhöht und die spezifische Aktivität in Abhängigkeit der Wasseraktivität erneut bestimmt (Abbildung 36). Die Konzentration an Vinylbutyrat wurde entsprechend angepasst. Als Lösungsmittel wurde aufgrund der Benzoinlöslichkeit bei 50 °C nur 2-MeTHF untersucht.

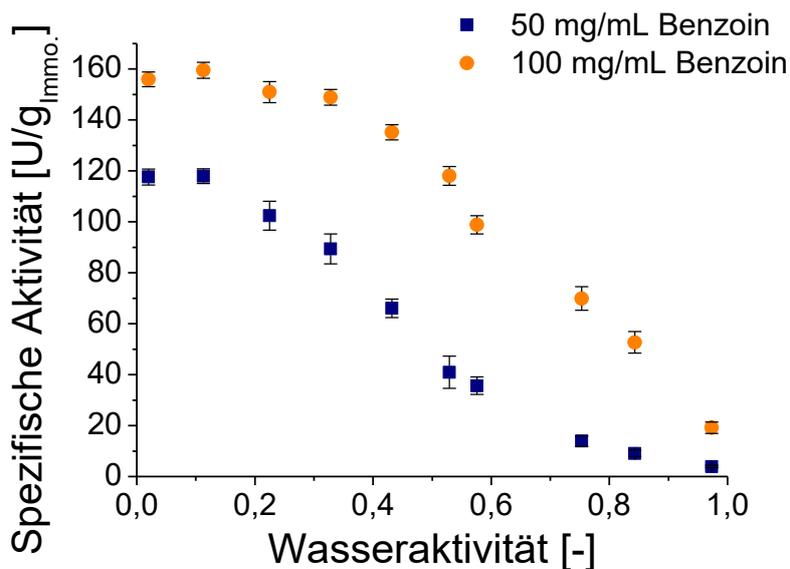


Abbildung 36 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der eingestellten Wasseraktivität bei einer Benzoinkonzentration von 50 mg/mL und 100 mg/mL.

Auch für die hier untersuchte Reaktion war eine Verschiebung der optimalen Wasseraktivität zu höheren Werten messbar (Abbildung 36). Es konnte die höchste spezifische Aktivität in beiden Fällen bei einer Wasseraktivität von 0,113 bestimmt werden. Der prozentuale Gewinn der Aktivität zwischen den Wasseraktivitäten $a_w \leq 0,02$ und $a_w = 0,113$ war höher, je höher die eingestellte Benzoinkonzentration war. Bei 50 mg/mL ergab sich eine Verbesserung der Aktivität um 0,3% und bei 100 mg/mL um 2,2% zwischen den zwei benannten Wasseraktivitäten. Dieses Ergebnis ermöglicht damit einen Blick auf den bereits diskutierten Zusammenhang zwischen der optimalen Wasseraktivität eines Enzyms und der optimalen Wasseraktivität einer bestimmten Reaktionsart. Wie bereits erwähnt, benötigen Enzyme auf der einen Seite einen gewissen Wassergehalt für ihre Hydratation und somit für ihre Aktivität. Die hier durchgeführte Reaktion wird wiederum auf der anderen Seite negativ durch anwesendes Wasser als Konkurrenzreaktion beeinflusst. Durch die Erhöhung der Benzoinkonzentration wurde die Vinylbutyratkonzentration gesteigert, während die Wasseraktivität und damit die Menge an verfügbarem Wasser konstant gehalten wurden. Daher konnte nur ein geringerer Anteil des Vinylbutyrats hydrolysiert werden. Durch die Verminderung des Einflusses des Wassers auf die Umesterung, ist daher eine Verschiebung zu einer vom Enzym bevorzugten Wasseraktivität denkbar.

3.2.6 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL von der Wasseraktivität wurde in Toluol und 2-MeTHF untersucht. Zur Einstellung der Wasseraktivität in den Reaktionsbestandteilen wurde die Inkubation über gesättigten Salzlösungen ausgewählt. Nach Etablierung dieser Methode, konnte eine Abnahme der spezifischen Aktivität durch Erhöhung der Wasseraktivität bestimmt werden. Die höchste spezifische Aktivität wurde dabei unter nahezu trockenen Bedingungen erreicht ($a_w \leq 0,02$). Als Hauptgrund wurde die Hydrolyse des Vinylbutyrates vermutet, da die LipTL mit Buttersäure keine Veresterung katalysieren konnte. Für die Abhängigkeit der Prozessstabilität der immobilisierten LipTL von der Wasseraktivität wurde zunächst eine Abnahme der Halbwertszeit beobachtet. Insbesondere in 2-MeTHF konnte bei einer Wasseraktivität von 0,223 erneut eine Zunahme der Halbwertszeit bestimmt werden. Die Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit und damit der Aktivität des Zr-TUD-1 von der Wasseraktivität wurde ebenfalls in Toluol und 2-MeTHF untersucht. In Toluol konnte keine Änderung der Aktivität beobachtet werden. In 2-MeTHF wurde im Gegensatz dazu ab einer Wasseraktivität von 0,223 eine deutliche Abnahme der Racemisierung bestimmt. Schlussendlich wurde die Abhängigkeit der optimalen Wasseraktivität für die spezifische Aktivität von der Substratkonzentration untersucht. Dabei konnte eine Verschiebung der optimalen Wasseraktivität von $a_w \leq 0,02$ zu $a_w = 0,113$ bestimmt werden. Je höher die Substratkonzentration dabei gewählt wurde, desto größer war der prozentuale Gewinn der Aktivität zwischen den benannten Wasseraktivitäten.

Für die weiteren Untersuchungen wurde eine Wasseraktivität von $a_w \leq 0,02$ ausgewählt, da bei der Standardsubstratkonzentration des Benzoin von 94 mM bzw. 20 mg/mL in Toluol und 2-MeTHF die höchste spezifische Aktivität der LipTL bei dieser Wasseraktivität bestimmt wurde. Trotz der Erhöhung der Halbwertszeit in 2-MeTHF bei einer Wasseraktivität von 0,223 wurde für beide Katalysatoren, insbesondere für den Zr-TUD-1, eine deutliche Abnahme der Aktivität verzeichnet. Daher wurde dieser Wasseraktivitätswert für eine spätere DKR als nicht geeignet bewertet. Bei der Durchführung der DKR bei höheren Substratkonzentrationen, könnte die Einstellung der Wasseraktivität auf $a_w = 0,113$ wiederum erneut interessant sein. Jedoch sollte beachtet werden, dass der relativ geringe Aktivitätsgewinn von 0,3–2,2% eine wesentlich erhöhte Vorbereitungszeit durch die Einstellung der Wasseraktivität über drei Tage benötigt und daher dies unter Umständen für einen industriellen Prozess nicht praktikabel wäre.

3.3 Optimierung des Reaktionsmediums

3.3.1 Auswahl der Lösungsmittel

Bei der Auswahl neuer Lösungsmittel für die DKR von Benzoin lag der Fokus auf Lösungsmitteln, die als umweltfreundlich gelten. Die Standardlösungsmittel der KR und der DKR von Benzoin sind das petroleum-basierende Toluol und das aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellte 2-MeTHF. Toluol ist auf der einen Seite aufgrund seiner Toxizität und der Darstellung als weniger umweltfreundlich im Vergleich zum 2-MeTHF zu bewerten. Auf der anderen Seite ist die Aktivität des Zr-TUD-1 in dem Lösungsmittel am höchsten (Nieguth *et al.*, 2014). Daher sollte insbesondere das Toluol durch eine umweltfreundlichere Alternative, bei vergleichbaren oder verbesserten Leistungen der immobilisierten LipTL und des Zr-TUD-1, ersetzt werden. Zum Bewerten der Umweltfreundlichkeit von Chemikalien existieren die 12 Prinzipien der Grünen Chemie (Sheldon, 2012). Diese Prinzipien sind unter anderem eine Abfallminderung und eine hohe Atomökonomie in der Synthese, die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen, sowie eine biologische Abbaubarkeit. Je nachdem wie viele Prinzipien eine Chemikalie bzw. die Synthese der Chemikalie erfüllen kann, desto „grüner“ bzw. umweltfreundlicher wird sie gegenüber anderer Alternativen eingeschätzt.

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Lösungsmittelklassen auf ihre Eignung als alternatives Reaktionsmedium für die KR bzw. DKR von Benzoin untersucht. Zum einen wurden weitere umweltfreundliche organische Lösungsmittel, sowie ionische Flüssigkeiten (ILs) und stark eutektische Lösungsmittel (DESSs) ausgewählt. Insbesondere für die ILs und DESSs konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass sie für viele Enzyme und deren katalysierte Reaktionen geeignet sind und somit umweltfreundlichere Alternativen zu konventionellen organischen Lösungsmitteln sind (Durand *et al.*, 2013; Kragl *et al.*, 2002; Sheldon *et al.*, 2002).

3.3.2 Organische Lösungsmittel

Bei der Suche nach alternativen organischen Lösungsmitteln lag der Fokus auf den Eigenschaften der Lösungsmittel. Auf Grundlage dessen wurden Cyclopentylmethylether (CPME) und 1,3-Dioxolan ausgewählt. CPME zeichnet sich unter anderem durch einen hohen Siedepunkt (106 °C), eine geringe Peroxidbildung und eine relativ hohe Stabilität gegenüber sauren und basischen Bedingungen aus. Durch den erhöhten Siedepunkt können Reaktionen bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, was zu verringerten

Reaktionszeiten führen kann. CPME eignet sich daher als Alternative für andere Ether wie Diethylether, Tetrahydrofuran, Methyltertbutylether und Dioxan (Watanabe *et al.*, 2007). 1,3-Dioxolan ist weder toxisch, noch krebserregend, wodurch sich eine erhöhte Sicherheit ergibt. Es ist zudem geruchslos, einfach aus dem System zu entfernen und gilt als umweltfreundlich (Moscoso *et al.*, 2014).

Für den Vergleich der spezifischen Aktivität der LipTL wurde zunächst die Benzoinlöslichkeit in den ausgewählten Lösungsmitteln sowie in Toluol und 2-MeTHF getestet. Für die Messung der spezifischen Aktivität und die DKR wurde die Löslichkeit bei 50 °C getestet, für die Messung der Prozessstabilität bei 25 °C. Als Zielkonzentration wurde 94 mM bzw. 20 mg/mL Benzoin bei beiden Temperaturen getestet.

Tabelle 19 Benzoinlöslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmitteln bei 25 °C und 50 °C.

Lösungsmittel	Benzoinlöslichkeit bei 25 °C	Benzoinlöslichkeit bei 50°C
2-MeTHF	20	20
Toluol	10	20
1,3-Dioxolan	20	20
CPME	10	20

Tabelle 19 fasst die Löslichkeit zusammen. In 2-MeTHF und 1,3-Dioxolan konnten 20 mg/mL Benzoin bereits bei 25 °C gelöst werden. Eine vergleichbare Löslichkeit konnte in Toluol und CPME nur durch die Erhöhung der Temperatur auf 50 °C erreicht werden. Für eine Vergleichbarkeit und Bewertung der Lösungsmittel wurde 20 mg/mL für die Analyse der spezifischen Aktivität und der DKR von Benzoin festgelegt und 10 mg/mL für die Bestimmung der Prozessstabilität um ein Auskristallisieren des Benzoins in den Schläuchen und der Pumpe zu verhindern, da diese nicht temperiert werden konnten. Aufgrund der Ergebnisse lag die Folgerung nahe, dass Benzoin im Allgemeinen in polaren Lösungsmitteln besser löslich ist, als in unpolaren. Eine ähnliche Tendenz wurde ebenfalls von Nieguth (2013) beobachtet, jedoch konnte kein genauer Zusammenhang zwischen den Lösungsmittelklassen, deren Polaritäten und der Löslichkeit bei 25 °C gefunden werden.

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit vom Lösungsmittel ist in Abbildung 37 dargestellt. Alle Lösungsmittel wurden in getrockneter Form ($a_w \leq 0,02$) eingesetzt, um einen Einfluss der Wasseraktivität zu vermeiden (siehe 3.2.2).

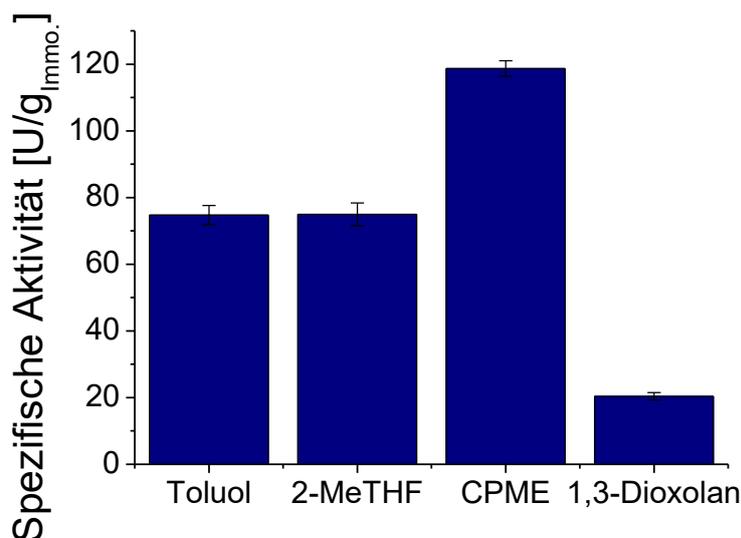


Abbildung 37 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Petrenz *et al.*, 2015).

In 2-MeTHF und Toluol wurde unter gleichen Bedingungen eine sehr ähnliche Aktivität von rund 75 U/g_{Immo.} bestimmt. In CPME wiederum konnte im Vergleich dazu eine Erhöhung der Aktivität auf das 1,6-Fache von 118,7 U/g_{Immo.} gemessen werden. In 1,3-Dioxolan ergab sich die geringste Aktivität der immobilisierten LipTL von 20,4 U/g_{Immo.} und damit eine 6-fach geringere Aktivität als in CPME. Nieguth (2013) konnte bereits einen Zusammenhang der Aktivität innerhalb einer Lösungsmittelklasse feststellen. Je höher der log P der getesteten Lösungsmittel lag, desto höhere spezifische Aktivitäten konnten gemessen werden. Dieser Zusammenhang ist auch hier zu beobachten. 1,3-Dioxolan, 2-MeTHF und CPME gehören zur Gruppe der Ether und haben log P-Werte von 1,3-Dioxolan: -0,37 (Hansch *et al.*, 1995), 2-MeTHF: 0,72 (Fagnelli *et al.*, 2012) und CPME: 1,59 (Oshima *et al.*, 2015). Der Grund könnte eine geringere Solvatisierung des Edukts durch eine geringe Polarität des Lösungsmittels sein. Durch die geringere Solvatisierung ist die Substratverfügbarkeit für das Enzym verbessert (Nieguth, 2013). Für Toluol kann diese Theorie ebenfalls angewandt werden. Im Allgemeinen scheinen aber Ether zu den höchsten Enzymaktivitäten in der KR von Benzoin zu führen. Die Eignung von CPME für enzymatische Reaktionen wurde bisher noch für sehr wenige Enzyme untersucht. Mine *et al.* konnten beispielsweise zeigen, dass durch die Verwendung von CPME als Lösungsmittel die Aktivität und die Enantioselektivität der Lipase aus *Pseudomonas cepacia* in der Umesterung von Solketal verbessert werden konnte (Mine *et al.*, 2005).

Neben der Aktivität ist die Stabilität der LipTL in Abhängigkeit des Lösungsmittels ein wichtiger Faktor zur Bewertung der Lösungsmittel. 1,3-Dioxolan wurde auf Grund der niedrigen Enzymaktivität in dem Lösungsmittel von der Untersuchung ausgeschlossen. Die Stabilität wurde erneut über die Messung der Prozessstabilität bzw. der Halbwertszeit bestimmt. Wie erwähnt, wurde hier für alle Lösungsmittel eine Benzoinkonzentration von 10 mg/mL gewählt, da die Konzentration einen Effekt auf die Halbwertszeit im gleichen Lösungsmittel haben kann (Nieguth, 2013). Es wurden erneut getrocknete Lösungsmittel eingesetzt. In Abbildung 38 sind die bestimmten Halbwertszeiten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel zusammengefasst.

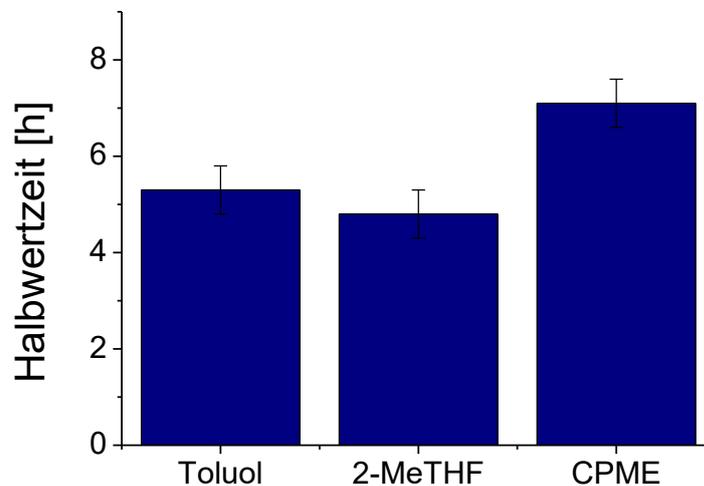


Abbildung 38 Halbwertszeit der immobilisierten LipTL im CSTR in Abhängigkeit des Lösungsmittels (Petrenz *et al.*, 2015).

Ähnlich zur Enzymaktivität konnte die Prozessstabilität durch Verwendung von CPME mit einer Halbwertszeit von 7,1 h um 50% im Vergleich zu 2-MeTHF und um 30% im Vergleich zu Toluol erhöht werden. Im Vergleich der Lösungsmittel konnte kein zufriedenstellender Zusammenhang zwischen der Natur des Lösungsmittels und dessen Halbwertszeit gefunden werden. Es ist bekannt, dass hydrophile Lösungsmittel das für die Hydratation des Enzyms benötigte Wasser von der Enzymoberfläche entfernen können (Doukyu & Ogino, 2010). Dies könnte die geringste Halbwertszeit in 2-MeTHF erklären. Zwischen den Halbwertszeiten in Toluol und CPME kann dies nicht bestätigt werden. Möglicherweise liegen für Ether aktivierende als auch stabilisierende Effekte auf die immobilisierte LipTL vor. Die Wasseraktivität kann in dem Fall als weiterer Faktor ausgeschlossen werden, da die

Wasseraktivität aller Reaktionsbestandteile vor der Durchführung kontrolliert und eingestellt wurde ($a_w < 0,02$).

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der Enzymaktivität und -stabilität in CPME wurde im letzten Schritt die Performance des Racemisierungskatalysators Zr-TUD-1 in den getrockneten Lösungsmitteln getestet. Die Eignung von Toluol und 2-MeTHF für die in-situ Racemisierung wurde bereits gezeigt (Nieguth *et al.*, 2014). 1,3-Dioxolan wurde trotz der geringen Enzymaktivität als Vergleich untersucht. Die Racemisierung wurde erneut durch die Abnahme des *ee*'s von (*R*)-Benzoin untersucht.

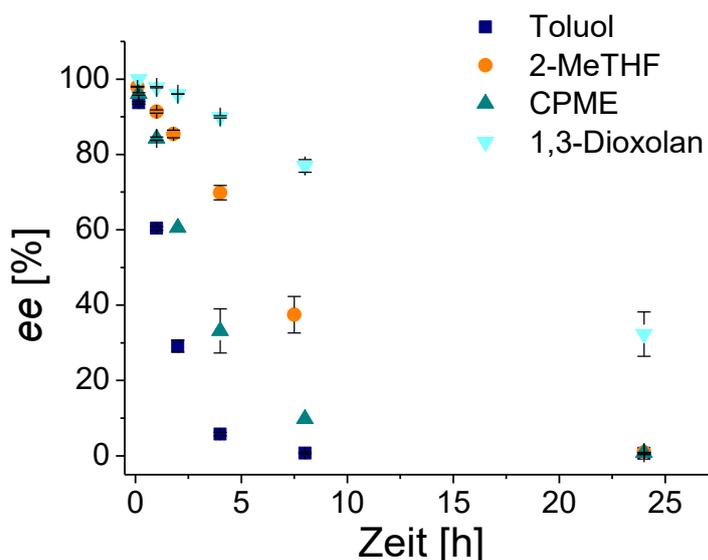


Abbildung 39 Abnahme des *ee* von (*R*)-Benzoin über die Zeit in unterschiedlichen Lösungsmitteln mit Zr-TUD-1 als Katalysator (Petrenz *et al.*, 2015).

Die höchste Zr-TUD-1-Aktivität wurde in Toluol beobachtet, gefolgt von CPME und 2-MeTHF (Abbildung 39). In Toluol und CPME konnte eine vollständige Racemisierung nach rund 12 h erreicht werden, in 2-MeTHF nach 24 h. Das Ergebnis für Toluol und 2-MeTHF ist konsistent mit der Literatur (Nieguth *et al.*, 2014). In 1,3-Dioxolan wurde die geringste Aktivität bestimmt. Innerhalb von 24 h konnte keine vollständige Racemisierung des (*R*)-Benzoins gemessen werden. Für die Untersuchung der DKR wurde dieses Lösungsmittel für weitere Untersuchungen ausgeschlossen. Aufgrund der überzeugenden Ergebnisse der Aktivität der Katalysatoren in CPME wurde dieses Lösungsmittel als geeignete Alternative, insbesondere für Toluol, für die KR und DKR von Benzoin und weiteren α -Hydroxyketone ausgewählt (Siehe 3.4 und 3.5).

3.3.3 Ionische Flüssigkeiten

Neben den organischen Lösungsmitteln wurden ILs auf ihre Eignung als Reaktionsmedium für die KR von Benzoin getestet. Durch die unzähligen Kombinationsmöglichkeiten verschiedener Kationen und Anionen existiert eine Vielzahl von kommerziell erhältlichen ILs und einige davon wurden für diese Arbeit auf diesem Weg bezogen. Als Kationen wurden zwei Imidazolium-Derivate ausgewählt (Tabelle 20). Die Kationen unterschieden sich dabei durch die Kettenlänge der Alkylseitenkette. Es wurden 1-Butyl-3-methylimidazolium [BMIM] und 1-Methyl-3-octylimidazolium [OMIM] gewählt. Jedes Kation wurde mit zwei verschiedenen Anionen kombiniert, zum einen mit Tetrafluoroborat [BF₄] und zum anderen mit Hexafluorophosphat [PF₆].

Tabelle 20 Zusammensetzung der ausgewählten ILs und ihre Löslichkeit von 94 mM Benzoin bei 50 °C.

