

Lipasen-katalysierte Polykondensation in wasserhaltigen Reaktionssystemen

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock



vorgelegt von

Julia Duwensee

Rostock 2008

Gutachter:

1. Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock (ICH)
2. PD Dr. Katrin Sternberg, Universität Rostock (IBMT)

Tag des Rigorosums: 27.01.2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2005 bis August 2008 im Institut für Chemie der Universität Rostock unter Betreuung von Prof. Dr. Udo Kragl angefertigt.

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Kragl für die Chance bedanken in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Mit seiner Idee der enzymatischen Polymerisation hat er den Grundstein für diese Arbeit gelegt und mich auch während der Zeit mit ausführlichen und anregenden Diskussionen unterstützt.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Wolfgang Ruth für die MS-Messungen und die Hilfestellung bei allen analytischen Problemen.

Ganz besonders danken möchte Stefanie Wenda, die mir als studentische Hilfskraft zur Seite stand, und Juliane Ratzka, die mit ihrer Diplomarbeit ebenfalls zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich der „Mädels-Klicke“ Daniela Hameister, Susanne Dreyer, Katja Neubauer, Sandra Klembt, Vera Zimmermann und Annett Horn für die netten Abende. Besonders erwähnenswert sind natürlich die netten Aufmunterungen (z.B. durch fliegende Frösche) meiner „Lieblings-Büronachbarin“ aus der 029.

Ein besonders großes Dankeschön geht an den „guten Geist der TC“, Frau Freitag. Sie war immer zur Stelle, wenn Hilfe gebraucht wird.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Technische Chemie für das nette Arbeitsklima. Ihr habt mich aufgemuntert, wenn der Frustrationsgrad besonders hoch war.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Firma Jülich Chiral Solutions (Codexis) und der Firma Cognis für die Bereitstellung der CaLB bedanken.

Für den finanziellen Support der Arbeit möchte ich dem DFG-Graduierten Kolleg 1213 „Neue Methoden für Nachhaltigkeit in Katalyse und Technik“ bedanken. Durch das GRK konnte ich mich mit anderen Gruppen austauschen und neue Ideen für meine eigene Arbeit bekommen. Vielen Dank auch an Anja Radtke, die mir immer bei der Erstellung meiner Reisekostenabrechnungen zur Seite stand.

Prof. Jingyang Jiang und seiner Arbeitsgruppe, besonders Yadong Lu, Gaoge und Wei Wei, gilt mein Dank für die Möglichkeit 3 Monate bei ihnen in Dalian (China) zu arbeiten. Es war eine unvergessliche Zeit, die mich nicht nur fachlich, sondern auch persönlich hat reifen lassen.

Ebenfalls gilt meine Dank Wolfgang Duwensee für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Meinen Eltern, meinem Schwiegereltern und meiner ganzen Familie danke ich für die Unterstützung in den vergangenen 3 Jahren; ohne euren Rückhalt hätte ich es nicht geschafft.

Ich danke meinen Freunden, besonders Ina Schlanges, für die netten Abendstunden, in denen die Arbeit nicht das einzige Gesprächsthema war.

Ein sehr großer Dank gilt meinem Mann Heiko, der immer für mich da war und mich auch in Krisenzeiten nach Kräften unterstützt hat. Natürlich danke ich auch unseren Katzen Luna und Lucy, die mich durch eine blockierte Tastatur mehr als einmal darauf hingewiesen haben, dass es nun Zeit zum Aufhören ist.

Für Heiko, Luna und Lucy

**Katzen erreichen mühelos,
was uns Menschen versagt bleibt:
durchs Leben zu gehen,
ohne Lärm zu machen.
(Ernest Hemmingway)**

Abstract

Lipasen-katalysierte Polykondensation in wasserhaltigen Reaktionssystemen

(Deutsch)

Die lipasen-katalysierte Polykondensation von hydrophilen Monomeren stellt ein Problem dar, da diese Monomere eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln besitzen. Klassischerweise werden lipasen-katalysierte Polykondensationen in wasserfreien organischen Lösungsmitteln durchgeführt, um die Gleichgewichtsreaktion zugunsten der Veresterung zu verschieben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein binäres Reaktionssystem etabliert, welches die Polykondensation von hydrophilen Monomeren ermöglicht, indem eine integrierte Produktentfernung mit der eigentlichen Reaktion gekoppelt wurde. Hierdurch konnte das Hydrolysegleichgewicht zugunsten der Veresterungsprodukte verschoben werden. Durch die Variation von system- und reaktionsspezifischen Parametern ist es möglich die Reaktion hinsichtlich der Ausbeute, des mittleren Molekulargewichts und der Polydispersität des Polyesters zu beeinflussen.

Zur Charakterisierung der zwei Polyester, welche modellhaft synthetisiert wurden, dienten NMR und MS-Untersuchungen. Darüber hinaus wurde im Rahmen der Arbeit das quantenchemische Berechnungsmodell COSMO-RS verwendet, um Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte und Verteilungskoeffizienten vorherzuberechnen. Hiermit kann abgeschätzt werden, ob und unter welchen Bedingungen eine Polykondensation im binären System möglich ist.

Lipase-catalysed polycondensation in water-containing reaction systems

(English)

Due to the low solubility of hydrophilic compounds, the enzymatic polycondensation of hydrophilic monomers is a major problem in industry. Under standard conditions lipase-catalysed polycondensations are accomplished in pure organic solvent coupled with in situ water removal to shift the equilibrium position to the ester formation. In this work a biphasic reaction system was applied for the polycondensation of hydrophilic monomers. An integrated product removal (IPR) was used to obtain higher polyester yields. By the variation of reaction parameters it was possible to control the yield, the molecular weight and the polydispersity of the produced polyesters.

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	5
3	Theorie	7
3.1	Polymerisation	7
3.1.1	Polyestersynthese	12
3.1.2	Enzym-katalysierte Polyestersynthese	14
3.1.3	Lipasen-katalysierte Polykondensation	17
3.2	Enzyme in der organischen Synthese	20
3.2.1	Lipasen	21
3.2.2	Lipasen in der organischen Synthese	27
3.2.3	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	29
3.3	Berechnung thermodynamischer Eigenschaften	33
3.3.1	COSMO	35
3.3.2	COSMO-RS	35
4	Ergebnisse	39
4.1	Einphasiges Reaktionssystem	40
4.2	Zweiphasiges Reaktionssystem	43
4.2.1	Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	44
4.2.2	Polykondensation von Citronensäure und Glucose	53
4.3	Kinetische Betrachtungen	71
4.3.1	Reinheit des Rohextraktes	72
4.3.2	Polykondensation von Glucose und Citronensäure	74
4.4	Strukturen und Eigenschaften der Polyester	82
4.4.1	Poly(butylsebacat)	82
4.4.2	Poly(glucosylcitrat)	88
4.5	Verteilung der Monomere in binären Reaktionssystemen	92
5	Zusammenfassung	99
6	Diskussion & Ausblick	101

7	Material & Methoden	104
7.1	Aktivitätsbestimmungen	104
7.1.1	Photometrischer Assay für die freie CaLB	104
7.1.2	GC-Assay für die immobilisierte CaLB	107
7.1.3	Gelelektrophorese und Proteingehalt	108
7.2	Reaktionsverfolgung	110
7.2.1	Verteilungskoeffizienten	110
7.2.2	Konzentrationsbestimmung der Monomere	111
7.3	Strukturaufklärung des Polyesters	113
7.3.1	GPC	113
7.3.2	NMR	114
7.3.3	MS	114
7.3.4	TG /DSC	115
7.4	COSMO-RS	116
7.4.1	Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht	116
7.4.2	Verteilungskoeffizienten	116
8	Literatur	117
9	Anhang	131
9.1	Chemikalienliste	131
9.2	Geräteliste	132
9.3	Messdaten	133
9.3.1	Verteilungskoeffizienten Diole	133
9.3.2	Verteilungskoeffizienten Disäuren und Ester	133
9.3.3	Raum-Zeit-Ausbeute Polyester	134
9.3.4	Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte	134
9.3.5	Effekt der Monomer Glucose und Citronensäure	134
9.4	Messanordnung	135
9.4.1	Messanordnung	135
9.5	GPC-Chromatogramme	136
9.6	Massenspektren	138

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Makromolekül Cellulose als wichtiger Bestandteil pflanzlicher Zellwände	1
Abb. 1-2	Bekannte Vertreter der Polyester: Polyethylenterephthalat und das Polycarbonat	2
Abb. 1-3	Prinzip der Ökoeffizienzanalyse	3
Abb. 2-1	Einflussgrößen auf die lipasen-katalysierte Veresterung	5
Abb. 3-1	Polyamid aus Hexamethyldiamin und Adipinsäure (Nylon 6,6)	7
Abb. 3-2	Mittlere Molekularmassenverteilung und ihre Berechnung	8
Abb. 3-3	Kunststoffe aus Erdöl (Beispiel)	9
Abb. 3-4	Prinzip des Polymerisationsmechanismus: Kettenwachstum (A) und Stufenwachstum (B)	11
Abb. 3-5	Enzymatische Polymerisationen und Polymermodifikationen nach Gübitz und Paulo (2003)	13
Abb. 3-6	Beispiel für Homo- und Copolyester (rote Sterne: Säurefunktion A, grüner Stern: Alkoholfunktion B)	15
Abb. 3-7	Lipasen-katalysierte Produktion von Polyestern anhand der 3 Reaktionstypen	17
Abb. 3-8	Grundlage und Berechnung des logP-Wertes	18
Abb. 3-9	Binäres Reaktionssystem für die lipasen-katalysierte Polykondensation	19
Abb. 3-10	Schematische Darstellung der 6 Enzymklassen nach IUBMB	20
Abb. 3-11	Schematische Darstellung der <i>lid</i> -Struktur in der geschlossenen (a) und offenen Position (b)	23
Abb. 3-12	Strukturmerkmal der Lipasen: α/β -Hydrolase Faltung	24
Abb. 3-13	Reaktionsmechanismus der Lipasen-katalysierten Hydrolyse	25
Abb. 3-14	Einsatz von Biokatalysatoren in unterschiedlichen Reaktionssystemen	27
Abb. 3-15	Schematischer Aufbau des Kanals zum aktiven Zentrum der CaLB	31
Abb. 3-16	Flussdiagramm für den Ablauf der Berechnungen in COSMO-RS	33
Abb. 3-17	σ -Profile von n-Hexan und Chloroform wie auch von deren Mischung und von einer Wasser-n-Hexan-Mischung	34
Abb. 3-18	Molekulare Wechselwirkung in Flüssigkeiten nach COSMO-RS	36
Abb. 4-1	Gleichgewichtsreaktion der lipasen-katalysierten Veresterung/ Hydrolyse	39
Abb. 4-2	Reaktionsschema der Modelreaktionen 1 und 2	40
Abb. 4-3	Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol im binären System	43
Abb. 4-4	Einfluss des Extraktionsmittels auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	45
Abb. 4-5	Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	47

IV

Abb. 4-6	Einfluss des pH-Wertes der Wasserphase auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	48
Abb. 4-7	Einfluss der Monomerstruktur auf die Polykondensation von Disäuren und Diolen	50
Abb. 4-8	Kombinationsmöglichkeiten von Glucose und Citronensäure bei der Polykondensation	53
Abb. 4-9	Einfluss des Extraktionsmittels auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure	55
Abb. 4-10	Reaktionsverlauf der Polykondensation von Glucose und Citronensäure in verschiedenen Lösungsmitteln	55
Abb. 4-11	Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels Novozym® 435	57
Abb. 4-12	Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CalB	58
Abb. 4-13	Reaktionsverlauf der Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CalB und Novozym® 435	59
Abb. 4-14	Einfluss des pH-Wertes auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure	61
Abb. 4-15	Inhibierung der freien CaLB in Abhängigkeit von der Citronensäurekonzentration	62
Abb. 4-16	Vergleich verschiedener Lipasen als Katalysatoren für die Polykondensation von Glucose und Citronensäure	64
Abb. 4-17	Einfluss des Monomerenverhältnisses auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CalB	65
Abb. 4-18	Einfluss des Phasenverhältnisses auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CalB	67
Abb. 4-19	Einfluss der Monomerstruktur auf die Polykondensation von Polyolen und Disäure mittels nativer CalB	69
Abb. 4-20	Gelelektrophorese der beiden Rohextrakte mit Standards	73
Abb. 4-21	Ablauf der lipasen-katalysierten Reaktion nach dem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus	74
Abb. 4-22	Relative Aktivität der CaLB in Abhängigkeit vom Substrat (A) und der Substratkonzentration (B)	76
Abb. 4-23	Relative Aktivität in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel	77
Abb. 4-24	Aktivität der CaLB bei verschiedenen pH-Werten	79
Abb. 4-25	Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der Temperatur	80
Abb. 4-26	NMR-Messungen des Poly(butyl sebacates)	83
Abb. 4-27	Massenspektrum des Polyesters aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	85
Abb. 4-28	Massenspektrum des Tween 60	86

Abb. 4-29	Thermogravimetrische Untersuchung des Polyesters aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol in einem Temperaturbereich zwischen 30 und 350°C	87
Abb. 4-30	Polyester aus Sebacinsäure und Butandiol	88
Abb. 4-31	MS-Spektren von Poly(glucosylcitrats) (PGC oben) und Poly(fructosylcitrats) (PFC unten)	90
Abb. 4-32	Übereinstimmung der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten der Diole in MTBE /Puffer	93
Abb. 4-33	Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten von 1,4-Butandiol und 1,6-Hexandiol	94
Abb. 4-34	Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten von Glucose in MTBE/ Puffer und n-Heptan/ Puffer	95
Abb. 7-1	Standardreaktion zur Bestimmung der Aktivität der freien Lipase	104
Abb. 7-2	Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten vom p-Nitrophenol	105
Abb. 7-3	Berechnung der Aktivität auf Grundlage des p-NPP-Assays	105
Abb. 7-4	Bestandteile des Aktivitätsassays für die native CaLB	106
Abb. 7-5	Halbwertszeit eines Enzyms nach einem Zerfallsgesetz erster Ordnung	107
Abb. 7-6	Gleichungen für Verteilungskoeffizienten für Diol und Dicarbonsäure	110
Abb. 7-7	Berechnung des Umsatzes aus den HPLC-Untersuchungen	111
Abb. 7-8	Zuordnung der chemischen Verschiebung im NMR	114
Abb. 9-1	Deaktivierender Effekt der Citronensäure auf die CaLB	134
Abb. 9-2	Aktivierender Effekt der Glucose auf die CaLB	135
Abb. 9-3	Schüttler mit Thermostat und Schüttler mit Heizblock aus Aluminium	135
Abb. 9-4	Gefäß mit 2-Phasensystem ($\alpha = 1$)	136
Abb. 9-5	10-Punkt-Kalibrierung mit Polystyrol	136
Abb. 9-6	GPC- Chromatogramm von Poly(butylsebacat)	136
Abb. 9-7	GPC- Chromatogramm von Poly(glucosylcitrat)	137
Abb. 9-8	GPC- Chromatogramm des Cognis-Rohextrakte	137
Abb. 9-9	Massenspektrum PEG 6000	138
Abb. 9-10	Massenspektrum Tween 60	138
Abb. 9-11	Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE	139
Abb. 9-12	Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in DIPE	139
Abb. 9-13	Massenspektrum Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE	140
Abb. 9-14	Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) und Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE	140
Abb. 9-15	Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) und Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in DIPE	141
Abb. 9-16	Massenspektrum Poly(butylsebacat), Synthese in DIPE	141

Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1	Potential für Biopolymere in Europa	2
Tab. 3-1	Angemessene Wasseraktivitäten für verschiedene Enzyme	13
Tab. 3-2	logP-Werte verschiedener Lösungsmittel (Wassermischbarkeit)	18
Tab. 3-3	Anwendung von Enzymen in der technischen Synthese	21
Tab. 3-4	Überblick Lipasen-katalysierter Reaktionen	22
Tab. 3-5	Vergleich der CalB mit der CaLA und der CRL	30
Tab. 4-1	Polykondensation von Sebacinsäure und 1,-Butandiol in verschiedenen Reaktionssystemen	41
Tab. 4-2	Polyesterlöslichkeit in verschiedene organischen Lösungsmitteln bei 25°C	45
Tab. 4-3	Einfluss des Phasenverhältnisses auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol	49
Tab. 4-4	Reaktionsgeschwindigkeiten der Modellreaktionen 1 und 2 in binären Reaktionssystemen	56
Tab. 4-5	Verteilungskoeffizienten von Glucose und Citronensäure in Abhängigkeit von der Temperatur	60
Tab. 4-6	Einfluss von r_0 auf die Aktivität und den Umsatz der Polykondensation von Glucose und Citronensäure	66
Tab. 4-7	Gleichgewichte im binären Reaktionssystem	71
Tab. 4-8	Relative Aktivität der CaLB in Abhängigkeit vom organischen Lösungsmittel	78
Tab. 4-9	Halbwertszeit der CaLB in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen	81
Tab. 4-10	Fragmentierung im MS für Poly(butylsebacat)	84
Tab. 4-11	Fragmentierung im MS für Poly(glucosylcitrat)	89
Tab. 4-12	Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten verschiedener Säuren und Ester bei 50 °C in MTBE/ Puffer	96
Tab. 7-1	Retentionszeit der Monomere	112
Tab. 7-2	Polystyrol-Standard zur 10-Punkt-Kalibrierung der GPC-Anlage zur Molekularmassenbestimmung	113
Tab. 9-1	Liste der Chemikalien	131
Tab. 9-2	Liste der Geräte	132
Tab. 9-3	Verteilungskoeffizienten Dirole (experimentell)	133
Tab. 9-4	Verteilungskoeffizienten Dirole (experimentell)	133
Tab. 9-5	Verteilungskoeffizienten Dirole (theoretisch)	133

VII

Tab. 9-6	Verteilungskoeffizienten Diole (theoretisch)	133
Tab. 9-7	Verteilungskoeffizienten Diole (experimentell)	133
Tab. 9-8	Verteilungskoeffizienten Diole (experimentell)	133
Tab. 9-9	Raum-Zeit-Ausbeuten von Modell 1 und 2	134
Tab. 9-10	LLE n-Heptan/ Wasser nach COSMO-RS	134
Tab. 9-11	LLE MTBE/ Wasser nach COSMO-RS	134

Abkürzungsverzeichnis

[X]	Konzentration der Komponente X in mol L ⁻¹
Abb.	Abbildung
a_B^α, a_B^β	Aktivitäten der Komponente B in den Phasen α und β
Amano PS	Immobilisierte Lipase aus <i>Pseudomonas</i> sp.
AoL	Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i>
CaLA	Lipase A aus <i>Candida antarctica</i>
CaLB	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>
CIL	Lipase aus <i>Candida lipolytica</i>
COGECA	General Committee for the Agricultural Cooperation in the European Union
COPA	Committee of Agricultural Organisations in the European Union
CRL	Lipase aus <i>Candida rugosa</i>
DIPE	Diisopropylether
E.C.	Enzyme Commission
ee	Enantiomerenüberschuss [%] (enantiomeric excess)
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FNR	Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe
Gl.	Gleichung
Gl.	Gleichung
GPC	Gelpermeationschromatographie
h	Stunde
IPR	Integrierte Produktentfernung (integrated product removal)
IUB	International Union of Biochemistry
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
K	Gleichgewichtskonstante
K_i	Inhibierungskonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Lipozym	Immobilisierte Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
log P	Logarithmus des Verteilungskoeffizient zwischen n-Octanol und Wasser
Min	Minute
MjL	Lipase aus <i>Mucor javanicus</i>
mM	Konzentration in Millimol pro L

MTBE	Methyl-tert. Butylether
n.d.	Not determined (nicht bestimmt)
P_B	Verteilungskoeffizient der Komponente B
PBS	Poly(butylsebacat)
PC	Polycarbonat
PET	Poly(ethylenterephthalat)
PFC	Poly(fructosylcitrat)
PfL	Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PGC	Poly(glucosylcitrat)
pH	pH-Wert [-]
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PLA	Polymilchsäure= Poly(lactic acid)
PP	Polypropylen
PrL	Lipase aus <i>Penicillium roqueforti</i>
r_0	Monomerenverhältnis
r_0	Verhältnis zwischen Disäure und Diol
RmL	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RZA	Raum-Zeit-Ausbeute [$\text{g l}^{-1} \text{d}^{-1}$]
SLM	Standardliter pro Minute
T	Temperatur in °C
Tab.	Tabelle
TG	Thermogravimetrie
U mL^{-1}	Units pro Milliliter
V	Reaktionsgeschwindigkeit
Vergl.	vergleiche
V_m	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
WKL	Lipase aus Weizenkeimen
x_B^α, x_B^β	Molenbrüche der Komponente B in den Phasen α und β
z.B.	Zum Beispiel
ΔG	Freie Energie des Übergangszustandes
α	Phasenverhältnis
$\mu_B^{0\alpha}, \mu_B^{0\beta}$	Standard-Potentiale der Komponente B in den Phasen α und β

1. Einleitung

Makromoleküle oder makromolekulare Stoffsysteme sind wichtige Bestandteile des Lebens und der Umwelt. In der Natur ist eine Vielzahl solcher hochmolekularen Stoffe bekannt, die die unterschiedlichsten Aufgaben übernehmen. Nicht nur in der Form von Nahrungsmitteln (z.B. Polysaccharide und Proteine), sondern auch als Baustoffe (z.B. Cellulose im Holz), in der Bekleidungsindustrie (z.B. Wolle oder Seide), als Klebstoffe (z.B. Asphalt) und als Schmuckbestandteil (z.B. Bernstein) finden Makromoleküle Anwendung (Abb. 1-1) [1-3].

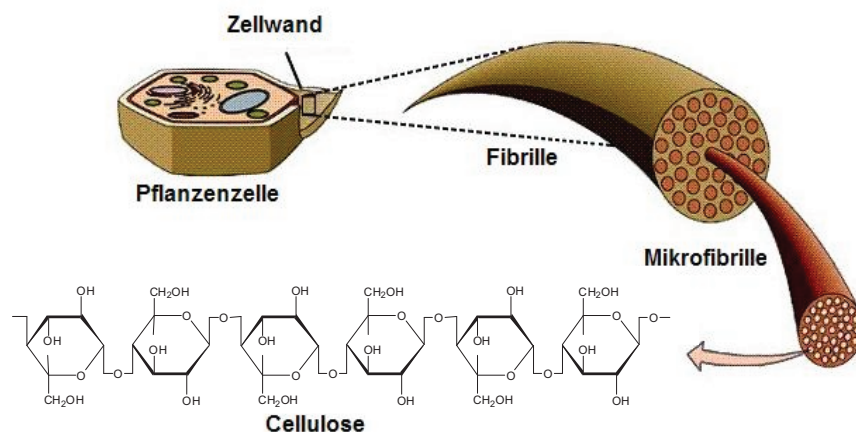


Abb. 1-1: Makromolekül Cellulose als wichtiger Bestandteil pflanzlicher Zellwände [4]

Erst das tiefere Verständnis der molekularen Struktur solcher Makromoleküle ermöglichte die gezielte Modifikation von polymeren Naturstoffen und die Synthese von neuartigen, synthetischen Polymeren (z.B. Polyurethane) [5, 6]. Ein wichtiger Fortschritt war hierbei die Erhöhung der mechanischen Stabilität von Naturkautschuk durch Vulkanisation. Für die Erhöhung der Elastizität ist die Vernetzung des langkettigen Polyisoprens (Naturkautschuk) über Schwefelbrücken verantwortlich.

Synthetische Polymere nehmen mittlerweile ebenfalls einen zentralen Platz in verschiedensten Produktbereichen ein. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Polyester, da sie ein besonders breites Anwendungsspektrum aufweisen. Neben Textilfasern, wie z.B. Trevira®, Dacron® oder Diolen®, verfügen einige Polyester über filmbildende Eigenschaften und können für Folien oder Filme verwendet werden. Die beiden bekanntesten Vertreter sind das Polyethylenterephthalat (PET, Plastik-Getränkeflaschen) und das Polycarbonat (PC, CDs/DVDs und Isolierfolien) (Abb. 1-2). Aufgrund der ubiquitären Anwendungsmöglichkeiten von Polyestern fanden diese Makromoleküle in der Vergangenheit schnell zahlreiche Anwendungen, wobei die Herstellung aus fossilen Rohstoffen erfolgt [7-11]. Ebenfalls auf fossiler Rohstoffbasis lassen sich biologisch abbaubare Polymere, wie beispielsweise das Ecoflex® der Firma BASF, herstellen. Hierbei handelt es sich um einen durch Bakterien und Pilze zersetzbaren Polyester, welcher sich besonders für die Verpackungsindustrie eignet, da er wasserfest und fettbeständig ist.

Der wachsende Ölpreis hat in den letzten Jahren dazu geführt, dass vermehrt auf dem Gebiet der nachwachsenden Rohstoffe geforscht wird; nicht nur zur

1. Einleitung

Polyesterherstellung, sondern auch zur Energiegewinnung (Biomass-to-liquid, BTL) oder für die Synthese von Building Blocks. Hierbei steht der Ersatz fossiler Ausgangsmaterialien im Vordergrund, um preiswertere und umweltverträglichere Produktionsmethoden zu entwickeln[3, 12-17].

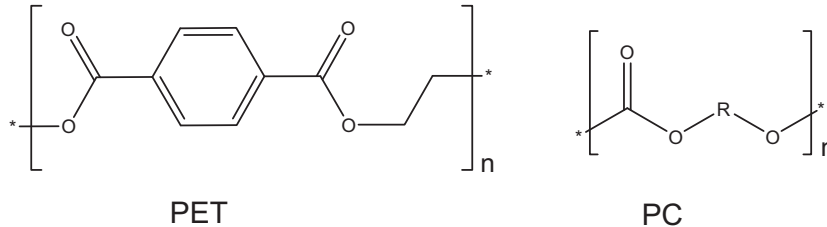


Abb. 1-2: Bekannte Vertreter der Polyester: Polyethylterephthalat und das Polycarbonat

In vielen Bereichen können Biopolymere bzw. -polyester hergestellt werden, die vergleichbare Eigenschaften besitzen wie die Produkte auf Erdölbasis. Heute lassen sich Verpackungsmaterialien für Lebensmittel sowie Einweggeschirr auf Stärkebasis herstellen. Diese Biopolymere sind durch die gleichen Techniken wie ihre petrochemischen Vertreter verarbeitbar[12]. Darüber hinaus besitzen sie auf dem Sektor der Lebensmittelverpackung einen wichtigen Vorteil gegenüber den Polymeren auf Erdölbasis. Biopolymere sind im Gegensatz zu den petrochemischen Polymeren biologisch abbaubar und toxikologisch unbedenklich.

Tab. 1-1: Potential für Biopolymere in Europa (Schätzungen der COPA¹ und COGECA², 2001)[3]

Potential für Biopolymere in Europa (Schätzungen der COPA und COGECA, 2001)	
Catering	450.000 t/a
Säcke zum Sammeln von Biomüll	100.000 t/a
Bioabbaubare Mulchfolien	130.000 t/a
Bioabbaubare Folien für Windeln	80.000 t/a
Windeln, vollständig aus biologisch abbaubaren Werkstoffen	240.000 t/a
Leichtverpackungen, Schalen und Dosen	400.000 t/a
Gemüseverpackungen	400.000 t/a
Komponenten für Fahrzeugreifen	200.000 t/a
Gesamt	2.000.000 t/a

¹COPA: Committee of Agricultural Organisations in the European Union

²COGECA: General Committee for the Agricultural Cooperation in the European Union

Dennoch hat sich die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen in der Industrie aus Kostengründen bisher nicht durchsetzen können [13]. Nach Angaben der FNR (Fachagentur für nachwachsende Rohstoffe) bewegten sich die Rohstoffpreise für Standard-Thermoplaste 2005 zwischen 900 bis 1.000 €/t (PE, PP) oder ab 1.500 €/t (PS). Für vergleichbare Biopolymere liegen die Preise mit 3.000 bis 5.000 €/t mehr als doppelt so hoch und damit sind diese nicht wirklich konkurrenzfähig[3]. Somit ist die Verwendung von Biopolymeren nur in Teilen des

1. Einleitung

Marktes ökonomisch. Dennoch ist Potential in einigen Markt Bereichen vorhanden, da Biopolymere für spezielle Anwendungen verbesserte Eigenschaften (Zugfestigkeit, Biodegradabilität) aufweisen und eine Reduktion der Abfallmenge möglich machen (Tab. 1-1).

Neben den Anwendungen in der Lebensmittelindustrie wird auch in der Medizintechnik an Makromolekülen aus nachwachsenden Rohstoffen geforscht. Die Anforderungen an die Kunststoffe unterscheiden sich allerdings sehr von denen in anderen Einsatzgebieten. Da eine hohe Qualität die Grundvoraussetzung für eine medizinische Applikation ist, können höhere Herstellungskosten akzeptiert werden. Beispiele hierfür sind das fermentativ hergestellte PHB (**P**oly**h**ydroxy**b**uttersäure), PLA (Polymilchsäure= **P**oly(**l**actic **a**cid)) und die Stärkepolymere. Diese werden für Verschlauchungen an medizinischen Geräten, in Braunülen und Kathetern genutzt. Darüber hinaus finden sie Anwendung als Beschichtungsmaterial für Implantate und als Kapselmateriale für Medikamente.

Das PHB, mit ähnlichen Produkteigenschaften wie Polyolefine, wird in den kommenden Jahren weitere Anwendungen finden [12, 18]. Bereits heute kann der transparente Kunststoff mit einer Ausbeute von 95 % durch Bakterien aus nachwachsenden Rohstoffen hergestellt werden. Ebenfalls ist PLA, fermentativ aus Mais gewonnen, im technischen Maßstab zugänglich. Beide Materialien werden in der Verpackungs- und Einweggeschirrsparte verwendet, um ihre petrochemischen Vertreter zu ersetzen.

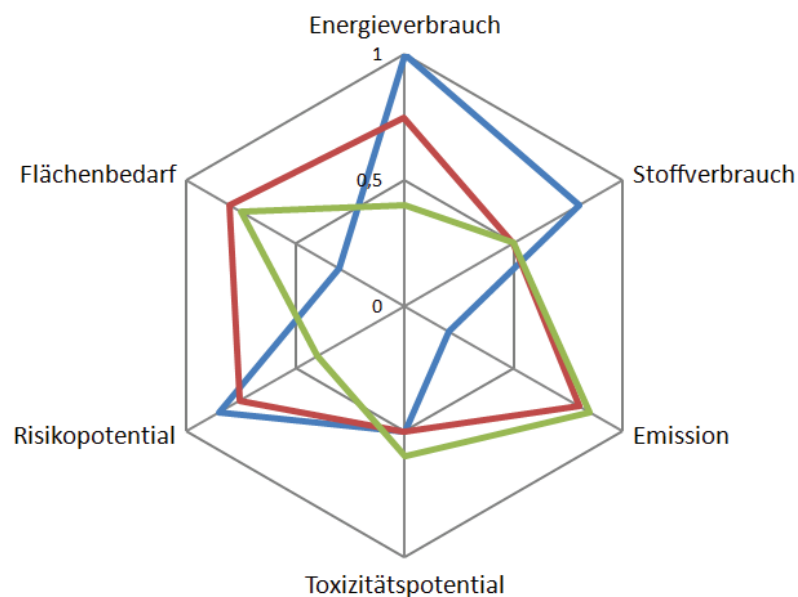


Abb. 1-3: Prinzip der Ökoeffizienzanalyse

Biopolymere sind folglich ein zukunftssträchtiges Forschungsgebiet mit zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten der Produkte. Da die Reserven an fossilen Rohstoffen begrenzt sind, ist für die Zukunft eine Steigerung des Marktanteils der Biopolymere zu erwarten. Führende Chemieunternehmen, wie BASF (Deutschland), DOW Chemical (USA) oder Mitsui Toatsu Chemicals (Japan) haben bereits ihre Produktpalette um Biopolymere erweitert und konzentrieren einen Teil ihrer Forschung und Entwicklung auf die Erweiterung dieses Feldes. Unter

1. Einleitung

Berücksichtigung der Tatsache, dass nicht jeder ökologische Prozess marktfähig ist, werden Ökoeffizienzanalysen zur Bewertung genutzt (Abb. 1-3). Hierbei ist der neue Prozess hinsichtlich seiner Gesamtkosten und der ökologischen Belastung in seiner Gänze zu bewerten und mit anderen Verfahren zu vergleichen[19].

In der vorliegenden Arbeit steht die Synthese eines neuartigen Biopolymers im Vordergrund. Ausgehend von den Ausgangsstoffen Citronensäure und Glucose soll mittels Biokatalyse ein Polyester aufgebaut werden. Da die Produkteigenschaften schwer abzuschätzen sind, können erst im Nachhinein wirkliche Anwendungsgebiete benannt werden. Als besonders vielversprechend wird der Einsatz des Produktes aber in der Medizintechnik gesehen. Der Einsatz biokompatibler Polymere als Beschichtungsmaterial von Implantaten, um Abstoßungsreaktionen zu minimieren, wird bereits untersucht [18].

2. Zielsetzung

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Herstellung eines neuartigen biokompatiblen Polymers auf der Basis biokompatibler Rohstoffe. Hierzu wird ein neues Reaktionssystem für die Polykondensation etabliert. Um die Grenzen und Limitierungen der Reaktion besser bewerten zu können, sollen die Abläufe der enzym-katalysierten Polykondensation im binären System beobachtet und analysiert werden. Hierfür werden sowohl kinetische wie auch thermodynamische Parameter herangezogen.

Die Herstellung des Polyesters erfolgt via Polykondensation von Disäure und Diol. Ein tieferes Verständnis der ablaufenden enzym-katalysierten Reaktion ist sinnvoll, um sie hinsichtlich Ausbeute, mittlerer Molekülmasse und Polydispersität beeinflussen zu können. Ein zentraler Punkt der Arbeit sind die hydrophilen Monomere. Aufgrund der Gleichgewichtslage von Veresterungsreaktionen im Allgemeinen und Polykondensationen im Besonderen, welche in Abbildung 2-1 angedeutet ist, sind die Gleichgewichtsumsätze meist gering. Üblicherweise erfolgt die Gleichgewichtsverschiebung zu höheren Produktausbeuten mittels der Synthese in reinen organischen Lösungsmitteln mit *in situ* Wasserentfernung, sprich durch Entfernung eines Reaktionsproduktes.

