

Universität  
Rostock



Traditio et Innovatio

# Lipase katalysierte Synthese von Mono- und Diestern sowie deren Untersuchung auf antibakterielle Eigenschaften

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

*doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

am Institut für Chemie

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Fanny Langschwager

aus Rostock

Rostock, 2018

[https://doi.org/10.18453/rosdok\\_id00002515](https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002515)

**Gutachter:**

Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock, Institut für Chemie

Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

**Jahr der Einreichung:** 2018

**Jahr der Verteidigung:** 2018

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Udo Kragl für das interessante Thema. Darüber hinaus gilt ihm mein Dank für die gute Betreuung und für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können.

Danken möchte ich auch der IOI Oleo Witten, im Besonderen Dr. Michael Stehr und Dr. Sebastian Reyer, für die Finanzierung der Arbeit, die gute Zusammenarbeit und die Möglichkeit, die Versuche zur Maßstabsvergrößerung in den Forschungslaboren der IOI Oleo Witten durchführen zu können.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Bernd Kreikemeyer, der mir die Möglichkeit gab, die Untersuchungen zum antibakteriellen Potential in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Vielen Dank, Thomas, für die Einarbeitung und allen anderen vielen Dank für das gute Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Kragl für die anregenden Diskussionen und den Hilfestellungen danken. Die gute Arbeitsatmosphäre erleichterte das Arbeiten im Labor. Danke, Lisa und Dennis, für die zahlreichen Säulen, die ihr für mich gemacht habt.

Mein Dank gilt auch Dr. Dirk Michalik und seinem Team für die Erstellung der NMR-Spektren und für die Hilfe bei der Auswertung.

Ich danke auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

## **Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 21, darunter 12 noch nicht in der Literatur beschriebene, Mono- und Diester ausgehend von Dicarbonsäuren und Alkenolen biokatalytisch synthetisiert. Die Isolierung der synthetisierten Mono- und Diester erfolgte mittels Säulenchromatografie. Zudem wurden Versuche zur Maßstabsvergrößerung durchgeführt, die den Reaktionsverlauf bestätigten. Die isolierten Ester wurden hinsichtlich ihres antibakteriellen Potentials untersucht.

## **Abstract**

Within this work 21 mono- and diesters including 12 not yet described in literature, were biocatalytically synthesized starting from dicarboxylic acids and alkenols. The isolation of the synthesized mono- and diesters was carried out by means of column chromatography. In addition, scale up experiments were carried out, which confirmed the reaction process. The obtained esters were examined for their antibacterial potential.

---

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Zielsetzung.....	5
3. Theoretische Grundlagen .....	7
3.1. Gewinnung von Dicarbonsäuren aus nachwachsenden Rohstoffen .....	7
3.2. Gewinnung von Terpenalkoholen und Zimtalkohol aus nachwachsenden Rohstoffen.....	9
3.3. Biokatalysatoren.....	11
3.3.1. Lipasen .....	13
3.4. Ester für kosmetische Produkte.....	14
3.5. Medizinische Mikrobiologie.....	16
3.5.1. Grampositive Bakterien.....	17
3.5.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
3.5.2. Gramnegative Bakterien .....	18
3.5.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	18
3.5.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
3.5.3. Bakterielleres Wachstum .....	20
4. Material und Methoden .....	21
4.1. Lipase Assay.....	21
4.1.1. Hydrolyse von <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat.....	21
4.1.2. Veresterung von Laurinsäure mit <i>n</i> -Propanol .....	21
4.2. Reaktionsverfolgung .....	22
4.3. Isolierung der synthetisierten Ester.....	22
4.4. Bestimmung von Verteilungskoeffizienten der Ester.....	22
4.5. Maßstabsvergrößerung .....	22
4.5.1. Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol.....	23
4.5.2. Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol - ohne Lösungsmittel.....	23
4.5.3. Veresterung von Bernsteinsäure mit Zimtalkohol.....	23
4.6. Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der synthetisierten Ester .	24
4.6.1. Killing Assay .....	24
4.6.2. Wachstumsversuche .....	25
5. Ergebnisse und Diskussion .....	27
5.1. Charakterisierung der <i>Candida antarctica</i> Lipase B.....	27
5.1.1. Temperaturabhängigkeit.....	27

---

5.1.2.	Lösungsmittelabhängigkeit .....	28
5.2.	Optimierung der Reaktionsbedingungen .....	30
5.2.1.	Vorversuche .....	31
5.2.2.	Lösungsmittelabhängigkeit .....	40
5.2.3.	Temperaturabhängigkeit .....	43
5.2.4.	Variation der Substratverhältnisse.....	46
5.2.5.	Reaktionsführung ohne Lösungsmittel .....	48
5.2.6.	Wassergehalt .....	49
5.2.7.	Rezyklierung des Enzyms.....	51
5.2.8.	Variation der Substrat-Alkohole .....	53
5.3.	Isolierung und Charakterisierung der Ester .....	55
5.3.1.	Isolierung .....	55
5.3.2.	Charakterisierung mittels NMR .....	57
5.3.3.	Bestimmung der Verteilungskoeffizienten .....	62
5.4.	Maßstabsvergrößerung .....	63
5.5.	Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der synthetisierten Ester	69
5.5.1.	Killing Assay .....	70
5.5.1.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	71
5.5.1.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	74
5.5.1.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	77
5.5.1.4.	Zusammenfassung der Killing Assays.....	80
5.5.2.	Wachstumsversuche.....	81
5.5.2.1.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	82
5.5.2.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	86
5.5.2.3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	89
5.5.2.4.	Zusammenfassung der Wachstumsversuche .....	90
6.	Diskussion und Ausblick.....	91
7.	Zusammenfassung.....	97
8.	Anhang.....	99
8.1.	Literaturverzeichnis .....	99
8.2.	LC/MS Methode .....	113
8.3.	GC Methode .....	113
8.4.	Zusammensetzung der Medien und Puffer .....	113
8.5.	verwendete Bakterienstämme .....	114

---

---

8.6. NMR-Spektren .....	114
8.7. Wachstumsversuche .....	132

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Mögliche aus biobasierter Bernsteinsäure herstellbare Produkte .....	2
Abbildung 2-1: verwendete Substrate .....	5
Abbildung 3-1: Mikrobieller Syntheseweg von einigen Terpenalkoholen in Microbial Cell Factories .....	10
Abbildung 3-2: Enzymklassen.....	11
Abbildung 3-3: Penicillinamylase katalysierte Synthese von 6-Aminopenicillinsäure .....	12
Abbildung 3-4: 3-D-Struktur der Cal B .....	13
Abbildung 3-5: Lipase katalysierte Synthese von S-Phenylethylamin und R-Phenylethylmethoxyamid .....	14
Abbildung 3-6: <i>Staphylococcus auerus</i> auf Blutagar .....	17
Abbildung 3-7: <i>Escherichia Coli</i> in Eiter .....	18
Abbildung 3-8: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> auf Blutagar.....	19
Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der Wachstumsphasen des bakteriellen Wachstums .....	20
Abbildung 4-1: Vorbereitung der Bakteriensuspension für den Killing Assay.....	24
Abbildung 5-1: Temperaturabhängigkeit der freien <i>Candida antarctica</i> Lipase B .....	27
Abbildung 5-2: a) Lösungsmittelabhängigkeit der <i>Candida antarctica</i> Lipase B bei der Veresterungsreaktion von Laurinsäure mit n-Propanol b) Wassergehalte der eingesetzten Lösungsmittel .....	29
Abbildung 5-3: Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	30
Abbildung 5-4: GC Chromatogramme a) Lipase katalysierte Synthese b) klassisch chemische Synthese mit H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> c) klassisch chemische Synthese mit <i>p</i> -TSS .....	31
Abbildung 5-5: Enzymscreening der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	32
Abbildung 5-6: Lösungsmittelabhängigkeit der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	33
Abbildung 5-7: Temperaturabhängigkeit der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	34
Abbildung 5-8: Wassergehaltsbestimmungen der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	36
Abbildung 5-9: Vergleich von direkter Veresterung (Bernsteinsäure) und Umesterung (BSDME, BSDEE) der Beispielreaktion .....	38
Abbildung 5-10: Vergleich der Reaktionsdurchführung zwischen Ein-Phasen-System und Zwei-Phasen-System .....	39
Abbildung 5-11: Substratkonzentrationserhöhung .....	39
Abbildung 5-12: Lösungsmittelabhängigkeit – Gesamtumsatz .....	41
Abbildung 5-13: Lösungsmittelabhängigkeit .....	42

---

Abbildung 5-14: Temperaturabhängigkeit .....	44
Abbildung 5-15: Substratverhältnisvariation .....	47
Abbildung 5-16: Reaktionsführung ohne Lösungsmittel bei unterschiedlichen Substratverhältnissen .....	49
Abbildung 5-17: Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol unter Zugabe von 1 % Wasser .....	50
Abbildung 5-18: Rezyklierungsversuche der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol.....	52
Abbildung 5-19: Reaktionsverlauf der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol, Nerol, Citronellol und Zimtalkohol .....	53
Abbildung 5-20: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum des Digeranylsuccinats mit Strukturformel.....	57
Abbildung 5-21: <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum des Digeranylsuccinats .....	58
Abbildung 5-22: HMBC-NMR-Spektrum des Digeranylsuccinats .....	59
Abbildung 5-23: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum des Monogeranylsuccinats mit dazugehöriger Strukturformel.....	60
Abbildung 5-24: <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum des Monogeranylsuccinats.....	61
Abbildung 5-25: HMBC-NMR Spektrum des Monogeranylsuccinats.....	62
Abbildung 5-26: Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol im 20 mL und 1 L Maßstab .....	64
Abbildung 5-27: Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol im 750 g Maßstab ohne Lösungsmittel .....	65
Abbildung 5-28: Auftragung des Umsatzes gegen die Selektivität der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol .....	66
Abbildung 5-29: Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Zimtalkohol im 750 g Maßstab ohne Lösungsmittel .....	67
Abbildung 5-30: Agarplatten mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	70
Abbildung 5-31: Grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Staphylococcus aureus</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 3 mmol/L Wirkkonzentration.....	71
Abbildung 5-32: Grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Staphylococcus aureus</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 10 mmol/L Wirkkonzentration.....	72
Abbildung 5-33: Grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Escherichia coli</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 3 mmol/L Wirkkonzentration .....	75
Abbildung 5-34: grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Escherichia coli</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	75
Abbildung 5-35: Grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 3 mmol/L Wirk- konzentration.....	78
Abbildung 5-36: Grafische Darstellung des Killing Assays von <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF - 10 mmol/L Wirkkonzentration.....	78
Abbildung 5-37: 96-Well-Platte mit Bakteriensuspension nach 24 h Messung.....	82

---

---

Abbildung 5-38: Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	83
Abbildung 5-39: Wachstumskurven von <i>Staphylococcus aureus</i> mit MGS/Geraniol - 3 mmol/L Wirkkonzentration, MCAF - 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	84
Abbildung 5-40: Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von <i>Escherichia coli</i> .....	87
Abbildung 5-41: Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	89
Abbildung 9-1: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Mononerylsuccinats .....	115
Abbildung 9-2: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dinerylsuccinats .....	116
Abbildung 9-3: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dicitronellylsuccinats .....	117
Abbildung 9-4: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dicinnamylsuccinats .....	118
Abbildung 9-5: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Monogeranylfumarats .....	119
Abbildung 9-6: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Digeranylfumarats .....	120
Abbildung 9-7: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Mononerylfumarats .....	121
Abbildung 9-8: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dinerylfumarats .....	122
Abbildung 9-9: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dicitronellylfumarats.....	123
Abbildung 9-10: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Monocinnamylfumarats .....	124
Abbildung 9-11: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Dicinnamylfumarats .....	125
Abbildung 9-12: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Monogeranylitaconats .....	126
Abbildung 9-13: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Mononerylitaconats .....	127
Abbildung 9-14: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Monocinnaylitaconats .....	128
Abbildung 9-15: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Digeranylmalats .....	129
Abbildung 9-16: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-Spektrum des Mononerylmalats .....	130
Abbildung 9-17: <sup>1</sup> H-, <sup>13</sup> C- und DEPT-NMR-Spektrum des Dicinnamylmalates .....	131
Abbildung 9-18: Wachstumskurven von <i>Staphylococcus aureus</i> für G, MGS, DGS, DNS, DCS, DCAS; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L ...	132
Abbildung 9-19: Wachstumskurven von <i>Staphylococcus aureus</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF, DCAF; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	132
Abbildung 9-20: Wachstumskurven von <i>Staphylococcus aureus</i> für MGI, MNF, MCAI, N, C, CA; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	133
Abbildung 9-21: Wachstumskurven von <i>Staphylococcus aureus</i> für MNI, MCAF, DGM, DCAM, BS, IS; Ester- bzw. Säurekonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	133
Abbildung 9-22: Wachstumskurven von <i>Escherichia coli</i> für G, MGS, DGS, DNS, DCS, DCAS; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration .....	134

---

---

Abbildung 9-23: Wachstumskurven von <i>Escherichia coli</i> für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF, DCAF; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration.....	134
Abbildung 9-24: Wachstumskurven von <i>Escherichia coli</i> für MGI, MNF, MCAI, N, C, CA; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration.....	135
Abbildung 9-25: Wachstumskurven von <i>Escherichia coli</i> für MNI, MCAF, DGM, DCAM, BS, IS; Ester- bzw. Säurekonzentration a) 3 mmol/L b) 10 mmol/L Wirkkonzentration.....	135

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1: Vergleich der Reaktionsbedingungen der Veresterungs- bzw. Umesterungsreaktion von Essigsäure bzw. Vinylacetat mit Zimtalkohol .....	37
Tabelle 5-2: Temperaturabhängigkeit - berechnete Gleichgewichtskonstanten .....	45
Tabelle 5-3: Isolierte Ausbeuten der synthetisierten Mono- und Diester .....	56
Tabelle 5-4: Gemessene Verteilungskoeffizienten für einige isolierte Ester .....	63
Tabelle 5-5: Raum-Zeit-Ausbeuten der Veresterungsreaktionen .....	68
Tabelle 5-6: Zusammenfassung des Killing Assays von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	73
Tabelle 5-7: Zusammenfassung des Killing Assays von <i>Escherichia coli</i> .....	76
Tabelle 5-8: Zusammenfassung des Killing Assays von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	79
Tabelle 5-9: Zusammenfassung der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der durchgeführten Wachstumsexperimente von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	85
Tabelle 5-10: Zusammenfassung der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der durchgeführten Wachstumsexperimente von <i>Staphylococcus aureus</i> .....	88
Tabelle 9-1: LC/MS Gradient.....	113
Tabelle 9-2: GC Methode .....	113
Tabelle 9-3: verwendete Bakterienstämme .....	114

---

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
A. PS	Amano PS Lipase
BS	Bernsteinsäure
BSDEE	Bernsteinsäurediethylester
BSDME	Bernsteinsäuredimethylester
C	Citronellol
CA	Zimtalkohol
Cal B	<i>Candida antarctica</i> Lipase B
DCAF	Dicinnamylfumarat
DCAM	Dicinnamylmalat
DCAS	Dicinnamylsuccinat
DCF	Dicitronellylfumarat
DCS	Dicitronellylsuccinat
DGF	Digeranylfumarat
DGM	Digeranylmalat
DGS	Digeranylsuccinat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNF	Dinerylummarat
DNS	Dinerylsuccinat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Geraniol
GC	Gaschromatografie
GC/MS	Gaschromatografie gekoppelte Massenspektrometrie
h	Stunden
IS	Itaconsäure
K	Kontrolle
KBE	Kolonie bildende Einheiten
LB	Lennox Base
LC/MS	Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie
LM	Lösungsmittel
MCAF	Monocinnamylfumarat
MCAI	Monocinnamylitaconat
MCAS	Monocinnamylsuccinat

---

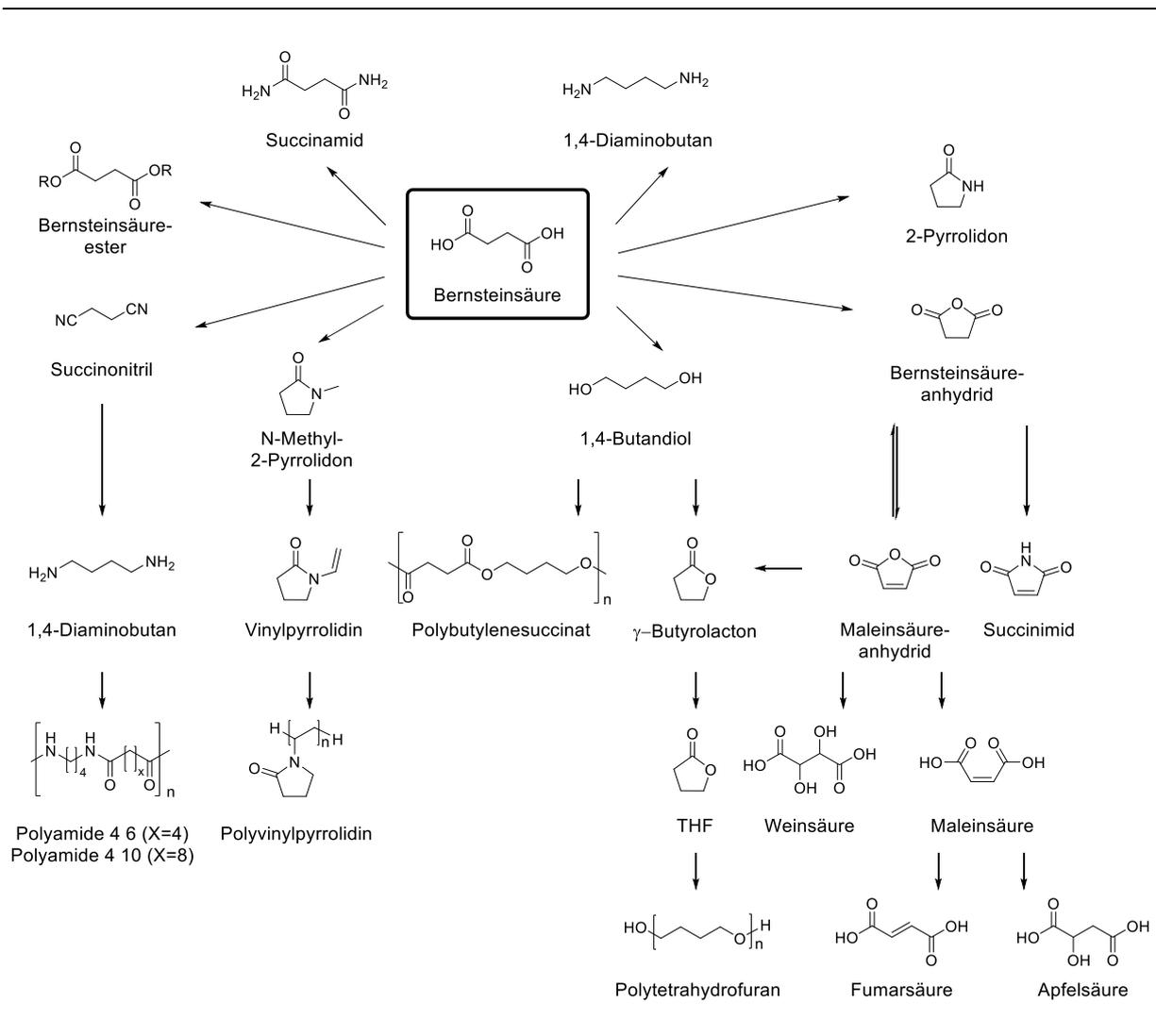
MGF	Monogeranylfumarat
MGI	Monogeranylitaconat
MGS	Monogeranylsuccinat
MNF	Mononerylfumarat
MNI	Mononerylitaconat
MNS	Mononerylsuccinat
MRGN	multiresistente gramnegative
MRSA	Methicillin resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MTBE	Methyl-tert-Butyl-Ether
min	Minuten
N	Nerol
N 435	Novozym 435
NMR	Kernresonanzspektroskopie
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
<i>P. ae.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>p</i> -NPP	<i>p</i> -Nitrophenylpalmitat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RM IM	Lipozym RM IM ( <i>Rhizomucor miehei</i> Lipase immobilisiert)
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
<i>S. au.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
THF	Tetrahydrofuran
TL IM	Lipozym TL IM ( <i>Thermomyces lanuginosus</i> Lipase immobilisiert)
TSB	Tryptophan Soya Broth
tr.	trocken
t/a	Tonnen pro Jahr



## 1. Einleitung

Das globale Wirtschaftswachstum beruht größtenteils auf der Nutzung fossiler Ressourcen. Durch die stetig wachsende Weltbevölkerung kann jedoch der Bedarf an Lebensmitteln, Materialien, Energie und chemischen Produkten durch die erdölbasierten Rohstoffe nicht gedeckt werden. Neben einer zusätzlichen Belastung der Umwelt beschleunigt der vermehrte Abbau von fossilen Rohstoffen zudem auch den Klimawandel. Können also Wirtschaftswachstum und Nachhaltigkeit zusammengeführt werden? Diese Frage greift die Bioökonomie auf. Diese kann als eine Wirtschaft definiert werden, bei der die Grundbausteine für Materialien, Chemikalien und Energie aus erneuerbaren biologischen Rohstoffen gewonnen werden. Diese Art der Wirtschaft kann viele der Anforderungen an Nachhaltigkeit aus ökologischer, sozialer und ökonomischer Sicht erfüllen, wenn sie intelligent gestaltet und umgesetzt wird. Potenzielle Vorteile aus dem Übergang zu einer biobasierten Wirtschaft umfassen eine Verringerung der Treibhausgasemissionen, eine Abnahme der Abhängigkeit von fossilen Rohstoffen, ein vernünftigerer Umgang mit den natürlichen Ressourcen und eine verbesserte Ernährungssicherheit [BMBF, 2017] [IMBERT, 2017] [MCCORMICK et al., 2013]. Diese biobasierte Wirtschaft soll die Produktion von erneuerbaren biologischen Ressourcen, deren Stoffumwandlungen und Abfallströme, in hochwertige Produkte wie Lebensmittel, Futtermittel, Bioerzeugnisse und Bioenergie in Landwirtschaft, Forstwirtschaft, Fischerei, Lebensmittel sowie Zellstoff- und Papierproduktion als auch Teile der Chemischen, Biotechnologischen und Energieindustrie decken. Um dies umzusetzen, ist unter anderem eine umfassende Verwendung der Biotechnologie notwendig [IMBERT, 2017] [SCARLAT et al., 2015]. Die Biotechnologie kann weitgehend als jede Technik definiert werden, die Organismen (oder Teile davon) verwendet, um Produkte zu modifizieren oder herzustellen, um Eigenschaften von Pflanzen und Tieren zu verbessern oder um Mikroorganismen für spezifische Anwendungen zu entwickeln [BICAS et al., 2010]. Eine Untergruppe der Biotechnologie ist dabei die weiße oder auch industrielle Biotechnologie. Hierbei werden lebende Zellen aus Hefen, Pilzen, Bakterien und Pflanzen sowie Enzyme verwendet, um verschiedenste Substanzen zu synthetisieren [FRAZETTO, 2003]. Um erdölbasierte Systeme durch Alternativen ausgehend von nachwachsenden Rohstoffen zu ersetzen, hat das US Department of Energy eine Liste von möglichen Plattformchemikalien erstellt, die aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden können: Bernstein-, Fumar- und Maleinsäure, 2,5-Furandicarbonsäure, 3-Hydroxypropionsäure, Asparaginsäure, Glucarsäure, Glutaminsäure, Itaconsäure, Levulinsäure, 3-Hydroxybutyrolacton, Glycerin, Sorbitol, Xylitol und Arabinitol [BOZELL et al., 2010]. Die Synthese von Bernsteinsäure aus nachwachsenden Rohstoffen ist ein erfolgreiches Beispiel für die biobasierte Industrie geworden, wobei vor allem die Produktion fermentativ

hergestellter Bernsteinsäure sich in den letzten zehn Jahren stark entwickelt hat. So produzieren mittlerweile eine Vielzahl von Firmen, wie Ajinomoto, Bioamber, MBEL und KAIST, Myriant, PTT MCC Biochem, Reverdia und Succinity großtechnisch Bernsteinsäure [BECKER et al., 2015] [CHOI et al., 2015] [COK et al., 2014] [LEE et al., 2014] [MURASE et al., 2004] [RUSH et al., 2014] [SANFORD et al., 2016] [SCHRODER et al., 2014] [VAN DE GRAAF et al., 2014] [YOCUM et al., 2014]. Bernsteinsäure ist eine Schlüsselchemikalie, die zur Herstellung von vielen Rohchemikalien eingesetzt werden kann. In Abbildung 1-1 sind mögliche Produkte, welche aus biobasierter Bernsteinsäure hergestellt werden können, dargestellt [MAZIERE et al., 2017].



**Abbildung 1-1:** Mögliche aus biobasierter Bernsteinsäure herstellbare Produkte [MAZIERE et al., 2017]

Die Bernsteinsäure kann dabei nicht nur chemisch, sondern auch biokatalytisch umgesetzt werden, beispielsweise katalysiert das Enzym *Candida antarctica* Lipase B die Synthese von Bernsteinsäureestern [MAZIERE et al., 2017]. Die Substanzklasse der Ester finden häufig Anwendung in der kosmetischen Industrie oder auch als Duft- und Aromastoffe. So werden sie beispielsweise als Weichmacher und Antioxidantien

in Cremes, Tenside in Shampoos und als Duftstoffe in Parfüms sowie Geschmacksstoffe in Lippenpflegeprodukten eingesetzt [KHAN et al., 2015]. Kosmetische Produkte mit einem hohen Wasseranteil, werden häufig antimikrobielle Wirkstoffe zugesetzt, um eine Kontamination mit pathogenen Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa*, zu verhindern [DEL OLMO et al., 2015] [LUNDOV et al., 2009]. Hier haben sich die Esterderivate der Benzoesäure als geeignete Antimikrobiotika herausgestellt. Die großtechnische Darstellung von Estern erfolgt Säure- oder Basen-katalysiert bei hohen Temperaturen (150 - 240 °C). Diese Prozesse zeigen bei den gewählten Reaktionsbedingungen jedoch keine ausgeprägten Regio- und Stereoselektivitäten in Folge dessen entstehen viele Nebenprodukte, was aufwendige Aufarbeitung erfordert und die Kosten der Produkte erhöht. Auch durch das erhöhte Bewusstsein in den Punkten Umwelt, Nachhaltigkeit und Achtsamkeit der Gesellschaft auf natürliche Produkte verlangt nach ständigen Alternativen zu herkömmlichen chemischen Synthesewegen [KHAN et al., 2015] [LUNDOV et al., 2009]. Eine mögliche Alternative bietet die Anwendung der Biotechnologie. Durch den Einsatz von biokatalytischen Verfahren können Prozesse bei milderen Bedingungen gefahren werden und es können sehr gute Produktqualitäten (hohe Reinheit, farblos, geruchlos) erzielt werden. Auch durch die vielen Fortschritte im Bereich der high throughput DNA-Sequenzierung und der rekombinanten DNA Technologie können Enzyme einfacher hergestellt und kommerziell bereitgestellt werden. Darüber hinaus haben neue Entwicklungen im Bereich des Proteinengineerings die Konstruktion von Enzymen ermöglicht, die definierte Eigenschaften hinsichtlich der Substratspezifität, Aktivität, Selektivität, Stabilität und des pH-Optimums aufweisen [SHELDON et al., 2017]. Die Anzahl an nachhaltig und umweltfreundlich hergestellten Substanzen kann dadurch signifikant erhöht werden und somit können mit Hilfe der Biokatalyse neue Synthesewege sowie neue Substanzen gefunden werden, um auf der Petrochemie basierende Stoffe zukünftig zu ersetzen [BERGER, 2009] [SHELDON et al., 2017].



## 2. Zielsetzung

Für viele industrielle Prozesse bietet die Biokatalyse eine kostengünstigere und effektivere Alternative für die Produktion von Bulk- und Feinchemikalien. Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuartiger Ester ausgehend von biobasierten Substraten und Biokatalysatoren. Dazu sollen biobasierte Dicarbonsäuren wie Bernstein-, Itacon-, Apfel-, und Fumarsäure sowie Alkohole aus ätherischen Ölen wie Geraniol, Nerol, Citronellol und Zimtalkohol als Substrate verwendet werden.

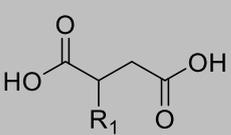
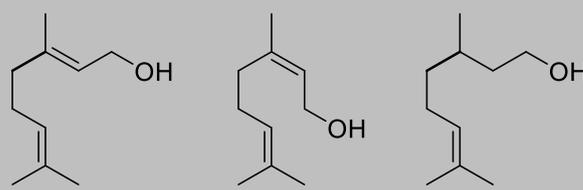
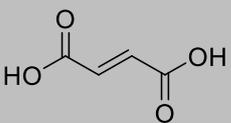
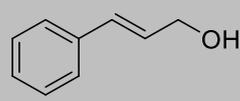
Dicarbonsäuren	Alkohole
 <p> <math>R_1</math> - H Bernsteinsäure            - <math>CH_2</math> Itaconsäure            - OH Apfelsäure         </p>	 <p>Geraniol      Nerol      Citronellol</p>
 <p>Fumarsäure</p>	 <p>Zimtalkohol</p>

Abbildung 2-1: verwendete Substrate

Die synthetisierten Ester sind vor allem interessante Verbindungen für die kosmetische Industrie. So könnten sie als Tenside, Emulgatoren oder Weichmacher Anwendung finden. Als Katalysator sollen Enzyme, genauer Lipasen eingesetzt werden. Klassisch werden Ester großtechnisch bei hohen Temperaturen (150 - 240 °C), mit Säuren oder Basen als Katalysator synthetisiert. Bei diesen Prozessen treten sehr viele Nebenreaktionen, wie beispielsweise ein Angriff der Doppelbindungen der Alkohole, auf. Dadurch wird die Produktqualität herabgesetzt und die Ester müssen einer aufwendigen Aufarbeitung unterzogen werden. Das Verfahren büßt dabei seinen eventuell vorhandenen ökonomischen und ökologischen Vorteil ein. Auch metallkatalysierte Verfahren, wie z.B. die Verwendung organischer Zinnverbindungen, sind in Hinblick auf eine Anwendung in kosmetischen Produkten nicht geeignet, da organische Zinnverbindungen meist toxisch sind. Anhand einer Testreaktion sollen die optimalen Reaktionsbedingungen für die biokatalytische Synthese gefunden werden. Dazu sollen unter anderem das Lösungsmittel, die Temperatur und das Substratverhältnis bei der Reaktionsführung genauer beleuchtet werden. Nachdem die optimalen Reaktionsbedingungen gefunden worden sind, soll eine Isolierung der biokatalytisch synthetisierten Ester erfolgen. Die so produzierten Verbindungen sollen

dann mit Hilfe von NMR-Spektroskopie charakterisiert werden. Des Weiteren sollen Versuche zur Maßstabsvergrößerung durchgeführt werden, um die prinzipielle Eignung der Vorgehensweise zur Herstellung großer Mengen der Produkte getestet werden und mögliche Engpässe identifiziert werden. Als letzter Schritt erfolgt die mikrobiologische Untersuchung der isolierten Mono- und Diester. Da die als Substrate verwendeten Alkohole antibakterielle Eigenschaften aufweisen, soll untersucht werden, ob die synthetisierten Ester ebenso eine antibakterielle Aktivität zeigen. Dazu sollen drei Bakterienstämme, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, welche häufig vorkommende Humanpathogene sind, untersucht werden. Anhand dieser Untersuchungen soll eine Einschätzung für die Anwendbarkeit der synthetisierten Ester in der kosmetischen Industrie getroffen werden.

### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1. Gewinnung von Dicarbonsäuren aus nachwachsenden Rohstoffen

Dicarbonsäuren, wie Bernstein- oder Fumarsäure, werden zu großen Teilen petrochemisch hergestellt. Aber auch die biobasierte Herstellung solcher Säuren gewinnt mehr und mehr an Bedeutung. So bieten beispielsweise Glucose oder Glycerin, als Substrate aus nachwachsenden Rohstoffen, eine günstigere Alternative um fermentativ Dicarbonsäuren herzustellen [BECKER et al., 2015] [BOZELL et al., 2010]. Bernsteinsäure kann beispielsweise fermentativ zum einen durch Wildtyp-Mikroorganismen, wie *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Basfia succiniciproducens* sowie *Mannheimia succiniciproducens* und zum anderen von gentechnisch modifizierten Mikroorganismen, wie *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Saccharomyces cerevesiae* sowie *Yarrowia lipolytica*, hergestellt werden. Als Substrate kommen häufig Zucker, wie Glucose, und Xylose oder Glycerin zum Einsatz. Des Weiteren können Abfallprodukte aus anderen industriellen Prozessen, wie Sulfitablauge sowie Zuckerrohrmelasse, als Substrate dienen [GAO et al., 2016] [JIANG et al., 2017] [KUHNERT et al., 2010] [MAZIERE et al., 2017] [MORALES et al., 2016] [SONG et al., 2006] [ZEIKUS et al., 1999]. Die fermentative Herstellung der Bernsteinsäure mittels *Actinobacillus succinogenes* und *Basfia succiniciproducens* aus Sulfitablauge wurde kürzlich durch Alexandri et al. gezeigt. Sulfitablauge ist ein Nebenprodukt der Zellstoff- und Papierindustrie und wird bei dem Sulfitaufschlussverfahren von Holzspänen erhalten. Dieses Nebenprodukt enthält neben phenolischen Verbindungen auch fermentierbare Zucker. Die phenolischen Bestandteile wurden von Alexandri et al. vor der Fermentation durch Extraktion mit Ethylacetat aus der Sulfitablauge entfernt, da diese den Fermentationsprozess stören. Durch die Abtrennung der phenolischen Bestandteile konnte die Bernsteinsäurekonzentration von 4,6 bzw. 6,2 g/L auf 8,8 bzw. 9,0 g/L gesteigert werden [ALEXANDRI et al., 2016]. In einer weiteren Veröffentlichung zeigten sie zudem, dass durch eine Immobilisierung der Zellen die Bernsteinsäurekonzentration auf 45 g/L erhöht werden konnte [ALEXANDRI et al., 2017]. Neben den Zuckern stellt das bereits erwähnte Glycerin ebenfalls ein geeignetes Substrat zur fermentativen Bernsteinsäureproduktion dar. Mehrere Literaturstellen belegten die fermentative Herstellung der Bernsteinsäure aus Glycerin mit Hilfe eines rekombinanten *Yarrowia lipolytica* Stamms [CUI et al., 2017] [GAO et al., 2016] [LI et al., 2017]. In Fed-batch Versuchen erreichten Cui et al. eine Bernsteinsäurekonzentration von 110,7 g/L. Ein

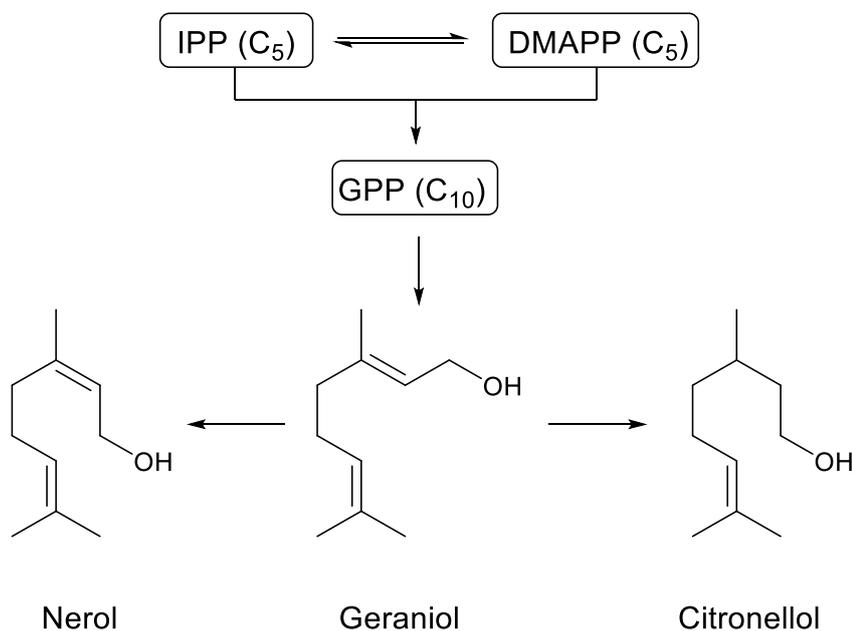
Vorteil dieser Methode ist, dass der pH-Wert nicht nachgeregelt werden muss, da der *Yarrowia lipolytica* Stamm auch bei niedrigen pH-Werten arbeiten kann [CUI et al., 2017]. Die industrielle Produktion von fermentativ hergestellter Bernsteinsäure hat sich in den letzten zehn Jahren stark entwickelt. So produzieren mittlerweile eine Vielzahl von Firmen, wie Ajinomoto, Bioamber, MBEL und KAIST, Myriant, PTT MCC Biochem, Reverdia und Succinity großtechnisch Bernsteinsäure [BECKER et al., 2015] [COK et al., 2014] [LEE et al., 2014] [MURASE et al., 2004] [RUSH et al., 2014] [SANFORD et al., 2016] [SCHRODER et al., 2014] [VAN DE GRAAF et al., 2014] [YOCUM et al., 2014]. Im Jahr 2010 startete die Firma Bioamber ihre Produktion am Standort Pomcaire (Frankreich). Sie erreichten eine Bernsteinsäureproduktion von 3 kt/a. Bereits 2014 erweiterten sie mit Hilfe von Mitsui & Co ihre Produktion und nahmen neue Produktionsstätten mit einer Kapazität von 30 – 65 kt/a in Brasilien, Kanada und Thailand in Betrieb. Für die fermentative Produktion der Bernsteinsäure verwendet Bioamber folgende Mikroorganismen: *Pichia kudriavzevii* 13723, *Escherichia coli* und Hefen, welche Glucose als Substrat benötigen [BECKER et al., 2015] [COK et al., 2014] [RUSH et al., 2014]. Weltweit werden ca. 54 kt/a fermentativ (Bioamber, Myriant, Reverdia, Myriant) und ca. 30 - 50 kt/a petrochemisch Bernsteinsäure produziert [MAZIERE et al., 2017]. Nicht nur Bernsteinsäure, sondern auch Fumarsäure kann fermentativ aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden. Bereits 1938 wurden 41 Stämme aus acht verschiedenen Mikroorganismenarten durch Foster und Waksman hinsichtlich der Fumarsäureproduktion getestet. Sie fanden heraus, dass die Mikroorganismenarten *Rhizopus*, *Mucor*, *Cunninghamella* und *Circinella* Fumarsäure fermentativ produzieren konnten. Die besten Ergebnisse wurden für *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae* und *Rhizopus formosa* erhalten [ENGEL et al., 2008]. Erst kürzlich zeigten Liu et al., dass *Rhizopus arrhizus* aus einem Gemisch aus Glucose und Xylose (75:25) fermentativ Fumarsäure produzieren kann. Dabei erreichten sie eine Fumarsäurekonzentration von 46,7 g/L [LIU et al., 2017]. Papadaki et al. verwendeten den gleichen Stamm, um Fumarsäure aus Sojabohnenhydrolysat, welches ein Nebenprodukt aus der Biodieselproduktion ist, herzustellen und erhielten eine Konzentration von 33 g/L [PAPADAKI et al., 2017]. Jimenes-Quero et al. verwendeten für die fermentative Produktion von Fumarsäure vier verschiedene Aspergillus Stämme (*A. terreus* 826, *A. terreus* 62071, *A. oryzae*, *A. tubingensis*). Als Substrate verwendeten sie Hydrolysate von lignocellulosehaltiger Biomasse, wie Weizenkleie und Maiskolben. Es gelang ihnen unter Verwendung von *A. terreus* 826, *A. terreus* 62071 und *A. oryzae* fermentativ Fumarsäure herzustellen. Gleichzeitig war es ihnen möglich mit *A. terreus* und *A. oryzae* fermentativ Itaconsäure herzustellen, wobei sie mit letzterem 0,11 mg Itaconsäure pro Gramm Biomasse produzieren konnten [JIMENES-QUERO et al., 2016] [JIMENES-QUERO et al., 2017]. Weitere Itaconsäure-produzierenden Mikroorganismen, sind: *Pseudozyma antarctica*, *Ustilaginales* Arten, wie *U. maydis* und *U. vetivericae*, sowie einige *Candida* und *Rodotorula* Arten. Auch recombinante Mikroorganismen wie *A. niger*, *E. coli*, *S.*

*cerevesiae*, *C. glutamicum* und *Y. lipolytica* konnten erfolgreich für die Produktion modifiziert werden. Neben Kohlenhydraten, wie Glucose und Xylose, werden häufig auch Glycerin oder industrielle Neben- und Abfallprodukte, wie Melasse, stärkehaltige Abfälle von Kartoffeln und Mais sowie lignocellulosehaltige Abfälle aus der Holzverarbeitenden Industrie und der Landwirtschaft als Substrate eingesetzt [BAFANA et al., 2017] [JIMNES-QUERO et al., 2016] [JIMNES-QUERO et al., 2017] [SAHA et al., 2017] [WILKE et al., 2001]. Zambanini et al. verwendeten beispielsweise den Mikroorganismus *U. vetiveria* TZ1 für die Itaconsäureproduktion aus Glycerin. Dabei wurde gleichzeitig auch Apfelsäure gebildet. Sie erreichten eine maximale Itaconsäurekonzentration von 34 g/L und eine Apfelsäurekonzentration von 46 g/L. Durch die gleichzeitige Bildung strukturell ähnlicher Carbonsäuren ist die anschließende Aufreinigung schwieriger. Um die Selektivität bezogen auf die Itaconsäure zu steigern, wurde der Mikroorganismus gentechnisch modifiziert. Dies führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer 2,0- bzw. 1,5-fach höheren Itaconsäurekonzentration und einer gleichzeitigen Reduzierung der Apfelsäurekonzentration um 75 bzw. 41 % [ZAMBANINI et al., 2017]. Neben *U. vetiveria* TZ1 sind auch einige *Aspergillus* Stämme, wie *A. flavus*, *A. niger*, und *A. oryzae* sowie einige *Penicillium* Stämme, wie *P. rubens* 67, *P. viticola* und *P. clerotiorum* K304 sowie *Zygosaccharomyces rouxii* V19, *E. coli*, *S. cerevesiae* und *Bacillus subtilis* in der Lage Apfelsäure zu produzieren. Als Substrate dienen hierbei Glucose, Xylose und Glycerin [CHI et al., 2014] [KNUF et al., 2013] [LIDEN, 2017] [ZELLE et al., 2008]. Abschließend kann festgestellt werden, dass viele Methoden und Prozesse zur biobasierten Herstellung von Dicarbonsäuren existieren. Nichtsdestotrotz müssen die Verfahren hinsichtlich der Ausbeuten und Produktivitäten weiter optimiert werden. Um den Bedarf an Chemikalien für die Industrie zu decken, muss Glucose als bisherige Kohlenstoffquelle zunehmend durch biomassebasierte Rohstoffe ersetzt werden.

### **3.2. Gewinnung von Terpenalkoholen und Zimtalkohol aus nachwachsenden Rohstoffen**

Terpenalkohole und Zimtalkohol kommen natürlich in Pflanzen und ihren ätherischen Ölen vor [ARCHER, 1988] [CARNESECCHI et al., 2001] [CHEN et al., 2010] [DORMAN et al., 2000] [THORSELL et al., 2006] [TIWARI et al., 2009]. Großtechnisch werden diese Substanzen entweder aus Pflanzen extraktiv gewonnen oder chemisch hergestellt. Die Konzentration der Verbindungen in den Pflanzen ist allerdings sehr gering. Auch die Abhängigkeit von Ausgangsstoffen, sowie die hohen Produktionskosten von diesen Substanzen aufgrund der Komplexität der Moleküle stellen eine große Herausforderung bei der chemischen Produktion dar. [GOUNARIS,

2010] [MIKS-KRAJNIK et al., 2017] Nicht nur die verwendeten Dicarbonsäuren, sondern auch die für diese Arbeit genutzten Terpenalkohole können mikrobiell aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden. Eine Möglichkeit beschrieben kürzlich Miks-Krajnik et al.: Durch Metabolic Engineering können die Mikroorganismen so modifiziert werden, dass die Zellen möglichst selektiv und in hohen Konzentrationen die gewünschten Substanzen synthetisieren. Aufgrund der Modifizierung der Zellen sollen sogenannte „Microbial Cell Factories“, welche die gewünschten Verbindungen, wie Terpenalkohole, möglichst selektiv und mit hohen Ausbeuten produzieren, entwickelt werden. In Abbildung 3-1 ist der mögliche mikrobielle Syntheseweg in Microbial Cell Factories von einigen Terpenalkoholen dargestellt. Beispiele für gentechnisch modifizierte Mikroorganismen, die Geraniol produzieren, sind: *S. cerevisiae*, *E. coli*, *Hanseniaspora uvarum* und *Rhodococcus erythropolis*, deren Substrate dabei Glucose sowie  $\beta$ -Myrcen aus Hopfen sind. [CARRAU et al., 2005] [CHEN et al., 2010] [FISCHER et al., 2011] [MIKS-KRAJNIK et al., 2017] [PARAMASIVAN et al., 2017] [PARDO et al., 2015] [WANG et al., 2017] [ZHAO et al., 2016] [ZHOU et al., 2014] Liu et al. beschrieben die Herstellung von Geraniol aus Glucose durch gentechnisch modifizierte *S. cerevisiae* Zellen und erzielten eine Geraniolkonzentration von 36 mg/L [LIU et al., 2013].



**Abbildung 3-1:** Mikrobieller Syntheseweg von einigen Terpenalkoholen in Microbial Cell Factories (IPP - Isopentylpyrophosphat, DMAPP - Dimethylallylpyrophosphat, GPP - Geranylpyrophosphat)

Auch Nerol, Citronellol und Zimtalkohol können mikrobiell mit Hilfe von *S. cerevisiae* gewonnen werden [CARRAU et al., 2005] [FISCHER et al., 2011] [GOTTARDI et al., 2017] [MIKS-KRAJNIK et al., 2017] [PARDOR et al., 2015]. Die beschriebenen Methoden führen ebenfalls zu sehr geringen Konzentrationen an Terpenalkoholen und Zimtalkohol. Theoretisch können alle natürlichen Substanzen biosynthetisch hergestellt werden. Die Identifizierung von geeigneten Biosynthesewegen und Organismen ermöglicht eine effiziente Produktion. Eine weitere Optimierung der Prozesse ist nötig, um eine großtechnische Produktion für die Zukunft zu realisieren [CAROLL et al., 2016].

### 3.3. Biokatalysatoren

Biokatalysatoren sind Proteine (Enzyme), die alle chemischen Reaktionen, die für das Überleben der Organismen erforderlich sind, katalysieren. Die Biokatalysatoren können auch chemische Reaktionen katalysieren, entweder als isoliertes Enzym oder als Enzymsysteme in lebenden Zellen. Sie werden hinsichtlich der verschiedenen Reaktionstypen, die sie in ihrem natürlichen Milieu katalysieren können, klassifiziert [BUCHHOLZ et al., 2012] [LIESE et al., 2000] [MCDONALD et al., 2013]. Diese Enzymklassen sind in Abbildung 3-2 dargestellt.

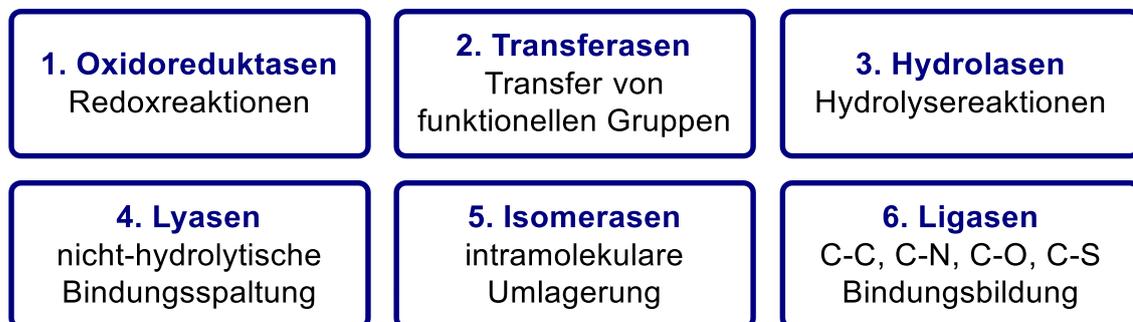
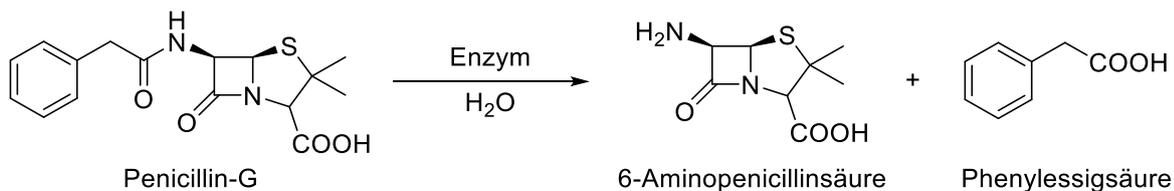


Abbildung 3-2: Enzymklassen

Enzyme sind nicht nur in der Lage ihre „natürlichen“ Reaktionen, sondern auch die entgegengesetzten Reaktionen zu katalysieren. So katalysieren beispielsweise Lipasen (EC 3.1.1.3) unter natürlichen Bedingungen Hydrolysereaktionen. Heutzutage werden sie jedoch ebenfalls für Veresterungsreaktionen in Forschung und Industrie eingesetzt. Aufgrund ihrer vielen Vorteile finden Biokatalysatoren auch bei industriellen Prozessen Anwendung. Im Folgenden sind diese Vorteile kurz zusammenfassend dargestellt [BUCHHOLZ et al., 2012] [ROZELL, 2003] [SHELDON et al., 2017]:

- hohe Substrat-, Stereo- und Regioselektivität
- arbeiten unter milden Reaktionsbedingungen (Raumtemperatur, Normaldruck und neutrale pH-Werte)
- hohe katalytische Effizienz (Reaktionsgeschwindigkeiten sind ca.  $10^8$  höher als bei nicht katalysierten Reaktionen)
- umweltfreundlich (bioabbaubar, geringere Abfallproduktion, durch milde Reaktionsbedingungen, Reduzierung der Energiezufuhr)

Biokatalysatoren werden bei einer Vielzahl von industriellen Prozessen, z.B. in der Lebensmittel- und Getränkeindustrie, der Textil-, Zellstoff- und Papierindustrie, im Gesundheitswesen, bei der Abwasserbehandlung, bei chemischen, pharmazeutischen und kosmetischen Produkten sowie bei der Herstellung von Biokraftstoffen, angewendet [CHOI et al., 2015] [GHAFFARI-MOGHADDAM et al., 2014] [LIESE et al., 2000]. Häufig in der pharmazeutischen Chemie eingesetzte Enzyme sind die Amylasen. Sie bilden eine Gruppe von Enzymen, die die Stickstoff-Kohlenstoff-Bindung von Amiden spalten können und gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen. Ein Beispiel ist die Penicillinamylase, auch Penicillinamidase genannt (EC 3.5.1.11) [BRUGGINK et al., 1998] [PARMAR et al., 2000] [TIWARI et al., 2010]. Mit Hilfe dieses Enzyms kann innerhalb eines Reaktionsschrittes 6-Aminopenicillinsäure, welche einen wichtigen Ausgangsstoff für die Antibiotikasyntese darstellt, aus Penicillin hergestellt werden [PARMAR et al., 2000] [LIESE et al., 2000]. Die Reaktionsgleichung für diese Synthese ist in Abbildung 3-5 dargestellt [LIESE et al., 2000].



**Abbildung 3-3:** Penicillinamylase katalysierte Synthese von 6-Aminopenicillinsäure [LIESE et al., 2000]

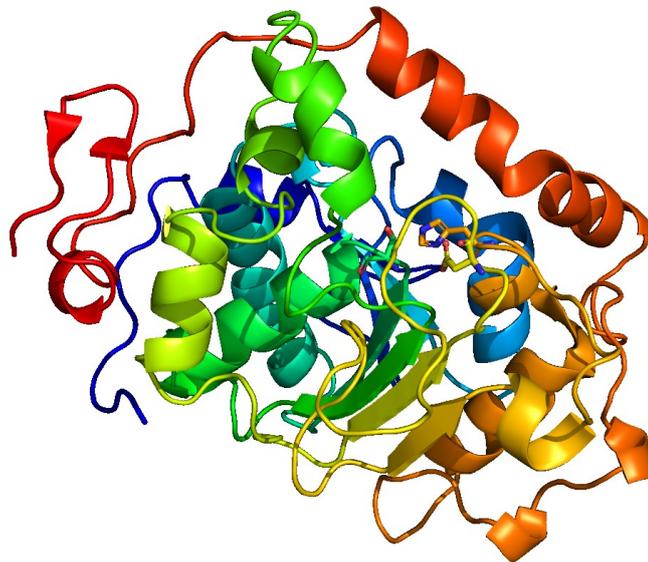
Ein Vorteil dieses Prozesses ist, dass die Synthese der 6-Aminopenicillinsäure innerhalb eines Reaktionsschrittes mit hohen Umsätzen (98 %) und unter milden Reaktionsbedingungen (pH 8,0; 30 – 35 °C, wässriges Medium) durchgeführt werden kann. Weltweit werden ca. 35000 t/a der 6-Aminopenicillinsäure biokatalytisch produziert [GRUDNWALD, 2014].