Bezeichnung	Kation	Anion	Benzoinlöslichkeit
[BMIM][BF ₄]	1-Butyl-3-methylimidazolium	BF ₄ ⁻	+
[BMIM][PF ₆]		PF ₆ ⁻	+
[OMIM][BF ₄]	1-Methyl-3-octylimidazolium	BF ₄ ⁻	+
[OMIM][PF ₆]		PF ₆ ⁻	+

In den gewählten ILs wurde erneut die Benzoinlöslichkeit überprüft. Es wurde die Standardkonzentration von 20 mg/mL (94 mM) gewählt und der Löslichkeitstest bei 50 °C durchgeführt (Tabelle 20). In allen ILs konnte die Zielkonzentration erreicht werden. Im Gegensatz zu den organischen Lösungsmitteln, in denen die vollständige Auflösung nach maximal 10 min erreicht werden konnte, war für die ILs mit [BMIM] eine Inkubationszeit von 30 min notwendig. Für die ILs aus [OMIM] musste die Inkubationszeit auf 40 min erhöht werden. Das Kation der ILs scheint den entscheidenden Einfluss auf die Löslichkeit zu haben. Durch die kurze Alkylkette von [BMIM] sind ILs mit diesem Kation etwas polarer als ILs mit [OMIM] als Kation. Dass sich Benzoin schneller und in größeren Mengen in polaren Lösungsmitteln löst, konnte auch für 2-MeTHF, Toluol und CPME beobachtet werden (siehe 3.3.2). Aufgrund der Möglichkeit zur Lösung der Zielkonzentration von 94 mM Benzoin wurde in allen ILs die spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL untersucht (Abbildung 40).

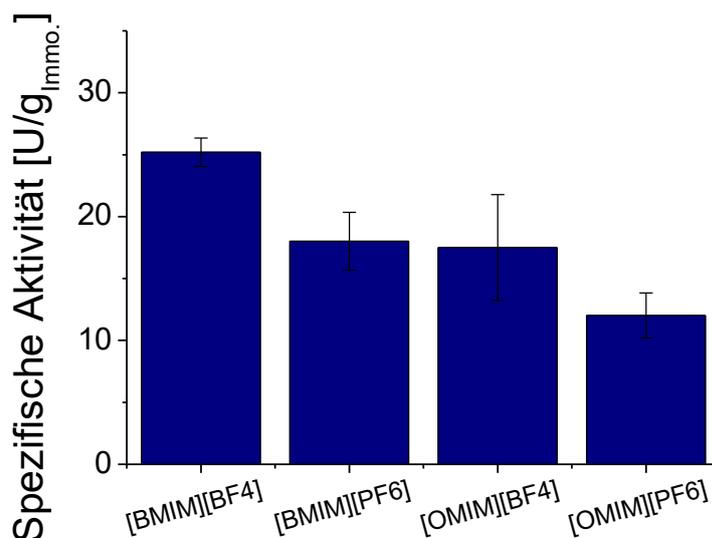


Abbildung 40 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in verschiedenen ILs.

Die höchste spezifische Aktivität in den ILs konnte in [BMIM][BF4] mit 25,2 U/g erreicht werden. Die geringste Aktivität wurde in der IL [OMIM][PF6] bestimmt. Im Vergleich der ILs untereinander waren damit sowohl eine Kationen-, als auch eine Anionenabhängigkeit der spezifischen Aktivität erkennbar. Unabhängig vom Anion konnte die Aktivität durch Verwendung von [BMIM] als Kationen gegenüber [OMIM] gesteigert werden. Bei den Anionen ergab sich in ILs mit [BF4] anstatt [PF6] unabhängig vom Kation eine verbesserte Aktivität. Zur Erklärung des Einflusses der ILs auf die Aktivität eines Enzyms können unterschiedlichen Parameter herangezogen werden. Diese sind unter anderem die Hydrophobizität bzw. der log P Wert, die Polarität und die Viskosität (Yang & Pan, 2005). Die zugehörigen Werte der hier verwendeten ILs sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21 Log P (Cho *et al.*, 2011), normierte Polarität E_T^N (Reichardt, 2005) und Viskosität (D. Han & Row, 2010; Huddleston *et al.*, 2001) der ILs bei 25 °C.

IL	log P	E_T^N	Viskosität [cP]
[BMIM][BF4]	-2,40	0,673	233
[BMIM][PF6]	-1,72	0,667	400
[OMIM][BF4]	-0,68	0,670	440
[OMIM][PF6]	-0,35	0,633	682

Bei Betrachtung der log P Werte fällt auf, dass die ILs wesentlich hydrophiler sind, als die bisher untersuchten organischen Lösungsmittel (siehe 3.3.2). In den hydrophoben organischen Lösungsmitteln konnten wesentlich höhere Aktivitäten erreicht werden.

Innerhalb der ILs kann dieser Trend nicht beobachtet werden, da in der IL [OMIM][PF6] nicht die höchste Aktivität gemessen wurde. Aus dem Grund scheint der log P Wert nicht der entscheidende Parameter zu sein, um die Aktivität in Abhängigkeit der verwendeten IL zu erklären. Hinsichtlich der Polarität der ILs ist ein Trend zu höheren Aktivitäten bei höheren Polaritäten erkennbar. Dies konnte bereits in einigen anderen Studien gezeigt werden (Lozano, de Diego, Carrié, *et al.*, 2001; Lozano, de Diego, Guegan, *et al.*, 2001; Park & Kazlauskas, 2001). Park und Kazlauskas (2001) konnte zudem zeigen, dass der Trend für organische Lösungsmittel gegensätzlich war. Yang und Pan (2005) schlossen daraus, dass möglicherweise stattdessen die Viskosität der entscheidende Parameter für den Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und der ILs ist. So hat die in der Arbeit verwendete polarste IL [BMIM][BF₄] die geringste Viskosität (Tabelle 21) und in ihr wurde die höchste spezifische Aktivität der LipTL gemessen. Mit steigender Viskosität sank wiederum die spezifische Aktivität (Abbildung 40). Ein Grund für diesen Trend kann in Massentransferlimitierung gefunden werden (Yang & Pan, 2005). Organische Lösungsmittel haben dem gegenüber wesentlich geringere Viskositäten (Toluol: 0,59 cP (MacFarlane *et al.*, 2001)), was ein weiterer Grund für die höheren Aktivitäten in den verwendeten organischen Lösungsmittel sein kann. Insgesamt konnten somit die hier getesteten ILs nicht als neue Alternative für die KR und die DKR von Benzoin bewertet werden.

3.3.4 Stark eutektischen Lösungsmittel

Als dritte alternative Lösungsmittelklasse wurden die DESs untersucht. Ähnlich der ILs existiert eine Vielzahl unterschiedlicher DESs durch die vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten der Ausgangsstoffe, in der Regel Ammoniumsalze und Wasserstoffbrückenbindungsdonoren, zur Bildung der eutektischen Mischungen, sowie deren molaren Verhältnisse zueinander. Im Gegensatz zu den ILs, sind diese kommerziell nicht erhältlich und müssen synthetisiert werden. Für die Untersuchung der DESs als Lösungsmittel in dieser Arbeit wurden als Ammoniumsalze Cholinchlorid und Ethylammoniumchlorid ausgewählt. Bei der Auswahl der Wasserstoffbrückenbindungsdonoren mit unterschiedlichen Kettenlängen und funktionellen Gruppen wurde eine hohe Variation der Eigenschaften der DESs angestrebt. Neben den häufig verwendeten Wasserstoffbrückenbindungsdonoren Glycerin und Harnstoff wurden einige von Maugeri und Domínguez de María (2012) vorgestellten Wasserstoffbrückenbindungsdonoren aus nachwachsenden Rohstoffen getestet. Es wurden Isosorbid und Lävulinsäure, sowie die weiteren Säuren Oxalsäure, Phenylpropionsäure und

Stearinsäure ausgewählt, um eine Variation der Kettenlänge der Säuren zu gewährleisten. Da in der Publikation von Maugeri und Domínguez de María (2012) zudem sperrige Wasserstoffbrückenbindungsdonoren mit Alkoholgruppen, z.B: Xylit, erfolgreich zur Bildung von DESs verwendet wurden, wurde Benzoin als möglicher Wasserstoffbrückenbindungsdonor in dieser Arbeit ebenfalls getestet. Für DESs aus Cholinchlorid wurden molare Verhältnisse zwischen 1:1 und 1:2 und für Ethylammoniumchlorid 1:1,5 verwendet. In Tabelle 22 sind alle getesteten Kombinationen der gewählten Ammoniumsalze und der Wasserstoffbrückenbindungsdonoren zu finden.

Tabelle 22 Zusammensetzung und Bildung der in dieser Arbeit synthetisierten DESs, +: Synthese war erfolgreich, -: Bildung eines DES wurde nicht beobachtet.

DES	Ammoniumsalz	Wasserstoffbrückenbindungs- donoren	Molares Verhältnis	DES-Bildung
ChCl:Gly	Cholinchlorid	Glycerin	1:2	+
ChCl:U	Cholinchlorid	Harnstoff	1:2	+
ChCl:Iso	Cholinchlorid	Isosorbid	1:2	+
ChCl:LS	Cholinchlorid	Lävulinsäure	1:2	+
ChCl:OS	Cholinchlorid	Oxalsäure	1:1	+
ChCl:PPS	Cholinchlorid	Phenylpropionsäure	1:1	+
ChCl:SS	Cholinchlorid	Stearinsäure	1:2	-
ChCl:Gly:SS	Cholinchlorid	Glycerin + Stearinsäure	1:1:1	-
ChCl:Ben	Cholinchlorid	Benzoin	1:2	-
ChCl:Gly:Ben	Cholinchlorid	Glycerin + Benzoin	1:1:1	-
EAC:Gly	Ethylammoniumchlorid	Glycerin	1:1,5	+
EAC:SS	Ethylammoniumchlorid	Stearinsäure	1:1,5	-

Die DESs ChCl:Gly, ChCl:U, EAC:Gly, ChCl:LS, ChCl:OS, ChCl:PPS und ChCl:Iso konnten erfolgreich hergestellt werden. Auffällig waren die DESs ChCl:OS und ChCl:PPS. ChCl:OS war bei 50 °C eine hoch-viskose Flüssigkeit und ChCl:PPS ein Feststoff. Daher erschienen diese DESs nicht als geeignet zur Verwendung als Lösungsmittel. Mit den Hydrogendonoren Stearinsäure und Benzoin konnten keine DESs gebildet werden. Die Verwendung von Ethylammoniumchlorid als Ammoniumsalz war für Stearinsäure ebenfalls nicht erfolgreich. Die Mischung von Glycerin und Stearinsäure bzw. Benzoin als Hydrogendonoren und Cholinchlorid ergab eine Suspension aus dem DES ChCl:Gly und der Stearinsäure bzw. dem Benzoin. Aufgrund der Ergebnisse wurden die DESs ChCl:OS und ChCl:PPS, sowie die Hydrogendonoren Stearinsäure und Benzoin von weiteren Tests ausgeschlossen.

Durch die Hygroskopie einiger Grundsubstanzen der DESs und der Abhängigkeit der Lipasenaktivität von der Wasseraktivität (siehe 3.2.2), wurde zunächst der a_w -Wert in allen erfolgreich gebildeten DESs bestimmt. Bei Werten von $a_w > 0,02$ wurden die DESs bei 130 °C für 2 h erhitzt und für 3 Tage in einem Exsikkator über Silicagel gelagert und der a_w -Wert erneut bestimmt.

Tabelle 23 Wasseraktivität der DESs vor und nach dem Trocknen.

DES	a_w -Wert nach Herstellung	a_w -Wert nach Trocknung
CHCl:Gly	0,057	0,009
ChCl:U	0,016	n. b.
ChCl:Iso	0,045	0,023
ChCl:LS	0,071	0,036
EAC:Gly	0,009	n. b.

Tabelle 23 fasst die Wasseraktivitäten der DESs zusammen. Für ChCl:Gly, ChCl:Iso und ChCl:LS war ein nachträgliches Ausheizen nach der Herstellung notwendig. Somit ergaben sich Wasseraktivitäten zwischen 0,04 und 0,01. Der Einfluss der Wasseraktivität auf die weitere Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde daher als sehr gering eingeschätzt.

Mit den erfolgreich gebildeten und getrockneten DESs wurde im nächsten Schritt zunächst die Benzoinlöslichkeit untersucht. Als Standardkonzentration wurde erneut 20 mg/mL gewählt. Bei einer unvollständigen Löslichkeit wurde die Benzoinkonzentration variiert bis zu einer minimalen Konzentration von 5 mg/mL. Zudem wurde im Fall einer sehr geringen Löslichkeit des Benzoin (<10 mg/mL) zusätzlich 10% (v/v) 2-Propanol hinzugefügt. Aufgrund der Löslichkeit und der zum Teil sehr hohen Viskosität der DESs wurden alle Löslichkeitsversuche für 24 h bei 50 °C auf einem Schüttler (1200 rpm) durchgeführt.

Tabelle 24 Untersuchung der Benzoinlöslichkeit der DESs (Petrenz *et al.*, 2015).

DESs	2-Propanol	Benzoin [mg/mL]	Löslichkeit
EAC:Gly	+	5	-
ChCl:Gly	+	5	-
ChCl:U	+	5	-
ChCl:Iso	-	5	+
ChCl:Iso	-	10	-
ChCl:Iso	+	10	+
ChCl:Iso	-	20	-
ChCl:Iso	+	20	-
ChCl:LA	-	20	+

Tabelle 24 fasst die erreichten Benzoinlöslichkeiten in den getesteten DESs zusammen. In den DESs ChCl:Gly, ChCl:U und EAC:Gly war in dem gewählten Konzentrationsbereich bis 5 mg/mL keine vollständige Löslichkeit möglich. Durch die Zugabe von 10% 2-Propanol konnten 5 mg/mL weiterhin nicht gelöst werden. Mittels einer HPLC-Analyse wurde eine gelöste Benzoinkonzentration von 2,5 mg/mL ChCl:Gly und EAC:Gly im Überstand nachgewiesen. In ChCl:U bildete sich aus dem DES und dem 2-Propanol ein Zweiphasensystem, wodurch die Benzoinlöslichkeit nicht verbessert werden konnte. In ChCl:LA waren bereits 20 mg/mL Benzoin löslich und in ChCl:Iso konnte die Löslichkeit von 5 mg/mL auf 10 mg/mL durch Zugabe von 2-Propanol erhöht werden. Auf Grundlage der Ergebnisse wurde an dieser Stelle ChCl:U von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Aktivität der LipTL in den DESs mit und ohne 2-Propanol untersucht. Es wurde dabei die höchste lösliche Benzoinkonzentration im jeweiligen DESs (Maximum 20 mg/mL) gewählt. Durand *et al.* (2012) konnten zeigen, dass die Verwendung von einem Immobilisat in DESs zu keinen konsistenten Ergebnissen führte, aufgrund der hohen Viskosität der DESs und den dadurch bedingten Stofftransportlimitierungen und Dispersionsschwierigkeiten. Daher wurde hier neben dem Lip TL-Immobilisat auch das LipTL-Lyophilisat untersucht. Durand *et al.* (2012) konnten zeigen, dass eine Zerkleinerung des Immobilisates zu einer Erhöhung der Enzymaktivitäten durch Vergrößerung der Oberfläche führen kann. Für die Zerkleinerung wurde ein Mörser verwendet. Zur Erhöhung der Trägeroberfläche wurde das Immobilisat in einem Mörser zerkleinert. Als Vergleich wurde in den DESs mit messbarer Enzymaktivität die Aktivität des ungemörserten Immobilisates untersucht.

Tabelle 25 Spezifische Aktivität der LipTL als Lyophilisat und Immobilisat in DESs. z: zerkleinert; 2PrOH: 2-Propanol (Petrenz *et al.*, 2015).

DES	Benzoin [mg/mL]	LipTL	Aktivität [U/g _{Immo.}]	Aktivität [U/g _{Protein}]
ChCl:Gly:2PrOH	2.5	Lyophilisat	-	0.
EAC:Gly:2PrOH	2.5	Lyophilisat	-	0
ChCl:Iso	5	Lyophilisat	-	28,5
ChCl:Iso:2PrOH	10	Lyophilisat	-	14,0
ChCl:LA	20	Lyophilisat	-	0
ChCl:Gly:2PrOH	2.5	z. Immobilisat	0.	0.
EAC:Gly:2PrOH	2.5	z. Immobilisat	0	0
ChCl:Iso	5	z. Immobilisat	1,9	77,3
ChCl:Iso:2PrOH	10	z. Immobilisat	0,3	12,0
ChCl:LA	20	z. Immobilisat	0	0
ChCl:Iso	5	Immobilisat	0,3	12,0

Sowohl für das Lyophilisat, als auch für das zerkleinerte Immobilisat konnte eine messbare Produktzunahme nur in dem DES ChCl:Iso festgestellt werden. Für das Lyophilisat konnte eine spezifische Aktivität von 28,5 U/g_{Protein} und für das zerkleinerte eine Aktivität von 77,3 U/g_{Protein} bzw. 1,9 U/g_{Immo.} bestimmt werden. Eine zusätzliche Zugabe von 2-Propanol führte in beiden Fällen trotz Erhöhung der Benzoinkonzentration zu einer geringeren Aktivität. In allen anderen getesteten DESs war innerhalb einer Stunde keine Produktzunahme messbar, selbst in dem DES ChCl:LA mit der höchsten Benzoinlöslichkeit. Für das nicht zerkleinerte Immobilisat ergab sich eine geringere Aktivität von 12 U/g_{Protein} bzw. 0,3 U/g_{Immo.} in ChCl:Iso als in den zwei anderen Varianten. Somit scheint die Verwendung von Immobilisaten mit einer geringen Partikelgröße oder die nachträgliche Zerkleinerung der Immobilisate für einen Einsatz derer in DESs vorteilhaft zu sein. Jedoch ist das Mörsern des Immobilisates keine reproduzierbare Methode, wodurch Abweichungen der Aktivität nach dem Zerkleinern nicht auszuschließen sind. Im Vergleich der Ergebnisse in den DESs zu den Aktivitäten in den organischen Lösungsmitteln und ILs ergaben sich signifikant niedrigere spezifische Aktivitäten. Grund dafür könnte, ähnlich wie bereits für die ILs schon festgestellt wurde, ein erhöhter Stofftransport bzw. Massentransferlimitierungen aufgrund der hohen Viskosität der DESs sein (H. Zhao *et al.*, 2011). Der Unterschied zwischen den Aktivitäten des Lyophilisates und des zerkleinerten Immobilisates kann zum einen durch die schon publizierte Hyperaktivierung der LipTL auf dem Träger (Nieguth *et al.*, 2014) und zum anderen durch zusätzliche Diffusionslimitierung aufgrund möglicher Enzymaggregation der freien LipTL zustande gekommen sein, da freie

Enzyme in organischen Lösungsmitteln unlöslich sind (Hanefeld *et al.*, 2009; Singer, 1963). Eine weitere Möglichkeit könnte die Bildung von Nebenprodukten durch die Reaktion der Wasserstoffdonoren mit freien Alkoholgruppen als Konkurrenzreaktion zum Benzoin sein. Gorke *et al.* (2008) konnten in der Umesterung von Ethylvalerat und 1-Butanol in dem DES ChCl:Gly nur eine geringe Menge an dem Glycerin Nebenprodukt messen bei einem Umsatz von 90%. Daher wird vermutet, dass auch in der KR von Benzoin mögliche Nebenprodukte der Hydrogendonoren nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Reaktion haben, wobei es fraglich ist, ob diese in der hier verwendeten HPLC-Analytik nachweisbar gewesen wäre. Dass die zusätzliche Zugabe von 2-Propanol zu einer messbaren Verringerung der Aktivität führte, könnte auf eine weitere Konkurrenzreaktion von Vinylbutyrat und 2-Propanol als Nukleophil zurückzuführen sein. Das hierbei entstehende Produkt Buttersäure-*iso*-propylester ist bei den hier verwendeten HPLC-Methoden nicht nachweisbar und kann damit nicht ausgeschlossen werden.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Löslichkeit von (*S*)-Benzoinbutyrat in ChCl:Iso untersucht. Dabei wurde eine maximale Löslichkeit von 0,3 mg/mL festgestellt. Bei einem entsprechenden hohen Umsatz wäre dadurch eine einfache Separation des Produktes durch dessen Auskristallisieren vom Reaktionsansatz denkbar. Daher wurde die KR von Benzoin in ChCl:Iso für 6 Tage durchgeführt um den maximalen Umsatz zu bestimmen (Abbildung 41).

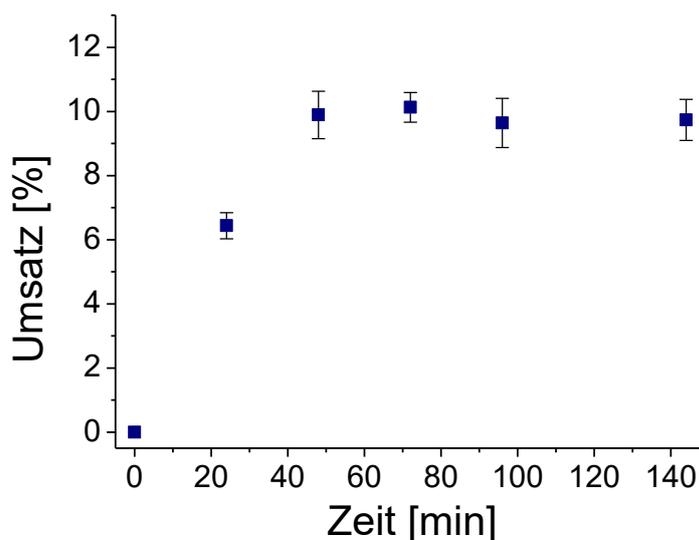


Abbildung 41 Umsatz der KR von Benzoin über die Zeit in ChCl:Iso (Petrenz *et al.*, 2015).

Der höchste Umsatz von 10% konnte nach 48 h erreicht werden. Anschließend konnte keine weitere Zunahme beobachten werden. Eine Auskristallisierung des Produktes konnte nicht erreicht werden. Vermutlich konnte der Umsatz nicht erhöht werden, da die LipTL, wie bereits beschrieben, aufgrund ihrer Thermolabilität nach rund 48 h vollständig deaktiviert wurden. ChCl:Iso bleibt damit hinsichtlich seiner Eigenschaften und der Umweltfreundlichkeit für weitere Untersuchung ein interessanter Kandidat. Möglichkeiten wären hier zum Beispiel die Verwendung einer Mischung zweier Wasserstoffbrückenbindungsdonoren zu Erniedrigung der Viskosität und Erhöhung der Benzoinkonzentration oder die Zugabe eines anderen organischen Lösungsmittels, beispielsweise CPME oder 2-MeTHF. In dieser Arbeit wurde das DES nicht als alternatives Lösungsmittel für die KR und DKR von Benzoin angesehen und nicht weiterverwendet.

