Untersuchung von neuartigen Methoden zur

Enzymimmobilisierung und

Reaktionsführung für enzymkatalysierte

Synthesen



Offen im Denken

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften doctor rerum naturalium Dr. rer. nat.

der Fakultät Chemie der Universität Duisburg-Essen

von M. Sc. Dennis Wunschik aus Tönisvorst

Datum der Einreichung: 25.05.2021

- 1. Gutachter: Prof. Dr. J. GUTMANN
- 2. Gutachter: Prof. Dr. K. HOFFMANN-JACOBSEN

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2021





Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI:10.17185/duepublico/74938**URN:**urn:nbn:de:hbz:464-20211129-093551-5

Alle Rechte vorbehalten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit folgendem Titel

Untersuchung von neuartigen Methoden zur Enzymimmobilisierung und Reaktionsführung für enzymkatalysierte Synthesen

selbstständig verfasst und keine anderen als die aufgeführten Quellen sowie Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen wurden als solche gekennzeichnet und des Weiteren versichere ich, dass an keiner anderen Stelle ein Promotionsverfahren beantragt wurde.

Dennis Wunschik

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich recht herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während der gesamten Zeit meiner Arbeit unterstützt haben! Einigen davon möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen.

Professorin Kerstin Hoffmann-Jacobsen danke ich herzlich für die Bereitstellung des vielseitigen Forschungsthemas, die wissenschaftliche Betreuung, die zahlreichen anregenden Diskussionen verbunden mit dem gewährten Freiraum während der Bearbeitung. Nicht zu vergessen Ihre Geduld sowie stetige Motivation, welche mich vom Anfang bis zum Ende meiner Arbeit begleitet haben. Behalten Sie ihre ausgeglichene und stets fordernde Art bei. Gleichzeitig möchte ich Professor Jochen Gutmann danken für die großartige Unterstützung, gepaart mit unzähligen nützlichen Ratschlägen. Sie haben mir die Nutzung von vielen Messgeräten ermöglicht, wodurch diese Arbeit erst realisierbar wurde. Dazu haben Sie mich eine gute Wissenschaftlichkeit und die Fähigkeit mich selbst als auch die betriebene Wissenschaft hochwertig zu präsentieren, gelehrt.

Besonders möchte ich mich bei Monika Weidmann, Kim Ingenbosch, Joscha Prießen und Lukas Weger für die immer ausgesprochen angenehme Atmosphäre, die wertvollen Diskussionen und die produktive wissenschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Eure wertvollen Anregungen und Ratschläge habe ich immer sehr geschätzt. Das Wichtigste an unserem Miteinander war jedoch immer die Möglichkeit den ein oder anderen Spaß in jeglicher Situation mit euch zu treiben.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch dem gesamten Kollegium des Fachbereichs Chemie der Hochschule Niederrhein sowie des Deutschen Textilforschungszentrums Nord-West, die Experimente und Messungen unkompliziert möglich gemacht und unterstützt haben. Im Besonderen möchte ich mich an dieser Stelle bei Joachim Horst, David Strunk, Sebastian Walther und Pia Borchert auf Seiten der Hochschule sowie bei Dennis Plohl, Stefan Korleck, Beate Gebert und Leonie Derksen auf Seiten des DTNW für ihre tatkräftige Unterstützung bedanken. Ebenfalls trägt meine Familie einen großen Anteil daran, dass ich meine Promotion erfolgreich beenden konnte. Ihre moralische Unterstützung und ihr stetiger Glaube haben mir immer den Rücken gestärkt. Meinen Freunden danke ich für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und für die Zerstreuung und Aufmunterung. Abschließend möchte ich mich noch bei Lisa Geerkens bedanken, die mich in der gesamten Zeit ausgehalten hat und mir Rückhalt in jeglicher Lebenslage gegeben hat. Für all das kann ich gar nicht genug danken!

Kurzdarstellung

Im Rahmen dieser Arbeit werden neue Synthesewege mittels immobilisierter Enzyme entwickelt. Im ersten Teil der Arbeit werden hierfür kommerzielle Enzymformulierungen verwendet, während der Schwerpunkt im zweiten Teil auf der Entwicklung neuer Immobilisationstechniken und deren reaktionstechnische Anwendung für neuartige Reaktionen liegt.

Die direkte Funktionalisierung von Polymeren mit zyklischen Carbonaten bietet die Möglichkeit einer isocyanatfreien Urethan (NIPU) Vernetzung. Daher wird eine biokatalytische Modellreaktion zur (Bi-)Funktionalisierung von Carboxylgruppen von Disäuren oder Polyestern mit zyklischem Glycerincarbonat entwickelt, die in der Folge auf kommerzielle Polyester Bindemittel für die Lackindustrie angewandt wird. Dabei zählen neben der Lipasenkatalyse die Reaktionszeit und -temperatur zu den Schlüsselfaktoren, um die Integrität des zyklischen Carbonats zu erhalten. Das synthetisierte SB-BisCC kann als grüner NIPU-Baustein dienen, während der funktionalisierte Polyester unter Verwendung einer deutlich reduzierten Menge an Aminkatalysator zu einer Stahlbeschichtung mit guten mechanischen und physikalischen Eigenschaften verarbeitet werden kann.

Der zweite Teil beschreibt die Entwicklung zweier neuartiger Immobilisierungsverfahren: Lipase B aus *C. antarctica* wird auf PMMA-beschichteten SiO₂ Partikeln, die mittels kontrollierter radikalischer Polymerisation hergestellt werden, immobilisiert. Der Einfluss der Oberflächenstruktur auf die Lipaseaktivität wird durch Variation der PMMA-Dichte und der daraus resultierenden Polymerstruktur analysiert. Der Lipasenkatalysator kann über sechs Recyclingschritte wiederverwendet werden, wobei intermediale Pfropfdichten zu den stabilsten Biokatalysatoren führen. Die mehrfache Verwendung ist ebenfalls in nicht nativen Medien möglich. Die kommerzielle Peroxidase MaxiBright[®] wird auf Polyvinylamin beschichteten Textilien kovalent mittels Glutardialdehyd immobilisiert. Anhand der Epoxidierung von Cyclohexen wird erstmalig die Möglichkeit der Nutzung der Peroxidase für gerichtet Oxidationsreaktionen demonstriert. Die Einbindung des textilen Bio-

I

katalysators in ein Reaktorkonzept ermöglicht eine signifikante Steigerung der Ausbeute. Hierfür wird der Textilkatalysator zwischen Reaktionsphase und Produktextraktionsphase eines 3D-gedruckten Modellreaktors platziert und ermöglicht sowohl eine Mehrfachnutzung des Biokatalysators als auch ein Recycling des nicht verbrauchten Cyclohexens.

Abstract

In this work new synthesis pathways are developed using immobilized enzymes. In the first part of the work, commercial enzyme formulations are used for this purpose, while the second part of the work focuses on the development of new immobilization techniques and their application in novel reactions.

The direct functionalization of polymers with cyclic carbonates offers the possibility of an isocyanate-free urethane (NIPU) crosslinking. Therefore, a biocatalytic model reaction for the (bi-)functionalization of carboxyl groups of diacids or polyesters with cyclic glycerol carbonate is being developed, which will subsequently be applied to commercial polyester binders for the coating industry. Besides lipase catalysis, reaction time and -temperature are key factors to maintain the integrity of the cyclic carbonate. The synthesized SB-BisCC can serve as a green NIPU building block, while the functionalized polyester can be processed into a steel coating with good mechanical and physical properties using a significantly reduced amount of amine catalyst.

The second part describes the development of two novel immobilization processes. Lipase B from C. antarctica is immobilized on PMMA-coated SiO₂ particles synthezised by controlled radical polymerization. The influence of the surface structure on the lipase activity is analyzed by varying the PMMA density and the resulting polymer structure. The lipase catalyst can be reused over six reaction cycles, whereby intermedial graft densities lead to the most stable biocatalysts. Multiple useage is also possible in non-native media. Covalent immobilization by glutardialdehyde on polyvinylamine coated textiles leads to an active biocatalyst for the peroxidase MaxiBright[®]. The epoxidation of cyclohexene is used to demonstrate the possibility of using the peroxidase for defined oxidation reactions. The integration of the textile biocatalyst into a reactor concept allows a significant increase in yield. For this purpose, the textile biocatalyst is placed between the reaction phase and the product extraction phase of a 3D-printed model reactor and allows multiple use of the biocatalyst as well as recycling of the unused cyclohexene.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung				
2	Gru	Grundlagen			
	2.1	Enzymatische Katalyse in nicht nativen Medien	4		
	2.2	Lipase	5		
		2.2.1 Proteinstruktur	6		
		2.2.2 Reaktionsmechanismus	7		
		2.2.3 Lipase katalysierte Reaktionen	9		
		2.2.4 Anwendungsgebiete für Lipasen	1		
		2.2.5 Lipase B aus Candida antarctica 1	2		
2.3 Peroxidase		Peroxidase	3		
		2.3.1 Reaktionsmechanismus Hämperoxidase-vermittelte Katalyse \ldots . 1	4		
		2.3.2 Anwendungsgebiete für Peroxidasen	7		
		2.3.3 Dye-Decolorizing Peroxidase aus <i>Mycetinis scorodonius</i>	8		
	2.4	Enzympromiskuität	1		
	2.5	Enzyme in nicht nativen Medien	2		
		2.5.1 Einfluss organischer Solvenzien auf Enzyme	4		
		2.5.2 Lipasen und Peroxidasen in organischer Solvenzien	7		
	2.6	Enzymimmobilisation zur Anwendung in nicht nativen Medien 2	8		
3	Ziel	setzung 3	3		
4	Mat	Aaterial und Methoden 39			
	4.1	Chemikalien und Geräte	5		
	4.2	Puffer und Lösungen			
	4.3	Enzyme	8		

4.4	4 Enzymimmobilisierung		
	4.4.1	Immobilisierung auf Silikapartikel	38
	4.4.2	Immobilisierung auf Textilien	40
4.5	Chara	kterisierung der Lipase Immobilisate basierend auf modifizierten Si-	
	likapa	rtikeln	41
	4.5.1	Thermogravimetrie	41
	4.5.2	Rasterelektronenmikroskopie	42
	4.5.3	Dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung des hydrodynamischen	
		Durchmessers	42
	4.5.4	Gelpermeationschromatographie zur Analyse der Molmasse der her-	
		gestellten PMMA-Beschichtung	42
	4.5.5	Enzymbelegung auf PMMA beschichteten Silikapartikel	43
	4.5.6	Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität	43
4.6	4.6 Charakterisierung der Peroxidase Immobilisate basierend auf PET-Ge		45
	4.6.1	Rasterelektronenmikroskopie	45
	4.6.2	Enzymbelegung auf textilen Polyestergewebe	45
	4.6.3	Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität	45
4.7	4.7 Enzymatische Synthesen		46
	4.7.1	Lipase katalysierte Synthese von Sebacin Biscyclocarbonate	46
	4.7.2	Lipase katalysierte polymeranaloge Umwandlung eines Polyester	
		basierten Bindemittels	48
	4.7.3	Epoxidierung von Cyclohexen mittels textil-fixierter Peroxidase $~$.	49
4.8	Chara	kterisierung der enzymkatalysierten Produkte	50
	4.8.1	Charakterisierung des Sebacin Biscyclocarbonats	50
	4.8.2	Charakterisierung des modifizierten Polyester basierten Bindemittels	52
	4.8.3	Charakterisierung des 1,2-Epoxycyclohexans über Massenspektro-	
		metrie gekoppelte Gaschromatographie (GC-MS)	54

5	Erge	ebnisse	und Diskussion	55
	5.1	Enzyn	natische Synthese von Rohstoffen für isocyanat freie Polyure thane $\ .$.	55
		5.1.1	Entwicklung und Optimierung einer enzymatischen Syntheseroute	
			zu Sebacin Biscyclocarbonat	57
		5.1.2	Charakterisierung des Sebacin Biscyclocarbonats	59
		5.1.3	Optimierung der SB BisCC Reaktionsführung	64
		5.1.4	Abschließende Diskussion	76
	5.2	Enzyn	natische polymeranaloge Umwandlung eines Polyester basierten Bin-	
		demit	tels	77
		5.2.1	Umweltfreundliche Synthesestrategie für die Vernetzung und Aus-	
			bildung einer Beschichtung	81
		5.2.2	Charakterisierung der funktionalisierten Polyester	83
		5.2.3	Vernetzung des funktionalisierten Polyesters und Charakterisierung	
			des Lackfilms	89
		5.2.4	Abschließende Diskussion	94
	5.3	Immo	bilisierung einer Lipase auf PMMA beschichteten TEOS-Partikeln	94
		5.3.1	Entwicklung eines PMMA beschichteten Trägersystems für Lipasen	
			auf Basis von TEOS-Partikeln	96
		5.3.2	Charakterisierung der Partikel fixierten Lipase mit Bezug auf un-	
			terschiedlichen PMMA-Beschichtungen	99
		5.3.3	Abschließende Diskussion	105
	5.4	Chem	o-enzymatische Epoxidierung mittels immobilisierter DyP-Typ Per-	
		oxidas	e in einem Textilreaktor	107
		5.4.1	Charakterisierung der textil-fixierten Peroxidase	108
		5.4.2	Biokatalytische Epoxidierung von Cyclohexen mittels textilfixierter	
			Peroxidase	116
		5.4.3	Optimierung der Peroxidase katalysierten Epoxidierung im Modell-	
			reaktor	119
		5.4.4	Abschließende Diskussion	130

6 Zusammenfassung	132
Literaturverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	xxiv
Tabellenverzeichnis	xxx
Abkürzungsverzeichnis	xxxi
Publikationen	xxxiii

1 Einleitung

»It takes 20 years to become an overnight succes.« Ein Satz der die Situation um die Rolle der Biotechnologie im Feld der organischen Chemie sowie der Biokatalyse in industriellen Synthesen widerspiegelt [1]. Die industrielle oder weiße Biotechnologie fasst alle Aspekte in diesem Gebiet zusammen und bietet langsam aber stetig nachhaltige sowie umweltfreundliche Alternativen zu klassischen chemischen Produktionsprozessen an. Diese finden in den unterschiedlichsten Sektoren Einsatz, wie zum Beispiel bei der Herstellung von Düngemittel, Gasen, organischen Chemikalien, Polymeren, Fasern, Kleb- und Dichtstoffen, Beschichtungen, Reinigungsmitteln, Kosmetika und Pharmawirkstoffen sowie bei der Verarbeitung von Textilien, Getränken, Lebensmitteln, Biokraftstoffen und Zellstoffen, wobei über 50% aller industriellen Biotransformationen im Pharmabereich durchgeführt werden (s. Abbildung 1, links). Der weltweite Markt der weißen Biotechnologie umfasste 2010 Transaktionen in der Größenordnung von 92 Milliarden Euro und wird für das Jahr 2020 auf 515 Milliarden Euro geschätzt. Speziell im Bereich der Enzymkatalyse betrug die geschätzte weltweite Marktgröße im Jahr 2010 für Enzyme 2,82 Milliarden USD [2]. Die am häufigsten eingesetzte Enzymklasse im industriellen Maßstab ist die der Hydrolasen (s. Abbildung 1, mitte). Aus dieser Enzymklasse zeigen Lipasen den größten industriellen Nutzen auf Grund ihrer Vielfältigkeit und im Besonderem ihre Enantioselektivität. Die Verwendung von Oxidoreduktasen für asymmetrische Synthesen stellt ebenfalls einen wichtigen, wenn auch deutlich geringeren, Anteil industrieller Biotransformationen dar. Alkoholdehydrogenasen sind die am häufigsten eingesetzten Oxidoreduktasen, während Peroxidase bisher weniger prominent verwendet werden [3, 4]. Enzymkatalysierte Reaktionen allgemein werden als sehr vielversprechend für die Erfüllung der Kriterien der grünen Chemie angesehen, welche eng verbunden sind mit der weißen Biotechnologie. Anastas et al. fasste 1991 die wesentlichen Herausforderungen, die an eine grüne Synthese gestellt werden, in 12 Thesen zusammen, die heutzutage als die >12 Prinzipien der Grünen Chemie« bekannt sind (s. Abbildung 2) [5, 6]. Im Zusammenhang mit den Prinzipien der grünen Chemie bieten Enzyme als Ganzes nicht nur Lösungen für das Abfallproblem,

1



Abbildung 1: Übersicht der Anwendungsgebiete, Art und Form eingesetzter Biokatalysatoren [8].

sondern schaffen darüber hinaus energieeffizientere und rohstoffärmere Prozesse [7]. Zudem sind sie umweltfreundliche Katalysatoren, die eine hohe Selektivität aufweisen, das wiederum zu hohen Produktreinheiten führen kann. Biokatalysatoren arbeiten in der Regel unter moderaten Bedingungen in der Nähe von Umgebungstemperaturen, -druck und -pH in wässrigen Milieu und können aus nachhaltigen sowie erneuerbaren Ressourcen gewonnen werden [10]. Die eingesetzten Biokatalysatoren selber können in diversen Formen eingesetzt werden (s. Abbildung 1, rechts), angepasst an die gewünschten Anforderun-





2

gen des jeweiligen Prozesses. Hier stellt die Immobilisation eine besondere Modifikation der Biokatalysatoren dar, auf Grund der daraus resultierenden Wiederverwendbarkeit und der damit verbundenen Optimierung der Kosteneffizienz als auch die Nutzung unter harschen Bedingungen in nicht nativen Medien. Eine kritische Bewertung bezüglich der Umweltfreundlichkeit sowie die wirtschaftliche Durchführbarkeit jedes Verfahrens auf Basis biokatalytischer Prozesse ist dennoch unumgänglich und notwendig. Das Potenzial der Biotechnologie für eine nachhaltige Produktion ist in vielen Bereichen bei weitem noch nicht voll ausgeschöpft. Jedoch zeigt die Forschung aus den vergangen Jahrzehnten das riesige Potenzial als auch die Vielfältigkeit der Biotechnologie auf. Der kontinuierlich steigende Bedarf sowie die steigende Zulassung an grünen Produktionsverfahren untermauern den Status der Zukunftstechnologie.

2 Grundlagen

2.1 Enzymatische Katalyse in nicht nativen Medien

Biokatalyse in organischen Medien ist in den letzten Jahrzehnten zu einer unentbehrlichen Erweiterung und Alternative der organischen Chemie geworden. Dieser Ausdruck birgt die Technologie, die heutzutage als erste Wahl bei der Herstellung einer breiten Palette chemischer Verbindungen anerkannt ist. Dabei finden enzymatisch katalysierte Synthesen in Akademia und Industrie gleichermaßen Beachtung [8] und stellt eine Querschnittstechnologie dar, die die wissenschaftliche Entwicklung in der Chemie entscheidend beeinflusst hat. Heutzutage sind enzymgesteuerte Synthesen für zahlreiche Moleküle konkurrenzfähig, wenn nicht sogar überlegen gegenüber klassisch, chemischen Verfahren [11]. In den frühen 2000ern jedoch war die Biokatalyse nur auf Nischenanwendungen beschränkt und der Fokus lag auf der Synthese oder Racematspaltung von optisch reinen Intermediaten für Wirkstoffe. Vor allem die Nutzung von Lipasen und Amidasen für die Racematspaltung chiraler primärer oder sekundärer Alkohole, Amine oder Carbonsäuren sind hier zu nennen [12, 13]. Seitdem hat sich die Biokatalyse mehr und mehr zu einer breit einsetzbaren Methode für die chemische Synthese und Produktion entwickelt [8, 14]. Ausschlaggebend für diese Entwicklung war die rasche Entdeckung neuer Enzymvarianten. Das beinhaltet zum Beispiel die zielgerichtete Entdeckung sowie durch das Enzym-Engineering geeigneter Biokatalysatoren, das auf Grund von preiswerten synthetischen Genen realisierbar war. Darüber hinaus ermöglichten Proteinsequenz- und Strukturdatenbanken einen leichten Zugang zu neuen Enzymen, welche durch Kombination von gerichteter Evolution, rationalem Proteindesign, Hochdurchsatz-Screening-Methoden und Immobilisationsverfahren in ihren Eigenschaften modifiziert werden konnten [15]. Während die hervorragenden katalytischen Eigenschaften sowie die vielseitige Anwendbarkeit von Enzymen allgemein akzeptiert sind, können so die limitierenden Faktoren wie Stabilität und Kosten verbessert bzw. verringert werden.

4

2.2 Lipase

Von den ersten Berichten C. Eijkmanns über lipolytisch wirksame Enzyme entwickelten sich Lipasen in den darauf folgenden 120 Jahren zu den bedeutungsvollsten Enzymen für die biotechnologische Industrie [16]. Lipolytische Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Umsetzung wasserunlöslicher Komponenten wie Lipiden und sind essentieller Bestandteil des Lipidstoffwechsels. Auf Grund dessen sind Lipasen ubiquitäre Enzyme und sind in fast allen Organismen aus dem mikrobiellen, pflanzlichen und tierischen Reich vorzufinden [17, 18]. Lipasen zählen zu den Serin-Hydrolasen auf Grund ihrer Inhibierung durch Tris(2,3-diethyl-4-nitrophenyl)phosphate [19] und werden genauer als Triacylglycerol-Acylhydrolasen (E.C. 3.1.1.3) definiert. Des Weiteren werden Lipasen den Esterasen (E.C. 3.1.1.1) untergeordnet, unterscheiden sich jedoch von diesen. Eine Unterscheidung beider Enzymklassen ist durch die gesamtheitliche Betrachtung folgender Kriterien wie der strukturellen Elemente, einer Grenzflächenaktivierung sowie des Substratspektrums möglich. Eine alleinige Einstufung durch den Vergleich von Lipase- und Esterase- Konseunssequenzen ist nicht möglich, obwohl diese eine sehr hohe Übereinstimmung aufweist [20]. Sie divergieren jedoch bei der sogenannten "lid-Domäne" (Deckel-Domäne), welche einige Lipasen besitzen. Dieses Strukturelement besteht aus ein bis zwei α -Helices oder einem Loop, welcher über dem aktiven Zentrum lokalisiert ist und im Normalzustand das hydrophobe aktive Zentrum isoliert. Erst bei Kontakt mit einer hydrophoben-hydrophilen Grenzfläche tritt eine Konformationsänderung ein und damit einhergehend findet eine Aktivierung der Lipase statt [21, 22, 23]. Einige Lipasen weisen hier ebenfalls Abweichungen auf, wie die minimal α/β -Hydrolase Lipase A aus *Bacillus* subtilis, die keine lid-Domäne besitzt [24, 25]. Somit ist eine alleinige Unterscheidung bezüglich konservierter Domänen und weiteren strukturellen Elementen sowie auf Basis einer Grenzflächenaktivität bzw. Grenzflächenaktivierung nicht möglich, da einige Lipasen dieses Phänomen nicht zeigen. Weitere Fälle die dieses Phänomen nicht zeigen sind Lip4 aus Candida rugosa [26] und LipB aus Candida antarctica [27].

Das Substratspektrum beider Enzymklassen ist ebenfalls breit gefächert, allerdings weisen Lipasen eine höhere Affinität auf wasserunlösliche, langkettige Carboxylestern (≥ 10 Kohlenstoffatome) der Triglyceride zu hydrolysieren. Dem gegenüber bevorzugen Esterasen wasserlösliche, kurzkettige Carboxylester (≤ 10 Kohlenstoffatome) [28]. Hinsichtlich dieser Komplexität von Lipasen und Esterasen wird eine Gruppierung auf Basis aller Kriterien vorgenommen.

2.2.1 Proteinstruktur

Strukturell gesehen bestehen alle Lipasen aus einer α/β Hydrolasefaltung sowie einer hoch konservierten katalytischen Triade. Dabei wird jeweils eine zentrale β -Faltblattstruktur auf beiden Seiten von einer variierenden Anzahl an α -Helices umgeben. Des Weiteren besitzen alle Lipasen eine katalytische Triade, welche aus den Substituenten von drei Aminosäuren zusammen gesetzt ist: Serin, Histidin und Asparaginsäure (oder Glutaminsäure bei z.B Lipasen aus *Geotrichum candidum* oder *Candida rugosa*) [29, 30, 31, 32]. Zusammen mit in der Regel zwei weiteren Aminosäuren der Oxyaniontasche bildet die katalytische Triade das aktive Zentrum. Die Stabilisierung dieses Motivs wird durch Wasserstoffbrücken zwischen dem Peptid N-Hs der zur Hauptkette gehörigen Aminosäuren und der Aminosäuren der Oxyaniontasche gewährleistet [21, 22]. Dabei unterteilt das Serin der katalytischen Triade das aktive Zentrum in zwei Bereiche bzw. Bindungstaschen. Hierzu zählt zum einen die Acyl-Bindungstasche und zum anderen die Nucleophil-Bindungstasche. Diese Konformation des aktiven Zentrums ist verantwortlich für die Stereoselektivität von Lipasen [33].

Ein weiteres typisches Strukturelement der Lipasen ist die sogenannte "lid" (Deckel) Domäne. Diese Domäne besteht aus ein bis zwei α -Helices oder einem Loop, die über dem aktiven Zentrum lokalisiert sind. Im inaktivem Zustand (Normalzustand) wird dadurch das katalytische Zentrum isoliert. Die zum Medium hinzeigende Seite dieser Domäne ist hydrophil, wohingegen die nach innen gerichtete Seite hydrophob ist. Somit isoliert die



Abbildung 3: Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Lipase, samt der Oxyaniontasche, der Acyl- und Nucleophil-Bindungsstelle [31].

Deckel Domäne in hydrophilen Medien das aktive Zentrum. In Anwesenheit von hydrophoben Substanzen oder Phasen, wie eine Öl-Wasser-Phase, klappt die mobile Deckel Domäne in die hydrophobe Phase. Mit der einhergehenden Konformationsänderung wird die Lipase aktiviert, indem die katalytische Triade zugänglich ist. Abschließend ist zu betonen, dass genau diese Deckel Domäne in Struktur und Zusammensetzung Teil des katalytischen Zentrums ist und somit maßgeblich die Substratspezifität beeinflusst [22, 31]. Eine schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des aktiven Zentrums ist in Abbildung 3 gegeben.

2.2.2 Reaktionsmechanismus

Der katalytische Mechanismus der Lipase ist in Abbildung 4 dargestellt und wird als Serin-Hydrolase Mechanismus bezeichnet. Auf Grund des Wechselspiels der Aminosäuresubstituenten der katalytischen Triade wird er auch Ping-Pong-Mechanismus genannt [30].

Die Anordnung der drei Aminosäuren der katalytischen Triade führen im ersten Schritt zu einer Acylierung. Dabei wird ein Proton zwischen der Asparaginsäure, dem Histidin und dem Serinrest übertragen. Daraus folgt die Aktivierung der Hydroxylgruppe des katalytischen Serins. Infolgedessen greift der Hydroxylrest des Serins, welches in diesem

7



Abbildung 4: Katalytischer Mechanismus von Lipasen [31].

Zustand eine deutlich erhöhte Nucleophilität aufweist, die Carbonylgruppe des Substrates an. Daraus resultiert das erste tetraedrische Intermediat, gebildet zwischen dem katalytischem Serin und dem Ester. Das hierbei entstehende Sauerstoffanion wird durch die Oxyaniontasche stabilisiert und reduziert dabei die Zustandsenergie des tetraedrischen Intermediats durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Währenddessen wird parallel das formal protonierte und positiv geladene Histidin über Wasserstoffbrücken zur Asparaginsäure stabilisiert. Im nächsten Schritt wird der Alkoxy-Rest aus dem Intermediat eliminiert, indem die Rückbildung der π -Bindung zwischen carbonylischem C-Atom

8

und carbonylischem Sauerstoffatom eintritt. Dieser wird vom Histidin protoniert und der entstehende Alkohol diffundiert ab. Zeitgleich wird ein Acyl-Enzym-Intermediat gebildet, bei dem der Alkohol durch das Serin substituiert wird (Acyl-Enzym-Ester). Als nächstes beginnt die Deacylierung, bei dem ein Nukleophil das Carbonyl-C-Atom angreift. Infolgedessen wird das Histidin erneut protoniert und das entstehende tetraedrische Zwischenprodukt wird ebenfalls über die Oxyaniontasche stabilisiert. Abschließend wird das Produkt freigesetzt und das Enzym gelangt in den Ausgangszustand, indem der Serin-Rest des Intermediats eliminiert wird und vom Histidin protoniert wird. Hierbei wird die π -Bindung zwischen carbonylischem C-Atom und carbonylischem Sauerstoffatom auf dem selben Weg regeneriert, wie zuvor beschrieben. Dieses Nucleophil kann entweder Wasser im Falle der Hydrolyse oder ein Alkohol im Falle der Alkoholyse sein [22, 31, 34].

2.2.3 Lipase katalysierte Reaktionen

Lipase katalysierte Hydrolyse

In natürlicher Umgebung katalysieren Lipasen die Hydrolyse der Esterbindung von Tri-, Di-, und Monoglyceriden zu Fettsäuren und Glycerin (s. Abbildung 5). Lipasen katalysieren darüber hinaus eine Vielzahl an weiteren Reaktionen, welche ebenfalls in Abbildung 5 dargestellt sind. Alle möglichen lipasekatalysierten Reaktionen finden dabei an einer Grenzfläche, einige wenige Lipasen zeigen hier ein gegensätzliches Verhalten, eines zweiphasigen Systems statt. Dieses wiederum besteht aus einer nicht mischbaren organischen Phase, welche das Substrat und eine wässrigen Phase enthält [28].

Lipase katalysierte Synthesen

Unter thermodynamisch günstigen Bedingungen, das bedeutet bei einer geringen Wasseraktivität, katalysieren Lipasen ebenfalls Veresterungen und Umesterungen (s. Abbildung 5). Bei der Veresterung wird eine Fettsäure kovalent an einen Alkohol gebunden, Hydrolyse



Abbildung 5: Übersicht Lipase katalysierte Reaktionen [34].

wobei ein Ester entsteht und gleichzeitig ein Wassermolekül freigesetzt wird. Unter diesen Mechanismus fallen auch Thioveresterungen und Amidierungen, wenn ein Thiol bzw Amin als Substrat fungiert. Umesterungen finden in Anwesenheit von mindestens zwei Estern statt, indem die Reste der Ester gegeneinander ausgetauscht werden. Eine ähnliche Reaktion stellt die Aminolyse, Alkoholyse und Acidolyse dar (s. Abbildung 5). Darüber hinaus sind Lipasen ebefalls in der Lage Michael Additionen [35] und indirekte Epoxidierungen von ungesättigten Molekülen zu katalysieren [36]. In der Regel ist für die Synthese-Reaktion ein wasserfreies Medium vonnöten, da die Affinität zur Hydrolyse-Reaktion deutlich höher ist. Somit ist eine geringe thermodynamische Wasseraktivität von größter Wichtigkeit, wobei die thermodynamische Aktivität ein Maß für die Molekülverfügbarkeit in einem Lösungsmittelsystem ist.

2.2.4 Anwendungsgebiete für Lipasen

Auf Grund ihrer Vielfalt an diversen Substraten, ihrer Selektivität, ihrer Stabilität in organischen Lösemitteln sowie der Tatsache, dass keine Co-Faktoren benötigt werden, sind Lipasen von großer Bedeutung für die chemische Industrie. Inzwischen ist eine Vielzahl stereospezifischer Umsetzungen bekannt, die Einzug in biotechnologische Verfahren zur Herstellung von Pharmazeutika, Kosmetika und Agrochemikalien erhalten haben [16, 37]. Anwendung finden Lipasen unter anderem in der Lebensmittelindustrie bei der Herstellung von Milchprodukten, wie z. B. Käse, Modifikation von Fetten und Ölen (Butter- und Magerine Herstellung), Babynahrung und kalorienreiche oder kalorienreduzierte Fette [38, 39]. In Detergenzien und Reinigungsmitteln dienen Lipasen als Additive wegen ihrer Aktivität und Stabilität bei hohen Temperaturen sowie basischen pH-Werten. Darüber hinaus ist der Einsatz von Lipasen zur Herstellung von Seifen, Geschirrspülmitteln und zur Reinigung von Kontaktlinsen unerlässlich [40, 41]. Weiterhin werden Lipasen in der Synthese von Feinchemikalien wie enantiomerenreinen Alkoholen sowie chiralen Amine und Amide ausgehend von racemischen Ausgangssubstanzen verwendet. In pharmazeutischen Verfahren ist der Nutzen von Lipase die Eliminierung von racemischen Gemischen, welche aus chiralen Molekülen wie Prostaglandine, Cephalosporine, Hydantoine und Penicilline bestehen. Unter allen Hydrolasen haben Lipasen den höchsten Nutzen für asymmetrische Synthesen [42, 43]. Ein aktuell interessantes Anwendungsfeld der Lipasen ist in der Energiewirtschaft angesiedelt. Hier werden Schmiermittel, Biodiesel und Biokerosin aus erneuerbaren Ressourcen durch Lipase katalysierte Umesterungen von pflanzlichen oder tierischen Ölen gewonnen [44, 45]. Zahlreiche Anwendungen im Bereich der Zellstoff- und Papierindustrie sowie für medizinische Zwecke sind ebenfalls bekannt [46].

2.2.5 Lipase B aus Candida antarctica

Candida antarctica ist in der Lage zwei Lipasen zu exprimieren, Lipase A und Lipase B. Während die Lipase B (CalB) eine der am häufigsten eingesetzten Hydrolasen im Bereich der Biokatalyse ist, wird die Lipase A bisher selten eingesetzt. Die Primärstruktur der CalB besteht aus 317 Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 33 kDa. Ein besonderes Merkmal der CalB ist das breite pH-Optimum sowie die hohe Thermo- und Lösemittelstabilität [47]. Eine Grenzflächenaktivierung weist die CalB nicht auf, da die lid-Domäne dauerhaft geöffnet ist [48]. Somit verweilt die CalB durchgehend im aktiven Zustand. Ebenfalls unterscheidet sich die Umgebung der katalytischen Triade der CalB von herkömmlichen Lipasen. Zeigt dieses Motiv für die meisten Lipasen die Sequenzfolge Gly-X-Ser-X-Gly, wurde das erste Gly durch ein Threonin (Thr40) substituiert. Dadurch kann eine dritte Wasserstoffbrücke zwischen Oxynaniontasche, welches aus drei Aminosäuren besteht, und Substrat ausgebildet werden [31, 33]. Die katalytische Triade ist Bestandteil des aktiven Zentrums, welches darüber hinaus aus den Aminosäuren Asp 187, His 224 und Ser 105 besteht. Über der katalytischen Triade ist eine große hydrophobe Tasche (Acyl-Tasche) ausgeprägt. In dieser Tasche ordnet sich der Acylrest während der Katalyse an (s. Abbildung 3). Unter der katalytischen Triade ist eine mittelgroße Tasche vorzufinden (Hydrophil-Tasche), in die die Abgangsgruppe / das Nucleophil angeordnet wird. Diese Domäne fasst lediglich Substituenten in Größe eines Propylrestes. Der Rest der Abgangsgruppe bzw. des Nucleophils ragt dabei aus der Tasche. Durch diese spezielle Struktur des aktiven Zentrums kann die ausgezeichnete Präferenz für bestimmte Enantiomere erklärt werden, wie für sekundäre Alkohole oder primäre Amine [14].

Für die vorliegende Dissertation wurde ausschließlich CalB als Lipase eingesetzt. Simulationsstudien bezüglich Stabilität und Flexibilität bestätigten keinerlei bzw. geringfügige Veränderungen der CalB Konformation in (di)polaren als auch unpolaren Lösemitteln. Auffällig ist hierbei, dass die Konformationsänderungen einzelner, kurzer Peptidsequenzen in dipolaren Lösemitteln steigen, jedoch in unpolaren Lösemitteln unverändert verbleiben. Die Aktivität der Lipasen werden zudem dadurch beeinflusst, dass Lösemittelmoleküle ebenfalls in das aktive Zentrum gelangen können. Dabei wird die Bildung der Wasserstoffbrücken zwischen Serin 105 und Histidin 224 erheblich gestört. Das hat zur Folge, dass die Aktiviterungsenergie des Katalysemechanismus steigt bzw. die Aktivität der CalB ab nimmt [49].

2.3 Peroxidase

Peroxidasen gelten als Isoenzyme, welche in fast allen lebenden Organismen vorzufinden sind. Charakteristisch für alle Arten von Peroxidasen ist die prosthetische Gruppe, die je nach Peroxidase Eisen, Mangan, Vanadium oder Halogene binden können. Darüber hinaus sind einige spezifische Peroxidasen bekannt, die durch eine metallfreie prosthetische Gruppe gekennzeichnet sind, wie Thiol-abhängige Peroxidasen oder Alkyl-abhängige Hydroperoxidasen. Generell besteht jedoch eine deutliche Mehrheit an Häm-Peroxidasen, welche im aktiven Zentrum ein Eisenprotoporphyrin IX aufweisen [50, 51, 52]. Dabei agieren Peroxidasen in vielen unterschiedlichen metabolischen Stoffwechselvorgängen als Schlüsselfaktoren unter der Umsetzung von Wasserstoffperoxid oder organischen Hydroperoxiden. Die Peroxide fungieren für die Peroxidasen als Elektronenakzeptoren, die reduziert werden und parallel zur Oxidation von einer Vielzahl an diversen Verbindungen führt. Diese spielen wiederum eine Rolle in der xenobiotischen Entgiftung, des angeborenen Immunsystems, der Hormonbiosynthese und der Pathogenese von Entzündungskrankheiten [53]. Auf Grund der katalytischen Funktion sind Peroxidasen den Oxidoreduktasen untergeordnet und unter der EC-Nummer 1.11.x zusammengefasst. Generell sind Peroxidasen nur schwerlich mittels den Klassifizierungsregeln der Enzyme Commission Numbers zu kategorisieren, da Peroxidasen verschiedene Elektronendonoren umsetzen können sowie verschiedene katalytische Modi von Oxidationen (Ein-Elektronen- bzw. Zwei-Elektronen-Oxidation) durchführen. Daher werden Peroxidasen zusätzlich nach weiteren Merkmalen klassifiziert, vorzugsweise nach Proteinstruktureigenschaften und Sequenzinformationen [52]. Danach werden die hämhaltigen Peroxidasen in zwei Superfamilien (lat. superfa*milia*) divergiert, welche in die Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie (tierische oder Säugetier-Peroxidase) und die pflanzliche Peroxidase Superfamilie resultiert. Innerhalb der pflanzlichen Peroxidase Superfamilie findet eine weitere Unterteilung nach entsprechender Sequenz, dem Wirtsorganismus und der physiologischen Funktion, statt. Somit können drei Hauptklassen mit folgender Klassifizierung definiert werden: Klasse I (intrazelluläre, nicht-tierische Peroxidasen), Klasse II (sezernierte Pilzperoxidasen), Klasse III (sezernierte Pflanzenperoxidasen) [54, 50, 55]. Eine ähnliche Unterteilung der Peroxidase-Cyclooxygenase Superfamilie nach Physiologie und Enzymfunktion ist ebenfalls akzeptabel (Lactoperoxidasen, Myeloperoxidasen etc.) [56]. In den letzten 20 Jahren sind jedoch eine Reihe von neuartigen hämhaltigen Peroxidasen aus Pilzen entdeckt worden, welche nicht in die beiden Superfamilien eingeordnet werden können. Darunter fallen die Thiolat-Peroxidasen, aromatischen Peroxygenasen sowie die farbstoffentfärbenden Peroxidasen [57, 58].