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Anwendung von Biokatalysatoren in der Industrie eine bewährte Technologie geworden ist [CHOI et al., 2015] [GHAFFARI-MOGHADDAM et al., 2014] [LIESE et al., 2000].

### 3.3.1. Lipasen

Lipasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und katalysieren unter natürlichen Bedingungen die Hydrolyse von Triglyceriden [ADLERCREUTZ, 2012] [UPPENBERG et al., 1994]. Diese Enzyme sind im Vergleich zu anderen Enzymen stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln und können daher auch Veresterungs- und Umesterungsreaktionen katalysieren. Zudem weisen sie ein breites Substratspektrum auf. So können auch Amine als Nucleophile dienen und so zu Amiden umgesetzt werden. Weitere mögliche Reaktionen, die von Lipasen katalysiert werden, sind: Aldol-Reaktionen, Racemisierungen und Epoxidierungen [ADLERCREUTZ, 2012]. Das aktive Zentrum der Lipase bildet die katalytische Triade und ist aus Histidin-Asparagin-Serin aufgebaut. [STAUCH et al., 2015] [UPPENBERG et al., 1994]. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym ist eine immobilisierte *Candida antarctica* Lipase B (Novozym 435). In dieser Form ist die *Candida antarctica* Lipase B adsorptiv auf einen makroporösen Träger (Lewatit VP OC 1600) gebunden. Die *Candida antarctica* Lipase B hat ein Molgewicht von 33 kDa und ihr pH-Optimum liegt bei einem pH-Wert von 7. [CABERA et al., 2009] [Kirk et al., 2002]. In Abbildung 3-3 ist die 3-D-Struktur der Cal B dargestellt. [PDB code: 1TCA] [UPPENBERG et al., 1994]

---



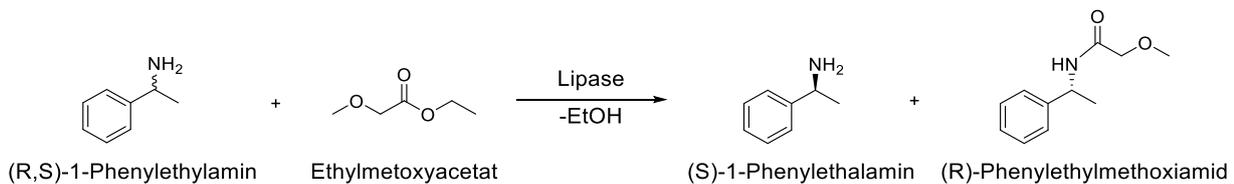
---

**Abbildung 3-4:** 3-D-Struktur der Cal B [PDB code: 1TCA] [UPPENBERG et al., 1994]

Das breite Substratspektrum macht die Lipasen zu dem am häufigsten industriell genutzten Biokatalysatoren. Des Weiteren zeigen sie sehr häufig eine hohe Chemo-, Regio- und Stereoselektivität. Sie können bereits bei sehr milden Reaktionsbedingungen (niedrige Temperaturen, Drücken) eingesetzt werden [ALMEIDA et al., 2017] [CABERA et al., 2009] [Kirk et al., 2002]. Anwendung finden

---

Lipasen in der Fett- und Öl- sowie der Waschmittelindustrie, bei der Produktion von bioabbaubaren Polymeren, bei der Lebensmittelverarbeitung, in der pharmazeutischen und Kosmetikindustrie, bei der Zellstoff- und Papierherstellung, bei der Behandlung von Abwässern sowie bei der Biodieselproduktion [CHOUDHURY et al., 2015] [SINGH et al., 2012]. Lipasen werden auch wegen ihrer signifikanten Enantioselektivität häufig verwendet. Die BASF nutzt diese Eigenschaft der Lipase, um enantiomerenreine Verbindungen wie S-Phenylethylamin herzustellen [LIESE et al., 2000] [UTHOFF et al., 2017]. Die Reaktionsgleichung dazu ist in Abbildung 3-4 dargestellt.



**Abbildung 3-5:** Lipase katalysierte Synthese von S-Phenylethylamin und R-Phenylethylmethoxyamid (200 g/L (R/S)-1-Phenylethylamin, pH 8,0 - 9,0, 25 °C, Medium: MTBE/Ethylmethoxyacetat, 5-7 h, *Burkholderia plantarii* Lipase immobilisiert auf einen Polyacrylatträger)

Mit diesem Prozess erreicht die BASF Ausbeuten von über 90 % und einen Enantiomerenüberschuss des S-1-Phenylethylamins von über 99 % bei einer Produktionskapazität von über 100 t/a. Enantiomerenreine Amine spielen zunehmend eine wichtige Rolle als Bausteine in der pharmazeutischen und agrochemischen Industrie. Neben 1-Phenylethylamin können viele weitere Substrate, wie beispielsweise 3,3-Dimethylbutyl-2-amin und 1-(4-Chlorophenyl)-ethylamin, mit Hilfe dieses Prozesses enantiomerenrein hergestellt werden [LIESE et al., 2000].

### 3.4. Ester für kosmetische Produkte

Unter allen Klassen von organischen Verbindungen, die in Kosmetika eingesetzt werden, bieten Ester ein weites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten. Sie werden beispielsweise in Cremes, Shampoos, Parfüms oder auch in Lippenpflegeprodukten verwendet. Die kosmetischen Ester können in vier Gruppen unterteilt werden: *Biotenside*, *Antioxidantien*, *Duft- und Geschmacksstoffe* sowie *Weichmacher* [KHAN et al., 2015]. *Biotenside* sind oberflächenaktive Substanzen, welche die Oberflächen- und Grenzflächenspannungen von Flüssigkeiten herabsetzen und so Emulsionen bilden können [BANAT et al., 2000] [MILLER et al., 2001]. Die bekanntesten Biotenside sind Glycolipide, welche als Emulgatoren oder Schäummittel sehr wichtige Bestandteile in kosmetischen Produkten darstellen [KHAN et al., 2015] [LOURITH et al., 2009]. Als Beispiele können Sorbitan- und Sucroseester mit einer Marktgröße von

20.000 bzw. 4.000 t/a genannt werden [KHAN et al., 2015]. *Antioxidantien* sind chemische Verbindungen, die freie Radikale abfangen können und dadurch Oxidationen verhindern oder reduzieren können. Hierzu zählen Ester von Vitamin A, Vitamin C und Vitamin E [LUPO, 2001] [KHAN et al., 2015]. Durch die Veresterung der Antioxidantien können ihre Stabilität, die Fettlöslichkeit und die Absorption durch die Haut verbessert werden [KHAN et al., 2015]. Ester, die als *Duft-* oder *Geschmacksstoffe* eingesetzt werden, sind meist aus kurzkettigen Säuren, wie Essigsäure, Propionsäure oder Buttersäure und Alkoholen, wie Butanol, Ethanol, Geraniol oder Citronellol aufgebaut. Duftstoffe werden häufig für Deodorants, Cremes und Seifen verwendet, wohingegen Geschmacksstoffe häufig in Lippenpflegeprodukten sowie in Zahnpasta Anwendung finden [CAROLL et al., 2016] [KHAN et al., 2015] [YAZAR et al., 2010]. *Weichmacher* oder Wachsester sind aus Carbonsäuren mit mehr als zwölf C-Atomen, wie Palmitin, Öl oder- Myristinsäure aufgebaut. Ein wichtiger Vertreter dieser Gruppe ist das Myristylmyristat [GARCIA et al., 1996] [KHAN et al., 2015] [MCELENY et al., 1996]. Wachsester besitzen spezielle Eigenschaften, wie eine gute Fettlöslichkeit, Bioabbaubarkeit und eine geringe bis keine Toxizität sowie der Fähigkeit, die Haut vor dem Austrocknen zu bewahren und elastisch zu halten. Diese Eigenschaften machen Wachsester besonders geeignet für die Anwendung in Haarspülungen oder Feuchtigkeitscremes [HILLS, 2003] [KHAN et al., 2015]. Ein erhöhtes Bewusstsein in den Punkten Umwelt, Nachhaltigkeit und Achtsamkeit der Gesellschaft auf natürliche und chemikalienfreie Produkte verlangt ständig nach Alternativen zu herkömmlichen chemischen Synthesewegen. Die Biokatalyse bietet dabei eine geeignete Alternative zu der klassisch chemischen Synthese. Mit Hilfe von biokatalytischen Methoden können die Prozesse vereinfacht, die Produktqualität erhöht und Abfallprodukte reduziert werden. Als Biokatalysatoren werden dafür Lipasen, wie beispielsweise die *Candida antarctica* Lipase B (Novozym 435 und andere immobilisierte Formen) oder die Lipase von *Rhizumucor miehei* (freie Form oder immobilisiert auf als Lipozym RM IM) eingesetzt. Aufgrund der geringen mechanischen Stabilität der Enzymträger ist der Einsatz von Rührkesselreaktoren nicht geeignet, weshalb häufig Festbettreaktoren zum Einsatz kommen. Allerdings sind Festbettreaktoren bei der Umsetzung von Reaktanden mit hohen Molmassen oder hoher Viskosität ungeeignet. Bei Veresterungsreaktionen kann durch das gebildete Reaktionswasser das Gleichgewicht nicht vollständig auf die Seite der Produkte verschoben werden. Um dieses aus der Reaktionsmischung abzutrennen, werden häufig Vakuumtechniken angewendet [KHAN et al., 2015]. Für diese Art der Reaktionen werden Blasensäulen-, Membran- und Mikroreaktoren verwendet. Bei der Verwendung eines Blasensäulenreaktors wird mit Hilfe des durchströmenden Gases eine Durchmischung der Reaktanden erreicht sowie das Reaktionswasser ausgetragen. Gleichzeitig wird der immobilisierte Biokatalysator dabei wenig mechanisch belastet und kann mehrfach wiederverwendet werden. So zeigten Hilterhaus et al., dass die Synthese von Myristylmyristat in einem Blasensäulenreaktor

bei gleichen Ausbeuten (ca. 99,6 %) vier Mal schneller als in einem Rührkesselreaktor abgelaufen ist. Der Vergleich mit einem Festbettreaktor zeigte, dass bei Verwendung eines Blasensäulenreaktors die biokatalytische Synthese von Myristylmyristat doppelt so schnell stattfindet. Der Katalysator (Novozym 435) konnte sechs Mal rezykliert werden und ein Aktivitätsverlust konnte nicht beobachtet werden [HILTERHAUS et al., 2009]. Kosmetische Produkte, die einen hohen Wasseranteil aufweisen, werden besonders häufig durch Mikroorganismen kontaminiert. Diese Kontamination kann die Zusammensetzung des Produktes verändern oder auch den Konsumenten gesundheitlich gefährden. Pathogene Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus* oder *Pseudomonas aeruginosa* werden häufig in den kontaminierten Produkten gefunden. Um dies zu verhindern, setzen die Hersteller den Produkten Konservierungsmittel und antimikrobielle Wirkstoffe zu. Typische Zusätze sind Formaldehyd und Methylisothiazolinon sowie Ester wie Derivate der Benzoesäure und Parabene [DEL OLMO et al., 2015] [LUNDOV et al., 2009]. Somit sind die Ester eine wichtige Substanzklasse nicht nur für die kosmetische Industrie. Auch hier werden vermehrt erneuerbare und nachhaltige Systeme und Prozesse anstatt von klassisch chemischen Verfahren angewendet.

### 3.5. Medizinische Mikrobiologie

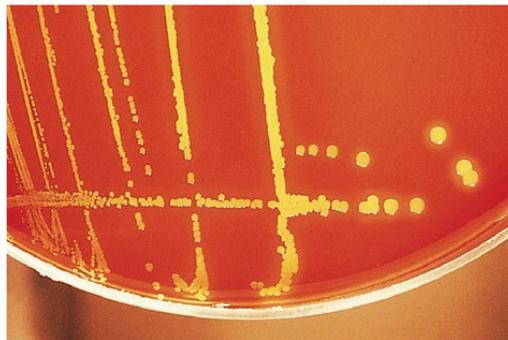
Die medizinische Mikrobiologie untersucht pathogene Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze sowie die von ihnen hervorgerufenen Symptome und Krankheiten des Wirts [WEBER et al., 1997]. Aufgrund einer weltweit breiten Anwendung im unnötig hohen Maße können Erreger zunehmend Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika ausbilden. Mittlerweile stellen solche multiresistenten Erreger ein großes Problem in Krankenhäusern dar. Diese Problemkeime sind vor allem Methicillin resistente *Staphylococcus aureus*, vancomycinresistente Enterokokken und multiresistente gramnegative Bakterien (MRGN). Sie sind entweder gegen drei oder alle der folgenden Antibiotikaklassen resistent (3MRGN und 4MRGN): Acylureidopinicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Fluorochinole [MAECHLER et al., 2017]. Im Folgenden werden die drei in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme vorgestellt.

### 3.5.1. Grampositive Bakterien

Die Zellwand von Grampositiven Bakterien ist aus einer mehrschichtigen Peptidoglycanhülle aufgebaut, welche weitaus dicker ist, als die von gramnegativen Bakterien. Beim Nachweis mit der Gramfärbung erscheinen sie dunkelblau [SUERBAUM et al., 2012].

#### 3.5.1.1. *Staphylococcus aureus*

Die *Staphylococcus aureus* Stämme, erstmals entdeckt 1878 von Robert Koch, sind Kokken bildende, fakultativ anaerobe Bakterien, welche Kohlenhydrate fermentativ verwerten können [SUERBAUM et al., 2012]. In Abbildung 3-6 ist der *Staphylococcus aureus* auf Blutagar dargestellt.



---

**Abbildung 3-6:** *Staphylococcus aureus* auf Blutagar [SUERBAUM et al., 2012]

Der Erreger kann sowohl oberflächlich-eitrige als auch tief-invasive eitrige Infektionen, die alle Organe befallen können, auslösen. *Staphylococcus aureus* ist ein sehr widerstandsfähiges Humanpathogen und kann über längere Zeit (30 min.) Temperaturen von bis zu 60 °C überstehen. Des Weiteren ist es in der Lage, den Magen- und Darmtrakt unbeschädigt zu passieren. Zudem kolonisiert dieser Bakterienstamm die Haut von etwa 20 - 50 % der Bevölkerung. Ihre starke Tenazität zeigen diese Stämme vor allem im Bereich der medizinischen Versorgung. So sind sie in der Lage auf medizinischen Materialien sowie in Staub zu überleben und stellen dadurch ein großes Problem in Krankenhäusern dar. Über 80 % der in Krankenhäusern auftretenden Stämme sind Penicillin resistent. Seit den 1960iger Jahren entwickelten sich Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (MRSA-Stämme), die Resistenzen gegen alle  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aufweisen [SUERBAUM et al., 2012] [WONG et al., 2017]. *Staphylococcus aureus* Stämme sind sehr anpassungsfähig, so trat die Methicillinresistenz bereits zwei Jahre nach

Einführung dieses Medikaments auf. Seit 2002 wird außerdem beschrieben, dass einige Stämme bereits eine Vacomycinantibiotikumresistenz entwickelt haben [WONG et al., 2017].

### 3.5.2. Gramnegative Bakterien

Gramnegative Bakterien besitzen eine komplexe, mehrschichtige Zellhülle, wobei innen eine dünne Mureinschicht vorliegt, die von einer äußeren Membran umgeben wird. Die äußere Membran besteht innen aus einer Phospholipidschicht und außen aus einer Polysaccharidschicht. Beim Nachweis mit der Gramfärbung wird der Farbstoff wieder ausgewaschen und die Bakterien besitzen danach eine unveränderte Farbe [SUERBAUM et al., 2012].

#### 3.5.2.1. *Escherichia coli*

Entdeckt wurde das *Escherichia coli* Bakterium 1885 von Theodor Escherich. Alle *Escherichia coli* Stämme sind begeißelt und dadurch beweglich [SUERBAUM et al., 2012]. In Abbildung 3-7 sind *Escherichia coli* Bakterien in Eiter dargestellt.

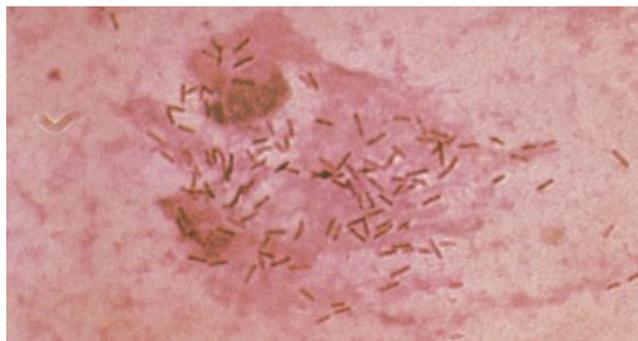


Abbildung 3-7: *Escherichia Coli* in Eiter [SUERBAUM et al., 2012]

Die *Escherichia coli* Bakterien kommen natürlich im Darmtrakt von Menschen und Tieren vor. Man unterscheidet fakultativ und obligat pathogene *Escherichia coli* Stämme, wobei erstere unter anderem Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen sowie Sepsen und letztere leichte bis schwere Durchfallerkrankungen auslösen können. *Escherichia coli* Bakterien zeigen eine starke Temperaturreistenz, so können sie von 4 bis 47 °C ihr Wachstum beibehalten, erst ab 60 °C werden sie abgetötet. Zudem zeigen auch einige diese Bakterienstämme eine Antibiotikaresistenz gegenüber

Penicillin und Cephalosporin bedingt durch das Vorhandensein von  $\beta$ -Laktamasen, die die Wirkung der Antibiotika aufheben [SUERBAUM et al., 2012].

### 3.5.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Das Stäbchenförmige *Pseudomonas aeruginosa* Bakterium ist 1900 von Walter Migula entdeckt worden [SCHUHMANN et al., 2011]. Es hat einen fakultativ anaeroben Stoffwechsel und ist begeißelt. In Abbildung 3-8 sind *Pseudomonas aeruginosa* Kolonien auf Blutagar dargestellt [SUERBAUM et al., 2012].



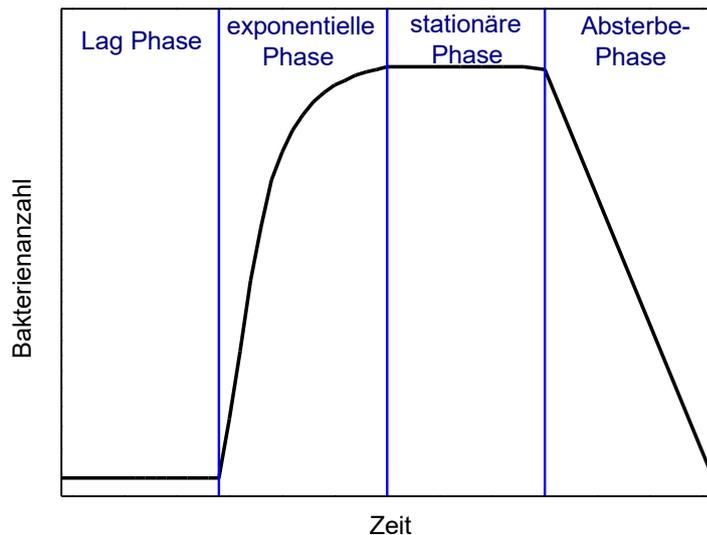
**Abbildung 3-8:** *Pseudomonas aeruginosa* auf Blutagar [SUERBAUM et al., 2012]

Diese Bakterienstämme kommen in der Natur im Erdboden, in Sümpfen und in küstennahen Lebensräumen sowie auf pflanzlichem und tierischem Gewebe vor. Auf nassen Oberflächen, wie beispielsweise auf Steinen, bilden sie dazu Biofilme aus. Sie besitzen eine hohe Umweltresistenz und zeigen zudem hohe Resistenzen gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und weiteren Antibiotikaklassen, wie z.B. Makrolide, auf. *Pseudomonas aeruginosa* Stämme lösen vor allem Atemwegs-, Harnwegs- und Wundinfektionen sowie im Krankenhaus erworbene (nosokomial) Pneumonien aus. Diese Stämme sind daher ein großes Problem für Kliniken, da sie dort Waschbecken, Toiletten und Duschen sowie Instrumente, Waschlotionen und Nahrungsmittel kolonisieren können [SUERBAUM et al., 2012].

### 3.5.3. Bakteriellles Wachstum

Das Wachstum von Bakterien kann in vier Phasen unterteilt werden: Lag Phase, exponentielle Phase, stationäre Phase und die Absterbephase. Diese sind in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt [SUERBAUM et al., 2012].

---



**Abbildung 3-9:** Schematische Darstellung der Wachstumsphasen des bakteriellen Wachstums [SUERBAUM et al., 2012]

Das Wachstumsmedium wird mit Bakterien angeimpft und bei einer für die Bakterien geeigneten Wachstumstemperatur inkubiert. Zunächst beginnen die Bakterien während der Lag Phase nicht mit dem Wachstum, da die im Medium vorhandenen Nährstoffe erst verwertet werden können, wenn die Bakterien die dafür notwendigen Enzyme gebildet haben. Sobald die benötigten Enzyme gebildet worden sind, können die Bakterien die vorhandenen Nährstoffe verstoffwechseln und mit der Zellteilung beginnen. Die Zellen befinden sich dann in der exponentiellen Phase ihres Wachstums. Dabei vermehren sich die Bakterien mit maximaler Vermehrungsgeschwindigkeit so lange bis sie die stationäre Phase erreichen. Während dieser Phase wird das Wachstum der Bakterien eingestellt. Eine mögliche Ursache dafür kann sein, dass die Bakterien während der exponentiellen Phase die gesamten Nährstoffe für ihr Wachstum verbraucht haben. Auch die Akkumulation von nicht abbaubaren Metaboliten im Medium kann die Bakterien in ihrem Wachstum hemmen. Während der Absterbephase verringert sich die Anzahl der lebenden Bakterien wieder, da diese durch die zuvor genannten Umstände gehemmt werden und absterben [SUERBAUM et al., 2012].

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Lipase Assay

Zur Bestimmung der Aktivität der *Candida antarctica* Lipase B werden zwei unterschiedliche Lipase Assays genutzt. Zum einen der photometrische Assay, bei dem die Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat untersucht wird und zum anderen die Veresterung von Laurinsäure mit *n*-Propanol.

#### 4.1.1. Hydrolyse von *p*-Nitrophenylpalmitat

Zu Beginn wird der Extinktionskoeffizient von *p*-Nitrophenol bestimmt. Dazu werden sechs unterschiedlich konzentrierte *p*-Nitrophenollösungen hergestellt und bei einer Wellenlänge von 401 nm vermessen. Zu eigentlichen Aktivitätsbestimmung werden in einer Küvette 890  $\mu$ L Glycinpuffer (0,1 mol/L, pH 9) und 10  $\mu$ L Substratlösung (*p*-Nitrophenylpalmitat, 10 mmol/L, Aceton) vorgelegt. Nach Zugabe von 100  $\mu$ L Enzymverdünnung (1 mg/ml, Cal B, Glycinpuffer) wird die Reaktion bei 401 nm über 60 s photometrisch verfolgt. Zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit werden die Enzymverdünnungen in Glycinpuffer angesetzt und für 1 h bei den entsprechenden Temperaturen (30 – 65 °C) inkubiert. Anschließend werden sie wie beschrieben analysiert. Alle Messungen erfolgten in dreifacher Ausführung.

#### 4.1.2. Veresterung von Laurinsäure mit *n*-Propanol

Zu *n*-Propanol (100 mmol/L) und Laurinsäure (100 mmol/L) werden 4 mL organisches Lösungsmittel (Aceton, Acetonitril, Heptan, MTBE, THF, Toluol) sowie 5 mg Cal B gegeben und bei 30 °C sowie 400 rpm geschüttelt. Nach 0, 5, 10, 20 und 30 min werden Proben entnommen und mittels GC vermessen.

## 4.2. Reaktionsverfolgung

Zu 20 mmol/L Bernsteinsäure werden 40 mmol/L Geraniol gegeben und mit 20 mL MTBE versetzt. Zum Start der Reaktion werden 40 mg Novozym 435 hinzugefügt und die Reaktionsmischung bei 50 °C für 48 h bei 400 rpm geschüttelt. Für die Optimierung der Reaktion werden folgende Parameter variiert: Lösungsmittel (MTBE, Hexan, Heptan, THF, Acetonitril, Aceton, ohne Lösungsmittel), Temperatur (30, 40, 50 °C), Substratverhältnis (Säure:Alkohol; 1:1, 1:2, 1:5, 2:1, 5:1) und Alkohol (Geraniol, Nerol, Citronellol, Zimtalkohol). Es werden zu bestimmten Zeiten Proben entnommen und mittels LC/MS bzw. GC vermessen. Alle Messungen werden mindestens in doppelter Ausführung durchgeführt.

## 4.3. Isolierung der synthetisierten Ester

Zu 250 mmol/L Säure werden 500 mmol/L Alkohol gegeben und mit 10 mL MTBE versetzt. Zum Start der Reaktion werden 250 mg Novozym 435 hinzugefügt und die Reaktionsmischung bei 50 °C für 4 - 48 h bei 400 rpm geschüttelt. Anschließend wird das Enzym abfiltriert und das Lösungsmittel abgedampft. Die synthetisierten Ester werden säulenchromatografisch aufgereinigt (Eluent: Toluol oder Toluol/Ethylacetat (98/2 - 70/30)).

## 4.4. Bestimmung von Verteilungskoeffizienten der Ester

Zur Bestimmung der Verteilungskoeffizienten werden die Verbindungen (10 mmol/L, bezogen auf ein Gesamtvolumen von 1 mL) in *n*-Octanol (500 µL) gelöst. Anschließend werden 500 µL Wasser zugegeben. Die Mischung wird für 3 h bei 30 °C und 400 rpm geschüttelt. Anschließend werden die Phasen getrennt und der Gehalt an Ester gaschromatografisch bestimmt.

## 4.5. Maßstabsvergrößerung

Die Versuche zur Maßstabsvergrößerung sind im Forschungslabor der IOI Oleo GmbH Witten durchgeführt worden.

#### **4.5.1. Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol**

In einem 2 L Mehrhalskolben, ausgestattet mit Thermometer, Rückflusskühler und Rührwerk, werden 27,6 g Bernsteinsäure, 72,3 g Geraniol (Substratverhältnis 1:2), 940 mL MTBE und 1,8894 g Novozym 435 gegeben. Das Reaktionsgemisch wird bei 60 °C über 23,5 h unter Rückfluss erhitzt. Über diesen Zeitraum werden in bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen und mittels GC/MS vermessen.

#### **4.5.2. Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol - ohne Lösungsmittel**

In einem 1 L Mehrhalskolben, ausgestattet mit Thermometer, Rückflusskühler, Wasserabscheider und Rührwerk, werden 318,1 g Bernsteinsäure, 209,7 g Geraniol (Substratverhältnis 2:1) und 10,75 g Novozym 435 gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 60°C erhitzt und ein Vakuum von 50 - 60 mbar angelegt. Da keine ausreichende Durchmischung erfolgte (zu viel Feststoff), werden 300 mL Wasser als Lösungsvermittler dazugegeben. Während der Reaktion wird das Wasser abdestilliert und eine Probe entnommen. Die Analytik ergibt, dass bis dahin kein Umsatz erfolgt. Nachdem das hinzugefügte Wasser aus dem Reaktionsgemisch entfernt wurde, wird erneut keine ausreichende Durchmischung erreicht und die Temperatur stieg auf 80 °C. Es werden nochmals 210,3 g Geraniol (Substratverhältnis 1:1) und 10,8 g Novozym 435 zu der Reaktionsmischung gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 60 °C erhitzt und ein Vakuum von 50 - 60 mbar angelegt, um das Reaktionswasser aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen. Über einen Zeitraum von 7,5 h werden kontinuierlich Proben entnommen und mittels GC/MS vermessen.

#### **4.5.3. Veresterung von Bernsteinsäure mit Zimtalkohol**

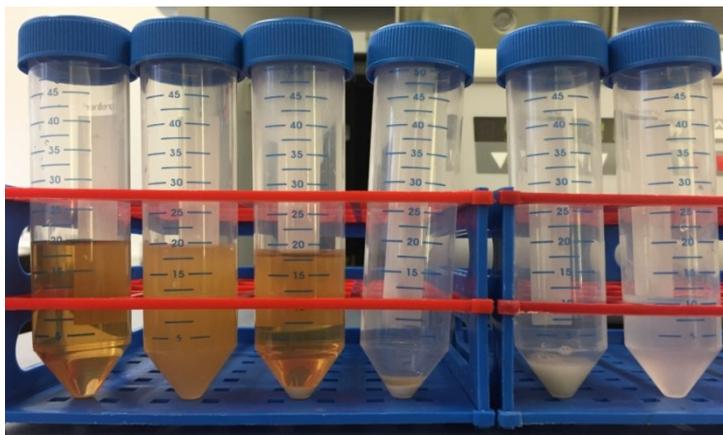
In einem 1 L Mehrhalskolben, ausgestattet mit Thermometer, Rückflusskühler, Wasserabscheider und Rührwerk, werden 153,1 g Bernsteinsäure, 347,4 g Zimtalkohol (Substratverhältnis 1:2) und 10,4 g Novozym 435 gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 60 °C erhitzt und ein Vakuum von 23 – 30 mbar angelegt, um das Reaktionswasser zu entfernen. Über einen Zeitraum von 16 h werden kontinuierlich Proben entnommen und mittels GC/MS vermessen.

## 4.6. Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der synthetisierten Ester

Die Untersuchungen zur Bestimmung der antibakteriellen Eigenschaften werden in einem wässrigen Medium, Tryptophan Soya Broth (TSB) oder Lennox Base (LB), sowie in Phosphatpuffer durchgeführt. Da die zu untersuchenden Ester nur geringfügig bis gar nicht in Wasser löslich sind, werden diese zunächst in Methylacetat vorgelöst. Die verwendeten Stammlösungen haben jeweils eine Konzentration von 100 und 250 mmol/L. Sie werden für die Experimente auf 3 bzw. 10 mmol/L verdünnt. Für die Übernachtskulturen werden 20 mL Medium mit Bakterien angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Für *Staphylococcus aureus* wird das TSB und für *Escherichia coli* sowie *Pseudomonas aeruginosa* das LB Medium verwendet.

### 4.6.1. Killing Assay

Die Übernachtskultur wird zunächst zentrifugiert (4000 rpm, 10 min) und der Überstand anschließend abdekantiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wird mit 1 mL einer Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS-Puffer) versetzt und aufgeschlämmt. Anschließend wird die Bakteriensuspension verdünnt und auf eine optische Dichte (OD 600, photometrischer Assay bei  $\lambda = 600$  nm) von 1,5 (*Staphylococcus aureus*) und 0,35 (*Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) eingestellt.



**Abbildung 4-1:** Vorbereitung der Bakteriensuspension für den Killing Assay

Von der Bakteriensuspension werden je 970 bzw. 960  $\mu$ L in Eppendorfgefäße pipettiert und mit 30 bzw. 40  $\mu$ L der Stammlösung (100 bzw. 250 mmol/L) versetzt. Die Probengefäße werden bei Raumtemperatur (20 – 22 °C) aufbewahrt und nach 4 sowie 24 h werden jeweils 100  $\mu$ L Proben entnommen. Die entnommenen Proben werden

anschließend sechs Mal verdünnt (1:10). Die Verdünnungen werden dann ausplattiert (TSB-/ LB-Agar) und bei 37 °C über Nacht im Brutschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Alle Versuche wurden für jeden untersuchten Ester vierfach wiederholt.

### **4.6.2. Wachstumsversuche**

Die Übernachtskultur wird 1:20 mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Von dieser Verdünnung werden je 485 bzw. 480 µL in Eppendorfgefäße pipettiert und mit 15 bzw. 20 µL der Stammlösung versetzt. Anschließend werden je zwei Mal 200 µL der vorbereiteten Bakteriensuspension in zwei verschiedene Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wird anschließend in ein auf 37 °C temperiertes Multikanal-Photometer gestellt, in welchem die Extinktion halbstündig über einen Zeitraum von 24 h gemessen wird.



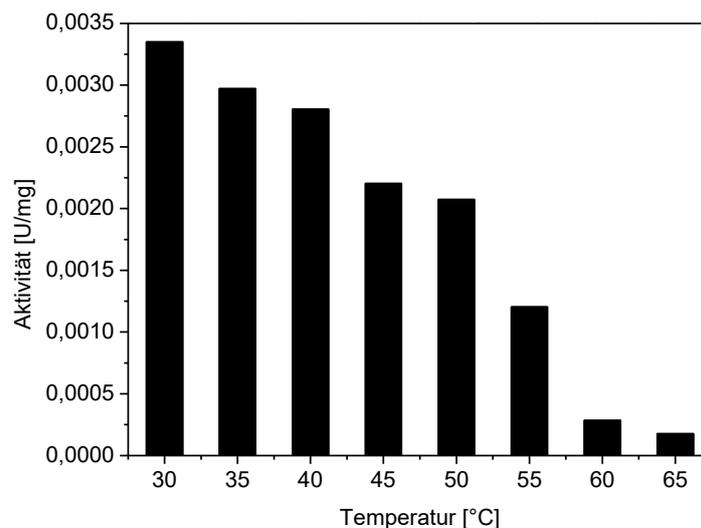
## 5. Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Arbeit dargestellt und diskutiert. Zunächst erfolgt die Charakterisierung hinsichtlich der Temperatur-, und Lösungsmittelabhängigkeit der *Candida antarctica* Lipase B. Im zweiten Teil wird die Reaktionsoptimierung der Testreaktion, bei welcher Bernsteinsäure und Geraniol als Substrate dienen, vorgestellt. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Lösungsmittel und Temperaturabhängigkeit sowie des Verhältnisses der Substrate und den Einsatz anderer Alkohole gelegt. Anschließend werden die Isolierungsexperimente gezeigt sowie die Versuche zur Maßstabsvergrößerung dargestellt und diskutiert. Die Untersuchungen zur Bestimmung des antibakteriellen Potentials der isolierten Ester werden im letzten Abschnitt dieses Kapitels erläutert.

### 5.1. Charakterisierung der *Candida antarctica* Lipase B

#### 5.1.1. Temperaturabhängigkeit

Zur Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Cal B wurde ein Bereich zwischen 30 - 65 °C gewählt. Die Enzymverdünnung wurde vorbereitet und für jeweils eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. In Abbildung 5-1 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

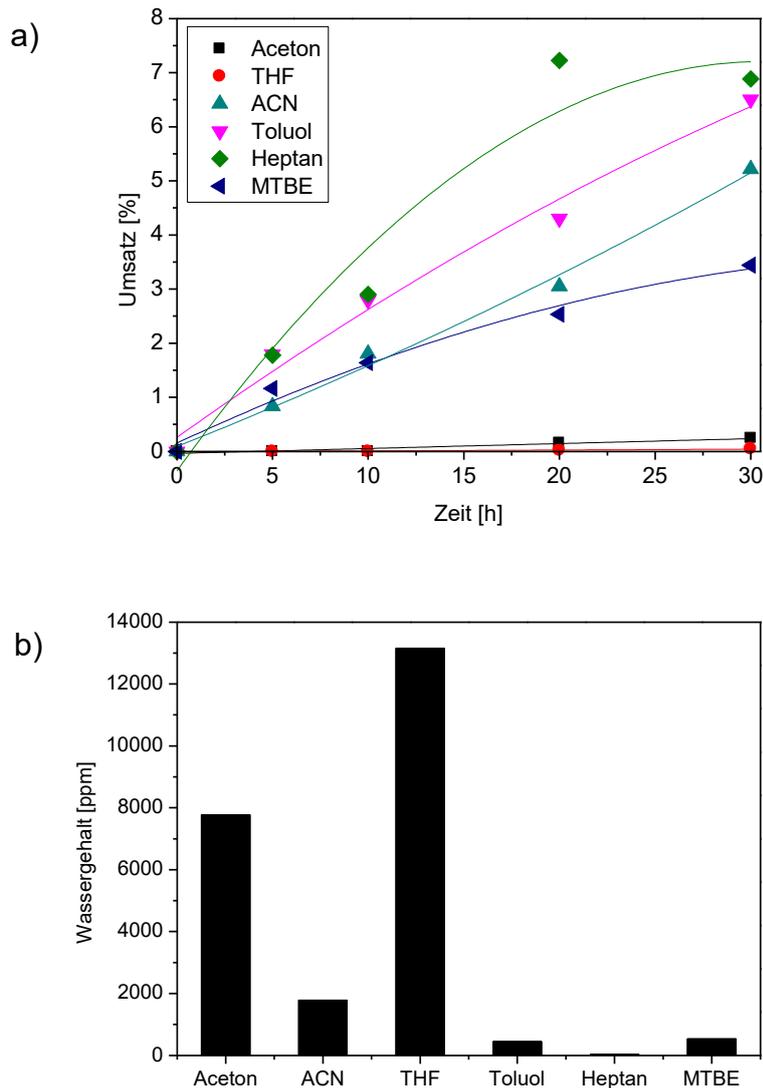


**Abbildung 5-1:** Temperaturabhängigkeit der freien *Candida antarctica* Lipase B (898  $\mu$ L Glycin-Puffer (0,1 M, pH 9), 10  $\mu$ L Substratlösung (p-NPP, 10 mmol/L, Aceton), 100  $\mu$ L Enzymverdünnung (1 mg/mL, inkubiert für 1 h bei 30/ 35/ 40/ 45/ 50/ 55/ 60 und 65 °C, 400 rpm))

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Aktivität der freien *Candida antarctica* Lipase B mit steigender Temperatur abnimmt. Des Weiteren kann der Abbildung entnommen werden, dass die Aktivität der *Candida antarctica* Lipase B bei Temperaturen zwischen 30 und 50 °C leicht und bei Temperaturen oberhalb von 55 °C stark abnimmt. Die *Candida antarctica* Lipase B ist durch ihren Ursprung ein an niedrige Temperaturen angepasstes Enzym. Es zeigt eine hohe katalytische Aktivität bei niedrigen Temperaturen, welche mit steigender Temperatur abnimmt [JOSEPH et al., 2008] [LEE et al., 2017]. Das Temperaturscreening bestätigt dieses Verhalten, so zeigt die freie *Candida antarctica* Lipase B, bei 30 °C zeigt die höchste Aktivität, die dann bis 50 °C stetig sinkt. Weiterhin ist bekannt, dass durch die Erhöhung der Temperatur auf oberhalb von 50 °C die meisten Enzyme denaturieren und so nicht mehr katalytisch aktiv sind [AL-ZUHAIR et al., 2003]. Dies erklärt den beobachteten starken Aktivitätsabfall oberhalb von 50 °C. Durch Immobilisierung kann sowohl die Thermostabilität als auch Aktivität, Spezifität, Wiederverwendbarkeit und Handhabung des Enzyms verbessert werden. Die Lipase ist ein häufig in der Industrie verwendetes Enzym, welches in freier und immobilisierter Form kommerziell, wie beispielsweise das Novozym 435, produziert wird. Neben der Immobilisierung kann auch die Verwendung von organischen Lösungsmitteln zu einer Verbesserung der Thermostabilität führen. Als Folge dessen ist die *Candida antarctica* Lipase B bei Verwendung im nicht wässrigen Medium bis 60°C stabil [LEE et al., 2017].

### 5.1.2. Lösungsmittelabhängigkeit

Für die Lösungsmittelabhängigkeit, wurden folgende Lösungsmittel verwendet: Hexan, Heptan, MTBE, Toluol, THF, Aceton (Abbildung 5-2 a). Die Abbildung zeigt, dass mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels die Aktivität sinkt. In unpolaren Lösungsmitteln werden höhere Umsätze erreicht. Die durchgeführte Veresterungsreaktion von Laurinsäure und n-Propanol ist eine Gleichgewichtsreaktion und verläuft reversibel, d.h. dass auch die Rückreaktion (Hydrolyse) gleichzeitig stattfinden kann. Die *Candida antarctica* Lipase B ist in der Lage sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion zu katalysieren (Hydrolyse/Veresterung). Je mehr Wasser im System vorliegt, desto stärker verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der Substrate, was mit einer geringeren Produktausbeute einhergeht. In Abbildung 5-2 b sind die gemessenen Wassergehalte der verwendeten Lösungsmittel vor Beginn der Reaktion dargestellt.



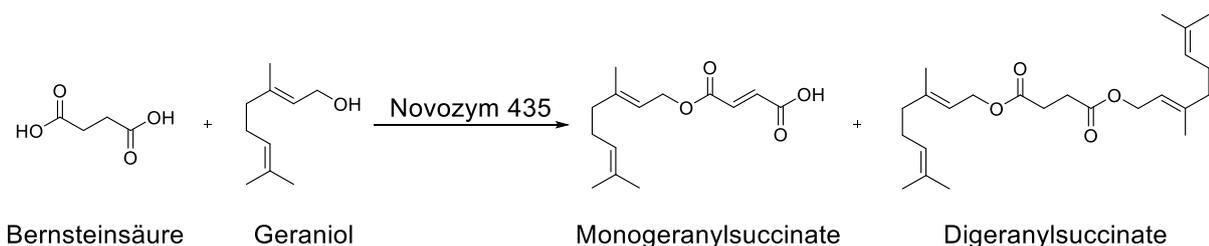
**Abbildung 5-2:** a) Lösungsmittelabhängigkeit der *Candida antarctica* Lipase B bei der Veresterungsreaktion von Laurinsäure mit n-Propanol (*n*-Propanol (100 mmol/L), Laurinsäure (100 mmol/L), 4 mL organisches Lösungsmittel, freie Cal B (5 mg), 30 °C, 400 rpm) b) Wassergehalte der eingesetzten Lösungsmittel

Wie der Abbildung 5-2 b entnommen werden kann, weisen die polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmittel sehr hohe Wassergehalte auf. Die unpolaren, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmittel hingegen enthalten weniger Wasser. Beim Vergleich mit den Umsätzen aus Abbildung 5-2 a, kann festgestellt werden, dass die Umsätze in mittel bis unpolaren Lösungsmitteln (ACN, MTBE, Toluol, Heptan) höher sind, als in polaren Lösungsmitteln (Aceton, THF). Durch den hohen Wassergehalt in diesen Lösungsmitteln wird die Hydrolyse bevorzugt katalysiert und das Gleichgewicht liegt auf Seiten der Edukte. So werden häufig Hexan, Heptan, Isooctan, MTBE und lösungsmittelfreie Systeme für Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen verwendet [ALMEIDA et al., 2017] [TANG et al., 2017] [UNGCHAROENWIWAT et al., 2016]. Der log P Wert wird häufig in Zusammenhang mit für Veresterungsreaktionen geeigneten Lösungsmitteln verwendet. Dieser Wert ist ein Maß dafür, wie hydrophob ein

Lösungsmittel ist [UNGCHAROENWIWAT et al., 2016]. Stark hydrophobe Lösungsmittel mit  $\log P > 4$  werden oft als geeignetste Lösungsmittel für Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen angegeben. Im Gegensatz dazu sind Lösungsmittel mit  $\log P$  Werten zwischen 2 und 4 mäßig geeignet und die polaren Lösungsmittel mit  $\log P$  Werten  $< 2$  wären ineffektiv. Das optimale Reaktionsmedium sollte jedoch mit Hilfe experimenteller Untersuchungen gefunden werden [TANG et al., 2017]. Wird diese Theorie auf die durchgeführte Reaktion angewendet, so kann festgestellt werden, dass das Lösungsmittel mit dem höchsten  $\log P$  Wert, Heptan ( $\log P$  4,24) auch den größten Umsatz zeigt. Einige Veresterungsreaktionen von beispielsweise Flavonoiden werden in mittelpolaren bis polaren Lösungsmitteln durchgeführt [ARAUJO et al., 2016]. Wahrscheinlich liegt, durch die geringe Löslichkeit von Flavonoiden in unpolaren organischen Lösungsmitteln, nicht genügend Substrat gelöst vor und kann nicht vom Enzym umgesetzt werden. In mittelpolaren und polaren Lösungsmitteln ist die Löslichkeit der Flavonoide besser und es steht mehr gelöstes Substrat für die Reaktion zu Verfügung, sodass auch mehr Umsatz erreicht werden kann.

## 5.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

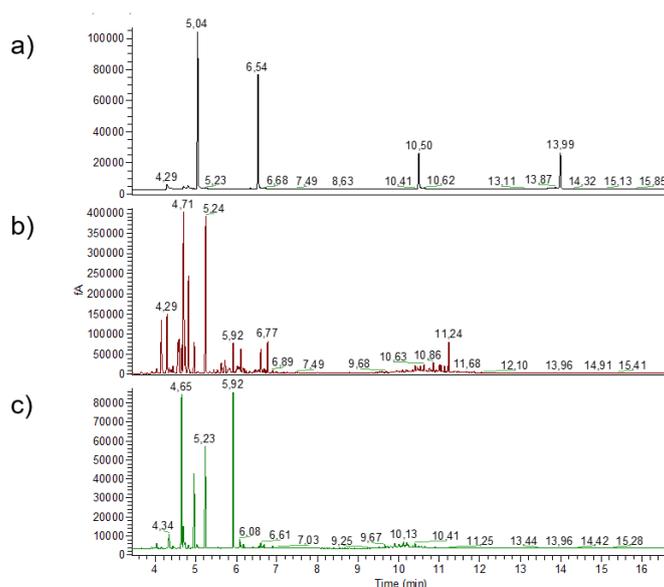
Für die Optimierung wurde eine Testreaktion mit Bernsteinsäure und Geraniol als Substrate genutzt, welche in Abbildung 5-3 ist dargestellt ist. Während der Reaktion wird zunächst unter Wasserabspaltung der Monoester gebildet, welcher dann in einem weiteren Schritt unter erneuter Wasserabspaltung zum Diester reagiert.



**Abbildung 5-3:** Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol

### 5.2.1. Vorversuche

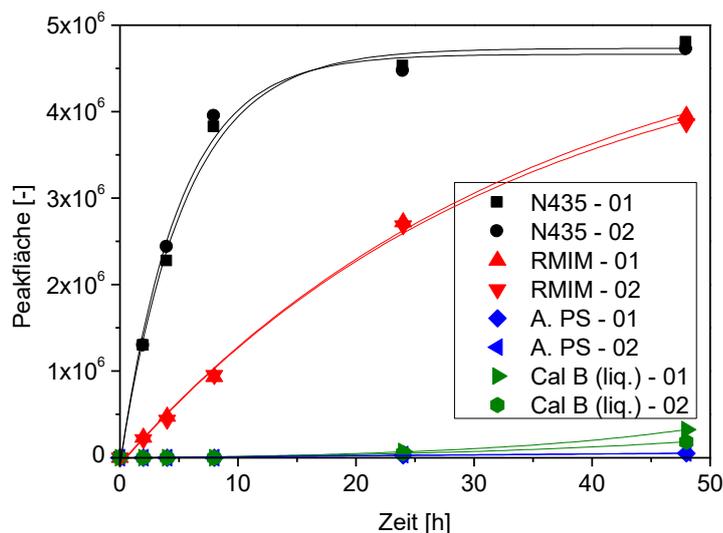
Es erfolgte ein Vergleich zwischen der klassisch chemischen Synthese von Estern und der Lipase katalysierten Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure mit Geraniol. In Abbildung 5-4 sind die dazugehörigen GC Chromatogramme dargestellt. Wie an den Chromatogrammen zu erkennen ist, hat die Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol bei den klassisch chemischen Varianten kaum bis gar nicht stattgefunden. Die Ursachen hierfür liegen in den Reaktionsbedingungen begründet. Wenn Alkene unter sauren Bedingungen reagieren, können Nebenreaktionen auftreten. Dabei greift die Säure die Doppelbindungen der Alkene an und wird durch eine nucleophile Addition an die Doppelbindungen anlagert. Dadurch können eine Vielzahl von Nebenprodukten gebildet werden. Zudem sind die verwendeten Säuren nur in katalytischen Mengen in der Reaktionsmischung vorhanden. Bei Verbrauch der Säure durch eine Nebenreaktion, steht sie der eigentlichen Veresterung nicht mehr zur Verfügung wodurch die Esterbildung gehemmt wird.



**Abbildung 5-4:** GC Chromatogramme a) Lipase katalysierte Synthese (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm) b) klassisch chemische Synthese mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> c) klassisch chemische Synthese mit *p*-TSS (Geraniol: 6,54 min, Monogeranylsuccinat: 10,50 min, Digeranylsuccinat: 13,99 min)

Die analytischen Messungen der Vorversuche wurden an der LC/MS durchgeführt. Da dort nur der Diester detektiert werden konnte, konnten nur die Peakflächen des Diesters zu Auswertung herangezogen werden. Im Folgenden werden diese Vorversuche vorgestellt und diskutiert.

Zunächst wurden mehrere Lipasen hinsichtlich ihrer Aktivität auf die Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol untersucht: Novozym 435, Lipozym RM IM, Amano PS und eine flüssige Cal B. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-5 dargestellt. Das Novozym 435 zeigt dabei die höchste Aktivität für die durchgeführte Reaktion. Auch das Lipozym RM IM zeigt einen ähnlich hohen Umsatz wie das Novozym 435 nach 48 h. Die Equilibrierung der Veresterungsreaktion, die durch das Novozym 435 katalysiert wurde, erfolgte dabei bereits nach 24 h. Die Amano PS Lipase und die flüssige *Candida antarctica* Lipase B zeigen nahezu keine Aktivität auf die untersuchte Reaktion. Vermutlich führen die erhöhten Temperaturen dabei zur Denaturierung und damit zur Desaktivierung der katalytischen Aktivität der Enzyme. Durch die Immobilisierung der Enzyme (Novozyym 435 und Lipozym RMIM) kann unter anderem deren Thermostabilität verbessert werden [AL-ZUHAIR et al., 2003] [LEE et al., 2017]. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist das Novozym 435 für alle weiteren Messungen verwendet worden.

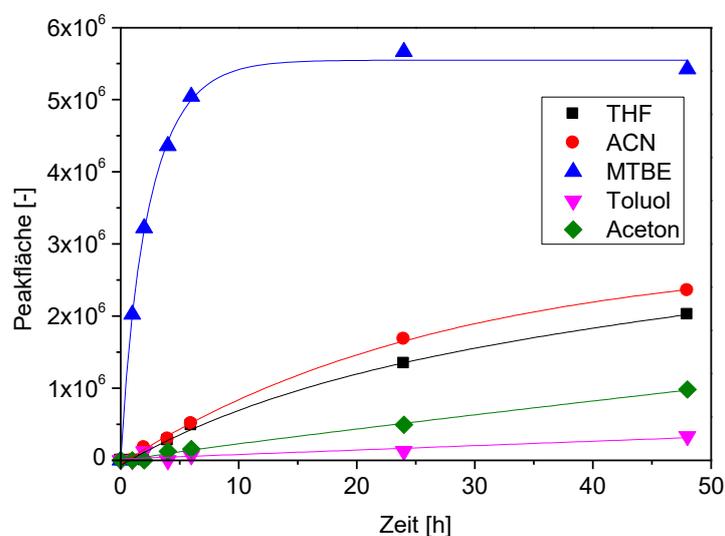


**Abbildung 5-5:** Enzymscreening der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435/ 20 mg Lipozym RM IM/ 40 mg Amano PS/ 10 µL Cal B (liq.), 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm) 01 und 02 sind dabei jeweils Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Auch Kuo et al. testeten sowohl das Novozym 435 als auch das Lipozym RM IM für die Veresterungsreaktion von Cetylalkohol und Oktansäure. Bei ihren Untersuchungen fanden sie heraus, dass beide Enzyme hohe Ausbeuten an Cetyloctanoat produzieren, jedoch erreichte das Novozym 435 dies in einer kürzeren Zeit und mit einer geringeren Enzymmenge [KUO et al., 2012]. Was auch die hier durchgeführten Messungen bestätigen. Zudem beschrieben Rahman *et al.*, dass die *Candida antarctica* Lipase B eine hohe Aktivität gegenüber Dicarbonsäuren aufweist [RAHMAN et al., 2011].

Für die Bestimmung der Lösungsmittelabhängigkeit sind verschiedene Lösungsmittel getestet worden: THF, Acetonitril, MTBE, Toluol, Aceton, Hexan, Heptan

(Abbildung 5-6). Bei der Reaktionsführung in Hexan und Heptan konnte kein Produkt detektiert werden. Die Verwendung von Toluol und Aceton als Reaktionsmedium erreichte nur eine geringe Produktbildung. Bei Durchführung der Reaktion in THF und Acetonitril konnte nur eine leichte Steigerung der Produktausbeute festgestellt werden. Als geeignetstes Lösungsmittel hat sich das MTBE herausgestellt. So zeigt der Reaktionsverlauf, dass bereits nach ca. 24 h der Gleichgewichtszustand der Reaktion erreicht ist, wenn MTBE als Reaktionsmedium eingesetzt wird. Alle weiteren Untersuchungen sind ausgehend von diesen Ergebnissen in MTBE durchgeführt worden.