3.3.5 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Für eine nachhaltige und umweltfreundliche DKR wurden verschiedene Lösungsmittelklassen getestet. Ausgewählt wurden organische Lösungsmittel, ILs und DESs. Als alternative organische Lösungsmittel wurden CPME und 1,3-Dioxolan ausgewählt und die Aktivitäten der immobilisierten LipTL und des Zr-TUD-1, sowie die Prozessstabilität der immobilisierten LipTL bestimmt und mit den Ergebnissen in den Standardlösungsmitteln Toluol und 2-MeTHF verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität und die Prozessstabilität der LipTL in CPME deutlich gesteigert werden konnte. Für den Zr-TUD-1 konnte in CPME eine annähernd gleiche Aktivität wie in dem bisher bevorzugten Toluol erreicht werden. In 1,3-Dioxolan wiederum wurde sowohl eine deutlich geringere Aktivität der LipTL, als auch vom Zr-TUD-1 bestimmt. Für die Eignung von ILs wurden vier ILs mit unterschiedlichen Kationen und Anionen ausgewählt und die spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL ermittelt. Dabei konnte eine Abhängigkeit der Aktivität vom Kation und vom Anion beobachtet werden. Die höchste Aktivität konnte in der IL mit der geringsten Viskosität erreicht werden, daher wurde die Viskosität als entscheidender Parameter ausgemacht. Da die Aktivität in allen getesteten ILs deutlich unter den Aktivitäten in den organischen Lösungsmitteln lag, wurden weitere Untersuchungen nicht durchgeführt. Im Fall der Eignung der DESs wurden eine Reihe verschiedener DESs hergestellt. Jedoch konnte nicht für alle Kombinationen eine DES-Bildung beobachtet werden. In den gebildeten DESs wurde zunächst die Benzoinlöslichkeit überprüft. In einigen Fällen wurde 2-Propanol zur Erhöhung der Löslichkeit hinzugefügt. In den DESs bzw. DES/2-Propanol-Mischungen mit einer Benzoinkonzentration von mindestens 2,5 mg/mL

wurde die spezifische Aktivität der nativen LipTL und der immobilisierten LipTL bestimmt. Aufgrund der hohen Viskosität der DESs wurde das Immobilisat zudem zur Erhöhung der Oberfläche zerkleinert. Dabei konnte lediglich in dem DES ChCl:Iso eine Produktbildung ermittelt werden. Das folgende Langzeitexperiment in dem DES ergab nur einen maximalen Umsatz von 10% in der KR von Benzoin. Daher wurden die DESs als Lösungsmittelklasse nicht weiter untersucht.

Unter allen getesteten Lösungsmitteln konnte somit CPME als neues alternatives Lösungsmittel für die DKR von Benzoin ausgemacht werden. Aufgrund dessen wurde Toluol von allen weiteren Untersuchungen, neben den ILs und DESs, ausgeschlossen. 2-MeTHF wurde weiterhin als Vergleich verwendet, da es ebenfalls als umweltfreundlich gilt.

3.4 Kinetische Racematspaltung symmetrischer und asymmetrischer α -Hydroxyketone

3.4.1 Auswahl der α -Hydroxyketone

Die bisherigen Studien zur der KR bzw. DKR von α -Hydroxyketonen mit der immobilisierten LipTL und dem Zr-TUD-1 als Katalysatoren wurden bisher nur für Benzoin durchgeführt. In anderen Studien konnte die Eignung der LipTL für weitere symmetrische (Hoyos *et al.*, 2006) und asymmetrische (Hoyos, Pace, *et al.*, 2011) Benzoin-Derivate gezeigt werden. Die Verwendung der Benzoin-Derivate als Substrate führte dabei in der Regel zu sehr hohen Enantioselektivitäten von >99%. Als zweiter Katalysator wurde jeweils der homogene Shvo-Katalysator verwendet. Die KR bzw. DKR von einigen asymmetrischen Acyloinen wurde auch untersucht. Für 2-Hydroxy-4-methyl-1-phenylpentan-1-on konnte erneut eine sehr hohe Enantioselektivität bestimmt werden (Hoyos, Pace, *et al.*, 2011). Für 2-Hydroxy-1-phenylpropan-1-on (2-Hydroxypropiophenon (HPP)) konnte keine Bevorzugung eines Enantiomers festgestellt werden (Maraitte *et al.*, 2013).

Die Eignung des heterogenen Katalysatorsystems LipTL und Zr-TUD-1 sollte daher für weitere symmetrische und asymmetrische α -Hydroxyketonen untersucht werden. Der Fokus lag, insbesondere bei der Auswahl der asymmetrischen Substrate, auf α -Hydroxyketonen, die eine industrielle Bedeutung besitzen, beispielsweise als Vorstufe für pharmazeutische Stoffe. Als weiteres symmetrisches α -Hydroxyketon wurde neben Benzoin das 2,2-Furoin ausgewählt. Dieses wird von der LipTL mit einer Enantioselektivität von

95% umgesetzt (Hoyos *et al.*, 2006) und diente damit neben Benzoin als weiteres Modellsubstrat. Im Fall der asymmetrischen α -Hydroxyketone wurden das bereits erwähnte HPP und das Phenylacetylcarbinol (PAC) ausgewählt. HPP und insbesondere halogenierte HPP-Derivate sind Ausgangsstoffe für beispielsweise Bupropion, einem Antidepressivum (Demir *et al.*, 2001) oder Voriconazol, einem Antimykotikum (Jeon *et al.*, 2007). Aus (*R*)-PAC kann unter anderem Ephedrin, ein Sympathomimetikum und aus (*S*)-PAC Norpseudoephedrin (Cathin), ein Appetitzügler, hergestellt werden (Sehl *et al.*, 2017; Sehl *et al.*, 2015).

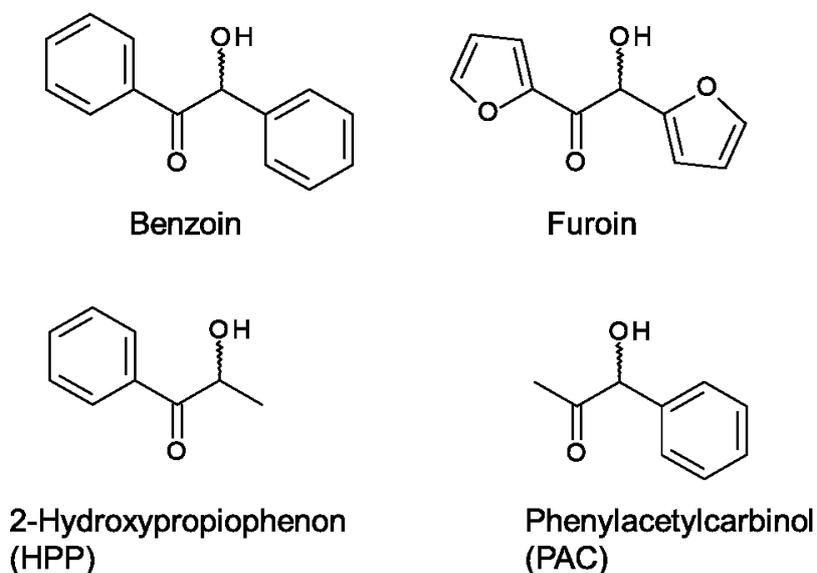


Abbildung 42 Für die DKR ausgewählte α -Hydroxyketone.

Mit den gewählten α -Hydroxyketonen (Abbildung 42) sollten zunächst die Akzeptanz durch die LipTL, die spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL, sowie das Hauptprodukt und dessen *ee* bestimmt werden. HPP wurde in die Versuchsreihe mit aufgenommen, obwohl bereits bekannt war, dass beide Enantiomere von der LipTL umgesetzt werden (Maraite *et al.*, 2013). Dies diente in erster Linie zur Untersuchung der Abhängigkeit der spezifischen Aktivität und des *ee* von den Seitengruppen der α -Hydroxyketone. Im weiteren Schritt wurde nach alternativen Lipasen gesucht, die möglicherweise zu verbesserten Aktivitäten oder *ee* führen.

3.4.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität der immobilisierten Lipase TL

Zur Untersuchung der KR wurde Furoin neben Benzoin kommerziell bezogen. PAC und HPP wurden von der chiracon GmbH (Luckenwalde, Deutschland) bereitgestellt. Für eine

Vergleichbarkeit der spezifischen Aktivität wurde stets eine Substratkonzentration von 94 mM eingesetzt. Alle Versuche wurden in 2-MeTHF und in der neuen Lösungsmittelalternative CPME durchgeführt. Als Wasseraktivität des Reaktionssystems wurde $a_w < 0,02$ festgelegt.

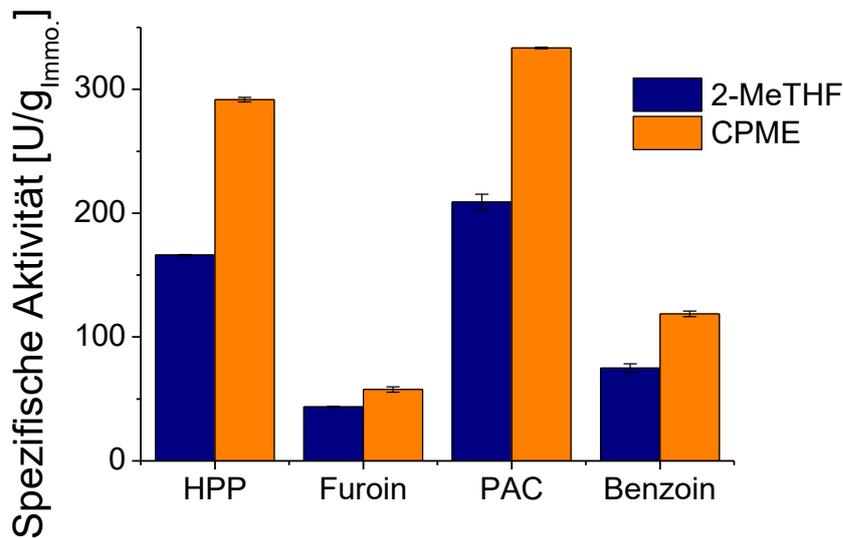


Abbildung 43 Spezifische Aktivität der immobilisierten LipTL in Abhängigkeit des Substrates in 2-MeTHF und CPME.

Wie aus Abbildung 43 erkennbar, konnten alle Substrate umgesetzt werden. Die höchsten spezifischen Aktivitäten der LipTL konnten mit den unsymmetrischen Substraten PAC und HPP in CPME erreicht werden. Durch die Verwendung von Substraten mit zwei großen Aryl-Seitenketten nahm die spezifische Aktivität merklich ab. Hinsichtlich der Aktivität werden somit scheinbar kürzere Seitenketten bevorzugt. Der Grund könnte im Aufbau des aktiven Zentrums liegen (siehe 1.2.2). Aus dem publizierten Homologiemodell ist ein Tyrosin-54 bekannt, dass mutmaßlich die carbonyltragende Seitenkette in der kleinen hydrophoben Tasche über eine Wasserstoffbrückenbindung bindet (Maraite *et al.*, 2013). Beim Benzoin und HPP handelt es sich hierbei um eine Benzoylgruppe, beim Furoin um eine Furoylgruppe und beim PAC um eine wesentlich kleinere Acetylgruppe (Abbildung 44).

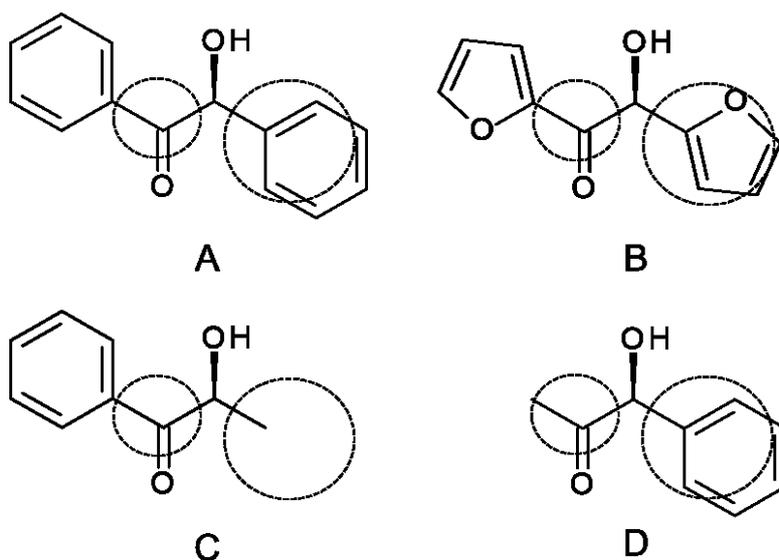


Abbildung 44 Orientierung der α -Hydroxyketone A: (*S*)-Benzoin, B: (*S*)-Furoin, C: (*S*)-HPP und D: (*S*)-PAC im aktiven Zentrum der LipTL entgegen der Kazlauskas-Regel. Kleiner Kreis: kleine Bindetasche, großer Kreis: große Bindetasche.

Offensichtlich verbessert die kleinere Methylgruppe des PAC in der kleinen Bindungstasche die Bindung des Substrates im aktiven Zentrum. In der Literatur ist bekannt, dass eine zusätzliche *iso*-Propylkette an der Benzoylkette zu einer wesentlichen geringeren Aktivität führt. Eine *iso*-Propylkette am Phenylrest hat wiederum keine Auswirkung (Hoyos, Pace, *et al.*, 2011). Die höhere Lipasenaktivität im Falle des HPP gegenüber des Benzoin kann durch die Substratkonzentration erklärt werden. Während beim Benzoin nur das (*S*)-Enantiomer umgesetzt wird, werden beide HPP-Enantiomere umgesetzt. Daher steht beim HPP eine Konzentration von 94 mM gegenüber 47 mM beim Benzoin für die Reaktion zur Verfügung. Durch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ergeben sich eine höhere Aktivität der Lipase beim Umsatz des HPP. Ein zusätzlicher positiver Einfluss auf die spezifische Aktivität ist durch die Methylgruppe des HPP gegenüber den Arylresten der anderen Substrate in der großen Bindungstasche (siehe Abbildung 44C) möglich, obwohl diese Reste in der großen Tasche zum Lösungsmittel hin orientiert werden (Maraite *et al.*, 2013).

3.4.3 Analyse der Hauptprodukte der kinetischen Racematspaltung

Von der LipTL ist bekannt, dass sie sich entgegen der Kazlauskas Regel verhält und mit allen bisher getesteten Substraten das (*S*)-Produkt bildet (Maraite *et al.*, 2013). Dies kann auf die bereits erwähnte Bindung der carbonyltragenden Seitenkette in der kleinen Tasche

zurückgeführt werden. PAC wurde bisher noch nicht als Substrat für die LipTL verwendet, daher war nicht bekannt, ob hierbei auch das (*S*)-Produkt gebildet wird. Das gleiche galt für das gering bevorzugte Enantiomer des HPP. Daher mussten für die Analyse der Produkte zunächst die Enantiomere für die Etablierung der Analytik und die Zuordnung der Peaks der HPLC-Chromatogramme besorgt werden. (*S*)- und (*R*)-PAC wurden dabei freundlicherweise von der Enzymicals AG (Greifswald, Deutschland) zur Verfügung gestellt. (*R*)-HPP konnte nach Literaturangaben über die Verknüpfung von Benzaldehyd und Acetaldehyd unter Verwendung der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* synthetisiert werden (Stillger *et al.*, 2006). Anschließend wurden jeweils die Aktivitätstests bis zum vollständigen Umsatz des bevorzugten Enantiomeres der Substrate durchgeführt und schließlich die Konfiguration und die *ee*'s der Hauptprodukte bestimmt. Die Versuche wurden hierbei nur in CPME durchgeführt, aufgrund der wesentlich höheren Aktivität in diesem Lösungsmittel.

Tabelle 26 Hauptprodukte und deren *ee* nach Durchführung der KRs bis zum vollständigen Umsatz des bevorzugten Substratenantiomeres.

Substrat	Reaktionszeit [h]	Hauptprodukt	<i>ee</i> [%]
Benzoin	1.5	(<i>S</i>)-Benzoinbutyrat	98
Furoin	1.5	(<i>S</i>)-Furoinbutyrat	96
PAC	0.25	(<i>S</i>)-PAC-Butyrat	88
HPP	0.25	(<i>R</i>)-HPP-Butyrat	7

Tabelle 26 fasst die erhaltenen Ergebnisse zusammen. Aufgrund der spezifischen Aktivitäten konnte das bevorzugte Enantiomer von PAC und HPP schon in einer Viertelstunde vollständig umgesetzt werden. Im Fall von Benzoin und Furoin war eine erhöhte Reaktionszeit von 1,5 h notwendig. Hinsichtlich des Hauptproduktes und dessen *ee* konnten für Furoin und Benzoin die Literaturangaben bestätigt werden (Hoyos *et al.*, 2006). Jedoch konnte für Benzoin kein *ee*<99% ermittelt werden. Das kann an den unterschiedlichen Analytikmethoden liegen, sodass hier auch geringe Spuren des (*R*)-Benzoinbutyrats nachgewiesen wurden. Für PAC konnte das Anti-Kazlauskas-Produkt (*S*)-PAC-Butyrat als Hauptprodukt bestimmt werden. Im Vergleich zum Benzoin und Furoin ergab sich ein geringerer *ee* des Produktes. Der Grund kann hier in der Acetylgruppe des PAC gefunden werden. Für Benzoin ist aus dem vorhandenen Modell bekannt, dass sich neben der Wasserstoffbrückenbindung zwischen Tyr-54 und der Carbonylgruppe eine π - π -Wechselwirkung zwischen dem Phenyl-Ring und dem Try-54 ausbildet (Maraite *et al.*, 2013). Diese Wechselwirkung kann sich beim PAC nicht ausbilden, wodurch sich

möglicherweise die Ausrichtung der der PAC-Enantiomere im aktiven Zentrum im Gegensatz zum Benzoin verändert, sodass auch das (*R*)-PAC zum geringen Teil umgesetzt werden kann. Beim HPP wurde wie erwartet ein sehr geringer *ee* erreicht. Interessanterweise zeigte sich, dass von den Enantiomeren das (*R*)-HPP bevorzugt wurde. Dies entspricht dem Kazlauskas-Produkt und steht damit im Widerspruch, dass sich bei Anwesenheit von Carbonylgruppen stets das Anti-Kazlauskas-Produkt bildet. Vermutlich wird das HPP sowohl in der Ausrichtung nach der Kazlauskas-Regel sowie in der gegensätzlichen Ausrichtung gebunden (Abbildung 45).

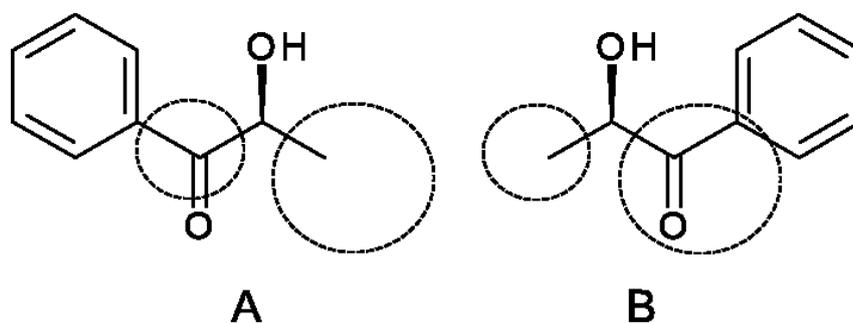


Abbildung 45 Mögliche Ausrichtungen des HPP A) entgegen der Kazlauskas-Regel und B) nach der Kazlauskas-Regel im aktiven Zentrum der Lipase TL. Kleiner Kreis: kleine Bindetasche, großer Kreis: große Bindetasche, A: (*S*)-HPP, B: (*R*)-HPP.

Von der Ausrichtung entgegen der Kazlauskas-Regel ist bekannt, dass aufgrund der Methyl-Gruppe beide Enantiomere in einer sehr ähnlichen Weise gebunden sind und daher beide ohne Bevorzugung umgesetzt werden (Maraite *et al.*, 2013). Aus der Mischung der Bindungen des HPP nach der Kazlauskas-Regel und der Anti-Kazlauskas-Ausrichtung ergibt sich somit möglicherweise die (*R*)-HPP-Bevorzugung. Wie erwartet ist die LipTL somit nicht für dieses Substrat geeignet, während sie für PAC, neben Benzoin und Furoin, als Biokatalysator für die DKR in Frage kommt.

3.4.4 Alternative Lipase für die kinetische Racematspaltung von HPP

Um auch die DKR von HPP erfolgreich durchführen zu können, wurde im nächsten Schritt eine alternative Lipase gesucht. Demir *et al.* (2001) konnten (*R*)-HPP und halogenierte (*R*)-HPP-Derivate über einen chemo-enzymatischen Weg herstellen, durch Hydrolyse der racemischen Ester mittels des Pilzes *Rhizopus oryzae*. Jeon *et al.* (2007) konnten enantiomerenreine (*R*)-Ester von HPP-Derivaten über die Umesterung der racemischen Substrate mit Vinylbutyrat mittels der CALB zeigen. Somit ergab sich die CALB als neuer

Kandidat für die DKR von HPP. Für die Herstellung des (*S*)-Esters bzw. des Anti-Kazlauskas-Produktes konnte in der Literatur keine weitere Lipase gefunden werden.

Für eine heterogene und recycelbare DKR wurde die CALB in immobilisierter Form als CALB immo plus (CALBip) kommerziell bezogen. Die KR von HPP wurde nach der Standardmethode durch Austausch der LipTL durch die CALB durchgeführt. Als Lösungsmittel wurden 2-MeTHF und CPME eingesetzt. Dabei wurde zunächst die spezifische Aktivität bestimmt und in dem Lösungsmittel mit der höchsten Lipasenaktivität die KR bis zum vollständigen Umsatz des bevorzugten Enantiomers durchgeführt. Anschließend erfolgte wiederum die Analyse des Hauptproduktes. In Tabelle 27 sind die dabei ermittelten Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 27 Spezifische Aktivität der CALBip in der KR von HPP in CPME und 2-MeTHF, sowie Hauptprodukt und dessen *ee*.