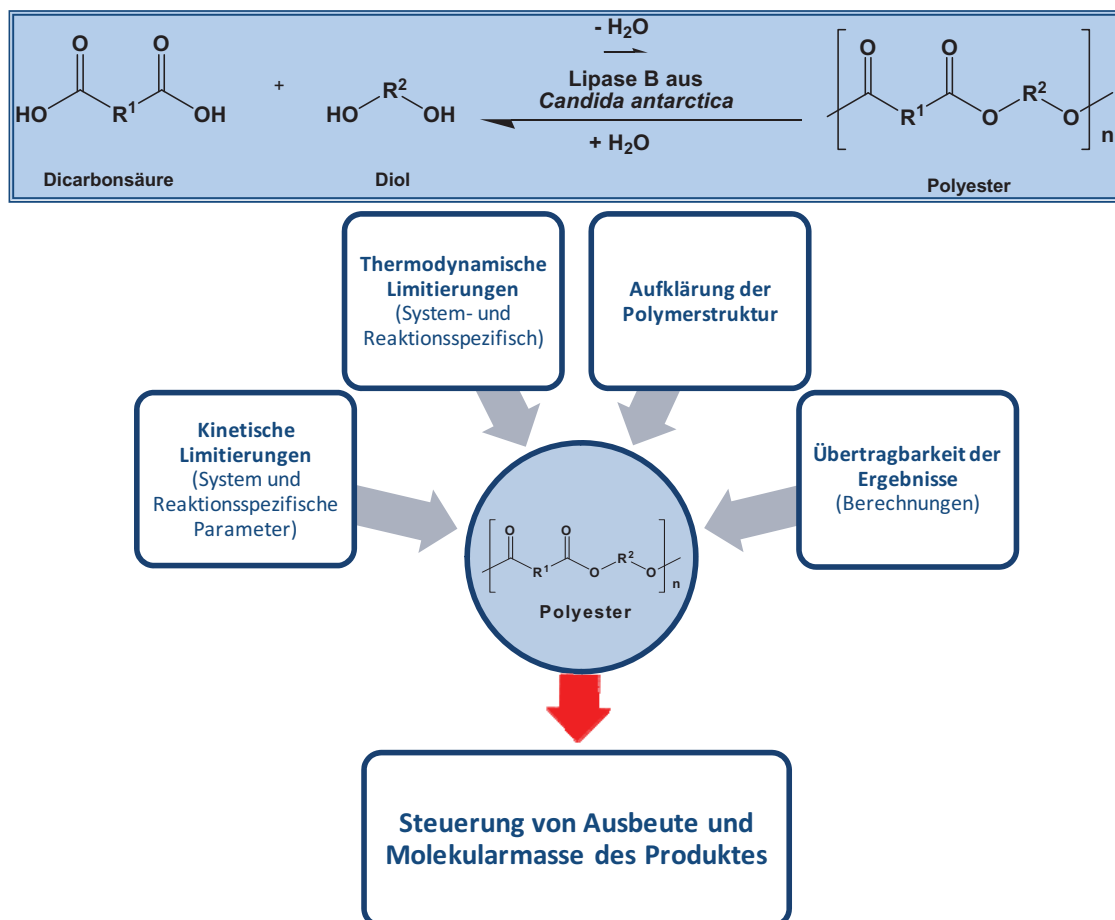


Abb. 2-1: Einflussgrößen auf die lipasen-katalysierte Veresterung

2. Zielsetzung

Modellhaft wurden Glucose und Citronensäure als hydrophile Monomere gewählt, da sie erstens aus nachwachsenden Rohstoffen zu gewinnen sind und zweites repräsentativ für eine Klasse von hydrophilen Ausgangsstoffen stehen. Wie bereits angedeutet, wird die Polykondensation unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt. Bei der Verwendung von hydrophilen Substanzen aus Monomeren erscheint die Vorgehensweise nicht sinnvoll. Die Monomerkonzentration in der Umgebung des Enzyms wäre gering, was zu einer Limitierung der Reaktion durch den Lösungsprozess der Monomere führen würde. Durch die Verwendung eines binären Reaktionssystems sollen derartige Limitierungen minimiert und somit die direkte Polykondensation von hydrophilen Monomeren ermöglicht werden. Da ein derartiger Ansatz neu auf dem Gebiet der Polykondensation ist, ist der Mechanismus noch nicht untersucht und muss ermittelt werden.

Das verwendete binäre System besteht aus einer wässrigen Reaktions- und einer organischen Extraktionsphase. In der Reaktionsphase befinden sich das Enzym, die Lipase B aus *Candida antarctica* sowie die beiden hydrophilen Monomere Glucose und Citronensäure. Da die CaLB keine Grenzflächenaktivierung besitzt, findet die Reaktion in der Wasserphase statt. Die organische Phase dient dabei zur kontinuierlichen Extraktion des Polyesters aus der Reaktionsphase. Hiermit soll die Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes zugunsten hoher Produktausbeuten erreicht werden. Im Verlauf der Arbeit sollen verschiedene Parameter untersucht werden, die die Veresterung beeinflussen. Hierbei ist zum einen zu unterscheiden, ob die Parameter auf die Verteilung der Komponenten zwischen den Phasen wirken (systemspezifisch) oder auf die Geschwindigkeit der Reaktion bzw. die Aktivität des Biokatalysators (reaktionsspezifisch). Des Weiteren zeigen sich unterschiedliche Effekte je nachdem, ob der kinetische oder der thermodynamische Bereich der Reaktion betrachtet wird.

Im Anfangsbereich der Reaktion (**Kinetik**) spielt die Verteilung der Stoffe zwischen den Phasen noch eine untergeordnete Rolle, da Inhibierungen erst bei hohen Stoffkonzentrationen auftreten (Substrat-/Produktinhibierung) und Massentransferlimitierungen erst im Verlauf sichtbar werden (Substrat-/Produkttransferate).

Für die Erreichung des **thermodynamischen** Gleichgewichtes ist die Verteilung aber von entscheidender Bedeutung, da sie den Umsatz und auch die Molekülmasse des Polyesters bestimmt. Es muss an dieser Stelle klar differenziert werden zwischen dem Gleichgewicht der Reaktion und der Gleichgewichtslage, welche sich im binären System einstellen wird.

Die Verteilung der Komponenten kann Aufschluss darüber geben, ob eine Reaktion effektiv im binären System durchzuführen ist. Durch sie lassen sich die Effektivität der Gleichgewichtsverschiebung, sprich die Effektivität der Extraktion, sowie die Stärke von Inhibierungen durch hohe Monomerkonzentrationen abschätzen. Diese Verteilungskoeffizienten der Reaktanden lassen sich experimentell ermitteln und mit den durch das quantenchemische Berechnungsmodell **COSMO-RS** (Conductor-like Screening Modell for Real Solvents) berechneten vergleichen. Die zuverlässige Berechnung würde die Abschätzung der Reaktionsbedingungen vereinfachen und somit die Reduktion von Vorversuchen und Optimierungsschritten ermöglichen.

3. Theoretische Grundlagen

3.1 Polymerisationen

Das Wort Polymer stammt aus dem Altgriechischen und setzt sich aus den Wörtern *poly* für *viel* und *meros* für *Teil* zusammen. Polymere sind folglich Makromoleküle, die sich aus vielen, meist gleichen Teilen, den Monomeren, zusammensetzen[1, 20].

Laut dem Chemikaliengesetzes (REACH-Verordnung Artikel 3, Nr. 5, Stand 18.12.2006) sind Polymere wie folgt definiert [21]:

Stoff, der aus Molekülen besteht, die durch eine Kette einer oder mehrerer Arten von Monomereinheiten gekennzeichnet sind. Die Moleküle müssen innerhalb eines bestimmten Molekulargewichtsbereiches liegen, wobei die Unterschiede beim Molekulargewicht im Wesentlichen auf die Unterschiede in der Zahl der Monomereinheiten zurückzuführen sind.

Ein Polymer enthält Folgendes:

- a) eine einfache Gewichtsmehrheit von Molekülen mit mindestens drei monomeren Untereinheiten, die zumindest mit einer weiteren Monomereinheit bzw. einem sogenannten Reaktanten eine kovalente Bindung eingegangen sind;
- b) weniger als eine einfache Gewichtsmehrheit von Molekülen mit demselben Molekulargewicht.

Hieraus folgt, dass das Wort Polymer kein definiertes Molekül bezeichnet und somit auch keine eindeutige Struktur beschreibt. Polymere bezeichnen vielmehr eine Substanz diffuser Struktur. Im Vordergrund stehen die makroskopischen Substanzeigenschaften, welche häufig durch Wechselwirkungen von Makromolekülen entstehen (z.B. ist Polystyrol amorph und transparent)[1].

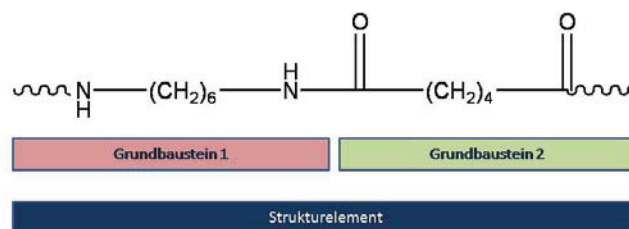


Abb. 3-1: Polyamid aus Hexamethylendiamin und Adipinsäure (Nylon 6,6)

Die kleinste Struktureinheit von Polymermolekülen ist das Strukturelement, auch **Repeating Unit (RU)** genannt. Es ist die kleinste wiederkehrende Einheit und aus ihr können Rückschlüsse auf die meist niedermolekularen Grundbausteine gezogen werden, anhand welcher sie unterschieden werden können. Besteht das Strukturelement nur aus **einem Grundbaustein**, so handelt es sich um ein Homo- oder Unipolymer (eine Monomersorte), wie z.B. das Polystyrol aus Styrol. Häufig findet man aber Copolymere, welche sich aus 2 oder mehr Grundbausteinen

3. Theoretische Grundlagen

zusammensetzen, wie im Falle des Nylon 6,6 aus Hexamethyldiamin und Adipinsäure (Abb. 3-1)[20, 22].

Wichtige Größen in der Polymerchemie sind die mittleren Molekülmassen bzw. Molekulargewichte. Man unterscheidet das Gewichtsmittel M_w , das Zahlenmittel M_n , das Zentrifugenmittel M_z und das Viskositätsmittel M_η (Abb. 3-2; Gl. 3-1 bis 3-4). Die wichtigsten der genannten Größen sind M_w und M_n und ihr Quotient stellt ein Maß für die Polydispersität dar. Der Polydispersitätsindex PDI oder Q bezeichnet den Bereich der Molekulargewichtsverteilung (Gl. 3-5). Angestrebt wird meist ein Polydispersitätsindex nahe 1, was einer schmalen Verteilung und damit einer definierteren Kettenlänge entspricht[1, 20].

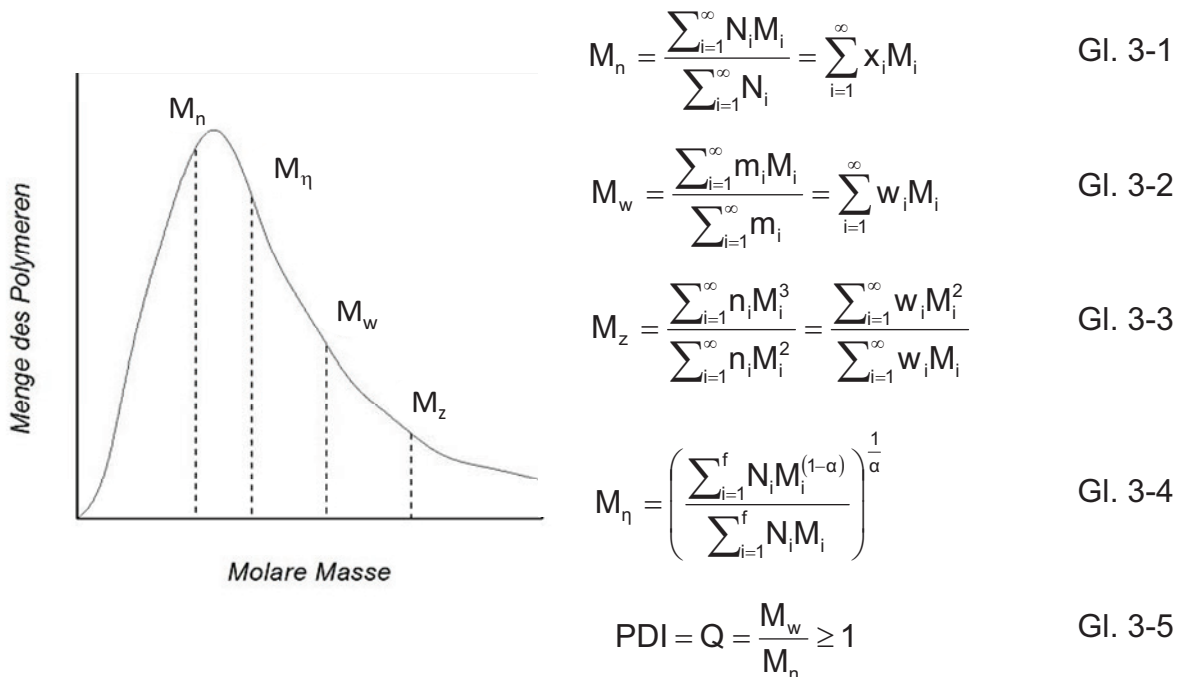


Abb. 3-2: Mittlere Molekülmassenverteilung und ihre Berechnung

Die geschichtliche Entwicklung der Nutzung von Kunststoffen durch den Menschen hat ihren Beginn vor Jahrhunderten. Einige polymere Naturstoffe wurden schon im Altertum eingesetzt, ohne dass deren chemischer Grundaufbau bekannt war, z.B. der natürlich vorkommende Asphalt. Charles Nelson Goodyear entwickelte 1851 eine Möglichkeit aus dem Milchsäure des Kautschukbaumes durch Zusatz von Schwefel Gummi herzustellen (Vulkanisation). Versuche zur Herstellung von Polyestern lassen sich bis in das Jahr 1847 zurückführen, als Berzelius aus Glycerin und Weinsäure ein harzartiges Produkt synthetisierte[23]. Erst 1930 wurde aber von Carothers in den USA die erste Polykondensation eines mehrwertigen Alkohols mit einer Dicarbonsäure durchgeführt. Im gleichen Jahr war es der IG Farben in Deutschland möglich, ein Polystyrolpolymer zu synthetisieren[20].

Weitere Meilensteine waren die Herstellung von Polyamiden (Nylon: Carothers, 1935 USA; Perlon: Schlack, 1939 D), die Entdeckung von PVC 1938 und die Entwicklung des Ziegler-Natta-Katalysators für die Niederdruck-Polyethylensynthese (1963 Nobelpreis). Im Jahre 1976 entwickelten die drei Chemiker Shirakawa, Heeger und MacDiarmid an der Universität in Pennsylvania/USA elektrisch leitfähige Polymere und erweiterten damit den Einsatzbereich der Polymere (dotiertes

3. Theoretische Grundlagen

Polyacetylen). Sie erhielten für diese Entdeckung im Jahre 2000 den Nobelpreis für Chemie[24]. Heute findet diese Entwicklung Anwendung in Batterien und Akkumulatoren (Lithium-Polymer-Akkus).

Seit Beginn der 80er-Jahre gab es ein zunehmendes Umweltbewusstsein. Die wachsende Abfallmenge führte dazu, dass sich die Hersteller auf umweltverträgliche und biologisch abbaubare Polymere konzentrierten. Die BASF entwickelte beispielsweise in den 90er-Jahren das biologisch abbaubare Ecoflex®, welches 2001 zur ersten bioabbaubaren Lebensmittelfolie verarbeitet wurde. Dieser durch Bakterien und Pilze vollständig zersetzbare Polyester wird zwar auf der Basis fossiler Rohstoffe hergestellt, ermöglicht aber trotzdem einen nachhaltigen Einsatz des Polymers[10].

Dennoch basieren auch heute viele Polymere auf fossilen Ausgangsstoffen, da bei der Produktion von Biopolymer noch immer die Rohstoffkosten nicht mit dem Ölpreis konkurrieren können [11, 25]. Auch ist zu berücksichtigen, dass eine Konkurrenz zwischen der Nutzung als Rohstoff und der Nutzung als Nahrungsmittel in einigen Bereichen der Biopolymere Berücksichtigung finden muss.

Nichtsdestotrotz wird in der Zukunft die Entwicklung von Biopolymeren eine wichtige Rolle spielen, da langfristig Alternativen zu fossilen Kunststoffen gefunden werden müssen[12, 13, 16].

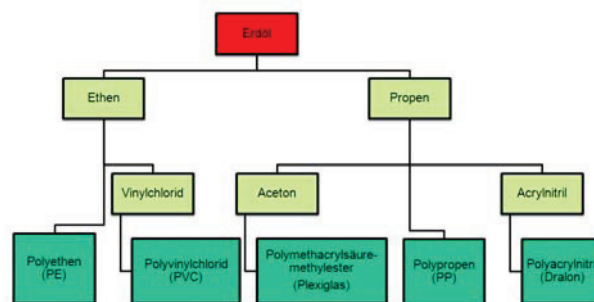


Abb. 3-3: Kunststoffe aus Erdöl (Beispiel)

Aufgrund der Struktur von Polymeren ist es schwierig, sie zu klassifizieren. Es gibt verschiedene Arten, Polymere zu bezeichnen. Eine Möglichkeit ist die strukturbasierende Klassifizierung. Wie aus dem Namen bereits hervorgeht, berücksichtigt man bei dieser Einteilung den Aufbau des Polymerstranges [2, 8, 22, 26].

Es werden unterschieden:

- **monodisperse Polymere**, welche nur aus einem Monomer bestehen
- **polydisperse Polymere**, welche aus mehreren Monomeren aufgebaut sind

Alternativ ist auch die folgende Einteilung möglich:

- **regelmäßige Polymere**. Poly(Milchsäure) ist ein Beispiel für ein regelmäßiges Polymer, da es immer gleich verknüpft ist, egal ob es durch ringöffnende Polymerisation von Lactid oder durch Polykondensation der Milchsäure hergestellt wird.
- **unregelmäßige Polymere**, sind nicht immer gleich verknüpft

3. Theoretische Grundlagen

Im Fall der Struktureinheit $-\text{CH}_2\text{-CHR}-$ gibt es unterschiedliche Arten der Anbindung die als **Kopf-Kopf-, Kopf-Schwanz- oder Schwanz-Schwanz-Kopplung** bezeichnet werden.

Darüber hinaus können Polymere auch prozessbasierend eingeteilt werden. Homopolymere sind hier Polymere, die nur aus einem Monomer aufgebaut sind, wobei keine Aussage über die Struktur (regelmäßig/ unregelmäßig) getroffen wird. Im Gegensatz dazu sind Copolymere aus mehr als einem Monomer aufgebaut. Einige Autoren, wie Elias, knüpfen diese Einstufung als Copolymer strikt an Additionsreaktionen. Laut Elias zählt ein Polymer aus Ethen und Propen zu den Copolymeren, wohingegen das Nylon 6,6 den Homopolymeren zugeordnet wird, da es ein Kondensationsprodukt ist[22]. Diese Definition ist in vielen Fällen irreführend. Ein Copolymer ist folglich ein Polymer, welches sich aus mehr als einer Spezies von Monomeren ableitet und ist damit nicht strikt auf Additionen beschränkt. Somit zählen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit synthetisierten Polymere via Polykondensation zu den Copolymeren. Aufgrund der Vielfältigkeit von Polymerstrukturen ist eine Einteilung nicht immer einfach, wie an den verschiedenen oben diskutierten Möglichkeiten gezeigt wurde[20, 26]. Der Übergang zwischen den Klassifizierungen ist oft fließend und eine Einteilung nicht immer zwingend notwendig.

Von größerer Wichtigkeit ist der Polymerisationsmechanismus, da durch ihn die Eigenschaften, Kettenlängen wie auch die Polydispersität beeinflusst und gesteuert werden können. Abschließend sollen die verschiedenen Arten des Polymerisationsmechanismus näher erläutert werden. Die generelle Einteilung von Polymerisationsreaktionen erfolgt in die folgenden Kategorien[2]:

- Ionische Polymerisation
 - Anionische Polymerisation
 - Kationische Polymerisation
- Radikalische Polymerisation
- Koordinationspolymerisation
- Polykondensation und -addition

Bei dieser Mechanismuskonversation ist anzumerken, dass die Ionische, Radikalische und Koordinationspolymerisation nach einem Kettenwachstums-Mechanismus ablaufen. Dies bedeutet, dass nur die aktivierte Seite des Polymers mit einem Monomer reagieren kann. Hierbei wird die Reaktivität auf die neue Endgruppe übertragen (Abb. 3-4 A). Anders verläuft der Mechanismus der Polykondensation und -addition, denn in diesem Fall kommt es zu einer chemischen Reaktion zwischen den Endgruppen. Dieser als Stufenwachstum bezeichnete Mechanismus benötigt bifunktionelle Monomere. Der Vorteil hierbei ist, dass nicht nur Monomere reagieren, sondern auch Di-, Tri- und Oligomere zum Kettenwachstum beitragen können.

Die **ionische Polymerisation** zeichnet sich durch einen Elektronentransfer von einem geladenen (negativ oder positiv geladenes Ion) Initiator auf ein Monomer aus. Das nun geladene Monomer bildet mit dem Gegenion des Initiators ein Ionenpaar, welches mit anderen Monomeren weiterreagieren kann. So kommt es zum Kettenwachstum. Der Kettenabbruch wird im Falle der anionischen Polymerisation

3. Theoretische Grundlagen

mit Hilfe eines austauschbaren Protons, wie z.B. in Wasser, erreicht. Dieses Proton gleicht dann die negative Ladung des Kettenendes aus und beendet den Polymerisationsprozess. Bei der kationischen Polymerisation, welche durch Protonenübertragung auf das Monomer gestartet wird, erfolgt der Abbruch mittels Rücktransfer auf den Initiator. Für die ionische Polymerisation ist ein Kettenabbruch nicht zwingend erforderlich. Im Falle eines „Lebenden Polymers“ verbleiben die aktivierten Endgruppen am Ende der Kette und ein erneutes Wachstum durch Zudosierung von Monomer ist möglich. Dies eröffnet die Möglichkeit durch den Zusatz unterschiedlicher Monomere die Eigenschaften des Polymers zu beeinflussen (Blockpolymer).

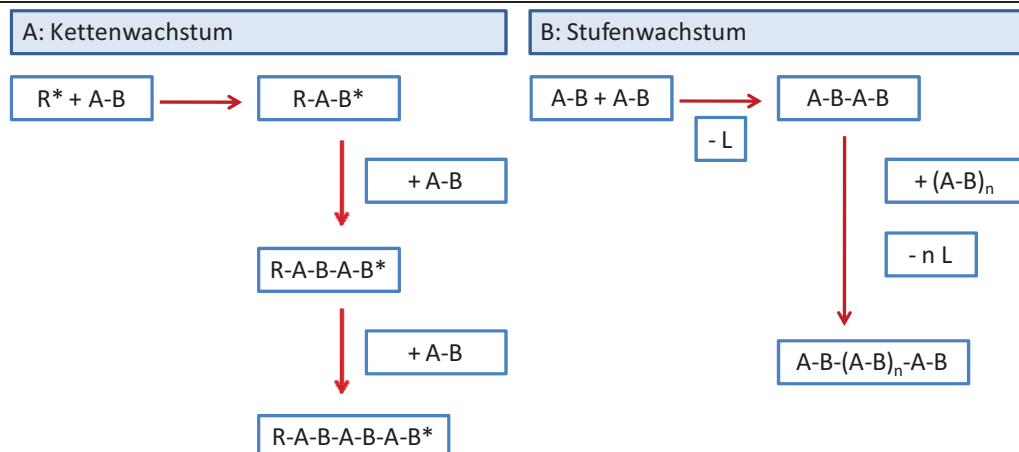


Abb. 3-4: Prinzip des Polymerisationsmechanismus: Kettenwachstum (A) und Stufenwachstum (B) (R^* - Initiator, $A-B$ - Monomer, L - Leaving group)

Radikalische Polymerisationen sind in der Regel schwer zu kontrollieren, was in ihrem radikalischen Mechanismus begründet ist [27]. Generell sind alle Monomere für diese Art der Polymerisation geeignet, die Radikale von einem Initiator übernehmen können. Als Initiator (Radikalüberträger auf das Monomer) können organische Peroxide, Azoverbindungen oder auch reiner Sauerstoff verwendet werden. Das Kettenwachstum erfolgt, nach der Aktivierung des Monomers, durch Reaktion zwischen dem aktivierten Monomer und einem weiteren Monomer unter Bildung eines aktivierten Dimers. Der Kettenabbruch wird entweder durch die Formierung einer Bindung durch Kombination zweier ungepaarter Elektronen realisiert oder aber durch Disproportionierung. Ein besonderer Fall der radikalischen Polymerisation ist die thermische Polymerisation, welche an dieser Stelle nur als Spezialfall erwähnt sei.

Katalytische Verfahren zur Herstellung von Polymeren werden häufig als **Koordinationspolymerisation** bezeichnet, da das Monomer an den Katalysator koordiniert wird [28, 29]. Diese Koordination und die Ausbildung eines Übergangszustandes ermöglichen die Formierung der Polymerkette. Die wichtigsten Familien von Koordinationskatalysatoren, welche in der Polymerisation zum Einsatz kommen sind die Ziegler-Natta- und die Metallocenkatalysatoren. Sie ermöglichen, je nach Wahl der Liganden, eine Steuerung des Polymeraufbaus.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der **Polykondensation und -addition** um ein Stufenwachstum, für welches bifunktionelle Monomere benötigt werden [7, 9, 26]. Dies und das Fehlen eines Initiators sind die grundlegenden Unterschiede

3. Theoretische Grundlagen

zwischen Ketten- und Stufenwachstum. Das Reaktionsprinzip, welches in Abbildung 3-4 angedeutet ist, lässt den Ablauf der Reaktion erkennen. Die meisten durch Kondensation produzierten Polymere schleusen bei ihrer Entstehung niedermolekulare Verbindungen aus, wie Wasser oder Ethanol. Werden diese Stoffe kontinuierlich aus dem Reaktionsgemisch entfernt, können höhere Kettenlängen erzielt werden. Eine Abbruchsreaktion lässt sich bei dieser Art der Polymerisation nicht definieren, da die Reaktion durch thermodynamische Limitierungen nach dem Prinzip von Le Chatelier zum Erliegen kommt. Weitere Ausführungen zum Thema der Polykondensation werden im Kapitel 3.1.2 anhand der Polyestersynthese erläutert.

3.1.1 Enzymatische Polymerisation

In den vergangenen Jahren ist das Interesse an enzym-katalysierten Polymerisationen stark angewachsen. In speziellen Bereichen der Polymerchemie ergeben sich bei der Verwendung von Enzymen neue Möglichkeiten. Ein besonderes Interesse besteht bei der Herstellung von neuartigen Polymeren, um erdölbasierte Polymere zu ersetzen und/oder neue Märkte zu erschließen[30].

Kobayashi und Uyama geben Beispiele für die Verwendung von Enzymen verschiedener Enzymklassen, die für die Synthese von Polymeren herangezogen werden können [31]. Neben Peroxidase und Laccasen (E.C. 1), welche die Bildung von Polymeren nach einem radikalischen Mechanismus katalysieren[32, 33], werden besonders Lipasen und Esterasen aus der Gruppe der Hydrolasen (EC 3) in der Polymersynthese eingesetzt[34]. Diese beiden bieten verschiedene Vorteile gegenüber anderen Enzymen, welche sie nicht nur für die Polymerchemie interessant machen, sondern generell ihren Einsatz in der organischen Synthese ermöglichen (Kap. 3.2.2).

Tab. 3-1: Angemessene Wasseraktivitäten für verschiedene Enzyme[35]

Enzym	a_w (Enzym 10% seiner max. Aktivität)
Glycosidase	0,5-0,8
Protease	0,5-0,6
Oxidoreduktase	0,15-0,7
Lipase	0,0-0,2

Da Lipasen nicht nur eine große Bandbreite an Reaktionen katalysieren, sondern meist trotz eines weiten Substratspektrums hoch selektiv sind, finden sie vielseitig Anwendung. Sie sind darüber hinaus toleranter als andere Enzyme, wie z.B. Oxidoreduktasen, gegenüber organischen Lösungsmitteln und auch bei Wasseraktivitäten um 0,1 noch aktiv, was die Katalyse in reinen organischen Lösungsmitteln ermöglicht (Tab. 3-1, vergl. Kapitel 3.2)[36-42]. Abgesehen von den bereits angeführten Vorteilen von Lipasen, ist die kommerzielle Verfügbarkeit größerer Mengen ein wichtiger Punkt, der die Lipasen zu einem interessanten Enzym für die Industrie macht [43, 44].

3. Theoretische Grundlagen

Weitere Beispiele für den Einsatz verschiedener Enzyme in der Polymersynthese wurden von Gübitz und Paulo zusammengefasst (Abb. 3-5)[45]. Einige interessante Beispiele dieser Arbeit werden im Folgenden näher diskutiert.

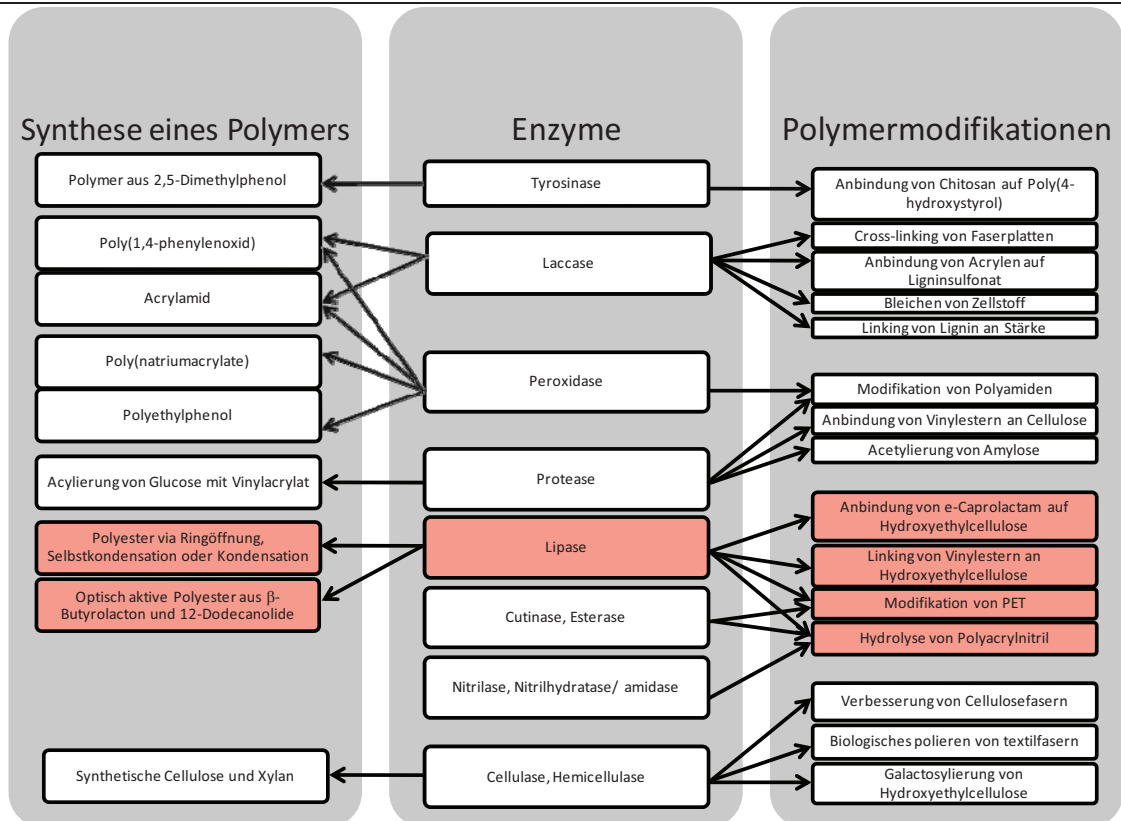


Abb. 3-5: Enzymatische Polymerisationen und Polymermodifikationen nach Gübitz und Paulo (2003)[45]

Phenolische und Acrylische Polymere

Die Produktion von aromatischen Polymeren mittels Peroxidasen oder Laccasen unterliegt, wie angedeutet, einem radikalischen Mechanismus[46-48]. Hieraus folgt, dass die Kontrolle der Regioselektivität solcher Kupplungsreaktionen häufig schwierig ist, da sich radikalische Intermediate bilden, welche im Verlauf der Polymerisation nicht selektiv weiterreagieren[32, 33, 49]. Nichtsdestotrotz stellt die enzym-katalysierte Variante der Polyphenolherstellung eine Alternative dar. Da auf das toxische Formaldehyd, welches bei der chemischen Synthese verwendet wird, verzichtet werden kann, sind die einzuhaltenden Arbeitsschutzvorschriften für den enzymatischen Prozess einfacher zu erfüllen und damit ist dieses Verfahren preiswerter. Besonders häufig ist die Anwendung von Peroxidasen und Wasserstoffperoxid bei derartigen oxidativen Kupplungen [32, 50]. Xu et al. berichteten über die in situ Polymerisation von oberflächengebundener Kaffeesäure mittels Peroxidasen und Laccasen[51]. Ebenso kann die oxidative Polymerisation von beispielsweise 4-Chloroguaiacol durch Laccasen erzielt werden, wobei die Geschwindigkeit der Reaktion von der Substratkonzentration und wesentlich vom pH abhängt[52].

Ligninmodifikationen durch die Copolymerisation von ABTS (2,2'-Aza-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) mit den Lignin-Modellkomponenten 2-Methoxyphenol (Guaiacol) und 1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-

3. Theoretische Grundlagen

propan-1,3-diol (Erol) können durch die katalytische Umsetzung mittels einer Laccase hergestellt werden[45].