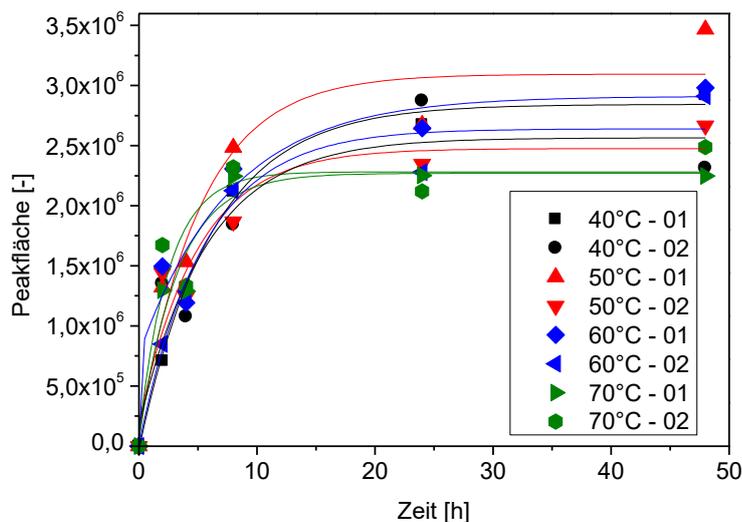


**Abbildung 5-6:** Lösungsmittelabhängigkeit der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL THF, ACN, MTBE, Toluol, Aceton, 50 °C, 400 rpm)

Wie bereits beschrieben, kann der log P Wert eine Hilfe für die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels sein. Demnach sollen stark hydrophobe Lösungsmittel mit  $\log P > 4$  oft die geeignetsten Lösungsmittel für Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen sein [TANG et al., 2017]. So besitzt MTBE einen log P Wert von 1,29 und wäre nach dieser Hypothese kein geeignetes Lösungsmittel für Veresterungsreaktionen. Jedoch spielen neben der Hydrophobizität des Lösungsmittels weitere Faktoren eine Rolle. Beispielsweise kann das Lösungsmittel selbst durch seine Polarität oder Struktur mit dem aktiven Zentrum des Enzyms interagieren und so einen Lösungsmittel-Enzym-Komplex bilden, wodurch das Enzym die Reaktion nicht mehr katalysieren kann. Hydrophobe Lösungsmittel könnten auch durch Abstreifen der am Enzym befindlichen Hydrathülle die Struktur des Enzyms verändern oder es denaturieren. Yan et al. untersuchten unter anderem die Lösungsmittelabhängigkeit der *Candida antarctica* Lipase B katalysierten kinetischen Racematspaltung von ( $\pm$ )-Menthol. Sie testeten verschiedene Lösungsmittel (log P

Wert zwischen 0,49 bis 4,5) mit dem Ergebnis, dass ebenfalls MTBE die besten Umsätze für die durchgeführte Reaktion lieferte [YAN et al., 2017].

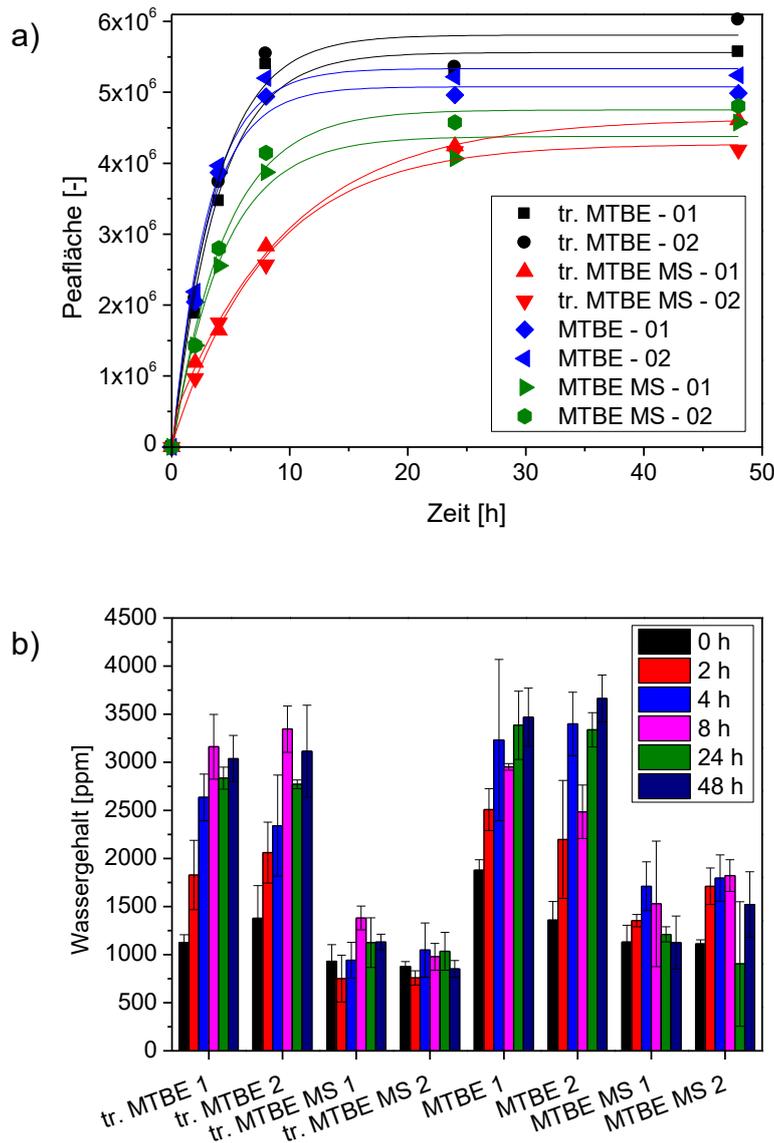
Viele in der Literatur beschriebene Veresterungsreaktionen finden bei Reaktionstemperaturen zwischen 40 -70 °C statt [ALMEIDA et al., 2017]. Daher ist dieser Temperaturbereich für die Bestimmung der Temperaturabhängigkeit ausgewählt worden. In Abbildung 5-7 sind die dazugehörigen Daten aufgetragen. Die Graphen zeigen trotz unterschiedlicher Reaktionstemperaturen einen ähnlichen Verlauf. Die Reaktionstemperatur von biokatalytischen Synthesen ist ein entscheidender Parameter. So wird die Löslichkeit der Substrate im Reaktionsmedium verbessert, die molekularen Kollisionen erhöht, Stofftransferlimitierungen reduziert und die Interaktion zwischen Enzym und Substrat unterstützt, wenn die Reaktionstemperatur erhöht wird. Die Enzyme sind in einem bestimmten Temperaturbereich stabil, jedoch kann eine Abnahme der katalytischen Aktivität und Stabilität auftreten, wenn die Reaktionstemperatur über diesen Bereich ansteigt, was zu einer thermischen Deaktivierung des Enzymes führt [ALMEIDA et al., 2017] [ZHAO et al., 2017].



**Abbildung 5-7:** Temperaturabhängigkeit der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 40/ 50/ 60/ 70 °C, 400 rpm) 01 und 02 sind dabei jeweils Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Anhand dieser Untersuchungen konnte keine optimale Reaktionstemperatur bestimmt werden. Bei industriellen Verfahren ist es von Wichtigkeit, dass die Prozesskosten möglichst gering gehalten werden. Wird viel Energie für einen Prozess aufgewendet, beispielsweise durch hohe Reaktionstemperaturen, sind auch die Prozesskosten hoch. Folglich sollte für alle weiteren Messungen die geringstmögliche Temperatur (weniger Energieaufwendung) verwendet werden: 40 °C. Da die Bernsteinsäure aber erst ab 50 °C Reaktionstemperatur vollständig im Medium gelöst wurde, wird diese Temperatur für alle weiteren Messungen verwendet.

Ein weiterer Faktor, der bei Veresterungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt, ist der bereits erwähnte Wassergehalt. Hierbei liegt die Schwierigkeit darin, dass das Enzym eine gewisse Menge an Wasser benötigt, um optimal zu arbeiten. Allerdings sollte bei Veresterungsreaktionen mit einem möglichst niedrigen Wassergehalt gearbeitet werden, da durch das Vorhandensein von Wasser die Rückreaktion (Hydrolyse) eintritt [BANIK et al., 2017]. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden die Reaktionen in getrocknetem und nicht getrocknetem MTBE sowie mit dem Zusatz von Molsieben durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion mittels LC/MS verfolgt und parallel Wassergehaltsbestimmungen durchgeführt. Die dazugehörigen Daten sind in Abbildung 5-8 zusammenfassend dargestellt. Bei der Durchführung der Reaktion in getrocknetem MTBE können die höchsten Produktkonzentrationen erzielt werden, wobei die Unterschiede der einzelnen Messungen nicht signifikant sind. Auch bei der Verwendung von nicht getrocknetem MTBE werden ähnlich hohe Produktkonzentrationen erhalten, während die Reaktionsverläufe für die durchgeführten Reaktionen mit Molsieben als Trockenmittel den geringsten Umsatz zeigen. Beim Vergleich der Reaktionsverläufe mit den dazugehörigen Wassergehalten, kann festgestellt werden, dass bei niedrigen Wassergehalten zwischen 1000 – 1500 ppm (mit Molsieben) geringe und für Wassergehalte bis 3000 ppm (ohne Molsiebe) höhere Produktkonzentrationen detektiert werden können. Unter den untersuchten Bedingungen ist ein Wassergehalt von 2000 – 3000 ppm vorteilhaft für die durchgeführte Reaktion. Außerdem ist erkennbar, dass sich das Gleichgewicht der Reaktion, bei Verwendung von Molsieben, erst später einstellt. Daraus kann geschlossen werden, dass der Einsatz von Molsieben unvorteilhaft für diese Reaktion ist. Die Rolle des Wassergehalts untersuchten auch Zhao et al. bei der Lipase katalysierten Umesterung von Sojabohnenöl mit Methanol und Butanol unter Verwendung des Lipozyms TL IM. Sie führten die Umesterungsreaktion bei verschiedenen Wassergehalten und Enzymkonzentrationen durch. Sie fanden dabei heraus, dass bei allen Enzymkonzentrationen (5, 10, 15, 20 % bezogen auf die Masse der Substrate) ein Wassergehalt von mehr als 0,9 % eine Abnahme des Umsatzes hervorruft. Zudem konnten sie feststellen, dass durch die Erhöhung der Enzymkonzentration auch höhere Umsätze bei Wassergehalten zwischen 0,3 bis 0,9 % erreicht werden konnten [ZHAO et al., 2017].



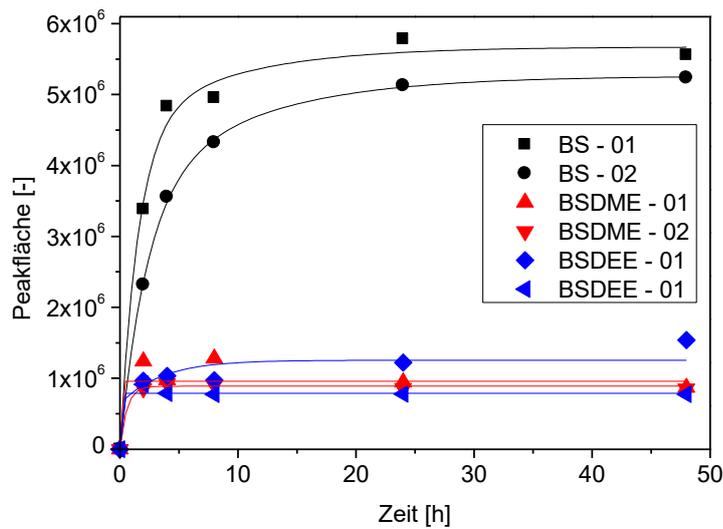
**Abbildung 5-8:** Wassergehaltsbestimmungen der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE (getrocknet und nicht getrocknet), mit und ohne Molsieben (3 A), 50 °C, 400 rpm) 01 und 02 sind dabei jeweils Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Durch Umesterungsreaktionen kann das Gleichgewicht zugunsten des gewünschten Produktes verschoben werden, da somit ein Entstehen von reaktionshemmendem Wasser vermieden werden kann. So soll das Gleichgewicht auf Seiten der Reaktionsprodukte verschoben werden, da das Nebenprodukt aus der Reaktionslösung entfernt werden kann und somit nicht mehr für die Rückreaktion zu Verfügung steht [YADAV et al., 2003]. Dabei sind Methyl-, Ethyl-, Isopropenyl- und vor allem Vinylester geeignete Substrate für Umesterungsreaktionen [XIN et al. 2017] [YADAV et al., 2003]. In Tabelle 5-1 sind die Reaktionsbedingungen für die Veresterungs- bzw. Umesterungsreaktion von Essigsäure bzw. Vinylacetat mit Zimtalkohol dargestellt.

**Tabelle 5-1:** Vergleich der Reaktionsbedingungen der Veresterungs- bzw. Umesterungsreaktion von Essigsäure bzw. Vinylacetat mit Zimtalkohol [CAI et al., 2017] [WU et al., 2014]

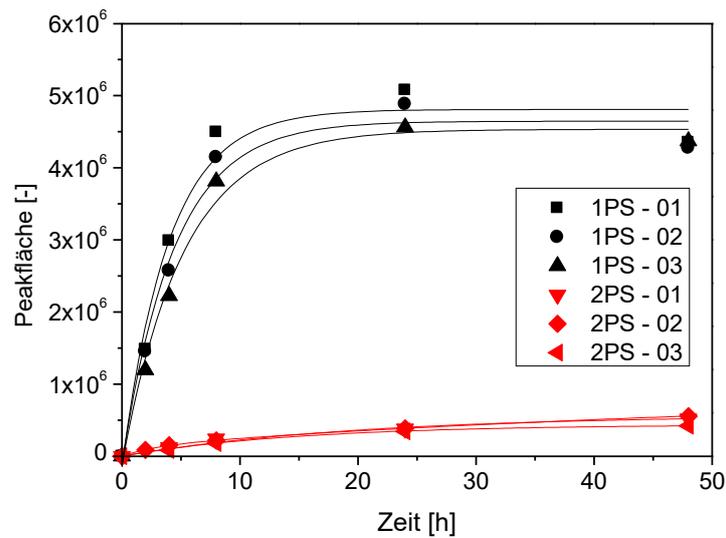
<b>Bedingungen</b>	<b>Wu et al., 2014</b>	<b>Cai et al., 2017</b>
Reaktionstyp	Veresterung	Umesterung
Verhältnis der Substrate (Säure bzw. Ester: Alkohol)	2:1	2:1
Lipase	<i>Porcine pankreas</i> Lipase immobilisiert auf Metallkeramikpulver	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i> Lipase
Temperatur	35 °C	40 °C
Lösungsmittel	Hexan	Hexan
Reaktionszeit	10 h	4 h
Ausbeute	62 %	93 %

Der Tabelle 5-1 kann entnommen werden, dass die Reaktionen unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt worden sind. So wurde das gleiche Substratverhältnis und Lösungsmittel sowie eine ähnliche Reaktionstemperatur verwendet. Jedoch sind unterschiedliche Lipasen und auch unterschiedliche Acyldonoren zum Einsatz gekommen. Bei der direkten Veresterung konnten Wu et al. nur einen Umsatz von rund 62 % erreichen [WU et al., 2014] und Cai et al. konnten zeigen, dass sie bei der Durchführung einer Umesterungsreaktion eine Ausbeute von 93 % erreichen [CAI et al., 2017]. Somit war es Cai et al. möglich durch die Umesterung die Reaktionszeit, um 6 h zu verkürzen und die Ausbeute an Cinnamylacetat um 30 % steigern. Auch für die Testreaktion sollte untersucht werden, ob durch eine Umesterungsreaktion die Ausbeute des Diesters erhöht werden kann. Für diese Versuche sind zunächst Bernsteinsäuredimethyl- und Bernsteinsäurediethylester hergestellt worden. Diese wurden anstelle von Bernsteinsäure als Substrate eingesetzt. In Abbildung 5-9 sind die dazugehörigen Reaktionsverläufe gezeigt. Bei der direkten Veresterung viel höhere Produktkonzentrationen als bei den Umesterungsreaktionen erreicht. Die Dimethyl- und Diethylester der Bernsteinsäure sind ausgehend von diesen Untersuchungen keine geeigneten Ausgangsstoffe für die durchgeführte Reaktion. Werden die erhaltenen Ergebnisse mit den Ergebnissen von Cui et al. und Wu et al. verglichen, so fällt auf, dass die Reaktionsbedingungen abweichen. So wird in dieser Arbeit ein anderes Lösungsmittel, eine andere Lipase, Methyl- und Ethylester anstatt eines Vinylesters sowie eine höhere Reaktionstemperatur verwendet. Auch Xin et al. erhielten bei der Lipase katalysierten Synthese von L-Ascorbylfluribipronat eine höhere Ausbeute (61 %) für die direkte Veresterung von L-Ascorbinsäure und Fluribiprofen als bei der Umesterung des Fluriprofenmethylesters [Xin et al., 2017].



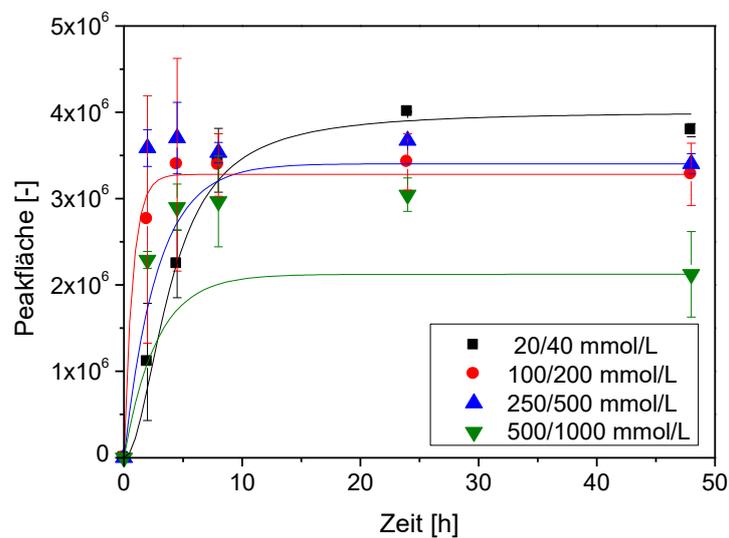
**Abbildung 5-9:** Vergleich von direkter Veresterung (Bernsteinsäure) und Umesterung (BSDME, BSDEE) der Beispielreaktion (20 mmol/L Bernsteinsäure/ BSDME/ BSDEE, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm) 01 und 02 sind dabei jeweils Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Um das Gleichgewicht der Reaktion auf die Seite der Produkte zu verschieben, gibt es die Möglichkeit der *in situ* Produktabtrennung. Dabei wird das Produkt kontinuierlich durch beispielsweise Extraktion oder Kristallisation aus der eigentlichen Reaktionsmischung abgetrennt. Dadurch wird die Bildung von einem Produkt begünstigt [BUQUE-TABOADA et al., 2004] [FREEMAN et al., 1993] [HECKE et al., 2014] [WOODLEY et al., 2008]. Für diesen Ansatz wurde die Reaktion in ein zwei-Phasen-System, bestehend aus Wasser und MTBE, übertragen. Während der Reaktion sollte das Produkt durch Anreicherung in der organischen Phase aus der Reaktionsphase abgetrennt werden. Duwensee et al. zeigten, dass die Lipase katalysierte Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol in einem Zwei-Phasen-System, bestehend aus einer wässrigen Reaktionsphase und einer organischen Extraktionsphase, abläuft. Mit diesem System erzielten sie einen Umsatz von 98 % und erhielten niedermolekulare Polyester mit Molmassen zwischen 1800 und 2500 g/mol [DUWENSEE et al., 2010]. Die Durchführung der Lipase katalysierten Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol im zwei-Phasen-System konnte keine Erhöhung des Umsatzes erzielen. In Abbildung 5-10 sind die dazugehörigen Reaktionsverläufe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Veresterung weitaus langsamer und mit weniger Umsatz im zwei-Phasen-System stattgefunden hat. Wahrscheinlich wurde durch das vorhandene Wasser die Rückreaktion begünstigt, sodass viel weniger Ester gebildet wurde. Besser wäre es ein anderes Lösungsmittelsystem bestehend aus zwei Phasen zu finden, worin kein Wasser enthalten ist. Dafür könnten beispielsweise zwei-Phasen-Systeme bestehend aus organischen Lösungsmitteln und ionischen Flüssigkeiten zum Einsatz kommen [COSTA et al., 2012].



**Abbildung 5-10:** Vergleich der Reaktionsdurchführung zwischen ein-Phasen-System und zwei-Phasen-System (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE bzw. 10 mL MTBE und 10 mL Wasser, 50 °C, 400 rpm) 01, 02 und 03 sind dabei jeweils Wiederholungsmessungen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Für eine Charakterisierung der Produkte mussten diese isoliert werden. Da die bisher durchgeführten Reaktionen mit geringen Konzentrationen durchgeführt worden sind, ist daher eine Konzentrationserhöhung vorgenommen worden. Dabei sind alle Substrate und auch das Enzym im gleichen Verhältnis erhöht worden (Abbildung 5-11).



**Abbildung 5-11:** Substratkonzentrationserhöhung (20, 100, 200, 500 mmol/L Bernsteinsäure, 40, 200, 500, 1000 mmol/L Geraniol, Verhältnis 1:2 (Bernsteinsäure:Geraniol) 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm)

Wie der Abbildung entnommen werden kann, sind Konzentrationen von 20 - 500 mmol/L an Bernsteinsäure eingesetzt worden. Weiterhin ist zu erkennen, dass der Kurvenverlauf der Graphen in etwa ähnlich ist. Jedoch kann bei einer Konzentration von 250 mmol/L bereits nach 4 h Reaktionszeit der Gleichgewichtszustand erreicht werden. Diese Beobachtung ist mit der Michaelis-Menten-Theorie zu erklären. Hierbei wird die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration betrachtet. Zunächst besteht ein linearer Zusammenhang, wenn die Substratkonzentration steigt, wird auch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht. Nach Erreichen der Sättigungskonzentration des Substrates kann die Umsatzgeschwindigkeit nicht weiter erhöht werden, da durch die Bildung einer maximalen Anzahl an Enzym-Substrat-Komplexen keine weitere Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit möglich ist [BISSWANGER, 2015]. Wenn bei einer Konzentration von 500 mmol/L diese Sättigungskonzentration erreicht wäre, dann würden die Ergebnisse mit denen der 250 mmol/L übereinstimmen. Jedoch liegen die Werte darunter, was auf eine Produktinhibierung hinweist. Dieser Effekt kommt auch erst bei höheren Konzentrationen zum tragen. Dabei blockiert das gebildete Produkt das aktive Zentrum des Enzyms. Und steht dadurch nicht mehr für die Umsetzung der Substrate zur Verfügung.

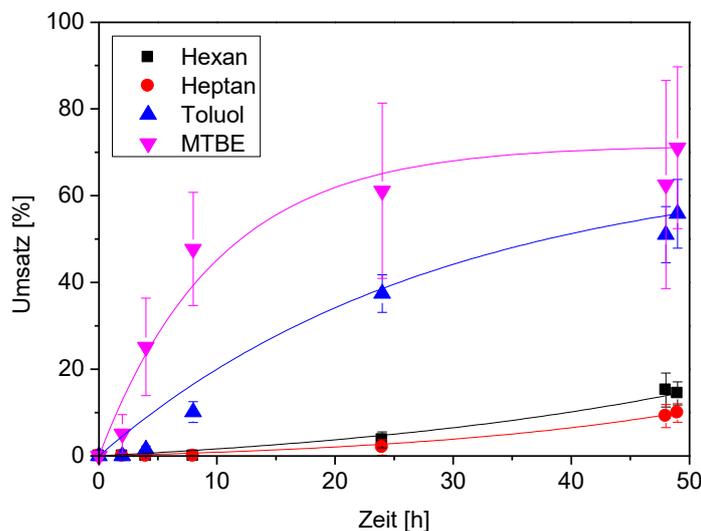
Für die Isolierungsexperimente wurden Ansätze im 1 g Maßstab angesetzt (250 mmol/L Säure, 500 mmol/L Alkohol, 250 mg Novozym 435, 10 mL MTBE, isolierte Ausbeuten siehe Abschnitt 5.3.1).

Das hier verwendete LC/MS-System bestand aus einer HPLC-Einheit und einem Ionenfallen Massenspektrometer. Aufgrund der vergleichsweise schlechten Linearität des Detektorsignals ist eine Quantifizierung oftmals schwierig. Um dennoch Umsätze und Ausbeuten an Mono- und Diester bestimmen zu können, ist daher auf eine GC-Analytik gewechselt worden.

### 5.2.2. Lösungsmittelabhängigkeit

Die Lösungsmittelabhängigkeit wurde erneut untersucht, um Aussagen darüber treffen zu können, welchen Einfluss das Lösungsmittel auf den Umsatz der Veresterungsreaktion hat. Für diese Untersuchung wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet: Hexan, Heptan, Toluol, MTBE, Aceton und Acetonitril. Die Gesamtausbeuten für diese Reaktionen sind in Abbildung 5-12 dargestellt. Wie zu erkennen ist, wird bei der Durchführung der Reaktion in MTBE der größte Umsatz (60 %) erzielt, was sich mit den Messungen der Vorversuche deckt. Wenn Toluol als Lösungsmittel verwendet wird, kann ein Gesamtumsatz von ca. 50 % erreicht werden. Bei der Verwendung von Hexan oder Heptan werden nur ca. 10 – 15 % Umsatz

erhalten. In den die anderen getesteten Lösungsmitteln (Aceton, Acetonitril) erfolgte kein Umsatz.

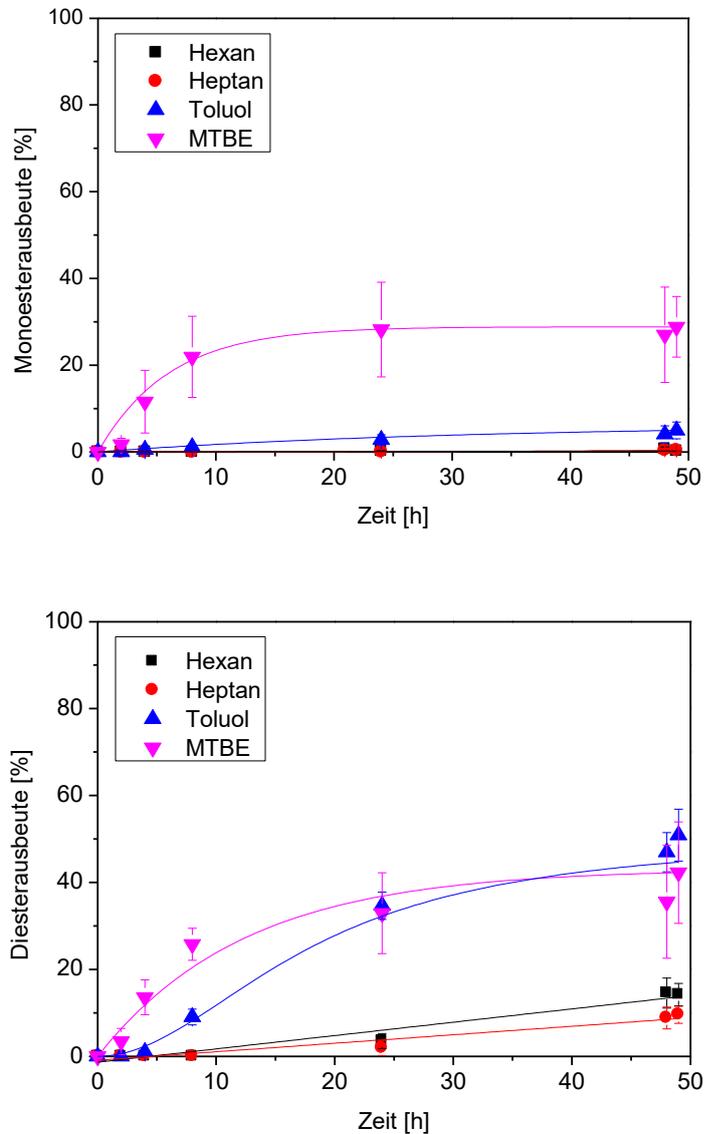


**Abbildung 5-12:** Lösungsmittelabhängigkeit – Gesamtumsatz (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL Hexan/ Heptan/ Toluol/ MTBE/ ACN/ Aceton, 50 °C, 400 rpm)

Der log P Wert kann, wie bereits erwähnt, eine Hilfe für die Auswahl eines geeigneten Lösungsmittels sein. Demzufolge sollen stark hydrophobe Lösungsmittel mit  $\log P > 4$  oft die besten Lösungsmittel für Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen sein. [TANG et al., 2017]. Allerdings besitzt MTBE einen log P Wert von 1,29 und wäre nach dieser Hypothese kein geeignetes Lösungsmittel für Veresterungsreaktionen. Neben der Hydrophobizität des Lösungsmittels spielen weitere Faktoren, wie beispielsweise die Löslichkeit der Substrate, eine Rolle. Dass bei der Verwendung von Aceton und Acetonitril kein Umsatz erfolgte, kann folgende Ursachen haben. So beschrieben Banik et al., dass polare Lösungsmittel wie Acetonitril mit dem aktiven Zentrum der Cal B interagieren können und mit dem Substrat konkurrieren. Anstatt eines Enzym-Substrat-Komplexes wird ein Lösungsmittel-Enzym-Komplex gebildet, welcher nicht in Produkt und Enzym zerfallen kann, wodurch das Enzym nicht mehr für die zu katalysierende Reaktion zu Verfügung steht [BANIK et al., 2016] [YAN et al., 2017]. Zudem können polare Lösungsmittel Wasser aufnehmen und die Hydrathülle des Enzyms zerstören. Durch das Fehlen der Wasserstoffbrückenbindungen, kann die Tertiärstruktur des Enzyms nicht aufrechterhalten und so deren Aktivität herabgesetzt werden [YAN et al., 2017]. Weiterhin wird beschreiben, dass unpolare Lösungsmittel wie Hexan oder MTBE geeigneter für die untersuchte Veresterungsreaktion von Buttersäure und Ethanol sind [BANIK et al., 2016].

Des Weiteren wurde die Lösungsmittelabhängigkeit der Testreaktion erneut bestimmt, um zu untersuchen, ob Unterschiede in den Mono- und Diesterausbeuten in Abhängigkeit vom Lösungsmittel auftreten. Dazu sind die Ausbeuten an Mono- und

Diester mittels GC bestimmt worden. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 5-13 dargestellt.



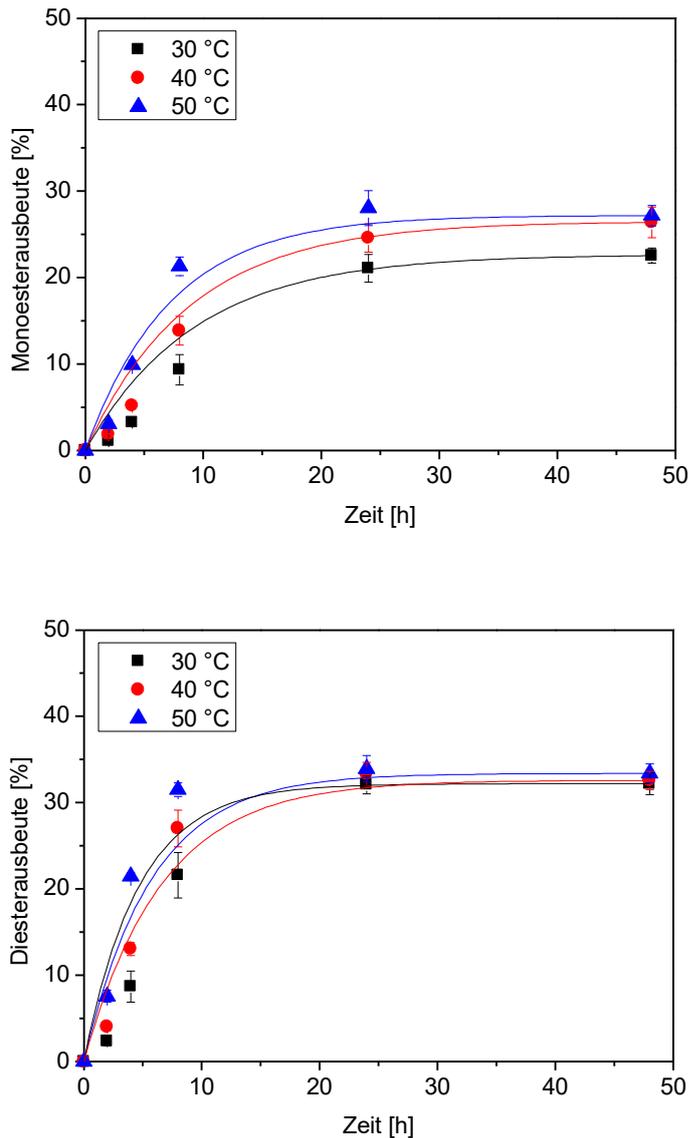
**Abbildung 5-13:** Lösungsmittelabhängigkeit (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL Hexan/ Heptan/ Toluol/ MTBE/ ACN/ Aceton, 50 °C, 400 rpm)

Aus den Auftragungen wird ersichtlich, dass bei der Verwendung von MTBE als Reaktionsmedium die Ausbeute an Monoester signifikant erhöht ist, als im Vergleich zu den anderen getesteten Lösungsmitteln. So entstehen 28 % Monoester in MTBE und weniger als 5 % bei der Verwendung der anderen Lösungsmittel. Werden die Ausbeuten des Diesters in Abhängigkeit vom Reaktionsmedium betrachtet, so kann festgestellt werden, dass Hexan und Heptan keine geeigneten Lösungsmittel für diese Reaktion sind (9 % bzw. 14 % Diester ausbeute). Des Weiteren kann die höchste Ausbeute an Diester (50 %) in Toluol nach 48 h erreicht werden. Für MTBE wird zwar eine geringere Ausbeute an Diester (40 %) erhalten, dafür stellt sich hier der

Gleichgewichtszustand mit 24 h schneller ein. Anhand dieser Ergebnisse kann geschlussfolgert werden, dass beim Einsatz von unpolaren Lösungsmitteln eher der Diester und bei mittelpolaren Lösungsmitteln eher der Monoester als Hauptprodukt erhalten wird. Dieses Verhalten wurde auch von Torres et al. gezeigt [TORRES et al., 1999 b]. Sie untersuchten die Veresterung von Apfelsäure mit Dodecanol, wobei die Synthese des Monoesters im Vordergrund stand. Sie fanden heraus, dass unter allen getesteten Lösungsmitteln Hexan die größte Ausbeute erzielt, allerdings entstand dabei auch der Diester als Hauptprodukt. Die größte Monoesterausbeute (10 %) konnten sie mit Dioxan als Lösungsmittel erreichen. Durch eine Erhöhung des Wassergehalts des Dioxans auf 2,9 % konnte die Monoesterausbeute auf 40 % gesteigert werden [TORRES et al., 1999 b]. Abhängig davon, ob als Hauptprodukt der Mono- oder Diester erhalten werden soll, sollte auch die Lösungsmittelwahl angepasst werden. Unpolare Lösungsmittel sind eher geeignet, um eine hohe Ausbeute an Diester zu erhalten. Wenn jedoch eine höhere Monoesterausbeute erzielt werden soll, eignen sich vor allem mittelpolare bis polare Lösungsmittel. Da nicht nur der Diester, sondern auch der Monoester erhalten werden soll, wird für die nachfolgenden Untersuchungen MTBE als Lösungsmittel verwendet.

### **5.2.3. Temperaturabhängigkeit**

Auch die Temperaturabhängigkeit wurde erneut untersucht, um zu bestimmen, ob die Temperatur einen Einfluss auf das Produktverhältnis von Mono- und Diester hat. In Abbildung 5-14 sind die Ergebnisse dargestellt. Als Reaktionstemperaturen sind 30, 40 und 50 °C ausgewählt worden. Auf die Untersuchung höherer Temperaturen wurde verzichtet, da der Siedepunkt von MTBE bei 55 °C liegt und somit das Lösungsmittel oberhalb dieser Temperatur sieden würde.



**Abbildung 5-14:** Temperaturabhängigkeit (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 30/ 40/ 50 °C, 400 rpm)

Wie zu erkennen ist, hat die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der durchgeführten Reaktion. Werden die Reaktionsverläufe des Monoesters bei den unterschiedlichen Temperaturen verglichen, wird ersichtlich, dass die höchsten Monoesterausbeuten (28 %) bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C erhalten werden, gefolgt von 40 °C (24 %) und 30 °C (21 %). Bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C wird der Gleichgewichtszustand schon nach etwa 24 h erreicht, wobei bei einer Temperatur von 40 °C der Gleichgewichtszustand erst nach 48 h eintritt. Nach einer Reaktionszeit von 8 h erreicht die Diesterausbeute bei einer Reaktionstemperatur von 50 °C bereits den Gleichgewichtszustand und eine Ausbeute von ca. 30 %. Für die Reaktionstemperaturen von 30 und 40 °C liegen diese Werte darunter, wobei die Ausbeute bei einer Temperatur von 30 °C am geringsten ist. Nach 24 h Reaktionszeit,

werden für die drei getesteten Temperaturen ähnliche Diesterausbeuten von ca. 30 % erhalten. Für alle weiteren Untersuchungen ist eine Reaktionstemperatur von 50 °C festgelegt worden, da sowohl die höchsten Mono- und Diesterausbeuten (ca. 30 %) in kurzer Zeit (8 h) erzielt werden konnten. Um den Einfluss der Temperatur noch genauer darstellen zu können, sind Gleichgewichtskonstanten berechnet worden (Tabelle 5-2). Die Gleichgewichtskonstante (K) ist der Quotient aus dem Produkt der Aktivitäten der Reaktionsprodukte durch das Produkt der Aktivität der Substrate. Wenn keine Aktivitäten bestimmt werden können, kann die Gleichgewichtskonstante ( $K_c$ ) auch näherungsweise mit Hilfe der Konzentrationen bestimmt werden [KOBAYASHI et al., 2003]. In Tabelle 5-2 sind die berechneten Gleichgewichtskonstanten für die unterschiedlichen Temperaturen dargestellt (Reaktionszeit 24 h).

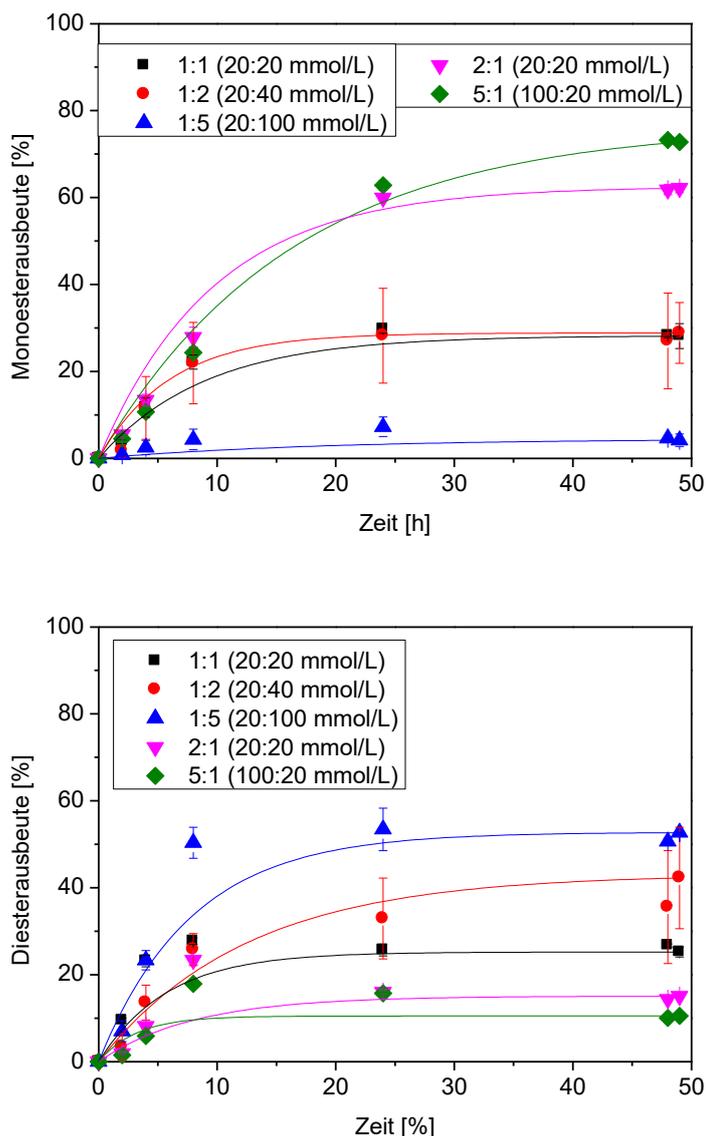
**Tabelle 5-2:** Temperaturabhängigkeit - berechnete Gleichgewichtskonstanten ( $K_c$ )

Temperatur [°C]	Gleichgewichtskonstante $K_c$ [-]
30	0,13
40	0,18
50	0,24

Anhand der Gleichgewichtskonstante kann abgeschätzt werden, ob das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Produkte ( $K > 1$ ) oder der Substrate ( $K < 1$ ) liegt. Wird der Gesamtumsatz der Reaktion betrachtet (ca. 60 %) muss die folgende Beziehung gelten:  $K > 1$ . Die hier berechneten Werte zeigen jedoch eindeutig, dass das Reaktionsgleichgewicht auf Seiten der Substrate liegt. Dieser Widerspruch kann dadurch begründet werden, dass die Ausbeuten bezogen auf die Bernsteinsäure berechnet wurden, da jeweils nur ein Molekül an Bernsteinsäure für den Mono- bzw. Diester umgesetzt wird. Würden die Ausbeuten bezogen auf das Geraniol angegeben werden, würde die Gesamtausbeute an Mono- und Diester nur rund 40 % betragen (Verhältnis Bernsteinsäure:Geraniol, 1:2). Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Gleichgewichtskonstanten mit steigender Temperatur auch größere Werte annehmen, sodass hier der signifikante Einfluss der Temperatur auf die durchgeführte Reaktion bestätigt werden kann. Auch Almeida et al. und Zhao et al. beschreiben, dass die Reaktionstemperatur biokatalytischer Reaktionen ein entscheidender Parameter ist. So wird unter anderem die Löslichkeit der Substrate im Reaktionsmedium verbessert, die molekularen Kollisionen erhöht, Massentransferlimitierungen reduziert und die Interaktion zwischen Enzym und Substrat unterstützt, wenn die Reaktionstemperatur erhöht wird. Die Enzyme sind in einem bestimmten Temperaturbereich stabil, jedoch kann eine Abnahme der katalytischen Aktivität und Stabilität auftreten, wenn die Reaktionstemperatur über die optimale Temperatur ansteigt, was zu einer thermischen Deaktivierung des Enzymes führt [ALMEIDA et al., 2017] [ZHAO et al., 2017].

#### 5.2.4. Variation der Substratverhältnisse

Für die Untersuchung des Einflusses der Substrate auf die Mono- bzw. Diesterausbeuten wurden verschiedene Substratverhältnisse untersucht. Zum einen wurde die Bernsteinsäurekonzentration konstant gehalten und die Geraniolkonzentration in bestimmten Verhältnissen (1:1, 1:2, 1:5) erhöht. Anschließend wurden die Bernsteinsäurekonzentrationen variiert und die Geraniolkonzentration konstant gehalten (2:1, 5:1). Die Reaktionsverläufe sind in Abbildung 5-15 dargestellt. Wie erwartet, erhöht ein Überschuss an Bernsteinsäure die Monoesterausbeute und ein Überschuss an Geraniol die Diesterausbeute. Während der ersten 24 h Reaktionszeit besteht kein Unterschied darin, ob die Bernsteinsäure im zweifachen oder fünffachen Überschuss vorliegt und es kann eine Monoesterausbeute von ca. 60 % erreicht werden. Allerdings kann die Monoesterausbeute weiterhin gesteigert werden, wenn die Reaktion 48 h gefahren wird. Bei einem fünffachen Überschuss an Bernsteinsäure kann so eine Monoesterausbeute von ca. 75 % erzielt werden. Bei einem Bernsteinsäure/Geraniol-Verhältnis von 1:1 und 1:2 wird in etwa gleich viel Monoester erhalten (ca. 30 %). Bei einem fünffachen Überschuss an Geraniol wird sehr wenig Monoester ( $\leq 8\%$ ) erhalten. Wie bereits erwähnt, kann ein gegensätzliches Verhalten beobachtet werden, wenn die Diesterausbeuten betrachtet werden. Bei einem Überschuss an Säure (2:1, 5:1) entsteht sehr wenig Diester, ca. 10 - 20 %. Wenn die Substrate im gleichen Verhältnis eingesetzt werden (1:1), werden ca. 25 % und bei einem zweifachen Überschuss an Alkohol werden ca. 30 % Diester erzielt. Über 50 % Diesterausbeute kann bei einem fünffachen Überschuss an Geraniol bereits nach 8 h erzielt werden. Abschließend kann festgehalten werden, dass eine möglichst hohe Ausbeute an Monoester erhalten wird, wenn die Säure im Überschuss (5:1, Bernsteinsäure:Geraniol) und hohe Diesterausbeuten, wenn der Alkohol im Überschuss (1:5, Bernsteinsäure:Geraniol) vorliegt. Um annähernd gleiche Mono- und Diesterausbeuten zu erhalten, ist ein Substratverhältnis von 1:1 oder 1:2 (Bernsteinsäure:Geraniol) geeignet.

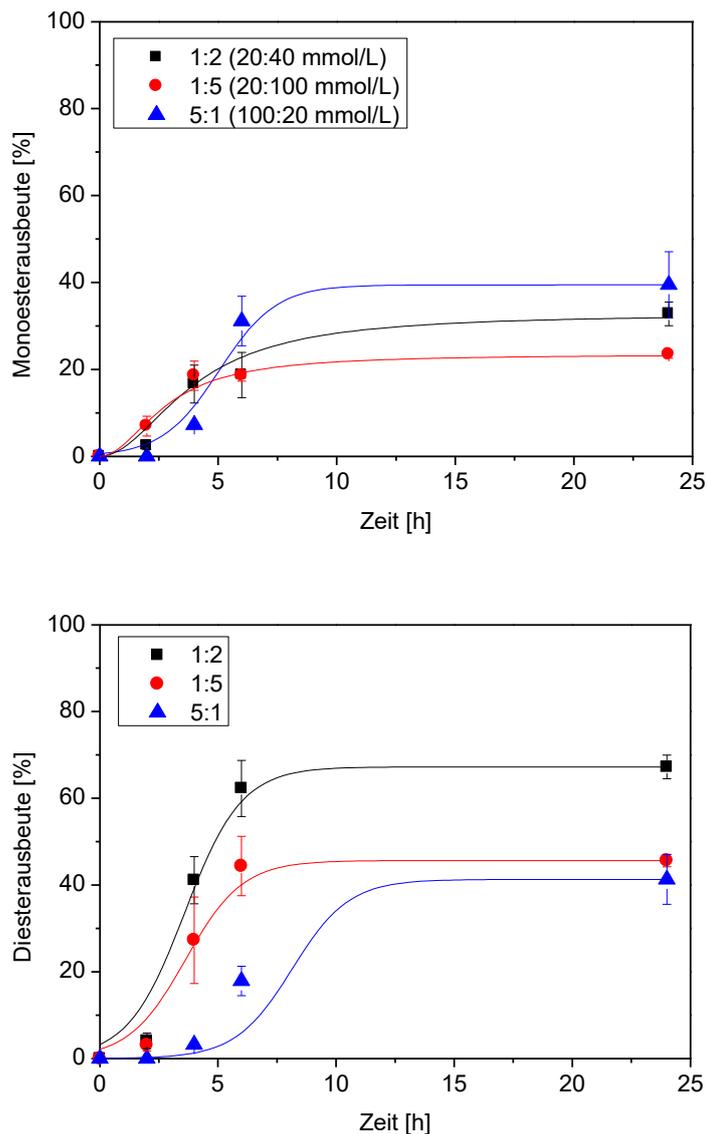


**Abbildung 5-15:** Substratverhältnisvariation (Substratverhältnis Bernsteinsäure:Geraniol – 1:1, 1:2, 1:5, 2:1, 5:1, 20/ 40/ 100 mmol/L Bernsteinsäure, 20/ 40/ 100 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm)

Für die Isolierungsversuche wurde ein Substratverhältnis von 1:2 (Säure:Alkohol) gewählt, da im besten Fall gleichzeitig sowohl der Monoester als auch der Diester isoliert werden können. Auch Rahman et al. untersuchten mit Hilfe der „central composite design analysis“ die Synthese eines Diesters aus Bernsteinsäure und Oleylalkohol. Das dabei bestimmte optimale Substratverhältnis war 1:7,8 (Bernsteinsäure:Oleylalkohol). Sie erhielten unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen (41,1 °C, 4,5 h, 20 mg Novozym 435, Hexan) 85 % Ausbeute an Diester bei Reaktionsführung mit einem Überschuss an Oleylalkohol [RAHMAN et al., 2011].

### 5.2.5. Reaktionsführung ohne Lösungsmittel

Bei vielen industriellen Prozessen wird auf Lösungsmittel verzichtet, da mitunter sehr viel Energie aufgewendet werden muss, um das Lösungsmittel wieder abzutrennen. In manchen Fällen können bestimmte Lösungsmittel aufgrund von Toxizität nicht verwendet werden. Um den Einsatz von Lösungsmitteln zu verringern, können auch Substrate als Lösungsmittel fungieren [GHAMGUI et al., 2004] [GÜVENC et al., 2002] [KARRA-CHAABOUNI et al., 2006] [WANG et al., 2017]. Dieses wurde im Folgenden für die Veresterungsreaktion untersucht. Des Weiteren sind die Reaktionsprodukte flüssig und können im Verlauf der Reaktion auch als Lösungsmittel dienen. Auch hierbei wurden die Substratverhältnisse variiert, um zu untersuchen, ob eine geringe Menge an Geraniol als Lösungsmittlersatz ausreicht oder ob ein zu hoher Überschuss die Lipase inhibiert. Die Reaktionsverläufe dazu sind in Abbildung 5-16 dargestellt. Der Abbildung kann entnommen werden, dass eine Reaktion auch ohne den Einsatz von Lösungsmittel stattgefunden hat. Durch die Reaktionsführung ohne Lösungsmittel konnten zudem höhere Ausbeuten erreicht werden. So konnten bei einem Verhältnis von 1:2 (Bernsteinsäure:Geraniol) Ausbeuten von 30 % für den Monoester und 65 % für den Diester erhalten werden. Bei der Reaktionsführung mit MTBE als Lösungsmittel und demselben Verhältnis konnten sowohl für den Monoester als auch für den Diester nur Ausbeuten von ca. 30 % erhalten werden. Wird der Überschuss an Geraniol erhöht (1:5), dann werden die Ausbeuten an Mono- und Diester verringert. Dies kann durch eine Substratinhibierung hervorgerufen werden. Durch Überschuss an Alkohol kommt es zur Bindung eines zweiten Substratmoleküls (Geraniol) an das Enzym und der so entstandene Enzym-Substrat-Substrat-Komplex kann nicht in Produkt und Enzym zerfallen. Dadurch wird in der gleichen Zeit weniger Produkt gebildet, da die inhibierten Enzyme nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung stehen. Der Überschuss an Geraniol ist demzufolge zu hoch, dadurch kann das Enzym nicht mehr optimal arbeiten und die Ausbeuten werden geringer. Bei einem Verhältnis von 5:1, bei dem ein fünffacher Überschuss an Bernsteinsäure vorliegt, können für den Mono- und den Diester Ausbeuten von ca. 40 % erhalten werden. Es liegen beide Produkte im gleichen Verhältnis vor. Im Vergleich dazu können bei der Reaktionsführung in MTBE als Lösungsmittel Monoesterausbeuten bis zu 75 % erhalten werden, wobei die Diesterausbeute mit ca. 15 % relativ gering war. Somit hat der Verzicht auf das Lösungsmittel in diesem Falle auch einen negativen Einfluss auf die Selektivität der Reaktion. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ein Verhältnis von 5:1 (Säure:Alkohol) gewählt werden sollte, um eine möglichst hohe Ausbeute an Monoester zu erreichen. Um allerdings eine hohe Ausbeute an Diester zu erhalten, sollte ein Substratverhältnis von 1:2 (Säure:Alkohol) gewählt werden.



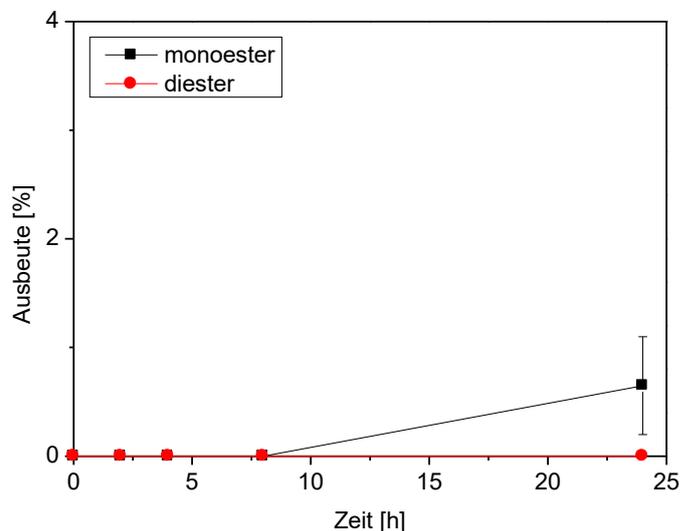
**Abbildung 5-16:** Reaktionsführung ohne Lösungsmittel bei unterschiedlichen Substratverhältnissen (Substratverhältnis Bernsteinsäure:Geraniol – 1:2, 1:5, 5:1, 20/ 100 mmol/L Bernsteinsäure, 20/ 40/ 100 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm)

### 5.2.6. Wassergehalt

Es ist bekannt, dass Enzyme eine geringe Menge an Wasser benötigen, um ihre aktive Konformation beizubehalten. Der benötigte Wassergehalt ist dabei von Enzym zu Enzym unterschiedlich. Daher ist der Wassergehalt bei Veresterungsreaktion ein wichtiger Parameter, der die Enzymaktivität in organischen Lösungsmitteln beeinflusst. [ALMEIDA et al., 2017] [BANIK et al., 2017] [CHULALAKSANANUKUL, et al., 1990]. So kann Wasser positive als auch negative Einflüsse auf die Reaktion haben. Positive Einflüsse sind dabei die allgemeine

Aktivierung des Enzyms aufgrund erhöhter interner Flexibilität, erhöhte Polarität des Aktiven Zentrums sowie eine erhöhte Protonenleitfähigkeit. Aber es kann auch negative Effekte, wie die Störung der Substratbindung, Bildung einer Diffusionsbarriere (hydrophobe Substrate) hervorrufen sowie mit Substraten bei Veresterungsreaktionen konkurrieren [ADLERCREUTZ, 2013]. Wie bereits in Abbildungen 5-12 gezeigt, stellt sich nach ca. 24 h ein Gleichgewicht zwischen Hin- Und Rückreaktion der Lipase katalysierte Synthese von Mono- und Digeranilsuccinat ein. Um das Gleichgewicht zu überwinden und die Ausbeute der Produkte zu erhöhen, könnte zunächst das Reaktionswasser aus der Reaktionslösung abgetrennt werden. Dies wurde erneut mit der Zugabe von Molsieben getestet. Jedoch konnte dadurch die Ausbeute nicht weiter gesteigert werden. Es müssten somit andere Methoden gefunden werden, um das Wasser aus der Reaktionslösung abzutrennen. Ein möglicher Ansatz das Reaktionswasser abzutrennen, wird in Abschnitt 5.4 beschrieben. Dabei kann durch den Verzicht des Lösungsmittels das entstehende Wasser mittels Vakuumtechniken aus der Reaktionslösung entfernt werden. Jedoch wird bei dieser Methode der Diester mit bis zu 90 % Ausbeute als Hauptprodukt erhalten.