Lösungsmittel	Spezifische Aktivität [U/g _{CalBip}]	Reaktionszeit [h]	Hauptprodukt	<i>ee</i> [%]
2-MeTHF	77	n. b.	(<i>R</i>)-HPP-Butyrate	n. b.
CPME	121	0,5	(<i>R</i>)-HPP-Butyrate	99

Vergleichbar zur LipTL konnte für die CALB eine deutlich höhere spezifische Aktivität in CPME als in 2-MeTHF erreicht werden. CPME scheint damit auch für andere Biokatalysatoren, insbesondere für Lipasen, ein sehr interessantes Lösungsmittel zu sein. In beiden Lösungsmitteln wurde das Kazlauskas-Produkt (*R*)-HPP-Butyrat als Hauptprodukt nachgewiesen. Damit wurde die Literaturangabe bestätigt. In CPME konnte ein vollständiger Umsatz des (*R*)-HPP nach 30 min erreicht werden. Für das Produkt ergab sich ein *ee* von 99%. Aufgrund des überzeugenden Ergebnisses wurde für die DKR von HPP die CALB als idealer Biokatalysator bewertet.

3.4.5 Einfluss der Wasseraktivität auf die spezifische Aktivität der immobilisierten CALB

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität der immobilisierten CALB wurden bei einer Wasseraktivität von $a_w < 0,02$ durchgeführt. Für die Bestimmung der optimalen Wasseraktivität wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasseraktivität analog zur LipTL untersucht (siehe 3.2.1). Als Lösungsmittel wurde in diesem Fall CPME ausgewählt, da dieses für die spätere DKR eingesetzt werden sollte.

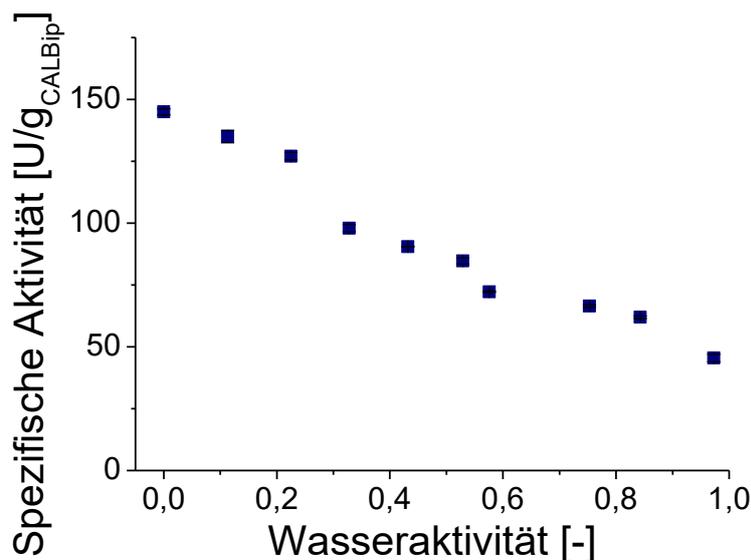


Abbildung 46 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der CALBip von der eingestellten Wasseraktivität in CPME.

Wie in Abbildung 46 ersichtlich, ergab sich für die CALB eine sehr ähnliche Abhängigkeit der Aktivität von der Wasseraktivität im Vergleich zum Ergebnis der LipTL (siehe 3.2.2). Es konnte die höchste spezifische Aktivität bei einer Wasseraktivität von $a_w \leq 0,02$ erreicht werden. Die Bevorzugung von geringer Wasseraktivität der CALB in Umesterungsreaktionen verschiedener sekundärer Alkohole mit Propionsäuremethylester konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden (Léonard-Nevers *et al.*, 2009). Hierbei wurde die Reaktion des Wassers als Konkurrenzreaktion gegenüber dem Alkohol als Grund für das Ergebnis angenommen. Für die folgenden Untersuchungen wurden auf Grundlage der Ergebnisse für die CALB eine Wasseraktivität des Reaktionssystems von $a_w \leq 0,02$ verwendet.

3.4.6 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die KR wurde von Benzoin auf weitere α -Hydroxyketone übertragen. Ausgewählt wurden Furoin, PAC und HPP als Substrate. Alle Substrate wurden hinsichtlich der spezifischen Aktivität der immobilisierten LipTL in CPME und 2-MeTHF untersucht. Das gebildete Hauptprodukt, sowie dessen *ee* wurden ermittelt. Es zeigte sich, dass die LipTL für alle Substrate, bis auf HPP, als Biokatalysator geeignet ist und die höchste spezifische Aktivität für alle Substrate stets in CPME erreicht werden konnte. Für Benzoin, Furoin und PAC wurde das (*S*)-Produkt als Hauptprodukt identifiziert. Jedoch wurde eine Abnahme des *ee* beim PAC im Vergleich zu den Substraten Benzoin und Furoin beobachtet. Im Falle des

HPP's wurden beide Enantiomere umgesetzt, dennoch konnte eine Bevorzugung des (*R*)-Enantiomers und damit die Bildung des Kazlauskas-Produktes ermittelt werden. Für HPP wurde im weiteren Vorgehen die CALB als alternativer Biokatalysator identifiziert. Die höchste spezifische Aktivität der immobilisierten CALB wurde erneut in CPME bestimmt. Als Hauptprodukt wurde das Kazlauskas-Produkt (*R*)-HPP-Butyrat mit einem exzellenten *ee* erhalten. Für die CALB wurde die Abhängigkeit der Aktivität von der Wasseraktivität untersucht. Ähnlich der LipTL konnte für die CALB die höchste Aktivität unter nahezu trockenen Bedingungen bestimmt werden.

Für das weitere Vorgehen und die Etablierung der heterogenen DKR der α -Hydroxyketone wurde auf Grundlage der Ergebnisse für die Substrate Benzoin, Furoin und PAC die LipTL und für HPP die CALB als Biokatalysator ausgewählt. Des Weiteren wurde für beide Enzyme CPME als das am besten geeignete Lösungsmittel für die DKR festgelegt, sowie eine Wasseraktivität des Reaktionssystems von $a_w \leq 0,02$.

3.5 Dynamisch kinetische Racematspaltung der α -Hydroxyketone

3.5.1 Synthese und Charakterisierung verschiedener heterogener Racemisierungskatalysatoren

In den Vorarbeiten von Nieguth (2013) und in den ersten Experimenten dieser Arbeit wurde stets der Zr-TUD-1, synthetisiert von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hanefeld der Technischen Universität Delft (Niederlande), verwendet. Im Lauf der Arbeit war es nicht mehr möglich den Chemokatalysator über diesen Weg zu beziehen. Daher wurde der Zr-TUD-1 nach dem Protokoll von Ramanathan *et al.* (2006) synthetisiert. Parallel dazu wurde als weiterer Katalysator der Zr-SBA-15 (Do *et al.*, 2012) hergestellt. Bei diesem Material handelt es sich ebenso um ein Zr-haltiges mesoporöses Silica, jedoch unterscheiden sich der Zr-TUD-1 und der Zr-SBA-15 in den verwendeten Ausgangsstoffen, sowie den Syntheseschritten. Der Zr-SBA-15 sollte als Alternative zum Zr-TUD-1 getestet werden, da beispielsweise die Synthese weniger Schritte aufweist (siehe 2.5.5 und 2.5.6).

Nach den erfolgten Synthesen unterschieden sich beide Katalysatoren deutlich in ihrer Optik. So bestand der Zr-TUD-1 aus grobkörnigen Kristallen, die zunächst für die weitere Verwendung gemörsert werden mussten. Der Zr-SBA-15 auf der anderen Seite wurde bereits als weißes, sehr feines Pulver nach der Calcinierung erhalten. Im nächsten Schritt wurden die neuen Katalysatoren in der Racemisierung von (*R*)-Benzoin getestet. Als

Standard und Vergleich diente dabei der bisher verwendete Zr-TUD-1 aus Delft (Zr-TUD-1 Delft).

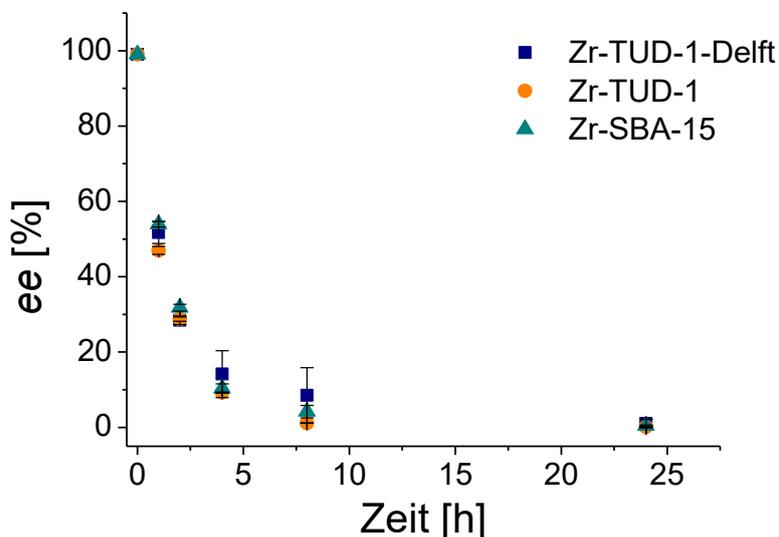


Abbildung 47 Racemisierung von (*R*)-Benzoin mit den Racemisierungskatalysatoren Zr-TUD-1-Delft, Zr-TUD-1 und Zr-SBA-15.

Wie aus Abbildung 47 ersichtlich ist, konnte für alle drei Katalysatoren eine sehr ähnliche Racemisierung des (*R*)-Benzoins und damit Aktivität der Katalysatoren erreicht werden. Die Synthese der beiden Chemokatalysatoren war somit erfolgreich. Der Zr-TUD-1-Delft zeigte im Vergleich eine etwas geringere Racemisierungsgeschwindigkeit. Dies kann auf die lange Lagerung über mehrere Monate und einer dabei einhergehenden Inaktivierung des Katalysators zurückgeführt werden. Zur erneuten Aktivierung des Katalysators wird in der Literatur eine Wiederholung der Calcinationsprozedur empfohlen (Ramanathan *et al.*, 2006). Die sehr ähnlichen Aktivitäten zwischen den beiden anderen Katalysatoren sind insoweit überraschend, da vermutet wurde, dass sie sich hinsichtlich der Größe der Oberflächen und der Porengröße durch die unterschiedlichen Synthesen unterscheiden. Aufgrund der fehlenden Informationen zu den benannten Parametern, kann an der Stelle nur spekuliert werden. Für die weiteren Untersuchungen zur DKR der unter 3.4.1 ausgewählten α -Hydroxyketone wurde an dieser Stelle der hier synthetisierte Zr-TUD-1 ausgewählt, da der Zr-SBA-15 aufgrund seiner sehr feinen Körnchengröße als problematisch für weitere Experimente in der Handhabung, beispielsweise beim Recycling der Katalysatoren oder beim Einsatz in dem bereits vorgestellten CSTR-System, bewertet wurde.

3.5.2 Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von Benzoin

Die DKR von Benzoin wurde hinsichtlich der Auswahl der Katalysatoren, der Temperatur, des Katalysatorenverhältnisses und des Lösungsmittels ausreichend optimiert (Nieguth, 2013; Nieguth *et al.*, 2014). Daher wurden die optimierten Reaktionsparameter übernommen und CPME als neue Lösungsmittelalternative getestet. Für den Vergleich wurde der Umsatz und der *ee* des Hauptproduktes (*S*)-Benzoinbutyrat nach 5 h Reaktionszeit bestimmt.

Tabelle 28 Umsatz und *ee* des (*S*)-Benzoinbutyrates in der DKR von Benzoin in CPME im Vergleich zu Toluol und 2-MeTHF nach 5 h (Petrenz *et al.*, 2015); a: Nieguth *et al.* (2014).

Lösungsmittel	Umsatz [%]	<i>ee</i> [%]
CPME	98	99
Toluol	98 ^a	99 ^a
2-MeTHF	97 ^a	97 ^a

Tabelle 28 vergleicht die hier erhaltenen Ergebnisse für den Umsatz und den *ee* in CPME mit den publizierten Werte in Toluol und 2-MeTHF. In CPME konnten die gleichen Werte für den Umsatz und *ee* wie in Toluol erreicht werden. Im Vergleich zu 2-MeTHF konnten die Ergebnisse in beiden Fällen verbessert werden. Die Verwendung von CPME als umweltfreundlichere Alternative für die DKR von Benzoin, insbesondere als Austausch für Toluol, konnte somit erfolgreich gezeigt werden. Neben der geringeren Toxizität, besitzt CPME zudem einen geringeren Siedepunkt im Vergleich zu Toluol, welcher die Ausarbeitung des Produktes simpler gestaltet.

3.5.3 Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von Furoin

Für die Optimierung der DKR des zweiten symmetrischen α -Hydroxyketons Furoin bildete die Standardmethode für Benzoin in CPME die Grundlage. Die Reaktionstemperatur von 50 °C, die Substratkonzentration von 94 mM und die Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 20 mg/mL wurden somit beibehalten. Als zu untersuchender Parameter wurde die Massenkonzentration des Zr-TUD-1 und damit das Katalysatorenverhältnis ausgewählt. Das Verhältnis wurde zwischen 1:1 und 1:3 zwischen Biokatalysator und Zr-TUD-1 variiert und der Verlauf der Ausbeute und des *ee* des Hauptproduktes, hier (*S*)-Furoinbutyrat, über 24 h verfolgt. Die Abbildung der Ausbeute des Hauptproduktes während des Reaktionsverlaufs, anstatt des Umsatzes des Substrates wie

beim Benzoin, wurde dabei gewählt, um eine mögliche Bildung von Nebenprodukten, wie beispielsweise das korrespondierende Diketon, erkennbar zu machen.

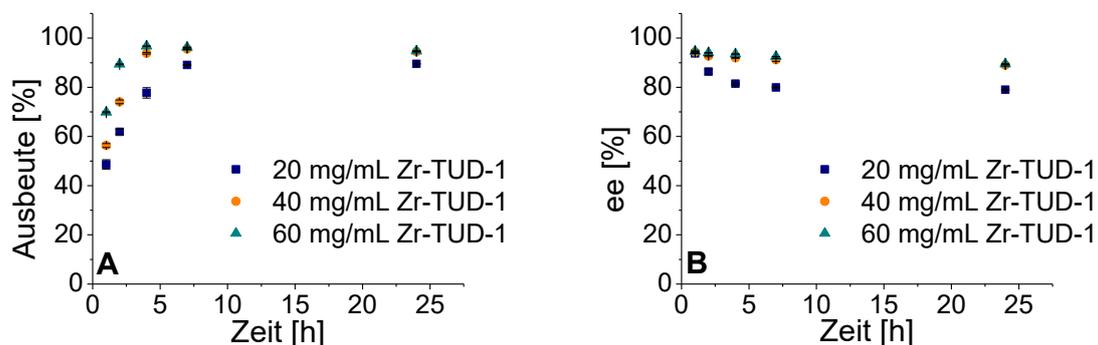


Abbildung 48 Entwicklung der Ausbeute und *ee* von (*S*)-Furoinbutyrat während der DKR von Furoin bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten LipTL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

Aus Abbildung 48 wird ersichtlich, dass ein Katalysatorenverhältnis von 1:1 und 1:2 zu einer geringeren Ausbeute führte innerhalb der ersten sieben beziehungsweise fünf Stunden Reaktionszeit gegenüber dem Verhältnis 1:3. Der *ee* des Hauptproduktes unterschied sich kaum zwischen den Verhältnissen 1:2 und 1:3, während 1:1 zu einem deutlichen geringeren *ee* führte. Dies deckt sich mit vorherigen Ergebnissen zur DKR von Benzoin (Nieguth, 2013). Hauptgrund liegt dabei an der Geschwindigkeit des Racemisierungsschrittes. Da dieser der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, wird bei einer zu langsamen Racemisierung nicht genug (*S*)-Substrat gebildet. Die Geschwindigkeit der Umesterung durch den Biokatalysator ist wiederum von der Konzentration der Substrate abhängig. Bei sehr geringer Konzentration des (*S*)-Substrats nimmt diese Reaktionsgeschwindigkeit ab, während die eigentlich wesentlich geringere Reaktionsgeschwindigkeit des Umsatzes des (*R*)-Substrats weiterhin relativ gleichbleibend ist. Dadurch verschiebt sich das Verhältnis von gebildetem (*S*)-Produkt zum (*R*)-Produkt und so zu einem geringeren *ee* des (*S*)-Produktes. Hinsichtlich des Umsatzes konnte ein Umsatz von $\geq 99\%$ beim Verhältnis 1:1 nach 7 h, bei 1:2 nach 5 h und bei 1:3 nach 4 h erreicht werden. Als Nebenprodukt, neben dem (*R*)-Produkt, konnten in allen Fällen lediglich Spuren des Diketon, Furil, nachgewiesen werden.

Zur Verdeutlichung des besten Katalysatorverhältnisses wurden im weiteren Vorgehen abgewandelte Selektivitäts-Umsatz-Diagramme erstellt. In dieser Art der Darstellung können die geeignetsten Parameter einer Reaktion abgelesen werden. Je weiter die Punkte einer Kurve sich in der oberen rechten Ecke des Diagramms befinden, desto selektiver, bei höheren Umsätzen, ist die Reaktion. Für die in dieser Arbeit untersuchte DKR wurde anstatt

des Umsatzes, die Ausbeute an dem jeweiligen Hauptprodukt und anstatt der Selektivität der *ee* des Hauptproduktes als wichtiger erachtet und diese Werte entsprechend im Diagramm ersetzt. Daher werden im Folgendem stets Enantiomerenüberschuss-Ausbeute-Diagramme dargestellt.

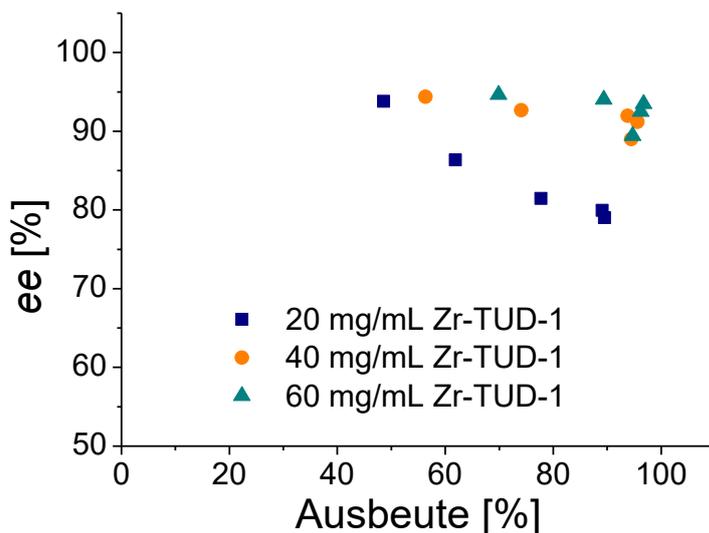


Abbildung 49 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (*S*)-Furoinbutyrat während der DKR von Furoin bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

In Abbildung 49 ist erkennbar, dass die höchsten *ee* bei gleichbleibender Ausbeute bei einem Katalysatorenverhältnis von 1:3 erreicht werden konnten. Dies verdeutlicht erneut, dass für die DKR von Furoin hinsichtlich des Umsatzes, der Ausbeute und des *ee* des Hauptproduktes dieses Katalysatorenverhältnis gewählt werden sollte, um bereits innerhalb von 4 h einen Vollumsatz des Furoins mit maximaler Ausbeute und *ee* des (*S*)-Furoinbutyrates erhalten zu können.

3.5.4 Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von PAC

Für die DKR des PACs wurde ebenso die Benzoinmethode hinsichtlich der Substratkonzentration, der Reaktionstemperatur und des Lösungsmittels CPME übernommen. Die Massenkonzentration der immobilisierten LipTL wurde zunächst bei 20 mg/mL fixiert und die Massenkonzentration des Zr-TUD-1 variiert. Es wurden Katalysatorenverhältnisse zwischen 1:1 und 1:3 untersucht.

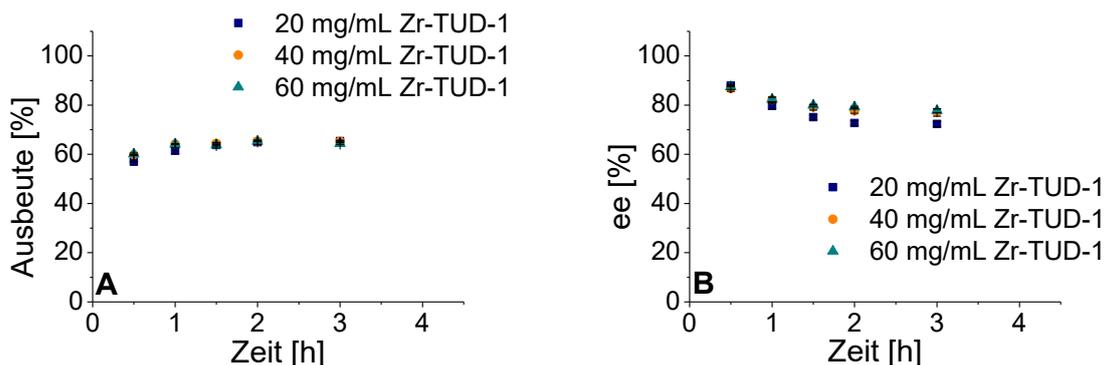


Abbildung 50 Entwicklung der Ausbeute und *ee* von (*S*)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten LipTL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

Aus Abbildung 50 wird ersichtlich, dass keine Verbesserung der Ausbeute an (*S*)-PAC-Butyrat und dessen *ee* durch Erhöhung des Verhältnisses von 1:1 zu 1:2 erreicht werden konnte. Es konnte kein Unterschied zwischen den Verhältnissen 1:2 und 1:3 hinsichtlich der Ausbeute bestimmt werden. Lediglich der *ee* konnte gering erhöht werden. So konnte mit beiden Verhältnissen bereits nach zwei Stunden ein Umsatz von >99% mit einer maximalen Ausbeute von 65% und einem *ee* von 78% bei einem Verhältnis von 1:2, beziehungsweise 79% bei einem Verhältnis von 1:3, erreicht werden.