2.3.1 Reaktionsmechanismus Hämperoxidase-vermittelte Katalyse

Bildung von Compound I

Oxidative Hämenzyme werden erst durch eine Reaktion mit einem Co-Substrat (Wasserstoffperoxid) in eine katalytisch aktive Form (Compound I) überführt (s. Abbildung 6). Im Grundzustand bindet ein Wassermolekül am aktiven Zentrum in Form eines distalen Liganden. Dieses wird im ersten Schritt freigegeben, so dass eine Bindung des Wasserstoffperoxidmoleküls (H₂O₂) an das dreiwertige Hämeisen stattfindet. Anschließend wird das dem Eisen proximale Proton des gebunden H₂O₂ umgelagert, das die Protonierung des distalen O-Atoms mittels des distalen Histidins zur Folge hat (Compound 0). Daraus resultiert die heterolytische Spaltung der O-O Bindung sowie eine ungleiche Verteilung der Elektronen zwischen beiden O-Atomen. Unter Abspaltung eines Wassermoleküls und der parallelen Umlagerung von zwei Elektronen auf das gebunden O-Atom, welches zunächst nach der Wasserabspaltung sechs Valenzelektronen besitzt, wird das katalytisch aktive Oxidationsmittel Fe(IV)-Oxo-Radikal (Compound I) gebildet. Die benötigten Elektronen für diesen Prozess liefern zum einen die Oxidation des Fe(III)- zum Fe(IV)-Ion und zum anderen die Oxidation des Porphyrinrings zum einfach positiv geladenen Porphyrin- π -Radikal [59, 60]. Über die Art und Weise des katalytischen Zyklus aller Peroxidasen ist die Proteinumgebung der Hämgruppe ausschlaggebend. Den Beginn der katalytischen Kaskade bildet die Abspaltung des Wassermoleküls und darauffolgend die heterolytische





Abbildung 6: Allgemeine schematische Darstellung des katalytischen Zyklus von Peroxidasen. Verbindung I: (Fe⁴⁺=O)Por^{*+}; Verbindung II: (Fe⁴⁺=O)Por; RH₂: Substratmolekül; RH^{*}: korrespondierendes Substratradikal.

Spaltung des H_2O_2 , welche stark von der distalen Aminosäure (Histidin, Glutamat oder Aspartat), die über dem Eisenion lokalisiert ist, abhängt. Im Grundzustand liegt die distale Aminosäure deprotoniert vor und bildet Wasserstoffbrücken zum distalen O-Atom des gebunden H_2O_2 aus. Dadurch ist die Verschiebung des Protons vom proximalen O-Atom zum distalen O-Atom erst möglich. Darüber hinaus nimmt die distale Aminosäure zwischenzeitlich ein Proton des gebunden H_2O_2 auf, das in der Bildung von Compound 0 resultiert. Eine in räumlicher Nähe zu diesem Event lokalisierte und positiv geladene Aminosäure (Arginin oder Histidin) stabilisiert das formal negativ geladene Intermediat. Dies ist notwendig für die folgende heterolytische Spaltung der O-O-Bindung. Des Weiteren ist die Oxidierung von aromatischen Aminosäureseitenketten (Tryptophan) an Stelle der Oxidierung des Porphyrinrings möglich. Die umliegenden Aminosäuren bestimmen somit maßgeblich, welches Radikal gebildet und stabilisiert wird. Deshalb ist das Redoxpotential der Oxy-Fe(IV)-Verbindung nicht nur von den axialen Liganden abhängig, sondern auch von den umliegenden Aminosäuren [61, 59].

Katalytischer Zyklus

Im ersten Schritt wird dem Eisenion ein Elektron durch das H_2O_2 entzogen und ein zweites Elektron dem Prophyrinmolekül bzw. einem Aminosäurerest der Hämgruppe (s. Abbildung 6). Daraus resultiert das zweifach oxidierte Oxo-Ferryl-Radikal (Compound I). Als nächstes wird das positiv geladene Porphyrin- π -Radikal (bzw. Aminosäureradikal) reduziert, was die Bildung des Compound II zur Folge hat. Dieser Schritt beinhaltet den Übertrag eines Elektrons des gebunden Substrats auf Compound I. Abschließend wird das Compound II Intermediat in Anwesenheit eines zweiten Substratmoleküls reduziert und folglich in den Ausgangszustand (Fe(III), resting state) überführt. Somit besteht der katalytische Zyklus aus drei aufeinanderfolgenden Redoxreaktionen (s. Abbildung 6). Dabei weist jedes Redoxpaar (Fe(III)/Compound I, Compound I/Compound II, Compound II/Fe(III)) ein spezifisches Redoxpotential auf, welches durch die proximale Proteinungebung definiert ist und die oxidative Kraft des Enzyms wiedergibt [62]. Die unterschiedlichen Oxidationsstufen der Hämgruppe können spektroskopisch nachgewiesen werden. So ist zum Beispiel die Meerrettich-Peroxidase im Ausgangszustand rot/bräunlich gefärbt, Compound I weist eine grünliche Färbung auf und Compound II eine rötliche Färbung [60].

Der allgemeine Reaktionsmechanismus für Peroxidasen beschreibt einen Ein-Elektron-Oxidations Prozess (s. Abbildung 6), indem zwei Substratmoleküle übergangsweise zwei radikalische Produkte bilden, welche in den meisten Fällen miteinander koppeln bzw. zu nicht-radikalischen Verbindungen disproportionieren. Einige Peroxidasen (Peroxygenasen, Häm-Thiolat- und Häm-Phenolat-Peroxidasen, Monooxygenasen) weisen jedoch die Eigenschaft auf, an einem Substramolekül einen sogennante Zwei-Elektronen-Oxidation durchzuführen. Dabei ist eine direkte Bindung des Substrats im aktiven Zentrum vonnöten, so dass in zwei aufeinanderfolgenden Ein-Elektron-Oxidationen zwei Elektronen dem Substrat abstrahiert werden können. Dieser Prozess durchläuft die selben Schritte analog zur Ein-Elektronen-Oxidation [63], jedoch sind Oxygenierungs- bzw. Peroxygenierungsreaktionen möglich. Welcher der beiden Oxidationsschritte umgesetzt wird, ist abhängig von Compound II. Liegt dieses Intermediat protoniert vor, kann eine Oxygenierungsreaktion stattfinden, da die Stärke der O-H-Bindung der Hydroxid-Gruppe am Eisenion deutlich stärker ist als die der C-H-Bindung des Substrats [64, 65].

2.3.2 Anwendungsgebiete für Peroxidasen

Gegenwärtig stellen industriell-technische-, Lebensmittel- und Umweltanwendungen die einzigen Märkte dar, welche eine signifikante Kommerzialisierung generell von Oxidoreduktasen erlauben. Basierend auf dem Reaktionsmechanismus sind die Mehrzahl der kommerziellen Enzyme Hydrolasen (Esterase, Proteasen, Lipasen etc.), während Oxidoreduktasen nur einen verschwindend geringen Anteil ausmachen [66, 67]. Der Anteil an Anwendungen von Peroxidasen ist nochmals geringer, jedoch kann eine vermehrte Verwendung an peroxidase-haltigen Biokatalysatoren in den vergangen Jahren beobachtet werden. Allgemein weisen Peroxidasen eine hohe katalytische Vielseitigkeit und Stabilität

auf, wodurch ein großes Potenzial vorhanden ist, Peroxidasen als Biokatalysatoren für industrielle Oxidationen und speziell für Redox-Konversionsprozesse einzusetzen [68, 69]. Deutlich wird die Relevanz von Peroxidasen im Gebiet der Biokatalyse anhand der zahlreichen Peroxidase basierenden Patente [70] sowie Veröffentlichungen [71], die in den letzten Jahren publiziert wurden. Anwendung finden Peroxidasen unter anderem in textilen Applikationen in Kombination mit Laccasen zur enzymatischen Bleiche von Baumwolle [72] sowie zum Bleichen von schwerlöslichen Verunreinigungen auf Textilien [73]. Auf Grund der oxidativen Wirksamkeit sind Anwendungen im Bereich des biologischen Abbaus sowie Detoxifizierung prädestiniert für Peroxidasen. Hierbei werden verworfene Farbstoffe aus Abwässern von Färbereien enzymatisch vorbehandelt, damit diese leichter ausgetragen werden können [74]. Analog zur Abwasserklärung der Färbeindustrie werden Peroxidasen ebenfalls zur Transformation diverser Xenobiotika, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und weiteren Schadstoffen aus Industrieabfällen eingesetzt [75, 76, 77]. Umgekehrt finden Peroxidase in wenigen organischen Synthesen Anwendung. Hierbei weisen Peroxidasen die Möglichkeit auf, ungesättigten Fettsäuren das korrespondierende Epoxid zu katalysieren, welche für die Plastikherstellung von Bedeutung sind. Zusätzlich sind Peroxidasen in der Lage aminosäure-basierte Polymere zu synthetisieren auf Grundlagen von Tyrosin oder Vanillin [78]. Diese Polymere werden bevorzugt zur Herstellung von Biosensoren eingesetzt. Diese sind besonders im Bereich der Biosensorik und Immunodetektion gut etabliert und stellen den bedeutsamsten kommerziellen Anwendungsbereich von Peroxidasen dar.[68].

2.3.3 Dye-Decolorizing Peroxidase aus Mycetinis scorodonius

Die Peroxidase aus dem Pilz *Mycetinis scorodonius* (MsP1) zählt zu den Dye-Decolorizing-Peroxidasen (DyP) und ist ein extrazelluläres hämhaltiges Enzym. Auffällig für alle Dye-Decolorizing-Peroxidasen ist der große Unterschied im Substratspektrum, biochemischen Eigenschaften und Aufbau gegenüber klassischen, extrazellulären, pilzlichen Vertretern der Klasse II-Peroxidasen sowie der Häm-Thiolat-Peroxidasen [79, 80]. Vor 20 Jahren
wurde erstmalig ein Vertreter dieser Superfamilie beschrieben und stellt damit eine sehr junge Enzymfamilie dar [81]. Charakteristisch sowie namensgebend für Dye-Decolorizing Peroxidasen ist die Eigenschaft synthetische Anthrachinon- als auch Azo-Farbstoffe zu oxidieren und demnach zu entfärben. Bisher sind elf weitere Peroxidasen aus sechs Basidiomyceten, die den Dye-Decolorizing-Peroxidasen zugeordnet werden können, bekannt [82, 83, 84, 85, 86]. Neben den aufgezählten Anthrachinon- und Azo-Farbstoffen können die DyP-Peroxidasen ebenfalls alle typischen Peroxidase-Substrate wie 2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) oder 2,6-Dimethoxyphenol (DMP) umsetzten [87, 80]. Darüber hinaus sind jedoch einige Vertreter, sowie die DyP-Peroxidase aus Mycetinis scorodonius, in der Lage, weitere Substrate wie β -Carotin und Xanthophylle zu oxidieren [83, 88]. Ein weiterer interessanter Aspekt der MsP1 stellt die Möglichkeit dar, das kleine organische Moleküle wie DMP direkt in der Bindungstasche am aktivem Zentrum binden können [89, 90, 91]. Im Gegensatz zu klassischen Peroxidasen können DyP-Peroxidasen die diversen Substrate über den Ein-Elektron-Oxidations- wie auch dem Zwei-Elektronen-Oxidationsmechanismus oxidieren (abhängig vom Substrat), womit Oxygenierungs- und Peroxygenierungsreaktionen katalysiert werden können [89, 90]. Die einzigartige Wasserstoffperoxid-Bindestelle von DyP-Peroxidasen unterscheidet sich von klassischen Peroxidasen. Die Neuanordnung des Protons des H_2O_2 erfolgt über ein distales Aspartat (MsP1 D173), wohingegen Histidin bei klassischen Peroxidasen diese Funktion übernimmt. Dieses strukturelle Merkmal ist zum einen essentiell für die Katalyse der MsP1, zum anderen ausschlaggebend für die Struktur der Bindungstasche. Das distale Aspartat zeigt im Gegensatz zum Histidin eine gewisse Flexibilität. Daher ändert das Aspartat die Position der Seitenkette während des Katalysevorganges, das wiederum vonnöten ist, damit Compound I gebildet wird [92]. Strittmatter et al. zeigt zudem, dass der veränderte Schwingmechanismus vom Aspartat zusätzlich die Größe der Bindungstasche verändert, so dass größere Moleküle als H₂O₂ passieren und am aktiven Zentrum binden können [90]. Der Reaktionsmechanismus für die MsP1, sowie alle anderen DyP-Peroxidasen ist bisher nicht abschließend geklärt. Die vermutete Katalyse verläuft teilweise äquivalent zum Mechanismus klassischer Peroxidasen (bis Compound I, s. Abbildung



Abbildung 7: Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus der MsP1 [79].

7), jedoch sind die folgenden Schritte noch unbekannt und eine Bildung von Compound II ist nicht nachweisbar. Die Bindungstasche der MsP1 wird maßgeblich durch die Aminosäurereste von Asparaginsäure 173, Arginin 333, Leucin 362 und Phenylalanin 364 und das aktive Zentrum durch die Reste der Aminosäuren Asparaginsäure 173, Histidin 310, Arginin 333 und Asparaginsäure 396 festgelegt [79, 87].

Die Struktur der MsP1 besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit einer Molmasse von 120-150 kDa. Nicht nur strukturell weist die MsP1 bzw. weisen die DyP-Peroxidasen besondere Eigenschaften vor. Dazu zählen ebenfalls eine außerordentliche Robustheit [93] sowie hohe pH-Werttoleranzen mit einem Optimum im niedrigem pH-Bereich [79, 94]. Eine Expression mit hohem Ertrag konnte parallel zur Charakterisierung der MsP1 in den letzten 10 Jahren mit dem Resultat etabliert werden [83], dass die Firma DSM (Heerlen, Niederlande) eine Enzymformulierung basierend auf der DyP-Peroxidase aus *Mycetinis scorodonius* unter dem Namen MaxiBright[®] vermarktet.

2.4 Enzympromiskuität

Der Fachbegriff enzymatische Promiskuität erlangte zu Beginn des Jahrhunderts Einzug in die Enzymologie. Dabei umfasst der Begriff nicht einzelne Enzyme, sondern beschreibt die allgemeine Eigenschaft von Enzymen alternative Reaktionen zu katalysieren, die von ihren natürlichen physiologischen Katalysen abweichen [95, 96]. Dabei gliedert sich die Enzympromiskuität in drei Gruppen, die im Folgenden näher erläutert werden [97, 95].

Substratpromiskuität

Die Substratpromiskuität umfasst die Eigenschaft einiger Enzyme katalytische Aktivität gegenüber einem breitem Substratspektrum vorzuweisen. Hierbei werden oft unerwartete Substrate eingesetzt und umgesetzt.

Katalytische Promiskuität

Die katalytische Promiskuität umfasst die Eigenschaft von Enzymen eine oder mehrere Reaktionen, die von ihrer natürlichen Katalysereaktion abweichen, zu katalysieren. Hierbei binden alternative bzw. neue Substrate am aktiven Zentrum oder an anderen Aminosäureresten, welche nicht zwingend im aktiven Zentrum lokalisiert sein müssen. Darüber hinaus kann die Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte ebenfalls gegenüber des natürlichen Ablaufes divergieren [98]. Dabei wird zwischen zwei Formen der katalytischen Promiskuität unterschieden. Hult und Berglund differenzieren diese Form der Promiskuität in die zufällige Promiskuität (durch ein Wildtyp-Enzym katalysierte Reaktion) und induzierte Promiskuität (durch Mutation induzierte neue enzymatische Aktivität) [95]. Bornscheuer und Kazlauskas bevorzugen eine Unterteilung hinsichtlich der Unterschiede in den katalysierten Reaktionen auf Grund der beteiligten Gruppen sowie des Katalysemechanismus [99].

Konditionspromiskuität

Die Konditionspromiskuität (condition promiscuity) beschreibt das Verhalten von Enzymen, die bei untypischen Temperaturen sowie pH-Werten oder in nicht nativen Medien auftreten. In industriellen Anwendungen ist oftmals die Kombination von mehreren Formen der Promiskuität zielführend. Dabei wird am Beispiel der Lipasen deutlich, welche in organischen Lösemitteln diverse Substrate umsetzen können [100], dass das Zusammenspiel der Konditionspromiskuität als auch der Substratpromiskuität von Bedeutung ist.

Somit resultiert die Enzympromiskuität aus zufälliger Variation der Aminosäure- und dem entsprechend der DNA-Sequenz im Laufe der Evolution [97]. Heutzutage bieten die verschiedensten Methoden im Gebiet der gerichteten Evolution und des Protein Engineering eine gezielte Modifikation bzw. Manipulation von Enzymen, um eine Steigerung von Aktivität, Selektivität und Stabilität zu erzielen. Demzufolge nimmt die Enzympromiskuität eine bedeutende Rolle in Bezug auf Enzym-Evolution, Enzym-Engineering und Biokatalyse ein und die Kombination von Promiskuität und Proteindesign ermöglicht neuartige Verwendungsmöglichkeiten von Enzymen in organischen Synthesen [99, 96].

2.5 Enzyme in nicht nativen Medien

Enzymatische Reaktionen in organischen Solvenzien bieten eine Vielzahl an industriell attraktiven Vorteilen. Darunter fällt allgemein die Möglichkeit wasserunlösliche sowie unpolare Substrate einzusetzen, die Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichtes zu Gunsten der Produktseite, die Unterbindung von wasserabhängiger Nebenreaktionen, Veränderung der Substratspezifität sowie Enantioselektivität und die Vermeidung von mikrobieller Verunreinigung [101, 33]. Ein gravierender Nachteil der Verwendung von Enzymen in wässrigen Medien ist neben der schlechten Löslichkeit vor allem die Instabilität der meisten organischen Moleküle mit mehr als vier Kohlenstoffatomen. Wasser ist ein schlechtes Lösemittel für die meisten Anwendungen in der industriellen Chemie sowie dessen Entfernung auf Grund des hohen Siedepunkts und niedrigen Dampfdrucks mühsamer als auch teurer als bei der Verwendung von Lösemitteln. Abhängig von der Mischbarkeit eines organischen Solvenz mit Wasser sowie des relativen Anteils an Lösemittel / Wasser im Medium wird in drei Haupttypen von Lösemittelsystemen unterschieden.

Wasser + Wasser mischbares Lösemittel (organisches Co-Lösemittelsystem)

Durch die Zugabe des Reaktionsmediums von wassermischbaren Co-Lösungsmitteln kann die Löslichkeit von wasserunlöslichen Molekülen stark verbessert werden. Das hat zur Folge, dass Massenübertragungsbegrenzungen erheblich reduziert werden, das wiederum zu schnelleren Reaktionsgeschwindigkeiten für hydrophobe Substrate führt. Vorteile dieses Systems sind in der Synthese von Estern und Peptiden vorzufinden, da das thermodynamische Gleichgewicht in diesem System die Synthese gegenüber der Hydrolyse begünstigt [102].

Wasser + Wasser nicht mischbares organisches Lösemittelsystem (Zweiphasensystem)

Dieses System besteht aus zwei Phasen, der wässrigen Phase samt gelösten Enzym und der Phase eines nicht wassermischbaren Lösemittels [102]. Die wässrige Phase bildet eine separate Schicht, welche in Kontakt zur Schicht des Lösemittels steht. Die Katalyse erfolgt hierbei in der wässrigen Phase oder an der Grenzfläche. Die entstehenden Produkte können anschließend umgehend in die organische Phase extrahiert werden. Dieses System ist ebenfalls von Vorteil für die Synthese von Estern und Peptiden, da das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite der Produktbildung, auf Grund der stetigen Extraktion des Produkts, verschoben wird. Charakteristische Merkmale des biphasischen Systems sind die leichte Trennung der Produkte, die gute Regeneration des Enzyms sowie die einfache Separierung der Phasen[103].

Wasserfreies organisches Lösemittelsystem

Native Enzyme sind in einer Reihe von organischen Lösemitteln unlöslich. Daher finden in diesem System lyophilisierte, immobilisierte oder mit amphipathischen Verbindungen modifizierte Enzyme Einsatz. Der Wassergehalt (Wasseraktivität) im System ist ein wichtiger Faktor und ist ausschlaggebend für die Aktivität des Enzyms. Hierbei zeigen Enzyme in hydrophoben Solvenzien eine höhere Aktivität und Stabilität als in hydrophilen. Nützlich ist die Biokatalyse in wasserfreien Medien für die Synthese von Estern, die Umesterung von Estern, als auch für die Peptidsynthese und zur Transformation diverser hydrophober Moleküle [104, 105].

2.5.1 Einfluss organischer Solvenzien auf Enzyme

Für die Umsetzung der potenziellen Vorteile der Biokatalyse in nicht nativen Medien ist ein Verständnis über den Einfluss von organischen Lösemitteln gegenüber Enzymen erforderlich. Hierbei sind die auftretenden Kräfte und Wechselwirkungen von Bedeutung sowie die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Stabilität, Selektivität und Aktivität. Allgemein beschrieben ist, dass abweichende Solvenzien zu Wasser einen oftmals nachteiligen Einfluss auf die Enzymaktivität ausüben [106]. Um Rückschlüsse der Auswirkung eines organischen Solvenz auf die Enzymeigenschaften zu erhalten, wurden in den vergangen Jahren diverse Lösemitteleigenschaften mit Bezug auf eine mögliche Korrelation des Verhaltens eines Enzyms in entsprechenden Lösemitteln betrachtet. Darunter fallen die Dielektrizitätskonstante, das Dipolmoment bzw. die Polarität, die Polarisierbarkeit, logP-Werte und die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Allerdings führt die Betrachtung eines einzelnen der aufgezählten Parameter, nicht zu einer validen Prognose [106].

Nichtsdestotrotz sind einige Zusammenhänge bei der Verwendung von Enzymen in organischen Medien bekannt und werden im Folgenden beschrieben.

Anderung der Konformation

Ausschlaggebend für die katalytische Aktivität von Enzymen ist die Proteinstruktur, welche durch die Tertiär- und Quartärstruktur vorgegeben ist. Maßgeblich für die Proteinfaltung ist ein Gleichgewicht zwischen hydrophoben Wechselwirkungen, elektrostatischen Ladungswechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräften und Wasserstoffbrückenbindungen [107]. Hierbei kann allgemein beschrieben werden, dass in wässrigen Systemen die polaren Gruppen des Proteins auf der Außenseite lokalisiert sind und dem wässrigem System exponiert sind. Demgegenüber sind die unpolaren Gruppen nach innen gerichtet und bilden einen hydrophoben Kern. Dabei wird Wasser benötigt, um viele dieser Wechselwirkungen zu fördern bzw. zu bewerkstelligen, während ein Mangel an Wasser sowie die Anwesenheit eines organischen Lösemittels diese Kräfte stören können, woraus eine Entfaltung des Proteins resultieren kann. Oftmals sind großen Mengen an Wasser nicht zwingend notwendig und bereits einige Wassermoleküle auf einem Protein genügen für eine katalytische Funktion [108]. Im Falle des Eindringens eines organischen Lösemittels in das aktive Zentrum eines Enzyms können verheerende Auswirkungen für die Katalyse die Folgen sein. Insbesondere bei Enzymen mit stark polaren Übergangszuständen wird durch die Exposition mit organischen Solvenzien die lokale Polarität in der Nähe des aktiven Zentrums verringert, wodurch der polare Übergangszustand destabilisiert wird [109]. Besondere polare Solvenzien können tief in Proteine penetrieren und sind weitaus besser in der Lage strukturelle Veränderungen zu induzieren als unpolare Lösemittel, welche oft nicht die polare äußere Spähre des Proteins durchdringen [110]. Darüber hinaus besitzen hydrophobe

Lösungsmittel im Allgemeinen eine geringe Tendenz das essentielle Wasser bzw. die Hydrathülle dem Protein zu entziehen. Dies zeigt erneut, dass hydrophobe Solvenzien in der Regel hydrophilen Lösemitteln überlegen sind in Bezug auf Biokatalyse in wasserfreien Systemen [111].

Änderung der Proteinflexibilität

Neben der Erhaltung der Konformation von Proteinen ist die Dynamik ein weiterer wichtiger Aspekt für die katalytische Funktion von Enzymen [112]. Diverse Studien postulieren eine direkte Korrelation der Proteindynamik und des Wassergehaltes [113, 114, 115]. Dabei konnte zu einem gezeigt werden, dass eine Erhöhung des Wassergehaltes zu einer Steigerung der Flexibilität im Protein führt, die wiederum in einer höheren Aktivität des Enzyms resultiert. Dementsprechend ist eine hohe Konformationsflexibilität von großer Bedeutung für die enzymatische Katalyse in Wasser. In nicht nativen Medien wird oftmals eine höhere Enzymaktivitäten in unpolaren Solvenzien nachgewiesen, welche die Dynamik von Proteinen negativ beeinflusst. Dieses Paradoxon könnte durch das zuvor beschriebene Phänomen erklärt werden, dass polare Lösungsmittel in das Enzym penetrieren, was zu strukturellen Störungen führen kann. Ein grundlegendes Verständnis der Proteinflexibilität konnte so bereits erarbeitet werden, jedoch sind diese komplexen Zusammenhänge nicht abschließend verstanden [114, 113].

Thermodynamische Stabilisierung des Substrats

Organische Solvenzien können unterschiedliche Einflüsse auf Reaktanden als auch Produkte ausüben, wodurch eine Veränderung der katalytischen Aktivität möglich ist. Höhere intrinsische Löslichkeit eines Substrates in einem organischem Lösemittel stellt eine thermodynamische Stabilisierung des Substrates dar. Das hat zur Folge, dass die Aktivität des Enzyms abnimmt [116]. Darüber hinaus nehmen organische Lösemittel Einfluss auf die thermodynamischen Aktivitätskoeffizienten. Daraus folgt zum Beispiel bei unpolaren, viskosen Lösemitteln, dass die Interaktion zwischen Enzym und Substrat auf Grund einer Verringerung der Stoßhäufigkeit behindert wird. Demnach beeinflussen organische Solvenzien die Lage des Gleichgewichts sowie die Geschwindigkeit in der das Gleichgewicht erreicht wird.

Protonierungsgrad des Enzyms

Die Proteinstruktur und damit einhergehend die Aktivität eines Enzyms ist ebenfalls von dem Protonierungsgrad der Aminosäurereste der Seitenketten als auch des aktiven Zentrums abhängig. Dieser kann über den pH-Wert des Mediums maßgeblich eingestellt werden. Mit Hilfe des so genannten pH-Gedächtnis kann der Protonierungsgrad unter Verwendung einer entsprechenden Pufferlösung im Vorfeld angepasst werden und durch anschließendes gefriertrocknen behält das Enzym diesen Status bei. Wird anschließend das getrocknete Enzym in einem organischen Solvenz eingesetzt, weist das Enzym den selbigen Protonierungsgrad vor [106].

2.5.2 Lipasen und Peroxidasen in organischer Solvenzien

Wasserfreie Medien erlauben die Vermeidung von wasserabhängigen Nebenreaktionen wie die Hydrolyse im Falle der Lipase. Daraus resultiert eine Verschiebung des thermodynamischen Gleichgewichts zu Gunsten der Synthesereaktion. Darüber hinaus sind Lipasen in einigen organischen Solvenzien thermodynamisch aktiver [117].

Lipaseabhängige Biokatalyse in nicht nativen Medien zur Trennung von Alkoholen, Säuren oder Lactonen durch Umesterungsreaktionen ist mittlerweile weitverbreitet [105]. Dazu haben in den letzten Jahren weitere Verfahren, wie die Acylierung von Aminen oder Ammoniak, an Bedeutung gewonnen sowohl für die Auflösung von Aminen als auch für die Herstellung chiraler Amide [118, 119]. Die Nutzung von Peroxidasen in organischen Medien ist dagegen weniger ausgeprägt. Grund dafür ist der bisher geringe kommerzielle Nutzen. Um die große Lücke zwischen dem riesigen Repertoire natürlicher Peroxidasen und dem begrenzten kommerziellen Peroxidase Produkten zu schließen, ist es notwendig, eine weitere Verbesserung der Kosten-Wettbewerbsfähigkeit zu erzielen. Biokatalysatoren auf Peroxidase-Basis weisen auf Grund der Vielseitigkeit jedoch ein hohes Potenzial für effiziente asymmetrische Syntheseanwendungen auf. Des Weiteren können Peroxidasen ein breites Spektrum an aliphatischen/aromatischen oder inerte Kohlenwasserstoffen funktionalisieren (Hydroxylierung, Sulfoxidierung, Epoxidierung) [120, 8, 121]. Besonders DyP-Peroxidasen bieten wegen ihrer speziellen Charakteristika viele Möglichkeiten für neuartige Synthesewege. Zum einen ist die hohe Toleranz gegenüber physikalischen Faktoren zu nennen, von größerer Bedeutung ist jedoch die Fähigkeit, Oxygenierungs- bzw. Peroxygenierungsreaktion in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durchzuführen unabhängig von weiteren Co-Faktoren.

2.6 Enzymimmobilisation zur Anwendung in nicht nativen Medien

Neben allen aufgezeigten Vorteilen die Enzyme gegenüber klassischen Katalysatoren haben, bestehen weiterhin zahlreiche limitierende Faktoren, welche für eine erfolgreiche Nutzung überwunden werden müssen. Dazu zählt ebenfalls die schlechte Löslichkeit von Enzymen in fast allen organischen Solvenzien. In den vergangen 100 Jahren wurden diverse





Einschluss in Trägermatrix



Cross-linking Trägermatrix frei

Abbildung 8: Übersicht der verschiedenen Immobilisationsarten.

Strategien entwickelt, um diese Restriktionen zu überwinden [122]. Eine der erfolgreichsten Methoden stellt dabei die Immobilisierung dar. Unter diesem Begriff werden alle Techniken zusammengefasst, die eine physikalische oder chemische Fixierung eines Enzyms an oder in einen festen Träger umfassen, so dass ein heterogenes immobilisiertes System entsteht (s. Abbildung 8) [123, 124]. Grundsätzlich können drei traditionelle Methoden der Enzymimmobilisierung unterschieden werden, welche die Bindung an einen physischen Träger, den Einschluss in eine Polymermatrix und das Vernetzen des Biokatalysators untereinander, beinhalten. Hierbei spielen die Oberflächeneigenschaften des Enzyms sowie die des Trägers eine bedeutende Rolle. Oberflächencharakteristika von Enzymen sind zum einen polare Gruppen (z.B. die Aminogruppen des Lysins oder die Säuregruppe der Glutaminsäure), unpolare Oberflächenregionen oder Zuckeranteile, die maßgeblich die Oberflächeneigenschaften mit definieren. Für das jeweilige Enzym kann das Trägersystem dementsprechend präpariert bzw. angepasst werden, damit möglichst optimale Bedingungen für das Enzym vorliegen.

Bindung des Biokatalysators an einen Träger (Carrier)



Diese Variante der Immobilisierung umfasst sämtliche Methoden der physikalischen

Abbildung 9: Schematische Übersicht der verschiedenen Möglichkeiten zur Enzymanbindung an einen physischen Träger.

(hydrophobe Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Wechselwirkungen), ionischen oder kovalenten Fixierung eines Enzyms an einen soliden Träger (s. Abbildung 9). Allgemein kann festgehalten werden, dass die reine physikalische Bindung die schwächste Anbindung eines Enzyms an einen Träger darstellt. Jedoch ist die adsorptive Fixierung eine der schonendsten Immobilisierungsverfahren auf Grund der geringen Einwirkung auf die Struktur des Enzyms und daraus resultierend auf die Aktivität. Oftmals zeigen adsorptiv gebunden Enzyme eine zu schwache Anbindung, so dass ein Einsatz in industriellen Prozessen unter hohen Konzentrationen an Reaktanden, Produkten und hohen Ionenstärken zum Ablösen des Biokatalysators vom Träger führen kann. Eine ionische Bindung ist deutlich stärker im Vergleich zur adsorptiven Bindung. Die kovalente Bindung eines Enzyms ist generell gesehen die stabilste und stärkste Möglichkeit der Enzymfixierung und minimiert den Prozess des "leaching". Diese Art der Immobilisierung birgt jedoch das Risiko, das Enzym irreversible zu deaktivieren, womit sowohl das Enzym als auch der Träger unbrauchbar werden. Die chemische Vernetzung des Enzyms führt zu größeren strukturellen Veränderungen auf der Proteinoberfläche, die wiederum die Aktivität negativ beeinflussen. Typische Träger die für diese Methode eingesetzt werden basieren auf Kunstharzen, metallischen Nanopartikeln, Biopolymeren oder anorganischen Polymeren, wie z.B. Zeolith oder mesoporöse Kieselsäuren [125]. Wobei die größte Aufmerksamkeit geordneten mesoporösen Silikaten, auf Grund ihrer attraktiven Eigenschaft bezüglich der Enzymimmobilisierung, zu kommt, welche in einheitlichen Porengrößen, großen Oberflächen, leichte funktionalisierbaren Oberflächen bestehen und gleichzeitig eine hohe thermische sowie chemische Stabilität aufweisen. Diese Methode hat sich in den vergangen Jahren als sehr vielversprechend erwiesen und bietet eine effiziente und kompatible Trägermatrix für diverse Biokatalysatoren [126, 127, 128].

Cross-linking des Biokatalysators

Ein Extremfall der kovalenten Anbindung von Enzymen ist die Vernetzung von Enzymen unter Verwendung bi-funktionellen Reagenzien (s.Abbildung 10). Ein klassisches und



Abbildung 10: Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze zur Herstellung trägerfreier immobilisierter Enzyme [131].

weitverbreitetes Reagenz zur Ausbildung dieser kovalenten Bindungen ist Glutardialdehyd (GDA). Die auf diese Weise vernetzten Enzyme bilden trägerlose Makropartikel, da der Biokatalysator nicht an einen Träger fixiert wird, sondern selber als solcher fungiert. Eingesetzt werden überwiegend Enzyme in kristalliner sowie lyophilisierter Form oder als Aggregate. Weniger häufig werden auch Enzyme in Lösung vernetzt [129, 130].

Einschluss des Biokatalysators

Enzyme können des Weiteren in ein Polymernetzwerk (Gelgitter), welche aus organischen Polymeren oder Kieselsol-Gelen bestehen können, oder in eine Membranvorrichtung, welche aus Hohlfaseren oder Mikrokapseln bestehen, eingeschlossen werden (s. Abbildung 11). Ein Einschluss allein ist in den meisten Fällen jedoch nicht ausreichend, um ein Austrag des Enzyms aus dem Trägersystem zu vermeiden. Daher wird oft eine zusätzliche Möglichkeit zur kovalenten Bindung des Enzyms mit angeboten. Für eine klare Unterscheidung zwischen Einschluss und Fixierung an ein Trägersystem gilt die Definition, dass die Synthese der Polymermatrix in Gegenwart des Enzyms erfolgen muss [133].



Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Beispiels zur Einschluss-Immobilisation auf Basis einer Polyvinylalkoholmatrix mit zusätzlicher Integration einer Kovalenten Anbindung des Enzyms über Ethylendiamin/Glutaraldehyd [132].

Zutreffend auf alle Arten der Immobilisierung sind eine Reihe von vorteilhaften Faktoren für den Einsatz von Enzymen in nicht wässrigen Systemen. Angefangen bei der Langzeitstabilität des Biokatalysators, die die Lebenszeit nativer Enzyme bei weitem überschreitet. Darüber hinaus ist eine verbesserte Stabilität sowohl unter Lager- als auch unter Betriebsbedingungen gegenüber Denaturierung durch Wärme oder organischen Lösemitteln vorzufinden. Durch eine der Anwendung entsprechenden Immobilisation kann eine Kontamination des Produkts durch einen ausgetragenen Biokatalysator minimalisiert bis sogar völlig ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird die Rückgewinnung und Wiederverwendung kostspieliger Enzyme gewährleistet sowie der Einsatz im kontinuierlichen Festbettbetrieb ermöglicht. Die verbesserte Enzymleistung und wiederholte Nutzbarkeit ergibt eine höhere Katalysatorproduktivität ($kg_{Produkt}/kg_{Enzym}$), die wiederum die Enzymkosten pro kg_{Produkt} bestimmen [123, 134].

3 Zielsetzung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Realisierung alternativer Synthesewege für industriell relevante Prozesse. Dabei gliedert sich die Arbeit in zwei unterschiedliche biokatalytische Verfahren. Zu einem lag der Fokus auf der Entwicklung eines Modellsystems zur Herstellung von Ausgangsstoffen für die Herstellung von isocyanatfreie Polyurethan auf Basis der nachhaltigen Ressourcen Sebeinsäure und zyklischem Glycerin-1,2-Carbonat unter Verwendung der Lipase B aus *Candida antarctica*. Um die komplexen Zusammenhänge bei der biokatalytischen Veresterung unter Erhalt der zyklischen Carbonatfunktionalität zu untersuchen, wurde eine Optimierung des Prozesses sowie ein Verständnis über Folge- und Nebenreaktionen angestrebt. Das Folgeziel war die Implementierung der optimierten Methodik zur Vernetzung von kommerziell erhältlichen Polyestern, über die zyklische Carbonatfunktionalität zu bewerkstelligen. Beabsichtigt war eine Beschichtung herzustellen mit gleichbleibenden mechanischen und physikalischen Eigenschaften. Hierbei ist eine Reduzierung der notwendigen Katalysatoren beabsichtigt, welche für die klassischen Vernetzungsverfahren essentiell sind, jedoch in der Regel umweltschädigend und toxisch wirken.

Enzymgesteuerte Synthesen in nicht nativen Medien sind oftmals nicht ohne den Schritt einer Immobilisation umsetzbar. Die Auswahl an lösemittelbeständigen und zugänglichen Lipase-Immobilisaten ist stark limitiert, weshalb das Interesse an Alternativen besteht. Das Ziel ein Immobilisationsprozess zu entwickeln für den Einsatz von Lipasen in nicht nativen Medien ist schlussendlich von großer Bedeutung. Dafür wurde ein System auf Basis von Polymerbürsten an Silika-Partikeln mittels ATRP erprobt sowie ein Einfluss der Oberflächenstruktur auf den Erfolg der Immobilisation ermittelt. Dabei sollten Rückschlüsse auf Enzymbelegung und Enzymaktivität in wässrigen als auch organischen Medien sowie eine Wiederverwendbarkeit als Indikatoren dienen, um die Immobilisation zu bewerten.

Das zweite biokatalytische Verfahren verfolgte das Ziel eine Modellsynthese zur Herstellung von epoxidierten zyklischen Alkenen unter Verwendung von einer Dye-DecolorizingPeroxidase aus *Mycetinis scorodonius* zu realisieren. Um eine Optimierung der Prozessführung umzusetzen, war zu einem das Ziel, ein Verständnis über den Zusammenhang von pH-Wert, Substratkonzentration sowie Reaktionszeit zu erlangen. Zum anderen war die Entwicklung eines Immobilisationsprozes der verwendeten Peroxidase in Verbindung mit der Integration in ein Reaktorkonzept angestrebt, welcher essentiell für eine erfolgreiche Umsetzung war.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Geräte

Bezeichnung	Reinheit	Lieferant
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan	99,0%	Sigma Aldrich
2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6- sulfonsäure)Diammoniumsalz	98,0%	Alfa Aesar
3- (Trime tho xy sily l propyl)-2-brom o-2-methyl propionate	95,0%	abcr
3-Aminopropyltriethoxysilan	98,0%	Alfa Aesar
Aceton	99,0%	Carl Roth
Acetonitril	99,9%	Carl Roth
Ammoniak	25,0%	Carl Roth
Anisol	99,0%	Carl Roth
Buttersäure-4-methylumbelliferylester	98.0%	Sigma Aldrich
Chloroform-d	99,8%	Armar
Copolyester (CPE) 1639	k.A.	Ultimaker
Cyclohexen	99,0%	Merck
Cyclopenthylmethylether	99,0%	Carl Roth
di-Natriumhydrogenphosphat	99,0%	Bernd Kraft
$Dimethyl sulfoxid-d_6$	99,5%	Deutero
Dynapol LS 415	k.A.	Evonik
Essigsäure-n-butylester	98,0%	Carl Roth
Ethanol, absolut	99,9%	Carl Roth
Ethanol, vergällt	96,0%	Carl Roth
Glutardialdehyd	25,0%	Carl Roth
Glycerin-1,2-carbonat	98,0%	Huntsman
Hexamethoxymethylmelamine	95,0%	Merck
Isopropanol	99,8%	Carl Roth
Kupfer(II)-bromid	$99{,}9\%$	Sigma Aldrich

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien Teil 1.