Um den Einfluss von Wasser auf die Reaktion zu untersuchen, sind 1 % Wasser (200  $\mu$ L, 500 mmol/L, 10.000 ppm) vor dem Start der Reaktion zur Reaktionslösung zugegeben worden. Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist in Abbildung 5-17 dargestellt werden.



---

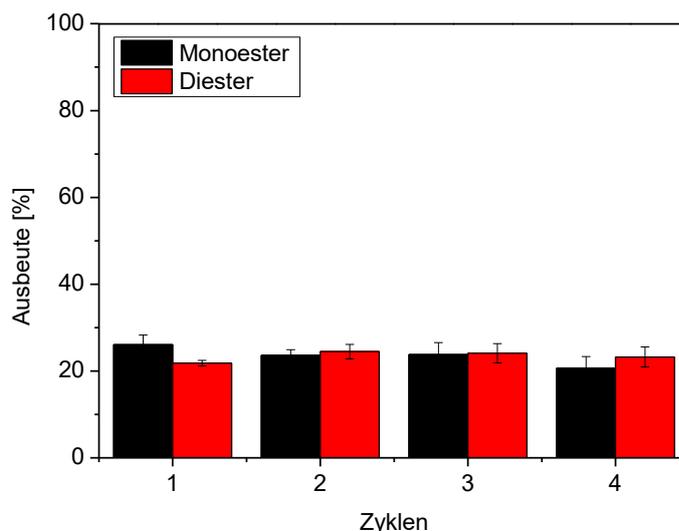
**Abbildung 5-17:** Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol unter Zugabe von 1 % Wasser (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 200  $\mu$ L Wasser, 50 °C, 400 rpm)

Sicherlich wird durch das MTBE, die Substrate und das Enzym ein Teil des Wassers gebunden, aber wie der Abbildung entnommen werden kann, liegt das Gleichgewicht der Reaktion durch die Zugabe dieses hohen Überschusses an Wasser auf Seiten der Substrate. Nach 24 h Reaktionszeit sind weniger als 1 % Monoester und kein Diester

gebildet worden. Wie bereits in Kapitel 5.2.1 gezeigt, wird das Gleichgewicht der Reaktion bei einem Wassergehalt zwischen 3000 - 4000 ppm eingestellt. Durch den hohen Überschuss an Wasser (10.000 ppm) in der Reaktionslösung wird dadurch die Hinreaktion so gut wie vollständig unterdrückt. Dies kann mit dem Prinzip von Le Chatelier begründet werden. Wird die Konzentration eines Produktes erhöht, so verschiebt sich das Gleichgewicht der Reaktion auf die Substratseite. Mehrere Literaturstellen belegen, dass nach Überschreitung eines für das Enzym optimalen Wassergehalts die Aktivität sinkt und so weniger Produkt gebildet wird [COMPTON et al., 2000] [GAYOT et al., 2003] [HAN et al., 1990] [LU et al., 2007].

### **5.2.7. Rezyklierung des Enzyms**

Für einen industriellen Prozess ist es wichtig, dass die Produktmengenspezifischen Katalysatorkosten möglichst gering sind. Dies kann durch eine hohe Stundenzahl des Katalysators, seine Wiedergewinnung oder auch durch geringe Kosten des Katalysators selbst erreicht werden. Zudem ist es wichtig, dass die Katalysatoren leicht abtrennbar sind, damit sie zum einen einfach wiedergewonnen und zum anderen vom Produkt abgetrennt werden. Damit Enzyme diesen Anforderungen entsprechen, werden diese immobilisiert und können dadurch besser für die industrielle Verwendung geeignet sein [BRADY et al., 2009] [FERNANDEZ-LAFUENTE, 2017] [HANEFELD et al., 2009] [MADHAVAN et al., 2017]. Dafür gibt es mehrere Immobilisationsmöglichkeiten, wie die adsorptive oder kovalente Bindung an einen Träger, die Verkapselung oder auch die Einschlussimmobilisierung [BRADY et al., 2009] [MADHAVAN et al., 2017]. Das hier verwendete Enzym (Novozym 435) war bereits auf einen Acrylharzträger adsorptiv immobilisiert. Eigene Untersuchungen zeigten, dass sich das Enzym in wässrigen Bedingungen vom Träger ablöst und nach der Abtrennung des Katalysators aus der Reaktionslösung nicht mehr für einen weiteren Zyklus zu Verfügung steht. Um zu überprüfen, ob hierbei auch ein Aktivitätsverlust auftritt, wurden Rezyklierungsversuche unter den gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Dazu wurde das Enzym nach 24 h Reaktionszeit von der Reaktionslösung abgetrennt und die Reaktion erneut gestartet. Insgesamt wurden vier Zyklen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 5-18 dargestellt.

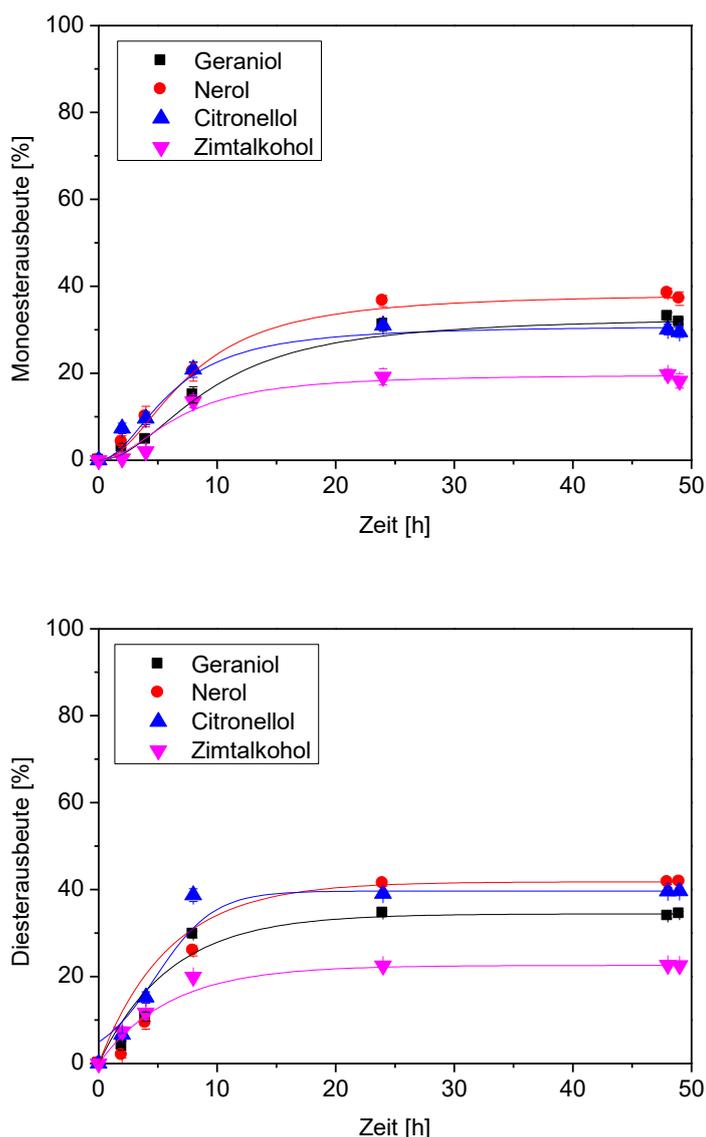


**Abbildung 5-18:** Rezyklierungsversuche der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm)

Wie zu erkennen ist, sind die Ausbeuten für Mono- und Diester für die vier Zyklen annähernd gleich, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Enzym keine Aktivität über diese Zeit verloren hat und dass sich das Enzym nicht vom Träger abgelöst haben kann. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist die Löslichkeit von Enzymen. Sie lösen sich bevorzugt in Wasser sowie polaren, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln und können dadurch vom Träger (je nach Immobilisierungsmethode) ablösen. In organischen Lösungsmitteln lösen sie sich allerdings kaum bis gar nicht und bleiben so am Träger gebunden [TORRES et al., 2004] Auch Vadgama et al. haben Rezyklierungsversuche mit dem Novozym 435 durchgeführt und konnten zeigen, dass der Umsatz der durchgeführten Veresterungsreaktion über 8 Zyklen konstant blieb [VADGAMA et al., 2015]. Mit den in Abbildung 5-19 dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das Enzym am Träger gebunden bleibt und sich nicht ablöst. Jedoch kann damit keine Aussage über die Langzeitstabilität des Novozyms 435 getroffen werden. Die Langzeitstabilität des Novozyms 435 wurde bereits 1989 beschrieben. So konnte eine immobilisierte *Candida antarctica* Lipase B bei einem kontinuierlichen Prozess (Umesterung von Sajabohnenöl mit Laurinsäure, 60 °C) über mehr als 2000 h eingesetzt werden ohne dabei einen signifikanten Aktivitätsverlust aufzuweisen [ANDERSON et al., 1997] [HELD-HANSEN et al., 1989]. Auch Royon et al. verwendeten das Novozym 435 in einem kontinuierlichen Prozess zu Herstellung von Biodiesel aus Baumwollkernöl und konnten nach 500 h keinen Aktivitätsverlust des Enzyms verzeichnen [ROYON et al., 2007].

### 5.2.8. Variation der Substrat-Alkohole

Die gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen für die Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol wurden auf weitere Veresterungsreaktionen übertragen. Anstelle von Geraniol wurden Nerol, Citronellol und Zimtalkohol als Substrate verwendet (Strukturen siehe Kapitel 2). In Abbildung 5-19 sind die Ergebnisse dazu dargestellt.



**Abbildung 5-19:** Reaktionsverlauf der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol, Nerol, Citronellol und Zimtalkohol (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol/ Nerol/ Citronellol/ Zimtalkohol, 40 mg Novozym 435, 20 mL MTBE, 50 °C, 400 rpm)

Die Mono- und Diesterausbeuten sind für die drei Terpenalkohole unterschiedlich. Nach ca. 24 h haben die Reaktionen ihren Gleichgewichtszustand erreicht und es

werden 33, 38 bzw. 30 % Monoesterausbeute sowie 34, 41 bzw. 39 % Diesterausbeute für Geraniol, Nerol und Citronellol erhalten. Diese unterschiedlichen Ausbeuten können durch die verschiedenen räumlichen Anordnungen der drei Terpenalkohole hervorgerufen werden. Das Geraniol und Nerol sind zueinander geordnete E/Z-Isomere, wodurch sie eine unterschiedliche räumliche Struktur besitzen. Dabei ist die Hydroxylgruppe des Nerols weniger sterisch gehindert als die des Geraniols. Hierdurch kann das Nerol einfacher durch das Enzym umgesetzt werden. Das Citronellol hat eine ähnliche räumliche Struktur wie das Geraniol. Das Citronellol besitzt eine Doppelbindung weniger im Vergleich zum Geraniol und wodurch die CH<sub>3</sub>-Gruppe an dieser Position anders im Raum angeordnet ist. Somit ist das Citronellol damit auch sterisch gehinderter als das Nerol. Resultierend daraus ergeben sich für die drei Terpenalkohole unterschiedlicher Ausbeuten an Mono- und Diester. Für den Zimtalkohol werden geringere Ausbeuten von 19 bzw. 22 % an Mono- und Diester erzielt. Der Zimtalkohol ist aus einem Propenol- und Benzylrest aufgebaut. Dadurch ist diese Verbindung stärker sterisch gehindert und kann schlechter umgesetzt werden als die Terpenalkohole. Bereits 1993 untersuchten Claon et al. die Lipase katalysierte Synthese Geraniol- und Citronellolester. Dabei zeigten ihre Ergebnisse, dass Geraniol besser umgesetzt wurde als das Citronellol [CLAON et al., 1993]. Lozano et al. untersuchen ebenso Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen von Geraniol, Nerol und Citronellol mit Essigsäure. Dabei fanden sie heraus, dass der Citronellylester mit 89 %, der Geranylester mit 76 % und der Nerylester mit 56 % Ausbeute gebildet wird [LOZANO et al., 2012]. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den hier erhaltenen Ergebnissen. Die kann darin begründet sein, dass Lozano et al. einfache Ester hergestellt und in dieser Arbeit Mono- und Diester synthetisiert worden sind. Auch da Silva et al. synthetisierten mit Eisen-(III)-nitrat als Katalysator Geranyl-, Neryl- und Citronellylacetat. Sie konnten zeigen, dass die Reaktion beim Einsatz von Nerol, gefolgt von Geraniol und Citronellol, den größten Gesamtumsatz aufweist, wobei die Unterschiede in den Umsätzen nicht sehr signifikant waren. Bei dieser chemischen Umsetzung entstehen jedoch Nebenprodukte. Wird die Ausbeute an dem Essigsäureester betrachtet, so kann festgestellt werden, dass auch hier das Citronellylacetat mit der höchsten Ausbeute, gefolgt von Geraniol und Nerol, gebildet wird [DA SILVA et al., 2016]. Auch diese Beobachtungen sind gegensätzlich zu den hier gefundenen Ergebnissen. Allerdings kann dieses entgegengesetzte Verhalten auch in den unterschiedlichen Reaktionen und Reaktionsbedingungen begründet sein. Auch Worzakowska et al. haben Diester ausgehend von Geraniol, Nerol, Citronellol sowie Zimtalkohol und Bernstein-, Glutar-, Adipin- sowie Sebacinsäure hergestellt. Die Reaktionen wurden bei 130 °C und mit Butylzinnsäure als Katalysator durchgeführt. Sie konnten für das Digeranyl-, Dineryl- und Dicitronellylsuccinat, bei Reaktionszeiten von 5, 8 und 4 h, Umsätze über 98 % erreichen. Für das Dicinnamylsuccinat sind keine Angaben über die Umsätze angegeben. Jedoch erhielten sie den Diester als Hauptprodukt und konnten keine Monoester synthetisieren [WORZAKOWSKA et al.,

2013] [WORZAKOWSKA, 2014] [WORZAKOWSKA et al., 2014 a] [WORZAKOWSKA et al., 2014 b]. Wie bereits beschrieben, werden von Worzakowska et al. sehr hohe Reaktionstemperaturen und eine organische Zinnverbindung, welche meist toxisch wirken, als Katalysator verwendet. Die hier vorgestellte Synthese kann unter milderen Bedingungen (50 °C) und ohne den Einsatz von toxischen Substanzen durchgeführt werden. Zudem können nicht nur die Diester, sondern auch die Monoester synthetisiert werden.

### **5.3. Isolierung und Charakterisierung der Ester**

#### **5.3.1. Isolierung**

Für die Synthese der Ester wurden Reaktionsansätze im 1 g Maßstab (bezogen auf die Ausgangsstoffe, 10 mL) durchgeführt. In Tabelle 5-3 sind die Reaktionsprodukte und die dazugehörigen isolierten Ausbeuten dargestellt. In der Tabelle sind 21, darunter 12 bislang nicht in der Literatur beschriebene, Mono- und Diester sowie ihre isolierten Ausbeuten zusammengefasst dargestellt. Die Ausbeuten demonstrieren, dass bei den symmetrischen Säuren (Bernstein- und Fumarsäure) vor allem die Diester isoliert werden konnten. Aufgrund der Symmetrie der Säuremoleküle kann das Enzym beide Carboxylgruppen gleich gut verestern und dadurch wird mehr Diester als Monoester gebildet. Bei den unsymmetrischen Säuren (Itacon- und Apfelsäure) werden die Monoester als Hauptprodukt isoliert. Durch das Vorhandensein eines Rests an der C2-Position des Säuremoleküls ist die weiter entfernte Säuregruppe reaktiver und kann durch das Enzym besser umgesetzt werden. Auch der sterische Anspruch der Reste kann einen Einfluss auf die Enzymkatalyse haben [LI et al., 2008] [PELLIS et al., 2015]. Wie bereits beschrieben haben auch Worzakowska et al. Digeranyl-, Dineryl-, Dicitronellyl- und Dicinnamylsuccinat synthetisieren können. Allerdings war es ihnen dabei nicht möglich auch die Monoester zu synthetisieren [WORZAKOWSKA et al., 2013] [WORZAKOWSKA, 2014] [WORZAKOWSKA et al., 2014 a] [WORZAKOWSKA et al., 2014 b].

**Tabelle 5-3:** Isolierte Ausbeuten der synthetisierten Mono- und Diester (n.i. – nicht isoliert)

<b>Produkt</b>	<b>isolierte Ausbeute [%]</b>	<b>in Literatur beschrieben</b>
Monogeranylsuccinat	6	[RIEKS et al., 2005]
Digeranylsuccinat	36	[WORZAKOWSKA et al., 2013]
<b>Mononerylsuccinat</b>	13	nicht beschrieben
Dinerylsuccinat	35	[WORZAKOWSKA et al., 2014 a]
Monocitronellylsuccinat	n.i.	[AULENTA et al., 2004]
Dicitronellylsuccinat	38	[WORZAKOWSKA et al., 2014 c]
Monocinnamylsuccinat	n.i.	[MACKERELL et al., 2014]
Dicinnamylsuccinat	28	[WORZAKOWSKA et al., 2014 b]
<b>Monogeranylfumarat</b>	20	nicht beschrieben
Digeranylfumarat	30	[HOLZNER, 2002]
<b>Mononerylfumarat</b>	22	nicht beschrieben
<b>Dinerylfumarat</b>	22	nicht beschrieben
Monocitronellylfumarat	n.i.	[MASSCHELEIN et al., 1998]
Dicitronellylfumarat	24	[TAN et al., 2009]
Monocinnamylfumarat	30	[CARLSON, 1982]
<b>Dicinnamylfumarat</b>	16	nicht beschrieben
<b>Monogeranylitaconat</b>	9	nicht beschrieben
<b>Digeranylitaconat</b>	2	nicht beschrieben
<b>Mononerylitaconat</b>	14	nicht beschrieben
Dinerylitaconat	n.i.	nicht beschrieben
<b>Monocitronellylitaconat</b>	2	nicht beschrieben
Dicitronellylitaconat	n.i.	nicht beschrieben
<b>Monocinnamylitaconat</b>	17	nicht beschrieben
Dicinnamylitaconat	n.i.	nicht beschrieben
Monogeranylmalat	n.i.	nicht beschrieben
<b>Digeranylmalat</b>	19	nicht beschrieben
<b>Mononerylmalat</b>	7	nicht beschrieben
Dinerylmalat	n.i.	nicht beschrieben
Monocitronellylmalat	n.i.	nicht beschrieben
Dicitronellylmalat	n.i.	nicht beschrieben
Monocinnamylmalat	n.i.	[SCHOBERT et al, 2005]
<b>Dicinnamylmalat</b>	27	nicht beschrieben

### 5.3.2. Charakterisierung mittels NMR

Nachdem die Produkte isoliert worden sind, wurden sie mittels NMR charakterisiert. Anhand eines Beispiels sollen die erhaltenen NMR-Spektren erläutert werden. In Abbildung 5-20 ist das  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum des Digeranylsuccinats dargestellt. Wie an der Struktur gezeigt, können die Signale den einzelnen Gruppen zugeordnet werden:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,61 (6H, s,  $\text{CH}_3$ ) 1,70 (12H, d,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) 2,08 (8H, d,  $J = 6,17$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) 2,64 (4H, s,  $\text{CH}_2$ ) 4,62 (4H, d,  $J = 7,25$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) 5,09 (2H, t,  $J = 6,94$  Hz, CH) 5,34 (2H, t,  $J = 7,25$  Hz, CH). Bei der Verwendung von deuteriertem Chloroform können keine OH-Gruppen im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum detektiert werden. Dadurch kann nicht eindeutig bewiesen werden, dass das Digeranylsuccinat vorliegt, da die Substrate (Bernsteinsäure und Geraniol mit einem Verhältnis von 1:1) die gleichen Signale im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum hervorrufen würden.

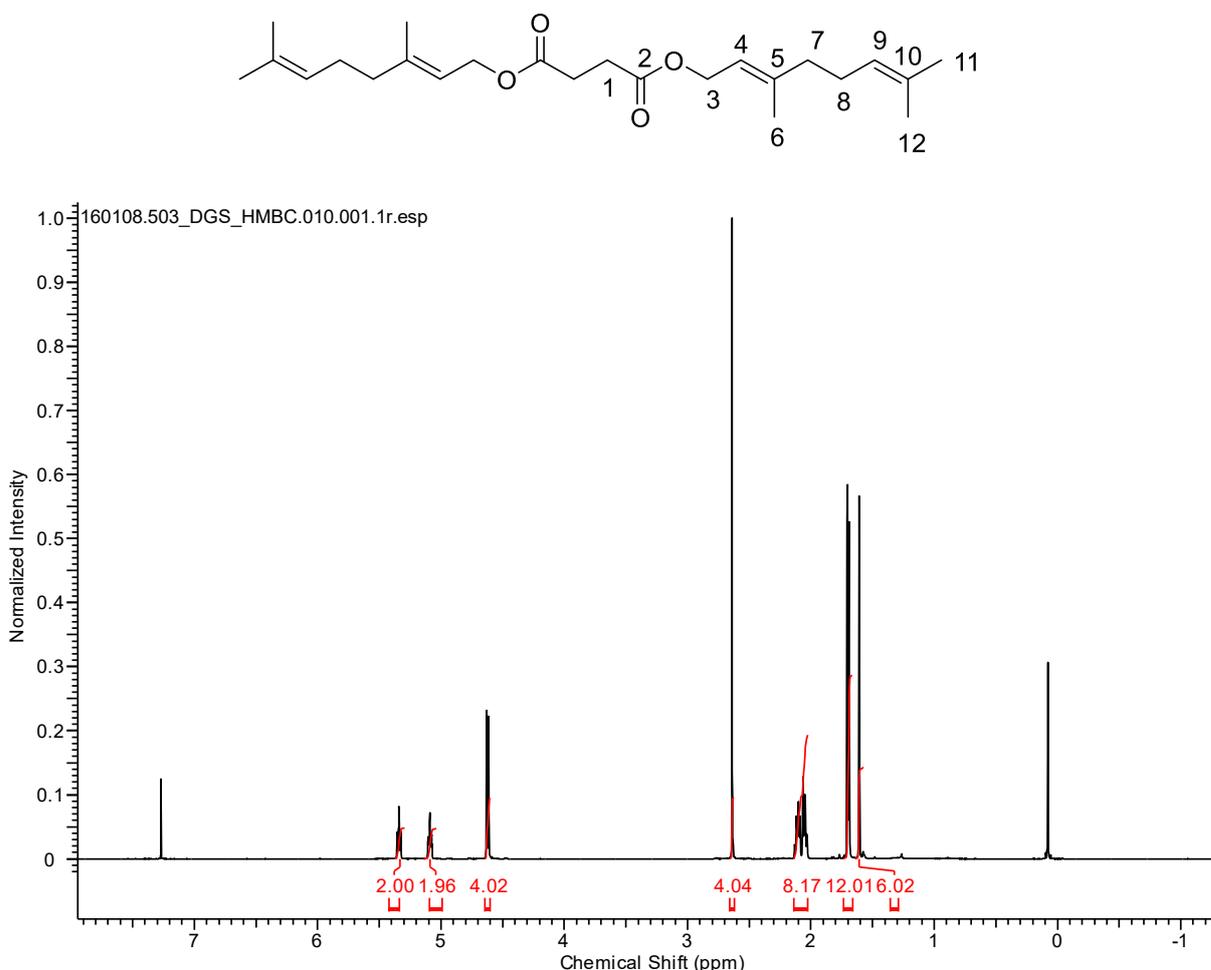
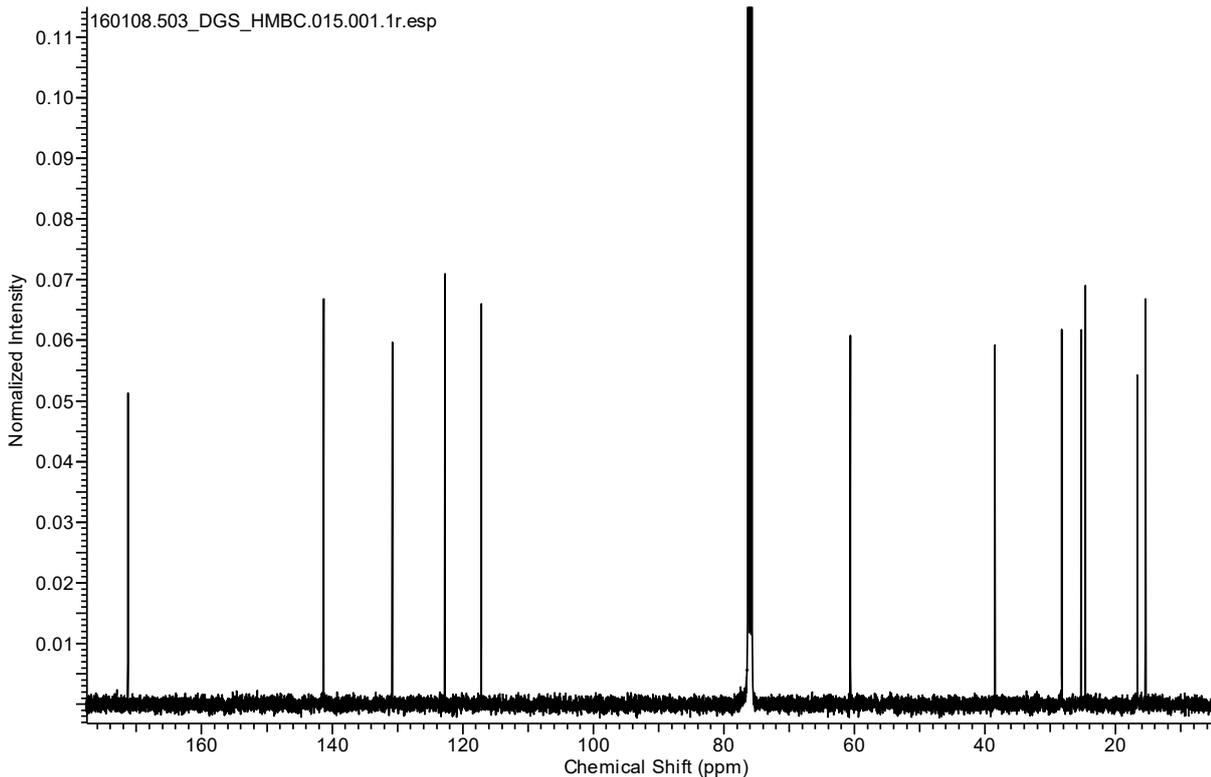


Abbildung 5-20:  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Digeranylsuccinats mit Strukturformel (500 MHz, Chloroform-d)

In Abbildung 5-21 ist das  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum des Digeranilsuccinats dargestellt. Auch hier können die Signale den einzelnen Atomen zugeordnet werden:  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 15,45 (C-6) 16,65 (C-12) 24,64 (C-11) 25,29 (C-8) 28,24 (C-1) 38,51 (C-7) 60,62 (C-3) 117,17 (C-4) 112,73 (C-9) 130,81 (C-10) 141,32 (C-5) 171,29 (C-2). Anhand der Signale kann auf das vorhergesagte Molekül geschlossen werden. Leider kann auch mit diesem  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob der Diester entstanden ist.

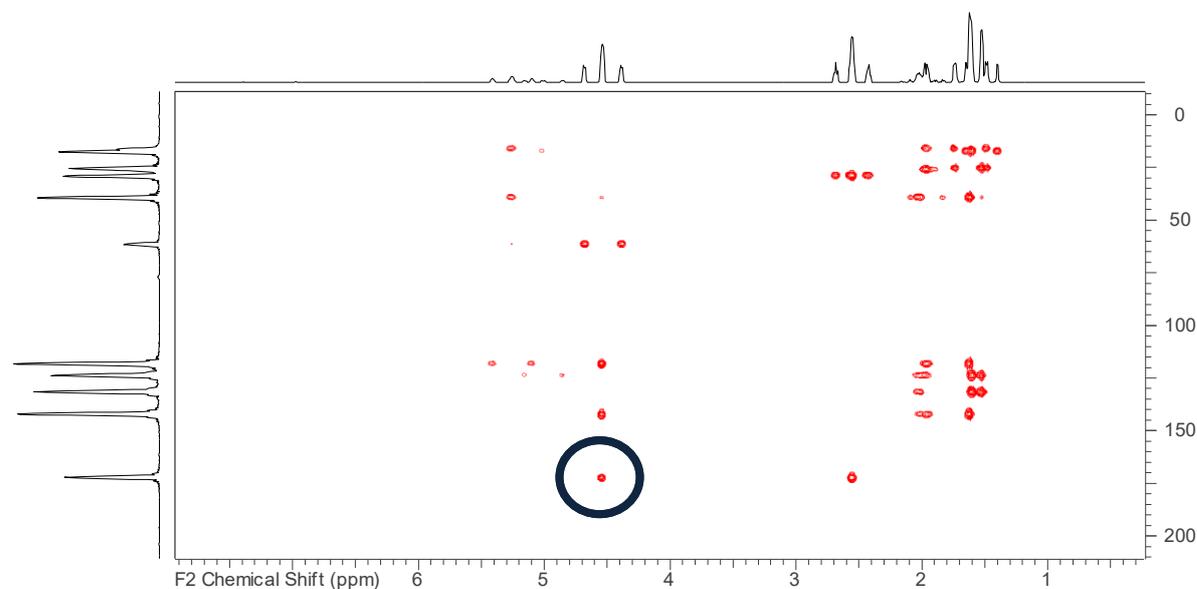
---



**Abbildung 5-21:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Digeranilsuccinats (500 MHz, Chloroform-d)

Um nachweisen zu können, dass der Diester gebildet wurde, sind HMBC-Messungen (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) durchgeführt worden. Das dazugehörige Spektrum ist in Abbildung 5-22 dargestellt. Die 2-D HMBC-Spektren können Korrelationen zwischen  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  oder  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  über zwei bis drei Bindungen zeigen [KEELER, 2011] [WEBB, 2006]. In solch einem Spektrum sind das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (oben) und das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum (links) gegenübergestellt. Mit Hilfe dieses Experiments kann die Kopplung zwischen dem Carbonylkohlenstoff ( $^{13}\text{C}$ : 171,29 ppm) und den H-Atomen ( $^1\text{H}$ : 4,62 ppm) des C3-Atoms detektiert werden, das blau markierte Signal entspricht dieser Korrelation. Dieses Signal kann nur dann erhalten werden, wenn eine Esterbindung zwischen der Bernsteinsäure und dem Geraniol gebildet worden ist. Durch die Anfertigung dieses Spektrums, kann eindeutig nachgewiesen werden, dass die gemessene Substanz das erwartete Digeranilsuccinat ist.

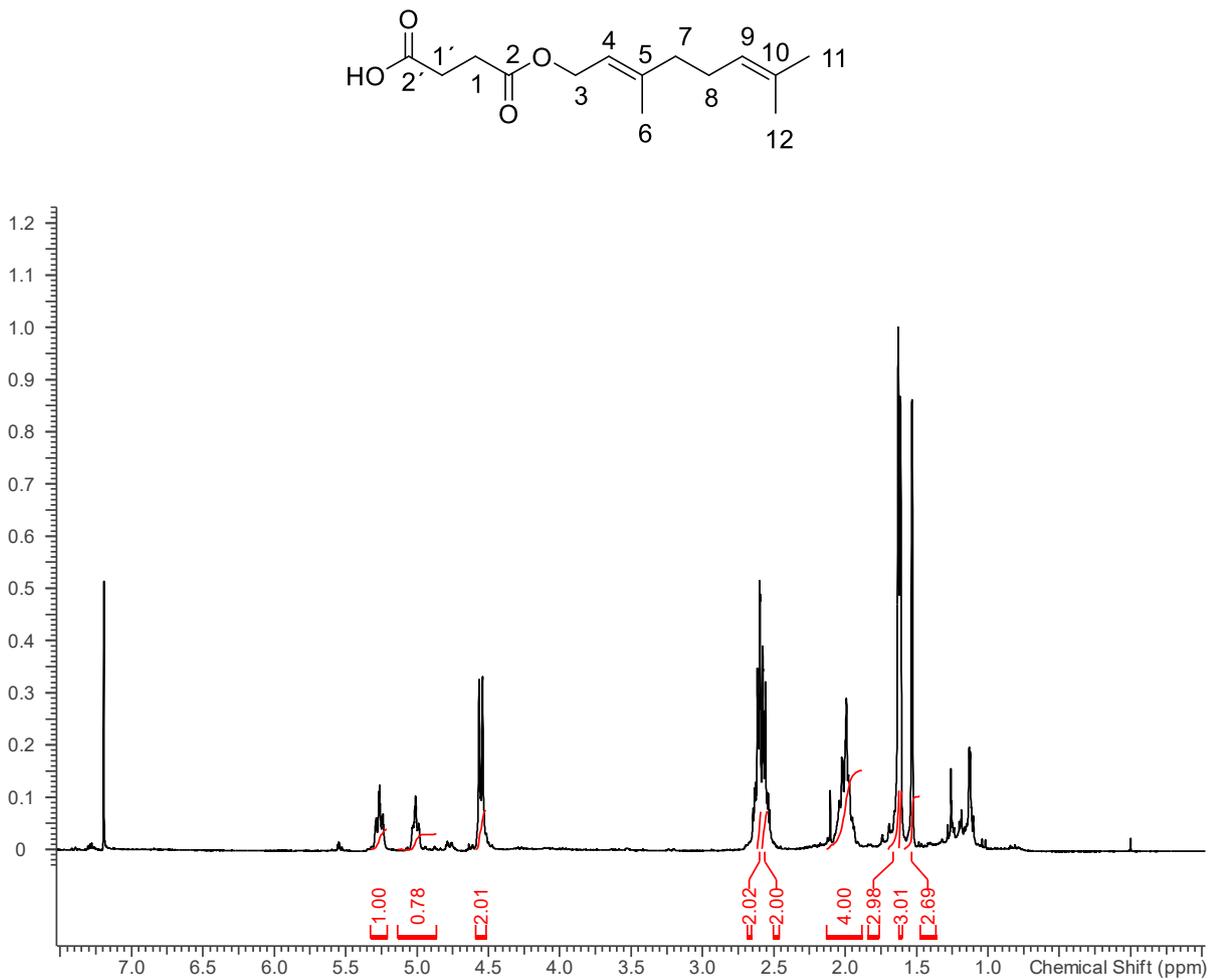
---



**Abbildung 5-22:** HMBC-NMR-Spektrum des Digeranylsuccinats (500 MHz, Chloroform-d)

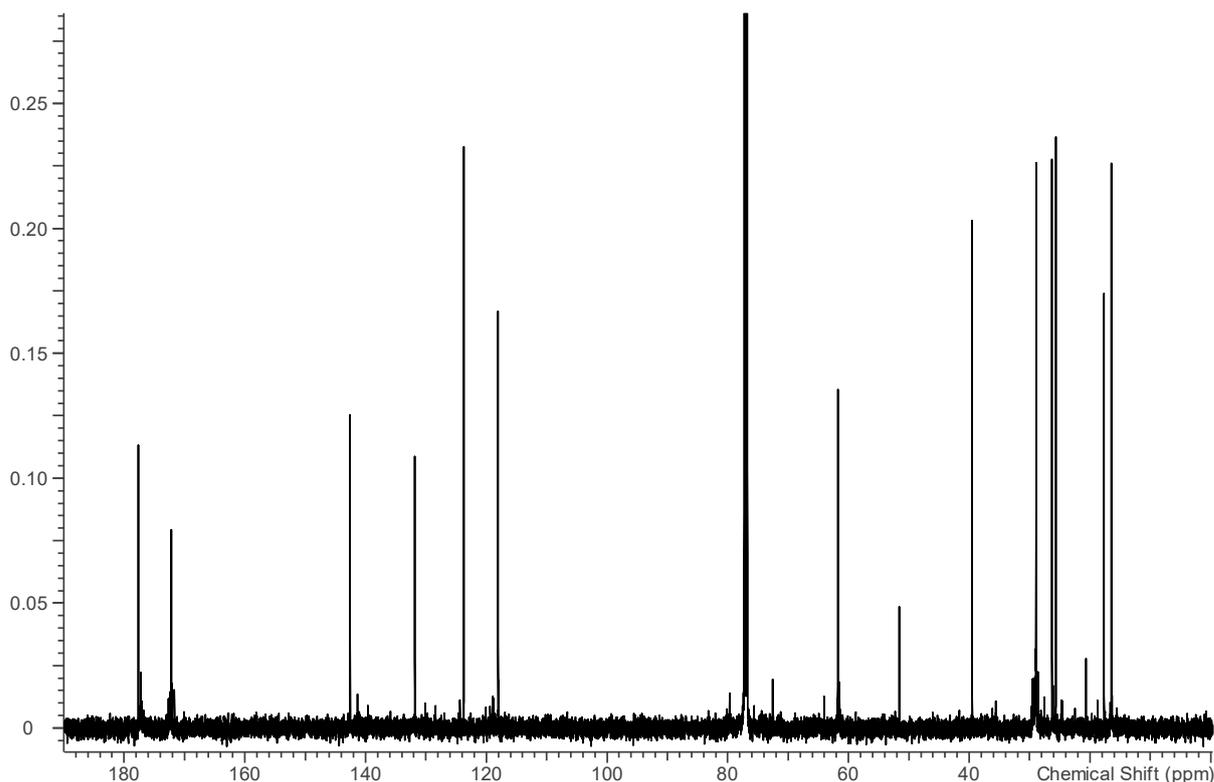
Auch Worzakowska et al. haben Digeranylsuccinat hergestellt und  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von dieser Verbindung angefertigt. Die Spektren von Worzakowska et al. entsprechen den in Abbildung 5-20 und 5-21 dargestellten Spektren [WORZAKOWSKA et al., 2013] [WORZAKOWSKA et al., 2014].

Die Spektren des Monogeranylsuccinats stehen beispielhaft für die Charakterisierung der Monoester mittels NMR-Spektroskopie. In Abbildung 5-23 ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Monogeranylsuccinats dargestellt. Wie der Abbildung entnommen werden kann, können die Signale den einzelnen Atomen zugeordnet werden:  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1,58 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) 1,66 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) 1,67 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ) 2,04 (4H, m;  $\text{CH}_2$ ) 2,61 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ) 2,65 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ) 4,60 (2H, d,  $J = 7,18$  Hz,  $\text{CH}_2$ ) 5,20 (1H, t,  $J = 6,80$  Hz, CH) 5,31 (1H, t,  $J = 7,18$ , CH). Die zusätzlichen kleinen Signale in diesem Spektrum deuten auf geringe Spuren von Verunreinigungen hin. Mit Hilfe der Integrale kann die Menge der Verunreinigungen auf ca. 12 % geschätzt werden. Durch dieses  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum kann das Monogeranylsuccinat allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden.



**Abbildung 5-23:** <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Monogeranylsuccinats mit dazugehöriger Strukturformel (300 MHz, Chloroform-d)

Daher wurde auch von dieser Verbindung ein <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum angefertigt, welches in Abbildung 5-24 dargestellt ist. Auch hier können die Signale den einzelnen Gruppen zugeordnet werden: <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 16,44 (C-6) 17,67 (C-12) 25,62 (C-11) 26,28 (C-8) 28,93 (C-1/1') 39,49 (C-7) 61,82 (C-3) 118,03 (C-4) 123,73 (C-9) 131,83 (C-10) 142,53 (C-5) 172,18 (C-2) 177,64 (C-2'). Auffällig an diesem <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum ist allerdings, dass für den Carbonylkohlenstoff zwei Signale (172,18 und 177,64 ppm) erhalten werden. Diese Signale deuten auf einen Monoester hin. Für das Digeranylsuccinat wurde nur ein Signal für die beiden Carbonylkohlenstoffe der Bernsteinsäureeinheit erhalten, da beide Kohlenstoffatome die gleiche chemische Umgebung aufweisen. Beim Monogeranylsuccinat hingegen weisen die beiden Carbonylkohlenstoffe eine unterschiedliche chemische Umgebung auf, da das eine verestert und das andere als freie Carboxylgruppe vorliegt. Dadurch ist das Signal für den Carbonylkohlenstoff, welcher verestert wurde, hochfeldverschoben.

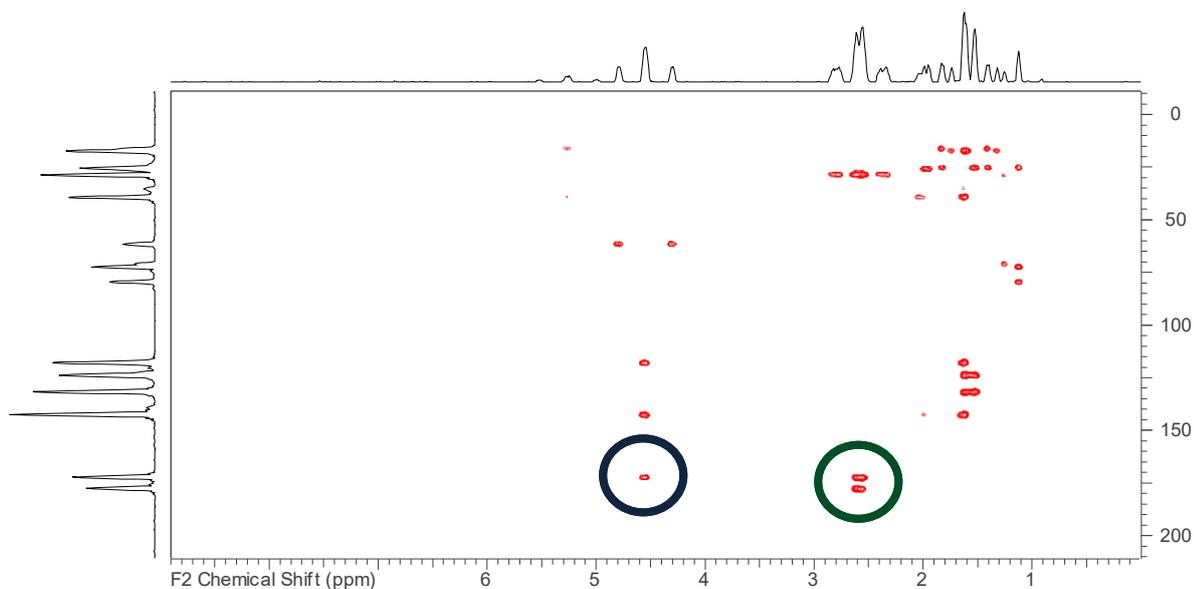


---

**Abbildung 5-24:**  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum des Monogeranylsuccinats (300 MHz, Chloroform-d)

Auch von dieser Verbindung wurde ein HMBC-NMR-Spektrum angefertigt, um die Esterbindung nachzuweisen. Dieses Spektrum ist in Abbildung 5-25 dargestellt.

Aus dem Spektrum wird ersichtlich, dass eindeutig der Monoester synthetisiert worden ist. Dieser Beweis kann mit Hilfe von zwei Signalen des HMBC-Spektrums begründet werden. Wie bereits erwähnt, zeigen die beiden Carbonylkohlenstoffe zwei unterschiedliche Signale im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Umgebung (veresterte Carboxylgruppe und freie Carboxylgruppe). Das im HMBC-Spektrum blau markierte Signal zeigt die Kopplung zwischen dem hochfeldverschobenen (bzw. mit Geraniol veresterten) Carbonylkohlenstoff und den H-Atomen, welche sich an der 3-Position der Geranioleinheit befinden. Der andere Carbonylkohlenstoff zeigt an dieser Stelle kein Signal, was darauf schließen lässt, dass keine Veresterung stattgefunden hat. Demzufolge kann eindeutig festgestellt werden, dass es sich bei der vorliegenden Verbindung um einen Monoester handelt. Ein weiteres Indiz dafür sind die grün markierten Signale. Diese entsprechen der Kopplung der H-Atome an der 1- und 1'-Position ( $^1\text{H}$ -NMR: 2,04 ppm) mit den jeweiligen Carbonylkohlenstoffen in der Bernsteinsäureeinheit. Durch die unterschiedliche chemische Umgebung der Carbonylkohlenstoffe werden zwei Signale für diese Kopplungen im HMBC-Spektrum erhalten. Somit kann eindeutig bewiesen werden, dass das Monogeranylsuccinat erhalten wurde.



**Abbildung 5-25:** HMBC-NMR Spektrum des Monogeranylsuccinats (300 MHz, Chloroform-d)

Alle weiteren NMR-Spektren für die synthetisierten Ester befinden sich im Anhang.

### 5.3.3. Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Aufgrund ihrer Struktur sind die Ester wahrscheinlich kaum bis gar nicht in Wasser löslich. Zur Überprüfung dieser Hypothese sind Verteilungskoeffizienten von einigen isolierten Estern aufgenommen worden. In Tabelle 5-4 sind die Ergebnisse zu dieser Untersuchung zusammengefasst. Ist der Wert für den Verteilungskoeffizienten einer Verbindung größer 1, so handelt es sich dabei um eine lipophile Verbindung. Bei Werten kleiner 1, zeigt die Verbindung vermehrt hydrophilen Charakter. Die bestimmten Verteilungskoeffizienten für alle vermessenen Ester sind größer als 1, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Ester lipophile Verbindungen sind und daher schlecht in Wasser löslich sind. Diese Untersuchungen sind für die Experimente zur Bestimmung des antibakteriellen Potentials durchgeführt worden. Die antibakteriellen Tests werden in einem wässrigen Medium durchgeführt, in welchem die zu testenden Ester kaum bis gar nicht löslich sind, sodass ein Lösungsvermittler verwendet werden sollte. Als Lösungsvermittler ist Methylacetat ausgewählt worden.

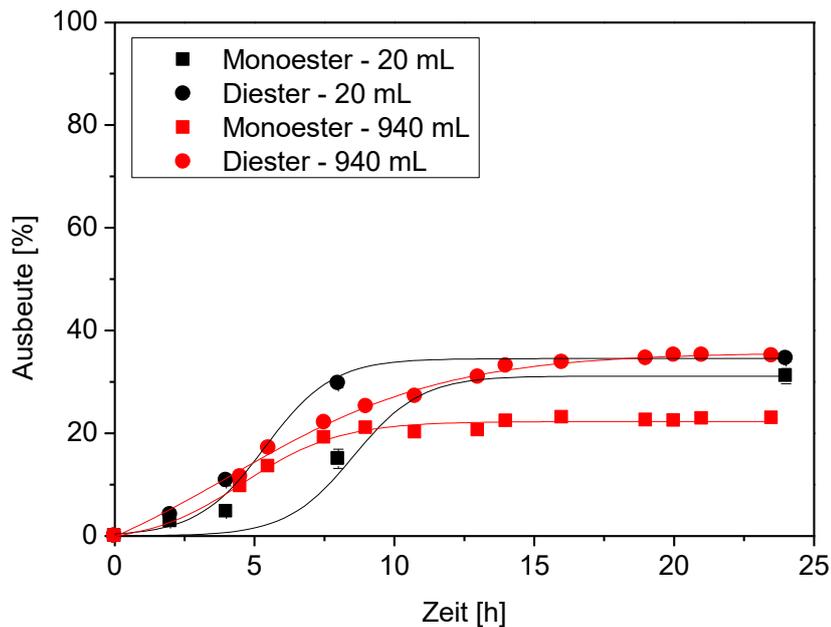
**Tabelle 5-4:** Gemessene Verteilungskoeffizienten für einige isolierte Ester (10 mmol/L Ester (bezogen auf Gesamtvolumen von 1 mL), 500 µL n-Octanol, 500 µL Wasser, 30 °C, 3 h, 400 rpm)

<b>Ester</b>	<b>Verteilungskoeffizient (K<sub>ow</sub>)</b>
<b>Digeranylsuccinat</b>	4,23 ± 0,05
<b>Dinerylsuccinat</b>	5,59 ± 0,29
<b>Dicitronellysuccinat</b>	2,02 ± 0,74
<b>Digeranylfumarat</b>	2,97 ± 0,29
<b>Mononerylfumarat</b>	1,67 ± 0,38
<b>Dicitronellylfumarat</b>	13,34 ± 3,21
<b>Dicinnamylfumarat</b>	4,93 ± 0,10
<b>Monocitronellylitaconat</b>	4,62 ± 0,56
<b>Dicitronellylitaconat</b>	20,92 ± 3,58

#### 5.4. Maßstabsvergrößerung

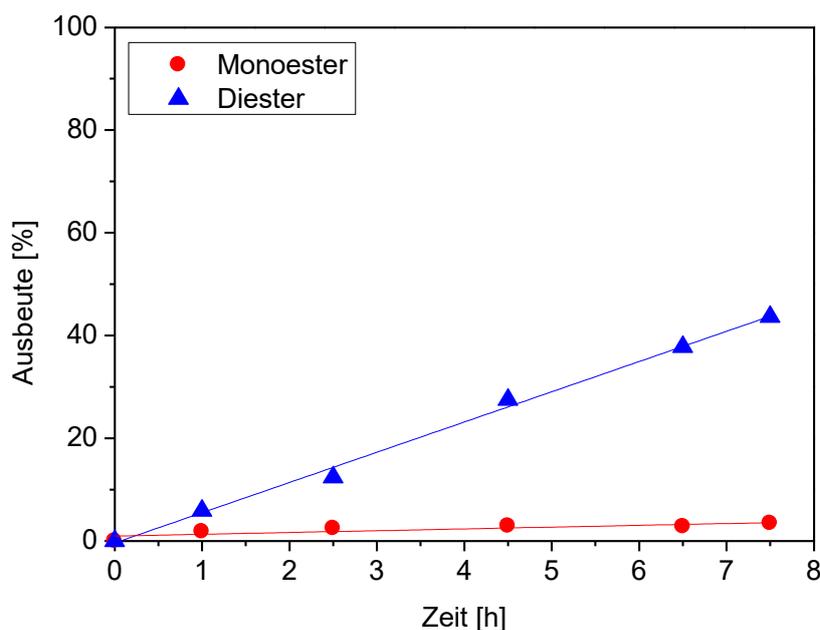
Durch die Versuche zur Maßstabsvergrößerung sollte die prinzipielle Eignung der Vorgehensweise zur Herstellung großer Mengen der Produkte getestet werden und mögliche Engpässe identifiziert werden. Aufgrund der begrenzten Zeit konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht alle Synthesen umfassend geprüft werden, aber die wesentliche Machbarkeit nachgewiesen werden.

Zunächst ist die Vergrößerung des Reaktionsansatzes untersucht worden. Für die analytischen Untersuchungen wurde eine Ansatzgröße von 20 mL gewählt, welcher für diese Untersuchungen auf ca. 1 L erhöht wurde. In Abbildung 5-26 ist der Reaktions-Zeit-Verlauf des vergrößerten Ansatzes im Vergleich zum 20 mL Reaktionsansatz dargestellt. Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass die Reaktionen ähnlich verlaufen. Bei beiden Reaktionsansätzen werden nach 24 h Reaktionszeit ca. 35 % Diester erhalten. Lediglich die Monoesterausbeute weicht ab. So konnten bei einem Reaktionsansatz von 20 mL ca. 30 % und bei einem Reaktionsansatz von 1 L ca. 20 % Monoester erhalten werden. Dies kann aber auch durch die unterschiedlichen Reaktionstemperaturen hervorgerufen worden sein. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Vergrößerung des Reaktionsansatzes von 20 mL auf 1 L keinen nachteiligen Einfluss auf die Ausbeute und die Selektivität der Reaktion hat.