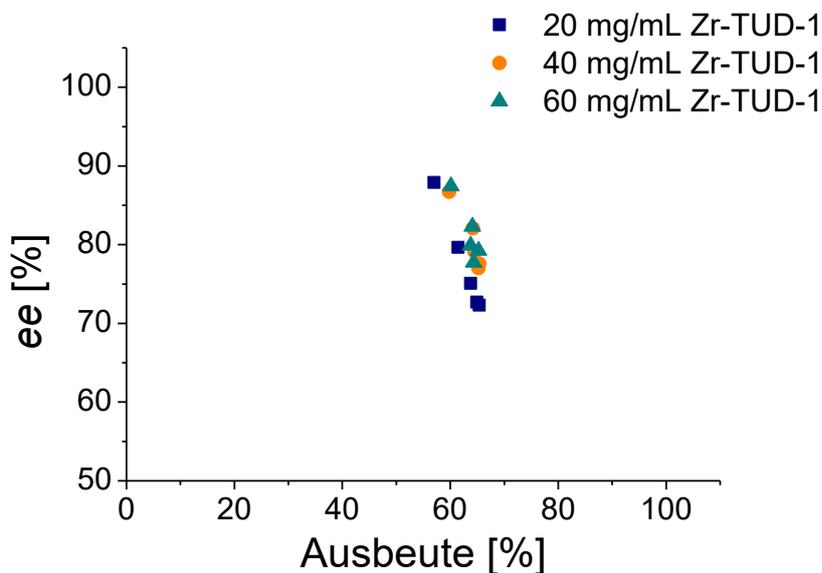


Abbildung 51 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (*S*)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

Das Ergebnis wird ebenfalls im Enantiomerenüberschuss-Ausbeute-Diagramm (Abbildung 51) deutlich, sodass die Erhöhung des Katalysatorenverhältnisses hinsichtlich der Erhöhung der Menge an Zr-TUD-1 an dieser Stelle wenig erfolgsversprechend schien. Es wurde vermutet, dass aufgrund der deutlich höheren Aktivität der LipTL mit PAC als Substrat im Gegensatz zu den anderen Substraten eine wesentlich größere Menge an dem Racemisierungskatalysator benötigt wird, damit die Racemisierung mit einer höheren Reaktionsgeschwindigkeit als die Umesterung abläuft. Daher wurde im nächsten Schritt die Massenkonzentration der immobilisierten LipTL auf 10 mg/mL und 2 mg/mL erniedrigt und die Massenkonzentration des Zr-TUD-1 bei 40 mg/ml fixiert. Dies entsprach den Katalysatorenverhältnisse von 1:4 und 1:20, jedoch wurde durch dieses Vorgehen das Verhältnis zwischen der Substratkonzentration und der Enzymkonzentration verändert.

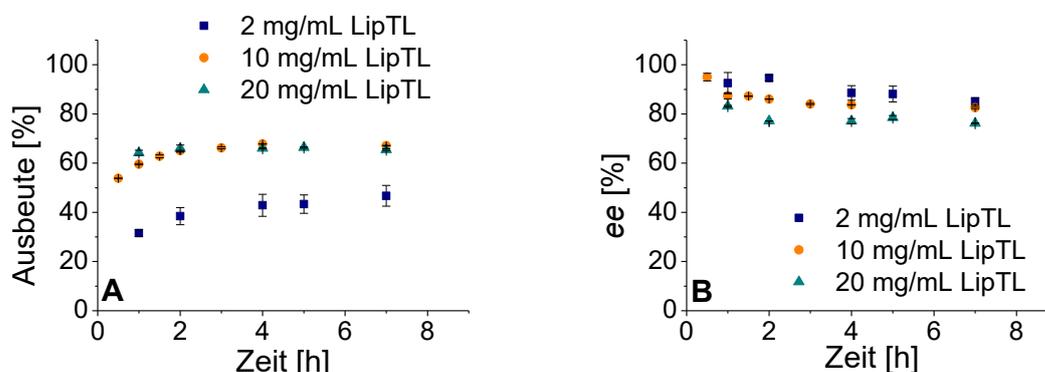


Abbildung 52 Entwicklung der Ausbeute und *ee* von (*S*)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 40 g/mL des Zr-TUD-1 und variierenden Massenkonzentrationen der immobilisierten LipTL.

In Abbildung 52 sind die Verläufe der Ausbeute und der *ee* des (*S*)-PAC-Butyrat bei den Verhältnissen von 1:2 bis 1:20 zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass trotz der Halbierung der Enzymkonzentration nach 1,5 h eine Ausbeute von rund 63% erreicht werden konnte. Eine längere Reaktionsführung führte wiederum zu einer weiteren Zunahme der Ausbeute von 4%. Lediglich mit der geringsten Konzentration von 2 mg/mL konnte innerhalb der Messzeit weder die maximale Ausbeute, noch der maximale Umsatz bestimmt werden. Unter Betrachtung der *ee*-Werte ist ein klarer Trend zu erkennen. Je geringer die Konzentration des Enzyms ist, desto höher sind die Werte des *ee*. Aus den zugehörigen Enantiomerenüberschuss-Ausbeute-Diagramm (Abbildung 53) wird deutlich, dass durch die Massenkonzentration von 10 mg/mL die höchsten *ee* bei gleichbleibender Ausbeute erreicht werden konnte, demnach eignet sich diese Enzymkonzentration und das Katalysatorenverhältnis von 1:4 am besten für die DKR von PAC.

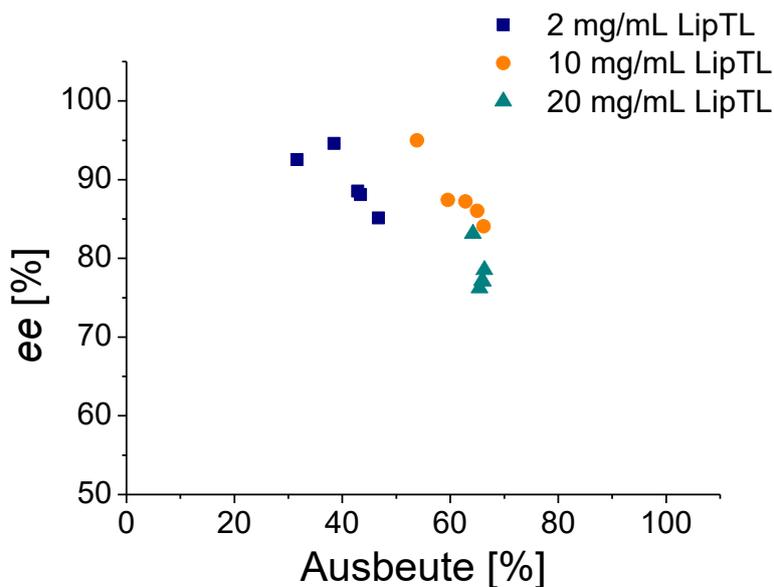


Abbildung 53 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (*S*)-PAC-Butyrat während der DKR von PAC bei einer festen Massenkonzentration von 40 g/mL des Zr-TUD-1 und variierenden Massenkonzentrationen der immobilisierten LipTL.

Beim Vergleich der zu den Ausbeuten zugehörigen Umsätze ergaben sich teilweise Unterschiede von bis zu 30%. So entsprach die genannte Ausbeute von 63% einem Umsatz von 87%. Daher wurde eine deutliche Bildung von Nebenprodukten vermutet. In der HPLC-Analytik wurden, neben geringen Mengen an Diketon, beide Enantiomere des HPP, sowie die zugehörigen Butyrate nachgewiesen. Es wurde an dieser Stelle vermutet, dass die Bildung von HPP aus der Racemisierung des (*R*)-PAC stammte (siehe 3.5.6). Da die LipTL in der Lage ist die Umesterung von HPP zu katalysieren, jedoch mit einer geringeren spezifischen Aktivität, erklärt dies das Vorhandensein der HPP-Butyrate.

3.5.5 Optimierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von HPP

Die Optimierung der DKR von HPP wurde ausschließlich mit der CALB als Biokatalysator durchgeführt. Aus den vorherigen DKRs der LipTL wurden die Reaktionstemperatur von 50 °C, die Substratkonzentration von 94 mM und die Massenkonzentration des immobilisierten Biokatalysators von 20 mg/mL beibehalten. Die Massenkonzentration des Zr-TUD-1 wurde hierbei zwischen 20 mg/mL und 80 mg/mL variiert und damit Katalysatorenverhältnisse von 1:1 bis 1:4 untersucht.

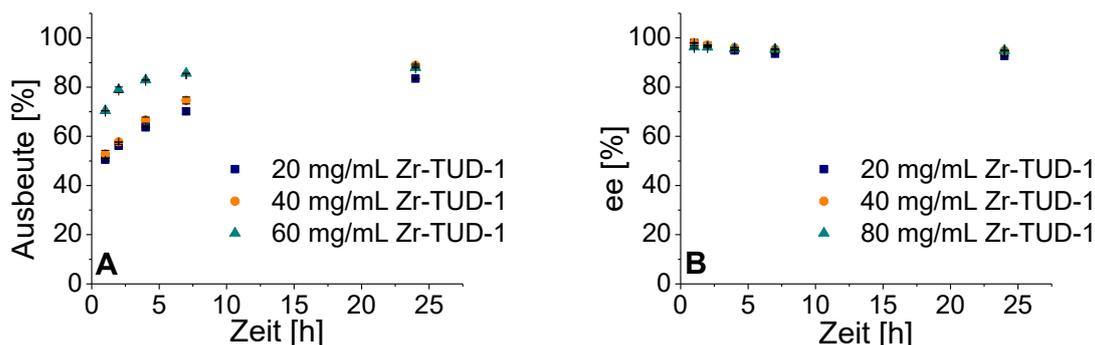


Abbildung 54 Entwicklung der Ausbeute und *ee* von (*R*)-HPP-Butyrat während der DKR von HPP bei einer festen Massenkonzentration von 20 g/mL der immobilisierten CALB und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

In Abbildung 54 sind die zeitlichen Verläufe der Ausbeute an (*R*)-HPP-Butyrat und dessen *ee* zusammengefasst. Es zeigte sich, dass zwischen den Verhältnissen 1:1 und 1:2 hinsichtlich der Ausbeuten der *ee*'s eine geringe Verbesserung beim Verhältnis 1:2 in beiden Fällen erreicht werden konnte. Eine deutliche Steigerung der Ausbeute konnte mit dem Verhältnis von 1:4 erreicht werden. Hierbei konnte die Ausbeute nach 7 h von 70% bei 1:1 und 75% bei 1:2 auf 86% erhöht werden. Eine Verbesserung des *ee* über die Reaktionszeit gegenüber dem Verhältnis 1:2 konnte nicht erreicht werden. Im Enantiomerenüberschuss-Ausbeute-Diagramm (Abbildung 55) wird die Steigerung der DKR-Effizienz durch Wahl des Katalysatorenverhältnisses von 1:4 erneut offensichtlich.

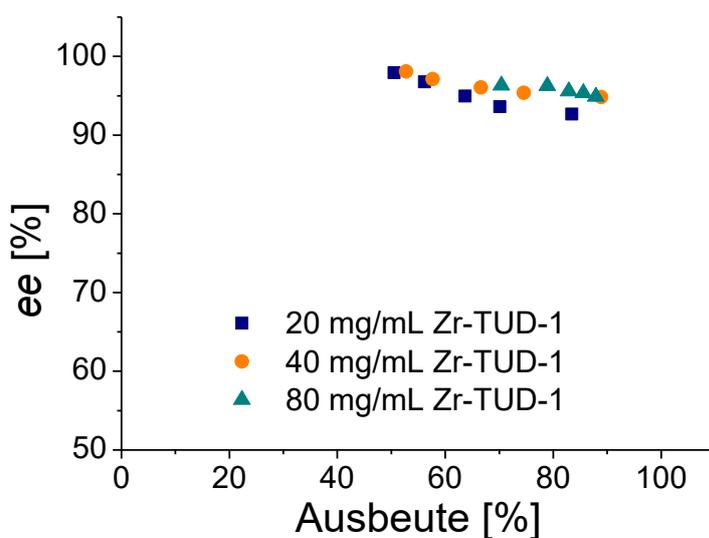


Abbildung 55 Zusammenhang zwischen Enantiomerenüberschuss und Ausbeute von (*R*)-HPP-Butyrat während der DKR von HPP bei einer festen Massenkonzentration der immobilisierten CALB von 20 mg/mL und variierenden Massenkonzentrationen des Zr-TUD-1.

Hinsichtlich des Umsatzes wird die Optimierung der DKR deutlich. So konnte nach 7 h Reaktionszeit ein Umsatz des HPP von 93% bei einem Verhältnis von 1:1, 95% bei 1:2 und 98% bei 1:4 erreicht werden. Der hohe Unterschied zwischen den erwähnten Ausbeuten zu diesem Zeitpunkt weist auf einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an Nebenprodukten hin. In der Analytik wurden beide Enantiomere des PAC, sowie Spuren der Butyrate und des Diketons identifiziert, vermutlich wie in der PAC-DKR durch den Racemisierungsmechanismus. Da die CALB wesentlich selektiver und mit höherer Aktivität das HPP gegenüber dem PAC umsetzt (Daten nicht gezeigt), konnte dadurch interessanterweise eine Abnahme des prozentualen Anteils der Nebenprodukte über die Reaktionszeit beobachtet werden. So konnte beispielsweise die Menge an Nebenprodukt von anfänglich 29% nach einer Stunde auf 14% nach 7 h bei einem Verhältnis von 1:4 verringert werden.

3.5.6 Untersuchung der Umlagerung von PAC und HPP durch den Zr-TUD-1

Wie bereits erwähnt, konnten sowohl in der DKR von PAC, als auch in der DKR von HPP, unabhängig vom verwendeten Biokatalysator, das jeweilig entgegengesetzte Regioisomer und dessen Butyrate als Nebenprodukte identifiziert werden. Als Grund wurde der Mechanismus der Racemisierung durch den Zr-TUD-1 vermutet. Bereits für den homogenen Shvo-Katalysator postulierten Hoyos *et al.* (2011) den Reaktionsmechanismus über das korrespondierende Diketon, wodurch bei asymmetrischen Benzolderivaten das racemische Regioisomer als Nebenprodukt entstehen kann, was teilweise durch den Biokatalysator verestert werden kann. Für das PAC bzw. das HPP würde der Reaktionsmechanismus der Racemisierung am Beispiel des (*R*)-PAC entsprechend der Abbildung 56 ablaufen.

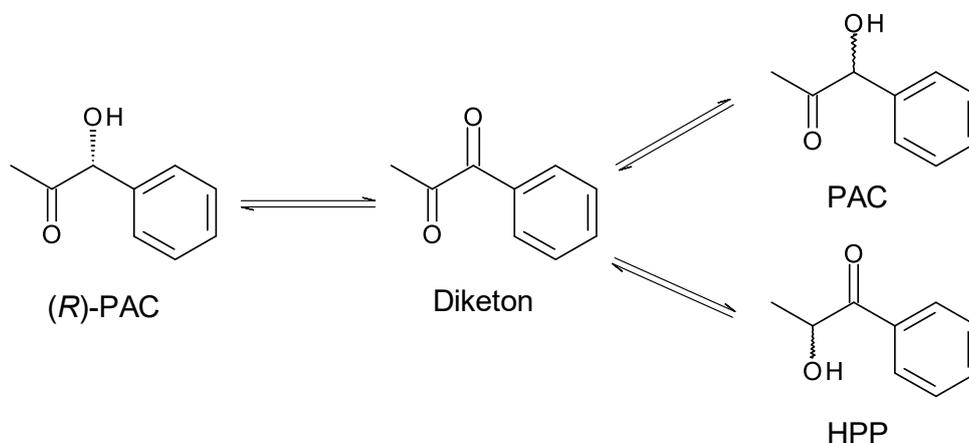


Abbildung 56 Vorgeschlagener Racemisierungsmechanismus des (*R*)-PAC durch den Zr-TUD-1.

Zur Untersuchung der Geschwindigkeit der Umlagerung des HPP bzw. des PAC durch den Zr-TUD-1 wurde die Racemisierung für jedes Substrat mit jeweils 40 mg/mL Zr-TUD-1 in CPME durchgeführt. Es wurden Proben über einen Zeitraum, entsprechend der Reaktionsdauer der PAC- bzw. HPP-DKR, entnommen und der Konzentrationsanteil der Regioisomere ermittelt. Aufgrund der geringen Menge der Enantiomere der Substrate wurde direkt das racemische Substrat eingesetzt und die Konzentrationsanteile direkt auf das Racemat bezogen. Aus den Verläufen in Abbildung 57 wird ersichtlich, dass wie vermutet, der Zr-TUD-1 das jeweils andere Regioisomer herstellen kann. Dabei scheint die Umlagerung im Fall des HPP eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit aufzuweisen. Jedoch konnte dafür keine ausreichende Erklärung gefunden werden. Es kann vermutet werden, dass möglicherweise die Oxidation der Alkoholgruppe aufgrund der benachbarten Methyl-Gruppe schneller abläuft als mit der Phenylgruppe beim PAC.

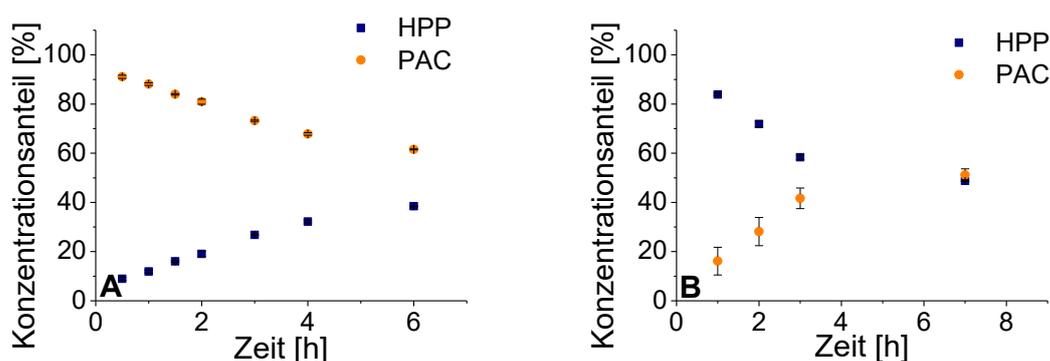


Abbildung 57 Konzentrationsanteile der Regioisomere in der Racemisierung von A: PAC und B: HPP mit dem Zr-TUD-1.

3.5.7 Wiederholung der dynamisch kinetischen Racematspaltung von PAC

Um das Potential einer heterogenen DKR zu zeigen ist insbesondere wiederholte DKR-Ansätze mit Wiederverwendung bzw. Recycling der Katalysatoren eine wichtige Möglichkeit. Auch die Durchführung einer kontinuierlichen DKR in einem CSTR-System ist denkbar. Aufgrund der einfacheren Durchführung von wiederholten DKR-Ansätzen wurde diese Variante ausgewählt. Nieguth (2013) erwähnte, dass schon nach dem ersten Zyklus eines Recyclings eine Abnahme der Enzymaktivität zu erwarten sei. Um diese Abnahme auszugleichen, kann entweder eine definierte Menge an Biokatalysator nach jedem Zyklus hinzugefügt werden oder die Reaktionszeit entsprechend verlängert werden. Für das Recycling der Katalysatoren der Benzoin-DKR wurde in der Studie die zweite Möglichkeit verwendet.

Für die Untersuchung der heterogenen DKR der in dieser Arbeit neu getesteten α -Hydroxyketone wurde das Recycling mit Zyklen mit fester Reaktionsdauer durchgeführt, um den prozentualen Verlust der Enzymaktivität deutlicher darzustellen. Zudem wurde im Gegensatz zu den Studien von Nieguth (2013) nach jedem Zyklus erneut Schlenk-Bedingungen eingestellt um die Menge an Diketon aufgrund des Sauerstoffs in der Atmosphäre möglichst gering zu halten. Als Substrat für die Wiederholung der DKR wurde PAC ausgewählt, da es auf der einen Seite eine wichtige industrielle Anwendung in der Synthese von Pharmazeutika hat und auf der anderen Seite für dessen DKR die in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte LipTL als Biokatalysator eingesetzt wird. Als Reaktionsbedingungen wurde neben den Standardbedingungen die optimierte Massenkonzentration (siehe 3.5.4) gewählt. Als Zyklusdauer wurden 1,5 h gewählt, da eine längere Zyklusdauer nur zu einem geringen Anstieg der Ausbeute mit einem deutlichen Verlust des *ee*'s des Produktes geführt hätte (siehe Abbildung 52).

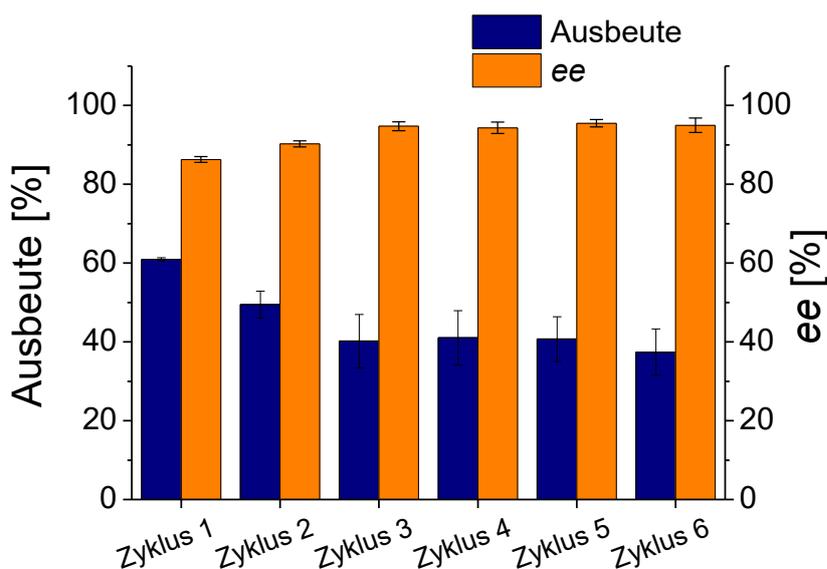


Abbildung 58 Wiederholung der PAC-DKR mit Ausbeute und *ee* des (*S*)-PAC-Butyrates über sechs Zyklen.

Abbildung 58 fasst die Ausbeute an (*S*)-PAC-Butyrat, sowie dessen *ee* über sechs durchgeführte Zyklen zusammen. Es konnte zunächst eine prozentuale Abnahme der Ausbeute über die ersten drei Zyklen von 34%, bezogen auf die maximale Ausbeute im ersten Zyklus beobachtet werden. Diese Ausbeute konnte wiederum über drei Zyklen konstant erreicht werden. Erst im sechsten Zyklus ergab sich eine weitere Abnahme der Ausbeute. Hinsichtlich des *ee* konnte aufgrund der Abnahme der Ausbeute auf der anderen Seite eine Erhöhung beobachtet werden. So konnte für Zyklus 3 bis 6 ein *ee* von 94–95%

bestimmt werden. Als Grund für die Abnahme der maximalen Ausbeute über die durchgeführten Zyklen kann die bekannte Thermolabilität der LipTL und die damit einhergehende Desaktivierung vermutet werden. Eine Desaktivierung des Zr-TUD-1 kann ebenso möglich sein. In einer vorherigen Studie wurde die Rezyklierbarkeit des Katalysators nach Wiederholung der Calcinierung gezeigt (Ramanathan *et al.*, 2006). Diese wurde zwischen den DKR-Zyklen aufgrund der schwierigen Trennbarkeit der zwei Katalysatoren nicht durchgeführt. Ein weiterer Grund könnte in dem Recycling an sich liegen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Aufarbeitungsschritte zwischen den Zyklen Material der Katalysatoren verloren gegangen sein könnte. Es ist denkbar, dass durch die Entfernung des Überstandes feinste Partikel nach jedem Zyklus mit entnommen wurden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass die DKR erfolgreich über 6 Zyklen eingesetzt werden konnte. Um den Verlust der Ausbeute entgegen zu wirken, wäre hier die Erhöhung der Reaktionszeit der einzelnen Zyklen eine mögliche Methode.

