

Entwicklung einer robusten chemo-enzymatisch dynamisch kinetischen Racematspaltung für die nachhaltige Synthese chiraler α -Hydroxyketone

vorgelegt von
Master of Science Biotechnologie
René Nieguth
aus Frankfurt (Oder)

Von der Fakultät II – Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Michael Kneissl
Berichtender:	Prof. Dr. Reinhard Schomäcker
Berichtende:	Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.04.2013

Berlin 2013

D83

Danksagung

Diese Arbeit entstand im Rahmen meiner Zeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TU Berlin am Lehrstuhl für Technische Chemie in der Arbeitsgruppe Enzymtechnologie.

Bei Frau Prof. Dr. Marion Ansorge-Schumacher möchte ich mich herzlichst für die Überlassung des interessanten Themas, ihr großes Vertrauen in mich und ihre exzellente Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken. Für die Übernahme des Referats danke ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Schomäcker, der die TU Berlin durch seine Kompetenz und seine offene Art oft sehr viel einfacher macht.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ulf Hanefeld für die Bereitstellung der TUD-1 Katalysatoren, die einen Grundstein der Ergebnisse dieser Arbeit legten und für die stete und freundliche Diskussionsbereitschaft.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich bei Patrick Enssle, Annika Petrenz, Stephan Spindler, Viktoria Janzer, Geneviève Rey und Constanze Heise, die im Rahmen von Master-, Diplom-, Praktikumsarbeiten oder als Hiwi bzw. Auszubildende großen Anteil am Entstehen dieser Arbeit hatten und durch die die Laborzeit nie langweilig wurde.

Mit Freude möchte ich mich natürlich auch bei meinen einzigartigen Kollegen für die großartige Zeit im Institut und bei lustigen Feierabenden bedanken. Ich danke dabei besonders Alexander Scholz und Andy Maraite, die zwei wirklich tolle Bürokollegen waren. Michel Geiger gilt ebenso Dank für die Hilfe im Labor, der unterhaltsamen Bib-Tage und für die „Bananen im Keller“.

Abschließend gehört aber das größte „Dankeschön“ meiner lieben Familie!

Danke für die jahrelange und uneingeschränkte Unterstützung, eure Liebe und Rückhalt.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<i>VII</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>VIII</i>
1 Einleitung	1
1.1 <i>Enzyme in organischen Lösungsmitteln</i>	1
1.2 <i>Immobilisierung von Enzymen</i>	3
1.3 <i>Maßnahmen zur Erhöhung der Aktivität und Stabilität von Enzymen in der chemischen Synthese</i>	6
1.4 <i>Bedeutung und Syntheserouten chiraler α-Hydroxyketone</i>	10
1.5 <i>Dynamisch kinetische Racematspaltung</i>	15
1.6 <i>Problemstellung und Zielsetzung</i>	20
2 Material und Methoden	22
2.1 <i>Material</i>	22
2.1.1 <i>Chemikalien</i>	22
2.1.2 <i>Geräte</i>	23
2.2 <i>Methoden</i>	24
2.2.1 <i>Immobilisierung der Lipase TL</i>	24
2.2.2 <i>Herstellung der statischen Suspensionen mit der Lipase TL</i>	24
2.2.3 <i>Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford</i>	25
2.2.4 <i>Bestimmung der spezifischen Aktivität</i>	25
2.2.5 <i>Silikonbeschichtung der Lipase TL-Immobilisate</i>	26
2.2.6 <i>Einstellung der Wasseraktivität in THF</i>	27
2.2.7 <i>Bestimmung der Lagerstabilität</i>	28
2.2.8 <i>Bestimmung der Prozessstabilität</i>	29
2.2.8.1 <i>Wiederholte Batch-Versuche</i>	29
2.2.8.2 <i>Kontinuierliches Reaktionssystem</i>	30
2.2.9 <i>Untersuchung der mechanischen Stabilität</i>	31
2.2.10 <i>Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop (REM)</i>	31
2.2.11 <i>Modifikation der immobilisierten Lipase TL</i>	31

2.2.11.1	Beschichtung mit Polyethylenimin	31
2.2.11.2	Succinylierung	32
2.2.11.3	Acylierung mit aktivierten Methoxypolyethylenglykolen (mPEG)	32
2.2.11.4	Hydroxyethylamidierung	33
2.2.11.5	Aminoethylamidierung	33
2.2.11.6	Dextranaldehyd-Modifikation	33
2.2.12	Racemisierung von (R)-Benzoin	34
2.2.13	Dynamisch kinetische Racematspaltung mit TUD-1 Katalysatoren	35
2.2.14	Rezyklierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung	35
2.2.15	Aufreinigungen und Synthesen	36
2.2.15.1	Aufreinigung von (R)-Benzoin	36
2.2.15.2	Synthese von Benzoinbutyrat	36
2.2.15.3	Synthese von Ru-Hydroxyapatit	37
2.2.16	Parameter der HPLC-Analytik	37
3	Ergebnisse und Diskussion	39
3.1	<i>Vorarbeiten zur Immobilisierung</i>	39
3.1.1	Methodenauswahl	39
3.1.2	Auswahl geeigneter Trägermaterialien	42
3.2	<i>Optimierung der Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel MP1001 und Sepabeads EC-OD</i>	44
3.2.1	Immobilisierungsdauer	45
3.2.2	Proteinstartkonzentration	47
3.2.3	Einfluss der Temperatur	55
3.2.4	Einfluss der Pufferkonzentrationen und des pH-Wertes	57
3.2.5	Bewertung der Immobilisierungsoptimierung	61
3.2.6	Einfluss der <i>silcoat</i> -Technologie	63
3.2.7	Vergleich der Acc-LipTL mit der nativen TL und Literaturdaten	66
3.3	<i>Charakterisierung der Reaktionsparameter – Einfluss auf die Aktivität und Stabilität der Acc-LipTL</i>	68
3.3.1	Aktivität	69
3.3.1.1	Wasseraktivität	70
3.3.1.2	Lösungsmittel	74
3.3.1.3	Temperatur	78
3.3.2	Lagerstabilität	79
3.3.2.1	Stabilität in Gegenwart der Edukte und Produkte	80
3.3.2.2	Lösungsmittel	82

3.3.2.3	Temperatur	83
3.3.3	Prozessstabilität	86
3.3.3.1	Wiederholte Batch-Versuche	87
3.3.3.2	Kontinuierlicher Prozess	89
3.3.3.3	Prozessstabilität im kontinuierlichem Prozess in verschiedenen Lösungsmitteln	96
3.3.4	Mechanische Stabilität	98
3.3.5	Zusammenfassung und Fazit der Charakterisierung	99
3.4	<i>Stabilisierung der Acc-LipTL durch physikalische und chemische Modifikation</i>	102
3.4.1	Aktivität und Lagerstabilität nach Modifikation von Acc-LipTL	103
3.4.2	Prozessstabilität der modifizierten Immobilisate im kontinuierlichen Prozess	107
3.4.3	Bewertung der Stabilisierung	109
3.5	<i>Racemisierung</i>	111
3.5.1	Katalysatorscreening zur Racemisierung von (R)-Benzoin	112
3.5.1.1	Optimierung der Racemisierung mit Al-TUD-1 und Zr-TUD-1	117
3.5.1.2	Lösungsmittel	117
3.5.1.3	Temperatur	118
3.5.1.4	Untersuchungen zur Umesterungsaktivität und Racemisierung des Benzoinesters	121
3.6	<i>Dynamisch kinetische Racematspaltung mit Al-TUD-1, Zr-TUD-1 und Acc-LipTL</i>	124
3.6.1	Lösungsmittel	124
3.6.2	Temperatur	126
3.6.3	Katalysatorverhältnisse	130
3.6.4	Rezyklierung	132
4	Zusammenfassung	139
	Literaturverzeichnis	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Methoden zur Immobilisierung von Enzymen [18]	4
Abbildung 2: Illustration der Chiralität am Beispiel von Benzoin	11
Abbildung 3: Prinzip einer DKR	16
Abbildung 4: Redox Racemisierung.....	18
Abbildung 5: Racemisierung durch Keto-Enol-Tautomerie von α -Hydroxyketonen	18
Abbildung 6: Lipase TL katalysierte DKR von Benzoin	19
Abbildung 7: Detailaufnahme einer statischen Suspension mit Lipase TL-Pulveragglomerate	41
Abbildung 8: Spez. Trägeraktivität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Immobilisierungsdauer	46
Abbildung 9: Proteinbeladungsdichte und spez. Trägeraktivität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration	48
Abbildung 10: Spez. Proteinaktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration	50
Abbildung 11: Faltung von Proteinen bei unterschiedlichen Beladungsdichten auf Oberflächen [120]	51
Abbildung 12: Proteinbeladungsdichte und spez. Trägeraktivität von Sepabead-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration	53
Abbildung 13: Spez. Proteinaktivität der Sepabead-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration	54
Abbildung 14: Beladungsdichte und spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Immobilisierungstemperatur; Die Aktivitätstests wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.	56
Abbildung 15: Anordnung der wichtigsten An- und Kationen der Hofmeisterreihe	58
Abbildung 16: Beladungsdichte der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Pufferkonzentrationen bei verschiedenen pH-Werten	59
Abbildung 17: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Pufferkonzentrationen bei unterschiedlichen pH-Werten	60
Abbildung 18: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration bei unterschiedlichen Immobilisierungsbedingungen (Immobilisierungstemp. bei 10 mM = 21,5 °C; 200 mM = 40°C)	62
Abbildung 19: REM-Aufnahmen der <i>silcoat</i> Acc-LipTL mit verschiedenen Silikongehalten	65
Abbildung 20: Vergleich der KR-Umsatzverläufe von Acc-LipTL mit den <i>silcoat</i> Acc-LipTL Varianten	66
Abbildung 21: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit von der Wasseraktivität in THF bei RT	73

Abbildung 22: Prozentuale Restaktivität von Acc-LipTL in verschiedenen Lösungsmitteln in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur (Toluol: 47 mM Benzoin, 2-MeTHF und THF: 94 mM Benzoin)	78
Abbildung 23: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit von Edukten und Produkten in THF bei RT.....	81
Abbildung 24: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit vom Lösungsmittel bei RT	83
Abbildung 25: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Temperatur in THF	84
Abbildung 26: Prozentuale Restaktivitäten der nativen Lipase TL und der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in THF bei 50 °C.....	85
Abbildung 27: Spez. Trägeraktivitäten der Acc-LipTL und der <i>silcoat</i> Acc-LipTL-Varianten in Abhängigkeit der Zyklenzahl der wiederholten Batch-Versuche in THF bei RT	87
Abbildung 28: Foto des kontinuierlichen Reaktors und schematischer Aufbau	89
Abbildung 29: Umsatzveränderung der KR im kontinuierlichen Reaktor (Durchflussrate = 1,25 mL/min; 94 mM Benzoin)	92
Abbildung 30: Prozessstabilität von Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit der Durchflussrate.....	93
Abbildung 31: Prozessstabilität der Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit der Benzoinkonzentration	94
Abbildung 32: REM-Aufnahmen der Acc-LipTL vor (A) und nach (B) einem kontinuierlichen Prozess	95
Abbildung 33: Prozessstabilität der Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit unterschiedlicher Lösungsmittel	96
Abbildung 34: REM-Aufnahmen der Acc-LipTL und der <i>silcoat</i> Acc-LipTL mit 70 % Silikon vor und nach einer mechanischen Behandlung in der Kugelmühle	99
Abbildung 35: Prozentuale Restaktivitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextran-Modifikation) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	103
Abbildung 36: Prozentuale Restaktivitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	104
Abbildung 37: Prozentuale Lagerstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextrane) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	105
Abbildung 38: Prozentuale Lagerstabilitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	106
Abbildung 39: Prozentuale Prozessstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextrane) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	108
Abbildung 40: Prozentuale Prozessstabilitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT	108
Abbildung 41: Aktivierungsmechanismus des Shvo-Katalysators	111

Abbildung 42: Enantiomerenüberschüsse nach Racemisierung von (R)-Benzoin durch Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit unterschiedlicher Lösungsmittel bei 50°C, 20h	118
Abbildung 43: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Al-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol	119
Abbildung 44: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol	119
Abbildung 45: Halbwertszeiten der Racemisierung von (R)-Benzoin durch Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol	121
Abbildung 46: Spez. Aktivitäten von Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in der KR von Benzoin mit Vinylbutyrat in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol	122
Abbildung 47: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit mit und ohne 47 mM Benzoinbutyrat in Toluol bei 70 °C; <i>ee</i> des Benzoinbutyrat über den gesamten Racemisierungsprozess	123
Abbildung 48: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Al-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol	127
Abbildung 49: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol	128
Abbildung 50: Entwicklung des <i>ee</i> des (S)-Benzoinbutyrats in der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Al-TUD-1 bzw. Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol	129
Abbildung 51: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch 20 mg/mL Acc-LipTL in Abhängigkeit verschiedener Mengen von Zr-TUD-1 in Toluol bei 50°C	130
Abbildung 52: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch 40 mg/mL Zr-TUD-1 in Abhängigkeit verschiedener Mengen von Acc-LipTL in Toluol bei 50°C	131
Abbildung 53: Umsatzveränderung der DKR von Benzoin mit Acc-LipTL und Zr-TUD-1 in Toluol und 2-MeTHF bei 50°C in wiederholten Reaktionszyklen	134
Abbildung 54: Umsatzveränderung nach 8 h des jeweiligen Zyklus in der Rezyklierung von Acc-LipTL sowie der mit mPEG, PEI und Dextran modifizierten Acc-LipTL-Varianten mit Zr-TUD-1 in 2-MeTHF bei 50°C	135
Abbildung 55: Endumsatz des jeweiligen Zyklus in der Rezyklierung von Acc-LipTL sowie der mit mPEG, PEI und Dextran modifizierten Acc-LipTL-Varianten mit Zr-TUD-1 in 2-MeTHF bei 50°C	137
Abbildung 56: Vergleich der Produktivität der mit PEI modifizierten Acc-LipTL-Variante und der statischen Suspensionen aus Hoyos <i>et al.</i> [89] in Abhängigkeit der Zyklenzahl [89]	138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Methoden zur Modifikation von Enzymen [50].....	10
Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten chemischen und biotechnologischen Synthesewege von α -Hydroxyketonen	14
Tabelle 3: Chemikalienliste	22
Tabelle 4: Geräteliste	23
Tabelle 5: Strukturen der Siloxane des 2-Komponentensilikon	27
Tabelle 6: Eingesetzte Dextranaldehyde.....	34
Tabelle 7: Parameter der HPLC-Methode	38
Tabelle 8: Retentionszeiten der Enantiomere von Benzoin und Benzoinbutyrat	38
Tabelle 9: Kriterien zur Auswahl geeigneter Trägermaterialien	43
Tabelle 10: Verwendete Trägermaterialien zur Immobilisierung der Lipase TL	43
Tabelle 11: Vergleich der Acc-LipTL mit der nativen Lipase TL und den statischen Suspensionen.....	67
Tabelle 12: Wassergehalt (v/v%) von THF bei definierten Wasseraktivitäten	72
Tabelle 13: Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur KR von Benzoin	76
Tabelle 14: Lagerstabilität von Acc-LipTL in verschiedenen Lösungsmitteln bei RT und 50 °C.....	85
Tabelle 15: Inaktivierungskonstanten und Lagerstabilitäten der Acc-LipTL und der <i>silcoat</i> Acc-LipTL-Varianten nach wiederholten Batch-Versuchen	88
Tabelle 16: Katalysatorscreening zur Racemisierung von (R)-Benzoin	115
Tabelle 17: Vergleich der DKR von Benzoin mit Acc-LipTL und Al-TUD-1 bzw. Zr-TUD-1 in Abhängigkeit verschiedener Lösungsmittel bei 50 °C	125

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
2-MeTHF	2-Methyltetrahydrofuran
Acc-LipTL	Accurel-Lipase TL
BSSA	Bernsteinsäureanhydrid
CSTR	Kontinuierlicher Rührreaktor
DKR	Dynamisch kinetische Racematspaltung
<i>ee</i>	Enantiomerenüberschuss
HAP	Calcium-Hydroxyapatit
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
IEP	Isoelektrischer Punkt
KPi	Kalium-Phosphatpuffer
KR	Kinetische Racematspaltung
KW	Kohlenwasserstoff
MIBK	Methylisobutylketon
mPEG	Methoxypolyethylenglykol
Mw	Molekulargewicht
PEI	Polyethylenimin
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Raumtemperatur
THF	Tetrahydrofuran
VB	Vinylbutyrat

1 Einleitung

1.1 Enzyme in organischen Lösungsmitteln

Enzyme bezeichnen Proteinstrukturen mit herausragenden katalytischen Eigenschaften. Die auch als Biokatalysatoren bekannten Moleküle setzen die Aktivierungsenergie (bio)chemischer Reaktionen herab und beschleunigen die Reaktionen dadurch um den Faktor 10^8 - 10^{14} [1]. Reaktionsbedingungen bei moderaten Temperaturen, pH-Werten im Bereich von 5-8 und Reaktionen bei Normaldruck wirken sich bei einem industriellen Einsatz von Enzymen positiv auf die Prozessökonomie aus. Das immense industrielle Potenzial erreichen Enzyme allerdings vor allem aufgrund der hohen Substrat-, Regio- und Stereoselektivitäten, die insbesondere in der chemischen Stoffproduktion zum Tragen kommen. Die Produktion komplexer chiraler Substanzen ist mit einem verringerten Einsatz bis hin zum vollständigen Verzicht auf Schutzgruppenchemie möglich, die in typischen organischen Synthesen unentbehrlich ist [2, 3].

In den letzten Jahrzehnten wurden vor allem in der Herstellung von Feinchemikalien, Pharmaprodukten und auch Treibstoffen eine Reihe neuer Synthesewege unter Verwendung von Enzymen entwickelt, die insbesondere in Bezug auf eine nachhaltige Chemie und höherer katalytischer Effizienz neue Maßstäbe setzten [4]. Während der Entwicklung solcher Syntheserouten ist allerdings eine auf Wasser basierende Reaktionsführung eine der größten Herausforderungen. Wasser weist oftmals eine sehr geringe Löslichkeit für viele Substrate auf und vermittelt störende Nebenreaktionen [5]. Aufgrund dessen ist der Einsatz von Enzymen in unkonventionellen (nicht wässrigen) Medien für die chemische Industrie sehr interessant und gewinnt nach wie vor an Bedeutung im Bereich der pharmazeutischen und chemischen Produktion.

Es wurden intensive Forschungen bezüglich eines Einsatzes unkonventioneller Medien in der Biokatalyse unternommen und dabei unter anderem Gasphasen, überkritische Fluide, ionische Flüssigkeiten und organische Lösungsmittel untersucht [6-8]. Letzteres stellt den wichtigsten Forschungsbereich der letzten zwei bis drei Dekaden dar, obwohl die generelle

Machbarkeit von enzymkatalysierten Reaktionen in reinen nicht wassermischbaren Lösungsmitteln bereits in den 1930er Jahren erstmalig gezeigt wurde [2]. Doch erst Arbeiten wie die von Zaks und Klivanov [9] stellten Lipasen als eine der ersten Enzyme vor, die erfolgreich unter Erhalt ihrer katalytischen Aktivität in diesen Reaktionssystemen eingesetzt wurden. Das aus diesen akademischen Forschungen hervorgegangene industrielle Interesse basiert nicht zuletzt auf den folgenden Vorteilen, welche derartige Reaktionssysteme mit sich bringen.

- » Die **Löslichkeit** unpolarer Substrate, welche in Wasser gar nicht oder nur unzureichend löslich sind, ist in organischen Lösungsmitteln wesentlich höher. Oftmals werden dadurch die Reaktionsrate und die maximal erreichbaren Produktkonzentrationen deutlich verbessert.
- » Das **thermodynamische Gleichgewicht** kann in organischen Lösungsmitteln von hydrolytischen hin zu Kondensationsreaktionen verschoben werden. Somit ist möglich, dass bspw. Lipasen anstatt der Hydrolyse von Estern, deren Synthese katalysieren.
- » Eine **Isolierung der Produkte** ist in organischen Lösungsmitteln wesentlich vereinfacht, da es sich hierbei um Medien mit teils sehr niedrigen Siedepunkten handelt. Dadurch kann die Anzahl an notwendigen Reinigungsschritten vermindert und somit die Gesamtausbeute der Reaktionen stark erhöht werden.
- » Wasservermittelte **Nebenreaktionen** sind durch die äußerst niedrigen Konzentrationen von Wasser in diesen Reaktionssystemen, welche zum Erhalt der katalytischen Aktivität als notwendig angesehen werden [10], deutlich vermindert.
- » Eine **Rückgewinnung der Enzyme** ist vereinfacht, da die meisten Enzympräparate in organischen Lösungsmitteln nicht gelöst vorliegen und somit nach Beendigung der Synthese vom Reaktionsansatz getrennt werden können.
- » Enzyme weisen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln oftmals eine erhöhte **Stabilität** auf [7, 11-13].

- » Die **Substrat- Regio- und Stereospezifitäten** einiger Enzyme können bei einem Einsatz in organischen Lösungsmitteln drastisch verändert sein [14, 15].

Trotz der herausragenden Vorteile der Biokatalyse in organischen Lösungsmitteln, bringt der Einsatz von Enzymen in diesen Systemen auch Nachteile mit sich. Die spezifische Enzymaktivität ist in nichtwässrigen organischen Lösungsmitteln oftmals stark reduziert. Je nach Enzym, dem verwendeten Lösungsmittel, der eingestellten Wasseraktivität oder auch der Art der Enzympräparation können unterschiedliche Ursachen für den Verlust der Aktivität in Frage kommen. So ist unter anderem möglich, dass die Konformation des aktiven Zentrums bei der Überführung in die wasserfreien Medien verändert oder sogar die Quartärstruktur von Proteinkomplexen aufgelöst wird. Da Enzympräparationen typischerweise vor einer Verwendung in organischen Lösungsmitteln getrocknet werden, ist auch ein Verlust katalytischer Aktivität infolge der Lyophilisierung der Enzymlösungen möglich [8]. Die Flexibilität der Enzyme, welche essentiell zur Ausbildung der katalytischen Fähigkeit ist, ist vor allem in unpolaren organischen Lösungsmitteln eingeschränkt. Der jedoch am häufigsten diskutierte Grund einer verminderten Aktivität ist der Verlust der für die Aktivität und Strukturintegrität essentiellen Hydrathülle von der Enzymoberfläche. Dieses Phänomen tritt vor allem bei polaren Lösungsmitteln auf [6, 10, 16].

1.2 Immobilisierung von Enzymen

Grundvoraussetzung für den Einsatz von Biokatalysatoren auf industrieller Ebene ist aufgrund der meist hohen Enzymkosten eine hohe Wiederverwendbarkeit. Diese wird durch eine leichte Abtrennung der Katalysatoren aus dem Reaktionsansatz nach Beendigung des Prozesses und dem möglichst langen Erhalt der katalytischen Aktivität ermöglicht. Die in dieser Arbeit verwendete Lipase TL aus *Pseudomonas stutzeri* ist in der kommerziell erhältlichen Form ein trockenes und sehr feines Pulver. Derartige Präparationen sind in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich und liegen daher bei Synthesen in diesen Medien fein suspendiert vor. Der heterogene Charakter bietet zwar theoretisch den Vorteil der einfachen Katalysatorabtrennung [17], ist jedoch großtechnisch mit gängigen Mitteln oft nicht wirtschaftlich realisierbar. Ist das fein verteilte Pulver im Labormaßstab leicht durch

Zentrifugation oder Filtration vom Reaktionsmedium zu trennen, so ist dies im großtechnischen Maßstab verbunden mit kostenintensiven Zentrifugationsanlagen oder langwierigen Filtrationsschritten. Auch eine Verwendung dieser Pulverpräparate in kontinuierlichen Reaktionssystemen ist aufgrund der Rückhalteproblematik nur bedingt möglich. Abhilfe kann dabei durch eine Immobilisierung der Enzyme geschaffen werden. Diese gezielte Heterogenisierung der Enzyme kann ebenso sehr hilfreich bezüglich einer Erhöhung der Stabilität sein. So wurden dahingehend hervorragende Ergebnisse in der Stabilisierung gegenüber Lösungsmitteln, erhöhter Temperatur und pH-Einflüssen erzielt [18-22]. Des Weiteren kann die Auswahl der richtigen Immobilisierungstechnik zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität führen [18, 23, 24].

Grundsätzlich kann zwischen drei methodischen Ansätzen zur Immobilisierung von Enzymen unterschieden werden: (1) Der Bindung von Enzymen an ein festes Trägermaterial, (2) einer Quervernetzung von Enzymmolekülen untereinander und einer Einkapselung in eine Matrix (3a) bzw. Einhüllung in eine Membran (3b) (Abbildung 1).

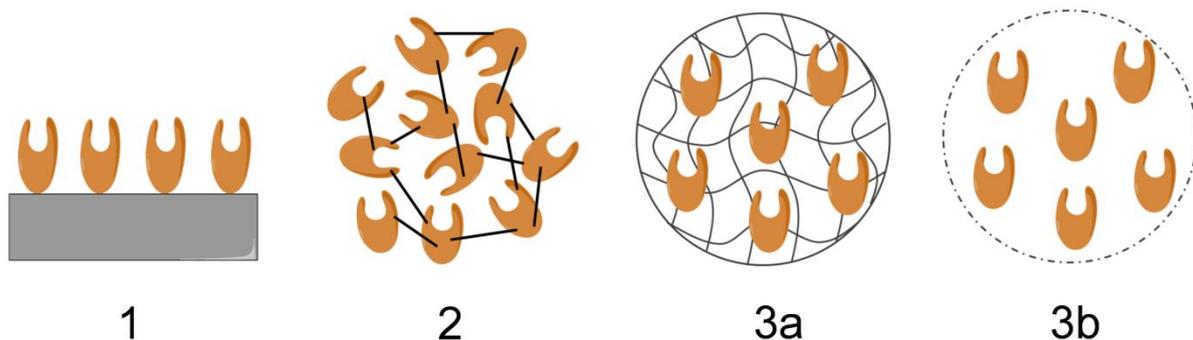


Abbildung 1: Methoden zur Immobilisierung von Enzymen [18]

Zur näheren Klassifizierung einer Trägerbindung von Enzymen muss zwischen den zugrundeliegenden Bindungskräften unterschieden werden. Eine vorwiegend auf elektrostatischen Wechselwirkungen, hydrophoben Interaktionen oder der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und von der Waals-Kräften basierenden Bindung wird der Gruppe der adsorptiven bzw. ionischen Immobilisierung zugeschrieben [24]. Diese Art der Anheftung ist sehr schonend für das Enzym, hat jedoch oftmals den Nachteil, dass die

Bindungskräfte sehr schwacher Natur sind. Dies kann bei einem Einsatz der Immobilisate in wässrigen oder tensidisch wirkenden Reaktionsmedien einen fortwährenden Verlust der Enzyme von der Trägeroberfläche nach sich ziehen [25]. Bei der adsorptiven Immobilisierung von Lipasen wird zudem oftmals von einer „Hyperaktivierung“ berichtet, die auf eine Grenzflächenaktivierung der Lipasen zurückzuführen ist. Dabei durchläuft die Lipase eine konformationelle Strukturänderung, sobald ein Kontakt mit einer wässrig/organischen Grenzfläche bzw. einem hydrophoben Trägermaterial hergestellt wird. Dabei klappt eine α -helikale Struktur, die das aktive Zentrum bedeckt und als „Lid“ bezeichnet wird, auf, da der dem aktiven Zentrum zugewandte Teil ebenfalls hydrophob ist. Dieser Vorgang ist in der Regel mit einer Steigerung der spezifischen Aktivität verbunden. Eine kovalente Bindung der Enzyme auf der Trägeroberfläche basiert auf einer Reaktion von Aminosäureseitenketten und funktionellen Gruppen auf dem Träger, die meist über Vernetzungsreagenzien vermittelt werden. Dies verhindert zwar ein „Abwaschen“ der Enzyme, ist jedoch oftmals mit starken Aktivitätsverlusten verbunden [26]. Diese kommen zustande, wenn die Bindungen Konformationsänderungen verursachen oder an Seitenketten binden, die für den katalytischen Mechanismus essentiell sind [27].

Die Bildung unlöslicher Enzymaggregate, sogenannter „CLEA's“, beruht auf einer Präzipitation von Enzymen ausgelöst von Salzen, organischen Flüssigkeiten oder Säuren, gefolgt von einem Einsatz multivalenter Vernetzungsreagenzien [28, 29]. Es können Enzymlösungen sowohl mit Fremdproteinen als auch mit Polymeren zusammen vernetzt werden. Dabei entstehen heterogene Enzympräparate, die je nach verwendetem nicht-katalytischen Material verschiedene Eigenschaften aufweisen können.

Einhüllungen bzw. Einkapselungen in polymere Matrices sind ebenfalls sehr schonend für das Enzym, da keine direkten Interaktionen mit der Enzymoberfläche eingegangen werden. Vielmehr kann eine Mikroumgebung geschaffen werden, die die Enzyme vor äußeren Einflüssen wie bspw. einem Einsatz in organischen Lösungsmitteln schützt [24]. Hauptnachteil dieser Methoden besteht in einem eingeschränkten Massentransfer, da das Immobilisierungspolymer als Diffusionsbarriere für die Substrate und Produkte zu betrachten ist.

In jedem Fall bleibt festzuhalten, dass es nicht „die beste“ Immobilisierungsmethode für alle Enzyme gibt. Viele der durchgeführten Immobilisierungen wurden ohne eine genaue strukturelle Information der Enzyme und ohne ein Verständnis des Zusammenhangs zwischen dem Verhalten der Immobilisate und der angewandten Methode durchgeführt [24]. Die Immobilisierung von Enzymen ist oftmals geprägt von der Abwägung die katalytische Aktivität und Stabilität zu erhalten oder möglichst zu verbessern und die meist verfahrenstechnischen Vorteile einer Immobilisierung zu erreichen [30]. Eine Möglichkeit, um beispielsweise mechanisch instabile Enzym-Polymer-Präparate für Prozesse mit hohen Scherkräften zu stabilisieren bzw. um die generelle Prozessstabilität hochaktiver immobilisierter Enzyme zu erhöhen, ist die rationale Kombination verschiedener Techniken. So können zum Beispiel Enzyme zuerst quervernetzt werden, um eine hohe Stabilität zu generieren und anschließend eine Polymereinhüllung zum Erreichen verfahrenstechnischer Anforderungen durchgeführt werden [31]. Aber auch eine nachträgliche Modifikation der bereits immobilisierten Enzyme kann helfen, um beispielsweise ein Abwaschen der Katalysatoren von der Trägeroberfläche zu minimieren oder auch um die Stabilität zu erhöhen [24]. Im folgenden Kapitel werden neben anderen Aspekten zur Verbesserung enzymatischer Reaktionen verschiedene Methoden vorgestellt, die eine Modifikation von Enzymen bewirken und somit Einfluss auf die Aktivität und Stabilität nehmen können.

1.3 Maßnahmen zur Erhöhung der Aktivität und Stabilität von Enzymen in der chemischen Synthese

Obwohl Enzyme bereits in einer Vielzahl von industriellen Prozessen eingesetzt werden, ist eine Ausweitung der Anwendungsgebiete durch fehlende Aktivitäten für spezielle Substrate, unzureichende Stabilitäten oder Selektivitäten beschränkt [30]. Im Wesentlichen gibt es dahingehend drei Ansätze diese Limitierungen zu überwinden und den Wirkungsbereich von Enzymen in der chemischen Synthese zu erweitern: (1) Entwicklung modifizierter Substrate (*substrate engineering*), (2) Weiterentwicklung des Reaktionsmediums (*medium engineering*) und die Modifikation von Enzymen (*catalyst engineering*).

Substrate engineering

Der Einsatz modifizierter Substrate zielt hauptsächlich auf eine Erhöhung der Effizienz enzymatischer Reaktionen ab [30]. Typische Beispiele sind der Einsatz fluorierter Acyldonatoren in der lipasekatalysierten Acylierung, um eine Aufreinigung der Produkte mit perfluorierten Lösungsmitteln zu erleichtern [32]. Dabei konnte im Vergleich zum herkömmlichen Prozess eine erhöhte Enantioselektivität festgestellt werden. Auch eine Verwendung alternativer Substrate kann die Ausbeute, die Enantioselektivität und die Stabilität der Biokatalysatoren erhöhen, wie es bei einem Einsatz von Vinyl-Estern chiraler Carboxylsäuren gegenüber typischerweise eingesetzten Ethyl-Estern nachgewiesen wurde [33, 34].

Medium engineering

Forschungen im Bereich der Reaktionsmedien haben seit der Entdeckung der Möglichkeit enzymatischer Reaktionen in unkonventionellen Medien fortwährend Bestand. So untersuchte Klivanov bereits 1987 den Einfluss unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Aktivität verschiedenster enzymatischer Prozesse [35]. In den letzten Jahrzehnten wurden sowohl die Einflüsse von Lösungsmitteln auf wässrige Reaktionen mit Cosolventien, wässrig-organische Zweiphasensysteme und auf einphasige Lösungsmittelsysteme erforscht. Es konnten durch die Zugabe von beispielsweise DMSO oder SDS drastisch erhöhte E-Werte (Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeit zweier Enantiomere) in einer lipasekatalysierten Hydrolyse von Phenoxypropionaten erreicht werden [36]. Zudem können Cosolventien einen Effekt auf die Stabilität von Enzymen haben, wie eine Arbeit von Iding *et al.* [37] zeigt. Noch deutlicher wird der Erfolg durchgeführter Studien zum „medium engineering“ im Bereich purer organischer Lösungsmittel. Hier reicht die Bandbreite der Ergebnisse von einem 20-fachen E-Wert einer durch Subtilisin katalysierten Reaktion allein durch den Wechsel des Lösungsmittels von Acetonitril zu 1,4-Dioxan [14], bis hin zu einer vollständig invertierten Enantioselektivität [15] als Folge des Lösungsmittelwechsels. Auch die Stabilität ist im großen Maße vom verwendeten Lösungsmittel anhängig, wie beispielsweise die zuvor diskutierte Neigung polarer Lösungsmittel zum Austausch oberflächengebundener Wassermoleküle mit Lösungsmittelmolekülen aufzeigte. Eine weitere Möglichkeit die Eigenschaften

des Reaktionsmediums entscheidend zu variieren, ist der Einsatz von ionischen Flüssigkeiten (IL) und/oder überkritischen Fluiden. Die Auswahl der entsprechenden Ionenpaare, der bei Raumtemperatur flüssigen ionischen Flüssigkeiten ist maßgeblich für die Eigenschaften dieses Reaktionsmediums [38]. Durch den Einsatz von IL's konnten bereits bemerkenswerte Verbesserungen im Hinblick auf Ausbeuten, Enantioselektivitäten und auch Enzymstabilitäten erreicht werden [39]. Überkritische Fluide zeigen insbesondere Vorteile in der Produktaufarbeitung und -extraktion und zeichnen sich durch hohe Diffusionsraten aus [40, 41].

Um für einen chemischen Prozess das passende Reaktionsmedium auszuwählen, müssen verschiedene Aspekte berücksichtigt werden. So sollten Substrate und Produkte eine ausreichende Löslichkeit aufweisen, das Lösungsmittel inert bezüglich jeglicher Nebenreaktionen sein und nach Möglichkeit eine niedrige Toxizität aufweisen sowie umweltverträglich sein [30].

Catalyst engineering

Das Forschungsgebiet des „catalyst engineering“ umfasst grundverschiedene Herangehensweisen. Das im englischen sogenannte „protein engineering“ umfasst im Wesentlichen molekularbiologische Strategien wie das rationale Design der Enzyme oder eine gerichtete Evolution [19, 21]. Beim rationalen Design wird versucht durch gezielte Austausche einzelner Aminosäuren die Sequenz der Enzyme zu verändern und damit Einfluss auf die dreidimensionale Struktur oder auf bestimmte Wechselwirkungen beispielsweise mit Substraten zu nehmen [6]. Eine gerichtete Evolution zielt eher darauf ab, durch zufällig eingeführte Punktmutationen und einem nachgeschalteten Screening (bzw. Selektion) Varianten des Enzyms zu generieren bzw. zu finden, welche verbesserte Eigenschaften aufweisen [42, 43]. Beide Methoden benötigen entweder umfassendes Wissen über Struktur-Wirkungsbeziehungen durch das Vorhandensein von beispielsweise Kristallstrukturen oder sind aufgrund der Anzahl an Mutanten, die einem Screening unterzogen werden müssen, sehr arbeitsaufwändig.

Neben diesen molekularbiologischen Ansätzen stehen im Wesentlichen die im vorherigen Kapitel bereits vorgestellte Immobilisierung, eine chemische Modifikationen von Enzymen sowie die Zugabe stabilisierender und aktivierender Agenzien zur Verfügung. Letzteres wird insbesondere bei einer Lyophilisierung der Enzyme angewendet, da die oftmals labilen Proteinstrukturen während des Trocknens einer Änderung der Sekundärstruktur unterliegen, was mit einer drastischen Abnahme der Aktivität verbunden sein kann [19]. Aber auch die Aktivität kann durch die Zugabe niedermolekularer Additive verbessert werden. Die Substanzen bilden die Basis für einen Effekt, der als „Imprinting“ bekannt ist und die Beibehaltung einer aktiven Konformation auch nach einer Trocknung beschreibt. Die Stoffe, die meist reversible Inhibitoren sind, stabilisieren das aktive Zentrum und können nach der Lyophilisierung entfernt werden, ohne die Konformation zu verändern [44]. Für weitere Additive wie Kronenether, Salze, Zucker, Antioxidantien oder Polyethylenglycol (PEG) wurden ebenfalls beeindruckende Stabilisierungen beschrieben [19, 21, 45]. Diese Art der Stabilisierung wird oft auch als physikalische Modifikationen bezeichnet. Eine chemische Modifikation hingegen bedeutet eine kovalente Bindung chemischer Reagenzien an funktionelle Gruppen der Aminosäureseitenketten des Enzyms. Obwohl die Zahl der zur Verfügung stehenden Reagenzien äußerst groß ist, sind die Reaktionen zur Anbindung der Moleküle begrenzt und in der Regel unspezifisch, was den Ort der Modifikation angeht [46]. Je nach Anzahl der am Modifikationsreagenz befindlichen reaktiven Gruppen können bi- oder multivalente Moleküle intra- oder auch intermolekulare Bindungen zwischen verschiedenen Aminosäureseitenketten generieren. Monovalente Stoffe hingegen können nur mit einzelnen Seitenketten reagieren und dienen eher der Veränderung der Oberflächeneigenschaften der Enzyme [19, 21]. Auch Polymere können an Enzyme gebunden werden, was insbesondere bei Verwendung von aktiviertem PEG zu deutlichen Steigerungen der Stabilität gegenüber Lösungsmitteln und erhöhten Reaktionstemperaturen geführt hat [47-49]. Tabelle 1 fasst einige der zur Verfügung stehenden Reaktionen und entsprechende Reagenzien zusammen, mit denen verschiedene Aminosäureseitenketten funktionalisiert werden können.

Tabelle 1: Methoden zur Modifikation von Enzymen [50]

Funktionelle Gruppe	Reaktion	Reagenzien
Aminogruppe	Amidierung	Imidoester
	Reduktive Alkylierung	NaBH ₄
	Acylierung	Anhydride
	Sulfonierung	z.b. Trinitrobenzolsulfonat
Carboxygruppe	Amidierung	EDC + Nucleophil
Guanidingruppe	Alkylierung	Dicarbonyl-Derivate
Imidazolgruppe	Alkylierung	Anhydride
Indolgruppe	Oxidation	N-Bromsuccinimid
Phenolgruppe	Nitrierung	Tetranitromethan
Thiolgruppe	Alkylierung	Halogenacetat
	Oxidation	Dithiobis(2-nitrobenzolsäure)
Thioethergruppe	Oxidation	H ₂ O ₂

1.4 Bedeutung und Syntheserouten chiraler α -Hydroxyketone

Chiralität bezeichnet die Anordnung von Atomen in einem Molekül, die bedingt, dass sich das Bild und Spiegelbild des Moleküls nicht zur Deckung bringen lassen. Auch als „Händigkeit“ bezeichnet, stellen tatsächlich die menschlichen Hände das einfachste Beispiel von Chiralität dar. Abbildung 2 zeigt das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Benzoin an einer Spiegelebene mit seinen beiden Enantiomeren. Die physikalischen Eigenschaften zweier Enantiomere sind in einer achiralen Umgebung identisch. Unterschiede zwischen den Molekülen ergeben sich lediglich im Drehwinkel von polarisiertem Licht und in der Interaktion mit anderen chiralen Molekülen. Der Umstand einer unterschiedlichen Wechselwirkung in einer chiralen Umgebung wird technisch vor allem zur Trennung der Moleküle, beispielsweise mittels einer HPLC genutzt. Aus biologischer Sicht ist die genaue Erkennung der verschiedenen Konfigurationen die Grundlage vieler fein regulierter Abläufe im lebenden Organismus. Dabei können verschiedene Enantiomere teils stark in ihrer physiologischen

Wirkung voneinander abweichen. Dies ist insbesondere in der Entwicklung pharmazeutischer Produkte von äußerster Wichtigkeit und unterstreicht das industrielle Interesse an einer enantiomerenreinen Herstellung chiraler Substanzen.

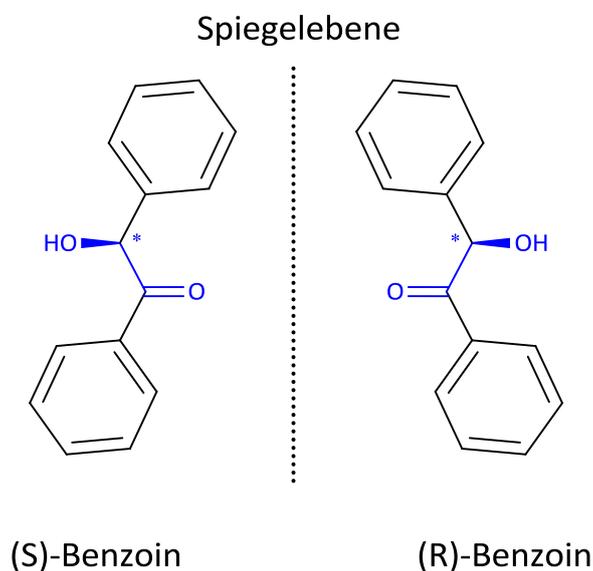


Abbildung 2: Illustration der Chiralität am Beispiel von Benzoin

Die auch als Acyloine bezeichneten α -Hydroxyketone sind aus Sicht der pharmazeutischen Industrie sehr interessant. Benzoin stellt das einfachste aromatische α -Hydroxyketon dar und wird neben der Verwendung als Urease-Inhibitor [51] vor allem als Synthese-Vorstufe für weitere heterozyklische Verbindungen verwendet [52-54]. Auch andere α -Hydroxyketone sind wichtige Synthesebausteine für eine Vielzahl von Medikamenten, unter anderem, weil sie einfach in andere mono- oder multifunktionelle Verbindungen wie Diole, Diamine oder Epoxide umgewandelt werden können [55]. So finden Moleküle dieser Stoffklasse Anwendung in der Herstellung von beispielsweise Cytokininhibitoren, von Wirkstoffen in Antidepressiva, Medikamenten gegen Alzheimer oder diversen Antibiotika [56].

Chemische Methoden zur Synthese von chiralen α -Hydroxyketonen

Zu den wichtigsten chemischen Synthesewegen gehören die direkte asymmetrische α -Hydroxylierung von Ketonen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und dem Einsatz eines organisch-inorganischen Cu-Piperazin Hybridpolymers [57] sowie die Ketohydroxylierung von Olefinen durch RuO₄ [58], sofern die Strategie eine Einführung von Hydroxygruppen ins Molekül vorsieht. Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von n-Bromsuccinimid und der Anwesenheit eines Kupferkatalysators, wodurch eine asymmetrische Monooxidation korrespondierender 1,2-Diole durchgeführt werden kann [59]. Bei einem Ausgang von Diketonen hingegen ist eine durch modifizierte Platinkatalysatoren oder chirale Rutheniumkatalysatoren stereoselektive Reduktion erfolgreich gezeigt worden [60]. Eine oxidative kinetische Racemattrennung ist durch den Einsatz von chiralen Eisen- oder Cobalt-Katalysatoren möglich [61]. Eine andere Methode, die nach biologischem Vorbild verläuft, ist die traditionelle Benzoinkondensation, die stereoselektiv über chirale Thiazolium- und Triazoliumsalze durchgeführt wird [62].

Chemische Syntheserouten chiraler Acyloine sind in den meisten Fällen Multi-Schritt-Synthesen, was oft mit einer Verringerung der Gesamtausbeute verbunden ist. Zudem steigt durch aufwändige Syntheserouten die Abfallmenge, was vor allem ökologisch als auch ökonomisch nachteilig ist. Da zusätzlich zum Teil nur moderate Enantioselektivitäten erreicht werden, wurden ausgiebige Untersuchungen hinsichtlich biotechnologischer Synthesewege unternommen.

Biotechnologische Methoden zur Synthese von chiralen α -Hydroxyketonen

Ein sehr erfolgreicher Syntheseweg für chirale α -Hydroxyketone ist der Einsatz der Thiadimindiphosphat (ThdP)-abhängigen Benzaldehydlyase (BAL), der Pyruvatdecarboxylase (PDC) oder der Benzoylformiatdecarboxylase (BFD). Diese Enzyme katalysieren die Bildung einer neuen C-C Bindung durch eine vom Cofaktor ThdP vermittelten Umpolung der Carbonylverbindung, was eine nukleophile Attacke anderer Carbonylgruppen ermöglicht. Die BAL zeichnet sich dabei insbesondere durch ein breites Substratspektrum aus, da sowohl gleiche als auch unterschiedliche Aldehyde als Substrat akzeptiert werden [63, 64].

Eine stereoselektive Oxidation vicinaler Diole ist durch den Einsatz einer Ganzzellsynthese mit *Bacillus stearothermophilus* möglich, führt jedoch nur zu sehr niedrigen Umsätzen von <20 % mit Enantiomerenüberschüssen (*ee*) von >99% [65]. Dahingegen ist die stereoselektive Reduktion von α -Diketonen sehr erfolgreich durchgeführt worden, wobei sogar die Entstehung der jeweiligen Enantiomere durch die Auswahl der Ganzzellbiokatalysatoren gesteuert werden kann [55, 66, 67]. Im Fall des Pilzes *Rhizopus oryzae* kann durch die Wahl des pH-Wertes wahrscheinlich die jeweilige Aktivität verschiedener Reduktasen geregelt werden, was bei pH-Werten von 7,5-8 zur Bildung des (R)-Enantiomers (*ee* 99%) führt und bei pH-Werten von 4-5 zum (S)-Enantiomer (*ee* 80%) [68]. Bei einem Einsatz von Lipasen bzw. Esterasen können sowohl racemische Ester (mit einer Estergruppe an der α -Hydroxyfunktion) enantioselektiv hydrolysiert werden [69], als auch durch Veresterungen bzw. Umesterungen enantioselektiv Esterbindungen an der α -Hydroxyfunktion eingeführt werden [70]. Da die Trennung der verbleibenden Substrate und der Ester aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften sehr einfach ist, kann das gewünschte Substratenantiomer durch eine nachfolgende unspezifische Hydrolyse des Esters einfach und in großen Ausbeuten zurückgewonnen werden. Generell sind diese sogenannten kinetischen Racematspaltungen (KR) auf einen Umsatz von maximal 50 % begrenzt, da aufgrund der hohen Selektivität bevorzugt nur ein Enantiomer umgesetzt wird. Um diese Hürde zu umgehen, wurde die Strategie der dynamisch kinetischen Racematspaltung (DKR) entwickelt. Die DKR wird im folgenden Kapitel, nicht zuletzt wegen der hohen Relevanz für diese Arbeit, näher vorgestellt.

Tabelle 2 fasst die vorgestellten chemischen und biotechnologischen Methoden, den jeweils verwendeten Katalysatoren und die Ausgangsmoleküle zur Synthese von chiralen α -Hydroxyketonen zusammen.

Tabelle 2: Zusammenfassung der wichtigsten chemischen und biotechnologischen Synthesewege von α -Hydroxyketonen

Zielmoleküle	Reaktion	Katalysator	Ausgangsmolekül(e)
	α -Hydroxylierung	Organisch-inorganisches Cu-Piperazin Hybridpolymer [57]	
	Ketohydroxylierung	RuO ₄ [58]	
Chemische / organochemische Synthese	Asymmetrische Oxidation	n-Bromsuccinimid bei Anwesenheit eines Kupferkatalysators [59]	
	Stereoselektive Reduktion	Pt-Katalysator, chiraler Ru-Katalysator [60]	
	Oxidative kinetische Racemattrennung	Chiraler Eisen- oder Cobalt Katalysator [61]	
	Asymmetrische Kondensation	Chirale Thiazoliums Salze [62]	
Biotechnologische Synthesen	Carboligation	z.B. Benzaldehydlyase [63, 64]	
	Oxidation	<i>B. stearothermophilus</i> diacetyl reductase [65]	
	Stereoselektive Reduktion	(<i>S</i>)-Enantiomer: z.B. <i>B. cereus</i> ¹ [67] (<i>R</i>)-Enantiomer: z.B. <i>X. oryzae</i> ¹ [66]	
	Kinetische Racemattrennung	Umesterung: <i>P. stutzeri</i> lipase [70]	
		Hydrolyse: <i>R. oryzae</i> ¹ [69]	

¹ Hier wurden Ganzzellsynthesen durchgeführt

1.5 Dynamisch kinetische Racematspaltung

Die Racematspaltung stellt den wichtigsten industriellen Ansatz zur Herstellung purer enantiomerenreiner Verbindungen dar [71]. Die enzymatisch katalysierte kinetische Racematspaltung basiert dabei auf einer bevorzugten Reaktion des Enzyms mit einem der beiden Enantiomere. Kinetisch betrachtet bedeutet dies, dass bei einer hohen Selektivität des Enzyms die Geschwindigkeitskonstante für die Umsetzung eines Enantiomers sehr viel größer ist, als für das entsprechend andere Molekül (Abbildung 3). Dies erklärt auch, dass sich die Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Erreichen der Umsatzmarke von 50 % deutlich verlangsamt, da das favorisierte Enantiomer nahezu verbraucht ist. Der maximal erreichbare Umsatz von eben lediglich 50 % stellt auch den größten Nachteil der kinetischen Racematspaltung dar. Zur Überwindung dieser Marke ist es nötig, das verbleibende, nicht erwünschte Enantiomer zu racemisieren und somit neues Substrat für die stereoselektive Umsetzung zu generieren. Die Kombination aus stereoselektiver Umsetzung eines Enantiomers und der Racemisierung des unerwünschten Substrates wird als dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) bezeichnet.

Erste Versuche, eine Trennung der Produkte vom unerwünschten Substratenantiomer durchzuführen, das restliche Substrat in einem folgenden Schritt zu racemisieren und dann erneut der enzymatischen Umsetzung zuzuführen, sind sehr umständlich und erfordern ein großes Maß an experimentellem Aufwand [72]. Um dabei eine Ausbeute von bis zu 100 % zu erreichen, müsste theoretisch eine unendliche Anzahl an Zyklen durchgeführt werden, wobei rein rechnerisch betrachtet nach bereits fünf Durchläufen ein Umsatz von >95 % erreicht werden kann. Gängiger hingegen ist die Durchführung einer *in situ* Racemisierung, bei der das unerwünschte Enantiomer gleichzeitig zur enzymatischen Reaktion ständig racemisiert wird, bis das komplette Substrat umgesetzt wurde. Dabei ist wichtig, dass die Geschwindigkeitskonstante der Racemisierung möglichst größer ist, als die der enzymatischen Reaktion. So kann die hohe Selektivität der Enzyme durch den ständigen Substratnachschieb genutzt werden [71] (Abbildung 3).

Da in der Regel versucht wird eine direkte Kopplung der enzymatischen Reaktion und der Racemisierung in einem gemeinsamen Reaktionsraum („onepot“) zu realisieren, ist die Optimierung beider Teilreaktionen nötig. Beide Katalysatoren sollten bei gleichen Bedingungen über eine ausreichende Stabilität und Aktivität verfügen. Ein gezieltes Screening bzw. Neuentwicklung geeigneter Racemisierungskatalysatoren stellt somit einen wichtigen Teil einer DKR-Prozessentwicklung dar.