Bezeichnung	Reinheit	Lieferant
L-(+)-Ascorbinsäure	99,5%	Carl Roth
Methacrylsäuremethylester	$99,\!0\%$	Merck
Methanol	$99{,}9\%$	Carl Roth
n-Hexan	98,0%	Carl Roth
N-Succinimidyl methacrylate	$99,\!0\%$	abcr
N,N,N',N",N"'-Pentamethyldiethylentriamin	$98,\!0\%$	Merck
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	$98,\!0\%$	Carl Roth
p-Toluolsulfonsäure Monohydrate	98,0%	Alfa Aesar
Polyvinylamine Lupamin _© 9095	k.A.	BASF
Sebacinsäure	$98,\!0\%$	Merck
Tetraethylorthosilicat	$99,\!0\%$	Merck
Tetrahydrofuran	$99,\!0\%$	Carl Roth
Toluol	99,5%	Carl Roth
Wasserstoffperoxid	30,0%	Carl Roth

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien Teil	2.
---	----

Tabelle 3: I	Liste der	verwendeten	Instrumente	Teil	1.

Bezeichnung	Messtechnik	Hersteller
5973 MS	Massenspektrometrie	Agilent
6530 Q-TOF LC/MS	Massenspektrometrie	Agilent
6890 GC	Gaschromatographie	Agilent
Brucker Avance III Fourier 400	NMR-Spektroskopie	Brucker
Brucker Fourier 300	NMR-Spektroskopie	Bruker
Bruker Vector 22	IR-Spektroskopie	Bruker
Bruker Lumos	IR-Spektroskopie	Bruker
Cary Eclipse	Fluoreszenzspektroskopie	Varian

Bezeichnung	Messtechnik	Hersteller
micro-TRI-gloss	Reflektometrie	ВҮК
REM S-3400N	Rasterelektronenmikroskopie	Hitachi High-Technologies
Schimadzu UV-1650PC	UV-Vis Spektroskopie	Schimadzu
TG209 TASC $414/3$	Thermogravimetrie	Netzsch
Ultimaker s5	3D-Drucker	Ultimaker
720-ES ICP OES	Atomemissionsspektrometrie	Varian

4.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung	Lagerung
Phosphatpuffer pH 8,0	$10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$	4°C
	$10 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$	
Phospaht-Citrat-Puffer pH 5,0	$0,2 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4$	4°C
	0,1 M Citronensäure	
Laufmittel LC/MS	90% Acetonitril	$4^{\circ}\mathrm{C}$
	$9,9\% \text{ ddH}_2\text{O}$	
	0,1% Armeisensäure	

Tabelle 5: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen.

Enzyme	Hersteller	Lagrung
CalB immo Plus	Purolite	4°C
Lipozyme [®] CALB	Novozymes®	$4^{\circ}\mathrm{C}$
$MaxiBright^{(R)}$	DSM	$4^{\circ}\mathrm{C}$

Tabelle 6: Liste der verwendeten Enzyme.

4.3 Enzyme

4.4 Enzymimmobilisierung

4.4.1 Immobilisierung auf Silikapartikel

Synthese von TEOS-Partikeln

Zur Synthese von TEOS-Partikeln wurden 34 ml Ethanol (abs.), 2,8 ml Ammoniak (25%) und 2,8 ml Tetraethoxysilan (TEOS) für 24 h bei 25 °C durchmischt. Die nach dem Stöber-Verfahren [135] synthetisierten Partikel wurden durch Zentrifugation isoliert und dreimalig mit 15 ml Ethanol (abs.) gewaschen.

Silanisierung von TEOS-Partikeln

Die Funktionalisierung der Partikeloberfläche erfolgte unter Verwendung von 3-Aminopropyltriethoxysilan (APTES) und 3-(Trimethoxysilyl)propyl-2-bromo-2-methylpropionat (AIS) (s. Abbildung 37). Ausgeführt wurde die Funktionalisierung in 10 ml Ethanol (abs.), in dem die Partikel resuspendiert wurden und 100 µl Silan sowie 10 µl Ammoniak (25%) hinzugefügt wurden. Dabei wurden verschiedene Verhältnisse von APTES zu AIS eingesetzt. Die Partikelsuspension wurde abschließend über Nacht bei 60 °C durchmischt. Die silanisierten TEOS-Partikel wurden, wie zuvor beschrieben, ebenfalls dreimalig mit Ethanol (abs.) gewaschen.

Polymerisation von Methylmethacrylat an TEOS-Partikel

Von den silanisierten TEOS-Partikeln wurden nach dem trocknen 700 mg sowie 20,3 mg Ascorbinsäure in einen Einhalskolben (Reaktionskolben) überführt. Der Kolben wurde mit einem Septum verschlossen und für eine halbe Stunde mit Argon begast. In einem Zweihalskolben entgaste ein Gemisch aus 9,8 ml Methylmethacrylat und 9,26 ml Anisol über einen Pump-Freeze-Cycle. Hierbei wurde zunächst der Zweihalskolben mit einem Septum bestückt und mit einem Küken an die Vakuumpumpe angeschlossen. Als nächstes wurde der Kolben evakuiert, anschließend verschlossen und das Reaktionsgemisch mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde erneut evakuiert, dann mit Argon belüftet und unter Argonatmosphäre das Reaktionsgemisch aufgetaut. Im nächsten Durchgang wurde zuerst der Kolben tiefgefroren, evakuiert, unter Argonatmosphäre gestellt sowie aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt und anschließend wurde das entgaste Reaktionsgemisch in den Reaktionskolben mittels einer Argon gespülten Spritze überführt. Der Reaktionskolben wurde daraufhin bei 50 °C in einem Ölbad platziert und die Partikel-Emulsion mittels eines Rührfisches durchmischt. Abschließend wurden zum Start der Polymerisation 286,5 µl der Katalysator-Stammlösung, bestehend aus 0,8 µmol^{*l⁻¹} N,N,N',N",N"'-Pentamethyldiethylentriamin (PMDETA) und 0,08 µmol^{*l⁻¹} Kupfer(II)-bromid (CuBr₂) gelöst in Acetonitril, zugegeben. Nach 1 h wurde die Polymerisation abgebrochen und die Partikel durch Zentrifugation isoliert. Die Aufarbeitung der separierten Partikel erfolgte durch zweifaches waschen in THF, THF/ddH₂O (50:50), ddH₂O, Acetonitril und zweifaches waschen in Methanol, bevor diese getrocknet wurden. Das ddH₂O bezeichnet Wasser einer Reinstwasseranlage (Mili-Q, Merck Millipore, Darmstadt) mit einem spezifischen Widerstand von 18,2 M Ω^{*} cm⁻¹ bei 25 °C.

Adsorptive Immobilisation an PMMA beschichteten TEOS-Partikeln

Die Immobilisierung der CalB wurde in einem 50 ml Falcon-Tube durchgeführt. Zunächst wurden 160 mg der modifizierten Partikel eingewogen und in 22,5 ml PO₄ Puffer pH 8,0 resuspendiert. Anschließend wurden 2,5 ml der Lipaselösung (10 g*l⁻¹) hinzugegeben und bei 20 °C für 24 h bei 100 rpm inkubiert. Nach 24 h Inkubationszeit wurden die Partikel abgenutscht, mit 50 ml PO₄ Puffer pH 8,0 sowie abschließend mit 10 ml 2-Propanol über der Nutsche gewaschen und getrocknet.

Kovalente Immobilisation an PMMA beschichteten TEOS-Partikeln mittels GDA

Die Immobilisierung erfolgte analog zur adsorptiven Immobilisation. Lediglich die Partikel wurden hier in 20,5 ml PO₄ Puffer pH 8,0 resuspendiert. Nach Zugabe der Lipase wurde abschließend eine GDA Konzentration von 2% eingestellt.

4.4.2 Immobilisierung auf Textilien

Modifizierung des Polyesters

Im ersten Schritt wurde das verwendete Polyestervlies (PET E20102 G/G) mit Lupamin[®] 9095 (Polyvinylamin, Feststoffgehalt 10% - 15%) modifiziert. Hierfür wurde Lupamin[®] mit ddH₂O 1 : 1 verdünnt und mit einigen Tropfen Marlipal 013/80 versetzt. Das Vlies wurde nun in der Polyvinylamin/ddH₂O/Marlipal Lösung für 30 min inkubiert und im Folgenden mittels eines Foulards definiert abgequetscht (170% - 190% Flottenaufnahme). Das feuchte Vlies wurde zunächst bei 80 °C vorgetrocknet, bevor das Polyvinylamin final bei 150 °C für 15 min im Ofen thermisch fixierte. Vor einer weiteren Nutzung lagerte das modifizierte PET über Nacht bei Raumtemperatur. Die Auflage an PVAm wurde anschließend gravimetrisch bestimmt, indem vor und nach der PVAm Ausrüstung das jeweilige Textil ausgewogen wurde. Die ermittelte Gewichtsdifferenz wurde als prozentualer Massenanteil wiedergegeben [136].

Immobilisation auf PVAm modifiziertem PET Gewebe

Das PVAm modifizierte Polyestergewebe, mit einer Größe von 10 cm * 15 cm, wurde zunächst mit ddH₂O befeuchtet. Anschließend wurden 12 ml einer 0,5% GDA haltigen MaxiBright[®] Enzymformulierung auf getröpfelt und gleichmäßig verteilt. Für eine optimale Fixierung des Enzyms wurde die Lösung 24 h auf dem Gewebe inkubiert. Unspezifisch gebundenes Enzym wurde über ein Waschverfahren entfernt . Hierfür wurde das Textil mit 100 ml 10 mM PO₄ pH 8,0 bei 80 °C für 30 min im Linitest[®] gewaschen und abschließend über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

4.5 Charakterisierung der Lipase Immobilisate basierend auf modifizierten Silikapartikeln

4.5.1 Thermogravimetrie

Nach der TEOS-Partikel Synthese sowie nach jedem Schritt der TEOS-Partikel Modifikation wurden thermogravimetrische Analysen (TGA) durchgeführt. Zur Analyse wurde ein TG209 & TASC 414/3 von Netzsch verwendet. Alle Messungen wurden unter Stickstoff-Durchstrom vermessen. Dabei wurden alle Proben zunächst mit 40 K*min⁻¹ auf 100 °C aufgeheizt und für 20 min konditioniert. Anschließend wurde ein Temperaturgradient von 10 K*min⁻¹ bis zu 900 °C gefahren. Die Bestimmung des Massenverlustes erfolgte zwischen 100 °C und 900 °C.

4.5.2 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahmen der nicht immobilisierten Partikel wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop S-3400N II der Firma Hitachi High-Technologies Europe GmbH erstellt. Hierfür wurde eine Spatelspitze der Partikel in 40 ml ddH₂O mittels eines Ultraschall-Homogenisators für 25 min homogenisiert. Anschließend wurde die Probe 1:100 mit ddH₂O verdünnt. Aus dieser verdünnten Lösung wurde ein Tropfen auf einen gereinigten sowie entfetteten Silica-Wafer appliziert. Die Proben wurden im Folgenden getrocknet, bevor sie mittels des Rasterelektronenmikroskop vermessen wurden.

4.5.3 Dynamische Lichtstreuung zur Bestimmung des hydrodynamischen Durchmessers

Der hydrodynamische Durchmesser aller Partikelvariationen wurde mittels eines Zetasizers Nano ZS der Firma Malvern Instruments Ltd. durchgeführt. Eine Spatelspitze der jeweiligen PMMA beschichteten TEOS Partikel wurden in 10 ml dH₂O für 25 min homogenisiert unter Verwendung eines Ultrashall-Homogenisators. Die Partikel-Suspension wird dabei durchgehend mit Eiswasser gekühlt. Für die Messung wird 1 ml Suspension in eine Polysterol Küvette überführt und pro Messung dreifach bestimmt. Bei zu hoher Partikelkonzentration muss gegebenenfalls die Suspension verdünnt werden.

4.5.4 Gelpermeationschromatographie zur Analyse der Molmasse der hergestellten PMMA-Beschichtung

Die Bestimmung des Zahlenmittels, Massenmittels, Zentrifugenmittels der Molmassenverteilung (Mn, Mw, Mz) und der Polydispersität (PD) erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie. Dabei kam ein Viscotek 270 max der Firma Malvern Instruments zum Einsatz. Hierfür wurden 10 mg Probe in 2 ml THF gelöst. Als Standards dienten Polymethylmethacrylat-Proben mit folgenden Molgewichten: 1850 g/mol, 6830 g/mol, 20100 g/mol, 73200 g/mol, 218000 g/mol, 608000 g/mol und 1050000 g/mol.

4.5.5 Enzymbelegung auf PMMA beschichteten Silikapartikel

Die Belegung der PMMA beschichteten TEOS-Partikel erfolgte durch Aktivitätsmessungen der Immobilisierungslösung vor und nach dem Immobilisationsprozess. Zur Bestimmung der Aktivität wurde der unter 4.5.6 beschriebene Fluoreszenz-Assay eingesetzt. Lediglich die Enzymlösung wurde 1:10 mit 20 mM PO₄ Puffer pH 8,0 verdünnt. Aus der Vorverdünnung wurden anschließend 100 µl in die Küvette injiziert in der zuvor 100 µM Substrat und PO₄ vorgelegt wurden. Die Detektorspannung musste hierfür auf 525 V angepasst werden.

Zur Ermittlung der Umsatzraten musste mit 4-Methylumbelliferon im entsprechenden Konzentrationsbereich kalibriert werden. Hierfür wurde eine Stammlösung mit $0.5 \text{ mM}^{*}\text{l}^{-1}$ hergestellt und in 3 µl Schritten auf 3 ml PO₄ Puffer zugegeben, bis eine Konzentration von 8 µmol^{*}l⁻¹ erreicht wurde. Die Auswertung erfolgte im linearen Bereich der Steigung.

4.5.6 Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität

Lipasekatalysierte Hydrolyse von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat

Für die kinetische Aufzeichnung der Hydrolyse wurden 10 mg der immobilisierten Partikel in eine Quarzglas-Küvette (Hellma Analytics) eingewogen. Anschließend wurden 2985 ml eines 20 mM PO₄ Puffer pH 8,0 mit dem Substrat in einem separatem Gefäß vor gemischt (Gesamtvolumen 3 ml), um eine Substratkonzentration von 100 µM einzustellen. Dies wurde dann in die Küvette mit dem Immobilisat überführt. Bei Verwendung von flüssiger Lipase wurde diese zum Schluss zugegeben anstelle der Immobilisate. Die Kinetik wurde über 500 s aufgezeichnet bei konstanter Durchmischung mittels eines Rührfisches, wenn nicht anders angegeben. Durchgeführt wurden alle Messungen am Varian Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer bei konstanten 20 °C und einer Detektorspannung von 465V. Anregungswellenlänge sowie Emissionswellenlänge betrugen hierbei 327 nm bzw. 449 nm. Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden im Anschluss in die Konzentration von 4-Methylumbelliferon transferiert. Diesbezüglich musste am selben Tag wie die Aktivitätsmessungen, mit 4-Methylumbelliferon in PO_4 Puffer pH 8,0 kalibriert und die Intensität mittels der Kalibrationsgleichung verrechnet werden.

Lipasekatalysierte Umesterung von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat

Die Umesterung von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat mit Isopropanol wurde unter Ausschluss von Wasser in reinem Isopropanol durchgeführt. Hierfür wurde eine Quarzglas-Küvette mit 10 mg des Biokatalysators sowie 3 ml Isopropanol und 100 μ M über 1500 s bei 25 °C im Varian Cary Eclipse Flourescence Spectrophotomerter mit 324 nm angeregt. Die Detektion erfolgte bei 382 nm bei einer Detektorspannung von 600V.

Lipasekatalysierte Veresterung von Ölsäure

Die Veresterung von 50 mM Ölsäure mit 100 mM Ethanol erfolgte in 2 ml n-Heptan. Zunächst wurden 10 mg des Biokatalysators in ein Reagenzglas vorgelegt bevor das Reaktionsgemisch zugeführt wurde. Die Reaktion erfolgte bei kontinuierlicher Durchmischung bei 45 °C. Nach 24 h wird die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml (HCl 14%) gestoppt. Die organische Phase wurde isoliert und in 1,2 ml frischem n-Heptan verdünnt bevor 110 mM Kupferacetat addiert wurden. Hierfür wurde eine Stammlösung des Kupferacetats frisch in ddH₂O hergestellt und mit Pyridin auf einen pH-Wert von 6,1 eingestellt. Die Menge an veresterter Ölsäure wurde nach der Zugabe von Kupferacetat über die Absorption bei 705 nm (UV-1650 PC-Spektrometer Schimadzu, Japan) ermittelt.

4.6 Charakterisierung der Peroxidase Immobilisate basierend auf PET-Gewebe

4.6.1 Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopie (REM) Aufnahmen des unbehandelten PET-Gewebes sowie nach Immobilisation der Peroxidase wurden am Deutschen Textilforschungszentrum Nord-West gGmbH in Krefeld mit einem Rasterelektronenmikroskop S-3400N II der Firma Hitachi High-Technologies Europe GmbH erstellt. Hierfür konnte das PET-Gewebe ohne Probenvorbereitung auf das Mikroskop appliziert werden.

4.6.2 Enzymbelegung auf textilen Polyestergewebe

Die Quantifizierung der gebundenen MaxiBright[®] erfolgte über die Bestimmung an Eisenatomen per ICP-OES (Varian-ES ICP Optical Emission Spectrometer) Analyse. Hierfür wurden 0,2 g des Textils in 8 ml 69% Salpetersäure mittels einer Mikrowelle aufgeschlossen und die aufgeschlossene Lösung wurde anschließend in einen 50 ml Messkolben überführt sowie mit ddH₂O aufgefüllt. Die Proben wurden über Nacht im Kühlschrank ruhen gelassen und abschließend über einen Sterilfilter (0,2 μ M) gereinigt, bevor diese vermessen wurden.

Parallel zu den enzymgebundenen Proben konnten Referenzen, die lediglich aus dem PVAm modifiziertem PET Gewebe bestanden, angefertigt und vermessen werden. Für die Quantifizierung des Eisens wurden alle Proben 5-fach bestimmt.

4.6.3 Bestimmung der Enzymaktivität und Stabilität

Zur Aktivitätsbestimmung der Immobilisate sowie der flüssigen MaxiBright[®] wurden eine 5 ml Reaktionslösung angesetzt, bestehend aus einem 100 mM Natriumacetate-Puffer pH 5 (2,5 ml), sowie 0,5 mM ABTS und 0,35 mM H_2O_2 . Anschließend wurde ein 1 cm² ausgerüstetes Textil bzw. flüssige MaxiBright[®] hinzugegeben und durchgehend geschwenkt. Die Quantifizierung des entstandenen Radikals wurde mittels UV/VIS Spektroskopie bei 420 nm durchgeführt [137, 138].

Die Lösemittelstabilität der immobilisierten MaxiBright[®] bezüglich der Aktivität wurde ebenfalls über den oben beschriebenen ABTS-Assay untersucht. Hierbei wurden die Immobilisate für 1 h im jeweiligem Lösemittel inkubiert und anschließend für 1 h im Natriumacetat-Puffer pH 5 gewaschen. Die Aktivität dieser Proben wurde jeweils vor und nach der Inkubation im Lösemittel detektiert.

4.7 Enzymatische Synthesen

4.7.1 Lipase katalysierte Synthese von Sebacin Biscyclocarbonate

Synthese und Aufarbeitung des SB BisCC

Zur Synthese der zweifach veresterten Sebacinsäure Bis[(2-oxo-1,3-dioxolan-4-yl)methyl] decanedioat (SB BisCC) werden 0,3 g (1,5 mmol) Sebacinsäure in 18 g des zyklischen Glycerin-1,2-Carbonats gelöst (GlyC). Anschließend wird 0,1 g des Biokatalysators, CalB immo Plus, hinzugefügt. Die Veresterung erfolgt in einem Rundkolben bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 1-14 Tagen. Nach Beendigung der gewünschten Reaktionszeit wird das Reaktionsgemisch filtriert, um den eingesetzten Biokatalysator zu separieren. Im zweiten Schritt wird das Produkt durch Präzipitation in 50 ml ddH₂O isoliert, dabei wird die filtrierte Reaktionslösung tropfenweise dem Wasser zugeführt. Im Anschluss wird der Niederschlag abgetrennt und getrocknet. Das so erhaltene Rohprodukt wird entweder für folgende Analysen verwendet oder in einem letzten Schritt von allen Nebenprodukten durch zweimaliges waschen mit Ethanol gereinigt. Abschließend wird das Produkt, welches als weißes Pulver vorliegt, unter Vakuum getrocknet und für alle folgenden Analysen verwendet. Zur Analyse der Temperatur auf die Synthese des SB BisCC wurde die Reaktion gestoppt, das Reaktionsgemisch in Wasser tropfenweise überführt und das Produkt in Chloroform extrahiert. Die Chloroform-Phase wurde anschließend isoliert und dreifach mit Wasser gewaschen. Abschließend wurden die Proben getrocknet und für die folgenden Analysen vorbereitet.

Aktivitätsanalysen des kommerziellen Biokatalysators im Reaktionssystem

Dee Einfluss des Reaktionsmediums auf die Stabilität des Biokatalysators bezüglich der Aktivität wird mittels des vorgestellten Assays aus 4.5.6 unter Verwendung eines PO₄ Puffers pH 7,5 analysiert.

Die Aktivität der CalB immo Plus wurde bei 20 °C, 50 °C und 80 °C bestimmt, indem 10 mg des Biokatalysators für die Hydrolyse des 4-Methylumbelliferon-butyrates eingesetzt wurden.

Der Einfluss des Reaktionsmediums auf den Biokatalysator wurde untersucht, indem 10 mg CalB immo Plus im Reaktionsgemisch bei den gewünschten Temperaturen für drei Tage inkubiert wurden. Anschließend wurden die Partikel abzentrifugiert, von der Inkubationslösung isoliert und 100 µl Reaktionsmedium zur Aktivitätsanalyse eingesetzt. Hierbei wurde der Aktivitäts-Assay bei 20 °C durchgeführt.

Zur Analyse der Stabilität wurde CalB immo Plus im Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur über 14 Tage inkubiert. Zu jedem Tag wurde die Enzymaktivität aus der Reaktionslösung untersucht. Hierfür wurden 100 µl der Reaktionslösung, ohne CalB immo Plus, in den Fluoreszenz Assay eingesetzt.

Die ermittelten Fluoreszenzintensitäten wurden im Anschluss in die Konzentration von 4-Methylumbelliferon transferiert. Diesbezüglich musste bei den jeweiligen Temperaturen, am selben Tag wie die Aktivitätsmessungen, mit 4-Methylumbelliferon in PO_4 Puffer pH 7,5 kalibriert und die Intensität mittels der Kalibrationsgleichung verrechnet werden.

4.7.2 Lipase katalysierte polymeranaloge Umwandlung eines Polyester basierten Bindemittels

Enzymatische Funktionalisierung des Polyesters

Die enzymatische Funktionalisierung des Polyesters Dynapol LS 415 erfolgte in 200 ml Essigsäure-n-butylester. Im ersten Schritt wurde 23 g (0,92 mmol) des Rohpolyesters im Butylester bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rühren gelöst. Anschließend wurde 50 g (420 mmol) des zyklischen Carbonats (GlyC) sowie 0,3 g CalB immo Plus dem gelösten Rohpolyester zugefügt und bei Raumtemperatur für 7 Tage kontinuierlich gerührt. Um die Modifizierung des Polyesters zu analysieren, musste ein Teil des Reaktionsgemisches filtriert und das Filtrat bei 40 °C und 35 mbar evaporiert werden. Anschließend wurde das verbliebene Reaktionsgemisch in n-Hexan überführt und der ausgefällte Polyester isoliert sowie dreifach mit Methanol gewaschen. Abschließend wurde der funktionalisierte Polyester unter Vakuum getrocknet.

Für die weitere Verwendung des modifizierten Polyesters (Filmbildung) wurde das Reaktionsgemisch filtriert und der Biokatalysator separiert. Des Weiteren wurde das Lösemittel im Rotationsverdampfer bei 55 °C und 47 mbar um die Hälfte reduziert.

Vernetzung des funktionalisierten Polyesters

Die Filmbildung erfolgte unter Zugabe von 8 g des Rohpolyesters sowie 2% DABCO, bezogen auf den Feststoffanteil im Reaktionsgemisch. Das Gemisch wurde anschließend 30 min gerührt, bevor die so hergestellte Beschichtung auf ein Stahlbleche aufgezogen wurde. Zuvor wurden alle Stahlbleche mittels eines Universalreinigers entfettet und gereinigt. Im Folgenden wurde ein 120 µm Film unter Verwendung eines Rakels aufgezogen, welcher zunächst bei 160 °C für 5 min getrocknet wurde. Anschließend wurde ein zweiter Film mit einer Schichtdicke von 180 µm appliziert und bei 160 °C für 20 min getrocknet. Alle Proben wurden in siebenfacher Ausführung hergestellt und dreifach bestimmt. Als Referenz wurde der Rohpolyester (Dynapol LS 415) unter Verwendung eines klassischen aminbasierten Katalysators appliziert. Hierfür musste der Rohpolyester mit 7,5% Hexamethoxymethylmelamine (HMMM) und 0,1% p-Toluolsulfonsäure vernetzt werden. Die Referenzen R1 härteten über 20 min bei 246 °C aus, analog zu dem enzymatisch funktionalisierten Polyester (s. Abschnitt 3.4.2). Referenzen R2 wurden lediglich bei 246 °C für 5 min gehärtet.

4.7.3 Epoxidierung von Cyclohexen mittels textil-fixierter Peroxidase

Epoxidierung im Rundkolben (Methode A)

Die Entwicklung des Syntheseprotokolls des 1,2-Epoxycyclohexans auf Basis der immobilisierten MaxiBright[®] sowie die Untersuchung des Lösemitteleinflusses auf die enzymkatalysierte Epoxidierung erfolgte in einem 25 ml Rundkolben. Zu diesem Zweck wurden 10 ml Lösemittel (Aceton, Acetonitril, Essigsäure-n-butylester (Butylacetat), Methoxycyclopentan (CPME), Cyclohexen, Isopropanol, n-Hexan, Toluol), 2 ml Cyclohexen und 2 ml ddH₂O in einem Rundkolben vorgelegt. Anschließend wurden 200 mg textilfixierte MaxiBright[®] zugegeben und 2 ml H₂O₂ (30%) tropfenweise eingeleitet. Die Epoxidierung erfolgte bei Raumtemperatur und konstanter Durchmischung mittels eines Magnetrührers.

Epoxidierung im Modellreaktor (Methode B)

Zur Prozessoptimierung, hinsichtlich auf die Erhöhung der Ausbeute, wurde ein Modellreaktor entworfen und in einem 3D Drucker (Ultimaker s5) realisiert. Hierfür wurde ein Co-Polyester (CPE 1639, transparent, Ultimaker) verwendet. Der so hergestellte Reaktor bestand aus 2 Kammern mit jeweils einem Volumen von 15 ml. Beide Kompartimente wurden durch ein 3 cm * 3 cm immobilisertes (MaxiBright[®]) Textilstück separiert, wobei die untere Kammer mit 15 ml Acetonitril befüllt wurde. Die obere Kammer bestand aus einem Zweiphasensystem mit 10 ml Cyclohexen (100 mmol, Zugabe erfolgt als Erstes) sowie 2 ml ddH₂O und 2 ml H₂O₂ (20 mmol). Zur Analyse der Abhängigkeit des pH-Wertes auf die Bildung des 1,2-Epoxycyclohexans wurde der Anteil an ddH2O durch ein Phosphat-Citrat Puffer ersetzt. Dabei wurde der Puffer mit dem H_2O_2 vorgemischt und auf pH-Werte zwischen pH 5 - 7 eingestellt. Anschließend wurde das Gemisch langsam auf die Cyclohexenphase im oberem Kompartiment zugegeben.

4.8 Charakterisierung der enzymkatalysierten Produkte

4.8.1 Charakterisierung des Sebacin Biscyclocarbonats

Kernspin resonanz spektroskopie

¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC-NMR und DEPT-135-NMR Messungen des sauberen SB BisCC wurden an einem Bruker Avance 3 Fourier 400 Spektrometer bei 400 MHz bzw. 100 MHz an der Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Routinemäßige ¹H-NMR Spektren wurden an einem Bruker Fourir 300 Spektrometer bei 300 MHz an der Hochschule Niederrhein aufgezeichnet. Das gereinigte und saubere Produkt (SB BisCC) wurde in CDCl₃ gelöst, wohingegen das Rohprodukt in DMSO-d₆ gelöst wurde. Als interner Standard dient das jeweilige Lösemittelsignal.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 1,29 (8H, s, -OCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 1,61 (4H, t, J = 7,1 Hz, -OCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-), 2,35 (4H, t, J = 7,5 Hz, -OCO-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 4,19, 4,6 (8H, m, t, J = 8,6 Hz, -OCOO-CH₂-CH-CH₂-O-) und 4,9 (2H, m, -OCOO-CH₂

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, δ , ppm)): 24,7 (-OCOO-CH₂- CH_2 -CH₂-), 28,9 (-OCO-CH₂-CH₂- CH_2 -), 33,9 (-OCO- CH_2 -CH₂-CH₂-), 62,8 (-OCOO-CH₂-CH- CH_2 -O-), 66,0 (-OCOO- CH_2 -CH- CH_2 -O), 73,8 (-OCOO-CH₂-CH- CH_2 -O), 154,4 (-OCOO vom zyklischen Carbonatring) und 173,2 (-OCO-CH₂-CH₂-CH₂-)

Attenuated Total Reflection (ATR) Infrarotspektroskopie

Infrarotspektren (IR-Spektren) der beiden Edukte sowie des gereinigten SB BisCC wurden an einem Bruker Vector 22 Spektrometer mittels ATR-Infrarotspektroskopie, unter Verwendung eines Germanium Kristalls, aufgenommen. Alle Spektren wurden bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹ bei 32 Scans pro Probe aufgezeichnet.

Massenspektrometrie

Massenspektren des gereinigten SB BisCC sowie des Rohproduktes wurden mit einem 6530 Q-TOF LC/MS System der Firma Agilent erfasst. Ausgerüstet ist das LC/MS System mit einem Jet-Stream Electron-Spray-Ion Source (ESI) zur Ionisierung der Probe. Detektiert wurden einfach positiv geladene Moleküle bzw. Fragmente. Das Massenspektrometer wie auch das HPLC System wurden durch eine Masshunter Workstation B.06.00 gesteuert. Zur Analyse des reinen SB BisCC und des Rohproduktes wurden zwei separate Methoden verwendet. Für beide Methoden wurden die folgende Parameter eingestellt: T_{source} : 300 °C, Trockengasstrom (drying gas) : 8 L*h⁻¹, Fragmenterspannung : 175 V.

Methode A wurde zur Analyse des gereinigten Produktes verwendet. Hierfür wurde das SB BisCC in Acetonitril gelöst und direkt in den TOF-Analysator injiziert.

Methode B wurde zur Betrachtung des Rohproduktes ausgewählt. Das Rohprodukt wurde dabei in ein Acetonitril/H₂O-Gemisch (90:10), welches mit 0,1% Armeisensäure angesäuert war, überführt. Für die Detektion der Oligomere musste die Kapillarspannung sowie die Cone-Spannung erhöht werden, was wiederum zu einer stärkeren Fragmentierung führte.

Bestimmung der Produktausbeute sowie des Eduktabbaus

Die Ausbeute des gereinigten und gefällten SB BisCC Pulver sowie des Rohproduktes wurde gravimetrisch ermittelt. Ebenfalls wurde die Menge an umgesetzter Sebacinsäure über einen Zeitraum von 7 h aufgezeichnet. Hierfür wurde 1 ml der Reaktionslösung in 1 ml Acetonitril verdünnt und der gebildete Niederschlag isoliert. Dieser wurde mit H_2O gewaschen und bei 80 °C getrocknet.

4.8.2 Charakterisierung des modifizierten Polyester basierten Bindemittels

Kernspin resonanz spektroskopie

¹H-NMR Spektren werden an einem Bruker Fourier 300 Spektrometer bei 300 MHz aufgezeichnet. Der funktionalisierte sowie der unbehandelte Polyester (reines Dynapol LS 415) werden in CDCl₃ gelöst. Als interner Standard dient das jeweilige Lösemittelsignal.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ , ppm): 4,05, 4,6 (8H, m, t, J = 8,6 Hz, -OCOO-C H_2 -CH-C H_2 -O-) und 4,9 (2H, m, -OCOO-CH₂-CH-CH₂-O-).

Attenuated Total Reflection (ATR) Infrarotspektroskopie

Alle IR-Spektren der Lackfilme wurden mittels IR-Spektrometers LUMOS FTIR der Firma Bruker aufgezeichnet. Das Spektrometer ist mit einem Golden Gate Single Reflection Diamond ATR-System gekoppelt, welches ein Germanium Kristall beinhaltet. Jede Probe wurde bei einer Auflösung von 4 cm⁻¹ jeweils 100 gescannt.

FTIR-ATR (cm⁻¹): 1740 (-COO-) und 1796 (-OCOO-)

Bestimmung der Säurezahl

Die Säurezahl des ursprünglichen sowie die des modifizierten Polyesters wurden mittels der genormten Prozedur zur Säurezahlbestimmung (DIN EN ISO 2114:2002) bestimmt.

Bestimmung der Schichtdicke

Die Schichtdicke wurde nach DIN EN ISO 3882 mittels eines Mini Test 4100 der Firma ElectroPhysik durchgeführt. Alle Bleche wurden sechsfach geprüft und aus den jeweiligen Messreihen wurden die Mittelwerte angegeben.

Bestimmung der Lackhärte

Die Härte der Beschichtung wurde nach DIN EN 1522 über die Pendeldämpfung bestimmt. Hierbei kam ein Königspendel der Marke Erichsen zum Einsatz, womit alle Proben dreifach bestimmt wurden. Dabei wurde unmittelbar nach der Aushärtung sowie nach einer Lagerung von zwei Wochen die Pendeldämpfung überprüft.

Bestimmung des Glanzes

Der Glanz des ausgehärteten Films wurde nach DIN EN ISO 2813 unter zur Hilfenahme eines micro-Tri-gloss der Firma BYK ermittelt. Ebenfalls wurde im Folgenden der Mittelwert aus fünffachen Messungen einer Probe angegeben.

Bestimmung der Adhäsionseigenschaften

Die Adhäsion wurde nach DIN EN ISO 2409 über einen Gitterschnitttest erhalten.

4.8.3 Charakterisierung des 1,2-Epoxycyclohexans über Massenspektrometrie gekoppelte Gaschromatographie (GC-MS)

Die qualitative wie auch quantitative Analyse des Peroxidase katalysierten 1,2-Epoxycyclohexans erfolgte anhand eines Agilent 6890 Gaschromatographie Systems, welches mit einem Agilent 5973 Massenspektrometer gekoppelt war. Ausgerüstet war die GC mit einer Agilent HP-5MS UI Säule mit einer Länge von 30 m und einem Durchmesser von 0,25 mm. Helium wurde als Trägergas eingesetzt bei einem Fluss von 0,7 ml*min⁻¹. Die Säule wurde zunächst bei 60 °C für 1 min betrieben und anschließend auf 120 °C bei einem Gradienten von 5 °C*min⁻¹, dann auf 250 °C bei einem Gradienten von 16.25 °C*min⁻¹ und abschließend auf 320 °C bei einem Gradienten von 1.75 °C*min⁻¹erhöht. Das Massenspektrometer war mit einer Electron-Impact-Ion-Source (EI) bestückt, welche mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV und bei T_{source} : 320 °C betrieben wurde. Zur Analyse wurden 1 µl aus den gesammelten Proben automatisch über ein Split/Splitless-Injektor im Splitless Modus injiziert.

Die Retentionszeit des enzymatisch katalysierten 1,2-Epoxycyclohexans wurde durch internes Spiken mit kommerziell erhältlichen Cyclohexenoxid (98+%, Alfa Aesar) abgeglichen. Hierfür wurden die Proben wie oben beschrieben vermessen und im Anschluss 1% der Referenzsubstanz hinzugefügt. Die so behandelte Probe wurde erneut injiziert und bestätigt die Anwesenheit von 1,2-Epoxycyclohexan.

Die Quantifizierung des gebildeten Epoxids erfolgte über eine Kalibration des kommerziell erworbenen Cyclohexenoxids (98+%) im entsprechenden Konzentrationsbereich.
5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Enzymatische Synthese von Rohstoffen für isocyanatfreie Polyurethane

Polyurethane umfassen Polymere, die lineare, verzweigte und vernetzte Architekturen aufweisen und nehmen eine führende Position unter den Polymerwerkstoffen ein. Die Vielfalt und Variabilität, in denen Polyurethane hergestellt werden können (Homopolymere, Copolymere, enthalten Polyether- oder Polyestersegmente), ist für die außerordentliche Verbreitung verantwortlich. Darüber hinaus weisen Polyurethane hervorragende mechanische Eigenschaften auf wie hohes Dehnugsvermögen, hohes Energieaufnahmevermögen, hohe Beständigkeit in aggressiven Umgebungen, thermische und chemische Stabilität, Vielseitigkeit in ihren Produkten und Anwendungen, einfache Anwendbarkeit sowie gute Haltbarkeit und Nachhaltigkeit der Endprodukte. Auf Grund dessen finden Polyurethane in vielen diversen häuslichen und industriellen Applikationen Anwendung [139, 140]. Die Herstellung von Polyurethanen beinhaltet jedoch die Reaktion von Polyolen mit Isocyanaten, die für die menschliche Gesundheit und die Umwelt schädlich sind. Die Synthese der benötigten Isocyanate selbst erfordert die Verwendung von toxischem Phosgen, das ebenfalls eine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellt. Eine hervorragende Alternative zum derzeitigen industriellen Syntheseweg ist dagegen die Reaktion zwischen zyklischen Carbonaten und Aminen unter Bildung von isocyanatfreien Polyhydroxyurethan (NIPU) [141, 142]. Angeregt durch staatliche Vorschriften wächst die Nachfrage nach umweltfreundlichen Prozessen, die potenzielle Gefahren für Mensch und Umwelt reduzieren. Hinzu kommt der stetig wachsende Marktbedarf an nachhaltigen Polymeren, die auf erneuerbaren Ressourcen basieren. Das Fehlen toxischer Zwischenprodukte und die Verfügbarkeit biobasierter potenzieller Ausgangsstoffe für beide Reaktanten, Amine und Carbonate, haben die NIPU-Technologie zum Schwerpunkt aktueller Forschungsaktivitäten gemacht. Zyklische Carbonate bilden dabei die Grundlage zur Herstellung von NI-PUs und können aus natürlichen Rohstoffen generiert werden. Glycerin stellt einen dieser

Rohstoffe dar und ist ein nachhaltiger sowie kostengünstiger Rohstoff [143], der in großen Mengen als Nebenprodukt bei der Biodieselproduktion anfällt [144]. Über eine Vielzahl von katalytischen oder biokatalytischen Reaktionswegen kann Glycerin in ein zyklisches Glycerincarbonat überführt werden, wodurch der ökologische Fußabdruck durch CO₂-Fixierung verbessert wird [145]. Glycerincarbonat selbst ist eine viskose Flüssigkeit, die als grünes, nicht flüchtiges Lösungsmittel in organischen Synthesen sowie in Beschichtungen und Reinigungsmitteln verwendet wird. Im Rahmen dieser Arbeit wird Glycerincarbonat als chemisches Reagenz eingesetzt und in hochwertige Carbonat-Bausteine für NIPU Synthese umgewandelt [146]. Die Synthese von biobasierten Biscyclocarbonat-Bausteinen für die NIPU-Chemie erfolgt entweder durch chemische Umwandlung nachhaltiger Ausgangsstoffe wie Fettsäureestern und Aminen oder durch Funktionalisierung biobasierter Monomere mit Glycerincarbonat [147, 148]. Während die chemische Umwandlung bei harschen Reaktionsbedingungen unter Bildung von schädlichen Oxiran-Zwischenprodukten erfolgt [149], kann die Funktionalisierung gezielter Monomere auch enzymatisch unter milden Bedingungen ohne zusätzlich entstehenden Gefahrstoffen durchgeführt werden. Carré et al. synthetisierten das NIPU-Monomer Sebacin Biscyclocarbonat aus Glycerincarbonat und Sebacinsäure [150], um auf dessen Basis erfolgreich NIPUs herzustellen. Die beschriebene chemische Reaktion umfasst jedoch zwei Schritte. Sebacinsäure muss zunächst aktiviert werden, unter Bildung des Säurechlorids, bevor die Funktionalisierung mit Glycerincarbonat umgesetzt werden kann. Ziel dieser Arbeit ist eine grüne, enzymbasierte und umweltfreundliche Ein-Schritt-Synthese zum Sebacin Biscyclocarbonat zu entwickeln. Ebenfalls dient Sebacinsäure, eine kostengünstige natürlich Dicarbonsäure, die aus Rizinusöl gewonnen wird, als Ausgangsstoff, um die Carbonat-Funktionalisierung einzufügen. Hierbei wird die Sebacinsäure mit Glycerincarbonat, welches ebenfalls das Lösemittel der Rektion darstellt, verestert unter Verwendung der Lipase B aus Candida antarctica. Dabei ist zu beachten, dass eine zweifache Funktionalisierung mit zyklischem Carbonat angestrebt wird. Das bifuntkionelle Sebacin Biscyclocarbonat (s. Abbildung 12 (1)) kann anschließend zur kontrollierten NIPU Synthese eingesetzt werden, wohingegen eine ungewollte Offnung der Carbonatringe zu unkontrollierten Nebenprodukten führen

kann (s. Abbildung 12 (2)). Vorteil dieses Konzepts ist die Verwendung von ausschließlich nachhaltigen Rohstoffen, wobei die Reaktion selber unter energiearmen Bedingungen sowie lösemittelfrei durchgeführt werden kann. Somit wird die Forderung bedient, die Diskrepanz zwischen dem grünen NIPU-Verfahren und dem herkömmlichem Verfahren, die zu biobasierten zyklischen Carbonat-Monomeren führen, zu schließen. Daher sind umweltfreundliche Syntheseprozesse von erneuerbaren bifunktionellen zyklischen Carbonaten von großer Nachfrage.