3.5.8 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die DKR der in dieser Arbeit ausgewählten α -Hydroxyketone wurde optimiert. Im Falle des Benzoin wurde die bereits in Vorarbeiten optimierte DKR mit der neuen Lösungsmittelalternative CPME durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass CPME eine geeignete Alternative zum Toluol als Standardlösungsmittel ist. Im Vergleich zum 2-MeTHF konnten sowohl der Umsatz, als auch der *ee* des Produktes in CPME verbessert werden. Für die Substrate Furoin, PAC und HPP sind die Umsätze, die Ausbeute und die *ee*'s der Hauptprodukte der DKR unter optimierten Bedingungen in Tabelle 29 zusammengefasst. Für die DKR von Furoin und PAC wurde die LipTL als Biokatalysator und für HPP die CALB eingesetzt. Zur Optimierung wurde jeweils das Verhältnis der immobilisierten Biokatalysatoren zum Zr-TUD-1 verändert. Für Furoin konnte ein optimales Verhältnis von 1:3 bestimmt werden. Für PAC und HPP wurden die besten Ergebnisse mit einem Verhältnis von 1:4 erhalten, jedoch bei unterschiedlichen Massenkonzentrationen. Für PAC war eine Massenkonzentration der immobilisierten LipTL von 10 mg/mL und vom Zr-TUD-1 von 40 mg/mL und für das HPP von 20 mg/mL und 80 mg/mL notwendig.

Tabelle 29 Zusammenfassung der optimierten DKR der α -Hydroxyketone.

Substrat	Katalysator- verhältnis ^a	Reaktionszeit [h]	Umsatz [%]	Ausbeute [%]	<i>ee</i> [%]
Furoin	1:3	4	>99	97	94
PAC	1:4	1,5	87	63	87
HPP	1:4	7	98	86	95

Für die Überprüfung des Potentials der heterogenen DKR für eine Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren wurde die PAC-DKR über sechs Zyklen eingesetzt und die Ausbeute und der *ee* des Produktes (*S*)-PAC-Butyrat untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Katalysatoren über alle Zyklen recycelt werden konnten, jedoch mit einem Verlust der Ausbeute über die ersten drei Zyklen. Ab dem dritten Zyklus konnte eine nahezu konstante Ausbeute erreicht werden. Durch diese geringere Ausbeute in den späteren Zyklen konnte der *ee* des Produktes verbessert werden.

3.6 Co-Immobilisierung von Bio- und Chemokatalysator

3.6.1 Auswahl der Methoden

Neben den bereits ausführlich demonstrierten und diskutierten Vorteilen der Verwendung von heterogenen Katalysatoren, verbleibt der Nachteil, dass in der DKR zwei Katalysatoren benötigt werden, welche sich in der Synthese und Körnchengröße stark unterscheiden können. Letzteres kann insbesondere das gemeinsame Recycling erschweren. Des Weiteren ist für den Biokatalysator ein weiteres Trägermaterial notwendig, was mit erhöhten Kosten einhergeht. Daher rückte in den letzten Jahren die Co-Immobilisierung von Enzymen und Metallkomponenten in den Fokus. Diese als künstliche Metalloenzyme bezeichneten Immobilisate wurden unter anderen ausführlich in der Forschungsgruppe von Prof. Bäckvall untersucht. In den Studien wurde ein Silicaschaum (*engl. mesocellular foam*, MCF) für die Immobilisierung von verschiedenen katalytischen Komponenten verwendet (Engström *et al.*, 2013; Engström *et al.*, 2011; Johnston *et al.*, 2012; Shakeri *et al.*, 2010; Shakeri *et al.*, 2011). So konnte die Lipase A aus *Candida antarctica* erfolgreich in dem MCF immobilisiert werden und in der KR und DKR von β -Aminoesters gemeinsam mit dem Shvo Katalysator (Shakeri *et al.*, 2010) und einem auf Palladium basierendem Nanokatalysator (Engström *et al.*, 2011) eingesetzt werden. Nach der Demonstration, dass die Immobilisierung von Palladiumnanopartikeln in dem MCF möglich ist (Shakeri *et al.*, 2011),

konnte schlussendlich ein künstliches Metalloenzym konstruiert werden (Engström *et al.*, 2013). Dieses bestand aus der CALB und den Palladiumnanopartikeln, die nacheinander auf der amino-funktionalisierten Oberfläche des MCF immobilisiert wurden. Die Lipase wurde dabei kovalent an die Oberfläche gebunden. Dieser Hybridkatalysator konnte anschließend erfolgreich in der DKR von primären Aminen eingesetzt werden, wobei der Umsatz der Reaktion durch Verwendung des Hybridkatalysators gegenüber den einzelnen Katalysatoren gesteigert werden konnte (Engström *et al.*, 2013).

Für die Konstruktion eines Hybridkatalysators für die DKR von α -Hydroxyketonen wurde dieser Ansatz in Betracht gezogen. Der Zr-TUD-1 beruht, wie die MCFs, auf einer Silica-Basis und beide Materialien besitzen Hydroxygruppen auf der Oberfläche (Ramanathan *et al.*, 2008; Shakeri *et al.*, 2011), welche für die Amino-Funktionalisierung verwendet werden können. Der größte Vorteil des Zr-TUD-1 gegenüber den MCFs ist, dass die aktive Metallspezies sich bereits in dessen Silicanezwerk befindet und somit eine zusätzliche Immobilisierung dieser Komponente auf dem Material nicht notwendig ist. Daher wurde der Chemo-Katalysator in dieser Arbeit direkt als Trägermaterial für die Immobilisierung der LipTL verwendet. Für die Immobilisierung wurden zwei Strategien verfolgt. Zum einen wurden die LipTL direkt adsorptiv an den Zr-TUD-1 gebunden. Zum anderen wurde die Zr-TUD-1-Oberfläche, ähnlich den MCFs, zunächst modifiziert und an die eingeführten Aminogruppen die LipTL kovalent gebunden.

3.6.2 Modifizierung der Oberfläche des Zr-TUD-1

Die Amino-Funktionalisierung der Zr-TUD-1-Oberfläche erfolgte nach Literaturangaben (Shakeri *et al.*, 2010) unter Verwendung von 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES, Abbildung 59). Dabei konnte eine Gewichtszunahme der eingesetzten Partikel von rund 10% festgestellt werden. Die Anzahl an zur Verfügung stehenden Aminogruppen und deren Dichte auf der Oberfläche wurde an dieser Stelle nicht vermessen, jedoch können bei der Modifizierung von Oberflächen mit APTES verschiedene Orientierungen des APTES auf der Oberfläche auftreten, die die Eignung des Materials für weitere Schritte beeinflussen können. Neben Mehrfachverknüpfungen und Quervernetzungen zwischen den APTES-Molekülen auf der Oberfläche, können insbesondere die Ausbildung von Multischichten, sowie Wechselwirkungen zwischen den Aminogruppen und den freien Hydroxygruppen die Menge an zur Verfügung stehenden Aminogruppen herabsetzen (Acres *et al.*, 2012).

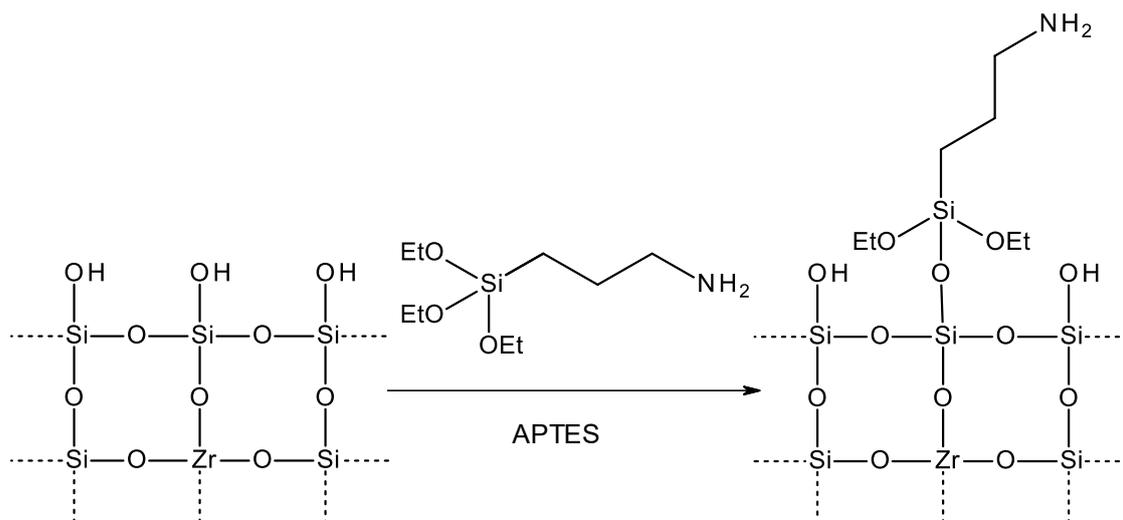


Abbildung 59 Modifizierung der Zr-TUD-1-Oberfläche mittels APTES.

3.6.3 Immobilisierung der LipTL und Charakterisierung der Immobilisate

Für die kovalente Immobilisierung der LipTL auf dem modifizierten Zr-TUD-1 (AP-Zr-TUD-1) musste die Oberfläche zunächst mit Glutaraldehyd aktiviert werden (Abbildung 60). Dies wurde analog zu den bisher verwendeten Trägern mit Aminogruppen (siehe 2.2.3) durchgeführt. Auffällig war dabei die rotbraune Farbe des AP-Zr-TUD-1 nach dem Schritt im Vergleich zu den kommerziellen Trägern, die in der Regel nach der Aktivierung eine rosa bis orangene Farbe aufwiesen. Daher wurde vermutet, dass der AP-Zr-TUD-1 eine wesentlich höhere Dichte der funktionellen Gruppen aufwies. Die anschließende Immobilisierung der LipTL führte letztendlich zu dem Hybridkatalysator.

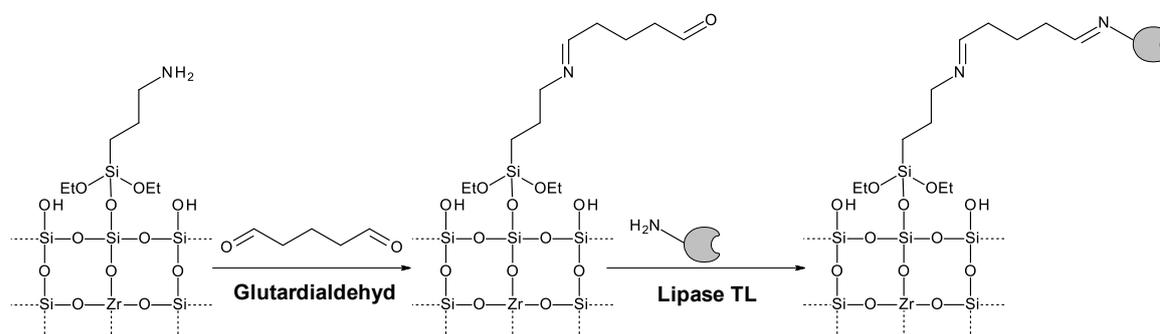


Abbildung 60 Aktivierung der AP-Zr-TUD-1-Oberfläche mit Glutaraldehyd und anschließender kovalenter Immobilisierung der LipTL.

Parallel dazu wurde die LipTL adsorptiv auf der Zr-TUD-1-Oberfläche immobilisiert. Dafür wurde der nicht modifizierte Zr-TUD-1 verwendet und die Immobilisierung nach der Standardmethode für Trägermaterialien für die adsorptive Immobilisierung durchgeführt

(siehe 0). Anschließend wurden die Immobilisate hinsichtlich ihrer Beladung und der Desorptionsstabilität der LipTL charakterisiert (Abbildung 61).

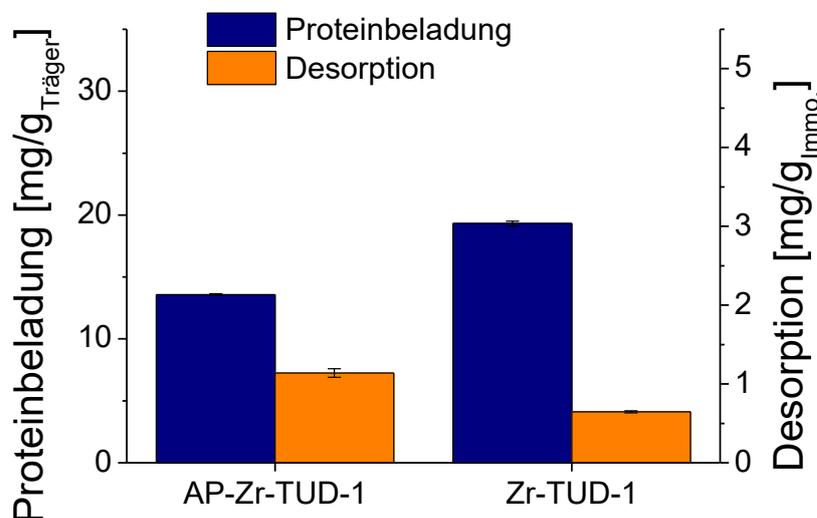


Abbildung 61 Beladung und Desorptionsstabilität der Immobilisat der LipTL auf den Trägern AP-Zr-TUD-1 und Zr-TUD-1.

Mit dem AP-Zr-TUD-1 konnte eine Beladung von 19,3 mg/g_{Träger} erreicht werden. Im Vergleich zu den Beladungen der bisher verwendeten kommerziellen Träger mit Aminofunktionen fällt diese wesentlich geringer aus (siehe 3.1.3). Dies kann auf die Porengröße von 6,9 nm des Zr-TUD-1 (Ramanathan *et al.*, 2006) zurückgeführt werden. Diese ist deutlich kleiner als die Porengröße aller bisher getesteten Träger (siehe 3.1), wohingegen die Oberfläche mit 764 m²/g (Ramanathan *et al.*, 2006) eine Größenordnung größer ist. So ist hierbei eine Unzugänglichkeit großer Teile dieser Oberfläche für die LipTL denkbar. Die Beladung auf dem Zr-TUD-1 lag wiederum in ähnlichen Dimensionen, wie die Beladung auf den bisher getesteten kommerziellen Silica-Trägern (siehe 3.1.2), jedoch fehlen hier Vergleichswerte der Oberflächen. Hinsichtlich der Desorptionsstabilität konnte für alle Immobilisate desorbierte LipTL nachgewiesen werden. Die Menge an desorbiertem Protein im Fall der adsorptivgebundenen Variante unterschied sich dabei wesentlich im Vergleich zu den vorher untersuchten Trägern. So desorbierte vom Zr-TUD-1 8,4% der gebundenen Proteinmenge gegenüber beispielsweise beim Accurel-Immobilisat von 46,4% (siehe 3.1.8). Dies deutet auf eine stabilere Bindung der LipTL auf dem Silica-Material, als auf Polypropylen. Wie bereits diskutiert, unterschieden sich diese Materialien insbesondere in der Hydrophobizität. Während beim Accurel die Adsorption über die hydrophoben Bereiche des Enzyms vollzogen wird, erfolgt bei Silica-Trägern die Immobilisierung

wahrscheinlich eher über die hydrophilen Bereiche der Enzymoberfläche. Im Fall der kovalenten Bindung der LipTL an den AP-Zr-TUD-1 konnte wie erwartet die geringste Menge an desorbiertem Enzym nachgewiesen werden, was erneut auf adsorptiv gebundenes Protein an dem Träger zurückgeführt werden kann.

3.6.4 Dynamisch kinetischen Racematspaltung mit Hybridkatalysator

Durch die gleichzeitige Anwesenheit beider katalytischer Spezies in dem Hybridkatalysator konnte die KR nicht getrennt von der Racemisierung betrachtet werden. Daher wurde der Hybridkatalysator direkt in der DKR von Benzoin als Modellssubstrat eingesetzt und direkt mit dem Standardsystem bestehend aus den zwei einzelnen heterogenen Katalysatoren verglichen. Als Lösungsmittel wurde CPME eingesetzt.

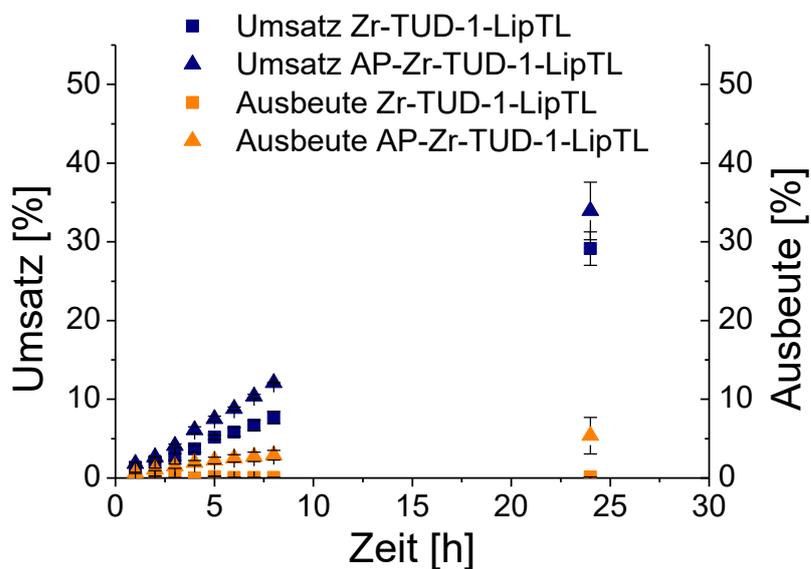


Abbildung 62 DKR von Benzoin mit den Hybridkatalysatoren Zr-TUD-1-LipTL und AP-Zr-TUD-1-LipTL.

Kreis: Umsatz bezogen auf Benzoin, Rechteck: Ausbeute an (*S*)-Benzoinbutyrat.

In Abbildung 62 sind die erhaltenen Umsätze bezogen auf Benzoin, sowie die Ausbeute an (*S*)-Benzoinbutyrat über 24 h in der DKR mit den zwei Hybridkatalysatoren zusammengefasst. Hinsichtlich des Benzoinumsatzes konnte für den Zr-TUD-1-LipTL ein maximaler Umsatz nach 24 h von 29% und für den AP-Zr-TUD-1-LipTL von 34% erreicht werden. Dies erweckt zunächst den Eindruck, dass beide Hybridkatalysatoren in der Lage sind, die Umesterung zu katalysieren. Unter Betrachtung der dazu gehörigen Ausbeuten, wird deutlich, dass das Benzoin nicht ausschließlich zum Ester umgesetzt wurde. So konnte mit dem Zr-TUD-1-LipTL nur eine kaum messbare Ausbeute von 0,2% und mit dem AP-Zr-TUD-1-LipTL von rund 5% erreicht werden. Das bedeutet auf der einen Seite, dass

die LipTL aktiv im Immobilisat AP-Zr-TUD-1-LipTL vorliegt, jedoch scheint die Aktivität relativ gering zu sein, sodass innerhalb der DKR eine deutliche Menge an Nebenprodukt gebildet werden konnte. Ein Grund für die geringe Enzymaktivität kann, neben den bereits diskutierten Gründen des Trägermaterials, der Immobilisierung von Fremdprotein und der Konformationseinschränkung durch die kovalenten Bindungen, insbesondere durch Ausbildung von Mehrfachbindungen aufgrund der vermuteten hohen Dichte an funktionellen Gruppen auf dem AP-Zr-TUD-1 (siehe 3.1.2 und 3.1.3), die Nähe der lewis-sauren Zr^{4+} -Zentren zum Enzym sein. Durch die räumliche Nähe beider Katalysatoren, ist eine Inaktivierung des Enzyms nicht auszuschließen. Dies könnte erklären, warum die kovalent gebundene LipTL eine höhere Ausbeute als die adsorptiv gebundene LipTL aufweist, da im ersten Fall das Enzym durch das APTES und das Glutaraldehyd als Abstandshalter eine größere Entfernung zur Oberfläche des Zr-TUD-1 besitzt. Hinsichtlich der Nebenproduktbildung konnte Benzil, das Diketon vom Benzoin, als einziges Nebenprodukt bestimmt werden. Wie bereits gezeigt, katalysiert der Zr-TUD-1 die Racemisierung von α -Hydroxyketonen stets über das zugehörige Diketon (siehe 1.5 und 3.5.6). In der Regel liegt die Menge an Diketon während der DKR in Spuren vor bzw. bei 1-2%. Bei der Verwendung der Hybridkatalysatoren konnte eine wesentlich höhere Menge an Benzil bestimmt werden (Abbildung 63), Diese lag bei 29% beim Zr-TUD-1-LipTL und bei 28% beim AP-Zr-TUD-1-LipTL nach 24 h. Da es sich bei der Racemisierung um ein Gleichgewicht zwischen dem α -Hydroxyketon und dem zugehörigen Diketon handelt, das α -Hydroxyketon durch die geringe Enzymaktivität nicht aus dem Gleichgewicht entfernt wird, kann dies die deutliche Menge an Diketon im Vergleich zur Standard-DKR erklären.

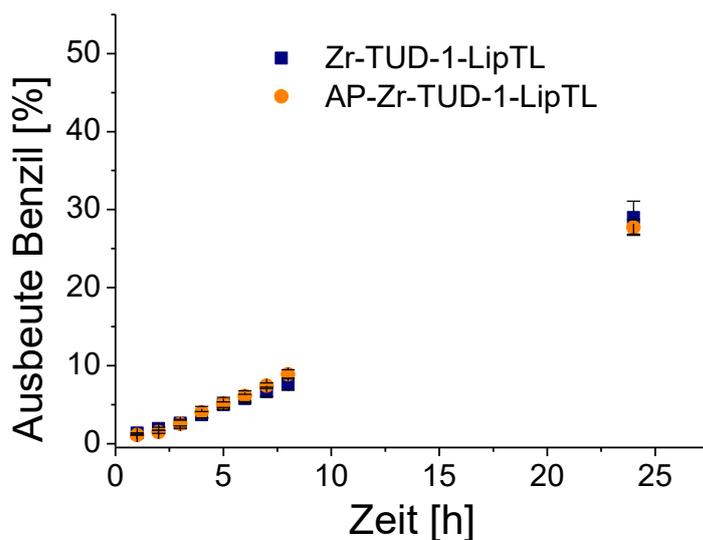


Abbildung 63 Ausbeute von Benzil in der DKR von Benzoin mit den Hybridkatalysatoren Zr-TUD-1-LipTL und AP-Zr-TUD-1-LipTL.