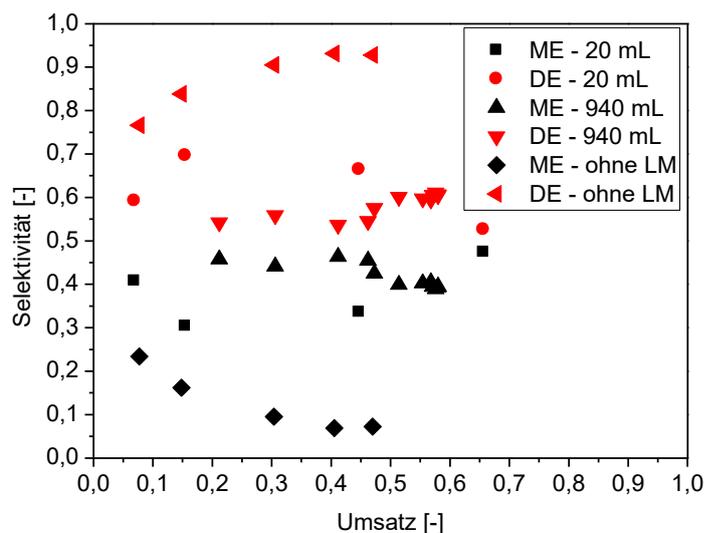
**Abbildung 5-26:** Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol im 20 mL und 1 L Maßstab (20 mmol/L Bernsteinsäure, 40 mmol/L Geraniol, 40 mg bzw. 1,889 g Novozym 435, 20 mL bzw. 940 mL MTBE, 50 bzw. 60 °C)

Die weiteren Versuche zur Maßstabsvergrößerung sind ohne Lösungsmittel durchgeführt worden. Während dieser Versuche dienten die Alkohole (Geraniol, Zimtalkohol) selbst als Lösungsmittel. Auch ein unterschiedliches Verhältnis der Substrate wurde dabei untersucht. Zunächst wurden Bernsteinsäure und Geraniol im Verhältnis 2:1 als Substrate getestet. Durch den Überschuss an Säure wurde der Monoester als Hauptprodukt erwartet. Hierbei trat die Problematik auf, dass die Substrate in diesem Verhältnis nicht durchmischbar waren (zu viel Feststoff), sodass als Lösungsvermittler Wasser dazugegeben werden musste. Das Wasser wurde während der Reaktion mit Hilfe eines Wasserabscheiders bei einer Temperatur von 60 °C und einem Druck von 60 mbar abgezogen. Doch zeigten GC/MS Messungen, dass wahrscheinlich durch den hohen Anteil an Wasser kein Produkt gebildet worden ist. Auch nachdem das gesamte Wasser aus der Reaktionsmischung abgetrennt worden ist, konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Die Temperatur stieg während der Reaktionsführung auf 80 °C an. Daher wurde der Anteil von Geraniol erhöht, sodass ein Substratverhältnis von 1:1 vorlag. Die Substrate waren dadurch besser durchmischbar und die Reaktion konnte gestartet werden. Durch die erhöhte Reaktionstemperatur (80 °C) konnte nicht gewährleistet werden, dass das Enzym nicht an Aktivität verloren hat, daher wurde erneut Novozym 435 zur Reaktionsmischung hinzugegeben. In Abbildung 5-27 ist der Reaktions-Zeit-Verlauf dieses Experimentes ab dem Zeitpunkt der erneuten Zugabe von Geraniol und Novozym 435 dargestellt.



**Abbildung 5-27:** Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol im 750 g Maßstab ohne Lösungsmittel (318,1 g Bernsteinsäure, 420 g Geraniol, 21,55 g Novozym 435, 60 °C, 50 - 60 mbar)

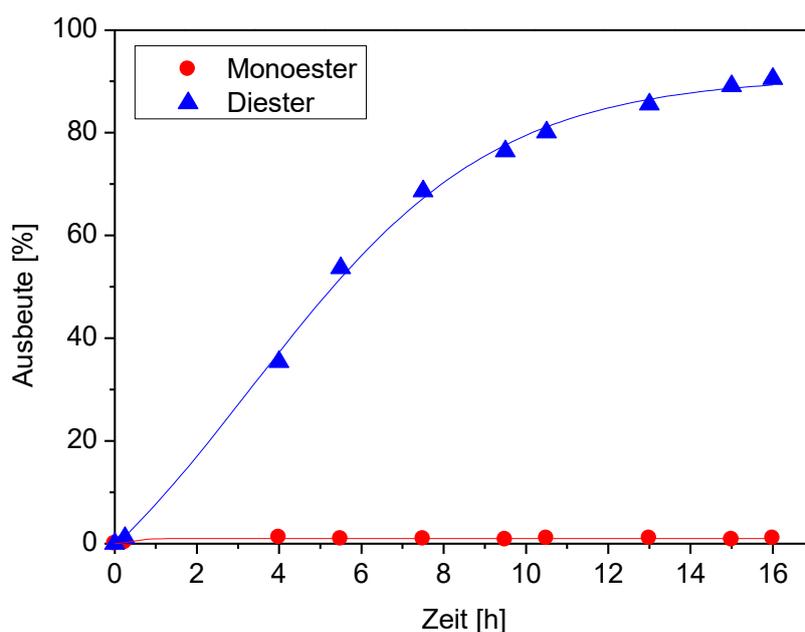
An der Auftragung ist zu erkennen, dass die Reaktion auch ohne Lösungsmittel stattgefunden hat. Durch das Substratverhältnis von 1:1 kann, bezogen auf die Bernsteinsäure, nur maximal 50 % Ausbeute an Diester erhalten werden. Der Abbildung kann entnommen werden, dass nach 7,5 h Reaktionszeit ca. 44 % Diester und ca. 3 % Monoester gebildet werden. Somit liegt der Diester entgegen der Erwartung als Hauptprodukt vor. Werden diese Ergebnisse mit den zuvor durchgeführten Substratverhältnistests (mit und ohne Lösungsmittel, Vgl. Kapitel 5.2.5., 5.2.4.) verglichen, fällt auf, dass das Verhältnis der gebildeten Produkte unterschiedlich ist. Bei der Durchführung der Reaktion ohne den Entzug des Reaktionswassers, werden Mono- und Diesterausbeuten (Verhältnis Bernsteinsäure:Geraniol, 1:1, 1:2) von 30 % erhalten. Somit liegen beide Produkte in ähnlichen Ausbeuten vor. Wird jedoch das Reaktionswasser aus der Reaktionsmischung entfernt, wird der Diester als Hauptprodukt gebildet (44 %). Durch den Entzug des Reaktionswassers wird hier die Rückreaktion unterdrückt und die Reaktion zugunsten des Diesters verschoben. Somit hat der Entzug des Reaktionswassers einen Einfluss auf die Selektivität der Reaktion. Um diesen Einfluss näher betrachten zu können sind die Umsätze und Selektivitäten bezogen auf den Mono- und Diester gegeneinander aufgetragen worden. In Abbildung 5-28 ist dies dargestellt. Dazu wurden die in diesem Kapitel beschriebenen Reaktionen (Veresterung von Bernsteinsäure und Geraniol, 20 und 940 mL Maßstab, sowie Reaktionsführung ohne Lösungsmittel mit Entzug des entstehenden Reaktionswassers) zum Vergleich herangezogen.



**Abbildung 5-28:** Auftragung des Umsatzes gegen die Selektivität der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol (20 und 940 mL Maßstab sowie Reaktionsführung ohne Lösungsmittel mit Entzug des Reaktionswassers)

Der Abbildung kann entnommen werden, dass die Selektivitäten der beiden mit Lösungsmittel durchgeführten Reaktionen ähnlich sind. Jedoch fällt auf, dass die Selektivität bezüglich des Diesters mit höheren Umsätzen ( $> 0,4$ ) sinkt und die des Monoesters steigt. Wobei bei allen Umsätzen eine Tendenz zur Diesterbildung nachgewiesen werden kann. Bei der Maßstabsvergrößerung ist dieser Effekt gegensätzlich. Bei Umsätzen bis 0,45 sind die Selektivitäten annähernd gleich (0,45 für den Monoester und 0,55 für den Diester), wobei eine leichte Tendenz zum Diester geht. Oberhalb eines Umsatzes von 0,45 steigt jedoch die Selektivität in Bezug zum Diesters und die des Monoesters sinkt. Werden diese Selektivitäten mit denen der Reaktionsführung ohne Lösungsmittel und mit Wasserentzug zu einem Vergleich herangezogen, so fällt auf, dass die Monoesterselektivität dramatisch gefallen ist und dadurch die Diesterselektivität auf 0,93 gestiegen ist. Dies bedeutet, dass während der Reaktion als Hauptprodukt der Diester gebildet wird. Durch den Entzug des Reaktionswassers kann sich kein Gleichgewicht zwischen Hin- Und Rückreaktion einstellen, da das Reaktionsprodukt Wasser kontinuierlich aus dem System entfernt wird. Durch die Symmetrie der Bernsteinsäure werden die beiden Carboxylgruppen nicht selektiv an einer Seite angegriffen. Zudem ist Bernsteinsäure ein Feststoff und wird nur in einem gewissen Maße im Geraniol gelöst. Der Monoester jedoch ist flüssig und steht dem Enzym so einfacher für die Umsetzung zur Verfügung als die Bernsteinsäure, welche in geringeren Konzentrationen kontinuierlich nachgelöst wird. An dieser Stelle wäre es interessant diesen Versuch mit den unsymmetrischen Säuren, wie Itacon- oder Apfelsäure, zu wiederholen und zu bestimmen welcher Ester bevorzugt gebildet wird. Aufgrund der begrenzten Zeit konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft werden.

Bei einem weiteren Versuch sind als Substrate Bernsteinsäure und Zimtalkohol in einem Verhältnis von 1:2 eingesetzt worden. Als Hauptprodukt wird bei diesem Versuch der Diester erwartet. Der Reaktions-Zeit-Verlauf ist in Abbildung 5-29 dargestellt. Den Daten ist zu entnehmen, dass der Diester als Hauptprodukt gebildet wird und der Monoester während der gesamten Reaktionszeit mit ca. 1 % in der Reaktionsmischung als Nebenprodukt vorliegt. Bereits nach 16 h Reaktionszeit konnte der Diester mit 90 % Ausbeute gebildet werden. Auch hier liegt der Grund für die Bildung des Diesters als Hauptprodukt wahrscheinlich darin begründet, dass das Reaktionsgleichgewicht aufgrund des Wasserentzugs auf die Seite der Produkte verschoben wird. Da die Bernsteinsäure wiederum nicht vollständig im Alkohol löslich ist, wird der gebildete Monoester wieder in den Diester umgesetzt und ist nur in geringen Konzentrationen in der Reaktionsmischung enthalten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen der Testreaktion einfach auf andere Substrate übertragen werden können und so ähnlich hohe Umsätze und Ausbeuten erhalten werden können.



**Abbildung 5-29:** Reaktionsverfolgung der Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Zimtalkohol im 750 g Maßstab ohne Lösungsmittel (153,1 g Bernsteinsäure, 347,1 g Zimtalkohol, 10,4 g Novozym 435, 60 °C, 23 – 30 mbar)

In Tabelle 5-5 sind die Raum-Zeit-Ausbeuten der vier in diesem Kapitel vorgestellten Ansätze angegeben. Dieser Wert spiegelt die Produktivität der Reaktion wieder, also wie viel Produkt pro Volumen und Zeiteinheit gebildet wurde. Der Tabelle kann entnommen werden, dass bei Verwendung eines Lösungsmittels als Reaktionsmedium sehr geringe Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass sich die Raum-Zeit-Ausbeuten des 20 mL und 940 mL Ansatzes nur

geringfügig unterscheiden. Es ist auch festzustellen, dass bei dem vergrößerten Reaktionsansatz mehr Diester und weniger Monoester gebildet wird als beim kleinen Maßstab. Damit kann die prinzipielle Machbarkeit einer Maßstabsvergrößerung erneut bestätigt werden.

**Tabelle 5-5:** Raum-Zeit-Ausbeuten der Veresterungsreaktionen (<sup>1</sup> 20 mL Ansatz, <sup>2</sup> 940 mL Ansatz, <sup>3</sup> Ansatz ohne Lösungsmittel)

Reaktion	Raum-Zeit-Ausbeute [ $\text{g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$ ]	
	Monoester	Diester
BS/G <sup>1</sup>	0,09	0,17
BS/G <sup>2</sup>	0,07	0,18
BS/G <sup>3</sup>	3,04	65,67
BS/ZA <sup>3</sup>	0,41	56,67

Werden nun die Werte des Versuches zur Maßstabsvergrößerung ohne Verwendung eines Lösungsmittels näher betrachtet, so fällt auf, dass durch den Entzug des Lösungsmittels die Raum-Zeit-Ausbeuten für den Mono- und Diester im Vergleich zu den vorherigen Versuchen deutlich gesteigert werden konnten. Wobei der Wert der Raum-Zeit-Ausbeute des Monoesters irreführend ist, da insgesamt nur rund 3 % Ausbeute an Monoester erhalten wurde. Nichtsdestotrotz konnte aber die Produktbildung pro Volumen und Zeiteinheit gesteigert werden. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Raum-Zeit-Ausbeute des Monoesters um mehr als 350 % gesteigert werden konnte. Durch den Entzug des Lösungsmittels war in der Umgebung des Enzyms mehr Substrat vorhanden, welches schneller umgesetzt werden konnte. Bei Verwendung eines Lösungsmittels und bei geringen Konzentrationen ist dies nicht unbedingt gegeben. Zudem wurde das entstehende Reaktionswasser aus der Mischung entfernt, wodurch das Gleichgewicht auf Seiten der Produkte verschoben wurde und die Selektivität der Reaktion bezogen auf den Monoester abnimmt. Allerdings kann so die Selektivität bezogen auf den Monoester gesteigert werden. Der Versuch zur Maßstabsvergrößerung mit Bernsteinsäure und Zimtalkohol zeigt eine ähnlich, aber etwas geringere Raum-Zeit-Ausbeute wie die Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol. Wie in Kapitel 5.2.8 bereits gezeigt, verläuft die Umsetzung des Zimtalkohols langsamer als die des Geraniols, da der Zimtalkohol sterischer gehindert ist, was durch die Raum-Zeit-Ausbeuten der beiden Reaktionen bestätigt werden kann. Weiterhin wird ersichtlich, dass der Diester als Hauptprodukt vorliegt. Beispielsweise überführten Korupp et al. die Lipase katalysierte lösungsmittelfreie Synthese von Glyceroladipat erfolgreich in einen 500 g Maßstab. Auch sie entzogen mit Hilfe von Vakuumtechniken das entstehende Wasser aus der Reaktionsmischung, um das Gleichgewicht zugunsten des Produktes zu verschieben und konnten so einen Umsatz von 95 % an Polyester erreichen. Dabei bestimmten sie Raum-Zeit-Ausbeuten von  $370 \text{ g} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{l}^{-1}$  und konnten so die hohe Produktivität der

untersuchten Reaktion zeigen [KORUPP et al., 2010]. Wie bereits erwähnt, konnte als Hauptprodukt, unabhängig vom Substratverhältnis, nur der Diester gebildet werden, wenn die Reaktion ohne Lösungsmittel und unter Wasserentzug durchgeführt wird. Durch die Verwendung eines Lösungsmittels und eines hohen Überschusses an Säure können, wie zuvor gezeigt, 75 % Monoesterausbeute erzielt werden. Je nachdem, ob der Mono- oder Diester als Hauptprodukt vorliegen soll, kann die Reaktion mit oder ohne Lösungsmittel durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit selektiv den Monoester zu erhalten, wäre es einen Alkoholrest vom Diester mit beispielsweise Natriummethanolat abzuspalten.

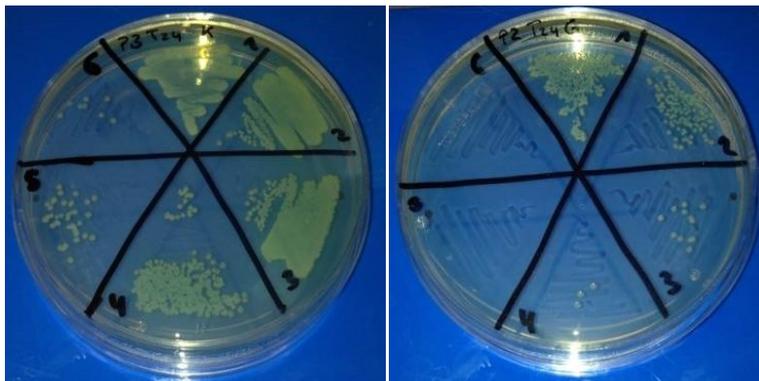
## **5.5. Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften der synthetisierten Ester**

Es ist bekannt, dass Ester der Monoterpene in vielen ätherischen Ölen von Pflanzen vorkommen [BONIKOWSKI et al., 2015]. Viele dieser ätherischen Öle zeigen eine hohe antibakterielle Wirkung auf eine Vielzahl von Mikroorganismen [BURT, 2004]. Auch die hier synthetisierten Ester sind unter anderem aus Monoterpenen aufgebaut, daher wurden sie hinsichtlich ihrer antibakteriellen Eigenschaften untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: der Killing Assay und die Wachstumsversuche. Da die eingesetzten Ester wenig bis gar nicht in Wasser löslich sind, war ein Lösungsvermittler notwendig. Oftmals eingesetzte Lösungsmittel sind dabei Dichlormethan oder Chloroform, diese Lösungsmittel sind aber nicht wasserlöslich. Daher ist Methylacetat ausgewählt worden, da es gut in Wasser löslich ist und die Bakterien nicht beeinflusst. Die Stammlösungen sind in Methylacetat angesetzt worden und hatten eine Konzentration von 100 und 250 mmol/L. Die Endkonzentration während der Experimente betragen 3 und 10 mmol/L. Diese Konzentrationen wurden dabei sowohl aus Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) und aus Literaturdaten bestimmt [CHANG et al., 2001] [JANSSEN et al., 1985] [KIM et al., 1995]. Um Interferenzen durch das Methylacetat auszuschließen, wurde pro Experiment eine Blank-Probe ohne Ester und mit Methylacetat durchgeführt. Neben den Estern sind auch die vier verwendeten Alkohole, sowie zwei Säuren als Kontrolle untersucht worden. Als Bakterienstämme wurden *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa* (in der Variante von multiresistenten Stämme (3MRGN) eingesetzt.

### 5.5.1. Killing Assay<sup>1</sup>

Bei diesen Experimenten wird untersucht, in wie weit die eingesetzten Verbindungen in der Lage sind die Bakterien abzutöten. Dazu wurden Bakteriensuspensionen in Phosphatpuffer hergestellt ( $OD_{600} = 1,50$  für *Staphylococcus aureus*,  $OD_{600} = 0,35$  für *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), mit den Stammlösungen der Ester versetzt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 0, 4 und 24 h wurden jeweils Proben entnommen und die Bakterienanzahl bestimmt. Dafür werden die entnommenen Proben sechs Mal verdünnt und diese anschließend auf Agarplatten ausplattiert. Nachdem die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden, konnten die Kolonie bildenden Einheiten (KBE) wachsen und am nächsten Tag ausgezählt werden. Mit Hilfe der Verdünnungen kann dann die tatsächliche Bakterienanzahl ermittelt werden. In Abbildung 5-30 sind zwei verschiedene Agarplatten (Kontrolle und Geraniol) dargestellt.

---



**Abbildung 5-30:** Agarplatten mit *Pseudomonas aeruginosa* links: Kontrolle, rechts: Geraniol (3 mmol/L Wirkkonzentration, 24 h Einwirkzeit)

Wie zu erkennen ist, weist die Kontrollplatte bei allen Verdünnungsstufen Kolonie bildende Einheiten auf. Auf der zweiten Platte sind die Verdünnungen der Bakteriensuspension ausplattiert worden und anschließend erfolgte die Zugabe von 30  $\mu$ L einer 100 mmol/L Lösung von Geraniol in Methylacetat und einer Inkubationszeit von 24 h. Es wird ersichtlich, dass die beiden letzten Verdünnungsstufen keine KBE zeigen. Das Geraniol zeigt demzufolge einen antibakteriellen Einfluss auf die *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien. Durch das Hinzufügen von Geraniol wurden ca. 99 % der Bakterien nach 24 h abgetötet. Auch andere, wie Tomadoni et al., konnten die antibakterielle Wirkung des Geraniols auf *Pseudomonas aeruginosa* und andere gramnegative sowie grampositive Bakterienstämme zeigen [DORMAN et al., 2000] [INOUYE et al., 2001] [TOMNADONI et al., 2015] [ZANETTI et al., 2015].

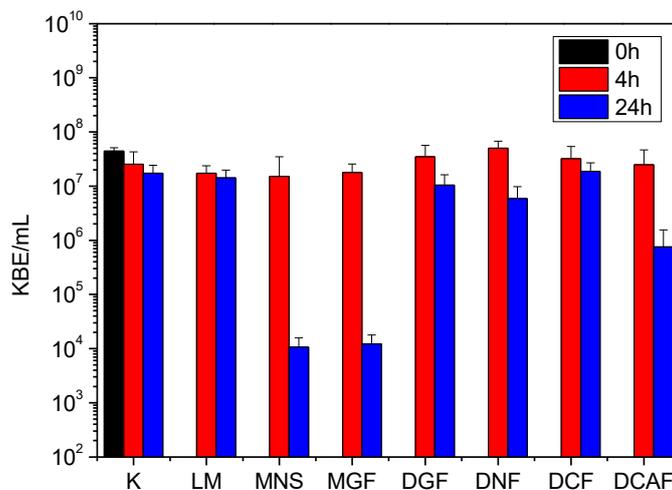
---

<sup>1</sup> Da es für diese Bezeichnung keine passende deutsche Übersetzung gibt, wird der englische Ausdruck weiterhin verwendet.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Killing Assays für jeden verwendeten Stamm einzeln vorgestellt und diskutiert. Die abgetöteten Bakterien werden im Vergleich zur Kontrolle berechnet und bewertet. Diese Werte sind erst relevant, wenn sie über 90 % liegen, da bei einer Abtötung von 90 % die geringste Verdünnungsstufe keine Bakterien mehr enthält. Liegen die Werte unterhalb von 90 % kann auch ein Fehler innerhalb der Verdünnung aufgetreten sein.

### 5.5.1.1. *Staphylococcus aureus*

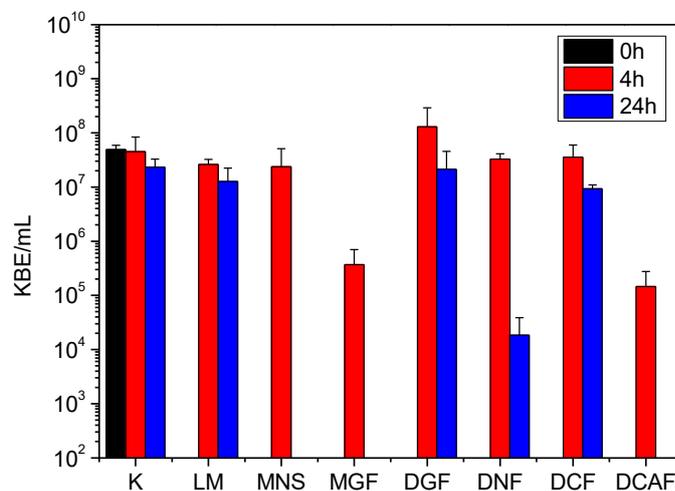
Wie bereits beschrieben, wird die Bakterienanzahl während dieser Experimente bestimmt, um zu untersuchen, ob die synthetisierten Ester eine antibakterielle Wirkung besitzen. Dabei wurde bei jeder Messung eine Kontrolle (reine Bakteriensuspension, ohne Vorhandensein von Zusatzstoffen) mit untersucht und auch der Einfluss des Lösungsmittels wurde bei jeder Untersuchung überprüft. In Abbildung 5-31 sind die so erhaltenen Daten für ausgewählte Verbindungen dargestellt.



**Abbildung 5-31:** Grafische Darstellung des Killing Assays von *Staphylococcus aureus* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (970  $\mu$ L Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 1,5); 30  $\mu$ L Ester-Stammlösung (100 mmol/L) - 3 mmol/L Wirkkonzentration)

Aus der Auftragung wird ersichtlich, dass das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Bakterien hat. Sowohl das Mononerylsuccinat als auch das Monogeranylfumarat zeigen einen Effekt nach 24 h. Bereits bei einer Konzentration von 3 mmol/L der eingesetzten Ester kann eine Abtötung von 99,9 % der Bakterien erreicht werden. Auch das Dicinnamylfumarat zeigt eine Wirkung auf die Bakterien, dabei konnten 95,6 % der Zellen abgetötet werden. Die anderen in dieser Versuchsreihe getesteten Verbindungen, Digeranyl-, Dineryl- und Dicitronellylfumarat, zeigen keinerlei Einfluss

auf die Bakterien. Werden diese Ergebnisse mit den Untersuchungen, bei denen die Ester mit einer Konzentration von 10 mmol/L eingesetzt wurden, verglichen, kann festgestellt werden, dass die beiden Monoester (MNS, MGF) sowie das Dicinnamylfumarat in der Lage sind die Zellen nach 24 h vollständig abzutöten. Dies ist in Abbildung 5-32 dargestellt. Bereits nach 4 h Einwirkzeit, zeigen sowohl das Monogeranylfumarat und das Mononerylfumarat als auch das Dicinnamylfumarat eine Wirkung (über 99,9 % der Zellen sind bis dahin abgestorben). Auch das Dinerylfumarat zeigt eine Abtötung von 99,9 % der Bakterien nach 24 h. Die beiden verbleibenden Diester (Digeranylfumarat und Dicitronellylfumarat) hingegen zeigen keinen Einfluss auf die Bakterien. Auch hier zeigt das eingesetzte Lösungsmittel, Methylacetat, keine Wirkung auf die Zellen.



**Abbildung 5-32:** Grafische Darstellung des Killing Assays von *Staphylococcus aureus* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (960  $\mu$ L Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 1,5); 40  $\mu$ L Ester-Stammlösung (250 mmol/L) - 10 mmol/L Wirkkonzentration)

Zur besseren Überschaubarkeit wurde hier auf die Darstellung der restlichen Diagramme verzichtet. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Zusammenfassung über die erhaltenen Ergebnisse. Dabei wurde der Prozentsatz der im Vergleich zur Kontrolle abgetöteten Bakterien berechnet.

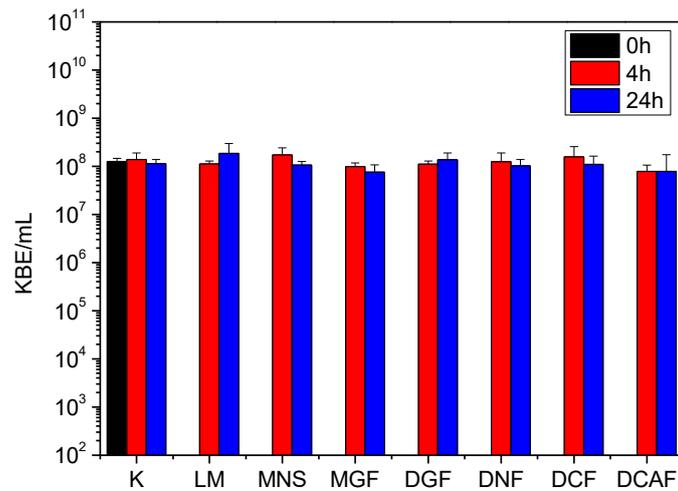
**Tabelle 5-6:** Zusammenfassung des Killing Assays von *Staphylococcus aureus*: abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%] (n.t. – nicht getestet)

Testsubstanzen	abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%]			
	3 mmol/L		10 mmol/L	
	4 h	24 h	4 h	24 h
<b>G</b>	94,1	≥ 99,9	87,2	≥ 99,9
<b>N</b>	-	≥ 99,9	61,1	≥ 99,9
<b>C</b>	-	99,9	65,8	≥ 99,9
<b>ZA</b>	-	90,7	98,1	≥ 99,9
<b>BS</b>	n.t.	n.t.	-	73,9
<b>IS</b>	n.t.	n.t.	-	63,1
<b>MGS</b>	55,5	99,9	96,9	≥ 99,9
<b>DGS</b>	-	-	-	85,9
<b>MNS</b>	40,4	99,9	47,0	≥ 99,9
<b>DNS</b>	-	15,4	-	47,7
<b>DCS</b>	-	12,4	-	96,0
<b>DCAS</b>	-	-	-	92,2
<b>MGF</b>	30,1	99,9	99,2	≥ 99,9
<b>DGF</b>	-	39,6	-	8,2
<b>MNF</b>	71,1	99,9	97,8	≥ 99,9
<b>DNF</b>	-	65,6	97,8	99,9
<b>DCF</b>	-	-	21,1	59,9
<b>MCAF</b>	-	99,9	79,9	≥ 99,9
<b>DCAF</b>	-	95,6	99,7	≥ 99,9
<b>MGI</b>	76,9	≥ 99,9	68,8	≥ 99,9
<b>DGI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MNI</b>	-	99,9	-	≥ 99,9
<b>MCI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAI</b>	-	99,4	58,8	≥ 99,9
<b>DGM</b>	n.t.	n.t.	-	14,9
<b>MNM</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAM</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>DCAM</b>	-	-	-	79,6

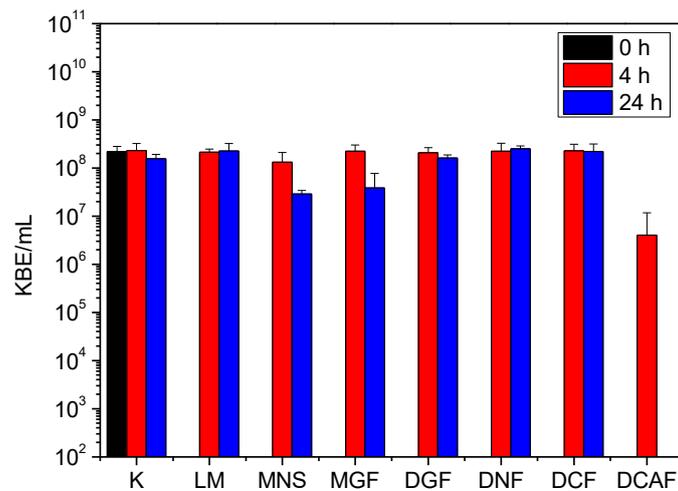
Aus Tabelle 5-6 wird ersichtlich, dass die Ausgangsstoffe, wie Geraniol, Nerol, Citronellol und Zimtalkohol eine sehr hohe antibakterielle Aktivität hinsichtlich dieses Bakterienstammes besitzen. Dies zeigten auch andere, wie Andogan et al., durch ihre Untersuchungen [ANDOGAN et al., 2002] [CHANG et al., 2001] [MULYANINGSIH et al., 2011] [ZANETTI et al., 2015]. Die beiden getesteten Säuren, Bernstein- und Itaconsäure, hingegen zeigen keine oder eine vernachlässigbar kleine Wirkung auf die Bakterien (unter 90 %). Bei den Estern kann festgestellt werden, dass alle Monoester eine sehr hohe antibakterielle Aktivität von über 99 % gegenüber den verwendeten *Staphylococcus aureus* Stamm aufweisen, sowohl bei einer Konzentration von 3 mmol/L als auch von 10 mmol/L nach einer Einwirkzeit von 24 h. Es kann außerdem festgestellt werden, dass das Dicinnamylfumarat eine sehr hohe antibakterielle Aktivität zeigt. Nach einer Einwirkzeit von 24 h und einer Konzentration von 3 mmol/L sind bereits über 95 % der Zellen abgetötet worden. Bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 4 h sind bereits 99,7 % und nach 24 h über 99,9 % der Bakterien abgestorben. Auch andere Diester zeigen ein hohes antibakterielles Potential. So konnten das Dicitronellysuccinat, das Dicinnamylsuccinat und das Dinerylfumarat über 92 % 96 % bzw. 99,9 % der Bakterien, bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h, abtöten. Die restlichen getesteten Verbindungen zeigen kein antibakterielles Potential.

#### **5.5.1.2. *Escherichia coli***

Für die Untersuchung der antibakteriellen Aktivität mit *Escherichia coli* wurden die Versuche wie zuvor beschrieben durchgeführt. In Abbildung 5-33 sind ausgewählte Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Das Lösungsmittel zeigt keinen Einfluss auf die Bakterien. Des Weiteren weisen die Ester bei einer Konzentration von 3 mmol/L keine antibakterielle Aktivität gegenüber den *Escherichia coli* Zellen auf. Wird jedoch die Konzentration der Ester auf 10 mmol/L erhöht, hat nur das Dicinnamylfumarat einen starken Einfluss auf die Bakterien. So ist diese Verbindungen in der Lage nach 4 h Einwirkzeit 98 % der Bakterien abzutöten, nach 24 h sind mehr als 99,9 % der Bakterien abgestorben. Die dazugehörigen Daten sind in Abbildung 5-34 gezeigt.



**Abbildung 5-33:** Grafische Darstellung des Killing Assays von *Escherichia coli* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (970 µL Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 0,35); 30 µL Ester-Stammlösung (100 mmol/L) - 3 mmol/L Wirkkonzentration)



**Abbildung 5-34:** grafische Darstellung des Killing Assays von *Escherichia coli* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (960 µL Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 0,35); 40 µL Ester-Stammlösung (250 mmol/L) - 10 mmol/L Wirkkonzentration)

Auch an dieser Stelle wird auf die Darstellung der restlichen Diagramme verzichtet. In Tabelle 5-7 sind die Daten dieser Messungen zusammenfassend dargestellt. Dabei wurde wieder die abgetötete Bakterienzahl im Vergleich zur Kontrolle berechnet und angegeben.

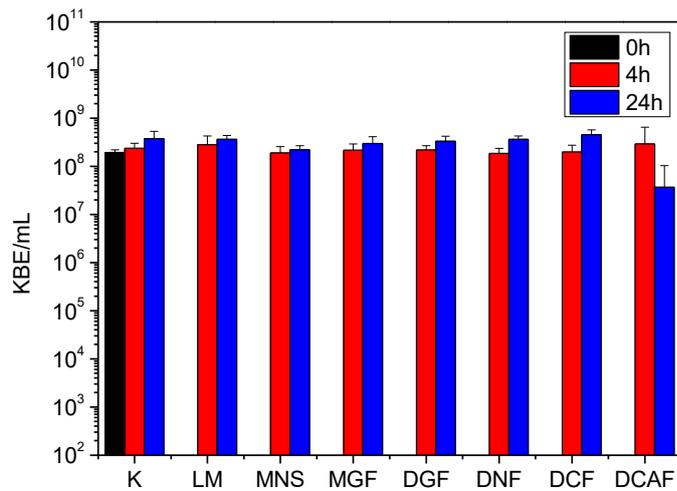
**Tabelle 5-7:** Zusammenfassung des Killing Assays von *Escherichia coli*: abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%] (n.t. – nicht getestet)

Testsubstanzen	abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%]			
	3 mmol/L		10 mmol/L	
	4 h	24 h	4 h	24 h
<b>G</b>	95,7	≥ 99,9	99,1	≥ 99,9
<b>N</b>	42,4	≥ 99,9	74,8	≥ 99,9
<b>C</b>	69,6	≥ 99,9	74,2	≥ 99,9
<b>ZA</b>	26,3	9,3	87,8	≥ 99,9
<b>BS</b>	n.t.	n.t.	-	-
<b>IS</b>	n.t.	n.t.	-	-
<b>MGS</b>	-	25,1	69,8	≥ 99,9
<b>DGS</b>	-	12,8	11,4	27,7
<b>MNS</b>	-	6,4	42,8	81,3
<b>DNS</b>	-	29,4	14,6	28,2
<b>DCS</b>	-	40,9	47,1	98,5
<b>DCAS</b>	-	-	-	75,1
<b>MGF</b>	28,9	33,4	3,2	75,0
<b>DGF</b>	-	-	-	-
<b>MNF</b>	-	47,2	41,0	99,3
<b>DNF</b>	-	-	-	-
<b>DCF</b>	-	-	-	-
<b>MCAF</b>	74,2	≥ 99,9	99,9	≥ 99,9
<b>DCAF</b>	43,1	31,0	98,3	≥ 99,9
<b>MGI</b>	-	25,8	-	99,9
<b>DGI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MNI</b>	-	61,2	92,9	98,8
<b>MCI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAI</b>	-	17,2	99,6	≥ 99,9
<b>DGM</b>	n.t.	n.t.	-	22,8
<b>MMN</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAM</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>DCAM</b>	-	-	79,6	99,9

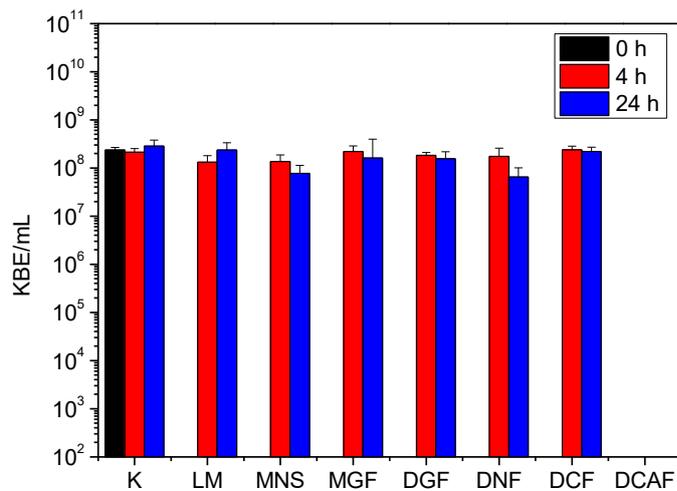
Der Tabelle kann entnommen werden, dass auch bei diesem Bakterienstamm das Geraniol, Nerol und Citronellol ein sehr hohes antibakterielles Potential aufweisen. Bereits bei einer Konzentration von 3 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h konnten über 99,9 % der Bakterien abgetötet werden. Auch bei einer Konzentration von 10 mmol/L sterben über 99,9 % der Bakterien nach einer Einwirkzeit von 24 h ab. Bereits nach 4 h Einwirkzeit und einer Konzentration von 10 mmol/L sind 99,1 % der Bakterien durch das Geraniol abgetötet worden. Der Zimtalkohol zeigt erst bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h ein hohes antibakterielles Potential (über 99,9 % der Zellen sind abgestorben). Vier der getesteten Verbindungen weisen ein sehr hohes antibakterielles Potential in Bezug auf die getesteten *Escherichia coli* Bakterien auf. So konnten das Monogeranylsuccinat, das Mono- und Dicinnamylfumarat sowie das Monocinnamylitaconat bei einer Konzentration von 10 mmol/L nach 24 h über 99,9 % der Bakterien abtöten. Auch durch das Dicitronellylsuccinat, Mononerylfumarat, Monogeranyl- und Mononerylitaconat sowie das Monocinnamylmalat konnten bei einer Konzentration von 10 mmol/L nach 24 h über 98,5 % der Bakterien abgetötet werden. Besonders interessante Ergebnisse zeigen das Mono- und Dicinnamylfumarat. Bereits bei einer Konzentration von 3 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h konnte das Monocinnamylfumarat über 99,9 % der Bakterien abtöten. Zudem zeigen diese beiden Verbindungen ein besseres antibakterielles Potential als der Zimtalkohol selbst. So wurden durch das Mono- und Dicinnamylfumarat bereits bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 4 h über 98 % der Bakterien abgetötet. Mit Hilfe des reinen Zimtalkohols bei gleicher Konzentration konnte dies erst nach 24 h Einwirkzeit erreicht werden.

#### **5.5.1.3. *Pseudomonas aeruginosa***

Für die *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte ein analoges experimentelles Vorgehen. Die Ergebnisse für die Messungen mit ausgewählten Estern sind in Abbildung 5-35 dargestellt. Bei einer Konzentration von 3 mmol/L keinen Einfluss auf die Bakterien aufweisen. Die einzige Ausnahme ist das Dicinnamylfumarat, welches nach 24 h ca. 90 % der Bakterien abtöten konnte. Zum Vergleich sind in Abbildung 5-36 die Ergebnisse bei einer Esterkonzentration von 10 mmol/L dargestellt. Wie zu erkennen ist, weist das Dicinnamylfumarat eine sehr hohe antibakterielle Wirkung auf. Bereits nach 4 h Einwirkzeit sind die Bakterien zu über 99,9 % abgetötet worden. Alle anderen dargestellten Verbindungen haben keinerlei Einfluss auf die Bakterien.



**Abbildung 5-35:** Grafische Darstellung des Killing Assays von *Pseudomonas aeruginosa* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (970  $\mu$ L Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 0,35); 30  $\mu$ L Ester-Stammlösung (100 mmol/L) - 3 mmol/L Wirkkonzentration)



**Abbildung 5-36:** Grafische Darstellung des Killing Assays von *Pseudomonas aeruginosa* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF und DCAF (960  $\mu$ L Bakteriensuspension in PBS-Puffer (OD 600 = 0,35); 40  $\mu$ L Ester-Stammlösung (250 mmol/L) - 10 mmol/L Wirkkonzentration)

Auch die Ergebnisse für diesen Bakterienstamm sind zusammengefasst in Tabelle 5-8 dargestellt. Dabei wurde wieder die abgetötete Bakterienzahl im Vergleich zur Kontrolle berechnet und angegeben. Auch an dieser Stelle wird auf die Darstellung der restlichen Diagramme verzichtet.

**Tabelle 5-8:** Zusammenfassung des Killing Assays von *Pseudomonas aeruginosa*: abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%] (n.t.- nicht getestet)

Testsubstanzen	abgetötete Bakterien im Vergleich zur Kontrolle [%]			
	3 mmol/L		10 mmol/L	
	4 h	24 h	4 h	24 h
<b>G</b>	58,1	99,0	78,2	≥ 99,9
<b>N</b>	64,8	99,4	99,9	≥ 99,9
<b>C</b>	70,6	98,5	97,3	≥ 99,9
<b>ZA</b>	34,1	69,3	99,9	≥ 99,9
<b>BS</b>	n.t.	n.t.	-	-
<b>IS</b>	n.t.	n.t.	-	-
<b>MGS</b>	-	-	26,7	45,5
<b>DGS</b>	-	-	38,0	36,3
<b>MNS</b>	19,8	41,3	35,6	72,7
<b>DNS</b>	-	-	-	-
<b>DCS</b>	-	-	18,4	35,4
<b>DCAS</b>	-	-	51,6	98,3
<b>MGF</b>	8,0	20,1	-	42,9
<b>DGF</b>	6,9	11,4	-	45,6
<b>MNF</b>	68,8	69,5	29,1	99,9
<b>DNF</b>	-	-	-	77,2
<b>DCF</b>	-	-	-	-
<b>MCAF</b>	≥ 99,9	≥ 99,9	≥ 99,9	≥ 99,9
<b>DCAF</b>	-	90,1	≥ 99,9	≥ 99,9
<b>MGI</b>	37,9	65,1	97,6	99,9
<b>DGI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MNI</b>	-	50,7	34,2	98,4
<b>MCI</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAI</b>	36,6	45,1	99,9	≥ 99,9
<b>DGM</b>	n.t.	n.t.	-	18,1
<b>MNM</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>MCAM</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>DCAM</b>	-	60,4	98,1	≥ 99,9

Das Geraniol, Nerol, Citronellol und der Zimtalkohol ein sehr hohes antibakterielles Potential auf. Bei einer Konzentration von 3 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h konnten das Geraniol, Nerol und Citronellol bereits über 98 % der *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien abtöten. Bei einer Konzentration von 10 mmol/L sind durch alle getesteten Alkohole über 99,9 % der Bakterien abgestorben. Bei gleicher Konzentration konnten das Nerol und der Zimtalkohol bereits nach 4 h Einwirkzeit über 99,9 % der Bakterien abtöten. Das Mono- und Dicinnamylfumarat besitzen ein sehr starkes antibakterielles Potential, da bereits nach 4 h Einwirkzeit und bei einer Konzentration von 10 mmol/L über 99,9 % der Bakterien abgetötet worden sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Monocinnamylfumarat ein stärkeres antibakterielles Potential als der Zimtalkohol selbst aufweist. Bereits nach 4 h Einwirkzeit und einer Konzentration von 3 mmol/L, konnten durch das Monocinnamylfumarat über 99,9 % der Bakterien abgetötet werden. Auch das Monogeranylitaconat, das Mononerylitaconat sowie das Dicinnamylmalat zeigen ein sehr hohes antibakterielles Potential. Bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h sind durch diese Ester über 99,9 % der Bakterien abgestorben. Zudem konnte das Mononerylitaconat bereits nach 4 h bei gleicher Konzentration 99,9 % der Bakterien abtöten. Durch das Dicinnamylsuccinat sind bei einer Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h über 98 % der Bakterien abgestorben.

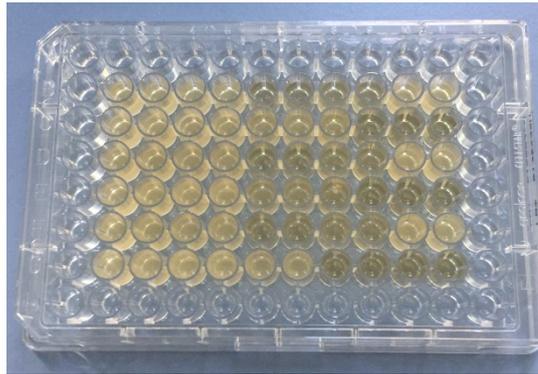
#### **5.5.1.4. Zusammenfassung der Killing Assays**

Gegenüber *Staphylococcus aureus* zeigten neben den Alkoholen (Geraniol, Nerol, Citronellol und Zimtalkohol) alle getesteten Monoester sowie das Dicinnamylfumarat eine sehr hohe antibakterielle Aktivität. So konnten über 99,9 % der Bakterien bei einer Esterkonzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h abgetötet werden. Durch das Monogeranylsuccinat und das Monocinnamylitaconat sind bereits nach 4 h Einwirkzeit bei einer Konzentration von 10 mmol/L 96,9 bzw. 99,7 % der *Staphylococcus aureus* Bakterien abgestorben. Bei einer Konzentration von 3 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h wurden durch das Monogeranyl- und Mononerylsuccinat, das Monogeranyl-, Mononeryl- und Monocinnamylfumarat, das sowie das Monocinnamylitaconat über 99 % der Bakterien abgetötet. Für den *Escherichia coli* Stamm konnten neben den Alkoholen folgende Verbindungen mit einem sehr hohen antibakteriellen Potential bestimmt werden (10 mmol/L, 24 h Einwirkzeit, Abtötung von 99,9 % der Bakterien): Monogeranylsuccinat, Mono- und Dicinnamylfumarat, Monogeranyl- und Monocinnamylitaconat sowie das Dicinnamylmalat. Das Mononerylsuccinat und das Dicitronellylsuccinat zeigten bei gleichen Bedingungen eine Abtötung von über 98 % der Bakterien. Bei einer

Konzentration von 10 mmol/L und einer Einwirkzeit von 4 h Stunden sind durch das Monocinnamylitaconat, Monocinnamyl- und Dicinnamylfumarat über 98 % der *Escherichia coli* Bakterien abgestorben. Besonders hervorzuheben ist das Monocinnamylfumarat, durch welches bei einer Konzentration von nur 3 mmol/L und einer Einwirkzeit von 24 h mehr als 99,9 % der Bakterien abgetötet werden konnten. Vor allem die Zimtalkoholderivate, wie das Monocinnamylfumarat und -itaconat sowie das Dicinnamylfumarat und -malat zeigen eine sehr hohe antibakterielle Aktivität (10 mmol/L, 24 h Einwirkzeit, Abtötung von 99,9 % der Bakterien). Auch das Monogeranylitaconat, das Mononerylfumarat und -itaconat zeigten eine hohe antibakterielle Aktivität, so konnten nach 24 h Einwirkzeit und einer Konzentration von 10 mmol/L über 98 % der Bakterien abgetötet werden. Auch hier ist besonders das Monocinnamylfumarat hervorzuheben, dass bereits nach 4 h Einwirkzeit bei einer Konzentration von 3 mmol/L über 99,9 % der *Pseudomonas aeruginosa* Bakterien abgetötet worden sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass vor allem die untersuchten Monoester ein sehr hohes antibakterielles Potential aufweisen. Des Weiteren zeigen auch einige Zimtalkoholderivate eine starke antibakterielle Wirkung auf den *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und den *Pseudomonas aeruginosa* Stamm. Folgende Ester konnten eine hohe bzw. sehr hohe antibakterielle Wirkung gegen alle drei getesteten Bakterienstämme zeigen: das Monogeranylitaconat, das Mononerylfumarat und -itaconat, das Monocinnamylfumarat und -itaconat sowie das Dicinnamylfumarat. Zanetti et al. synthetisierten beispielsweise Lipase katalysiert das Geranylcinnamat und testeten diese Verbindung auf ihr antibakterielles Potential. Sie fanden heraus, dass diese Verbindung eine hohe antibakterielle Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* besitzt. Jedoch zeigt das Geranylcinnamat ein ähnliches bzw. geringeres antibakterielles Potential als die Substrate [ZANETTI et al., 2016]. Im Vergleich zu den hier untersuchten Verbindungen, zeigten das Monocinnamyl- und Dicinnamylfumarat ein höheres antibakterielles Potential als der Zimtalkohol selbst.

### 5.5.2. Wachstumsversuche

Bei der Durchführung der Wachstumsversuche soll getestet werden, ob durch die Zugabe der Ester das Wachstum der Bakterien verzögert, verlangsamt oder aufgehalten sowie gleichbleibend oder beschleunigt werden konnte. Die einzelnen Proben wurden in 96-Well-Platten gegeben und die optische Dichte (600 nm) der Bakteriensuspensionen wird mit einem Mikrotiterplatten-Photometer über einen Zeitraum von 24 h jeweils nach 30 min photometrisch bestimmt. In Abbildung 5-37 sind diese mit Proben befüllten 96-Well-Platten nach der 24 h Messung dargestellt.

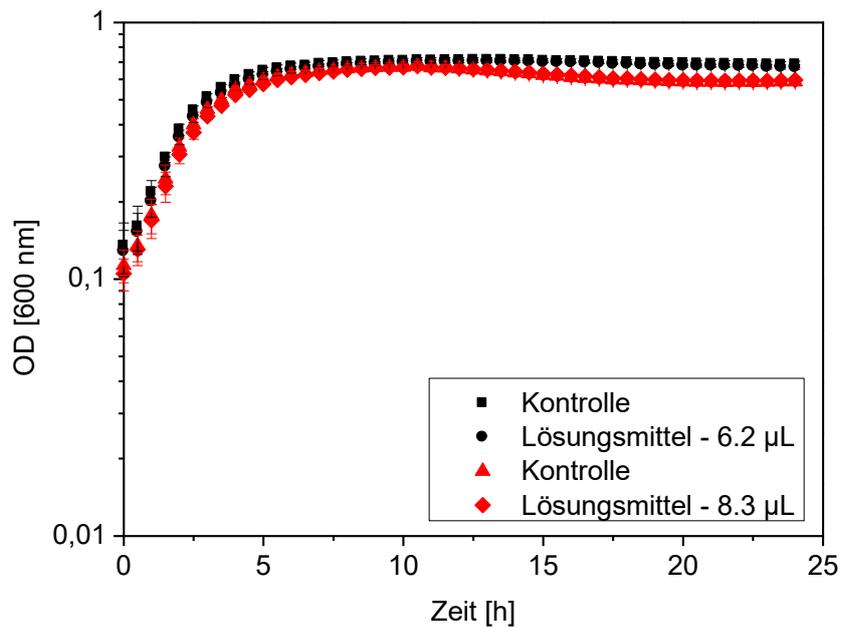


**Abbildung 5-37:** 96-Well-Platte mit Bakteriensuspension nach 24 h Messung

Es ist zu erkennen, dass einige der Wells eine Trübung aufzeigen und andere klar sind. Zu Beginn der Messung werden die Bakteriensuspensionen vorbereitet, in die Wells gegeben und anschließend werden die in Methylacetat vorgelösten Stammlösungen der Ester zugegeben. Die Bakteriensuspension in den Wells ist dann klar. Während die 96-Well-Platte über 24 h vermessen wird, wird sie auf 37 °C erwärmt, sodass die Bakterien die optimalen Bedingungen für ihr Wachstum haben. Durch das Bakterienwachstum tritt eine Trübung ein, welche mit steigender Bakterienzahl zunimmt. Eine klare Suspension bedeutet, dass ein gehemmtes oder kein Wachstum stattgefunden hat. Wie der Abbildung entnommen werden kann, haben einige getestete Verbindungen das Bakterienwachstum gestört. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Wachstumsversuche für jeden verwendeten Stamm einzeln vorgestellt und diskutiert.

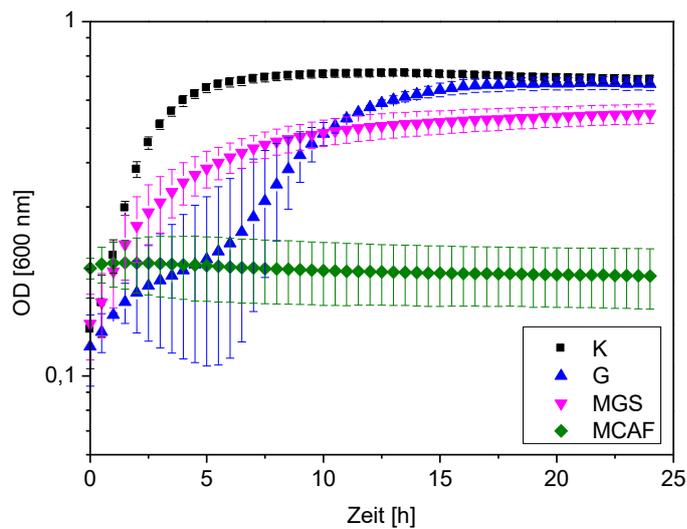
### **5.5.2.1. *Staphylococcus aureus***

Als Lösungsvermittler wird für die Experimente Methylacetat verwendet. Da dieses Lösungsmittel einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum haben kann, wurde dieser zunächst untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 5-38 dargestellt. Wie der Abbildung entnommen werden kann, beginnen die Bakterien sofort mit ihrem Wachstum und nach ca. 5 h haben sie die stationäre Phase erreicht. Die Datenpunkte für die Kontrolle und die Messungen mit dem Methylacetat liegen nahezu aufeinander. Somit kann geschlussfolgert werden, dass das Lösungsmittel in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum hat. In der folgenden Abbildung sind die Wachstumskurven für einige ausgewählte Verbindungen dargestellt.