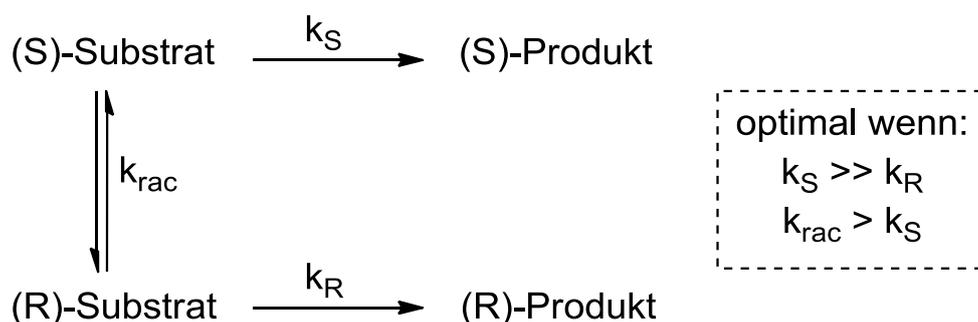


Abbildung 3: Prinzip einer DKR

Ebbers *et al.* [73] haben eine Klassifizierung verschiedener Racemisierungsmethoden vorgeschlagen und folgende Einteilung vorgenommen:

- » Thermische Racemisierung
- » Photochemische Racemisierung
- » Säure/Basen-Racemisierung
- » Bildung von Schiff'schen Basen
- » Enzym-katalysierte Racemisierung
- » Redox-Racemisierung
- » Nukleophile Substitution
- » Bildung von Meso-Intermediaten

Obwohl für alle Methoden durch diverse Beispielreaktionen eine generelle Eignung zur Racemisierung chiraler Moleküle gezeigt werden konnte, sind nicht alle Strategien für eine Kombination mit Enzymen geeignet. So sind beispielsweise die hohen Reaktionstemperaturen der thermischen Racemisierung der Grund dafür, dass diese Methode üblicherweise nicht im „onepot“ mit Enzymen verwendet wird. Typische Racemisierungstemperaturen liegen bei $>100\text{ °C}$ [73], wobei Enzyme in der Regel bei Raumtemperatur oder

leicht erhöhten Temperaturen von 30-50 °C eingesetzt werden. Photochemische Racemisierungen haben ein sehr begrenztes Substratspektrum, welches sich insbesondere auf Cyclopropanderivate oder Allene beschränkt. Die Bildung von Schiff'schen Basen kann nur mit freien primären Aminogruppen am Chiralitätszentrum durchgeführt werden und ist daher hier nicht von Bedeutung. Nukleophile Substitutionen werden bezüglich einer Racemisierung vor allem für Halogenide und Nitrile beschrieben und ist auch aufgrund des Reaktionsmechanismus nicht für diese Arbeit geeignet (vgl. [73]). Die Bildung der Meso-Intermediate bezeichnet die Racemisierung ohne eine Reaktion am chiralen Zentrum. Dabei wird das chirale Molekül zuerst in ein achirales überführt, indem eine der funktionellen Gruppen am chiralen Zentrum reagiert und beispielsweise eine zweite identische Estergruppe am Stereozentrum eingeführt wird. Eine nachfolgende Hydrolyse kann dann die Stereoinformation zurückbringen. Diese Methode ist jedoch für das hier eingesetzte Substrat nicht relevant. Des Weiteren ist die Möglichkeit der enzymatischen Racemisierung bereits erfolgreich durch den Einsatz verschiedener Racemasen, wie beispielsweise der Mandelatracesase für die Racemisierung der Mandelsäure, gezeigt worden [72]. Allerdings ist zumeist das Substratspektrum dieser Enzyme eingeschränkt und aufgrund einer oftmals geringen Stabilität in organischen Lösungsmitteln sind diese Biokatalysatoren kaum in der Lage mit chemischen Varianten zu konkurrieren.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Racemisierungsmethoden wurde die Redox-Racemisierung durch Übergangsmetallkatalysatoren vielfach in Kombination mit einer enzymatischen Acylierung für sekundäre Alkohole [74-76] bzw. α -Hydroxyketone [70, 77] beschrieben. Dabei kommen vor allem Ruthenium basierte organo-metallische Katalysatoren zum Einsatz und ermöglichen so eine „reversible Wasserstoffübertragung“. Der anzunehmende Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 4 dargestellt. Maßgeblich beteiligt am Erfolg dieser chemo-enzymatischen Kombination waren die Arbeiten der Gruppe um Bäckvall, die den Ruthenium basierten Shvo-Katalysator erstmals in der DKR von 1-Phenylethanol unter Verwendung von Novozym 435 beschrieben [78]. Darauf folgend wurden in den letzten 10 - 15 Jahren erstaunliche Fortschritte im Bereich der DKR durch Übergangsmetall - Enzym-Katalyse gemacht, wobei in der Entwicklung neuer Katalysatoren insbesondere auf eine Verkürzung der Reaktionszeit, milderer Reaktionsbedingungen und

eine möglichst einfache Handhabung hingearbeitet wurde. Die Ergebnisse dieser Studien wurden in verschiedenen Übersichtsartikeln hervorragend zusammengetragen [79-81].

Eine zweite erfolgreich angewandte Strategie zur Racemisierung von chiralen sekundären Alkoholen [82, 83] und Acyloinen [84] ist die säure-katalysierte Racemisierung. Hierbei kommen hauptsächlich heterogene Katalysatoren zum Einsatz, die aus verfahrenstechnischer Sicht als sehr geeignet gelten. Durch den heterogenen Charakter wird die Abtrennung der Katalysatoren stark vereinfacht. Folglich ist deren Wiederverwendung erleichtert und die Reinheit der Produktlösung kann durch einen einfachen mechanischen Prozessschritt wesentlich erhöht werden. Die Bandbreite der aciden Trägermaterialien reicht von Ionenaustauschern [84] über Zeolithe, welche mit Aluminium und Zirconium funktionalisiert sind [85], bis hin zu Benzylsulfonsäure-modifizierten Trägermaterialien [86]. Für Acyloine wird unter anderem vorgeschlagen, dass eine Racemisierung über die Bildung der korrespondierenden Endiole abläuft, was in Abbildung 5 dargestellt ist [84, 87, 88].

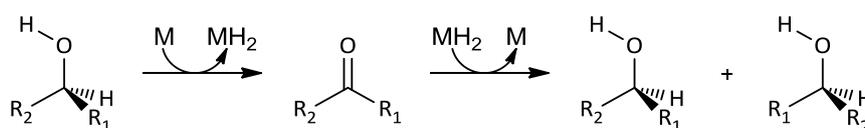


Abbildung 4: Redox Racemisierung

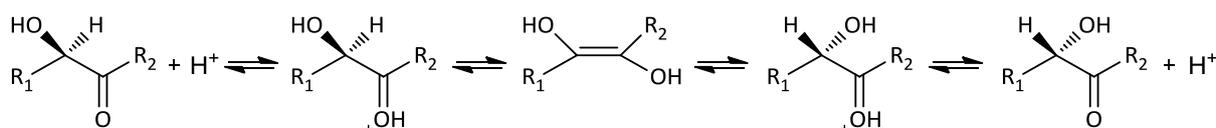


Abbildung 5: Racemisierung durch Keto-Enol-Tautomerie von α -Hydroxyketonen

Die dynamisch kinetische Racematspaltung von Benzoin stellt die Zielreaktion dieser Arbeit dar (Abbildung 6). Die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Andrés R. Alcántara und dabei insbesondere Dr. Pilar Hoyos haben bereits umfassende Studien zur chemo-enzymatischen Kopplung der Lipase TL mit einem chemischen Racemisierungskatalysator, dem Shvo-Katalysator betrieben [70, 89, 90].

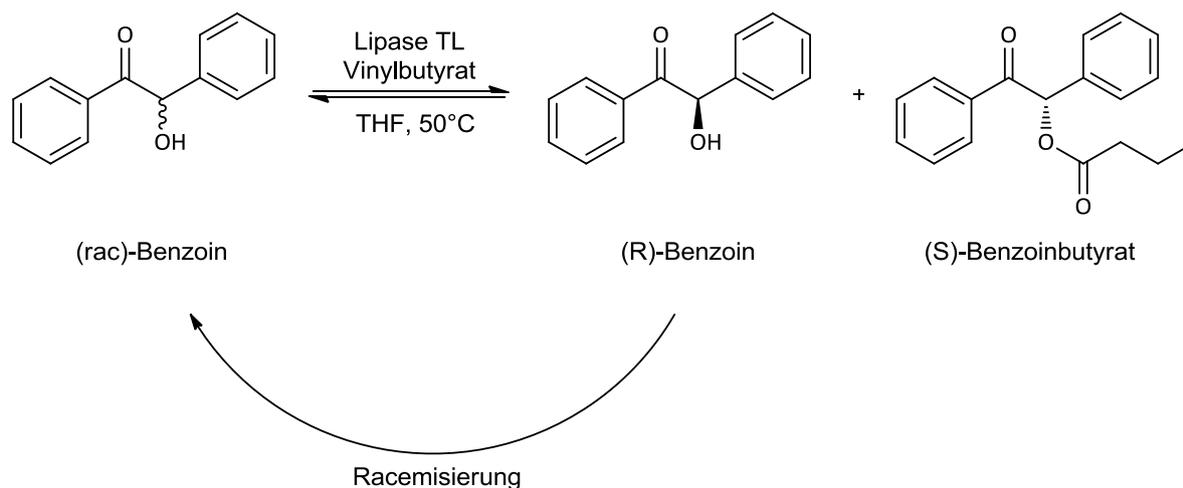


Abbildung 6: Lipase TL katalysierte DKR von Benzoin

Hoyos *et al.* [70] konnten erfolgreich zeigen, dass die DKR mit dem genannten Katalysator möglich ist und Umsätze von maximal 92 % bei einem *ee* von >99 % in einer Reaktionszeit von 48 h erreicht werden können. Die dort beschriebene thermische Instabilität der Lipase TL führte dazu, dass die DKR in insgesamt drei Schritten durchgeführt werden musste. Dabei wurde nach einer kurzen KR von ca. 3 h und einem Umsatz von 30 % das Lösungsmittel und der Acyldonor entfernt und die DKR durch Zugabe von frischem Lösungsmittel, Acyldonor und des Shvo-Katalysators gestartet. Der dritte Schritt bestand in einer späteren (nach 24 h) erneuten Zugabe von Lipase TL-Pulver, um die Deaktivierung des Enzyms auszugleichen. Eine Immobilisierung der Lipase in Silikon führte laut Hoyos *et al.* zu einer Stabilisierung [89]. In dieser Einsatzform konnte ein Umsatz von maximal 87 % bei einem *ee* von >99 % in einer Reaktionszeit von 20 h erreicht werden, ohne dass zusätzliche Schritte notwendig wurden.

1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Die Synthese chiraler α -Hydroxyketone ist für die pharmazeutische Industrie von großer Bedeutung. Die Verwendung derartiger Verbindungen als Synthesebausteine in der Medikamentenherstellung oder als Vorstufen anderer chiraler Moleküle hat das Bestreben nach einer effizienten Herstellung in den letzten Jahren stark gefördert. Gegenüber chemischen Herstellungsverfahren zeichnen sich biokatalytische Methoden insbesondere durch ihre hohe Regio- und Stereoselektivität sowie durch milde Reaktionsbedingungen aus. Die dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) beschreibt die Kombination einer enzymatisch katalysierten Racematspaltung und der *in situ* Racemisierung des nicht umgesetzten Eduktenantiomers. Der Einsatz von Hydrolasen zur Katalyse der kinetischen Racematspaltung (KR) ist insbesondere industriell von außerordentlichem Interesse, da diese Enzyme keine Cofaktoren benötigen und zudem eine hohe Stabilität in unkonventionellen Medien zeigen.

Benzoin stellt das einfachste aromatische α -Hydroxyketon dar und ist das Zielsubstrat dieser Arbeit. Stand der Technik zur Synthese von enantiomerenreinem Benzoin bzw. seiner Ester mittels DKR ist der Einsatz einer immobilisierten Variante der kommerziellen Lipase TL aus *Pseudomonas stutzeri* und eines Übergangsmetallkatalysators (Shvo-Katalysator) zur Racemisierung. Bisherige Arbeiten zeigten neben dem immensen Potential der DKR von Benzoin auch die Limitierungen bezüglich einer industriellen Umsetzung. Hoyos *et al.* [89] beschrieben eine hohe Instabilität der Lipase TL unter den gewählten Reaktionsbedingungen. Eine nachfolgend entwickelte Immobilisierung der Lipase TL in einer statischen Suspension führte nach Aussage von Hoyos *et al.* [89] zu einer erhöhten Stabilität. Vorexperimente zu dieser Arbeit zeigten jedoch, dass die Silikonpräparate Nachteile in ihrer Handhabung und der reproduzierbaren Herstellung aufweisen. Der verwendete Racemisierungskatalysator ist zudem sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff bzw. Wasser und kann aufgrund des homogenen Charakters nicht wiederverwendet werden.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines verbesserten Reaktionssystems zur DKR von Benzoin. Hauptaugenmerk sollte dabei auf eine einfache Handhabung und hohe Robustheit der eingesetzten Katalysatoren gelegt werden. Zielvorgabe war es, die Ergebnisse dieser Arbeit als Grundlage zur Auslegung einer technischen Umsetzung der DKR von Benzoin in folgenden Projekten anzuwenden. Zur Erfüllung der Zielvorgabe wurden zwei wesentliche Teilziele formuliert und in den entsprechenden Arbeitsschritten bearbeitet:

- (1) Optimierung der kinetischen Racematspaltung
 - » Immobilisierung der Lipase TL, bei der reproduzierbar hochaktive Immobilisate hergestellt werden können, die den Anforderungen einer Reaktion in unkonventionellen Medien genügen (Kapitel 3.1 und 3.2)
 - » Charakterisierung der Reaktionsparameter der KR zur Optimierung der Aktivität und zur Identifikation inaktivierender Einflüsse auf die Lipase TL (Kapitel 3.3)
 - » Maßnahmen zur Steigerung der Stabilität der immobilisierten Lipase TL (Kapitel 3.4)

- (2) Die Entwicklung einer alternativen Racemisierungsmethode zur „onepot“ DKR von Benzoin.
 - » Screening nach alternativen, heterogenen Racemisierungskatalysatoren und Untersuchung ihrer Eignung für die Racemisierung und DKR von Benzoin (Kapitel 3.5)
 - » Charakterisierung und Optimierung der DKR von Benzoin unter Verwendung des alternativen Reaktionssystems (Kapitel 3.6)

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungsmittel und gängige Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders aufgeführt, über die Zulieferer Sigma Aldrich oder Carl Roth bezogen.

Tabelle 3: Chemikalienliste

Bezeichnung	Hersteller, Standort
1,4-Dioxan	Merck (Darmstadt, DE)
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid	Merck (Darmstadt, DE)
2-Komponenten Silikon	Evonik Goldschmidt (Essen, DE)
2-Methyltetrahydrofuran	AppliChem (Darmstadt, DE)
Accurel MP1001	Membrana (Wuppertal, DE)
Benzoin (rac, (R), (S))	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ethanolamin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ethylendiamin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Hydroxylamin	Merck (Darmstadt, DE)
iso-Propanol	VWR (Darmstadt, DE)
Karstedt-Katalysator	Evonik Goldschmidt (Essen, DE)
Lipase TL	Meito Sangyo Co., Ltd. (Nagoya, JPN)
Methylisobutylketon	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Molekularsieb (4 Å)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Palladium auf Kohlenstoff	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Pyridin	AppliChem (Darmstadt, DE)
Roti-Quant	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Sepabead EC-OD	Resindion S.R.L (Binasco, I)

Shvo-Katalysator	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Sulfonsäureträger	Merck (Darmstadt, DE)
Sylgard®184-Komponente A / B	Dow Corning (Wiesbaden, DE)
Syl-Off®4000	Dow Corning (Wiesbaden, DE)
TUD-1-Katalysatoren	TU Delft (Delft, NL) – AK Prof. Hanefeld
Vanadylsulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Vinylbutyrat	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

2.1.2 Geräte

Tabelle 4: Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller, Standort
Autotitrator Titroline Alpha	Schott AG (Mainz, DE)
Feinwaage CP225D	Sartorius (Göttingen, DE)
HPLC & Autosampler	Knauer (Berlin, DE)
HPLC-Pumpe K501	Knauer (Berlin, DE)
Inkubationsschüttler Unimax 1010	Heidolph (Schwabach, DE)
Magnetrührer RCT B	IKA Werk2 (Staufen, DE)
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite M200	Tecan Systems Inc. (Männedorf, CH)
Multirührplatte RT15	Ika (Staufen, DE)
Peristaltikpumpe	Watson & Marlow (Falmouth, GB)
pH-Meter	Metrohm (Filderstadt Plattenhard, DE)
Schlenkline (Eigenanfertigung)	Glasbläserei TU Berlin (Berlin, DE)
Schwingmühle MM301	Retsch (Haan, Deutschland)
Thermomix-Gerät MKR 23	Ditabis AG (Pforzheim, DE)
Thermoschrank	Aqualytic (Dortmund, DE)
Vakuumpumpe MZ 2C	Vakuubrand (Wertheim, DE)
Waage U6100S	Sartorius (Göttingen, DE)
Zentrifuge Biofuge Stratos	Heraeus (Hanau, DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Immobilisierung der Lipase TL

Eine Immobilisierung der Lipase TL erfolgte auf den Trägern Accurel MP1001 und Sepabead EC-OD. Mit dem Zweck der Erhöhung der Zugänglichkeit der Poren für die wässrige Lipaselösung [91] wurden im Fall des Accurel MP1001 500 mg Träger und bei den Sepabead EC-OD 100 mg des Materials mit Ethanol ($7,5 \text{ mL/g}_{\text{Träger}}$) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Entsprechend der zu untersuchenden Lipasestartkonzentration wurde das lyophilisierte Lipase TL-Pulver eingewogen und in 11 mL 10-400 mM Kaliumphosphatpuffer unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur (RT) gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden für 10 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Zur Bestimmung des Proteingehalts vor der Immobilisierung wurde der Enzymlösung eine Probe entnommen und mit der Bradford-Methode (siehe Kapitel 2.2.3) untersucht. Zum Start der Immobilisierung wurde das Trägermaterial, welches sich in 15 mL Glasgefäßen mit Bördelrand befand, mit 10 mL Enzymlösung versetzt, verschlossen und 4 h bei der zu untersuchenden Temperatur auf einem Orbitalschüttler bei 340 rpm inkubiert. Nach Ablauf der Immobilisierungsdauer wurde eine Probe von der Reaktionslösung entnommen und erneut der Proteingehalt bestimmt. Folgend wurden die Immobilisate zur Wäsche zweimal mit 10 mL Immobilisierungspuffer für 5 Minuten geschüttelt und abschließend nach Filtration mit Hilfe einer Vakuumpumpe im Exsikkator im Vakuum getrocknet. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte ebenfalls im Exsikkator und unter reduziertem Druck.

2.2.2 Herstellung der statischen Suspensionen mit der Lipase TL

Die Herstellung der statischen Suspensionen erfolgte nach dem Protokoll von Hoyos *et al.* [89]. Es wurden 4 g der Sylgard®184-Komponente A (Divinylsiloxan) und 0,4 g der Komponente B (Copolymer eines Methylhydrosiloxans und Dimethylsiloxan) sowie 40 mg Platinkatalysator Syl-Off®4000 in 1 mL Hexan homogenisiert. Folgend wurden 105 mg Lipase TL-Pulver zugegeben, kräftig geschüttelt und anschließend durchmischt, bis die Viskosität begann zuzunehmen. Nach sichtbarer Zunahme der Viskosität wurde das Gemisch

in eine stark gerührte wässrige 4 % PVA-Lösung mit einer Temperatur von 45 °C gegeben und für weitere 2 h darin gerührt. Abschließend wurden die statischen Suspensionspartikel abfiltriert, mit Wasser gewaschen und über Nacht bei 40 °C getrocknet. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte im Exsikkator und unter reduziertem Druck.

2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Die Bestimmung des Gesamtproteingehalts erfolgte nach der Methode von Bradford. Diese beruht auf der unspezifischen Komplexbildung zwischen dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 und basischen sowie aromatischen Aminosäureresten der Proteine, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verschiebt [92]. Die Kalibrierung wurde unter Verwendung von Rinderserumalbumin im Konzentrationsbereich von 20 µg/mL bis 100 µg/mL erstellt.

In einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50 µL verdünnte Probe vorgelegt und mit 200 µL Bradfordreagenz, bestehend aus 5,5 Volumenanteilen dest. Wasser und 2 Volumenanteilen Roti-Quant, versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei RT erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm. Alle Messungen wurden mindestens im Doppelansatz durchgeführt.

2.2.4 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Das Standardsystem der Aktivitätsbestimmung ist die kinetische Racematspaltung von Benzoin in Tetrahydrofuran (THF) als Lösungsmittel. Die Standard-Benzoinkonzentration betrug 20 mg/mL (94 mM) und vom Acyldonor Vinylbutyrat (VB) wurden 6 Äquivalente eingesetzt. Die Standardreaktionstemperatur betrug 21,5 °C, was im Folgenden auch als Raumtemperatur (RT) bezeichnet wird. Zur Durchführung des Aktivitätstests wurden 10-60 mg Lipase TL-Immobilisat bzw. Lipase TL-Pulver in 1,5 mL HPLC-Vials vorgelegt und mit 1 mL Benzoinlösung versetzt. Folgend wurde dieser Reaktionsansatz für 10 Minuten bei 1100 rpm in einem Thermomixer geschüttelt, um die mit Luft gefüllten Kavitäten der Accurel-Träger mit Reaktionslösung zu benetzen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von

71,6 μL Vinylbutyrat gestartet und weiterhin geschüttelt. Die Probenentnahme erfolgte nach gewählten Zeitabständen von beispielsweise 3, 6, 9 Minuten mit einer gasdichten Spritze durch ein Septum im Deckel des HPLC-Gefäßes. 20-30 μL Probe wurden folgend in 1 mL *iso*-Propanol überführt, kräftig geschüttelt und mit Hilfe einer HPLC (siehe Kapitel 2.2.16) analysiert. Sofern das native Lipase TL-Pulver untersucht wurde, mussten nach Verdünnung der Probe mit *iso*-Propanol kleinste Mengen des Pulvers durch 1 Minute Zentrifugation bei 13000 rpm abgetrennt und der Überstand in ein leeres HPLC-Gefäß überführt werden.

Der genaue Verdünnungsfaktor ergab sich aus dem Verhältnis der Stoffmenge der Edukte und Produkte in der verdünnten Probe zur Stoffmenge des eingesetzten Benzoin. Die Stoffmengen der Edukte und Produkte konnten aus denen in der HPLC mittels Kalibration aller Substanzen ermittelten Konzentrationen und dem bekannten Volumen (1 mL + Probenmenge) errechnet werden.

Einfluss des Lösungsmittels und der Temperatur

Die Untersuchungen bezüglich einer Lösungsmittelalternative wurden analog zum Standardaktivitätstest durchgeführt. Einzig die Benzoinkonzentration musste aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit angepasst werden. Es wurden erneut 6 Äquivalente Vinylbutyrat verwendet.

Im Rahmen der Bestimmung der spezifischen Aktivität in Abhängigkeit der Temperatur wurde die Benzoinlösung vor Zugabe zum Lipase TL-Immobilisat bzw. zum Lipase TL-Pulver in einem Ölbad vortemperiert und der Thermomixer auf die gewählte Temperatur eingestellt. Alle weiteren Abläufe erfolgten analog dem Standardaktivitätstest.

2.2.5 Silikonbeschichtung der Lipase TL-Immobilisate

Die Beschichtung der Accurel-Lipase TL-Immobilisate erfolgte in Anlehnung an das Beschichtungsprotokoll von Wiemann *et al.* [25]. Es wurden Ansätze von 0,5 g Lipase TL-Immobilisat mit variierenden Silikonmengen verwendet, wobei sich die prozentualen Angaben des Silikonanteils jeweils auf die Gesamtmasse des beschichteten (*silcoat*) Präparats beziehen. Es wurde ein 2-Komponenten Silikon der Firma Evonik Goldschmidt

(Essen) verwendet, welches zum einen aus dem Polymermonomer Divinylsiloxan (V-Siloxan) und zum anderen aus einem SiH-Siloxan als Vernetzer bestand (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 5). Während der Polymerisierung wurde im Bezug auf die reaktiven Gruppen ein Vinylüberschuss von 10 % verwendet. Es wurden 40 ppm Karstedt-Katalysator bezogen auf die Platinmenge pro Gramm Silikon eingesetzt. Die Silikonkomponenten wurden zunächst in das 2-3 fache Volumen Cyclohexan gelöst, der Polymerisationskatalysator zugegeben und mit den Enzympräparaten einer Metallschale durchmischt. Die Durchmischung wurde bis zum Verdampfen des Hauptteils des Cyclohexans fortgeführt. Die beschichteten Immobilisate wurden nachfolgend noch für ca. 1 h im Abzug stehen gelassen und dann bis zur Verwendung bei RT im Exsikkator unter vermindertem Druck gelagert.

Tabelle 5: Strukturen der Siloxane des 2-Komponentensilikon

Abkürzung	Strukturformel	Viskosität (η) und Molekulargewicht (MW)*
Divinylsiloxane		
A 100	$\text{CH}_2=\text{CH}-\text{SiOMe}_2-(\text{SiOMe}_2)_{98}-\text{SiOMe}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$	η : 100-150 mPa/s MW: 7438 g/mol
SiH-Siloxane		
B 5	$\text{Me}_3\text{SiO}-(\text{SiOMe}_2)_{43}-(\text{SiOMeH})_5-\text{SiOMe}_3$ [10 % der Siliziumatome sind funktionalisiert]	η : 50-120 mPa/s MW: 3639 g/mol

Herstellerangaben (Evonik Goldschmidt GmbH, Essen)

2.2.6 Einstellung der Wasseraktivität in THF

Zur Einstellung der Wasseraktivität wurden definierte Wassermengen zu trockenem THF gegeben. Den Zusammenhang des Wassergehaltes und der Wasseraktivität wurde einer Tabelle aus dem Skript zur Vorlesung Enzymtechnologie III von Frau Prof. Dr. Ansorge-Schumacher entnommen. Um das THF zu trocknen wurde, dies über wasserfreien Natriumsulfat über Nacht gelagert und unter verminderten Druck davon getrennt. Die Lagerung erfolgt anschließend mit aktivierten Molsieben unter einer Argon-Atmosphäre. Der Aktivitätstests in diesen Lösungsmitteln erfolgte nach dem Standardprotokoll und wurde

umgehend nach Einstellung der Wasseraktivität durchgeführt. Die Menge an zugesetztem Wasser ist der Tabelle 12 zu entnehmen.

2.2.7 Bestimmung der Lagerstabilität

Zur Bestimmung der Halbwertszeiten der Lagerstabilität der Lipase TL-Immobilisate bzw. des nativen Lipase TL-Pulvers wurde die Abnahme der spezifischen Aktivität über die Zeit bei definierten Bedingungen bestimmt. Zur Durchführung dieser Untersuchung wurden Aliquots des zu untersuchenden Enzympräparats eingewogen und unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Die Restaktivität von jeweils zwei Aliquots wurde nach gewählten Zeiträumen nach folgenden Protokollen ermittelt. Die Vorgehensweise zur Berechnung der Halbwertszeiten aus den ermittelten Aktivitäten kann Kapitel 3.3.2 entnommen werden.

Standardlagerstabilitätstest

5-20 mg Lipase TL-Immobilisat bzw. Lipase TL-Pulver wurde mit 500 μ L THF versetzt und für definierte Zeiträume von beispielsweise 2, 4, 6, 8 h bei 1100 rpm und 21,5 °C inkubiert. 10 Minuten vor den gewählten Zeitpunkten wurden 500 μ L Benzoinlösung in THF (188 mM) hinzugefügt. Die Reaktion wurde durch die nachfolgende Zugabe von 71,6 μ L Vinylbutyrat (6 Äquivalente) gestartet. Die Probenbehandlung erfolgte wie unter Kapitel 2.2.4 beschrieben.

Einfluss der Edukte und Produkte auf die Lagerstabilität

Zur Bestimmung der Lagerstabilität bei Anwesenheit des Benzoins wurden je 20 mg Lipase TL-Immobilisat in 1 mL einer 94 mM Benzoinlösung (in THF) inkubiert und der Aktivitätstest zweier Aliquots zu gewählten Zeitpunkten durch Zugabe von 71,6 μ L Vinylbutyrat gestartet. Für die Vinylbutyrat-abhängige Lagerstabilität wurden 500 μ L THF mit 35,8 μ L Vinylbutyrat versetzt und je 20 mg Lipase TL-Immobilisat darin inkubiert. Der Aktivitätstest wurde durch Zugabe von weiteren 35,8 μ L Vinylbutyrat und 500 μ L einer 188 mM Benzoinlösung (in THF) gestartet.

Zur Bestimmung der produktabhängigen Lagerstabilitäten wurden je 20 mg Lipase TL-Immobilisat in 1 mL THF mit entweder 47 mM Benzoinbutyrat oder 47 mM Acetaldehyd inkubiert. Dies entspricht der Konzentration an Produkt bei einem Umsatz von 50 % des racemischen Benzoin. 10 Minuten vor den gewählten Zeitpunkten der Restaktivitätsbestimmung wurden dem Reaktionsansatz 500 µL einer 188 mM Benzoinlösung (in THF) zugegeben und der Aktivitätstest durch Zugabe von 71,6 µL Vinylbutyrat gestartet.

Einfluss des Lösungsmittels

Die Bestimmung der Lagerstabilität in Abhängigkeit des Lösungsmittels erfolgte analog zum Standardlagerstabilitätstest mit dem jeweiligen Lösungsmittel. Die Benzoinkonzentration wurde je nach Löslichkeit im untersuchten Lösungsmittel von 23,5-188 mM variiert.

Einfluss der Temperatur

Zur Bestimmung der Lagerstabilität in Abhängigkeit der Temperatur wurden die Lipase TL-Immobilisate während der Inkubation in 500 µL THF bei der gewählten Temperatur (21,5-99 °C) im Thermomixer geschüttelt. Die Benzoinlösung (in THF) wurde in einem Ölbad entsprechend temperiert und zu gewählten Zeitpunkten zur Bestimmung der Restaktivität dem Reaktionsansatz zugegeben. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog zum Standardlagerstabilitätstest.

2.2.8 Bestimmung der Prozessstabilität

2.2.8.1 Wiederholte Batch-Versuche

Die Untersuchung der Prozessstabilität der nativen sowie der mit Silikon beschichteten Accurel-Lipase TL-Immobilisate in wiederholten Batch-Versuchen erfolgte in THF als Lösungsmittel und bei 21,5 °C. Die Reaktionsansätze entsprachen denen des Standardaktivitätstests, wobei je nach Silikonmenge auf den Enzympräparaten eine entsprechende größere Menge der beschichteten Immobilisate eingewogen wurde, um letztlich in allen Ansätzen 30 mg Lipase TL-Immobilisat vorliegen zu haben. Nach Start des ersten Zyklus wurden zu gewählten Abständen Proben entnommen und die Zeit bestimmt,

bis ein Umsatz von 50 % erreicht wurde. Nach Beendigung der KR wurden die Immobilisate 2 Mal mit THF gewaschen und filtriert. Die Immobilisate wurden dann in weiteren Zyklen eingesetzt, wobei diese jeweils nach 3 h abgebrochen wurden. Es wurden sowohl die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit als auch der Umsatz nach 3 h bestimmt.

2.2.8.2 Kontinuierliches Reaktionssystem

Die Bestimmung der Prozessstabilität in einem kontinuierlichen System wurde durch einen kontinuierlichen Rührkesselreaktor (CSTR) realisiert. Der Reaktor bestand zunächst aus einem 6 mL Schnappdeckelglas, welches mit einem Umstülpstופן aus Silikon verschlossen wurde. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde ein 6 mL Glasgefäß verwendet, welches durch das Vorhandensein eines Gewindes mit einem Deckel inkl. lösungsmittelbeständiger Dichtungen verschlossen werden konnte (siehe Abbildung 28). Der Wechsel des Reaktors hatte keinen Einfluss auf die bestimmten Halbwertszeiten. Die Substratlösung wurde durch druckfeste Kunststoffkapillaren mit einem Innendurchmesser von 1 mm mit Hilfe einer HPLC-Hochdruckpumpe gefördert. Nach einer vollständigen Füllung des Reaktors mit Substratlösung konnte diese durch den entstehenden Überdruck über eine weitere Kapillare in das Auffanggefäß abfließen. Die Auslasskapillare befand sich in einem Deckeleinsatz aus Teflon, der den Reaktionsraum und die Kapillare räumlich durch einen Edelstahlfilter mit Maschenweiten von 50 µm abgrenzte (siehe Aufbau in Abbildung 28). Probennahme erfolgte am Ende der Auslasskapillare zu gewählten Zeitpunkten. Die Durchmischung im Reaktor wurde durch sternförmige Reagenzglas-Rührfische sichergestellt.

In einer beispielhaften Untersuchung wurden 50 mg Lipase TL-Immobilisat im Reaktor vorgelegt und der Rührfisch zugegeben. Nach dem Verschließen des Reaktorgefäßes wurden die Zu- und Ablaufkapillaren angeschlossen. Das Vorratsgefäß wurde mit einer Benzoinlösung (in THF) (23,5-94 mM) und 3 Äquivalenten Vinylbutyrat unter Verdrängung des gesamten Luftraumes gefüllt. Die gewählte Flussrate wurde an der Pumpe eingestellt und der Magnetrührer gestartet. In regelmäßigen Zeitabständen wurde eine Probe des Ablaufs entnommen und in *iso*-Propanol überführt. Die Analyse erfolgte analog zur Standardaktivitätsbestimmung mittels HPLC (siehe Kapitel 2.2.16) analysiert.

Die Vorgehensweise zur Berechnung der Halbwertszeiten aus den ermittelten Umsätzen kann Kapitel 3.3.3 entnommen werden.

2.2.9 Untersuchung der mechanischen Stabilität

Zur Untersuchung der mechanischen Stabilität wurden die nativen sowie mit Silikon beschichteten Accurel-Lipase TL-Immobilisate, welche einen Silikonanteil von 70 % aufwiesen, in einer Schwingmühle zusammen mit einer definierten Menge an Glaskugeln geschüttelt. Es wurden 1 g natives Lipase TL-Immobilisat und ca. 1,5 g beschichtetes Lipase TL-Immobilisat mit ca. 3 g Glaskugeln (Durchmesser: 2 mm) in ein Metallgefäß gegeben. Der Ansatz wurde bei einer Frequenz von 30 sec^{-1} für 5 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Es wurden Proben der behandelten Träger rasterelektronenmikroskopisch untersucht.

2.2.10 Aufnahmen am Rasterelektronenmikroskop (REM)

Alle hier aufgeführten REM-Aufnahmen wurden am Zentrum für Elektronenmikroskopie der Technischen Universität Berlin mittels eines Rasterelektronenmikroskops (Hitachi S 2700 mit Wolfram Elektrode, Beschleunigungsspannung: 20 kV, Elektronenstrahlstärke: 500 nA) erstellt. Die Partikel wurden mittels doppelseitig klebender Folie auf einen Aluminium-Probenteller fixiert und für die Oberflächenaufnahmen mit Gold besputtert (Filmdicke ca. 20 nm).

2.2.11 Modifikation der immobilisierten Lipase TL

2.2.11.1 Beschichtung mit Polyethylenimin

Die Modifikation der immobilisierten Lipase TL mit Polyethylenimin wurde in Anlehnung an die Vorschrift von Guisan *et al.* [93] durchgeführt. Dazu wurden 100 mg Lipase TL-Immobilisat mit Ethanol ($7,5 \text{ mL/g}_{\text{Träger}}$) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 mL Polyethylenimin (PEI) in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH

6,2, Endkonzentration PEI 1 %). Die Modifikation wurde für 1 h bei RT unter konstantem Schütteln bei 340 rpm durchgeführt. Die Immobilisate wurden vom Überstand getrennt, mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen und nach Vakuumfiltration im Exsikkator getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die modifizierten Immobilisate im Exsikkator bei reduziertem Druck gelagert. Da die Immobilisate eine Gewichtserhöhung von ca. 10 % nach der Modifikation aufwiesen, musste in weiterführenden Untersuchungen die Präparatmenge erhöht werden.

2.2.11.2 Succinylierung

Die Modifikation mit Bernsteinsäureanhydrid (BSSA) erfolgte nach dem Protokoll von Bianchi *et al.* [94]. 100 mg Lipase TL-Immobilisat wurden mit Ethanol (7,5 mL/g_{Träger}) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. 20 mg BSSA wurden in 2 mL 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 8) gelöst. Der pH-Wert wurde unter Verwendung eines Autotitrators durch Zugabe von 1 M Kaliumhydroxidlösung konstant gehalten. Das inkubierte Immobilisat wurde mit der BSSA-Lösung versetzt und für 2 h bei 20 °C und 340 rpm geschüttelt. Der Überstand wurde abgetrennt und die modifizierten Immobilisate mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen. Nach einer Vakuumfiltration erfolgte die Trocknung im Exsikkator. Die modifizierten Immobilisate wurden ebenfalls im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung unter reduziertem Druck gelagert.

2.2.11.3 Acylierung mit aktivierten Methoxypolyethylenglykolen (mPEG)

Die Modifikation mit p-Nitrophenyl-mPEG_n-carbonat erfolgte in Anlehnung an die Vorschrift von Ratzka *et al.* [95]. Die aktivierten mPEG's wurden arbeitsgruppenintern hergestellt und waren identisch mit denen aus der Studie von Ratzka *et al.* [95]. 100 mg Lipase TL-Immobilisat wurden mit Ethanol (7,5 mL/g_{Träger}) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurde 2 mL 200 mM Kaliumphosphatpuffers (pH 6,2) zugegeben. Zur Reaktionslösung wurden p-Nitrophenyl-mPEG₂₀₀₀-carbonat bzw. p-Nitrophenyl-mPEG₅₀₀₀-carbonat im molaren Überschuss von 1:100 und 1:500 (bezogen auf die Molmasse an Protein auf den Trägern) hinzugefügt. Die Modifikation erfolgte für 2 h bei RT und 340 rpm

auf einem Orbitalschüttler. Der Überstand wurde abgetrennt und die modifizierten Immobilisate mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen. Nach einer Vakuumfiltration erfolgte die Trocknung im Exsikkator. Die modifizierten Immobilisate wurden ebenfalls im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung unter reduziertem Druck gelagert.

2.2.11.4 Hydroxyethylamidierung

Die Hydroxyethylamidierung mit Ethanolamin erfolgte gemäß eines Protokolls von Cabrera *et al.* [96]. Dazu wurden 100 mg Lipase TL-Immobilisat mit Ethanol (7,5 mL/g_{Träger}) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 mL 1 M Ethanolamin (EA) in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH = 4,75). Im nächsten Schritt wurden 16 mg 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 90 Minuten bei 25 °C und 340 rpm geschüttelt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Immobilisate mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) gewaschen, mit 6 mL 0,1 M Hydroxylamin in 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7) versetzt und für 4 h bei 25 °C und 340 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Die modifizierten Immobilisate wurden gefiltert, mit Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen und nach einer Vakuumfiltration im Exsikkator getrocknet. Die modifizierten Immobilisate wurden ebenfalls im Exsikkator bis zur weiteren Verwendung unter reduziertem Druck gelagert.

2.2.11.5 Aminoethylamidierung

Die Aminoethylamidierung wurde analog zur Hydroxyethylamidierung (siehe Kapitel 2.2.11.4) nach einem Protokoll von Cabrera *et al.* [96] durchgeführt, wobei anstelle des Ethanolamin hierbei Ethylendiamin verwendet wurde.

2.2.11.6 Dextranaldehyd-Modifikation

Die Modifikation mit Dextranaldehyden erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Fernandez-Lafuente *et al.* [97]. Die hier verwendeten Dextranaldehyde wurden bereits in vorherigen Studien im Arbeitskreis hergestellt und sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Die

Bezeichnung des Öffnungsgrades entspricht dabei der Anzahl an Natriumperiodat-Äquivalenten, die während der Aktivierung zugesetzt wurden.

Tabelle 6: Eingesetzte Dextranaldehyde

Molare Masse [kDa]	Öffnungsgrad ¹	Verwendete Abkürzung
10	1	D10-1
10	5	D10-5
10	10	D10-10
40	1	D40-1
40	5	D40-5
40	10	D40-10
100	1	D100-1
100	5	D100-5
100	10	D100-10
100	20	D100-20

¹ Entspricht der Anzahl an Natriumperiodat-Äquivalenten, die während der Aktivierung zugesetzt wurden

Es wurden 100 mg des Lipase TL-Immobilisats mit Ethanol (7,5 mL/g_{Träger}) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 5,2 mL einer 33,33 mg/mL Dextranaldehydlösung (Mengenverhältnis Enzym:Dextranaldehyd 1:25). Die Reaktionslösung wurde für 2 h bei 20 °C und 340 rpm geschüttelt. Die Immobilisate wurden vom Überstand getrennt, mit 200 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,2) gewaschen und nach Vakuumfiltration im Exsikkator getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die modifizierten Immobilisate im Exsikkator bei reduziertem Druck gelagert.

2.2.12 Racemisierung von (R)-Benzoin

Das zur Racemisierung eingesetzte (R)-Benzoin wurde im Rahmen dieser Arbeit selbst aus einem Reaktionsgemisch der kinetischen Racematspaltung gereinigt (siehe Kapitel 2.2.15.1).

Die TUD-1-Katalysatoren wurden bis zur Verwendung bei 100 °C und alle weiteren Katalysatoren bei RT gelagert. Zur Verwendung der TUD-1 Katalysatoren wurden 20 mg in 10 mL Schlenkkolben eingewogen und nochmals für mindestens 8 h bei 100 °C aufbewahrt. Die darauffolgende Evakuierung an der Schlenkanlage erfolgte noch im heißen Zustand. Es wurden 3 Schlenkzyklen durchgeführt. Die Temperierung der Kolben erfolgte durch ein Ölbad. Zur Durchmischung wurden sternförmige Reagenzglas-Rührfische bereits während der Einwaage zugeben. Die restlichen Katalysatoren wurden nach der Einwaage von 20 mg direkt an die Schlenkanlage angeschlossen und durch 3 Schlenkzyklen für die Reaktion vorbereitet. Die Reaktion wurde unter Stickstoffbedingungen durch die Zugabe von 500 µL einer 94 mM (R)-Benzoinlösung im jeweiligen Lösungsmittel gestartet. Die Substratzugabe sowie die Probenentnahme (10 µL) erfolgten im Gegenstrom. Die Proben wurden mit 1 mL *iso*-Propanol verdünnt und mittels HPLC der Enantiomerenüberschuss (*ee*) analysiert.

2.2.13 Dynamisch kinetische Racematspaltung mit TUD-1 Katalysatoren

Analog zu den Racemisierungsversuchen wurden 6-20 mg der jeweiligen TUD-1 Katalysatoren in 10 mL Schlenkkolben eingewogen und gemeinsam mit den Rührfischen für mindestens 8 h bei 100 °C gelagert. Die Kolben wurden heiß an die Schlenkanlage angeschlossen und 3 Schlenkzyklen durchgeführt. Die folgende Zugabe von 5-20 mg Lipase TL-Immobilisat erfolgte im Stickstoffgegenstrom. Es wurden erneut 3 Schlenkzyklen durchgeführt. Im Stickstoffstrom wurden dann eine 94 mM Benzoinlösung im jeweiligen Lösungsmittel und 35,8 µL Vinylbutyrat (6 Äquivalente) zugegeben und damit die Reaktion gestartet. Es wurden 10 µL Proben zu geeigneten Zeitpunkten im Gegenstrom entnommen und mit 1 mL *iso*-Propanol verdünnt. Die Analyse der Produktbildung und des Enantiomerenüberschusses erfolgte mittels HPLC (siehe Kapitel 2.2.16).

2.2.14 Rezyklierung der dynamisch kinetischen Racematspaltung

In der Durchführung der Rezyklierung der DKR wurde der erste Zyklus gemäß der Beschreibung aus Kapitel 2.2.13 durchgeführt. Nach Beendigung des ersten und analog dazu der weiteren Zyklen wurde der Überstand abgenommen und die Lipase TL-Immobilisate

sowie die TUD-1 Katalysatoren zweimal mit je 5 mL des jeweiligen Lösungsmittels gewaschen. Die Abnahme des Reaktionsgemisches und des Waschlösungsmittels erfolgte über einen HPLC-Lösungsmittelfilter, der durch einen Schlauch mit einer 10 mL Spritze verbunden war. Damit konnte ein Verlust der sehr feinen TUD-1 Katalysatoren verhindert werden. Nach erneuter Zugabe von 500 μ L 94 mM Benzoinlösung und 35,8 μ L Vinylbutyrat (6 Äquivalente) wurden die Zyklen neu gestartet.

2.2.15 Aufreinigungen und Synthesen

2.2.15.1 Aufreinigung von (R)-Benzoin

Zur Gewinnung von größeren Mengen an reinem (R)-Benzoin wurde der Maßstab der kinetischen Racematspaltung mit den Lipase TL-Immobilisaten vergrößert. Es wurden pro Ansatz 2 g racemisches Benzoin in 100 mL THF gelöst und zu 1 g Lipase TL-Immobilisat gegeben. Die Zugabe von 3,58 mL Vinylbutyrat (3 Äquivalente) startete die Reaktion, die über Nacht bei RT gerührt wurde. Nach Kontrolle des Umsatzes von 50 % mittels HPLC wurde die Reaktionslösung filtriert und der Überstand am Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel getrennt. Das zurückbleibende Gemisch aus Vinylbutyrat, (R)-Benzoin und (S)-Benzoinbutyrat wurde in Dichlormethan aufgenommen. Die Reinigung des (R)-Benzoins erfolgte über eine Kieselgelsäulenchromatographie mit einem Laufmittel aus *n*-Hexan/Ethylacetat (5:1). (R)-Benzoin konnte nach Abtrennung des Laufmittels als weißer Feststoff erhalten werden. Da die HPLC-Kalibrierung zur Analyse von Benzoin durch kommerziell erhältliche Reinsubstanzen der Benzoinenantiomere durchgeführt wurde, war die Identifikation des (R)-Benzoins problemlos möglich. Es konnte eine Reinheit von >98 % festgestellt werden.

2.2.15.2 Synthese von Benzoinbutyrat

Zur Identifikation und Kalibrierung der Produkte der (dynamisch) kinetischen Racematspaltung in der HPLC-Analyse wurde Benzoinbutyrat chemisch nach dem Protokoll von Hoyos *et al.* [70] synthetisiert. Es wurden 2 mmol Benzoin (1 Äquivalent), 2,2 mmol

Triethylamin (1,1 Äquivalente) und 3 mmol Butyrylchlorid (1,5 Äquivalente) in 6 mL Dichlormethan gelöst. Das Gemisch wurde mit Argon überschichtet und bei 30 °C für 15 h gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mittels Kieselgelsäulenchromatographie mit dem Laufmittel *n*-Hexan/Ethylacetat (5:1) getrennt und per ¹H-NMR analysiert.

¹H-NMR Benzoinbutyrat (CDCl₃, 400 MHz): δ (ppm) = 0.98 (s, 1H, 3-H), 1.69- 1.174 (d, *J*= 15 Hz, 2H, 2-H), 2.4- 2.5 (s, 2H, 3-H), 6.86 (s, 1H, 4-H), 7.93 (s, 2H, 5-H), 7.36 (s, 2H, 6-H), 7.38 (s, 3H, 7-H), 7.48 (s 2H, 7-H), 7.51 (s, 1H, 9-H).

2.2.15.3 Synthese von Ru-Hydroxyapatit

Die Herstellung des Ruthenium-Hydroxyapatits erfolgte nach einem Protokoll von Wuyts *et al.* [98]. Zur Herstellung des Hydroxyapatit (HAP) wurden 0,2 mol Calciumnitrat (Ca(NO₃)₂·4 H₂O) in 100 mL dest. Wasser gelöst und durch Zugabe von ca. 4 mL 25 % Ammoniaklösung auf pH 11 eingestellt. Es wurde eine zweite Lösung bestehend aus 0,12 mol Ammoniumphosphat ((NH₄)₂HPO₄) in 250 mL dest. Wasser hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde ebenfalls durch 25 % Ammoniaklösung auf pH 11 gebracht. Unter starkem Rühren wurde die Phosphatlösung mit einer peristaltischen Schlauchpumpe und einer Flussrate von 4-5 mL/h zur Ca²⁺-Lösung gegeben, wodurch ein weißes Präzipitat gebildet wurde. Nach vollständiger Zugabe wurde das Gemisch für weitere 2 h bei RT gerührt und anschließend für 1 h unter Reflux erhitzt. Nach abkühlen auf RT wurde der Ansatz für 20 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und nachfolgend zweimal mit dest. Wasser gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert. Der Feststoff wurde abschließend lyophilisiert. Zur Beladung mit Ruthenium wurde 1 g HAP in 45 mL dest Wasser suspendiert, welches 2 % Rutheniumchlorid (RuCl₃) enthielt. Die Suspension wurde für 24 h geschüttelt und abschließend erneut gewaschen, zentrifugiert und lyophilisiert.

2.2.16 Parameter der HPLC-Analytik

Die Analyse der Proben der (dynamisch) kinetischen Racematspaltung bzw. der Racemisierung erfolgte mittels HPLC. Die Trennung der Substanzen und der jeweiligen

Enantiomere erfolgte auf der chiralen Säule Chiralpak IA. Als Eluenten wurden *n*-Hexan und *iso*-Propanol verwendet. Die Detektion erfolgte durch einen Diodenarraydetektor bei einer definierten Wellenlänge von 243 nm, wobei der gesamte Wellenlängenbereich zwischen 193-400 nm erfasst wurde. Die Parameter der HPLC-Methode sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Parameter der HPLC-Methode

Parameter	Information
Säule	Chiralpak IA, 250 x 4,6 mm ID
Detektor	Smartline UV Detector 2600 (Diodenarray - Detektor)
Durchflussrate	1,2 mL/min
Temperatur	40 °C
Injektionsvolumen	20 µL

Die Retentionszeiten der Enantiomere des Benzoin und des Benzoinbutyrats bei den genannten Parametern sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Retentionszeiten der Enantiomere von Benzoin und Benzoinbutyrat

Substanzen	Retentionszeit [min]
(R)-Benzoinbutyrat	4,75
(S)-Benzoinbutyrat	5,55
(R)-Benzoin	9,85
(S)-Benzoin	11,08

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Vorarbeiten zur Immobilisierung

3.1.1 Methodenauswahl

Die Lipase TL, welche von der japanischen Firma *Meito Sangyo Co., Ltd.* vertrieben wird, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen in unterschiedlicher Weise immobilisiert. Die bisherigen Arbeiten sollen hier als Ausgangspunkt zur Entwicklung einer optimierten Immobilisierungsmethode kurz genannt und vor dem Hintergrund einer Eignung für das Erreichen des Projektziels diskutiert werden.

Trägerlose Quervernetzung

Die Firma *CLEA Technologies* bietet eine trägerlos immobilisierte Variante der Lipase TL an. Zur Herstellung der Immobilisate werden die Enzyme ausgefällt und die Aggregate mit Hilfe multivalenter Reagenzien kovalent quervernetzt [28, 29]. Laut Hersteller werden die dabei entstehenden „cross-linked enzyme aggregates (CLEA)“ als Suspension vertrieben und verfügen über eine Hydrolyseaktivität von ca. 1200 TBU/mL (Tributyryl Units). Es werden zwei Varianten angeboten, wobei eine den Zusatz trägt, besonders für den Einsatz in organischen Medien geeignet zu sein. Es wird in den vom Hersteller bereitgestellten Informationen nicht genauer auf die Unterschiede der Präparate eingegangen.

Nachteile dieser Methode, welche einen vielfältigen Einsatz in industriellen Synthesen erschweren, sind die oft sehr kleinen Partikelgrößen, eine geringe mechanische Stabilität [24] und auch die häufigen Aktivitätsverluste in der Herstellung der CLEA [99]. Die Verwendung toxischer Reagenzien wie beispielsweise Glutardialdehyd oder Diisocyanate zur Herstellung der Aggregate können die Verwendung dieser in pharmazeutischen Produktionen aufgrund hoher Reinheitsanforderungen deutlich erschweren. Diese grundlegenden Herausforderungen bei der Verwendung der Methode, aber auch angesichts der bereits erfolgten kommerziellen Etablierung der *Pseudomonas stutzeri* CLEA-Immobilisierung wird in diesem Projekt von einer Optimierung der Methode abgesehen.

Einbettung

Hoyos *et al.* [89] verwendeten verschiedene Einhüllungsmethoden, um die Lipase TL zu immobilisieren. Dabei wurden zum einen Sol-Gele nach Protokollen von Reetz *et al.* [22] aus *Iso*-butyltrimethoxysilan, Propyltrimethoxysilan und Tetramethoxysilan hergestellt und die Lipase darin eingebettet. Des Weiteren entwickelten Buthe *et al.* [100] eine Methode zur Herstellung statischer Emulsionen, die dann auf die Lipase TL angewandt wurde. Hierbei wurde das Enzym, gelöst in einer wässrigen Phase, in Silikonphären eingehüllt. Die dabei gebildeten Immobilisate sind in Abhängigkeit ihres Trocknungsgrades auch für wasserfreie Umesterungsreaktionen geeignet [89]. Die dritte Variante der Einhüllung stellt die Bildung statischer Suspensionen dar. Hierbei wurde ähnlich der statischen Emulsion das Enzym in Silikon eingebettet, wobei das trockene Enzympräparat verwendet wurde. Charakterisiert in der kinetischen Racematspaltung (KR) von Benzoin wiesen die statischen Emulsionen eine etwas verringerte spezifische Aktivität im Vergleich zum kommerziellen Präparat auf. Die Sol-Gel Immobilisate zeigten eine um 40 % erhöhte und die statische Suspension sogar eine um ca. 120 % gesteigerte, auf das immobilisierte Protein bezogene, Aktivität.

Trotz dieser signifikanten Aktivitätssteigerungen ist dieser Ansatz in wesentlichen Aspekten zu hinterfragen. Die Methode zur Herstellung der Immobilisate basiert auf der Etablierung einer Dispersion des noch flüssigen Silikons (inklusive der suspendierten Lipase TL) in einer wässrigen Polyvinylalkohol-Lösung. In Vorversuchen zur Reproduktion der publizierten Methode fiel auf, dass das Lipasepulver lediglich makroskopisch fein suspendiert im Silikon vorliegt. Bei genauerer Betrachtung einer beispielhaft in eine Petrischale ausgegossenen statischen Suspension war festzustellen, dass sich bei Anwendung dieser Vorgehensweise Agglomerate des Enzympulvers unterschiedlicher Größe bildeten (Abbildung 7). Dies hat zwangsläufig zur Folge, dass die nachfolgend gebildeten statischen Suspensionspartikel über verschieden hohe Enzymbeladungen verfügen und somit die reproduzierbare Herstellung von Immobilisaten ähnlicher Aktivität schwierig sein dürfte. Des Weiteren ist anzunehmen, dass durch die Agglomeration des Pulvers Diffusionsbeschränkungen auftreten, die das katalytische Potential der Lipase TL negativ beeinflussen. Die statischen Suspensionen sollen

daher in dieser Arbeit lediglich als Referenz dienen, um die hier entwickelten Immobilisate zu bewerten.