Modifikation von Polymeren

Neben der Synthese von Polymeren mittels Biokatalyse ist auch die enzymatische Modifikation von Polymeren von Interesse. Zum Beispiel konnte Tyrosinase genutzt werden, um nukleophile Substanzen auf der Oberfläche von Poly(hydroxystyrol) in einer Mischung aus Wasser und Methanol zu immobilisieren. Ebenfalls können Laccasen unter Verwendung eines Mediators die Hydrophilie einer polymeren Oberfläche erhöhen und diese so für besondere Anwendungen geeignet machen[52, 53]. Polysaccharide, wie Amylose, wiesen aufgrund ihrer hohen Bioabbaubarkeit und ihrer hohen Biokompatibilität ein besonderes Potential auf. Die Protease aus *Bacillus subtilis* kann zur Amylosemodifikation verwendet werden, da sie die regioselektive Acylierung katalysiert. Hierdurch können die Eigenschaften der Kunststoffe entscheidend beeinflusst werden. Die Modifikation von Stärke mit Lignin, welches mittels Laccase an die Stärke gekoppelt wird, führt zu einer Reduktion der Viskosität auf weniger als 10 % verglichen mit der nativen Stärke, was die Verarbeitung der resultierenden Mischung erleichtert.

Weitere Modifikationen von natürlichen Polymeren, wie z.B. Cellulose, Lignin und Stärke, wie auch von synthetischen Polymeren, wie PET (Poly(ethylenterephthalat)) oder Polyamiden, sind in der Literatur beschrieben. Sie dienen meist dazu, die Materialeigenschaften des Polymers zu beeinflussen und/oder funktionelle Gruppen zur Anbindung von Stoffen zu konstruieren.

3.1.2 Polyestersynthese

Polyester sind Polymere, die in der Repeating Unit ihrer Hauptkette eine Esterbindung tragen. In diesem Kapitel sollen vor allem die Besonderheiten linearer Homo- und Copolyester näher betrachtet werden. Bei ersteren handelt es sich um den AB-Typ des Produktes, da das Monomer, z.B. eine Hydroxycarbonsäure, zwei unterschiedliche funktionelle Gruppen trägt, welche zu einer intermolekularen Reaktion befähigt sind. Ebenfalls kommen zyklische Monomere zum Einsatz, welche durch Ringöffnung das Homopolymer bilden (Abb. 3-6). Poly(α -hydroxyessigsäure), als ein solches Homopolymer, findet in der Medizin Anwendung als resorbierbare chirurgische Nähfäden und wird hergestellt mittels anionischer ring-öffnender Polymerisation des zyklischen Dimers der α -Hydroxyessigsäure[54]. Folglich liegt in diesem Fall eine Selbstkondensation vor. Ähnliches gilt für die Selbstkondensation von 3-Hydroxybuttersäure, wobei hier nicht zwingend das zyklische Butyrolacton als Monomer dienen muss (Abb. 3-6)[25, 55-57].

Copolymere auf der anderen Seite entstehen bei der Reaktion zweier unterschiedlicher Monomere, wie es bei der Polykondensation von Dicarbonsäure und Diol der Fall ist. Das entstehende Produkt wird dann als AABB-Typ bezeichnet (Abb. 3-6). Hierbei sind prinzipiell sowohl aliphatische wie auch aromatische Dicarbonsäuren einsetzbar. Bei der Verwendung aliphatischer Disäuren, wie Adipin- oder Sebacinsäure mit einem Überschuss an Diolen, entstehen flüssige bzw. leicht schmelzbare Polyester mit mittleren Molekulargewichten von 1000 bis 4000 g/mol. Typischerweise erfolgt die Herstellung bei 180°C, wobei das entstehende Reaktionswasser zusammen mit organischen Lösungsmitteln als Wasserschleppern

3. Theoretische Grundlagen

(Toluol, Xylol) azeotrop entfernt wird. Die Verwendung von aromatischen Disäuren führt zu festen Granulaten. Poly(ethylterephthalt) schmilzt beispielsweise erst bei 255°C und wird aufgrund seiner Transparenz zur Herstellung von Getränkeflaschen eingesetzt.

Da Veresterungen und besonders Polykondensationen thermodynamisch limitiert sind (Prinzip von Le Chatelier), ist für eine effektive Kondensation mit hohen Produktausbeuten und höheren Molekülmassen eine Gleichgewichtsverschiebung erforderlich.

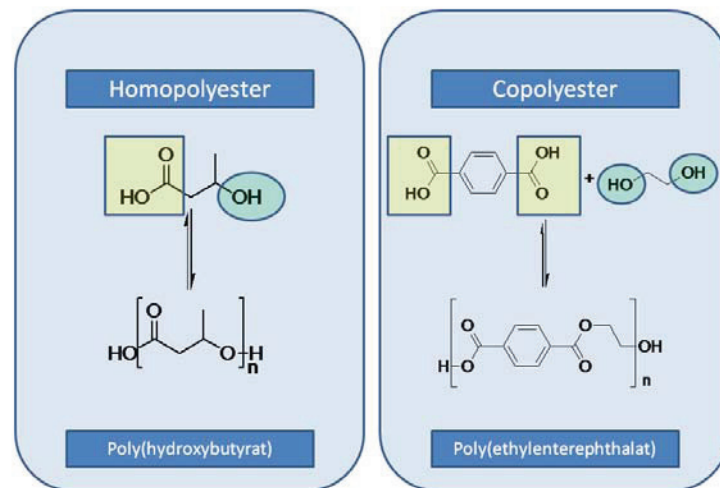


Abb. 3-6: Beispiel für Homo- und Copolyester (gelbes Rechteck: Säurefunktion A, grüner Kreis: Alkoholfunktion B)

Es ergeben sich folgende Möglichkeiten für das Herstellungsverfahren[23]:

- **Azeotrope Veresterung:**
Veresterung von Dicarbonsäure und Diol. Um das Gleichgewicht zu höheren Esterausbeuten zu verschieben, wird das entstehende Wasser durch azeotrope Destillation entfernt.
- **Alkoholische Umesterung:**
Das Diol wird in der Schmelze an einem Katalysator (Oberflächenkontakt) mit einem Dicarbonsäureester zur Reaktion gebracht.
- **Acylierung:**
Anstelle der Disäure wird bei dieser Methode das Säurechlorid verwendet, wobei nicht Wasser, sondern HCl ausgeschleust wird. Diese Reaktion kann in einem Lösungsmittel oder in der Schmelze durchgeführt werden, wobei der Wassergehalt möglichst gering sein sollte, da Säurechloride in Wasser zur Zersetzung neigen. (Besonderheit: Statt des Alkohols kann auch der Trimethylsilylether mit dem Säurechlorid zur Reaktion gebracht werden. Es resultiert statt der HCl das Trimethylsilylchlorid.)
- **Acetatmethode:**
Die nur für phenolische Hydroxygruppen geeignete Methode beruht auf der Reaktion der freien Säure mit der Alkoholkomponente, welche bereits mit Essigsäure verestert ist. Während der Kondensation wird Essigsäure freigesetzt, welche schwierig zu entfernen ist. Es resultiert meist ein Absinken des pH-Wertes, welcher zu sauren Nebenreaktionen führen kann.

3. Theoretische Grundlagen

(Besonderheit: Wird anstelle der freien Säure der Trimethylsilylester verwendet, entsteht der Essigsäuretrimethylsilylester, welcher weniger sauer ist.)

- *Ringöffnende Polymerisation:*

Durch die katalytische Ringöffnung von Lactonen können ohne Kondensationsreaktion aliphatische Polyester unter milden Reaktionsbedingungen hergestellt werden.

Im technischen Maßstab wird häufig die alkoholische Umesterung verwendet. Auf diese Weise erfolgt die großtechnische Herstellung von Polyethylenterephthalat (PET) und Polybutylenterephthalat (PBT). Im Labormaßstab kann die Polykondensation via azeotroper Veresterung effektiv durchgeführt werden, welche unter industriellen Voraussetzungen zu kostenintensiv wäre. Durch die beschriebenen Methoden ist die Herstellung verschiedenster Polyester möglich. Neben den allgemein bekannten Polyesteranwendungen als Flaschenmaterial (PET) und Faserstoff für Textilien und Vliesstoffe, können Polyester auch als Folien und Filme verwendet werden. Darüber hinaus finden sie Anwendung als flexible Leiterplatten (Mylar, DuPont) und Isoliermaterial von elektrischen Geräten (Polyesterharze).

Bis heute wird eine Vielzahl der eingesetzten Polyester aus petrochemischen Bestandteilen aufgebaut, doch auch die nachwachsenden Rohstoffe sind von wachsendem Interesse. Die Industrie sucht nach Alternativen zu den bisher bekannten Polyestern. Hierbei gibt es zwei generelle Richtungen in der Forschung, welche sich in ihrer Herangehensweise unterscheiden.

Zum einen werden Polyester auf Basis nachwachsender Rohstoffe gesucht, welche ähnliche Eigenschaften aufweisen wie die petrochemischen Vertreter. Eine andere Herangehensweise zielt auf die Entwicklung neuer Polyester für alternative Anwendungen und neue Märkte. Die beiden wichtigsten Vertreter der Biopolyester, welche nicht nur in der Verpackungsindustrie, sondern auch in der Medizintechnik eingesetzt werden, sind das Poly(hydroxybutyrat) (PHB) und die Poly(milchsäure) (PLA)[14-16, 58-60]. Zur Bewertung neuer Prozesse hinsichtlich ihrer Umweltverträglichkeit werden Ökobilanzen (engl.: Life cycle assessment (LCA)) angefertigt. Eine solche Ökobilanz der Firma Cargill Dow zum NatureWorks™ PLA zeigt die Verringerung der Umweltbelastung ausgehend vom kompletten Prozess über den gesamten Lebensweg, verglichen mit petrochemischen Polyestern[61].

Es ist folglich nachvollziehbar, dass nicht nur die schrumpfenden Ölreserven, sondern auch die ökologisch nachhaltige Produktion und der exponentiell steigende Polymerbedarf weltweit für das Interesse an bioabbaubaren Kunststoffen verantwortlich sind. Erste industrielle PLA-Anlagen existieren bereits in den Niederlanden, Japan und China.

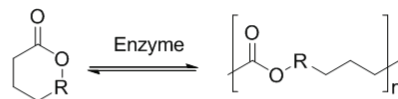
3.1.3 Enzymatische Polyestersynthese

Die Herstellung von Polyestern mittels Lipasenkatalyse ist in der Literatur bekannt und es werden 3 Reaktionstypen unterschieden, welche zum Polyester führen. Die **Ring-öffnende Polymerisation** beschreibt die Öffnung eines Lactons mit Hilfe der Lipase und das anschließende Kettenwachstum durch die Addition eines weiteren

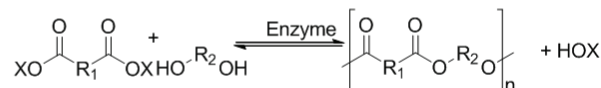
3. Theoretische Grundlagen

Lactons[62-65]. Des Weiteren sind Polyester über die **Polykondensation von Hydroxycarbonsäuren** zugänglich[66-68]. Bei dem dritten Typus handelt es sich um die **Polykondensation von Dicarbonsäurederivaten mit Dialkoholen**[69-72]. Anhand von Abbildung 3-7 ist zu erkennen, dass die entstehenden Produkte unterschiedliche Strukturen in Abhängigkeit von dem Reaktionstypus besitzen. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Monomere stellt eine besonders interessante Variante dar, denn sie eröffnet eine große Variationsbreite der herzustellenden Produkte. Durch die Größe der Monomere, ihren aliphatischen oder aromatischen Aufbau wie auch durch zusätzliche funktionelle Gruppen, welche nach der Kondensation im Polymergerüst vorhanden sind, lassen sich die Eigenschaften des Polyesters in gewünschter Weise steuern.

Ring-öffnende Polymerisation von Lactonen



Polykondensation von Dicarbonsäuren und Diolen



Polykondensation von Hydroxycarbonsäuren

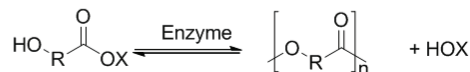


Abb. 3-7: Lipasen-katalysierte Produktion von Polyestern anhand der 3 Reaktionstypen

Die Lipasen katalysieren nicht nur die Hydrolyse von Estern, sondern auch ihre Synthese. Es handelt sich, wie in Abbildung 3-7 angedeutet, um eine Gleichgewichtsreaktion, wobei das Gleichgewicht auf Seiten der Hydrolyseprodukte liegt. In Gegenwart von Wasser ist die Hydrolyse aufgrund der Gleichgewichtskonstanten also bevorzugt, weshalb eine „Verschiebung“ der Gleichgewichtslage zu Esterseiten für eine effektive Produktion benötigt wird.

Eine derartige Gleichgewichtsverschiebung erfolgt in der Regel unter Wasserausschluss, um die Hydrolysereaktion so weit wie möglich zu unterdrücken. Wie bei der chemischen Polyestersynthese (Kap. 3.1.2) bereits beschrieben, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, die Verschiebung des Gleichgewichtes zu erreichen. Die azeotrope Destillation des produzierten Wassers, die Verwendung von Molekularsieben sowie das Arbeiten im Vakuum sind nur einige Beispiele, wie das Gleichgewicht der Veresterung zu höheren Produktausbeuten verschoben werden kann[44, 73-75]. Vorteilhaft für die Polyesterproduktion mittels Lipasenkatalyse ist die hohe Toleranz der Lipasen gegenüber nicht-konventionellen Reaktionsbedingungen, auf welche im Kapitel 3.2 genauer eingegangen wird. Es lassen sich Polyestersynthesen in reinem organischem Lösungsmittel oder auch ganz ohne Lösungsmittel (flüssiges Edukt als Lösungsmittel) durchführen. Bei der Verwendung

3. Theoretische Grundlagen

organischer Lösungsmittel als Reaktionsmedium ist meist der logP-Wert (Verteilungskoeffizient n-Oktanol/ Wasser) ein entscheidender Faktor.

Tab. 3-2: logP-Werte verschiedener Lösungsmittel (Wassermischbarkeit)

Lösungsmittel	logP [-] ¹	Mischbarkeit mit Wasser
n-Heptan	4,66	logP > 4: Keine Mischbarkeit mit Wasser (geringe Deaktivierung)
n-Hexan	4,1	
Tetrachlorkohlenstoff	3,0	2 < logP < 4: Geringe Mischbarkeit mit Wasser (Deaktivierung ist langsam)
Toluol	2,5	
Chloroform	2,0	
Triethylamin	1,6	0 < logP < 2: Partielle Mischbarkeit (Deaktivierung des Enzyms ist schneller)
Diisopropylether	1,4	
Methyl-tert-butylether	1,0	
Tetrahydrofuran	0,49	logP < 0: Vollständige Mischbarkeit mit Wasser (schnelle Deaktivierung/ Denaturierung)
Aceton	-0,23	
Ethanol	-0,24	
Wasser	-1,38	

¹Literatur logP: [76-80]

Bei der Tabelle 3-2 handelt es sich um eine Näherung, welche Lösungsmittel am ehesten für die Enzymkatalyse geeignet sind [81, 82]. Lösungsmittel mit logP < 1 werden meist als Lösungsvermittler in geringen Gehalten von wenigen Volumenprozent eingesetzt [35, 83]. Dies dient zur Erhöhung der Substratkonzentration in wässrigen Reaktionssystemen [84]. Folglich ist die Wahl eines Lösungsmittels nicht nur anhand des logP, sondern auch anhand der Aufgabe, welche es im Reaktionssystem leisten soll, zu treffen.

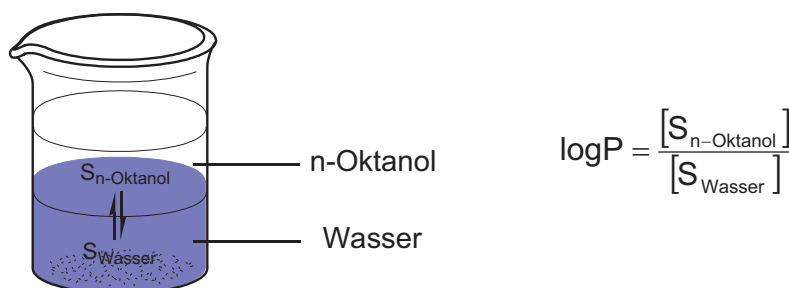


Abb. 3-8: Grundlage und Berechnung des logP-Wertes

Generell ist der logP ein Maß für die Lipophilie eines Lösungsmittels und hieraus lässt sich seine Wirkung auf das Enzym abschätzen (Abb. 3-8). In lipophilen Lösungsmitteln steht das Enzym nicht direkt mit dem organischen Solvents in Kontakt, um das eingebundene Wasser herauszulösen.

Die Polykondensation wird, wie bereits erwähnt, häufig in reinem organischen Lösungsmittel mit Wasserentfernung durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass Lipasen unter derartigen Bedingungen meist in immobilisierter Form eingesetzt

3. Theoretische Grundlagen

werden, handelt es sich streng genommen um ein binäres Reaktionssystem aus flüssiger Phase und festem Träger[85, 86].

Binäre Reaktionssysteme, bestehend aus 2 meist flüssigen Phasen, werden in der Biokatalyse ebenfalls als Reaktionssystem verwendet[87, 88]. Hierbei bilden z.B. organische Lösungsmittel, die mit Wasser nicht oder nur gering mischbar sind, definierte 2-Phasen Systeme. Sie haben den Vorteil, dass sie aufgrund ihres lipophilen Charakters schlecht wasserlösliche Substanzen lösen. Da die Lösungsmittel nur zu einem geringen Teil in die Wasserphase übergehen, wirken sie auf das Enzym weniger denaturierend als der Zusatz wassermischbarer organischer Lösungsmittel[89-91]. Im binären Reaktionssystem ist eine Immobilisierung der Lipase folglich nicht notwendig. Vielmehr ist die Verteilung der Substrate und Produkte in solchen Systemen wichtig, denn durch sie können Inhibierungen unterdrückt und Massentransferlimitierungen ermittelt werden.

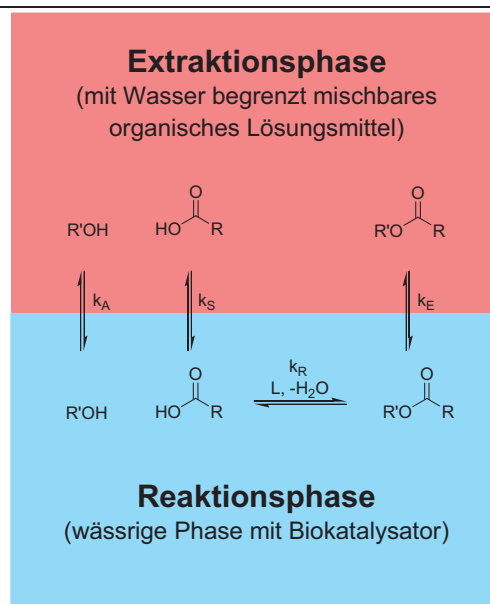


Abb. 3-9: Binäres Reaktionssystem für die lipasen-katalysierte Polykondensation (k_A -Phasengleichgewicht Alkohol, k_S -Phasengleichgewicht Säure, k_E -Phasengleichgewicht Ester, k_R -Reaktionsgleichgewicht)

Die lipasen-katalysierte Polyestersynthese kann im 2-Phasen System durchgeführt werden, was einige Vorteile gegenüber der klassischen Synthese im homogenen Reaktionssystem liefert (Abb. 3-9). Prinzipiell besteht das Reaktionssystem aus einer wässrigen Phase, der Reaktionsphase, in welcher sich das Enzym befindet. Je nach Hydrophilie der Monomere und Art des organischen Lösungsmittels liegt eine entsprechend hohe Konzentration der Monomere in der Reaktionsphase vor. Der Polyester geht in die organische Phase, die Extraktionsphase, über und somit ist es möglich, durch integrierte Produktentfernung das Gleichgewicht zu verschieben.

Diese Art der Polyestersynthese ermöglicht nicht nur die Verwendung der freien Lipase, wodurch eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden kann. Sie vereinfacht darüber hinaus die Produktisolierung durch die integrierte Produktabtrennung (IPR)[92].

3.2 Enzyme in der organischen Synthese

Enzymatische Prozesse werden auch ohne Wissen über ihren Mechanismus und ihre Struktur schon seit Jahrhunderten von der Menschheit eingesetzt. Durch die „gewachsenen“ Bezeichnungen existierte eine uneindeutige und unsystematische Namensgebung der Enzyme. 1961 setzte die **IUBMB** (International **U**ion of **B**iochemistry and **M**olecular **B**iology), auch bekannt als **IUB** (International **U**ion of **B**iochemistry), diesem ein Ende und erarbeitete eine einheitliche Nomenklatur. Die Union klassifizierte alle bekannten Enzyme mit EC-Nummern (**E**nzyme **C**ommission) und ermöglichte so eine eindeutige Einstufung. Die Einteilung erfolgt über den Reaktionstypus, welchen die Enzyme katalysieren [93, 94]. Hieraus ergeben sich die 6 Hauptklassen der Enzyme, welche in der Abbildung 3-10 skizziert sind.

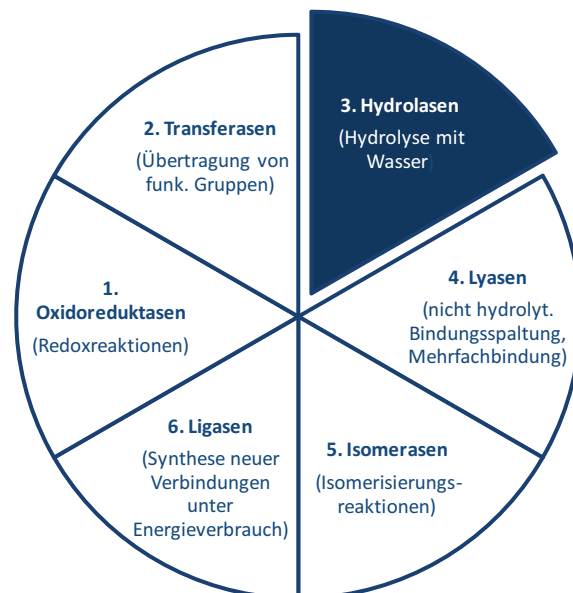


Abb. 3-10: Schematische Darstellung der 6 Enzymklassen nach IUBMB

Außer der Einteilung in die 6 Hauptklassen müssen noch detaillierte Klassifizierungen erfolgen, um ein Enzym genau charakterisieren zu können.

In der modernen organischen Synthese finden zahlreiche Enzyme Anwendung. Oft können Reaktionen durch sie effizienter gestaltet werden oder der katalysierte Reaktionsschritt wird durch den Biokatalysator erst ermöglicht. Tabelle 3-3 zeigt einige Anwendungsbeispiele, die den Nutzen von enzymkatalysierten Reaktionen im industriellen Maßstab zum Ausdruck bringen sollen. Die Synthesen werden von Enzymen aus unterschiedlichen E.C.-Klassen katalysiert, welche zudem in unterschiedlicher Form eingesetzt werden.

In der Industrie sind nur selten die natürlichen Substrate der Enzyme von Interesse, sondern die Enzyme werden mit nicht-natürlichen Substanzen konfrontiert. Dieses kann eine Verringerung der Enzymaktivität hervorrufen. Darüber hinaus sind andere „bottle necks“ bekannt, welche nicht-konventionelle Reaktionsbedingungen notwendig machen.

3. Theoretische Grundlagen

Man unterscheidet dabei zwischen Variationen im Bereich der Reaktionsbedingungen und denen im Bereich des Reaktionsmediums (Abb. 3-12).

- Verändertes Reaktionsmedium
 - Reaktionen in einem System ohne organische Lösungsmittel
 - Reaktionen in der Gasphase
 - Nicht-konventionelle Lösungsmittel, wie ionische Flüssigkeiten und überkritische Gase
 - Organische Lösungsmittel als Additive (wassermischbar), Substratreservoir (binäres System) oder als eigentliches Reaktionssystem
- Veränderte Reaktionsbedingungen
 - Veränderter Druck ($p \neq p_{\text{Atmosphäre}}$)
 - Extreme Reaktionstemperaturen ($T < 4^\circ\text{C}$, $T > 70^\circ\text{C}$)
 - Veränderter pH-Wert ($\text{pH} < 4$, $\text{pH} > 8$)

Tab. 3-3: Anwendung von Enzymen in der technischen Synthese[95]

Enzym	Anwendung	Produkt	Anwendende Firmen
Glucoseisomerase	Festbett, IER	Glucose/Fructose-Sirup	Verschiedene
Nitrilhydratase	Ruhende Zellen	Acrylamid	Nitto, DSM
Lipase aus <i>Mucor miehei</i>	Festbett	Kakaobutter	Unilever (NL), Fijii (J)
Thermolysin	Lösliches Enzym	Aspartam	Tosoh, DSM
Lipase	Festbett	Optisch aktive Amine/ Alkohole	BASF
Lipase aus <i>Pseudomonas sp.</i>	Festbett, IER, EMR	(S)-Acylthioisobutytrat	DSM, Tanabe
Dehydratase	Ruhende Zellen	L-Carnitin	Lonza AG

Farbabstufungen: Dunkelblau: >1.000.000 t/a; Mittelblau: >10.000 t/a; Blau: >1.000 t/a; Cyan: >100 t/a Hellblau: >10 t/a

3.2.1 Lipasen

Die Lipasen, als Untergruppe der Hydrolasen (E.C. 3), sind in der Biotechnologie von großer Bedeutung. Bereits heute finden sie vielseitige Anwendung in der Industrie, z.B. bei der Herstellung optisch aktiver Amine. Als die am häufigsten verwendeten Biokatalysatoren haben sie Proteasen und Amylasen bereits abgelöst [96, 97].

Dieses liegt vor allem in den folgenden Vorteilen begründet[96, 98]:

- Lipasen besitzen häufig ein weites Substratspektrum.
- Lipasen besitzen eine hohe Regio-, Stereo- und Enantioselektivität.
- Neben der Hydrolyse lassen sich auch andere Reaktionen durch Lipasen katalysieren.
- Sie weisen eine hohe Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln auf.
- Lipasen sind nicht abhängig von einem Cofaktor.
- Viele Lipasen sind kommerziell in größeren Mengen verfügbar.
- In immobilisierter Form sind sie thermisch stabil und können rezykliert werden.

3. Theoretische Grundlagen

Als Triacylglycerin-Hydrolasen (E.C. 3.1.1.3) katalysieren Lipasen natürlicherweise die Verseifung (Hydrolyse) von Triacylglyceriden, wobei sie die Fettsäuren freisetzen und so die Energiereserven des Organismus mobilisieren. Bisher wurden sie aus verschiedenen Tieren (z.B. Pankreas-Lipasen), Pilzen (Lipase aus *Candida rugosa* (CRL)) und Mikroorganismen (Lipase aus *Pseudomonas* oder *Staphylococcus*) isoliert. Bezüglich des Molekulargewichtes der Lipasen, welches zwischen 19 kDa bis 70 kDa liegt, sind die Lipasen zu den niedermolekularen Proteinen zu zählen. Dieser Fakt ermöglicht ihnen eine hohe Mobilität, was ihre natürliche Funktion als extrazelluläre Enzyme begünstigt.

Tab. 3-4: Überblick Lipasen-katalysierter Reaktionen[99]

1. Hydrolyse	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-OH} + \text{R}_2\text{OH}$
2. Veresterung	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OH} + \text{R}_2\text{OH} \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{H}_2\text{O}$
3. Umesterung	
Alkoholyse	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{R}_3\text{OH} \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_3 + \text{R}_2\text{OH}$
Acidolyse	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{R}_3\text{-C(=O)-OH} \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_3 + \text{R}_2\text{-C(=O)-OH}$
4. Interesterifikation	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{R}_3\text{-C(=O)-OR}_4 \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_4 + \text{R}_3\text{-C(=O)-OR}_2$
5. Ammonolyse	$\text{R}_1\text{-C(=O)-OR}_2 + \text{NH}_3 \xrightleftharpoons{\text{Lipase}} \text{R}_1\text{-C(=O)-NH}_2 + \text{R}_2\text{OH}$

Generell katalysieren Lipasen die Hydrolyse langkettiger Carbonsäureester im schwach sauren bis schwach basischen pH-Bereich und bei moderaten Temperaturen, wobei die meisten Lipasen auch eine hohe Akzeptanz für kurzkettige Substrate aufweisen[100]. In der Literatur sind ebenfalls Ausnahmen bekannt, die extremere Temperatur und pH-Optima zeigten. Neves-Petersen et al. ermittelten beispielsweise für die Lipasen aus *Thermomyces lanuginosus* und *Rhizomucor miehei* alkalische pH-Optima zwischen pH 10-12[101]. Abgesehen von der Hydrolyse sind Lipasen in der Lage weitere Reaktionen zu katalysieren. Umesterungs- und

3. Theoretische Grundlagen

Veresterungsreaktionen können je nach Lage, des Gleichgewichtes effektiv durchgeführt werden (Tab. 3-4). Gotor et al. Berichteten ebenso von der Möglichkeit, Amidbindungen mittels Lipasenkatalyse zu bilden und zu spalten[102-105].

Ein prägnantes Merkmal, welches sich bei vielen Lipasen zeigt, ist eine Grenzflächenaktivierung, welche in ihrer Struktur begründet liegt. Hierbei ist eine signifikante Steigerung der Aktivität zu verzeichnen, wenn die Konzentration des lipophilen Substrates sich oberhalb der kritischen Mizellkonzentration (CMC) befindet und es so zur Ausbildung einer Öl-Wasser-Phasengrenze kommt. Das bei Lipasen vorhandene *lid* oder *falp* stellt die Erklärung für die Grenzflächenaktivierung dar. Es handelt sich dabei um eine α -helikale Struktur, welche in rein wässrigem Medium den Zugang zum aktiven Zentrum der Lipase verschließt. Folglich sind solche Lipasen in rein wässriger Lösung nahezu inaktiv. Der innen liegende Teil des *lid* ist hydrophob, wohingegen der nach außen gerichtete Teil hydrophil ist. Bei Kontakt der Lipase mit einer Öl-Wasser-Phasengrenze wird eine Konformationsänderung induziert, bei der sich das *lid* öffnet und somit die lipophile Oberfläche der Lipase vergrößert (Abb. 3-11). Mit der *lid*-Öffnung geht der sprunghafte Anstieg der Aktivität einher, welche beispielsweise bei der Lipase aus *Rhizomucor miehei* und der menschlichen Pankreas-Lipase nachgewiesen wurde[106, 107].

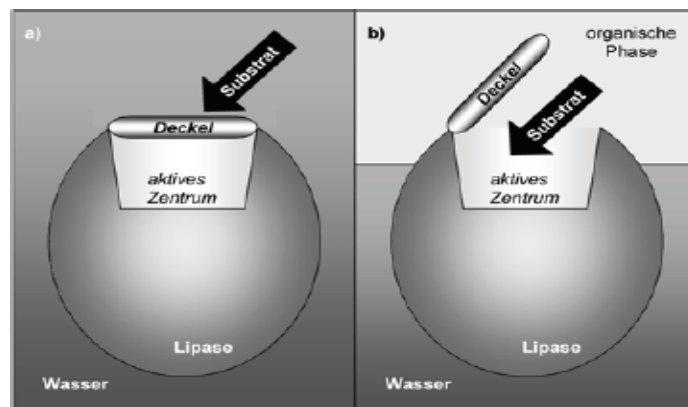


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der *lid*-Struktur in der geschlossenen (a) und offenen Position (b)[108]

Bisher war das Vorhandensein einer Grenzflächenaktivierung in Kombination mit *lid*-Struktur ein eindeutiges Strukturmerkmal zur Unterscheidung von Lipasen und Esterasen. Es wurden aber in den vergangenen Jahren ebenfalls Vertreter der Lipasen gefunden, welche zwar eine *lid*-Struktur besitzen, jedoch keine Grenzflächenaktivierung aufweisen. Ein Beispiel für eine solche Lipase ist die Lipase B aus *Candida antarctica*. Nähere Betrachtungen zu dieser werden im Kapitel 3.2.3 folgen.

Die fehlende Grenzflächenaktivierung wird auf die Größe des *lids* zurückgeführt, da solche Lipasen nur einen kleinen Deckel besitzen, welcher das aktive Zentrum nicht ausreichend abschirmt. Demzufolge ist diese Differenzierung zwischen Lipasen und Esterasen aufgrund der Grenzflächenaktivierung nicht mehr zulässig, weshalb man heute die unterschiedliche Substratspezifität als Kriterium heranzieht. Lipasen (Triacylglycerin-Hydrolasen, E.C. 3.1.1.3) katalysieren bevorzugt die Hydrolyse langkettiger Acylglyceride (> 12 C-Atome), wohingegen Esterasen (Carboxylester-

3. Theoretische Grundlagen

Hydrolasen, E.C. 3.1.1.1) ihre höchste Aktivität in Kontakt mit kurzkettigen Estersubstraten (≤ 12 C-Atome) erreichen.

Ein weiteres Strukturmerkmal aller Lipasen ist die α/β -Hydrolase-Faltung. Dies bedeutet, dass diese Enzyme ein Strukturelement aus mindestens fünf parallelen β -Faltblättern besitzen, welche beidseitig von α -Helices umrahmt bzw. verbunden werden (Abb. 3-12). Hierbei weisen sie ein für die Katalyse wichtiges Strukturmerkmal, die katalytische Triade, auf.

Reaktionsmechanismus

Von zentraler Bedeutung für die Aktivität einer Lipase und damit für den Mechanismus der katalysierten Reaktion ist ein charakteristischer Aufbau. Die katalytische Triade, eine Sequenz aus drei Aminosäuren (AS), befindet sich dabei im aktiven Zentrum der Lipase. In den meisten Lipasen findet sich die gleiche katalytische Triade aus Asparaginsäure (Asp), Histidin (His) und Serin (Ser), lediglich in einigen Ausnahmefällen, wie *Geotrichum candidum* oder *Candida rugosa*, ist das Aspartat durch Glutamat ersetzt [106, 109, 110]. Diese Triade befindet sich im aktiven Zentrum und diese Anordnung wird strukturell durch β -Faltblätter und α -Helices hervorgerufen (Abb. 3-12). Hierbei befindet sich das nukleophile Serin (rot) in einer Schleife zwischen einem mittleren β -Faltblatt und einer darauf folgenden α -Helix. Diese Anordnung wird auch als „nukleophiler Ellenbogen“ bezeichnet, wofür das konservierte Pentapeptid-Konsensusmotiv „Gly-X-Ser-X-Gly“ Voraussetzung ist [110].