5.1.1 Entwicklung und Optimierung einer enzymatischen Syntheseroute zu Sebacin Biscyclocarbonat

Abbildung 12 zeigt den Syntheseweg zum zyklischen SB BisCC (1). Dieser beruht auf der Lipase (CalB immo Plus) katalysierten Veresterung von Sebacinsäure mit Glycerin-1,2-Carbonat. Hierbei diente das Glycerin-1,2-Carbonat nicht nur als Substrat, sondern auch als Lösemittel, welches auf Grund seiner Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit als grünes Lösemittel einzuordnen ist. Nach Ou et al. weißt Glycerincarbonat im Zusammenhang als grünes Lösemittel wasserähnliche Eigenschaften auf. Dies resultiert aus dem Grund, dass gängige Lösemittel keine guten ionisierende und dissoziierende Eigenschaften besitzen, im Gegensatz zu Wasser, und sind daher nicht wirklich biokompatibel im Hinblick auf die nötige Ionisierung von Aminosäureresten. Propylencarbonat zeigt hier jedoch eher wasserähnliche Charakteristika, wie eine hohe Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon_r =$ 66,1), ist allerdings ein weniger basisches Lösemittel im Vergleich zu Wasser. Säuren zeigen in Propylencarbonat ein signifikant schwächeres saures Verhalten als in Wasser. Die Basizität von Alkoholen und von Wasser sind grundsätzlich sehr ähnlich. Das, durch die Einführung einer Hydroxylgruppe, resultierende Glycerincarbonat weißt unter diesen Gesichtspunkten eine höhere Ahnlichkeit zu Wasser auf als Propylencarbonat. Im Vergleich, die Dielektrizitätskonstante von Wasser ($\varepsilon_r = 78,30$) sowie von Glycerincarbonat ($\varepsilon_r =$ 82,66) [151]. Die Basizität als auch die Dielektrizitätskonstante sind wichtige Merkmale, die direkten Einfluss auf die Aktivität der Lipase ausüben. Dadurch bestimmt das Re-



Abbildung 12: Reaktionsschema zum Sebacin Biscyclocarbonats (1) einschließlich möglicher Nebenreaktionen zu Oligomeren (2).

aktionsmedium maßgeblich den Ionisierungszustand der Aminosäurereste der Seitenkette der Lipase, welcher wiederum ausschlaggebend für die Aktivität ist [117, 152].

Anwendung in der Synthese zum SB BisCC findet ein kommerziell erhältlicher Biokatalysator CalB immo Plus. Dieser besteht aus Lipase B der *Candida antarcitca*, die auf einem Divinylbenzol Methacryl Copolymer Trägermaterial adsorptiv gebunden ist. Eine erfolgreiche Veresterung der Sebacinsäure mit dem zyklischen Carbonat konnte durch IR- und NMR Spektroskopie sowie Massenspektrometrie qualitativ als auch quantitativ nachgewiesen werden. Die Charakterisierung des SB BisCC sowie die Charakterisierung von mögliche Nebenprodukte wird im Folgendem erläutert. Ebenso wird im nächsten Abschnitt die Optimierung der Reaktionsführung bezüglich einer optimierten Produktausbeute beschrieben.

5.1.2 Charakterisierung des Sebacin Biscyclocarbonats

Die qualitative Bestimmung des gereinigten sowie getrockneten SB BisCC erfolgte über die Betrachtung der Carbonylbande (s. Abbildung 13) bei 1796 (-OCOO-) cm⁻¹ im Infrarotspektrum des SB BisCC. Diese Bande war erst durch eine Veresterung des zyklischen Carbonates mit Sebacinsäure nachweisbar und bildete ein zusätzliches Carbonylsignal im Vergleich zu dem Carbonylsignal der Säuregruppe bei 1740 cm⁻¹ (-COO-).

Verunreinigungen des Produktes konnten durch NMR-Spektroskopie Untersuchungen ausgeschlossen werden (s. Abbildung 14, 15, 16). Das ¹H-NMR Spektrum des aufgereinigten Produktes zeigt die Signale der Protonen des zyklischen Carbonats zwischen 4,2 -5,0 ppm (s. Abbildung 14, oben, D-F), wohingegen die Protonen der aliphatischen Kette zwischen 1,3 - 2,5 ppm (s. Abbildung 14, oben, A-C) sichtbar sind.



Abbildung 13: FTIR Spektrum des SB BisCC im Vergleich zu den Reaktanten Glycerin-1,2-Carbonat und Sebacinsäure.



Abbildung 14: ¹H- (oben) und ¹³C- (unten) NMR Spektrum (400 Mhz) des gereinigten SB BisCC in CDCl₃.

Die Intensitäten der ¹H-NMR Signale A und B ergeben jeweils 4, Signal C weist eine Intensität von 6 auf, wohingegen die Signale D und F eine Intensität von 8 aufweisen. Dabei wurde auf das Signal E (CH-Gruppe des zyklischen Carbonts) mit 2 normiert. Die Zuordnung stimmt mit den ¹³C-Signalen überein und konnte durch das DEPT-135-NMR (s. Abbildung 15) bestätigt werden, welches eine Aussage über die direkt gebundenen Protonen an NMR unempfindliche Kohlenstoffatome zulässt. Durch das Polarisationsverfahren



Abbildung 15: DEPT 135 Spektrum des gereinigten SB BisCC in CDCl₃ (400 Mhz). Verunreinigungen sind durch die roten Boxen gekennzeichnet.

im DEPT-135 ($\theta = 135$) ergeben CH₃- und CH-Gruppen ein positives Signal, wohingegen CH₂ ein negatives Signal induziert. Abbildung 14 und 15 korrelieren und bestätigen die Identifikation des SB BisCC.



Abbildung 16: H-C HMQC-NMR Spektrum des gereinigten SB BisCC (400 Mhz).

¹³C-Signale A-C und D,F konnten den aliphatischen CH_2 -Gruppen bzw. den CH_2 -Gruppen des zyklischen Carbonats, auf Grund der Betrachtung der Intensitäten, zugeordnet werden, sowie der negativen Ausrichtung der Signale im DEPT-135. Signal E zeigt dagegen eine positive Ausrichtung und entspricht der CH-Gruppe des zyklischen Carbonats. Die quatären C-Atome G und H weisen eine starke chemische Verschiebung auf (154,4 ppm (-OCOO-) und 173,2 ppm (-OC-CH₂-CH₂-CH₂)), auf Grund der benachbarten Sauerstoffatome, und konnten folglich nicht im DEPT-135-NMR nachgewiesen werden. Demzufolge kann die vollständige Funktionalisierung der beiden Säuregruppen der Sebacinsäure mit Glycerin-1,2-carbonat bestätigt werden.



Abbildung 17: ESI-TOF Massenspektren des aufgereinigten Produktes unter Verwendung der Methode A (oben) und Methode B (unten).

Durch den Vergleich der Intensität der CH-Gruppe (Signal E) mit den Signalen der Verunreinigung zwischen 3,70 - 3,97 ppm konnte eine Reinheit von über 95% ermittelt werden. Dies konnte abschließend ebenfalls durch Massenspektroskopie des gereinigten Produktes bestätigt werden. Abbildung 17 repräsentiert die MS-Spektren unter Verwendung zweier unterschiedlicher Methoden (s. Abschnitt 4.8.1, Methode A und Methode B). Unter Verwendung der Methode A wurde das aufgereinigte Produkt in Acetonitril gelöst und direkt in den TOF-Analysator injiziert. Das Spektrum zeigt ausschließlich den Molekülpeak als Natriumaddukt bei m/z = 425 und weißt keinerlei Fragmente oder signifikante Nebenprodukte auf. Methode B wurde eingesetzt, um das Rohprodukt zu charakterisieren. Wichtig ist hier anzumerken, dass kleinere Mengen an oligomeren Verunreinigungen im Produkt detektiert wurden. Der Molekülpeak fiel hingegen deutlich geringer aus. Stattdessen wurden Fragmente, welche eine CO₂-Gruppe verloren haben, bei m/z = 376 beobachtet. Im Bereich von m/z = 715 ist der prominenteste Peak der Verunreinigung vorzufinden und stimmt mit einem Oligomer überein, welches aus drei Sebacinsäure-Einheiten besteht, an dem die finale Carbonat Funktionalisierung fehlt.

5.1.3 Optimierung der SB BisCC Reaktionsführung

Zur Prozessoptimierung der SB BisCC Synthese wurden folgende Parameter betrachtetet: die Reaktionstemperatur und- zeit, das molare Verhältnis der Reaktanten sowie die Aufreinigung des Produktes. Ziel der Modifikationen in der Reaktionsführung ist die Erhöhung der Produktausbeute (s. Abbildung 12 (1)) sowie die Vermeidung an Nebenprodukten (s. Abbildung 12 (2))

Einfluss der Temperatur auf die Synthese des SB BisCC

Zunächst wurde eine Temperaturabhängigkeit mit Bezug auf die Produktbildung bei Raumtemperatur, 50 °C und 80 °C betrachtet. Hierfür wurden die Reaktanten in einem Molverhältnis von 100 : 1 von Glycerin-1,2-Carbonat zu Sebacinsäure eingesetzt und die Reaktionszeit auf drei Tage festgelegt. Anschließend wurde die Rohproduktausbeute wie auch die Produktausbeute gravimetrisch bestimmt. Abbildung 18 zeigt die ermittelten Ausbeuten bei den oben genannten Temperaturen. Auffällig ist, dass der höchste Ertrag an Rohprodukt als auch an SB BisCC bei Raumtemperatur erhalten wurde. Bei steigender



Abbildung 18: Temperaturabhängigkeit der Rohprodukt- und Produktausbeute nach einer 3 Tage-Reaktion.

Temperatur war ein abnehmender Trend zu beobachten, wobei ab 50 °C bereits kaum Bildung an Produkt festgestellt werden konnte.

Diese Temperaturabhängigkeit widerspricht den Angaben des Lieferanten [153] sowie der postulierten Lipase Daten [154] im Temperaturbereich von 60 °C - 80 °C in nicht wässrigen Systemen. Darüber hinaus ist die beobachtete thermodynamische Wirkung der Temperatur auf die Reaktion gegenteilig zu der erwarteten Wirkung. Auf Grund dessen ist die Aktivität des Immobilisats im eingesetzten Reaktionsmedium bei den jeweiligen Temperaturen von Bedeutung. Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität der immobilisierten Lipase wurde mittels des fluoreszenzspektroskopischen Assays (s. Abschnitt 4.7.1) auf Basis von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat untersucht (s. Abbildung 19). Dabei wurde die Esterbindung in Anwesenheit von Wasser gespalten und das Substrat in 4-Methylumbelliferon und Buttersäure hydrolysiert. Der entstandene Alkohol weiste ein Absorptionsmaxima bei 327 nm auf und fluoresziert im Bereich von 449 nm [155, 156]. Abbildung 20, linker Panel, zeigt, dass die höchste Aktivität bei 50 °C, welche um den Faktor 9-10 höher ist, im Vergleich zu der Hydrolyse bei 20 °C und 80 °C. Dieses Verhalten stimmt überein mit der ermittelten und postulierten maximalen Umesterungsaktivität der CalB in Glycerincarbonat bei 60 °C [151].

In der Regel ist das Temperaturoptimum enzymatisch katalysierter Veresterungen dadurch reguliert, dass zum einen durch den thermodynamische Einfluss der Temperatur auf die Reaktionskinetik und zum anderen durch die Temperaturresistenz des Biokatalysators. Die thermische Stabilität der immobilisierten Lipase wurde analysiert, indem eine definierte Menge CalB immo Plus im Reaktionsgemisch (Glycerin-1,2-Carbonat und Se-



Abbildung 19: Lipase abhängige Hydrolyse des 4-Methylumbelliferyl-Butyrat zum korrespondierendem Fluorophor 4-Methylumbelliferon und Buttersäure.



Abbildung 20: Linker Panel: Temperaturabhängige Anfangsgeschwindigkeit (v₀) der Lipaseaktivität mittels fluoreszenzspektroskopischer Analyse der Hydrolyse von 4-MU-Butyrat. Rechter Panel: Restaktivität bei 20 °C nach Inkubation der CalB immo Plus bei den angegebenen Temperaturen.

bacinsäure) bei den oben genannten Temperaturen für drei Tage inkubiert wurde. Die Restaktivität der Lipase bezüglich Hydrolyse konnte mittels des bereits verwendeten Fluoreszenz-Assays bestimmt werden, welcher bei 20 °C durchgeführt wurde. Abbildung 20, rechter Panel, zeigt, dass eine Inkubation bei erhöhten Temperaturen zu einer teilweisen Inhibierung der Veresterung führt. Bei 50 °C war dieser Effekt jedoch zwischen den jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten um den Faktor 10 überkompensiert. Dieses Verhalten zeigt, dass die Temperaturabhängigkeit bezüglich der Ausbeute der Zielreaktion nicht allein durch die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität beschrieben werden kann, sondern Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität und der Produktausbeute divergieren.

¹H-NMR Spektren der Produkte nach Synthese bei Raumtemperatur, 50 °C und 80 °C sind in Abbildung 21 dargestellt. Hierfür wurde nach 3 Tagen die Synthese mit Wasser gequencht und das Produkt in Chloroform extrahiert. Dadurch ist eine Trennung der Edukte möglich. Im Bereich von 3,7 ppm -3,9 ppm und 4,6 ppm legen die Spek-

tren Signale von Verunreinigungen offen. Mit ansteigender Temperatur konnten ebenfalls höhere Intensitäten beobachten werden. Dies deutet auf eine Bildung von Nebenprodukten bei ansteigender Temperatur hin. NMR Daten von Non-isocyanate Polyurethanes (NIPU) [150] legen nahe, dass die zusätzlichen Signale, hervorgehoben in Abbildung 21, auf Ringöffnungsprodukte zurückzuführen sind. Abbildung 12 veranschaulicht, dass die Öffnung des zyklischen Carbonatrings die Bildung von diversen Oligomeren begünstigt. Die Zuweisung der zusätzlichen Signale konnte ebenfalls durch DEPT-135-NMR (s. Abbil-

RT 50°C 80°C 5,0 4,5 4,0 3,5 3,0 2,5 2,0 1,5 1,0 ppm

Abbildung 21: Temperaturabhängige ¹H-NMR Spektren (CDCl₃) des aufgearbeiteten SB BisCC implizieren Verunreinigungen im Bereich von 3,5 - 4,0 ppm.

67

dung 15) sowie 2D HMQC (s. Abbidung 16) bestätigt werden. Dabei konnte das Signal bei 3,7 ppm, auf Grund der negativen Ausrichtung im DEPT-135-NMR, dem C $H_{\mathcal{Z}}$ zugeordnet werden. Das Signal bei 3,9 ppm konnte wiederum dem CH-O-C Proton zugewiesen werden, da an dieser Stelle eine positive Ausrichtung detektiert wurde. Des Weiteren bestätigt die Aufschlüsselung möglicher Nebenprodukt (s. Abbildung 25 H^G, H^I) die Zuordnung des CH-O-C Proton zu dem Signal an der Stelle 3,9 ppm. Daher liegt die Vermutung nahe, dass erhöhte Temperaturen Ringöffnungsreaktionen begünstigen, das zu einem Produktabbau führt und damit verbunden eine niedrigere Produktausbeute erzielt wird. Dem gegenüber konnte außerdem nachgewiesen werden, dass das aufgereinigte SB BisCC, nach temperieren auf die jeweiligen Temperaturen, zu den Signalen der Verunreinigungen führt. Dabei ist zu erwähnen, dass das Glycerin-1,2-Carbonat temperaturstabil ist. Daher kann die Annahme getroffen werden, dass der Biokatalysator ebenfalls eine Rolle in der Ringöffnungsreaktion spielen kann. Lipasen generell, wie auch die CalB, sind in der Lage die Ringschließung zum Glycerin-1,2-Carbonat (z.B. aus Dimethylcarbonat und Glycerin) zu katalysieren [157]. Dieses Verhalten impliziert, dass die Lipase die Umkehrreaktion ebenfalls katalysiert. Im Weiteren kann die Annahme, durch die Vielzahl an bekannten Lipase katalysierten Ringöffnungsreaktionen [158], untermauert werden. Diese Prozesse treten bevorzugt bei höheren Temperaturen auf. Die höchsten Umsätze der Ringschlussreaktion zum Glycerin-1,2-Carbonat werden zum Beispiel bei 50 °C erzielt [157]. Selbiges gilt für die Lipase-abhängige Polymerisation von Trimethylencarbonat [159].

Diese Analyse zeigt die zentrale Herausforderung in der Entwicklung des gegenwärtigen enzymatischen Prozesses. Die hohe Ausbeute des veresterten Produktes bei niedrigen Temperaturen verweist auf eine Selektivität zu Gunsten der Veresterungsreaktion hin gegenüber einer möglichen Ringöffnungsreaktion. Daraus kann abgeleitet werden, dass nicht nur die Enzymaktivität, als auch -stabilität die optimale Reaktionstemperatur für die hier vorgestellte Veresterung festlegen, sondern die Energiebarriere möglicher Konkurrenzreaktionen ebenfalls berücksichtigt werden muss.

Einfluss der Reaktionszeit auf die Synthese des SB BisCC

Nachdem die optimale Reaktionstemperatur bezüglich der maximalen Ausbeute von SB BisCC bei Raumtemperatur ermittelt werden konnte, wurde der Einfluss der Reaktionszeit auf die Synthese bei Raumtemperatur betrachtet. Hierfür wurde die Ausbeute an Rohprodukt sowie SB BisCC nach verschieden Zeiten bestimmt (1- 14 Tage). Abbildung 22, linker Panel, zeigt dass nach drei Tagen eine maximale Ausbeute des Rohproduktes von 100% erzielt wurde. Die maximale Ausbeute von ca. 70% an SB BisCC wurde jedoch erst nach sieben Tagen erreicht. Daraus geht hervor, dass die Selektivität bezüglich des Produktes im Zeitraum von 1 - 7 Tagen steigt und bei weiterer Reaktionszeit wieder abnimmt. Die Umsetzung der Sebacinsäure wurde gravimetrisch bestimmt. Hierfür wurde die Sebacinsäure mittels Acetonitril aus dem Reaktionsgemisch gefällt und anschließend über FT-IR Analyse quantifiziert. Wie Abbildung 22 zeigt, ist die Sebacinsäure nach sieben Stunden vollständig umgesetzt. Daher ist die Sebacinsäure nicht der Hauptgrund für den zeitlichen Verlauf der Produktbildung.



Abbildung 22: Linker Panel: Abhängigkeit der Ausbeuten des Rohproduktes und SB BisCC bezüglich der Reaktionszeit (Tage). Rechter Panel: Abbau der Sebacinsäure Konzentration über die Zeit (Stunden).

Um zu überprüfen, inwieweit die Stabilität der Lipase für den zeitlichen Verlauf der Produktausbeute ursächlich ist, wurde die Stabilität der Lipase nach Inkubation im Reaktionsansatz über 14 Tage beobachtet. Hierfür wurde die Aktivität der Lipase aus der Inkubationslösung analysiert unter Verwendung des vorgestellten Fluoreszenz-Assay. Abbildung 23 zeigt die Lipaseaktivität über den gesamten Testzeitraum von 14 Tagen. Die Aktivität zeigte erst ab Tag fünf eine abnehmende Tendenz an und flacht mit fortschreitender Inkubationszeit ab. An Tag 14 konnte weiterhin eine Restaktivität von 60% angegeben werden. Hierbei ist anzumerken, dass die Lipaseaktivität aus dem Reaktionsmedium bestimmt wurde. Der Biokatalysator selber, sprich die Polymerkügelchen der CalB immo Plus, zeigte nach wenigen Tagen keinerlei Aktivität mehr, jedoch konnten Anderungen in den Produktausbeuten festgestellt werden. Daher wurde das Reaktionsmedium auf Lipaseaktivität geprüft. Hier wurde Aktivität über den gesamten Zeitraum beobachtet. Diese Daten weisen auf ein Leaching des adsorptiv gebundenen Enzyms vom Divinylbenzol / Methacrylat Copolymer in das umliegende Glycerincarbonat hin. Nichtsdestotrotz sind die Stabilitätsdaten der Lipase konsistent mit den ermittelten konstanten Ausbeuten (Rohprodukt), welche nach einer bestimmten Reaktionszeit erzielt wurden. Jedoch



Abbildung 23: Anfangsgeschwindigkeit (v₀) der Lipaseaktivität bezogen auf die Hydrolyse von 4-MU-Butyrat nach Inkubation der CalB immo Plus im Reaktionsmedium bei Raumtemperatur.

ermöglicht die Stabilitätsanalyse der Lipase nach Inkubation im Reaktionsmedium keine Erläuterung bezüglich eines Reaktionsoptimums.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Selektivität, welche durch die Reaktionszeit beeinflusst wurde, wurde das Rohprodukt massenspektrometrisch und spektroskopisch mittels ¹H-NMR analysiert. In Abbildung 24 ist die LC-MS Analyse des Reaktionsgemischs dargestellt, welche die Anwesenheit von Trimeren bis Pentameren bestätigt. Hierfür wurden Spektren des Rohprodukts nach 3, 7 und 14 Tagen unter Verwendung der Methode B (s. Abschnitt 3.8.2) aufgezeichnet. Die gefundenen Oligomere sind größtenteils fragmentiert worden. Die prominentesten Peaks der Oligomere sind bei m/z = 1289 und m/z = 1380 vorzufinden. Eine Masse von 1380 g*mol⁻¹ steht in Übereinstimmung mit einem



Abbildung 24: ESI-TOF Spektren (Methode B) des Rohprodukts nach verschieden Reaktionszeiten (3 - 14 Tage).

möglichen Pentamer, welches in Abbildung 12 dargestellt ist, nach Eliminierung von zwei CO_2 Molekülen auf Grund der starken Fragmentierung. Der Peak bei m/z = 1289 deckt sich mit der Molmasse eines Pentamers nach interner Veresterung der durch Ringöffnung gebildeten primären Alkoholgruppen. Dabei ist zu beachten, dass die Größe der beobachteten Oligomere und die relative Peakintensität vermutlich von der Ionisierung des Rohprodukts, der Auflösung in Acetonitril und der verwendeten Spannung abhängt. Die Massenspektren liefern jedoch einen direkten Hinweis auf die Bildung von Oligomeren durch die Lipase.

Des Weiteren konnte die Bildung von Oligomeren durch ¹H-NMR Spektroskopie bestätigt und aufgeklärt werden. Im Gegensatz zu den vorigen NMR Analysen wurde DMSO d_6 verwendet, da das Rohprodukt nicht vollständig in CDCl₃ löslich war. Zu beachten ist hierbei die höhere chemische Verschiebung, induziert durch das DMSO- d_6 im Vergleich



Abbildung 25: ¹H-NMR Spektrum des Rohproduktes nach 3 Tagen Synthese.

zu CDCl₃. Abbildung 25 zeigt exemplarisch das ¹H-NMR Spektrum des Rohprodukts nach einer drei Tage Synthese. Alle Signale des Spektrums konnten dabei entweder dem Produkt oder den möglichen vorgestellten Nebenprodukten zugeordnet werden. Die postulierten Strukturen sowie die Zuordnung stimmen mit der ermittelten NIPU Polymer NMR Daten von Carré *et al.* überein [150]. Die Verunreinigungen um 3,5 - 3,7 ppm können Ringöffnungsprodukten zugeteilt werden, wie zuvor diskutiert. Ein weiteres Indiz für die Öffnung des zyklischen Carbonats ist das Signal der CH^H-Gruppe. Die entstandenen OH-Gruppen sind in DMSO-d₆ mittels ¹H-NMR Spektroskopie nachweisbar und können bei 5,25 ppm lokalisiert werden.

Aus all dem kann abgeleitet werden, dass die Bildung von Oligomeren, die aus Ringöffnungsreaktionen resultieren, wie dargestellt in Abbildung 12, die bedeutendste Nebenreaktion ist. Die Anwesenheit von Oligomeren durch Synthesen bei Raumtemperatur unterstützt die These der oben diskutierten enzymatischen Ringöffnung.

Der Mechanismus, der zu einer optimalen Produktausbeute nach sieben Tagen führte, kann durch die Korrelation zeitaufgelöster ¹H-NMR Spektren aufgeschlüsselt werden. Hierfür wurde in einem Zeitfenster von 1 - 14 Tagen zu jedem Tag ein ¹H-NMR Spektrum aufgezeichnet. Änderungen in den Spektren über die Zeit waren lediglich im Bereich zwischen 4 - 6 ppm sichtbar. Die Spektren in Abbildung 26 wurden jeweils auf die Intensität der CH₂-Gruppe (s. Abbildung 14 und 25, Signal B) der Sebacinsäure normiert. Im gezeigten Abschnitt sind die Protonen der CH^E-Gruppe (Produkt) und CH^H-Gruppe (Nebenprodukt) sowie die Protonen der Hydroxylgruppen OH^{K,L} (Nebenprodukt) abgebildet. Aus Abbildung 26 geht deutlich hervor, dass der relative Anteil an Ringöffnungsprodukten in Bezug auf das Zielmolekül mit steigender Reaktionszeit ebenfalls steigt. Vielmehr weisten die Spektren nach langen Reaktionszeiten, ähnlich wie die vorhergegangen LC-MS Versuche, auf die Bildung von größeren Molekülen hin.

Eine relativ rapide Abnahme der zyklischen Carbonat Signale bei Reatkionszeiten über sieben Tage ist zudem festzustellen, wobei die des Nebenproduktes konstant verbleiben.



Abbildung 26: Ausschnitt der ¹H-NMR-Spektren über 14 Tage Reaktionszeit. Die Zuordnungen beziehen sich auf Abbildung 25.

Dieses Verhalten ist typisch für einen vollständigen Substratverbrauch. Sebacinsäure ist allerdings innerhalb des ersten Tages vollständig umgesetzt und das zyklische Carbonat wird in großem Überschuss zur Verfügung gestellt. Monofunktionalisierte Sebacinsäure, d.h. Sebacinsäure mit einer veresterten Glycerincarbonat-Einheit und einer freien Carboxylgruppe, wird wahrscheinlich nicht durch Acetonitril gefällt. Dafür spricht die Löslichkeit des zyklischen Carbonats in Acetonitril. Somit wird mittels der gravimetrischen Bestimmung nur freie Sebacinsäure ausgewogen und gilt als verbraucht, sobald die Veresterung eines Carbonat-Moleküls mit der Carboxylgruppe eines Sebacinsäure-Moleküls stattfindet. Dabei ist die Bildung des Zielmoleküls noch nicht abgeschlossen. Die Erhöhung der Produktausbeute nach dem Verbrauch von Sebacinsäure deutet auf ein deutlich langsameren Prozess der Doppelfunktionalisierung der Sebacinsäure hin, als die Monofunktionalisierung. Daher kann die Abnahme des Produktsignals nach sieben Tagen durch eine vollständige Funktionalisierung der Sebacinsäure mit dem zyklischen Carbonat erklärt werden. Da die Veresterungsreaktion nahe am Gleichgewicht ist, beginnt die Lipase das Produkt als neue Substratquelle zu bevorzugen. Folglich ist die Bildung von Nebenprodukten begünstigt, da die Menge an Substrat zur Bildung von Nebenprodukten steigt und daraus folgend die Produktausbeute sinkt. Die Ringöffnung führt zudem in Teilen zu irreversiblen Zersetzung, wenn neu gebildete Hydroxyl- und Carboxylgruppen anschließend weiteren Veresterungen unterworfen werden. Dies führt zu einem kooperativen irreversiblen Abbau des Produktes.

Weitere Optimierungen der Reaktionsführung

Das molare Verhältnis von Sebacinsäure zum zyklischen Carbonat kann lediglich im Bereich variiert werden, indem die Disäure im Carbonat löslich ist.Daher ist eine stöchiometrisch ausgeglichene Reaktion nicht möglich. Im entsprechenden Konzentrationsbereich konnte kein Effekt auf die Ausbeute an SB BisCC durch Variation der Eduktkonzentrationen erreicht werden.

Eine weitere Möglichkeit Produktausbeuten in Lipase katalysierten Veresterungsreaktionen zu erhöhen, ist die kontinuierliche Eliminierung von Wasser aus dem Reaktionsprozess [160]. In der durchgeführten Arbeit konnte jedoch kein positiver Effekt bezüglich der Produktausbeute aufgezeigt werden, indem zum einen die Synthese unter Zugabe von Trocknungsmitteln (z.B. Na₂SO₄) und zum anderen unter reduziertem Druck (200 mbar) durchgeführt wurde. Daher kann die Aussage getroffen werden, dass die langsame Doppelfunktionalisierung sowie die Konkurrenzreaktion, induziert durch die Ringöffnung, eher die Reaktionsausbeuten beeinflusst als die Anwesenheit von Wasser.

Auf Grund der erheblichen Menge an Nebenprodukten und der Reaktion im reinem Glycerin-1,2-Carbonat ist die Aufarbeitung des Produktes von entschiedener Bedeutung.

Hierfür wurde ein umweltfreundliches Reinigungsverfahren entwickelt, basierend auf der Fällung in Wasser und Eliminierung der Nebenprodukte mittels Ethanol, welches zu einer Produktreinheit von 95% führt. Dabei ist der Waschschritt mittels Ethanol hauptsächlich für die Entfernung vom zyklischen Carbonat sowie der Nebenprodukte verantwortlich. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die postulierte chemische Struktur (s. Abbildung 12 (2)) und die vorhanden Hydroxylgruppen.

5.1.4 Abschließende Diskussion

Die Produktausbeute an SB BisCC konnte nach Optimierung der Synthese im Hinblick auf Temperatur, Reaktionszeit sowie Aufarbeitung auf ca. 70% gesteigert werden. Dabei wurde eine Reinheit von über 95% des SB BisCC erzielt. Mittels eines klassisch, chemischen Syntheseweg des gewünschten Moleküls wurde eine Ausbeute im Bereich von 71 -77% [150] erzielt. Damit lag die Ausbeute des enzymatischen Prozesses im Bereich des chemischen Prozesses. Die nicht quantitative Umsetzung ist hauptsächlich durch die konkurrierenden Reaktionen zu erklären. Nichtsdestotrotz können die gebildeten niedermolekularen Oligomere möglicherweise ebenfalls in der NIPU-Synthese eingesetzt werden. Die Eignung in technologischen Anwendungen für die NIPU-Synthese kann in weiterführenden Studien beleuchtet werden. Dies würde die Notwendigkeit, Teile des Reaktionsproduktes zu verwerfen, vermeiden und sogleich die Materialumwandlungseffizienz der vorgestellten Synthese aufwerten.

Der erfolgreiche biokatalytische Reaktionsweg bestätigt, dass Glycerin-1,2-Carbonat als grünes Lösemittel Anwendung finden kann, indem Lipasen ihre Reaktivität beibehalten. Zudem zeigte die Arbeit, dass das zyklische Carbonat als Substrat verwendet werden kann und die Veresterung des Alkohols selektiv erfolgte, indem die Ringöffnungsreaktion bei moderaten Umgebungstemperaturen und Zeiten unterdrückt wurde. Die Veresterung von Glycerin-1,2-Carbonat wurde schon zuvor beschrieben, unter der Verwendung von hochreaktiven Acyldonatoren, Vinylacetat und deren Racemattrennung [161]. Dennoch ist die vorgestellte Synthese die erste bekannte Lipase katalysierte Reaktion einer direkten Funktionalisierung von Carbonsäuren mit Glycerin-1,2-Carbonat. Hervorzuheben ist, dass die vorgestellte biokatalytische 1-Schritt Synthese bisher nicht auf klassisch chemischen Weg in einem 1-Schritt Verfahren zu bewerkstelligen ist. Wie von Ghandi *et al.* beschrieben, führt die Kondensation von Fettsäuren mit Glycerincarbonat in Gegenwart eines basischen Katalysators zur Öffnung des Carbonats und zur Bildung von Monoglyzeriden. Unter sorgfältig angepassten Reaktionsbedingungen ist es jedoch möglich Glycerin Dicarbonat [4-(Methoxycarbonyloxymethyl)-1,3-dioxolan- 2-one] in geringen Mengen mittels K_2CO_3 zu synthetisieren [162]. Allerdings wird im Falle der chemischen Veresterung von Fettsäure eine vorherige Aktivierung der Carboxylgruppe benötigt, um das gewünschte Produkt zu erhalten [150]. Auf Grund dessen stellt der hier präsentierte biokatalytische Syntheseweg nicht nur eine grüne Alternative zu einer bekannten Synthese dar, sondern reduziert ebenfalls die Anzahl der erforderlichen Reaktionsschritte und ermöglicht eine direkte sowie lösemittelfreie Funktionalisierung.

Im Folgendem wird die Anwendung des hier entwickelten Veresterungsprozesses an einem technisch relevanten System erprobt. Hierfür wird ein Polyester auf dem hier dargestellten Weg mit Glycerin-1,2-Carbonat funktionalisiert und weiter zu einem Lackfilm verarbeitet.

5.2 Enzymatische polymeranaloge Umwandlung eines Polyester basierten Bindemittels

Beschichtungen begegnen wir nahezu überall im alltäglichen Leben, dabei dienen diese hauptsächlich als Schutz vor mechanischen oder physikalischen Einflüssen, was dekorative Zwecke nicht ausschließt. Die Grundbestandteile dieser Beschichtungen, wie Lacke und Farben, sind Bindemittel, Lösungsmittel, Pigmente und Additive. Unter den verschiedenen Bindemittelsystemen, die in Lacken verwendet werden, stellen diejenigen auf Basis von ungesättigten Polyesterharzen die am weit verbreitetsten dar. Diese Polyesterharze sind mit Säure- und Hydroxygruppen funktionalisiert, die relativ frei von Olresten sind und in dem Begriff Polyester zusammengefasst. Solche Harze werden hauptsächlich aus der Kondensationsreaktion mehrwertiger Alkohole mit Di- / Trisäuren oder Anhydriden gewonnen unter der Bildung einer esterfunktionellen Gruppe im Polymerrückgrat. Die Art des aus einer Kondensationspolymerisation resultierenden Polyesters sowie deren stereochemische Anordnung und Zusammensetzung hängt von der Beschaffenheit sowie dem Verhältnis der Monomere ab [163]. Im Allgemeinen sind Polyester entweder säurefunktionell oder hydroxyfunktionell, je nach Molverhältnis der verwendeten Monomere. Auf Grund der Vielzahl an unterschiedlich eingesetzten Monomeren können hyperverzweigte, dendritische, Sternund Netzwerkpolyester mit unterschiedlichen Geometrien hergestellt werden, was die Polyester zu einer vielfältigen Gruppe für Beschichtungsanwendungen macht [164, 165]. Die letztendliche Beschichtung auf Polyesterbasis wird über zwei klassisch chemische Vernetzungsreaktionen hergestellt, für die die Verwendung von Melaminen oder Isocyanaten notwendig ist (s. Abbildung 27).

Dabei stellen Melamin-Formaldehyd- Harze einen wichtigen Bestandteil an wärmehärtbaren Harzprodukten dar. Anwendung finden Melamine in der Beschichtungsindustrie in großem Umfang als Bindemittel und Vernetzer zur Herstellung von hochbeständigen Beschichtungen. Ein klassisches Melamin für die Vernetzungsreaktion ist das Hexamethoxymethylmelamin (HMMM), welches durch die Reaktion von Melamin mit Formaldehyd hergestellt wird unter der Formierung von Methoxymethylgruppen [166]. Hydroxylierte Polyester werden im Allgemeinen mit butylierten Melaminharzen und HMMM mit Hilfe einer starken Säure wie p-Toluolsulfonsäure vernetzt. Der dazugehörige Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 27 dargestellt [167]. Neben der Protonierung der methylierten Methoxygruppen kann auch die Protonierung bereits gebildeter Vernetzungen erfolgen und zur Spaltung der zwischen Polyester- und Melaminharz gebildeten Bindung führen. Durch Eliminierung des entstehenden Alkohols kann das Gleichgewicht der Reaktion entsprechend verschoben werden, das zur Folge die Netzwerkbildung begünstigt.

Polyester-Urethane stellen das zweite System zur Vernetzung von Polyestern dar, wel-

che in Beschichtungen für Indoor- und Outdoor-Applikationen angewendet werden, auf Grund ihrer guten Haftungseigenschaften sowie hohen Beständidkeit gegen Lösemitteln, Chemikalien und Witterungseinflüssen. Die Synthese basiert auf einer Additionsreaktion eines Polyesterpolyols mit einem Di-/Polyisocyanat (s. Abbildung 27), in dem die Hydroxylgruppe des Polyesters als Nukleophil und das Isocyanat-Kohlenstoff (-N=C=O=) als Elektrophil wirkt. Daraus folgte eine direkte Polymerisation zwischen den Hydroxylgruppen des Polyesters und der NCO-Gruppe des Isocyanats, welche äußerst reaktiv sind. Je nach Reaktionsbedingungen sind daher auch diverse Sekundärreaktionen möglich, die die Bildung von Dimeren und Trimeren begünstigen. Für eine Umsetzung zum Polyurethan ist jedoch ein Katalysator nötig. Die am häufigsten eingesetzten Katalysatoren sind hierbei tertiäre Amine oder zinnorganische Verbindungen, die jeweils eine große Gruppe an unterschiedlichen und kommerziell erhältlichen Katalysatoren umfasst [168].

Im Vergleich zu den klassischen Vernetzungsreaktionen zeigt die vorliegende Arbeit eine umweltfreundliche Alternative zur Vernetzung von carboxylierten Polyestern auf Basis von zyklischen Carbonaten. Diese sind in der grünen Polymerchemie von großem Interesse, da sie die Bildung einer Urethanbindung mittels Aminen ermöglicht. Die Synthese von Polyhydroxyurethanen aus Biscyclocarbonaten und Diaminen ist eine vielversprechende grüne Alternative zur herkömmlichen Synthese von Polyurethanen, wodurch die Verwendung von toxischen Isocyanaten vermieden werden kann [169]. Das ist wiederum von großem Interesse, da Isocyanate nicht vollständig aus der Kundenformulierung entfernt werden können.

Eine Funktionalisierung mit zyklischem Carbonat kann zum einen über die Reaktion von Epoxiden mit CO_2 erfolgen. Dieses Verfahren wurde bereits verwendet, um Siloxane zu funktionalisieren und anschließend über ein Diamin zu einem isocyanatfreien Polyurethan Netzwerk zu härten [170]. Nachteil dieser Methode ist, dass für die Vernetzung Schwermetallkatalysatoren sowie Amine benötigt werden, die oftmals toxisch sind. Im Abschnitt 5.1 konnte bereits erfolgreich gezeigt werden, dass die Einführung von zyklischen Carbonaten in Dicarbonsäuren durch lipasekatalysierte Veresterung ohne vorherige



Abbildung 27: Schematische Darstellung der Vernetzung von Polyester über klassisch chemische Verfahren auf Basis von Melamin und Isocyanaten sowie über Lipase induzierte Selbst-Vernetzung.