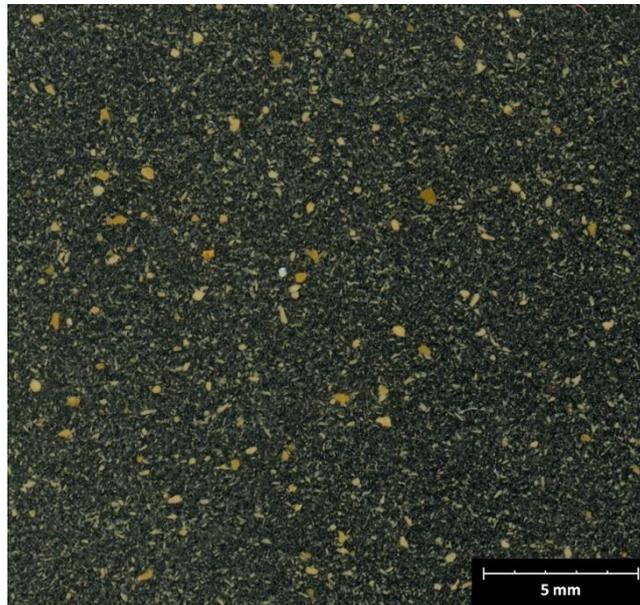


Abbildung 7: Detailaufnahme einer statischen Suspension mit Lipase TL-Pulveragglomerate

Adsorptive Trägerbindung

Fauré und Illanes [101] berichteten von einer adsorptiven Bindung der Lipase aus *Pseudomonas stutzeri* an verschiedenen funktionalisierte hydrophobe Trägermaterialien (Sepabeads). Dabei wurden zum einen Träger mit Butyl- und zum anderen mit Octadecylgruppen verwendet. Die Immobilisate wiesen im Vergleich zur nicht immobilisierten Variante im Fall der Butyl-Träger eine geringere Aktivitätsausbeute (ca. 25 %) und eine um 100 % gesteigerte Ausbeute bei den Octadecylträgern auf. Eingesetzt wurden die Immobilisate in der Umesterung von Sterolen mit Fettsäureestern in organischen Lösungsmitteln wie *tert*-Butanol bzw. *n*-Hexan.

Das hier verwendete Immobilisierungsprotokoll ist simpel durchzuführen und eignet sich daher sehr gut für eine großtechnische Umsetzung. Die signifikante Steigerung der spezifischen Aktivität sowie der Verzicht auf giftige Reagenzien unterstreicht dies eindeutig. Die Verwendung einer kovalenten Immobilisierung auf beispielsweise Amino-funktionalisierten Trägern wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter in Betracht gezogen.

Vorversuche zu dieser Variante der Immobilisierung zeigten eine vollständige Inaktivierung der Lipase TL im Vergleich zur nativen Form (Daten nicht gezeigt). Obwohl eine Optimierung dieser Methode potentiell eine Verbesserung der Ergebnisse herbeiführen könnte, steht der generelle Aktivitätsverlust einer anzunehmenden Hyperaktivierung im Fall der adsorptiven Trägerbindung gegenüber. Zudem sollte der Vorteil eines verringerten Enzymleachings in wässrigen Systemen als Folge einer kovalenten Trägerbindung in diesem Projekt eine untergeordnete Rolle spielen, da die Immobilisate in organischen Lösungsmitteln eingesetzt werden.

Fazit

Die aufgezeigten Immobilisierungsvarianten der Lipase TL aus *Pseudomonas stutzeri* weisen in den meisten Fällen eine Steigerung der spezifischen Aktivität auf. Dennoch sind die Methoden der Einhüllung sowie der kovalenten Vernetzung bzw. kovalenten Trägerbindung in Anbetracht der Zielvorgaben dieser Arbeit kritisch zu betrachten. Die Durchführung aufwändiger Protokolle, der potentielle Aktivitätsverlust während der Immobilisierung und aufgrund der Agglomeration der Lipase sowie die Verwendung giftiger Reagenzien sind die wesentlichen Nachteile dieser Methoden. Aufgrund dessen sowie der oft publizierten Vorteile der adsorptiven Lipaseimmobilisierung auf hydrophoben Trägermaterialien (einfaches Protokoll, potentielle Hyperaktivierung der Lipase, einfache Abtrennbarkeit) [24, 26, 27, 102] wurde diese Methode auch im Rahmen dieser Arbeit favorisiert. Da es bisher keine Arbeiten bezüglich der optimalen Immobilisierungsparameter für eine adsorptive Bindung der Lipase TL gibt, wurden ausgewählte Faktoren variiert und deren Einfluss auf die Immobilisierung untersucht.

3.1.2 Auswahl geeigneter Trägermaterialien

Für die Eignung von Trägermaterialien für eine adsorptive Immobilisierung sind vor allem physikalische und chemische Eigenschaften der jeweiligen Oberfläche bestimmend [24]. Dabei zählen die Größe der Partikel selbst, die Porendurchmesser als auch die verfügbare Oberfläche zu den physikalischen Eigenschaften und die chemische Struktur der Träger sowie Bindungsfunktionalitäten auf der Oberfläche zu den chemischen Begebenheiten.

Für die Trägersauswahl der hier durchzuführenden Immobilisierung wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt (Tabelle 9):

Tabelle 9: Kriterien zur Auswahl geeigneter Trägermaterialien

Kriterium	Erklärung
Porösität / große spezifische Oberfläche	» Eine große Oberfläche erhöht die Beladungskapazität pro Träger und somit evtl. die spezifische Aktivität der Träger
Ausreichende Korngröße ($\varnothing \geq 100 \mu\text{m}$)	» Gute Abtrennbarkeit am Ende der Synthese » Größere Partikeldurchmesser verringern den Gegendruck in Festbettreaktoren [24]
Stark hydrophober Charakter	» Bisherige Studien zeigten bereits die Möglichkeit der Hyperaktivierung der Lipase TL bei einem Kontakt mit hydrophoben Oberflächen [89, 101]
Chemisch inert	» Vermeidung von Träger-katalysierten Nebenreaktionen » Hohe Wiederverwendbarkeit
Hohe mechanische Stabilität / <i>silcoat</i> -Eignung	» Einfache Abtrennbarkeit durch konstante Partikelgrößen » <i>Silcoat</i> -Methode: Mechanische Stabilisierung poröser Materialien durch eine Kompositbildung mit Silikon [25, 103]
Kommerzielle Verfügbarkeit	» Voraussetzung für einfache technische Umsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin zwei potentiell geeignete Trägermaterialien ausgewählt. Die Träger mit ihren wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Trägermaterialien zur Immobilisierung der Lipase TL

Träger (Hersteller)	Material	Spez. Oberfläche	Partikelgröße	Beispiele für immobilisierte Lipasen
Accurel MP 1001 (Membrana)	Polypropylen	35 m ² /g	400-1000 μm	<i>P. cepacia</i> Lipase [104], <i>C. rugosa</i> Lipase [105] <i>C. antarctica</i> Lipase B [106] <i>M. javanicus</i> Lipase [107]
Sepabead EC-OD (Resindion)	Polymethacrylat	86 m ² /g	150-300 μm	<i>P. stutzeri</i> Lipase [101] <i>C. antarctica</i> Lipase B [108] <i>R. miehie</i> Lipase [93] <i>C. rugosa</i> Lipase [93]

Bei beiden Trägern handelt es sich um hochporöse synthetische Polymere, welche kommerziell erhältlich sind. Die schwammartigen Accurel MP1001 (folgend als Accurel bezeichnet) sind aufgrund ihres Polypropylengerüsts als stark hydrophob einzustufen. Sepabead EC-OD (folgend als Sepabead bezeichnet), bestehend aus einem Polymethacrylat, besitzt zusätzlich gebundene Octadecyl (C₁₈)-Gruppen, die die Hydrophobizität stark erhöhen. Die Träger unterscheiden sich zusätzlich in der mittleren Partikelgröße und der spezifischen Oberfläche. Eine große Oberfläche, wie sie die Sepabeads aufweisen, wird als vorteilhaft für eine Enzymimmobilisierung beschrieben [24]. Dennoch wurde das Accurel-trägermaterial mit einer Oberfläche von nur 35 m²/g ausgewählt, da eine Vielzahl von positiven Literaturbeispielen für eine Immobilisierung von Lipasen zu finden sind [13, 107, 109-111]. Für Sepabeads EC-OD konnten wie zuvor erwähnt, Faure und Illanes [101] eine Eignung für die Immobilisierung der Lipase TL zeigen.

3.2 Optimierung der Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel MP1001 und Sepabeads EC-OD

Die adsorptive Bindung einer Lipase an ein hydrophobes Trägermaterial basiert hauptsächlich auf Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Bereichen des Enzyms und des verwendeten Trägers. Diese Interaktion ist sowohl von Eigenschaften des Trägers, als auch von den Bedingungen, bei denen die Immobilisierung durchgeführt wird, abhängig [24]. Es spielen dabei sowohl Parameter eine Rolle, die die Aktivität des Enzyms selbst beeinflussen, aber auch solche, die die Bindungsstringenz bzw. das Bindungsverhalten von Proteinen verändern. Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Trägermaterialien, unterschiedlicher Verhältnisse aus eingesetztem Enzym zu Träger, variierender Pufferkonzentrationen und pH-Werten und der Temperatur während der Immobilisierung untersucht.

Analog zu den bisherigen Immobilisierungsstudien der Lipase TL wurde zu Beginn der Optimierung ein Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 verwendet. Dies ist im Einklang mit den Empfehlungen des Herstellers Meito Sangyo Co. [112], welcher ein pH-Optimum zwischen pH 7-8 angibt. Das Lösen des Lipase TL Pulvers in Puffer führte zu einer gelblich bis braunfarbenden Lösung, die einen deutlich sichtbaren Anteil ungelöster Bestandteile

enthielt. Die Löslichkeit konnte auch durch Veränderung des pH-Wertes bzw. durch Erhöhung der Ionenstärke nicht beeinflusst werden. Für die Einstellung des pH-Wertes von 5 wurde ein Propionsäurepuffer, für pH 7 Kaliumphosphatpuffer und für pH 8 TRIS-Puffer verwendet. Im Folgenden wurde die zu lösende Lipasemenge in Puffer suspendiert und nach Abtrennung der ungelösten Bestandteile durch Zentrifugation zur Immobilisierung eingesetzt. Es konnte bei jeder untersuchten Lipasestartkonzentration ein Proteingehalt von durchschnittlichen 12,9 % festgestellt werden. Die entgegen der Arbeiten von Hoyos *et al.* [89] und Faure und Illanes [101] (jeweils 100 mM) verwendete Pufferkonzentration von 10 mM wurde im Vorfeld an eine Studie von Bastida *et al.* [113] angelehnt. Eine niedrige Ionenstärke des Puffermediums soll demnach eine Erhöhung der Adsorptionsgeschwindigkeit [113] und der Bindungsselektivität (bezogen auf die selektivere Bindung von Lipasen gegenüber im Präparat enthaltende Fremdproteine) bewirken [114].

3.2.1 Immobilisierungsdauer

In bisherigen Studien zur adsorptiven Bindung von Lipasen auf Accurel wurde mehrmals beschrieben, dass es nach Exposition der Träger mit der Lipaselösung zu einer sehr schnellen Beladung dieser mit Proteinen kommt [107, 110, 115]. Gleichzeitig wurde ein etwas verzögerter Sättigungsverlauf der Aktivität festgestellt. Dieses Verhalten wurde mit der unterschiedlichen Adsorptionsrate der Lipasen gegenüber denen im Präparat enthaltenen Fremdproteinen erklärt [107]. Im weiteren Verlauf der Immobilisierung soll es laut den Autoren dann zu einem Austausch der nur leicht gebundenen Fremdproteine mit den höher affinen Lipasen kommen, die dann spezifischer an der Trägeroberfläche binden. Da der Fokus dieser Arbeit auf dem Gleichgewicht aus einer optimalen Immobilisierung und einer technisch einfach durchzuführenden Methode liegt, ist das Ziel die Dauer der Immobilisierung so kurz wie möglich zu halten und dabei möglichst das Maximum an Lipase zu binden. Um dieses Ziel zu erreichen und die geeignetste Immobilisierungsdauer zu ermitteln, wurden folgend Aliquots der Immobilisierung auf Accurel nach verschiedenen Zeitpunkten abgebrochen und nach Trocknung der Immobilisate deren spezifische Trägeraktivität bestimmt. Die spezifische Trägeraktivität bezeichnet die katalytische Aktivität in Units (U) [$\mu\text{mol}_{\text{Produkt}}/\text{min}$] im Verhältnis zu der Masse der in der KR von Benzoin

eingesetzten Immobilisate [$\text{g}_{\text{Träger}}$] und wird in [$\text{U}/\text{g}_{\text{Träger}}$] angegeben. Die KR wurde nach dem in Kapitel 2.2.4 aufgeführten Standardprotokoll durchgeführt.

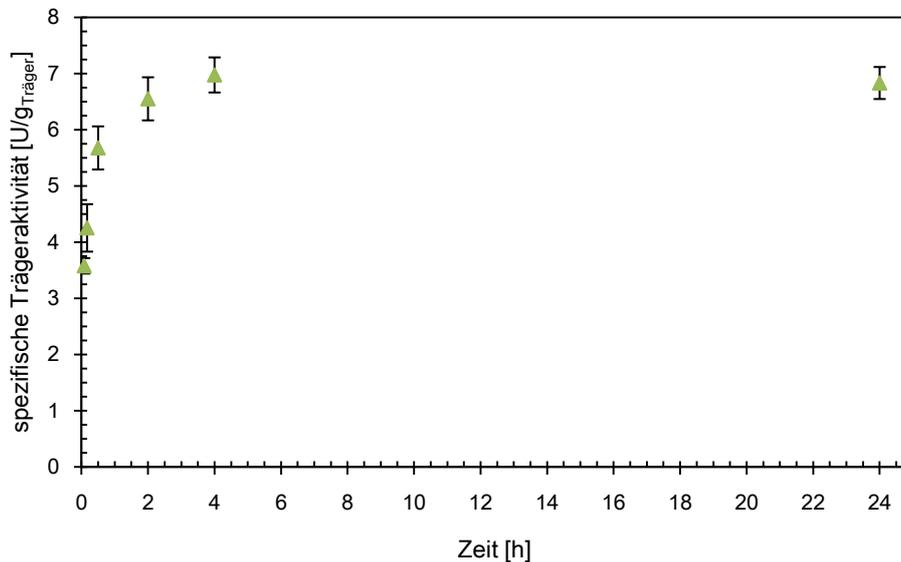


Abbildung 8: Spez. Trägeraktivität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Immobilisierungsdauer

Abbildung 8 zeigt eine schnelle Zunahme der spezifischen Trägeraktivität innerhalb der ersten 30 - 60 min, die dann ab ca. 4 h in eine Sättigung übergeht. Nach 24 h Inkubationszeit ist die spezifische Aktivität der Accurel-Lipase TL Immobilisate (im weiteren Verlauf als Acc-LipTL bezeichnet) nicht weiter angestiegen. Auf Grundlage verschiedener Lipase-Immobilisierungsstudien auf dem Material Accurel, die ebenfalls den Übergang in eine Sättigung nach 2-4 h beobachten konnten [107, 110], war auch keine weitere Steigerung der Aktivität nach einer deutlich verlängerten Inkubationszeit (24 h) zu erwarten. Im Folgenden wurden alle Immobilisierungen auf Accurel über einen Zeitraum von 4 h durchgeführt. Die Empfehlungen der Firma Resindion für die Immobilisierung auf den Sepadbead EC-OD gaben einen Zeitraum von mindestens 3 h vor. Da die Inkubationszeit von 4 h das Protokoll der Sepadbead-Immobilisierung erfüllt, keine Desorption der bereits gebundenen Lipasen bei einer verlängerten Kontaktzeit zu erwarten war, wurde die Immobilisierungsdauer für die Sepadbead ebenfalls auf 4 h festgesetzt.

3.2.2 Proteinstarkonzentration

Die Aktivität von Trägern mit adsorptiv gebundenen Enzymen hängt im Wesentlichen von drei Aspekten ab. Zum einen ist die strukturelle Beschaffenheit des Trägermaterials dafür ausschlaggebend, ob während der Reaktion aufgrund von strukturbedingten Diffusionsbarrieren eine scheinbar niedrigere Reaktionsrate gemessen wird [24]. Diese Limitierungen sind hauptsächlich in der Größe der Poren und deren Zugänglichkeit begründet. Oftmals ist dies nur durch die Auswahl geeigneter Materialien zu vermeiden und kann daher nach der Entscheidung für ein Trägermaterial als konstant angesehen werden. Der zweite Punkt ist die Veränderung der Konformation der immobilisierten Enzyme nach erfolgter Trägerbindung. Diese Änderungen treten meist aufgrund von direkten Interaktionen sekundärer Struktur motive mit der Trägeroberfläche auf und können sowohl positive wie auch negative Effekte auf die Aktivität haben [26]. Der dritte Faktor ist die Beladungsdichte und somit die Menge des gebundenen Enzyms. Die Beladungsdichte ist sowohl von der zur Bindung verfügbaren Oberfläche, als auch von der vorhandenen Menge des zu immobilisierenden Enzyms abhängig [116]. Die maximal zur Verfügung stehende Oberfläche hängt wiederum von der Porengröße und der Zugänglichkeit der Poren für das zu immobilisierende Enzym ab [24]. Unter Annahme der Ausbildung einer Einfachschicht aus gebundenen Enzymen auf der Trägeroberfläche ist demnach zu erwarten, dass nach einer vollständigen Beladung der zugänglichen Oberfläche die spezifische Trägeraktivität nicht weiter ansteigt. Hier wäre dann das Beladungsmaximum erreicht. Binden dennoch weitere Enzyme auf der bestehenden Enzymschicht, kommen Mehrfachschichten zustande. Diese lassen in der Regel aufgrund gegenseitiger Wechselwirkungen der Enzyme oder auftretender Diffusionslimitierungen keine weitere Aktivitätssteigerung zu [109]. Da sich bei einer adsorptiven Immobilisierung ein Adsorptiongleichgewicht aus gebundenen und gelösten Lipasemolekülen einstellt, steigt die Beladung der Trägermaterialien, wenn die Enzymkonzentration in der Immobilisierungslösung erhöht wird [109]. Dieser Vorgang ist wiederum durch das Erreichen der maximalen Beladungsdichte begrenzt, die wie bereits erwähnt, ihrerseits von der zugänglichen Trägeroberfläche limitiert wird.

Im Folgenden wurde versucht durch Steigerung der Startkonzentration der Lipaselösung die Beladungsdichte der Accurel- und Sepabead-Träger zu maximieren. Die Beladungsdichte ist definiert als die effektiv adsorbierte Proteinmenge bezogen auf die Menge der eingesetzten Träger und wird im Folgenden in der Einheit [$\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$] angegeben. Zur Bewertung der Beladung wurden die spezifische Aktivität der Träger und der gebundenen Proteine als entscheidende Parameter herangezogen.

Um in weitergehenden Analysen über ausreichend Immobilisat zu verfügen, wurden 500 mg Accurel-Träger für 10 mL der Lipaselösung verwendet. Der Einsatz der identischen Menge an Sepabead-Trägern pro Immobilisierungsvolumen ergab eine kaum messbare Restaktivität der Partikel, weswegen die zur Immobilisierung eingesetzte Menge an Sepabeads auf 100 mg verringert wurde. Die Steigerung des Verhältnisses aus Enzym zu Träger sollte die Beladung und damit auch die nachzuweisende Aktivität steigern. Die Immobilisierungstemperatur betrug 21,5 °C und die mindestens im Doppelversuch durchgeführten Ansätze wurden durchgehend auf einem Orbitalschüttler durchmischt.

Accurel

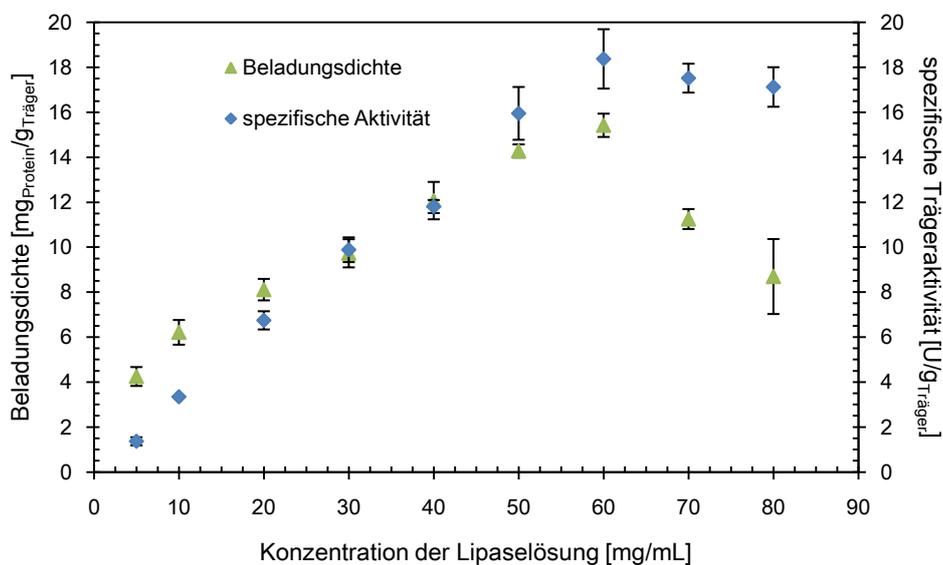


Abbildung 9: Proteinbeladungsdichte und spez. Trägeraktivität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration

Abbildung 9 stellt den Verlauf der Beladungsdichte und der spezifischen Aktivität der Acc-LipTL über einen Konzentrationsbereich von 5 mg/mL bis 80 mg/mL der Lipaselösung dar. Die spezifische Aktivität steigt linear bis zu einer Konzentration von 60 mg/mL auf einen maximalen Wert von 18,4 U/g_{Träger} an und bleibt dann im Rahmen der Messungenauigkeiten konstant. Die Beladungsdichte steigt ebenfalls bis zu einer Startkonzentration von 60 mg/mL auf einen maximalen Wert von 15,2 mg_{Protein}/g_{Träger} an. Bei einer weiteren Erhöhung der Lipasestartkonzentration nimmt die Beladungsdichte jedoch drastisch ab. Da sich jedoch die spezifische Trägeraktivität bei Konzentrationen >60 mg/mL nicht wesentlich verändert, ist nicht davon auszugehen, dass sich die Menge an gebundener Lipase auf dem Träger oberhalb dieser Konzentration verringert. Die Bildung von Multienzymschichten, die ebenfalls einen weiteren Anstieg der Aktivität verhindern könnten, sollte jedoch mit einer Steigerung der Beladungsdichte nachzuweisen sein. Ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Fremdproteinen im Lipase TL-Pulver, was von Maraite *et al.* [117] gezeigt werden konnte, und dem Abfall der Beladungsdichte ab 70 mg/mL konnte nicht hergestellt werden. Da bei allen untersuchten Konzentrationen ein gleichbleibender Proteingehalt (12,9 %) festgestellt werden konnte, ist auch von einem unterschiedlichen Löslichkeitsverhalten verschiedener Proteine bei einer steigenden Proteinkonzentration als Ursache abzusehen. Das Ziel dieser Arbeit ist die Erzeugung hochaktiver Immobilisate, weswegen vor allem die spezifische Trägeraktivität von Bedeutung ist. Da diese Aktivität bei einer Erhöhung der Lipasestartkonzentration ohnehin nicht weiter stieg, wurde auf eine endgültige Klärung der Fehlerursachen an dieser Stelle verzichtet. Die Beladungswerte der Lipasestartkonzentration >60 mg/mL wurden folgend auf eine fehlerhafte Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Immobilisierungsüberstände zurückgeführt und daher nicht als signifikant betrachtet.

Obwohl angesichts der Kurvenverläufe aus Abbildung 9 zunächst von einer simplen linearen Abhängigkeit zwischen der Beladungsdichte und der spezifischen Trägeraktivität ausgegangen werden kann, macht die Auftragung der spezifischen Proteinaktivität über der Startkonzentration deutlich, welchen Einfluss die Konzentration auf die Immobilisierung der Lipase TL hat. Die horizontale Linie in Abbildung 10 markiert die spezifische Proteinaktivität des nicht immobilisierten Lipase TL Pulvers bei ca. 350 U/mg_{Protein}. Bei der Berechnung dieser

wurde der per Bradford-Methode bestimmte Proteingehalt des Lipasepulvers von 12,9 % zu Grunde gelegt. Es wurde die Annahme getroffen, dass es sich bei dem gesamten Protein um die Lipase TL handelt. Wie erwähnt ist jedoch bekannt, dass das Lipase TL-Pulver nicht nur die Lipase enthält, sondern auch noch eine geringe Menge an Fremdproteinen (siehe SDS-Page in Maraité *et al.* [117]). Da die genaue Menge nicht bekannt ist, kann auch der exakte Lipasegehalt des Pulvers nicht bestimmt werden. Da dieser niedriger sein dürfte, als der hier bestimmte Proteingehalt, ist die spezifische Proteinaktivität der nativen Lipase TL tatsächlich höher als $350 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dennoch an der beschriebenen Annahme festgehalten, da sonst kein Referenzwert zur Bewertung der Immobilisierung bestimmt werden konnte.

Die spezifische Proteinaktivität der Acc-LipTL ist bis zu einer Beladungsdichte von etwa $7 \text{ mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ geringer als die der nicht immobilisierten nativen Lipase TL. Die Proteinaktivität steigt dann bei einer Erhöhung der Lipasestartkonzentration bis auf mindestens 30 mg/mL weiter an und bleibt bis zu einer Konzentration von 60 mg/mL stabil bei einem Wert um $1000\text{-}1200 \text{ U/mg}_{\text{Protein}}$. Die Steigerung im weiteren Verlauf ist wie bereits erläutert auf die als zu niedrig anzusehenden Beladungsdichten zurückzuführen und daher sehr wahrscheinlich deutlich zu hoch.

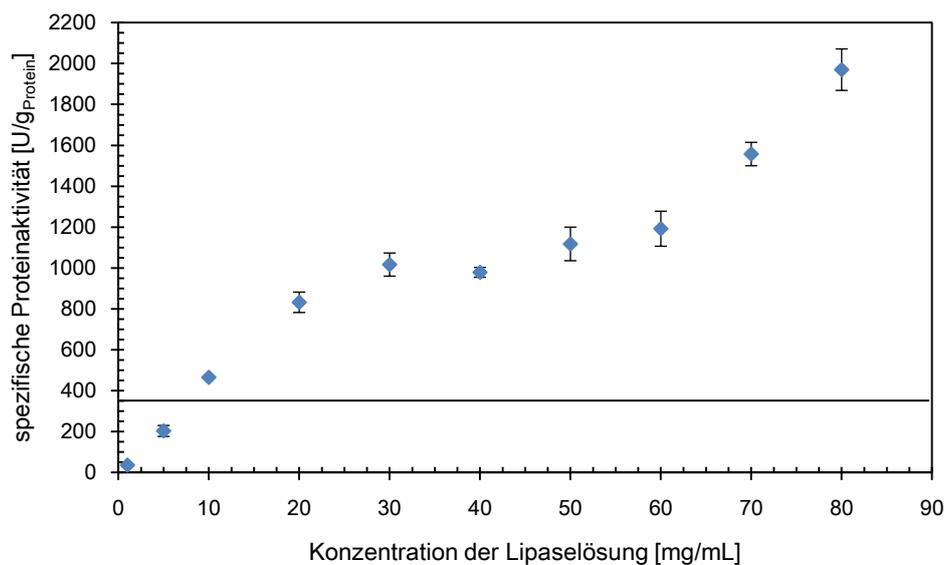


Abbildung 10: Spez. Proteinaktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration

Der Verlust an spezifischer Proteinaktivität bei sehr niedrigen Beladungen lässt sich möglicherweise damit erklären, dass Enzyme bei einer adsorptiven Bindung an Oberflächen dazu tendieren, die Kontaktfläche zum Trägermaterial zu maximieren [118]. Dabei kann es als Folge der Ausbildung vieler Bindungsstellen zu einer Änderung der aktiven Konformation bis hin zu einer Entfaltung des Enzyms kommen [24, 119] (Abbildung 11). Da die jedem einzelnen Enzym zur Verfügung stehende Bindungsfläche bei höheren Beladungen geringer wird, ist auch die Anzahl der möglichen Bindungsstellen kleiner, was der zuvor beschriebenen Änderung der Konformation entgegen wirkt [120].

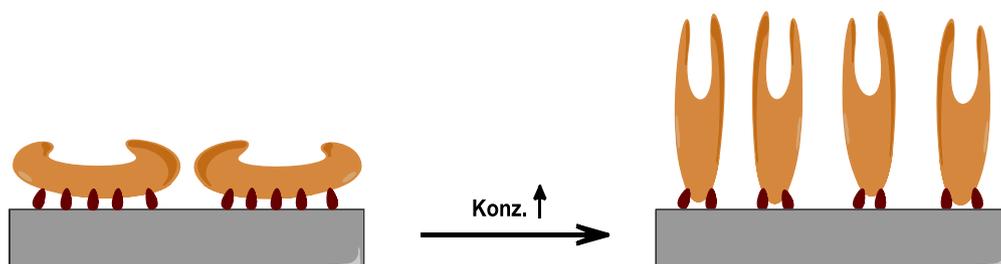


Abbildung 11: Faltung von Proteinen bei unterschiedlichen Beladungsdichten auf Oberflächen [120]

Die Steigerung der spezifischen Proteinaktivität der Lipase TL, die ab einer Proteinstartkonzentration von ca. 10 mg/mL auftritt, ist sehr wahrscheinlich auf einen gemischten Effekt zweier typischer Phänomene zurückzuführen. Zum einen ist bekannt, dass sehr hydrophobe Trägermaterialien Lipasen selektiv aus einem Gemisch verschiedener Proteine binden können. Damit würde es sich hierbei um eine Art Reinigungseffekt der nativen Lipase TL Lösung handeln. Da bei der Berechnung der spezifischen Proteinaktivität die gebundene Menge Protein auf dem Träger zu Grunde gelegt wird und nicht bestimmt werden kann, ob es sich dabei um Fremdprotein oder Lipase handelt, steigt die spezifische Proteinaktivität wenn vorwiegend Lipase gebunden wird. Hinweis auf diesen Effekt gibt vor allem die niedrige Immobilisierungsausbeute (bezogen auf die Bindung des eingesetzten Proteins), die lediglich bei 10-15 % liegt. Der zweite mögliche Grund einer Steigerung der katalytischen Wirkung der gebundenen Enzyme ist die für viele Lipasen beschriebene Grenzflächenaktivierung (siehe auch Kapitel 1.2). Dies deckt sich mit den in Kapitel 3.1.1 vorgestellten bisherigen Immobilisierungen der Lipase TL, bei denen ebenfalls dieses Phänomen als Grund für eine Steigerung der Aktivität angeführt wurde. Gestützt wird diese Begründung zum

einem dadurch, dass bei Hoyos *et al.* [89] das komplette Lipase TL-Pulver zur Immobilisierung verwendet wurde und somit eine Aufreinigung weitestgehend ausgeschlossen werden kann und aufgrund dessen, dass Fauré und Illanes Immobilisierungsausbeuten von 93 % nachweisen konnten. Damit ist nur ein sehr geringer Teil nicht gebunden worden und dieser erklärt nicht den Anstieg der spezifischen Aktivität um den Faktor Zwei [101].

Obwohl noch keine weiteren Optimierungsschritte der Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel durchgeführt wurden, konnte die spezifische Proteinaktivität unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache um den Faktor 2,9 zwar geringfügig, aber signifikant gesteigert werden. (Fauré und Illanes : 2,0 (Adsorption); Hoyos *et al.*: 2,2 (Einschluss)).

Bei der Verwendung einer Lipasestartkonzentration von 60 mg/mL konnten Immobilisate hergestellt werden, die zu diesem Zeitpunkt der Optimierung das Maximum der spezifischen Trägeraktivität aufwiesen. Dennoch wurde im weiteren Verlauf der Arbeit die Startkonzentration von 30 mg/mL zur Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel verwendet. Eine Erhöhung der Beladung und damit der spezifischen Trägeraktivität ist bei Acc-LipTL ab einer Konzentration von 60 mg/mL wie gezeigt nicht möglich. Daher sollte eher versucht werden die Beladung bei 30 mg/mL durch nachfolgende Optimierungsschritte zu erhöhen und somit die Effizienz der Immobilisierung weiter zu steigern. Unter Annahme einer auftretenden Hyperaktivierung ist die Wahl der Startkonzentration von 30 mg/mL geeignet, da die Lipase ab hier in ihrer optimalen katalytisch Konformation (grenzflächenaktiviert) immobilisiert ist.

Sepabead EC-OD

Analog zu Accurel wurde die Konzentration der Lipaselösung während der Immobilisierung auf den Sepabead EC-OD Trägern schrittweise von 10 mg/mL bis 60 mg/mL erhöht. Eine weitere Steigerung war angesichts der bereits ab 40 mg/mL stagnierenden spezifischen Trägeraktivität nicht erfolgsversprechend. Auch bei Verwendung dieser Träger steigt die Beladungsdichte bis 40 mg/mL linear an und erhöht sich bis 60 mg/mL nur noch minimal. Da diese lineare Abhängigkeit nicht durch den Ursprung des Diagramms verläuft, ist

anzunehmen, dass analog zum Accurel-Träger die Beladung bei sehr niedrigen Konzentrationen schnell ansteigt und erst dann weiter linear zunimmt.

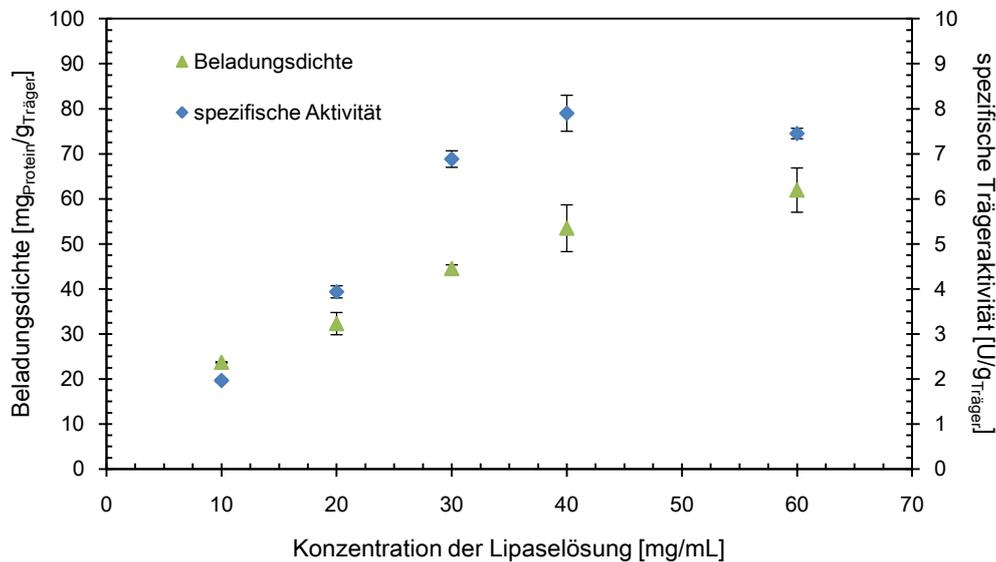


Abbildung 12: Proteinbeladungsdichte und spez. Trägeraktivität von Sepabead-LipTL in Abhängigkeit der Lipasekonzentration

Um die Beladungsdichten der beiden Trägersystem vergleichen zu können, muss die unterschiedliche Trägermenge pro Immobilisierungsansatz beachtet werden. Da nur ein Fünftel des Trägermaterials bei den Sepabeads eingesetzt wurde, können allenfalls die Konzentrationsansätze mit 50 mg/mL bei den Accurel und mit 10 mg/mL bei den Sepabeads verglichen werden. Hierbei wird jedoch außer Acht gelassen, dass trotz der vergleichbaren Proteinmenge pro Trägermaterial eine höhere Lipasekonzentration in der Lösung auch eine höhere Triebkraft zur Adsorption der Lipase bewirkt [109]. Bei 50 mg/mL ist die Beladungsdichte auf den Acc-LipTL bei 14,3 mg/g, wohingegen die Sepabead-LipTL bei 10 mg/mL 23,7 mg/g des Proteins adsorbiert haben. Da die Sepabead-Träger im Vergleich eine mehr als doppelt so große Oberfläche besitzen (siehe Tabelle 10), ist eine höhere Beladung das, was bei ähnlichen Bedingungen durchaus zu erwarten gewesen ist. Die weiterführende Annahme, dass eine höhere Beladung *per se* auch zu einer gesteigerten spezifischen Trägeraktivität führt, konnte am Beispiel der Sepabeads jedoch nicht bestätigt werden. Die spezifische Trägeraktivität erhöht sich ebenfalls linear bis zu einer

Konzentration von 40 mg/mL auf einen Maximalwert von 7,9 U/g_{Träger} und nimmt bei einer Startkonzentration von 60 mg/mL wieder geringfügig ab. Der wiederholte Vergleich der Sepabead- und Accurel- Immobilisate bei 10 mg/mL bzw. 50 mg/mL macht deutlich, dass die spezifische Aktivität bei den Accurel um den Faktor Acht höher ist (Sepabead-LipTL: 1,9 U/g_{Träger}; Acc-LipTL: 15,9 U/g_{Träger}). Die geringe Aktivitätsausbeute spiegelt sich noch deutlicher in der Auftragung der spezifischen Proteinaktivität über der Lipasestartkonzentration wieder (Abbildung 13).

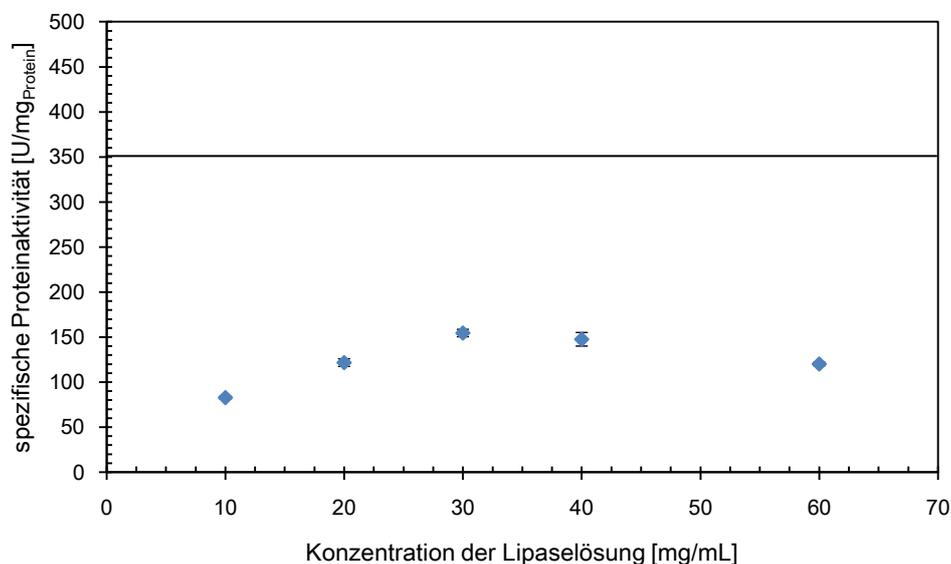


Abbildung 13: Spez. Proteinaktivität der Sepabead-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration

Die spezifische Proteinaktivität der auf den Sepabeads gebundenen Lipase TL ist mit maximal 150 U/mg_{Protein} bei 30 mg/mL Lipasestartkonzentration deutlich niedriger als die der nicht immobilisierten Form. Auf dem ersten Blick steht dies im Widerspruch zu den Ergebnissen von Faure und Illanes [101], die eine Aktivierung der Lipase auf Sepabeads beschrieben. Es ist jedoch anzumerken, dass Faure und Illanes [101] eine Erhöhung der spezifischen Proteinaktivität bei einem 100-fach geringeren Lipase zu Träger Verhältnis nachweisen konnten. Die Aktivitätsausbeute verringerte sich in dieser Studie zudem bei einer Erhöhung des Lipase pro Träger Verhältnisses deutlich. So ist es nicht sonderlich überraschend, dass bei einer weiteren Steigerung der Lipasemenge pro Träger um nochmals Faktor 10-60 eine weitergehende Erniedrigung der spezifischen Proteinaktivität festzustellen ist.

Die Theorie der Konformationsänderung der gebundenen Enzyme aufgrund der großen zur Verfügung stehenden Bindungsfläche kann aufgrund der hohen Beladungswerte ausgeschlossen werden. Es ist eher davon auszugehen, dass es bei den Sepabeads in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich zu keiner selektiven Bindung der Lipase kommt. Damit lassen sich zum einen die hohen Beladungswerte erklären und zum anderen die daraus resultierenden spezifischen Proteinaktivitäten. Die Annäherung an das Maximum der Bindungskapazität hätte demnach zur Folge, dass je nach Menge an Fremdprotein im Lipase TL-Pulver signifikant weniger Lipase auf den Sepabead-Trägern im Vergleich zu den Accurel gebunden wird und somit auch die spezifische Trägeraktivität niedriger ist.

Bei einem Einsatz der Sepabead-LipTL in einem industriellen Prozess würde zur Aufrechterhaltung einer hohen volumetrischen Aktivität des Ansatzes, eine sehr große Immobilisatmenge benötigt werden. Insbesondere im direkten Vergleich zu den Acc-LipTL, bei denen wesentlich weniger Material verwendet werden müsste, ist dies aus ökonomischer Sicht nicht anstrebenswert. Daher konnte eine weiterführende Optimierung der Sepabead-Immobilisierung nicht gerechtfertigt werden und wurde folgend hier nicht durchgeführt.

3.2.3 Einfluss der Temperatur

Im Allgemeinen ist die adsorptive Bindung von Molekülen aus Gas- oder Flüssigkeitsphasen an Festkörperoberflächen abhängig vom Druck und der Temperatur [121]. Dabei gilt: Bei einer Erhöhung der Temperatur verringert sich die Adsorption als Folge der erhöhten kinetischen Energie der adsorbierenden Moleküle. Eine Steigerung der kinetischen Energie hat aber bei Proteinen auch eine erhöhte Flexibilität und eine eventuell dadurch veränderte Konformation zur Folge. Abgesehen vom Extremfall der vollständigen Entfaltung bei zu hohen Temperaturen führt dies zu einer Änderung der Zugänglichkeit faltungsbedingt verdeckter Bereiche, wie beispielsweise hydrophober Domänen. In der hydrophoben Interaktionschromatographie (HIC) wird dieses Phänomen dazu genutzt, um die Bindungsstärke und somit die Trennleistung der Chromatographie zu erhöhen [121]. Bezogen auf eine Immobilisierung von Lipasen durch hydrophobe Wechselwirkungen kann dies bedeuten, dass infolge der Vergrößerung der hydrophoben Kontaktfläche zwischen den Enzymen und

der Oberfläche die Affinität der Enzyme zum Trägermaterial steigt und damit auch die Effizienz des Immobilisierungsprozesses. Die Freilegung hydrophober Domänen im Inneren der Proteine könnte dabei jedoch auch eine negative Auswirkungen auf die Aktivität der Enzyme haben, da sich dadurch die Konformation stark verändert. Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit der Einfluss einer Änderung der Temperatur auf die Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel genutzt werden kann. Es wurden erneut die Beladungsdichte und die spezifischen Träger- bzw. Proteinaktivität betrachtet.

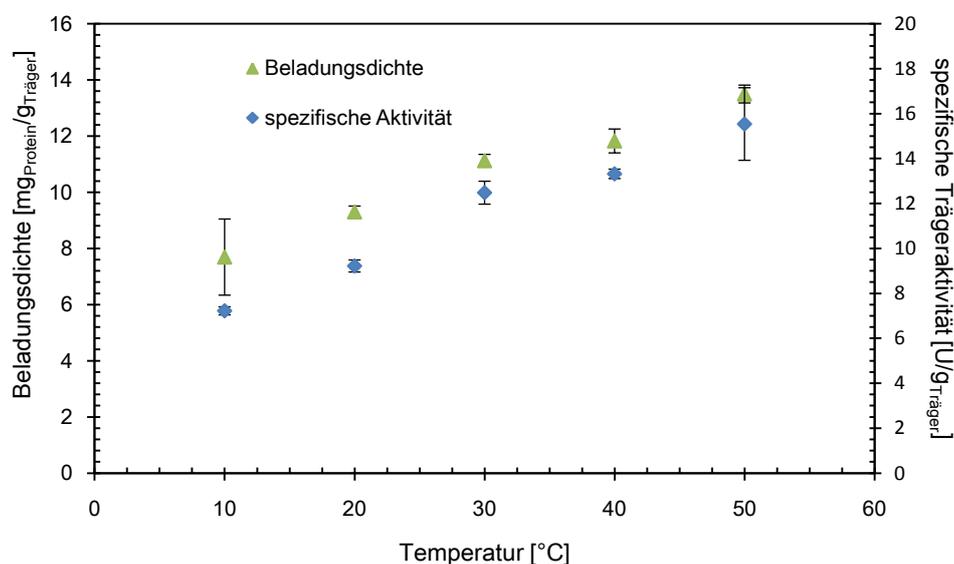


Abbildung 14: Beladungsdichte und spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Immobilisierungstemperatur; Die Aktivitätstests wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Beladungsdichte und die spezifische Aktivität der Träger steigen in proportional linearer Abhängigkeit bis zur hier maximal untersuchten Immobilisierungstemperatur von 50 °C an (Abbildung 14). Gegenüber der bisher verwendeten Raumtemperatur konnte somit bei 50 °C eine um ca. 66 % gesteigerte spezifische Trägeraktivität erreicht werden. Eine Verringerung der Temperatur auf 10 °C geht mit einer Erniedrigung der untersuchten Parameter einher. Die spezifische Proteinaktivität verändert sich aufgrund der direkten Proportionalität der Beladungsdichte und der spezifischen Trägeraktivität nur geringfügig. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Steigerung nur auf die erhöhte Beladung zurückzuführen ist und nicht auf eine Immobilisierung der Lipase TL in einer katalytisch aktiveren Konformation.

Aus dem Datenblatt der Lipase TL kann entnommen werden, dass eine verbesserte Thermostabilität des Enzyms unter 40 °C gegeben ist [112]. Um eine temperaturbedingte Inaktivierung des Enzyms während der Immobilisierung zu vermeiden, aber trotzdem von der Erhöhung der Beladungsdichte bzw. der spezifischen Trägeraktivität zu profitieren, wurde eine Immobilisierungstemperatur von 40 °C als optimal bestimmt. Die Steigerung der spezifischen Trägeraktivität bei 40 °C gegenüber der zuvor verwendeten Raumtemperatur betrug somit 43 %.

3.2.4 Einfluss der Pufferkonzentrationen und des pH-Wertes

Bei der Optimierung einer Lipaseimmobilisierung sind weitere Analogien zur HIC sehr hilfreich. So ist bekannt, dass die Adsorption von hydrophoben Proteinen auf hydrophoben Oberflächen bei erhöhten Salzkonzentrationen gefördert wird [122, 123]. Diese sogenannte „Salz-vermittelte Adsorption“ [124] ist darauf zurückzuführen, dass hydrophobe Bereiche von Proteinen mit einer geordneten Hydrathülle umgeben sind, welche eine Aggregation dieser Regionen und damit der Proteinmoleküle untereinander verhindert. In dem Maße, in dem bestimmte Salzionen einer solchen Proteinlösung zugeführt werden, werden Wassermoleküle dieser Hydrathülle entzogen, da sie zur Hydratisierung der Salzionen benötigt werden [121]. Infolgedessen ist eine Assoziation der hydrophoben Bereiche der Proteine untereinander, aber eben auch mit vorhandenen hydrophoben Oberflächen möglich und wird durch steigende Salzkonzentrationen weiter forciert. Geeignet sind mehrwertige Anionen wie beispielsweise Sulfat oder Phosphat mit dazugehörigen Kationen wie Ammonium, Natrium oder Kalium. Die Eignung von verschiedenen Anionen und Kationen folgt der sogenannten Hofmeisterreihe. Kosmotrope bzw. antichaotrope Salze fördern hydrophobe Wechselwirkungen (linke Seite der Hofmeisterreihe), wohingegen chaotrope Salze (rechts in der Hofmeisterreihe befindliche Ionen) die Löslichkeit von hydrophoben Proteinen in Lösungen begünstigen (Abbildung 15) [125]. Der in dieser Arbeit zur Immobilisierung verwendete Kaliumphosphatpuffer setzt sich aus stark antichaotropen Phosphationen und Kalium-Anionen zusammen, was die Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen generell fördern sollte.

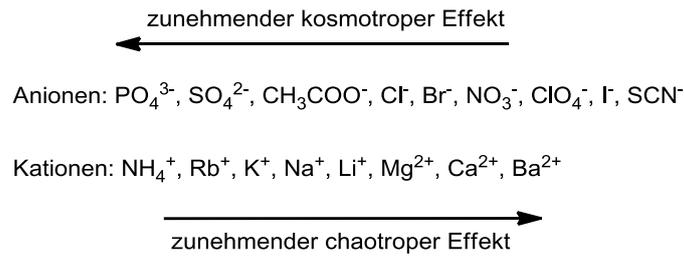


Abbildung 15: Anordnung der wichtigsten An- und Kationen der Hofmeisterreihe

Den Effekt der Pufferkonzentration auf die Immobilisierung von Lipasen wurde unter anderem bereits am Beispiel der Lipasen aus *Candida rugosa* und *Rhizopus oryzae* in der Studie von Lee *et al.* [126] demonstriert. Hier konnte ein Anstieg der Aktivität bei steigenden Pufferkonzentrationen bis 250 mM verzeichnet werden. Bei noch höheren Konzentrationen (bis 1,25 M) verringerten sich die Aktivitätswerte jedoch, was auf die zu starke Wasser-Subtraktion von der Enzymoberfläche durch die Ionen zurückgeführt wurde [126].

Im Folgenden wurde die Konzentration des Kaliumphosphatpuffers von 10 mM auf maximal 400 mM erhöht und der Einfluss auf die Beladungsdichte und die spezifische Trägeraktivität bzw. Proteinaktivität untersucht. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob die Variation des pH-Wertes um den Isoelektrischen Punkt (IEP) (pH 6,6 [112]) einen Einfluss auf die untersuchten Parameter hat. Enzyme weisen am IEP eine Nettoladung von Null auf, da sich positiv und negativ geladene Aminosäureseitenketten ausgleichen. In diesem Zustand ist eine erfolgreiche Bindung an hydrophobe Trägermaterialien hauptsächlich den hydrophoben Wechselwirkungen zuzuschreiben. Es wurden nachfolgend bei jeder untersuchten Pufferkonzentration Immobilisierungen bei den pH-Werten 6,2, 6,6 und 7,0 durchgeführt. Da die Optimierungsexperimente parallel geplant und realisiert wurden, ist zu diesem Zeitpunkt an der Raumtemperatur als Immobilisierungstemperatur festgehalten worden. Die Kombination von allen optimierten Parametern wurde dann im Anschluss durchgeführt und wird an gesonderter Stelle diskutiert (siehe 3.2.5).

Die Beladungsdichte steigt bei einer Pufferkonzentrationserhöhung von 10 mM auf 100 mM deutlich von Werten um $10 \text{ mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ auf ca. $21 \text{ mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ an. Bei einer weiteren Verdopplung (auf 200 mM) bzw. Vervierfachung (auf 400 mM) der Pufferkonzentration

nimmt die Beladung Werte von 23 - 25 $\text{mg}_{\text{Protein}}/\text{g}_{\text{Träger}}$ an (Abbildung 16). Der pH-Wert scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Beladung der Accurelträger zu haben. Einzig die Verringerung der Beladung bei einer Pufferkonzentration von 400 mM und einem pH-Wert von 7,0 ist davon abweichend. Theoretisch wäre es möglich, dass eine zu hohe Konzentration antichaotroper Ionen zu einer Ausfällung der Proteine durch die bereits angesprochenen erhöhten Wechselwirkungen der hydrophoben Bereiche auf den Proteinoberflächen führt. Dieser Effekt sollte jedoch am IEP am stärksten ausgebildet sein (hier pH-Wert von 6,6), weil dort die hydrophoben Wechselwirkungen besonders begünstigt sind. Da aber lediglich bei pH 7,0 eine signifikante Abnahme beobachtet werden konnte, wird diese niedrige Beladung eher experimentellen Messfehlern zugesprochen. Generell sind die Abweichungen in diesem erhöhten Pufferkonzentrationsbereich tendenziell stärker. Dies dürfte vor allem an der hohen Eigenabsorbanz der Pufferlösung nach Interaktion mit dem Bradfordreagenz liegen.