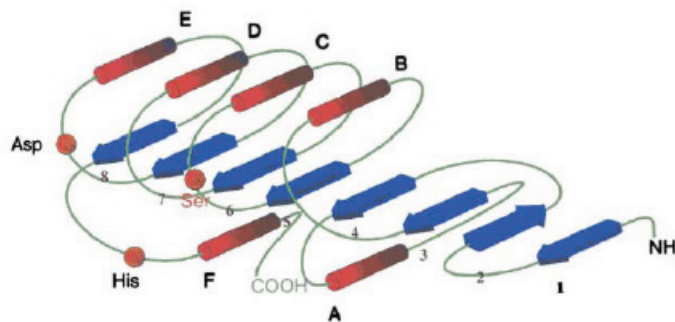


Abb. 3-12: Strukturmerkmal der Lipasen: α/β -Hydrolase Faltung [99]

Der Mechanismus der Katalyse von Serin-Hydrolasen kann wie folgt zu erklären:

1. Das Serin wird nukleophil aktiviert, wobei der Imidazolring des Histidins dessen Nukleophilie durch seine Wechselwirkung mit dem Wasserstoff der Serin-Hydroxygruppe erhöht. Der deprotonierte Aspartat-Rest wirkt hierbei stabilisierend auf das Histidin.

2. Der eigentliche Angriff des Serins am Carbonylkohlenstoff erfolgt und initiiert somit die Hydrolyse. Dieses verläuft nach einem **Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus**.

3. Es bildet sich der Enzym-Substrat-Komplex aus, welcher einen tetraedrischen Übergangszustand bzw. ein Intermediat ausbildet (T_d^1). Dieses Intermediat wird auch

3. Theoretische Grundlagen

als **Oxyanion** bezeichnet. Amidgruppen im Rückgrat des Proteins stabilisieren diesen Zustand (Oxyanionentasche).

4. Das katalytische Histidin überträgt im Folgeschritt ein Proton auf die OH-funktionalisierte Gruppe des Substrates, so dass es unter Freisetzung des Alkohols zu Ausbildung des **Acyl-Enzym-Komplexes** kommt. In diesem Zustand ist der Rest über die OH-Funktion des Serins verestert.

5. Nach dem nukleophilen Angriff des durch das Histidin aktivierten Wassers bildet sich erneut ein tetraedrisches Intermediat (T_d^2) aus.

6. Das Histidin überträgt sein Proton abschließend auf das Serin, wodurch die Freisetzung der Säure erreicht wird. Das Enzym befindet sich nun wieder in seinem ursprünglichen Zustand und kann einen neuen Zyklus durchlaufen.

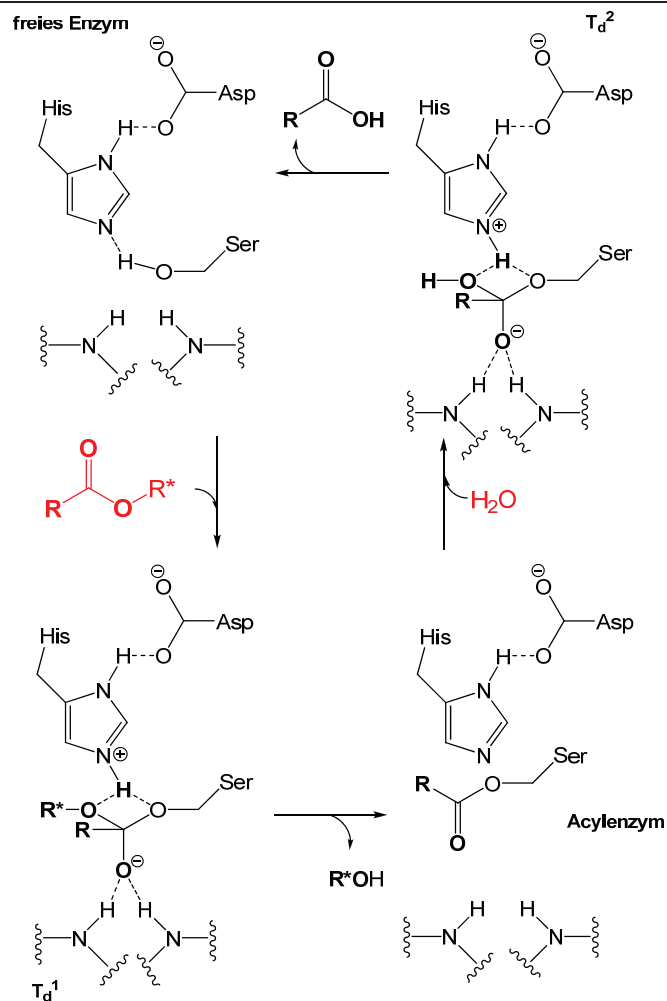


Abb. 3-13: Reaktionsmechanismus der Lipasen-katalysierten Hydrolyse (Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus)

Eine Besonderheit des diskutierten Mechanismus wurde erst vor wenigen Jahren festgestellt. Neves-Petersen et al. (2001) stellten eine Theorie auf, nach welcher das entstehende Säure-Anion (T_d^2) aus dem aktiven Zentrum der Lipase herauskatapultiert wird [101]. Dieser auch als „Katapult“-Theorie bekannte Ansatz beruht auf der negativen Nettoladung des katalytischen Zentrums von Lipasen am pH-Optimum. Das bei der Hydrolyse entstehende Säureanion soll durch

3. Theoretische Grundlagen

elektrostatische Abstoßung nach der Umsetzung herausgedrängt werden, womit das aktive Zentrum für den nächsten katalytischen Zyklus wieder zur Verfügung steht. Welches genau der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist, ist nicht eindeutig geklärt. Sowohl die Produktfreisetzung kann limitierend sein wie auch die Bildung des ersten tetraedrischen Übergangszustandes.

Die katalytische Triade ermöglicht über den in Abbildung 3-13 dargestellten Mechanismus auch die Umsetzung zu Carbonsäureestern, da es sich bei dem Nukelophil, welches in Schritt 5 angreift nicht zwingend um Wasser handeln muss. Zur Beeinflussung der Produktselektivität ist bei der betrachteten Gleichgewichtsreaktion die Wahl der Reaktionsbedingungen wichtig (Kap. 3.1.3).

Thermodynamische Grundlagen der Gleichgewichtsreaktion

Betrachtet man die Gleichgewichtslage der Lipasen-katalysierten Veresterungsreaktionen, so ist festzustellen, dass die Hydrolyseprodukte, Carbonsäure und Alkohol, die energieärmeren Komponenten sind.

Nach den Gesetzen der Thermodynamik ergibt sich die Änderung der freien Energie (nach Gibbs) aus der Änderung der Enthalpie (Wärmetönung) und der Änderung der Entropie (Ordnung bzw. Unordnung des Systems) (Gl. 3-6). Unter Standardbedingungen ist die Änderung der freien Energie ΔG^0 konstant und somit eine für das System charakteristische Größe. Sie bezeichnet die Energie, welche unter Standardbedingungen ($p=1\text{atm}$, $T=298\text{K}$, $\text{pH}: 7$, $c_{\text{Reaktanden}} = 1\text{mol/l}$), von 1 Mol Reaktanden ausgehend, bis zum Erreichen des Gleichgewichts benötigt bzw. freigesetzt wird. Da die oben angegebenen Standardbedingungen meist nicht mit den Reaktionsbedingungen übereinstimmen, muss die freie Energie nach der Gleichung 3-7 berechnet werden. Der Quotient aus Produkt- und Eduktkonzentration kann hierbei als Gleichgewichtskonstante K_{Gl} bezeichnet werden[111].

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad \text{Gl. 3-6}$$

wenn $\Delta G < 0$ Reaktion läuft spontan ab
 $\Delta G = 0$ Reaktion hat das Gleichgewicht erreicht
 $\Delta G > 0$ Reaktion läuft nicht spontan ab

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{c_{\text{Produkt1}} \cdot c_{\text{Produkt2}}}{c_{\text{Edukt1}} \cdot c_{\text{Edukt2}}} = \Delta G^0 + RT \ln K_{\text{Gl}} \quad \text{Gl. 3-7}$$

Um eine effektive Produktion des Esters zu erreichen, muss das Gleichgewicht zugunsten des Kondensationsproduktes verschoben werden. Generell setzen die Lipasen bei der Katalyse die Aktivierungsenergie herab, weshalb die Reaktion in gewissem Maße freiwillig abläuft. Da aber Lipasen sowohl die Veresterung als auch die Hydrolyse katalysieren, muss zur Verschiebung des Gleichgewichtes eines der Reaktionsprodukte entfernt werden[112-114].

Die Kenntnis der freien Energiedifferenz ΔG ist wichtig für die Prozessauslegung, denn nur bei negativer Energiedifferenz läuft die beobachtete Reaktion unter den gewählten Reaktionsbedingungen spontan ab. Mit einer auf das Problem angepassten Reaktionsführung kann auch eine Reaktion mit positiver freier Energie in eine spontan ablaufende Reaktion umgewandelt werden. Dieses kann z.B. durch

3. Theoretische Grundlagen

die kontinuierliche Produktentfernung geschehen, da hiermit das Gleichgewicht beeinflusst wird.

Die Tatsache, dass Lipasen nicht an hohe Wasseraktivitäten des Reaktionssystems gebunden sind, wie Proteasen, erweist sich bei der Verschiebung der Gleichgewichtslage zu höheren Esterausbeuten als vorteilhaft. Dies macht es möglich, Lipasen in reinen und sogar wasserfreien organischen Lösungsmitteln einzusetzen und durch *in situ* Wasserentfernung die Produktausbeute zu maximieren[115, 116].

3.2.2 Lipasen in der organischen Synthese

Lipasen wurden als erste Enzyme erfolgreich in nativer Form (ohne Immobilisierung) in reinen organischen Lösungsmitteln eingesetzt[117, 118]. Hierbei bildet sich eine Suspension, welche besonders treffend durch die englische Bezeichnung „microaqueous phase systems“ beschrieben wird. Ein solcher Einsatz ist aber bei einer Vielzahl von Enzymen, auch bei einigen Lipasen, nicht sinnvoll, da sie an Aktivität verlieren. Um eine irreversible Denaturierung zu verhindern, können andere Reaktionssysteme verwendet werden, welche darüber hinaus auch bei der Lösung anderer reaktionsbedingter Probleme helfen können.

Der Einsatz organischer Lösungsmittelsysteme lässt sich grob in Ein- und Zwei-Phasen Systeme unterteilen (Abb. 3-14). Sie umfassen den Gebrauch von Zusätzen wassermischbarer organischer Lösungsmittel zu wässrigen Lösungen, von reversibilen Systemen, von rein organischen Lösungsmittelsystemen und zweiphasigen Systemen aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel.

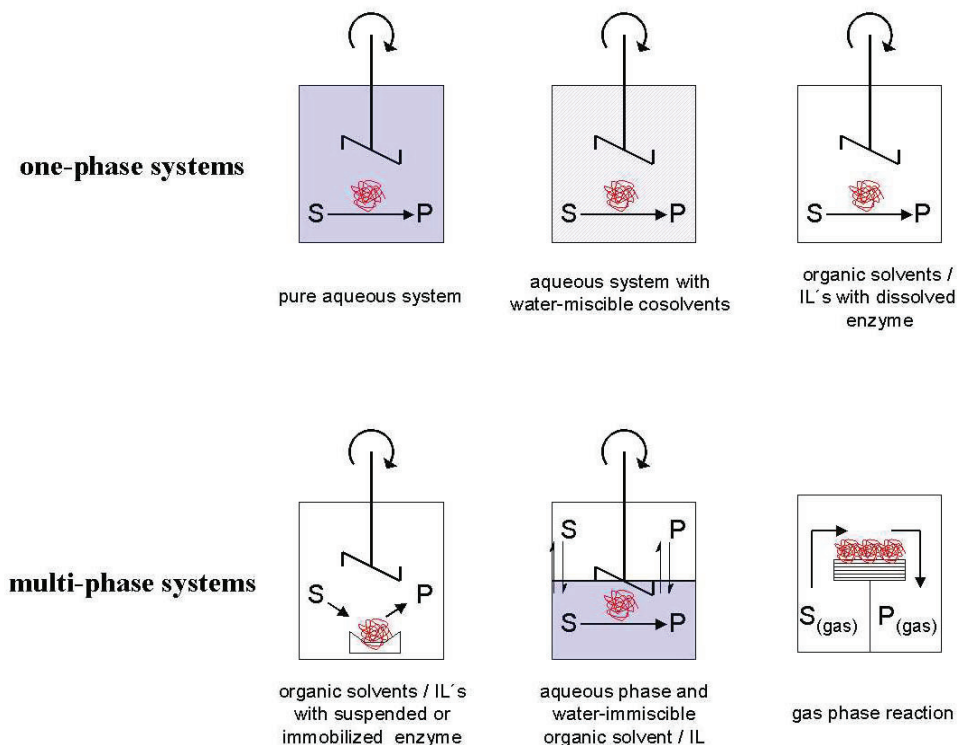


Abb. 3-14: Einsatz von Biokatalysatoren in unterschiedlichen Reaktionssystemen[119]

3. Theoretische Grundlagen

Der Zusatz organischer Lösungsmittel zu einem wässrigen System dient meist dazu, die Konzentration von schlecht wasserlöslichen Substraten in der Umgebung des Enzyms zu erhöhen. Es können sich in einigen Fällen aber auch positive Wirkungen auf Selektivität, Aktivität und Stabilität zeigen. Beispielsweise konnten Schumacher et al. durch den Zusatz von 24,5 % (v/v) Acetonitril die Substratinhibierung der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) durch 2-Butanon fest vollständig zurückdrängen. In revers-mizellaren Systemen sind die Enzymmoleküle in diskreten, wasserhaltigen reversen Mizellen oder microemulsionsbasierten Gelen immobilisiert. Die amphiphilen Moleküle werden in einer Phase aus hydrophobem organischen Lösungsmittel gebildet. Hierdurch kann die Stabilität der Enzyme gegenüber unpolaren Lösungsmitteln erhöht werden [120]. In organischen Lösungsmittelsystemen liegen die Biokatalysatoren meist immobilisiert vor, um ihre Stabilität zu erhöhen. Daher handelt es sich streng genommen um ein binäres Reaktionssystem als flüssiger und fester bis gallertartiger Phase, je nach Immobilisierungsart. Besonders breit sind die Einsatzmöglichkeiten von zweiphasigen Systemen, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen werden wird [121, 122].

Die Durchführung enzymatischer Reaktionen in reinen organischen Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen mit Wasser bringt aus biotechnologischer Sicht viele Vorteile [121, 123, 124]:

- Höhere Löslichkeit hydrophober Substrate und Produkte
- Verschiebung des thermodynamischen Reaktionsgleichgewichtes
- Höhere Ausbeuten durch vereinfachte Produktisolierung
- Unterdrückung unerwünschter wasserabhängiger Nebenreaktionen
- Leichte Rückgewinnung des immobilisierten Enzyms durch einfache Filtration
- Eliminierung mikrobieller Verunreinigungen
- Minimierung der durch lipophile Substrate/ Produkte verursachten Inhibierung des Enzyms

Bei der Verwendung von Enzymen in organischen Lösungsmitteln ist es von großer Bedeutung, für einen ausreichenden Wassergehalt in der organischen Phase zu sorgen. Im Allgemeinen gilt, dass mit sinkendem Wassergehalt die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms verringert wird, was zu einer vollständigen Deaktivierung führen kann. Auch Lipasen benötigen eine bestimmte Wasseraktivität, um ihre Hydrathülle und damit ihre Struktur aufrecht zu erhalten. Bei der betrachteten Veresterung gilt es einen Kompromiss zwischen der für die Struktur essenziellen Wassermenge und einer effektiven Gleichgewichtsverschiebung zu finden [92, 125, 126]. Die Eigenschaften des organischen Lösungsmittels bestimmen neben der Selektivität ebenso die Aktivität und die Stabilität eines Enzyms [76, 121, 123, 127].

Speziell 2-Phasen Systeme bestehen entweder aus einem organischen Lösungsmittel (Spezialfall: flüssiges Substrat), einem Gas oder einem überkritischem Fluid in Kontakt mit einer meist wässrigen Phase. Bei dem in dieser Arbeit betrachteten System handelt es sich um ein 2-Phasen System, welches aus einer wässrigen Reaktionsphase und einem begrenzt wassermischbaren organischen Lösungsmittel besteht (Abb. 3-9).

3. Theoretische Grundlagen

Im Allgemeinen liefert die Durchführung enzym-katalysierter Reaktionen in binären Reaktionssystemen eine Reihe von Vorteilen[76, 124, 126, 128]:

- Erhöhte Substrat- und Produktkonzentration im Gesamtsystem
- Geringere Enzymdeaktivierung durch Verringerung des Lösungsmittelkontakts
- Verringerung einer Substrat- oder Produktinhibierung
- Vereinfachte Produktisolierung
- Höherer Umsatz durch integrierte Produktabtrennung (IPR)
- Verringerung von Neben- und Folgereaktionen
- Vereinfachte Katalysatorrezyklisierung
- Keine Notwendigkeit für Immobilisierung

In einem 2-Phasen System befindet sich das Enzym gemeinsam mit den hydrophilen Komponenten in der wässrigen Reaktionsphase. Die Verteilung aller Komponenten zwischen den beiden Phasen hängt stark von den Eigenschaften (Polarität etc.) der Substanz und des organischen Lösungsmittels ab. Hydrophobe Komponenten befinden sich auf Grund ihrer geringen Wasserlöslichkeit überwiegend in der organischen Phase des 2-Phasen Systems[113, 121]. Im Falle hydrophober Substrate dient die organische Phase folglich als Substratreservoir, aus dem kontinuierlich Substrat in die wässrige Phase nachgeliefert werden kann. Voraussetzung für eine effektiv ablaufende Reaktion ist hier die schnelle Nachlieferung des Substrates über die Phasengrenzfläche, um eine Massentransferlimitierung auszuschließen.

Jedoch beeinflusst ein intensiverer Kontakt mit der organischen Phase die Aktivität des Enzyms. So wird er im Fall eines grenzflächenaktiven Enzyms zur Erhöhung seiner Aktivität führen. Auf der anderen Seite resultiert bei nicht grenzflächenaktivierten Enzymen meist eine Denaturierung. Folglich sind sowohl die Verteilung aller Komponenten zwischen den Phasen wie auch der Kontakt zwischen Enzym und organischem Lösungsmittel von entscheidender Bedeutung für deren Aktivität.

In dieser Arbeit liegen die hydrophilen Substrate bzw. Monomere zu über 90 % in der wässrigen Phase vor, womit eine Massentransferlimitierung ausgeschlossen werden kann. Bezüglich des Produktes, welches zur Gleichgewichtsverschiebung möglichst effektiv aus der Wasserphase entfernt werden muss, ist eine Phasentransferlimitierung nicht auszuschließen. Die Geschwindigkeit des Transportes bestimmt bei der Polykondensation nicht nur den Umsatz, sondern auch die Molekülmasse des Polyesters. Der Vorteil der verwendeten CaLB ist hierbei, dass sie keine Grenzflächenaktivierung besitzt und somit die Monomere aus der Wasserphase umsetzen kann. Zu bemerken sei an dieser Stelle, dass durch Säure und vor allem durch den Alkohol die Lipase inhibiert wird. Somit ist die Verteilung der Substrate wie auch des Produktes im binären Reaktionssystem von entscheidender Bedeutung.

3.2.3 Lipase Typ B aus *Candida antarctica*

Die Lipase Typ B aus *Candida antarctica*, kurz CaLB, gehört zu den Triacylglycerinhydrolasen (E.C. 3.1.1.3). Sie wurde erstmals in einem aus dem antarktischen Vandasee stammenden alkalophilen Organismus entdeckt und zählt

3. Theoretische Grundlagen

heutzutage zu den erfolgreichsten industriell zum Einsatz kommenden Biokatalysatoren. Die Produktion der CaLB erfolgt heute rekombinant in *Aspergillus* sp., welches die Herstellung größerer Mengen für den industriellen Maßstab ermöglicht. Mit einem Molekulargewicht von 33 kDa (entspricht 33 kg mol^{-1}) zählt sie zu den kurzkettigen Peptiden[129]. Auch für eine Lipase besitzt die CaLB eine vergleichsweise kurze Kettenlänge (Tab. 3-5)[130, 131].

Die ubiquitäre Anwendung ist zum einem auf die Tatsache zurückzuführen, dass die CaLB in immobilisierter Form Temperaturen von bis zu 90°C toleriert und ausreichend Aktivität zeigt[98]. Zum anderen weist die CaLB ein besonders breites Substratspektrum auf, wobei sie gleichzeitig sehr selektiv ist. Im Gegensatz zu den meisten Lipasen wurde bei der CaLB bisher keine Grenzflächenaktivierung festgestellt, was ihren Einsatzbereich auf wässrige Lösungen erweitert[132]. Hieraus, sowie aus der langsamen Hydrolysegeschwindigkeit der CaLB gegenüber langkettigen Triglyceriden, folgt, dass die CaLB vielleicht besser in der Gruppe der Esterasen klassifiziert wäre. Nichtsdestotrotz weist sie viele typische Merkmale einer Lipase auf. Neben den Triacylglycerinen, den natürlichen Substraten, ist die Umsetzung von anderen Ausgangsstoffen mit hoher Regio-, Stereo- und Enantioselektivität möglich. Raza et al. entwickelten ein molekulardynamisches Modell, mit dessen Hilfe die Enantioselektivität der CaLB vorausberechnet werden kann[133].

Tab. 3-5: Vergleich der CaLB mit der CaLA und der CRL[134-136]

	CaLB	CaLA	CRL (inaktiv; aktiv)
Molekülmasse	33 kDa	45 kDa	58 kDa
Aminosäureanzahl	342	441	549
Isoelektrischer Punkt	6,0	7,5	5,6-5,8
Disulfidbrücken	3 (47-89, 241-283, 318-336)	2 (101-273, 350-394)	2 (60-97, 268-277)
Katalytische Triade	Ser, His, Asp	Ser, His, Asp	Ser, His, Glu
Grenzflächenaktivierung	nein	✓ (gering)	✓
Subunits	1	k.A. ¹	1

¹keine Angabe

Der Einsatzbereich der CaLB reicht von enantioselektiver Hydrolyse über Veresterungen, Polymerisationen und Aminolysen bis hin zu dynamisch kinetischen Racematspaltungen. In Kombination mit einem Ruthenium-Katalysator vom Noyori-Typ konnten Hilker et al. 2006 über eine dynamisch kinetische Racematspaltung chirale Polyester herstellen[137]. Quervernetzte Polyester können durch die Kombination von Polykondensation und ring-öffnender Polymerisation mittels CaLB erzeugt werden[138]. Darüber hinaus war es Herford et al. möglich, ein thiolendfunktionalisiertes Poly(ϵ -Caprolactam) herzustellen, indem sie die CaLB verwendeten[139].

Wie die Bezeichnung Typ B bei der CaLB indiziert, existiert auch ein Typ A, welcher gleichzeitig mit der CaLB isoliert wurde. Obwohl die beiden Typen demselben Organismus entstammen, unterscheiden sie sich dennoch relativ stark, vor allem in der Substratspezifität[110]. Im Vergleich zur CaLA (Lipase Typ A aus

3. Theoretische Grundlagen

Candida antarctica) zeigt der B-Typ eine höhere Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Estern, Amiden und Thiolen; große Triglyceride werden hingegen nur mit geringe Aktivitäten und Regioselektivitäten umgesetzt. Die CaLA weist eine hohe Aktivität gegenüber kurzkettigen Triglyceriden auf. Obwohl die CaLA eine höhere thermische Stabilität besitzt, besteht ein größeres Interesse an der Lipase B bezüglich industrieller Anwendungen, was in ihrer Selektivität und ihrem weiten Substratspektrum begründet ist[98, 140].

Die CaLB zeigt hohe Aktivität bei neutralen Reaktionsbedingungen und ist in einem pH-Bereich zwischen 3,5 und 9,5 in wässrigen Medien stabil. Die Temperatur, bei der die CaLB denaturiert, variiert zwischen 50 °C und 80 °C, in Abhängigkeit vom gewählten pH-Wert und Puffer. Bei niedrigen pH-Werten ist die höhere Denaturierungstemperatur zu finden. In immobilisierter Form erscheint die CaLB stabiler und kann ohne Aktivitätsverlust bei 60-80°C über mehrere tausend Stunden verwendet werden. Auch Synthesen bei höheren Temperaturen (> 90°C) sind bereits beschrieben. Das pH-Optimum (Aktivität) der CaLB liegt bei einem pH von 6., wohingegen die CaLA bei einem höheren pH-Wert von 7 die maximale Aktivität zeigt[98, 140].

Es existieren zahlreiche Beispiele für die Katalyse durch die CaLB bei der Synthese und Hydrolyse von Estern. Bei der Synthese von einfachen Estern besitzt die CaLB eine hohe Spezifität gegenüber geradkettigen Fettsäuren. Die kleinsten Fettsäuren gelten als schlecht akzeptierte Substrate wohingegen Fettsäuren von Butansäure bis hin zur Octadecansäure gleichbleibend gut akzeptiert werden. Auch einfach ungesättigte Ölsäure und die mehrfach ungesättigte Linolsäure können von der CaLB als Substrat genutzt werden.

Geradkettige primäre Alkohole gelten als exzellente Substrate der CaLB. Besonders gilt dies aber für sekundäre Alkohole wie 2-Propanol, während tertiäre Alkohole, wie *tert*-Butanol, als Substrate nicht akzeptiert werden. Daher werden sie auch als inertes Lösungsmittel bei Veresterungen eingesetzt[98, 141].

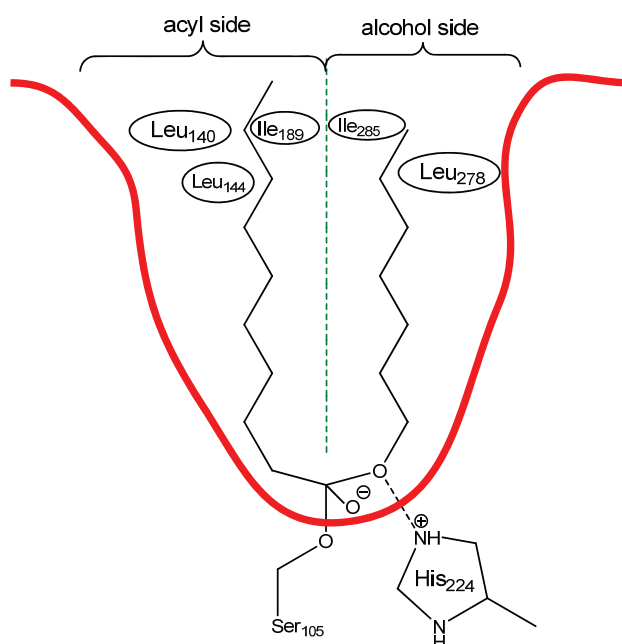


Abb. 3-15: Schematischer Aufbau des Kanals zum aktiven Zentrum der CaLB [131]

3. Theoretische Grundlagen

Die CaLB weist eine ausgesprochen hohe Substratspezifität hinsichtlich der Regio- und Enantioselektivität auf. Bei der Acylierung verschiedener Kohlenhydrate reagiert sie besonders regioselektiv. So kann bei der Veresterung von Glucose mit Stearinsäure innerhalb von 48 h ein Umsatz von 93 % erreicht werden, wobei > 90 % der Veresterung am C₆ erfolgen[73]. Ihre hohe Enantioselektivität wird vor allem bei der Erzeugung optisch aktiver Komponenten durch die Spaltung racemischer Gemische deutlich. Sie besitzt eine katalytische Präferenz gegenüber den *R*-Enantiomeren sekundärer Alkohole, wobei ee's von > 95 % möglich sind[142, 143]. Leonard et al. berichteten beispielsweise von der enantioselektiven Acylierung von 2-Pentanol durch Methylpropanat in einem Fest/ Gas-Reaktor[141].

Neben den genannten Einsatzmöglichkeiten der CaLB existieren zahlreiche weitere Anwendungen, bei denen die CaLB in speziellen Reaktionen, wie der Herstellung von funktionalisierten Polymeren, eingesetzt wird. Des Weiteren wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass sich alternative Nukleophile wie Amino- oder Thiolgruppen einsetzen ließen, die dann anstelle von Wasser oder eines Alkohols in den katalytischen Zyklus eingebunden werden können[98, 144].

Uppenberg fand 1994 heraus, dass die CalB einen Kanal zum aktiven Zentrum besitzt, welcher 10 x 4 Å breit und 12 Å tief ist [129, 130]. Nach Uppenberg et al. gliedert sich dieser Kanal in eine Acyl- und eine Alkoholseite, wodurch die Enantioselektivität festgelegt ist (Abb. 3-15)[131]. Durch den Transfer eines Protons vom Histidin (His 224) des aktiven Zentrums auf den Sauerstoff des Alkohols ist die Teilung des Kanal vorgegeben und die Anbindung des Substrates festgelegt. Aufgrund der fehlenden *lid*-Struktur ist es Substratmolekülen, aber auch Lösungsmittelmolekülen möglich, in das aktive Zentrum einzudringen, ohne dass eine lipophile Grenzschicht vorhanden sein muss. Hinderlich für besonders hydrophile Substrate ist der hydrophobe Charakter der Kanalinnenseite, welcher durch eine „Beschichtung“ der Kanalwand mit aliphatischen Resten entsteht. Dies kann sich negativ auf die Polykondensation von hydrophilen Substraten auswirken.

3.3 Berechnung thermodynamischer Eigenschaften

Die Abschätzung oder Vorhersage von physikalischen Eigenschaften neuartiger Substanzen findet in der Industrie immer mehr Anwendungen. Da die Kenntnis der Eigenschaften von Stoffen oder Stoffgemischen für die verfahrenstechnische Auslegung von Prozessen sehr wichtig ist, benötigt man diese Daten bevor der Bau einer Anlage geplant werden kann. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang die Löslichkeit und Verteilung eines Stoffes zwischen verschiedenen Phasen, sprich im fluiden Medium.

Ausgehend von der Quantenmechanik können physikalische Eigenschaften berechnet werden. Quantenchemische Methoden berechnen die molekularen Eigenschaften isolierter Moleküle im Vakuum. Ausgehend davon ist das Verhalten von Molekülen in der Gasphase sehr genau zu bestimmen. Da die Vielzahl chemischer Reaktionen aber nicht in der Gasphase, sondern in Lösung stattfindet, können diese Ergebnisse nicht ohne weiteres adaptiert werden. Moleküle in Lösung können nicht als isoliert betrachtet werden, was die Berechnung der Eigenschaften verkompliziert[145]. Realistische Modellierungen der Vielzahl an Parametern können durch die *Molekular Dynamik*[146-148] oder die *Monte Carlo Methode*[145, 149] mit großer Genauigkeit erreicht werden. Der Nachteil dieser beiden Methoden ist, dass sie sehr zeitaufwändig sind. Eine andere Herangehensweise ist die Berechnung via sogenannter Gruppenbeitragsmethoden, wie z.B. UNIFAC (Universal Functional Activity Coefficient)[150, 151]. Hierbei wird das Molekül in Fragmente unterteilt, welchen ein bestimmter Anteil an den intermolekularen Wechselwirkungen zugeordnet ist. Dabei gehen die Informationen über intramolekulare Wechselwirkungen verloren.

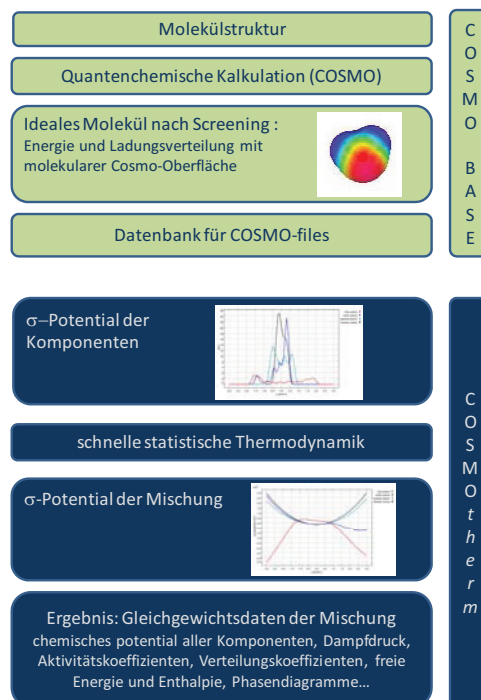


Abb. 3-16: Flussdiagramm für den Ablauf der Berechnungen in COSMO-RS

3. Theoretische Grundlagen

Der Vorteil der Gruppenbeitragsmethoden ist, dass, ausgehend von einem Datensatz an Fragmenten, vergleichsweise schnelle und damit kostengünstige Ergebnisse zur Verfügung stehen. Eine dritte Methodik ist die Annäherung an das Problem über ein Dielectric Continuum Solvation Model (CSM)[152, 153]. Hierbei werden Moleküle in Lösung auf einem quantenchemischen Level betrachtet, indem wichtige Merkmale des Lösungsmittels, wie z.B. die elektrostatischen Wechselwirkungen mit den gelösten Verbindungen, mittels klassischer dielektrischer Theorie angenähert werden. Man unterscheidet hier zwischen dem Conductor-like Screening Model (COSMO) und dem Conductor-like Screening Model for Real Solvents (COSMO-RS). In der Arbeit wurde lediglich das Conductor-like Model for Real Solvents verwendet, welches auf COSMO aufbaut. In der Graphik 3-16 sind die Aufgaben der beiden Modelle skizziert[154].