Aktivierung möglich ist. Unter den Umgebungsbedingungen der Enzymkatalyse bleibt der Carbonatring erhalten, wodurch eine gezielte Vernetzung in einem nachfolgendem Verfahren möglich ist. Im folgendem Abschnitt konnte diese Technik eingesetzt werden, um eine Glycerin-1,2-Carbonat-Funktionalität in einen kommerziellen Carboxy-funktionalisierten Polyester einzufügen (s. Abbildung 28). Das enzymatisch hergestellte Bindemittel wurde anschließend in einem zweiten Schritt unter Verwendung von geringen Mengen eines Amin-Katalysators zu einer Polyesterbeschichtung gehärtet. Von besonderer Bedeutung ist, dass das verwendete Amin nicht als Vernetzungsmittel dient und somit nicht in das Polyesternetzwerk integriert wird. Durch die Carbonatfunktionalität wird eine Selbst-Vernetzung der funktionalisierten Polyester möglich. Die hier dargestellte Methode stellt eine umweltfreundliche, nachhaltige sowie ökonomisch sinnvolle Alternative zu klassischen Vernetzungsprotokollen (Melamin-Polyester, Urethan-Polyester) dar und schließt die Nutzung von Isocyanaten, Melaminverbindungen, metallorganische Verbindungen und Aminen als Vernetzungsmittel aus.

5.2.1 Umweltfreundliche Synthesestrategie für die Vernetzung und Ausbildung einer Beschichtung

Dieser Abschnitt behandelt die Adaptierung des entwickelten Modellsystem aus 5.1, um vernetzungsfähige Glycerin-1,2-Carbonat Gruppen in ein kommerziellen carboxylfunktionalisierten Polyester (Dynapol LS 415 der Firma Evonik) unter Abspaltung von Wasser einzufügen (s. Abbildung 28). Das so hergestellte Bindemittel wurde anschließend mittels eines nicht toxischen Amin-Katalysator (2% DABCO) und bei 160 °C zu einer Polyesterbeschichtung gehärtet, indem die carbonfunktionalisierten Polyester selbst vernetzten. Im Folgenden wurden die Eigenschaften der Beschichtung überprüft und mit einer Beschichtung des ursprünglichen Polyesters nach konventioneller Melaminhärtung verglichen. Laut Lieferant ist Dynapol LS 415 ein linearer und gesättigter Polyester. Weitere Eigenschaften sind in Tabelle 7 aufgeführt. Evonik stellte hierfür extra eine Charge mit einer außergewöhnlich hohen Säurefunktionalität bereit. Diese Carboxylgruppen wurden in der en-



Abbildung 28: Synthese der Carbonat Funktionalisierung des Polyesters und der Vernetzung des Lackfilms. $R_3 = Glycerin-1,2$ -Carbonat, Butanol, Alkoholgruppen aus möglichen Ringöffnungen des Carbonats

Lieferform [%] w/w	T _G [°C]	M_n [g*mol ⁻¹]	Struktur	Säurezahl [mg _{KOH} *g ⁻¹]	$\mathrm{OH} ext{-Wert}$ $[\mathrm{mg}_{\mathrm{KOH}} * \mathrm{g}^{-1}]$
40	12	25000	linear	29	1,4

Tabelle 7: Eigenschaften des Polyesters Dynapol LS 415.

zymatischen polymeranalogen Reaktion zur Bildung von Glycerincarbonat-Endgruppen für die Netzwerkbildung benötigt.

5.2.2 Charakterisierung der funktionalisierten Polyester

Bestimmung der Säurezahl

Aufschluss über den Erfolg sowie den Grad der Funktionalisierung lieferte die Bestimmung der Säurezahl. Diese wurde für den ursprüngliche Polyester (Rohpolyester) als auch für den modifizierten Polyester bestimmt. Nach erfolgreicher Glycerincarbonat Funktionalisierung sank der Wert der Säurezahl auf 50% des ursprünglichen Wertes (s. Tabelle 8). Somit konnte der Grad der Funktionalisierung mit 50% beziffert werden.

Tabelle 8: Säurezahl des unbehandelten und des modifizierten Polyesters.

Polyester	Säurezahl [mg ^{KOH} *g ⁻¹]
Rohpolyester	$29,07 \pm 0,35$
Funktionalisierter Polyester	$14,54 \pm 0,31$

Infrarotspektroskopie des Bindemittels

Die erfolgreiche Veresterung konnte ebenfalls durch infrarotspektroskopische Analyse der Edukte sowie des Polyesters nach der Funktionalisierung bestätigt werden. Abbildung 29 stellt die Spektren gegenüber. Dabei ist die Carbonylgruppe des Rohpolyesters um 1740 cm⁻¹ sichtbar. Nach erfolgreicher Veresterung wurde eine zweite Carbonylbande um 1796 cm⁻¹ deutlich. Diese ist charakteristisch für chemisch gebundenes Glycerin-1,2-Carbonat. Der Unterschied von nicht verestertem zu verestertem Carbonat spiegelt sich im Signal der Carbonylbande wieder, welche von 1772 cm⁻¹ (unverestert) auf 1796 cm⁻¹ (verestert)



Abbildung 29: FTIR Spektren des Rohpolyesters und des Glycerin-1,2-Carbonats sowie des funktionalisierten Polyesters.

schiebt. Die Spektren deuteten zudem daraufhin, dass kein unverestertes Carbonat detektiert wurde.

Kernspinresonanzspektroskopie des Bindemittels

Die Funktionalisierung des Polyesters wurde abschließend mittels NMR Spektroskopie validiert. In Abbildung 30 sind die ¹H-NMR Spektren des Rohprodukts und des funktionalisierten Polyesters gegenübergestellt. Deutlich sichtbar sind die zusätzlichen Signale des Carbonats, im Spektrum des modifiziertem Polyesters, im Bereich von 4,0 - 5,0 ppm.

Die Signale bei 4,5 (8H, m, t, J = 8,6 Hz, -OCOO-CH₂-CH-CH₂-O-) und 4,95 (2H, m, -OCOO-CH₂-CH-CH₂-O-) sind charakteristisch für die Veresterung von zyklischem Carbonat. Wie bereits im Abschnitt 5.1.2 diskutiert, führte die Veresterung des zyklischen Carbonats zu einer Verschiebung des -OCOO-CH₂-CH-CH₂-O- Signals (Signal B) von 4,8 ppm auf 4,95 ppm. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass die detektierten Signale des ¹H-NMR Spektrums, der Abbildung 30 oben, durch verbliebenes Glycerin-1,2-Carbonat aus der Reaktionslösung resultieren. Des Weiteren ist das vorhandene Multiplett bei 4,95 ppm ein deutlicher Hinweis auf eine kovalente Funktionalisierung des Polyesters mit Glycerin-1,2-Carbonat.

Zudem wurde ein Signal bei 4,8 ppm detektiert. Dieses Signal deutete entweder auf restliches Glycerin-1,2-Carbonat oder auf die Öffnung des Carbonatrings hin (s. Abbildung 28). Ein weiteres Indiz für die Ringöffnung, welches als Nebenreaktion in Erscheinung tritt, sind die Signale bei 4,5 ppm, 4,0 ppm und 3,7 ppm. Diese können den markierten Protonen D, F und G (s. Abbildung 30) zugeordnet werden [150]. Die Zuordnung wurde bereits genauer unter Abschnitt 5.1.2 beschrieben. Des Weiteren sind die Signale D, F und G leicht verschoben und im Vergleich zu freiem Glycerin-1,2-Carbonat ergeben diese Dubletts (s. Abbildung 31). Dies deutete darauf hin, dass zusätzlich zum vorhandenem restlichen Glycerin-1,2-Carbonat, lineares Carbonat als Nebenprodukt anfällt.

Auf Grund des Mangels an strukturellen Informationen bezüglich des Rohpolyesters, war eine Analyse sowie Charakterisierung des Polymerrückgrates nicht möglich. Dennoch zeigte der Vergleich der ¹H-NMR Spektren vor und nach der Veresterung des Polyesters mit dem zyklischen Carbonat keine wesentlichen Veränderung auf. Das bedeutet, dass die Polyesterstruktur unbeeinflusst bleibt.

Die Lipase katalysierte Veresterung wurde in Butylacetat durchgeführt. Das Lösemittel



Abbildung 30: ¹H-NMR Spektren des Rohpolyester (unten) und des Carbonat funktionalisierten Polyesters (oben). Signal D, F und G zeigen Nebenprodukte durch Öffnung des Carbonatrings.



Abbildung 31: Ausschnitt der ¹H-NMR Spektren von reinem Glycerin-1,2-Carbonat (rote Linie) und vom funktionalisiertem Polyester (schwarze Linie).

vereint die Eigenschaften der Löslichkeit des Polyesters sowie Mischbarkeit mit Glycerin-1,2-Carbonat und der verbleibenden katalytischen Aktivität der Lipase. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass Butylacetat jedoch auch als Substrat für die Lipase dienen kann. Die möglichen Spaltprodukte Essigsäure und Butanol könnten wiederum ebenfalls durch die Lipase mit dem Polyester weiter verestert werden. Eine partielle Hydrolyse des Butylacetat konnte im NMR des Produkts (s. Abbildung 30, oben) wiedergefunden werden. Dabei konnte nicht ausgeschlossen werden, dass entstehende Essigsäure die beobachtete Öffnung des Carbonatrings auslöst.

Eine Referenz Synthese in Cyclopentylmethylether (CPME) zeigte ebenfalls eine Funktionalisierung des Dynapols LS 415 und somit ähnliche ¹H-NMR Spektren (s. Abbildung 32). Unterschiede in den Spektren resultierten aus den jeweiligen Lösemitteln und eines geringeren Funktionalisierungsgrads in CPME. Das bestätigte zum einen, dass CPME keine Alternative zu einem esterbasierten Lösemittel ist und zum anderen, dass der Polyester durch Butylacetat nicht wesentlich beeinflusst wurde. Des Weiteren wird für die Lipase katalysierte Hydrolyse des Butylacetat Wasser benötigt, welches nur als Verunreinigung



Abbildung 32: ¹H-NMR Spektren des funktionalisiertem Polyester in Butylacetat (oben) und Cyclopentylmethylether (unten).

im eingesetzten Glycerin-1,2-Carbonat anwesend war. Daher kann die Annahme getroffen werden, dass der große Überschuss an zyklischem Carbonat, im Vergleich zum Wasser, die Carbonatfunktionalisierung des Polyesters begünstigte. Den endgültigen Beweis für die beschriebene chemische Modifikation legten die Analysen des hergestellten Netzwerks aus dem modifizierten Dynapol LS 415 dar, was im Folgendem beschrieben wird.

Eine optimale Reaktionszeit konnte ebenfalls bestimmt werden (sieben Tage) und deckt sich mit dem gefundenen Optimum der SB BisCC Synthese (s. Abschnitt 5.1.3). Da die Reaktion bei milden Bedingungen (Raumtemperatur) katalysiert wird, erhöht die relativ lange Reaktionszeit die Synthesekosten nur in Bezug auf den Durchsatz, jedoch nicht in Bezug auf die Energie- oder Materialkosten. Da sich die Ausbeute nach drei Tagen nur geringfügig erhöhte, müsste in einem industriellen Umfeld die Möglichkeit einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute durch Verkürzung der Reaktionszeit geprüft werden.

5.2.3 Vernetzung des funktionalisierten Polyesters und Charakterisierung des Lackfilms

Zur Analyse der Polyesterbeschichtung auf Basis der carbonatfuntkionalisierten Polyestern wurden sieben Beschichtungen (M1-M7) nach 4.7.2 hergestellt. Diese wurden im Folgenden mit dem carbonatfunktionalisierten Polyester vor der Vernetzung sowie mit zwei Referenzen verglichen. Beide Referenzen (R1,R2) wurden mit HMMM und p-Toluolsulfonsäure zu einem Polyester-Melamin-Coating (s. Abbildung 27) gehärtet. Lediglich die Zeit des Härteprozesses wurde variiert (R1 = 20 min, R2 = 5 min). Die Reaktion der Öffnung zyklischer Carbonate zur Bildung eines Netzwerkes wurde mit Hilfe von FTIR-Spektroskopie bereits analysiert und in der Literatur beschrieben [141, 171]. Daraus ist zu entnehmen, dass zyklische, fünfgliedrige Carbonate ein signifikantes Signal im Bereich von 1750 - 1860 cm⁻¹ abbilden. Im unvernetzten, funktionalisierten Polyester konnten die Valenzschwingungen der C=O Bindung bei 1715 cm⁻¹ und 1785 cm⁻¹ sowie die des Polyester-Grundgerüst (Backbone) bei 1793 cm⁻¹ als auch der Carbonat Endgruppe bei 1811 cm⁻¹ nachgewiesen werden.

Abbildung 33 zeigt einen Vergleich der IR-Spektren des unbehandelten Polyesters sowie des modifizierten Polyesters vor und nach der Vernetzung. Die zuvor genannten Signale verschwanden vollständig, nachdem der modifizierte Polyester mittels DABCO bei 160 °C für 20 min vernetzt wurde. Dabei wurden zwei neue Signale bei 1803 cm⁻¹ und 1817 cm⁻¹ sichtbar. Eine detailliertere Ansicht des beschriebenen Ausschnitts ist in Abbildung 34 zu sehen.

Die Veränderung der besagten Signale konnte in allen Beschichtungen, basierend auf der Vernetzung des modifizierten Polyesters (Beschichtung M1- M7), festgestellt werden. Dieser Sachverhalt bestätigte, dass eine Vernetzung erst auf Grund der zuvor eingeführten Funktionalisierung eintritt. Die Verwendung geringer Mengen an einem aminhaltigen Katalysator führte zu einer beschleunigten Öffnung des Carbonatrings. Auf diesen Schritt folgte eine Reaktion mit freien Alkohol-Gruppen des teilweise abgebauten Polyesters (wie



Abbildung 33: Vergleich der FTIR-Spektren des Rohpolyesters (rote Linie), des unvernetzten modifizierten Polyester (blaue Linie) und der gehärteten Beschichtung (M1-M7, schwarze Linien).

zuvor beschrieben), freiem Glycerin-1,2-Carbonat oder von Alkohol-Gruppen basierend auf der Öffnung des zyklischen Carbonats, um das beschriebene Polyesternetzwerk zu formen (s. Abbildung 35).

Somit entstanden neue Polyester- und lineare Carbonatgruppen, welche durch die Identifizierung mittels IR-Spektroskopie bei 1803 cm⁻¹ und 1817 cm⁻¹ nachgewiesen wurden. Das Hauptsignal des linearen Carbonats sollte in dem Hauptsignal der Carbonylbande bei 1715 cm⁻¹ bzw. bei ca. 1750 cm⁻¹ liegen [172]. Jedoch überlagerte das Carbonylsignal des Polyesters alle anderen und Veränderungen waren dadurch in diesem Bereich nicht sichtbar. Die Signale nach der Vernetzung im Bereich von 1803 cm⁻¹ sowie 1817 cm⁻¹ resultieren aus den postulierten Strukturen, die in Abbildung 28 aufgeführt sind. Eine Zuordnung der Signale zu den verschiedenen Reaktionsprodukten war jedoch kaum


Abbildung 34: Vergleich der FTIR-Spektren des Rohpolyesters (rote Linie), des unvernetzten modifizierten Polyester (blaue Linie) und der gehärteten Beschichtung (M1-M7, schwarze Linien).

möglich. Die Veränderung der IR Spektren der Beschichtungen konnten in allen, mittels Glycerincarbonat hergestellten Beschichtungen, festgestellt werden und zeigten, dass die Vernetzung erst auf Grund der zuvor eingeführten Funktionalisierung eintritt.

Weitere Charakterisierungen des funktionalisierten Polyesters sowie dessen Praktikabilität in diversen Anwendungen wurden anhand der erstellten Beschichtungen durchgeführt. In Anwesenheit von Glycerin-1,2-Carbonat wurden Beschichtungen mit Schichtdicken von 28,4 µm - 32,0 µm erstellt (s. Tabelle 9). Hier konnte festgestellt werden,



Abbildung 35: Schema der Polyestervernetzung.

Tabelle 5. Dementaleke der Desementung.			
Probe	\emptyset _{Schichtdicke} [μm]		
Referenz 1	$32,8 \pm 3,7$		
Referenz 2	$28,5\pm1,8$		
Beschichtung 1 - 7	29.8 ± 2.0		

Tabelle 9: Schichtdicke der Beschichtung.

dass geringe Mengen an verbliebenen Glycerin-1,2-Carbonat zu einer deutlich verbesserten Vernetzung führten und folglich zu einer einfacheren Formierung der Beschichtung. Ebenfalls konnte an dieser Stelle festgestellt werden, dass die Zugabe geringer Mengen des Rohpolyesters die Bildung eines stabilen und harten Polyesternetzwerks förderten. Die mechanischen Eigenschaften der Beschichtung, welche ausschlaggebend sind für die technische Leistungsfähigkeit, sind im Folgendem beschrieben. Unter den verschiedenen möglichen Eigenschaften wurden die Härte, Glanz und Haftung ausgiebig betrachtet, um die Qualität der Beschichtungen zu charakterisieren (s. Tabellen 10 - 12).

Tabelle 10: Pendeldämpfung.

Probe	\emptyset Pendeldämpfung
Referenz 1	178 ± 3
Referenz 2	189 ± 7
Beschichtung 1 - 7	79 ± 3

Die Härte der Beschichtung wurde nach DIN EN ISO 1522 über die Pendeldämpfung bestimmt (s. Tabelle 10). Daraus ging hervor, dass der funktionalisierte Polyester im Vergleich zu den Referenzen zu signifikant niedrigeren Werten führte. Die Oberflächenhärte nahm somit in den Glycerin-1,2-Carbonat funktionalisierten Polyesterbeschichtungen ab und formte dennoch einen soliden, festen und nicht klebrigen Film. Somit konnte eine erfolgreiche Netzwerkbildung aus enzymatisch funktionalisierten Polyester erstellt wer-

Tabelle 11: Glanz.				
Probe	Winekl[° $]$	\emptyset Glanz		
Referenz 1	20	$98,8\pm5,8$		
	60	$116,0 \pm 1,4$		
	85	$98,2\pm1,0$		
Referenz 2	20	$92,3\pm1,0$		
	60	$113,0\pm0,3$		
	85	$98,3\pm0,3$		
Beschichtung 1 - 7	20	$86,7\pm2,07$		
	60	$109,1 \pm 1,1$		
	85	$91,8 \pm 1,2$		

11 11 **m** 1

Tabelle 12: Gitterschnitt.

Probe	\emptyset Gitterschnitt
Referenz 1	0 ± 0
Referenz 2	0 ± 0
Beschichtung 1 - 7	$0,4\pm0,5$

den, welche gute physikalische Eigenschaften gegenüber Krafteinwirkung von außerhalb aufweiste. Die Eigenschaften des Glanzes wurden nach DIN EN ISO 2813 bestimmt und weisten ebenfalls geringfügig niedrigere Werte auf. Dem gegenüber zeigte der Gitterschnitt Test nach DIN EN ISO 2409 keinerlei Unterschiede zu den Referenzen auf. Somit weiste die Beschichtung auf Basis des vorgestellten enzymatischen und umweltfreundlichen Vernetzungsprozess ähnliche bzw. gleiche mechanische und physikalische Eigenschaften auf wie die Polyester-Melamin-Beschichtung, ohne jedoch toxische Katalysatoren oder Vernetzer zu benötigen.

5.2.4 Abschließende Diskussion

Das zuvor entwickelte Modellsystem zur lipasenkatalysierten Funktionalisierung mit Glycerincarbonat konnte auf ein reales Polyestersystem angewendet werden. Somit wurde ein grüner Syntheseweg zur Modifizierung von Polyestern mit dem umweltfreundlichen Vernetzer Glycerincarbonat entwickelt. Die eingesetzte CalB, in Form von CalB immo Plus, zeigte eine hohe Selektivität für die Veresterung der reaktiven Endgruppen, wie aus den NMR-Analysen hervorgeht. Dabei ist von Bedeutung, dass der eingesetzte Polyester von der Lipase nicht verdaut wurde, sondern die vorgestellte Funktionalisierung katalysierte.

Die Verwendung des selbstvernetzenden funktionalisierten Polyesters für die Beschichtung, welche mit nur geringen Mengen an Aminkatalysator erzeugt wurde, weiste einen harten, glänzenden Film mit einer guten Haftung auf Stahl auf. IR-Spektren bestätigen zum einen die Funktionalisierung des Polyesters und zum anderen die folgende erfolgreiche Vernetzung. Dies bestätigt das vorgestellte Konzept einer ungiftigen und umweltfreundlicheren Methode zur Herstellung von Beschichtungen.

5.3 Immobilisierung einer Lipase auf PMMA beschichteten TEOS-Partikeln

Ein weit verbreiteter Ansatz zur Stabilisierung von Lipasen ist die Immobilisation und ist essentiell für die Realisierung zahlreicher biotechnologischer Prozesse. Das prominenteste Beispiel einer immobilisierten Lipase stellt die Anbindung der Lipase B aus *Candida antarctica* an einen makroporösen Acrylträger dar [173]. Novozym 435 und CalB immo Plus stellen hierbei die gebräuchlichsten kommerziellen Produkte dar, die beide auf der adsorptiven Fixierung an einem hydrophoben Poly(methylmethacrylat)-Copolymer bzw. Styrol-Divinylbenzol-Copolymer basieren [173, 153, 128]. Vorteil dieser Technik ist zum einen die Erhöhung der Grenzflächenaktivität durch hydrophobe Wechselwirkungen der Trägeroberfläche mit der amphiphilen Deckel-Domäne, welche maßgeblich die Aktivierung der Lipase steuert [173]. Zum anderen bewirkt diese Immobilisation eine Verdopplung der Lebenszeit des Enzyms in wässrigen Systemen sowie in nicht nativen Medien [174, 175]. Eine Steigerung der Aktivität bei steigenden Temperaturen konnte nur geringfügig (Faktor von zwei) erreicht werden und zudem zeigt Novozym 435 als auch CalB immo Plus ein identisches Temperaturoptimum wie die lösliche CalB [176, 177]. Eine der größten Limitierungen des Biokatalysators ist die Beständigkeit der Komposition aus CalB und Trägermaterial, so konnt in dieser Arbeit im Abschnitt 5.1.3 gezeigt werden, dass die CalB in Glycerin-1,2-Carbonat von der Trägeroberfläche desorbiert. Darüber hinaus sind diese Trägersysteme gegenüber vielen Lösemittel nicht beständig. Die vielen Vorteile, die immobilisierte Enzyme bzw. Biokatalysatoren zu bieten haben, spiegeln das riesige Potenzial dieser Technik wieder, jedoch ist dieses noch nicht vollständig ausgeschöpft. Die Art und Weise, in der Enzyme auf physischen Oberflächen immobilisiert werden, ist entscheidend für die Herstellung bioaktiver Oberflächen. So gelten zum Beispiel für Biosensoren oder Biochips andere Rahmenbedingungen und Anforderungen als für Biokatalysatoren [178, 133]. Demzufolge sind die Oberflächencharakteristika ein entscheidender Faktor für die katalytischen Eigenschaften des Biokatalysators. Eine interessante Möglichkeit, welche in den vergangen Jahren deutlich an Popularität gewonnen hat, ist die Modifizierung von Trägeroberflächen mit Polymerbürsten. Das sind Polymerketten, die an eine Oberfläche oder Grenzfläche mit einer ausreichend hohen Pforpfdichte gebunden sind. Hierbei entscheidet die Pfropfdichte über die Polymerstruktur mit ansteigender Dichte, die bei niedrigen Polymerdichten von der »pancake-« über den »mushroom-state« zur Polymerbürste übergehen [179, 180]. Polymerbürsten weisen eine Reihe von biokompatiblen Eigenschaften für die Immobilisierung von Enzymen auf. So können Polymerbürsten aus diversen, nicht faulenden und zersetzungsresistenten Materialien hergestellt werden [181, 182]. Darüber hinaus bilden diverse Polymerbürsten eine stabilisierende Umgebung für Enzyme im Vergleich zu anderen Oberflächen, indem diese die Proteinentfaltung inhibieren [183]. Zudem sind die kovalent gebundenen Polymerketten äußerst resistent gegenüber Lösemitteln, Temperaturen und pH-Werten. Neben den biokompatiblen Eigenschaften ist vor allem die Abstimmbarkeit hervorzuheben. Durch geschickte Einstellung der Polymerchemie, des Molekulargewichts sowie der Pfropfdichte können die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Polymerketten rational gesteuert werden [184]. Das wiederum ermöglicht die molekularen Details der Polymerketten den jeweiligen Enzymen anzupassen, da diese die Enzymstruktur sowie -dynamik an der Grenzfläche der Polymerbürsten und Reaktionsmedien entscheidend beeinflussen können.

Das folgende Kapitel stellt eine neue Methode zur Immobilisierung der CalB auf Polymethylmethacrylat (PMMA) beschichteten Partikel vor. Der Fokus liegt dabei auf der Entwicklung von Enzymimmobilisaten mit dem Ziel den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Immobilisierungseffiziens und die Lipaseaktivität zu betrachten unter dem Aspekt der Lösemittelbeständigkeit. Auf Grund der hohen chemischen und thermischen Stabilität dienen sphärische Partikel auf Basis von Tetraethoxysilan als Trägerkern [185, 186]. TEOS zählt zu den mit am häufigsten verwendeten Vorläufern der Kieselsäure und weist eine leicht einzustellende und kontrollierbare Hydrolysegeschwindigkeit auf [187].

5.3.1 Entwicklung eines PMMA beschichteten Trägersystems für Lipasen auf Basis von TEOS-Partikeln

Den Kern der beschichteten Partikel bilden sphärische Partikel aus Tetraethoxysilan (TEOS), welche nach dem Stöber-Verfahren über eine nukleophile Polykondensation hergestellt wurden (s. Abbildung 36) [135]. Die Modifikation der Oberfläche erfolgte über eine Atomtransfer-Radikalpolymerisation (ATRP) an zuvor angebundenem Initiator. Hierfür wurden die Partikel mit unterschiedlichen Verhältnissen eines ATRP-Initiator Silans (AIS) und eines Amino-Silans funktionalisiert (s. Abbildung 37). Dabei agiert das Amino-Silan ((3-Aminopropyl)triethoxysilan) als Platzhalter an dem keine Polymerisation stattfindet. Lediglich am bromierten Initiator-Silan (3-(Trimethoxysilyl)propyl-2-brom-2-methylpropanoat) können anschließend über ATRP PMMA-Bürsten mittels dem »grafting-from-Verfahren« synthetisiert werden. Auf Grund der damit regulierbaren Pfropfdichte der PMMA-Bürsten kann ebenfalls die Struktur der PMMA-Ketten gesteuert werden. In Ab-



Abbildung 36: Schematische Darstellung zur TEOS-Partikel Synthese nach dem Stöber-Verfahren.

bildung 38 sind Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen der synthetisierten Partikel dargestellt und zeigen zum einen (A-B) die reinen TEOS-Partikel und zum anderen PMMA modifizierte TEOS-Partikel (C-D). Erste Hinweise auf eine Polymerbeschichtung werden auf Grund der unterschiedlichen Verformung der beschichteten Partikel (D) im Vergleich zu den uniform runden TEOS-Partikeln (B) bei einer Vergrößerung von 100k ersichtlich. Mittels Thermogravimetrie konnte bestätigt werden, dass die Pfropfdichte über verschiedene Verhältnisse an AIS zu APTES eingestellt werden konnte (s. Abbildung 39, linker Panel). Mit ansteigender AIS Belegung konnte eine zunehmende Polymermasse bestimmt werden. Hierbei zeigten die reinen TEOS-Partikel einen Massenverlust von ca. 10%. Der



3-Aminopropyltriethoxysilan

3-(TrimethoxysilyI)propyl-2-bromo-2-methylpropionate

Abbildung 37: Eingesetzt Silane zur Oberflächenfunktionalität der TEOS-Partikel.



Abbildung 38: Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen reiner TEOS-Partikel (A-B) und PMMA modifizierten Partikel (C-D) an 100% ASI Funktionalität bei einer Vergrößerung von 25k (A,C) und 100k (B,D).

Anteil an Silan auf der Partikeloberfläche wurde exemplarisch für eine 100% APTES Funktionalisierung (TEOS - APTES / AIS 0%) angegeben und beträgt 4%. Mit zunehmender Menge an gebundenem AIS konnte ein Massenverlust von 15% bis hin zu 45%



Abbildung 39: Thermogravimetrische Analyse (linker Panel) und Messung der dynamische Lichtstreuung (rechter Panel) aller verschiedenen PMMA modifizierten TEOS-Partikel.

aufgezeichnet werden. In Korrelation zur ansteigenden Polymermasse konnten ebenfalls konstant ansteigende hydrodynamische Durchmesser der PMMA beschichteten Partikel mittels dynamischer Lichtstreuung beobachtet werden (s. Abbildung 39, rechter Panel). Dabei zeigte die reine Funktionalisierung mit APTES (TEOS - APTES / AIS 0%) keinerlei Unterschied im hydrodynamischen Durchmesser zu den reinen TEOS-Partikeln (170 nm). Partikel mit einer PMMA-Beschichtung auf 25% - 50% AIS Funktionalisierung weisten zu einander identische Werte auf (190 nm), die lediglich geringfügig höher lagen im Vergleich zu den unbeschichteten Partikeln. Eine Erhöhung des hydrodynamischen Durchmessers konnte erst ab 60% AIS Funktionalisierung (200 nm) beobachtet werden und mündet in einem Maximum um 90% ASI (260 nm). Das wiederum verdeutlicht, dass mit zunehmender Pfropfdichte die Polymerstruktur von möglichen Zwischenzuständen aus »pancake-« und »mushroom-state« zu aufrecht stehenden Polymerbürsten übergeht. Deutlich wird an dieser Stelle die Wirksamkeit des APTES als Platzhalter zur Regulierung der Pfropfdichte auf der Partikeloberfläche. Die Molmasse der Polymerbürsten wurde parallel zur Polymerisation ermittelt, indem etwas freier Initiator zur Polymerisation zugeführt wurde. Die in Lösung synthetisierten Polymere aus der Reaktionslösung wurden in Methanol gefällt und anschließend durch Lösen in Chloroform und Ausfällen in Methanol zwei Mal umkristallisiert. Anschließend wurde das gereinigte PMMA mittels Gelpermeationschromatographie analysiert. Dabei wurden Molmassen von $31.000,00 \pm 600 \text{ g}^*\text{mol}^{-1}$ nach einer konstanten Polymerisationszeit von einer Stunde ermittelt.

5.3.2 Charakterisierung der Partikel fixierten Lipase mit Bezug auf unterschiedlichen PMMA-Beschichtungen

Enzymbelegung der PMMA modifizierten Partikel

Die Enzymbelegung an PMMA modifizierten Partikeln wurde exemplarisch an Partikeln mit 50% ASI Funktionalität ausgeführt. Hierfür wurde die Lipaseaktivität der Im-

Enzymlösung	Aktivität	relative Aktivität	Enzymemenge
	$[(nmol^*l^{-1})^*s^{-1}]$	[%]	[mg]
Vor der Immobilisation	$15,5 \pm 0,6$	$100 \pm 4,3$	6,25
Nach der Immobilisation	$13,3 \pm 0,1$	$86,1 \pm 4,7$	$5,\!38 \pm 0,\!25$

Tabelle 13: Ermittelte Lipaseaktivität aus der Immobilizationslösung vor und nach der Immobilization (24 h).

mobilizationslösung mittels des vorgestellten Aktivitäts-Assay jeweils vor und nach dem Immobilisationsprozesses untersucht (s. Abbildung 19). Tabelle 13 zeigt die Aktivität der nativen CalB (15,5 ± 0,6 nmol*l^{-1*}s ⁻¹), welche für die Bestimmung der Belegung auf eine relative Aktivität von 100% gesetzt wurde. Nach dem Immobilisierungsprozess (24 h) sinkt die Lipaseaktivität (13,3 ± 0,1 nmol*l^{-1*}s ⁻¹) aus der Enzymlösung und eine verbliebene relative Aktivität von 86,1 ± 4,7 % konnte ermittelt werden. Diese Abnahme kann mit der Adsorption der CalB an die vorliegenden Partikel erklärt werden. Die Konzentration der Ausgangslösung der verwendeten CalB betrug 10 g*l⁻¹, aus der folglich die Menge an eingesetzter CalB (6.25 mg) berechnet werden konnte. Im Weiteren konnte die adsorbierte Proteinmenge (0,87 ± 0,25 mg) an 40 mg eingesetzten PMMA modifizierten Partikel bestimmt werden. Anhand der vorgestellten Immobilisierungsmethode können somit 21,68 ± 6,37 mg Enzym pro Gramm Partikel gebunden werden.

Aktivität- und Stabilitätsanalyse der Lipase Immobilisate

Der Einfluss der Polymerdichte auf die Aktivität und Stabilität der adsorptiv gebundenen CalB wurde mittels des vorgestellten Fluoreszenz-Assays analysiert (s. Abbildung 19). Die hydrolytische Aktivität der Partikelproben wurde nacheinander für mehrere Zyklen gemessen, um nicht nur die anfängliche Aktivität der Partikel, sondern auch die Stabilität in Bezug auf das Austragen (Leaching) der CalB zu bestimmen. Unspezifisch adsorbierte Proteine sind typischerweise anfällig für Desorption von Oberflächen bei bio-



Abbildung 40: Linker Panel gibt die Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Lipaseaktivität auf den verschiedenen PMMA modifizierten Partikel des ersten Zyklus wieder. Rechter Panel beschreibt die relative Aktivität aller Immobilisate über den ersten bis sechsten Zyklus. Dabei sind alle Aktivitäten bezogen auf die Aktivität des jeweils ersten Zyklus der unterschiedlichen Biokatalysatoren.

katalytischer Verwendung. Ein wesentlicher Vorteil der immobilisierten Enzyme ist jedoch die Wiederverwendbarkeit des teuren Biokatalysators, weswegen Desorptionseffekte durch geschickte Immobilisationsprozesse minimiert bzw. unterbunden werden sollten. Die Aktivitätsdaten für den ersten Zyklus zeigten für alle Trägervarianten, auf Grund von Befeuchtungseffekten der stark hydrophoben Partikel in einem wässrigen System, schwankende Werte um ein konstantes Niveau von ca 17 nmol*l⁻¹*s⁻¹. In Abbildung 40 (links) sind die Aktivitäten der unterschiedlichen PMMA beschichteten Biokatalysatoren gegen die AIS-Funktionalität dargestellt, die günstige Polymerdichten im Bereich von 40% - 60% AIS Funktionalität aufweisen. Im Vergleich zu Partikeln mit einer reinen APTES (AIS 0%) Funktionalität wird der Nutzen der PMMA Beschichtung deutlich. Nach der Waschprozedur zeigte diese Immobilisationsvariante lediglich sehr niedrige Hydrolyseaktivitäten, was darauf zurückzuführen ist, dass nur geringe Mengen CalB auf dem Träger verblieben sind. Bereits die niedrigste PMMA- Auflage führte zu einer deutlichen Verbesserung der Aktivität bzw. Stabilität gegenüber der Desorption im Waschvorgang. Im Allgemeinen nahm die Aktivität mit zunehmenden Zyklen ab. Abbildung 40, rechter Panel, zeigt die Stabilität gegenüber des Leachings. Interessanterweise zeigte die CalB an PMMA modifizierten Partikel mit einer 50% AIS Funktionalität höchste Stabilität und Aktivität über sechs Hydrolysezyklen, gefolgt von 40%- und 60% AIS funktionalisierten Partikeln. Dies deutet darauf hin, dass hohe Polymerdichten für eine stabile Enzymimmobilisierung nicht günstig sind. Partikel mit hohen Bürstendichten begünstigen die Adsorption auf der Oberflächen der PMMA Beschichtung, was jedoch nur einen minimalen Schutz gegenüber der Desorption bietet. Niedrige Bürstendichten führen zu unterschiedlichen Polymerstrukturen, wie »pancake-« oder »mushroom-Strukturen« [188], die analog zu den hohen Dichten nur wenig Schutz vor Desorptionsprozessen bieten. PMMA modifizierte Partikel im Bereich von 50% AIS Funktionalität begünstigen vermutlich das Eindringen der Enzyme in die Polymerbürsten und inhibieren somit Desorptionsprozesse unter Beibehaltung ihrer Aktivität. Diese Ergebnisse stimmen mit der Arbeit von Marschelke *et al.* überein, in der eine höhere immobilisierte Laccaseaktivität bei mittleren Polymerdichten von 2-(Dimethylamino)ethylmethacrylat beobachtet wurde [189].

Um die Stabilität des Biokatalysators zu verbessern, wurde der Einfluss der kovalenten Vernetzung des adsorbierten Enzyms analysiert. Glutardialdehyd wurde während des Immobilisationsprozesses als Vernetzer zugeführt. Die Stabilität und Aktivität wurde ebenfalls anhand des Fluoreszenz-Assays analysiert. Wie zuvor wurden ebenfalls sechs Hydrolysezyklen mit den selben Partikeln durchgeführt und in Abbildung 41 dargestellt. Während eine geringere Aktivität nach der Vernetzung für den ersten Zyklus beobachtet werden konnte, nahm die Aktivität lediglich zum zweiten Zyklus geringfügig ab und zeigte über die restlichen fünf Zyklen ein konstantes Aktivitätsniveau. Demgegenüber wies die adsorptiv gebundene CalB eine stete Abnahme der Aktivität mit zunehmender Nutzung auf, so dass die Vernetzung in diesem System nach drei Zyklen höhere Aktivitäten zeigte. Diese Ergebnisse deuten auf das Potenzial hin, die adsorptive Bindung von CalB an PMMA-Bürsten hinsichtlich Aktivität und Stabilität zu unterstützen, indem die Vernetzung zwischen adsorbierten Enzymen integriert wird.



Abbildung 41: Einfluss von Glutardialdeyh (GDA) auf die Aktivität und Stabilität der immobilisierten CalB auf PMMA modifizierten Partikel mit 90% ASI Funktionalität. Aufgetragen sind die Anfangsgeschwindigkeiten (v₀) von Zyklus 1 - 6 vernetzter und unvernetzter Immobilisate.

Der Einsatz von Biokatalysatoren in nicht nativen Medien ist für die chemische Industrie auf Grund zahlreicher Vorteile von großer Bedeutung. Daher müssen die Biokatalysatoren für den Einsatz unter rauen Bedingungen geeignet sein, einschließlich das Trägersystem. Daher wurde immobilisierte CalB auf PMMA beschichteten Partikeln mit 80% ASI Funktionalität verwendet, um die Umesterung von 4-MU-Butyrat mit Isopropanol durchzuführen (s. Abbildung 42 und Tabelle 14). Grundsätzlich konnte eine erfolgreiche Umesterung des 4-MU-Butyrats mit Isopropanol realisiert werden, wobei das Isopropanol zum einen als Substrat und zum anderen als Lösemittel für die Reaktion diente. Auf Grund der Abwesenheit von Wasser ist eine Umesterung möglich, da die bevorzug-



Abbildung 42: Reaktionsschema der Umesterung von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat mit Isopropanol.

Tabelle 14: Aktivitate pro $g_{(Trägermaterial)}$ sowie pro $g_{(gebundenes Enzym)}$ der Umesteru	ing von
4-MU-Butyrat mittels immobilisierter CalB an PMMA modifizierten H	Partikel
mit 80% ASI Funktionalität versus zwei kommerziell erhältlicher im	mobili-
sierter CalB Produkte.	

Immobilisat	Aktivität	Aktivität		
	$[(a.u.*s^{-1})*g^{-1}_{(\mathrm{Trägermaterial})}]$	$[(a.u.*s^{-1})*g^{-1}_{(gebundenes Enzym)}]$		
PMMA Partikel	$17,6 \pm 2,7$	$813,7 \pm 125,8$		
CalB immo Plus	$65{,}3\pm5{,}0$	$653,6 \pm 50,0$		
Novozym 435	$60,3 \pm 4,8$	$603,4 \pm 48,3$		

te Hydrolysereaktion unterbunden wurde. Im Vergleich zu den kommerziell erhältlichen CalB Präparaten, CalB immo Plus und Novozym 435, konnte für die PMMA beschichteten Partikel eine 3,5-fach langsamere Aktivität beobachtet werden unter Verwendung der gleichen Menge an Immobilisat (10 mg). Die Aktivität pro $g_{(gebundenes Enzym)}$ deutet jedoch auf vergleichbare Aktivitäten der getesteten CalB Präparate hin.