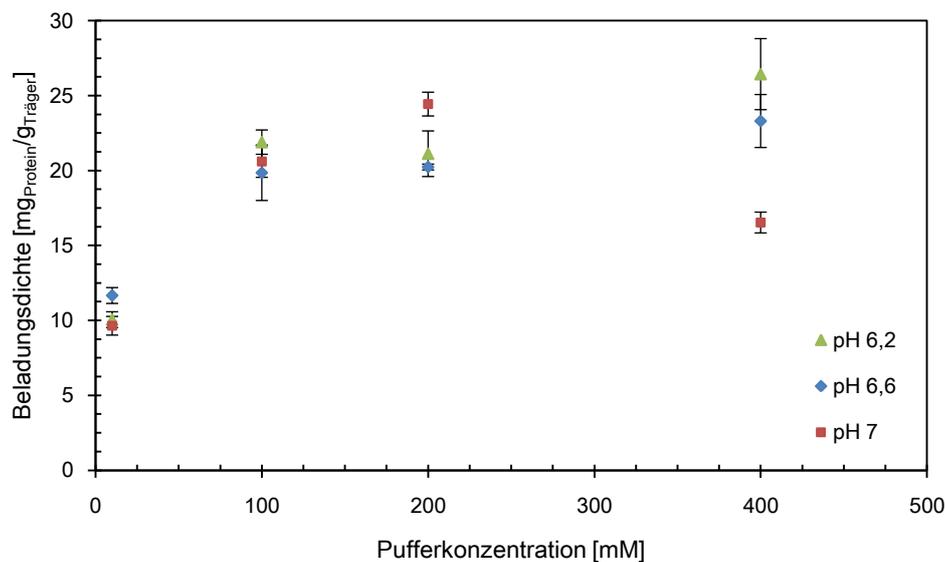


Abbildung 16: Beladungsdichte der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Pufferkonzentrationen bei verschiedenen pH-Werten

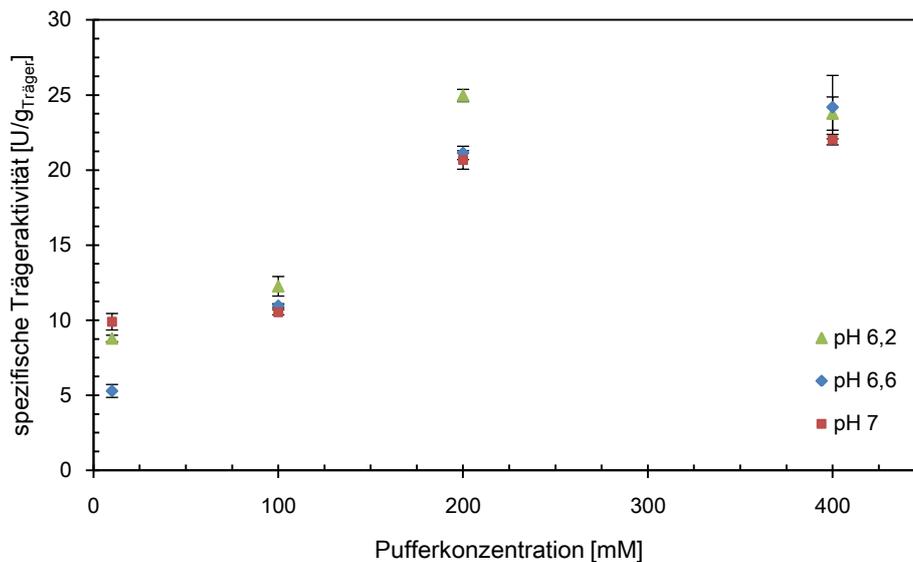


Abbildung 17: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Pufferkonzentrationen bei unterschiedlichen pH-Werten

In Anbetracht der Entwicklung der spezifischen Trägeraktivität bei den verschiedenen Pufferkonzentrationen fällt zunächst auf, dass die Aktivität bei der Erhöhung der Pufferkonzentration nicht wie zuvor proportional der Beladungsdichte folgt (Abbildung 17). Erst bei 200 mM steigt die Aktivität signifikant an und ändert sich dann bei 400 mM nicht mehr wesentlich. Die Aktivität erhöht sich um den Faktor 2 - 2,2 von rund 10 - 12 U/g_{Träger} bei 10 - 100 mM hin zu 20 - 23 U/g_{Träger} bei 200 - 400 mM. Dies entspricht relativ gesehen dem Wert, den auch die Beladungsdichte zwischen 10 und 100 mM ansteigt. Bei einem pH-Wert von 6,2 und einer Konzentration von 200 mM wird die maximale Aktivität von etwa 25 U/g_{Träger} erreicht. Die Signifikanz dieser erhöhten Aktivität gegenüber den anderen untersuchten pH-Werten (jeweils bei 200 mM) ist genauso wie das Wertepaar pH 6,6 bei 10 mM zu hinterfragen. Bei der letztgenannten Kombination verringert sich die Aktivität um die Hälfte auf nur noch 5 U/g_{Träger} gegenüber den pH-Werten 6,2 und 7,0. Bei allen anderen untersuchten Bedingungen ist analog zur Beladungsdichte kein signifikanter Zusammenhang der Aktivität und des pH-Wertes festzustellen.

Eine hinreichende Begründung für die pH-Wert bedingten Abweichungen konnte nicht gefunden werden. Die geringere Aktivität am IEP (pH 6,6) bei 10 mM lässt sich evtl. ähnlich

erklären, wie zuvor die Erniedrigung der spezifischen Proteinaktivität bei zu niedriger Beladungsdichte (siehe Kapitel 3.2.2). Es ist denkbar, dass die Affinität der hydrophoben Bereiche des Enzyms zur Trägeroberfläche am IEP deutlich höher ist als bei den anderen untersuchten pH-Werten. Trotz der erhöhten Beladungsdichte bei 30 mg/mL Proteinstartkonzentration würde dies dazu führen, dass die dann vorherrschende Konformation der Enzyme nicht der entspricht, die die höchste Aktivität ermöglicht. Folglich könnte die steigende Beladungsdichte bei Erhöhung der Pufferkonzentration den stabilisierenden Einfluss und die damit verbundene aktive Konformation wieder herstellen. Um die erhöhte Aktivität bei pH 6,2 und 200 mM zu evaluieren, wurden die Immobilisierungen bei 200 mM bei allen pH-Werten wiederholt. Es konnte im Bereich der Fehlergrenzen der gleiche Zusammenhang festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), weswegen im Folgenden diese Bedingungen als das Optimum dieser Untersuchungen angesehen wurden. Die spezifische Proteinaktivität beträgt hierbei 1183 U/g_{Protein} und liegt damit im Bereich dessen, was bereits bei der Optimierung der Proteinstartkonzentration für 30 mg/mL erreicht wurde.

Über den Grund für das unterschiedliche Verhalten der Beladungsdichte und der Aktivität kann nur spekuliert werden. Es ist denkbar, dass sich die Freilegung der hydrophoben Enzymdomänen durch die Erhöhung der kosmotropen Ionenkonzentration schnell in der verbesserten Bindungsaffinität widerspiegelt, aber erst bei einer weiteren Steigerung der Ionenkonzentration die aktive Konformation eingenommen wird. Schlussendlich ist von besonderer Bedeutung, dass die Änderung der Pufferkonzentration einen massiven Einfluss auf das Bindungsverhalten der Lipase TL hat.

3.2.5 Bewertung der Immobilisierungsoptimierung

Wie durch die vorausgegangenen Untersuchungen deutlich gezeigt werden konnte, haben die Änderung der Temperatur sowie der Pufferbedingungen einen massiven Einfluss auf das Bindungsverhalten der Lipase TL. Da es hierbei zu einer deutlichen Steigerung der Beladungsdichte und der spezifischen Trägeraktivität bei einer Proteinstartkonzentration von 30 mg/mL kam, sollte nun nochmals der Einfluss der Proteinstartkonzentration bei der erhöhten Temperatur und einem optimierten Immobilisierungspuffer gezeigt werden.

Eine gegenseitige Beeinflussung der Parameter Temperatur und Puffer wurde nicht erwartet, kann aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Klärung möglicher Wechselwirkungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Es wurden erneut Immobilisierungen mit Proteinstartkonzentrationen von 20, 30 und 60 mg/mL bei 40 °C in einem 200 mM KPi-Puffer mit einem pH-Wert von 6,2 durchgeführt. In Abbildung 18 ist deutlich die Steigerung der spezifischen Trägeraktivität bei allen untersuchten Proteinstartkonzentrationen zu erkennen. Die massive Steigerung der Immobilisierungseffizienz infolge der Optimierung der Temperatur und des Puffers wird insbesondere dadurch sichtbar, dass die Aktivitätssteigerung aufgrund der Verdopplung der Startkonzentration (von 30 mg/mL auf 60 mg/mL) bei den optimierten Bedingungen deutlich geringer ausfällt, als es zu Beginn der Untersuchungen der Fall war.

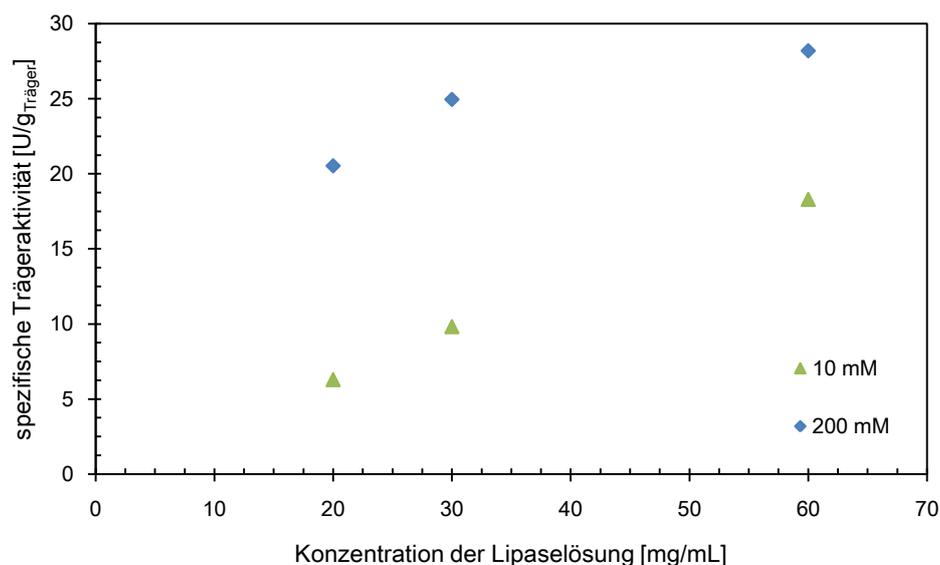


Abbildung 18: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Lipasestartkonzentration bei unterschiedlichen Immobilisierungsbedingungen (Immobilisierungstemp. bei 10 mM = 21,5 °C; 200 mM = 40°C)

Bei den initialen Bedingungen (10 mM KPi, pH 7,0, 21,5 °C) konnte die Aktivität durch Erhöhung der Lipasemenge um 85 % gesteigert werden, wobei es unter optimalen Bedingungen lediglich zu einer Steigerung um knapp 13 % kommt. Der nur geringe Zuwachs der spezifischen Trägeraktivität rechtfertigt somit nicht die Verdopplung der Lipasestartkonzentration auf 60 mg/mL, weswegen alle weiteren Immobilisierungen im Rahmen dieser

Arbeit bei 40 °C, einer Proteinstartkonzentration von 30 mg/mL und unter Verwendung eines 200 mM KPi-Puffers mit einem pH-Wert von 6,2 durchgeführt wurden.

3.2.6 Einfluss der *silcoat*-Technologie

Neben der in Kapitel 3.1.1 vorgestellten Verwendung von Silikon zur Einbettung von Lipasen ist dieses Polymer nachweislich auch sehr gut geeignet, um das Leachingverhalten von porösen Trägern mit darauf adsorptiv gebundenen Enzymen zu verbessern. Dies konnte in einer arbeitsgruppeninternen Studie eindrucksvoll am Beispiel des kommerziellen Lipasepräparats Novozym 435 demonstriert werden. Die Herstellung von Kompositpartikeln (im weiteren mit dem Präfix *silcoat* gekennzeichnet) aus dem Novozym 435 und Silikon führte zu einer beachtlichen Verbesserung der Leachingstabilität und erhöhte im besonderen Maße die Belastbarkeit der Novozym 435 Partikel gegenüber mechanischen Einflüssen [25, 103]. Demonstriert in beispielhaften Syntheszyklen der chemischen Bulkindustrie konnten unter anderem Steigerungen der Halbwertszeiten in Prozessen mit hohem Leachingpotential um mehr als den Faktor 25 erreicht werden [127]. In ähnlichen Größenordnungen lag die Halbwertszeitverlängerung der eingesetzten *silcoat*Novozym 435 in Rührwerksreaktoren, in denen eine hohe mechanische Belastung auf die Immobilisate wirkte [127]. Die Herstellung der Komposite bestand aus einer Inkubation poröser Trägermaterialien in einem Zweikomponenten-Silikon, welches mit einem leicht verdampfenden organischen Lösungsmittel gemischt wurde. Das Lösungsmittel dient dabei zur Verringerung der Viskosität der Siloxanmischung und dazu, das polymerisierende Silikon gleichmäßig in den Poren der Träger zu verteilen. Nach Verdampfen des Lösungsmittels polymerisiert das Silikon vollständig aus und umschließt die adsorptiv gebundenen Enzyme auf der Trägersoberfläche [25]. Obwohl ein Leaching von adsorptiv gebundenen Enzymen in organischen Lösungsmitteln aufgrund der fehlenden Löslichkeit unwahrscheinlich ist, wurde bereits gezeigt, dass reine Substrate diesen Effekt hervorrufen können. Da bei einem Einsatz polarer Lösungsmittel ein Verlust der Enzyme nicht ausgeschlossen werden kann, ist eine Beschichtung mit Silikon möglicherweise ebenso hilfreich. Hauptaugenmerk sollte dennoch darauf liegen, inwiefern sich der aktivierende Effekt des Silikonkontaktes analog zu Arbeiten von Hoyos *et al.* [89] auf die hiesigen Acc-LipTL übertragen lässt. Sollte die Steigerung der Aktivität auf den Acc-LipTL

vor allem aufgrund von Aufreinigungseffekten zustande kommen, könnte der Kontakt zum Silikon eine zusätzliche Hyperaktivierung hervorrufen. Dazu wurden Acc-LipTL mit verschiedenen Mengen Silikon beschichtet und der Einfluss auf die spezifische Trägeraktivität untersucht. Es wurden zwar Siloxane eines anderen Herstellers als bei Hoyos *et al.* [89] verwendet, jedoch ist die Struktur des Silikons bis auf leichte Abweichungen in der Kettenlänge identisch. Angefertigt wurden *silcoat*Acc-LipTL mit 30, 50 und 70 % Silikonanteil bezogen auf die Gesamtmasse der beschichteten Partikel.

Nach Beendigung des Beschichtungsprozesses konnte festgestellt werden, dass die *silcoat*Acc-LipTL mit 30 und 50 % Silikonanteil keine erkennbare Änderung ihres äußeren Erscheinungsbildes aufwiesen. Erst die Immobilisate mit 70 % Silikon bildeten zum Teil Agglomerate aus überschüssigem Silikon und mehreren Partikeln. Zur besseren Visualisierung wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der *silcoat*Acc-LipTL angefertigt. Abbildung 19 zeigt die Accurelpartikel mit den jeweiligen Silikonanteilen, wobei sehr gut die schwammartige Struktur der Accurelträger zu erkennen ist. Die Veränderung der Porengrößen und der Partikelform bei den verschiedenen Bildausschnitten ist aller Wahrscheinlichkeit nach nicht dem Silcoat-Prozess zuzuschreiben, da dies auch bei unbeschichteten Trägern beobachtet werden konnte. Die Beobachtungen aus dem Beschichtungsprozess bestätigen sich bei Betrachtung der Aufnahmen insofern, dass erst bei einem Silikonanteil von 70 % eine Silikonschicht auf der Oberfläche der Acc-LipTL zu erkennen ist. Bei den Ansätzen mit einem Anteil von 30 und 50 % ist anzunehmen, dass das Silikon in die Porositäten einzieht und diese graduell auffüllt. Dieser Effekt wurde auch für die Novozym 435 Partikel beobachtet. Dort lag der Silikonanteil, bei dem eine äußere Schicht zu erkennen war, bei 54 % [25].

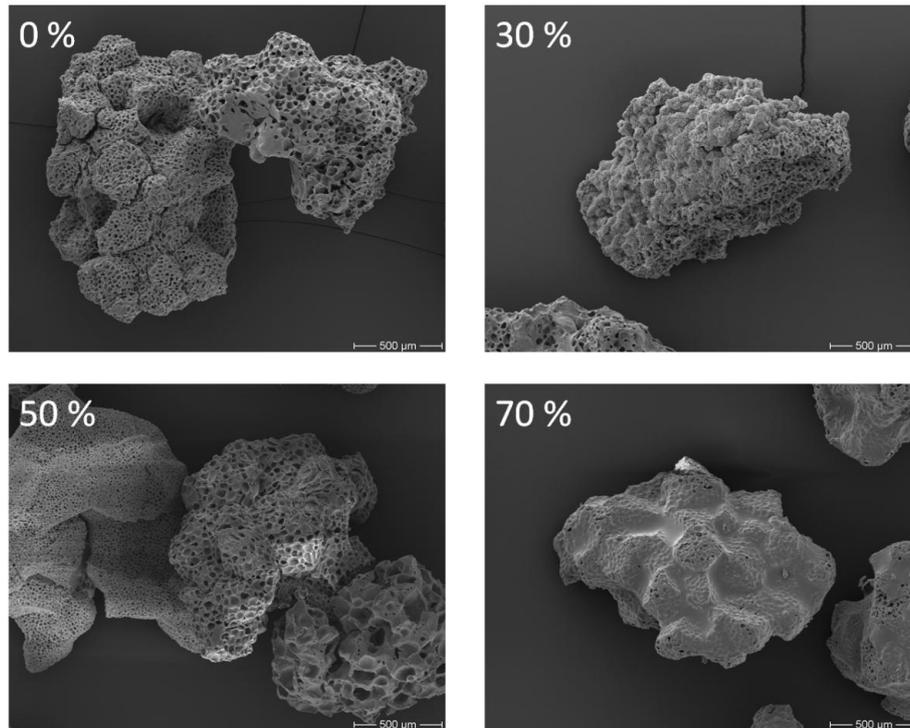


Abbildung 19: REM-Aufnahmen der *silcoat*Acc-LipTL mit verschiedenen Silikongehalten

Die spezifische Trägeraktivität der *silcoat*Acc-LipTL ändert sich unabhängig von der Silikonmenge nicht signifikant (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 20 sind die Verlaufskurven der KR von Benzoin in THF bei Raumtemperatur für die Acc-LipTL sowie der verschiedenen *silcoat*Acc-LipTL aufgetragen. Im Falle des *silcoat*Acc-LipTL wurde entsprechend des Silikonanteils eine erhöhte Menge Immobilisat verwendet, so dass effektiv gleich viel Acc-LipTL für alle Reaktionen eingesetzt wurde. Der maximale Umsatz von 50 % wurde bei allen Immobilisaten nach ca. 3 h erreicht, wobei die Verläufe der Umsatzkurven keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der unterschiedlichen Silikonmengen aufweisen. Eine Beschichtung der Novozym 435 mit unterschiedlichen Mengen Silikon führte zu einer signifikanten Verringerung der spezifischen Aktivität, was vor allem auf Diffusionslimitierungen durch das Silikon zurückgeführt wurde [25, 103]. Der Grund dafür, dass in der KR von Benzoin keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Silikonmengen gefunden wurden, ist mit dem Quellungsverhalten von Silikon in organischen Lösungsmitteln zu erklären. Der Einsatz von Silikonen in organischen Lösungsmitteln resultiert in einer deutlichen Gewichts- und Größenzunahme, was bereits in früheren Studien gezeigt werden konnte [100].

Durch das Aufquellen des Silikonnetzwerkes ist eine Verringerung von Diffusionsbarrieren wahrscheinlich und würde die hier erhaltenen Ergebnisse erklären. Eine Erhöhung der in Silikon eingebetteten Lipase TL, wie es in der Studie von Hoyos *et al.* [89] nachgewiesen werden konnte, ist bei einer vorhergehenden Immobilisierung auf einen hydrophoben Träger offensichtlich nicht möglich. Wenn eine Hyperaktivierung stattfindet, ist davon auszugehen, dass die Lipase TL Moleküle infolge der Accurelimmobilisierung bereits die grenzflächenaktivierte Konformation eingenommen haben.

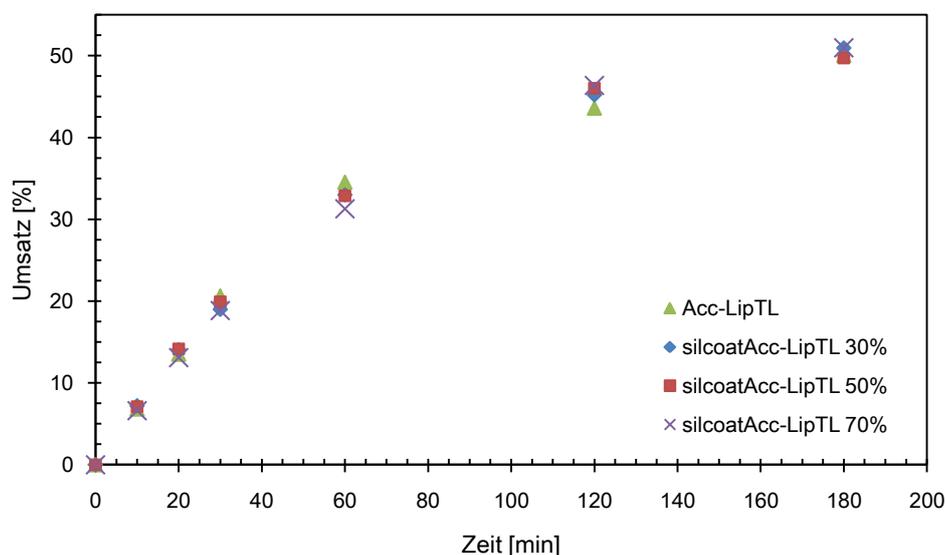


Abbildung 20: Vergleich der KR-Umsatzverläufe von Acc-LipTL mit den *silcoat*-Acc-LipTL Varianten

3.2.7 Vergleich der Acc-LipTL mit der nativen TL und Literaturdaten

Der Proteingehalt des Lipase TL Präparats lag in dieser Arbeit bei 12,9 %. In den Immobilisierungsstudien von Faure und Illanes [101] und Hoyos *et al.* [89] wurden Gehalte von 17,3 % bzw. sogar 33 % angegeben. Basierend auf den Untersuchungen von Maraite *et al.* [117], die ein Vorhandensein von Fremdproteinen nachweisen konnten, liegt die Vermutung nahe, dass diese Abweichungen chargenbedingt sind, da es sich aller Wahrscheinlichkeit nach bei dem Präparat um ein grob gereinigtes Fermentationsextrakt handelt. Somit können sich Schwankungen in der Fermentation direkt in der

Zusammensetzung der Präparate widerspiegeln. Dies wird dadurch gestützt, dass die spezifische Proteinaktivität der hier verwendeten nativen Lipase TL im Vergleich zu der von Hoyos *et al.* [89] um den Faktor 5,6 höher ist. Aufgrund dessen wurden die statischen Suspensionen mit der hier verwendeten Charge Lipase TL hergestellt und als Vergleich für die Acc-LipTL genutzt.

Tabelle 11: Vergleich der Acc-LipTL mit der nativen Lipase TL und den statischen Suspensionen

Präparat	Beladungsdichte [mg _{Protein} /g _{Präparat/Träger}]	Spezifische Aktivität [U/g _{Präparat}]	Spezifische Proteinaktivität [U/g _{Protein}]	Aktivierungsfaktor [-]
Lipase TL nativ	129,0	44,6	352	1
Accurel – Lipase TL	17,8	24,7	1437	4,1
statische Suspension ¹	3,1	0,95	310	0,9
statische Suspension (Hoyos <i>et al.</i> [89])	7,6	1,1	139	2,2 ²

¹Eigens hergestellte statische Suspension ²Ist bezogen auf die verwendete Charge Lipase TL in der Arbeit von Hoyos *et al.* [89]

Tabelle 11 fasst die Beladungsdichten der hergestellten Immobilisate bzw. den Proteingehalt der nativen Lipase TL, die jeweiligen spezifischen Aktivitäten der Präparate/Träger, die dazugehörigen spezifischen Proteinaktivitäten und den Aktivierungsfaktor bezogen auf die native Lipase TL zusammen. Für den hier durchgeführten Vergleich wurden Acc-LipTL mit einer Beladungsdichte von 17,8 mg_{Protein}/g_{Träger} zugrunde gelegt.

Die Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel kann abschließend als sehr erfolgreich bewertet werden, da eine um den Faktor 4,1 höhere Aktivitätsausbeute erreicht werden konnte. Der Vergleich der statischen Suspension von Hoyos *et al.* [89] und der hier hergestellten macht deutlich, dass die Aktivierung der Lipase TL nicht reproduziert werden konnte (bezogen auf die Aktivität der hier verwendeten nativen Lipase TL). Die Synthese wurde mit identischen Materialien (Silikon) und mehrere Male durchgeführt, was zu keiner Änderung der Ergebnisse führte. Es kann letztendlich nicht genau geklärt werden, ob es sich

hier um einen Fehler in der Herstellung der statischen Suspensionen handelt oder ob Unterschiede in den Enzymchargen diese Abweichungen erklären könnten. Interessanterweise bestätigt dieses Ergebnis die fehlende Aktivierung nach einer Beschichtung der Acc-LipTL mit Silikon. Dies stützt die Theorie der selektiven Lipase TL Bindung und der dadurch erreichten Aufreinigung. Ungeachtet dessen weisen die Acc-LipTL noch weitere Vorteile gegenüber den statischen Suspensionen auf. Die statischen Suspensionen quellen bei einem Kontakt mit Lösungsmittel sehr stark, was dazu führt, dass bei einem geringen Reaktionsvolumen nur sehr wenig dieses Präparats eingesetzt werden kann. Dies erniedrigt die volumetrische Aktivität des Ansatzes erheblich. Die inerte Beschaffenheit der Accurelträger und die geringe Korngröße ermöglichen auch bei geringen Volumina eine hohe volumetrische Aktivität. Des Weiteren ist dieses Quellungsverhalten bei den *silcoat*Acc-LipTL nicht zu finden, da wahrscheinlich der feste Träger ein Quellen des Silikons weitestgehend unterbindet.

3.3 Charakterisierung der Reaktionsparameter – Einfluss auf die Aktivität und Stabilität der Acc-LipTL

In den Arbeiten von Hoyos *et al.* [70, 89, 90] wurde, wie in Kapitel 1.5 vorgestellt, die dynamisch kinetische Racematspaltung von Benzoin unter Verwendung der Lipase TL und des Shvo-Katalysators eingehend untersucht. Es wurden dabei sowohl die Einsatzart der Lipase TL sowie der Einfluss der Reaktionstemperatur und verschiedener Acyldonatoren auf den jeweiligen Umsatz der KR betrachtet. Des Weiteren wurden Untersuchungen hinsichtlich der DKR-Strategie durchgeführt, um trotz der beschriebenen Deaktivierung der Lipase TL bei 50 °C den Umsatz der DKR zu maximieren und gleichzeitig die Reaktionszeit zu minimieren. Die Immobilisierung der Lipase TL in statischen Suspensionen führte laut Hoyos *et al.* [89] zu einer Stabilisierung bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C. Es wurden jedoch keine Untersuchungen bezüglich des Stabilisierungsgrundes bzw. des genauen Ausmaßes der Stabilisierung durchgeführt.

Für eine rationale Steigerung der Stabilität der Lipase TL ist es von Vorteil, wenn die deaktivierenden Einflussfaktoren eindeutig identifiziert werden können. Es ist auf der

Grundlage der bisherigen Publikationen nicht ersichtlich, ob die Lipase TL vor allem temperatursensitiv ist oder ob zusätzlich oder eben alleinig das verwendete Lösungsmittel bzw. die Substrate oder Produkte eine Verminderung der Stabilität hervorrufen. Aufgrund dessen wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Charakterisierung der Acc-LipTL bezüglich des Einflusses verschiedener Reaktionsparameter auf die Aktivität, die Lager- und Prozessstabilität durchgeführt. Zusätzlich sollten verschiedene Lösungsmittel getestet werden, um eine potentielle Alternative zu THF aufzuzeigen. Die Aufnahme der Lagerstabilität wurde dazu verwendet, um Einflüsse isoliert voneinander betrachten und bewerten zu können. Die Prozessstabilität diente zur Kontrolle der in den vorherigen Versuchen ermittelten Einflussfaktoren und zur Charakterisierung der Acc-LipTL unter den jeweiligen Einsatzbedingungen. Die Einflussnahme der Parameter auf die Aktivität der Acc-LipTL wurden im weiteren Verlauf der Arbeit dazu genutzt, um optimale Arbeitsbedingungen für die DKR zu finden.

3.3.1 Aktivität

In Anbetracht des Reaktionssystems der kinetischen Racematspaltung von Benzoin können folgende variierbare Parameter bestimmt werden, die potentiell einen Einfluss auf die Aktivität der Lipase TL haben: Acyldonor, Substratkonzentration, Wasseraktivität, das verwendete Lösungsmittel und die Reaktionstemperatur.

Auf Grundlage der zur Verfügung stehenden Literaturdaten von Aoyagi *et al.* [128] und Hoyos *et al.* [70, 89, 90] konnten Vinylester als sehr gut geeignete Acyldonatoren identifiziert werden. Generell eignen sich diese Enolester in Umesterungsreaktionen, da die gebildeten Enol-Nebenprodukte direkt zu Aldehyden oder Ketonen tautomerisieren [129, 130]. Die dadurch entstehende Irreversibilität der Reaktion erhöht die Reaktionsgeschwindigkeit enorm. Bezüglich der Aktivität wurde eine Variation des Acyldonors aufgrund dessen nicht in Betracht gezogen und an der Verwendung von Vinylbutyrat festgehalten.

Die Substratkonzentration wurde von Hoyos *et al.* [90] variiert, was eine annähernd lineare Steigerung der Aktivität bei sukzessiver Erhöhung der Substratkonzentration zur Folge hatte. Für eine Untersuchung von Parametern, die einen direkten Einfluss auf die Aktivität haben,

ist von Vorteil, wenn die Aktivität allein vom Enzym abhängig ist [2]. Aufgrund der geringen Löslichkeit des Benzoin ist das Erreichen einer Substratkonzentration, bei der die Aktivität nur vom Enzym abhängt, nicht möglich und so wurde an einer definierten Konzentration festgehalten. Um den Einfluss der sich ändernden Substratkonzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit möglichst klein zu halten, wurden die Zeitpunkte der Probenahmen im Aktivitätstest so gewählt, dass der Umsatz der Reaktion minimal (<10 %) blieb. Folglich wurden die Parameter Wasseraktivität, Lösungsmittel und Reaktionstemperatur genauer betrachtet.

3.3.1.1 Wasseraktivität

Die KR von Benzoin basiert auf der Verwendung eines nichtwässrigen, organischen Lösungsmittelsystems. Gründe dafür sind vor allem die gute Benzoinlöslichkeit in THF und das Fehlen einer Wasserphase, da Wasser als Konkurrenzreaktion zum Acyldonor fungiert. Das Reaktionsgleichgewicht wird dadurch auf die Seite der Umesterungsreaktion verschoben und damit die Hydrolyse des Acyldonors verhindert. Nichtsdestotrotz kann Wasser auch in nicht wässrigen Reaktionssystemen eine entscheidende Rolle spielen. Nach heutigem Kenntnisstand ist eine vom Enzym abhängige Wassermenge zur Aufrechterhaltung der Hydrathülle notwendig, um die strukturelle Mobilität und der damit verbundenen, aktivitätssteigernden Flexibilität des Enzyms sicherzustellen [131]. Zur Beschreibung der Menge dieses Wassers wurde der Begriff der Wasseraktivität (a_w) eingeführt. Die Wasseraktivität ist definiert als der Wasserdampfdruck über einem Material oder einer Flüssigkeit im Verhältnis zum Wasserdampfdruck über reinem Wasser [132]. In Bezug auf ein enzymatisches Reaktionssystem beschreibt der a_w -Wert die Menge an verfügbarem Wasser, die nach Sättigung aller Interaktionspartner des Wassers, wie beispielsweise dem Lösungsmittel, den Substraten, den verwendeten Reaktionsgefäßen und den Enzymen bzw. Immobilisaten, im Reaktionssystem vorliegt.

Es wurden unterschiedliche Methoden zur Einstellung der Wasseraktivität entwickelt. Die Inkubation des gesamten Reaktionssystems oder auch nur einzelner Komponenten über einer gesättigten Salzlösung stellt die am weitesten verbreitete Methode dar [133]. Dabei

werden Salze verwendet, die nach Herstellung einer übersättigten Lösung einen festen Wasseraktivitätswert aufweisen. Dieser Wert variiert zwischen 0-1, wobei 0 absolut trocken und 1 die Wasseraktivität über reinem Wasser bedeutet. Folgend stellt sich nach einer ausreichend langen Inkubationszeit der a_w -Wert des Salzes auch im Reaktionssystem ein. Diese Methode ermöglicht aufgrund der definierten Wasseraktivitäten eine genaue Charakterisierung der Abhängigkeit der Aktivität von der Menge des verfügbaren Wassers.

Um einen ersten Eindruck von dieser Abhängigkeit zu bekommen, kann für bestimmte Lösungsmittel deren Abhängigkeit zwischen dem Wassergehalt und der Wasseraktivität aus Tabellenwerken abgelesen werden. Die definierte Zugabe einer sehr geringen Wassermenge für theoretisch trockene Lösungsmittel ermöglicht somit die Einstellung einer gewünschten Wasseraktivität. Bei sehr unpolaren Lösungsmitteln ist dies jedoch nur sehr schwierig möglich, da die Wassermenge, die zugegeben werden müsste, oftmals zu klein für eine reproduzierbare Zugabe ist. Bei polaren und wassermischbaren Lösungsmitteln wie THF ist diese Methode leicht anwendbar und wurde in einer früheren Studie zum Einfluss des Wassergehaltes auf die Reaktionsgeschwindigkeit einer Umesterung mittels der Protease Subtilisin Carlsberg angewendet [134]. Die Kontrolle der Wasseraktivität bei Umesterungsreaktionen ist dahingehend simpel, dass bei der Reaktion kein zusätzliches Reaktionswasser entsteht oder verbraucht wird. Offensichtliches Manko dieser Methode ist jedoch die mögliche Diskrepanz zwischen der Wasseraktivität des Lösungsmittels und der des späteren, sich im Gleichgewicht befindlichen Reaktionssystems. Ein Teil des Wassers interagiert auch mit den anderen Bestandteilen des Systems (Substrat, Enzym(träger), Reaktionsgefäße). Da die Stärke der Interaktionen nicht voraussagbar ist, ist auch keine Aussage über die tatsächliche Wasseraktivität möglich. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass obwohl sich der Wassergehalt des Reaktionsansatzes nicht ändert, die tatsächliche Wasseraktivität geringer ist, als die durch die Wasserzugabe eingestellte. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Komponenten wie Benzoin als Substrat und Accurel als Trägermaterial sind sehr hydrophob, weswegen eine Aufnahme des im Lösungsmittel befindlichen Wassers eher unwahrscheinlich ist. Das Vinylbutyrat wurde verwendet wie erworben und könnte aufgrund seiner polaren Natur einen Teil des Wassers aufnehmen. Da die Menge des Vinylbutyrats jedoch sehr gering ist, ist dahingehend keine wesentliche Änderung des a_w -Wertes zu

erwarten. Eine höhere Wasseraktivität als eingestellt könnte ebenso auftreten, da nicht davon ausgegangen werden konnte, dass das verwendete Lösungsmittel absolut trocken ist. In diesem Fall ist möglich, dass eine geringe und als konstant anzusehende Menge Wasser im THF Einfluss auf den a_w -Wert nimmt. Da jedoch das THF auf Natriumsulfat getrocknet und mehrere Tage vor Verwendung auf aktivierten Molsieben gelagert wurde, ist auch dieser Einfluss als sehr gering einzuschätzen. Auf der Grundlage dieser Voraussetzungen kann diese Methodik für eine Feststellung einer generellen Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Wasseraktivität genutzt werden. Die Möglichkeit den tatsächlichen a_w -Wert des Reaktionsansatzes mit einem Taupunkthygrometer oder einen Leitfähigkeitsmesser zu ermitteln, ist laut Herstellerangaben nicht möglich, da die Sensibilität der verwendeten Membranen gegenüber einer reinen Lösungsmittelphase zu hoch ist.

Im Folgenden wurden verschiedene Wasseraktivitäten durch Zugabe definierter Mengen Wasser zu THF eingestellt. Die Acc-LipTL wurden bis zur Verwendung in einem Exsikkator unter reduziertem Druck und über Trocknungsmitteln gelagert. Tabelle 12 listet den Wassergehalt des THF und die theoretisch dadurch eingestellte Wasseraktivität auf.

Tabelle 12: Wassergehalt (v/v%) von THF bei definierten Wasseraktivitäten

Wasseraktivität	Wassergehalt THF [%]
0,000	0
0,100	0,185
0,200	0,402
0,400	0,98
0,600	1,94
0,800	4,02

Frühere Studien belegen, dass die optimale Wasseraktivität von Enzym zu Enzym variiert, was auf die unterschiedlichen Molekülstrukturen zurückgeführt wurde [135]. Die aktivitätsbezogenen, optimalen Wasseraktivitäten in Ver- bzw. Umesterungsreaktionen liegen beispielsweise bei einem a_w -Wert von etwa 0,55 für die Lipase aus

Mucor miehei [131], oder bei $a_w=0,33$ für die Lipase aus *Candida rugosa* [136]. Des Weiteren konnte für eine Lipase einer *Pseudomonas sp.* eine stetig ansteigende Aktivität mit zunehmender Wasseraktivität [136] und im Gegensatz dazu für die Lipase aus *Rhizopus arrhizus*, bei Durchführung einer Umesterung von Ethyl Decanoat und Dodecanol zu Dodecyl Decanoat, eine stetig abnehmende Aktivität bei steigender Wasseraktivität festgestellt werden [136]. Des Weiteren wiesen Valivety *et al.* [137] nach, dass auch bei einem sehr niedrigen a_w -Wert von theoretisch 0,0001 eine signifikante Restaktivität in der gleichen Umesterungsreaktion für die Lipase aus *Mucor miehei* möglich ist. Die hier erhaltenden Daten zeigen einen ähnlichen Zusammenhang wie die letztgenannten Beispiele.

In Abbildung 21 ist die spezifische Trägeraktivität der Acc-LipTL für die KR von Benzoin in THF über verschiedene initiale Lösungsmittel-Wasseraktivitäten aufgetragen. Wie bereits zuvor diskutiert, ist anzunehmen, dass sich die tatsächliche Wasseraktivität von der eingestellten unterscheidet. Nichtsdestotrotz ist deutlich zu erkennen, dass sich eine Erhöhung des Wassergehaltes im Reaktionssystem negativ auf die katalytische Aktivität der Immobilisate auswirkt.

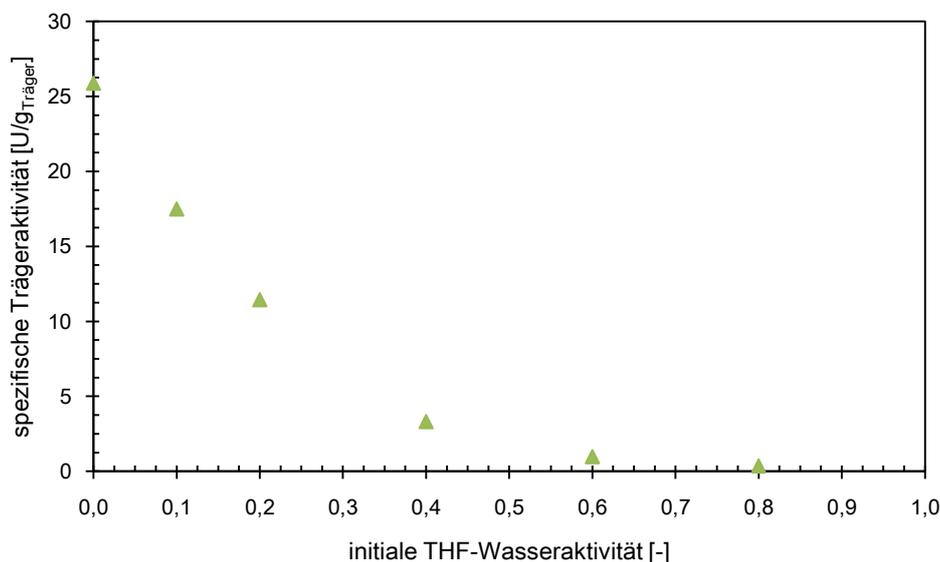


Abbildung 21: Spez. Trägeraktivität der Acc-LipTL in Abhängigkeit von der Wasseraktivität in THF bei RT

Die spezifische Aktivität sinkt von maximal 25,9 U/g_{Träger} bei einer apparenten Wasseraktivität von Null, bis auf eine fast nicht mehr nachweisbare Aktivität bei einem apparenten a_w -Wert von 0,8. Es ist bekannt, dass eine kritische Hydratisierung der Enzymoberfläche nötig ist, um die Flexibilität zu gewährleisten. Bei einer fortwährenden Bindung von Wassermolekülen, was bei einer steigenden Wasseraktivität anzunehmen ist, führt dies zu einer Steigerung der Flexibilität der Enzyme im nichtwässrigen Medium [134]. Eine stark erhöhte Flexibilität ermöglicht dabei die Ausbildung unvorteilhafter Konformationszustände, die eine Inaktivierung oder zumindest einen Verlust der Aktivität nach sich ziehen können [8]. Es ist theoretisch auch möglich, dass sich die Steigerung des Wassergehaltes auf das Reaktionsgleichgewicht auswirkt und deshalb die Aktivität der Umesterung sinkt.

Letztlich kann klar herausgestellt werden, dass bei Verwendung dieses Reaktionssystems unter den hier vorherrschenden Laborbedingungen eine Trocknung der Acc-LipTL und des Lösungsmittels zu einer Maximierung der spezifischen Aktivität führt. Anscheinend gilt, je trockener die Bedingungen sind, desto aktiver sind die Acc-LipTL in der KR von Benzoin. Im weiteren Verlauf wurden alle verwendeten Lösungsmittel vor der Verwendung in der KR von Benzoin für mehrere Tage auf aktivierten Molsieben gelagert. Die Acc-LipTL wurden wie bereits beschrieben unter trockenen Bedingungen aufbewahrt. Die Substrate wurden wie erworben ohne vorherige Behandlung eingesetzt, da wie bereits zuvor diskutiert, deren Einfluss auf die Wasseraktivität als sehr gering einzuschätzen ist.

3.3.1.2 Lösungsmittel

In rein organischen Reaktionssystemen sind oftmals die intrinsischen Eigenschaften der Lösungsmittel entscheidend für die enzymatische Aktivität [8]. Es wurde in zahlreichen Studien versucht die Aktivität, Stabilität und Selektivität von Enzymen mit diversen Lösungsmittelparametern, wie beispielsweise der Polarität, der Leitfähigkeit oder der Hydrophobizität, zu korrelieren, um Richtlinien für die Auswahl des geeignetsten Lösungsmittels zu erstellen. Die Schlussfolgerung der Vielzahl an Untersuchungen dürfte die Erkenntnis sein, dass es nicht „den“ Parameter gibt, der eine solche Voraussage zulässt [16, 132, 138].

Dennoch wurde oft versucht durch Verwendung des log P-Konzepts, welches ein Maß für die Hydrophobizität eines Lösungsmittels ist, den Einfluss auf die Aktivität und Stabilität von Enzymen zu beschreiben [139]. Das Konzept beruht auf dem dekadischen Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen Oktanol und Wasser und beschreibt im Prinzip die Fähigkeit des Lösungsmittels, sich mit Wasser zu mischen. Je höher der log P-Wert, desto hydrophober das Lösungsmittel. Eine Wassermischbarkeit wird für Lösungsmittel mit einem log P-Wert von -2,5 - 0 (vollständig mischbar) und 0 - 2 (teilweise mischbar) angenommen [3].

Die Aktivität bzw. die Inaktivierung von Enzymen kann jedoch von sehr viel mehr Faktoren abhängen, als allein von der Hydrophobizität des Lösungsmittels. Es kann zu direkten Interaktionen der funktionellen Gruppen der Lösungsmittelmoleküle mit der Enzymoberfläche kommen oder die Solvatisierung der Substrate kann in verschiedenen Lösungsmitteln unterschiedlich sein. Je stärker ein Substrat solvatisiert vorliegt, desto geringer ist die freie Energie des Substrates, was eine verringerte Verfügbarkeit dessen für das katalysierende Enzym bedingt [140]. Dies kann im Folgenden durch eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Daher ist das log P-Konzept allein nicht hinreichend dazu geeignet, Voraussagen zur Aktivität und Stabilität zu treffen [132]. Eine Betrachtung der Hydrophobizität von Lösungsmitteln der gleichen Stoffklasse hingegen kann möglicherweise Aufschluss über den Einfluss auf die Aktivität oder Stabilität geben.

Im Rahmen dieser Charakterisierung wurden Lösungsmittel ausgewählt, die in der Literatur zur Lösung von Benzoin erwähnt wurden bzw. die in experimentellen Vorarbeiten eine Mindestlöslichkeit von 10 mg/mL Benzoin aufwiesen. Tabelle 13 fasst die getesteten Lösungsmittel in ihren Stoffklassen, deren log P-Wert, die maximale Löslichkeit von Benzoin und die spezifische Trägeraktivität der Acc-LipTL in den jeweiligen Solventien zusammen.

Tabelle 13: Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur KR von Benzoin

Stoffklasse der Lösungsmittel	Lösungsmittel	log P	Maximale Löslichkeit von Benzoin bei 21,5 °C [mg/mL]	Spezifische Aktivität [U/g _{Träger}] ¹
Ketone	DMSO	-1,3	20	1
	Aceton	-0,23	>20	12,6
	MIBK	1,31	10 (20) ³	13,6
Ether	1,4-Dioxan	-1,11	>20	10,9
	THF	0,49	>20	13
	2-MeTHF	0,72	>20	20,7
chlorierte KW ²	DCM	1,25	>20	4
	TCM	2	>20	4,2
Azine	Pyridin	0,71	>20	5,6
Nitrile	Acetonitril	-0,33	20	6,2
aromatische KW ²	Toluol	2,5	10 (>20)³	15,2
gesättigte KW ²	Hexan	3,5	-	0
	Heptan	4	-	0

¹ Benzoinkonzentration von 10 mg/mL; ² Kohlenwasserstoffe; ³ Lösung des Benzoins durch leichtes Erwärmen, bei 50 °C höhere Konzentrationen möglich

Es konnte weder ein Zusammenhang zwischen dem log P-Wert noch der verwendeten Lösungsmittelklasse und der maximalen Löslichkeit von Benzoin festgestellt werden. Lösungsmittel die teilweise (log P = 0-2) oder vollständig (log P = -2,5-0) mit Wasser mischbar sind, weisen mit vereinzelt Ausnahmen eine gute Löslichkeit für Benzoin auf (> 20 mg/mL). Einzig sehr hydrophobe Lösungsmittel (log P > 2,5) konnten kein Benzoin lösen. Im Fall des Toluols konnte eine gute Löslichkeit durch Erhöhung der Temperatur erreicht werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden alle Aktivitätstests bei einer Substratkonzentration von 10 mg/mL durchgeführt.

Innerhalb der Lösungsmittelklassen konnte durch die Untersuchung mehrerer Lösungsmittel bei den Ketonen und den Ethern ein Zusammenhang zwischen dem log P-Wert und der Aktivität der Acc-LipTL gefunden werden. Je höher der log P-Wert hierbei war, desto höher die Aktivität. Es ist möglich, dass ein höherer log P-Wert eine schlechtere Löslichkeit des

Benzoins bedingt und dieses somit weniger solvatisiert vorliegt. Eine geringe Solvatisierung bedeutet aber auch eine gute Verfügbarkeit des Substrates für das Enzym und somit eine höhere Aktivität. Der Vergleich der log P Werte der verschiedenen Stoffklassen macht jedoch nochmals deutlich, dass ein genereller Vergleich dieses Parameters zu keiner Korrelation führt. Die höchste spezifische Trägeraktivität konnte in 2-MeTHF mit $20,7 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ festgestellt werden. Auch Toluol wies mit $15,2 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$ eine höhere Aktivität als das Standardsystem in THF auf ($13 \text{ U/g}_{\text{Träger}}$). Chlorierte KW, Azine, Nitrile und gesättigte KW eignen sich offenbar nicht für die KR von Benzoin mit Acc-LipTL, da hierbei jeweils signifikant niedrigere Aktivitäten als in THF festgestellt wurden. Eine mögliche Ursache für einen Verlust der katalytischen Aktivität ist möglicherweise in einer direkten Interaktion zwischen den Lösungsmitteln und der Lipase TL zu finden. So ist bekannt, dass eine starke Solvatisierung von Aminosäureseitenketten zu einem Verlust der strukturellen Integrität führt und je nach Stärke der Interaktion in einer Verringerung der Aktivität deutlich wird [6].

Zusätzlich muss generell bedacht werden, dass trotz einer Lagerung der Lösungsmittel über Molsieben der exakte Wassergehalt der Lösungsmittel nicht bestimmt wurde. Der Wassergehalt eines Lösungsmittels ist, wie im vorherigen Kapitel diskutiert, direkt mit der Wasseraktivität verbunden. Nach Zaks und Klivanov [141] ist der notwendige Wassergehalt im Lösungsmittel, der erforderlich ist, um eine bestimmte Hydratisierung des Enzyms zu erreichen, je nach Hydrophilie des Lösungsmittels verschieden. So ist beispielsweise in hydrophoben Lösungsmitteln eine geringere Wassermenge erforderlich, um eine bestimmte Wasseraktivität zu erreichen, als es in hydrophileren der Fall ist. Daher ist denkbar, dass auch dieser Sachverhalt für die spezifischen Aktivitäten von Acc-LipTL in den verschiedenen Lösungsmitteln verantwortlich ist.

Die Lagerung von Lösungsmitteln über Molsieben stellt eine gängige Methode zur Entfernung eines Großteils des Wassers dar und ist hinsichtlich einer potentiellen Anwendung der (D)KR von Benzoin in einem industriellen Maßstab einfach umzusetzen. Unter den gegebenen Bedingungen können die erhaltenen Daten als signifikant betrachtet werden, weswegen an dieser Vorgehensweise festgehalten wurde. Auf Basis dieser Daten wurden THF, Toluol und 2-MeTHF ausgewählt, um den Einfluss der Temperatur auf die spezifische Aktivität der Acc-LipTL zu untersuchen.

3.3.1.3 Temperatur

Eine Erhöhung der Reaktionstemperatur ist insbesondere hinsichtlich der Kombination der Acc-LipTL mit einem chemischen Racemisierungskatalysator interessant. Häufig werden diese in chemo-enzymatischen Reaktionssystemen bei erhöhten Temperaturen, meist um 50-80 °C eingesetzt [84, 142, 143]. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde die Temperatur schrittweise erhöht und die spezifische Trägeraktivität der Acc-LipTL aufgenommen.

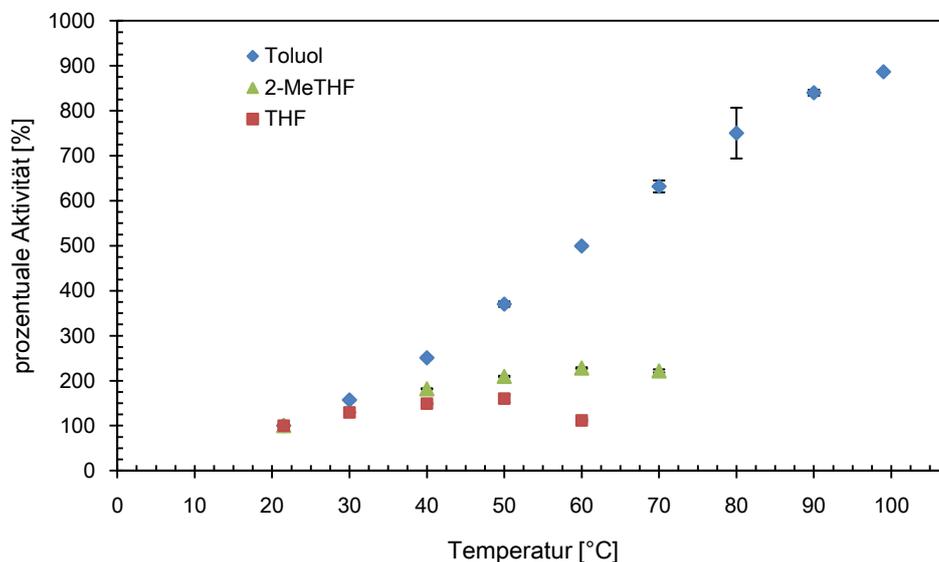


Abbildung 22: Prozentuale Restaktivität von Acc-LipTL in verschiedenen Lösungsmitteln in Abhängigkeit der Reaktionstemperatur (Toluol: 47 mM Benzoin, 2-MeTHF und THF: 94 mM Benzoin)

In Abbildung 22 ist die prozentuale Restaktivität der Acc-LipTL in THF, 2-MeTHF und Toluol über unterschiedlichen Temperaturen aufgetragen. Die Bestimmung der Restaktivitäten in Toluol als Lösungsmittel wurde bei einer Benzoinkonzentration von 10 mg/mL durchgeführt, so dass auch Aktivitätstests bei Raumtemperatur möglich wurden. Im Fall von THF und 2-MeTHF wurde an der Standardkonzentration von 20 mg/mL festgehalten. Es ist deutlich erkennbar, dass die Aktivität bei Verwendung des THF's das Maximum bei 50 °C, im Fall des 2-MeTHF bei 60 °C und bei Toluol als Lösungsmittel erst bei >99 °C aufweist, was die höchste Temperatur darstellte, die ohne Veränderung des Messsystems eingestellt werden konnte. Die prozentuale Steigerung der Restaktivitäten betrug im Vergleich zur Raumtemperatur bei:

THF = 160 %; 2-MeTHF = 227 %; Toluol = 886 %. Grundsätzlich konnte eine Steigerung der Aktivität bei Erhöhung der Temperatur erwartet werden. Die Unterschiede der prozentualen Steigerungen in den jeweiligen Lösungsmitteln sind aller Wahrscheinlichkeit nach mit der unterschiedlichen Thermostabilität der Lipase TL in den verschiedenen Lösungsmitteln zu erklären. So scheint die Lipase TL in Toluol wesentlich thermostabiler zu sein als in THF und 2-MeTHF. Es ist denkbar, dass die hydrophoben Lösungsmittelmoleküle des Toluols die Konformation der allem Anschein nach ebenso hydrophoben Lipase TL besser stabilisieren und somit vor der temperaturbedingten Inaktivierung schützen.

Eine Verringerung der Stabilität der Enzyme wird zudem durch den jeweilig sigmoiden Kurvenverlauf mit anschließender Verminderung der Restaktivität deutlich. Demnach ist die Temperatur, bei der das Aktivitätsmaximum erreicht wurde, nicht zwingend die, welche für einen technischen Prozess als optimal anzusehen ist. Um diese zu ermitteln, müsste die jeweilige Halbwertszeit der Acc-LipTL im entsprechenden Lösungsmittel und den einzelnen Temperaturen in Korrelation mit der spezifischen Aktivität gebracht werden. So könnte die zu erwartende Menge an Produkt bis zur vollständigen Deaktivierung der Enzyme errechnet werden. Diese Abschätzung ist insbesondere für eine alleinige Betrachtung der KR interessant. Mit einem Optimierungsfokus, der sich auf die Entwicklung einer verbesserten DKR von Benzoin richtet, sind Reaktionstemperaturen bei mindestens 50-60 °C anzustreben. Daher schien an dieser Stelle eine Erhöhung der Stabilität der Acc-LipTL vielversprechender zu sein, um dadurch höhere Reaktionstemperaturen und die damit verbundene höhere spezifische Aktivität der Acc-LipTL nutzen zu können.