Im oberen Teil der Skizze ist die Generierung der sogenannten COSMO-files dargestellt. Ausgehend von der Struktur einer Verbindung werden die Berechnungen gestartet. Hierbei ist es nicht notwendig, die genaue Struktur der Verbindung bezüglich der Atomkoordinaten zu kennen. Die Verknüpfungen zwischen den Atomen reichen aus, um damit die geometrische Optimierung und die COSMO-Berechnung durchzuführen. Hierzu können verschiedene quantenchemische Programme verwendet werden, wie z.B. DMol oder Turbomole[152].

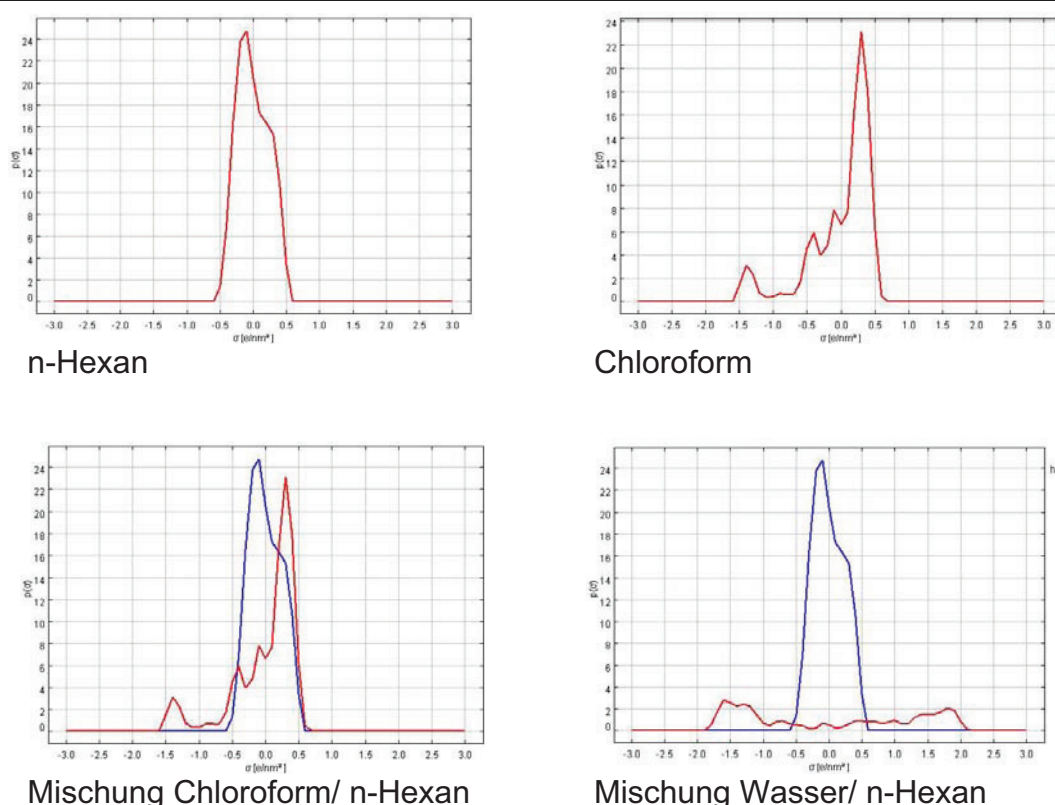


Abb. 3-17: σ -Profile von n-Hexan und Chloroform wie auch von deren Mischung und einer von Wasser-n-Hexan-Mischung

Als Ergebnis werden die Geometrie der Verbindung, ihre Energie im Leiter sowie die Ladungsdichte aller Oberflächensegmente erhalten. Diese Informationen werden in den COSMO-files gespeichert. Ein Teil der Abbildung 3-16 zeigt die Ladungsverteilung an der Oberfläche eines Wassermoleküls (Bild im grünen Teil).

3. Theoretische Grundlagen

Hierbei werden positive Oberflächenladungen mit einem roten Farbton und negative mit einem blauen Farbton wiedergegeben. Die Farbabstufungen richten sich nach der Ladungsintensität, wobei Grüntöne eher nicht geladene Bereiche repräsentieren. Im Falle des Wassers wird die negative Ladung, welche durch die freien Elektronenpaare am Sauerstoff lokalisiert ist, durch eine positive Oberflächenladung abgeschirmt. Gleiches gilt für die Wasserstoffe, deren positive Partialladung durch eine negative Oberflächenladung ausgeglichen wird.

Der untere Teil des Flussdiagramms repräsentiert den in dieser Arbeit verwendeten COSMO-RS-Bereich der Kalkulation[154]. In diesem Teil werden aus den Eigenschaften der Einzelmoleküle makroskopische Eigenschaften von Systemen und Mischungen berechnet. Das Ergebnis solcher Berechnungen sind sogenannte σ -Profile, welche Informationen über die Anzahl der Segmente mit einer bestimmten Ladung σ enthalten. Solche σ -Profile geben Aufschluss über das System und sind meist mit Lösungsmittleigenschaften verknüpft. Anhand des folgenden Beispiels soll der Zusammenhang zwischen σ -Profil und Lösungsmittleigenschaften erläutert werden. In Abbildung 3-17 sind die σ -Profile von Hexan und Chloroform sowie von deren Mischung dargestellt. Eine deutliche Interaktion der beiden Lösungsmittel ist anhand des σ -Profils ersichtlich. Im Gegensatz dazu zeigen die σ -Profile von Wasser und n-Hexan keine Interaktion der beiden Flüssigkeiten, woraus sich schließen lässt, dass sie nur geringfügig ineinander mischbar sind.

3.3.1 COSMO

Im Dielectric Continuum Solvation Model wird das Lösungsmittel als ein dielektrisches Kontinuum mit einer Dielektrizitätskonstanten ϵ behandelt[154, 155]. Die Grundlage des Conductor-like Screening Model ist die Annahme eines idealen Leiters mit $\epsilon=0$, um den Rechenaufwand zu reduzieren. Im simpelsten Falle ist das elektrische Potential Φ an jedem Punkt r_σ der Oberfläche 0.

Der Nachteil dieser Annahme ist, dass dies nur für einen Leiter, nicht aber für eine definierte Dielektrizitätskonstante gilt. Um dies zu korrigieren, kann der Ansatz über die ideal abgeschirmte Ladungsdichte σ^* gewählt werden (Gl. 3-8).

$$\sigma = f(\epsilon)\sigma^* = \frac{\epsilon - 1}{\epsilon + \chi} \sigma^* \quad \text{Gl. 3-8}$$

An dieser Stelle soll auf die Berechnung der COSMO-files nicht weiter eingegangen werden, da diese nicht Gegenstand der vorgelegten Arbeit waren. Es wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass zur Bewertung der in Kapitel 5-4 diskutierten Ergebnisse die Herangehensweise wichtig ist. Im Gegensatz zu den Gruppenbeitragsmethoden konzentriert sich die Berechnung mittels COSMO auf die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Molekülen. Sie ermöglicht so die Einbeziehung von intra- und intermolekularen Wechselwirkungen[145, 152].

3.3.2 COSMO-RS

Die Eigenschaften eines Moleküls in einem idealen Leiter oder in einem dielektrischen Kontinuum können mittels COSMO berechnet werden. COSMO-RS stellt nun eine Brücke zwischen den Eigenschaften der Einzelmoleküle und den

3. Theoretische Grundlagen

makroskopischen Eigenschaften dar[145]. Die Übertragung der Moleküleigenschaften auf den makroskopischen Sektor basiert auf dem Interaktionsmodell. Es beruht auf den Wechselwirkungen zwischen den geladenen Oberflächen der Moleküle und statistischer Thermodynamik (Abb. 3-18)[154].

Ausgangspunkt ist, dass jeder Punkt dem nächsten Atom in seiner nächsten Umgebung zugeordnet ist. Die relative Distanz ist in diesem Fall die reale Distanz geteilt durch den Van-der-Waals-Radius des korrespondierenden Atoms. Hierdurch wird ein polyhedraler Raum konstruiert, welcher die Moleküle in dichter Packung enthält. In Lösung ist der minimale Abstand zweier Atome der Van-der-Waals-Radius, wohingegen der durchschnittliche Abstand im Raum 20 % größer ist.

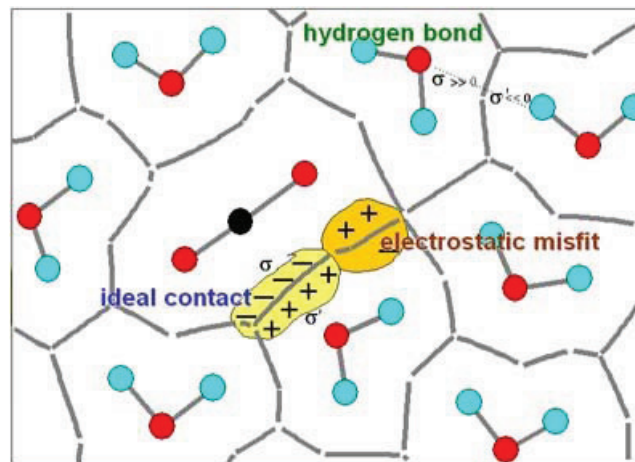


Abb. 3-18: Molekulare Wechselwirkung in Flüssigkeiten nach COSMO-RS[153, 154]

Normalerweise kommen die Oberflächensegmente gepaart vor (Abb. 3-18) und idealerweise sind keine ungepaarten Segmente vorhanden. Falls doch ein solch isoliertes Segment auftritt, kann es aufgrund der Zahl an Oberflächensegmenten vernachlässigt werden. Ein Segmentpaar wird durch seine effektive Größe a_{eff} und seine Ladungsdichte σ_{tot} charakterisiert. Das letztere ist die Summe der lokalen Ladungsdichten $\sigma_{\text{tot}} = \sigma + \sigma'$. Bei idealem Kontakt ist $|\sigma| = |\sigma'|$.

Die intermolekulare Wechselwirkung wird dabei nicht nur von Abweichungen dieses idealen Kontaktes beeinflusst (E_{misfit}), sondern auch Wasserstoffbindungen müssen bei ausreichender Oberflächengröße berücksichtigt werden (Gl. 3-9).

$$E_{\text{int}}(\sigma, \sigma') = E_{\text{misfit}}(\sigma, \sigma') + E_{\text{H-Bind}}(\sigma, \sigma') \quad \text{Gl. 3-9}$$

Um das reale Lösungsmittel zu modellieren, muss die Verteilungsfunktion der Ladungsdichten von teilnehmenden Reaktanten berücksichtigt werden. Diese werden als σ -Profile $p_i(\sigma)$ bezeichnet. Mit der Annahme, dass effektive Oberflächensegmente unabhängig voneinander sind, können die geometrischen Informationen eines COSMO-files weggelassen und so auf das σ -Profil reduziert werden.

Weitergehend kann nun die Molekülkonzentration auf die Segmentkonzentration transformiert werden, um so das σ -Profil des gesamten Systems $P_s(\sigma)$ als Summe der molenbruchgewichteten σ -Profile aller Komponenten zu erhalten:

$$P_S(\sigma) = \sum x_i P'(\sigma) \quad \text{Gl. 3-10}$$

Die folgende Gleichung, welche iterativ gelöst werden muss, gibt das chemische Potential eines Segmentes wieder (Gl. 3-11).

$$\mu_S(\sigma) = -\frac{RT}{a_{\text{eff}}} \left[\int P_S(\sigma') \exp\left(\frac{a_{\text{eff}}}{RT} (\mu_S(\sigma') - E_{\text{misfit}}(\sigma, \sigma') - E_{\text{H-Bind.}}(\sigma, \sigma'))\right) d\sigma' \right] \quad \text{Gl. 3-11}$$

Um vom einzelnen Segment zur Gesamtheit aller Segmente zu kommen, muss das chemische Potential der Komponente i im Lösungsmittel berechnet werden. Dieses Potential setzt sich aus einem kombinatorischen und einem Rest- oder Störterm zusammen (Gl. 3-12).

$$\mu_S^i = \mu_{c,S}^i + \mu_{\text{res},S}^i = \mu_{c,S}^i + \int P'(\sigma) \mu_S(\sigma) d\sigma \quad \text{Gl. 3-12}$$

Der kombinatorische Term gibt dabei die entropischen Effekte wieder, welche durch Form und Größe der Lösungsmittel- und der Komponentenmoleküle verursacht werden. Hingegen beschreibt der zweite Term die enthalpischen Effekte, resultierend aus Wechselwirkungen zwischen Komponente i und Lösungsmittel S. Das resultierende Potential ist lediglich ein pseudo-chemisches Potential. Für die Berechnung der Verteilungskoeffizienten wurde die folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$\log_{10}(P_{(2,1)}^i) = \log_{10} \left(\exp\left[\frac{(\mu_1^i - \mu_2^i)}{RT}\right] \frac{V_1}{V_2} \right) \quad \text{Gl. 3-13}$$

Die diskutierten Annahmen und Vereinfachungen werden in Kapitel 5-4 zur Diskussion der Ergebnisse verwendet. Die Berechnung der Verteilungskoeffizienten in COSMO-RS wurde aufgrund von LLE-Daten (liquid-liquid-equilibrium) durchgeführt, welche ebenfalls via COSMO-RS berechnet wurden.

Anhand des Programms können die folgenden Größen berechnet werden [150, 153, 156, 157]:

- Dampfdrücke
- Siedepunkte
- Aktivitätskoeffizienten
- Gaslöslichkeit/ Löslichkeiten
- Verteilungskoeffizienten
- VLE/LLE
- u.v.m.

Polymere können mit COSMO-RS heute nur mit sehr unzureichender Genauigkeit berechnet werden, da der kombinatorische Term für solche Molekülmassen nicht gefittet ist.

4. Ergebnisse

Bei der Betrachtung der allgemeinen Reaktionsgleichung von lipasen-katalysierten Polykondensationen ist auffällig, dass es sich um eine Gleichgewichtsreaktion handelt. Lipasen katalysieren demzufolge neben der Hydrolyse von Estern auch die Veresterung von Carbonsäuren mit Alkoholen. Diese Tatsache kann für die enzymatische Synthese von einfachen Estern wie auch von Polyestern genutzt werden. Da die Gleichgewichtslage der Reaktion (Abb. 4-1) auf Seiten der Hydrolyseprodukte, Carbonsäure und Alkohol, liegt, ist es notwendig, das Gleichgewicht durch Abtrennung der Produkte bzw. eines der Produkte zu beeinflussen. Hierbei wird die Möglichkeit genutzt, dass sich das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion nicht einstellen kann, wenn eines der Produkte kontinuierlich entfernt wird.

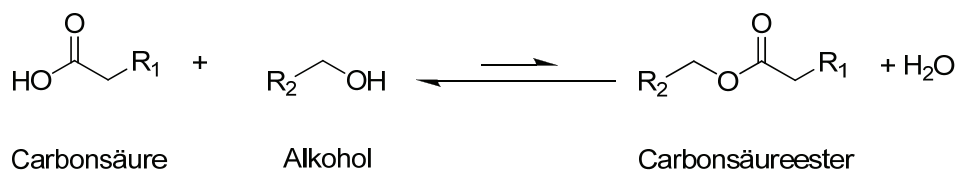


Abb. 4-1: Gleichgewichtsreaktion der lipasen-katalysierten Veresterung/ Hydrolyse

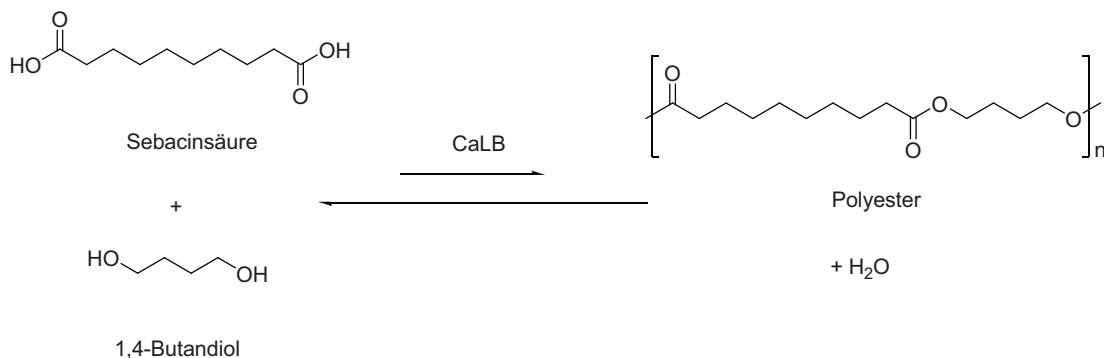
Konventionell wird die Veresterung unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt, was bedeutet, dass das entstehende Reaktionswasser entfernt wird. Verschiedene Methoden, wie z.B. die Entfernung des Wassers mittels Molekularsieben oder auch die Abtrennung via azeotroper Destillation, sind in der Literatur beschrieben und werden auch im technischen Maßstab eingesetzt[73, 75, 158]. Chang et al. veröffentlichten beispielsweise die Synthese von Triglyceriden aus Glycerol und 4-Phenylbuttersäure in lösungsmittelfreien Systemen[74]. Alternativ können auch einfache Ester mit Alkoholen zur Umsetzung gebracht werden. Eine solche Umesterung nutzen Kim et al., um aus Glycerol und Methylcarbonat Glycerolcarbonat herzustellen[159]. Das ausgeschleuste Methanol kann, ähnlich der Wasserentfernung durch Molekularsiebe, entfernt werden. Problematisch ist die Umsetzung von hydrophilen Ausgangsstoffen in derartigen Reaktionssystemen.

Das Ziel der Arbeit war die Herstellung eines neuartigen Polyesters aus hydrophilen Monomeren. Besonderes Interesse bestand für Polyester auf Zuckerbasis, da für den angestrebten Einsatz in der Medizintechnik eine hohe Biokompatibilität vorausgesetzt wird. Das sich aus der Verwendung von Zuckern als Monomere ergebende Problem ist deren geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln. Daher musste zuvor ein neuartiges binäres Reaktionssystem für die Polykondensation etabliert werden. Bei diesem System befinden sich die Monomere in der wässrigen Reaktionsphase, wohingegen das Produkt, der Polyester, in die organische Phase (Extraktionsphase) übergeht. In den folgenden Kapiteln wird die Beeinflussung von Kettenlänge und Ausbeute durch unterschiedliche Reaktionsparameter näher diskutiert werden.

4.1 Einphasiges System

Entscheidend für die Bewertung des binären Reaktionssystems ist der Vergleich mit dem konventionell eingesetzten einphasigen System anhand einer bereits untersuchten Reaktion. Die enzymatische Kondensation von Sebacinsäure mit 1,4-Butandiol schien hierzu geeignet (Abb. 4-2). Bereits 1994 berichteten Witt et al. über die Bioabbaubarkeit von Copolymeren auf Basis von Sebacinsäure und Diolen, hergestellt in lösungsmittelfreien Systemen[160]. Uyama et al. untersuchten ihrerseits den Einfluss von Reaktionsbedingungen auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol, katalysiert durch die Lipase B aus *Candida antarctica*[71]. Folglich handelt es sich bei der Kondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol um eine hinreichend untersuchte Reaktion, die zum Vergleich der beiden Reaktionssysteme geeignet ist[25, 38, 39, 161]. Die Polyestersynthese aus Glucose und Citronensäure dient als Modell für die Verwendung von hydrophilen Monomeren (Abb. 4-2). In den folgenden Kapiteln werden die Einflüsse diskutiert werden, die Umsatz, Kettenlänge und Polydispersität des Produktes bestimmen. Darüber hinaus sollen die Ergebnisse hinsichtlich der Anwendbarkeit des binären Reaktionssystems für Polykondensationsreaktionen betrachtet werden.

Modell 1:



Modell 2:

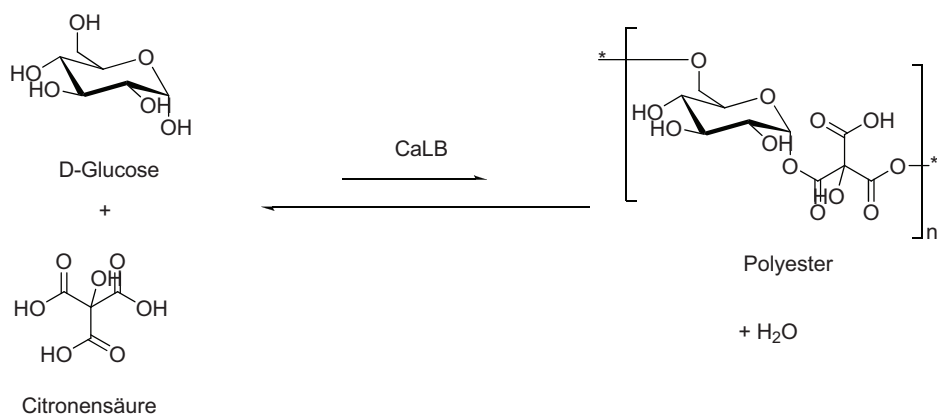


Abb. 4-2: Reaktionsschema der Modellreaktionen 1 und 2

4. Ergebnisse

Im Vergleich mit dem einphasigen System ist zu erkennen, dass die Kondensation im binären System ebenfalls effektiv ist (Tab. 4-1). Vergleichbare Umsätze können im bulk- und MTBE/ Puffer-System erzielt werden. Hervorzuheben ist der signifikante Unterschied zwischen DIPE als einphasigem (54%) und zweiphasigem (96%) System. Ebenso sind Unterschiede bei den erreichten Kettenlängen zu erkennen. Hohe Molekülmassen sind im binären MTBE/ Puffer-Gemisch zugänglich, wobei an dieser Stelle darauf hingewiesen werden muss, dass es sich hier mit 10 RU (Repeating Units) nur um Oligomere und nicht um wirkliche Polymere handelt. Die Molekülmassen, welche von Mahapatro et al. hergestellt wurden, konnten nicht reproduziert werden. Diese Gruppe konnten mittels der CaLB Polyester mit einer Kettenlänge bis $42.000 \text{ g mol}^{-1}$ in Diphenylether herstellen[161]. Hierzu waren allerdings Temperaturen von 70°C über einen Zeitraum von 3 Tagen notwendig, welche im binären System mit DIPE und MTBE aufgrund des Siedepunktes nur unter Druck möglich sind. Abgesehen vom Siedepunkt sind Temperaturen $> 70^\circ\text{C}$ in DIPE und MTBE nicht sinnvoll, da das Novozym® 435 bei Temperaturen $> 50^\circ\text{C}$ in diesen Systemen deaktiviert wird (Kap. 4.2.1, Temperatur).

Schon an dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass in einem binären Reaktionssystem die Molekülmasse des Produktes limitiert ist, was durch die Beschaffenheit des Systems hervorgerufen wird. Aufgrund des Verteilungskoeffizienten geht das Produkt nicht vollständig in die organische Phase über, weshalb die Gleichgewichtsverschiebung nicht so effektiv wie im Falle der Wasserentfernung ist. Da das Wasser ebenfalls in der organischen Phase zum Teil gelöst ist, kann die Rückreaktion folglich aufgrund des:

- Verteilungskoeffizienten des Produktes (ebenfalls abhängig von der Kettenlänge) und der
- Löslichkeit des Wassers in der organischen Phase

nicht vollständig unterdrückt werden. Das Ziel des binären Systems ist folglich in erster Linie, die Umsetzung von hydrophilen Monomeren zu ermöglichen, und erst in zweiter Linie, hohe Molekülmassen zu erreichen.

Tab. 4-1: Polykondensation von Sebacinsäure und 1,-Butandiol in verschiedenen Reaktionssystemen (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL, $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ Sebacinsäure, min. $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ 1,4-Butandiol, 10 %(w/w) Novozym® 435, 60°C , 200 U/min, 48 h)

System	Ausbeute /%	Molekülmasse /g mol ⁻¹
Einphasen-Systeme		
„bulk“ ¹ / Molekularsiebe	84 ± 3	2230 ± 40
Diisopropylether (DIPE)/ Molekularsiebe	54 ± 2	1830 ± 20
Zweiphasen-Systeme		
Diisopropylether (DIPE)/ Puffer (pH 6) ²	96 ± 4	1890 ± 30
Methyl- <i>tert.</i> -Butylether (MTBE)/ Puffer (pH 6) ²	86 ± 3	2520 ± 60

¹ „bulk“: Überschuss an 1,4-Butandiol (als Lösungsmittel)

² Citratpuffer (200mM, pH 6,0), Phasenverhältnis 1:1,

Mit den Ergebnissen aus Tabelle 4-1 ist die Verwendbarkeit des Reaktionssystems für die Polykondensation belegt und es kann daher in einem

4. Ergebnisse

zweiten Schritt auf hydrophile Monomere übertragen werden. Darüber hinaus lassen sich auch eher hydrophobe Monomere mit diesem Reaktionssystem effektiv synthetisieren. Hierbei stellt das zweiphasige System einen Vorteil im Hinblick auf die Aufarbeitung der Reaktionsmischung und der Polydispersität dar. Durch Abtrennung der organischen Phase und Entfernung des Lösungsmittels, z. B. durch Evaporation, ist die Isolierung des Produktes ohne Monomer- oder Katalysatorrückstände möglich. Die Molekulargewichtsverteilung bei der Umsetzung in binären Systemen ist sehr eng ($\leq 1,4$), was auf die definierte Verweilzeit der Kette zurückgeführt werden kann. Weiter erfordert das binäre System weder kostenintensive Vakuum-Apparaturen noch zu regenerierende Molekularsiebe. Die beiden Phasen können ohne weitere Aufarbeitung im Kreislauf gefahren werden.

Neben den oben diskutierten Monomeren, Sebacinsäure und 1,4-Butandiol, ist ebenfalls die Polykondensation von D-Glucose und Citronensäure als Modellreaktion für hydrophile Monomere betrachtet worden. Eine Kondensation in reinem organischen Lösungsmittel gestaltet sich kompliziert, da beide Monomere nahezu unlöslich in organischen Solventien sind. Es lässt sich hierbei vermuten, dass eine signifikante Massentransferlimitierung durch zum einen den langsamen Lösungsprozess der Monomere und zum anderen die anschließende Diffusion an den Träger der immobilisierten CaLB resultieren wird (zweifache Massentransferlimitierung). Bei Experimenten im einphasigen System wurde keine Polykondensation von Glucose und Citronensäure beobachtet. Im binären Reaktionssystem (MTBE/Puffer) hingegen konnten in ersten Versuchen bei 50°C Umsätze von 8 % bei der Verwendung der freien CaLB und über 11% bei der Verwendung des Novozyms® 435 erzielt werden.

Generell sei an dieser Stelle bemerkt, dass Blindversuche ohne Enzym für jedes in der Folge beschreibende Experiment durchgeführt wurden. In keinem dieser Experimente war eine Reaktion ohne den Biokatalysator detektierbar.

4.2 Zweiphasiges System

Wie im Kapitel 4.1 bereits angedeutet, ist das binäre Reaktionssystem vor allem für Polykondensationen von hydrophilen Ausgangsstoffen von Vorteil. Hierbei sind nicht nur die Wahl des Lösungsmittels von entscheidender Bedeutung, sondern auch andere Reaktionsparameter. Im Folgenden soll anhand der Modellreaktion von Sebacinsäure mit 1,4-Butandiol (Abb. 4-2) gezeigt werden, wie die Molekülmasse und der Umsatz bzw. die Ausbeute durch die Variation der Reaktionsparameter beeinflusst werden können. Die Reaktion von Glucose mit Citronensäure, welche in einem anschließenden Teil näher diskutiert werden wird, stellt ein Modell für hydrophile Monomer, besonders Zucker, dar.

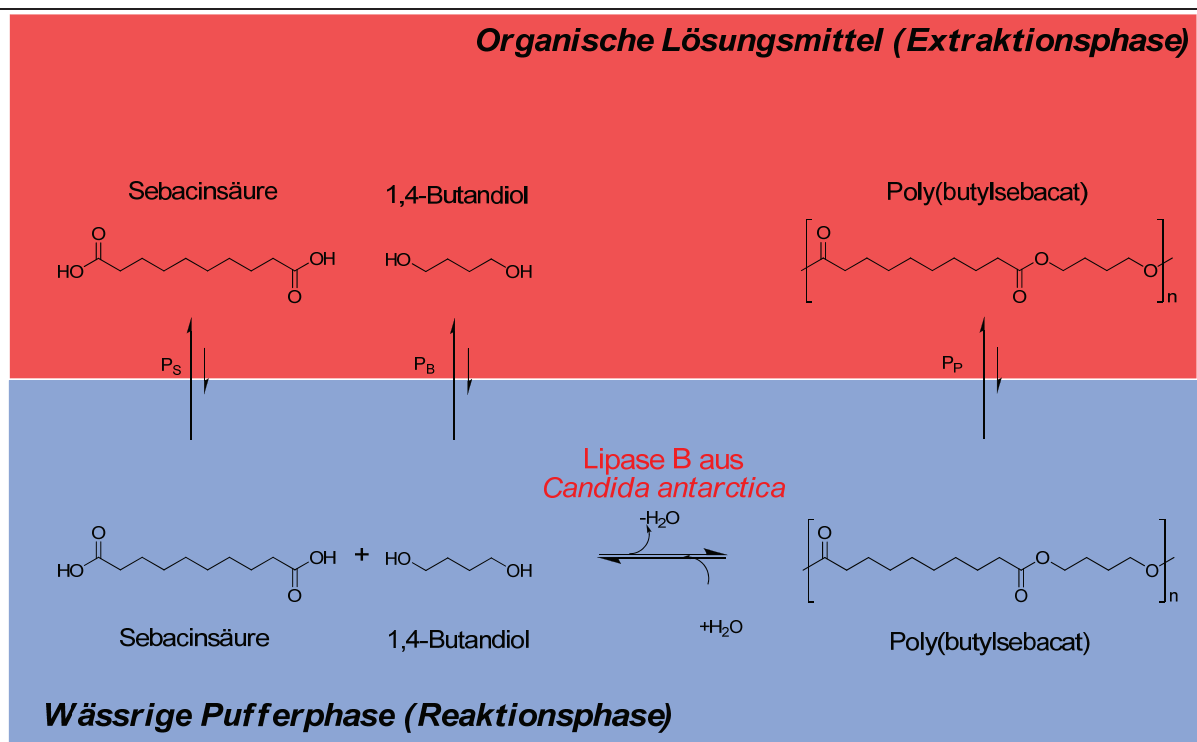


Abb. 4-3: Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol im binären System (Verteilungskoeffizienten von Sebacinsäure P_S , 1,4-Butandiol P_B und Poly(butylsebacat) P_P)

Abbildung 4-3 skizziert hierbei kurz die Reaktion des Modells 1 im binären Reaktionssystem. Die beiden Modellsysteme weisen in der Beschaffenheit der Monomere und damit deren Verteilung zwischen den Phasen große Unterschiede auf, die bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse miteinbezogen werden müssen. Hierfür werden die Verteilungskoeffizienten der Komponenten herangezogen.

4.2.1 Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol

Da es sich bei der Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol um eine bereits untersuchte Reaktion handelt, bei welcher keine verzweigten Produkte entstehen können, ist sie besonders geeignet, um den katalytischen Prozess zu studieren. Als wichtige Parameter, welche einen erheblichen Einfluss auf die Polykondensation haben, wurden die folgenden identifiziert:

- Das Extraktionsmittel
- Die Temperatur
- Der pH-Wert (der Reaktionsphase)
- Die Monomerstruktur

Bei der Bewertung der Einflussgrößen ist zu berücksichtigen, dass einige der Parameter lediglich Einfluss auf die Enzymaktivität und –stabilität nehmen, folglich auf die Reaktion an sich. Eine Vielzahl der Parameter, wie z.B. Extraktionsmittel und Temperatur, verändern aber neben der Aktivität auch die Verteilung der Komponenten zwischen den Phasen.

Das Extraktionsmittel

Der Nernstsche Verteilungssatz besagt, dass sich eine Substanz i in einem zweiphasigen System anhand der Differenz des chemischen Potentials beider Phasen verteilt. Eine solche Potentialdifferenz ist charakteristisch für ein gegebenes System und stellt bei festen Randbedingungen eine Konstante dar.

Für die effektive Polykondensation sollten die Randbedingungen so gewählt werden, dass eine hohe Monomerkonzentration in der wässrigen Phase und eine hohe Polyesterkonzentration in der organischen Phase vorliegt. Diese Polykondensation lässt sich effektiv durch die Wahl des Extraktionsmittels steuern, wie Abbildung 4-4 zeigt. Hierbei korrelieren die Ausbeute (graue Balken) und die Molekülmasse (rote Linie) nicht direkt mit dem $\log P$ -Konzept oder anderen physikalischen Eigenschaften, wie z.B. der Dielektrizitätskonstante. Die Ergebnisse scheinen eher mit der Potentialdifferenz in Verbindung zu stehen. Durch sie wird die Verteilung des Produktes zwischen Reaktions- und Extraktionsphase beeinflusst.

In binären Systemen, in denen das organische Lösungsmittel eine hohe Produktlöslichkeit zeigt, sind die Ausbeuten höher als in Lösungsmitteln mit geringer Löslichkeit (Tab. 4-2). Dieses lässt sich auf einen schnellen Transport des Polymers über die Phasengrenze in das Innere der organischen Phase zurückführen. Bei einem effektiven Transport von der Phasengrenze, wie er in Systemen wie Chloroform/ Puffer vorliegt, ist die geringe Kettenlänge des Polyesters erklärbar. Je schneller das Polymer über die Grenzfläche aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird, desto effektiver ist die Gleichgewichtsverschiebung (hohe Ausbeute). Gleichzeitig ist die Kettenlänge umso geringer, da die weitere Monomeranbindung durch den Abtransport unterbunden wird. Folglich korreliert die Molekülmasse mit dem **Massentransport des Polyesters** über die Phasengrenze. Systeme wie n-Hexan/ Puffer weisen eine zu geringe Affinität der organischen Phase zum Polyester

4. Ergebnisse

auf, weshalb in diesen Systemen eine effektive Gleichgewichtsverschiebung nicht stattfindet.