Zusätzlich wurde die Veresterung von Ölsäure mit Ethanol in n-Heptan durchgeführt mittels 10 mg immobilisierter CalB an PMMA modifizierten Partikel mit 80% ASI Funktionalität. Dabei stellt n-Heptan ein unpolares Lösemittel dar, welches die Nutzung von Lipasen, im Vergleich zu anderen organischen Lösemitteln, begünstigt [190, 191] und zu





einer erfolgreichen Veresterung zu Olsäureethylester führt (s. Abbildung 43). Nach 24 h kann eine nahezu vollständige Umwandlung von Ölsäure für die eingesetzte adsorbierte CalB an PMMA modifizierten Partikeln mit 80% ASI Funktionalität unabhängig von der Vernetzung mit 2% GDA berichtet werden. Gleiche Transformationen konnten für wiederholte Verwendungen der Biokatalysatoren über zwei Zyklen berichtet werden. Zusammengefasst konnte eine erfolgreiche Anwendung der adsorbierten CalB an PMMA beschichteten Partikeln in Isopropanol als auch n-Heptan realisiert werden, mit dem Potenzial den Biokatalysator erneut zu verwenden.

5.3.3 Abschließende Diskussion

Die synthetisierten PMMA-Bürsten bieten eine stark hydrophobe Oberfläche, die auf Grund der hydrophoben Proteinoberfläche für die adsorptive Anlagerung von Lipase vorteilhaft ist. Unter vielen verschiedenen Protokollen zur Immobilisierung von Lipasen ist die Verwendung von hydrophoben Trägern eine sehr effiziente Methode. Hierbei spielt die Grenzflächenaktivierung durch die hydrophoben Wechselwirkungen der Lipase mit der Oberfläche des Trägermaterial eine bedeutende Rolle. Nicht nur begünstigt die Immobilisation die Stabilität des Enzyms gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen, sondern bewirkt ebenfalls eine Aktivierung samt Stabilisierung dieses Zustandes, indem die hydrophobe Deckel-Domäne aufklappt [176]. Diese Domäne ist in wässriger Umgebung tendenziell oberhalb des aktiven Zentrums lokalisiert (geschlossene Konformation) und verhindert in diesem Zustand die Interaktion von Substrat und Enzym [192]. Zu diesem Zweck wurden bereits verschiedene hydrophobe Trägersysteme entwickelt und verwendet, wie Octyl-Agarose-Beads [193], Decaoctyl-Sepabeads [176], mit Acrylgruppen beschichtete Kieselsäuren, Polypropylen [194] oder Styrol / Styrol-Divinylbenzol-Beads [128]. Eine ordnungsgemäße Immobilisierung kann jedoch auch Eigenschaften wie Stabilität und Aktivität verbessern. Das konnte anhand der hier vorgestellten erfolgreichen Immobilisierung auf gepfropften PMMA-Bürsten, an einen Trägerkern aus TEOS, umgesetzt werden. Daher wurden unterschiedliche Mengen an ATRP-Initiator-Silan und APTES auf die Partikeloberfläche eingebracht, wodurch eine Regulierung der Polymerdichte möglich war. Alle getesteten Träger auf PMMA-Basis zeigten nach der Immobilisierung mit CalB über sechs Zyklen wiederholter Verwendung Hydrolyseaktivität. Dabei konnte die höchste Aktivität als auch Stabilität für Partikel mit einer 50% ASI Funktionalität beobachtet werden. Das zeigt, dass intermediäre Pfropfdichten den maximalen Dichten vorzuziehen sind, was auf eine optimale Immobilisierungsbedingung um etwa 50% ASI Funktionalität hindeutet. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten kann durch die Struktur der Polymerbürsten erklärt werden. Hierbei könnten intermediäre Pfropfdichten genügend Raum bieten, damit die CalB zusätzlich zwischen die Bürsten diffundieren kann, diese jedoch die Desorption inhibieren ohne die Diffusion des Substrates zu limitieren. Das Konzept der PMMA modifizierten Oberfläche ist hierbei auf Grund der stabilisierenden Eigenschaften essentiell für die Realisierung des Biokatalysators. Reine Silan beschichtete Partikel zeigten kaum Lipaseaktivität nach der Waschprozedur, wohingegen die niedrigste PMMA Auflage zu einer signifikanten Verbesserung der Stabilität und Aktivität führten. Die Modifikation der Oberfläche mit Polymerbürsten (auf Basis von Polystyrol-Glycidylmetharylat-Copolymeren, Poly(sulfobetainmethacrylat), Poly(ethylenglykol)methacrylat, sowie modifizierten Poly(glycidylmethacrylat)) und deren positiven Einfluss bezüglich Temperatur-, pH- und Lösemittelstabilität auf adsorptiv sowie kovalent gebundene Lipasen konnte in diversen Veröffentlichungen gezeigt werden [195, 196, 197]. Jedoch ist die Komposition aus CalB und einer adsorptiven Immobilisierung auf sowie zwischen PMMA-Polymerbürsten neuartig. Erstrebenswert an der vorgestellten Technik ist die Nutzung ökonomisch sinnvoller Ressourcen wie TEOS als auch PMMA zur Herstellung des Trägersystems im Vergleich zu den bisherigen publizierten Systemen.

In einem zweiten Schritt wurde die adsorptive Anbindung durch eine kovalente Vernetzung der Enzyme mittels GDA erweitert. Während GDA im Vergleich zu rein adsorptiven Immobilisierung eine geringere Aktivität zeigte, führte die GDA-Modifikation zu einer signifikanten Erhöhung der Stabilität, was zu einer konstanten Aktivität über mehrere wiederholte Anwendungen führte. Die Anwendung der entwickelten Immobilsierungsmethode konnte ebenfalls zur Synthese in nicht nativen Medien eingesetzt werden. Die Veresterung von Ölsäure zum Ethylester in n-Heptan als auch die Umesterung von 4-MU-Butyrat in Isopropanol konnten realisiert werden. Dabei konnten konstante Umsatzraten für die Transformation der Ölsäure nach 24 h bei wiederholter Nutzung des selben Biokatalysators gezeigt werden. Somit wurde eine Methodik zur Immobilisierung von Lipase B aus *Candida antarctica* entwickelt, die eine hohe Aktivität, Stabilität sowie Wiederverwendbarkeit in wässrigen Systemen und darüber hinaus auch in nicht nativen Medien aufweist.

5.4 Chemo-enzymatische Epoxidierung mittels immobilisierter DyP-Typ Peroxidase in einem Textilreaktor

Die industrielle Anwendung von Enzymen wird häufig durch zu hohe Kosten in der Enzymherstellung sowie geringe Raum-Zeit-Ausbeute limitiert. Immobilisationsprozesse sind eine Möglichkeit die Enzymkosten, auf Grund der Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators, zu reduzieren. Darüber hinaus erfordert zudem der Einsatz von Enzymen in organischen Medien oftmals eine Immobilisation, um die Enzymaktivität aufrecht zu erhalten und die Stabilität des Biokatalysators im Reaktionsmedium zu gewährleisten. Eine Reihe gängiger Immobilisierungstechniken wurde schon an Peroxidasen erprobt [198]. Peroxidasen fanden jedoch nur selten Anwendung in organischen Synthesen. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass verschiedene Textilien als Enzymträger dienen können. Die textilfixierten Peroxidasen und Katalsen zeigten einen weitgehenden Erhalt der Enzymaktivität, so dass sowohl die Stabilität als auch die Wiederverwertbarkeit ein zufriedenstellendes Maß erreichen [199, 136, 200]. Dabei stellen Textilien nicht nur eine preiswerte Alternative dar, sondern bieten auch eine spezifische Durchströmbarkeit, die für neue Reaktorkonzepte genutzt werden kann.

Der folgende Abschnitt beschreibt, dass eine herkömmliche und kommerzielle Peroxidase, MaxiBright[®], in einer organischen Synthese durch Immobilisierung auf Polyethylen-



Abbildung 44: Syntheseweg der Peroxidase katalysierten Epoxidierung von Cyclohexen.

terephthalat basiertem Textil eingesetzt werden kann. Das Potenzial des textilbasierten Biokatalysators wird anhand einer erfolgreichen Epoxidierung von Cyclohexen in organischen Medien deutlich (s. Abbildung 44). In Kombination der Immobiliserungstechnik mit einem Modellreaktor, in Anlehnung an einen Membranreaktor, ist die Realisierung eines neuen wirtschaftlichen chemo-enzymatischen Oxidationsweges möglich.

5.4.1 Charakterisierung der textil-fixierten Peroxidase

In vorhergehenden Arbeiten wurden verschiedene Verfahren zur kovalenten Immobilisierung auf verschiedenen Textilien mit diversen Oberflächenfunktionalitäten beschrieben [200]. Basierend auf der Methode zur Fixierung von Peroxidasen, die in wässrigen System Anwendung finden [136, 200], wurde das Verfahren für die Dye Decolorizing Peroxidase MaxiBright[®] mit Hinblick auf die Nutzung des Biokatalysators in organischen Medien ausgeweitet. Eine erfolgreiche Immobilisierung der Peroxidase auf einem Polyethylenterephthalat Gewebe wurde durch mikroskopische Bildgebung, Aktivitätsmessungen des textilen Biokatalysators und ICP-OES-Analysen gezeigt.

Enzymbelegung des PET-Gewebes

Die in Abbildung 45 dargestellten Bilder zeigen das vorbehandelte Textil mit PVAm Ausrüstung (s. Abbildung 45, links) und den mit GDA vernetzten Biokatalysator (s. Abbildung 45, rechts). Das Cross-Linking-Verfahren führte zu einer vollständigen Beschichtung der Fasern im Gewebe. Während das PVAm funktionalisierte Textil grau-gelbliche klar definierte und uniforme Fasern zeigte, war nach der Vernetzung eine gelbliche Auflage zu erkennen, die unterschiedliche Dicken und Verklumpungen aufweiste. Diese bestand aus der Vernetzung zwischen Glutardialdehyd und den Aminogruppen der CalB sowie der Polyvinylauflage. Abbildung 46 zeigt schematisch den Prozess der Vorfunktionalisierung des PET Gewebes mit PVAm und nachfolgend das Cross-Linking zwischen dem modifizierten Gewebe und der Lipase.

Die Quantifizierung der angebundenen Peroxidase nach dem vorgestellten Immobilisationsprozess wurde mittels ICP-OES bestimmt [136]. Die eingesetzte MaxiBright[®] besitzt Häm als prosthetische Gruppe, welche ein Eisenatom pro Monomer (68,3 kDa) beinhaltet [201]. So ergab die Menge an Eisen, welche über die ICP-OES Analyse quantifiziert wurde, auf einer definierten Menge Textil die exakte Enzymbelegung wieder. Dafür wurde die Konzentration des Eisens (c_{Fe}), welche aus der gelösten Probe (s. Abschnitt 4.6.2)



Abbildung 45: 3D mikroskopische Bilder (200 fache Vergrößerung)des Trägermaterials PET E20102 G/G nach der Funktionalisierung mit PVAm (links) und nach der Immobilisation von MaxiBright[®] (rechts).

Schritt 1: Vorfunktionalisierung mit PVAm



Abbildung 46: Schematische Darstellung der Vernetzungsreaktion des Polyethylenterephthalats mit Polyvinylamin.

bestimmt wurde, über die Masse (m_{Fe}) in die Stoffmenge (n_{Fe}) verrechnet. Diese wurde mittels einer Referenzmessung (PVAm Textil) korrigiert und ergab anschließend die Stoffmenge an immobilisierter MaxiBright[®] (n_{MB}) wieder. Daraus resultierte eine Enzymbele-

Tabelle 15:	Auswertung der ICP-OES Analyse. $MB = MaxiBright^{(R)}$; $c_{Fe} = Ermittelte$
	Eisenkonzentration der verwendeten Probe aus der ICP-OES Analyse; $m_{Fe} =$
	Umgerechnete Masse an Eisen; n_{Fe} = Stoffmenge an Eisen bezogen auf die
	errechnete Masse des Eisens; n_{MB} = Berechnete Stoffmenge an MB auf der
	verwendeten Probe; m_{MB} = Berechnete Masse an MB.

Probe	$\mathbf{c_{Fe}}$	$\mathbf{m_{Fe}}$	n_{Fe}	n_{MB}	$\mathbf{m}_{\mathbf{MB}}$	Belegung	
	$[mg^*l^{-1}]$	[mg]	[mol]	[mol]	[mg]	$[{ m g_{MB}}^* { m g_{Textil}}^{-1}]$	
Immobilisat	0,32	0,016	$2,92^*10^{-7}$	$2,56*10^{-7}$	0,017	0,087	
	±	±	±	±	\pm	±	
	0,04	0,002	$3,6^*10^{-8}$	$3,6^*10^{-8}$	0,002	0,012	
PET-PVAm	0,052	0,002	$3,386^*10^{-8}$				
	±	±	±				
	0,003	1^*10^{-4}	$2,91*10^{-9}$				

gung von $0.10 \pm 0.01 \text{ g}_{\text{Enzym}} \text{*g}_{\text{Textil}}^{-1}$ (s. Tabelle 15). Das entspricht einer Immobilisierung von ca. 50% der eingesetzten Peroxidase.

Aktivitäts- und Stabilitätsanalyse der Peroxidase Immobilisate

Mittels UV-VIS Spektroskopie wurde eine zeitabhängige Analyse der Aktivität der textilfixierten Peroxidase mittels 2,2'-Azino-di-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS) durchgeführt (s. Abbildung 48 und 49). Durch Variation der Konzentration des Vernetzers Glutardialdehyd (GDA) wurde die Grundaktivität und Langzeitstabilität optimiert. Anhand einer Verringerung der GDA Konzentration im Immobilisationsprozess bei zeitgleicher Adsorption sowie Cross-Linking konnte eine irreversible Anbindung des Enzyms in aktiver Form erreicht werden.

Die Langzeitstabilität konnte durch mehrfache Aktivitätsmessung an demselben Biokatalysator bei gleichbleibender Aktivität bestätigt werden. Trotz eines gründlichen Waschprozesses nach der Immobilisation konnte eine Aktivitätsreduzierung nach dem ersten Zyklus in einigen Fällen beobachtet werden. Dies kann auf die harschen Testbedingungen zurückgeführt werden, die eine Ablösung von schwach gebundenen Enzymen vom Trägermaterial begünstigten. Die Langzeitaktivität des Biokatalysators sowie die Lösemittelresistenz wurde mittels Aktivitätsanalyse über die Oxidation von ABTS bestimmt. ABTS wird in Anwesenheit von H₂O₂ und der hier verwendeten Peroxidase zu einem einfach positiv geladenen Radikal und Wasser katalysiert (s. Abbildung 47, Schritt 1), welches ein Absorptionsmaximum bei 420 nm aufweist. Liegt ein Überschuss an H_2O_2 vor, ist eine Katalyse zum zweifach geladenen Kation mittels der verwendeten Peroxidase ebenfalls möglich (s. Abbildung 47, Schritt 2). Um die Katalyse zum zweifach geladenen Kation zu vermeiden, wird zur Aktivitätsbestimmung ein Überschuss an ABTS eingestellt, so dass lediglich das Radikal gebildet wird. Abbildung 48 zeigt die Aktivität der ABTS Oxidation im Phospaht-Citrat Puffer pH 5,0 nach 2, 4, 6, 10 und 18 Wochen Lagerung bei 4 °C, RT und 30 °C. Die Lagerungstemperatur von 30 °C wurde gewählt, um eine Abschätzung für



Abbildung 47: Peroxidase abhängige Katalyse des 2,2'-Azino-di-3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure (ABTS) Diammoniumsalzes zum entsprechendem Radikal bzw. Kation.

noch längere Lagerungszeiten vornehmen zu können. Gelagert wurden die Immobilisate in Puffer, trocken, in 100% Isopropanol und in einem Gemisch von 20% Isopropanol und 80% Wasser. Die Lagerung in Alkohol wurde mit Hinblick auf einen möglichen Einsatz des Biokatalysators in Chromatographiesäulen durchgeführt, welche oftmals in der Ruhephase auf einem Alkohol / Wasser-Gemisch stehen, zwecks Unterbindung von mikrobiologischem Wachstum. Unter milden Lagerungsbedingungen, im Puffer und trocken, zeigte der Biokatalysator nach sechs respektive 18 Wochen bei jeder gewählten Temperatur Peroxidase-Aktivität. Die trockene Lagerung stellte hier die beste Variante dar, wobei über 18 Wochen ein konstantes Niveau bei den jeweiligen Temperaturen zu beobachten



Abbildung 48: Langzeitstabilität des Biokatalysators unter verschiedenen Lagerbedingungen. Panel A = Lagerung im trockenem, Panel B = Lagerung im Puffer, Panel C = Lagerung in Isopropanol / Wasser (20/80), Panel D = Lagerung in Isopropanol. Dunkelgrau = 4 °C, hellgrau = RT, weiß = 30 °C und schwarz gepunktet = Startwert.

ist. Lediglich bei 30 °C ist nach 18 Wochen eine Abnahme deutlich zu sehen. Ahnliches Verhalten konnte für die Lagerung in Puffer über 6 Wochen aufgezeichnet werden. Hier konnten leicht höhere Werte der Aktivität, im Vergleich zur trockenen Lagerung, festgehalten werden. Jedoch war auch eine stärkere abnehmende Tendenz nach vier Wochen Lagerung zu erkennen. Die Lagerung im Alkohol / Wasser-Gemisch sowie in reinem Alkohol ist nicht ratsam. Die detektierten Aktivitäten im Alkohol / Wasser-Gemisch waren deutlich geringer im Vergleich zu den Werten für die Lagerung in Puffer und im Trockenen. Des Weiteren konnte eine deutliche Abnahme an Aktivität über die Wochen beobachtet werden. Im Gemisch als auch im reinen Alkohol konnte Aktivität nur nach zwei Wochen festgestellt werden. Über diesen Zeitraum hinaus konnte keinerlei Umsatz an ABTS im Assay detektiert werden. Durch die Lagerung in reinem Alkohol weiste der Biokatalysator die geringsten Aktivitätswerte auf, wobei hier nur die Lagerung bei 4 °C zu konstanten Werten führte. Bei Erhöhung der Temperatur sank die Aktivität auf ein Mindestmaß und ist nach zwei Wochen kaum noch zu messen. Somit scheint die trockene Lagerung für das textilgebundene Enzym im Hinblick auf Aktivität, Stabilität und Praktikabilität optimal. Sobald der Biokatalysator einer Lösung (Puffer, Alkohol/Wasser-Gemisch oder reinem Alkohol) ausgesetzt war, konnte über die fortlaufenden Wochen eine Minderung an Aktivität beobachtet werden, welche durch das Ablösen von schwach gebundenen Enzymen resultierte. Hierbei schien Alkohol ein deutlich stärkeren Einfluss auszuüben. Zudem wirkte der Alkohol inhibierend bzw. denaturierend auf die Peroxidase. Schmidt postulierte bereits einen inhibierenden Einfluss von Ethanol auf die Oxidation von ABTS durch die MsP1 [202].

Die Lösemittelresistenz wurde ebenfalls mittels des beschriebenen ABTS-Assays untersucht, indem die Immobilisate in verschiedenen Lösemittel für 1 h inkubierten, anschließend mit Phosphat-Citrat Puffer pH 5,0 gewaschen und dann in den Aktivitäts-Assay eingesetzt wurden. Grund für die Betrachtung der verschiedenen Lösemittel ist das Ziel mit dem textilen Biokatalysator in der Folge eine chemo-enzymatische Epoxidierung in organischen Medien durchzuführen. Die Aktivität nach der Inkubation des Biokatalysators in den jeweiligen Lösemittel ist in Abbildung 49 wiedergegeben. Ein hohes Akti-



Abbildung 49: Aktivitätsanalyse der Peroxidase Immobilisate nach Inkubation in den angegebenen Lösemitteln und anschießender Oxidation im Puffersystem.

vitätsniveau wurde nach Inkubation in Toluol erhalten. Allerdings konnte in allen eingesetzten Lösemitteln Enzymaktivität beobachtet werden. Für eine Aussage über die Stabilität wurde der verwendete Biokatalysator wiederholt (bis zu drei Zyklen) in dem beschriebenen Aktivitäts-Assay eingesetzt. Dabei war die Stabilität nach Inkubation in Cyclohexen vergleichbar mit der Stabilität nach Inkubation im Puffer, in welchem die höchste als auch stabilste Aktivität beobachtet werden konnte. Diese Analyse zeigte die Anwendbarkeit der textilgebundenen Peroxidase in den getesteten organischen Lösemitteln. Dennoch konnte beobachtet werden, dass das entstehende Epoxid, 1,2-Epoxycycylohexan, einen starken Einfluss auf die Aktivität der immobilisierten Peroxidase ausübt. Abbildung 49 zeigt, dass die geringsten Werte für die Aktivität in Anwesenheit von 1% des Epoxids aufgezeichnet wurden. Grund für die inhibierende Wirkung des Epoxids ist die elektrophile Natur des Moleküls. Dadurch neigen Epoxide mit primären Aminen, in diesem Fall die primären Amin-Gruppen von Lösemittel exponierten Aminosäureseitenketten, zu reagieren. Daraus resultieren mögliche Konformationsänderungen und damit einhergehend die Inhibierung des Enzyms [203].

5.4.2 Biokatalytische Epoxidierung von Cyclohexen mittels textilfixierter Peroxidase

Die Epoxidierung von Cyclohexen wurde als Modellreaktion für die nicht asymmetrische Epoxidierung von kleinen organischen Molekülen verwendet. Im Gegensatz zur Epoxidierung von größeren Molekülen, solche wie Fettsäuren, die in der biokatalytischen Fachliteratur ausführlich beschrieben sind [36, 204], wird auf die enzymatische Epoxidierung von zyklischen Alkenen weniger häufig verwiesen [205]. Die DyP-Typ Peroxidasen MaxiBright[®] bietet die Möglichkeit Cyclohexen zum entsprechenden Epoxid zu oxidieren. Im Folgenden wurde in diversen Lösemitteln erfolgreiche Epoxidierungen von Cyclohexen gezeigt mit deutlich unterschiedlichen Ausbeuten. Hierfür wurden die Synthesen in Kolben für 24 h durchgeführt (Methode A). Die Produktbildung wurde anschließend mittels GC/MS Analyse der organischen Phase des Reaktionsgemisches bestimmt.

Identifikation des 1,2-Epoxycyclohexans

Qualitativ wurde das gebildete 1,2-Epoxycyclohexan mittels Kopplung von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie nachgewiesen. Somit konnte die Retentionszeit des Epoxids aus dem Reaktionsansatz vermessen und intern gespikt werden. Dafür wurde die selbe Probe mit Cyclohexenoxid (98+% Alfa Aesar) gespikt und erneut vermessen. Abbildung 50 zeigt ein gefiltertes, nach der Masse des Epoxids (m/z = 81), GC-Chromatogramm beider Messungen. Hier wurde deutlich, dass die Peroxidase das 1,2-Epoxycyclohexan aus Cyclohexen katalysierte. Dabei wurde eine Retentionszeit von 3,9 min für das Epoxid detektiert. Die Quantifizierung des Epoxids erfolgte durch eine Kalibrierung mit dem erworbenem Cyclohexenoxid (98+% Alfa Aesar) im Konzentrationsbereich von 30 mg*ml⁻¹ - 0,05 mg *ml⁻¹. Der Peak um 4,4 min zeigte dagegen eine Verunreinigung mit ähnlicher Masse wie das Produkt und wird im Folgenden näher beschrieben.



Abbildung 50: Gefiltertes (m/z = 81) GC-Chromatogramm der Probe vor und nach internem Spiking mit Cyclohexenoxid (98+%). Die schwarze Linie zeigt das Chromatogramm der Probe und die rote Linie das Chromatogramm der gespikten Probe.

Lösemittelabhängige biokatalytische Epoxidierung

Zur Optimierung wurde der Einfluss von neun unterschiedlichen Lösemitteln auf die Ausbeute der Epoxidierungsreaktion betrachtet, unter Verwendung von Methode A (s. 3.7.1). Abbildung 51 zeigt die höchsten Peakflächen für die Synthese in Acetonitril, CPME und Cyclohexen. Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass die absoluten Ausbeuten lediglich um 1% lagen, wodurch eine gründliche Quantifizierung nicht gerechtfertigt werden kann. Jedoch konnte die Annahme getroffen werden, dass in allen Lösemitteln, ausgenommen in Wasser, die Epoxidierung von Cyclohexen stattfand und in Spuren nachgewiesen werden konnte. Die umweltfreundlichste Variante und im Hinblick darauf überflüssige Lösemittel vermeiden zu können, wurden die folgenden Reaktionsoptimierungen in reinem Cyclohexen durchgeführt. Ausschlaggebend war die zufriedenstellende relative Ausbeute in Cyclohexen im Vergleich zu den anderen Lösemitteln sowie das Konzept der grünen Chemie. Darüber hinaus deuteten die Daten auf eine gute Löslichkeit



Abbildung 51: Screening der Lösemittelabhängigkeit der Epoxidierungsreaktion. Angegeben sind relative GC Peakflächen zu einer Einzelbestimmung der jeweiligen Reaktion nach 24 h.

des Cyclohexens sowie des Epoxids in Acetonitril. Diese Eigenschaft fand in späteren Versuche Anwendung.

Einfluss der Immobilisation auf die Epoxid-Synthese

Die spezifische Aktivität bezüglich der Epoxidierungsreaktion des textilgebundenen Enzyms im Vergleich zum freien, nativem Enzym wurde analysiert. Hierfür wurde die Menge an flüssiger MaxiBright[®], die erforderlich ist, um eine gleiche Menge an Cyclohexenoxid wie 0,2 g Textil (0,02 g immobilisiertes Enzym) herzustellen, bestimmt. Erforderlich dafür war 1 g flüssige MaxiBright[®]-Formulierung (0,1 g MaxiBright[®] in Lösung). Der textile Biokatalysator hatte somit eine ca. zehnfach höhere Aktivität als die flüssige Formulierung bzw. die spezifische Aktivität pro Enzym ist um das Fünffache erhöht. Das zeigte, dass die Immobilisierung die Enzymstabilität und -aktivität signifikant für die Oxidationsreaktion in organischen Lösemitteln erhöhte. Des Weiteren bietet das Textil neue Möglichkeiten der Reaktionsführung, die im Folgenden analyisiert werden.

5.4.3 Optimierung der Peroxidase katalysierten Epoxidierung im Modellreaktor

Auf Grund der Enzyminhibition des Exposids wurde die Extraktion von 1,2-Epoxycyclohexan mittels Acetonitril untersucht, um das gebildete Produkt kontinuierlich aus dem Reaktionsgemisch bzw. vom Biokatalysator zu isolieren. Generell ist Acetonitril ein gutes Lösemittel für Epoxide [206]. Extraktionsversuche untermauerten die Löslichkeit des Epoxids in Acetonitril und zeigten eine effiziente Extraktion von ca. 80%. Um eine kontinuierliche Produktextraktion bei maximaler Katalysatoraktivität zu ermöglichen, wurde ein Modellreaktor für den Oxidationsprozess entwickelt (Methode B).

Dieser wurde durch den 3D-Druck mit einem Ultimaker s5, unter Verwendung eines Co-Polyesters CPE, realisiert. Wie in Abbildung 52 dargestellt, bestand der Reaktor aus zwei Kammern. Die obere Kammer beinhaltete Cyclohexen, wobei die untere Kammer mit Acetonitril ausgerüstet wurde. Der Biokatalysator befand sich an der Phasengrenze. Auf diese Weise wurde ein Membranreaktor aufgebaut, der die Dichteunterschiede der



Abbildung 52: Schema des gedruckten Modellreaktors (A) und der Prozessablaufplan zur Rückgewinnung bzw. Rückführung des Cyclohexens sowie zur Analyse der Wiederverwertbarkeit des Biokatalysators (B). 1) Unterer Reaktorbehälter, 2) oberer Reaktorbehälter, 3) textilgebundene MaxiBright[®] an PVAm funktionalisiertem PET, 4) Acetonitril, 5) Cyclohexen und Wasserstoffperoxid.

119

Lösungsmittel für eine optimale Platzierung des biokatalytischen Textils an der Grenzfläche zwischen Extraktions- und Reaktionsmedium nutzte. Des Weiteren konnte durch kontinuierliches Zutropfen von Wasserstoffperoxid auf die Cyclohexenphase, welches ab einer bestimmten Konzentration inhibierend wirkt, die Konzentration des Co-Substrats reguliert werden. Hierbei tauschten sich das Cyclohexen und die wässrige Phase langsam mit der Zeit aus. Die Epoxidierung fand dabei beim Einströmen von Wasserstoffperoxid in das Textil statt, wobei das Acetonitril das gebildete Epoxid löste und somit den Biokatalysator vor eine längere Exposition mit dem 1,2-Cyclohexan bewahrte (Methode B). Die im Modellreaktor erzielten Ausbeuten (Methode B) waren im Vergleich zu den in Kolben durchgeführten Reaktionen (Methode A) deutlich erhöht. Es wurde eine Steigerung um den Faktor von ca. 30 beobachtet. Während nach Methode A einen Umsatz von ca. 0.16% erreicht wurde, erfolgte nach Methode B eine Umsetzung von ca. 4.4% (s. Abbildung 53) nach jeweils 60 min Reaktionszeit. Die deutliche Erhöhung der Ausbeute liegt darin begründet, dass das textilgebundene Enzym einer verringerten Exposition gegenüber des Wasserstoffperoxids und des gebildeten Epoxids ausgesetzt war. Hierbei fungierte Wasserstoffperoxid nicht nur als Co-Substrat, sondern zeigte auch generell eine deutliche denaturierende Wirkung gegenüber Peroxidasen, sowie im besonderem MsP1 gegenüber [207]. Darüber hinaus führte die Produktentfernung aus dem Reaktionsgleichgewicht zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Produktbildung.

Einfluss der Reaktionszeit auf die Epoxidierung

Um die optimale Reaktionszeit zu bestimmen, wurden zeitabhängige Ausbeuten bestimmt. Ein Optimum konnte bei einer Reaktionszeit von einer Stunde beobachtet werden, wie in Abbildung 53 zu sehen ist. Eine Abnahme der Produktbildung war nach 60 min zu erkennen und kann durch die hohe Affinität von Epoxiden weiter zu reagieren sowie der DyP-Typ-Peroxidase für Nebenreaktionen begründet werden. Abbildung 54 stellt die gefundenen Nebenprodukte im Verhältnis zum 1,2-Epoxycyclohexan über die Reaktionszeit dar und zeigte einen Anstieg der Nebenprodukte im Verhältnis zum Epoxid



Abbildung 53: Zeitabhängige Ausbeute des 1,2-Epoxycyclohexans.

nach 60 min. Die GC/MS-Anaylsen zeigten das hydroxylierte Substrate (2-Cyclohexen-1ol) und das Keton (Cyclohex-2-en-1-on), die als prominenteste Nebenprodukte auftreten, gebildet wurden. Hydroxylierung als Nebenreaktion bei Epoxidierungsreaktionen wurde bereits für unspezifische Peroxygenasen beschrieben [208, 209]. Abbildung 55 zeigt



Abbildung 54: Relative Ausbeute der Nebenprodukte im Bezug auf 1,2-Epoxycyclohexan über 120 min. Schwarz = Menge an 1,2-Epoxycyclohexan bezogen auf 100%, grün = relative Menge an Peak 6,5, blau = relative Menge an Cyclohex-2-en-1-on, rot = relative Menge an 2-Cyclohexen-1-ol.

ein ungefiltertes GC-Chromatogramm in dem vier Nebenprodukte und das gewünschte Epoxid mittels Massenspektroskopie identifiziert werden konnten, welche mit einem Datenbankabgleich (NIST Massenspektren-Datenbank) gekoppelt wurde. Alle angegebenen Verbindungen wurden mit einer Übereinstimmung $\geq 95\%$ identifiziert. Die Retentionszeiten des Cyclohex-2-en-1-on, 2-Cyclohexen-1-ol und des 1,2-Cyclohexandiols lagen bei 4,4 min, 4,9 min und 11,7 min. Wohingegen der Peak bei 6,5 min einem benachbarten doppelt hydroxylierten Produkt zugeordnet werden konnte, welches stark fragmentierte.



Abbildung 55: GC Chromatogramm aus der Cyclohexen-Phase gekoppelt mit der Identifikation der gefundenen Signale mittel Massenspektrometrie und Datenbankabgleich.

Die relative Menge dieser Kontaminationen des Reaktionsgemisches in Bezug auf das Produkt nahm mit zunehmender Reaktionszeit zu. Daher wurden alle folgende Reaktionen auf eine Stunde ausgelegt.

Einfluss des pH-Wertes auf die Epoxidierung

Das pH-Optimum der MaxiBright[®] liegt zwischen pH 3-4. Eine Veränderung des pH-Wertes in Richtung sauren Milieus der wässrigen Phase verbessert die Ausbeuten der Epoxidierung jedoch nicht. Hierfür wurde die Synthese wie beschrieben im Reaktor durchgeführt und der wässrige Teil wurde auf die pH-Werte 7, 6 und 5 eingestellt, bevor dieser der Reaktion zugeführt wurde. Abbildung 56 zeigt, dass eine Verringerung des pH-Wertes zu einer Abnahme der Produktbildung führte. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten ist die Begünstigung von Nebenprodukten bzw. Nebenreaktionen des Epoxids bei niedrigen pH-Werten. Daher wurde im Folgenden sowie zu vor für alle Synthesen der pH-Wert der wässrigen Phase bei pH 7 belassen. Für eine Erhöhung der Ausbeute werden daher im nächsten Abschnitt die Erhöhung an Co-Substrat (Wasserstoffperoxid) und die Produktinhibierung betrachtet.



Abbildung 56: pH-Abhängigkeit der biokatalytischen Epoxidierung von Cyclohexen.

Einfluss der H_2O_2 Konzentration auf die Epoxidierung

Die Epoxidierung wurde im Reaktor unter Variation der Wasserstoffperoxid Konzentration durchgeführt. Abbildung 57 zeigt die Wasserstoffperoxid abhängige Produktbildung. Dort sind die relativen Ausbeuten der wiederholten Analysen der Konzentrationsvariation dargestellt. Die maximale Ausbeute jeder Versuchsreihe wurde auf 100% gesetzt. Deutlich wurde, dass ein Optimum bei 1,4 mol*l⁻¹ sichtbar ist, wobei eine Epoxidbildung nur in einem Konzentrationsbereich von 0,7 mol*l⁻¹ - 2,8 mol*l⁻¹ stattfand.

Im Folgenden wurde eine Wasserstoffperoxid-Konzentration von 1,4 mol*l⁻¹ für alle weiteren Synthesen eingesetzt. In der lösemittelfreien Synthese entsprach dies einem Molverhältnis von Cyclohexen : Wasserstoffperoxid 4 : 1, das eine substöchiometrische Zufuhr des Co-Substrats zur Reaktion bedeutete. Zu hohe Wasserstoffperoxid Konzentration führen im Allgemeinem zu einer Inhibierung bzw. Denaturierung des Enzyms [210]. Des Weiteren wurde untersucht, ob eine Oxidation unter Wasserstoffperoxid-Ausschluss und unter Anreicherung von Sauerstoff im Reaktionsmedium während der Synthese möglich



Abbildung 57: Einfluss von der Wasserstoffperoxid Konzentration auf die Ausbeute des 1,2-Epoxycyclohexans. Ausbeuten sind als relative Ausbeuten im Vergleich zur maximalen Ausbeute angegeben. Fehlerbalken geben den maximalen Fehler der relativen Ausbeuten an, die aus 3-fach Bestimmungen erhalten wurden.

wäre. Schreibner *et al.* und Zorn *et al.* konnten eine Wasserstoffperoxid unabhängige Oxidation für das Substrat β -Carotin beobachten. Jedoch zeigte das verwendete MaxiBright[®] Immobilisat keinerlei oxidierende Wirkung in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid [201][209]. Daher musste eine zufriedenstellende Transformation von Cyclohexen durch Recycling des Substrats (Cyclohexen) erreicht werden. Das Schema für die Rückgewinnung des Cyclohexens und erneute Einspeisung ins Reaktionssystem ist in Abbildung 52 dargestellt.

Einfluss der Reaktionsführung

Um die Reaktionsführung zu optimieren wurde schließlich der Einfluss der Durchmischung auf das Reaktionssystem betrachtet. Hierbei wurden entweder beide Kammern sowie jede Kammer jeweils einzeln mittels eines Magnetrührers durchmischt. Interessanterweise ist die Durchmischung der Reaktionskammer (obere Kammer) kontraproduktiv für die Epoxidbildung (s. Abbildung 58). Das Mischen der Cyclohexen / Wasserstoffperoxid-



Abbildung 58: Zeitabhängige Ausbeute des 1,2-Epoxycyclohexans.

Phase führte zu einer Emulsion des Gemisches. Daraus resultierten wiederum zwei mögliche unerwünschte Effekte. Zuerst sollte die Reaktion an der Interphase zwischen den Wassertropfen und dem Cyclohexen stattfinden. Der Kontakt bzw. die Zugänglichkeit dieser Interphase mit dem makroskopischen Textil ist bei einer dispersen Emulsion nicht gegeben. Folgend war das textilgebundene Enzym bei einer Durchmischung des Reaktionsgemisches kontinuierlich einer hohen Konzentration an Wasserstoffperoxid ausgesetzt, das wiederum zur Inaktivierung des Enzyms führte. Klassischerweise wurde dies durch tropfenweise Zugabe von Wasserstoffperoxid umgangen. Eine bessere Ausbeute wurde auf diesem Weg allerdings nicht erzielt. Daher kann die Annahme getroffen werden, dass durch die tropfenweise Zugabe nicht die optimale Wasserstoffperoxid-Konzentration eingestellt werden konnte, um eine maximale Ausbeute zu gewährleisten. Auf Grund des negativen Einflusses der Durchmischung des Reaktionsgemisches wurde diese Option nicht weiter verfolgt. Das Konzept von Modellreaktoren wurde schon in der Vergangenheit als ein nützliches Tool eingesetzt, um zum Beispiel die Hemmung von Lipasen durch Wasserstoffperoxid in einem komplementären Konzept anzugehen [211]. Das wesentliche Ziel war dabei, die Inaktivierung des Enzyms und die Reaktionsgeschwindigkeit, welche beide von der Wasserstoffperoxid-Konzentration dominiert werden, auszugleichen. Der Reaktionsweg in reinem Cyclohexen führte unweigerlich zu sehr hohen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen. In der vorgestellten Synthesemethode wurde Wasserstoffperoxid substöchiometrisch eingesetzt, wobei die Gesamtkonzentration deutlich über der inaktivierenden Konzentration von Wasserstoffperoxid im µM Bereich lag [207]. Mit dem Textilreaktor wurde dieser Kompromiss durch die Einführung eines Konzentrationsgradienten des inhibierenden Substrates in der Reaktionskammer und des Produkts innerhalb des textilen Biokatalysators ausgeglichen. Die Experimente zur Durchmischung zeigten, dass der kontinuierliche Fluss von Wasserstoffperoxid bedingt durch die Schwerkraft zu einer optimalen stationären Wasserstoffperoxid Zufuhr an der Textiloberfläche führte. Auf diese Weise wurde die lokale Konzentration von Wasserstoffperoxid am biokatalytisch aktiven Textil optimiert, während gleichzeitig eine große Menge Wasserstoff-
peroxid für akzeptable Ausbeuten eingebracht werden konnten.

Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators

Zuletzt wurde die Wiederverwendbarkeit der immobilisierten DyP-Typ-Peroxidase bezüglich der Epoxidierungsreaktion unter den optimierten Bedingungen im Modellreaktor betrachtet. Wie in Abbildung 59 wurden sechs Zyklen mit dem gleichen Biokatalysator erfolgreich durchgeführt. Darüber hinaus wurde ein intrinsisches Recycling des Cyclohexens etabliert (dargestellt in Abbildung 52,B). Das Cyclohexen wurde nach jedem Synthesezyklus recycelt und durch Phasentrennung aus der wässrigen Phase isoliert. Somit konnte nach jedem Zyklus das rückgewonnene Cyclohexen dem nächsten Reaktionszyklus zurückgeführt werden. Die Restaktivität der immobilisierten MaxiBright[®] blieb dabei über fünf Zyklen erhalten und nahm im sechsten Zyklus leicht ab. Die steigende Ausbeute in den ersten Zyklus wird auf Benetzungsphänomene zurückgeführt. Die Abnahme zum sechsten Zyklus kann auf eine Abnahme der Enzymaktivität hinweisen. Insgesamt konnte eine 15%ige akkumulierte Ausbeute nach sechs Reaktionszyklen ermittelt werden. Zwar ist die Ausbeute über die Peroxidase katalysierte Epoxidierung geringer als eine Lipase ka-



Abbildung 59: Wiederholter Einsatz des Biokatalysators im Modellreaktor zu Epoxidierung von Cyclohexen einschließlich Recycling des Substrates.

talysierte Epoxiderung, jedoch wird für die Lipase katalysierte Reaktion die Verwendung von gefährlichen sowie giftigen Peroxycarbonsäuren benötigt. Des Weiteren ist die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators stark limitiert [206], wenn keinerlei zusätzlicher Schutz des Enzyms angeboten wird [212].

DyP-Typ-Peroxidase Aktivität bezüglich der Epoxidierungsreaktion

Auf Grund der guten, hohen Verfügbarkeit des verwendeten Enzyms bietet die dargelegte Arbeit neue Möglichkeiten und öffnet neue Perspektiven für die Anwendung von Enzymen, im speziellem der Peroxidasen, im Feld der synthetischen Chemie. Lipasenkatalyse wird ubiquitär eingesetzt, da diese in flüssiger als auch immobilisierter Form kommerziell verfügbar sind, unter synthetischen Bedingungen stabil sind und ein breites Substratspektrum aufweisen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Peroxidasen ebenfalls promiskuitiv sein können und die Immobilisierung des Enzyms auf dem Textil für Enzymstabilität in organischem Lösungsmittel sorgt. Der zur Epoxidierung notwendige Mechanismus der DyP-Typ-Peroxidase ist bisher nicht abschließend geklärt und wird im Folgenden beleuchtet.

Die Epoxidierung von C-C Doppelbindungen wurde erstmalig durch Cytochrom P450 (CYP)-Monooxygenasen unter Verwendung einer großen Anzahl und Vielfalt exogener und endogener Substrate realisiert [213, 214, 215]. Monooxygenasen benötigen jedoch Co-Faktoren um katalytisch wirksam zu sein. Peroxygenasen katalysierte Epoxidierungen von C-C Doppelbindungen sind dagegen unabhängig von Co-Faktoren. Daher erlangen Peroxygenasen immer mehr an Bedeutung, dass in einem wachsenden Interesse an peroxygenasekatalytischen Prozessen in organischen Synthesen resultiert [216, 217]. Allerdings weisen Peroxygenasen einige Schwierigkeiten in ihrer Expression sowie Stabilität auf, was letztendlich in niedrigen Expressionsausbeuten sowie geringen Enzymstabilitäten mündet [218]. Nichtsdestotrotz berichtet Peter *et al.* über die Epoxidierung mehrerer ungesättigter Moleküle durch Peroxygenasen mit Ausbeuten von 1%, die von kleinen linearen Alkenen bis zu zyklischen verzweigten Molekülen reichen [217]. Aranda *et al.* zeigte die

Epoxidierung von Fettsäuren mittels diverser unspezifischer Peroxygenasen und deren optimale Wasserstoffperoxid-Konzentrationen für die jeweilige Reaktion. So wurden mit nicht kommerziellen Peroxygenasen Ausbeuten von nahezu 100% erzielt. Die optimalen Wasserstoffperoxid-Konzentrationen liegen dabei im mM Bereich, wohingegen die optimale Wasserstoffperoxid Konzentration im hier vorgestellten Modellreaktor im molaren Bereich angesiedelt ist.

Der postulierte Reaktionsmechanismus von Peroxygenasen kombiniert Aspekte von CYP-Monooxygenasen und Häm-Peroxidasen. Transiente kinetische Analysen haben die Bildung reaktiver Eisen-Oxo Spezies (Compound I und Compound II) aus Wassrstoffperoxid ohne den Einsatz von Co-Faktoren gezeigt, die letztlich essentiell für die Katalyse der CYP-Monooxygenasen sind. Die relevante Eisen-Oxo Spezies I werden sowohl im Peroxidase, als auch im Peroxygenase Reaktionsmechanismus gebildet. Die Differenzierung des Mechanismus erfolgt im nachfolgenden Schritt, indem Peroxygenasen die Möglichkeit bieten den Sauerstofftransfer durchzuführen, während Peroxidasen die H-Abstraktion bewirken. Der katalytische Mechanismus von pflanzlichen und tierischen Peroxidasen über die Bildung von Compound I sowie die Bildung eines Produkts, welches ein Sauerstoffradikal beinhaltet, ist ausführlich beschrieben [87]. Dem gegenüber ist der Mechanismus der DyP-Typ-Peroxidase teilweise unbekannt. Yoshida et al. publizierte die Annahme, dass die katalytisch aktive Seitenkette von DyP-Typ-Peroxidasen einen wesentlichen Unterschied zu den klassischen Häm Peroxidasen aufweist, indem Histidin durch Aspartat ersetzt wurde im Fall der MsP1 (s. Abbildung 7) [92]. Durch den Austausch der Aminosäure wird eine Änderung der Proteinflexibilität am aktivem Zentrum bewerkstelligt, das in einer Konformationsänderung des Aspartats mündet, induziert durch die Anwesenheit und Abwesenheit von H₂O₂ [90]. Darüber hinaus ändert dieser Schwingmechanismus vom Aspartat zusätzlich die Größe der Öffnung des Häm-Zugangkanals, so dass auch größere Moleküle als H₂O₂ (beispielsweise kleine organische Komponenten) passieren können. Somit würde das Aspartat als *qatekeeper* dienen, wodurch das Enzym in der Lage wäre, Substrate direkt in der Hämaktivität zu oxidieren [90]. Strittmatter et al. konnte in seinen Studien beweisen das DyP-Typ-Peroxidasen kleine organische Moleküle in der Häm-Tasche binden können. Diese Fähigkeit hängt direkt mit der Form des Häm-Kanals zusammen, welcher dem Häm-Kanal von Cytochrome P450 und unspezifischen Peroxygenasen (UPOs) ähnelt, die die direkte Oxidation von Substraten am Häm katalysieren [90, 91, 89]. Der detaillierte mikroskopische Mechanismus zur oxidativen Spaltung von Doppelbindungen, wie er von Zorn *et al.* beobachtet wurde, muss jedoch noch aufgeklärt werden [209].

In Bezug auf die vorangegangene Diskussion muss das Ergebnis der vorliegenden Studie neu formuliert werden, in dem behauptet wird, dass die MsP1-Peroxidase unter geeigneten Reaktionsbedingungen Peroxygenase-Aktivität zeigt. Die Analyse der geeigneten Reaktionsbedingungen deutet darauf hin, dass das Lösungsmittel einen starken Einfluss auf die Wahl des Reaktionsweges hat. Erstens wird in Wasser kein Epoxid gebildet. Dies steht im Einklang mit der vorgeschlagenen Beteiligung von Wasser bei der Protonenentnahme. Darüber hinaus hängt die Stabilität des angenommenen Alken-Eisen-Komplexes vom gewählten Lösungsmittel ab. Das Reaktionskonzept in reinem Cyclohexen sollte die Wahrscheinlichkeit der Bildung dieses Komplexes weiter erhöhen. Die gute Ausbeute sowohl in Acetonitril als auch im vorgestellten Modellreaktor deutet darauf hin, dass eine gute Epoxidlöslichkeit oder -entfernung die Epoxidierung erhöht. Schließlich begünstigen lange Reaktionszeiten die Hydroxylierung und Spaltung, so dass das Epoxid nur bei kürzeren Reaktionszeiten erhalten bleibt.

5.4.4 Abschließende Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte eine erfolgreiche Methode zur Immobilisierung der kommerziellen DyP-Typ-Peroxidase MaxiBright[®] auf einem herkömmlichen Polyestergewebe etabliert werden. Vorteile dieser Methode sind zum einen die hohe Enzymbelegung von ca. 50% der eingesetzten Enzymlösung und zum anderen die hohe Lösemittelstabilität der MaxiBright[®], wobei eine außergewöhnlich gute Aktivität nach Inkubation in Toluol und Cyclohexen beobachtet werden konnte. Im vorgestelltem Modellreaktor wurde die Anwendbarkeit des Biokatalysators für die chemo-enzymatische Synthese in organischen Medien nachgewiesen, indem erfolgreich Cyclohexen zum korrespondierendem Epoxid oxidiert werden konnte. Diese Technik erwies sich jedoch nicht als praktikabel für die Immobilisierung der Lipase B *Candida antarctica* und eine Adaption konnte nicht realisiert werden.

Die Immobilisierung der MaxiBright[®] ergab eine deutliche Erhöhung (Faktor = 30) der synthetischen Aktivität gegenüber der flüssigen Peroxidase. Die Entwicklung des Modellreaktors, welcher aus zwei Kammern bestand, die durch den textilen Biokatalysator separiert wurden, war der Schlüssel um die Ausbeuten signifikant zu erhöhen. Dabei konnte die Wiederverwendbarkeit des Immobilisats durch wiederholtes Einsätzen des Biokatalysators und durch Recycling des nicht umgesetzten Cyclohexens festgestellt werden. Das wiederum führte zu der Möglichkeit die Ausbeuten auf das gewünschte Niveaus anzuheben.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden vier biokatalytische Konzepte für die Nutzung von Biokatalysatoren entwickelt. Ziel war die Implementierung umweltfreundlicher sowie nachhaltiger Technologien in industriell bestehende Prozesse als auch neuartige Möglichkeiten aufzuzeigen. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Reduzierung von (an-)organischen Katalysatoren als auch organischen Lösemitteln ein. Dabei gliedert sich die vorliegende Arbeit in die Entwicklung und Anwendung neuer Synthesewege zur isocyanatfreien Polyuretanchemie auf Grund von lipasekatalysierter Reaktionsführungen sowie in die Entwicklung neuer Immobilisationsmethoden für Enzymkatalysen in organischen Medien.

Die biokatalytische Syntheseroute zum Sebacin Biscyclocarbonat (SB BisCC) bietet einen emissionsarmen und energieeffizienten Weg zur Funktionalisierung von Carbonsäuren mit zyklischem Glycerincarbonat. Ein Modellsystem basierend auf der lipasekatalysierten (CalB immo Plus) Synthese von SB BisCC aus Sebacinsäure und Glycerin-1,2-Carbonat wurde in einem lösungsmittelfreien Reaktionssystem untersucht. SB BisCC wurde erfolgreich in hoher Reinheit (> 95%) synthetisiert. Dabei bietet die Enzymkatalyse die Möglichkeit die Reaktion bei niedrigen Temperaturen durchzuführen, die gleichzeitig den größten Einfluss auf die Synthese hat. Im Gegensatz zum Aktivitätsoptimum der Lipase musste die Reaktion sogar bei Raumtemperatur durchgeführt werden, um die Integrität des Glycerincarbonatrings zu erhalten. Diese zyklischen Carbonate können anschließend als NIPU-Monomere dienen und durch die Carboxylgruppen das Feld der biobasierten Ausgangsmaterialien erweitern.

Die hier entwickelte Technologie wurde im Folgenden in der Lacktechnologie angewandt. Hierfür wurden Polyester enzymatisch mit zyklischem Carbonat funktionalisiert, um diese anschließend zur Bildung von Polyester-Netzwerken zu verwenden. Dabei zeigte die verwendete CalB immo Plus eine hohe Selektivität für die Veresterung der reaktiven Endgruppen. Anschließend konnte der modifizierte Polyester erfolgreich in Stahlbeschichtungen eingesetzt werden. Die Carbonat vernetzten Schichten wiesen ähnliche mechanische und physische Eigenschaften auf, wie eine Referenzbeschichtung basierend auf einer klassischen Melamin-Vernetzungsreaktion ausgehend vom unbehandeltem Polyester. Hervorzuheben ist die geringfügige Menge an notwendigem Aminkatalysator für die Netzwerkbildung, die in einem harten, glänzenden Film mit einer guten Haftung auf Stahl resultierten. Das wiederum belegt die erfolgreiche Implementierung einer nicht toxischen Beschichtung und stellt eine neue Option zur Herstellung von umweltschonenden Polymernetzwerken dar.

Auf Grund der limitierenden Anwendung der lipasehaltigen Biokatalysatoren in organischen Lösemitteln, wie die vorgestellte Desorption der CalB in Glycerin-1,2-Carbonat, wurden eigene Ansätze für alternative Immobilisationsmethoden entwickelt. Diese basieren auf PMMA beschichteten Kieselsäurepartikeln (TEOS) mit unterschiedlichen Polymerdichten bzw. Polymerstrukturen. Dafür wurden erfolgreich unterschiedliche Verhältnisse an APTES zum bromierten Initiator Silan (AIS) auf die Partikeloberfläche eingebracht, was zu steigenden Polymerauflagen und hydrodynamischen Partikeldurchmessern mit steigender AIS-Konzentration führte. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die adsorptiv gebundene CalB auf allen PMMA beschichteten Partikeln Hydrolyseaktivität zeigte, jedoch intermediäre Pfropfdichten den maximalen Dichten vorzuziehen sind. Dabei ist die PMMA-Modifizierung essentiell für den Erhalt der Aktivität sowie der Stabilität. Die Integration der Vernetzung adsorbierter CalB mittels GDA unterstützte die Stabilität des hergestellten Biokatalysators über mehrere Hydrolysezyklen des selben Biokatalysators, führte jedoch generell zu Einbußen der Aktivität im Vergleich zur reinen adsorptiven Immobilisation. Die Lösemittelbeständigkeit des Biokatalysators konnte anhand zweier Transformationsreaktionen (Umesterung von 4-MU-Butyrat, Veresterung von Ölsäure) in Isopropanol und n-Heptan erfolgreich realisiert werden, wobei auch hier eine Wiederverwertbarkeit des Biokatalysators beobachtet werden konnte.

Abschließend konnte eine erfolgreiche Immobilisierung einer kommerziellen Dye-Decolorizing Peroxidase (MaxiBright[®]) auf einem modifizierten Polyester-Textil realisiert werden mit einem Immobilisationsgrad von 50% bzw. einer Enzymbelegung von 10%, die zu einer ausgeprägten Aktivitätstabilität in organischen Medien führte. In einer Modellreaktion wurde die synthetische Fähigkeit des neuen Biokatalysators nachgewiesen. Hierfür wurde die Oxidation von Cyclohexen zum 1,2-Epoxycyclohexan in reinem Cyclohexen erstmalig für eine Dye-Decolorizing Peroxidase erfolgreiche realisiert sowie untersucht. Dabei konnte eine Steigerung der synthetischen Aktivität mittels Immobilisierung auf dem Textil erzielt werden. Eine signifikante Verbesserung der Ausbeute konnte durch die Entwicklung und Implementierung eines Modellreaktors erzielt werden. Darüber hinaus wurde die Wiederverwendbarkeit des Biokatalysators in wiederholten Reaktionen durch Recycling des nicht umgesetzten Cyclohexen nachgewiesen und ermöglichte die Ausbeute auf ein gewünschtes Niveau einzustellen.

Literaturverzeichnis

- Meyer, H.-P.; Eichhorn, E.; Hanlon, S.; Lütz, S.; Schürmann, M.; Wohlgemuth, R.; Coppolecchia, R.: The use of enzymes in organic synthesis and the life sciences: perspectives from the Swiss Industrial Biocatalysis Consortium (SIBC). In: *Catal. Sci. Technol.* 3 (2013), H. 1, S. 29–40.
- [2] Coelho, M. A.; Ribeiro, B. D., Hrsg.: White Biotechnology for Sustainable Chemistry. Green Chemistry Series. The Royal Society of Chemistry, 2016, P001–417.
- [3] Müller, A.; Hauer, B.; Rosche, B.: Asymmetric alkene reduction by yeast old yellow enzymes and by a novel Zymomonas mobilis reductase. In: *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007), H. 1, S. 22–29.
- [4] Hollmann, F.; Arends, I. W. C. E.; Holtmann, D.: Enzymatic reductions for the chemist. In: *Green Chem.* 13 (2011), H. 9, S. 2285–2314.
- [5] Sanderson, K.: Chemistry: It's not easy being green. In: Nature 469 (2011), S. 18–20.
- [6] Anastas, P. T.; Kirchhoff, M. M.: Origins, Current Status, and Future Challenges of Green Chemistry. In: Acc. Chem. Res. 35 (2002), H. 9, S. 686–694.
- Jegannathan, K. R.; Nielsen, P. H.: Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. In: *Journal of Cleaner Production* 42 (2013), S. 228–240.
- [8] Liese, A.; Seelbach, K.; Buchholz, A.; Haberland, J.: "Industrial Biotransformation". In: Wiley & Sons, 2006, S. 147–513.
- [9] Anastas, P.; Eghbali, N.: Green Chemistry: Principles and Practice. In: Chem. Soc. Rev. 39 (2010), H. 1, S. 301–312.
- [10] Wohlgemuth, R.: Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. In: Current Opinion in Biotechnology 21 (2010), H. 6, S. 713–724.
- [11] Gröger, H.: Catalytic Asymmetric Synthesis. Wiley & Sons, 2010, S. 269–341.

- Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Keßeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski,
 T.: Industrial Methods for the Production of Optically Active Intermediates. In:
 Angewandte Chemie International Edition 43 (2004), H. 7, S. 788–824.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.: Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (2001), S. 258–268.
- Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.: Hydrolases in organic synthesis: Regio- and stereoselective biotransformations. 2. Edition. Wiley, 2006.
- [15] Galanie, S.; Entwistle, D.; Lalonde, J.: Engineering biosynthetic enzymes for industrial natural product synthesis. In: *Nat. Prod. Rep.* 37 (2020), H. 8, S. 1122– 1143.
- [16] Jaeger, K.-E.; Eggert, T.: Lipases for biotechnology. In: Current Opinion in Biotechnology 13 (2002), H. 4, S. 390–397.
- [17] Gilbert, E.: Pseudomonas lipases: Biochemical properties and molecular cloning.
 In: Enzyme and Microbial Technology 15 (1993), H. 8, S. 634–645.
- [18] Jaeger, K.-E.; Ransac, S.; Dijkstra, B. W.; Colson, C.; Heuvel, M. van; Misset, O.:
 Bacterial lipases. In: *FEMS Microbiology Rev.* 15 (1994), H. 1, S. 29–63.
- [19] Chapus, C.; Semeriva, M.: Mechanism of pancreatic lipase action. 2. Catalytic properties of modified lipases. In: *Biochemistry* 15 (1976), H. 23, S. 4988–4991.
- Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; De Castro, E.; Langendijk-Genevaux,
 P. S.; Pagni, M.; Sigrist, C. J. A.: The PROSITE database. In: *Nucleic Acids Research* 34 (2006), S. 227–230.
- [21] Derewenda, U.; Brzozowski, A. M.; Lawson, D. M.; Derewenda, Z. S.: Catalysis at the interface: the anatomy of a conformational change in a triglyceride lipase. In: *Biohemistry* 31 (1992), H. 5, S. 1532–1541.
- [22] Ollis, D. L.; Carr, P. D.: α/β Hydrolase Fold: An Update. In: Protein & Peptide Letters 16 (2009), H. 10, S. 1137–1148.

- [23] Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J. L.; Verschueren, K. H.; Goldman, A.: The α/β hydrolase fold. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 5 (1992), H. 3, S. 197–211.
- [24] Ahmad, S.; Kamal, M. Z.; Sankaranarayanan, R.; Rao, N. M.: Thermostable Bacillus subtilis Lipases: In Vitro Evolution and Structural Insight. In: *Journal of Molecular Biology* 381 (2008), H. 2, S. 324–340.
- [25] Pouderoyen], G. [; Eggert, T.; Jaeger, K.-E.; Dijkstra, B. W.: The crystal structure of Bacillus subtili lipase: a minimal α/β hydrolase fold enzyme. In: Journal of Molecular Biology 309 (2001), H. 1, S. 215–226.
- Barriuso, J.; Vaquero, M. E.; Prieto, A.; Martinez, M. J.: Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the Candida rugosa-like family: A review.
 In: *Biotechnology Advances* 34 (2016), H. 5, S. 874–885.
- [27] Zisis, T.; Freddolino, P. L.; Turunen, P.; Teeseling, M. C. F. van; Rowan, A. E.;
 Blank, K. G.: Interfacial Activation of Candida antarctica Lipase B: Combined
 Evidence from Experiment and Simulation. In: *Biochemistry* 54 (2015), H. 38,
 S. 5969–5979.
- [28] Arpigny, J. L.; Jaeger, K. E.: Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. In: *The Biochemical journal* 343 (1999), H. 1, S. 177–183.
- [29] Reetz, M. T.: Lipases as practical biocatalysts. In: Current Opinion in Chemical Biology 6 (2002), H. 2, S. 145–150.
- [30] Rantwijk, F. van; Hacking, M. A. P. J.; Sheldon, R. A.: Lipase-Catalyzed Synthesis of Carboxylic Amides: Nitrogen Nucleophiles as Acyl Acceptor. In: *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly* 131 (2000), H. 6, S. 549–569.
- [31] Rauwerdink, A.; Kazlauskas, R. J.: How the Same Core Catalytic Machinery Catalyzes 17 Different Reactions: the Serine-Histidine-Aspartate Catalytic Triad of α/β-Hydrolase Fold Enzymes. In: ACS Catal. 5 (2015), H. 10, S. 6153–6176.

iii

- [32] Dasetty, S.; Blenner, M. A.; Sarupria, S.: Engineering Lipases: walking the fine line between activity and stability. In: *Materi. Res. Express* 4 (2017), H. 11, S. 114008.
- [33] Ghanem, A.: Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. In: *Tetrahedron* 63 (2007), H. 8, S. 1721–1754.
- [34] Sandoval, G. Berlin-Heidelberg: Springer New York, 2018.
- [35] Ghasemi, S.; Heidary, M.; Faramarzi, M. A.; Habibi, Z.: Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 100 (2014), S. 121–128.
- [36] Aouf, C.; Durand, E.; Lecomte, J.; Figueroa-Espinoza, M.-C.; Dubreucq, E.; Fulcrand, H.; Villeneuve, P.: The use of lipases as biocatalysts for the epoxidation of fatty acids and phenolic compounds. In: *Green Chem.* 16 (2014), H. 4, S. 1740– 1754.
- [37] Patel, R. N.: "Pharmaceutical Intermediates by Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications". In: Wiley & Sons, 2016. Kap. 16, S. 367–403.
- [38] Peng, Q.; Wang, X.; Shang, M.; Huang, J.; Guan, G.; Li, Y.; Shi, B.: Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. In: *Microb. Cell Fact.* 13 (2014), H. 1, S. 1.
- [39] Ferreira-Dias, S.; Sandoval, G.; Plou, F.; Valero, F.: The potential use of lipases in the production of fatty acid derivatives for the food and nutraceutical industries. In: *Electronic Journal of Biotechnology* 16 (2013), H. 3.
- [40] Li, X.-L.; Zhang, W.-H.; Wang, Y.-D.; Dai, Y.-J.; Zhang, H.-T.; Wang, Y.; Wang, H.-K.; Lu, F.-P.: A high-detergent-performance, cold-adapted lipase from Pseudomonas stutzeri PS59 suitable for detergent formulation. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 102 (2014), S. 16–24.
- [41] Lailaja, V. P.; Chandrasekaran, M.: Detergent compatible alkaline lipase produced by marine Bacillus smithii BTMS 11. In: World J. Microbiol. Biotechnol. 29 (2013), H. 8, S. 1349–1360.

- [42] Gérard, D.; Guéroult, M.; Casas-Godoy, L.; Condoret, J.-S.; André, I.; Marty, A.;
 Duquesne, S.: Efficient resolution of profen ethyl ester racemates by engineered
 Yarrowia lipolytica Lip2p lipase. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 28 (2017), H. 3,
 S. 433–441.
- [43] Tian, X.; Zhang, G.; Lü, X.; Zhang, A.; Lin, J.; Zheng, L.; Zhang, S.; Cao, S.: Re-solution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl) alanine by using microgel beads containing Pseudomonas cepacia lipase. In: *Biocatalysis and Biotransformation* 30 (2012), H. 4, S. 391–398.
- [44] Fukuda, H.; Kondo, A.; Noda, H.: Biodiesel fuel production by transesterification of oils. In: *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (2001), H. 5, S. 405–416.
- [45] Tao, Y.; Chen, B.; Liu, L.; Tan, T.: Synthesis of trimethylolpropane esters with immobilized lipase from Candida sp. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 74 (2012), H. 3, S. 151–155.
- [46] Khan, A.; Sharma, S.; Kumar, A.; Watterson, A.; Kumar, J.; Parmar, V.: Novozym-435 Catalyzed Syntheses of Polyesters and Polyamides of Medicinal and Industrial Relevance. In: *ChemSusChem.* 7 (2014), H. 2, S. 379–390.
- [47] Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A.: The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from Candida antarctica. In: *Structure* 2 (1994), H. 4, S. 293–308.
- [48] Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V.: Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. In: Adv. Synth. Catal. 348 (2006), H. 7-8, S. 797–812.
- [49] Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W.: Analysis of the Conformational Stability and Activity of Candida antarctica Lipase B in Organic Solvents: insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. In: J. Biol. Chem. 285 (2010), H. 37, S. 28434–28441.
- [50] Welinder, K. G.: Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. In: Current Opinion in Structural Biology 2 (1992), H. 3, S. 388–393.

v

- [51] Branchaud, B. P.: Heme Peroxidases. In: J. Am. Chem. Soc. 122 (2000), H. 30,
 S. 7434–7434.
- [52] Passardi, F.; Theiler, G.; Zamocky, M.; Cosio, C.; Rouhier, N.; Teixera, F.; Margis-Pinheiro, M.; Ioannidis, V.; Penel, C.; Falquet, L.; Dunand, C.: PeroxiBase: the peroxidase database. In: *Phytochemistry* 68 (2007), H. 12, S. 1605–1611.
- [53] Lubos, E.; Loscalzo, J.; Handy, D. E.: Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. In: Antioxidants and Redox Signaling 15 (2011), H. 7, S. 1957–1997.
- [54] Conesa, A.; Punt, P. J.; Hondel, C. A. M. J. J. van den: Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. In: *Journal of Biotechnology* 93 (2002), H. 2, S. 143–158.
- [55] Passardi, F.; Bakalovic, N.; Teixeira, F. K.; Margis-Pinheiro, M.; Penel, C.; Dunand, C.: Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organellemediated transmission to eukaryotes. In: *Genomics* 89 (2007), H. 5, S. 567–579.
- [56] Zámocký, M.; Furtmüller, P. G.; Obinger, C.: Two distinct groups of fungal catalase/peroxidases. In: *Biochem. Soc. Trans.* 37 (2009), H. 4, S. 772–777.
- [57] Pecyna, M. J.; Ullrich, R.; Bittner, B.; Clemens, A.; Scheibner, K.; Schubert, R.;
 Hofrichter, M.: Molecular characterization of aromatic peroxygenase from Agrocybe aegerita. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009), H. 5, S. 885–897.
- [58] Sugano, Y.; Nakano, R.; Sasaki, K.; Shoda, M.: Efficient Heterologous Expression in Aspergillus oryzae of a Unique Dye-Decolorizing Peroxidase, DyP, of Geotrichum candidum Dec 1. In: *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2000), H. 4, S. 1754–1758.
- [59] Poulos, T. L.: Heme Enzyme Structure and Function. In: Chem. Rev. 114 (2014),
 H. 7, S. 3919–3962.
- [60] The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. In: Nature 417 (2002), S. 463–468.

- [61] Guallar, V.; Baik, M.-H.; Lippard, S. J.; Friesner, R. A.: Peripheral heme substituents control the hydrogen-atom abstraction chemistry in cytochromes P450. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), H. 12, S. 6998–7002.
- [62] Battistuzzi, G.; Bellei, M.; Bortolotti, C. A.; Sola, M.: Redox properties of heme peroxidases. In: Archives of Biochemistry and Biophysics 500 (2010), S. 21–36.
- [63] Wang, R.; Visser, S. P. de: How does the push/pull effect of the axial ligand influence the catalytic properties of Compound I of catalase and cytochrome P450?
 In: Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2007), S. 1464–72.
- [64] Groves, J. T.: Enzymatic C-H bond activation: Using push to get pull. In: Nature chemistry 6 (2014), S. 89–91.
- [65] Green, M. T.; Dawson, J. H.; Gray, H. B.: Oxoiron(IV) in Chloroperoxidase Compound II Is Basic: Implications for P450 Chemistry. In: *Science* 304 (2004), H. 5677, S. 1653–1656.
- [66] Kirk, O.; Borchert, T. V.; Fuglsang, C. C.: Industrial enzyme applications. In: *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002), H. 4, S. 345–51.
- [67] Burton, S. G.: Oxidizing enzymes as biocatalysts. In: Trends in Biotechnology 21 (2003), H. 12, S. 543–9.
- [68] Azevedo, A. M.; Martins, V. C.; Prazeres, D. M. F.; Vojinović, V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P.: Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. In: *Biotechnology Annual Review* 9 (2003), S. 199–247.
- [69] Xu, F.: Applications of oxidoreductases: Recent progress. In: Industrial Biotechnology 1 (2005), H. 1, S. 38–50.
- [70] Alvarado, B.; Torres, E.: Recents patents in the use of peroxidases. In: Recent Patents on Biotechnology 3 (2009), H. 2, S. 88–102.
- [71] Que, L.; Tolman, W. B.: Biologically inspired oxidation catalysis. In: Nature 455 (2008), S. 333–340.

- Tzanov, T.; Basto, C.; Gübitz, G. M.; Cavaco-Paulo, A.: Laccases to Improve the Whiteness in a Conventional Bleaching of Cotton. In: *Macromol. Mater. Eng.* 288 (2003), H. 10, S. 807–810.
- [73] Galante, Y. M.; Formantici, C.: Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries. In: *Current Organic Chemistry* 7 (2003), H. 13, S. 1399– 1422.
- Shaffiqu, T. S.; Roy, J. J.; Nair, R. A.; Abraham, T. E.: Degradation of textile dyes mediated by plant peroxidases. In: *Appl. Biochem. Biotechnol* 102 (2002), H. 1, S. 315–326.
- [75] Parales, R. E.; Haddock, J. D.: Biocatalytic degradation of pollutants. In: Current Opinion in Biotechnology 15 (2004), H. 4, S. 374–379.
- [76] Ikehata, K.; Buchanan, I. D.; Smith, D. W.: Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. In: *Journal of Environmental Engineering and Science* 3 (2004), H. 1, S. 1–19.
- [77] Lai, Y.-C.; Lin, S.-C.: Application of immobilized horseradish peroxidase for the removal of p-chlorophenol from aqueous solution. In: *Process Biochemistry* 40 (2005), H. 3, S. 1167–1174.
- [78] Xu, P.; Kaplan, D. L.: Horseradish Peroxidase Catalyzed Polymerization of Tyrosine Derivatives for Nanoscale Surface Patterning. In: *Journal of Macromolecular Science*, Part A 41 (2004), H. 12, S. 1437–1445.
- Sugano, Y.; Muramatsu, R.; Ichiyanagi, A.; Sato, T.; Shoda, M.: DyP, a Unique Dye-decolorizing Peroxidase, Represents a Novel Heme Peroxidase Family: ASP171
 REPLACES THE DISTAL HISTIDINE OF CLASSICAL PEROXIDASES. In: J. Biol. Chem. 282 (2007), H. 50, S. 36652–36658.
- [80] Sugano, Y.: DyP-type peroxidases comprise a novel heme peroxidase family. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009), H. 8, S. 1387–1403.

- [81] Kim, S. J.; Shoda, M.: Purification and characterization of a novel peroxidase from Geotrichum candidum dec 1 involved in decolorization of dyes. In: Applied and Environmental Microbiology 65 (1999), H. 3, S. 1029–1035.
- [82] Johjima, T.; Ohkuma, M.; Kudo, T.: Isolation and cDNA cloning of novel hydrogen peroxide-dependent phenol oxidase from the basidiomycete Termitomyces albuminosus. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (2003), H. 3, S. 220–225.
- [83] Scheibner, M.; Hülsdau, B.; Zelena, K.; Nimtz, M.; Boer, L. de; Berger, R. G.; Zorn, H.: Novel peroxidases of Marasmius scorodonius degrade beta-carotene. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77 (2008), H. 6, S. 1241–1250.
- [84] Liers, C.; Pecyna, M. J.; Kellner, H.; Worrich, A.; Zorn, H.; Steffen, K. T.; Hofrichter, M.; Ullrich, R.: Substrate oxidation by dye-decolorizing peroxidases (DyPs) from wood- and litter-degrading agaricomycetes compared to other fungal and plant heme-peroxidases. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013), S. 5839–49.
- [85] Liers, C.; Bobeth, C.; Pecyna, M.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.: DyP-like peroxidases of the jelly fungus Auricularia auricula-judae oxidize nonphenolic lignin model compounds and high-redox potential dyes. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85 (2010), S. 1869–1879.
- [86] Salvachúa, D.; Prieto, A.; Martínez, Á. T.; Martínez, M. J.: Characterization of a Novel Dye-Decolorizing Peroxidase (DyP)-Type Enzyme from Irpex lacteus and its Application in Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 79 (2013), H. 14, S. 4316.
- [87] Hofrichter, M.; Ullrich, R.; Pecyna, M. J.; Liers, C.; Lundell, T.: New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87 (2010), H. 3, S. 871–897.
- [88] Zelena, K.; Hardebusch, B.; Hülsdau, B.; Berger, R. G.; Zorn, H.: Generation of Norisoprenoid Flavors from Carotenoids by Fungal Peroxidases. In: J. Agric. Food Chem. 57 (2009), H. 21, S. 9951–9955.

 $\mathbf{i}\mathbf{x}$

- [89] Strittmatter, E.; Serrer, K.; Liers, C.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Piontek, K.; Schleicher, E.; Plattner, D. A.: The toolbox of Auricularia auricula-judae dyedecolorizing peroxidase - Identification of three new potential substrate-interaction sites. In: Archives of Biochemistry and Biophysics 574 (2015), S. 75–85.
- [90] Strittmatter, E.; Liers, C.; Ullrich, R.; Wachter, S.; Hofrichter, M.; Plattner, D. A.; Piontek, K.: First crystal structure of a fungal high-redox potential dye-decolorizing peroxidase: substrate interaction sites and long-range electron transfer. In: *J. Biol. Chem.* 288 (2013), H. 6, S. 4095–4102.
- [91] Yoshida, T.; Tsuge, H.; Hisabori, T.; Sugano, Y.: Crystal structures of dye-decolorizing peroxidase with ascorbic acid and 2,6-dimethoxyphenol. In: *FEBS Letters* 586 (2012), H. 24, S. 4351–4356.
- [92] Yoshida, T.; Tsuge, H.; Konno, H.; Hisabori, T.; Sugano, Y.: The catalytic mechanism of dye-decolorizing peroxidase DyP may require the swinging movement of an aspartic acid residue. In: *The FEBS Journal* 278 (2011), H. 13, S. 2387–2394.
- [93] Pühse, M.; Szweda, R. T.; Ma, Y.; Jeworrek, C.; Winter, R.; Zorn, H.: Marasmius scorodonius extracellular dimeric peroxidase - exploring its temperature and pressure stability. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1794 (2009), H. 7, S. 1091– 1098.
- [94] Liers, C.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Minibayeva, F. V.; Beckett, R. P.: A heme peroxidase of the ascomyceteous lichen Leptogium saturninum oxidizes high-redox potential substrates. In: *Fungal Genetics and Biology* 48 (2011), H. 12, S. 1139– 1145.
- [95] Hult, K.; Berglund, P.: Enzyme promiscuity: mechanism and applications. In: Trends in Biotechnology 25 (2007), S. 231–8.
- [96] Wu, Q.; Liu, B.-K.; Lin, X.-F.: Enzymatic Promiscuity for Organic Synthesis and Cascade Process. In: *Current Organic Chemistry* 14 (2010), H. 17, S. 1966–1988.
- [97] O'Brien, P. J.; Herschlag, D.: Catalytic promiscuity and the evolution of new enzymatic activities. In: *Chemistry and Biology* 6 (1999), H. 4, S. 91–105.

x

- [98] Dwivedee, B. P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J. K.; Banerjee, U. C.: Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. In: *ChemistrySelect* 3 (2018), H. 9, S. 2441–2466.
- [99] Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J.: Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways. In: Angewandte Chemie International Edition 43 (2004), H. 45, S. 6032–6040.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B.:
 Industrial biocatalysis today and tomorrow. In: *Nature* 409 (2001), S. 258–68.
- [101] Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V.: Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40 (2006), H. 3, S. 111–120.
- [102] Khmelnitsky, Y. L.; Levashov, A. V.; Klyachko, N. L.; Martinek, K.: Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. In: *Enzyme and Microbial Technology* 10 (1988), H. 12, S. 710–724.
- [103] Ghatorae, A. S.; Bell, G.; Halling, P. J.: Inactivation of enzymes by organic solvents: New technique with well-defined interfacial area. In: *Biotechnol. Bioeng.* 43 (1994), H. 4, S. 331–336.
- [104] Castro, G. R.; Knubovets, T.: Homogeneous biocatalysis in organic solvents and water-organic mixtures. In: *Critical Reviews in Biotechnology* 23 (2003), H. 3, S. 195–231.
- [105] Klibanov, A. M.: Improving enzymes by using them in organic solvents. In: *Nature* 409 (2001), S. 241–246.
- [106] Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K.: Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. eng. In: *Biol. Proced Online* 18 (Jan. 2016), H. 2, S. 2.
- [107] Gaylord, N. G.; Gibbs, J. H.: Physical chemistry of macromolecules. C. TANFORD.
 In: J. Polym. Sci. 62 (1962), H. 173, S22–S23.

- [108] Zaks, A.; Klibanov, A. M.: The effect of water on enzyme action in organic media.
 In: J. Biol. Chem. 263 (1988), H. 17, S. 8017–8021.
- [109] Careri, G.: Cooperative charge fluctuations by migrating protons in globular proteins. In: *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 70 (1998), H. 3, S. 223– 49.
- [110] Wangikar, P. P.; Michels, P. C.; Clark, D. S.; Dordick, J. S.: Structure and Function of Subtilisin BPN' Solubilized in Organic Solvents. In: J. Am. Chem. Soc. 119 (1997), H. 1, S. 70–76.
- [111] Klibanov, A. M.: Why are enzymes less active in organic solvents than in water? In: Trends in Biotechnology 15 (1997), H. 3, S. 97–101.
- [112] Daniel, R. M.; Dunn, R. V.; Finney, J. L.; Smith, J. C.: The role of dynamics in enzyme activity. In: Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 32 (2003), S. 69–92.
- [113] Soares, C. M.; Teixeira, V. H.; Baptista, A. M.: Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: insights from molecular dynamics simulation studies. In: *Biophysical Journal* 84 (2003), S. 1628–1641.
- [114] Eppler, R. K.; Komor, R. S.; Huynh, J.; Dordick, J. S.; Reimer, J. A.; Clark, D. S.: Water dynamics and salt-activation of enzymes in organic media: mechanistic implications revealed by NMR spectroscopy. In: *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America 103 (2006), H. 15, S. 5706–5710.
- [115] Guinn, R. M.; Skerker, P. S.; Kavanaugh, P.; Clark, D. S.: Activity and flexibility of alcohol dehydrogenase in organic solvents. In: *Biotechnol. Bioeng.* 37 (1991), H. 4, S. 303–308.
- [116] Kim, J.; Clark, D. S.; Dordick, J. S.: Intrinsic effects of solvent polarity on enzymic activation energies. In: *Biotechnol. Bioeng.* 67 (2000), S. 112–6.
- [117] Carrea, G.; Riva, S.: Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. In: Angewandte Chemie International Edition 39 (2000), H. 13, S. 2226– 2254.