**Abbildung 5-38:** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Methylacetat, je 200 µL pro Well)

An Abbildung 5-39 können mehrere Phänomene beobachtet werden. Das Wachstum der Kontrolle verläuft normal, zunächst durchlaufen die Bakterien für etwa 5 Stunden die exponentielle Phase, bei welcher sie ungehindert wachsen. Danach befinden sie sich in der stationären Phase. Durch die Zugabe von 3 mmol/L Geraniol wird das Wachstum der Bakterien gestört. Sie wachsen viel langsamer als die Kontrolle und erst nach ca. 17 - 18 h haben sie die stationäre Phase auf der gleichen Höhe wie die Kontrolle erreicht. Somit konnte der Zusatz von Geraniol das bakterielle Wachstum der *Staphylococcus aureus* um das ca. 3-fache verlangsamen. Wird die Wachstumskurve des Monogeranylsuccinats (rosa) betrachtet, so fällt auf, dass auch das Wachstum während der exponentiellen Phase verlangsamt wird, allerdings nicht so stark wie beim Geraniol. Die Bakterien erreichen nach ca. 10 h die stationäre Phase, jedoch wird eine um 20 % verringerte Bakterienanzahl als bei der Kontrolle erhalten, was durch das Geraniol nicht erreicht werden konnte. Somit hat das Monogeranylsuccinat bei der gleichen Konzentration einen viel stärkeren Einfluss auf das Wachstum der *Staphylococcus aureus* Bakterien als das Geraniol. Die Wachstumskurve vom Monocinnamylfumarat (grün) beginnt bei einer höheren optischen Dichte, welches nicht durch eine höhere Bakterienanzahl hervorgerufen wird. Durch die Zugabe des Esters ist die Bakteriensuspension getrübt worden, was sich in der gemessenen Dichte widerspiegelt. Nichtsdestotrotz ist es möglich diese Kurve mit den anderen zu vergleichen. Wie ersichtlich ist, zeigt die Wachstumskurve der *Staphylococcus aureus* Bakterien, welche mit Monocinnamylfumarat versetzt wurden, keinen Anstieg. Durch den Zusatz von 10 mmol/L Monocinnamylfumarat kann das Wachstum der Bakterien ganz gehemmt werden.



**Abbildung 5-39:** Wachstumskurven von *Staphylococcus aureus* mit G, MGS, MCAF (485/480  $\mu$ L Bakteriensuspension in Medium, 15  $\mu$ L MGS/Geraniol-Stammlösung (100 mmol/L – 3 mmol/L Wirkkonzentration), 20  $\mu$ L MCAF-Stammlösung (250 mmol/L – 10 mmol/L Wirkkonzentration), je 200  $\mu$ L pro Well)

In der nachfolgenden Tabelle sind die Wachstumsexperimente ausgewertet zusammengefasst. Dazu wurden von allen Messungen, die einen Effekt auf das bakterielle Wachstum zeigten, Wachstumsraten, Verdopplungszeiten und wenn aufgetreten die verlängerte Lag Phase bestimmt und zusammengefasst dargestellt. (Umfassende Ergebnisse der Wachstumskurven befinden sich im Anhang.) Da nicht alle Experimente gleichzeitig durchgeführt werden konnten, sind in der Tabelle mehrere Werte für die Kontrolle angegeben. Der Vergleich zwischen den angegebenen Werten für die durchgeführten Experimente mit den Estern bezieht sich dann immer auf den Wert der vorherigen Kontrolle.

## Ergebnisse und Diskussion

**Tabelle 5-9:** Zusammenfassung der Wachstumsraten im Vergleich zur Kontrolle [%] und Verdopplungszeiten der durchgeführten Wachstumsexperimente von *Staphylococcus aureus*

	3 mmol/L			10 mmol/L		
	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	t <sub>d</sub> [h]	verlängerte Lag Phase [h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	t <sub>d</sub> [h]	verlängerte Lag Phase [h]
<b>K</b>	0.47 ± 0.05	1.49 ± 0.15	-	0.37 ± 0.03	1.86 ± 0.14	-
<b>G</b>	0.16 ± 0.05	4.57 ± 1.17	-	0.13 ± 0.02	5.49 ± 0.69	-
<b>MGS</b>	0.23 ± 0.01	2.99 ± 0.17	-	0	0	-
<b>K</b>	0.22 ± 0.02	3.13 ± 0.30	-	0.20 ± 0.01	3.49 ± 0.19	-
<b>MNS</b>	0.06 ± 0.01	11.22 ± 2.15	-	0	0	-
<b>MGF</b>	0.12 ± 0.03	6.12 ± 1.54	-	0.04 ± 0.02	24.40 ± 14.69	10
<b>MNF</b>	0.09 ± 0.04	8.85 ± 5.17	-	0	0	-
<b>DCAF</b>	0.23 ± 0.03	3.01 ± 0.39	-	0.16 ± 0.04	4.52 ± 1.06	-
<b>MGI</b>	0	0	-	0	0	-
<b>MCAI</b>	0.19 ± 0.02	3.71 ± 0.38	-	0.05 ± 0.00	13.20 ± 0.69	-
<b>N</b>	0.25 ± 0.02	2.79 ± 0.20	-	0.17 ± 0.02	4.07 ± 0.37	9
<b>C</b>	0.27 ± 0.02	2.59 ± 0.15	-	0.13 ± 0.04	5.96 ± 1.99	-
<b>ZA</b>	0.16 ± 0.05	4.85 ± 2.06	-	0	0	-
<b>K</b>	0,36 ± 0,05	1,94 ± 0,26	-	0,36 ± 0,05	1,94 ± 0,26	-
<b>MNI</b>	0,17 ± 0,08	4,66 ± 2,29	-	0	0	-
<b>MCAF</b>	0,11 ± 0,02	6,57 ± 1,05	-	0	0	-

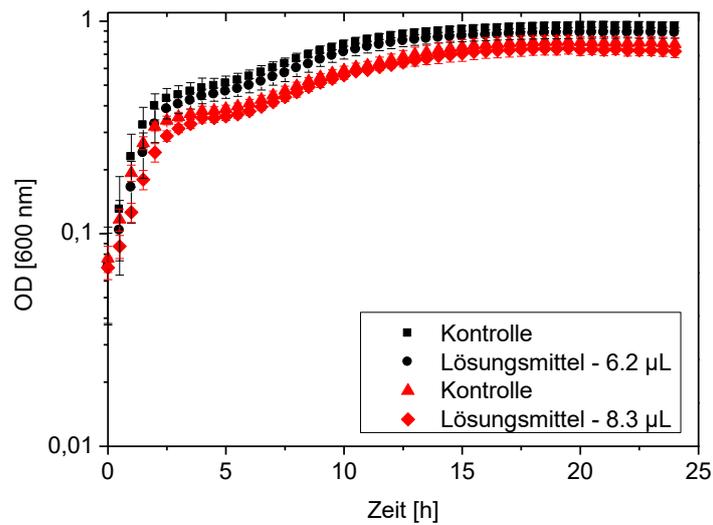
Der Tabelle 5-9 kann entnommen werden, dass neben den Alkoholen vor allem die Monoester und auch die Derivate des Zimtalkohols einen hemmenden Effekt auf das Wachstum der *Staphylococcus aureus* Bakterien zeigen. Des Weiteren kann festgestellt werden, dass bei einer Konzentration von 3 mmol/L alle dargestellten Verbindungen, bis auf das Dicinnamylfumarat, Nerol und Citronellol, das Wachstum der Bakterien hemmen. Erkennbar ist dies an den geringeren Wachstumsraten bzw. erhöhten Verdopplungszeiten im Vergleich zur Kontrolle. Unter den getesteten Estern

zeigen das Mononerylsuccinat sowie -fumarat die beste Hemmung des bakteriellen Wachstums (geringste Wachstumsraten und höchste Verdopplungszeiten). Wird die Konzentration der Ester auf 10 mmol/L erhöht, zeigen alle aufgeführten Verbindungen einen hemmenden Einfluss auf die Wachstumsraten bzw. Verdopplungszeiten. Des Weiteren wird ersichtlich, dass mehrere Verbindungen, wie das Monogeranyl- und Mononerylsuccinat, das Mononeryl- und Monocinnamylfumarat sowie das Monogeranyl- und Mononerylitaconat, das Wachstum der Bakterien ganz hemmen. Diese vollständige Hemmung des Wachstums kann von den vier getesteten Alkoholen nur vom Zimtalkohol erreicht werden. Somit hemmen die in der Tabelle aufgeführten Monoester und das Dicinnamylfumarat das bakterielle Wachstum der *Staphylococcus aureus* Bakterien besser als das Geraniol, Nerol und Citronello.

Wird diese Beobachtung mit den dazugehörigen Wachstumskurven verglichen (siehe Anhang), können durch die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit nur bedingt Aussagen über das antibakterielle Potential geschlussfolgert werden. Wie bereits beschrieben zeigt beispielsweise das Geraniol eine geringe Wachstumsrate als das Monogeranylsuccinat bei einer eingesetzten Konzentration von 3 mmol/L. Jedoch kann das Wachstum der Bakterien durch das Monogeranylsuccinat besser gehemmt werden, als durch das Geraniol (Vgl. Abbildung 5-39). Dieser Effekt wird auch durch den Einsatz folgender Substanzen erreicht: Mononerylsuccinat (3 mmol/L), Monocinnamylfumarat (3 mmol/L), Dicinnamylfumarat (10 mmol/L), Monocinnamylitaconat (10 mmol/L).

### **5.5.2.2. *Escherichia coli***

Zunächst erfolgte die Untersuchung des Einflusses vom Lösungsmittel, Methylacetat, auf das bakterielle Wachstum der *Escherichia coli* Bakterien. Dies ist in Abbildung 5-40 dargestellt. Wie der Abbildung entnommen werden kann, beginnen die Bakterien sofort mit ihrem Wachstum und nach ca. 12 h haben sie die stationäre Phase erreicht. Die Datenpunkte für die Kontrolle und die Messungen mit dem Methylacetat liegen fast aufeinander. Das Lösungsmittel hat in den eingesetzten Konzentrationen also keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum hat.



**Abbildung 5-40:** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von *Escherichia coli* (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Methylacetat, je 200 µL pro Well)

In Tabelle 5-10 sind die Wachstumsexperimente ausgewertet zusammengefasst. Dazu wurden von allen Messungen, die einen Effekt auf das bakterielle Wachstum zeigten, Wachstumsraten, Verdopplungszeiten und wenn aufgetreten die verlängerte Lag Phase bestimmt und dargestellt. Da auch hier nicht alle Experimente gleichzeitig durchgeführt werden konnten, sind in der Tabelle mehrere Werte für die Kontrolle angegeben. Der Vergleich zwischen den angegebenen Werten für die durchgeführten Experimente mit den Estern bezieht sich dann immer auf den Wert der vorherigen Kontrolle. Der Tabelle kann entnommen werden, dass neben den Alkoholen auch hier vor allem die Monoester und auch das Dicinnamylfumarat einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum der *Escherichia coli* Bakterien zeigen. Durch die Zugabe der in der Tabelle aufgeführten Ester (Ausnahme Monocinnamylfumarat bei einer Konzentration von 3 mmol/L) werden niedrigere Wachstumsraten bzw. größere Verdopplungszeiten im Vergleich zur Kontrolle für das bakterielle Wachstum erreicht. Neben dem Zimtalkohol zeigt das Dicinnamylfumarat bei einer Konzentration von 3 mmol/L die geringste Wachstumsrate bzw. größte Verdopplungszeit im Vergleich zur Kontrolle. Das Monocinnamylfumarat jedoch zeigt keine Hemmung des bakteriellen Wachstums bei einer Konzentration von 3 mmol/L, wenn diese Aussage nur über die Wachstumsrate bzw. Verdopplungszeit getroffen wird. Über die gesamte Wachstumskurve (siehe Anhang) kann eine Hemmung durch das Monocinnamylfumarat auf das bakterielle Wachstum der *Escherichia coli* Zellen beobachtet werden. Wird der Verlauf des bakteriellen Wachstums zwischen der Kontrolle und der, bei welchem Monocinnamylfumarat zugesetzt worden ist, verglichen, so kann festgestellt werden, dass beim Erreichen der stationären Phase eine Verringerung der Bakterienanzahl durch Zusatz von Monocinnamylfumarat bestimmt werden konnte. Wenn die Konzentration des Monocinnamylfumarats auf 10 mmol/L erhöht wird, ist eine vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums

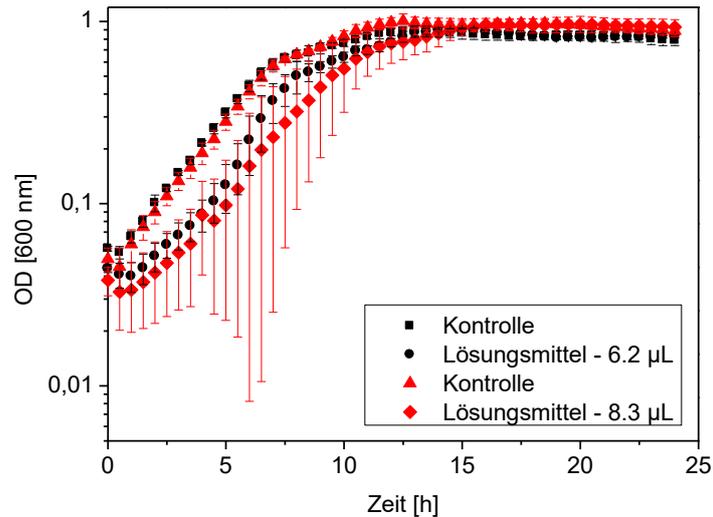
beobachtbar. Alle anderen in der Tabelle aufgeführten Verbindungen können bei einer Konzentration von 10 mmol/L zwar noch niedrigere Wachstumsraten bzw. höhere Verdopplungszeiten erreichen, jedoch keine vollständige Hemmung. Die getesteten Alkohole können keine vollständige Hemmung des bakteriellen Wachstums erreichen. Das Monocinnamylfumarat hat also ein höheres antibakterielles Potential als die Alkohole selbst. Allerdings konnte die Lag Phase für diesen *Escherichia coli* Stamm nur durch die Alkohole verlängert werden.

**Tabelle 5-10:** Zusammenfassung der Wachstumsraten und Verdopplungszeiten der durchgeführten Wachstumsexperimente von *Staphylococcus aureus*

	3 mmol/L			10 mmol/L		
	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	t <sub>d</sub> [h]	verlängerte Lag Phase [h]	$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	t <sub>d</sub> [h]	verlängerte Lag Phase [h]
<b>K</b>	0.52 ± 0.02	1.32 ± 0.05	-	0.35 ± 0.03	1.98 ± 0.15	-
<b>G</b>	0.31 ± 0.06	2.29 ± 0.44	3	0.12 ± 0.02	5.74 ± 0.95	2
<b>MGS</b>	0.46 ± 0.07	1.53 ± 0.21	-	0.33 ± 0.02	2.12 ± 0.17	-
<b>K</b>	0.68 ± 0.01	1.03 ± 0.02	-	0.50 ± 0.03	1.40 ± 0.09	-
<b>LM</b>	0.47 ± 0.05	1.50 ± 0.16	-	0.24 ± 0.02	2.88 ± 0.27	-
<b>MNS</b>	0.41 ± 0.05	1.71 ± 0.22	-	0.17 ± 0.03	4.09 ± 0.60	-
<b>MNF</b>	0.62 ± 0.05	1.11 ± 0.09	-	0.16 ± 0.21	14.34 ± 13.05	-
<b>DCAF</b>	0.21 ± 0.02	3.29 ± 0.37	-	0.23 ± 0.12	4.56 ± 4.13	-
<b>MGI</b>	0.37 ± 0.00	1.87 ± 0.01	-	0.27 ± 0.04	2.61 ± 0.43	-
<b>MCAI</b>	0,24 ± 0.03	2.94 ± 0.32	-	0.25 ± 0.03	2.83 ± 0.36	-
<b>N</b>	0.24 ± 0.04	2.99 ± 0.63	-	0.27 ± 0.18	8.44 ± 12.68	8
<b>C</b>	0.37 ± 0.03	1.88 ± 0.14	-	0.29 ± 0.09	2.57 ± 0.84	2.5
<b>ZA</b>	0.18 ± 0.03	3.97 ± 0.65	-	0.12 ± 0.03	6.29 ± 1.74	17.5
<b>K</b>	0,19 ± 0,02	3,63 ± 0,32	-	0,19 ± 0,02	3,63 ± 0,32	-
<b>MCAF</b>	0,21 ± 0,05	3,34 ± 0,60	-	0	0	-

### 5.5.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Für die Wachstumsversuche wurde auch hier zunächst der Einfluss des Lösungsmittels auf das bakterielle Wachstum untersucht. Dabei wurden die Wachstumskurven mit und ohne Zusatz von Lösungsmittel aufgenommen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 5-41 dargestellt.



**Abbildung 5-41:** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Methylacetat, je 200 µL pro Well)

Die Bakterien beginnen sofort mit ihrem Wachstum und haben nach ca. 12 h die stationäre Phase erreicht. Die Datenpunkte für die Kontrolle und die Messungen mit dem Methylacetat liegen sehr weit auseinander. Das Lösungsmittel in den eingesetzten Konzentrationen hat also einen starken Einfluss auf das bakterielle Wachstum. Aus diesem Grund sind keine weiteren Wachstumsversuche mit den Estern durchgeführt worden. Um diese Untersuchungen dennoch durchführen zu können, muss ein anderes, das Wachstum nicht beeinflussendes, Lösungsmittel gefunden und getestet werden. Diese weiteren Untersuchungen zum Einfluss anderer Lösungsmittel auf das Wachstum der *Pseudomonas aeruginosa* konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

#### 5.5.2.4. Zusammenfassung der Wachstumsversuche

Da die Ester eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen, erfolgte die Lösung in Methylacetat als Lösungsvermittler. Zunächst ist der Einfluss dieses Lösungsmittels auf das bakterielle Wachstum getestet worden. Für den *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* Stamm konnte gezeigt werden, dass sich das Methylacetat nicht auf das bakterielle Wachstum auswirkt. Für den *Pseudomonas aeruginosa* Stamm allerdings konnte gezeigt werden, dass das Methylacetat das bakterielle Wachstum beeinflusst, weswegen keine weiteren Untersuchungen mit diesem Stamm durchgeführt wurden. Für den *Staphylococcus aureus* Stamm weisen neben den Alkoholen vor allem die Monoester und auch die Derivate des Zimtalkohols (Mono- und Dicinnamylfumarat, Monocinnamylitaconat) einen hemmenden Effekt auf das bakterielle Wachstum auf. Bei einer eingesetzten Konzentration von 10 mmol/L hemmen folgende Ester das Wachstum der *Staphylococcus aureus* Bakterien vollständig: das Monogeranyl- und Mononerylsuccinat, das Mononeryl- und Monocinnamylfumarat sowie das Monogeranyl- und Mononerylitaconat. Neben den Alkoholen zeigen vor allem die Monoester und auch das Dicinnamylfumarat einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum der *Escherichia coli* Bakterien. Hierbei konnte nur das Monocinnamylfumarat bei einer Konzentration von 10 mmol/L das bakterielle Wachstum vollständig hemmen. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Monocinnamylfumarat (10 mmol/L) das Wachstum *Staphylococcus aureus* und der *Escherichia coli* Bakterien vollständig hemmen kann.

## 6. Diskussion und Ausblick

Die Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol ist hinsichtlich Lösungsmittel, Temperatur und Substratverhältnis optimiert worden. Für die Untersuchungen zur Lösungsmittelabhängigkeit sind folgende Lösungsmittel verwendet worden: Hexan, Heptan, Toluol, MTBE, Aceton und Acetonitril. Es konnte gezeigt werden, dass der höchste Gesamtumsatz bei Verwendung von MTBE erzielt werden konnte. Dabei lagen die Mono- und Diesterausbeuten bei 28 % und 40 %. Für die unpolaren Lösungsmittel wie Hexan, Heptan und Toluol konnte als Hauptprodukt der Diester erhalten werden (9 %, 14 % und 50 %). Diesen Effekt konnten auch Torres et al. bei der Lipase katalysierten Veresterung von Apfelsäure und 1-Dodecanol feststellen. Je unpolarer das verwendete Lösungsmittel war, desto mehr Diester wurde gebildet [TORRES et al., 1999 b], was sich mit den hier gezeigten Ergebnissen deckt. Dieses Verhalten kann unter anderem auch in der Löslichkeit der Substrate begründet sein. Die Bernsteinsäure ist ein polares Molekül, welches schlecht löslich in stark unpolaren Lösungsmitteln ist. Das Geraniol und der Monoester sind jedoch lipophile Verbindungen und dadurch gut in unpolaren Lösungsmitteln löslich. Durch die schlechte Löslichkeit der Bernsteinsäure steht nur wenig Substrat für die Bildung des Monoesters zur Verfügung. Der Monoester jedoch ist gut löslich in unpolaren Lösungsmitteln und steht in Konkurrenz mit der Bernsteinsäure, sodass der Monoester aufgrund seiner Löslichkeit schneller in den Diester umgesetzt wird. Das MTBE ist dabei weniger stark unpolar als das Hexan, Heptan und Toluol. Dadurch ist die Löslichkeit der Bernsteinsäure in diesem Lösungsmittel erhöht. Und dadurch kann das Enzym sowohl die Bernsteinsäure als auch den Monoester gleich gut umsetzen, was zur Folge hat, dass beide Reaktionsprodukte in höheren Ausbeuten erhalten werden. Bei Verwendung der polaren Lösungsmittel Aceton und Acetonitril konnte kein Umsatz der Reaktion erreicht werden. So beschrieben Banik et al., dass polare Lösungsmittel wie Acetonitril mit dem aktiven Zentrum der Cal B interagieren können und mit dem Substrat konkurrieren. Anstatt eines Enzym-Substrat-Komplexes wird ein Lösungsmittel-Enzym-Komplex gebildet, welcher nicht in Produkt und Enzym zerfallen kann, wodurch das Enzym nicht mehr für die zu katalysierende Reaktion zu Verfügung steht [BANIK et al., 2016] [YAN et al., 2017]. Außerdem können polare Lösungsmittel Wasser aufnehmen und so die Hydrathülle des Enzyms zerstören. Durch das Fehlen der Wasserstoffbrückenbindungen, kann die Tertiärstruktur des Enzyms nicht aufrechterhalten und so deren Aktivität herabgesetzt werden [YAN et al., 2017].

Der Temperatureinfluss wurde in den Intervallen 30, 40 und 50 °C untersucht. Dabei hat die Temperatur einen signifikanten Einfluss auf die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit der durchgeführten Reaktion. Laut der Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel soll sich die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppeln, wenn die Reaktionstemperatur um 10 °C erhöht wird. An den

Monoesterausbeuten ist dabei eine Steigerung der Ausbeuten von 21 % zu 28 % (30 °C zu 50 °C) zu verzeichnen. Die Diesterausbeuten liegen für alle getesteten Temperaturen nach Einstellung des Gleichgewichts bei 30 %. Jedoch ist deutlich zu erkennen, dass sich der Gleichgewichtszustand der Reaktion bei 50 °C schneller einstellt als bei 30 und 40 °C. Das entstehende Reaktionswasser wird während der Reaktion nicht aus der Mischung abgetrennt. Dadurch stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion ein. Durch die erhöhte Reaktionstemperatur nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit zu, wodurch das Reaktionsgleichgewicht schneller eingestellt wird. Dieser Effekt kann auch durch die berechneten Gleichgewichtskonstanten bestätigt werden, mit steigender Temperatur wird auch das Gleichgewicht der Reaktion hin zur Produktseite verschoben.

Die Untersuchungen zum Substratverhältnis zeigten, dass eine Erhöhung des Substratverhältnisses hinsichtlich der Bernsteinsäure eine höhere Ausbeute an Monoester erzielt werden konnte (75 %). Wird wiederum das Substratverhältnis so angepasst, dass Geraniol im Überschuss vorliegt, können höhere Diesterausbeuten erzielt werden (50 %). Nach dem Prinzip von Le Chatelier kann das Gleichgewicht der Reaktion auf Seiten der Produkte verschoben werden, indem die Substratkonzentration erhöht wird. Dies konnte durch Torres et al. nachgewiesen werden. Sie untersuchten eine Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Milchsäure und 1-Dodecanol und konnten zeigen, dass bei Konzentrationserhöhung eines Substrates die Ausbeute an Dodecylactat erhöht werden kann. Bei einem fünffachen Überschuss an Säure konnten sie die Ausbeute von 53 % auf 87 % steigern. Sie konnten außerdem demonstrieren, dass eine Ausbeute von 90 % erreicht werden kann, wenn ein zehnfacher Überschuss an Alkohol eingesetzt wird [TORRES et al., 1999 a]. Diese Arbeiten sind aber nur bedingt mit der hier untersuchten Reaktion zu vergleichen, da Torres et al. nur einen einfachen Ester synthetisiert haben. In einer weiteren Veröffentlichung berichteten Torres et al. über ihre Untersuchungen zu einer Lipase katalysierten Veresterungsreaktion von Apfelsäure und 1-Dodecanol. Dabei lag das Hauptaugenmerk der Arbeit auf der Synthese des Monoesters. Sie konnten auch zeigen, dass durch die Erhöhung der Säurekonzentration die Ausbeute an Monoester gesteigert werden konnte [TORRES et al., 1999 b]. Im Gegensatz dazu untersuchten Rahman et al. eine Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure mit Oleylalkohol mit dem Ziel den Diester als Hauptprodukt zu synthetisieren. Sie konnten unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen zeigen, dass die Ausbeute an Diester mit steigender Alkoholkonzentration erhöht werden konnte. [RAHMAN et al., 2011]. Die von Torres et al. und Rahman et al. erhaltenen Ergebnisse decken sich mit denen in dieser Arbeit. Durch die Erhöhung der Substratkonzentration konnte hier zum einen der Umsatz erhöht werden und zum anderen auch die Selektivität hinsichtlich des Mono- bzw. Diesters gesteigert werden.

Durch die Reaktionsführung ohne Lösungsmittel konnten bei einem Substratverhältnis von 1:2 (Bernsteinsäure:Geraniol) höhere Ausbeuten erreicht werden (30 % Monoester und 65 % Diester) als bei Reaktionsführung mit MTBE als Lösungsmittel. Bei einem fünffachen Überschuss an Bernsteinsäure können Mono- und Diesterausbeuten von ca. 40 % erhalten werden. Im Vergleich dazu können bei der Reaktionsführung in MTBE als Lösungsmittel Monoesterausbeuten bis zu 75 % erhalten werden, wobei die Diesterausbeute mit ca. 15 % relativ gering war. Somit hat der Verzicht des Lösungsmittels in diesem Falle auch einen negativen Einfluss auf die Selektivität der Reaktion.

Des Weiteren konnten Versuche zur Maßstabsvergrößerung erfolgreich durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Vergrößerung des Reaktionsansatzes von 20 mL auf 1 L keinen negativen Einfluss auf die Ausbeute und die Selektivität der Reaktion hat, was auch durch die Raum-Zeit-Ausbeuten bestätigt werden kann. Auch Truppo et al. führten erfolgreich Versuche zur Maßstabsvergrößerung durch. Anhand einer Lipase katalysierten asymmetrischen Hydrolyse eines Indolethylesters konnte der Maßstab der Reaktion von 0,2 L über 1 L auf 40 L erhöhen werden. Dabei erhielten sie bei den verschiedenen Reaktionsmaßstäben gleich hohe Ausbeuten von 50 % und auch Enantioselektivitäten von 99,75 % [TRUPPO et al., 2006]. Die Lipase katalysierte Synthese von Palmestern ausgehend von Palmöl und Oleylalkohol konnte von Keng et al. ebenso erfolgreich in einen 50 L Maßstab überführt werden und erzielten nach 5 h Reaktionszeit eine Ausbeute von über 97 % [KENG et al, 2008]. Weitere Versuche zur Maßstabsvergrößerung sind ohne die Verwendung eines Lösungsmittels durchgeführt worden. Dabei wurde das entstehende Reaktionswasser mit Hilfe von Vakuumtechniken aus der Reaktionslösung abgetrennt und es konnten Ausbeuten von bis zu 90 % erzielt werden. Allerdings lag dabei der Diester als Hauptprodukt vor, der Monoester-Gehalt betrug zwischen 1 - 3 %. Wahrscheinlich wird durch den Entzug des Reaktionswassers die Rückreaktion unterdrückt und die Reaktion unabhängig vom Substratverhältnis zugunsten des Diesters verschoben. Die Lipase katalysierte lösungsmittelfreie Synthese von Glyceroladipat wurde erfolgreich von Korupp et al. in einen 500 g Maßstab überführt. Auch sie entzogen mit Hilfe von Vakuumtechniken das entstehende Wasser aus der Reaktionsmischung, um das Gleichgewicht zugunsten des Produktes zu verschieben und konnten so einen Umsatz von 95 % an Polyester erreichen [KORUPP et al., 2010].

Die gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen sind auf die Veresterungsreaktionen von weiteren Substraten übertragen worden und es konnten so insgesamt 21, darunter noch nicht in der Literatur beschriebene, Ester synthetisiert, isoliert sowie mit Hilfe von NMR charakterisiert werden. Die Synthese von Geraniolestern wurde von verschiedenen Autoren untersucht [SALVI et al., 2018]. So erreichten Isah et al. und Nicoletti et al. bei der Lipase katalysierten Umsetzung von Geraniol und Propionsäure einen Umsatz an Geraniolpropionat von 50% (10 h) bzw.

83% (24 h) [ISAH et al., 2017] [NICOLETTI et al., 2015]. Paroul et al. verwendeten einen lösungsmittelfreien Syntheseansatz und erreichten einen maximalen Umsatz an Geraniolpropionat von 93% [PAROUL et al., 2010] [SALVI et al., 2018]. Auch Claon et al. untersuchten Lipase katalysierte Veresterungsreaktionen Geraniol und Citronellol mit Essig-, Butter-, Capron- sowie Caprylsäure in n-Hexan und konnten Ausbeuten über 85 % erreichen [CLAON et al. 1993]. Auch verschiedenste Nerolester, wie beispielsweise Nerylbutyrat, konnten biokatalytisch hergestellt werden [LOZANO et al., 2011] [LONZANO et al., 2015]. Die Synthese verschiedenster Zimtalkoholester sind bereits auch bekannt. Jedoch liefern die hier aufgeführten Synthesen nur einfache Ester im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Reaktionen, wobei Mono- und Diester hergestellt worden sind [OTTO et al., 1998] [YADAV et al., 2012]. Auch Worzakowska et al. haben Diester ausgehend von Geraniol, Nerol, Citronellol sowie Zimtalkohol und Bernstein-, Glutar-, Adipin- sowie Sebacinsäure hergestellt. Die Reaktionen wurden bei 130 °C und mit Butylzinnsäure als Katalysator durchgeführt. Sie konnten für das Digeranyl-, Dineryl- und Dicitronellylsuccinat, bei Reaktionszeiten von 5, 8 und 4 h, Umsätze über 98 % erreichen. Für das Dicinnamylsuccinat sind keine Angaben über die Umsätze angegeben. Jedoch erhielten sie den Diester als Hauptprodukt und konnten keine Monoester synthetisieren und verwendeten kein biokatalytisches Verfahren zu Herstellung der Diester [WORZAKOWSKA et al., 2013] [WORZAKOWSKA, 2014] [WORZAKOWSKA et al., 2014 a] [WORZAKOWSKA et al., 2014 b].

Je nachdem, ob der Mono- oder der Diester erhalten werden soll, können die Reaktionsbedingungen angepasst werden. Bei Verwendung von MTBE als Lösungsmittel und eines fünffachen Überschusses an Säure können 75 % Monoesterausbeute erzielt werden. Wenn der Diester als Hauptprodukt erhalten werden soll, sollte die Reaktion ohne Lösungsmittel durchgeführt und das entstehende Wasser aus der Reaktionsmischung abgetrennt werden. Die Isolierung der Ester wurde säulenchromatografisch durchgeführt. Da diese Isolationsmethode für die großtechnische Produktion ungeeignet ist, sollten andere Aufreinigungsmethoden gefunden werden. Mögliche wäre eine Destillation, durch die der Mono- und Diester rein gewonnen werden kann. Einige der synthetisierten Ester besitzen eine tensidartige Struktur, wodurch sie Anwendung in der Lebensmittel- und Kosmetikindustrie finden können.

Wie bereits beschrieben, besitzen einige der synthetisierten Ester ein hohes antibakterielles Potential. Um dieses zu bestimmen, wurden drei Bakterienstämme, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden (Killing Assay und Wachstumsexperimente), untersucht. Die Experimente haben gezeigt, dass vor allem die getesteten Monoester ein sehr hohes antibakterielles Potential besitzen, sowie einige Mono- und Diesterderivate des Zimtalkohols. Bei der Durchführung der Killing Assays konnten

folgende Ester eine hohe bzw. sehr hohe antibakterielle Wirkung gegen die drei getesteten Bakterienstämme zeigen: das Monogeranylitaconat, das Mononerylfumarat und -itaconat, das Monocinnamylfumarat und -itaconat sowie das Dicinnamylfumarat. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Monocinnamylfumarat (10 mmol/L) das Wachstum der *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* Bakterien vollständig hemmen kann. Das Monocinnamylfumarat kann hierbei besonders hervorgehoben werden, da diese Verbindung sowohl bei den Killing Assays als auch bei den Wachstumsversuchen ein sehr hohes antibakterielles Potential gezeigt hat. Über die Wirkmechanismen der Terpenalkohole sowie des Zimtalkohols, welche Bestandteile von ätherischen Ölen sind, ist nicht viel bekannt. Verschiedene Mechanismen zur antibakteriellen Aktivität von ätherischen Ölen wurden jedoch postuliert. So sollen sie hauptsächlich die zelluläre Architektur der Zellen destabilisieren, was zum Abbau der Membranintegrität und eine erhöhte Durchlässigkeit hervorruft. Dadurch werden eine Vielzahl an zellulären Aktivitäten, wie die Energieerzeugung, der Membrantransport und andere metabolische Regulationsfunktionen, unterbrochen. Dank ihrer lipophilen Natur können ätherische Öle die bakteriellen Zellmembranen leicht durchdringen und durchlässiger machen, wodurch ein Austreten von Zellulären Komponenten und Ionen führt. Es wird auch beschrieben, dass die Wirkungsweise von ätherischen Ölen stark von der Zusammensetzung und Menge der Einzelsubstanzen abhängig ist. Auch die Anwesenheit und Position von funktionellen Gruppen innerhalb der Moleküle können die Bioaktivität der ätherischen Öle beeinflussen [LOPEZ-ROMERO et al., 2015] [SWAMY et al., 2016]. Die Wirkmechanismen der hier synthetisierten Ester sind bisher nicht beschrieben, jedoch zeigten Dorman et al., dass die Gegenwart einer Acetateinheit in der Struktur die Aktivität der Stammverbindung erhöht. Im Fall von Geraniol zeigte das Geranylacetat eine Zunahme der Aktivität gegen die Testmikroorganismen. Eine ähnliche Tendenz wurde für Borneol und Bornylacetat festgestellt. Borneol war weniger aktiv als das Acetat, außer gegen *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Beneckea natrigens*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium suaveolens* und *Serratia marcescens* [DORMAN et al., 2000]. Mögliche Wirkmechanismen wären auch eine Destabilisierung der Zellmembranen, auch könnte die Aufnahme von Nährstoffen sowie Transportprozesse gestört oder blockiert sowie Stoffwechselprozesse innerhalb der Zelle beeinflusst werden. Auch könnten die Ester durch die Bakterien verstoffwechselt werden, wodurch möglicherweise für die Bakterien toxische Abbauprodukte entstehen. Um diese möglichen Mechanismen eindeutig aufklären zu können, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Wie bereits beschrieben werden in kosmetischen Produkten häufig antimikrobielle Wirkstoffe zugesetzt, um eine Kontamination mit Keimen entgegenzuwirken. Als Beispiel eines solchen Zusatzes kann das Methylparaben genannt werden. Lundov et al. beschreiben, dass in Europa die maximal erlaubte Menge von 0,4 % (ca. 20 mmol/L) in kosmetischen Produkten an Methylparaben

enthalten sein darf [LUNDOV et al., 2009]. Diese Menge entspricht in etwa der in dieser Arbeit bestimmten Wirkkonzentrationen der Ester von 10 mmol/L.

Um die Eignung für den Einsatz in kosmetischen Produkten grob abschätzen zu können, ist eine Kostenabschätzung beispielhaft für das Mono- und Digeranylsuccinat durchgeführt worden. Dabei sind nur die Substrat-, Katalysator und Lösungsmittelkosten zur Berechnung herangezogen worden. Daraus ergeben sich für ein Gramm Monogeranylsuccinat 5,74 € und für ein Gramm Digeranylsuccinat 1,34 €. Diese Preise sind im Vergleich zu herkömmlich verwendeten antimikrobiellen Zusatzstoffen in kosmetischen Produkten relativ hoch (Methylparaben: 100 g,  $\geq 99,0$  %, ca. 30 €). Jedoch können die Kosten der Ester bei Produktion im großen Maßstab noch weiter gesenkt werden. Der Einsatz der in dieser Arbeit untersuchten Ester als antimikrobielle Wirkstoffe in kosmetischen Produkten könnte eine „natürliche“ Alternative zu den herkömmlich genutzten Zusatzstoffen sein.

## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten neuartige Ester ausgehend von Dicarbonsäuren und Alkenolen hergestellt werden. Die Lipase katalysierte Veresterungsreaktion von Bernsteinsäure und Geraniol ist hinsichtlich Lösungsmittel, Temperatur und Substratverhältnis optimiert worden. Dabei wurden folgende optimale Reaktionsbedingungen gefunden: MTBE als Lösungsmittel, 50 °C Reaktionstemperatur und ein Substratverhältnis von 1:2 (Bernsteinsäure:Geraniol). Je nach Reaktionsführung wurden maximale Ausbeuten von 75 % und 50 % für das Mono- und das Digeranylsuccinat erhalten. Es wurde gezeigt, dass die Reaktion auch ohne den Einsatz eines Lösungsmittels durchführbar ist, jedoch auch, dass der Verzicht des Lösungsmittels einen negativen Einfluss auf die Selektivität der Reaktion hat.

Die gefundenen optimalen Reaktionsbedingungen (MTBE, 50 °C Substratverhältnis 1:2) sind auf weitere Substrate (Fumarsäure, Itaconsäure, Apfelsäure, Nerol, Citronellol, Zimtalkohol) übertragen worden und es wurden so insgesamt 21, darunter 12 noch nicht in der Literatur beschriebene, Ester synthetisiert und mit Ausbeuten zwischen 2 - 38 % isoliert sowie mit Hilfe von NMR charakterisiert.

Des Weiteren wurden Versuche zur Maßstabsvergrößerung (1 L Maßstab) erfolgreich durchgeführt, die Ausbeute und Selektivität der Reaktion wurden dabei nicht beeinflusst. Zudem wurden auch Experimente zur Maßstabsvergrößerung ohne die Verwendung eines Lösungsmittels durchgeführt, wobei das entstehende Reaktionswasser mit Hilfe von Vakuumtechniken aus der Reaktionslösung abgetrennt wurde. Es zeigte sich, dass hierbei der Diester als Hauptprodukt (90 %) und der Monoester als Nebenprodukt (1 - 3 %) erhalten wurde.

Wie bereits beschrieben, besitzen einige der synthetisierten Ester ein hohes antibakterielles Potential. Um dieses zu bestimmen, wurden drei Bakterienstämme, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden (Killing Assay und Wachstumsexperimente), untersucht. Die Experimente haben gezeigt, dass vor allem die getesteten Monoester ein sehr hohes antibakterielles Potential besitzen, sowie die Mono- und Diesterderivate des Zimtalkohols. Bei der Durchführung der Killing Assays konnten folgende Ester eine hohe bzw. sehr hohe antibakterielle Wirkung gegen die drei getesteten Bakterienstämme zeigen: das Monogeranylitaconat, das Mononerylfumarat und -itaconat, das Monocinnamylfumarat und -itaconat sowie das Dicinnamylfumarat. Zudem konnte gezeigt werden, dass das Monocinnamylfumarat das Wachstum der *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* Bakterien vollständig hemmen kann. Das Monocinnamylfumarat kann hierbei besonders hervorgehoben werden, da diese Verbindung sowohl bei den Killing Assays als auch bei den Wachstumsversuchen ein sehr hohes antibakterielles Potential gezeigt hat.



## 8. Anhang

### 8.1. Literaturverzeichnis

Adlercreutz, Patrick, 2013, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chemical Society reviews* 42 (15), 6406-6436

Alexandri, M.; Papapostolou, H.; Vlysidis, A.; Gardeli, C.; Komaitis, M.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A. A., 2016, Extraction of phenolic compounds and succinic acid production from spent sulphite liquor, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 91 (11), 2751-2760

Alexandri, M.; Papapostolou, H.; Stragier, L.; Verstraete, W.; Papanikolaou, S.; Koutinas, A. A., 2017, Succinic acid production by immobilized cultures using spent sulphite liquor as fermentation medium, *Bioresource technology* 238, 214-222

Almeida, A. G.; Meneses, A. C. de; Araújo, P. H. H. de; Oliveira, D. de, 2017, A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries, *Trends in Food Science & Technology* 69, 95-105

Al-Zuhair, S.; Hasan, M.; Ramachandran, K. B., 2003, Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase, *Process Biochemistry* 38 (8), 1155-1163

Andoğan, B. C.; Baydar, H.; Kaya, S.; Demirci, M.; Özbaşar, D.; Mumcu, E., 2002, Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils, *Archives of Pharmacal Research* 25 (6), 860-864

Araújo, M. E.M. B. de; Franco, Y. E. M.; Messias, M. C. F.; Longato, G. B.; Pamphile, J. A.; Carvalho, P. O. de, 2017, Biocatalytic Synthesis of Flavonoid Esters by Lipases and Their Biological Benefits, *Planta medica* 83 (1-02), 7-22

Archer, A. W., 1988 Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 447, 272-276

Aulenta, F.; Drew, M. G. B.; Foster, A.; Hayes, W.; Rannard, S.; Thornthwaite, D. W., 2005, Synthesis and characterization of fluorescent poly(aromatic amide) dendrimers, *The Journal of organic chemistry* 70 (1), 63-78

Badgujar, K. C.; Bhanage, B. M., 2014, Enhanced Biocatalytic Activity of Lipase Immobilized on Biodegradable Copolymer of Chitosan and Polyvinyl Alcohol Support for Synthesis of Propionate Ester. Kinetic Approach, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 53 (49), 18806-18815

- Bafana, R.; Pandey, R. A., 2017, New approaches for itaconic acid production. Bottlenecks and possible remedies, *Critical reviews in biotechnology*, 1-15
- Banat, I. M.; Makkar, R. S.; Cameotra, S. S., 2000, Potential commercial applications of microbial surfactants, *Applied microbiology and biotechnology* 53 (5), 495-508
- Becker, J.; Lange, A.; Fabarius, J.; Wittmann, C., 2015, Top value platform chemicals. Bio-based production of organic acids, *Current opinion in biotechnology* 36, 168-175
- Berger, R. G., 2009, Biotechnology of flavours-the next generation, *Biotechnology letters* 31 (11), 1651-1659
- Bicas, J. L.; Silva, J. C.; Dionísio, A. P.; Pastore, G. M., 2010, Biotechnological production of bioflavors and functional sugars, *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 30 (1), 7-18
- Bisswanger, H., 2015, Enzyme - Struktur, Kinetik und Anwendungen, Hoboken: Wiley-VCH
- Bonikowski, R.; Paoli, M.; Szymczak, K.; Krajewska, A.; Wajs-Bonikowska, A.; Tomi, F.; Kalemba, D., 2016, Chromatographic and spectral characteristic of some esters of a common monoterpene alcohols, *Flavour and Fragrance Journal* 31 (4), 290-292
- Bozell, J. J.; Petersen, G. R., 2010, Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-the US Department of Energy's "Top 10" revisited, *Green Chemistry* 12 (4), 539-554
- Brady, D.; Jordaan, J., 2009, Advances in enzyme immobilisation, *Biotechnology letters* 31 (11), 1639-1650
- Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornscheuer, U. T., 2012, Biocatalysts and Enzyme Technology, 2. Auflage, Wiley-Blackwell
- Buque-Taboada, E. M.; Straathof, A. J. J.; Heijnen, J. J.; van der Wielen, L. A. M., 2004, In situ product removal using a crystallization loop in asymmetric reduction of 4-oxoisophorone by *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology and bioengineering* 86 (7), 795-800
- Burt, S., 2004, Essential oils Their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International journal of food microbiology* 94 (3), 223-253
- Cabrera, Z.; Fernandez-Lorente, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M., 2009, Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57 (1-4), 171-176
- Cai, X.; Wang, W.; Lin, L.; He, D.; Shen, Y.; Wei, W.; Wei, D., 2017, Cinnamyl Esters Synthesis By Lipase-Catalyzed Transesterification in a Non-Aqueous System, *Catalysis Letters* 147 (4), 946-952

- Carlson, R. C., 1982, Controlling odor in photopolymerization, US4324679 A
- Carnesecchi, S.; Schneider, Y.; Ceraline, J.; Duranton, B.; Gosse, F.; Seiler, N.; Raul, F., 2001, Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298 (1), 197-200.
- Carrau, F. M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E., 2005, De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, *FEMS microbiology letters* 243 (1), 107-115
- Carroll, A. L.; Desai, S. H.; Atsumi, S., 2016, Microbial production of scent and flavor compounds, *Current opinion in biotechnology* 37, 8-15
- Chang, S.-T.; Chen, P.-F.; Chang, S.-C., 2001, Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*, *Journal of Ethnopharmacology* 77 (1), 123-127
- Chen, W.; Viljoen, A. M., 2010, Geraniol - A review of a commercially important fragrance material, *South African Journal of Botany* 76 (4), 643-651
- Chi, Z.; Wang, Z.-P.; Wang, G.-Y.; Khan, I.; Chi, Z.-M., 2016, Microbial biosynthesis and secretion of L-malic acid and its applications, *Critical reviews in biotechnology* 36 (1), 99-107
- Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S., 2015, Industrial applications of enzyme biocatalysis Current status and future aspects, *Biotechnology advances* 33 (7), 1443-1454
- Choi, S.; Song, C. W.; Shin, J. H.; Lee, S. Y., 2015, Biorefineries for the production of top building block chemicals and their derivatives, *Metabolic engineering* 28, 223-239
- Choudhury, P.; Bhunia, B., 2015, Industrial application of lipase: a review, *Biopharm Journal* 1 (2), 41-47
- Chulalaksananukul, W.; Condoret, J. S.; Delorme, P.; Willemot, R. M., 1990, Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n -hexane, *FEBS Letters* 276 (1-2), 181-184
- Claon, P. A.; Akoh, C. C., 1993, Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane, *Biotechnology Letters* 15 (12), 1211-1216
- Cok, B.; Tsiropoulos, I.; Roes, A. L.; Patel, M. K., 2014, Succinic acid production derived from carbohydrates An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8 (1), 16-29
- Compton, D. L.; Laszlo, J. A.; Berhow, M. A., 2000, Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters, *Journal of the American Oil Chemists Society* 77 (5), 513-519

- Costa, A. J. L.; Soromenho, M. R. C.; Shimizu, K.; Marrucho, I. M.; Esperança, J. M. S. S.; Canongia Lopes, J. N.; Rebelo, L. P. N., 2012, Liquid-liquid equilibrium of cholinium-derived bistriflimide ionic liquids with water and octanol, *The journal of physical chemistry B* 116 (30), 9186-9195
- Cui, Z.; Gao, C.; Li, J.; Hou, J.; Lin, C. S. K.; Qi, Q., 2017, Engineering of unconventional yeast *Yarrowia lipolytica* for efficient succinic acid production from glycerol at low pH, *Metabolic engineering* 42, 126-133
- da Silva, M. J.; Ayala, D. A. M., 2016, Unravelling transition metal-catalyzed terpenic alcohol esterification A straightforward process for the synthesis of fragrances, *Catalysis Science and Technology* 6 (9), 3197-3207
- Del Olmo, A.; Calzada, J.; Nuñez, M., 2017, Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives Uses, exposure, and controversy, *Critical reviews in food science and nutrition* 57 (14), 3084-3103
- Dorman, H. J. D.; Deans, S. G., 2000, Antimicrobial agents from plants Antibacterial activity of plant volatile oils, *Journal Applied Microbiolog* 88 (2), 308-316
- Dutta Banik, S.; Nordblad, M.; Woodley, J. M.; Peters, G. H., 2016, A Correlation between the Activity of *Candida antarctica* Lipase B and Differences in Binding Free Energies of Organic Solvent and Substrate, *ACS Catalysis* 6 (10), 6350-6361
- Dutta Banik, S.; Nordblad, M.; Woodley, J. M.; Peters, G. H., 2017, Effect of Water Clustering on the Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Medium, *Catalysts* 7 (8), 227
- Duwensee, J.; Wenda, S.; Ruth, W.; Kragl, U., 2010, Lipase-Catalyzed Polycondensation in Water A New Approach for Polyester Synthesis, *Organic Process Research and Development* 14 (1), 48-57
- Fernandez-Lafuente, R., 2017, Special Issue, Enzyme Immobilization 2016, *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (4), 601
- Fischer, M. J. C.; Meyer, S.; Claudel, P.; Bergdoll, M.; Karst, F., 2011, Metabolic engineering of monoterpene synthesis in yeast, *Biotechnology and Bioengineering* 108 (8), 1883-1892
- Frazzetto, G., 2003, White biotechnology, *EMBO reports* 4 (9), 835-837
- Freeman, A.; Woodley, J. M.; Lilly, M. D., 1993, In Situ Product Removal as a Tool for Bioprocessing, *Nature Biotechnology* 11 (9), 1007-1012
- Gao, C.; Yang, X.; Wang, H.; Rivero, C. P.; Li, C.; Cui, Z., 2016, Robust succinic acid production from crude glycerol using engineered *Yarrowia lipolytica*, *Biotechnology for biofuels* 9 (1), 179

- Garcia, T.; Martinez, M.; Aracil, J., 2009, Enzymatic Synthesis of Myristyl Myristate Estimation of Parameters and Optimization Of the Process, *Biocatalysis and Biotransformation* 14 (1), 67-85
- Gayot, S.; Santarelli, X.; Coulon, D., 2003, Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media. Effect of the water content, *Journal of Biotechnology* 101 (1), 29-36
- Ghaffari-Moghaddam, M.; Eslahi, H.; Omay, D.; Zakipour-Rahimabadi, E., 2014, Industrial applications of enzymes, *Review Journal of Chemistry* 4 (4), 341-361
- Ghamgui, H.; Karra-Chaâbouni, M.; Gargouri, Y., 2004, 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* A comparative study between n-hexane and solvent-free system, *Enzyme and Microbial Technology* 35 (4), 355-363
- Gottardi, M.; Knudsen, J. D.; Prado, L.; Oreb, M.; Branduardi, P.; Boles, E., 2017, De novo biosynthesis of trans-cinnamic acid derivatives in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied microbiology and biotechnology* 101 (12), 4883-4893
- Gounaris, Y., 2010, Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates A review, *Flavour Fragr. J.* 25 (5), 367-386
- Güvenç, A.; Kapucu, N.; Mehmetoğlu, Ü., 2002, The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system, *Process Biochemistry* 38 (3), 379-386
- Han, D.; Walde, P.; Luisi, P. L., 1990, Dependence of Lipase Activity on Water Content and Enzyme Concentration in Reverse Micelles, *Biocatalysis Biotransformation* 4 (2-3), 153-161
- Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E., 2009, Understanding enzyme immobilisation., *Chemical Society reviews* 38 (2), 453-468
- Hills, G., 2003, Industrial use of lipases to produce fatty acid esters, *European Journal of Lipid Science and Technology* 105 (10), 601-607
- Hilterhaus, L.; Liese, A.; Thum, O., 2009, Verfahren zur enzymatischen Herstellung von Carbonsäureestern, EP2080807 A2
- Holzner, G., 2002, Antimicrobial perfume compositions, US6479456 B1
- Imbert, E., 2017, Food waste valorization options Opportunities from the bioeconomy, *Open Agriculture* 2 (1), 195-204
- Inouye, S.; Takizawa, T.; Yamaguchi, H., 2001, Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47 (5), 565-573
- Isah, A. A.; Mahat, N. A.; Jamalis, J.; Attan, N.; Zakaria, I. I.; Huyop, F.; Wahab, R. A., 2017, Synthesis of geranyl propionate in a solvent-free medium using *Rhizomucor*

miehei lipase covalently immobilized on chitosan-graphene oxide beads, *Preparative biochemistry & biotechnology* 47 (2), 199-210

Janssen, A. M.; Scheffer, J. J.; Baerheim Svendsen, A., 1987, Antimicrobial activity of essential oils - A 1976-1986 literature review Aspects of the test methods, *Planta medica* 53 (5), 395-398

Jiang, M.; Ma, J.; Wu, M.; Liu, R.; Liang, L.; Xin, F., 2017, Progress of succinic acid production from renewable resources Metabolic and fermentative strategies, *Bioresource technology*, 1710-1717

Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Avérous, L.; Phalip, V., 2016, Itaconic and Fumaric Acid Production from Biomass Hydrolysates by *Aspergillus* Strains, *Journal of microbiology and biotechnology* 26 (9), 1557-1565