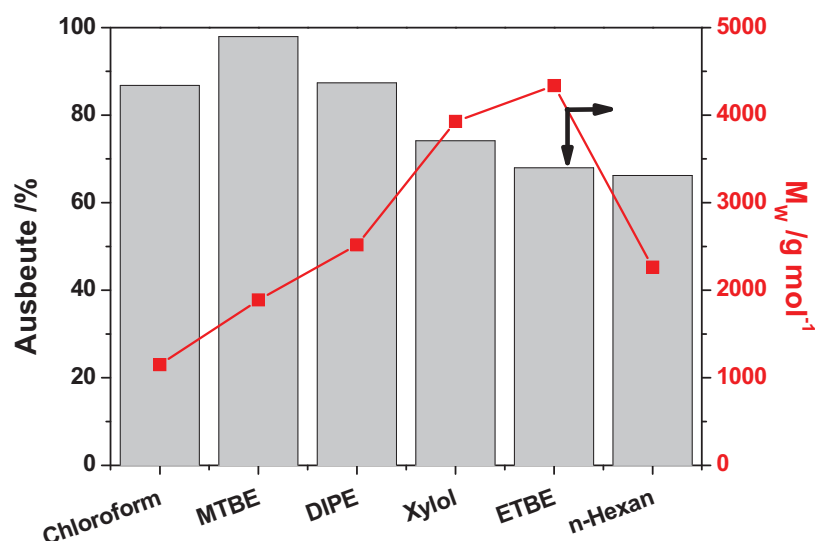


Abb. 4-4: Einfluss des Extraktionsmittels auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL, 0,1 mol L⁻¹ Sebacinsäure, 0,1 mol L⁻¹ 1,4-Butandiol, 10 %(w/w) Novozym® 435, 50°C, 200 U/min, 48h)

Wie bereits in Kapitel 4.1 angedeutet, wurden parallel Versuche ohne den Biokatalysator durchgeführt. Hieraus lässt sich die thermodynamische Gleichgewichtslage der Polykondensation im binären System bestimmen. In den Experimenten konnten nur geringe Mengen von Di- und Trimeren ermittelt werden. Der Umsatz im binären Reaktionssystem ohne Katalysator bewegte sich zwischen 2 % in MTBE und 4 % in n-Hexan. Da die Di- und Trimere sich ähnlich wie die Monomere zwischen den Phasen verteilen, konnte keine Gleichgewichtsverschiebung erzielt werden.

Tab. 4-2: Polyesterlöslichkeit in verschiedenen organischen Lösungsmitteln bei 25°C (Poly(butylsebacat))

Organisches Lösungsmittel	Polyesterlöslichkeit /g L ⁻¹
Chloroform	140
MTBE	110
DIPE	105
p-Xylol	100
ETBE	100
n-Hexan	45

Da Messungen der Phasentransfergeschwindigkeit nicht zugänglich waren, mussten aus den Löslichkeiten in der organischen Phase Rückschlüsse auf die Triebkraft gezogen werden, was zu Ungenauigkeiten aufgrund dieser Vereinfachung führt. Die Annahme ist, dass eine hohe Löslichkeit des Polyesters in der organischen

4. Ergebnisse

Phase zu einem schnellen Transport von der Phasengrenzfläche in das Innere der organischen Phase führt. Hierbei wird von einem schnelleren Transport als dem Kettenwachstum ausgegangen.

Es lässt sich folglich feststellen, dass bei der Polykondensation im binären System ein Kompromiss zwischen Ausbeute und Molekülmasse gefunden werden muss. Für folgende Untersuchungen werden MTBE und DIPE betrachtet, da in binären Systemen mit diesen Extraktionsmitteln sowohl annehmbare Ausbeuten wie auch moderate Molekülmassen erreicht wurden. In Experimenten zur weiteren Parameteranpassung sollen demnach sowohl Effekte auf Ausbeute wie auch auf die Kettenlänge deutlich werden.

Die Temperatur

Die **Reaktionsgeschwindigkeits-Temperatur-Regel** (RGT-Regel) nach Van't Hoff (1884) besagt, dass sich mit der Erhöhung der Temperatur um 10°C die Reaktionsgeschwindigkeit verdoppelt. Mit dieser Regel lassen sich Temperatureinflüsse auf enzymatische Reaktionen abschätzen. Darüber hinaus beeinflusst die Temperatur nicht nur die enzymatische Reaktion und deren Geschwindigkeit, sondern auch die Löslichkeit der Phasen ineinander sowie die Verteilung der Reaktanden.

Der thermischen Aktivitätssteigerung entgegen wirkt eine thermische Deaktivierung, welche mit steigender Temperatur zunimmt. Diese setzt sich im binären Reaktionssystem aus zwei Faktoren zusammen. Zum einen trägt die hohe Temperatur zur Proteinfaltung bzw. Denaturierung bei, zum anderen steigt mit der Temperatur auch die Löslichkeit der Phasen ineinander. Hierdurch ist das Enzym in höherem Maße dem organischen Lösungsmittel ausgesetzt. Anhand der Graphik 4-5 A sind diese beiden Effekte deutlich zu erkennen. Die Ausbeute kann in einem MTBE/Puffer-System von 78 % auf 98 % erhöht werden, wenn die Reaktionstemperatur von 30°C auf 60°C gesteigert wird. Jedoch ist der deaktivierende Effekt zu erkennen, wenn eine geringe Menge der Lipase verwendet wird. Bei 2,5 und 5 % (w/w) Novozym® 435 wird bei einer Temperatur über 50°C eine geringere Ausbeute erreicht als erwartet. Hieraus lässt sich schließen, dass die thermische Deaktivierung des Biokatalysators schneller erfolgt als das Erreichen des Endumsatzes der Polyester-synthese. Dieses kann durch die portionsweise Zugabe der CaLB umgangen werden, wie es in Abbildung 4-5 A mit den roten Balken angedeutet ist. Bei der Verwendung von mehr als 5 % (w/w) des Novozyms® 435, wird der Endumsatz erreicht, da bis zum Zeitpunkt nach 48 h nicht die gesamte Lipase deaktiviert ist. Der deaktivierende Effekt von Temperatur über 50°C war nicht erwartet worden, da die CaLB erst bei Temperaturen von > 60°C denaturieren sollte[98]. Kumar et al. führten Poly(ϵ -Caprolactam)-synthesen in verschiedenen organischen Lösungsmitteln mit Novozym® 435 bei 70 °C durch[162]. Auch in anderen Veröffentlichungen wurde effektiv unter ähnlichen Reaktionsbedingungen gearbeitet ohne dass eine Deaktivierung festgestellt wurde[64, 163, 164]. Allerdings stammen alle Arbeiten aus derselben Gruppe um R.A. Gross, was auf eine Besonderheit der Enzympräparation schließen lässt. Distel et al.[58] wie auch Rejasse et al.[165] und Chang et al.[166] berichteten hingegen von einer ähnlichen Deaktivierung des Novozyms® 435 ab 55°C[167, 168].

4. Ergebnisse

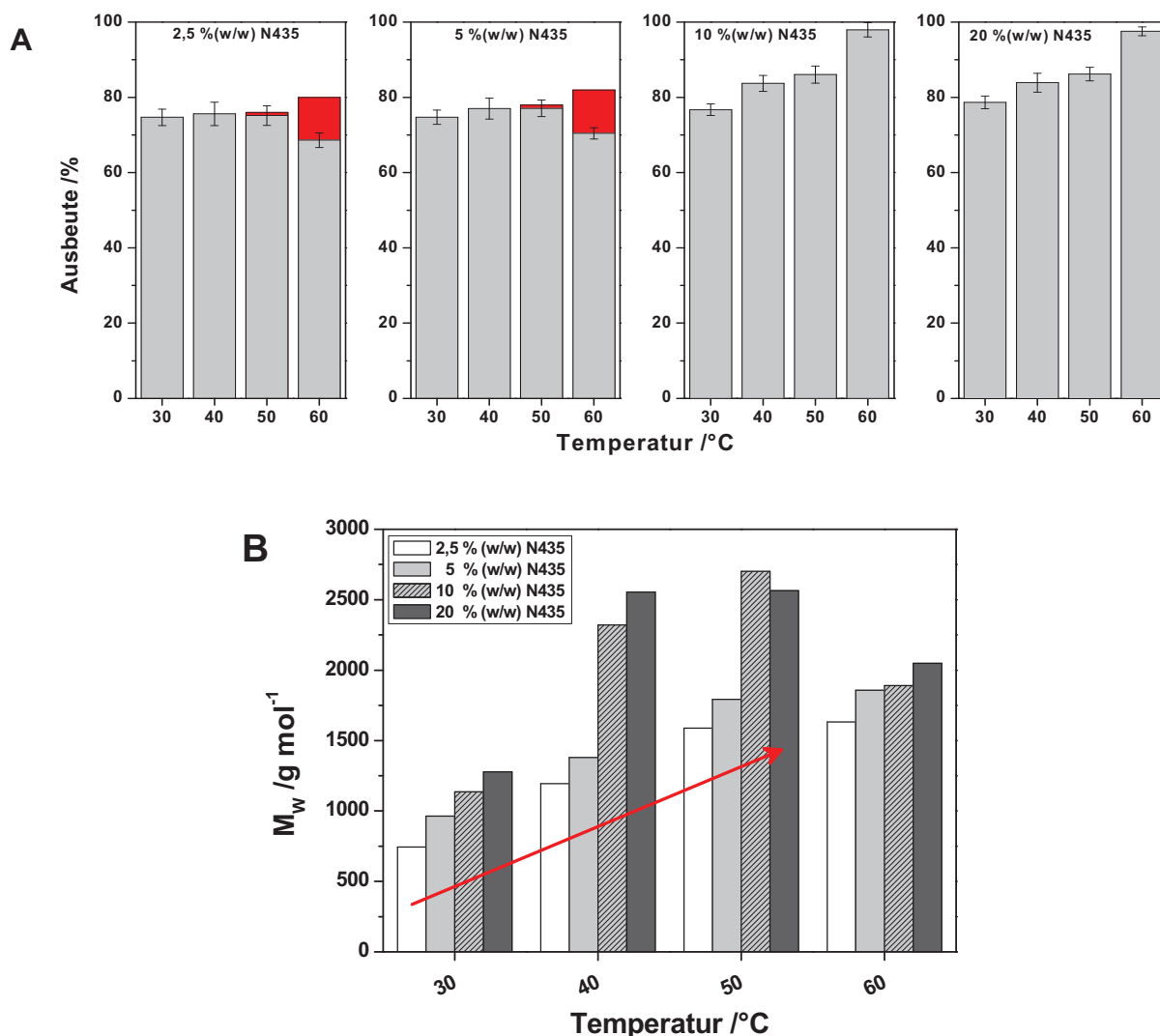


Abb. 4-5: Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol; A Ausbeute; B: Molekülmasse (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL (MTBE/ Puffer), 0,1 mol L⁻¹ Sebacinsäure, 0,1 mol L⁻¹ 1,4-Butandiol, 2,5 -20 % (w/w) Novozym® 435, 30-60°C, 200 U/min, 48h, rote Balken: Enzym in 4 Portionen zugegeben)

Darüber hinaus ist ein Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Molekülmasse zu beobachten. Dieser steht jedoch nicht nur mit der noch aktiven Enzymmenge in Verbindung, sondern auch mit der Verteilung der Systemkomponenten. Mit steigender Temperatur verändert sich nicht nur die Löslichkeit der Phasen ineinander, sondern auch die Verteilungsgleichgewichte für Monomere und Produkt.

Es ist bekannt, dass eine Erhöhung der Temperatur zu einer verbesserten Löslichkeit der zu lösenden Substanz führt, was auch hier der Fall ist. Die Affinität des Polyesters zur Extraktionsphase steigt mit der Temperatur. Folglich ist der Transport über die Phasengrenze bei 60°C schneller als bei 50°C, was sich in einer geringeren Molekülmasse niederschlägt. Die Ergebnisse sind durch die Nähe zum Siedepunkt des organischen Lösungsmittels nicht zu 100 % verlässlich, da während der Probenahme Lösungsmittel entweichen konnte. Dieses Verdampfen führt zu einer Volumenverringerng der organischen Phase, was ebenfalls den Verteilungskoeffizienten beeinflusst. Die Probenahme durch ein Septum minimierte

4. Ergebnisse

die Verdampfung des Lösungsmittels und führte zu denselben Ergebnissen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der Fehler bei den Probenahmen nicht für die obigen Ergebnisse verantwortlich ist.

Der pH-Wert der wässrigen Phase

Neben Extraktionsmittel und Temperatur ist auch der pH-Wert der Wasserphase ein wichtiger Parameter. Er beeinflusst auf der einen Seite die Aktivität und Stabilität der CaLB, auf der anderen Seite aber auch die Löslichkeiten aller Komponenten.

Ein signifikanter Effekt des pH-Wertes auf die Ausbeute des Polyesters konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb. 4-6), obwohl Aktivitätsmessungen einen deutlichen Einfluss des pH-Wertes auf die Lipaseaktivität zeigten (Kap.4.3.2). Hieraus folgt, dass nicht nur die Aktivität und Stabilität der Lipase für den Umsatz verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang scheint das binäre Reaktionssystem die Ausbeute des Polyesters thermodynamisch zu limitieren. Diese Schlussfolgerung legt die Annahme nahe, dass die organische Phase mit dem Polyester gesättigt bzw. die Potentialdifferenz klein ist und aus diesem Grunde nur eine sehr langsame Extraktion des Produktes erfolgt. Dies lässt sich durch die Masse des Polyesters in der organischen Phase begründen, welcher mit nahe an der Sättigungskonzentration liegt (vergleiche Tab. 4-2).

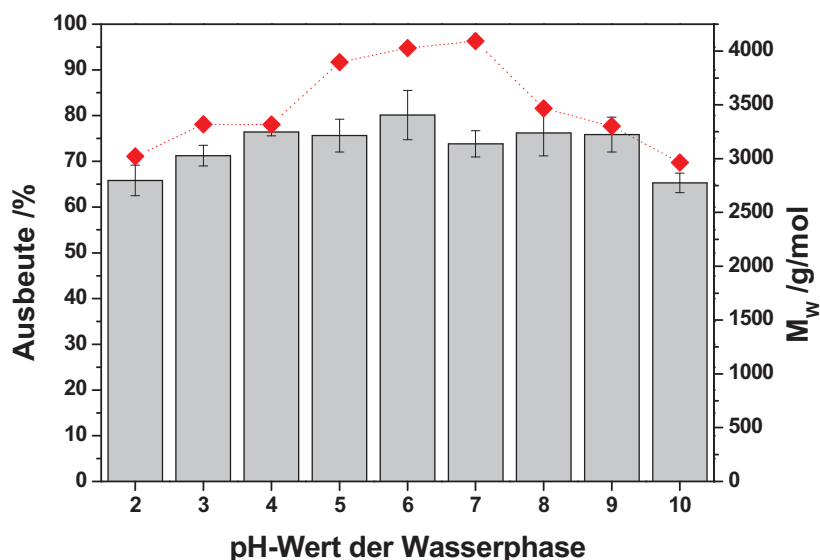


Abb. 4-6: Einfluss des pH-Wertes der Wasserphase auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL (MTBE/ Puffer), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Sebacinsäure, min. $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ 1,4-Butandiol, 10 % (w/w) Novozym® 435, 50°C , 200 U/min, 48h)

Daher sollte es möglich sein durch ein alternatives Phasenverhältnis α (mit $\alpha = C_{\text{Org.Phase}}/C_{\text{aq.Phase}}$) höhere Umsätze zu erreichen, da eine größere organische Phase ($\alpha > 1$) größere Konzentrationen bis zur Sättigung aufnehmen kann (größere Potentialdifferenz = höhere Triebkraft). Untersuchungen zu diesem Punkt weisen eindeutige Ergebnisse auf, die die obige Annahme zweifelsfrei beweisen. Es ist festzustellen, dass eine Volumenverdopplung der organischen Phase zu einer

4. Ergebnisse

Erhöhung der Ausbeute im neutralen pH-Bereich (pH 6-8) um ca. 10 % führt (Tab. 4-3).

Hierbei ist nicht nur von entscheidender Bedeutung, dass die Kapazität der organischen Phase für die Aufnahme des Polyesters nicht limitierend ist. Auch die Phasengrenzfläche ist hierfür von Bedeutung. Da die Phasengrenzfläche durch eine intensive, vertikale Schüttelbewegung jedoch immer maximal gehalten wurde, soll dieser Punkt nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.

Tab. 4-3: Einfluss des Phasenverhältnisses auf die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol

pH der Wasserphase	Ausbeute/ % ($\alpha=1$)	Ausbeute/ % ($\alpha=2$)
5	75	78
6	82	92
7	74	89
8	78	87
9	77	80

Die Puffersalze wirken sich auf die Produktausbeute aus, da die Aktivität der CaLB eine Abhängigkeit zeigt (vergl. Kap. 4.3.2). So ist die Ausbeute des Sebacinsäure-Butandiol-Polyesters beeinflussbar durch die Puffersalze bei pH 7. Unter der Verwendung eines Phosphatpuffers ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer) sind geringere Ausbeuten von um 75 % (bei pH 7) zu erreichen. In einem Phthalat-Puffer (pH 7) mit gleicher Pufferkapazität sind hingegen Ausbeuten von > 80 % erreichbar. Generell ist anzumerken, dass durch die Vergrößerung der organischen Phase die Polyesterausbeute um 5-10 % im pH-Bereich zwischen 6-8 gesteigert werden kann.

Die Molekülmassen der Produkte unterscheiden sich je nach pH-Wert der Wasserphase. Eine Begründung hierfür könnte der langsamere Phasentransfer im pH-Bereich zwischen 5 und 7 sein. Da eine Beeinflussung der Molekülmasse durch die Größe des Phasenverhältnisses verzeichnet werden konnte, ist diese Annahme plausibel.

Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass die Sebacinsäure mit ihren pK_A -Werten zwischen 4,55 und 5,52 in der deprotonierten Form vorliegt. Obwohl die Lipasen, laut Buthe et al., eher die protonierte Form der Säure als Substrat akzeptiert, erfolgt eine effektivere Umsetzung bei pH 6 [169]. Dies ist vermutlich darin begründet, dass saurere pH-Werte die Enzymkonformation beeinträchtigen. Anzeichen für die Denaturierung konnten bei sauren pH-Werten (pH < 5) beobachtet werden. Abgesehen von der Ladung der Säure muss auch die Ladung des aktiven Zentrums in Abhängigkeit vom pH berücksichtigt werden. Laut Neves-Petresen et al. besitzt das aktive Zentrum der CaLB erst ab pH-Werten oberhalb von 6 eine negative Ladung, was die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigt [101].

Die Wahl des Lösungsmittels, die Reaktionstemperatur und der pH-Wert sind anhand der Daten als wichtige Parameter bei der Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol festgestellt worden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Ausbeute und die Kettenlänge des Polyesters in komplexer Weise durch

4. Ergebnisse

verschiedene, einstellbare Parameter beeinflusst werden kann, wobei die Zusammenhänge nicht einfach zu durchschauen sind. Aufgrund dessen wäre der Einsatz von Methoden der Versuchsplanung sinnvoll. Erste Versuche hierzu waren allerdings nur bedingt erfolgreich, da die experimentellen Ergebnisse im Rahmen ihrer Standardabweichung auf dem bereits erreichten hohen Niveau keine signifikante Verbesserung für die Funktionen der Suchalgorithmen ergaben.

Die Monomerstruktur

Die Struktur der Monomere beeinflusst sowohl Ausbeute als auch Molekülmasse des Produktes. Es lässt sich erkennen, dass mit zunehmender Kettenlänge die Ausbeute des Polyesters steigt. Diese Beobachtung lässt sich sowohl für die Diole (von C3 zu C10) machen als auch bei den Disäuren (von C2 zu C10). Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Zum einen werden aus thermodynamischer Sicht die Polyester aus langkettigen Monomeren schneller in die organische Phase übergehen, da sie einen anderen Verteilungskoeffizienten aufweisen als die Polyester aus kurzkettigeren Monomeren. Darüber hinaus gibt es aber auch kinetische Einflussgrößen, die zu einem größeren Umsatz in der gleichen Zeit führen. Da die Lipasen bevorzugt langkettige Substrate umsetzen, wurde diese signifikante Tendenz erwartet[98, 170, 171]. Hinzu kommt, dass Lipasen sowohl durch den Alkohol als auch durch die Säure inhibiert werden. Mit zunehmender Kettenlänge sinkt die Löslichkeit der Monomere in der wässrigen Phase. Hieraus folgt, dass eine geringere Inhibitorkonzentration auf die Lipase einwirkt, was zu höheren Aktivitäten und damit Ausbeuten führt[100, 127, 168, 172]. Darüber hinaus ist auch die Kettenlänge des Alkohols von Bedeutung für den Inhibierungsgrad. Yadav et al. untersuchten die Abhängigkeit der Inhibierung der CaLB von der Kettenlänge des Alkohols und fanden heraus, dass je langkettiger der Alkohol, desto geringer die Inhibierung ist[173]. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse in Abbildung 4-7.

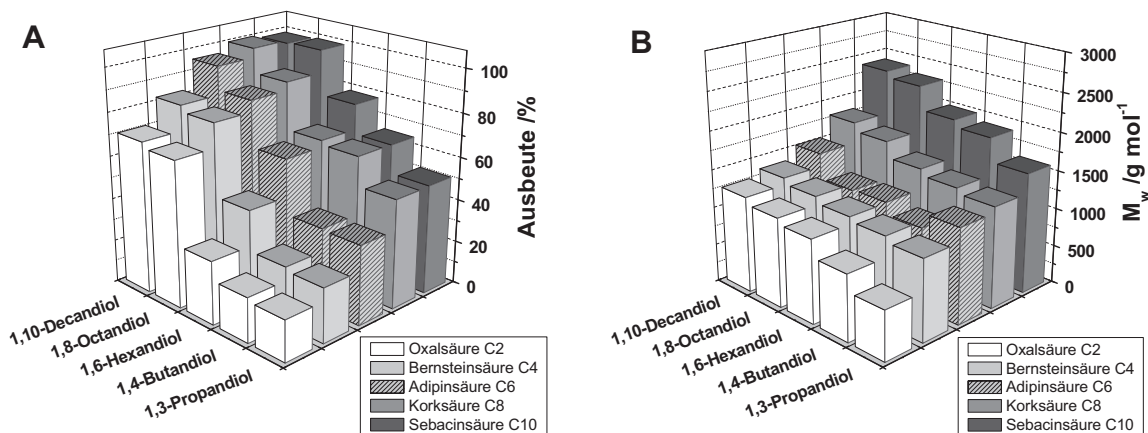


Abb. 4-7: Einfluss der Monomerstruktur auf die Polykondensation von Disäuren und Diolen (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL (MTBE/ Puffer), 0,1 mol L⁻¹ Sebacinsäure, min. 0,1 mol L⁻¹ 1,4-Butandiol, 10 % (w/w) Novozym® 435, 50°C, 200 U/min, 48h)

4. Ergebnisse

Neben der Inhibitorwirkung des Alkohols konnte bei den untersuchten Systemen ein stark deaktivierender Effekt der Disäuren festgestellt werden. Kinetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Inhibierung nicht nur auf die Struktur der Monomere zurückzuführen ist, sondern häufig durch ein starkes Absinken des pH-Wertes hervorgerufen wird. Die Pufferkonzentration der Wasserphase muss in Abhängigkeit von der Säurekonzentration angepasst werden, um ein Absinken des pHs zu verhindern und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die in Graphik 4-7 dargestellten Ergebnisse beinhalten eine solche Anpassung der Pufferkonzentration.

Es ist eine Erhöhung der Ausbeute mit steigender Kettenlänge der Disäuren zu erkennen, obwohl anhand der geringen Monomerkonzentration in der Wasserphase eine Massentransferlimitierung erwartet wurde. Es lässt sich schlussfolgern, dass längkettige Säuren, wie die Sebacinsäure, eher in das Substratspektrum der CaLB passen, da sie den natürlichen Substraten, den Fettsäuren, ähnlicher sind (vergl. Kap. 3.2).

Betrachtet man die mittlere Molekülmasse der Polyester, so ist kein deutlicher Effekt der Kettenlänge zu erkennen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden Mahapatoro et al. einen signifikanten Einfluss der Monomerkettenlänge auf das Molekulargewicht[161]. Ebenfalls Uyama et al. berichteten über eine Korrelation zwischen Diol- bzw. Disäurestruktur und dem Molekulargewicht des Produktes[71, 174, 175]. Sie ermittelten, dass mit steigender Kettenlänge der Monomere die Molekülmasse gesteigert werden konnte, wobei die Akzeptanz durch die CaLB für Ketten über C₁₀ (für Diol und Disäure) eine höhere Reaktionstemperatur erfordert. Da im binären Reaktionssystem eine solche Abhängigkeit des Molekulargewichtes nicht festzustellen ist, wird ein komplizierter Mechanismus vermutet. Die Verteilung der Monomere scheint ebenfalls die Molekülmasse des Polyesters zu beschränken.

Ein weiterer positiver Effekt des binären Reaktionssystems ist die enge Molekulargewichtsverteilung und damit die geringe **Polydispersität**. Bei den in diesem Kapitel diskutierten Untersuchungen bewegten sich die Polydispersitäten (Gl. 3-5) zwischen 1,2 und 1,4. Hieraus ist zu ersehen, dass die synthetisierten Oligomere sehr homogen sind.

Die Polykondensation im klassischen Reaktionssystem ermöglicht zwar die Synthese langkettigerer Polyester, aber die Polydispersität ist in den meisten Fällen nur schwer zu kontrollieren. In günstigen Fällen können PDIs von 2 erreicht werden, wie von Mahapatro et al.[69, 161]. Je diffuser die mittlere Molekülmasse ist, desto diffuser sind auch die Eigenschaften. Für die technische Nutzung wird folglich ein Polyester mit möglichst enger Verteilung benötigt. Davon abgesehen sollten die Reaktionen reproduzierbare PDIs ergeben, um die Qualität eines Produktes zu gewährleisten. All dieses ist durch den Einsatz eines binären Reaktionssystems möglich, da die Polydispersität nicht nur sehr klein, sondern auch reproduzierbar ist (Standardabweichung $\pm 0,02$).

Fazit

Die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol konnte im binären Reaktionssystem erfolgreich durchgeführt werden. Es haben sich verschiedene Einflussgrößen gezeigt, welche die Ausbeute und die Molekülmasse beeinflussen können:

- Die Polyesterlöslichkeit in der organischen Phase
 - Hohe Löslichkeit → hohe Ausbeute
 - Niedrige Löslichkeit → hohe Molekülmasse
- Deaktivierung bei Temperaturen $> 50^{\circ}\text{C}$
 - Denaturierung des Enzyms, bzw. leaching vom Träger
 - Phasenlöslichkeit erhöht
 - Verteilung der Substrate und Produkt beeinflusst
- neutraler pH-Wert der Reaktionsphase
 - deaktivierender Effekt von Phosphat
 - Sättigungsgrenze der organischen Phase erreicht
- Die Monomerstruktur
 - Inhibierung durch kurzkettige Monomere
 - Verteilung der Monomere und des Produktes

Die wichtigsten Parameter, welche man folglich für eine effektive Polykondensation im binären System kennen sollte, sind die **Verteilungskoeffizienten der Substrate** und des Produktes sowie die **Phasenlöslichkeit in Abhängigkeit von der Temperatur**.

4.2.2 Polykondensation von Citronensäure und Glucose

Bei der Polykondensation von hydrophilen Monomeren ist zu beachten, dass die Ausgangsstoffe eine geringe Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln aufweisen. Hieraus ergibt sich, wie im Kapitel 4-1 bereits angedeutet, ein Problem bei der Umsetzung mittels der klassischen Methodik. Das binäre Reaktionssystem erscheint hierbei als vielversprechende Alternative, um eine hohe Konzentration der Monomere im System zu gewährleisten.

Die Modellreaktion von D-Glucose und Citronensäure ist hierbei von besonderer Bedeutung, aber auch von besonderer Komplexität. Da sowohl Glucose als auch Citronensäure biokompatible Stoffe sind und aus nachwachsenden Rohstoffen gewonnen werden können, stellen derartige Ausgangsstoffe interessante Polymerkomponenten, vor allem für die Medizintechnik, dar. Nicht nur die Produkteigenschaften eines solchen Polyesters würden für biokompatible Beschichtungen wie auch für die Fixierung und gezielte Freisetzung von Wirkstoffen von Interesse sein (Sternberg 2007). Ein weiterer Vorteil eines solchen Polyesters wäre, dass die Degeneration des Polyesters zu Zersetzungsprodukten führen würde, welche für den Organismus im Allgemeinen verträglich sind.

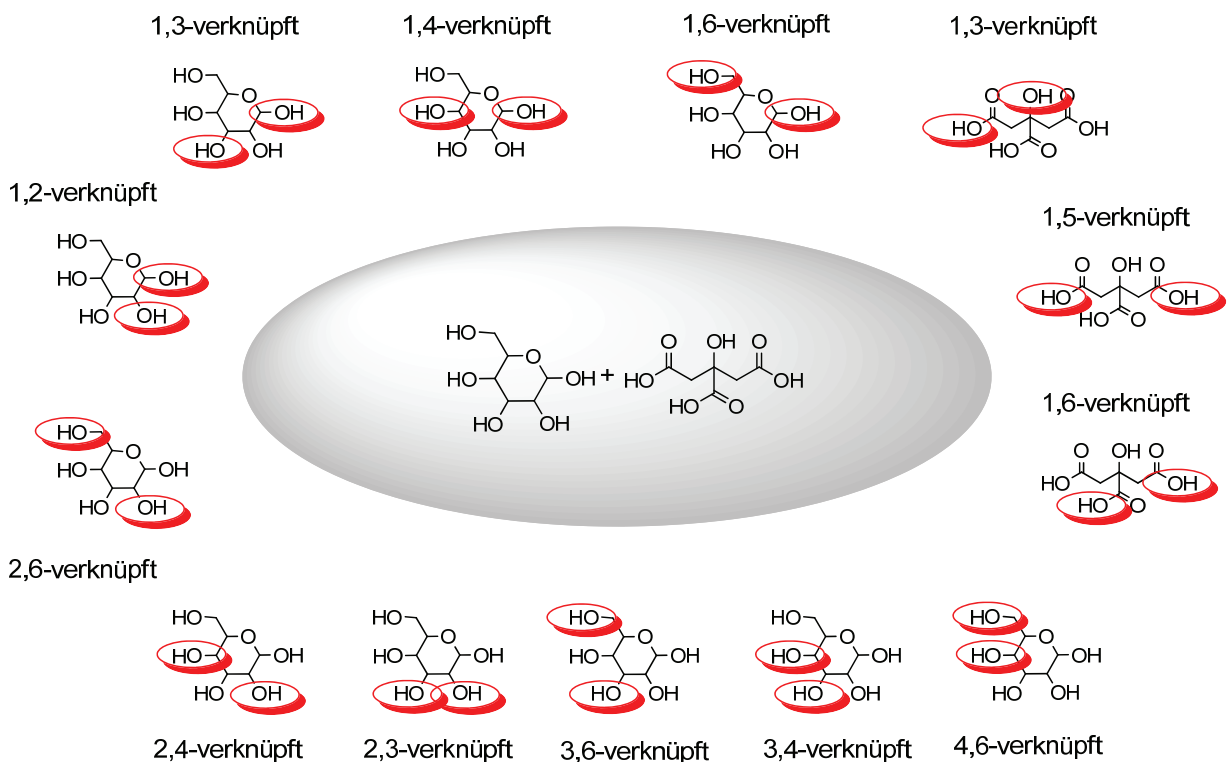


Abb. 4-8: Kombinationsmöglichkeiten von Glucose und Citronensäure bei der Polykondensation

Die Vielzahl von funktionellen Gruppen, welches aus medizintechnischer Sicht viele Möglichkeiten bietet, ist aus synthetischer Sicht eher problematisch. Auf chemischem Wege wären aufwendige Schützungs- und Entschützungs-schritte vonnöten, um die Reaktion an ausgewählten Gruppen zu steuern, was den Prozess

4. Ergebnisse

zeit- und kostenintensiv machen würde. Das Ziel der biokatalytischen Umsetzung im binären Reaktionssystem war die Produktion eines hoch symmetrischen Polyesters ohne die Blockierung einzelner Gruppen für den Angriff. Theoretisch ergeben sich die oben stehenden Möglichkeiten der Verknüpfung (Abb. 4-8). Im Kapitel 4.4.2 werden diese strukturellen Besonderheiten des Polyesters ausführlicher diskutiert werden. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass nur eine Art der Verknüpfung nachgewiesen werden konnte, bei welcher sich ein AABB-Polyester aus 1 Molekül Glucose und einem Molekül Citronensäure bildet. Dies wurde anhand der abnehmenden Monomerkonzentration im Verhältnis vermutet. Da die Monomerkonzentrationen sich in äquimolaren Mengen verändern, induziert dieses eine 1:1-Verknüpfung im Polyester. Mittels der massenspektroskopischen Untersuchungen konnte eine hoch symmetrische Struktur belegt werden, was im Kapitel 4.3.2 ausführlich diskutiert wird. Dieser Nachweis einer linearen Struktur ist von entscheidender Bedeutung für die Diskussion der nachfolgenden Parametereinflüsse, denn lineare Polymere weisen andere physikalische Eigenschaften auf als quervernetzte.

Das Extraktionsmittel

Wie bereits im Kapitel 4.2.1 angedeutet, hat die Wahl des Extraktionsmittels einen entscheidenden Einfluss auf die Polykondensation. Auch die Reaktion von Glucose und Citronensäure wird in Produktausbeute und Molekülmasse des Esters von der Polarität und der Extraktionswirkung der organischen Phase gesteuert. Im Rahmen der Untersuchungen zum Modell 1 konnte eine Abhängigkeit der Ausbeute sowie der Molekülmasse von der Polyesterlöslichkeit ermittelt werden. Das Modell 2 zeigt diese direkte Abhängigkeit nicht so deutlich. Zu erwarten war ein Umsatzanstieg mit steigender Löslichkeit des Polyesters in der organischen Phase. Mit steigender Löslichkeit erfolgt ein schnellerer Transport des Polymers über die Phasengrenzfläche in das Innere der organischen Phase. Dies wiederum führt gleichzeitig zu einer Verringerung der Kettenlänge aufgrund der verringerten Zeit der Kette in der organischen Phase.