3.3.2 Lagerstabilität

Die Lagerstabilität bezeichnet die Abnahme der Aktivität bei einer Lagerung unter konstanten Bedingungen über einen definierten Zeitraum und dient der isolierten Betrachtung einzelner Parameter. Ziel der Untersuchung ist die Identifikation der Parameter, welche einen signifikanten Anteil an der Destabilisierung der Lipase TL haben. Ausgangspunkt und Referenz der Untersuchung ist das Standardsystem in THF. Da nicht auszuschließen ist, dass auch Edukte oder Produkte eine negative Wirkung auf die Stabilität

des Enzyms haben, wurde der Einfluss dieser ebenso untersucht, wie die Folge einer erhöhten Temperatur und alternativer Lösungsmittel. Die Bewertung der Stabilität erfolgte durch eine Ermittlung der Halbwertszeit. Durch eine Auftragung der logarithmierten Restaktivitäten über der Zeit konnte auf Basis der Annahme einer exponentiellen Deaktivierung der Enzyme nach dem Gesetz erster Ordnung [21] (Gleichung 1) die Inaktivierungskonstante k_I bestimmt werden. Über Gleichung 2 wurde folgend die Halbwertszeit (HWZ) errechnet.

$$A_t = A_0 e^{-k_I t} \quad \text{(Gleichung 1)}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_I} \quad \text{(Gleichung 2)}$$

A_t und A_0 = Aktivität zum Zeitpunkt t und zu Beginn (Zeitpunkt Null)

$t_{1/2}$ = Halbwertszeit (Zeit nach der die Aktivität 50 % des Ausgangswertes entspricht)

3.3.2.1 Stabilität in Gegenwart der Edukte und Produkte

Die Acc-LipTL wurden jeweils unter Anwesenheit eines der Edukte (Benzoin bzw. Vinylbutyrat) und der einzelnen Produkte (Benzoinbutyrat bzw. Acetaldehyd) in THF inkubiert. Die Konzentrationen entsprachen im Fall der Edukte denen eines Standardaktivitätstests und im Fall der Produkte den Konzentrationen, die bei einem Vollumsatz einer KR vorhanden wären. Abbildung 23 fasst die jeweiligen Halbwertszeiten im Vergleich zur Halbwertszeit in reinem THF zusammen.

Die Halbwertszeit der Acc-LipTL in THF beträgt 12,7 h. In Anbetracht der bisher publizierten Reaktionsdauern der DKR von Benzoin, welche mindestens 20 h betragen [89], belegt dies die bereits durch Hoyos *et al.* [70, 89] erwähnte geringe Stabilität der Lipase TL. Sowohl die Anwesenheit der Edukte als auch der Produkte hat eine leicht stabilisierende Wirkung auf die Immobilisate, da sich die Halbwertszeiten im Fall der Edukte auf ca. 14-15 h und bei den Produkten sogar auf etwa 16-17 h erhöhen. Es ist nicht untypisch für Enzyme, dass diese sich bei Anwesenheit von Substraten aufgrund der Molekülbindung im aktiven Zentrum

langsamer entfalten bzw. erst bei einer höheren Temperatur inaktivieren [2]. Aufgrund der Standardabweichung der erhaltenden Werte ist jedoch die Frage berechtigt, wie signifikant diese Erhöhung der Stabilität ist.

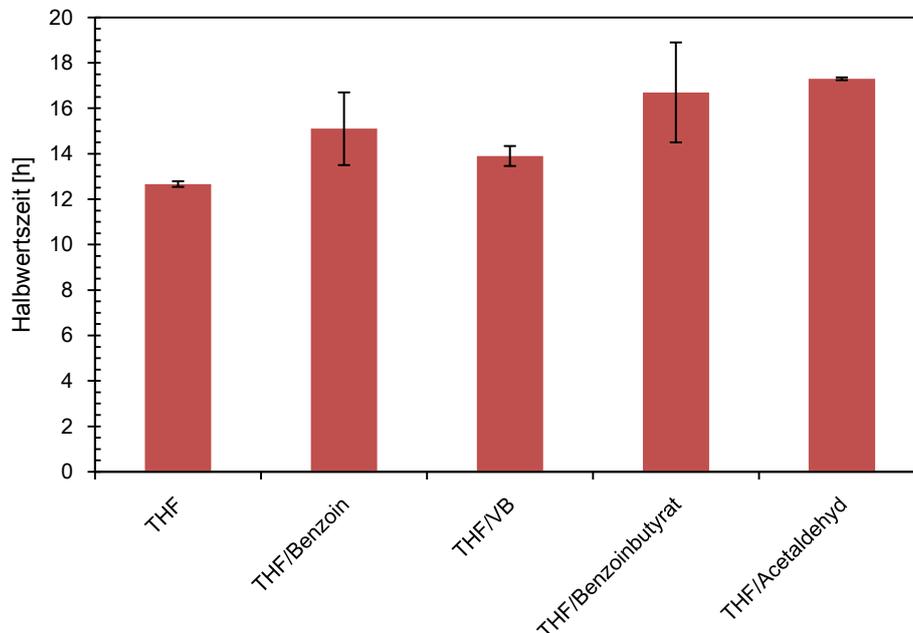


Abbildung 23: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit von Edukten und Produkten in THF bei RT

Sicher anzunehmen hingegen ist der umgekehrte Schluss, nämlich dass keines der Edukte oder Produkte eine deaktivierende Wirkung auf die Acc-LipTL hat. Herauszuheben ist dabei das Ergebnis nach Inkubation mit Acetaldehyd, da dies bekanntermaßen einen negativen Effekt auf einige Lipasen haben kann [144, 145]. Es wurde in diesen Studien bereits vermutet, dass die Sensitivität der Lipasen gegenüber Acetaldehyd unter anderem von der mikrobiellen Herkunft abhängt [144]. Lipasen aus *Pseudomonas sp.* zeigen demnach eine geringere Neigung zur Ausbildung der deaktivierend wirkenden Schiff'schen Basen, welche sich zwischen den Lysinresten der Enzyme und den Aldehyden formen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse bestand folglich kein Grund, das Reaktionssystem hinsichtlich der Edukte (Acyl donor) bzw. Produkte zu verändern. Es wurde dementsprechend an Vinylbutyrat als Acyl donor festgehalten, gleichwohl sich Acetaldehyd als Nebenprodukt bildet.

3.3.2.2 Lösungsmittel

Im weiteren Verlauf wurden jene Lösungsmittel aus Kapitel 3.3.1.2 hinsichtlich ihrer Lagerstabilität getestet, die eine ausreichend hohe spezifische Aktivität der Acc-LipTL ermöglichen ($>5 \text{ U/mg}_{\text{Träger}}$). Das Standardsystem mit THF als Solvens galt dabei als Referenz und somit gleichzeitig als Gradmesser für eine potentielle Steigerung der Stabilität der Immobilisate. Wie in Abbildung 24 ersichtlich, ist lediglich die Halbwertszeit in Pyridin mit 6 h niedriger als in THF (12,7 h). In allen weiteren untersuchten Lösungsmitteln wiesen die Acc-LipTL Halbwertszeiten auf, die zum Teil deutlich über der THF-Referenz lagen. Besonders herausstechend sind dabei MIBK und Toluol, da dort Werte von über 90 h aus den Messungen extrapoliert werden konnten. In Acetonitril, 1,4-Dioxan und 2-MeTHF konnten Halbwertszeiten von 27,5 h, 30 h bzw. 33 h festgestellt werden, die ebenso signifikant höher waren, als im Standardsystem. Als möglicher Erklärungsansatz gilt auch hier die unterschiedliche Fähigkeit verschiedener organischer Lösungsmittel die am Enzym befindlichen Wassermoleküle zu verdrängen [10, 139]. Hydrophobe Lösungsmittel, wie beispielsweise MIBK und Toluol haben im Gegensatz zu polaren und wassermischbaren eine geringere Wasseraufnahmekapazität und sind daher in einem geringeren Maße dazu in der Lage, oberflächengebundenes Wasser abzustreifen [2]. Deswegen können in diesen Lösungsmitteln generell höhere Enzymstabilitäten beobachtet werden [139, 146]. Da diese Wassermoleküle essentiell für die Aktivität und die strukturelle Integrität der Enzyme sind, sind die zum Teil drastischen Änderungen der Halbwertszeit nicht verwunderlich. Hinzu kommt, dass bei den hier untersuchten polaren Lösungsmitteln möglicherweise auch noch direkte Wechselwirkungen des jeweiligen Lösungsmittels mit der Lipase TL auftreten [138]. Dabei kann es zu Störungen der ionischen Interaktionen und unter Umständen sogar zu einem Aufbrechen dieser kommen, was bis hin zu einer teilweisen Entfaltung der molekularen Struktur führen kann [6].

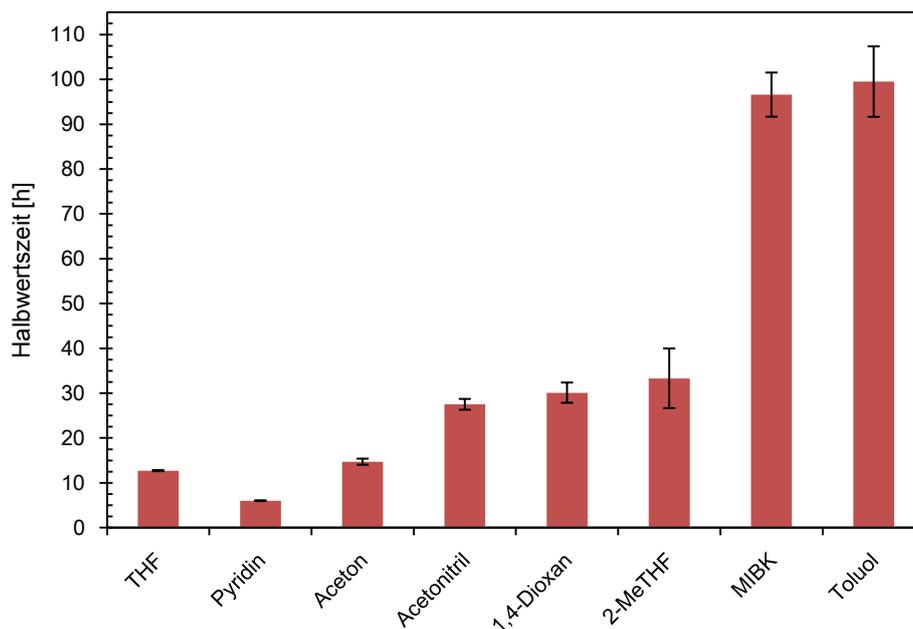


Abbildung 24: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit vom Lösungsmittel bei RT

Analog zu Kapitel 3.3.1.2 muss hier jedoch ebenso kritisch bemerkt werden, dass keine Daten über den tatsächlichen Wassergehalt der Lösungsmittel erhoben wurden und daher auch keine belastbaren Aussagen über die tatsächlichen Wasseraktivitäten getroffen werden können. Ob und in welchem Maße die Wasseraktivität einen Einfluss auf die Lagerstabilität der Acc-LipTL in den verschiedenen Lösungsmitteln hat, konnte demnach nicht beurteilt werden. Da jedoch, wie bereits zuvor festgestellt, die Trocknung der Lösungsmittel nach dem hier durchgeführten Verfahren sehr einfach ist, sind die Ergebnisse hier als dienlich für eine gezielte Optimierung des KR-System zu erachten. Für den weiteren Verlauf wurden aufgrund der zuvor ermittelten hohen spezifischen Aktivität Toluol und 2-MeTHF zusammen mit THF als Standard hinsichtlich der temperaturabhängigen Lagerstabilität untersucht.

3.3.2.3 Temperatur

Die Temperatur ist üblicherweise der Parameter mit dem stärksten Einfluss auf die Stabilität von Enzymen [2]. Eine Erhöhung der Temperatur führt zwar zu einem Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen, jedoch steigert sich auch die strukturelle Flexibilität des Enzyms. Dies hat bei zu hohen Temperaturen bzw. bei zu langen Inkubations-

zeiträumen eine Entfaltung der dreidimensionalen Struktur des Enzyms zur Folge und äußert sich in einer Reduktion der spezifischen Aktivität. Da bereits bei der Untersuchung der aktivitätsbezogenen Temperaturabhängigkeit ein deaktivierender Einfluss vermutet wurde, sollte nun auch die Lagerstabilität bei erhöhten Temperaturen untersucht werden. Es wurden zunächst die Lagerstabilitäten im THF-Standardsystem bei schrittweise um 10 °C erhöhten Reaktionstemperaturen aufgenommen, wobei erneut 60 °C das Maximum darstellte. Aus Abbildung 25 lässt sich eindeutig schlussfolgern, dass Acc-LipTL stark temperatursensitiv ist. Die Halbwertszeit verringert sich von 12,7 h bei Raumtemperatur auf lediglich 3,2 h bei 50 °C und sogar nur 2,4 h bei 60 °C. Dies bestätigt die in Kapitel 3.3.1.3 aufgestellte Vermutung, sowie die in den Arbeiten von Hoyos *et al.* erwähnte Inaktivierung in Folge erhöhter Temperaturen [70, 89].

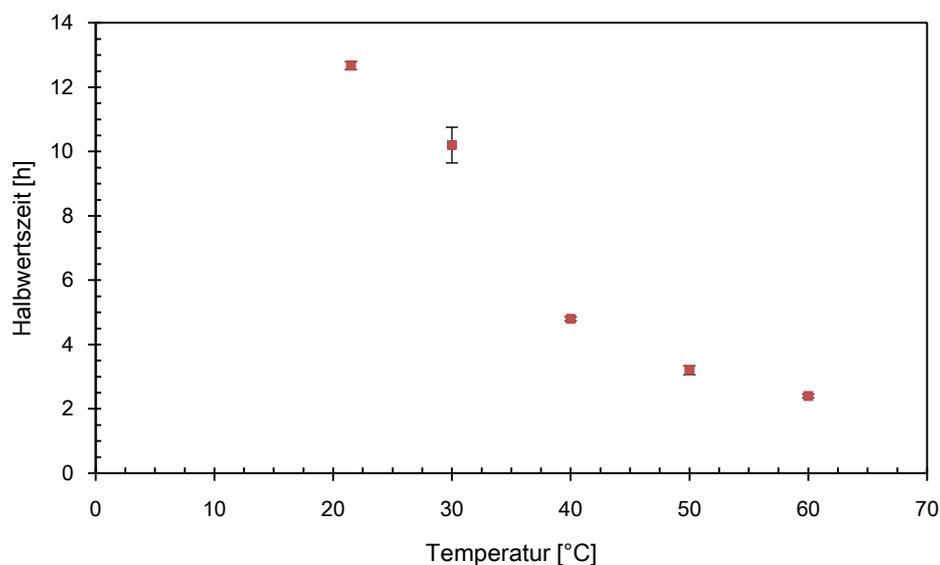


Abbildung 25: Lagerstabilität von Acc-LipTL in Abhängigkeit der Temperatur in THF

Hoyos *et al.* beschrieben eine Stabilisierung der in Silikon eingehüllten Lipase TL gegenüber der nativen Formulierung [89]. Um einen möglicherweise ebenso stabilisierenden Einfluss der adsorptiven Trägerbindung auf die Lipase TL nachzuweisen, wurden in Abbildung 26 die Verläufe der Restaktivitäten der Acc-LipTL und der nativen Lipase TL bei 50 °C in THF gegenüber gestellt. Die Abnahme der spezifischen Aktivität, hier als jeweilig prozentuale Restaktivität angegeben, verläuft unabhängig von der Einsatzform der Lipase TL gleich.

Damit konnte keine Stabilisierung der Lipase TL nach einer Bindung an Accurel MP1001 nachgewiesen werden.

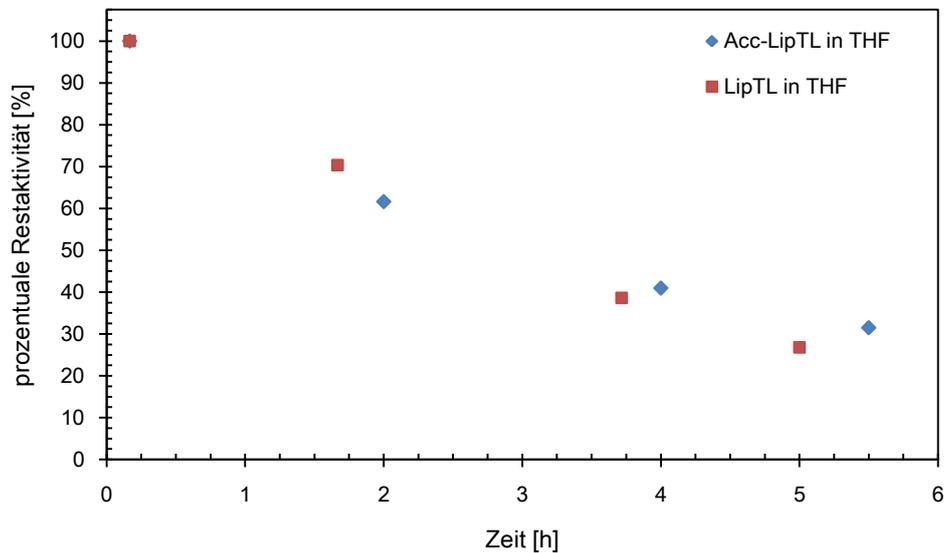


Abbildung 26: Prozentuale Restaktivitäten der nativen Lipase TL und der Acc-LipTL in Abhängigkeit der Inkubationsdauer in THF bei 50 °C

In den vorangegangenen Kapiteln wurden 2-MeTHF und Toluol aufgrund der hohen spezifischen Aktivität und der im Vergleich zu THF erhöhten Lagerstabilität als alternative Lösungsmittel für die KR bzw. DKR von Benzoin identifiziert. Folgend wurde auch bei diesen Lösungsmitteln der isolierte Einfluss einer erhöhten Temperatur untersucht. Tabelle 14 fasst die Halbwertszeiten in Toluol, 2-MeTHF und THF bei 50 °C im Vergleich zu den Halbwertszeiten bei Raumtemperatur zusammen.

Tabelle 14: Lagerstabilität von Acc-LipTL in verschiedenen Lösungsmitteln bei RT und 50 °C

Lösungsmittel	21,5 °C		50 °C	
	HWZ [h]	HWZ [% _{THF}]	HWZ [h]	HWZ [% _{THF}]
THF	12,7	100	3,2	100
2-MeTHF	33	260	8,4	262
Toluol	99,5	752	62	1937

Die Halbwertszeiten für 2-MeTHF und Toluol sind mit 8,4 h und 62 h bei 50 °C stark verringert. Die Betrachtung der prozentualen Halbwertszeiten, die jeweils auf THF bezogen wurden, macht eine außerordentlich hohe Thermostabilität der Acc-LipTL in Toluol gegenüber dem Standardsystem in THF deutlich. Wohingegen 2-MeTHF die gleiche relative Stabilität gegenüber THF aufzeigt, ist in Toluol eine um den Faktor 19 höhere Halbwertszeit zu verzeichnen. Diese ist um nochmals mehr als Faktor zwei größer als die erhöhte Stabilität bei Raumtemperatur im direkten Vergleich von THF und Toluol. Dies könnte erklären, warum es in Toluol möglich ist die Reaktionstemperatur bis auf über 90 °C zu erhöhen, bevor der inaktivierende Einfluss größer wird als die Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit der Acc-LipTL. Eine hinreichende Begründung für das unterschiedliche Verhalten der unterschiedlichen Lösungsmittel konnte anhand dieser Daten jedoch nicht gefunden werden.

3.3.3 Prozessstabilität

Als Prozessstabilität wird im Allgemeinen die Langzeitstabilität von Biokatalysatoren unter realen Reaktionsbedingungen verstanden [21]. Im Gegensatz zur Bestimmung der Lagerstabilität spielen hierbei Parameter wie mechanische Kräfte durch Rührer, Konzentrationsänderungen der Substrate und Produkte, Einflüsse durch eine Vor- und Nachbereitung der Katalysatoren und vor allem auch die fortwährenden Konformationsänderungen in Folge der katalytischen Wirkung der Enzyme eine Rolle. Für die Durchführung der KR von Benzoin in industriellem Maßstab ist sowohl der Einsatz der Acc-LipTL in wiederholten Batch-Versuchen als auch ein kontinuierlicher Prozess denkbar. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Systeme zur Bestimmung der Prozessstabilität angewandt, um jeweils möglichst reale Bedingungen zu simulieren. Beiden Methoden liegt die Annahme zu Grunde, dass analog zur Bestimmung der Lagerstabilitäts-Halbwertszeit die Deaktivierung der Enzyme nach Gesetz erster-Ordnung abläuft und aus den ermittelten Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten oder analog dazu den Umsätzen eine Inaktivierungskonstante k_i abgeleitet werden kann, aus der wiederum die Halbwertszeit bestimmt wird (Gleichung 2).

3.3.3.1 Wiederholte Batch-Versuche

Zur Bestimmung der Prozessstabilität in wiederholten Batch-Versuchen wurden die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten der einzelnen Reaktionszyklen ermittelt und zur Berechnung der Inaktivierungskonstanten verwendet. Um zusätzlich einen möglichen stabilisierenden Einfluss einer Silikonbeschichtung auf die Acc-LipTL zu untersuchen, wurden die in Kapitel 3.2.6 hergestellten *silcoat*Acc-LipTL mit 30, 50 und 70 % Silikonanteil ebenfalls getestet. Im ersten Zyklus wurde die Zeit bestimmt, die nötig war, um einen maximalen Umsatz von 50 % zu erreichen. Infolgedessen wurde der Zeitraum von 3 h als Reaktionszeit für die weiteren Zyklen festgelegt.

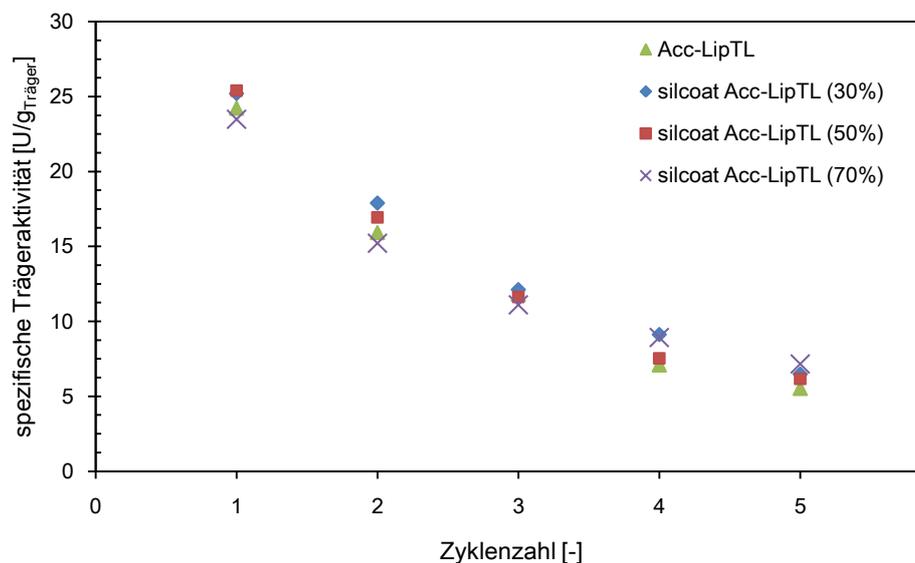


Abbildung 27: Spez. Trägeraktivitäten der Acc-LipTL und der *silcoat*Acc-LipTL-Varianten in Abhängigkeit der Zykluszahl der wiederholten Batch-Versuche in THF bei RT

Entsprechend der Ergebnisse aus den Versuchen zur Lagerstabilität ist in Abbildung 27 deutlich zu erkennen, dass Acc-LipTL sowie alle der eingesetzten *silcoat*Acc-LipTL im Verlauf der durchgeführten Zyklen deutlich an Aktivität verlieren. Da die Beschichtung der Acc-LipTL mit Silikon auch bei einem steigenden Anteil an Silikon keinerlei stabilisierenden Einfluss auf die Acc-LipTL aufweist, kann ein Leaching der Lipase TL in THF ausgeschlossen werden. Die spezifische Aktivität der Immobilisate verringert sich pro Zyklus um etwa 30-35 % auf lediglich ca. 25 % des Ausgangswertes nach dem fünften Ansatz. Der Umsatz ändert sich

ebenfalls von initial 50 % auf ca. 26-28 % nach dem letzten Zyklus. Nach Bestimmung der Inaktivierungskonstanten wurden Halbwertszeiten im Bereich von 5-6 h ermittelt (Tabelle 15). Diese Halbwertszeiten liegen somit deutlich unter denen der Lagerstabilität in THF. Es ist denkbar, dass die Konformationsänderungen während der Reaktion bestimmte Areale oder Domänen der Lipase TL freilegen und diese dann mit THF interagieren können. Eine Solvatisierung dieser Bereiche könnte eine Verringerung der Aktivität nach sich ziehen und vor allem der Grund für die verringerte Prozessstabilität gegenüber der Lagerstabilität sein.

Tabelle 15: Inaktivierungskonstanten und Lagerstabilitäten der Acc-LipTL und der *silcoat*Acc-LipTL-Varianten nach wiederholten Batch-Versuchen

Ansatz	k_i [$\cdot 10^{-3}$]	HWZ [h]
Acc-LipTL	125,5	5,2
<i>silcoat</i> Acc-LipTL 30%	113,0	6,1
<i>silcoat</i> Acc-LipTL 50%	121,4	5,2
<i>silcoat</i> Acc-LipTL 70%	97,0	6,5

Zudem geht die Änderung des Umsatzes innerhalb eines Reaktionszyklus mit einer Veränderung der Reaktionsbedingungen (Konzentration des Substrates und der Produkte) für die untersuchten Immobilisate einher. Mit den Hinweisen auf einen Einfluss der Substrate bzw. Produkte auf die Lagerstabilität, ist auch hier nicht auszuschließen, dass die sich ändernde Konzentration einen Effekt auf die Prozessstabilität hat. Ein weiterer möglicher Grund für die verringerte Stabilität im Prozess könnte die Handhabung der Immobilisate während der Durchführung der Zyklen sein. Die Acc-LipTL wurden nach jedem Zyklus einer Wäsche mit THF unterzogen, um kein anhaftendes Substrat und Produkt in den nächsten Zyklus zu verschleppen. Obwohl versucht wurde eine Trocknung der Acc-LipTL während dieser Wäschen zu vermeiden, ist nicht auszuschließen, dass die Immobilisate aufgrund der leichten Flüchtigkeit des THFs getrocknet wurden. Relevanz bekommt dieser Sachverhalt dadurch, dass im Rahmen der Immobilisierung Vorexperimente durchgeführt wurden, um die Trocknungszeit durch eine Extraktion des Wassers aus den feuchten

Immobilisaten mit einem wassermischbaren und sehr volatilen Lösungsmittel wie THF zu beschleunigen. Dabei wurde festgestellt, dass eine derartige Behandlung zu einer starken Inaktivierung der Acc-LipTL führt (Daten nicht gezeigt). Daher ist nicht auszuschließen, dass die Immobilisate infolge der Wäschen an Aktivität verloren haben.

3.3.3.2 Kontinuierlicher Prozess

Hauptvorteil der Verwendung von kontinuierlichen Reaktionssystemen zur Messung der Prozessstabilität ist die Möglichkeit konstante Reaktionsbedingungen zu schaffen und stabil zu halten [2]. Je nach Präparation des zu untersuchenden Enzyms sind verschiedene Reaktortypen geeignet. Für immobilisierte Enzyme werden oft Festbettreaktoren aufgrund der geringen mechanischen Beanspruchung verwendet, wohingegen für lösliche Biokatalysatoren eher kontinuierliche Rührkesselreaktoren (CSTR – continuous stirred-tank reactor) mit einer Membran zur Rückhaltung der gelösten Enzyme zweckentsprechend sind [2].

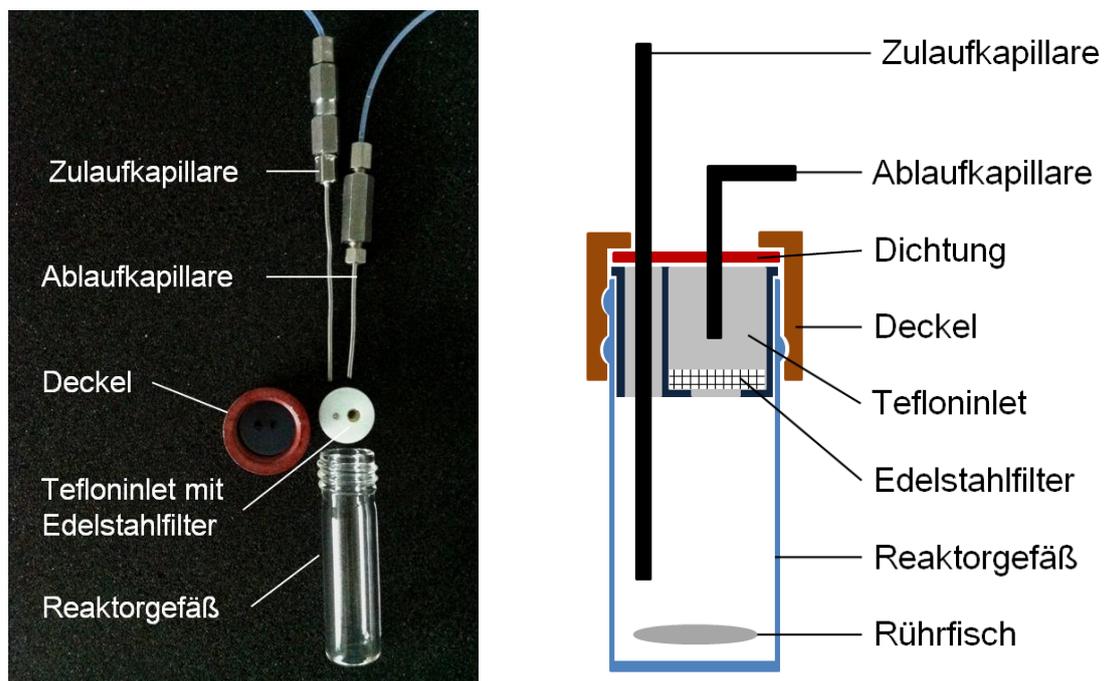


Abbildung 28: Foto des kontinuierlichen Reaktors und schematischer Aufbau

In der hier durchgeführten Arbeit wurde für die Charakterisierung der Acc-LipTL dessen ungeachtet ein Reaktor verwendet, der bezüglich des Aufbaus dem eines CSTR entspricht.

Dadurch war es möglich, auch den Einfluss der mechanischen Beanspruchung infolge der Durchmischung auf die Prozessstabilität zu untersuchen. Zum Rückhalt der Immobilisate wurde ein Edelstahlfilter vor dem Auslass des Reaktors mit Maschenweiten von 50 μm verwendet. Abbildung 28 zeigt ein Foto sowie den schematischen Aufbau des Reaktors.

Zur Festlegung der grundlegenden Parameter des CSTR's wurden Vorüberlegungen und Vorexperimente durchgeführt und die Einflüsse der jeweiligen Parameter auf die Halbwertszeit der Acc-LipTL untersucht. Zu den direkt einstellbaren Größen zählen die Konzentrationen der Edukte sowie die Durchflussrate der Eduktlösung. Bei der Bestimmung einer geeigneten Durchflussrate wurde besonderer Wert auf einen sich nicht zu stark ändernden Umsatz gelegt, um die bereits im vorherigen Kapitel besprochenen Nachteile zu minimieren. Daher wurde zum Betrieb des CSTR eine differentielle Arbeitsweise angewandt. Ein differentielles Arbeiten bedeutet, dass für den Umsatz ein maximaler Wert von 5-10 % festgelegt wird. Dies ermöglicht einen minimalen Einfluss der Konzentrationsänderungen der Edukte und Produkte über der Zeit, weswegen die potentiellen Auswirkungen auf die Prozessstabilität vernachlässigbar werden. Durch die Edukt- und Produktkonzentrationen, welche folglich in kleinen Grenzen als konstant anzusehen sind, wurde angenommen, dass das System in der Lage ist auch Immobilisate mit unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten (z.B. infolge von Modifikationen) hinsichtlich ihrer Prozessstabilität vergleichen zu können.

Der im Betrieb des Reaktor zu erreichende Umsatz wird bei volumenbeständigen Reaktionen durch das Verhältnis von hydrodynamischer Verweilzeit zu der auf die Eingangsbedingungen bezogenen Zeitkonstanten der Reaktion bestimmt. Dieser Zusammenhang entspricht der ersten Damköhlerschen Zahl (Da_1), die für eine irreversible Reaktion n-ter Ordnung folgend definiert ist [147]:

$$Da_1 = k \cdot c_0^{n-1} \cdot \tau = \frac{X}{(1-X)^n} \quad (\text{Gleichung 3})$$

k = Geschwindigkeitskonstante [min^{-1}]

c_0 = Anfangskonzentration

τ = Verweilzeit

X = Umsatz

Zur Ermittlung der einzustellenden Durchflussrate, muss zunächst die Verweilzeit bestimmt werden, bei der der Umsatz im Bereich einer differentiellen Arbeitsweise liegt. Der Zusammenhang zwischen Durchflussrate und Verweilzeit kann über das Reaktorvolumen laut Gleichung 4 hergestellt werden:

$$\dot{V} = \frac{V}{\tau} \quad (\text{Gleichung 4})$$

\dot{V} = Durchflussrate [mL/min]

V = Volumen des Reaktors [mL] = 6 mL

Die Verweilzeit entspricht der Zeit, welche sich ein definiertes Volumen (Reaktorvolumen) in einem kontinuierlich durchströmten Reaktor bzw. der gesamten Anlage befindet. Die Berechnung der Verweilzeit lässt sich unter der Annahme einer ablaufenden Reaktion erster Ordnung durchführen, indem der Quotient der Damköhlerzahl und der Geschwindigkeitskonstante der Umesterungsreaktion von Benzoin gebildet wird (Gleichung 5).

$$\tau = \frac{Da}{k} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstante k, kann in volumenbeständigen und irreversiblen Reaktion die gemessene Reaktionsgeschwindigkeit r des verwendeten Immobilisats der Stoffmengenänderungsgeschwindigkeit -R des Edukts gleichgesetzt werden, so dass mit -R=r folgender Zusammenhang gilt:

$$k = \frac{-R}{c} \quad (\text{Gleichung 6})$$

Aufgrund der Zugabe des Vinylbutyrats im Überschuss wurde eine Reaktion erster Ordnung angenommen. Unter Zuhilfenahme der Gleichungen 3-6 konnte nun bei einem maximalen Umsatz von $X = 0,1$, einem Reaktorvolumen von 6 mL, einer Benzoinstartkonzentration von 94 mM sowie einer Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der eingesetzten 100 mg Acc-LipTL von 2,17 mmol/L*min eine Durchflussrate von 1,25 mL/min und damit eine Verweilzeit von

4,8 Minuten bestimmt werden. Als Daumenregel für die Einstellung eines Gleichgewichts in einem kontinuierlichen System wird das Fünffache der Verweilzeit angenommen [147]. Daher gilt: Je kleiner die Verweilzeit, desto schneller stellt sich das System auf äußere Veränderungen, z.B. der Inaktivierung der Immobilisate, ein. Abbildung 29 zeigt beispielhaft den Verlauf des Umsatzes eines kontinuierlichen Prozesses mit Acc-LipTL.

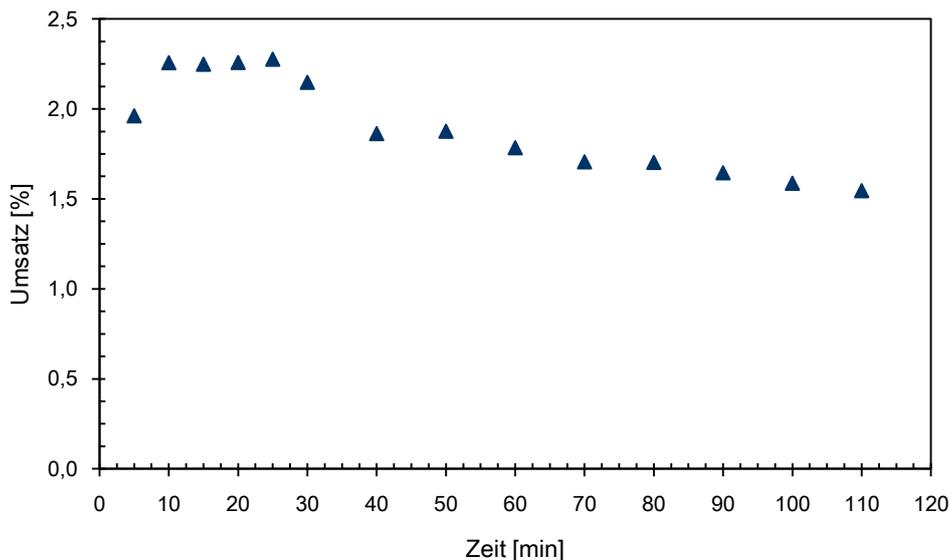


Abbildung 29: Umsatzveränderung der KR im kontinuierlichen Reaktor (Durchflussrate = 1,25 mL/min; 94 mM Benzoin)

Bereits nach nur 10 - 15 min, also sogar weniger als dem Fünffachen der Verweilzeit, stellte sich ein stabiler Umsatz, also ein steady-state-Zustand ein. Da der Umsatz nur bei 2,3 % und damit unter den erwarteten 10 % lag, ist davon auszugehen, dass es sich bei der Reaktion nicht um eine Reaktion erster Ordnung handelt. Möglicherweise ist der Überschuss des Acyldonors zu gering, was diese Abweichung erklären könnte. Da die Annahme der Reaktionsordnung vornehmlich dazu diente, einen Eindruck über die Größenordnung der Verweilzeit und der Durchflussrate zu erhalten, wurde trotzdem daran festgehalten. Die Grundlage zur Charakterisierung der Acc-LipTL im kontinuierlichen System war mit dem Erreichen eines Gleichgewichtszustandes und eines niedrigen Umsatzes erreicht. Nach ca. 25 Minuten konnte deutlich die Inaktivierung der Immobilisate durch eine Abnahme des Umsatzes beobachtet werden. Da hier die Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeit

nicht möglich ist, kann aus der Veränderung des Umsatzes über die Zeit die Inaktivierungskonstante und damit wiederum die Halbwertszeit des betrachteten Immobilisates errechnet werden [2]. Die mehrfach durchgeführten Messungen in THF ergaben eine Halbwertszeit der Acc-LipTL von 2,2 h.

Da eine Durchflussrate von 1,25 mL/min einen Umsatz weit unter 10 % ergab und dabei der Verbrauch an Lösungsmittel sowie der eingesetzten Edukte sehr hoch war, wurde der Einfluss einer geringeren Durchflussrate auf die Halbwertszeit der Acc-LipTL untersucht. Im Folgenden wurden daher 1 mL/min und 0,5 mL/min getestet. In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass eine Verringerung der Durchflussrate keinen signifikanten Einfluss auf die Halbwertszeit hat. Da der Umsatz auch bei 0,5 mL/min unter 10 % lag, wurde die Durchflussrate dementsprechend in den folgenden Experimenten verringert.

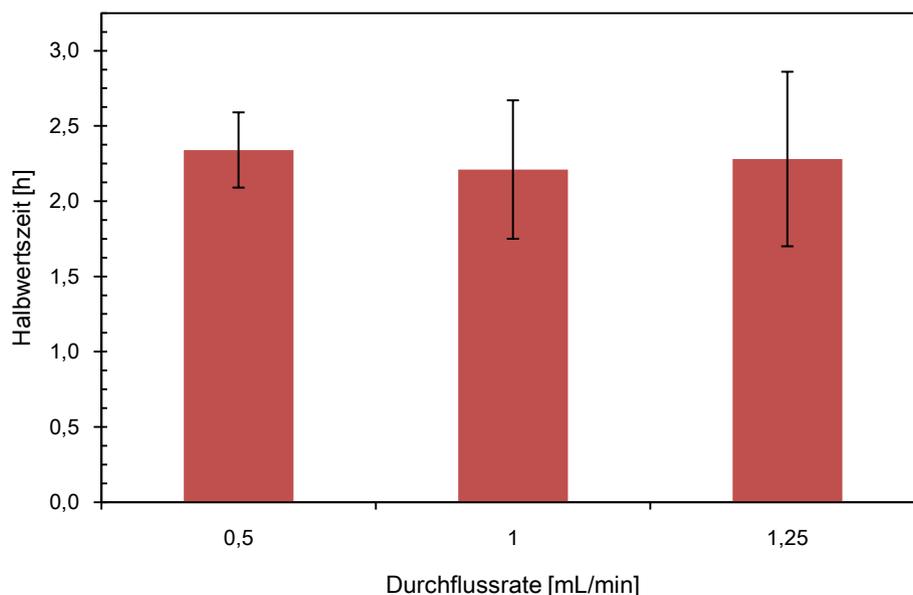


Abbildung 30: Prozessstabilität von Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit der Durchflussrate

Um den Einfluss der Benzoinstartkonzentration auf die Stabilität der Acc-LipTL auch in diesem System zu untersuchen, wurde die Konzentration auf 23,5 bzw. 47 mM verringert und die Halbwertszeiten bestimmt. Die Hinweise darauf, dass Benzoin generell stabilisierend wirkt (siehe Kapitel 3.3.2.1), werden anhand der erhaltenen Daten gestützt. Die Halbwertszeit sinkt bei 23,5 mM Benzoin in THF auf 0,9 h und bei 47 mM auf 2 h ab

(Abbildung 31). Eine mögliche Begründung dafür ist, wie bereits zuvor diskutiert wurde, eine Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur durch das Binden des Substrates im aktiven Zentrum, was bei höherer Konzentration wahrscheinlicher ist. Auch die Bildung einer stabilisierenden Mikroumgebung durch direkte Wechselwirkungen der funktionellen Gruppen des Benzoin mit Aminosäureseitenketten wäre denkbar.

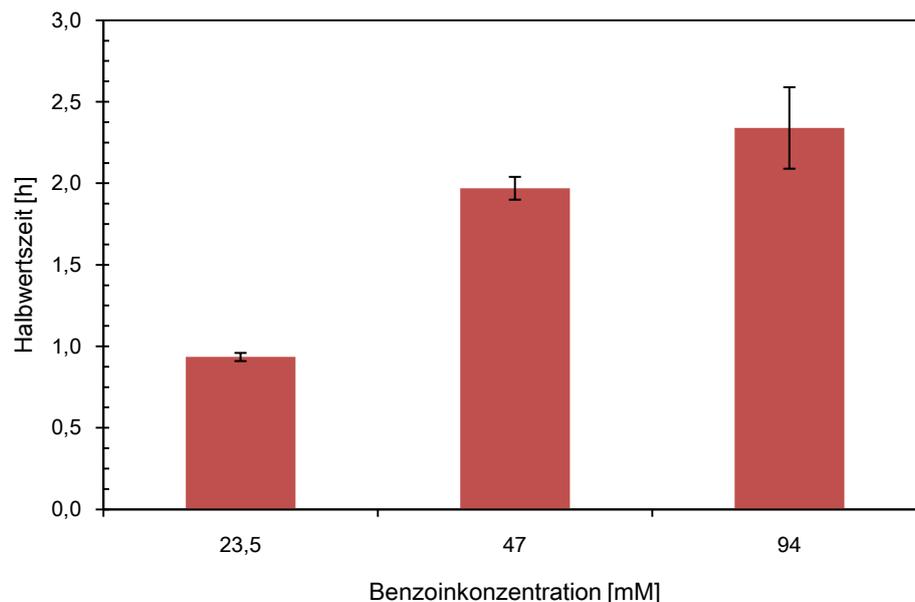


Abbildung 31: Prozessstabilität der Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit der Benzoinkonzentration

Die zuvor ermittelten Halbwertszeiten der wiederholten Batch-Versuche von 5-6 h stehen im deutlichen Widerspruch zu einer vierfachen Wiederverwendung der Lipase TL in jeweils 20 h Zyklen in der Studie von Hoyos *et al.* [89]. Da bei der Herstellung der statischen Suspensionen das Lipase TL-Pulver unverändert eingesetzt und dementsprechend auch vollständig immobilisiert wurde, wäre denkbar, dass die scheinbar hohe Stabilität der Immobilisate aufgrund der Zuschlagstoffe des Pulvers auftrat. Laut Hersteller bestanden diese vor allem aus Kohlenhydraten, Asche und Lipiden. Vor der Immobilisierung der Lipase TL auf Accurel wurden unlösliche Bestandteile aus der Enzymlösung abzentrifugiert, wobei es sich um einen Teil der Zuschlagstoffe gehandelt haben könnte. Zudem wird angenommen, dass es zu einer selektiven Bindung und somit zu einer Aufreinigung der Lipase TL auf Accurel kommt. Daher wäre denkbar, dass die fehlenden Zuschlagstoffe ihre

potenziell stabilisierende Wirkung nicht entfalten können und daher die Prozessstabilität der Acc-LipTL geringer ist als die des nativen Lipase TL-Pulvers oder der statischen Suspensionen. Um einen gültigen Vergleich der unterschiedlichen Immobilisate zu ermöglichen, bei dem keine Unterschiede in der Handhabung während der Wäschen das Ergebnis möglicherweise verfälschen, wurden die statischen Suspensionen im kontinuierlichen Prozess untersucht. Es konnte dabei eine Halbwertszeit von $2,9 \pm 0,3$ h ermittelt werden, die, hinsichtlich der langen publizierten Laufzeiten, nur unwesentlich höher ist als die der Acc-LipTL. Auf Basis dieser Ergebnisse konnte zwar immer noch keine ausreichende Erklärung für die langen Laufzeiten der Immobilisate von Hoyos *et al.* [89] gefunden werden, jedoch kann eine signifikant verringerte Stabilität infolge der Immobilisierung auf Accurel sicher ausgeschlossen werden.

Um abschließend einen Eindruck von der mechanischen Beanspruchung der Immobilisate während des kontinuierlichen Prozesses zu bekommen, wurden REM-Aufnahmen der eingesetzten Partikel angefertigt. In Abbildung 32 werden Nahaufnahmen der äußeren Porenstrukturen der Acc-LipTL vor (A) und nach (B) einem Einsatz im kontinuierlichen Prozess verglichen.

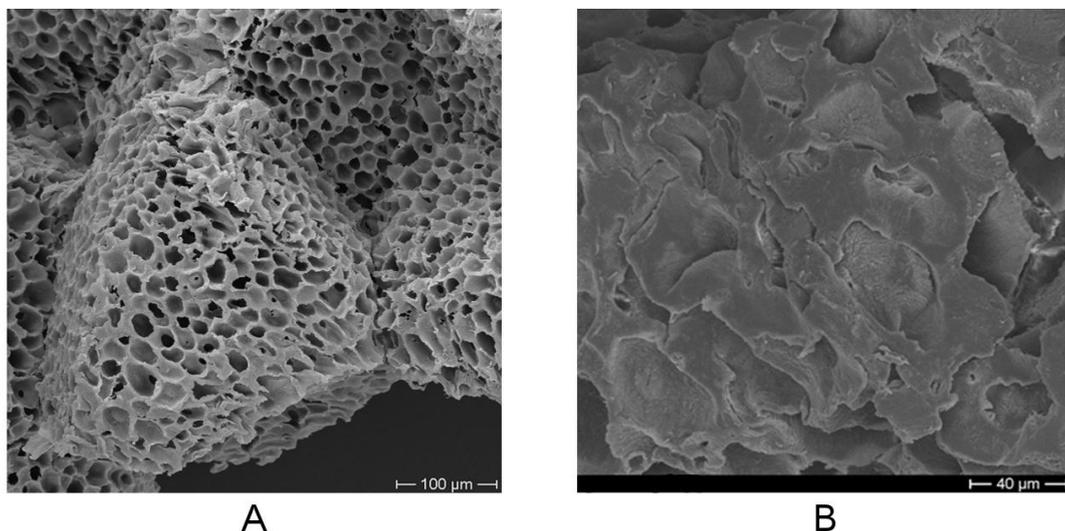


Abbildung 32: REM-Aufnahmen der Acc-LipTL vor (A) und nach (B) einem kontinuierlichen Prozess

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Träger nach der Verwendung im kontinuierlichen System deutliche Abriebspuren aufweisen. Hierbei ist denkbar, dass die gebundene Lipase TL

aufgrund der mechanischen Einwirkungen direkt Schaden nimmt oder eine Verringerung der Aktivität durch den Verlust „abgeriebener“ Lipase TL auftritt. In Kapitel 3.3.4 wurde die mechanische Stabilität der Acc-LipTL sowie der *silcoat*Acc-LipTL näher betrachtet.

3.3.3.3 Prozessstabilität im kontinuierlichem Prozess in verschiedenen Lösungsmitteln

Zur Ermittlung der kontinuierlichen Prozessstabilität wurden Lösungsmittel untersucht, die zum Teil sehr vielversprechende Lagerstabilitäten aufwiesen. Es wurden neben den bereits zuvor favorisierten Lösungsmitteln 2-MeTHF, Toluol und THF als Standard auch noch MIBK und 1,4-Dioxan untersucht. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Um eine Löslichkeit des Substrates in allen Lösungsmitteln zu gewährleisten, wurde die Benzoinkonzentration auf 47 mM reduziert. In Abbildung 33 sind die ermittelten Halbwertszeiten zusammengefasst und erweisen sich in zweierlei Hinsicht als sehr interessant.

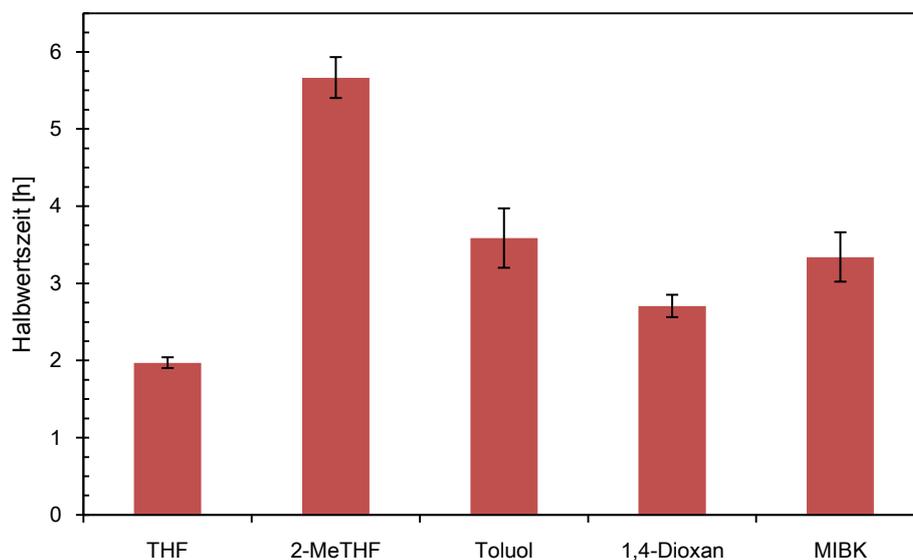


Abbildung 33: Prozessstabilität der Acc-LipTL im kontinuierlichen Reaktor in Abhängigkeit unterschiedlicher Lösungsmittel

Zunächst führt sich der Trend fort, dass die ermittelten Lagerstabilitätshalbwertszeiten um ein Vielfaches höher sind, als die Halbwertszeiten im kontinuierlichen Reaktor. Besonders deutlich wird das bei Verwendung von Toluol und MIBK. Wohingegen die Halbwertszeit bei

einer Lagerung in diesen Lösungsmitteln bei über 90 h lag, so sind es im kontinuierlichem Betrieb lediglich ca. 3 h.

Dies verdeutlicht auch den zweiten interessanten Aspekt dieser Ergebnisse, die Neubewertung der stabilisierenden Wirkung der Lösungsmittel. Die relative Erhöhung der Stabilität bei der alternativen Verwendung von 2-MeTHF und 1,4-Dioxan anstelle des THFs ist vergleichbar mit den Werten der Lagerstabilität. Dahingegen weisen Toluol und MIBK eine nur geringfügig verbesserte Prozessstabilität im Vergleich zum Standard auf. Ein inaktivierender Effekt des Toluol bzw. MIBK auf die Lipase TL, der nur während der stattfindenden Reaktion auftritt, ist nicht auszuschließen. Es handelt sich bei Lösungsmittel bedingten Inaktivierungen zumeist um eine Freilegung von beispielsweise hydrophoben Domänen der Enzyme infolge der Konformationsänderungen während der Reaktion. Ebenso hydrophobe Lösungsmittelmoleküle können während einer Reaktion an diese Bereiche binden und somit die Entfaltung des Enzyms fördern [5]. Die wesentlich höhere Lagerstabilität im Fall des Toluol und des MIBK könnte demnach mit der Unzugänglichkeit eben dieser hydrophoben Domänen des Enzyms bei einer Lagerung zu erklären sein.