Hinsichtlich des *ee* des eigentlichen Produktes der DKR konnte für den Zr-TUD-1-LipTL ein $ee > 99\%$ während der gesamten Reaktionszeit festgestellt werden. Da aufgrund des sehr geringen Umsatzes mögliche Spuren des (*R*)-Produktes mithilfe der Analytik nicht hätten nachgewiesen werden können, kann dieser *ee* nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Für den *ee* in der DKR mit dem Hybridkatalysator AP-Zr-TUD-1-LipTL ergaben sich überraschenderweise deutlich andere Werte (Abbildung 64).

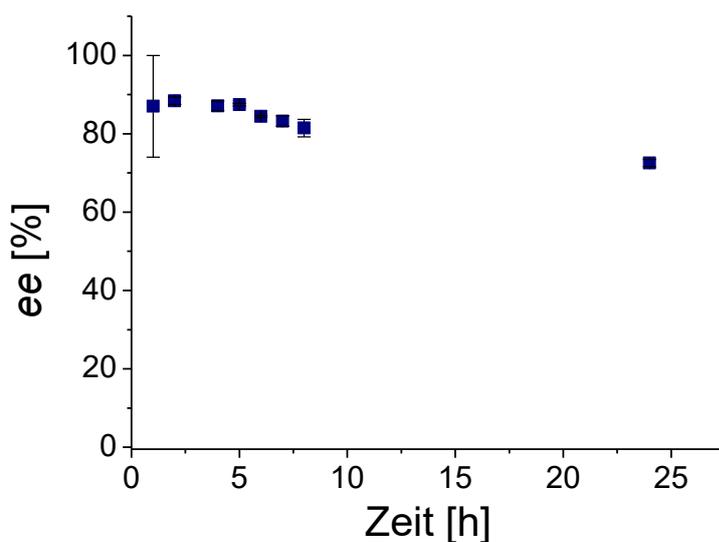


Abbildung 64 Verlauf des *ee* von (*S*)-Benzoinbutyrat während der DKR von Benzoin mit dem Hybridkatalysator AP-Zr-TUD-1-LipTL.

Zunächst wurde ein *ee* von 87% nach einer Stunde bestimmt. Dieser sank im Laufe der DKR kontinuierlich auf 73% ab. Die gebildete Menge an (*R*)-Benzoinbutyrates steht damit mit der bisher beobachteten Enantioselektivität der LipTL im Widerspruch (siehe 3.5.2). Ein Grund könnte die kovalente Bindung der LipTL sein. Wie bereits vermutet, wurde die LipTL an der Oberfläche des AP-Zr-TUD-1 mittels Mehrfachbindungen immobilisiert. Dies könnte möglicherweise zu einer deutlichen Verzerrung der Konformation und damit des aktiven Zentrums geführt haben, wodurch das (*R*)-Benzoin ebenfalls umgesetzt werden konnte.

3.6.5 Zusammenfassung und Bewertung der Ergebnisse

Die Synthese eines Hybridkatalysators wurde untersucht. Hierfür wurden zwei Strategien verfolgt. Die LipTL wurde sowohl adsorptiv, als auch kovalent an den Racemisierungskatalysator Zr-TUD-1 gebunden. Für die kovalente Immobilisierung musste zunächst die Oberfläche mit APTES modifiziert und die dabei entstandenen Aminogruppen mit Glutardialdehyd aktiviert werden. Die dadurch entstandene Gewichtszunahme und Veränderung der Farbe der Partikel wurde dabei als Indikator für eine erfolgreiche Modifikation angesehen. Die nach der Immobilisierung der LipTL erhaltenden Hybridkatalysatoren wurden anschließend in der DKR von Benzoin in CPME eingesetzt. In beiden Fällen konnte ein Umsatz des Benzoins über 24 h verzeichnet werden, jedoch wurde das Benzoin nicht ausschließlich zum Ester umgesetzt. So konnten beim Einsatz der adsorptiv gebundene LipTL nur Spuren des Produktes nachgewiesen werden. Im Fall der kovalent immobilisierten LipTL wurde eine etwas höhere Ausbeute des (*S*)-Benzoinbutyrats von 5% bestimmt. Als Nebenprodukt wurde Benzil identifiziert. Hinsichtlich des *ee* des Hauptproduktes (*S*)-Benzoinbutyrat wurde eine deutliche Abnahme dessen für den Hybridkatalysator AP-ZR-TUD-1-LipTL beobachtet. Im Falle des AP-Zr-TUD-1-LipTL war somit die Synthese theoretisch erfolgreich, da die LipTL aktiv vorlag. Dennoch wurde eine Verzerrung des aktiven Zentrums vermutet, was zu einer Verringerung der Enantioselektivität der LipTL geführt haben könnte. Im Vergleich zum Standardsystem, der Verwendung der einzelnen Katalysatoren, konnte der Hybridkatalysator bisher keine konkurrenzfähigen Ergebnisse liefern, da mit dem Standardsystem innerhalb von 5 h bereits ein vollständiger Umsatz des Benzoins mit einem *ee* von 99% in CPME erreicht werden konnte (siehe 3.5.2). Dennoch bietet das Ergebnis einen erfolgsversprechenden Ansatzpunkt für weitere Optimierungsmöglichkeiten. So könnte die Porengröße des Zr-TUD-1 vergrößert werden durch Verwendung anderer porenformender Komponenten, beispielsweise wie beim Zr-SBA-15 (Do *et al.*, 2012) und MCF (Y. Han *et al.*, 2006) das Pluronic P-123. Die

Variation des Verhältnisses von APTES und Glutardialdehyd zur Menge der Partikel könnte untersucht werden, um den Einfluss der Menge an funktionellen Gruppen auf der Oberfläche des Trägers auf die LipTL zu zeigen. Dies könnte zur Vermeidung von Mehrfachbindungen führen, die als Grund für die geringe Aktivität und Enantioselektivität vermutet wurden. Zur Verbesserung der Leistung des Zr-TUD-1-LipTL könnte eine Modifizierung der Oberfläche des Zr-TUD-1 mit hydrophoben Gruppen mit anschließender adsorptiver Immobilisierung der LipTL durchgeführt werden. Möglich wäre eine Verwendung von Decyltrimethoxysilan, da dieses im Fall der Sol-Gele schon zu einer Hyperaktivierung der LipTL geführt hat (siehe 2.2.6).

4 Zusammenfassung

Die heterogene chemo-enzymatische DKR ist eine effektive Methode zur Darstellung enantiomerenreiner α -Hydroxyketone. Die Eignung der Kombination aus der immobilisierten LipTL und dem Zr-TUD-1 wurde bisher für Benzoin als Substrat demonstriert (Nieguth *et al.*, 2014). Ziel dieser Arbeit war die Übertragung der genannten DKR auf weitere symmetrische und asymmetrische α -Hydroxyketone. Dafür sollte zunächst eine Optimierung der DKR durchgeführt werden. Das optimierte System sollte im Folgendem für weitere ausgewählte α -Hydroxyketone übernommen und gegebenenfalls angepasst werden. Zudem sollte ein Konzept für die Co-Immobilisierung des Bio- und des Chemokatalysators ausgearbeitet und getestet werden.

Zur Optimierung des Biokatalysators, der Lipase TL, wurden verschiedene Methoden zur Immobilisierung untersucht. Für die trägerbasierte Immobilisierung wurden 37 kommerziell erhältliche Träger für eine adsorptive, eine kovalente und eine ionische Immobilisierung ausgewählt. Als Methode zum Einschluss der Lipase in ein Polymer wurden Sol-Gele untersucht. Für alle Immobilisate wurden die Parameter Proteinbeladung und spezifische Aktivität ermittelt. Die höchste spezifische Aktivität und damit eine Hyperaktivierung um den Faktor 4 konnte auf Trägern aus Polypropylen nachgewiesen werden. Nach einigen Optimierungen wurden die vier Träger Accurel, IB-S500, ECR8214 und ECR8417 für die weitere Untersuchung der mechanischen Stabilität des Trägermaterials, der Desorptionsstabilität und der Prozessstabilität des Immobilisates ausgewählt. Die höchste mechanische Stabilität konnte für Träger aus Polypropylen gezeigt werden. Die höchsten Desorptionsstabilitäten ergaben sich für die kovalent immobilisierte LipTL auf den Trägern ECR8214 und ECR8417. Die Prozessstabilität konnte bis auf das ECR8417-Immobilisat durch die Immobilisierung im Vergleich zum Lyophilisat erhöht werden. Letztendlich wurde für die weitere Forschung der Träger Accurel aufgrund seiner Hyperaktivierung, seiner kommerziellen Verfügbarkeit und der zu vernachlässigenden Desorption der LipTL in organischen Lösungsmitteln ausgewählt.

Im nächsten Optimierungsschritt wurde die Wasseraktivität des Reaktionssystems und die Auswirkung auf die Aktivitäten des Bio- und Chemokatalysators, sowie die Prozessstabilität des Biokatalysators untersucht. Die höchste spezifische Aktivität der LipTL konnte dabei bei der geringsten Wasseraktivität erreicht werden. Das Ergebnis wurde in den zwei verwendeten Lösungsmitteln Toluol und 2-MeTHF erhalten. Hinsichtlich der

Prozessstabilität konnte der höchste Wert bei der geringsten Wasseraktivität bestimmt werden. Innerhalb der getesteten Wasseraktivitäten konnte für den Zr-TUD-1 keine Änderung der Aktivität in Toluol beobachtet werden. In 2-MeTHF konnte eine deutliche Abnahme der Aktivität ab einer Wasseraktivität von 0,223 festgestellt werden. Es konnte zudem eine Abhängigkeit der optimalen Wasseraktivität mit der höchsten Aktivität der LipTL von der Substratkonzentration demonstriert werden. Je höher die Substratkonzentration gewählt wurde, desto deutlicher verschob sich die optimale Wasseraktivität von $a_w < 0,02$ zu dem Wert 0,113. Für die weitere Arbeit wurde eine Wasseraktivität von $a_w < 0,02$ festgelegt aufgrund des zu geringen Gewinns der spezifischen Aktivität im Vergleich zur benötigten Vorbereitungszeit zur Einstellung einer definierten Wasseraktivität.

Um die Umweltfreundlichkeit der DKR zu verbessern, wurden als weiterer Optimierungsschritt alternative Lösungsmittel untersucht. Als Lösungsmittelklassen wurden organische Lösungsmittel, ILs und DESs ausgewählt. In allen Lösungsmitteln wurden zunächst die Benzoinlöslichkeit und die spezifische Aktivität der LipTL bestimmt. Mit den geeigneten Kandidaten sollte im Weiteren die Prozessstabilität der LipTL und die Aktivität des Zr-TUD-1 ermittelt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ILs und DESs keine Alternativen darstellen. Im Falle der DESs konnte nur in dem DES ChCl:Iso eine Aktivität bestimmt werden. Bei den alternativen organischen Lösungsmitteln konnte CPME ermittelt werden. In dem Lösungsmittel konnte sowohl die spezifische Aktivität als auch die Prozessstabilität der LipTL gesteigert werden. Auch für den Zr-TUD-1 konnte die Eignung des CPME nachgewiesen werden. Daher wurde CPME als neues alternatives Lösungsmittel für die DKR festgelegt.

Für die Etablierung der optimierten DKR für weitere α -Hydroxyketone wurde zunächst die KR einzeln betrachtet. Als Substrate wurden Furoin, PAC und HPP ausgewählt und die spezifische Aktivität der LipTL, sowie deren Enantioselektivität untersucht. Es konnte eine Abhängigkeit der Aktivität und der Enantioselektivität von der Größe der Substituenten ermittelt werden. So konnten die höchsten Aktivitäten mit den Substraten mit kleinen Resten bestimmt werden. Die höchsten Enantioselektivitäten konnten bei Substraten mit den größten Resten erreicht werden. Von allen getesteten Substraten war die LipTL aufgrund der wesentlich geringeren Enantioselektivität nicht für HPP geeignet. Für alle anderen Substrate konnte eine (*S*)-Selektivität ermittelt werden. Als alternativer Biokatalysator wurde die CALB untersucht. Diese konnte HPP mit einer sehr hohen Enantioselektivität und einer (*R*)-Selektivität umsetzen. Eine zusätzliche Optimierung der

Wasseraktivität des Reaktionssystems ergab die höchste spezifische Aktivität bei der geringsten Wasseraktivität.

Die Etablierung und Optimierung der DKR der ausgewählten α -Hydroxyketone wurde in CPME mit der LipTL für Benzoin, Furoin und PAC und für HPP mit der CALB durchgeführt. Als Wasseraktivität wurde $a_w < 0,02$ festgelegt. Die DKR wurde hinsichtlich des Katalysatorenverhältnisses optimiert. Eine unabhängige Betrachtung der Racemisierung war aufgrund der fehlenden Zugänglichkeit der einzelnen Enantiomere nicht möglich. Die DKRs und deren Optimierungen wurden hinsichtlich der Umsätze, Ausbeute und der *ee*'s der Hauptprodukte untersucht und bewertet. Es konnte festgestellt werden, dass für jedes Substrat ein unterschiedliches Verhältnis der Katalysatoren notwendig war. Die PAC-DKR wurde im Folgendem auf ihre Möglichkeit zum Recycling der Katalysatoren untersucht. Es wurden sechs Zyklen durchgeführt und die Wiederverwendbarkeit der Katalysatoren demonstriert.

Als weiteres Projekt wurde die Co-Immobilisierung des Bio- und des Chemokatalysators untersucht. Dafür wurde die LipTL adsorptiv und kovalent auf dem Zr-TUD-1 immobilisiert. Für die kovalente Immobilisierung wurde zunächst die Oberfläche des Zr-TUD-1 modifiziert. Die Hybridkatalysatoren wurden in der DKR des Modellsubstrates Benzoin eingesetzt. Es konnte in beiden Fällen ein Umsatz mit einer sehr geringen Ausbeute des Hauptproduktes beobachtet werden. Als Nebenprodukte wurden Benzil und für den kovalenten Hybridkatalysator das (*R*)-Produkt identifiziert. Es konnte die prinzipielle Möglichkeit einer Co-Immobilisierung demonstriert werden, jedoch mit deutlichem Optimierungsbedarf.

Die heterogene chemo-enzymatische DKR konnte somit erfolgreich in optimierter Form auf die Substrate Furoin, HPP und PAC übertragen werden. Für HPP musste die LipTL durch die CALB ersetzt werden. Dadurch konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der Zr-TUD-1 auch mit weiteren Lipasen kombinierbar ist. Insgesamt konnte so das Anwendungsspektrum dieser Reaktion um pharmazeutisch wichtige Substrate erweitert werden. Die Verwendung des Hybridkatalysators ergibt einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Forschungen, um die Produktreinigung und die Wiederverwertung der Katalysatoren zu vereinfachen.

5 Literaturverzeichnis

- Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L., & Rasheed, R. K. (2004). Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*, *126*(29), 9142-9147.
- Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Munro, H. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2001). Preparation of novel, moisture-stable, Lewis-acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. *Chem Commun (Camb)*(19), 2010-2011.
- Acres, R. G., Ellis, A. V., Alvino, J., Lenahan, C. E., Khodakov, D. A., Metha, G. F., & Andersson, G. G. (2012). Molecular structure of 3-aminopropyltriethoxysilane layers formed on silanol-terminated silicon surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, *116*(10), 6289-6297.
- Agrawal, S., Martínez-Castro, E., Marcos, R., & Martín-Matute, B. n. (2014). Readily available ruthenium complex for efficient dynamic kinetic resolution of aromatic α -hydroxy ketones. *Organic letters*, *16*(8), 2256-2259.
- Aires-Trapote, A., Hoyos, P., Alcántara, A. s. R., Tamayo, A., Rubio, J., Rumbero, A., & Hernáiz, M. J. (2015). Covalent Immobilization of *Pseudomonas stutzeri* lipase on a porous polymer: an efficient biocatalyst for a scalable production of enantiopure benzoin esters under sustainable conditions. *Organic process research & development*, *19*(7), 687-694.
- Al-Duri, B., & Yong, Y. (2000). Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports. *Biochemical Engineering Journal*, *4*(3), 207-215.
- Allen, J. V., & Williams, J. M. (1996). Dynamic kinetic resolution with enzyme and palladium combinations. *Tetrahedron Letters*, *37*(11), 1859-1862.
- Aoyagi, Y., Agata, N., Shibata, N., Horiguchi, M., & Williams, R. M. (2000). Lipase TL®-mediated kinetic resolution of benzoin: facile synthesis of (1R, 2S)-erythro-2-amino-1, 2-diphenylethanol. *Tetrahedron Letters*, *41*(52), 10159-10162.
- Arai, T., Sato, T., Noguchi, H., Kanoh, H., Kaneko, K., & Yanagisawa, A. (2006). Direct α -hydroxylation of ketones catalyzed by organic-inorganic hybrid polymer. *Chemistry letters*, *35*(10), 1094-1095.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O., & Ottolenghi, M. (1994). Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chemistry of materials*, *6*(10), 1605-1614.
- Baerns, M., Behr, A., Brehm, A., Gmehling, J., Hofmann, H., & Onken, U. (2013). *Technische Chemie*: John Wiley & Sons.
- Basso, A., De Martin, L., Ebert, C., Gardossi, L., & Linda, P. (2000). High isolated yields in thermodynamically controlled peptide synthesis in toluene catalysed by thermolysin adsorbed on Celite R-640. *Chem Commun (Camb)*(6), 467-468. doi: 10.1039/B000797H
- Bell, G., Halling, P. J., Moore, B. D., Partridge, J., & Rees, D. G. (1995). Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends in Biotechnology*, *13*(11), 468-473.
- Bommarius, A. S., Drauz, K., Klenk, H., & Wandrey, C. (1992). Operational stability of enzymes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *672*(1), 126-136.
- Bonde, M., Pontoppidan, H., & Pepper, D. S. (1992). Direct dye binding—a quantitative assay for solid-phase immobilized protein. *Analytical biochemistry*, *200*(1), 195-198.

- Bosley, J. A., & Clayton, J. C. (1994). Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnology and bioengineering*, *43*(10), 934-938.
- Bovara, R., Carrea, G., Ottolina, G., & Riva, S. (1993). Effects of water activity on V_{max} and K_m of lipase catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnol Lett*, *15*(9), 937-942.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Brady, D., & Jordaan, J. (2009). Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett*, *31*(11), 1639.
- Cao, L. (2006). *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*: John Wiley & Sons.
- Carrea, G., & Riva, S. (2000). Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, *39*(13), 2226-2254.
- Cho, C.-W., Preiss, U., Jungnickel, C., Stolte, S., Arning, J. r., Ranke, J., Klamt, A., Krossing, I., & Thöming, J. (2011). Ionic liquids: predictions of physicochemical properties with experimental and/or DFT-calculated LFER parameters to understand molecular interactions in solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, *115*(19), 6040-6050.
- Chowdary, G., & Prapulla, S. (2002). The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification. *Process Biochemistry*, *38*(3), 393-397.
- Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta*, *766*, 61-68. doi: 10.1016/j.aca.2012.12.019
- de Gonzalo, G., Lavandera, I., Durchschein, K., Wurm, D., Faber, K., & Kroutil, W. (2007). Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxy-functionalised water-miscible ionic liquids as solvents. *Tetrahedron: Asymmetry*, *18*(21), 2541-2546. doi: 10.1016/j.tetasy.2007.10.010
- Demir, A. S., Hamamci, H., Sesenoglu, O., Aydogan, F., Capanoglu, D., & Neslihanoglu, R. (2001). Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (R)-2-hydroxypropiofenones. *Tetrahedron: Asymmetry*, *12*(13), 1953-1956.
- Do, D. M., Jaenicke, S., & Chuah, G.-K. (2012). Mesoporous Zr-SBA-15 as a green solid acid catalyst for the Prins reaction. *Catalysis Science & Technology*, *2*(7), 1417-1424.
- Doukyu, N., & Ogino, H. (2010). Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, *48*(3), 270-282. doi: 10.1016/j.bej.2009.09.009
- Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B., Piombo, G., Dubreucq, E., & Villeneuve, P. (2012). Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochemistry*, *47*(12), 2081-2089.
- Durand, E., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2013). Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*(4), 379-385.
- Ebbers, E. J., Ariaans, G. J., Houbiers, J. P., Bruggink, A., & Zwanenburg, B. (1997). Controlled racemization of optically active organic compounds: prospects for asymmetric transformation. *Tetrahedron*, *53*(28), 9417-9476.
- Eckstein, M., Sesing, M., Kragl, U., & Adlercreutz, P. (2002). At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnol Lett*, *24*(11), 867-872.

- Edegger, K., Stampfer, W., Seisser, B., Faber, K., Mayer, S. F., Oehrlein, R., Hafner, A., & Kroutil, W. (2006). Regio- and Stereoselective Reduction of Diketones and Oxidation of Diols by Biocatalytic Hydrogen Transfer. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006(8), 1904-1909.
- El Gihani, M. T., & Williams, J. M. (1999). Dynamic kinetic resolution. *Curr Opin Chem Biol*, 3(1), 11-15.
- Enders, D., & Kallfass, U. (2002). An efficient nucleophilic carbene catalyst for the asymmetric benzoin condensation. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(10), 1743-1745.
- Engström, K., Johnston, E. V., Verho, O., Gustafson, K. P., Shakeri, M., Tai, C. W., & Bäckvall, J. E. (2013). Co-immobilization of an Enzyme and a Metal into the Compartments of Mesoporous Silica for Cooperative Tandem Catalysis: An Artificial Metalloenzyme. *Angewandte Chemie*, 125(52), 14256-14260.
- Engström, K., Shakeri, M., & Bäckvall, J. E. (2011). Dynamic Kinetic Resolution of β -Amino Esters by a Heterogeneous System of a Palladium Nanocatalyst and *Candida antarctica* Lipase A. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011(10), 1827-1830.
- Erbeldinger, M., Mesiano, A. J., & Russell, A. J. (2000). Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid— An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnology progress*, 16(6), 1129-1131.
- Eş, I., Vieira, J. D. G., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(5), 2065-2082.
- Fauré, N., & Illanes, A. (2011). Immobilization of *Pseudomonas stutzeri* lipase for the transesterification of wood sterols with fatty acid esters. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(5-6), 1332-1341.
- Findeisen, A., Thum, O., & Ansorge-Schumacher, M. (2014). Biocatalytically active silCoat-composites entrapping viable *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98(4), 1557-1566.
- Fragnelli, M. C., Hoyos, P., Romano, D., Gandolfi, R., Alcántara, A. R., & Molinari, F. (2012). Enantioselective reduction and deracemisation using the non-conventional yeast *Pichia glucozyma* in water/organic solvent biphasic systems: preparation of (S)-1, 2-diaryl-2-hydroxyethanones (benzoin). *Tetrahedron*, 68(2), 523-528.
- Goderis, H., Ampe, G., Feyten, M., Fouwe, B., Guffens, W., Van Cauwenbergh, S., & Tობback, P. (1987). Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity. *Biotechnology and bioengineering*, 30(2), 258-266.
- Gorke, J. T., Srienc, F., & Kazlauskas, R. J. (2008). Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem Commun (Camb)*(10), 1235-1237.
- Gorke, J. T., Srienc, F., & Kazlauskas, R. J. (2010). Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15(1), 40-53. doi: 10.1007/s12257-009-3079-z
- Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of research of the national Bureau of Standards, A. Physics and Chemistry A*, 81, 89-96.
- Hahn-Hägerdal, B. (1986). Water activity: a possible external regulator in biotechnical processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(6), 322-327.
- Hailes, H. C., Rother, D., Müller, M., Westphal, R., Ward, J. M., Pleiss, J., Vogel, C., & Pohl, M. (2013). Engineering stereoselectivity of ThDP-dependent enzymes. *The FEBS Journal*, 280(24), 6374-6394.
- Halling, P. J. (1992). Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnology Techniques*, 6(3), 271-276.