Jiménez-Quero, A.; Pollet, E.; Zhao, M.; Marchioni, E.; Averous, L.; Phalip, V., 2017, Fungal fermentation of lignocellulosic biomass for itaconic and fumaric acid production, *Journal of microbiology and biotechnology* 27 (1), 1-8

Joseph, B.; Ramteke, P. W.; Thomas, G., 2008, Cold active microbial lipases Some hot issues and recent developments, *Biotechnology advances* 26 (5), 457-470

Karra-Châabouni, M.; Ghamgui, H.; Bezzine, S.; Rekik, A.; Gargouri, Y., 2006, Production of flavour esters by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system, *Process Biochemistry* 41 (7), 1692-1698

Keeler, J., 2011, Understanding NMR Spectroscopy, Hoboken: John Wiley & Sons

Keng, P. S.; Basri, M.; Ariff, A. B.; Abdul Rahman, M. B.; Abdul Rahman, R. N. Z.; Salleh, A. B., 2008, Scale-up synthesis of lipase-catalyzed palm esters in stirred-tank reactor, *Bioresource technology* 99 (14), 6097-6104

Kim, J.; Marshall, M. R.; Wei, C., 1995, Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (11), 2839-2845

Kirk, O.; Borchert, T., V.; Fuglsang, C., C., 2002, Industrial enzyme applications, *Current opinion in biotechnology* 13 (4), 345-351

Kirk, O.; Christensen, M. W., 2002, Lipases from *Candida antarctica* Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Organic Process Research and Development* 6 (4), 446-451

Knuf, C.; Nookaew, I.; Brown, S. H.; McCulloch, M.; Berry, A.; Nielsen, J., 2013, Investigation of malic acid production in *Aspergillus oryzae* under nitrogen starvation conditions, *Applied and environmental microbiology* 79 (19), 6050-6058

- Kobayashi, T.; Furutani, W.; Adachi, S.; Matsuno, R., 2003, Equilibrium constant for the lipase-catalyzed synthesis of fatty acid butyl ester in various organic solvents, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 24-25, 61-66
- Korupp, C.; Weberskirch, R.; Müller, J. J.; Liese, A.; Hilterhaus, L., 2010, Scaleup of Lipase-Catalyzed Polyester Synthesis, *Organic Process Research and Development* 14 (5), 1118-1124
- Kraai, G. N.; Winkelman, J. G. M.; Vries, J. G. de; Heeres, H. J., 2008, Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system, *Biochemical Engineering Journal* 41 (1), 87-94
- Kuhnert, P.; Scholten, E.; Haefner, S.; Mayor, D.; Frey, J., 2010, *Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pasteurellaceae isolated from bovine rumen, *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 60 (Pt 1), 44–50
- Kuo, C.-H.; Chen, H.-H.; Chen, J.-H.; Liu, Y.-C.; Shieh, C.-J., 2012, High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by lipozyme RMIM and Novozym 435, *International journal of molecular sciences* 13 (9), 11694-11704
- Lee, S. Y., 2017, *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals*, Springer International Publishing
- Lee, C. W.; Jang, S.-H.; Chung, H.-S., 2017, Improving the Stability of Cold-Adapted Enzymes by Immobilization, *Catalysts* 7 (4), 112
- Li, C.; Yang, X.; Gao, S.; Wang, H.; Lin, C. S. K., 2017, High efficiency succinic acid production from glycerol via in situ fibrous bed bioreactor with an engineered *Yarrowia lipolytica*, *Bioresource technology* 225, 9-16
- Li, G.; Yao, D.; Zong, M., 2008, Lipase-catalyzed synthesis of biodegradable copolymer containing malic acid units in solvent-free system, *European Polymer Journal* 44 (4), 1123-1129
- Lidén, G., 2017, Carboxylic Acid Production, *Fermentation* 3 (3), 46
- Liu, H.; Hu, H.; Jin, Y.; Yue, X.; Deng, L.; Wang, F.; Tan, T., 2017, Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* RH 7-13-9, *Bioresource technology* 233, 30-33
- Liu, J.; Zhang, W.; Du, G.; Chen, J.; Zhou, J., 2013, Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of biotechnology* 168 (4), 446-451
- Lopez-Romero, J. C.; González-Ríos, H.; Borges, A.; Simões, M., 2015, Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2015, 795435

- Lourith, N.; Kanlayavattanakul, M., 2009, Natural surfactants used in cosmetics Glycolipids, *International journal of cosmetic science* 31 (4), 255-261
- Lozano, P.; Bernal, J. M.; Gómez, C.; García-Verdugo, E.; Burguete, I. M.; Sánchez, G., 2015, Green bioprocesses in sponge-like ionic liquids, *Catalysis Today* 255, 54–59
- Lozano, P.; Bernal, J. M.; Navarro, A., 2012, A clean enzymatic process for producing flavour esters by direct esterification in switchable ionic liquid/solid phases, *Green Chemistry* 14 (11), 3026-3033
- Lu, J.; Nie, K.; Xie, F.; Wang, F.; Tan, T., 2007, Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida* sp. 99-125, *Process Biochemistry* 42 (9), 1367-1370
- Lundov, M. D.; Moesby, L.; Zachariae, C.; Johansen, J. D., 2009, Contamination versus preservation of cosmetics A review on legislation, usage, infections, and contact allergy, *Contact dermatitis* 60 (2), 70-78
- Lupo, M. P., 2001, Antioxidants and vitamins in cosmetics, *Clinics in Dermatology* 19 (4), 467-473
- Madhavan, A.; Sindhu, R.; Binod, P.; Sukumaran, R. K.; Pandey, A., 2017, Strategies for design of improved biocatalysts for industrial applications, *Bioresource technology* 245 (Pt B), 1304-1313
- Maechler, F.; Geffers, C.; Schwab, F.; Peña Diaz, L.-A.; Behnke, M.; Gastmeier, P., 2017, Entwicklung der Resistenzsituation in Deutschland Wo stehen wir wirklich? *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 112 (3), 186-191
- Mazière, A.; Prinsen, P.; García, A.; Luque, R.; Len, C., 2017, A review of progress in (bio)catalytic routes from/to renewable succinic acid, *Biofuels, Bioproduct and Biorefining* 15 (6), 908-931
- McCormick, K.; Kautto, N., 2013, The Bioeconomy in Europe An Overview, *Sustainability* 5 (6), 2589-2608
- McDonald, A. G.; Tipton, K. F., 2014, Fifty-five years of enzyme classification Advances and difficulties, *The FEBS Journal* 281 (2), 583-592
- McEleney, J.; Reenstra, W.; Vock, C. A., 1996, Lotion which is temporarily colored upon application, US5567420 A
- Mackereel, A., JR.; Zhang, H.; Osterman, A.; Kolhatkar, R., 2014, Targeting NAD biosynthesis in bacterial pathogens, US8785499 B2
- Masschelein, A.; Thoen, C. A. J. K., 1998, Fabric care compositions, EP0864642 A1
- Mikš-Krajnik, M.; Zoglowek, M.; Buron-Moles, G.; Forster, J., 2017, Microbial Production of Flavors and Fragrances, In: Lee S. (eds) *Consequences of Microbial*

Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham

Miller, D. J.; Henning, T.; Grünbein, W., 2001, Phase inversion of W/O emulsions by adding hydrophilic surfactant - a technique for making cosmetics products, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 183-185, 681-688

Morales, M.; Ataman, M.; Badr, S.; Linster, S.; Kourlimpinis, I.; Papadokonstantakis, S., 2016, Sustainability assessment of succinic acid production technologies from biomass using metabolic engineering, *Energy and Environmental Science* 9 (9), 2794-2805

Mulyaningsih, S.; Sporer, F.; Reichling, J.; Wink, M., 2011, Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens, *Pharmaceutical biology* 49 (9), 893-899

Nicoletti, G.; Cipolatti, E. P.; Valério, A.; Carbonera, N. T. G.; Soares, N. S.; Theilacker, E., 2015, Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate, *Bioprocess and biosystems engineering* 38 (9), 1739–1748

Otto, R. T.; Bornscheuer, U. T.; Scheib, H.; Pleiss, J.; Syltatk, C.; Schmid, R. D., 1998, Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: Synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (vitamin C) esters, *Biotechnology Letters* 20 (11), 1091–1094

Papadaki, A.; Androutsopoulos, N.; Patsalou, M.; Koutinas, M.; Kopsahelis, N.; Castro, A., 2017, Biotechnological Production of Fumaric Acid The Effect of Morphology of *Rhizopus arrhizus* NRRL 2582, *Fermentation* 3 (3), 33

Paramasivan, K.; Mutturi, S., 2017, Progress in terpene synthesis strategies through engineering of *Saccharomyces cerevisiae*, *Critical reviews in biotechnology* 37 (8), 974-989

Pardo, E.; Rico, J.; Gil, J. V.; Orejas, M., 2015, De novo production of six key grape aroma monoterpenes by a geraniol synthase-engineered *S. cerevisiae* wine strain, *Microbial cell factories* 14, 136

Paroul, N.; Grzegozeski, L. P.; Chiaradia, V.; Treichel, H.; Cansian, R. L.; Oliveira, J. V.; Oliveira, D. de, 2010, Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85 (12), 1636-1641

Pellis, A.; Corici, L.; Sinigoi, L.; D'Amelio, N.; Fattor, D.; Ferrario, V., 2015 Towards feasible and scalable solvent-free enzymatic polycondensations Integrating robust biocatalysts with thin film reactions, *Green Chemistry* 17 (3), 1756-1766

Rahman, M. B. A.; Jarmi, N. I.; Chaibakhsh, N.; Basri, M., 2011, Modeling and optimization of lipase-catalyzed production of succinic acid ester using central

composite design analysis, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38 (1), 229-234

Rieks, A.; Kähler, M.; Kirchner, U.; Wiggenghorn, K.; Kinzer, M.; Risch, S., 2005, Antimicrobial active preparations containing terpene derivatives, WO2005012210 A2

Roa Engel, C. A.; Straathof, A. J. J.; Zijlmans, T. W.; van Gulik, W. M.; van der Wielen, L. A. M., 2008, Fumaric acid production by fermentation, *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (3), 379-389

Royon, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G.; Locatelli, S., 2007, Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent, *Bioresource technology* 98 (3), 648-653

Rozzell, J. D., 1999, Commercial scale biocatalysis. Myths and realities, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 7 (10), 2253-2261

Rush, B. J.; Fosmer, A. M., 2014, Methods for Succinate Production, US 20140363862 A1

Saha, B. C., 2017, Emerging biotechnologies for production of itaconic acid and its applications as a platform chemical, *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 44 (2), 303-315

Salvi, H. M.; Kamble, M. P.; Yadav, G. D., 2018, Synthesis of Geraniol Esters in a Continuous-Flow Packed-Bed Reactor of Immobilized Lipase. Optimization of Process Parameters and Kinetic Modeling, *Applied biochemistry and biotechnology* 184 (2), 630-643

Sanford, K.; Chotani, G.; Danielson, N.; Zahn, J. A., 2016, Scaling up of renewable chemicals, *Current opinion in biotechnology* 38, 112-122

Sang Y. L., Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals, Springer International Publishing, 1–19

Scarlat, N.; Dallemand, J.-F.; Monforti-Ferrario, F.; Nita, V., 2015, The role of biomass and bioenergy in a future bioeconomy Policies and facts, *Environmental Development* 15, 3-34

Schobert, R.; Jagusch, C., 2005, An Efficient Synthesis of Carlosic Acid and Other 5-Carboxymethyltetronates from Malates, *Synthesis* (14), 2421-2425

Schroder, H.; Haefner, S.; Abendroth, G. von; Hollmann, R.; Raddatz, A.; Ernst, H.; Gurski, H., 2014, Microbial succinic acid producers and purification of succinic acid, US 8673598 B2

Schumann, W., 2011, Eine neue Waffe gegen pathogene Bakterien?, *Biologie in unserer Zeit* 41 (6), 360-361

- Sheldon, R. A.; Pereira, P. C., 2017, Biocatalysis engineering The big picture, *Chemical Society reviews* 46 (10), 2678-2691
- Singh, A. K.; Mukhopadhyay, M., 2012, Overview of fungal lipase A review, *Applied biochemistry and biotechnology* 166 (2), 486-520
- Song, H.; Lee, S. Y., 2006, Production of succinic acid by bacterial fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* 39 (3), 352-361
- Stauch, B.; Fisher, S. J.; Cianci, M., 2015, Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B. Protonation and the mechanism of interfacial activation, *Journal of lipid research* 56 (12), 2348-2358
- Suerbaum, S.; Hahn, H.; Burchard, G.-D.; Kaufmann, S. H. E.; Schulz, T. F., 2012, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 7., überarbeitete Auflage, Berlin, Springer (Springer-Lehrbuch)
- Swamy, M. K.; Akhtar, M. S.; Sinniah, U. R., 2016, Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action An Updated Review, *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM* 2016, 3012462
- Tan, T. Y.; Braun, N.; Tan, J. H. C.; Neugebauer, W., 2009, Floating combi-bar and mixture for producing same, US20090253601 A1
- Tang, J.; Chen, G.; Wang, L.; Miao, M.; Jiang, B.; Feng, B., 2017, Immobilization of *Y. lipolytica* lipase and the continuous synthesis of geranyl propionate, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133 (1), 311-316
- Thorsell, W.; Mikiver, A.; Tunón, H., 2006, Repelling properties of some plant materials on the tick *Ixodes ricinus* L., *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 13 (1-2), 132-134
- Tiwari, M.; Kakkar, P., 2009, Plant derived antioxidants - Geraniol and camphene protect rat alveolar macrophages against t-BHP induced oxidative stress, *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 23 (2), 295-301
- Tomadoni, B.; Cassani, L.; Moreira, M. R.; Ponce, A., 2015, Efficacy of vanillin and geraniol in reducing *Escherichia coli* O157 H7 on strawberry juice, *LWT - Food Science and Technology* 64 (2), 554-557
- Torres, C.; Otero, C., 1999 a, Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols, *Enzyme and Microbial Technology* 25 (8-9), 745-752
- Torres, C.; Bernabé, M.; Otero, C., 1999 b, Part II Two enzymatic procedures for the selective synthesis of malic acid monoesters, *Enzyme and Microbial Technology* 25 (8-9), 753-761

- Torres, S.; Castro G., R., 2004, Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems, *Food Technology and Biotechnology* 42 (4), 271-277
- Truppo, M. D.; Journet, M.; Shafiee, A.; Moore, J. C., 2006, Optimization and Scale-Up of a Lipase-Catalyzed Enzymatic Resolution of an Indole Ester Intermediate for a Prostaglandin D<sub>2</sub> (DP) Receptor Antagonist Targeting Allergic Rhinitis, *Organic Process Research and Development* 10 (3), 592-598
- Ungcharoenwiwat, P.; Canyuk, B.; H-Kittikun, A., 2016, Synthesis of jatropha oil based wax esters using an immobilized lipase from Burkholderia sp. EQ3 and Lipozyme RM IM, *Process Biochemistry* 51 (3), 392-398
- Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., 1994, The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida Antarctica*, *Structure* 2 (4), 293-308
- Vadgama, R. N.; Odaneth, A. A.; Lali, A. M., 2015, Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I. Batch optimization studies, *Biotechnology reports (Amsterdam, Netherlands)* 8, 133-137
- Van De Graaf, M. J.; Valianpoer, F.; Fiey, G.; Delattre, L.; Schulten, E. A. M., 2015, Process for the crystallization of succinic acid, US 20150057425 A1
- van Hecke, W.; Kaur, G.; Wever, H. de, 2014, Advances in in-situ product recovery (ISPR) in whole cell biotechnology during the last decade, *Biotechnology advances* 32 (7), 1245-1255
- Wang, X.; Chen, Y.; Zheng, L.; Jin, Q.; Wang, X., 2017, Synthesis of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol by enzymatic acidolysis in a solvent-free system, *Food chemistry* 228, 420-426
- Wang, X.; Jin, Q.; Wang, T.; Huang, J.; Wang, X., 2013, An improved method for the synthesis of 1-monoolein, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97, 130-136
- Wang, C; Zada, B.; Wei, G.; Kim, S.-W., 2017, Metabolic engineering and synthetic biology approaches driving isoprenoid production in *Escherichia coli*, *Bioresource technology* 241, 430-438
- Webb, G. A., 2006, Modern Magnetic Resonance Part 2: Applications in Medical and Pharmaceutical Sciences, 1. Aufl. Springer Netherlands
- Weber, H, (Hg.), 1997, Wörterbuch der Mikrobiologie, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm: Gustav Fischer Verlag
- Willke, T.; Vorlop, K.-D., 2001, Biotechnological production of itaconic acid, *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 (3-4), 289-295

- Wong, E. S.; Chow, C. W. Y.; Luk, W. K.; Fung, K. S. C.; Li, Kenneth K. W., 2017, A 10-Year Review of Ocular Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections Epidemiology, Clinical Features, and Treatment, *Cornea* 36 (1), 92-97
- Woodley, J. M.; Bisschops, M.; Straathof, A. J. J.; Ottens, M., 2008, Future directions for in-situ product removal (ISPR), *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83 (2), 121-123
- Worzakowska, M., 2014 c, Thermal properties of citronellyl diesters, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 118 (1), 299-309
- Worzakowska, M.; Ścigalski, P., 2013, TG/DSC/FTIR characterization of linear geranyl diesters, *Journal of Therm Analysis and Calorimetry* 113 (1), 53-60
- Worzakowska, M.; Ścigalski, P., 2014 a, Synthesis and thermal behavior of linear neryl diesters in inert and oxidative atmosphere, *Journal of Therm Analysis and Calorimetry* 115 (1), 783-792
- Worzakowska, M.; Ścigalski, P., 2014 b, Thermal behavior of cinnamyl diesters studied by the TG/FTIR/QMS in inert atmosphere, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 106, 48-56
- Wu, Z.; Qi, W.; Wang, M.; Su, R.; He, Z., 2014, Lipase immobilized on novel ceramic supporter with Ni activation for efficient cinnamyl acetate synthesis, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 110, 32-38
- Xin, J.-Y.; Sun, L.-R.; Chen, S.-M.; Wang, Y.; Xia, C.-G., 2017, Synthesis of L-Ascorbyl Flurbiprofenate by Lipase-Catalyzed Esterification and Transesterification Reactions, *BioMed research international* 2017, 5751262
- Yadav, G. D.; Devendran, S., 2012, Lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification in non-aqueous medium, *Process Biochemistry* 47 (3), 496-502
- Yadav, G. D.; Trivedi, A. H., 2003, Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media, *Enzyme and Microbial Technology* 32 (7), 783-789
- Yan, H. de; Li, Q.; Wang, Z., 2017, Efficient kinetic resolution of ( $\pm$ )-menthol by a lipase from *Thermomyces lanuginosus*, *Biotechnology and applied biochemistry* 64 (1), 87-91
- Yazar, K.; Johnsson, S.; Lind, M.-L.; Boman, A.; Lidén, C., 2011, Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents, *Contact dermatitis* 64 (5), 265-272
- Yocum, R. R.; Hermann, T.; Hu, X., 2014, Fermentation of glycerol to organic acids, US 20140234923 A1

Zambanini, T.; Hosseinpour Tehrani, H.; Geiser, E.; Merker, D.; Schleese, S.; Krabbe, J., 2017, Efficient itaconic acid production from glycerol with *Ustilago vetiveriae* TZ1, *Biotechnology for biofuels* 10, 131

Zanetti, M.; Carniel, T. K.; Valério, A.; Oliveira, J. V. de; Oliveira, D. de; Araújo, Pedro H. H. de, 2017, Synthesis of geranyl cinnamate by lipase-catalyzed reaction and its evaluation as an antimicrobial agent, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 92 (1), 115-121

Zanetti, M.; Ternus, Z. R.; Dalcanton, F.; Mello, M. M. de; Oliveira, D. de; Araujo P. H. H., 2015, Microbiological Characterization of Pure Geraniol and Comparison with Bactericidal Activity of the Cinnamic Acid in Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria, *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 07 (04), 186-193

Zeikus, J. G.; Jain, M. K.; Elankovan, P., 1999, Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products, *Applied Microbiology and Biotechnology* 51 (5), 545-552

Zelle, R. M.; Hulster, E. de; van Winden, W. A.; Waard, P. de; Dijkema, C.; Winkler, A. A. et al., 2008, Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae* Engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction, and malate export, *Applied and environmental microbiology* 74 (9), 2766-2777

Zhao, J.; Bao, X.; Li, C.; Shen, Y.; Hou, J., 2016, Improving monoterpene geraniol production through geranyl diphosphate synthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (10), 4561-4571

Zhao, T. T.; Choi, N.; Kim, H.; Kim, Y.; Kim, H.-R.; Kim, I.-H., 2017, Lipase-Mediated Synthesis of Fatty Acid Esters Using a Blending Alcohol Consisting of Methanol and 1-Butanol, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 94 (4), 559-565

Zhou, J.; Wang, C.; Yoon, S.-H.; Jang, H.-J.; Choi, E.-S.; Kim, S.-W., 2014, Engineering *Escherichia coli* for selective geraniol production with minimized endogenous dehydrogenation, *Journal of biotechnology* 169, 42-50

## 8.2. LC/MS Methode

Tabelle 8-1: LC/MS Gradient

Zeit [min]	Wasser [%]	Acetonitril [%]
0	80	20
8	20	80
16	40	60
20	80	20
25	80	20

Fluss: 200 µL/min

Säule: Kinetex 150x3x2,6 Phenomenex

## 8.3. GC Methode

Tabelle 8-2: GC Methode

Rate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
	80,00	2,00
20,00	300,00	4,00

Fluss: 1,2 mL/min

Säule: HP 5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm)

## 8.4. Zusammensetzung der Medien und Puffer

Aller Medien und Puffer werden nach dem Ansetzten sterilisiert und dann erst für die Versuche verwendet.

### TSB-Medium

24 g TSB

mit 800 mL dest. Wasser auffüllen

**LB- Medium**

16 g LB  
 3,6 g NaCl

mit 800 mL dest. Wasser auffüllen

**PBS-Puffer (10x)**

64,008 g NaCl  
 1,6 g KCl  
 14,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O  
 2,16 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

mit 800 mL dest. Wasser auffüllen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen

**PBS-Puffer (1x)**

80 mL PBS-Puffer (10x)

auf 800 mL auffüllen

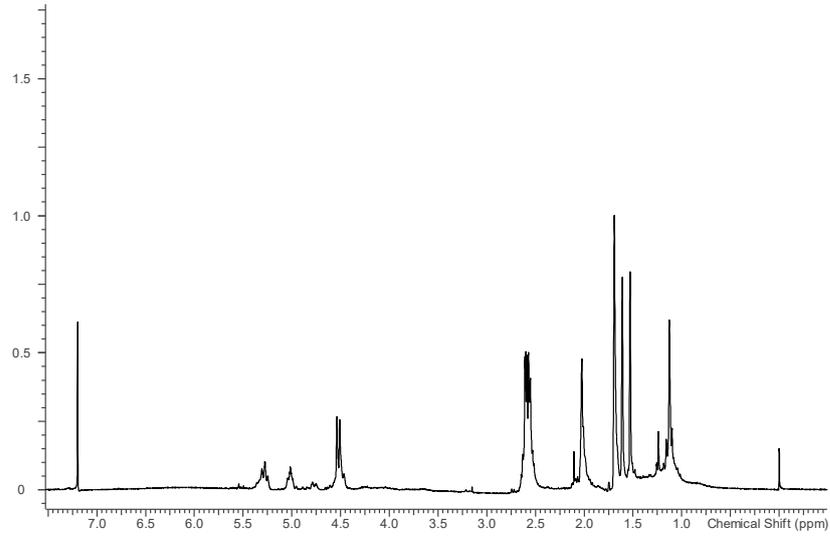
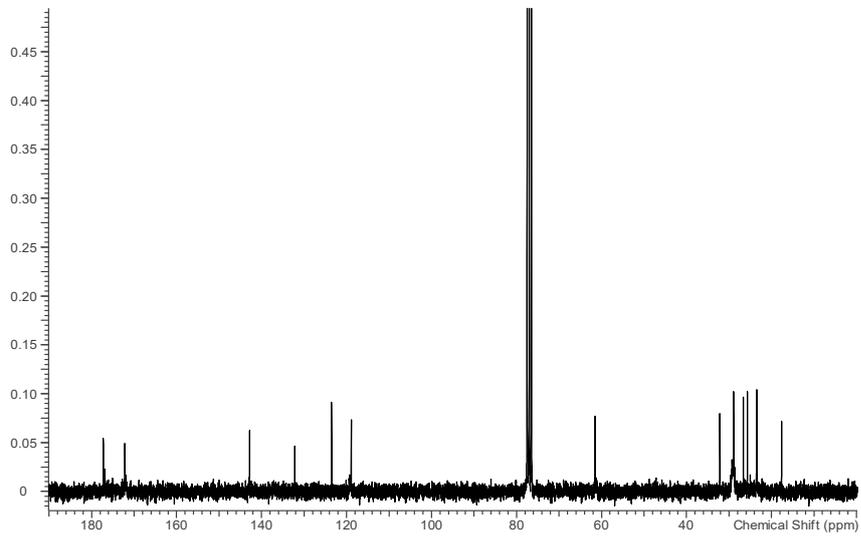
**8.5. verwendete Bakterienstämme**

Tabelle 8-3: verwendete Bakterienstämme

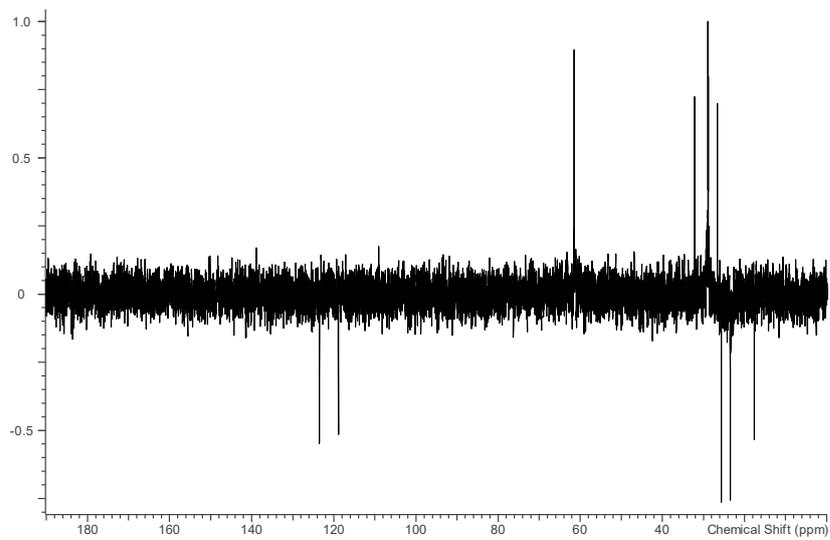
Art	Stammnummer	Bemerkung	Herkunft
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	4735	-	Kathetersepsis, Tennessee
<i>Escherichia coli</i>	63	3MRGN	Patientenisolat, Wundabstrich, Polytrauma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40	3MRGN	Patientenisolat, Kriegstrauma, Perinealabstrich

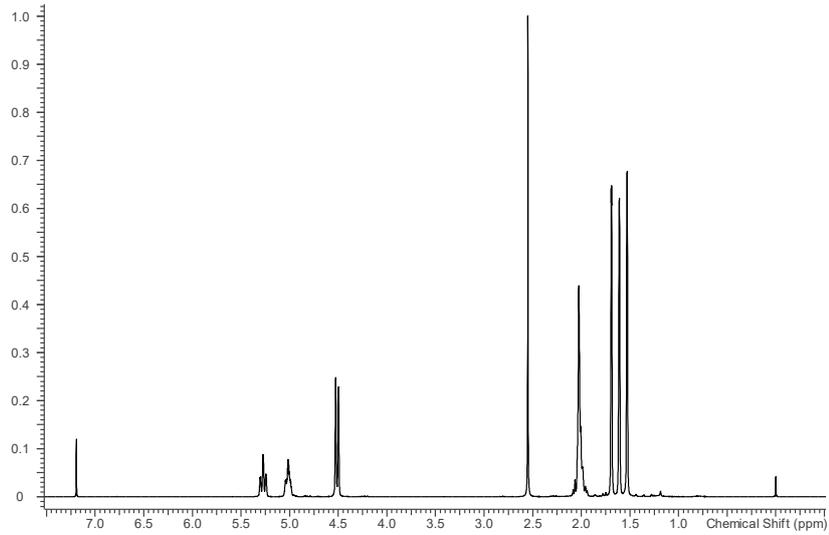
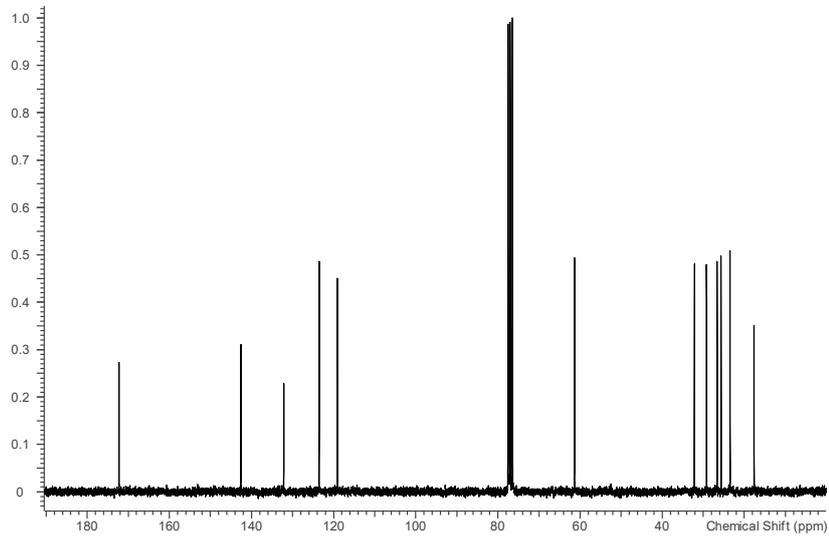
**8.6. NMR-Spektren**

Es konnte nicht genügend Digeranylitaconat und Monocitronellylsuccinat isoliert werden, sodass von diesen Verbindungen keine NMR-Spektren angefertigt werden konnten.

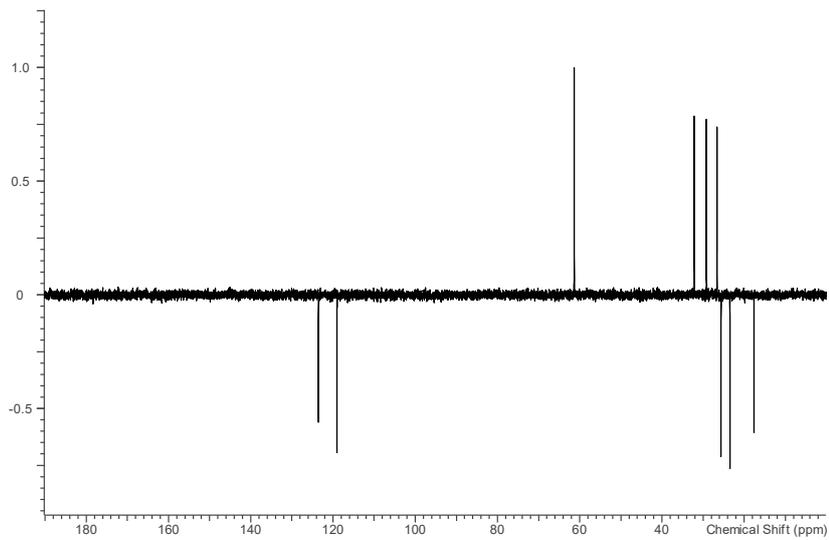
$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

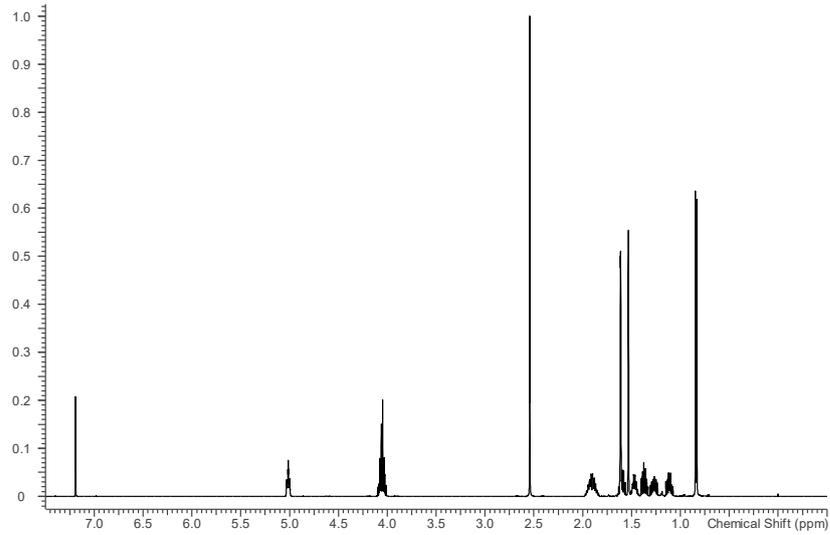
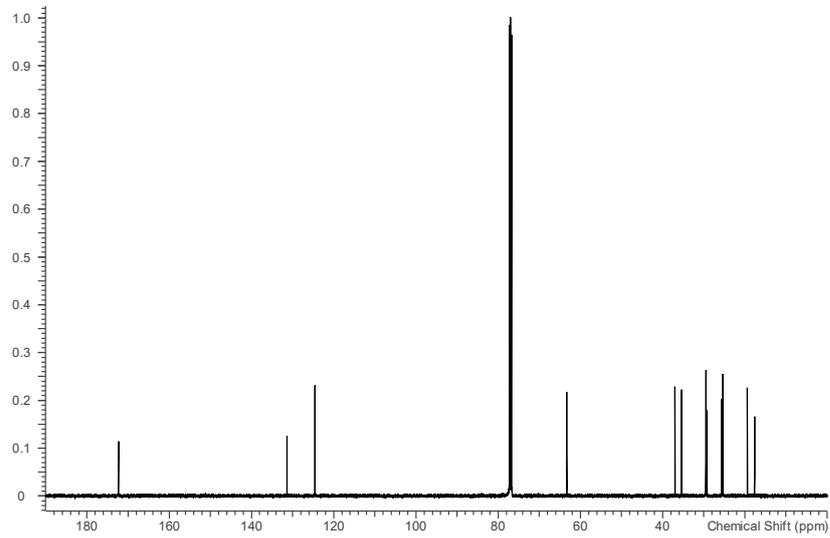
DEPT

**Abbildung 8-1:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monomerylsuccinats (Chloroform-d, 200MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

**Abbildung 8-2:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Dinerylsuccinats (Chloroform-d, 200MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

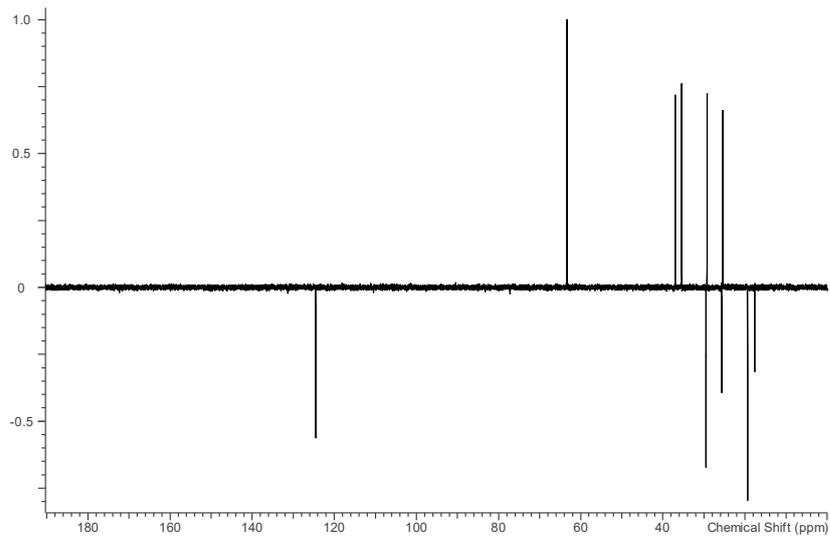
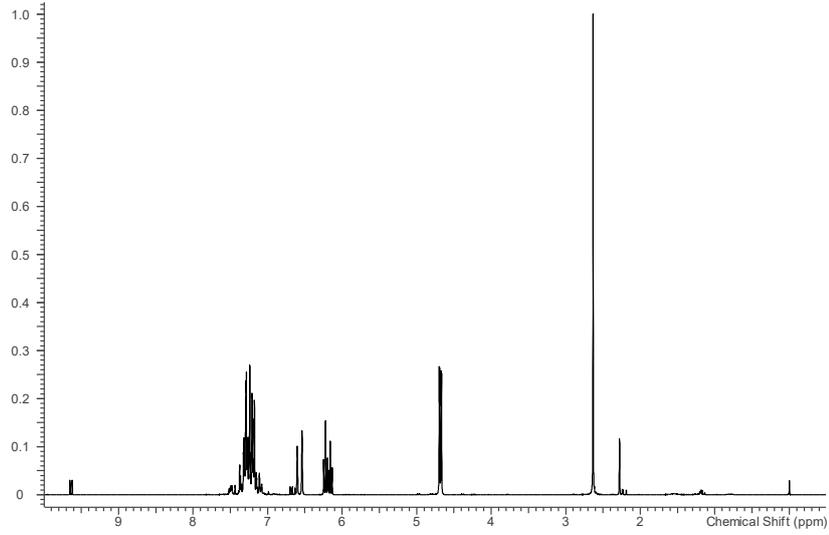
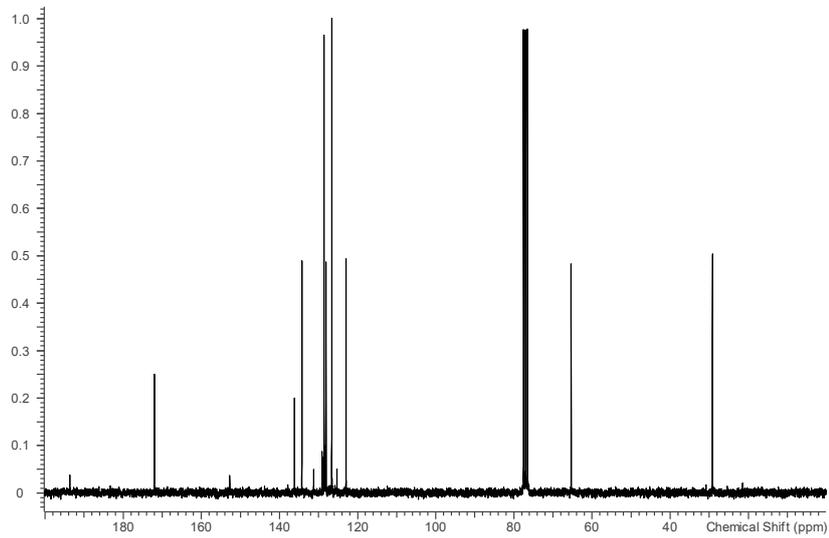


Abbildung 8-3:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Dicitronellysuccinats (Chloroform-d, 500MHz)

$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

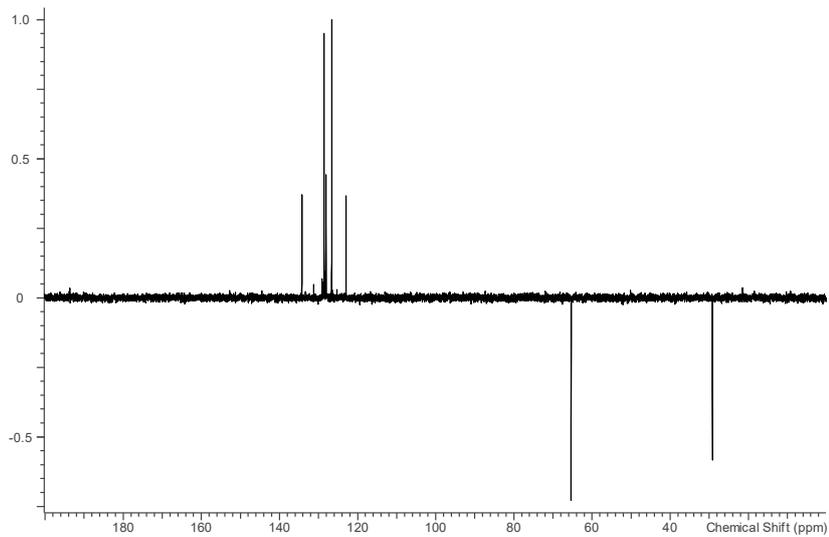
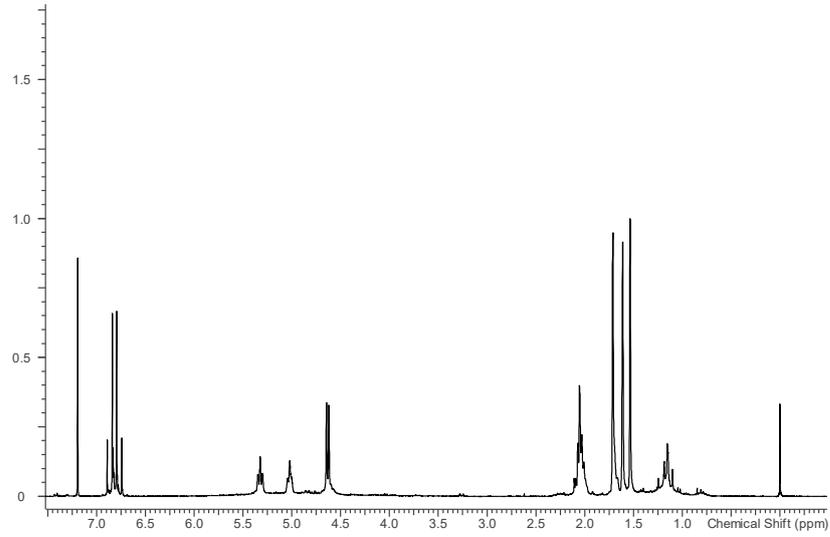
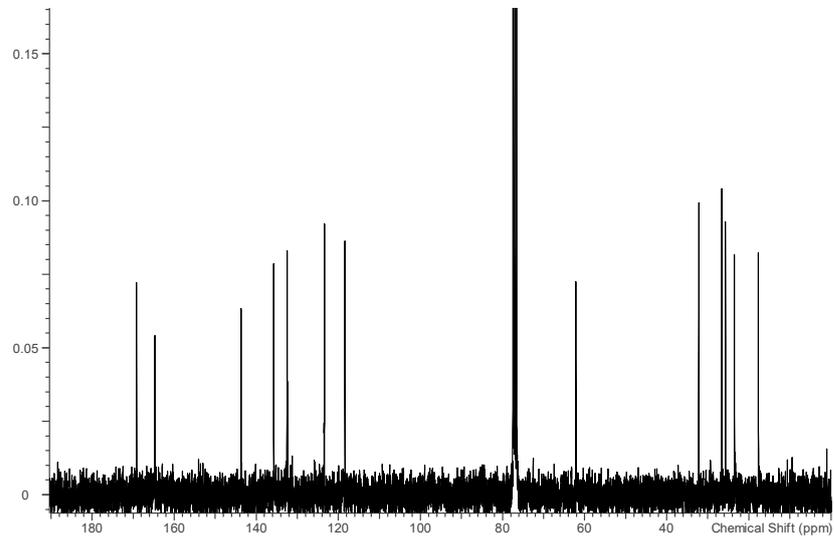


Abbildung 8-4:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Dicinnamylsuccinats (Chloroform-d, 200MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

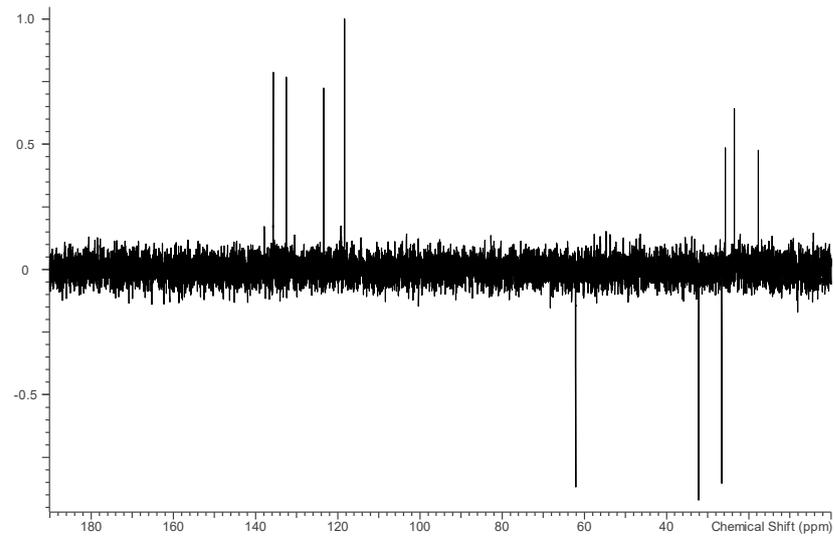
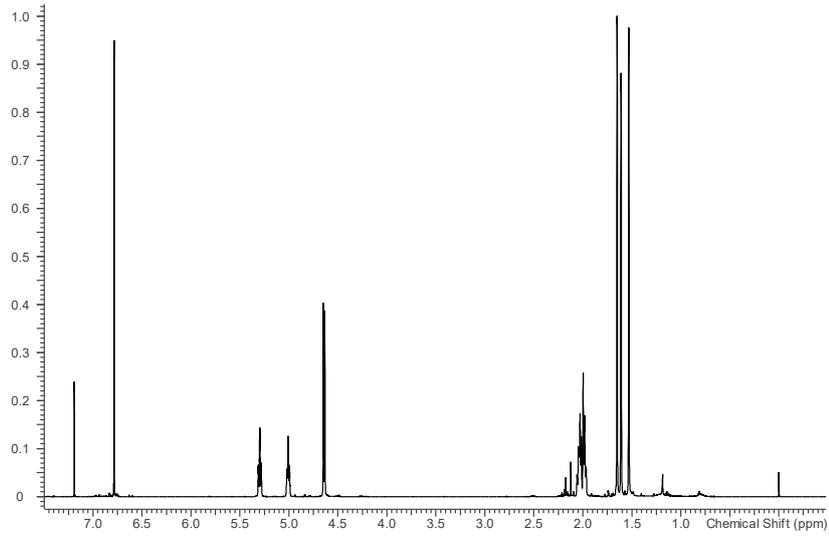
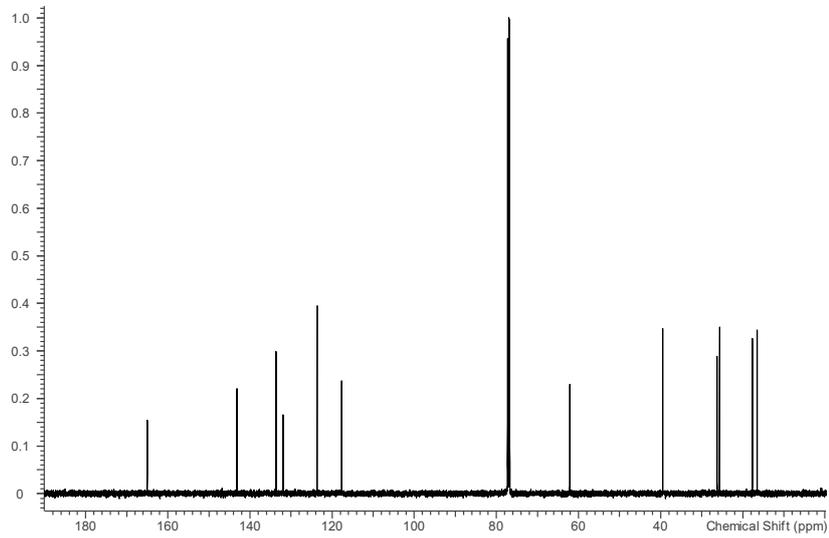


Abbildung 8-5:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monogeranylfumarats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

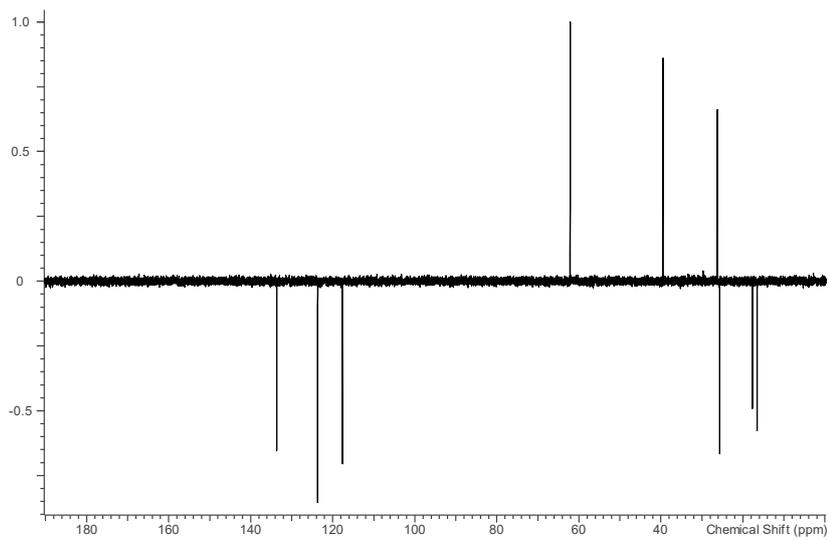
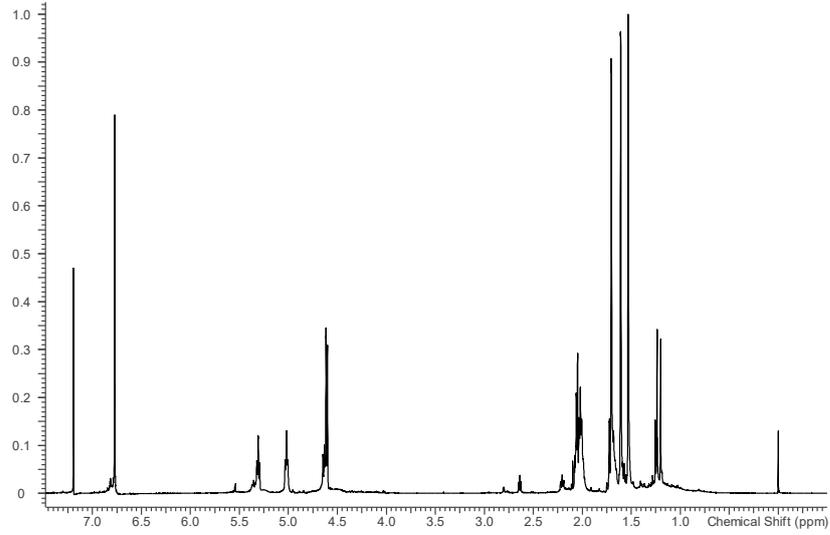
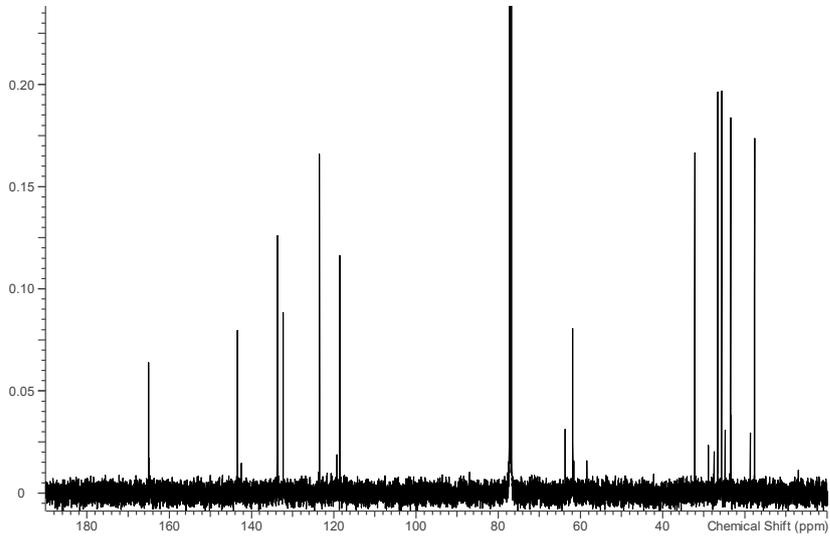
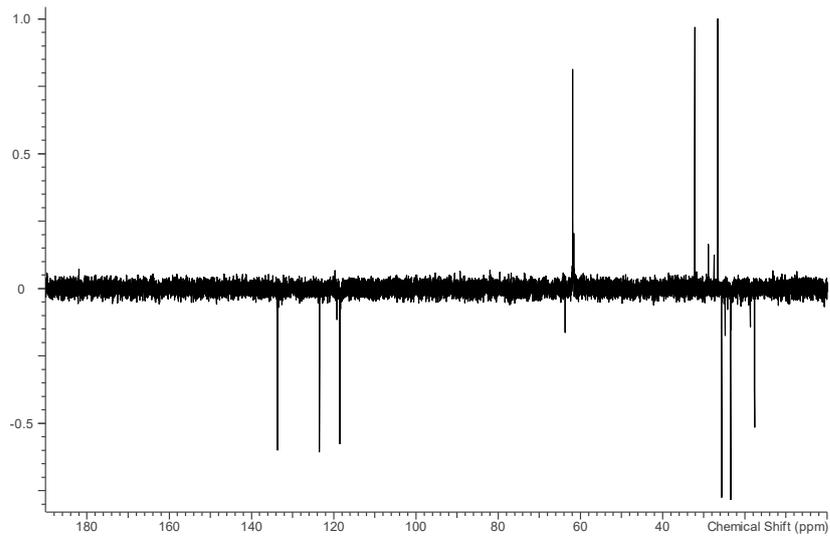
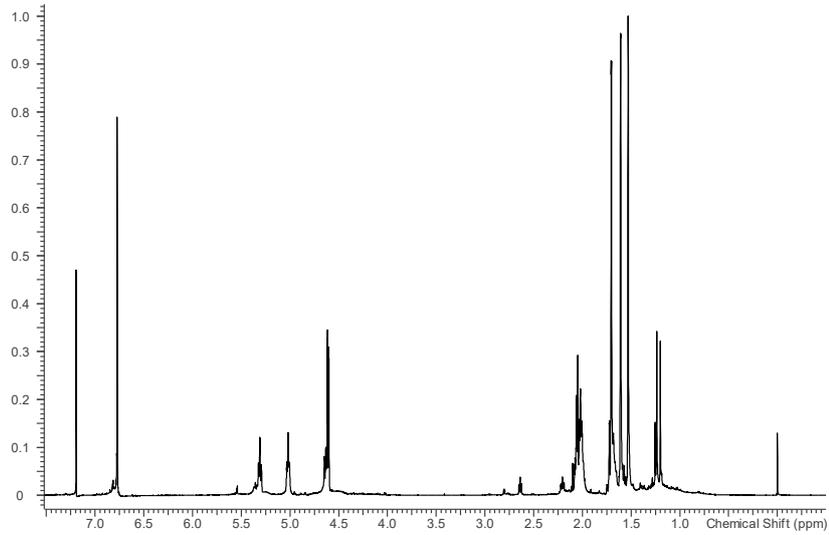
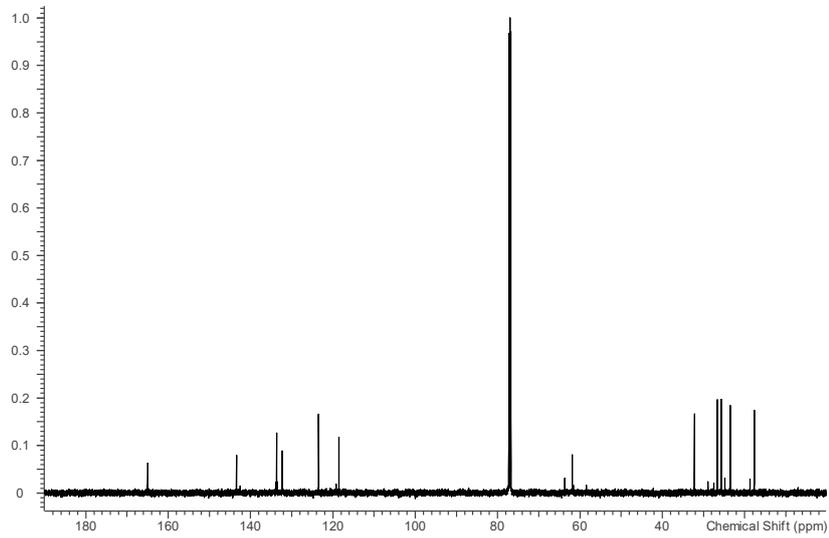