Der Umstand, dass das Vorratsgefäß, welches die im jeweiligen Lösungsmittel gelösten Substrate enthielt, nicht vor der Umgebungsfeuchtigkeit geschützt wurde, lässt einen weiteren Erklärungsansatz zu. Wie bereits in vorherigen Kapiteln ausführlich diskutiert wurde, ist nur eine kleine Wassermenge notwendig, um die Wasseraktivität in unpolaren Lösungsmitteln zu erhöhen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Umgebungsluft, welche durch die Vorratsflaschenbelüftung in Kontakt mit dem Lösungsmittel kam, eine Veränderung der Wasseraktivität herbeigeführt hat. Dies würde erklären, warum die Relation der Stabilisierung in 2-MeTHF gegenüber THF bei der Lagerstabilität und der Prozessstabilität ähnlich ist und bei Toluol und MIBK signifikant niedriger. Durch die wesentlich höhere Aufnahmekapazität von 2-MeTHF für Wasser, hat eine geringe Wassermenge einen unwesentlichen Einfluss auf die Wasseraktivität. Anders verhält sich das bei hydrophoben Lösungsmitteln, die aufgrund der niedrigen Wasseraufnahmekapazität sensitiver auf kleinste Veränderungen des Wassergehaltes reagieren. Bezogen auf die Halbwertszeiten von Toluol und MIBK würde dies bedeuten, dass neben der Abnahme des Umsatzes bedingt durch eine Inaktivierung des Enzyms auch eine Verringerung der Aktivität

infolge der mit der Dauer der Reaktion steigenden Wasseraktivität einen signifikanten Einfluss auf den Umsatz gehabt haben könnte.

Abschließend ist 2-MeTHF auf Grundlage der verschiedenen Experimente zur Aktivität und Stabilität der Lipase TL als geeignetste Lösungsmittelalternative anzusehen.

3.3.4 Mechanische Stabilität

Eine unzureichende mechanische Stabilität von porösen Immobilisatpartikeln ist oftmals limitierend für einen großtechnischen Einsatz bei der Verwendung von Reaktoren mit Rührwerkselementen [127]. Die bei der Durchmischung viskoser Medien auftretenden Scherkräfte infolge hoher Leistungseinträge führen mitunter sehr schnell zu einem Verlust der strukturellen Integrität der Immobilisate. Aber auch bei einem Einsatz der Enzym-beladenen Trägermaterialien in organischen Lösungsmitteln, 2- oder Mehrphasensystemen stellt die mechanische Stabilität bei langer Prozesszeit ein wichtiges Kriterium für eine technische Umsetzung vieler Synthesen dar. Typischerweise führt eine Verringerung der durchschnittlichen Korngröße zu verstopften Filterelementen im Abtrennschritt der Biokatalysatoren. Des Weiteren ist ein Verlust zermahlener jedoch aktiver Immobilisate oder sogar die direkte Schädigung der Enzyme möglich. In einer vorangegangenen Studie konnte eine massive Erhöhung der mechanischen Stabilität durch die Verwendung von Silikon als kompositbildende Matrix nachgewiesen werden [25, 103, 127]. Bezugnehmend auf den Stabilitätstest von Wiemann *et al.* [25] wurden Acc-LipTL sowie *silcoat*Acc-LipTL mit einem Silikongehalt von 70 % in einer Schwingmühle mit Glasperlen mechanisch behandelt. Die Partikel wurden mittels REM-Aufnahmen qualitativ charakterisiert. Abbildung 34 zeigt REM-Aufnahmen der Acc-LipTL und *silcoat*Acc-LipTL im unbehandelten Zustand (vorher) und nach der mechanischen Behandlung (nachher). Aufgrund der Abbildung aller Partikel im gleichen Größenmaßstab, wird die Verkleinerung der Partikeldurchmesser im Fall der Acc-LipTL nach der mechanischen Belastung besonders deutlich. Die mit Silikon behandelten Partikel behalten ihre Größe und Integrität bei, was die bereits beschriebene stabilisierende Wirkung des Silikons auch bei einer Anwendung auf Accurel MP1001 bestätigt. Die Kombination aus der Fähigkeit die mechanischen Stabilität zu erhöhen und dem Fakt, dass die Acc-LipTL

keinerlei Aktivität durch eine Behandlung mit dem chemisch inerten Silikon verlieren (siehe Kapitel 3.2.6), macht einen Einsatz der *silcoat*Acc-LipTL in großtechnischen Synthesen besonders interessant.

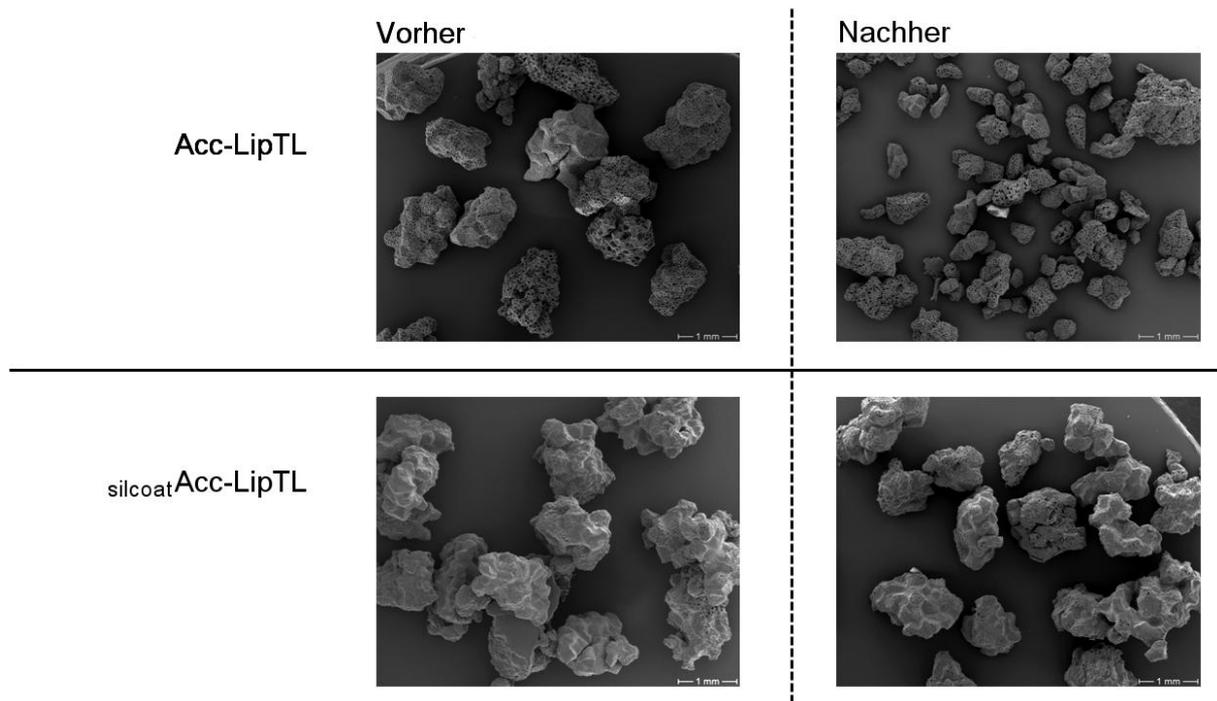


Abbildung 34: REM-Aufnahmen der Acc-LipTL und der *silcoat*Acc-LipTL mit 70 % Silikon vor und nach einer mechanischen Behandlung in der Kugelmühle

3.3.5 Zusammenfassung und Fazit der Charakterisierung

Die Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Wasseraktivität haben ergeben, dass je trockener das Reaktionssystem ist, desto höher ist die spezifische Trägeraktivität der Acc-LipTL. Des Weiteren ist die spezifische Aktivität stark vom Lösungsmittel abhängig, in welchem die KR durchgeführt wird. 2-MeTHF und Toluol sind alternative Lösungsmittel, die eine erhöhte Aktivität der Acc-LipTL bewirken. Eine steigende Temperatur bewirkt einen starken Aktivitätsanstieg, der im Fall des Toluols bis ca. 100 °C anhält. Im Fall des THF und des 2-MeTHF sind maximal 50 °C bzw. 60 °C möglich. Die Erhöhung der Temperatur hat gleichzeitig eine Verringerung der Stabilität zur Folge, was in einem abgeflachten Aktivitätsanstieg bei Steigerung der Temperatur und durch eine abnehmende Lagerstabilität nachgewiesen werden konnte. Die Anwesenheit einzelner Substrate und Produkte hat

keinen negativen Einfluss auf die Stabilität. Während der Bestimmung der Prozessstabilität konnte eine stabilisierende Wirkung bei höheren Benzoinkonzentrationen festgestellt werden. Die Acc-LipTL weisen Halbwertszeiten von 5-6 h im Batch-System und 2,2 h im kontinuierlichen Reaktor auf (THF). Des Weiteren wurde 2-MeTHF während der kontinuierlichen Messungen als das Lösungsmittel identifiziert, welches die höchste Stabilität im Prozess ermöglicht. Toluol und MIBK bewirken zwar die höchsten Lagerstabilitäten mit >90 h, jedoch ist Acc-LipTL in diesen Lösungsmitteln im kontinuierlichen Betrieb nur geringfügig stabiler als in THF. Die statischen Suspensionen nach Protokoll von Hoyos *et al.* [79] weisen mit 2,9 h eine annähernd gleiche Stabilität wie die Acc-LipTL im kontinuierlichen Prozess auf. Die mechanische Stabilität der Acc-LipTL kann nach einer Behandlung mit Silikon drastisch erhöht werden.

Zunächst kann festgestellt werden, dass mit Hilfe der Lagerstabilität sehr gut die isolierten Einflüsse der Temperatur und der Substrate sichtbar gemacht werden können. Dennoch lassen nur Messungen der Prozessstabilität Rückschlüsse auf ein Verhalten der Immobilisate unter realen Bedingungen zu. Voraussetzung dafür ist jedoch, dass das Messsystem sehr genau definiert und charakterisiert ist, um äußere Einflüsse auf die ermittelten Halbwertszeiten zu minimieren. Nur so können verlässliche Aussagen über eine Katalysatorstandzeit unter Prozessbedingungen getroffen und zur Auslegung von technischen Synthesen genutzt werden.

Aus der Gesamtheit der Charakterisierungsergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen formulieren:

- » Eine erhöhte Temperatur und der Einfluss des THF können als die Parameter identifiziert werden, die eine starke Inaktivierung der Acc-LipTL verursachen. Insbesondere der durch das Lösungsmittel forcierte Verlust des Oberflächenwassers wird als der gravierendste Inaktivierungsgrund vermutet.
- » Der Wechsel des Lösungsmittels kann die Thermostabilität erhöhen (Toluol) bzw. eine höhere Prozessstabilität ermöglichen (2-MeTHF)

- » Hohe Substratkonzentrationen wurden zwar als stabilisierender Parameter gefunden, aber hier nicht weiter betrachtet. In dieser Arbeit werden alle DKR-Untersuchungen nur als Batch-Versuche durchgeführt. Das bedeutet in erster Linie, dass sich dabei die Substratkonzentration über den gesamten Prozess zwangsläufig verringert. Dieser Zusammenhang ist jedoch für spätere Umsetzungen der DKR im kontinuierlichen Betrieb interessant und sollten dort in die Auslegung mit einfließen.
- » Die Möglichkeit der Temperaturerhöhung auf 50-60 °C ist sehr aussichtsreich für eine spätere Kombination der Acc-LipTL mit gängigen Racemisierungskatalysatoren, da diese oftmals nur bei erhöhten Reaktionstemperaturen arbeiten.
- » Das Favorisieren trockener Reaktionsbedingungen sollte für alle bekannten Racemisierungskatalysatoren von Vorteil sein, was positiv im Hinblick auf eine „One-pot“-Lösung der DKR zu bewerten ist.
- » Der Einsatz der Acc-LipTL in wiederholten Batch-Versuchen brachte eine höhere Halbwertszeit als in einem kontinuierlichen Reaktor hervor. Da das kontinuierliche Messsystem zunächst als *proof of principle* etabliert wurde, ist die Bewertung der absoluten Halbwertszeiten jedoch vermutlich nicht ausreichend belastbar.
- » Um eine ausreichende Stabilität der Acc-LipTL für einen technischen Einsatz sicherzustellen, müssen neben dem Wechsel des Lösungsmittels weitere Methoden zur Stabilisierung angewandt werden.

Im weiteren Verlauf wurden das THF-Lagerstabilitätssystem und die Messung der Prozessstabilität im kontinuierlichen Reaktor in THF als Standardsysteme angewandt, um die modifizierten Acc-LipTL zu bewerten. Dies basiert darauf, dass der Einfluss des Lösungsmittels als einer der stärksten inaktivierenden Parameter angesehen wird. THF soll somit beispielhaft für die Gruppe der polaren und wassermischbaren Lösungsmittel stehen, die eine Fähigkeit zur Dehydratisierung der Enzymoberfläche haben.

3.4 Stabilisierung der Acc-LipTL durch physikalische und chemische Modifikation

Durch die große Vielfalt an potentiell einsetzbaren Reagenzien, sind einer gezielten chemischen Modifikation einzelner Aminosäureseitenketten kaum Grenzen gesetzt, wie bereits in Kapitel 1.3 umfassend vorgestellt wurde [30, 46, 47, 148]. Um zu evaluieren, ob die Aktivitäts- bzw. Stabilitätseigenschaften der Lipase TL durch den Einsatz physikalischer und chemischer Modifikationsmethoden verändert werden können, wurden im Folgenden Protokolle einer Auswahl vielversprechender Modifikationen auf die Acc-LipTL angewendet. In den Versuchen wurde die immobilisierte Form eingesetzt, weil die Lipase auf den Trägern in der bereits optimalen Konformation gebunden ist und diese stabilisiert werden sollte. Zur nachfolgenden Charakterisierung wurden die spezifischen Aktivitäten der behandelten Acc-LipTL sowie die Lager- und Prozessstabilitäten in THF und bei Raumtemperatur ermittelt.

Zu den physikalischen Methoden zählt der Einsatz von Polyethylenimin (PEI) [93]. Dieses Polymer bildet nicht kovalente Interaktionen mit der Enzymoberfläche aus und wurde bisher als sehr geeignet für die Erhöhung der Stabilität beschrieben. Zur chemischen Modifikation von freien Aminogruppen wurde sowohl eine Succinylierung mit Bernsteinsäureanhydrid [94] als auch eine Acylierung mit aktivierten Methoxypolyethylenglykolketten (mPEG) [95] durchgeführt. Im Fall der Acylierung wurden sowohl mPEG's mit einem Molekulargewicht von 2166 g/mol (mPEG₂₀₀₀) bzw. 5166 g/mol (mPEG₅₀₀₀) eingesetzt. Eine Anbindung von Substituenten an Carboxygruppen wurde durch eine Amidierung mit zwei primären Aminen: Hydroxyethylamin (HEA) [96] und Ethylendiamin (AEA) [96] realisiert. Ebenfalls zur Modifikation primärer Aminogruppen dienten aktivierte, also mit Natriumperiodat geöffnete Dextrane [97, 149]. Der Unterschied zur Succinylierung und zur Verwendung des mPEG lag dabei in der wesentlich größeren Kettenlänge der Dextranpolymere und in der Möglichkeit von intermolekularen Bindungen, durch die mehrfache Öffnung der Polymere. Es wurden Moleküle verschiedener Molmassen im Bereich von 10 - 100 kDa verwendet und dabei der Grad der Polymeröffnung variiert.

3.4.1 Aktivität und Lagerstabilität nach Modifikation von Acc-LipTL

Spezifische Aktivität

Die spezifische Aktivität der modifizierten Immobilisate ist mit Ausnahme der Verwendung des mPEG₂₀₀₀ in jedem Fall niedriger als die Ausgangsaktivität der unbehandelten Acc-LipTL (Abbildung 35 und Abbildung 36). Insbesondere nach Modifikation der Carboxygruppen mit HEA und AEA sowie nach einer Anbindung jeglicher Dextrane sind Aktivitätseinbußen von ca. 25 % (HEA und AEA) und maximal 75 % im Fall des Dextrans D10-10 festzustellen. Dextranmoleküle mit größerer Kettenlänge (D40 und D100) wiesen generell höhere Restaktivitäten von etwa 60 - 70 % auf. Bei D100 konnte mit rund 82 % die höchste Restaktivität ermittelt werden, sofern die Polymerketten mit 10 Äquivalenten des Natriumperiodat geöffnet wurden. Nach einer Behandlung der Acc-LipTL mit mPEG₂₀₀₀, mPEG₅₀₀₀, BSSA und PEI sind nur geringfügige Veränderungen (± 10 -12 %) der Aktivität nachweisbar.

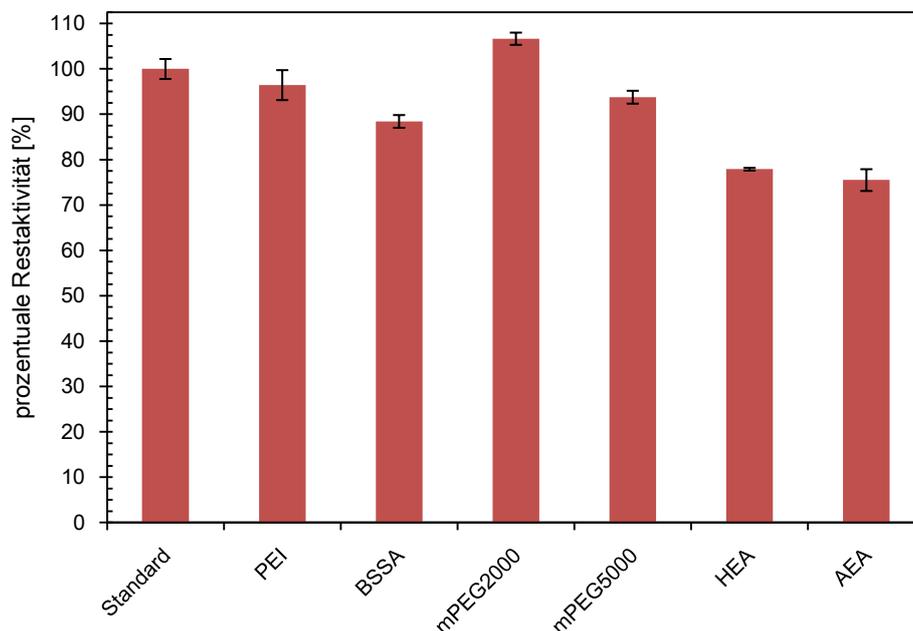


Abbildung 35: Prozentuale Restaktivitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextran-Modifikation) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

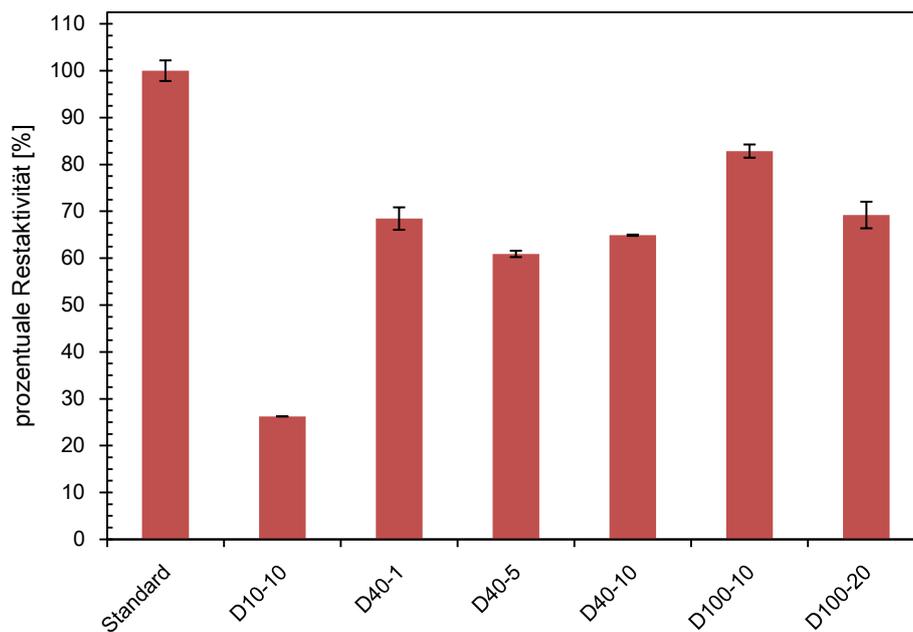


Abbildung 36: Prozentuale Restaktivitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

Hauptgrund für die Aktivitätsveränderungen infolge der Modifikationen könnte die Reaktion der Reagenzien mit den Aminosäureseitenketten sein, die eine katalytische und weniger eine strukturelle Funktion im Enzym haben. Leicht reaktive oder geladene Seitenketten sind unter anderem in Enzymen dafür verantwortlich Substrate in das aktive Zentrum zu leiten, einen Übergangszustand im katalytischen Prozess zu stabilisieren oder auch durch ionische Wechselwirkungen bestimmte Enzymkonformationen zu ermöglichen. Sind diese Seitenketten in ihrer Ladung verändert bzw. sind Substituenten daran kovalent gebunden, so ist abhängig von der Struktur des Enzyms, dem verwendeten Substrat oder von der eigentlichen Reaktion, ob eine der aufgezählten Funktionen besser oder schlechter abläuft. Die vergleichsweise großen Aktivitätsverluste der mit HEA und AEA modifizierten Acc-LipTL lassen sich somit möglicherweise auf eine Modifikation der in der katalytischen Triade befindlichen Asparaginsäure zurückführen.

Sowohl bei chemischen Modifikationsreagenzien als auch bei physikalischen Modifikationen ist aber neben der direkten Interaktion mit Aminosäureseitenketten ebenso die Größe und jeweilige Struktur der Moleküle entscheidend für den Einfluss auf die spezifische Aktivität.

Cabrera *et al.* [96] fanden bei der Anwendung von PEI auf Novozym 435 einen Zusammenhang zwischen der Größe des verwendeten Polymers und der Restaktivität der Immobilisate. Es konnte eine positive Auswirkung der Verwendung größerer Polymere, wie das auch hier eingesetzte PEI mit $M_w=750$ kDa, auf die Aktivität festgestellt werden. Begründet wurde dies mit der Fähigkeit großer Polymere die Enzymoberfläche weitläufig abzudecken und dabei nicht in kleineren Taschen oder Poren sterische Hinderungen der reaktionsbedingten Konformationsänderungen des Enzyms zu verursachen. Dieser Effekt kann ebenfalls bei einem Einsatz der Dextranaldehyde beobachtet werden. Hier wurde die höchste Restaktivität bei der Verwendung der Polymere mit einem Molekulargewicht von 100 kDa beobachtet (Abbildung 36).

Lagerstabilität

Die Lagerstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL sind mit Ausnahme des PEI und des Dextranaldehyds D100-20 deutlich niedriger als die des unbehandelten Acc-LipTL (Abbildung 37 und Abbildung 38).

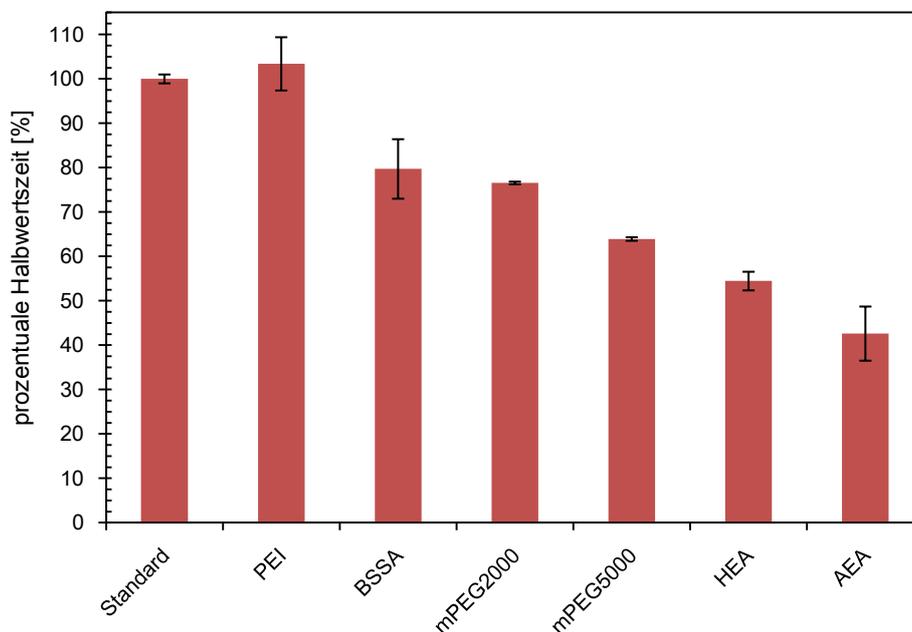


Abbildung 37: Prozentuale Lagerstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextrane) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

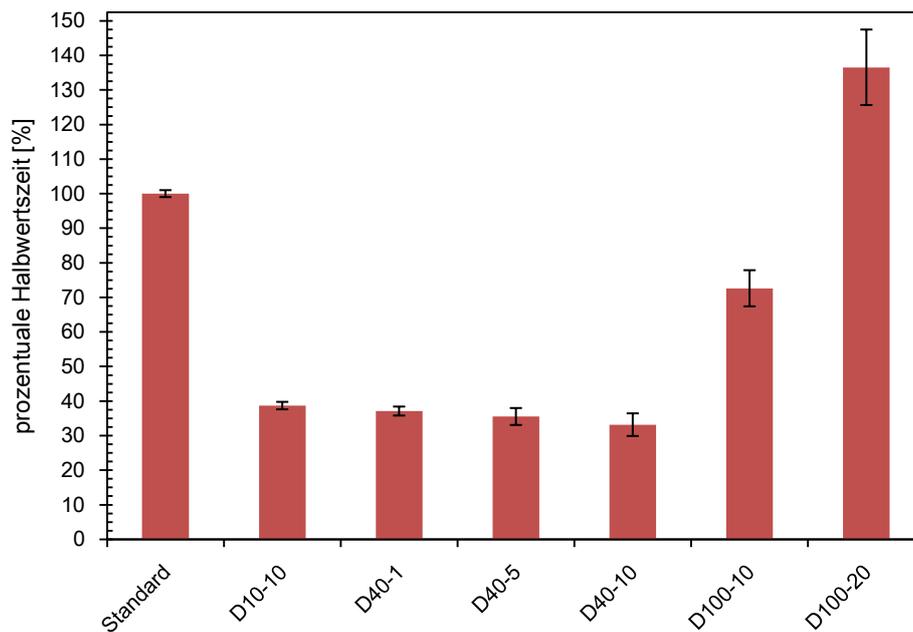


Abbildung 38: Prozentuale Lagerstabilitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

Die mit PEI behandelten Immobilisate wiesen wie bei der Aktivität eine nur sehr geringe Änderung im Vergleich zur nativen Variante auf, wohingegen das mit D100-20 modifizierte Präparat sogar eine Steigerung der Lagerstabilität um ca. 36 % zeigte. Die Verwendung des Polyethylenimins führte somit weder zu einer signifikanten Veränderung der Aktivität noch der Stabilität, weswegen sich hier zwangsläufig die Frage stellt, ob tatsächlich eine Modifikation der Acc-LipTL stattgefunden hat.

Die zuvor diskutierte Abdeckung der Enzymoberfläche mit langen Polymerketten kann mit einer veränderten Mikroumgebung einhergehen, die beispielsweise das molekular gebundene Wasser vor dem sogenannten „stripping“ durch polare Lösungsmittel schützt. Dies sollte insbesondere bei mPEG der Fall sein, was im Rahmen einer Studie von Rodríguez-Martínez *et al.* nachgewiesen wurde [48]. Trotz der Annahme, dass THF unter anderem aufgrund des Wasserentzuges inaktivierend wirkt, konnte ein derartiger Zusammenhang hier jedoch für mPEG nicht festgestellt werden.

Im Fall der Dextranaldehyde ist infolge der hohen Beladungsdichte der Acc-LipTL nicht auszuschließen, dass es zur Bildung von intermolekularen Bindungen zwischen benachbarten

Enzymen kommt [150]. Dies und die ebenso bestehende Möglichkeit von intramolekularen Bindungen mehrerer Lysinreste auf der Enzymoberfläche können dabei die Flexibilität und somit die Aktivität beeinflussen, aber vor allem die Stabilität erhöhen [150]. Diese Vermutung wird durch die Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur der Lipase TL durch Maraite *et al.* gestützt, die mehrere Lysine in der Sequenz der Lipase TL nachweisen konnten [117]. Der Grad der Aktivierung, also die Menge der reaktiven Aldehydgruppen könnte in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielen. Die Bildung von inter- bzw. intramolekularen Enzym-Dextran-Enzymbindungen oder Enzym-Dextranbindungen sind bei einer großen Anzahl an Aldehydgruppen wahrscheinlicher. Je länger dabei das Polymermolekül ist, desto eher können auch weiter entfernte Aminogruppen erreicht werden. Dies würde die Erhöhung der Lagerstabilität bei Verwendung des D100-20 erklären.

BSSA und mPEG hingegen sind monovalente Reagenzien und können zwar die Mikroumgebung der Enzyme beeinflussen, jedoch keine Mehrfachbindungen zwischen unterschiedlichen Aminofunktionen herstellen.

Im Folgenden wurden die Prozessstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL im kontinuierlichen System in THF bestimmt, um festzustellen, ob sich die Hinweise der Lagerstabilität in einer Stabilisierung der Acc-LipTL im Prozess bestätigen lassen.

3.4.2 Prozessstabilität der modifizierten Immobilisate im kontinuierlichen Prozess

Es ist festzustellen, dass alle durchgeführten Modifikationen eine Stabilisierung der Acc-LipTL im kontinuierlichen Prozess bewirken (Abbildung 39 und Abbildung 40). Die erhöhte Prozessstabilität der PEI-Acc-LipTL (203 % bezogen auf die nativen Acc-LipTL) zeigt eindeutig, dass es trotz unveränderter Lagerstabilität zu einer signifikanten Einflussnahme des Polymers kommt. Dies ist insbesondere aufgrund der unveränderten spezifischen Aktivität zu bemerken, da dadurch eine effiziente Nachbehandlung der Immobilisate möglich wird. Gleiches gilt für die mit mPEG₅₀₀₀ modifizierten Präparate, die trotz verringerter Lagerstabilität aufgrund der hohen Restaktivität und einer im Vergleich sehr hohen Prozessstabilität (243 %) vielversprechende Ergebnisse liefern.

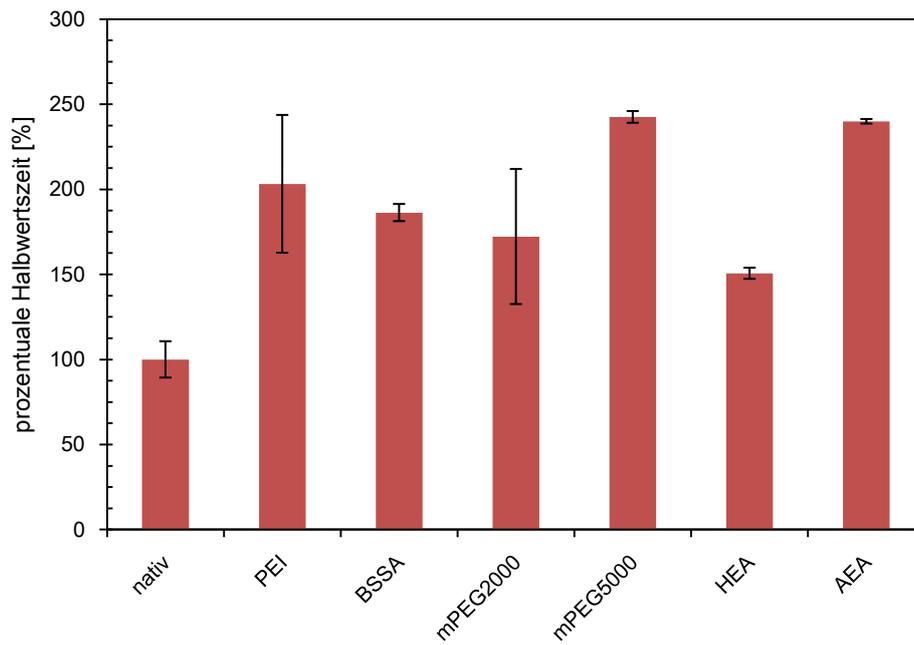


Abbildung 39: Prozentuale Prozessstabilitäten der modifizierten Acc-LipTL (ohne Dextrane) in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

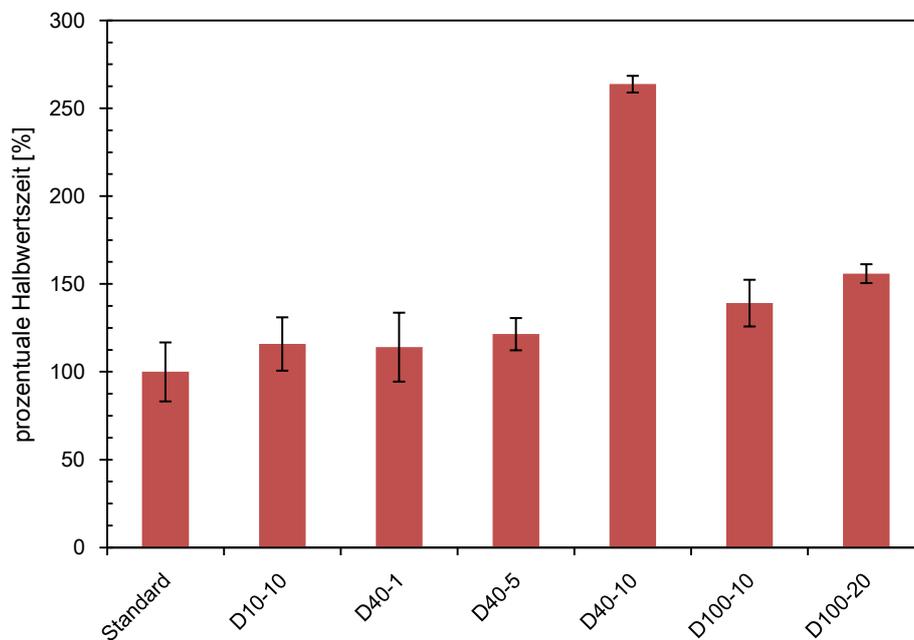


Abbildung 40: Prozentuale Prozessstabilitäten der Dextran-modifizierten Acc-LipTL in Bezug auf natives Acc-LipTL in THF bei RT

Innerhalb der untersuchten Dextrane konnte eine nur sehr schwache Tendenz dahingehend festgestellt werden, dass eine Erhöhung der Stabilität mit Verlängerung der Polymerketten einhergeht. Das D40-10 sticht mit einer relativen Halbwertszeit von 263 % deutlich gegenüber den weiteren getesteten Dextranaldehyden heraus, welche Halbwertszeiten von 115 % bei D10-1 bis 155 % bei D100-20 aufwiesen. Somit konnte die stark erhöhte Lagerstabilität des D100-20 unter Prozessbedingungen nicht bestätigt werden. Es ist an dieser Stelle nicht möglich die Ursache für die hohe Stabilität des D40-10 aufzuklären, da sich kein Zusammenhang zwischen der Kettenlänge (D10 und D100 zeigen niedrigere Werte) oder etwa des Öffnungsgrades der Dextrane erkennen lässt.

Unabhängig von den absoluten Ergebnissen ist festzustellen, dass die Halbwertszeiten der Prozessstabilität einen erneut grundlegend anderen Eindruck über die Stabilität der Acc-LipTL vermitteln, als die zuvor bestimmten Lagerstabilitäten. Wohingegen bei vorherigen Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.3.2.2 sowie 3.3.3.3) unter anderem eine „Verfälschung“ des Zusammenhangs zwischen Lagerstabilität und Prozessstabilität aufgrund der vermeintlich unterschiedlichen Wasseraktivitäten in den Lösungsmitteln vermutet wurde, ist hier nicht direkt ersichtlich, was die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sind.

Nichtsdestotrotz sind die zum Teil im vorherigen Kapitel diskutierten Gründe für eine Stabilisierung der Acc-LipTL gegenüber den destabilisierenden Einflüssen des Lösungsmittels und der Gesamtreaktion auch hier anzuführen. So kann davon ausgegangen werden, dass die Bildung einer schützenden Mikroumgebung durch gebundene Polymere wie mPEG oder auch PEI eine direkte Interaktion des polaren und wassermischbaren THFs mit der Hydrathülle des Enzyms erschweren. Auch eine Verringerung der Flexibilität und die damit einhergehende Stabilisierung einer rigideren Konformation hemmt eine Entfaltung des Enzyms, wodurch die Halbwertszeit deutlich verlängert wird.

3.4.3 Bewertung der Stabilisierung

Aufgrund der Tatsache, dass das kontinuierliche Reaktionssystem die tatsächlichen Wechselwirkungen zwischen den Substraten bzw. Produkten und den modifizierten Acc-LipTL realer abbildet, wurden nur Halbwertszeiten aus diesen Versuchen beurteilt. Eine Entscheidung

zugunsten oder gegen einen späteren Einsatz modifizierter Acc-LipTL in der DKR von Benzoin hätte auf der Grundlage der Lagerstabilitäten bedeutet, dass nur das D100-20 eingesetzt worden wäre. Die verbesserten Stabilitäten der anderen Immobilisate während eines tatsächlichen Prozesses hätten somit nicht nachgewiesen werden können. Auf der Grundlage dieser Schlussfolgerung ist es dringend notwendig an dieser Stelle anzumerken, dass die überwiegende Mehrzahl der experimentellen Daten der Publikationen, welche sich mit der Stabilisierung von Enzymen durch chemische Modifikationen befassen, auf der Bestimmung von Lagerstabilitäten basieren [94, 95, 97, 151]. Es sind somit begründete Zweifel an der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf reale Prozesse festzustellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die erfolgversprechendsten Modifikationen ausgewählt und im weiteren Verlauf in der DKR eingesetzt. Die Kriterien für die Auswahl waren zum ersten ein minimaler Abfall der spezifischen Aktivität nach der Modifikation, der nicht mehr als 10 % betragen sollte. Zum zweiten sollte die Prozessstabilität deutlich über der von nativen Acc-LipTL liegen. Folgend wurden die Immobilisate nach einer Modifikation mit PEI, mPEG₅₀₀₀ und D40-10 ausgewählt. Das mit Dextran modifizierte Immobilisat wurde entgegen des ersten Kriteriums ausgewählt, weil es die größte Prozessstabilität aller Modifikationen aufwies und somit trotz des Verlustes an spezifischer Aktivität getestet werden sollte.

Herauszuheben ist vor allem die Methode der PEI-Modifikation, da es sich hierbei um ein Verfahren mit sehr simpler Durchführung handelt. Damit birgt dies das größte Potenzial technische Anwendung zu finden. Es sind keine vorhergehenden Syntheseschritte nötig, um beispielsweise eine Aktivierung der Polymere zu erreichen. Dies ist wiederum bei PEG und Dextran notwendig, was die Handhabung etwas erschwert.

Die modifizierten Acc-LipTL wurden im weiteren Verlauf in einer DKR mit erhöhter Temperatur eingesetzt, was eine gesonderte Betrachtung der Temperatur hier ersetzen sollte.

3.5 Racemisierung

Im Jahr 2006 wurde von Hoyos *et al.* [70] eine *in situ* Racemisierung von Benzoin zur Durchführung einer DKR beschrieben. In jener Arbeit wurde der von Larsson *et al.* [78] erstmals für die chemo-enzymatische Kombination eingesetzte Shvo-Katalysator verwendet. Dieser auf Ruthenium basierende Homogenkatalysator wird durch erhöhte Temperaturen aktiviert, wobei das Dimer in seine oxidierende und reduzierende Untereinheiten zerfällt [152] (Abbildung 41).

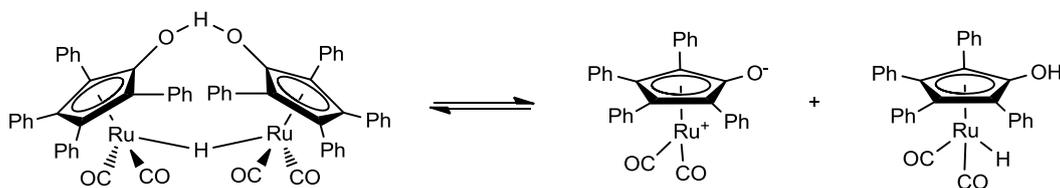


Abbildung 41: Aktivierungsmechanismus des Shvo-Katalysators

Obwohl der Vorteil gegenüber einigen anderen auf Ruthenium basierenden Katalysatoren darin besteht, dass die Aktivierung durch Hitze und nicht etwa durch starke Basen wie bspw. Kalium-*tert*-butanolat möglich ist [153], weist Shvo's Katalysator dennoch Nachteile im experimentellen Umgang auf. Es ist bekannt, dass Spuren von Sauerstoff den Abbau des Rutheniumkatalysators in DKR Reaktionen hervorrufen kann [90], was den Einsatz einer Schutzgasatmosphäre zwingend notwendig macht. Die häufig eingesetzten Vinylester, die die Möglichkeit zur irreversiblen Reaktionsführung bei Umesterungen bieten, können bei einer gleichzeitigen Verwendung des Shvo-Katalysators nicht benutzt werden. Das nach der Spaltung durch Keto-Enol-Tautomerie aus dem Enol entstehende Acetaldehyd fungiert selbst als Substrat für den Racemisierungskatalysator [154] und würde somit die Reaktionsgeschwindigkeit des Katalysators für die eigentliche Reaktion senken. Der jedoch, zumindest aus verfahrenstechnischer Sicht gesehen, größte Nachteil ist der homogene Charakter des Shvo-Katalysators. Die daraus folgenden Schwierigkeiten betreffen vor allem die potentielle Verunreinigung des Produktes, welche zumindest aufwändigere Reinigungsschritte nach sich zieht und die nicht gegebene Wiederverwendbarkeit, welche vor allem die ökonomische Auslegung der Prozesse betrifft.

Ziel dieser Arbeit war somit die Entwicklung einer alternativen Racemisierungsmethode für Benzoin. Diese sollte insbesondere experimentell einfacher zu handhaben sein, um eine spätere industrielle Umsetzung zu erleichtern. Des Weiteren sollte versucht werden, durch eine hohe Racemisierungsgeschwindigkeit die Gesamtreaktionsdauer der DKR zu verkürzen, um einer Deaktivierung der Acc-LipTL entgegen zu wirken. Generell wurde dabei ein heterogener Charakter des Katalysators zugrunde gelegt, um eine Wiederverwendung desselben zu ermöglichen.

3.5.1 Katalysatorscreening zur Racemisierung von (R)-Benzoin

Die von Hoyos *et al.* [70] publizierte Studie enthielt keine Daten betreffend der Racemisierungskinetik des Shvo-Katalysators mit Benzoin als Substrat. Um dennoch einen Referenzwert für die Optimierung der Racemisierung von (R)-Benzoin zu erhalten, wurden Shvo-Katalysatoren zweier Bezugsquellen (Sigma-Aldrich und STREM-Chemicals) verwendet. (R)-Benzoin wurde mittels einer KR von racemischen Benzoin mit Acc-LipTL und einer nachfolgenden chromatographischen Trennung des (S)-Benzoinbutyrats und des verbliebenen (R)-Benzoins selbst dargestellt. Alle Versuche wurden an einer Schlenk-Anlage unter Luftausschluss und der Verwendung von Argon oder Stickstoff als Inertgas durchgeführt. Mit Annahme einer sachgerechten Durchführung der Experimente war es jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, reproduzierbare Ergebnisse für die Racemisierung von (R)-Benzoin mit einem Shvo-Katalysator zu erhalten. Die Katalysatoren beider Bezugsquellen zeigten nicht annähernd die Aktivität, die nötig ist, um wie von Hoyos *et al.* [89] beschrieben eine DKR in 20 h mit einem Umsatz von 87% abzuschließen. Der Enantiomerenüberschuss (*ee*) des (R)-Benzoin lag nach 20 h bei über 80 % (Daten nicht gezeigt). Auch eingehende Kontrollen dessen, ob das System tatsächlich unter Luftausschluss arbeitet, konnten dahingehend keine Besserung einstellen. Es konnten bis zur Beendigung der experimentellen Arbeit die genauen Ursachen der erhaltenden Daten nicht geklärt werden. Auf Nachfrage bei Dr. Pilar Hoyos (Organic and Pharmaceutical Chemistry Department Madrid/ Spanien) konnte mit dem Ziel der Fehlerbehebung festgestellt werden, dass die verwendeten Lösungsmittel nicht wie von Hoyos über einen Natriumspiegel getrocknet wurden und somit potentiell noch Restwasser enthielten. Dabei wurde erklärend im persönlichen Gespräch

mitgeteilt, dass neben der Sensitivität gegenüber Sauerstoff vor allem Wasser einen negativen Einfluss auf die Aktivität von Rutheniumkatalysatoren hat. Dies unterstreicht nochmals das offensichtlich schmale Arbeitsfenster von diesen Katalysatoren, was nachdrücklich einen Wechsel zu einfacheren Systemen empfiehlt. Um trotzdem eine Benchmark für die hier durchgeführte Optimierung der Racemisierung zu entwickeln, wurde angenommen, dass eine Racemisierung innerhalb einer Reaktionszeit von 20 h in einem ausreichenden Umsatz ablaufen muss, um einen DKR-Umsatz von mindestens 87 % zu erreichen [89]. Nach eigener Festlegung meint ein ausreichender Umsatz in diesem Fall einen *ee* von unter 20 %. Somit wurde ungeachtet dessen, dass die Länge der Reaktionszeit in der beschriebenen Arbeit auch aufgrund einer Deaktivierung der Lipase TL begründet gewesen sein kann, die Dauer von 20 h folgend als Maßstab verwendet.

Im hier durchgeführten Screening wurden verschiedene heterogene Katalysatoren ausgewählt, für die bereits die Fähigkeit zur Racemisierung von sekundären Alkoholen berichtet wurde. Dieses Kriterium wurde angewendet, da Benzoin als einfachstes aromatisches α -Hydroxyketon prinzipiell als ein sekundärer Alkohol betrachtet werden kann und zudem oftmals 1-Phenylethanol als Standardsubstrat in Racemisierungsstudien verwendet wird. Ebenso wie Benzoin besitzt 1-Phenylethanol einen Phenylrest in α -Stellung zum Chiralitätszentrum, was ähnliche sterische Voraussetzungen schafft. Da jedoch bei α -Hydroxyketonen die Hydroxyfunktion selbst in α -Stellung zu einer Carbonylgruppe steht und sich somit die chemischen Eigenschaften des Moleküls grundlegend verändern, konnte nicht ohne Weiteres vorausgesagt werden, ob die beschriebenen Katalysatoren auch Benzoin als Substrat akzeptieren.

Wuyts *et al.* [143] testeten verschiedene auf Vanadium basierende Katalysatoren und konnten Vanadyl sulfat (VO_2SO_4) als sehr gut geeigneten Racemisierungskatalysator für 1-Phenylethanol in Oktan identifizieren. Sie wiesen die Bildung eines Carbenium Ions nach, was auf einen säurekatalysierten Racemisierungsprozess schließen lässt. In einer weiteren Studie dieser Arbeitsgruppe wurde ein rutheniumhaltiger, heterogener Katalysator entwickelt, der, sofern unter Sauerstoffausschluss verwendet, ebenfalls zur Racemisierung von 1-Phenylethanol geeignet ist [98]. Folgend wurde Calcium-Hydroxyapatit (HAP) nach

dem dort beschriebenen Protokoll hergestellt und im zweiten Schritt mit Rutheniumtrichlorid behandelt. Infolge eines Ionenaustausches wurde HAP mit Ruthenium beladen [98]. Dieser nachweislich heterogene Katalysator wurde folgend von Wuyts *et al.* mit Shvo's Katalysator und weiteren homogenen und heterogenen Metallkatalysatoren verglichen, was ein ähnliches Racemisierungspotenzial zum Shvo-Katalysator hervorbrachte. Ein mit Benzylsulfonsäuren beladenes Silicat wurde von Lozano *et al.* [86] für die Racemisierung von 1-Phenylethanol in überkritischem CO₂ eingesetzt. Mit dem Präparat „Sulfonic acid resin MP“ von Novabiochem kam im Rahmen dieser Arbeit ein ähnlicher Katalysator zum Einsatz. Es wurde jedoch auf den zusätzlichen Einsatz von ionischen Flüssigkeiten, wie es Lozano *et al.* beschrieben, verzichtet. Als nächster Katalysator sollte mit Palladium beladener Kohlenstoff getestet werden. Hier wurde unter anderem aufgrund der Arbeit von Ahn *et al.* [79] auf eine Eignung zur Racemisierung von Benzoin geschlossen und als kommerzielles Präparat ebenfalls verwendet. Die größte Gruppe untersuchter Katalysatoren sind aber die an der Technischen Universität Delft (NL) hergestellten und mit unterschiedlichen Metallen koordinierten TUD-1. Bei TUD-1 handelt es sich um ein schwammartiges, mesoporöses und dreidimensionales Material, das grundsätzliche Ähnlichkeit zu Zeolithen aufweist [155]. Das Material basiert auf der Benutzung von Tetraethylorthosilicat als Ausgangsmaterial und als Siliziumquelle. Der wesentliche Vorteil gegenüber eindimensionalen Zeolithen ist die Vermeidung jeglicher Diffusionsbarrieren, was auf die Struktur und die sehr große Oberfläche des Materials zurückzuführen ist [155, 156]. Durch die einfache Einarbeitung verschiedenster Metallatome (direkt während der Synthese) wurden drei Katalysatorengruppen von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulf Hanefeld für Biokatalyse und organische Chemie an der TU Delft hergestellt. Es wurden dabei zum Teil unterschiedliche Silicium/Metall Verhältnisse verwendet. Bei den eingesetzten Metallatomen handelte es sich um Aluminium, Zirkonium und Wolfram. Nachweise für die Fähigkeit verschiedener Zeolithe eine säurekatalysierte Racemisierung von Phenylethanol zu katalysieren, wurden in verschiedenen Arbeitsgruppen erbracht [82, 83, 85]. Auch diese Katalysatoren enthielten zum Teil mit Aluminium und Zirkonium zusätzliche reaktive Gruppen. Da in fast allen der oben genannten Arbeiten unpolare Lösungsmittel und insbesondere Toluol verwendet wurden [85, 98, 143, 156], kam dies auch

im hier durchgeführten Screening zum Einsatz. Wie aus Tabelle 16 ersichtlich wird, wurden zunächst die TUD-1-Katalysatoren für eine Reaktionsdauer von 20 h und einer Reaktionstemperatur von 50 °C getestet. Alle Versuche fanden unter Schlenkbedingungen statt und die TUD-1 Katalysatoren wurden bis zur Verwendung bei >100 °C gelagert, um eine Adsorption von Wasser zu vermeiden.

Tabelle 16: Katalysatorscreening zur Racemisierung von (*R*)-Benzoin

Katalysator	Lösungs- mittel	Temp. [°C]	Katalysator- konzentration [mg/mL]	Zeit [h]	Konzentration (<i>R</i>)-Benzoin [mM]	ee Benzoin [%]
TUD-1	Toluol	50	40	20	94	93,8
Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) ¹	Toluol	50	40	20	94	1,3
Al-TUD-1 (Si/Al=4) ¹	Toluol	50	40	20	94	0,2
Al-TUD-1 (Si/Al=25) ¹	Toluol	50	40	20	94	23,2
W-TUD-1 (Si/W=10) ¹	Toluol	50	40	20	94	65,7
W-TUD-1 (Si/W=20) ¹	Toluol	50	40	20	94	43,9
W-TUD-1 (Si/W=30) ¹	Toluol	50	40	20	94	63,9
W-TUD-1 (Si/W=40) ¹	Toluol	50	40	20	94	73,7
W-TUD-1 (Si/W=50) ¹	Toluol	50	40	20	94	71,7
Zr-TUD-1 (Si/Zr=25)	Toluol	50	40	4	94	4,4
Al-TUD-1 (Si/Al=4)	Toluol	50	40	4	94	42,8
Ru-Hydroxy-apatit ²	Toluol	50	40	4	94	91,7
Pd-Kohlenstoff ³	Toluol	80	40	4	94	85,0
Vanadyl sulfat	Toluol	50	40	4	94	88,5
Sulfonsäureträger ⁴	Toluol	50	40	5,5	94	90,4

¹Al=Aluminium, Zr=Zirkonium, W=Wolfram, Si=Silicium; ²Hergestellt nach [98]; ³Palladium auf Kohlenstoff;

⁴Markenname: „Sulfonic acid resin MP“

Bereits das TUD-1 Material ohne koordinierte Metallatome zeigte eine schwache Veränderung des ee auf 93,8 % was auf die intrinsische Acidität des Materials zurückzuführen ist [155]. Die W-TUD-1 zeigten mit einem steigenden Wolframanteil eine

deutliche Verringerung des *ee* bis auf minimal 43,9 % bei einem Si/W Verhältnis von 20. Bei einer weiteren Steigerung hin zu einem Verhältnis von 10 stieg der *ee* aber wieder auf 65,7 % an. Deutlich bessere Ergebnisse zeigten hingegen die mit Aluminium und Zirconium koordinierten TUD-1. Auch hier wirkte sich ein steigender Aluminiumgehalt positiv auf die Racemisierung aus, so dass bei Si/Al=4 ein *ee* von 0,2 nachgewiesen werden konnte. Ein im Rahmen der Messungengenauigkeit identischer *ee* konnte für Zr-TUD-1 festgestellt werden. Ein steigender Gehalt der Metallatome geht mit der Erhöhung der reaktiven Stellen („active sites“) und damit gleichzeitig mit einer erhöhten Acidität einher [156]. Da es sich bei der Racemisierung von Benzoin unter Verwendung der X-TUD-1 um eine säurekatalysierte Reaktion handelt, läuft die aller Wahrscheinlichkeit nach stattfindende Keto-Enol-Tautomerie [84, 87, 157], begünstigt bei steigender Acidität ab [85, 156] (Reaktionsschema siehe Abbildung 5).