- [118] Alfonso, I.; Gotor, V.: Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates. In: *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004), H. 4, S. 201–209.
- [119] Rantwijk, F. van; Sheldon, R. A.: Biocatalysis in ionic liquids. In: Chem. Rev. 107 (2007), S. 2757–85.
- Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Allen, C. C.: Aromatic dioxygenases: molecular biocatalysis and applications. In: *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001), H. 6, S. 564– 73.
- [121] Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G.: Dispelling the myths-biocatalysis in industrial synthesis. In: *Science* 299 (2003), S. 1694–1697.
- [122] Sheldon, R. A.: Atom efficiency and catalysis in organic synthesis. In: Pure and Applied Chemistry 72 (2000), H. 7, S. 1233–1246.
- [123] Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E.: Understanding enzyme immobilisation. In: Chem. Soc. Rev. 38 (2 2009), S. 453–68.
- [124] Tran, D. N.; Balkus, K. J.: Perspective of Recent Progress in Immobilization of Enzymes. In: ACS Catal. 1 (2011), H. 8, S. 956–968.
- [125] Kim, D. C.; Jang, A.-R.; Kang, D. J.: Biological functionality of active enzyme structures immobilized on various solid surfaces. In: *Current Applied Physics* 9 (2009), H. 6, S. 1454–1458.
- [126] Yang, X.; Chen, D.; Zhao, H.: Silica particles with immobilized protein molecules and polymer brushes. In: Acta Biomaterialia 29 (2016), S. 446–454.
- [127] Díaz, J. F.; Balkus, K. J.: Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. In: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2 (1996), H. 2, S. 115–126.
- [128] Hernandez, K.; Garcia-Galan, C.; Fernandez-Lafuente, R.: Simple and efficient immobilization of lipase B from Candida antarctica on porous styrene-divinylbenzene beads. In: *Enzyme and Microbial Technology* 49 (2011), H. 1, S. 72–78.

- [129] Jegan Roy, J.; Emilia Abraham, T.: Strategies in making cross-linked enzyme crystals. In: *Chem. Rev.* 104 (2004), H. 9, S. 3705–22.
- [130] Sheldon, R. A.: Characteristic features and biotechnological applications of crosslinked enzyme aggregates (CLEAs). In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92 (2011), H. 3, S. 467–477.
- [131] Cao, L.; Langen, L. v.; Sheldon, R. A.: Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? In: *Current Opinion in Biotechnology* 14 (2003), H. 4, S. 387–394.
- [132] Shinde, P.; Musameh, M.; Gao, Y.; Robinson, A. J.; Kyratzis, I.: Immobilization and stabilization of alcohol dehydrogenase on polyvinyl alcohol fibre. In: *Biotechnology Reports* 19 (2018).
- Sheldon, R. A.: Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. In: Adv. Synth. Catal. 349 (2007), H. 8-9, S. 1289–1307.
- [134] Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C.: Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. In: Adv. Synth. Catal. 353 (2011), H. 16, S. 2885–2904.
- [135] Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E.: Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 26 (1968), H. 1, S. 62–69.
- [136] Kiehl, K.; Opwis, K.; Gutmann, J. S.: Polyvinylamine-coated polyester fibers as a carrier matrix for the immobilization of peroxidases. In: *Eng. Life Sci.* 17 (2017), H. 6, S. 645–652.
- Berger, R.: Methods of enzymatic analysis, vol. I. "Fundamentals". 3rd Edition.
 Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel: Verlag Chemie, 1983. 579 S. 240 DM.
 In: Acta Biotechnol. 4 (1984), H. 3, S. 300.
- [138] J. Keesey: Biochemica Information: A Revised Biochemical Reference Source. 1st Edition. Inianapolis: Boehringer Mannheim Biochemicals, 1987.

- [139] Król, P.: Synthesis methods, chemical structures and phase structures of linear polyurethanes. Properties and applications of linear polyurethanes in polyurethane elastomers, copolymers and ionomers. In: *Progress in Materials Science* 52 (2007), H. 6, S. 915–1015.
- [140] Somarathna, H.; Raman, S.; Mohotti, D.; Mutalib, A.; Badri, K.: The use of polyurethane for structural and infrastructural engineering applications: A state-ofthe-art review. In: *Construction and Building Materials* 190 (2018), S. 995–1014.
- [141] Mazurek, M.; Bruliński, T.; Tomczyk, K.; Parzuchowski, P.; Florjańczyk, Z.; Plichta, A.; Rokicki, G.: Aliphatic-aromatic poly(ester-carbonate)s obtained from simple carbonate esters, α,ω-aliphatic diols and dimethyl terephthalate. In: J. Polym. Res. 22 (2015), H. 3, S. 34.
- [142] Nohra, B.; Candy, L.; Blanco, J.-F.; Guerin, C.; Raoul, Y.; Mouloungui, Z.: From Petrochemical Polyurethanes to Biobased Polyhydroxyurethanes. In: *Macromolecules* 46 (2013), H. 10, S. 3771–3792.
- [143] Soares, R. R.; Simonetti, D. A.; Dumesic, J. A.: Glycerol as a source for fuels and chemicals by low-temperature catalytic processing. In: Angewandte Chemie (International ed. in English) 45 (2006), H. 24, S. 3982–3985.
- [144] Behr, A.; Eilting, J.; Irawadi, K.; Leschinski, J.; Lindner, F.: Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. In: *Green Chem.* 10 (2008), H. 1, S. 13–30.
- [145] Sonnati, M. O.; Amigoni, S.; Taffin de Givenchy, E. P.; Darmanin, T.; Choulet,
 O.; Guittard, F.: Glycerol carbonate as a versatile building block for tomorrow: synthesis, reactivity, properties and applications. In: *Green Chem.* 15 (2013), H. 2,
 S. 283–306.
- [146] Duval, C.; Kébir, N.; Jauseau, R.; Burel, F.: Organocatalytic synthesis of novel renewable non-isocyanate polyhydroxyurethanes. In: J. of Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. 54 (2016), H. 6, S. 758–764.

- [147] Kathalewar, M. S.; Joshi, P. B.; Sabnis, A. S.; Malshe, V. C.: Non-isocyanate polyurethanes: from chemistry to applications. In: RSC Adv. 3 (2013), H. 13, S. 4110– 4129.
- [148] Datta, J.; Włoch, M.: Progress in non-isocyanate polyurethanes synthesized from cyclic carbonate intermediates and di- or polyamines in the context of structure-properties relationship and from an environmental point of view. In: *Polym. Bull.* 73 (2016), S. 1459–1496.
- [149] Maisonneuve, L.; Lamarzelle, O.; Rix, E.; Grau, E.; Cramail, H.: Isocyanate-Free Routes to Polyurethanes and Poly(hydroxy Urethane)s. In: *Chem. Rev.* 115 (2015), H. 22, S. 12407–12439.
- [150] Carré, C.; Bonnet, L.; Avérous, L.: Original biobased nonisocyanate polyurethanes: solvent and catalyst free synthesis, thermal properties and rheological behaviour.
 In: RSC Adv. 4 (2014), H. 96, S. 54018–54025.
- [151] Ou, G.; He, B.; Yuan, Y.: Lipases are soluble and active in glycerol carbonate as a novel biosolvent. In: *Enzyme and Microbial Technology* 49 (2011), H. 2, S. 167–170.
- [152] Schmitke, J. L.; Wescott, C. R.; Klibanov, A. M.: The Mechanistic Dissection of the Plunge in Enzymatic Activity upon Transition from Water to Anhydrous Solvents.
 In: J. Am. Chem. Soc. 118 (1996), H. 14, S. 3360–3365.
- [153] Purolite: Product Information. In: Data Sheet (2019).
- [154] Arroyo, M.; Sinisterra, J. V.: High Enantioselective Esterification of 2-Arylpropionic Acids Catalyzed by Immobilized Lipase from Candida antarctica: A Mechanistic Approach. In: J. Org. Chem. 59 (1994), H. 16, S. 4410–4417.
- [155] Kübler, D.; Bergmann, A.; Weger, L.; Ingenbosch, K. N.; Hoffmann-Jacobsen, K.: Kinetics of Detergent-Induced Activation and Inhibition of a Minimal Lipase. In: J. Phys. Chem. B 121 (2017), H. 6, S. 1248–1257.
- [156] Roberts, I. M.: Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: A convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. In: *Lipids* 20 (1985), H. 4, S. 243– 247.

- [157] Lee, K. H.; Park, C.-H.; Lee, E. Y.: Biosynthesis of glycerol carbonate from glycerol by lipase in dimethyl carbonate as the solvent. In: *Bioprocess Biosyst. Eng.* 33 (2010), H. 9, S. 1059–1065.
- [158] Matsumura, S.; Soeda, Y.; Toshima, K.: Perspectives for synthesis and production of polyurethanes and related polymers by enzymes directed toward green and sustainable chemistry. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70 (2006), H. 1, S. 12–20.
- [159] Henderson, L. A.; Svirkin, Y. Y.; Gross, R. A.; Kaplan, D. L.; Swift, G.: Enzyme-Catalyzed Polymerizations of ε-Caprolactone: Effects of Initiator on Product Structure, Propagation Kinetics, and Mechani. In: *Macromolecules* 29 (1996), H. 24, S. 7759–7766.
- [160] Jiang, Y.; Loos, K.: Enzymatic Synthesis of Biobased Polyesters and Polyamides.
 In: *Polymers* 8 (2016), H. 7, S. 243.
- [161] Pallavicini, M.; Valoti, E.; Villa, L.; Piccolo, O.: Lipase-Catalyzed Resolution of Glycerol 2,3-Carbonate. In: J. Org. Chem. 59 (1994), H. 7, S. 1751–1754.
- [162] Ghandi, M.; Mostashari, A.; Karegar, M.; Barzegar, M.: Efficient Synthesis of α-Monoglycerides via Solventless Condensation of Fatty Acids with Glycerol Carbonate. In: J. Amer. Oil Chem. Soc. 84 (2007), H. 7, S. 681–685.
- [163] Edlund, U.; Albertsson, A.-C.: Polyesters based on diacid monomers. In: Advanced Drug Delivery Reviews 55 (2003), H. 4, S. 585–609.
- [164] Nummelin, S.; Skrifvars, M.; Rissanen, K.: "Polyester and Ester Functionalized Dendrimers". In: Dendrimers II: Architecture, Nanostructure and Supramolecular Chemistry. Springer Berlin Heidelberg, 2000, S. 1–67.
- [165] Kricheldorf, H. R.: Star shaped and hyperbranched aromatic polyesters. In: Pure and Applied Chemistry 70 (1998), H. 6, S. 1235–1238.
- [166] Chang, T. T.: Novel approaches to characterization of melamine coating resins. In: Progress in Organic Coatings 29 (1996), H. 1-4, S. 45–53.

- [167] Bauer, D. R.; Dickie, R. A.: Crosslinking chemistry and network structure in organic coatings. I. Cure of melamine formaldehyde/acrylic copolymer films. In: J. Polym. Sci. Polym. Ed. 18 (1980), H. 10, S. 1997–2014.
- [168] Chattopadhyay, D. K.; Raju, K. V. S. N.: Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. In: *Progress in Polymer Science* 32 (2007), H. 3, S. 352–418.
- [169] Cornille, A.; Auvergne, R.; Figovsky, O.; Boutevin, B.; Caillol, S.: A perspective approach to sustainable routes for non-isocyanate polyurethanes. In: *European Polymer Journal* 87 (2017), S. 535–552.
- [170] Liu, G.; Wu, G.; Huo, S.; Jin, C.; Kong, Z.: Synthesis and properties of nonisocyanate polyurethane coatings derived from cyclic carbonate-functionalized polysiloxanes. In: *Progress in Organic Coatings* 112 (2017), S. 169–175.
- [171] Long, D. A.: Infrared and Raman characteristic group frequencies. In: Journal of Raman Spectroscopy 35 (2004), H. 10, S. 905–905.
- [172] Geschwind, J.; Frey, H.: Poly(1,2-glycerol carbonate): A Fundamental Polymer Structure Synthesized from CO2 and Glycidyl Ethers. In: *Macromolecules* 46 (2013), H. 9, S. 3280–3287.
- [173] Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; Santos, J. C. S. dos; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R.: Novozym 435: the "perfect" lipase immobilized biocatalyst? In: *Catal. Sci. Technol.* 9 (10 2019), H. 10, S. 2380–2420.
- [174] Poojari, Y.; Clarson, S. J.: Thermal stability of Candida antarctica lipase B immobilized on macroporous acrylic resin particles in organic media. In: *Biocatalysis* and Agricultural Biotechnology 2 (2013), H. 1, S. 7–11.
- [175] Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.: Thermal stabilization of immobilized lipase B from Candida antarctica on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. In: *Enzyme and Microbial Technology* 24 (1999), H. 1, S. 3–12.

- [176] Palomo, J. M.; Muñoz, G.; Fernández-Lorente, G.; Mateo, C.; Fernández-Lafuente, R.; Guisán, J. M.: Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20 (2002), S. 279–286.
- [177] Zhang, P.-L.; Cheng, Q.; Xu, W.; Tang, K.-W.: Enzymatic Enantioselective Hydrolysis of 2-(3-Chlorophenyl) Propionic Acid Ester Enhanced by PEG: Experiment and Optimization. In: *Ind. Eng. Chem. Res.* 57 (2018), H. 32, S. 11246–11256.
- [178] Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R.: Enzyme immobilization: an update. In: J. Chem. Biol. 6 (2013), H. 4, S. 185–205.
- [179] Pyun, J.; Kowalewski, T.; Matyjaszewski, K.: Synthesis of Polymer Brushes Using Atom Transfer Radical Polymerization. In: *Macromol. Rapid Commun.* 24 (2003), H. 18, S. 1043–1059.
- [180] Liu, G.; Cheng, H.; Yan, L.; Zhang, G.: Study of the Kinetics of the Pancake-to-Brush Transition of Poly(N-isopropylacrylamide) Chains. In: J. Phys. Chem. B 109 (2005), H. 47, S. 22603–22607.
- [181] Wilson, C. J.; Clegg, R. E.; Leavesley, D. I.; Pearcy, M. J.: Mediation of Biomaterial-Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review. In: *Tissue Engineering* 11 (2005), H. 1-2, S. 1–18.
- [182] Jiang, H.; Xu, F.-J.: Biomolecule-functionalized polymer brushes. In: Chem. Soc. Rev. 42 (2013), H. 8, S. 3394–3426.
- [183] Qi, H.; Du, Y.; Hu, G.; Zhang, L.: Poly(carboxybetaine methacrylate)-functionalized magnetic composite particles: A biofriendly support for lipase immobilization. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 107 (2018), S. 2660–2666.
- [184] Stuart, M. A. C.; Huck, W. T. S.; Genzer, J.; Müller, M.; Ober, C.; Stamm, M.; Sukhorukov, G. B.; Szleifer, I.; Tsukruk, V. V.; Urban, M.; Winnik, F.; Zauscher, S.; Luzinov, I.; Minko, S.: Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. In: *Nature Materials* 9 (2010), S. 101–113.

- [185] Nepomuscene, N. J.; Daniel, D.; Krastanov, A.: Biosensor to Detect Chromium in Wastewater. In: Biotechnology & Biotechnological Equipment 21 (2007), H. 3, S. 377–381.
- [186] Zhang, X.; Guan, R.-F.; Wu, D.-Q.; Chan, K.-Y.: Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 33 (2005), H. 1, S. 43–50.
- [187] Prakash, J.; Tripathi, B.; Kumar Ghosh, S.: "Chapter 4 Low Temperature Coating Deriving from Metal-Organic Precursors: An Economical and Environmentally Benign Approach". In: *Intelligent Coatings for Corrosion Control*. Butterworth-Heinemann, 2015, S. 93–134.
- [188] Chen, J.-K.; Hsieh, C.-Y.; Huang, C.-F.; Li, P.-m.: Characterization of patterned poly(methyl methacrylate) brushes under various structures upon solvent immersion. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 338 (2009), H. 2, S. 428–434.
- [189] Marschelke, C.; Raguzin, I.; Matura, A.; Fery, A.; Synytska, A.: Controlled and tunable design of polymer interface for immobilization of enzymes: does curvature matter? In: Soft Matter 13 (2017), H. 5, S. 1074–1084.
- [190] Pohar, A.; Plazl, I.; Žnidaršič–Plazl, P.: Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n–heptane two-phase system at the microreactor scale. In: *Lab Chip* 9 (2009), H. 23, S. 3385–3390.
- [191] Pencreac'h, G.; Baratti, J. C.: Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the Pseudomonas cepacia lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media. In: *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1996), H. 6, S. 417–422.
- [192] Fernandez-Lafuente, R.; Armisén, P.; Sabuquillo, P.; Fernández-Lorente, G.; Guisán,
 J. M.: Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports.
 In: Chemistry and Physics of Lipids 93 (1998), H. 1, S. 185–197.

- [193] Rueda, N.; Santos, J. C. S. dos; Torres, R.; Ortiz, C.; Barbosa, O.; Fernandez-Lafuente, R.: Improved performance of lipases immobilized on heterofunctional octyl-glyoxyl agarose beads. In: RSC Adv. 5 (2015), H. 15, S. 11212–11222.
- [194] Cao, L.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.: Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. In: *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6 (1999), H. 3, S. 279– 285.
- [195] Karagoz, B.; Bayramoglu, G.; Altintas, B.; Bicak, N.; Arica, M. Y.: Poly(glycidyl methacrylate)-Polystyrene Diblocks Copolymer Grafted Nanocomposite Microspheres from Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization for Lipase Immobilization: Application in Flavor Ester Synthesis. In: Ind. Eng. Chem. Res. 49 (2010), H. 20, S. 9655–9665.
- [196] Weltz, J.; Kienle, D. F.; Schwartz, D. K.; Kaar, J. L.: Dramatic Increase in Catalytic Performance of Immobilized Lipases by Their Stabilization on Polymer Brush Supports. In: ACS Catal. 9 (2019), H. 6, S. 4992–5001.
- [197] Goto, M.; Okubo, T.; Kawakita, H.; Uezu, K.; Tsuneda, S.; Saito, K.; Goto, M.; Tamada, M.; Sugo, T.: Design of polymer brushes for immobilizing enzymes onto hollow fiber micropores in organic media reaction. In: *Biochemical Engineering Journal* 37 (2007), H. 2, S. 159–165.
- [198] Bilal, M.; Rasheed, T.; Zhao, Y.; Iqbal, H. M. N.; Cui, J.: Smart chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 119 (2018), S. 278–290.
- [199] Opwis, K.; Knittel, D.; Schollmeyer, E.: Immobilization of Catalase on Textile Carrier Materials. In: AATCC review 4 (2004), H. 11, S. 25–2.
- [200] Kiehl, K.; Straube, T.; Opwis, K.; Gutmann, J. S.: Strategies for permanent immobilization of enzymes on textile carriers. In: *Eng. Life Sci.* 15 (2015), H. 6, S. 622– 626.

xxi

- [201] Novel peroxidases of Marasmius scorodonius degrade beta-carotene. In: Appl. Microbiol. Biotechnol. 77 (2008), H. 6, S. 1241–1250.
- [202] Schmidt, K.: "Biochemische und molekularbiologische Charakterisierung neuartiger Oxidoreduktasen aus Basidiomyceten". Diss. Justus-Liebig-Universitaet, Giesen, 2016.
- [203] Greg T. Hermanson, Hrsg.: Bioconjugate Techniques (Third Edition). Third Edition. Boston: Academic Press, 2013.
- [204] Hollmann, F.; Arends, I. W.; Buehler, K.; Schallmey, A.; Bühler, B.: Enzymemediated oxidations for the chemist. In: *Green Chem.* 13 (2011), H. 2, S. 226– 265.
- [205] Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L.: Lipase-mediated epoxidation utilizing urea-hydrogen peroxide in ethyl acetate. In: *Green Chem.* 8 (2006), H. 10, S. 923– 926.
- [206] Méndez-Sánchez, D.; Ríos-Lombardía, N.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V.: Chemoenzymatic epoxidation of alkenes based on peracid formation by a Rhizomucor miehei lipase-catalyzed perhydrolysis reaction. In: *Tetrahedron* 70 (2014), H. 6, S. 1144–1148.
- [207] Szweda, R. T.; Schmidt, K.; Zorn, H.: Bleaching of colored whey and milk by a multiple-enzyme system. In: *Eur. Food Res. Technol.* 237 (2013), H. 3, S. 377–384.
- [208] Gutiérrez, A.; Babot, E. D.; Ullrich, R.; Hofrichter, M.; Martínez, A. T.; del Río, J. C.: Regioselective oxygenation of fatty acids, fatty alcohols and other aliphatic compounds by a basidiomycete heme-thiolate peroxidase. In: Archives of Biochemistry and Biophysics 514 (2011), H. 1-2, S. 33–43.
- [209] Zorn, H.; Langhoff, S.; Scheibner, M.; Nimtz, M.; Berger, R. G.: A peroxidase from Lepista irina cleaves , β,β-carotene to flavor compounds. In: *Biological Chemistry* 384 (2003), H. 7, S. 1049–1056.

- [210] Arnao, M.; Acosta, M.; Rio, J. del; Varón, R.; García-Cánovas, F.: A kinetic study on the suicide inactivation of peroxidase by hydrogen peroxide. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1041 (1990), H. 1, S. 43–47.
- [211] Hagström, A. E. V.; Törnvall, U.; Nordblad, M.; Hatti-Kaul, R.; Woodley, J. M.: Chemo-enzymatic epoxidation-process options for improving biocatalytic productivity. In: *Biotechnol. Prog.* 27 (2011), H. 1, S. 67–76.
- [212] Bhattacharya, S.; Drews, A.; Lyagin, E.; Kraume, M.; Ansorge–Schumacher, M. B.: Efficient chemo-enzymatic epoxidation using silcoat: Novozym435: characterizing the multiphase system. In: *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012), H. 8, S. 1448–1455.
- [213] Ortiz de Montellano, P. R.: Cytochrome P450. Springer, 2005.
- [214] Guengerich, F. P.: Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. In: *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001), H. 6, S. 611–650.
- [215] Hrycay, E. G.; Bandiera, S. M.: "Monooxygenase, peroxidase and peroxygenase properties and reaction mechanisms of cytochrome P450 enzymes". In: Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450. Springer, 2015, S. 1–61.
- [216] Hofrichter, M.; Kellner, H.; Pecyna, M. J.; Ullrich, R.: "Fungal unspecific peroxygenases: heme-thiolate proteins that combine peroxidase and cytochrome P450 properties". In: *Monooxygenase, peroxidase and Peroxygenase properties and mechanisms of cytochrome P450.* Springer, 2015, S. 341–368.
- [217] Peter, S.; Kinne, M.; Ullrich, R.; Kayser, G.; Hofrichter, M.: Epoxidation of linear, branched and cyclic alkenes catalyzed by unspecific peroxygenase. In: *Enzyme and Microbial Technology* 52 (2013), H. 6-7, S. 370–376.
- [218] Wang, Y.; Lan, D.; Durrani, R.; Hollmann, F.: Peroxygenases en route to becoming dream catalysts. What are the opportunities and challenges? In: *Current Opinion* in Chemical Biology 37 (2017), S. 1–9.

Abbildungsverzeichnis

1	Übersicht der Anwendungsgebiete, Art und Form eingesetzter Biokatalysa-	
	toren [8]	2
2	Die 12 Prinzipien der grünen Chemie [9]	2
3	Schematische Darstellung des aktiven Zentrums der Lipase, samt der Oxya-	
	niontasche, der Acyl- und Nucleophil-Bindungsstelle [31]	7
4	Katalytischer Mechanismus von Lipasen [31]	8
5	Übersicht Lipase katalysierte Reaktionen [34]	10
6	Allgemeine schematische Darstellung des katalytischen Zyklus von Peroxi-	
	dasen. Verbindung I: (Fe ⁴⁺ =O)Por ^{*+} ; Verbindung II: (Fe ⁴⁺ =O)Por; RH ₂ :	
	Substratmolekül; $\mathrm{RH}^*:$ korrespondierendes Substrat radikal	15
7	Schematische Darstellung des katalytischen Zyklus der MsP1 [79]	20
8	Übersicht der verschiedenen Immobilisationsarten	28
9	Schematische Übersicht der verschiedenen Möglichkeiten zur Enzymanbin-	
	dung an einen physischen Träger.	29
10	Schematische Darstellung der verschiedenen Ansätze zur Herstellung trägerfrei	er
	immobilisierter Enzyme [131]	31
11	Schematische Darstellung eines Beispiels zur Einschluss-Immobilisation auf	
	Basis einer Polyvinylalkoholmatrix mit zusätzlicher Integration einer Ko-	
	valenten Anbindung des Enzyms über Ethylendiamin/Glutaraldehyd [132].	32
12	Reaktions schema zum Sebacin Biscyclocarbonats (1) einschließlich möglicher	
	Nebenreaktionen zu Oligomeren (2).	58
13	FTIR Spektrum des SB BisCC im Vergleich zu den Reaktanten Glycerin-	
	1,2-Carbonat und Sebacinsäure	59
14	$^{1}\mathrm{H}\text{-}$ (oben) und $^{13}\mathrm{C}\text{-}$ (unten) NMR Spektrum (400 Mhz) des gereinigten SB	
	BisCC in $CDCl_3$	60
15	DEPT 135 Spektrum des gereinigten SB BisCC in CDCl_3 (400 Mhz). Ver-	
	unreinigungen sind durch die roten Boxen gekennzeichnet.	61

16	H-C HMQC-NMR Spektrum des gereinigten SB BisCC (400 Mhz). \ldots .	62
17	ESI-TOF Massenspektren des aufgereinigten Produktes unter Verwendung der Methode A (oben) und Methode B (unten).	63
18	Temperaturabhängigkeit der Rohprodukt- und Produktausbeute nach einer 3 Tage-Reaktion.	64
19	Lipase abhängige Hydrolyse des 4-Methylumbelliferyl-Butyrat zum korre- spondierendem Fluorophor 4-Methylumbelliferon und Buttersäure	65
20	Linker Panel: Temperaturabhängige Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Lipaseaktivität mittels fluoreszenzspektroskopischer Analyse der Hydrolyse von 4-MU-Butyrat. Rechter Panel: Restaktivität bei 20 °C nach Inkubation der	
	CalB immo Plus bei den angegebenen Temperaturen	66
21	Temperaturabhängige ¹ H-NMR Spektren (CDCl ₃) des aufgearbeiteten SB BisCC implizieren Verunreinigungen im Bereich von $3,5 - 4,0$ ppm	67
22	Linker Panel: Abhängigkeit der Ausbeuten des Rohproduktes und SB BisCC bezüglich der Reaktionszeit (Tage). Rechter Panel: Abbau der Sebacinsäure Konzentration über die Zeit (Stunden).	69
23	Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Lipaseaktivität bezogen auf die Hydrolyse von 4-MU-Butyrat nach Inkubation der CalB immo Plus im Reaktionsme-	70
2.4	dium bei Raumtemperatur.	70
24	ESI-TOF Spektren (Methode B) des Rohprodukts nach verschieden Reak- tionszeiten (3 - 14 Tage).	71
25	$^1\mathrm{H}\text{-}\mathrm{NMR}$ Spektrum des Rohproduktes nach 3 Tagen Synthese	72
26	Ausschnitt der ¹ H-NMR-Spektren über 14 Tage Reaktionszeit. Die Zuord- nungen beziehen sich auf Abbildung 25	74
27	Schematische Darstellung der Vernetzung von Polyester über klassisch che- mische Verfahren auf Basis von Melamin und Isocyanaten sowie über Lipase	
	induzierte Selbst-Vernetzung.	80

28	Synthese der Carbonat Funktionalisierung des Polyesters und der Vernet-	
	zung des Lackfilms. R 3 = Glycerin-1,2-Carbonat, Butanol, Alkoholgruppen	
	aus möglichen Ringöffnungen des Carbonats	82
29	FTIR Spektren des Rohpolyesters und des Glycerin-1,2-Carbonats sowie	
	des funktionalisierten Polyesters.	84
30	$^{1}\mathrm{H}\text{-}\mathrm{NMR}$ Spektren des Rohpolyester (unten) und des Carbonat funktiona-	
	lisierten Polyesters (oben). Signal D, F und G zeigen Nebenprodukte durch	
	Öffnung des Carbonatrings.	86
31	Ausschnitt der ¹ H-NMR Spektren von reinem Glycerin-1,2-Carbonat (rote	
	Linie) und vom funktionalisiertem Polyester (schwarze Linie). \ldots	87
32	$^1\mathrm{H}\text{-}\mathrm{NMR}$ Spektren des funktionalisiertem Polyester in Butylacetat (oben)	
	und Cyclopentylmethylether (unten).	88
33	Vergleich der FTIR-Spektren des Rohpolyesters (rote Linie), des unvernetz-	
	ten modifizierten Polyester (blaue Linie) und der gehärteten Beschichtung	
	(M1-M7, schwarze Linien)	90
34	Vergleich der FTIR-Spektren des Rohpolyesters (rote Linie), des unvernetz-	
	ten modifizierten Polyester (blaue Linie) und der gehärteten Beschichtung	
	(M1-M7, schwarze Linien)	91
35	Schema der Polyestervernetzung.	91
36	Schematische Darstellung zur TEOS-Partikel Synthese nach dem Stöber-	
	Verfahren	97
37	Eingesetzt Silane zur Oberflächenfunktionalität der TEOS-Partikel	97
38	Rasterelektronenmikroskop Aufnahmen reiner TEOS-Partikel (A-B) und	
	PMMA modifizierten Partikel (C-D) an 100% ASI Funktionalität bei einer	
	Vergrößerung von 25k (A,C) und 100k (B,D).	98
39	Thermogravimetrische Analyse (linker Panel) und Messung der dynami-	
	sche Lichtstreuung (rechter Panel) aller verschiedenen PMMA modifizier-	
	ten TEOS-Partikel.	98
40	Linker Panel gibt die Anfangsgeschwindigkeit (v_0) der Lipaseaktivität auf	
----	--	-----
	den verschiedenen PMMA modifizierten Partikel des ersten Zyklus wieder.	
	Rechter Panel beschreibt die relative Aktivität aller Immobilisate über den	
	ersten bis sechsten Zyklus. Dabei sind alle Aktivitäten bezogen auf die	
	Aktivität des jeweils ersten Zyklus der unterschiedlichen Biokatalysatoren.	101

41	Einfluss von Glutardialdeyh (GDA) auf die Aktivität und Stabilität der im-
	mobilisierten Cal B auf PMMA modifizierten Partikel mit 90% ASI Funk-
	tionalität. Aufgetragen sind die Anfangsgeschwindigkeiten (\mathbf{v}_0) von Zyklus
	1 - 6 vernetzter und unvernetzter Immobilisate
42	Reaktionsschema der Umesterung von 4-Methylumbelliferyl-Butyrat mit
	Isopropanol
43	Reaktionsschema der Veresterung von Ölsäure mit Ethanol zum Ölsäureethylester

40	reaktionsseneina der veresterung von Ofsaure mit Ethanor zum Ofsaureentyrester
	in n-Heptan mittels immobilisierter CalB an Partikeln mit 80% AIS Funk-
	tionalität. Zur Synthese wurde rein adsorptive gebundene Cal B $(\mbox{-}\ensuremath{\operatorname{GDA}})$
	und zusätzlich vernetzte Cal B $(+~2\%$ GDA) eingesetzt, die über zwei se-
	perate Reaktionszyklen verwendet wurden
44	Syntheseweg der Peroxidase katalysierten Epoxidierung von Cyclohexen. 108
45	3D mikroskopische Bilder (200 fache Vergrößerung)des Trägermaterials PET
	E20102 G/G nach der Funktionalisierung mit PVAm (links) und nach der

48	Langzeitstabilität des Biokatalysators unter verschiedenen Lagerbedingun-
	gen. Panel A = Lagerung im trockenem, Panel B = Lagerung im Puffer,
	Panel C = Lagerung in Isopropanol / Wasser (20/80), Panel D = Lage-
	rung in Isopropanol. Dunkelgrau = 4 °C, hellgrau = RT, weiß = 30 °C und
	schwarz gepunktet = Startwert
49	Aktivitätsanalyse der Peroxidase Immobilisate nach Inkubation in den an-
	gegebenen Lösemitteln und anschießender Oxidation im Puffersystem 115
50	Gefiltertes (m/z = 81) GC-Chromatogramm der Probe vor und nach in-
	ternem Spiking mit Cyclohexenoxid (98+%). Die schwarze Linie zeigt das
	Chromatogramm der Probe und die rote Linie das Chromatogramm der
	gespikten Probe
51	Screening der Lösemittelabhängigkeit der Epoxidierungsreaktion. Angege-
	ben sind relative GC Peakflächen zu einer Einzelbestimmung der jeweiligen
	Reaktion nach 24 h
52	Schema des gedruckten Modellreaktors (A) und der Prozessablaufplan zur
	Rückgewinnung bzw. Rückführung des Cyclohexens sowie zur Analyse der
	Wiederverwertbarkeit des Biokatalysators (B). 1) Unterer Reaktorbehälter,
	2) oberer Reaktorbehälter, 3) textilgebundene MaxiBright $^{\ensuremath{\mathbb{R}}}$ an PVAm
	funktionalisiertem PET, 4) Acetonitril, 5) Cyclohexen und Wasserstoff-
	peroxid
53	Zeitabhängige Ausbeute des 1,2-Epoxycyclohexans
54	Relative Ausbeute der Nebenprodukte im Bezug auf 1,2-Epoxycyclohexan
	über 120 min. Schwarz = Menge an 1,2-Epoxycyclohexan bezogen auf
	100%, grün = relative Menge an Peak 6,5, blau = relative Menge an
	Cyclohex-2-en-1-on, rot = relative Menge an 2-Cyclohexen-1-ol. $\dots \dots \dots$
55	GC Chromatogramm aus der Cyclohexen-Phase gekoppelt mit der Iden-
	tifikation der gefundenen Signale mittel Massenspektrometrie und Daten-
	bankabgleich
56	pH-Abhängigkeit der biokatalytischen Epoxidierung von Cyclohexen 123

57	Einfluss von der Wasserstoffperoxid Konzentration auf die Ausbeute des	
	1,2-Epoxycyclohexans. Ausbeuten sind als relative Ausbeuten im Vergleich	
	zur maximalen Ausbeute angegeben. Fehlerbalken geben den maximalen	
Fehler der relativen Ausbeuten an, die aus 3-fach Bestimmungen erhalten		
	wurden	
58	Zeitabhängige Ausbeute des 1,2-Epoxycyclohexans	
59	Wiederholter Einsatz des Biokatalysators im Modellreaktor zu Epoxidie-	
	rung von Cyclohexen einschließlich Recycling des Substrates	

Tabellenverzeichnis

1	Liste der verwendeten Chemikalien Teil 1
2	Liste der verwendeten Chemikalien Teil 2
3	Liste der verwendeten Instrumente Teil 1
4	Liste der verwendeten Instrumente Teil 2
5	Liste der verwendeten Puffer und Lösungen
6	Liste der verwendeten Enzyme
7	Eigenschaften des Polyesters Dynapol LS 415
8	Säurezahl des unbehandelten und des modifizierten Polyesters 83
9	Schichtdicke der Beschichtung
10	Pendeldämpfung
11	Glanz
12	Gitterschnitt
13	Ermittelte Lipaseaktivität aus der Immobilizationslösung vor und nach der
	Immobilization (24 h)
14	Aktivitäte pro $g_{(Trägermaterial)}$ sowie pro $g_{(gebundenes Enzym)}$ der Umesterung
	von 4-MU-Butyrat mittels immobilisierter CalB an PMMA modifizierten
	Partikel mit 80% ASI Funktionalität versus zwei kommerziell erhältlicher
	immobilisierter CalB Produkte
15	Auswertung der ICP-OES Analyse. $MB = MaxiBright^{\textcircled{R}}$; $c_{Fe} = Ermittelte$
	Eisenkonzentration der verwendeten Probe aus der ICP-OES Analyse; m_{Fe}
	= Umgerechnete Masse an Eisen; n_{Fe} = Stoffmenge an Eisen bezogen auf
	die errechnete Masse des Eisens; $\mathbf{n}_{\mathrm{MB}}=$ Berechnete Stoffmenge an MB auf
	der verwendeten Probe; m_{MB} = Berechnete Masse an MB

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
4-MU	4-Methylumbelliferon
4-MU-Butyrat	4-Methylumbelliferyl-Butyrat
abs.	absolut
ABTS	$2,2'-Azino-bis-(3-Ethylbenzothiazolin-6-sulfons \ddot{a} ure)$
	Diammoniumsalz
AIS	ATRP-Initiator Silan
APTES	(3-Aminoporpyl)triethoxysilan
ARGET ATRP	Activators regenerated by electrone transfer radical
	polymerization
a.u.	arbitrary unit
CalB	Candida antarctica Lipase B
$\mathrm{CHCl}_3 \ / \ \mathrm{CDCl}_3$	Chloroform
CPE	Copolyester (CPE) 1639
CPME	Cyclopenthylmethylether
CYP	Cytochrom P450 Monooxygenase
DABCO	1,3-Diazabicyclo $(2.2.2)$ octan
DEPT 135	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ddH_2	Reinstwasser (Milli-Q-Wasser)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DyP	Dye decolourizing Peroxidase
ESI EtOH	Ethanol
FT-IR GC	Gaschromatographie
GDA	Glutardialdehyd
GlyC h	Stunde
HMMM	Hexamethoxymethylmelamin
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
ICP-OES	Optische Emissionsspektrometrie mit induktiv
	gekoppeltem Plasma

LC	Flüssigchromatographie
Lip	Lipase
MeOH	Methanol
min	Minute
Mn	Zahlenmittel der Molmassenverteilung
MS	Massenspektroskopie
Mw	Massenmittel der Molmassenverteilung
Mz	Zentrifugenmittel der Molmassenverteilung
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
PD	Polydispersität
PET	Polyethylenterephthalat
PMMA	Polymethylmethacrylate
PMDETA	N, N, N', N", N"'-Pentamethyl diethylentriamin
PVAm	Polyvinylamin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
Rohp.	Rohprodukt
RT	Raumtemperatur
TGA	thermogravimetrische Analyse
THF	Tetrahydrofuran
SB BisCC	Sebacin Biscyclocarbonat
UV /Vis	Ultraviolett / visible (sichtbar)

Publikationen

Veröffentlichungen als Erstautor

Wunschik D.S.; Ingenbosch, K. N.; Zähres, M.; Horst, J; Mayer, C.; Jäger, M.; Strehmel,V.; Dornbusch, M. und Hoffmann-Jacobsen, K.: Biocatalytic and solvent-free synthesis ofa bio-based biscyclocarbonate. In: *Green Chem.* 20.20 (2018), S. 4738-4745.

Wunschik, D. S.; Ophardt, Y.; Hoffmann-Jacobsen, K. und Dornbusch, M.: Lipase catalyzed modification of functionalized polyester binders. In: *Progress in Organic Coatings* 136 (2019), Nr. 105208.

Wunschik, D. S.; Ingenbosch, K. N.; Süss, P.; Liebelt, U.; Quint, S.; Dyllick-Brenzinger, M.; Zuhse, R.; Menyes, U.; Hoffmann-Jacobsen, K.; Opwis, K. und Gutmann, J.: Enzymatic epoxidation of cyclohexene by peroxidase immobilization on a textile and an adapted reactor design. In: *Enzyme and Microbial Technology* 136 (2020), Nr. 109512.

Veröffentlichungen als Coautor

Ingenbosch, K. N.; Rousek, A.; Wunschik, D. S. und Hoffmann-Jacobsen, K.: A fluorescence based activity assay for immobilized lipases in non-native media. In: *Analytical Biochemistry* 569 (2019), S. 22-27.

Ingenbosch, K. N.; Quint, S.; Dyllick-Brenzinger, M.; Wunschik, D. S.; Kiebist, J.; Süss,
P.; Liebelt, U.; Zuhse, R.; Menyes, U.; Scheibner, K.;Mayer, C.; Opwis, K.; Gutmann, J.
S.; Hoffmann-Jacobsen, K.: Singlet oxygen generation by peroxidases and peroxygenases
for chemo-enzymatic synthesis. In: *ChemBioChem.* 22.2 (2021), S. 398-407