Abbildung 8-6:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Digeranylfumarats (Chloroform-d, 500MHz)

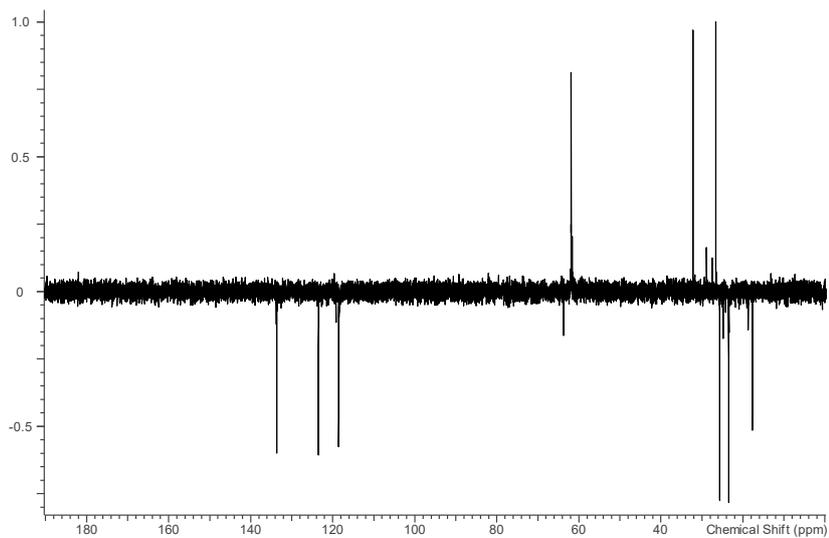
$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

Abbildung 8-7:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monomethylfumarats (Chloroform-d, 300MHz)

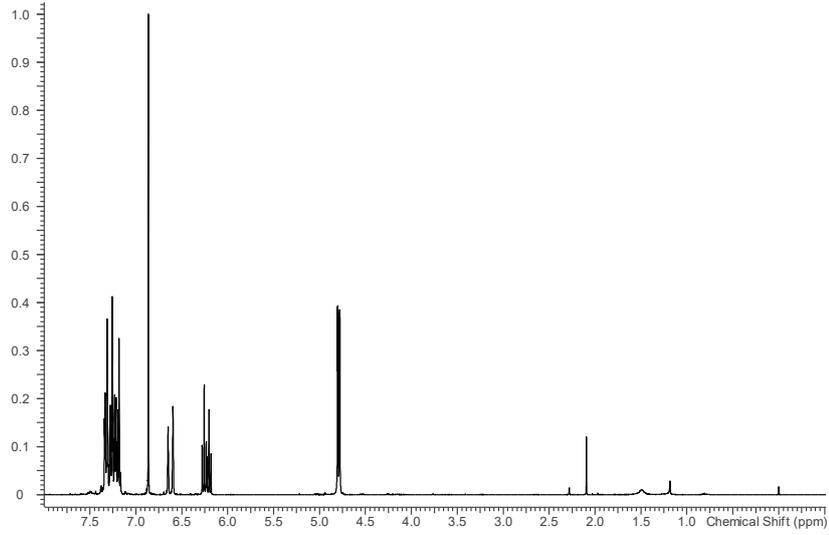
$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

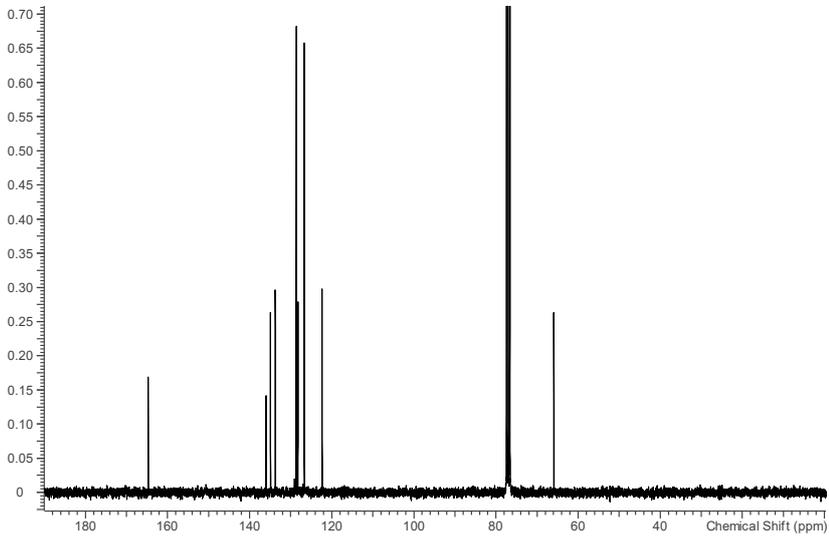
Abbildung 8-8:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Dinerylfumarats (Chloroform-d, 500MHz)



$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

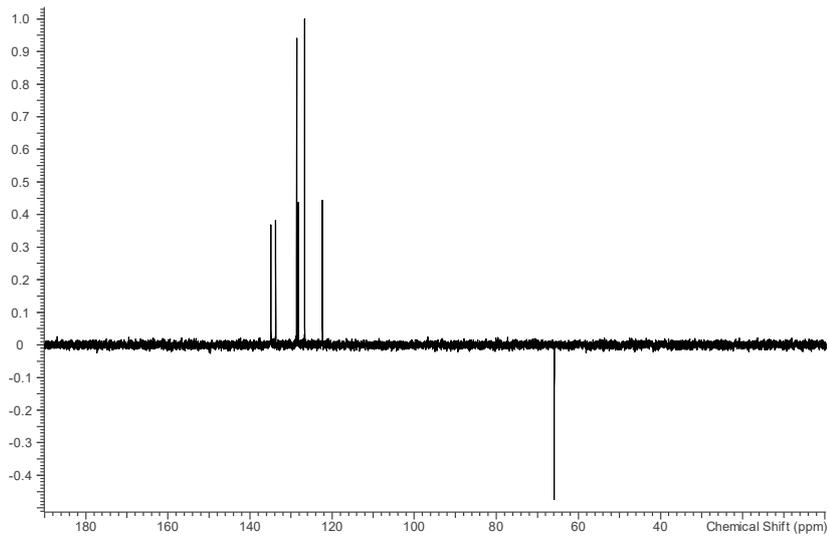
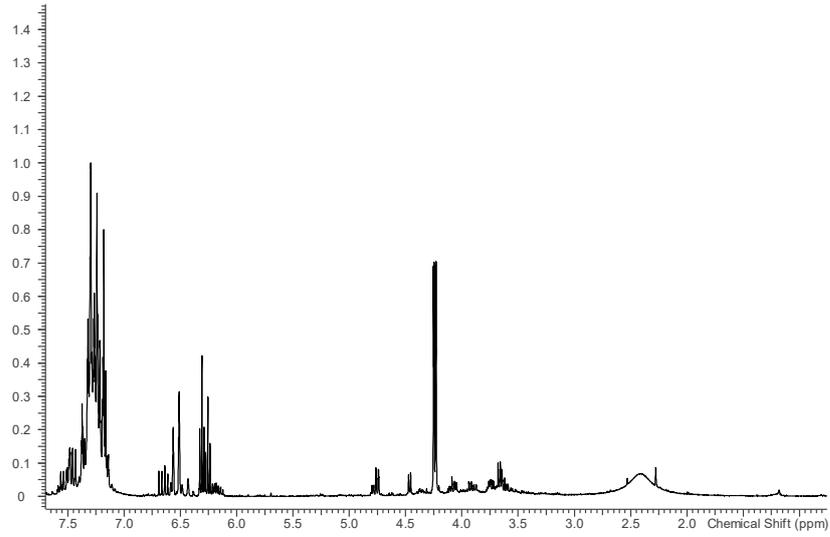
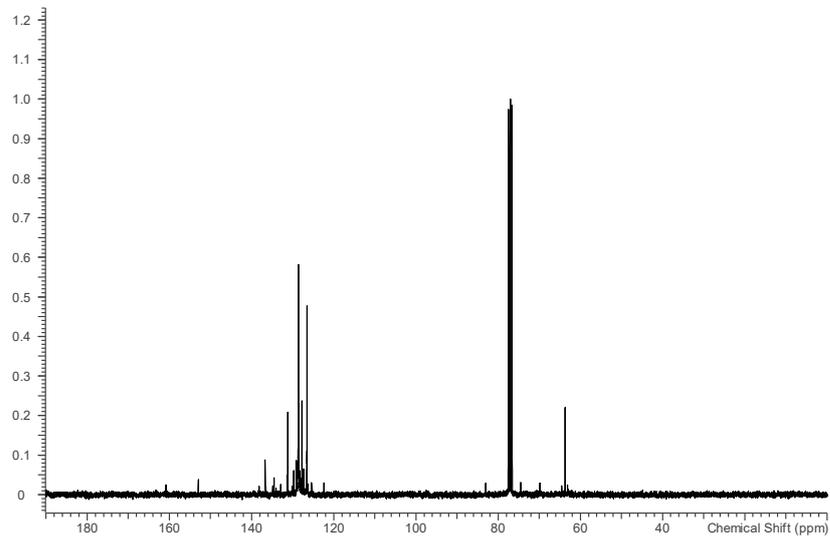


Abbildung 8-10:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monocinnamylfumarats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

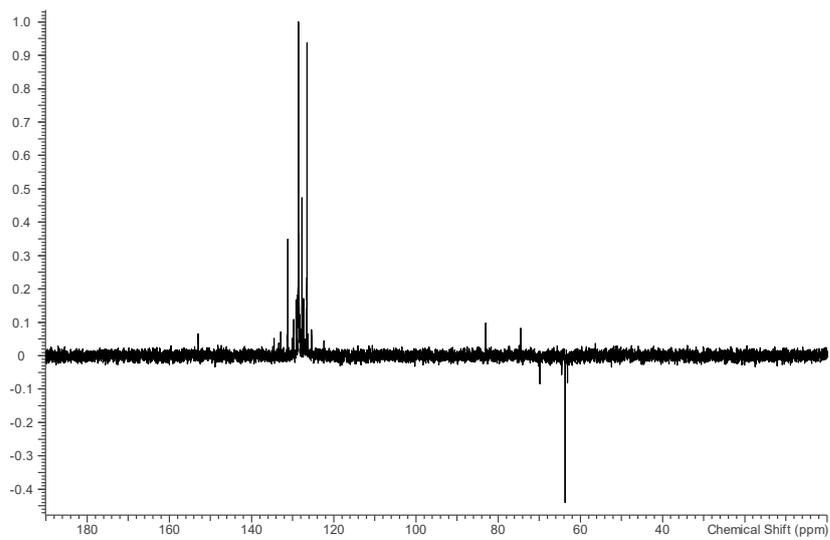
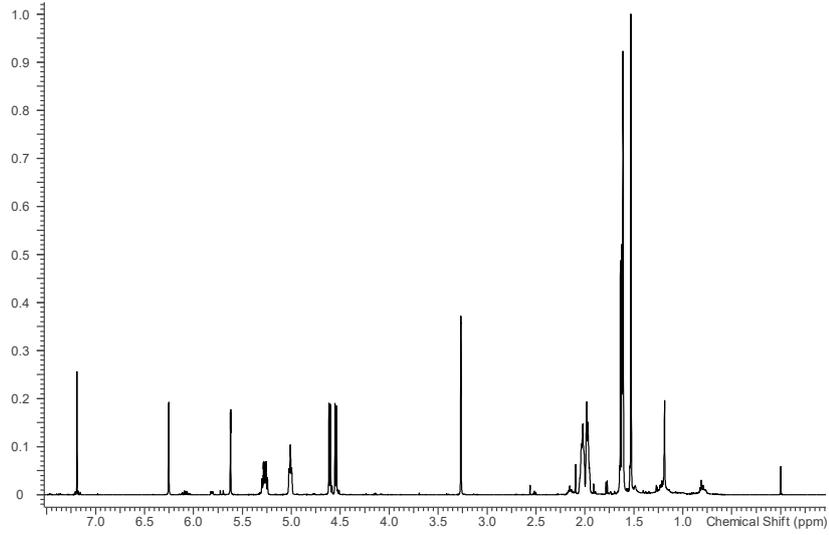
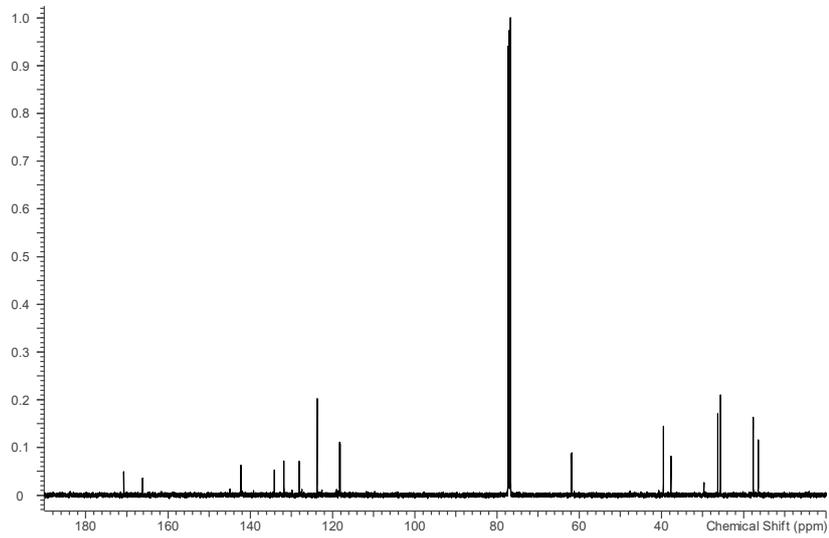


Abbildung 8-11:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Dicinnamylfumarats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

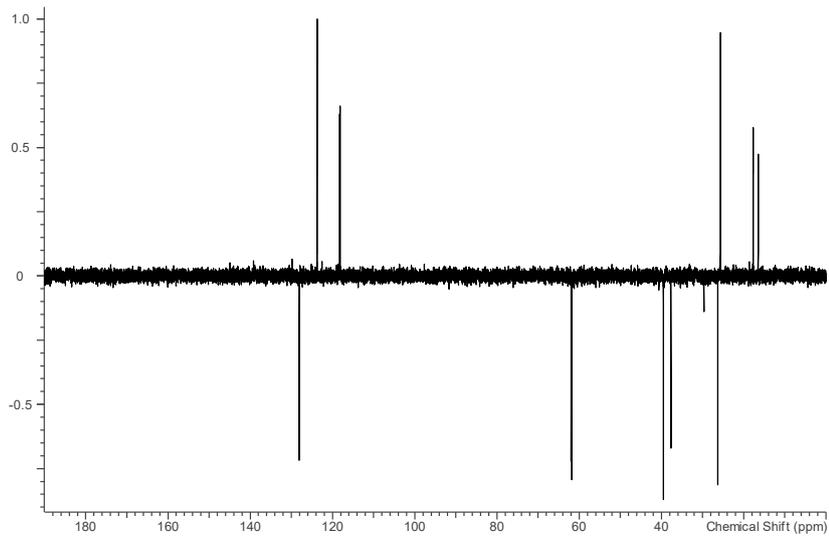
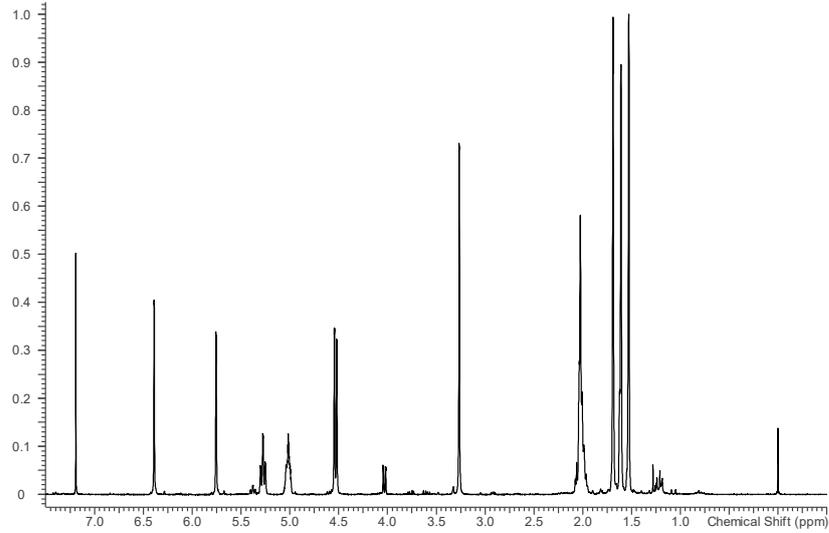
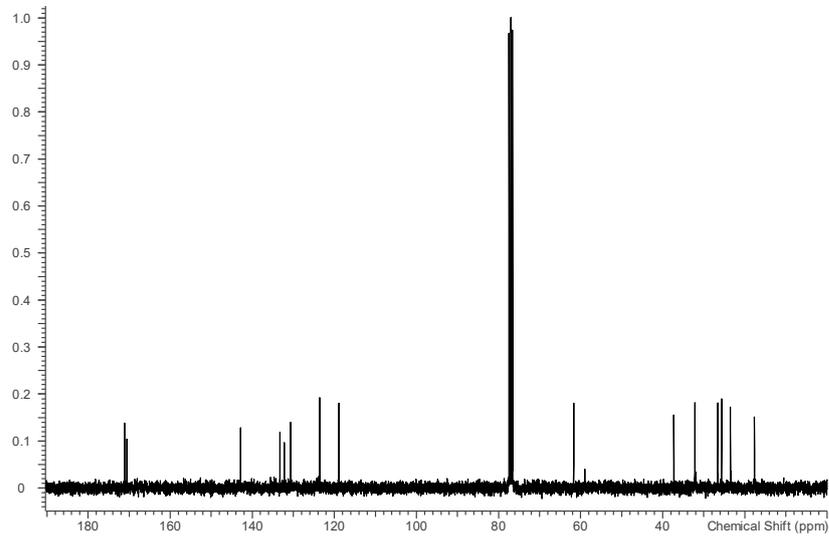


Abbildung 8-12:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monoglycerolitaconats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

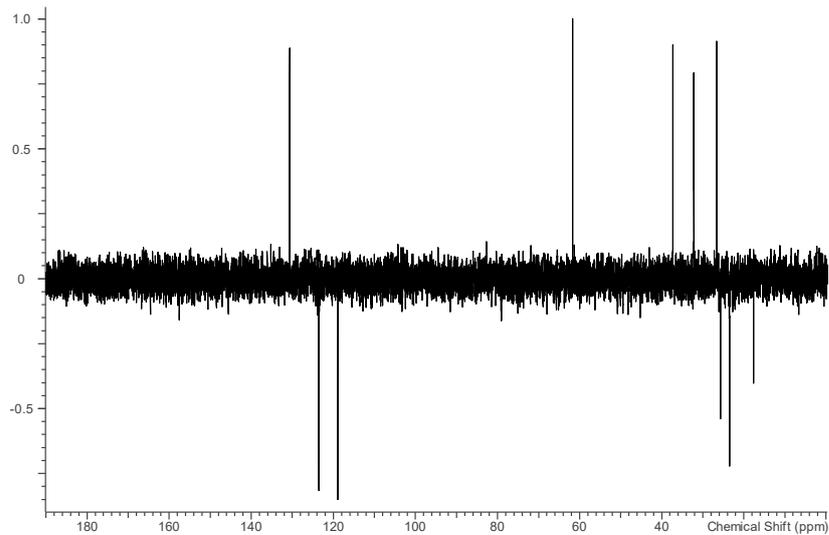
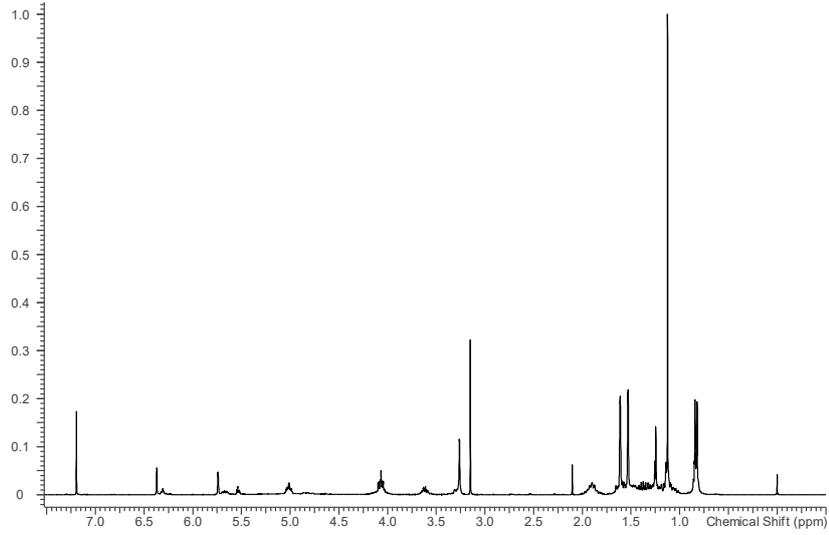
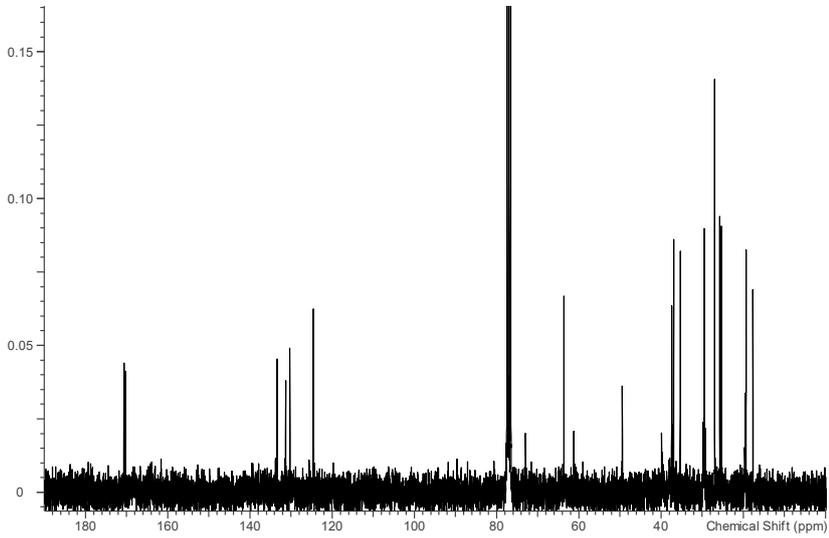


Abbildung 8-13:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monomethylitaconats (Chloroform-d, 500MHz)

$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

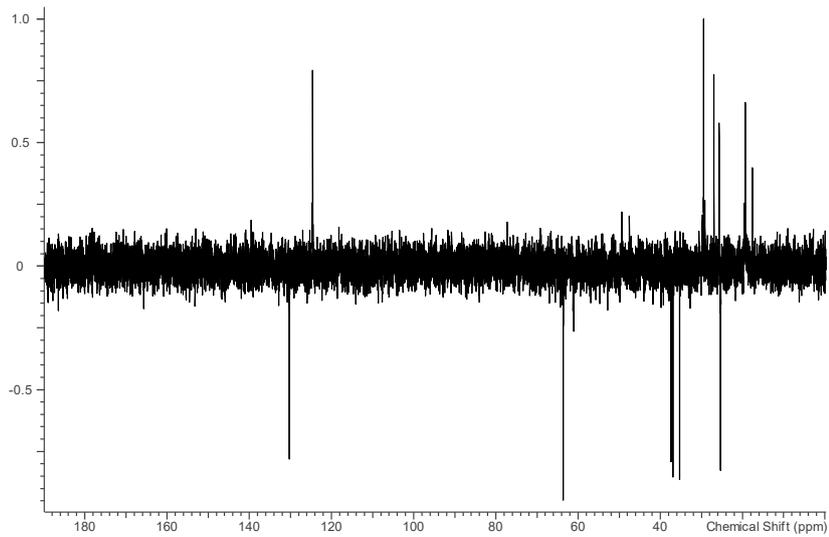
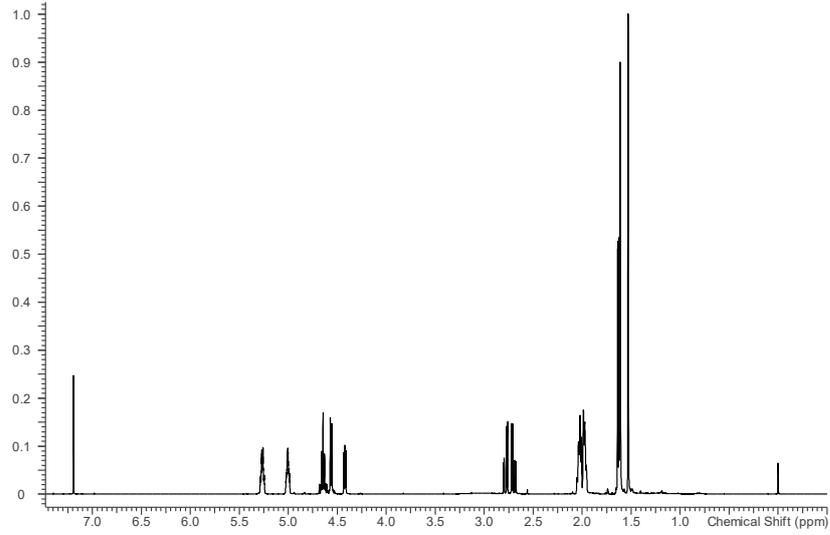
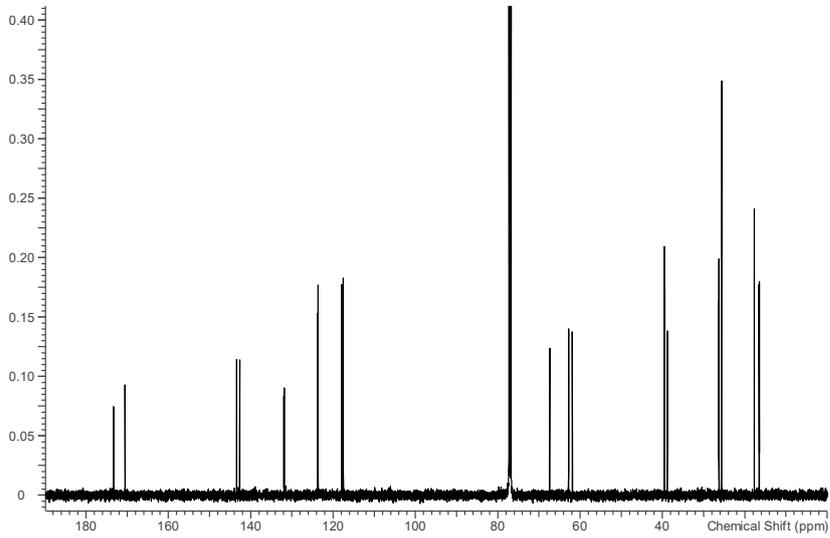


Abbildung 8-14:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monocinnaylitaconats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

DEPT

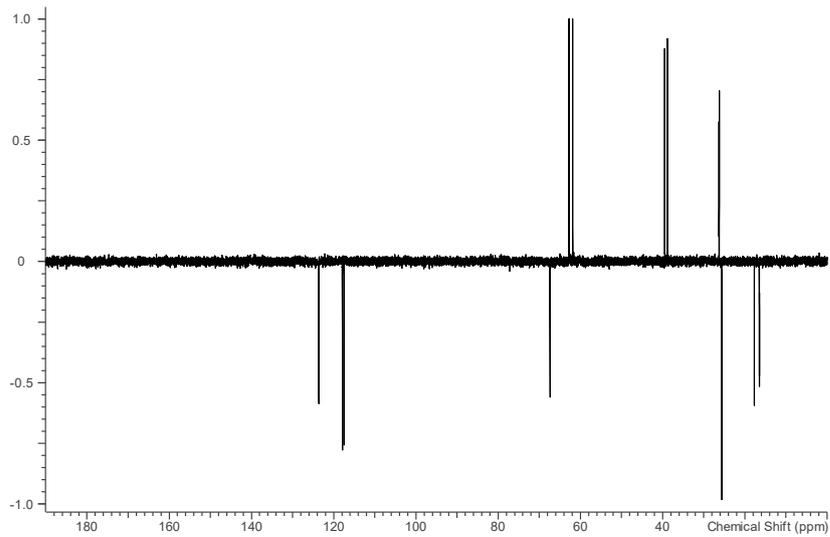
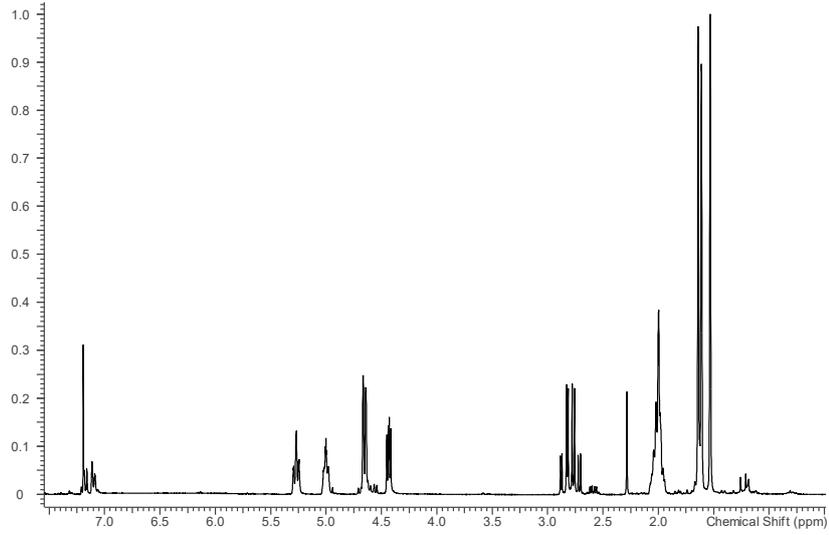
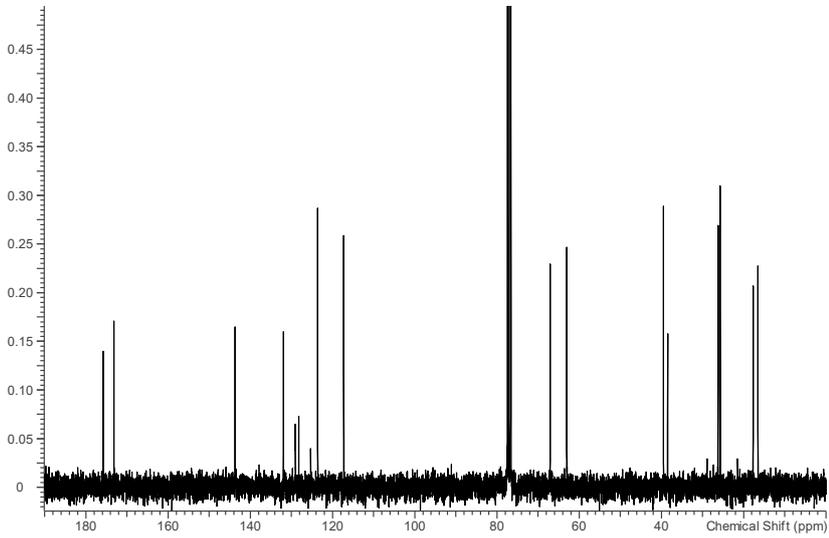


Abbildung 8-15:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Digeranylmaleats (Chloroform-d, 500MHz)

$^1\text{H}$



$^{13}\text{C}$



DEPT

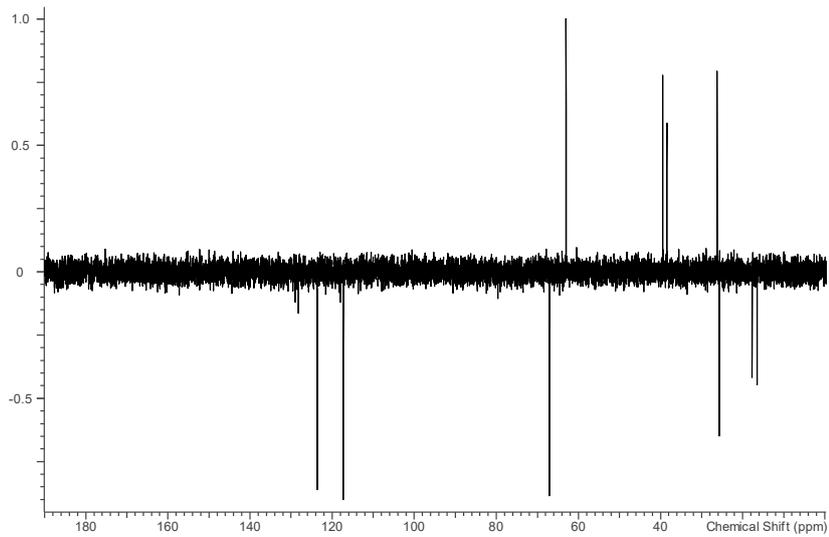
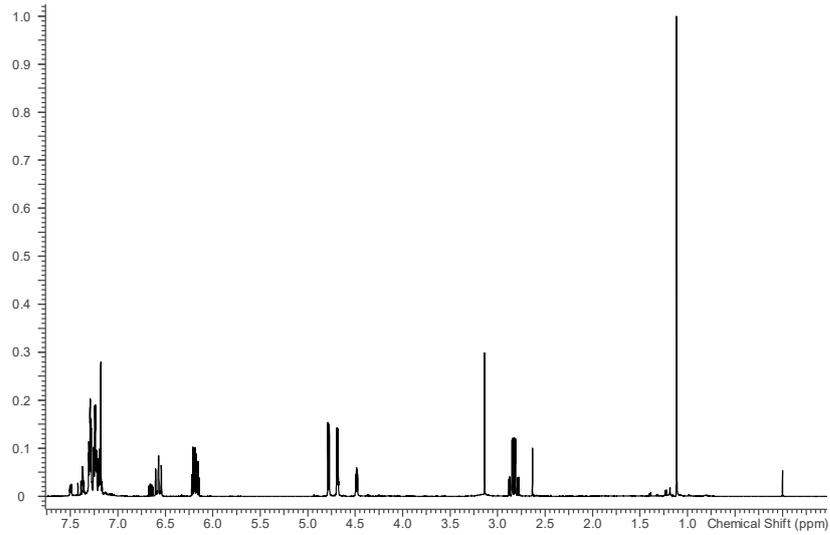
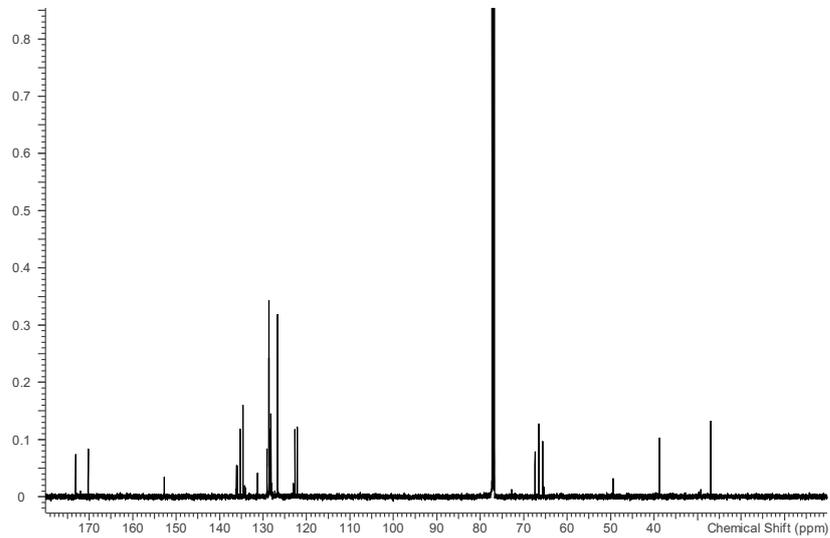
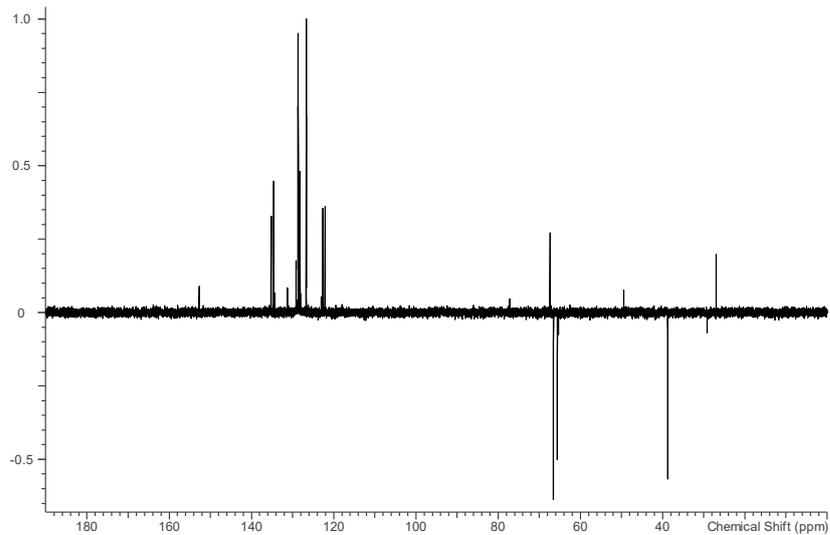


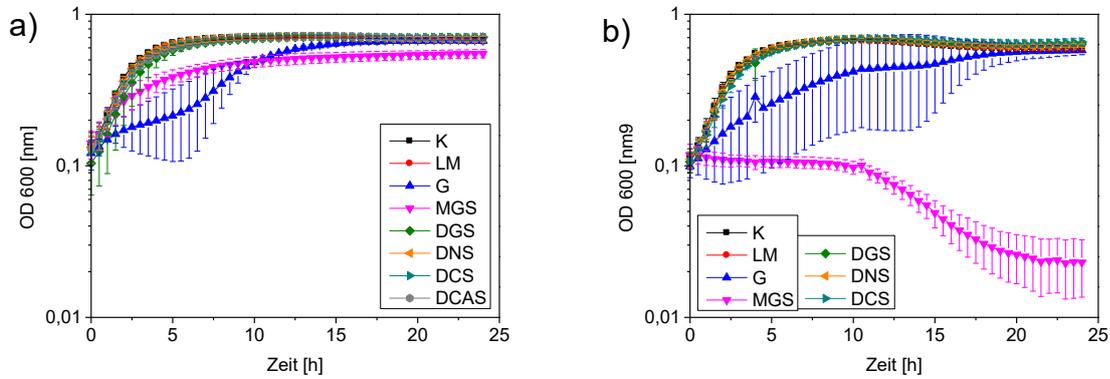
Abbildung 8-16:  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-Spektrum des Monomethylmalats (Chloroform-d, 300MHz)

$^1\text{H}$  $^{13}\text{C}$ 

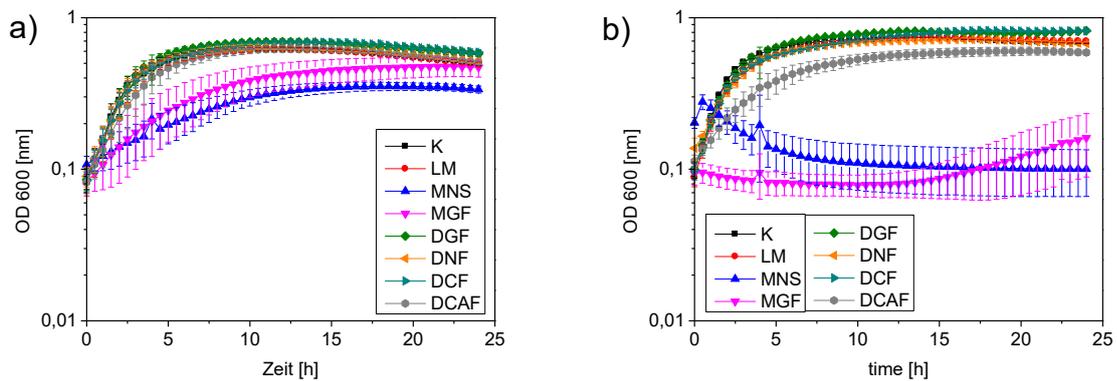
DEPT

**Abbildung 8-17:**  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und DEPT-NMR-Spektrum des Dicinnamylmalates (Chloroform-d, 500 MHz)

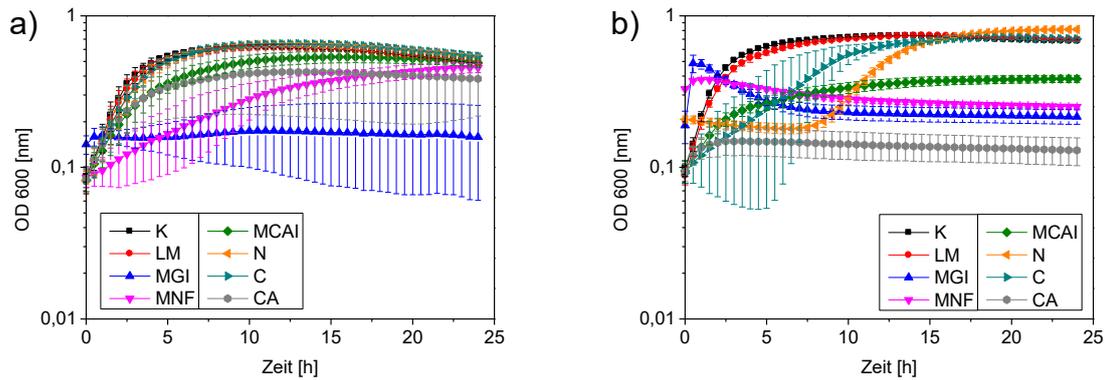
## 8.7. Wachstumsversuche



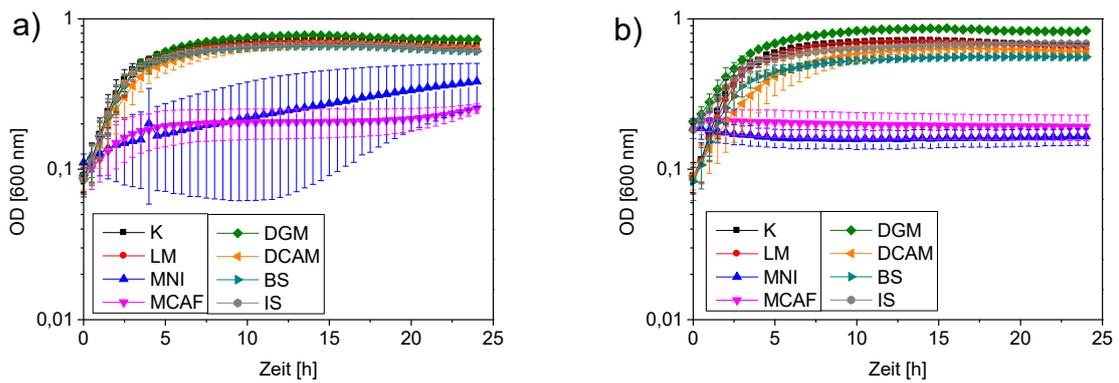
**Abbildung 8-18:** Wachstumskurven von *Staphylococcus aureus* für G, MGS, DGS, DNS, DCS, DCAS; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L (485  $\mu$ L Bakteriensuspension in Medium, 15  $\mu$ L Stammlösung (100 mmol/L), je 200  $\mu$ L pro Well) b) 10 mmol/L (480  $\mu$ L Bakteriensuspension in Medium, 20  $\mu$ L Stammlösung (250 mmol/L), je 200  $\mu$ L pro Well)



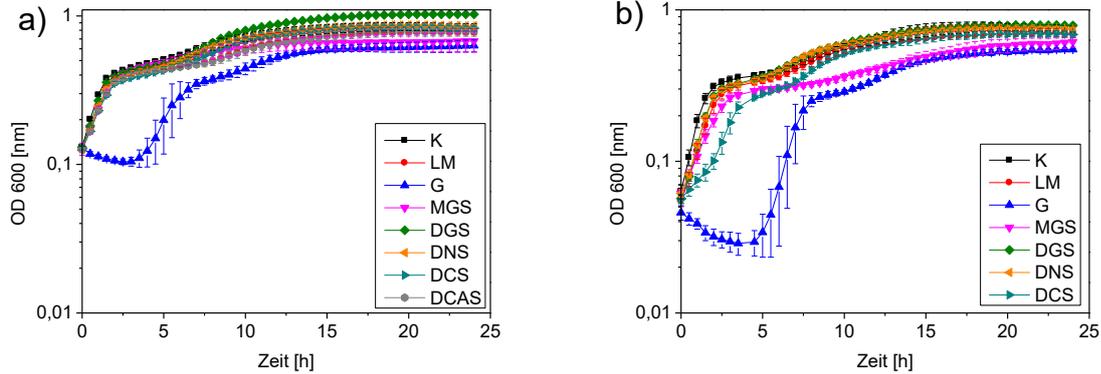
**Abbildung 8-19:** Wachstumskurven von *Staphylococcus aureus* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF, DCAF; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L (485  $\mu$ L Bakteriensuspension in Medium, 15  $\mu$ L Stammlösung (100 mmol/L), je 200  $\mu$ L pro Well) b) 10 mmol/L (480  $\mu$ L Bakteriensuspension in Medium, 20  $\mu$ L Stammlösung (250 mmol/L), je 200  $\mu$ L pro Well)



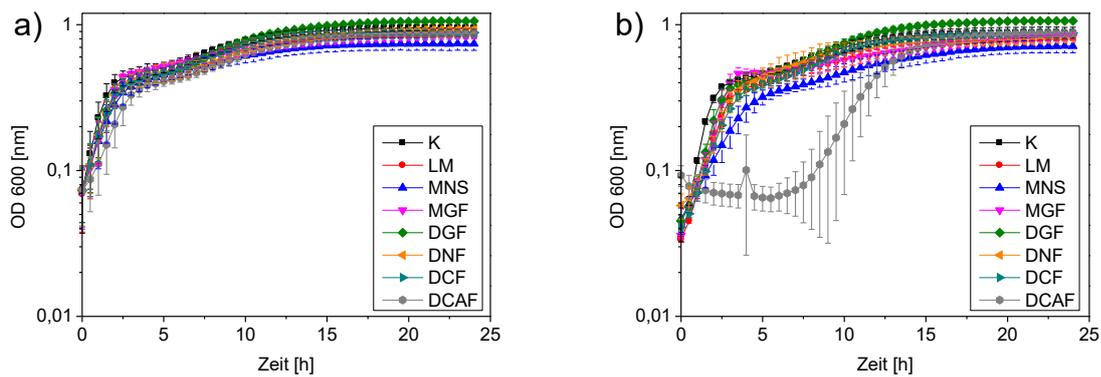
**Abbildung 8-20:** Wachstumskurven von *Staphylococcus aureus* für MGI, MNF, MCAI, N, C, CA; Ester- bzw. Säurekonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/L (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)



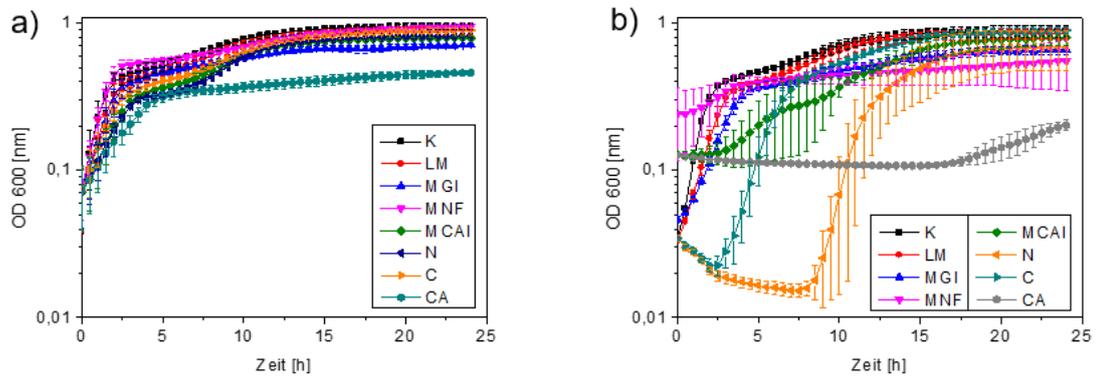
**Abbildung 8-21:** Wachstumskurven von *Staphylococcus aureus* für MNI, MCAF, DGM, DCAM, BS, IS; Ester- bzw. Säurekonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/L (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)



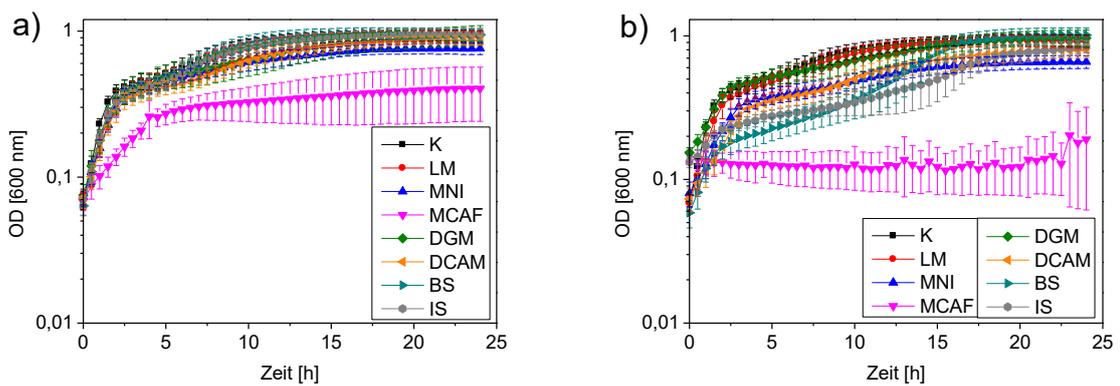
**Abbildung 8-22:** Wachstumskurven von *Escherichia coli* für G, MGS, DGS, DNS, DCS, DCAS; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/L (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)



**Abbildung 8-23:** Wachstumskurven von *Escherichia coli* für MNS, MGF, DGF, DNF, DCF, DCAF; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/L (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)



**Abbildung 8-24:** Wachstumskurven von *Escherichia coli* für MGI, MNF, MCAI, N, C, CA; Ester- bzw. Alkoholkonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/L (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)



**Abbildung 8-25:** Wachstumskurven von *Escherichia coli* für MNI, MCAF, DGM, DCAM, BS, IS; Ester- bzw. Säurekonzentration a) 3 mmol/L (485 µL Bakteriensuspension in Medium, 15 µL Stammlösung (100 mmol/L), je 200 µL pro Well) b) 10 mmol/ (480 µL Bakteriensuspension in Medium, 20 µL Stammlösung (250 mmol/L), je 200 µL pro Well)