Als Folge der hervorragenden Ergebnisse für Al-TUD-1 (Si/Al=4) und Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) wurde die Reaktionszeit in den folgenden Screeningexperimenten auf 4 h verkürzt und die weiteren Katalysatoren untersucht. Wie dem unteren Teil der Tabelle 16 zu entnehmen ist, katalysiert Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) selbst nach einer sehr kurzen Reaktionsdauer von nur 4 h eine nahezu vollständige Racemisierung des eingesetzten (R)-Benzoins. Al-TUD-1 (Si/Al=4) weist ebenfalls einen signifikant reduzierten *ee* von 42,8 % auf, der jedoch deutlich höher ist als der des Zr-TUD-1 (Si/Zr=25). Beide Werte lassen die zunächst noch unbestätigte Vermutung zu, dass diese Racemisierung des (R)-Benzoins deutlich schneller ist als bei einer Verwendung des Shvo-Katalysators. Überraschenderweise wiesen alle weiteren getesteten Racemisierungskatalysatoren lediglich *ee* im Bereich um 85-90 % auf. Diese Ergebnisse lassen zwar in jedem Fall auf die Fähigkeit Benzoin zu racemisieren schließen, belegen aber auch sehr langsame Reaktionsraten. Dies steht im ersten Moment im Gegensatz zu den teilweise sehr guten Ergebnissen in der Racemisierung von 1-Phenylethanol. Mögliche Gründe für die niedrigen Aktivitäten mit Benzoin als Substrat könnten unterschiedliche Aciditäten der Katalysatoren sein, wobei aber auch Diffusionslimitierungen aufgrund der im Vergleich zum 1-Phenylethanol wesentlich größeren Molekülstruktur des Benzoins verantwortlich sein könnten. Bezüglich des Ru-HAP wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Kontrollexperimente (XRD, ICP oder XPS) zur Sicherstellung der Trägermaterialsynthese

durchgeführt, so dass eine Diskussion der Ergebnisse nur unzureichend möglich ist. Auf die Durchführung einer Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde aufgrund der außerordentlich guten Ergebnisse für Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) und Al-TUD-1 (Si/Al=4) für die Nicht-TUD-1 Katalysatoren verzichtet. Im Gegensatz dazu wurde folgend der Einfluss des Lösungsmittels sowie der Temperatur auf die Racemisierungsgeschwindigkeit der Al-TUD-1 (Si/Al=4) und Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) untersucht. Im weiteren Verlauf werden die untersuchten TUD-1 Katalysatoren nur noch als Al-TUD-1 bzw. Zr-TUD-1 bezeichnet.

3.5.1.1 Optimierung der Racemisierung mit Al-TUD-1 und Zr-TUD-1

3.5.1.2 Lösungsmittel

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die DKR von Benzoin eine „onepot-Synthese“ angestrebt, was voraussetzt, dass jegliche Reaktionsbedingungen für die enzymatisch katalysierte KR auch mit denen der Racemisierung harmonisieren. Es wurden im Folgenden neben dem Standardlösungsmittel THF auch jene Lösungsmittel für die Racemisierung getestet, die entweder die höchsten Aktivitäten und Prozessstabilitäten in der KR ermöglichten (Toluol, 2-MeTHF, MIBK) oder eine gute Löslichkeit von Benzoin bei noch ausreichend guter Aktivität zeigten (1,4-Dioxan). Es wurden erneut alle Experimente bei einer Temperatur von 50 °C unter Schlenkbedingungen durchgeführt.

In Abbildung 42 sind die *ee* des (R)-Benzoins nach der Racemisierung mit den jeweiligen Katalysatoren in verschiedenen Lösungsmitteln aufgetragen. Obwohl die tatsächliche Racemisierungsgeschwindigkeit für Toluol aufgrund der Reaktionszeit von 20 h nicht genau aufgelöst wurde, so ist dennoch für alle anderen Lösungsmittel bis auf MIBK zu erkennen, dass Al-TUD-1 eine höhere Racemisierungsgeschwindigkeit als Zr-TUD-1 aufweist. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Ramanathan *et al.* [156], die Zr-TUD-1 als Katalysator für die Meerwein-Ponndorf-Verley (MPV) Reaktion und für die Prins-Reaktion untersucht haben, wurde Toluol als das geeignetste Lösungsmittel für eine Verwendung der TUD-1 Katalysatoren identifiziert. Obwohl Ether als Lösungsmittel wesentlich geringer an den „active sites“ der Katalysatoren koordinieren sollten, als es beispielsweise bei Alkoholen der

Fall ist, so ist trotzdem anzunehmen, dass das in Etherverbindungen vorhandene Sauerstoffatom ebenfalls an Zirconium und Aluminium koordinieren kann.

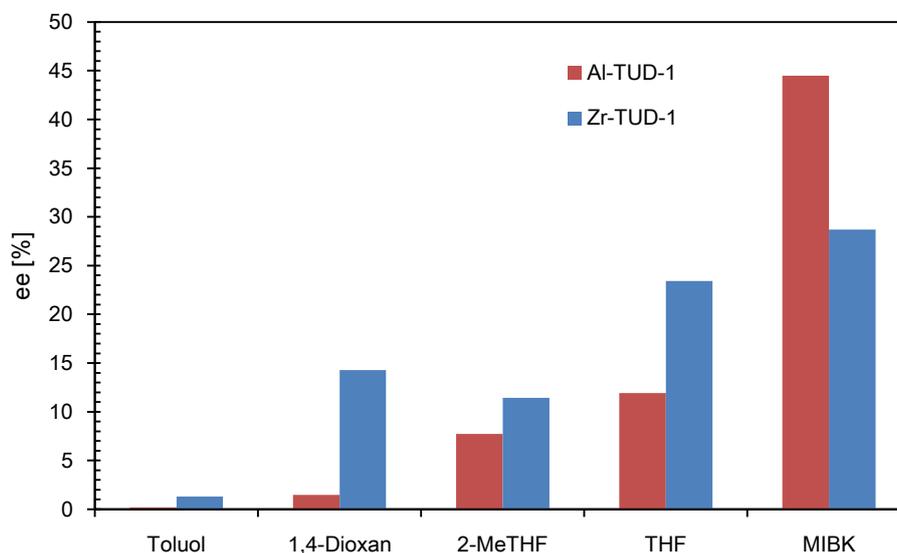


Abbildung 42: Enantiomerenüberschüsse nach Racemisierung von (R)-Benzoin durch Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit unterschiedlicher Lösungsmittel bei 50°C, 20h

Bei einer Bewertung der untersuchten Lösungsmittel anhand der eigens definierten Benchmark von einem $ee < 20\%$ nach 20 h Reaktionszeit, werden Toluol, 1,4-Dioxan und 2-MeTHF als Lösungsmittel für eine spätere DKR eingesetzt. Für die weiteren Charakterisierungsexperimente wird hingegen nur Toluol aufgrund der wesentlich höheren Racemisierungsgeschwindigkeit verwendet.

3.5.1.3 Temperatur

Die Reaktionstemperatur ist ein weiterer wichtiger Optimierungsparameter, da chemisch katalysierte Racemisierungsreaktionen für gewöhnlich schneller ablaufen, sofern die Temperatur erhöht wird [85]. Da für Toluol gezeigt werden konnte, dass Acc-LipTL trotz einsetzender thermischer Deaktivierung bis zu einer Temperatur von 99 °C steigende Aktivitäten aufweist, wurde die Racemisierungsgeschwindigkeit in einem Temperaturbereich von 50 - 90 °C variiert. Um eine gleichmäßige Temperierung parallel ablaufender Reaktions-

ansätze zu gewährleisten, wurde ein Ölbad verwendet, indem alle Ansätze über einer Multirührplatte durchmischt wurden.

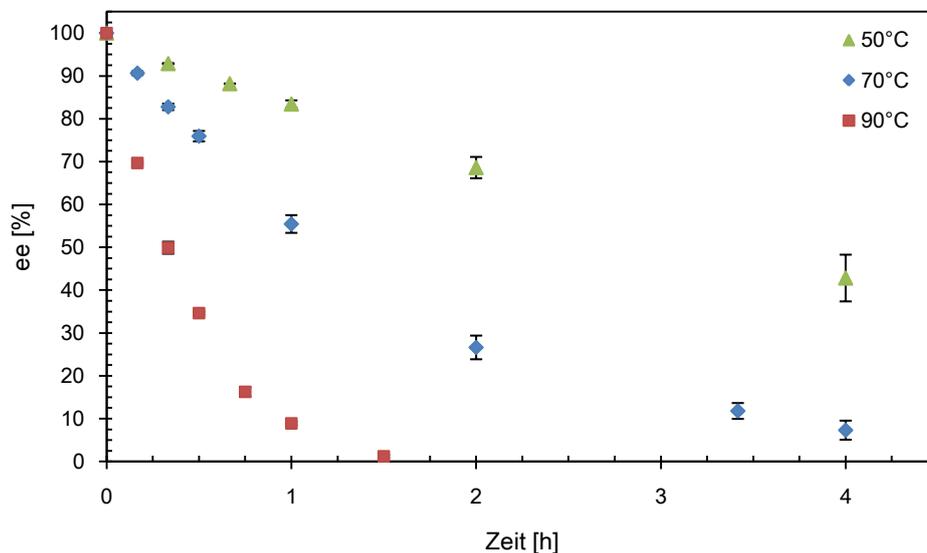


Abbildung 43: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Al-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol

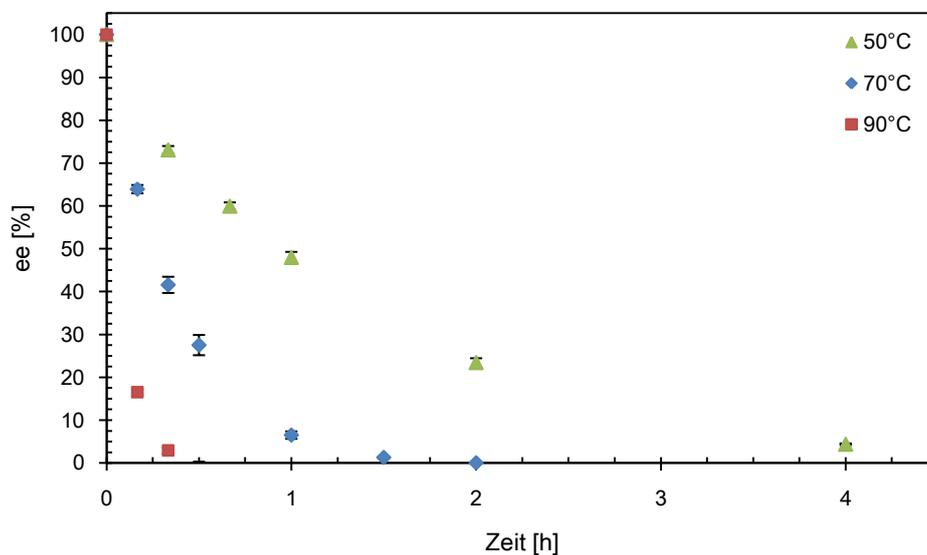


Abbildung 44: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol

Abbildung 43 und Abbildung 44 lassen eine starke Abhängigkeit der Racemisierungsgeschwindigkeit von der Temperatur für beide Katalysatoren erkennen. Wie bereits aus den Screeningversuchen erwartet werden konnte, katalysiert Zr-TUD-1 die Reaktion in einem höheren Maße als Al-TUD-1. So konnte für Zr-TUD-1 eine vollständige Racemisierung des eingesetzten (R)-Benzoins bei 90 °C bereits nach etwa 30 Minuten nachgewiesen werden. Doch auch für Al-TUD-1 konnte mit einer benötigten Zeit von 90 Minuten bis zur vollständigen Racemisierung ein exzellentes Ergebnis erzielt werden.

Sofern die Racemisierungsreaktion ausgehend von einem reinen Enantiomer beginnt, kann unter Annahme dessen, dass beide Enantiomere mit der gleichen Geschwindigkeitskonstanten reagieren, eine Kinetik erster Ordnung angenommen werden und daraus Gleichung 7 unter der Bedingung $[S]_t = [R]_0 - [R]_t$ abgeleitet werden:

$$\ln\left(\frac{[R]_0}{2[R]_t - [R]_0}\right) = k_{rac}t \quad (\text{Gleichung 7})$$

$[R]_0$ und $[R]_t$ = Die Konzentrationen des (R)-Enantiomers zum Zeitpunkt Null und t

k_{rac} = Geschwindigkeitskonstante der Racemisierung.

Die Halbwertszeit der Racemisierung, also die Zeit nach dem der *ee* auf 50 % des Ausgangswertes gesunken ist, kann dann leicht aus der Gleichung 8 berechnet werden [158]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{rac}} \quad (\text{Gleichung 8})$$

Daraufhin wurden in Abbildung 45 die Halbwertszeiten der Reaktionen bei verschiedenen Temperaturen aufgetragen und ein direkter Vergleich der Katalysatoren durchgeführt.

Wie in Abbildung 45 ersichtlich, halbiert sich der *ee*-Wert bei Verwendung des Zr-TUD-1 innerhalb von ca. 54 Minuten bei 50 °C, ca. 14 Minuten und ca. 4 Minuten bei 70 °C bzw. 90 °C. Demgegenüber stehen bei steigenden Temperaturen Halbwertszeiten von 197 Minuten, 71 Minuten und 20 Minuten bei Al-TUD-1. Somit lässt Zr-TUD-1 die Racemisierung etwa um den Faktor von vier bis fünf schneller ablaufen als Al-TUD-1.

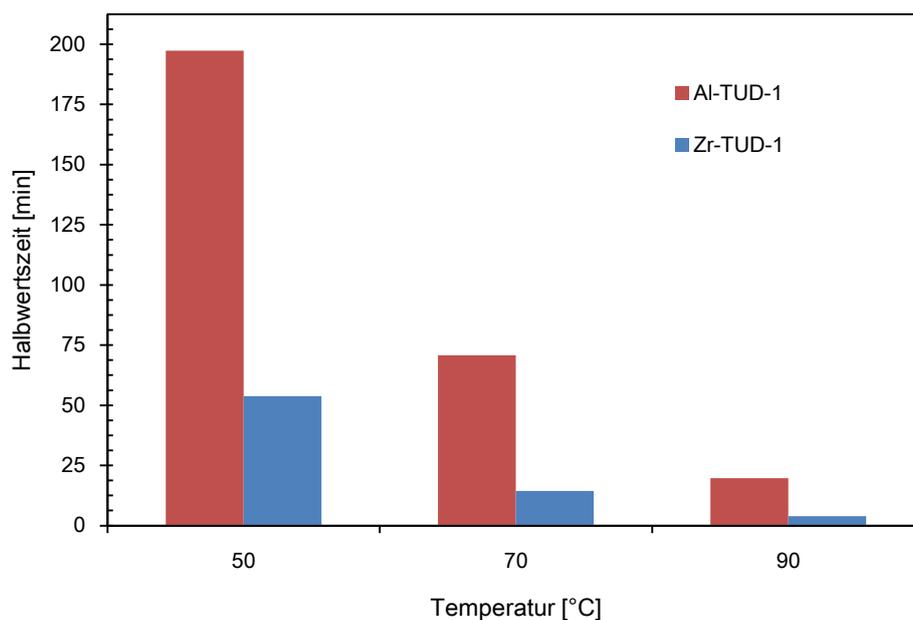


Abbildung 45: Halbwertszeiten der Racemisierung von (*R*)-Benzoin durch Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol

Eine erhöhte Aktivität des chemischen Katalysators ist jedoch unter Umständen auch mit einer erhöhten Neigung zu Nebenreaktionen verbunden. Eine typische Nebenreaktion bei einem Einsatz saurer Racemisierungskatalysatoren ist zum einen die Racemisierung des in der KR/DKR gebildeten Esters und die nicht selektive Umesterung selbst [158, 159]. Letztere macht sich insbesondere durch eine Abnahme des Produkt-*ee*'s in der DKR bemerkbar. Im Folgenden wurden die Neigungen von Zr-TUD-1 und Al-TUD-1 zur Umesterung und zur Racemisierung des Esters untersucht.

3.5.1.4 Untersuchungen zur Umesterungsaktivität und Racemisierung des Benzoinesters

Um die jeweilige Umesterungsaktivität der Racemisierungskatalysatoren zu untersuchen, wurden Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in der Standard-KR von Benzoin anstelle des Acc-LipTL eingesetzt. Es wurden die Aktivitätswerte bei 50, 70 und 90 °C aufgenommen.

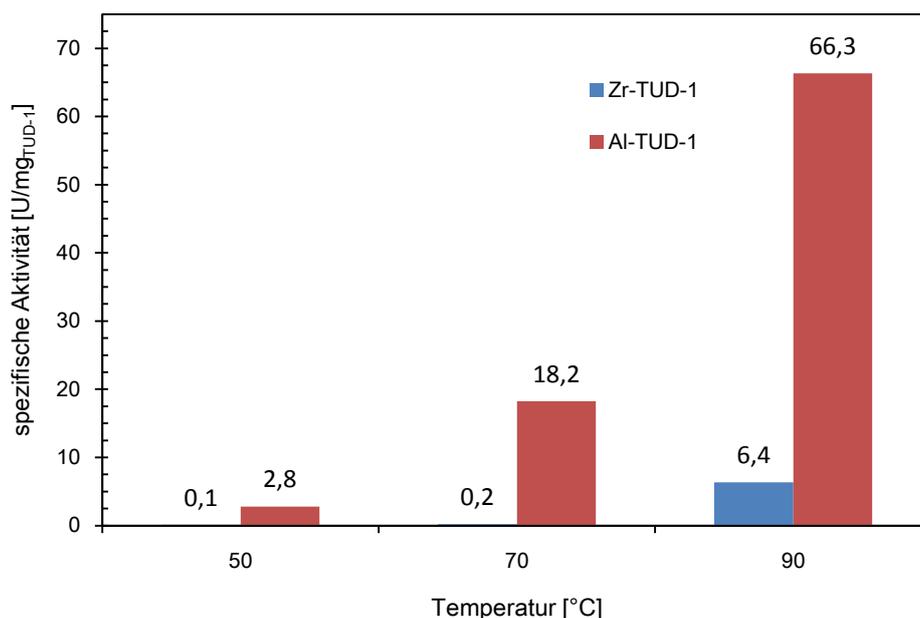


Abbildung 46: Spez. Aktivitäten von Al-TUD-1 und Zr-TUD-1 in der KR von Benzoin mit Vinylbutyrat in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol

Abbildung 46 macht deutlich, dass die unerwünschte Umesterung bei Al-TUD-1 in einem wesentlich höheren Umfang abläuft, als bei Zr-TUD-1. Wohingegen beim letztgenannten Katalysator bei 50 °C und 70 °C keine nennenswerte Aktivität nachgewiesen werden konnte, so konkurriert Al-TUD-1 mit 2,8 U/mg_{Al-TUD-1} bei 50 °C und 18,2 U/mg_{Al-TUD-1} bei 70 °C deutlich mit Acc-LipTL um die Umesterung von Benzoin. Bei 90 °C konnte für beide Katalysatoren eine signifikante Aktivität gefunden werden.

Eine säurekatalysierte Umesterung ist auf die Anwesenheit einer Brønstedt-Säure-Funktionalität zurückzuführen [160], die infolge einer Protonierung der Carbonylgruppe des Acyldonors die Reaktion einleitet. Der Gehalt von Brønstedt-Säure-Zentren ist bei Zr-TUD-1 und Al-TUD-1 sehr verschieden. Während Zr-TUD-1 fast ausschließlich Lewis-Säure- und lediglich Spuren von Brønstedt-Säure-Stellen aufweist [156], handelt es sich bei Al-TUD-1 schon eher um eine Brønstedt-Säure [155]. Dies sollte auch das unterschiedliche Verhalten der Katalysatoren in der KR von Benzoin erklären.

In beiden Fällen konnte sowohl (R)- als auch das (S)-Enantiomer des Esters gefunden werden. Da sowohl eine nicht selektive Veresterung, aber auch eine Racemisierung des

gebildeten Esters stattfinden kann, wurde im nächsten Schritt eine Racemisierung von (R)-Benzoin in Anwesenheit des (S)-Benzoinbutyrats durchgeführt. Im Rahmen dieses Versuches konnte ebenfalls untersucht werden, ob die Racemisierungsgeschwindigkeit des Zr-TUD-1 durch das Produkt der KR gehemmt wird.

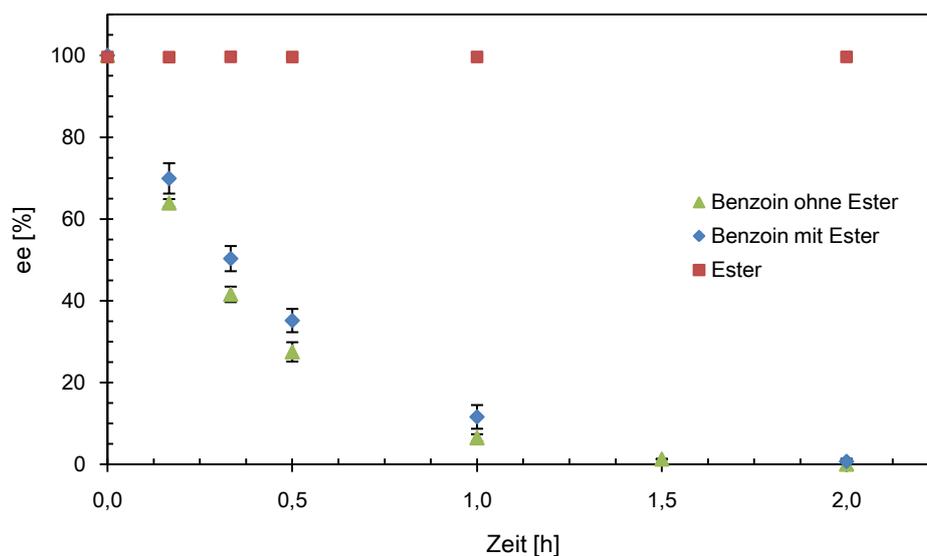


Abbildung 47: Racemisierung von (R)-Benzoin durch Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit mit und ohne 47 mM Benzoinbutyrat in Toluol bei 70 °C; ee des Benzoinbutyrat über den gesamten Racemisierungsprozess

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass Zr-TUD-1 nicht in der Lage ist (S)-Benzoinbutyrat zu racemisieren, da der ee über den gesamten Prozess bei > 99 % bleibt (Abbildung 47). Des Weiteren konnte keine signifikante Verlangsamung der Racemisierungsgeschwindigkeit festgestellt werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen gemeinsam mit der hohen Racemisierungsgeschwindigkeit und der geringen Neigung zu unerwünschten Nebenreaktionen die hervorragende Eignung des Zr-TUD-1 für die DKR von Benzoin.

3.6 Dynamisch kinetische Racematspaltung mit Al-TUD-1, Zr-TUD-1 und Acc-LipTL

Zu Beginn dieser Arbeit war Stand der Technik, dass die DKR von Benzoin mit einer immobilisierten Variante der Lipase TL (statische Suspension) in 20 h mit einem Umsatz von 87 % bei einem *ee* von >99 % durchgeführt werden kann [89]. Bei Verwendung der Lipase TL in nativer Form war durch eine stufenweise Applikation des Enzyms ein Umsatz von 92 % in einer gesamten Reaktionsdauer von 48 h möglich. Auch hier konnten ausgezeichnete *ee*'s von >99 % erreicht werden. Nachteile dieser Arbeiten bestehen aus eigener Sicht vor allem in der Sensitivität des Reaktionssystems und der dadurch nur schwer umzusetzenden Übertragung in einen technischen Maßstab. Dabei standen sowohl die hohe Instabilität der Lipase TL als auch die komplexe Handhabung des Shvo-Katalysators im Fokus der hier durchgeführten Optimierung. Bisher konnten sowohl eine aktivierende Immobilisierung, eine Stabilisierung der Acc-LipTL und die Identifikation eines heterogenen und äußerst aktiven Racemisierungskatalysators erfolgreich gezeigt werden. Im folgenden Abschnitt sollen daher nun die einzeln optimierten „Bausteine“ zu einer Gesamtreaktion, der DKR von Benzoin, zusammengefügt werden. Dabei werden erneut die Parameter Lösungsmittel und Temperatur betrachtet, um zum einen bereits erhaltene Ergebnisse zu validieren und zum anderen, um den Einfluss auf die „onepot“ Reaktionsführung zu untersuchen. Abschluss findet diese Arbeit in der Evaluierung der Wiederverwendbarkeit des Reaktionssystems, was sowohl aus ökonomischer als auch aus verfahrenstechnischer Sicht eines der wichtigsten Parameter darstellt.

3.6.1 Lösungsmittel

Basierend auf der Untersuchung geeigneter Lösungsmittel für die Racemisierung erfolgte die DKR in THF als Standard, 2-MeTHF, 1,4-Dioxan und Toluol. Die experimentelle Vorgehensweise bestand in der Herstellung von Schlenkbedingungen bei Anwesenheit von Acc-LipTL und des jeweiligen Racemisierungskatalysators. Die Zugabe von 94 mM Benzoin im jeweiligen Lösungsmittel und 6 Äquivalenten Vinylbutyrat im Gegenstrom startete die Reaktion, welche gerührt bei 50 °C für einen Zeitraum von 5 h durchgeführt wurde.

Tabelle 17: Vergleich der DKR von Benzoin mit Acc-LipTL und Al-TUD-1 bzw. Zr-TUD-1 in Abhängigkeit verschiedener Lösungsmittel bei 50 °C

Lösungsmittel	Racemisierungskatalysator	Zeit [h]	Umsatz [%]	ee (S) Benzoinbutyrat [%]	ee (R) Benzoin [%]
THF	Al-TUD-1	5	25,1 ¹	84,2 ¹	16,8
2-MeTHF	Al-TUD-1	5	85,9	96,6	45,4
1,4-Dioxan	Al-TUD-1	5	73,2	79,2	12,7
Toluol	Al-TUD-1	5	93,2	83,3	42,7
THF	Zr-TUD-1	5	53,5 ¹	99,6 ¹	30,2
2-MeTHF	Zr-TUD-1	5	96,8	97	28,3
1,4-Dioxan	Zr-TUD-1	5	72,5	97,4	24,2
Toluol	Zr-TUD-1	5	98,4	98,5	12,1

Bed.: 500 µL, 94 mM (R,S)-Benzoin, 6 Äquiv. Vinylbutyrat, 50°C, N₂-Atmosphäre ¹ Die Trennung der Produkte von Nebenprodukten war nicht vollständig möglich, was die Berechnung verfälschen kann

Die in Tabelle 17 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass bis auf die Verwendung von THF als Lösungsmittel alle DKR's einen Umsatz aufweisen, der höher ist als die intrinsische Limitierung von 50 % in der KR. Dies zeigt die generelle Machbarkeit der „onepot“-Reaktionsführung für Acc-LipTL und den TUD-1 Katalysatoren.

Bei Verwendung des bisherigen KR-Standardssystem mit THF konnte eine starke Nebenproduktbildung nachgewiesen werden. Dies beeinträchtigte zum einen die Quantifizierung der Produkte und Edukte und ließ zum anderen auf nicht bekannte Nebenreaktionen zwischen Acc-LipTL, dem Lösungsmittel und insbesondere den Al-TUD-1 schließen. Der niedrige Umsatz von 25,1 % lässt somit vermuten, dass die Aktivität des Acc-LipTL deutlich reduziert wurde bzw. eine Deaktivierung stattgefunden haben könnte. Der niedrige ee des Substrates hingegen zeigt, dass der Racemisierungskatalysator offenbar sehr gut funktionierte, was ebenfalls an dem verhältnismäßig niedrigen Produkt-ee zu erkennen ist. Dieser ist wahrscheinlich auf die nicht selektive Umesterungsaktivität von Al-TUD-1 zurückzuführen, die bereits zuvor nachgewiesen worden war. Auf eine genaue Bestimmung der gebildeten Nebenprodukte wurde allerdings verzichtet, da nach allen bisherigen Optimierungsschritten THF ohnehin als nicht gut geeignet angesehen werden muss und

somit eine weitere Verwendung dieses Lösungsmittels nicht empfohlen wird. 1,4-Dioxan eignet sich zwar grundsätzlich als Lösungsmittel für die DKR, da Umsätze von >50 % darin möglich sind, jedoch stoppte die Reaktion unabhängig vom verwendeten Racemisierungskatalysator bei einem Umsatz von ca. 73 % bei Produkt-*ee*'s von etwa 80 % bei Al-TUD-1 und >97 % bei Zr-TUD-1. Auch hier zeigt sich die erhöhte Neigung des Al-TUD-1 zur nicht selektiven Umesterung von Benzoin in dem erniedrigten *ee*-Wert. Hervorragende Ergebnisse konnten indessen bei den DKR's in 2-MeTHF und Toluol und der Verwendung von Zr-TUD-1 erhalten werden. Hier wurden innerhalb von nur 5 h in 2-MeTHF 96,8 % und in Toluol 98,4 % Umsatz nachgewiesen. Der *ee* des gebildeten Esters ist in Toluol mit 98,5 % exzellent und mit 97 % in 2-MeTHF zwar etwas geringer, aber dennoch als sehr gut zu bewerten. Obwohl auch Al-TUD-1 in 2-MeTHF und Toluol sehr gute Ergebnisse hervorbringt, so sind diese aufgrund eines niedrigeren Umsatzes in 2-MeTHF und wegen des unzureichenden *ee*'s in Toluol signifikant schlechter als für Zr-TUD-1.

Im Vergleich zu den zuvor aufgeführten Benchmarks von Hoyos *et al.* [89] konnte somit der Umsatz weiter erhöht werden. Gleichzeitig war es möglich, die Reaktionszeit auf nur 5 h zu verkürzen. Beide Ergebnisse unterstreichen das Potenzial des hier entwickelten DKR-Systems im Gegensatz zum derzeitigen Stand der Technik. Hinzu kommt, dass kein Mehraufwand gegenüber der KR zu verzeichnen ist, da beide Katalysatoren (Acc-LipTL und Zr-TUD-1) im gleichen Arbeitsschritt für die DKR verwendet werden.

3.6.2 Temperatur

Die Verwendung von mindestens 50 °C als Reaktionstemperatur wurde ausgewählt, um einen Vergleich zu bisherigen Arbeiten zu gewähren. Es wird davon ausgegangen, dass eine Verringerung der Temperatur mit einer Erniedrigung der Racemisierungsgeschwindigkeit einhergeht und dadurch dies zu dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird. Demzufolge müsste mit einer entsprechenden Reduktion der Acc-LipTL-Menge einer Verschlechterung des Produkt-*ee* entgegen gewirkt werden, da die Lipase bei einer längerfristigen Verfügbarkeit des (R)-Benzoins dieses ebenfalls als Substrat akzeptiert. Obwohl eine geringere Reaktionstemperatur nachweislich zu einer Erhöhung der Stabilität

von Acc-LipTL führt, destabilisiert eine verlängerte Inkubationszeit im Reaktionssystem das Acc-LipTL-Präparat. Da eine Recycling des Lipase-Immobilisats angestrebt wird, ist nach eigener Meinung eine Verkürzung der Reaktionszeit hinsichtlich einer hohen Katalysatorstandzeit zielführender. Aufgrund dessen wurde im Folgenden untersucht, inwiefern eine Veränderung der Temperatur dazu genutzt werden kann, die Reaktionszeit der DKR noch weiter zu verkürzen. Dazu wurden DKR's in Toluol durchgeführt und die Temperatur von 50 °C auf 70 bzw. 90 °C erhöht. Es wurde die Zunahme des Benzoinbutyrats in kleinen Zeitabständen bestimmt und somit der Verlauf der DKR dokumentiert (Abbildung 48 und Abbildung 49).

Sowohl für den Al-TUD-1 (Abbildung 48) als auch für Zr-TUD-1 (Abbildung 49) konnte durch die Erhöhung der Temperatur die Reaktionszeit bis zum Erreichen eines Umsatzes von bis zu >99 % deutlich verkürzt werden.

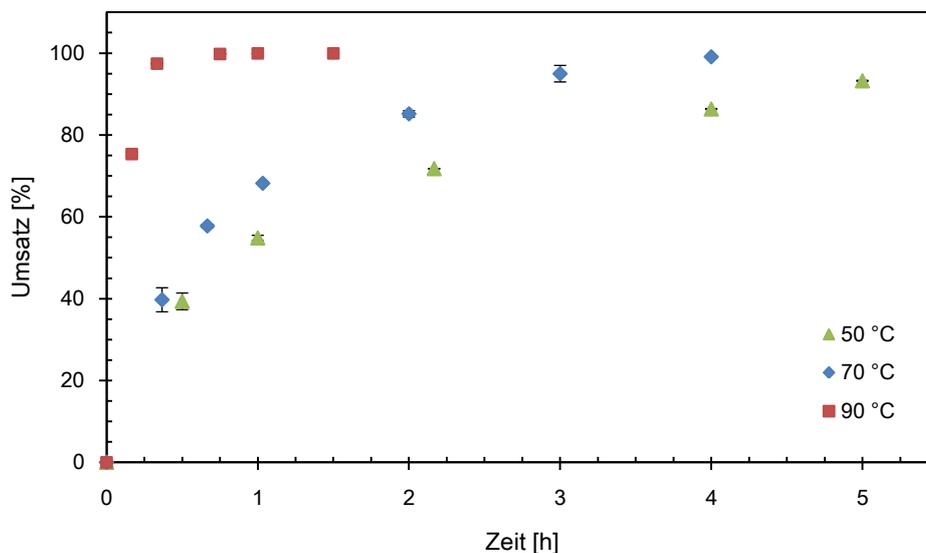


Abbildung 48: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Al-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol

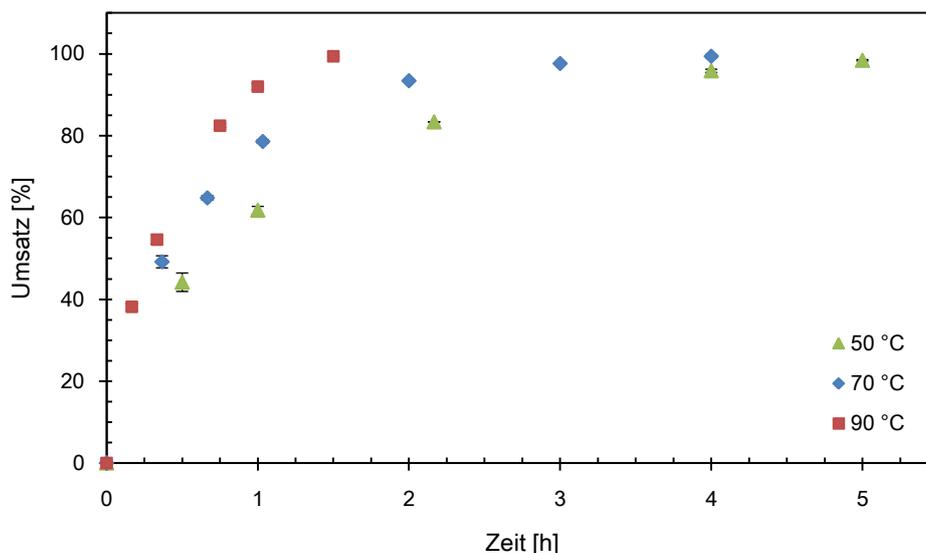


Abbildung 49: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Reaktionszeit bei verschiedenen Temperaturen in Toluol

Dabei ist besonders auffällig, dass die Reaktionsverläufe der jeweiligen DKR's mit den verschiedenen Racemisierungskatalysatoren bei 50 °C und 70 °C sehr ähnlich sind, dagegen aber bei 90 °C deutliche Unterschiede zu erkennen sind. Während die DKR mit Al-TUD-1 bereits nach 45 Minuten einen Umsatz von >99 % erreicht, ist die DKR mit Zr-TUD-1 erst nach etwa 90 Minuten vollständig beendet. Dies widerspricht zunächst den bisher erhaltenden Ergebnissen, in denen Zr-TUD-1 der Racemisierungskatalysator war, der eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit aufwies. Dieser Zusammenhang konnte erwartungsgemäß auch für die beiden anderen Temperaturen gefunden werden, nicht jedoch für 90 °C.

Die Erklärung für dieses Phänomen kann bei erneuter Betrachtung der spezifischen Aktivität der TUD-1-Katalysatoren in der KR von Benzoin (Abbildung 46) gefunden werden. Dort konnte bereits gezeigt werden, dass Al-TUD-1 bei einer Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 90 °C eine sehr starke Zunahme der Umesterungsaktivität zeigt. Dies bedeutet, dass sowohl Acc-LipTL als auch Al-TUD-1 die Umesterung von Benzoin katalysieren. Da Al-TUD-1 dies nicht stereoselektiv katalysiert, wird dieser Zusammenhang bei einer Auftragung der Produkt-*ee*'s über der Temperatur besonders deutlich (Abbildung 50).

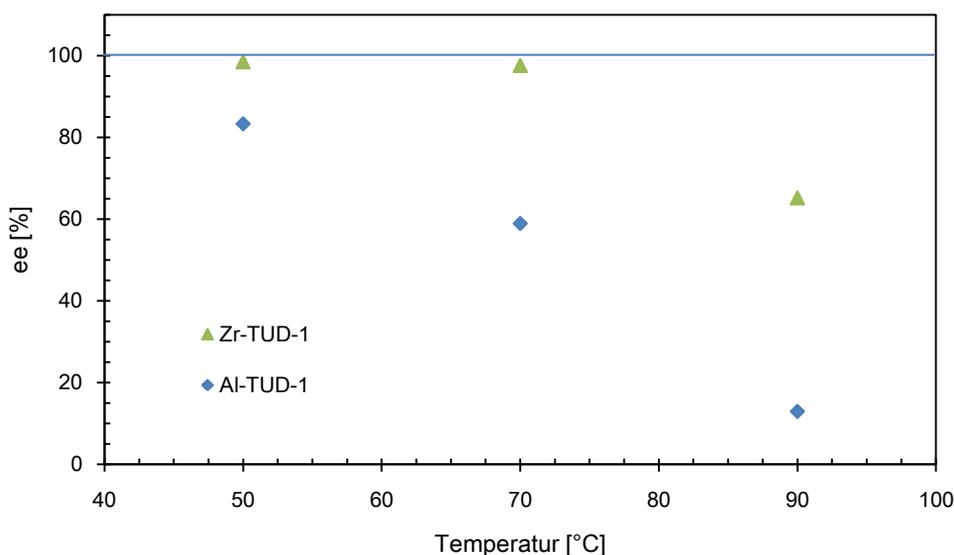


Abbildung 50: Entwicklung des *ee* des (*S*)-Benzoinbutyrats in der DKR von Benzoin durch Acc-LipTL und Al-TUD-1 bzw. Zr-TUD-1 in Abhängigkeit der Temperatur in Toluol

Sofern Al-TUD-1 als Racemisierungskatalysator eingesetzt wurde, nehmen die Produkt-*ee*'s sehr stark mit einer Erhöhung der Temperatur ab. Bei Zr-TUD-1 konnte ein *ee* von >97 % auch bei 70 °C erreicht werden. Diese fallen dann jedoch bei 90 °C auch auf 65 % ab. Bei Al-TUD-1 konnte bei gleicher Temperatur nur noch ein *ee* von ca. 13 % festgestellt werden. Hierbei wird deutlich, dass die enzymatisch katalysierte Umesterung nur noch eine untergeordnete Rolle spielt und der Großteil des Esters durch Al-TUD-1 gebildet wird.

Abschließend ist herauszustellen, dass wenn die Zielspezifikation der optischen Reinheit des Produktes einen *ee* von >97 % zulässt, die Reaktionszeit zur vollständigen Umsetzung des Benzoin durch eine Erhöhung der Temperatur auf 70 °C weiter auf 4 h reduziert werden kann. Des Weiteren ist festzustellen, dass Al-TUD-1 aufgrund der hohen Neigung zur Katalyse der nicht selektiven Umesterung nicht für einen Einsatz in der DKR von Benzoin geeignet ist.

3.6.3 Katalysatorverhältnisse

Als Grundregel für eine DKR gilt, dass die Racemisierungsreaktion nach Möglichkeit schneller ablaufen sollte als die zweite, meist enzymatisch katalysierte Reaktion [71]. Dies soll verhindern, dass das unerwünschte Enantiomer als Substrat akzeptiert wird, weil die *in situ* Racemisierung zu langsam abläuft. Infolge dessen würde sich der Produkt-*ee* merklich verschlechtern. Aufgrund der zwar geringen, aber nachweisbaren nicht selektiven Umesterungsaktivität des Zr-TUD-1 ist jedoch auch anzunehmen, dass eine Erhöhung der Racemisierungsaktivität die Bildungsrate der Nebenprodukte steigert. Eine Reduktion der Konzentration hingegen könnte eine Verbesserung des *ee* nach sich ziehen, steht aber in Konkurrenz mit der oben beschriebenen enzymatischen Umesterung des unerwünschten Enantiomers. Der einfachste Weg die jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten einzustellen, ist die Regulierung der Katalysatormenge im Reaktionsansatz. In den bisherigen DKRs wurden die Katalysator-Konzentrationen konstant bei 40 mg/mL für den Racemisierungskatalysator und 20 mg/mL im Fall des Acc-LipTL gehalten. Es wurde im Folgenden untersucht, wie weit die Konzentration des Racemisierungskatalysators mit dem Ziel eines verbesserten Produkt-*ee* verringert werden kann, ohne die Racemisierung dabei zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt werden zu lassen.

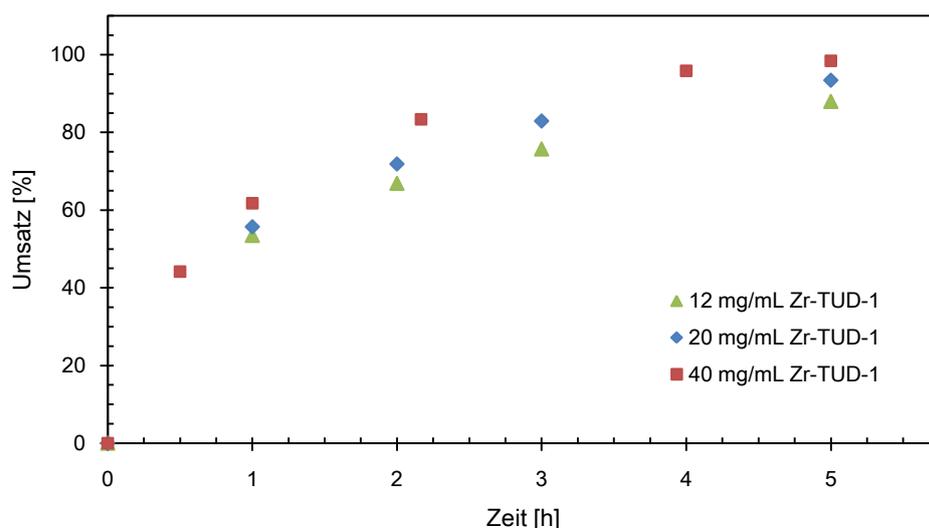


Abbildung 51: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch 20 mg/mL Acc-LipTL in Abhängigkeit verschiedener Mengen von Zr-TUD-1 in Toluol bei 50°C

In Abbildung 51 wird deutlich, dass die Verringerung der Zr-TUD-1 -Konzentration zu reduzierten Umsätzen nach 5 h Reaktionszeit führt (88 % bei 12mg/mL; 93,4 % bei 20 mg/mL und 98,4 % bei 40 mg/mL). Der Produkt-*ee* lag bei 97,6 % für 12 mg/mL und stieg auf 98,5 % bei der höchsten untersuchten Konzentration an. Das bedeutet, dass tatsächlich bei einer Reduktion der Zr-TUD-1 -Konzentration die Racemisierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird. Der sinkende *ee* zeigt demzufolge an, dass die Lipase TL, wenn auch nur in sehr geringem Maße, das (R)-Benzoin als Substrat akzeptiert. Wie groß der Einfluss einer sich ändernden Acc-LipTL-Konzentration auf den *ee* des Esters ist, wurde in weiteren Experimenten untersucht. Es wurde die Menge an Acc-LipTL im Vergleich zum bisherigen Standard sowohl erhöht als auch erniedrigt und der Einfluss auf den Verlauf der DKR dokumentiert (Abbildung 52).

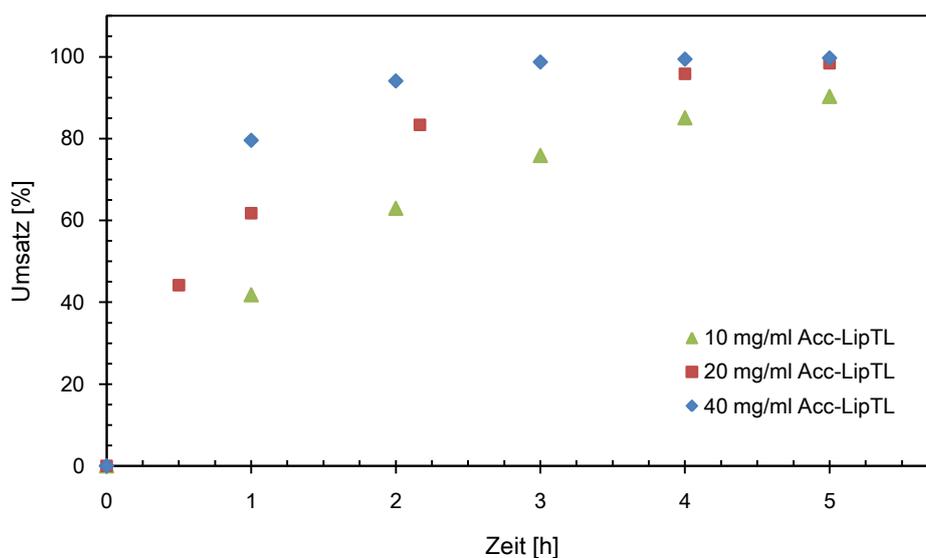


Abbildung 52: Umsatzverläufe der DKR von Benzoin durch 40 mg/mL Zr-TUD-1 in Abhängigkeit verschiedener Mengen von Acc-LipTL in Toluol bei 50°C

Zunächst ist festzustellen, dass der *ee* bei einer Erhöhung der Acc-LipTL-Konzentration auf 40 mg/mL auf 97,5 % absinkt (von 98,5 % bei der Standardkonzentration von 20 mg/mL). Eine Verringerung der Enzymaktivität hat keinen Einfluss auf den *ee*, was im Prinzip als weitere Bestätigung der nicht selektiven Umesterung durch Zr-TUD-1 angesehen werden kann. Die Erhöhung der Acc-LipTL Menge hat jedoch vor allem zur Folge, dass die

Reaktionszeit auf lediglich 3 h verkürzt werden konnte. Generell ist der Einfluss der sich ändernden Acc-LipTL Menge sehr stark, erreicht aber offensichtlich bei etwa 40 mg/mL eine Konzentration, die bei gegebener Zr-TUD-1 -Konzentration das Maximum zur Beibehaltung hoher *ee* bedeutet.

Es lässt sich erneut besonders herausstellen, dass bei einer Produktspezifikation mit einem gewünschtem *ee* von >97 %, Zr-TUD-1 eine hohe Eignung für eine technisch durchgeführte DKR besitzt. Eine Verringerung des Zr-TUD-1 auf vergleichsweise niedrige Katalysatorkonzentrationen führt zu sehr guten DKR-Ergebnissen. Zudem ist die Racemisierungsgeschwindigkeit ausreichend groß, um auch bei einer Verdopplung der Acc-LipTL-Konzentration hervorragende *ee* zu garantieren.

3.6.4 Rezyklierung

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Acc-LipTL eine Prozessstabilität von ca. 3,5 h in Toluol und ca. 5,5 h in 2-MeTHF aufweist. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass die im kontinuierlichen Prozess bestimmten Halbwertszeiten um etwa 50 % kleiner sind, als die bei wiederholten Batch-Versuchen erhaltenen Daten.

Es wurden folgend wiederholte DKR-Batches der unterschiedlichen Acc-LipTL-Immobilisate (modifiziert und nativ) ausgeführt. Es war dadurch möglich, einen direkten Vergleich zur Arbeit von Hoyos *et al.* [89] herzustellen und damit das Potential des hier erarbeiteten Reaktionssystems besser zu bewerten. In Anbetracht der Halbwertszeiten war bei der Auslegung der Rezyklierung unter Verwendung der Standardparameter (40 mg/mL Zr-TUD-1; 20 mg/mL Acc-LipTL, 50 °C) eine signifikante Verringerungen des Umsatzes bereits nach dem ersten Zyklus anzunehmen, zumal die Halbwertszeitbestimmungen bei Raumtemperatur durchgeführt wurden und die DKR bei 50 °C abläuft. In diesem Fall können zwei unterschiedliche Strategien angewandt werden, um diesem Umstand entgegen zu wirken:

- » Zugabe einer definierten Menge Acc-LipTL nach jedem Zyklus um eine Deaktivierung auszugleichen.
- » Verlängerung der Reaktionszeit der Zyklen, um sinkende Umsätze auszugleichen. Beendigung der Rezyklisierung, wenn Umsatz unter eine definierte Grenze abfällt.

Beide Möglichkeiten haben sowohl Vor- als auch Nachteile und sind entsprechend der Prozessvorgaben auszuwählen. Dabei spielt im größeren Maßstab vor allem die Verfügbarkeit der Katalysatoren eine entscheidende Rolle. Da eine ressourcensparende Arbeitsweise anzustreben ist, wurden folgend nach dem ersten Zyklus die Reaktionszeiten der weiteren Zyklen so lange erhöht, dass entweder ein Umsatz von > 98 % nachgewiesen werden konnte oder die Reaktionszeit eine Dauer von maximal 24 h erreicht hatte. Die zu Beginn des ersten Zyklus hergestellten Schlenkbedingungen konnten für alle weiteren Durchgänge nicht aufrecht erhalten werden, da ein „Lösungsmittel-Trocknen“ der Katalysatoren durch das Anlegen des Vakuums und des darauffolgenden Verdampfen des Lösungsmittels verhindert werden sollte. Die zu erwartende Deaktivierung der Acc-LipTL durch ein „Trocknen“, welche sich in Vorarbeiten andeutete, wäre ein größerer Nachteil als ein möglicher Verlust von Racemisierungsaktivität infolge fehlender Schlenkbedingungen. Es ist zudem nicht bekannt, wie stark der Einfluss der Feuchtigkeit, welche sich maximal im Waschprozess aus der Umgebungsluft im Reaktionsansatz festsetzen kann, tatsächlich auf die Racemisierungsgeschwindigkeit ist.

Zunächst wurden die Ergebnisse aus den Prozessstabilitätsmessungen in verschiedenen Lösungsmitteln in der DKR validiert. Dazu wurden mehrere DKR-Zyklen unter Verwendung von Acc-LipTL und Zr-TUD-1 sowohl in 2-MeTHF als auch in Toluol durchgeführt. Wie oben beschrieben, wurden die Reaktionszeiten auf den Umsatz angepasst. Dabei wurden die Zyklen immer dann beendet, wenn die DKR in einem der Lösungsmittel den geforderten Umsatz erreicht hat.

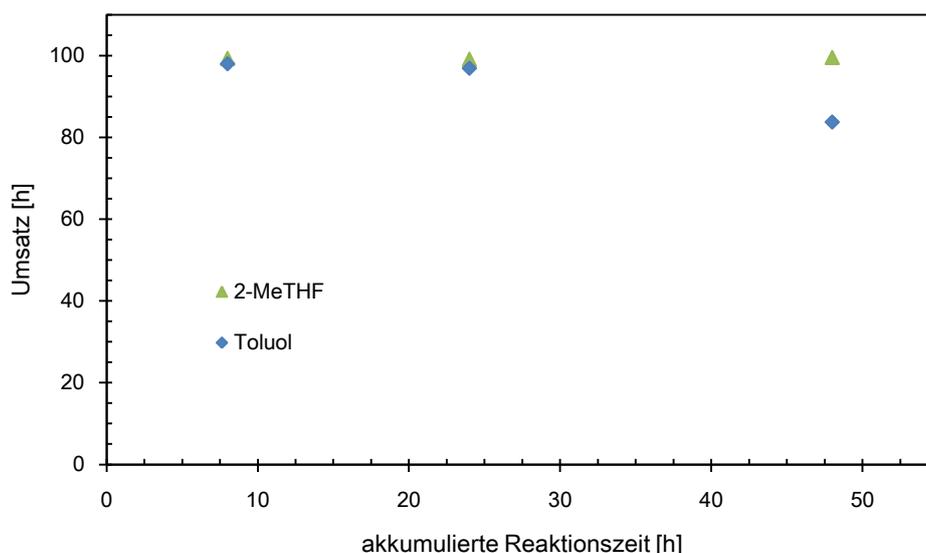


Abbildung 53: Umsatzveränderung der DKR von Benzoin mit Acc-LipTL und Zr-TUD-1 in Toluol und 2-MeTHF bei 50°C in wiederholten Reaktionszyklen

Abbildung 53 zeigt die Entwicklung der DRK-Umsätze in 2-MeTHF und Toluol, welche über der akkumulierten Reaktionszeit aufgetragen wurden. Die bereits in Kapitel 3.3.3.3 erhaltenen Ergebnisse bestätigen sich in den hier gezeigten Daten. Da aufgrund der Arbeiten von Ramanathan *et al.* [156] sowie Telalovic *et al.* [155] von einer sehr guten Rezyklierbarkeit des Zr-TUD-1 auszugehen ist, ist die Abnahme des Umsatzes einer Deaktivierung der Acc-LipTL zuzuschreiben. Somit war anzunehmen, dass es gegenüber einer DKR in Toluol eher in 2-MeTHF möglich sein sollte, über mehrere Zyklen hinweg höhere Umsätze zu erreichen. Auffällig dabei ist jedoch, dass Halbwertszeiten von ca. 3,5 - 5,5 h und auch wenn diese in wiederholten Batch-Versuchen um den Faktor zwei größer sind, nicht hätten darauf schließen lassen, dass nach einer akkumulierten Reaktionsdauer von 48 h Umsätze von 99,5 % in 2-MeTHF ($ee >97\%$) oder auch 83 % ($ee >98\%$) in Toluol möglich sind. An dieser Stelle kommt die Frage auf, ob eventuell der Unterschied zwischen der Prozessstabilität in wiederholten KR-Versuchen und dem kontinuierlichem Betrieb in 2-MeTHF und Toluol größer ist als in THF. Denkbar ist aber auch, dass es durch die Anwesenheit der Zr-TUD-1 zu einer stabilisierenden Wirkung auf Acc-LipTL kommt, die jedoch nicht ohne weiteres nachzuweisen ist. Die ausreichende Klärung dieses stabilisierenden Phänomens konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden.