Wie in Kapitel 4.2.1 sind die Lösungsmittel in der Graphik nach steigender Polyesterlöslichkeit von links nach rechts angeordnet (Abb. 4-9; DIPE: moderate Polyesterlöslichkeit; n-Hexan: niedrige Polyesterlöslichkeit). Analog zu den Poly(butylsebacat)-Ergebnissen verhalten sich Lösungsmittel mit mittlerer Affinität, wie die DIPE und MTBE. Die bessere Löslichkeit des Polyesters in diesen organischen Phasen resultiert in höheren Kettenlängen, wobei der Umsatz gering ist. Lösungsmittel mit hoher Affinität zum Polyester, d.h. in denen der Transport über die Phasengrenze schneller ist als das Kettenwachstum, konnten bei den Untersuchungen nicht gefunden werden. Dies ist vermutlich auf die vergleichsweise hohe Hydrophilie des Produktes zurückzuführen. Die Vielzahl von Hydroxygruppen ruft eine geringe Löslichkeit in Lösungsmitteln hervor, welche mit Wasser ein binäres System bilden. n-Heptan, Toluol, Chloroform und n-Hexan zeigen in der Löslichkeit des Polyesters keinen signifikanten Unterschied. Alle 4 Lösungsmittel weisen eine geringe Löslichkeit für den Polyester auf. Daher sind die vergleichsweise hohen Umsätze, für die normalerweise eine effektive Gleichgewichtsverschiebung benötigt ist, nicht wie im Fall des Modells 1 zu erklären.

4. Ergebnisse

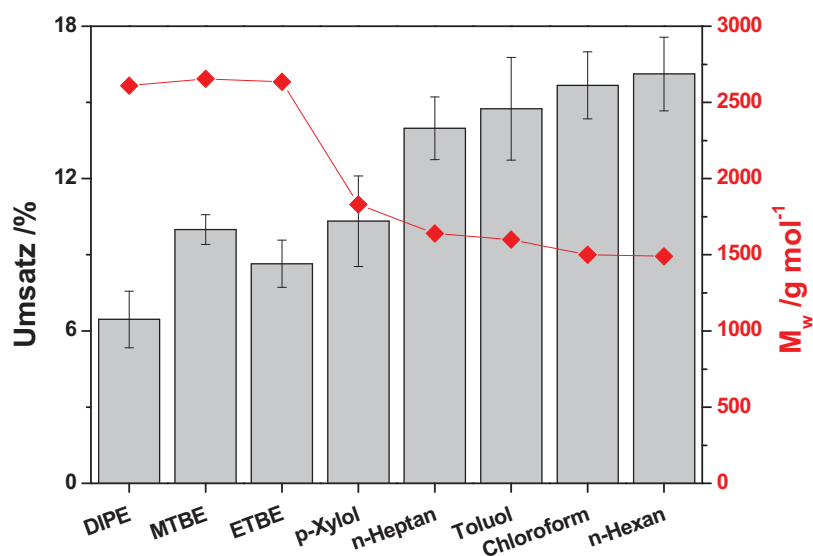


Abb. 4-9: Einfluss des Extraktionsmittels auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL (MTBE/ Puffer), 0,05 mol L⁻¹ Citronensäure, 0,05 mol L⁻¹ Glucose, 10 % (w/w) Novozym® 435, 40°C, 200 U/min, 96h)

Anhand der Reaktionsverläufe lässt sich ermitteln, warum die Ergebnisse nach 4 Tagen (Abb. 4-9) auf den ersten Blick nicht schlüssig erscheinen. Die oben erläuterte Theorie berücksichtigt die Gleichgewichtsumsätze, welche aber nach 4 Tagen noch nicht in allen Systemen erreicht sind. Abbildung 4-10 illustriert, dass in n-Hexan und Chloroform ein stationärer Zustand mit einem maximalen Umsatz von 16 % nach 3-4 Tagen erreicht wird. Dabei weist die Reaktion in Chloroform eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit als in n-Hexan auf, was mit der unterschiedlichen Aktivität der Lipase in diesen Systemen zusammenhängt.

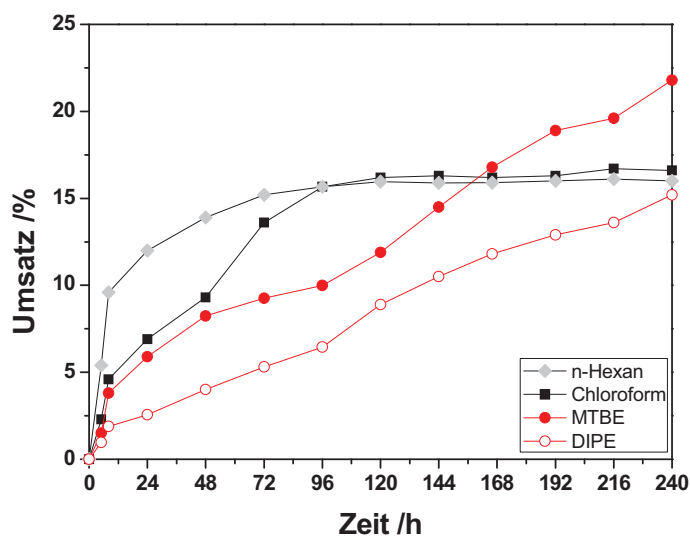


Abb. 4-10: Reaktionsverlauf der Polykondensation von Glucose und Citronensäure in verschiedenen Lösungsmitteln (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL (MTBE/ Puffer), 0,05 mol L⁻¹ Citronensäure, 0,05 mol L⁻¹ Glucose, 10 % (w/w) Novozym® 435, 40°C, 200 U/min, 240 h)

4. Ergebnisse

In 2-Phasen Systemen mit MTBE und DIPE verläuft die Kondensation langsam, da die Transfergeschwindigkeit des Produktes in die Extraktionsphase langsam ist. Die Reaktion kann deshalb nicht effektiv verschoben werden, denn die momentane Polyesterkonzentration in der wässrigen Phase ist zu hoch, um eine schnelle Reaktion zu generieren. Erwartungsgemäß sollte der Gleichgewichtsumsatz höher als im n-Hexan- und Chloroform-System sein, was in Abbildung 4-10 ersichtlich ist. Hieraus ist abzulesen, dass die in Kapitel 4.2.1 diskutierte Erklärung über die Korrelation von Umsatz und Molekülmasse mit der Phasentransfer-Geschwindigkeit für das Produkt auch auf das Poly(glucosylcitrat) übertragbar ist. Da aus Effizienzgründen der Endumsatz in den MTBE/ und DIPE/ Puffer-Systemen nur exemplarisch bestimmt wurde, soll dieser hier angegeben werden. Nach einer Reaktionszeit von ca. 21 Tagen wurden in den Systemen Umsätze von 36 % (DIPE) bzw. 38 % (MTBE) ermittelt. Die Molekülmasse des Produktes veränderte sich während der langen Reaktionszeit hingegen nicht und lag zwischen 2750 g mol^{-1} (MTBE) und 2700 g mol^{-1} (DIPE). Die Standardabweichung betrug $\pm 50 \text{ g mol}^{-1}$.

Die Synthese des Polyesters aus Glucose und Citronensäure verläuft dabei wesentlich langsamer als die Modellreaktion 1, was die Reaktionsgeschwindigkeiten deutlich machen (Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Reaktionsgeschwindigkeiten der Modellreaktionen 1 und 2 in binären Reaktionssystemen

Extraktionsphase	$V_{\text{binär}} \text{ (Modell 1) / mol h}^{-1}$	$V_{\text{binär}} \text{ (Modell 2) / mol h}^{-1}$
Chloroform	0,130	0,00350
n-Hexan	0,100	0,00600
MTBE	0,094	0,00300
DIPE	0,060	0,00125

Die Reaktionsgeschwindigkeiten, welche anhand der experimentellen Daten berechnet wurden, setzen sich aus der eigentlichen Reaktionsgeschwindigkeit der Polykondensation und der Phasentransfergeschwindigkeit zusammen. Weiterführende Arbeiten auf diesem Gebiet sind anzustreben, um genauer zu bestimmen, welcher der beiden Schritte limitierend ist. An dieser Stelle kann aus den Daten der Rückschluss gezogen werden, dass die Modellreaktion 1 im binären System mit höheren Raum-Zeit-Ausbeuten (Anhang Tab. 9-9) abläuft als die Polykondensation der hydrophilen Monomere. In Lösungsmitteln mit moderater Affinität zum Polyester (DIPE/ MTBE) ist die Reaktionsgeschwindigkeit besonders gering, wobei diese Extraktionsmittel höhermolekulare Oligomere liefern.

Nichtsdestotrotz sind die Möglichkeiten, die sich durch diese Art des Reaktionssystems ergeben, vielfältig.

Die hier aufgezeigten **Vorteile** sind:

1. Polykondensationen in wässrigen Reaktionssystemen durchzuführen und
2. Polykondensationen auch von hydrophilen Monomeren selektiv zu realisieren.

4. Ergebnisse

Abgesehen von den diskutierten Punkten soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass ein Abbruch der Reaktion nach 4 zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen kann. Da für die weiteren Untersuchungen DIPE und MTBE ausgewählt wurden, sollte diese Tatsache bei der Ergebnisdiskussion berücksichtigt werden.

Die Temperatur

Temperatureffekte bei chemischen Reaktionen, ob katalytisch oder spontan, sind hinreichend beschrieben. Bei der Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol im binären Reaktionssystem konnte bereits ein Zusammenhang zwischen Temperatur und Ausbeute bzw. Molekülmasse festgestellt werden. Die CaLB ist eine Lipase aus einem extremophilen Organismus und folglich lassen sich mit ihr auch Reaktionen unter Bedingungen katalysieren, die außerhalb des physiologischen Bereiches liegen. Yoshida et al. berichteten bereits 2006 über die katalytische Wirksamkeit der immobilisierten CaLB bei Temperaturen zwischen 60°C und 90°C[176]. Ebenfalls stellten Kumar et al. bei der Polymerisation von ϵ -Caprolactam fest, dass Temperaturen von 70°C geeignet sind[162]. Bei Durchführung der Reaktionen in Toluol konnten die Temperaturen bis 90°C erhöht werden. Die freie Lipase kann jedoch nicht bei derartigen extremen Temperaturen ohne Aktivitätsverlust verwendet werden. Um dies zu illustrieren, wurden sowohl die native CalB als auch das Novozym® 435 in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht (Abb. 4-11 und Abb. 4-12).

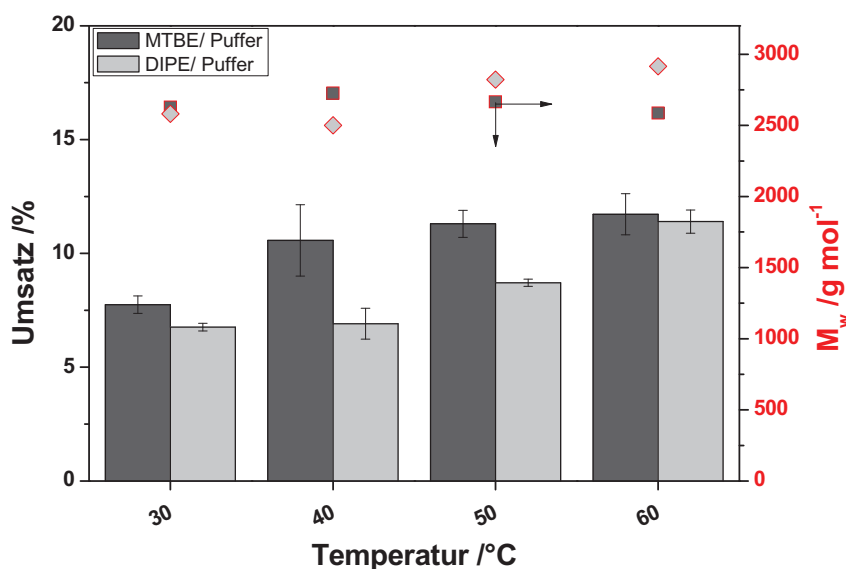


Abb. 4-11: Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels Novozym® 435 (Bedingungen Gesamtvolumen: 5mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol) (dunkelgrau) und DIPE/ Puffer (hellgrau); 0,05 mol Substrat; 10 %(w/w) N435; Reaktionszeit: 96h; $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen, Balken: Umsatz; Punkte: Molekülmassen)

Für die Polykondensation von Glucose und Citronensäure wurden die Untersuchungen sowohl in MTBE als auch in DIPE durchgeführt, um eventuelle Unterschiede zwischen diesen beiden Lösungsmitteln zu ermitteln. Aufgrund der

4. Ergebnisse

Siedepunkte von MTBE und DIPE war eine Steigerung der Temperatur über 60°C in den üblicherweise verwendeten Reaktionsgefäßen nicht sinnvoll. Versuche in druckstabilen Gefäßen bei 70, 80 und 90 °C lieferten keine neuen Erkenntnisse im Vergleich zu den Ergebnissen bei 60°C und werden deshalb nicht weiter diskutiert werden.

Das Novozym® 435 zeigt eine hohe Stabilität auch bei hohen Temperaturen. Bei Temperaturen oberhalb von 60°C sind ebenfalls keine signifikanten Verluste der Aktivität über den Reaktionszeitraum von 4 Tagen festzustellen. Die thermische Deaktivierung, welche im binären System für Modell 1 gefunden wurde, konnte im Falle dieser Polykondensation von Glucose und Citronensäure nicht bestätigt werden. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen auf eine Inhibierung der CaLB durch die Komponenten des Modells 1, Sebacinsäure und 1,4-Butandiol hervorgerufen wird. Da mit zunehmender Temperatur sich die Verteilungskoeffizienten sowie die Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte verändern, kann hierdurch eine Substratinhibierung sichtbar werden.

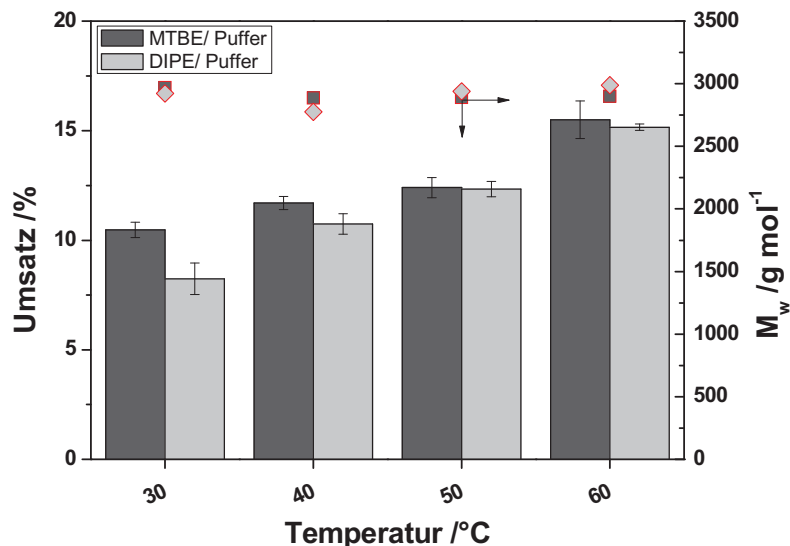


Abb. 4-12: Temperatureinfluss auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CaLB (Bedingungen Gesamtvolumen: 5mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol) (dunkelgrau) und DIPE/ Puffer (hellgrau); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CaLB; Reaktionszeit: 96h; $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen, Balken: Umsatz; Punkte: Molekülmassen)

In Folgeuntersuchungen hat sich herausgestellt, dass die hohe Substratkonzentration in der wässrigen Phase für eine Deaktivierung verantwortlich ist. Mit steigender Substratkonzentration erhöht sich der inhibierende Effekt von Alkohol und Säure auf die CaLB. Bereits Garcia-Alles und Gotor berichteten über die kompetitive Inhibierung der CaLB, genauer des Novozyms® 435, durch den Alkohol 1-Butanol[127, 177]. Hierbei handelt es sich um eine Blockierung der Bindungsstelle für den Acyl-Teil, was in einer Inhibierung resultiert. Darüber hinaus konnten Romero et al. eine Inhibierung durch kurzkettige Säuren (hier: Essigsäure) nachweisen, welche zu einem Teil auf das Substrat selbst zurückgeführt wurde und zum anderen Teil auf den Einfluss hoher Säurekonzentrationen auf den pH-Wert[178, 179]. Hydrophobe Säuren, wie die Sebacinsäure, konnten bisher nicht als Inhibitoren identifiziert werden, weshalb im Fall des Modells 1 die Inhibierung durch das 1,4-

4. Ergebnisse

Butandiol zu vermuten ist, welches sich zu einem nicht unerheblichen Teil in der wässrigen Phase löst (Anhang Abb. 9-3 bis 9-8).

Da die Citronensäure, als kurzkettige Säure, einen stark inhibierenden Effekt auf die CaLB besitzt, ist an dieser Stelle noch nicht zu klären, warum in Modell 2 keine Deaktivierung zu verzeichnen ist. Näherungsweise kann aber bereits hier mit dem Verteilungskoeffizienten argumentiert werden. Da mit steigender Temperatur die Löslichkeit der hydrophilen Ausgangsstoffe in der organischen Phase steigt, sollte eine Verringerung des deaktivierenden Effektes resultieren. Weitere Ergebnisse zu diesem Thema finden sich in Kapitel 4.3. Hier werden weitere Effekte dargestellt werden, welche mit den an dieser Stelle diskutierten Messungen nicht ermittelt werden konnten.

Bei einem Vergleich dieser Resultate mit den Ergebnissen der nativen CaLB lässt sich ein deutlicher Unterschied feststellen. Die Umsätze, welche nach einer Reaktionszeit von 4 Tagen erreicht worden sind, liegen im Falle der nativen CaLB um 2 % bis 4 % höher als in den Systemen mit immobilisierter Lipase. Das native Enzym zeigt keine Deaktivierung mit steigender Temperatur, da die Denaturierungstemperatur zwischen 50°C und 80°C, je nach pH, liegt. Anderson et al. berichteten über eine erhöhte Temperaturstabilität der CaLB bei niedrigen pH-Werten[98]. Da die Untersuchungen bei einem pH von 6,0 durchgeführt wurden, liegt die Denaturierungstemperatur, wie sich in den Untersuchungen auch zeigte, oberhalb von 60°C. Ein solcher Zusammenhang wurde bei der immobilisierten CaLB nicht gefunden.

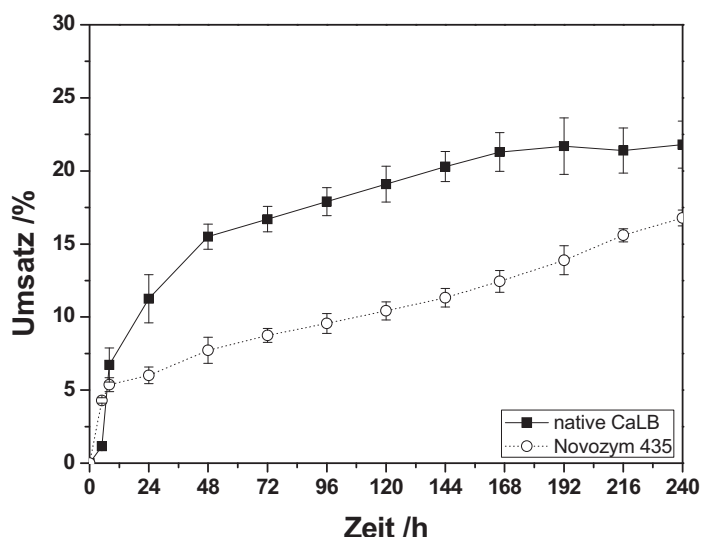


Abb. 4-13: Reaktionsverlauf der Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CaLB und Novozym® 435 (Bedingungen Gesamtvolumen: 5mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CaLB oder 10 %(w/w) Novozym® 435; Reaktionszeit: 240 h, 50°C, $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen)

Wie im Vorfeld bereits nachgewiesen, handelt es sich bei den Umsätzen nach 4 Tagen nicht um die maximalen Endumsätze. Aus Effizienzgründen konnte nicht für die Variation aller Reaktionsbedingungen die Reaktion bis zu ihrem Endumsatz (nach ca. 3 Wochen) verfolgt werden. Da das Ziel eine effektive Herstellung auch im technischen Maßstab beinhaltete, wurde darauf geachtet, in einer moderaten Zeit

4. Ergebnisse

den Umsatz zu maximieren und unnötige Kosten zu vermeiden. Der zeitliche Verlauf der Reaktion (Abb. 4-13), katalysiert durch die freie CaLB oder das Novozym® 435, illustriert die unterschiedliche Geschwindigkeit der enzymatischen Umsetzung. Das Novozym® 435 erweist sich bei gleicher eingesetzter Anfangsaktivität (Einwaage entspricht 100 U/ml) als weniger aktiver Katalysator. Dieses ist auf eine Massentransferlimitierung des Diffusionsprozesses des Substrates in die Peripherie der Lipase zurückzuführen.

Da die immobilisierte CaLB keine erkennbaren Vorteile im Hinblick auf Stabilität und Rezyklisierbarkeit aufweist, wurde die native CaLB als Katalysator für weitere Untersuchungen genutzt. Sie ermöglicht in vergleichbarer Zeit einen höheren Umsatz und ist damit effektiver. Da im Falle der Polykondensation von Glucose und Citronensäure der Umsatz nach 96 h lediglich bei ~ 15 % liegt, erschien die Verwendung der freien CaLB als Katalysator sinnvoll. Stabilitätsuntersuchungen der nativen CaLB ergaben darüber hinaus eine Restaktivität der CaLB im Reaktionssystem von > 40 % nach 4 Tagen. Bei einer portionsweisen Zugabe der gleichen Gesamtzymmenge in 4 Portionen alle 24 h lässt sich nach 4 Tagen noch eine Restaktivität von > 70 % ermitteln.

Die Molekülmasse der entstehenden Polyester wird nicht von der Reaktionstemperatur oder der Form des Biokatalysators beeinflusst. Die für das Modell 1 festgestellte Abhängigkeit der Molekülmassen von der Reaktionstemperatur, welche sich auf die Löslichkeit der Monomere in der wässrigen Phase zurückführen ließ, ist für Modell 2 nicht beobachtbar. Dieses liegt in den Verteilungskoeffizienten der Monomere begründet (Tab. 4-5). Da in dem untersuchten Temperaturbereich zwischen 30°C und 60°C 90 % bis 86 % der Monomere in der wässrigen Phase vorliegen, ist kein signifikanter Einfluss auf die Molekülmasse zu erkennen.

Tab. 4-5: Verteilungskoeffizienten von Glucose und Citronensäure in Abhängigkeit von der Temperatur

		Verteilungskoeffizient P	
		P _{Glucose}	P _{Citronensäure}
MTBE	30°C	0,1	0,09
	40°C	0,1	0,09
	50°C	0,17	0,16
	60°C	0,18	0,19
DIPE	30°C	0,13	0,12
	40°C	0,14	0,14
	50°C	0,14	0,14
	60°C	0,16	0,16

Generell ist aus den in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnissen die Schlussfolgerung zu ziehen, dass sich mittels Temperatur der Umsatz auf 15 % bei einer Reaktionszeit von 4 Tagen und auf > 20 % bei einer Reaktionszeit von 10 Tagen steigern lässt. Die Verwendung der freien Lipase wird favorisiert, da sie die

4. Ergebnisse

Reaktion mit einer höheren Geschwindigkeit ablaufen lässt, was mutmaßlich auf eine Massentransferlimitierung im Falle des immobilisierten Enzyms zurückzuführen ist. Eine Temperaturabhängigkeit der Molekülmasse konnte aus den bereits diskutierten Gründen für das Modell 2 nicht gefunden werden.

Der pH-Wert der wässrigen Phase

Der pH-Bereich, in welchem die meisten Enzyme die maximale Aktivität erreichen, liegt im Neutralbereich. Um die Abhängigkeit der Polykondensation von Glucose und Citronensäure vom pH-Wert der wässrigen Phase zu bewerten, wurde ein pH-Bereich zwischen 3 und 9 untersucht.

Da sich in Aktivitätsmessungen (Kap. 4.3.2) ein großer Einfluss der Puffersalze gezeigt hat, wurden um den Neutralbereich die Umsatzmessungen unter Veränderung der Puffersalze wiederholt. Eine erhöhte Aktivität der freien CalB in Phthalat-Puffer verglichen mit Phosphat-Puffer liefert nach 4 Tagen einen Umsatz 12 % statt 11% bei einem pH-Wert von 7. Hieraus folgt, wie auch aus dem Reaktionsverlauf hervorgeht, dass sich die Reaktion nicht im thermodynamischen Gleichgewicht befindet und der geringe Umsatz auf die geringe Reaktionsgeschwindigkeit zurückgeführt werden kann. Die Stabilität der Lipase ist nicht limitierend, da nach 4 Tagen noch mehr als 40 % Restaktivität vorhanden ist, was durch eine portionsweise Zugabe des Enzyms noch gesteigert werden kann.

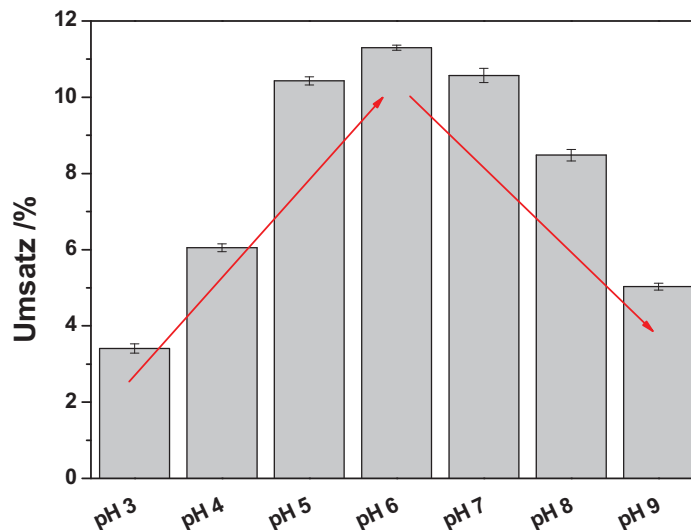


Abb. 4-14: Einfluss des pH-Wertes auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure (Bedingungen Gesamtvolumen: 5mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CalB; Reaktionszeit: 96h, 50°C, $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen)

Generell zeigt sich aber eine Abhängigkeit des Umsatzes von dem pH-Wert der Wasserphase (Abb. 4-14). Dieser Effekt ist ausgeprägter, als es im Modell 1 der Fall war. Der Grund hierfür ist die langsame Reaktionsgeschwindigkeit. Da sich die Reaktion nach 4 Tagen noch nicht im steady-state-Bereich befindet, lassen sich die hier präsentierten Ergebnisse nur bedingt mit dem Modell 1 vergleichen. Es ist

4. Ergebnisse

ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Reaktion vom pH-Wert der Lösung abhängt. Dies wiederum hängt mit der Aktivität der CaLB im jeweiligen System zusammen, worauf in einem späteren Kapitel noch näher eingegangen werden wird (Kap. 4.3.2). Bezüglich des Endumsatzes der Reaktion lässt sich festhalten, dass in einem pH-Bereich zwischen 5-8 vergleichbare Endumsätze erzielt werden können. Diese Ergebnisse zur Reaktionsgeschwindigkeit und zum Endumsatz korrelieren mit dem Modell 1.

Wichtig für eine großtechnisch anwendbare Synthese des Polyesters ist an dieser Stelle nicht der maximal erreichbare Umsatz, sondern die Produktivität bzw. Raum-Zeit-Ausbeute. Für diesen Zweck ist ein pH-Wert zwischen 5 und 7 geeignet. Buthe et al. ermittelten für die Veresterung von Propionsäure mit 1-Butanol katalysiert durch die Lipasen aus *Candida rugosa* (CRL) und *Thermomyces lanuginosa* (TLL) pH-Optima von 3.5 und 4.25[180]. Damit zeigen Lipasen für die Veresterung ein anderes pH-Optimum als für die Hydrolyse, die meist in schwach alkalischem Milieu bevorzugt abläuft. Dieser Zusammenhang kann auch für die CaLB gefunden werden, wie Graphik 5-14 zeigt.

Die Molekülmasse des Produktes bleibt im Falle der pH-Wert-Variation unbeeinflusst. Lediglich bei extremen pH-Werten < 4 und > 8 ist die Kettenlänge nach 4 Tagen kürzer als im übrigen pH-Bereich. Dies ist vermutlich auf die extrem langsame Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen, aus welcher eine geringere Kettenlänge resultiert.

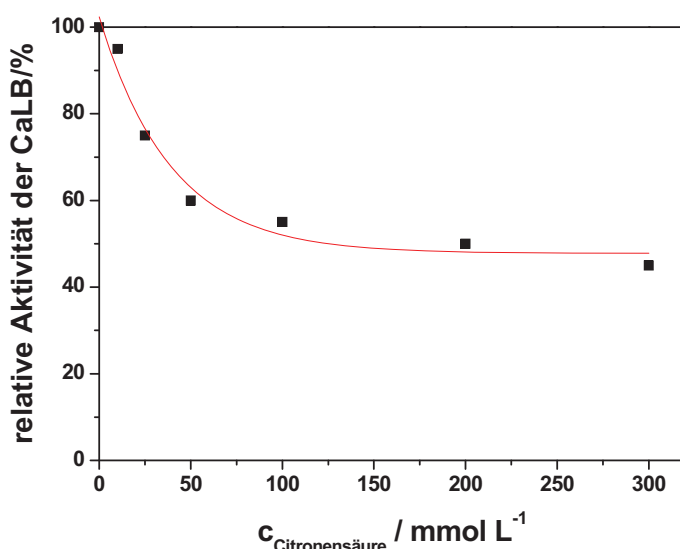


Abb. 4-15: Inhibierung der freien CaLB in Abhängigkeit von der Citronensäurekonzentration (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL MTBE/Puffer, 0,0 - 0,3 mol Citronensäure, 50°C, $\alpha = 1$, p-NPP-Assay)

Wie in Kapitel 4.2.1 festgestellt wurde, besteht ein Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und der vorliegenden Form der Säure. Es ist zu berücksichtigen, dass die Citronensäure mit ihren drei pK_A -Werten von 3,13, 4,76 und 6,40 überwiegend in der deprotonierten Form vorliegt. Nur eine der Säuregruppen liegt protoniert vor. Obwohl die CaLB, laut Buthe et al. eher die protonierte Form der Säure als Substrat akzeptiert, erfolgt eine effektivere Umsetzung bei pH 6[169]. Dies ist durch die

4. Ergebnisse

Gesamtladung des aktiven Zentrums zu erklären[101]. Dies ist vermutlich darin begründet, dass saurere pH-Werte die Enzymkonformation beeinträchtigen. Denaturierungserscheinungen konnten bei sauren pH-Werten beobachtet werden. Weiterhin ist bemerkenswert, dass der pK_A -Wert einer Gruppe so weit im Sauren (3,13) liegt, dass diese zu nahezu 100 % deprotoniert ist. Da aufgrund der massenspektroskopischen Untersuchungen bewiesen werden konnte, dass nur zwei der Säuregruppen sich an der Reaktion beteiligen, könnten die pK_A -Werte zur Erklärung herangezogen werden.

Durch die Einstellung des geeigneten pH der Wasserphase lässt sich folglich der Umsatz der Veresterung wiederum positiv beeinflussen und die Hydrolyse gleichzeitig zurückdrängen. Für weitere Untersuchungen wurde ein pH-Wert von 6,0 in der Wasserphase eingestellt, da sich bei diesem pH der höchste Umsatz verzeichnen ließ. Anstelle eines Phthalat-Puffers erfolgt die Einstellung des pH über einem Citrat-Puffer, da in diesem bereits eins der Monomere enthalten ist und folglich die Reaktion nicht durch zusätzliche Puffersalze gestört wird.

Nachteilig an dieser Variante ist die Inhibierung der CaLB durch hohe Citronensäurekonzentrationen (Abb. 4-15; vergl. Kap. 4.3.2), welche an dieser Stelle als Kompromiss in Kauf genommen werden muss.

Der Biokatalysator und seine Konzentration

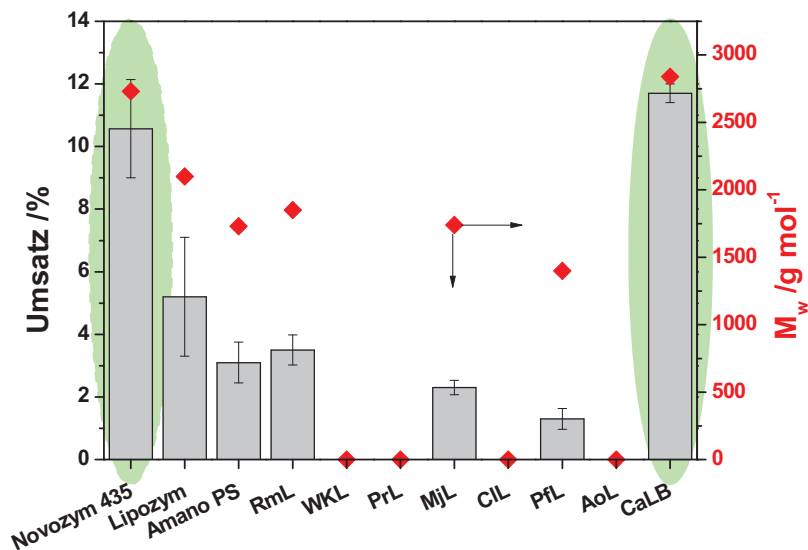
Neben den systemspezifischen Parametern, wie dem Extraktionsmittel, der Temperatur und dem pH-Wert, haben auch die Form des Biokatalysators (nativ oder immobilisiert) sowie seine Menge einen Einfluss auf die Kondensation. Die Struktur des aktiven Zentrums eines Enzyms ist dafür verantwortlich, wie gut nicht natürliche Substrate von ihm umgesetzt werden.