- Halling, P. J. (1994). Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(3), 178-206.
- Han, D., & Row, K. H. (2010). Recent applications of ionic liquids in separation technology. *Molecules*, 15(4), 2405-2426.
- Han, Y., Lee, S. S., & Ying, J. Y. (2006). Pressure-driven enzyme entrapment in siliceous mesocellular foam. *Chemistry of materials*, 18(3), 643-649.
- Hanefeld, U., Gardossi, L., & Magner, E. (2009). Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev*, 38(2), 453-468.
- Hansch, C., Heller, S. R., & Leo, A. (1995). *Exploring Qsar (Hydrophobic, Electronic & Steric Constants)*: American Chemical Society.
- Herr, N., Ratzka, J., Lauterbach, L., Lenz, O., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2013). Stability enhancement of an O₂-tolerant NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase by a combination of immobilisation and chemical modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 169-174.
- Hoyos, P., Buthe, A., Ansorge-Schumacher, M. B., Sinisterra, J. V., & Alcántara, A. R. (2008). Highly efficient one pot dynamic kinetic resolution of benzoin with entrapped *Pseudomonas stutzeri* lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 52-53, 133-139.
- Hoyos, P., Fernández, M., Sinisterra, J. V., & Alcántara, A. R. (2006). Dynamic kinetic resolution of benzoin by lipase-metal combo catalysis. *J Org Chem*, 71(20), 7632-7637.
- Hoyos, P., Pace, V., Sinisterra, J. V., & Alcántara, A. R. (2011). Chemoenzymatic synthesis of chiral unsymmetrical benzoin esters. *Tetrahedron*, 67(38), 7321-7329.
- Hoyos, P., Quezada, M. A., Sinisterra, J. V., & Alcántara, A. R. (2011). Optimised Dynamic Kinetic Resolution of benzoin by a chemoenzymatic approach in 2-MeTHF. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 72(1-2), 20-24.
- Hoyos, P., Sinisterra, J.-V., Molinari, F., Alcántara, A. s. R., & Domínguez de María, P. (2009). Biocatalytic strategies for the asymmetric synthesis of α -hydroxy ketones. *Accounts of chemical research*, 43(2), 288-299.
- Huddleston, J. G., Visser, A. E., Reichert, W. M., Willauer, H. D., Broker, G. A., & Rogers, R. D. (2001). Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chemistry*, 3(4), 156-164.
- Jakoblinnert, A., Mladenov, R., Paul, A., Sibilla, F., Schwaneberg, U., Ansorge-Schumacher, M. B., & de Maria, P. D. (2011). Asymmetric reduction of ketones with recombinant *E. coli* whole cells in neat substrates. *Chem Commun (Camb)*, 47(44), 12230-12232. doi: 10.1039/c1cc14097c
- Jeon, N. Y., Ko, S.-J., Lee, Y. S., Kim, B. T., Won, K., & Lee, H. (2007). Synthesis of optically pure halogenated phenyl 2-hydroxypropanones by lipase-catalyzed enantioselective transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 48(1), 38-41.
- Johnston, E. V., Verho, O., Kärkäs, M. D., Shakeri, M., Tai, C. W., Palmgren, P., Eriksson, K., Oscarsson, S., & Bäckvall, J. E. (2012). Highly dispersed palladium nanoparticles on mesocellular foam: an efficient and recyclable heterogeneous catalyst for alcohol oxidation. *Chemistry—A European Journal*, 18(39), 12202-12206.
- Khmelnitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V., & Martinek, K. (1991). Denaturation capacity: a new quantitative criterion for selection of organic solvents as reaction media in biocatalysis. *The FEBS Journal*, 198(1), 31-41.
- Kragl, U., Eckstein, M., & Kaftzik, N. (2002). Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(6), 565-571.

- Kumar Alamsetti, S., Muthupandi, P., & Sekar, G. (2009). Chiral Cobalt-Catalyzed Enantiomer-Differentiating Oxidation of Racemic Benzoin by Using Molecular Oxygen as Stoichiometric Oxidant. *Chemistry-a European Journal*, 15(22), 5424-5427.
- Kvittingen, L. (1994). Some aspects of biocatalysis in organic solvents. *Tetrahedron*, 50(28), 8253-8274.
- Larsson, A. L., Persson, B. A., & Bäckvall, J. E. (1997). Enzymatic Resolution of Alcohols Coupled with Ruthenium-Catalyzed Racemization of the Substrate Alcohol. *Angewandte Chemie International Edition*, 36(11), 1211-1212.
- Lee, J. H., Kim, S. B., Park, C., & Kim, S. W. (2010). Effect of a buffer mixture system on the activity of lipases during immobilization process. *Bioresource technology*, 101(1), S66-S70.
- Lee, J. K., & Kim, M.-J. (2002). Ionic liquid-coated enzyme for biocatalysis in organic solvent. *J Org Chem*, 67(19), 6845-6847.
- Léonard-Nevers, V., Marton, Z., Lamare, S., Hult, K., & Graber, M. (2009). Understanding water effect on *Candida antarctica* lipase B activity and enantioselectivity towards secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59(1), 90-95.
- Loderer, C., & Ansorge-Schumacher, M. (2015). Enzyme-catalysed regio- and enantioselective preparative scale synthesis of (S)-2-hydroxy alkanones. *RSC Advances*, 5(48), 38271-38276.
- Lozano, P., de Diego, T., Carrié, D., Vaultier, M., & Iborra, J. L. (2001). Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol Lett*, 23(18), 1529-1533.
- Lozano, P., de Diego, T., Guegan, J. P., Vaultier, M., & Iborra, J. L. (2001). Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnology and bioengineering*, 75(5), 563-569.
- Ma, L., Persson, M., & Adlercreutz, P. (2002). Water activity dependence of lipase catalysis in organic media explains successful transesterification reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 1024-1029.
- MacFarlane, D. R., Golding, J., Forsyth, S., Forsyth, M., & Deacon, G. B. (2001). Low viscosity ionic liquids based on organic salts of the dicyanamide anion. *Chem Commun (Camb)*(16), 1430-1431.
- Madeira Lau, R., Van Rantwijk, F., Seddon, K., & Sheldon, R. (2000). Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic letters*, 2(26), 4189-4191.
- Maraite, A., Hoyos, P., Carballeira, J. D., Cabrera, Á. C., Ansorge-Schumacher, M. B., & Alcántara, A. R. (2013). Lipase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification, homology modelling and rational explanation of the substrate binding mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 88-98.
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., & Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451-1463.
- Mateo, C., Torres, R., Fernández-Lorente, G., Ortiz, C., Fuentes, M., Hidalgo, A., López-Gallego, F., Abian, O., Palomo, J. M., & Betancor, L. (2003). Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method. *Biomacromolecules*, 4(3), 772-777.
- Maugeri, Z., & Domínguez de María, P. (2012). Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Advances*, 2(2), 421-425.
- Maugeri, Z., & Domínguez de María, P. (2014a). Benzaldehyde lyase (BAL)-catalyzed enantioselective C-C bond formation in deep-eutectic-solvents-buffer mixtures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 107, 120-123.

- Maugeri, Z., & Domínguez de María, P. (2014b). Whole-Cell Biocatalysis in Deep-Eutectic-Solvents/Aqueous Mixtures. *ChemCatChem*, 6(6), 1535-1537.
- Maugeri, Z., Leitner, W., & Domínguez de María, P. (2013). Chymotrypsin-Catalyzed Peptide Synthesis in Deep Eutectic Solvents. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(20), 4223-4228. doi: 10.1002/ejoc.201300448
- Mine, Y., Zhang, L., Fukunaga, K., & Sugimura, Y. (2005). Enhancement of enzyme activity and enantioselectivity by cyclopentyl methyl ether in the transesterification catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase co-lyophilized with cyclodextrins. *Biotechnol Lett*, 27(6), 383-388.
- Minovska, V., Winkelhausen, E., & Kuzmanova, S. (2005). Lipase immobilized by different techniques on various support materials applied in oil hydrolysis. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 70(4), 609-624.
- Moscoso, R., Carbajo, J., & Squella, J. (2014). 1, 3-Dioxolane: A green solvent for the preparation of carbon nanotube-modified electrodes. *Electrochemistry Communications*, 48, 69-72.
- Müller, C. R., Meiners, I., & Domínguez de María, P. (2014). Highly enantioselective tandem enzyme–organocatalyst crossed aldol reactions with acetaldehyde in deep-eutectic-solvents. *RSC Advances*, 4(86), 46097-46101.
- Murty, V. R., Bhat, J., & Muniswaran, P. (2002). Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: a review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(2), 57-66.
- Muthupandi, P., Alamsetti, S. K., & Sekar, G. (2009). Chiral iron complex catalyzed enantioselective oxidation of racemic benzoin. *Chem Commun (Camb)*(22), 3288-3290.
- Nakaoki, T., Mei, Y., Miller, L. M., Kumar, A., Kalra, B., Miller, M. E., Kirk, O., Christensen, M., & Gross, R. A. (2005). *Candida antarctica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: effects of immobilization matrices on polymerization kinetics & molecular weight. *Industrial Biotechnology*, 1(2), 126-134.
- Nestl, B. M., Bodlenner, A., Stuermer, R., Hauer, B., Kroutil, W., & Faber, K. (2007). Biocatalytic racemization of synthetically important functionalized α -hydroxyketones using microbial cells. *Tetrahedron: Asymmetry*, 18(12), 1465-1474. doi: 10.1016/j.tetasy.2007.06.005
- Nieguth, R. (2013). *Entwicklung einer robusten chemo-enzymatisch dynamisch kinetischen Racematspaltung für die nachhaltige Synthese chiraler α -Hydroxyketone*. (Dissertation), Technische Universität Berlin, Berlin. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.14279/depositonce-3554>
- Nieguth, R., Eckstein, M., Wiemann, L. O., Thum, O., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2011). Enabling Industrial Biocatalytic Processes by Application of Silicone-Coated Enzyme Preparations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353(13), 2522-2528.
- Nieguth, R., ten Dam, J., Petrenz, A., Ramanathan, A., Hanefeld, U., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2014). Combined heterogeneous bio-and chemo-catalysis for dynamic kinetic resolution of (rac)-benzoin. *RSC Advances*, 4(85), 45495-45503.
- Nini, L., Sarda, L., Comeau, L.-C., Boitard, E., Dubès, J.-P., & Chahinian, H. (2001). Lipase-catalysed hydrolysis of short-chain substrates in solution and in emulsion: a kinetic study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1534(1), 34-44.
- Ogino, H., & Ishikawa, H. (2001). Enzymes which are stable in the presence of organic solvents. *Journal of bioscience and bioengineering*, 91(2), 109-116.
- Okrasa, K., Guibé-Jampel, E., & Therisod, M. (2003). Ionic liquids as a new reaction medium for oxidase–peroxidase-catalyzed sulfoxidation. *Tetrahedron: Asymmetry*, 14(17), 2487-2490.

- Onomura, O., Arimoto, H., Matsumura, Y., & Demizu, Y. (2007). Asymmetric oxidation of 1, 2-diols using N-bromosuccinimide in the presence of chiral copper catalyst. *Tetrahedron Letters*, 48(49), 8668-8672.
- Oshima, T., Fujiwara, I., & Baba, Y. (2015). Extraction Behavior of Metal Ions Using D2EHPA in Cyclopentyl Methyl Ether. *Solvent Extraction Research and Development, Japan*, 22(2), 119-125.
- Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents—solvents for the 21st century. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(5), 1063-1071.
- Park, S., & Kazlauskas, R. J. (2001). Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J Org Chem*, 66(25), 8395-8401.
- Patel, R., Kumari, M., & Khan, A. B. (2014). Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: a review. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 3701-3720.
- Pavlidis, I. V., Gournis, D., Papadopoulos, G. K., & Stamatidis, H. (2009). Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 60(1), 50-56.
- Peper, S., Kara, S., Long, W. S., Liese, A., & Niemeyer, B. (2011). Immobilization and characterization of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* on spherical silica carrier. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(6), 671-680.
- Petrenz, A., de María, P. D., Ramanathan, A., Hanefeld, U., Ansorge-Schumacher, M. B., & Kara, S. (2015). Medium and reaction engineering for the establishment of a chemo-enzymatic dynamic kinetic resolution of rac-benzoin in batch and continuous mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 114, 42-49.
- Pirozzi, D., & Greco, G. (2004). Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(2), 94-100.
- Plietker, B. (2005). The RuO₄-Catalyzed Ketohydroxylation, Part II: A Regio-, Chemo- and Stereoselectivity Study. *European Journal of Organic Chemistry*, 2005(9), 1919-1929.
- Ramanathan, A., Castro Villalobos, M. C., Kwakernaak, C., Telalovic, S., & Hanefeld, U. (2008). Zr-TUD-1: A Lewis Acidic, Three-Dimensional, Mesoporous, Zirconium-Containing Catalyst. *Chemistry-a European Journal*, 14(3), 961-972.
- Ramanathan, A., Klomp, D., Peters, J. A., & Hanefeld, U. (2006). Zr-TUD-1: A novel heterogeneous catalyst for the Meerwein-Ponndorf-Verley reaction. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 260(1), 62-69.
- Reetz, M. T. (1997). Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Advanced Materials*, 9(12), 943-954. doi: 10.1002/adma.19970091203
- Reetz, M. T., & Schimossek, K. (1996). Lipase-catalyzed dynamic kinetic resolution of chiral amines: use of palladium as the racemization catalyst. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 50(12), 668-669.
- Reetz, M. T., Tielmann, P., Wiesenhöfer, W., Könen, W., & Zonta, A. (2003). Second Generation Sol-Gel Encapsulated Lipases: Robust Heterogeneous Biocatalysts. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 345(6-7), 717-728. doi: 10.1002/adsc.200303016
- Reetz, M. T., Zonta, A., & Simpelkamp, J. (1995). Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34(3), 301-303.
- Reetz, M. T., Zonta, A., & Simpelkamp, J. (1996). Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. *Biotechnology and bioengineering*, 49(5), 527-534.

- Reichardt, C. (2005). Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chemistry*, 7(5), 339-351.
- Sabbani, S., Hedenström, E., & Nordin, O. (2006). The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42(1), 1-9.
- Sate, D., Janssen, M. H., Stephens, G., Sheldon, R. A., Seddon, K. R., & Lu, J. R. (2007). Enzyme aggregation in ionic liquids studied by dynamic light scattering and small angle neutron scattering. *Green Chemistry*, 9(8), 859-867.
- Sehl, T., Bock, S., Marx, L., Maugeri, Z., Walter, L., Westphal, R., Vogel, C., Menyes, U., Erhardt, M., & Müller, M. (2017). Asymmetric synthesis of (S)-phenylacetylcarbinol—closing a gap in C–C bond formation. *Green Chemistry*, 19, 380-384.
- Sehl, T., Maugeri, Z., & Rother, D. (2015). Multi-step synthesis strategies towards 1, 2-amino alcohols with special emphasis on phenylpropanolamines. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 114, 65-71.
- Séverac, E., Galy, O., Turon, F., Pantel, C. A., Condoret, J.-S., Monsan, P., & Marty, A. (2011). Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: analysis of the economical impact. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(1), 61-70.
- Shakeri, M., Engström, K., Sandström, A. G., & Bäckvall, J. E. (2010). Highly Enantioselective Resolution of β -Amino Esters by *Candida antarctica* Lipase A Immobilized in Mesocellular Foam: Application to Dynamic Kinetic Resolution. *ChemCatChem*, 2(5), 534-538.
- Shakeri, M., Tai, C. w., Göthelid, E., Oscarsson, S., & Bäckvall, J. E. (2011). Small Pd nanoparticles supported in large pores of mesocellular foam: an excellent catalyst for racemization of amines. *Chemistry-a European Journal*, 17(47), 13269-13273.
- Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA® s): stable and recyclable biocatalysts: Portland Press Limited.
- Sheldon, R. A. (2012). Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem Soc Rev*, 41(4), 1437-1451.
- Sheldon, R. A., Lau, R. M., Sorgedraeger, M. J., van Rantwijk, F., & Seddon, K. R. (2002). Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry*, 4(2), 147-151. doi: 10.1039/b110008b
- Singer, S. (1963). The properties of proteins in nonaqueous solvents. *Advances in protein chemistry*, 17, 1-68.
- Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep eutectic solvents (DESs) and their applications. *Chemical Reviews*, 114(21), 11060-11082.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Stecher, H., Felfer, U., & Faber, K. (1997). Large-scale production of Mandelate racemase by *Pseudomonas putida* ATCC 12633: optimization of enzyme induction and development of a stable crude enzyme preparation. *J Biotechnol*, 56(1), 33-40.
- Stillger, T., Pohl, M., Wandrey, C., & Liese, A. (2006). Reaction Engineering of Benzaldehyde Lyase from *Pseudomonas fluorescens* Catalyzing Enantioselective C–C Bond Formation. *Organic process research & development*, 10(6), 1172-1177.
- Svensson, I., Wehtje, E., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1994). Effects of water activity on reaction rates and equilibrium positions in enzymatic esterifications. *Biotechnology and bioengineering*, 44(5), 549-556.

- Torres, R., Ortiz, C., Pessela, B. C., Palomo, J. M., Mateo, C., Guisán, J. M., & Fernández-Lafuente, R. (2006). Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. *Enzyme and Microbial Technology*, *39*(2), 167-171.
- Toukoniitty, E., Mäki-Arvela, P., Kuzma, M., Villela, A., Neyestanaki, A. K., Salmi, T., Sjöholm, R., Leino, R., Laine, E., & Murzin, D. Y. (2001). Enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1, 2-propanedione. *Journal of Catalysis*, *204*(2), 281-291.
- Trivedi, A., Heinemann, M., Spiess, A. C., Daussmann, T., & Büchs, J. (2005). Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases. *Journal of bioscience and bioengineering*, *99*(4), 340-347.
- Valivety, R. H., Halling, P. J., & Macrae, A. R. (1992). Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, *1118*(3), 218-222.
- Watanabe, K., Yamagiwa, N., & Torisawa, Y. (2007). Cyclopentyl methyl ether as a new and alternative process solvent. *Organic process research & development*, *11*(2), 251-258.
- Wehtje, E., & Adlercreutz, P. (1997). Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnology and bioengineering*, *55*(5), 798-806.
- Wehtje, E., Svensson, I., Adlercreutz, P., & Mattiasson, B. (1993). Continuous control of water activity during biocatalysis in organic media. *Biotechnology Techniques*, *7*(12), 873-878.
- Wiemann, L. O. (2010). *Entwicklung stabiler Enzympräparate zur Verwendung als industrielle Biokatalysatoren*. (Dissertation), Technische Universität Berlin, Berlin. Retrieved from <https://www.depositonce.tu-berlin.de/handle/11303/2930>
- Wiemann, L. O., Nieguth, R., Eckstein, M., Naumann, M., Thum, O., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2009). Composite particles of novozyme 435 and silicone: advancing technical applicability of macroporous enzyme carriers. *ChemCatChem*, *1*(4), 455-462.
- Yamamoto, K., Oishi, K., Fujimatsu, I., & Komatsu, K. (1991). Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Applied and environmental microbiology*, *57*(10), 3028-3032.
- Yang, Z., & Pan, W. (2005). Ionic liquids: Green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme and Microbial Technology*, *37*(1), 19-28.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1984). Enzymatic catalysis in organic media at 100 degrees C. *Science*, *224*, 1249-1252.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(10), 3192-3196.
- Zaks, A., & Klibanov, A. M. (1988). The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry*, *263*(17), 8017-8021.
- Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jerome, F. (2012). Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem Soc Rev*, *41*(21), 7108-7146. doi: 10.1039/c2cs35178a
- Zhao, D., Wu, M., Kou, Y., & Min, E. (2002). Ionic liquids: applications in catalysis. *Catalysis today*, *74*(1), 157-189.
- Zhao, H., Baker, G. A., & Holmes, S. (2011). New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org Biomol Chem*, *9*(6), 1908-1916.
- Zhao, H., Zhang, C., & Crittle, T. D. (2013). Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *85*, 243-247.

Anhang A: Publikationen

Nieguth, R., ten Dam, J., Petrenz, A., Ramanathan, A., Hanefeld, U., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2014). Combined heterogeneous bio-and chemo-catalysis for dynamic kinetic resolution of (rac)-benzoin. *RSC Advances*, 4(85), 45495-45503.

Petrenz, A., Domínguez de María, P., Ramanathan, A., Hanefeld, U., Kara, S., & Ansorge-Schumacher, M. B. (2014). Chemo-enzymatische heterogenkatalysierte Eintopfsynthese von enantiomerenreinem Benzoin. *Chemie Ingenieur Technik*, 86(9), 1488-1488.

Petrenz, A., de María, P. D., Ramanathan, A., Hanefeld, U., Ansorge-Schumacher, M. B., & Kara, S. (2015). Medium and reaction engineering for the establishment of a chemo-enzymatic dynamic kinetic resolution of rac-benzoin in batch and continuous mode. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 114, 42-49.

Petrenz-Beck, A., Kühn, J., Zuhse, R. & Ansorge-Schumacher, M. B. (2018). Chemo-enzymatic dynamic kinetic resolution of symmetric and non-symmetric α -hydroxy ketones for industrial application. (in preparation).

Anhang B: Versicherungen

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Technischen Universität Dresden an der Professur für Molekulare Biotechnologie unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Marion B. Ansorge-Schumacher angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass keine früheren erfolglosen Promotionsverfahren stattgefunden haben.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Technische Universität Dresden an.

Ort, Datum

Unterschrift