Nichtsdestotrotz konnte bestätigt werden, dass 2-MeTHF das Lösungsmittel mit der höchsten Stabilität von Acc-LipTL ist. In Anbetracht dessen, dass es sich bei 2-MeTHF um ein aus nachwachsenden Rohstoffen hergestelltes Lösungsmittel handelt [161], sind diese Ergebnisse im Bezug auf eine technische Umsetzung des Prozesses sehr vielversprechend. Obwohl die Racemisierungsgeschwindigkeit in 2-MeTHF niedriger ist, ist dies als Lösungsmittel der Wahl für eine chemo-enzymatische DKR von Benzoin mit Acc-LipTL und Zr-TUD-1 ausdrücklich zu empfehlen.

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwiefern sich die durchgeführten Modifikationen des Acc-LipTL auf die Katalysatorstandzeit in der DKR auswirken. Es wurden die mit PEI, mPEG₅₀₀₀ und D40-10 modifizierten Immobilisate in der Rezyklierung der DKR verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden neben der Einhaltung der oben genannten Bedingungen zur Durchführung der Rezyklierung (>98 % Umsatz; max. 24h) und der Bestimmung der Umsätze am Ende der Zyklen auch der jeweilige Umsatz nach 8 h festgestellt und miteinander verglichen. Die Auftragung dieser 8 h-Umsätze über die akkumulierte Reaktionszeit gibt ein genaueres Bild über den Verlust der katalytischen Fähigkeit des jeweiligen Reaktionssystems (Abbildung 54).

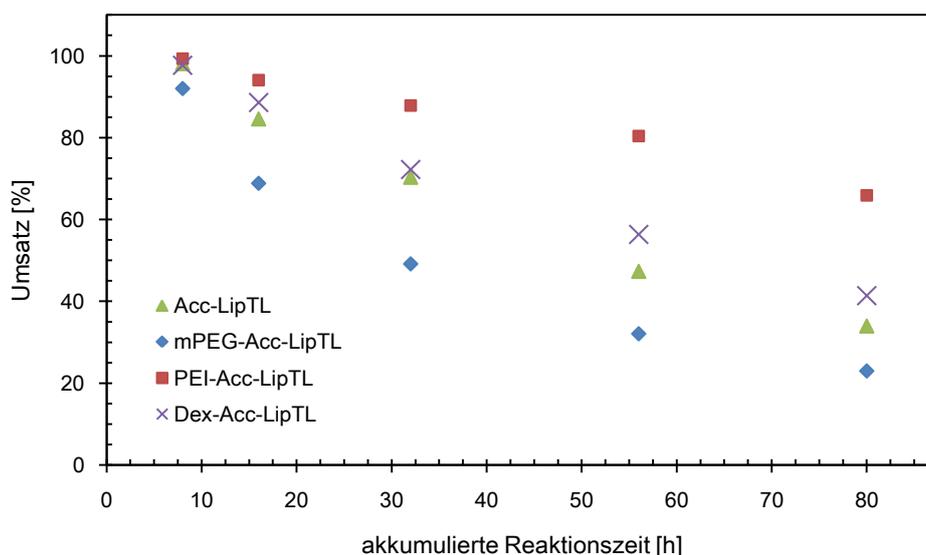


Abbildung 54: Umsatzveränderung nach 8 h des jeweiligen Zyklus in der Rezyklierung von Acc-LipTL sowie der mit mPEG, PEI und Dextran modifizierten Acc-LipTL-Varianten mit Zr-TUD-1 in 2-MeTHF bei 50°C

Wie in Abbildung 54 dargestellt, konnte für alle Immobilisate eine Abnahme des 8 h-Umsatzes festgestellt werden. Da auch hier davon ausgegangen wird, dass die Abnahme des Umsatzes vor allem durch eine Inaktivierung der Lipase TL begründet ist, sind etwaige Unterschiede einer erhöhten bzw. erniedrigten Stabilität der Acc-LipTL zuzuschreiben. So konnte im Vergleich zur nativen Form des Acc-LipTL vor allem für PEI eine signifikante Steigerung der Stabilität beobachtet werden. Dagegen führte die mPEG-Modifikation lediglich zu einer sehr geringen Verbesserung der Stabilität. Die Dextranmodifikation hatte im Vergleich gar eine Verschlechterung des Umsatzes im Verlauf der Rezyklierung zur Folge. Da die geringere Aktivität der D_{40-10} Acc-LipTL durch die Verwendung einer größeren Immobilisatmenge ausgeglichen wurde, kann dies als Ursache für die geringeren Umsätze ausgeschlossen werden. Die erhöhte Prozessstabilität der D_{40-10} Acc-LipTL, welche im kontinuierlichen Reaktor gefunden wurde, konnte hier nicht bestätigt werden. Über die tatsächlichen Gründe für die Stabilisierung bzw. Destabilisierung der modifizierten Acc-LipTL kann auch an dieser Stelle nur gemutmaßt werden. Neben den bereits zuvor diskutierten möglichen Auswirkungen der einzelnen Modifikationen auf die Lipase TL (siehe 3.4 und folgende Unterkapitel), soll hier ein möglicher weiterer Zusammenhang anderer Arbeiten und der hier erhöhten Stabilität hervor gehoben werden. Torres *et al.* [162] beschrieben infolge einer Beschichtung von Invertase-Immobilisaten mit PEI eine erhöhte Stabilität gegenüber sauren Reaktionsbedingungen. Obwohl die Immobilisierung der Lipase TL eine direkte Interaktion mit den Säurefunktionalitäten der Racemisierungskatalysatoren vermindern sollte, wurde auch von Ödman *et al.* [84] beschrieben, dass saure Racemisierungskatalysatoren eine Deaktivierung von immobilisierten Enzymen hervorrufen können. Obwohl der Mechanismus der Deaktivierung nicht bekannt ist, könnte ein Schutz vor eben dieser direkten Interaktion mit sauren Funktionalitäten durch das PEI den Zuwachs an Prozessstabilität begründen.

Die Abnahme der Aktivitäten führte im Verlauf der Rezyklierung dazu, dass die Reaktionszeit von 8 h im ersten Durchgang auf 16 h im zweiten und dann folgend auf 24 h in jedem weiteren Zyklus erhöht wurde. Abbildung 55 zeigt die Endumsätze der einzelnen Ansätze nach den genannten Zeiträumen über der akkumulierten Reaktionszeit. Aufgrund der erhöhten Reaktionsdauer konnte für alle Ansätze, bis auf die DKR mit D_{40-10} Acc-LipTL,

Umsätze von 98-99 % für die ersten drei Zyklen nachgewiesen werden. Erwartungsgemäß konnte dann ein signifikanter Abfall des Umsatzes für die nativen Acc-LipTL und $m\text{PEG}$ Acc-LipTL festgestellt werden. Für die DKR mit PEI Acc-LipTL wurde auch nach der fünften Wiederholung und einer Gesamtreaktionsdauer von 96 h keine Veränderung des Umsatzes gefunden. Der ee des Produktes war bei allen Ansätzen mit >98 % hervorragend und sogar geringfügig höher als in den Vorexperimenten in 2-MeTHF und Zr-TUD-1.

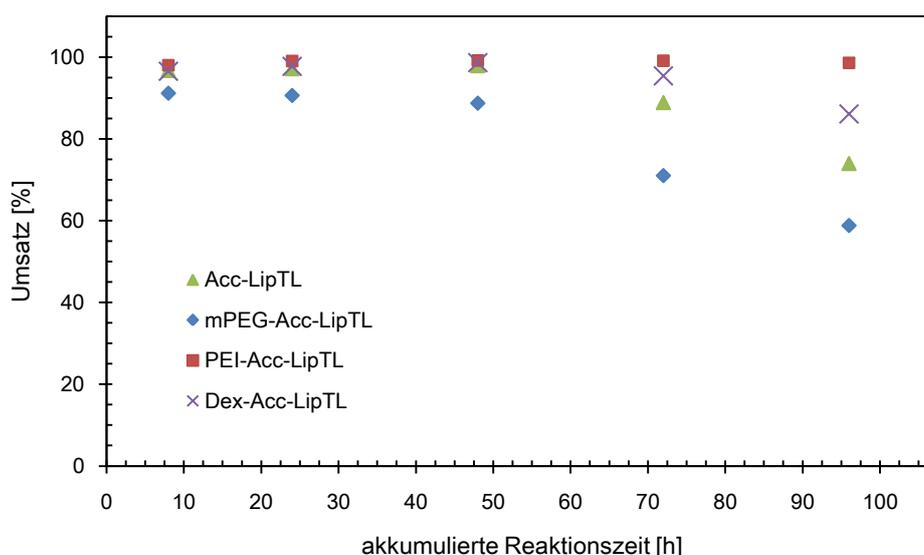


Abbildung 55: Endumsatz des jeweiligen Zyklus in der Rezyklierung von Acc-LipTL sowie der mit mPEG, PEI und Dextran modifizierten Acc-LipTL-Varianten mit Zr-TUD-1 in 2-MeTHF bei 50°C

Die hier erhaltenen Ergebnisse können als Beweis für eine problemlose Rezyklierbarkeit des Zr-TUD-1 angesehen werden. Außerdem wurden die Racemisierungskatalysatoren gemeinsam mit den jeweiligen Acc-LipTL-Varianten im Reaktionsgefäß durch mehrmaliges Zuführen und Abtrennen von frischem Lösungsmittel (2-MeTHF) vom vorherigen Reaktionsansatz getrennt und durch Zugabe der Substrate der nächste Durchgang direkt begonnen. Somit ist offensichtlich nicht zwingend notwendig, dass die DKR unter Schlenkbedingungen ausgeführt wird. Der Erhalt der Racemisierungsaktivität und die einfache Handhabung unterstreicht die generelle Eignung der Zr-TUD-1 für die DKR von Benzoin und hebt das große Potenzial zur Überführung des Prozesses in einen technischen Maßstab nochmals hervor. Die deutliche Verminderung der Deaktivierung der Acc-LipTL bewirkt als Folge der PEI-Modifikation eine Steigerung der Katalysatorstandzeit und erhöht

damit die insgesamt erreichbare Ausbeute des DKR-Prozesses. Hoyos *et al.* [89] berechneten die Menge des synthetisierten Benzoinbutyrats im Verhältnis zur eingesetzten Proteinmenge, um somit die Steigerung der Effizienz der DKR infolge der Immobilisierung in statischen Suspensionen zu verdeutlichen. Abbildung 56 greift diese Berechnung auf und zeigt die Menge Benzoinbutyrat pro Menge gebundenem Protein bei Verwendung der PEI-Acc-LipTL .

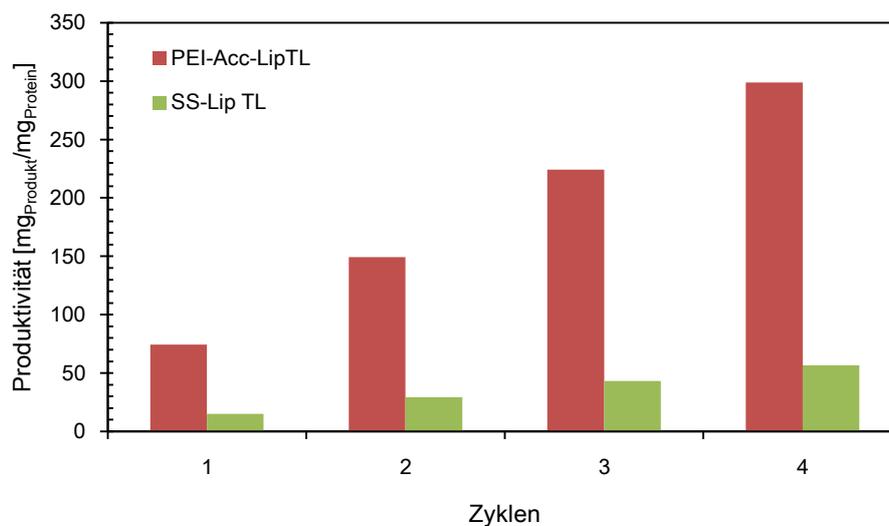


Abbildung 56: Vergleich der Produktivität der mit PEI modifizierten Acc-LipTL-Variante und der statischen Suspensionen aus Hoyos *et al.* [89] in Abhängigkeit der Zyklenzahl [89]

Es konnte eine deutliche Steigerung der Effizienz in der wiederholten DKR von Benzoin durch den Einsatz von PEI-Acc-LipTL erreicht werden. Dies ist zum einen auf die Erhöhung der spezifischen Proteinaktivität nach Optimierung der Lipase TL-Immobilisierung auf Accurel und zum anderen auf die Steigerung der Stabilität der Acc-LipTL nach Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Durchführung der PEI-Modifikation zurückzuführen. So ist bei der alternativen Verwendung von PEI-Acc-LipTL anstelle der Statischen Suspension und der Verwendung von 2-MeTHF anstatt THF möglich, fast sechsmal mehr Benzoinbutyrat pro gebundenes Protein nach vier Zyklen zu produzieren. Dabei ist nochmals darauf hinzuweisen, dass nur die initiale Menge Zr-TUD-1 verwendet werden musste und keine Zugabe neuen Katalysators, wie bei der Verwendung des Shvo-Katalysators, nötig wurde.

4 Zusammenfassung

Die dynamisch kinetische Racematspaltung (DKR) ist eine elegante und effiziente Methode zur Herstellung chiraler α -Hydroxyketone, welche aus Sicht der pharmazeutischen Industrie sehr interessant sind. Zur Synthese von Benzoin, dem einfachsten aromatischen α -Hydroxyketon, mittels DKR wurde bisher über ein System mit der in Silikon immobilisierten Lipase TL und einem Übergangsmetallkatalysator (Shvo-Katalysator) berichtet [89]. Obwohl hohe Umsätze (max. 87 %) bei sehr hohen *ee* (99%) mit diesem System erreicht werden können, ist die technische Anwendbarkeit dieser Kombination sehr begrenzt. Die Immobilisate weisen Schwächen in der Handhabbarkeit sowie der reproduzierbaren Herstellung auf und der Racemisierungskatalysator ist sehr sensitiv gegenüber Sauerstoff und Wasser.

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung der DKR von Benzoin, was im Rahmen dieser Studie durch zwei Teilprojekte realisiert werden sollte: (1) Die Optimierung der kinetischen Racematspaltung sowohl auf der Seite der Biokatalysatorentwicklung als auch in der Prozessparameteroptimierung und (2) die Entwicklung einer alternativen Racemisierungsmethode zur „onepot“ DKR von Benzoin. Abschluss findet die Arbeit in der Charakterisierung der DKR unter Verwendung des neuen Reaktionssystems und dem Vergleich zum bisherigen Stand der Technik.

Für die Immobilisierung der Lipase TL wurde die Methode der adsorptiven Trägerbindung ausgewählt und auf den hydrophoben Materialien Accurel MP1001 und Sepabeads EC-OD angewandt. Es wurde folgend der Einfluss variabler Parameter der adsorptiven Immobilisierung untersucht. Dazu zählten Proteinstartkonzentration, Temperatur, Pufferkonzentration und pH-Wert der Immobilisierungslösung. Es konnte für Accurel ein starker Anstieg der Beladungsdichte und der spezifischen Trägeraktivität bei Erhöhung der Proteinstartkonzentration bis 60 mg/mL nachgewiesen werden. Die spezifische Proteinaktivität der Acc-LipTL stieg bis zu einer Startkonzentration von 30 mg/mL ebenfalls an, blieb jedoch folgend konstant. Das Sepabead-Material zeigte eine ähnliche Abhängigkeit wie Accurel gegenüber der Proteinstartkonzentration, wies jedoch eine um den Faktor acht niedrigere Aktivität als Acc-LipTL auf. Aufgrund dessen wurde die Immobilisierung auf

Sepabeads nicht weiter betrachtet. Sowohl die Erhöhung der Temperatur, als auch die Steigerung der Pufferkonzentration konnten die Beladungsdichte und die spezifische Aktivität der Acc-LipTL weiter steigern. Der pH-Wert zeigte keinen signifikanten Einfluss. So konnten letztendlich die optimalen Immobilisierungsbedingungen: 30 mg/mL Lipasekonzentration, 40 °C Immobilisierungstemperatur, 200 mM Kaliumphosphatpuffer mit pH 6,2 definiert werden, bei denen Acc-LipTL eine spezifische Trägeraktivität von 24,7 U/mg_{Träger} und eine spezifische Proteinaktivität von 1437 U/mg_{Protein} aufwies. Dies bedeutet eine um Faktor 4,1 höhere Aktivität als das native Lipase TL-Pulver und eine signifikante Steigerung der Aktivität gegenüber der statischen Suspension von Hoyos *et al.* [89]. Die Beschichtung der Acc-LipTL mit unterschiedlichen Mengen Silikon zeigte keine Beeinflussung der Aktivität, aber eine signifikante Stabilisierung gegenüber mechanischen Einflüssen.

Die Charakterisierung der kinetischen Racematspaltung umfasste die Untersuchung der Aktivität, Lagerstabilität und Prozessstabilität der Acc-LipTL. Bezüglich der Aktivität konnte eine niedrige Wasseraktivität als positiv ermittelt werden. Die Trocknung der Lösungsmittel über Molsieben und eine Lagerung der Acc-LipTL bei sehr trockenen Bedingungen ermöglichten hier das Maximum der Aktivität. In der Untersuchung alternativer Lösungsmittel ermöglichten 2-MeTHF und Toluol höhere Aktivitäten als im Standardsystem THF. Eine darauffolgende Untersuchung der Temperatursteigerung in diesen drei Lösungsmitteln brachten Maxima bei 50 °C für THF, 60 °C für 2-MeTHF und sogar >99 °C für Toluol hervor. Die Aktivität von Toluol war bei der maximalen Temperatur über 800 % höher als bei Raumtemperatur. Eine Abschwächung des Aktivitätsanstieges wies jedoch auf eine Deaktivierung bei hohen Temperaturen hin, was folgend in der Ermittlung der Lagerstabilität deutlich nachgewiesen werden konnte. Die Lagerstabilitätsmessungen dienten des Weiteren zur isolierten Betrachtung des Einflusses der Edukte und Produkte auf die Stabilität der Acc-LipTL. Es konnte keine Inaktivierung, sondern eher eine leichte Stabilisierung in Anwesenheit der Edukte bzw. Produkte gezeigt werden. Dabei erwies sich auch das Nebenprodukt Acetaldehyd als nicht schädlich. Die Untersuchung der Lagerstabilitäten in verschiedenen Lösungsmitteln wiesen die hydrophoben Lösungsmittel MIBK und Toluol als stark stabilisierend aus (Halbwertszeit >90 h), wobei auch alle anderen Solventien eine erhöhte

Lagerstabilität im Vergleich zu THF (Halbwertszeit 12,7 h) aufwiesen. Eine erhöhte Lagerstabilität konnte für Toluol auch bei 50 °C nachgewiesen werden. Zur Ermittlung der Prozessstabilität wurden sowohl wiederholte Batch-Versuche als auch Versuche in einem kontinuierlichen Prozess durchgeführt. In den wiederholten Batch-Versuchen konnte für Acc-LipTL in THF eine Halbwertszeit von 5,5 h und in dem hier entwickelten kontinuierlichen Reaktorsystem eine Halbwertszeit von 2,2 h ermittelt werden. Die Unterschiede zur höheren Lagerstabilität wurden dabei vor allem den komplexen Einflüssen des Prozesses und der nicht kontrollierten Wasseraktivität zugeschrieben. Beim Vergleich der Lösungsmittel im kontinuierlichen Prozess erwies sich 2-MeTHF als besonders stabilisierend, indem die Halbwertszeit auf 5,6 h erhöht werden konnte.

Zur nachträglichen Stabilisierung der Acc-LipTL wurden etablierte Protokolle genutzt, um sowohl Amino- als auch Carboxylfunktionen der Aminosäureseitenketten zu modifizieren und mit Polyethylenimin eine physikalische Modifikation anzuwenden. Neben überwiegend sehr hohen Restaktivitäten nach den jeweiligen Modifikationen, konnten erneut signifikante Unterschiede zwischen der Lager- und Prozessstabilität festgestellt werden. Auf Basis der prozessnahen Untersuchungen im kontinuierlichen Reaktor wurden PEI, mPEG und eine Dextranmodifikation als die Methoden identifiziert, die die Stabilität gegenüber den komplexen Inaktivierungseinflüssen signifikant erhöhen können. Es konnten jeweils mehr als doppelt so hohe Halbwertszeiten im Vergleich zum nativen Acc-LipTL ermittelt werden.

Das Screening nach alternativen Racemisierungskatalysatoren wurde sowohl auf Basis publizierter heterogener Katalysatoren durchgeführt, die eine Eignung der Racemisierung von sekundären Alkoholen zeigen, als auch auf Grundlage einer Reihe an der TU Delft (NL) neuentwickelter Katalysatoren. Unter allen getesteten Materialien stellten sich die sogenannten TUD-1 Materialien und dabei insbesondere Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) und Al-TUD-1 (Si/Al=4) als außerordentlich aktiv heraus. Weitere Untersuchungen ergaben eine starke Temperaturabhängigkeit und eine Neigung zur Katalyse einer nicht selektiven Umesterung von Benzoin. Wohingegen Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) eine minimale Aktivität dahingehend aufwies, wurde für Al-TUD-1 (Si/Al=4) bei erhöhten Temperaturen eine starke Umesterungsaktivität

gefunden. Eine Racemisierung des gebildeten Esters konnte ausgeschlossen werden, genau wie die Beeinflussung der Racemisierungsgeschwindigkeit durch die Anwesenheit des Esters.

Es konnte folgend erfolgreich eine „onepot“ – Kombination der TUD-1 Katalysatoren und der Acc-LipTL in der DKR von Benzoin gezeigt werden. Dabei wurden erneut 2-MeTHF und Toluol als die geeignetsten Lösungsmittel ermittelt. So konnte erstmals eine DKR von Benzoin innerhalb von 5 h mit einem Umsatz von >98 % und einem *ee* von >98 % durchgeführt werden. Die Erhöhung der Temperatur erniedrigte die Reaktionszeit nochmals, wobei dabei eine Reduzierung des *ee* festgestellt wurde. Die Variation der Katalysatorverhältnisse hingegen bewirkte eine minimale Reaktionszeit von 4 h bei einem Umsatz von >98 % und einem *ee* von >97 % mit Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) und Acc-LipTL. Die Untersuchung der Rezyklierung der DKR unter Verwendung des Zr-TUD-1 (Si/Zr=25) und der modifizierten Acc-LipTL (PEI, mPEG, Dextran) sowie des nativen Acc-LipTL ergaben eine sehr gute Wiederverwendbarkeit des Reaktionssystems. Es konnte eine Steigerung der Stabilität der mit PEI und mPEG modifizierten Acc-LipTL nachgewiesen werden. Mit _{PEI}Acc-LipTL konnte die DKR unter Verlängerung der Reaktionszyklen mindestens fünfmal wiederholt werden, ohne dass der Umsatz unter 98 % sank. Es wurden jeweils *ee*'s von >98 % erreicht. Der Vergleich der Reaktionseffizienz gegenüber dem System von Hoyos *et al.* [89] ergab eine sechsfach höhere Produktausbeute pro immobilisiertes Protein, wobei nur die initiale Menge Racemisierungskatalysator verwendet wurde.

Literaturverzeichnis

1. **Azerad, R.**, *Application of Biocatalysts in Organic-Synthesis*. Bulletin De La Societe Chimique De France, **1995**. 132(1): p. 17-51.
2. **Bommarius, A.S. and B.R. Riebel**, *Biocatalysis*. **2004**, Weinheim ; Cambridge: Wiley-VCH. xxiii, 611 p.
3. **Faber, K.**, *Biotransformations in organic chemistry*. 5th rev. & corr. ed. **2004**, Berlin ; New York: Springer. xi, 454 p.
4. **Liese, A., K. Seelbach, and C. Wandrey**, *Industrial biotransformations*. 2nd completely rev. and extended ed. **2006**, Weinheim: Wiley-VCH. xiv, 556 p.
5. **Doukyu, N. and H. Ogino**, *Organic solvent-tolerant enzymes*. Biochemical Engineering Journal, **2010**. 48(3): p. 270-282.
6. **Illanes, A., et al.**, *Recent trends in biocatalysis engineering*. Bioresource Technology, **2012**. 115: p. 48-57.
7. **Klibanov, A.M.**, *Improving enzymes by using them in organic solvents*. Nature, **2001**. 409(6817): p. 241-246.
8. **Carrea, G. and S. Riva**, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*. **2008**, Weinheim: Wiley-VCH. xvii, 310 p.
9. **Zaks, A. and A.M. Klibanov**, *Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100-Degrees-C*. Science, **1984**. 224(4654): p. 1249-1251.
10. **Gorman, L.A.S. and J.S. Dordick**, *Organic-Solvents Strip Water Off Enzymes*. Biotechnology and Bioengineering, **1992**. 39(4): p. 392-397.
11. **Carrea, G. and S. Riva**, *Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents*. Angewandte Chemie-International Edition, **2000**. 39(13): p. 2226-2254.
12. **Dabulis, K. and A.M. Klibanov**, *Dramatic Enhancement of Enzymatic-Activity in Organic-Solvents by Lyoprotectants*. Biotechnology and Bioengineering, **1993**. 41(5): p. 566-571.
13. **Persson, M., et al.**, *Preparation of lipases for use in organic solvents*. Enzyme and Microbial Technology, **2002**. 31(6): p. 833-841.
14. **Fitzpatrick, P.A. and A.M. Klibanov**, *How Can the Solvent Affect Enzyme Enantioselectivity*. Journal of the American Chemical Society, **1991**. 113(8): p. 3166-3171.

15. **Wescott, C.R., H. Noritomi, and A.M. Klibanov**, *Rational control of enzymatic enantioselectivity through solvation thermodynamics*. Journal of the American Chemical Society, **1996**. 118(43): p. 10365-10370.
16. **Halling, P.J.**, *Biocatalysis in low-water media: understanding effects of reaction conditions*. Current Opinion in Chemical Biology, **2000**. 4(1): p. 74-80.
17. **Saxena, R.K., et al.**, *Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry*. Current Science, **1999**. 77(1): p. 101-115.
18. **Brady, D. and J. Jordaan**, *Advances in enzyme immobilisation*. Biotechnology Letters, **2009**. 31(11): p. 1639-1650.
19. **Fagain, C.**, *Understanding and Increasing Protein Stability*. Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology, **1995**. 1252(1): p. 1-14.
20. **Garcia-Galan, C., et al.**, *Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance*. Advanced Synthesis & Catalysis, **2011**. 353(16): p. 2885-2904.
21. **O'Fagain, C.**, *Enzyme stabilization - recent experimental progress*. Enzyme and Microbial Technology, **2003**. 33(2-3): p. 137-149.
22. **Reetz, M.T., A. Zonta, and J. Simpelkamp**, *Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials*. Biotechnology and Bioengineering, **1996**. 49(5): p. 527-534.
23. **Bosley, J.**, *Turning lipases into industrial biocatalysts*. Biochemical Society transactions, **1997**. 25(1): p. 174-8.
24. **Cao, L.**, *Carrier-bound immobilized enzymes : principles, applications and design*. **2005**, Weinheim: Wiley-VCH. xv, 563 p.
25. **Wiemann, L.O., et al.**, *Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers*. Chemcatchem, **2009**. 1(4): p. 455-462.
26. **Hanefeld, U., L. Gardossi, and E. Magner**, *Understanding enzyme immobilisation*. Chemical Society Reviews, **2009**. 38(2): p. 453-468.
27. **Mateo, C., et al.**, *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology, **2007**. 40(6): p. 1451-1463.
28. **Cao, L.Q., F. van Rantwijk, and R.A. Sheldon**, *Cross-linked enzyme aggregates: A simple and effective method for the immobilization of penicillin acylase*. Organic Letters, **2000**. 2(10): p. 1361-1364.

29. **Sheldon, R.A.**, *Cross-linked enzyme aggregates (CLEA (R) s): stable and recyclable biocatalysts*. Biochemical Society Transactions, **2007**. 35: p. 1583-1587.
30. **Adamczak, M. and S.H. Krishna**, *Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis*. Food Technology and Biotechnology, **2004**. 42(4): p. 251-264.
31. **Akgol, S., et al.**, *Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol microspheres*. Food Chemistry, **2001**. 74(3): p. 281-288.
32. **Hungerhoff, B., H. Sonnenschein, and F. Theil**, *Separation of enantiomers by extraction based on lipase-catalyzed enantiomer-selective fluoros-phase labeling*. Angewandte Chemie-International Edition, **2001**. 40(13): p. 2492-+.
33. **Gascoyne, D.G., et al.**, *Molecular basis for enantioselectivity of lipase from Chromobacterium viscosum toward the diesters of 2,3-dihydro-3-(4'-hydroxyphenyl)-1,1,3-trimethyl-1H-inden-5-ol*. Journal of Organic Chemistry, **2001**. 66(9): p. 3041-3048.
34. **Henke, E., et al.**, *Lipase-catalyzed resolution of ibuprofen*. Monatshefte Fur Chemie, **2000**. 131(6): p. 633-638.
35. **Klibanov, A.M.**, *Enzyme-Catalyzed Processes in Organic-Solvents*. Annals of the New York Academy of Sciences, **1987**. 501: p. 129-129.
36. **Watanabe, K. and S. Ueji**, *Dimethyl sulfoxide as a co-solvent dramatically enhances the enantioselectivity in lipase-catalysed resolutions of 2-phenoxypropionic acyl derivatives*. Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1, **2001**(12): p. 1386-1390.
37. **Iding, H., B. Wirz, and M. Rogers-Evans**, *Chemo-enzymatic preparation of chiral 3-aminopyrrolidine derivatives*. Tetrahedron, **2004**. 60(3): p. 647-653.
38. **Wasserscheid, P. and W. Keim**, *Ionic liquids - New "solutions" for transition metal catalysis*. Angewandte Chemie-International Edition, **2000**. 39(21): p. 3772-3789.
39. **Kragl, U., M. Eckstein, and N. Kaftzik**, *Enzyme catalysis in ionic liquids*. Current Opinion in Biotechnology, **2002**. 13(6): p. 565-571.
40. **Leitner, W. and P.G. Jessop**, *Chemical synthesis using supercritical fluids*. **1999**, Weinheim ; New York: Wiley-VCH. xx, 480 p.
41. **Chmiel, H.**, *Bioprozesstechnik*. **1991**: G. Fischer.
42. **Dalby, P.A.**, *Optimising enzyme function by directed evolution*. Current Opinion in Structural Biology, **2003**. 13(4): p. 500-505.
43. **Hibbert, E.G. and P.A. Dalby**, *Directed evolution strategies for improved enzymatic performance*. Microbial Cell Factories, **2005**. 4.

44. **Russell, A.J. and A.M. Klibanov**, *Inhibitor-Induced Enzyme Activation in Organic-Solvents*. *Journal of Biological Chemistry*, **1988**. 263(24): p. 11624-11626.
45. **Iyer, P.V. and L. Ananthanarayan**, *Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment*. *Process Biochemistry*, **2008**. 43(10): p. 1019-1032.
46. **Davis, B.G.**, *Chemical modification of biocatalysts*. *Current Opinion in Biotechnology*, **2003**. 14(4): p. 379-386.
47. **DeSantis, G. and J.B. Jones**, *Chemical modification of enzymes for enhanced functionality*. *Current Opinion in Biotechnology*, **1999**. 10(4): p. 324-330.
48. **Rodriguez-Martinez, J.A., et al.**, *Stabilization of alpha-Chymotrypsin Upon PEGylation Correlates With Reduced Structural Dynamics*. *Biotechnology and Bioengineering*, **2008**. 101(6): p. 1142-1149.
49. **van den Wittenboer, A., et al.**, *Systematic assessment of the stability of benzaldehyde lyase in aqueous-organic biphasic systems and its stabilization by modification with methoxy-poly(ethylene) glycol*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2010**. 67(3-4): p. 208-213.
50. **Means, G.E. and R.E. Feeney**, *Chemical Modifications of Proteins: History and Applications*. *Bioconjugate Chemistry*, **1990**. 1(1): p. 2-12.
51. **Tanaka, T., M. Kawase, and S. Tani**, *alpha-hydroxyketones as inhibitors of urease*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2004**. 12(2): p. 501-505.
52. **Mohan, J. and D. Khatter**, *Heterocyclic systems containing bridgehead nitrogen atom: Synthesis and evaluation of bioactivity of s-triazolo [3,4-b] [1,3,4] thiadiazoles, s-triazolo [3,4-b] thiadiazines*. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, **2002**. 12(1): p. 45-48.
53. **Pei, W.W., et al.**, *Convenient syntheses of 2-alkyl(aryl)-4,5-diphenyloxazoles and 2-alkyl(aryl)-4-phenyloxazoles*. *Synthesis-Stuttgart*, **1998**(9): p. 1298-1304.
54. **Abdou, W.M., Y.O. El-Khoshnieh, and A.A. Kamel**, *Condensation of alpha-hydroxy ketones with phosphorus ylides: A convenient synthesis of linear heterocyclic formation*. *Heteroatom Chemistry*, **1999**. 10(6): p. 481-487.
55. **Elmir, A.S., et al.**, *Fusarium roseum and Aspergillus oryzae-mediated enantioselective reduction of benzils to benzoins*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2008**. 55(3-4): p. 164-168.
56. **Hoyos, P., et al.**, *Biocatalytic Strategies for the Asymmetric Synthesis of alpha-Hydroxy Ketones*. *Accounts of Chemical Research*, **2010**. 43(2): p. 288-299.
57. **Arai, T., et al.**, *Direct alpha-hydroxylation of ketones catalyzed by organic-inorganic hybrid polymer*. *Chemistry Letters*, **2006**. 35(10): p. 1094-1095.

-
58. **Plietker, B.**, *RuO₄-catalyzed ketohydroxylation of olefins*. The Journal of organic chemistry, **2003**. 68(18): p. 7123-5.
59. **Onomura, O., et al.**, *Asymmetric oxidation of 1,2-diols using N-bromosuccinimide in the presence of chiral copper catalyst*. Tetrahedron Letters, **2007**. 48(49): p. 8668-8672.
60. **Toukoniitty, E., et al.**, *Enantioselective hydrogenation of 1-phenyl-1,2-propanedione*. Journal of Catalysis, **2001**. 204(2): p. 281-291.
61. **Alamsetti, S.K., P. Muthupandi, and G. Sekar**, *Chiral Cobalt-Catalyzed Enantiomer-Differentiating Oxidation of Racemic Benzoin by Using Molecular Oxygen as Stoichiometric Oxidant*. Chemistry-a European Journal, **2009**. 15(22): p. 5424-5427.
62. **Enders, D., et al.**, *N-heterocyclic carbene catalysed asymmetric cross-benzoin reactions of heteroaromatic aldehydes with trifluoromethyl ketones*. Chemical Communications, **2010**. 46(34): p. 6282-6284.
63. **de Maria, P.D., et al.**, *Asymmetric synthesis of aliphatic 2-hydroxy ketones by enzymatic carbonylation of aldehydes*. European Journal of Organic Chemistry, **2007**(18): p. 2940-2944.
64. **Dunkelmann, P., et al.**, *Development of a donor-acceptor concept for enzymatic cross-coupling reactions of aldehydes: The first asymmetric cross-benzoin condensation*. Journal of the American Chemical Society, **2002**. 124(41): p. 12084-12085.
65. **Bortolini, O., et al.**, *Kinetic resolution of vic-diols by Bacillus stearothermophilus diacetyl reductase*. Tetrahedron-Asymmetry, **1998**. 9(4): p. 647-651.
66. **Konishi, J., H. Ohta, and G. Tsuchihashi**, *Asymmetric Reduction of Benzil to Benzoin Catalyzed by the Enzyme-System of a Microorganism*. Chemistry Letters, **1985**(8): p. 1111-1112.
67. **Saito, T., et al.**, *Asymmetric reduction of benzil to (S)-benzoin with whole cells of Bacillus cereus*. Applied Biochemistry and Biotechnology, **2003**. 111(3): p. 185-190.
68. **Demir, A.S., et al.**, *Fungal deracemization of benzoin*. Tetrahedron Letters, **2002**. 43(36): p. 6447-6449.
69. **Demir, A.S., et al.**, *Simple chemoenzymatic access to enantiopure pharmacologically interesting (R)-2-hydroxypropiophenones*. Tetrahedron-Asymmetry, **2001**. 12(13): p. 1953-1956.
70. **Hoyos, P., et al.**, *Dynamic kinetic resolution of benzoin by lipase-metal combo catalysis*. The Journal of organic chemistry, **2006**. 71(20): p. 7632-7.

71. **El Gihani, M.T. and J.M.J. Williams**, *Dynamic kinetic resolution*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**. 3(1): p. 11-15.
72. **Schnell, B., K. Faber, and W. Kroutil**, *Enzymatic racemisation and its application to synthetic biotransformations*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, **2003**. 345(6-7): p. 653-666.
73. **Ebbers, E.J., et al.**, *Controlled racemization of optically active organic compounds: Prospects for asymmetric transformation*. *Tetrahedron*, **1997**. 53(28): p. 9417-9476.
74. **Kim, M.J., et al.**, *Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols by enzyme-metal combinations in ionic liquid*. *Green Chemistry*, **2004**. 6(9): p. 471-474.
75. **Bogar, K., B. Martin-Matute, and J.E. Backvall**, *Large-scale ruthenium-and enzyme-catalyzed dynamic kinetic resolution of (rac)-1-phenylethanol*. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2007**. 3: p. -.
76. **Martin-Matute, B., et al.**, *Racemization of secondary alcohols catalyzed by cyclopentadienylruthenium complexes: Evidence for an alkoxide pathway by fast beta-hydride elimination - Readdition*. *Chemistry-a European Journal*, **2007**. 13(21): p. 6063-6072.
77. **Hoyos, P., et al.**, *Chemoenzymatic synthesis of chiral unsymmetrical benzoin esters*. *Tetrahedron*, **2011**. 67(38): p. 7321-7329.
78. **Larsson, A.L.E., B.A. Persson, and J.E. Backvall**, *Enzymatic resolution of alcohols coupled with ruthenium-catalyzed racemization of the substrate alcohol*. *Angewandte Chemie-International Edition*, **1997**. 36(11): p. 1211-1212.
79. **Ahn, Y., et al.**, *Racemization catalysts for the dynamic kinetic resolution of alcohols and amines*. *Coordination Chemistry Reviews*, **2008**. 252(5-7): p. 647-658.
80. **Martin-Matute, B. and J.E. Backvall**, *Dynamic kinetic resolution catalyzed by enzymes and metals*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2007**. 11(2): p. 226-232.
81. **Sturmer, R.**, *Enzymes and transition metal complexes in tandem - A new concept for dynamic kinetic resolution*. *Angewandte Chemie-International Edition* **1997**. 36(11): p. 1173-1174.
82. **Wuyts, S., et al.**, *A zeolite-enzyme combination for biphasic dynamic kinetic resolution of benzylic alcohols*. *Chemical Communications*, **2003**(15): p. 1928-1929.
83. **Costa, L.F.A., et al.**, *Zeolite screening for the racemization of 1-phenylethanol*. *Catalysis Today*, **2008**. 133: p. 625-631.
84. **Odman, P., L.A. Wessjohann, and U.T. Bornscheuer**, *Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of acylloins*. *Journal of Organic Chemistry*, **2005**. 70(23): p. 9551-9555.

-
85. **Zhu, Y.Z., et al.**, *Dynamic kinetic resolution of secondary alcohols combining enzyme-catalyzed transesterification and zeolite-catalyzed racemization*. Chemistry-a European Journal, **2007**. 13(2): p. 541-547.
86. **Lozano, P., et al.**, *Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of rac-1-phenylethanol in ionic liquids and ionic liquids/supercritical carbon dioxide systems*. Biotechnology letters, **2006**. 28(19): p. 1559-65.
87. **Easwar, S., et al.**, *Enantioselective enzymatic approach to (+)- and (-)-2-acetoxy/hydroxycyclopentanones*. Tetrahedron-Asymmetry, **2002**. 13(13): p. 1367-1371.
88. **Taniguchi, T., R.M. Kanada, and K. Ogasawara**, *Lipase-mediated kinetic resolution of tricyclic acyloins, endo-3-hydroxytricyclo[4.2.1.0(2,5)]non-7-en-4-one and endo-3-hydroxytricyclo[4.2.2.0(2,5)]dec-7-en-4-one*. Tetrahedron-Asymmetry, **1997**. 8(16): p. 2773-2780.
89. **Hoyos, P., et al.**, *Highly efficient one pot dynamic kinetic resolution of benzoin with entrapped Pseudomonas stutzeri lipase*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2008**. 52-3: p. 133-139.
90. **Hoyos, P., et al.**, *Optimised Dynamic Kinetic Resolution of benzoin by a chemoenzymatic approach in 2-MeTHF*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2011**. 72(1-2): p. 20-24.
91. **Blanco, R.M., et al.**, *Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2007**. 47(1-2): p. 13-20.
92. **Bradford, M.M.**, *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical Biochemistry, **1976**. 72(1-2): p. 248-254.
93. **Guisan, J.M., et al.**, *Preparation of new lipases derivatives with high activity-stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2001**. 11(4-6): p. 817-824.
94. **Bianchi, D., et al.**, *Effects of Chemical Modification on Stereoselectivity of Pseudomonas-Cepacia Lipase*. Tetrahedron-Asymmetry, **1993**. 4(5): p. 777-782.
95. **Ratzka, J., et al.**, *Stabilisation of the NAD(+)-reducing soluble [NiFe]-hydrogenase from Ralstonia eutropha H16 through modification with methoxy-poly(ethylene) glycol*. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, **2012**. 74(3-4): p. 219-223.
96. **Cabrera, Z., et al.**, *Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification*. Process Biochemistry, **2009**. 44(2): p. 226-231.

-
97. **Fernandez-Lafuente, R., et al.**, *Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: Dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents*. *Enzyme and Microbial Technology*, **1999**. 24(1-2): p. 96-103.
 98. **Wuyts, S., et al.**, *A heterogeneous Ru-hydroxyapatite catalyst for mild racemization of alcohols*. *Journal of Catalysis*, **2003**. 219(2): p. 417-424.
 99. **Wang, M.F., et al.**, *Enhancement of activity of cross-linked enzyme aggregates by a sugar-assisted precipitation strategy: Technical development and molecular mechanism*. *Journal of Biotechnology*, **2011**. 156(1): p. 30-38.
 100. **Buthe, A., et al.**, *Generation of lipase-containing static emulsions in silicone spheres for synthesis in organic media*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2005**. 35(4-6): p. 93-99.
 101. **Faure, N. and A. Illanes**, *Immobilization of Pseudomonas stutzeri Lipase for the Transesterification of Wood Sterols with Fatty Acid Esters*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2011**. 165(5-6): p. 1332-1341.
 102. **Palomo, J.M., et al.**, *Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from Bacillus thermocatenuatus by interfacial adsorption on hydrophobic supports*. *Biotechnology Progress*, **2004**. 20(2): p. 630-635.
 103. **Wiemann, L.O., et al.**, *Enzyme Stabilization by Deposition of Silicone Coatings*. *Organic Process Research & Development*, **2009**. 13(3): p. 617-620.
 104. **End, N. and K.U. Schoning**, *Immobilized biocatalysts in industrial research and production*. *Immobilized Catalysts*, **2004**. 242: p. 273-317.
 105. **Lehmann, S.V., et al.**, *Enzymatic resolution to (-)-ormeloxifene intermediates from their racemates using immobilized Candida rugosa lipase*. *Chirality*, **2000**. 12(7): p. 568-573.
 106. **Vorhaben, T., et al.**, *Plasma-Modified Polypropylene as Carrier for the Immobilization of Candida antarctica Lipase B and Pyrobaculum calidifontis Esterase*. *Chemcatchem*, **2010**. 2(8): p. 992-996.
 107. **Salis, A., et al.**, *Characterisation of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilisation*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2003**. 24-5: p. 75-82.
 108. **Cabrera, Z., et al.**, *Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from Candida antarctica B adsorbed on other hydrophobic supports*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2009**. 57(1-4): p. 171-176.

-
109. **Al-Duri, B. and Y.P. Yong**, *Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic and hydrophilic/hydrophobic supports*. *Biochemical Engineering Journal*, **2000**. 4(3): p. 207-215.
110. **Almeida, R.V., et al.**, *Immobilization of a recombinant thermostable esterase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification*. *Biochemical Engineering Journal*, **2008**. 39(3): p. 531-537.
111. **Sabbani, S., E. Hedenstrom, and O. Nordin**, *The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2006**. 42(1-2): p. 1-9.
112. http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/kaseihin/index_e.html, Website Meito Sangyo Co. Stand **08.01.2013**.
113. **Bastida, A., et al.**, *Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports*. *Biotechnology and Bioengineering*, **1998**. 58(5): p. 486-493.
114. **Palomo, J.M., et al.**, *Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2002**. 19: p. 279-286.
115. **Gitlesen, T., M. Bauer, and P. Adlercreutz**, *Adsorption of lipase on polypropylene powder*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1997**. 1345(2): p. 188-196.
116. **Blanco, R.M., et al.**, *Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization - Characterization of the support and the catalysts*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **2004**. 30(2): p. 83-93.
117. **Maraite, A., et al.**, *Lipase from *Pseudomonas stutzeri*: Purification, homology modelling and rational explanation of the substrate binding mode*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**. 87(0): p. 88-98.
118. **Bosley, J.A. and A.D. Peilow**, *Immobilization of lipases on porous polypropylene: Reduction in esterification efficiency at low loading*. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **1997**. 74(2): p. 107-111.
119. **Wehtje, E., P. Adlercreutz, and B. Mattiasson**, *Improved Activity Retention of Enzymes Deposited on Solid Supports*. *Biotechnology and Bioengineering*, **1993**. 41(2): p. 171-178.
120. **Andrade, J.D.**, *Surface and interfacial aspects of biomedical polymers*. **1985**, New York: Plenum Press.

121. **Queiroz, J.A., C.T. Tomaz, and J.M.S. Cabral**, *Hydrophobic interaction chromatography of proteins*. Journal of Biotechnology, **2001**. 87(2): p. 143-159.
122. **Dias-Cabral, A.C., et al.**, *The effects of ligand chain length, salt concentration and temperature on the adsorption of bovine serum albumin onto polypropyleneglycol-Sepharose*. Biomedical Chromatography, **2005**. 19(8): p. 606-616.
123. **Diogo, M.M., et al.**, *Hydrophobic interaction chromatography of Chromobacterium viscosum lipase on polypropylene glycol immobilised on Sepharose*. Journal of Chromatography A, **1999**. 849(2): p. 413-419.
124. **Porath, J.**, *Salt-Promoted Adsorption - Recent Developments*. Journal of Chromatography, **1986**. 376: p. 331-341.
125. **Wittmann, J.**, *Schaumfraktionierung einer bakteriellen Lipase*. **2000**: Herbert Utz Verlag.
126. **Lee, J.H., et al.**, *Effect of a buffer mixture system on the activity of lipases during immobilization process*. Bioresource Technology, **2010**. 101: p. S66-S70.
127. **Nieguth, R., et al.**, *Enabling Industrial Biocatalytic Processes by Application of Silicone-Coated Enzyme Preparations*. Advanced Synthesis & Catalysis, **2011**. 353(13): p. 2522-2528.
128. **Aoyagi, Y., et al.**, *Lipase TL (R)-mediated kinetic resolution of benzoin: facile synthesis of (1R,2S)-erythro-2-amino-1,2-diphenylethanol*. Tetrahedron Letters, **2000**. 41(52): p. 10159-10162.
129. **Degueilcastaing, M., et al.**, *Enzymatic-Reactions in Organic-Synthesis .2. Ester Interchange of Vinyl Esters*. Tetrahedron Letters, **1987**. 28(9): p. 953-954.
130. **Hanefeld, U.**, *Reagents for (ir) reversible enzymatic acylations*. Organic & Biomolecular Chemistry, **2003**. 1(14): p. 2405-2415.
131. **Valivety, R.H., P.J. Halling, and A.R. Macrae**, *Reaction-Rate with Suspended Lipase Catalyst Shows Similar Dependence on Water Activity in Different Organic-Solvents*. Biochimica Et Biophysica Acta, **1992**. 1118(3): p. 218-222.
132. **Halling, P.J.**, *Thermodynamic Predictions for Biocatalysis in Nonconventional Media - Theory, Tests, and Recommendations for Experimental-Design and Analysis*. Enzyme and Microbial Technology, **1994**. 16(3): p. 178-206.
133. **Vulfson, E.N., P.J. Halling, and H.L. Holland**, *Enzymes in nonaqueous solvents : methods and protocols*. Methods in biotechnology 15. **2001**, Totowa, NJ: Humana Press. xix, 679 p.

-
134. **Affleck, R., et al.**, *Enzymatic Catalysis and Dynamics in Low-Water Environments*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1992**. 89(3): p. 1100-1104.
135. **Haidacher, D., A. Vailaya, and C. Horvath**, *Temperature effects in hydrophobic interaction chromatography*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **1996**. 93(6): p. 2290-2295.
136. **Wehtje, E. and P. Adlercreutz**, *Lipases have similar water activity profiles in different reactions*. Biotechnology Letters, **1997**. 19(6): p. 537-540.
137. **Valivety, R.H., P.J. Halling, and A.R. Macrae**, *Rhizomucor-Miehei Lipase Remains Highly-Active at Water Activity Below 0.0001*. Febs Letters, **1992**. 301(3): p. 258-260.
138. **Bell, G., A.E.M. Janssen, and P.J. Halling**, *Water activity fails to predict critical hydration level for enzyme activity in polar organic solvents: Interconversion of water concentrations and activities*. Enzyme and Microbial Technology, **1997**. 20(6): p. 471-477.
139. **Laane, C., et al.**, *Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents*. Biotechnology and Bioengineering, **2009**. 102(1): p. 2-8.
140. **Ryu, K. and J.S. Dordick**, *How Do Organic-Solvents Affect Peroxidase Structure and Function*. Biochemistry, **1992**. 31(9): p. 2588-2598.
141. **Zaks, A. and A.M. Klibanov**, *The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media*. Journal of Biological Chemistry, **1988**. 263(17): p. 8017-8021.
142. **Bogar, K., et al.**, *Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of allylic alcohols: A highly enantioselective route to acyloin acetates*. Organic Letters, **2007**. 9(17): p. 3401-3404.
143. **Wuyts, S., et al.**, *Heterogeneous vanadium catalysts for racemization and chemoenzymatic dynamic kinetic resolution of benzylic alcohols*. Green Chemistry, **2007**. 9(10): p. 1104-1108.
144. **Franken, B., et al.**, *Mechanism of acetaldehyde-induced deactivation of microbial lipases*. BMC Biochemistry, **2011**. 12.
145. **Kaga, H., et al.**, *Stabilization of Candida Lipase against Acetaldehyde by Adsorption onto Celite*. Biotechnology Techniques, **1994**. 8(6): p. 369-374.
146. **Adachi, S. and T. Kobayashi**, *Synthesis of esters by immobilized-lipase-catalyzed condensation reaction of sugars and fatty acids in water-miscible organic solvent*. Journal of Bioscience and Bioengineering, **2005**. 99(2): p. 87-94.
147. **Baerns, M.**, *Technische Chemie: Lehrbuch*. **2006**: Wiley-VCH Verlag GmbH.

-
148. **Diaz-Rodriguez, A. and B.G. Davis**, *Chemical modification in the creation of novel biocatalysts*. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2011**. 15(2): p. 211-219.
149. **Gutarra, M.L.E., et al.**, *Enzyme Surface Glycosylation in the Solid Phase: Improved Activity and Selectivity of Candida Antarctica Lipase B*. *Chemcatchem*, **2011**. 3(12): p. 1902-1910.
150. **Fuentes, M., et al.**, *Determination of protein-protein interactions through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking*. *Proteomics*, **2004**. 4(9): p. 2602-2607.
151. **Kazan, D., H. Ertan, and A. Erarslan**, *Stabilization of Escherichia coli penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1997**. 48(2): p. 191-197.
152. **Conley, B.L., et al.**, *Discovery, Applications, and Catalytic Mechanisms of Shvo's Catalyst*. *Chemical Reviews*, **2010**. 110(4): p. 2294-2312.
153. **Martin-Matute, B., et al.**, *Combined ruthenium(II) and lipase catalysis for efficient dynamic kinetic resolution of secondary alcohols. Insight into the racemization mechanism*. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**. 127(24): p. 8817-8825.
154. **Persson, B.A., F.F. Huerta, and J.E. Backvall**, *Dynamic kinetic resolution of secondary diols via coupled ruthenium and enzyme catalysis*. *Journal of Organic Chemistry*, **1999**. 64(14): p. 5237-5240.
155. **Telalovic, S., et al.**, *TUD-1: synthesis and application of a versatile catalyst, carrier, material ...* *Journal of Materials Chemistry*, **2010**. 20(4): p. 642-658.
156. **Ramanathan, A., et al.**, *Zr-TUD-1: A lewis acidic, three-dimensional, mesoporous, zirconium-containing catalyst*. *Chemistry-a European Journal*, **2008**. 14(3): p. 961-972.
157. **Taniguchi, T. and K. Ogasawara**, *Lipase-triethylamine-mediated dynamic transesterification of a tricyclic acyloin having a latent meso-structure: A new route to optically pure oxodicyclopentadiene*. *Chemical Communications*, **1997**(15): p. 1399-1400.
158. **Wuyts, S., et al.**, *Acid zeolites as alcohol racemization catalysts: Screening and application in biphasic dynamic kinetic resolution*. *Chemistry-a European Journal*, **2004**. 11(1): p. 386-397.
159. **Parvulescu, A., et al.**, *Heterogeneous Catalysts for Racemization and Dynamic Kinetic Resolution of Amines and Secondary Alcohols*. *Topics in Catalysis*, **2010**. 53(13-14): p. 931-941.
160. **Schuchardt, U., R. Sercheli, and R.M. Vargas**, *Transesterification of vegetable oils: a review*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **1998**. 9(3): p. 199-210.

161. **Pace, V., et al.**, *2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry*. *Chemsuschem*, **2012**. 5(8): p. 1369-1379.
162. **Torres, R., et al.**, *Reversible immobilization of invertase on Sepabeads coated with polyethyleneimine: Optimization of the biocatalyst's stability*. *Biotechnology Progress*, **2002**. 18(6): p. 1221-1226.