Wie bereits im Kapitel 3 erläutert wurde, besitzt die CaLB einen Kanal, in dem das katalytisch aktive Serin (Ser 105) sitzt. Die Substrate sind gezwungen durch den tiefen Kanal (12 Å) zur katalytischen Triade zu gelangen[129-132]. Aufgrund der hohen Hydrophobie des Kanals war eine schlechte Akzeptanz der Monomere durch die CaLB im Besonderen, aber auch durch Lipasen allgemein zu erwarten. Trotz der Beschaffenheit des aktiven Zentrums erwiesen sich sowohl Novozym® 435 als auch die freie CaLB als geeignete Biokatalysatoren. Es ist zu vermuten, dass das fehlende *lid* bei der CaLB einen Einfluss auf die Umsetzung hat, denn Lipasen besitzen durch dieses üblicherweise eine Grenzflächenaktivierung, welche der CaLB fehlt[132]. Aufgrund der Tatsache, dass Glucose und Citronensäure, wie die Verteilungskoeffizienten zeigen (Tab. 4-3), zum größten Teil in der wässrigen Phase vorliegen, ist die Umsetzung durch grenzflächenaktivierte Lipasen erschwert. Sie öffnen ihr aktives Zentrum zur organischen Phase, in welcher kaum Substrat vorhanden ist[135, 181, 182]. Hieraus folgt, dass Glucose und Citronensäure zwar schlechte Substrate für die CaLB darstellen, da sie hydrophil und voluminös sind (vergl. Kap. 3-2). Nichtsdestotrotz katalysiert diese Lipase die Polykondensation des Modells 2 mit den höchsten Umsätzen, verglichen mit den anderen ausgewählten Lipasen (Abb. 4-16).

In Abbildung 4-16 zeigt sich, dass andere Lipasen die Veresterung ebenfalls katalysieren, wobei dies zu geringeren Umsätzen und Molekülmassen $< 2000 \text{ g mol}^{-1}$ führt. Die Lipase aus *Rhizomucor miehei*, ist eine 1,3-spezifische

4. Ergebnisse

Triacylglycerinhydrolase und ihr aktives Zentrum ist für langkettige Substrate geeignet[109, 173, 183]. Wie schon bei der CaLB diskutiert, besitzt auch die RmL einen Kanal in dem das aktive Zentrum sitzt. Dieser hydrophobe Kanal ist dabei nahezu doppelt so lang bzw. tief wie der der CaLB. Vasel et al. beschrieben den Kanal mit einer Länge von 23,3 Å, was der Länge eine Fettsäure C₁₈ mit dem Kohlenstoffatom des Glycerols annähernd entspricht (Stearinsäure mit Glycerol 21,9 Å). Aus der Beschaffenheit des Kanals und der Grenzflächenaktivierung der RmL ist der Grund für den geringeren Umsatz ersichtlich[109].



immobilisiert: Novozym 435, Lipozym (Lipase aus *Rhizomucor miehei*), Amano PS (Lipase aus *Pseudomonas* sp.);

nativ: RmL (Lipase aus *Rhizomucor miehei*), WKL (Lipase aus Weizenkeimen), PrL (Lipase aus *Penicillium roqueforti*), MjR (Lipase aus *Mucor javanicus*), CIL (Lipase aus *Candida lipolytica*), Pfl (Lipase aus *Pseudomonas fluorescens*), AoL (Lipase aus *Aspergillus oryzae*), CaLB)

Abb. 4-16: Vergleich verschiedener Lipasen als Katalysatoren für die Polykondensation von Glucose und Citronensäure (Bedingungen Gesamtvolumen: 5mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CaLB; Reaktionszeit: 96h, 50°C, $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen)

Generell ist festzuhalten, dass freie Lipasen die Umsetzung schlechter zu katalysieren scheinen als die immobilisierten. Ausnahme hierbei ist die CaLB, die sowohl in freier wie auch immobilisierter Form die höchsten Umsätze liefert. Wie in vorherigen Abschnitten bereits beschrieben, ist die freie Form der CaLB sogar zu favorisieren, da sie eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit zeigt. Da bei den übrigen hier verwendeten Lipasen keine Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchung erfolgte, kann keine endgültige Aussage darüber getroffen werden, ob die geringen Umsätze durch Aktivitätsverlust und/oder Denaturierung hervorgerufen wurden. Die Bildung eines weißen amorphen Niederschlages während der Versuche mit WKL, PrL, MjR, CIL, Pfl und AoL indizieren aber eine Denaturierung, welche wahrscheinlich durch den direkten Kontakt zwischen nativem Enzym und dem organischen Lösungsmittel hervorgerufen wurde[115, 184-186]. Die RmL zeigte nur geringe

4. Ergebnisse

Denaturierungserscheinungen, verglichen mit den anderen Biokatalysatoren. Bei der nativen CaLB war im System MTBE/ Puffer keine Denaturierung (weißer Niederschlag) zu beobachten.

Abschließend ist die Aussage zu treffen, dass die CaLB aufgrund der Struktur ihres aktiven Zentrums und des fehlenden *lids* der geeignete Katalysator ist. Durch eine „Hydrophilierung“ oder „Aufweitung“ des Kanals, z.B. mittels gen shuffling oder directed evolution, könnte die Akzeptanz der Monomere noch verbessert werden. Da solche Modifikationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden und derartige Mutanten nicht kommerziell erhältlich sind, bleibt diese Annahme Anknüpfungspunkt für weiterführende Arbeiten.

Die Monomerkonzentration und das Monomerverhältnis r_0

Die Aktivität der CaLB ist, wie bereits erwähnt, von der Konzentration der Monomere in ihrer unmittelbaren Umgebung stark abhängig. Sowohl Alkohole als auch kurzkettige Carbonsäuren inhibieren die Lipase. Dieser Aktivitätsverlust während der Reaktion sollte in geringeren Umsätzen sichtbar werden, da in der gleichen Zeit nicht die gleiche Menge Edukt umgesetzt werden kann. Abbildung 4-17 verdeutlicht, dass mit steigender Glucosekonzentration der Umsatz nahezu konstant bleibt (blauer Pfeil). Dies legt die Vermutung nahe, dass Glucose einen geringen oder sogar keinen inhibierenden Effekt besitzt. Aktivitätsmessungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen und -verhältnissen untermauern diese Annahme (vergl. Kap. 4.3.2). Hingegen ist ein deaktivierender Einfluss der Citronensäure klar ersichtlich (roter Pfeil), auf welchen in Abb. 4-15 bereits hingewiesen wurde.

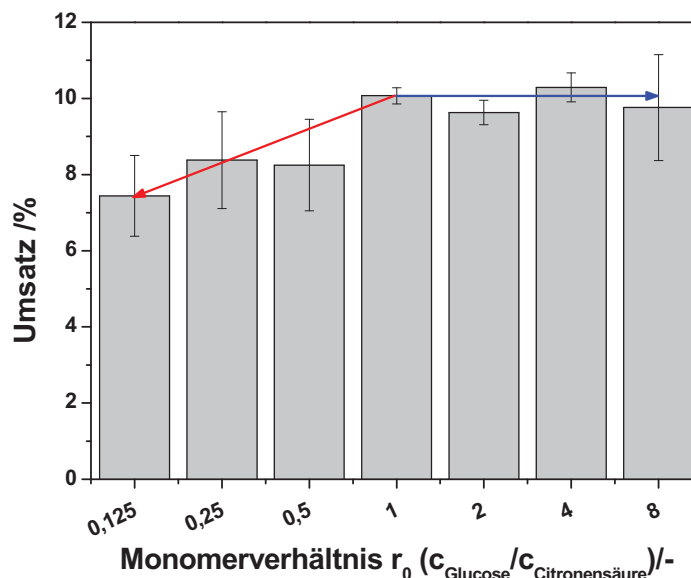


Abb. 4-17: Einfluss des Monomerenverhältnisses auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CaLB (Systeme: MTBE/ Puffer; 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CaLB; Reaktionszeit: 96h; $r_0=0,125-8$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen)

4. Ergebnisse

Bei einem r_0 -Wert (Konzentration Glucose/ Konzentration Citronensäure) von 0,125 liegt rein rechnerisch ein 8-facher Überschuss an Citronensäure vor, welcher in dem präsentierten System aufgrund des verwendeten Citratpuffers noch höher (10-fach) ist. Da in vergleichenden Experimenten in Phthamat-Puffer keine höheren Umsätze zu erreichen waren, kann darauf geschlossen werden, dass bei einem 8-fachen Überschuss von Citronensäure eine maximale Deaktivierung der CaLB vorliegt. Dies ist auch aus der Graphik 4-15 ablesbar.

Zur Diskussion der Ergebnisse muss noch ein weiterer Aspekt berücksichtigt werden. Bei hohen Konzentrationen von Citronensäure ist die Kapazität des 100 mM Puffers nicht mehr ausreichend, um den pH-Wert konstant bei 6,0 zu halten. Folglich muss die Pufferkonzentration der Substratkonzentration angepasst werden, um den entsprechenden pH zu halten. Der Effekt hoher Ionenstärken auf Proteine ist hierbei zu berücksichtigen[187]. Verzichtet man auf die Einstellung des Puffers zugunsten geringerer Ionenstärken, resultiert ein gravierenden pH-Abfall von 6,0 auf 2,4. Hiermit liegt das System außerhalb des pH-Optimums der CaLB und die Reaktion verlangsamt sich (vergl. 4.2.2 pH-Abschnitt). Gleichzeitig sinkt die Molekülmasse, da der Phasentransfer schneller als das Kettenwachstum ist. Alternativ hätte auch ein Autotitrator anstatt eines Puffers eingesetzt werden können, der aber für das vorgestellte binäre System nur bedingt geeignet war und aus praktischen Gründen nicht verwendet wurde.

Folglich kann an dieser Stelle nicht nur der Effekt der Citronensäurekonzentration betrachtet werden, sondern es muss die Kombinationswirkung aus zwei Effekten, Inhibitorkonzentration und pH-Einfluss, berücksichtigt werden.

Tab. 4-6: Einfluss von r_0 auf die Aktivität und den Umsatz der Polykondensation von Glucose und Citronensäure

r_0 ($c_{\text{Glucose}}/c_{\text{Citronensäure}}$)	Aktivität /U mL ⁻¹	Umsatz /%
0,125	0,102	7,44
0,25	0,123	8,38
0,5	0,154	8,25
1	0,200	10,07
2	0,203	9,63
4	0,214	10,29
8	0,209	9,76

Tabelle 4-6 ergänzt die obigen Ausführungen. Eine erhöhte Glucosekonzentration scheint keinen Einfluss auf die Aktivität der CaLB sowie auf den Umsatz zu haben. Hingegen führt die Erhöhung der Citronensäurekonzentration zu einer Verringerung der Aktivität, was sich wiederum negativ auf die Produktivität auswirkt. Weitere Informationen zur Inhibierung und Aktivierung der CaLB in diesem binären System sind im Abschnitt 4.3.2 über die kinetischen Einflussgrößen zu finden. In diesem Zusammenhang werden auch die Effekte, welche durch die Glucose verursacht werden, diskutiert.

Das Phasenverhältnis

Abschließend zur Modellreaktion 2 im binären Reaktionssystem soll das Phasenverhältnis ($V_{\text{organisch}}/V_{\text{wässrig}}$) betrachtet werden, welches bereits im Abschnitt 4.2.1 zur Umsatzerhöhung herangezogen wurde. Wie im Abschnitt über den Einfluss des Extraktionsmittels bereits angedeutet, ist die Differenz im chemischen Potential zwischen den Phasen von entscheidender Bedeutung für den Umsatz sowie die Molekülmasse. Da diese Potentialdifferenz die Geschwindigkeit des Transfers über die Grenzfläche und damit die Zeit des Kettenwachstums steuert, liegt die Vermutung nahe, dass eine größere Extraktionsphase höhere Extraktionsraten und damit eine effektivere Verschiebung des Veresterungsgleichgewichtes bewirken sollte. Gleichzeitig ist eine Verringerung der Molekülmasse zu erwarten.

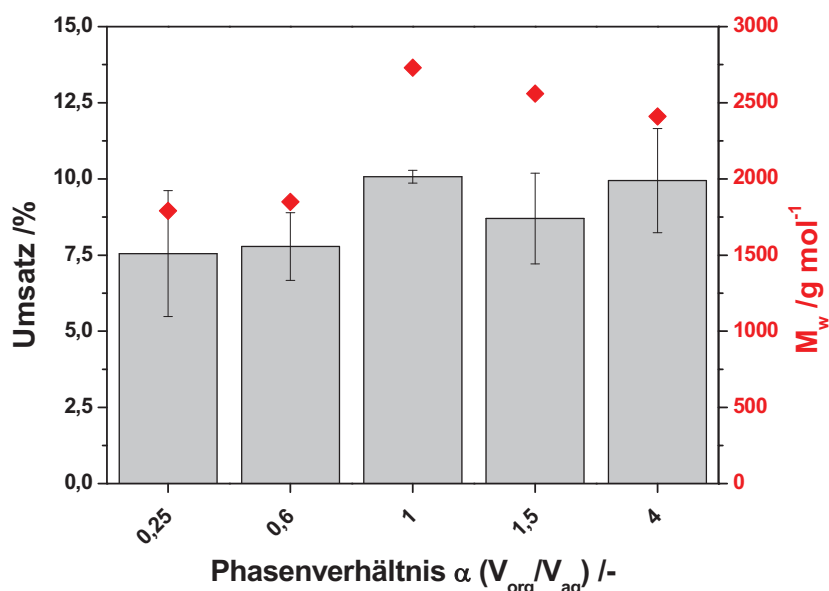


Abb. 4-18: Einfluss des Phasenverhältnisses auf die Polykondensation von Glucose und Citronensäure mittels nativer CalB (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL, Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CalB; Reaktionszeit: 96h; 50°C, $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen)

Der Zusammenhang zwischen dem Phasenverhältnis und dem Umsatz sowie der Molekülmasse ist aus den Ergebnissen nicht direkt zu erkennen und zeigt nur in Teilen den erwarteten Verlauf (Abb. 4-18).

Sowohl Umsatz als auch die Kettenlänge des Polyesters sind in Systemen, welche eine größere Wasserphase ($\alpha < 1$), besitzen, geringer als im Falle eines Phasenverhältnisses von 1:1. Dies war zu erwarten, da in diesen Systemen die Extraktionswirkung der organischen Phase aufgrund der volumenabhängigen Verteilungskoeffizienten geringer ist und somit das Reaktionsgleichgewicht weniger effektiv verschoben werden kann.

Für $\alpha > 1$ sollte eine bessere Extraktion des Produktes resultieren, was in diesem Fall nicht zu beobachten war. Der Umsatz bleibt verglichen mit $\alpha = 1$ innerhalb der Standardabweichung nahezu konstant. Diese große Standardabweichung, welche sich aus der Beschaffenheit des 2-Phasen Systems ergab, lässt eine genauere

4. Ergebnisse

Betrachtung der Unterschiede nicht zu. Dennoch ist festzuhalten, dass eine Vergrößerung der organischen Phase nicht den gewünschten Effekt hat.

Bezüglich der Molekülmassen ist bei größeren α -Werten kein Effekt ersichtlich, wohingegen eine Vergrößerung zu niedrigeren Molekülmassen führt. Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die Polykondensation im binären Reaktionssystem, wie es hier betrachtet wird, nicht mehr vom Phasentransfer limitiert wird, sondern von der Reaktion. Dies konnte durch Versuche zur Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Phasengrenzfläche untermauert werden. Lediglich die Vergrößerung der Wasserphase und damit die Verlängerung der Verweilzeit der Kette in der Reaktionsphase scheinen die Abbaureaktion der Kette zu begünstigen, was sich in geringeren Kettenlängen zeigt.

Verglichen mit den Ergebnissen vom Modell 1 (vergl. Tab. 4-3), bei welchem eine Umsatzsteigerung um ca. 10 % durch die Verdopplung des Phasenvolumens möglich war, ist hier kein signifikanter Zusammenhang zwischen α und dem Umsatz bzw. dem Molekulargewicht zu erkennen. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die organische Phase an dieser Stelle nicht mit dem Polyester gesättigt ist und die Reaktion den Umsatz und das Molekulargewicht begrenzt.

Die Monomerstruktur

Das verwendete Modell 2 stellt eine komplizierte Modellreaktion dar, da die Monomere an sich viele Verknüpfungsmöglichkeiten haben (Abb. 4-8) und es darüber hinaus noch ein Tautomerengleichgewicht gibt, dem die Glucose in Lösung unterliegt [188-190]. Zum besseren Verständnis der Reaktion war es vonnöten die Ergebnisse des Glucose/Citronensäure-Systems mit anderen Monomeren zu vergleichen. Abbildung 4-19 A zeigt die Ergebnisse der Zucker- bzw. Polyol-Variation, wobei Citronensäure als Disäure-Komponente konstant gehalten wurde. Die rechte Abbildung (B) illustriert die Resultate der Disäure-Variation, wobei Glucose als Monomer konstant gehalten wurde.

Die Verwendung von Disacchariden, als Alkoholkomponente, ermöglicht nur geringe Umsätze und Molekülmassen, da solche Monomere schlecht von der CaLB akzeptiert werden. Aufgrund der Struktur des aktiven Zentrums bzw. des Kanals zum aktiven Zentrum ist die katalytische Umsetzung solcher Substrate gehindert und das Kettenwachstum noch zusätzlich limitiert. Zuckeralkohole sollten von der CaLB besser umgesetzt werden, da das aktive Zentrum der CaLB für lineare Moleküle „konzipiert“ ist (vergl. Kap. 3-2). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, dass Umsatz und Molekülmasse des Polyesters im Falle des Sorbitols unter den Erwartungen liegen. Dies ist vermutlich auf den aktivierenden Effekt von Glucose und Fructose als Monomere zurückzuführen (Kap. 4.3.2). Sorbitol weist trotz einer Vielzahl von OH-Gruppen keinen aktivierenden, sondern einen deaktivierenden Effekt auf. Durch die lineare Form des Zuckeralkohols kann dieser zwar besser in das aktive Zentrum der Lipase gelangen, weist damit aber auch ähnliche Strukturmerkmale, wie lineare Diole, auf, und eine vergleichbare Deaktivierung wird hervorgerufen.

Zyklische Monomere, wie Fructose und Glucose, haben keine deaktivierende Wirkung auf die CaLB. Disaccharide auf der anderen Seite erscheinen zu voluminös für den Kanal der CaLB und werden daher kaum umgesetzt. Glucose kann mit verschiedenen Disäuren zur Reaktion gebracht werden, wobei es von Vorteil ist, wenn die Disäure eine ausreichende Wasserlöslichkeit besitzt. Sebacinsäure weist

4. Ergebnisse

eine geringe Wasserlöslichkeit auf, was zu einer Massentransferlimitierung der Reaktion über die Phasengrenze führt (Nachlieferung des Monomers). Adipinsäure hingegen liefert bessere Ergebnisse, da hier eine solche Limitierung nur schwach ausgeprägt ist. Oxalsäure als kurzkettige Säure zeigt ähnlich wie Essigsäure und Citronensäure einen stark deaktivierenden Effekt auf die Lipase, weshalb auch hier die Umsätze niedrig sind.

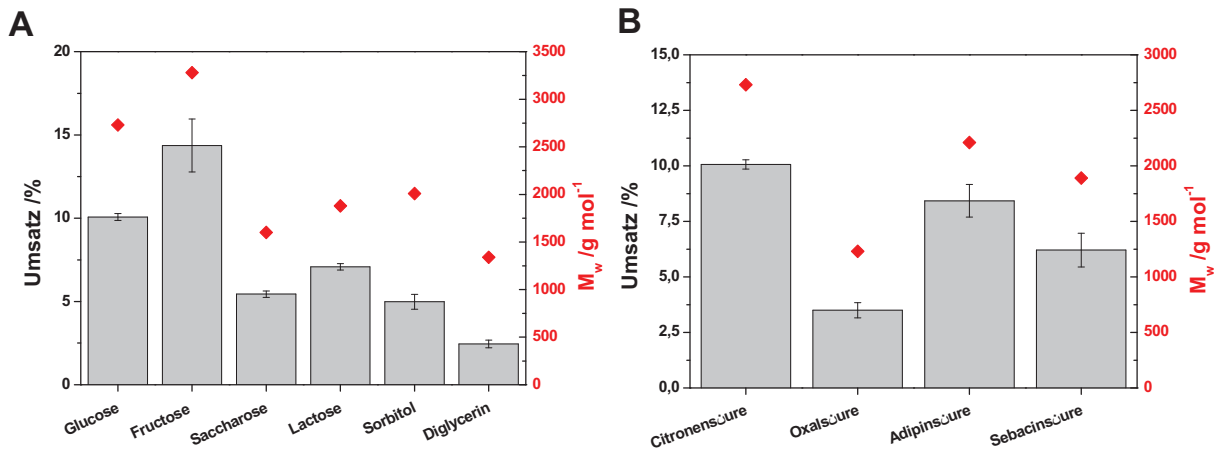


Abb. 4-19: Einfluss der Monomerstruktur auf die Polykondensation von Polyolen und Disäure mittels nativer CaLB (Systeme: MTBE/ Puffer (pH 6,0; 0,1mol); 0,05 mol Substrat, 100 U/ml native CaLB; Reaktionszeit: 96h; 50°C, $r_0=1$, $\alpha=1$, Mittelwerte aus min. 3 Messungen, Balken: Umsatz; Punkte: Molekülmassen)

Für die Kondensation der hydrophilen Monomere kann geschlussfolgert werden, dass Monosaccharide eine aktivierende Wirkung auf die CaLB besitzen, wohingegen gut wasserlösliche lineare Substrate das Enzym inhibieren.

Fazit

Die Polykondensation von Citronensäure und Glucose konnte im binären Reaktionssystem erfolgreich durchgeführt werden. Es haben sich verschiedene Einflussgrößen gezeigt, welche die Ausbeute und die Molekülmasse beeinflussen können:

- Die Polyesterlöslichkeit in der organischen Phase
 - Ether als Extraktionsphase ermöglichen die höchsten Molekulargewichte
- Deaktivierung durch Temperaturen
 - Deaktivierung des Novozyms® 435 ist auf Inhibitorkonzentration in der Wasserphase zurückzuführen und nicht auf thermische Denaturierung
- Schwach saurer pH-Wert der Reaktionsphase
 - deaktivierender Effekt von Phosphat
 - Form der Säure ist wichtig (deprotoniert/ protoniert)
- Biokatalysator
 - CaLB zeigt die besten Resultate wegen fehlender Grenzflächenaktivierung
- Monomer- und Phasenverhältnis
 - Citronensäure ist Inhibitor; Glucose aktiviert CaLB
 - Volumen der organischen Phase ist nicht limitierend für Umsatz (keine Sättigung mit Polyester)
- Die Monomerstruktur
 - Aktivierung der CaLB durch Monosaccharide
 - Inhibierung durch kurzkettige Disäuren
 - Monomere sollten in derselben Phase vorliegen (Massentransferlimitierung)

Die wichtigsten Parameter, welche man folglich für eine effektive Polykondensation im binären System kennen sollte, sind die **Verteilungskoeffizienten der Substrate** und des Produktes sowie die **Phasenlöslichkeit in Abhängigkeit von der Temperatur**.

In Spezialfällen, wenn die Reaktorauslegung und die Anpassung der Reaktionsparameter nicht den gewünschten Erfolg bringen, können **genetische Modifikationen des Enzyms** helfen, die Akzeptanz des Substrates zu verbessern.

4.3 Kinetische Betrachtungen

Zum Verständnis der Abläufe einer chemischen Reaktion ist neben der Kenntnis des Reaktionsverlaufes auch die Kenntnis des Mechanismus notwendig. Der Mechanismus nicht nur der Reaktion, sondern auch der anderen im Reaktionssystem ablaufenden Prozesse kann dazu beitragen, die Reaktionsparameter der Polykondensation so zu gestalten, dass Umsatz und Molekülmasse maximiert werden. Daher erschien es notwendig, den Mechanismus der Polykondensation im binären Reaktionssystem näher zu betrachten.

Wie in Abbildung 4-3 angedeutet, gibt es im binären Reaktionssystem neben dem Gleichgewicht der lipasen-katalysierten Veresterung noch die Verteilungsgleichgewichte der Komponenten. Tab. 4-7 soll verdeutlichen, welche Gleichgewichte berücksichtigt werden müssen und wie die bevorzugte Gleichgewichtslage für eine effektive Polykondensation aussieht.

Tab. 4-7: Gleichgewichte im binären Reaktionssystem

Gleichgewicht	Ideale Gleichgewichtslage auf Seiten	Gleichgewichtseinstellung
Reaktionsgleichgewicht	Produkte	schnell
Phasengleichgewicht S₁ (Glucose)	wässrig	schnell
Phasengleichgewicht S₂ (Citronensäure)	wässrig	schnell
Phasengleichgewicht P (Polyester)	organisch	moderat
Phasengleichgewicht E (CaLB)	wässrig	schnell
Löslichkeiten der Phasen ineinander	gering	schnell

Da unter realen Umständen nur in wenigen Ausnahmefällen ideale Bedingungen vorliegen, muss davon ausgegangen werden, dass nicht alle Gleichgewichte die ideale Gleichgewichtslage erreichen werden. Es soll mit Hilfe der folgenden Untersuchungen herausgefunden werden, was die Reaktion unter den gewählten Randbedingungen limitiert. Ziel ist es, das Gleichgewicht der Reaktion so zu beeinflussen, dass Umsatz und Molekülmassen maximal sind.

Betrachtet man die in Tabelle 4-7 stehenden Punkte, so fällt auf, dass ein großer Teil der Gleichgewichte bereits annähernd der idealen Vorstellung entspricht. Die Verteilung der Edukte S₁ und S₂ sowie die Verteilung der CaLB ist in den binären Systemen MTBE/ Puffer und DIPE/ Puffer zugunsten der wässrigen Phase verschoben, sprich sie liegen in der Wasserphase vor. Die Löslichkeit der Phasen ineinander in Abhängigkeit von der Temperatur ist ebenfalls gering, wobei eine Deaktivierung der Lipase nicht ausgeschlossen werden kann. Die Wasserlöslichkeiten liegen mit 42 g L⁻¹ (20°C) für MTBE und 12 g L⁻¹ (20°C) für DIPE

4. Ergebnisse

vergleichsweise hoch[191]. Die wichtigen Gleichgewichte, welche den geringen Umsatz und die geringe Molekülmasse bewirken, sind das Reaktionsgleichgewicht und das Extraktionsgleichgewicht des Polyesters.

Da sich in den Umsatzuntersuchungen eine Diskrepanz der Ergebnisse bei der Verwendung unterschiedlicher Enzymchargen gezeigt hat, sollen zuallererst die Reinheit und Zusammensetzung des verwendeten Rohextraktes diskutiert werden. Hieraus ergeben sich Schlussfolgerungen, die für die Interpretation der Aktivitäts- und Stabilitätsmessungen von entscheidender Bedeutung sind.

Anschließend werden die Einflüsse auf die Enzymaktivität diskutiert werden. Hieraus kann man zum einen Rückschlüsse auf den Mechanismus der Reaktion ziehen und darüber hinaus Limitierungen des binären Systems aufdecken.

4.3.1 Reinheit des Rohextraktes

Bei den Reaktionen, welche in den vorherigen Kapiteln diskutiert wurden, ist ein Rohextrakt der Firma Julich Chiral Solution (heute Teil von Codexis, Jülich, Germany) verwendet worden. Die Verwendung isolierter Lipase ist in den meisten Fällen schwierig, da die Isolierung sehr aufwendig oder sogar nicht möglich ist, da sich die Komponenten des Rohextraktes zu sehr ähneln. Aus Kosten- und Aufwandsgründen wird daher bei dem Einsatz von Lipasen meist auf eine Aufreinigung verzichtet. Nichtsdestotrotz ist eine Reaktion katalysiert durch einen Rohextrakt nicht leicht zu interpretieren, da Nebenaktivitäten berücksichtigt werden müssen.

Eine Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung der in dem Rohextrakt enthaltenen Proteine nach ihrer Größe. So ist eine Einschätzung möglich, welche Proteine außer dem gewünschten noch enthalten sind. Die Intensität der Banden korreliert dabei mit der Menge des Proteins und ermöglicht eine Abschätzung der Mengenverhältnisse. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung enthält der verwendete Rohextrakt zum größten Teil ein Protein mit einer Molekülmasse von ungefähr 33-35 kDa, was der CaLB entspricht (Abb. 4-20). Darüber hinaus ist zu erkennen, dass eine Vielzahl anderer Proteine mit niederen und höheren Molekülmassen enthalten ist.

Die Proteinbanden bei 20 und 60 kDa, welche durch die intensive Färbung auf eine vergleichsweise hohe Konzentration hinweisen, konnten nicht zugeordnet werden. Es ist aber zu erkennen, dass die beiden dargestellten Rohextrakte unterschiedlicher Herkunft (Cognis, 2 und Codexis, 3) ein ähnliches Proteinspektrum zeigen. Neben- oder Queraktivitäten sollten folglich in beiden Chargen in ähnlicher Weise auftreten und zu ähnlichen Ergebnissen führen. Anzumerken ist darüber hinaus, dass die CaLA, der andere Lipasetyp aus *Candida antarctica*, nicht im Rohextrakt enthalten zu sein scheint, da eine entsprechende Bande bei 45 kDa nicht zu erkennen ist.

Die wichtige Aussage, die aus dieser Untersuchung zu erhalten ist, ist das Vorhandensein anderer Proteine im Rohextrakt, bei welchen es sich ebenfalls um Lipasen handeln kann. Hieraus lässt sich ermesen, dass die Reaktion und ebenfalls die Aktivitätsbestimmung nicht nur auf das gewünschte Protein, sondern auf die Mischung zu beziehen sind.

4. Ergebnisse

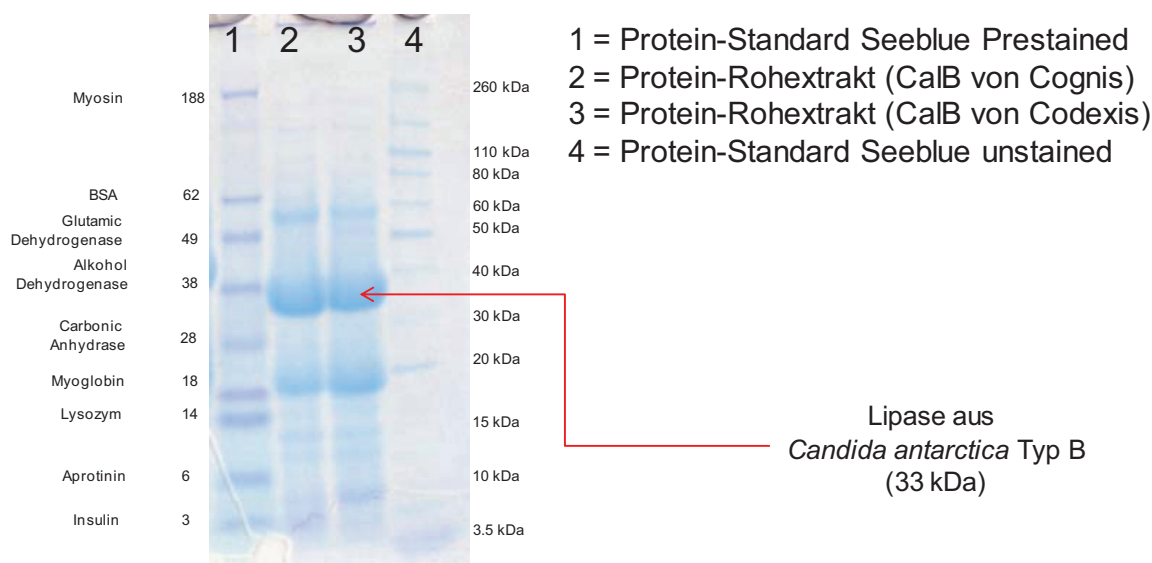


Abb. 4-20: Gelelektrophorese der beiden Rohextrakte mit Standards

Der Gesamtproteingehalt des Rohextraktes, ermittelt über den Bradford-Assay zur Proteinbestimmung, zeigte eine Proteinkonzentration von 14 mg mL^{-1} (Codexis) bzw. 10 mg mL^{-1} (Cognis). Unter Berücksichtigung des hohen Verdünnungsfaktors lässt sich die generelle Aussage treffen, dass die Rohextraktchargen miteinander vergleichbar sind; nicht nur hinsichtlich ihrer Proteinzusammensetzung, sondern auch bezüglich des Gesamtproteingehaltes. In Aktivitäts- und Stabilitätsuntersuchungen wurden jedoch große Unterschiede zwischen den beiden Chargen festgestellt, die durch die vorhergehend erläuterten Ergebnisse nicht zu erklären waren.

Aus diesem Grund schlossen sich HPLC- und GPC-Messungen der Rohextrakte an die Untersuchung der Zusammensetzung an. Mit einer derartigen Analyse sollten Zusätze, welche das Protein bzw. die Proteine aktivieren oder stabilisieren, nachgewiesen werden. HPLC-Messungen auf niedermolekulare Zusätze ergaben keine neuen Erkenntnisse, wohingegen GPC-Messungen aufschlussreiche Daten lieferten. In dem Rohextrakt der Firma Cognis konnte der Zusatz eines Polymers nachgewiesen werden (Anhang Abb. 9-8). Der Zusatz von Polyethylenglycol zur Stabilisierung von Proteinen ist eine bekannte Technik[85]. So wird Poly(ethylenglycol) bei der Lyophilisation von CaLB zugesetzt, um die Aktivität des freien Enzyms in organischen Lösungsmitteln zu erhöhen[192]. Auch für die Aufreinigung von aktiven Enzymen in wässrigen 2-Phasen Systemen ist der Einsatz von PEG beziehungsweise PEG-ähnlichen Substanzen beschrieben[193]. Hieraus lassen sich die höhere Stabilität und die geringe Aktivität gegenüber den Modellsubstraten Glucose und Citronensäure erklären. Da es sich bei Polyethylenglycol (PEG) um ein Diol handelt, stellt es ebenso ein Substrat für die CaLB dar. Sahoo et al. berichteten über die Polymerisation von Sebacinsäure und PEG-Diolen unterschiedlicher Molekülmasse bei 70 °C [194]. Bereits vorher veröffentlichten auch Kumar et al. Arbeiten, die die Verwendung von PEG als Substrat beschrieben[195-197].

4. Ergebnisse

Da keine weitere Aufklärung der Struktur des gefundenen Zusatzes durchgeführt wurde, bleibt die Annahme, dass PEG eingesetzt worden ist, eine Vermutung. Die in 4.2 diskutierten Ergebnisse wurden mit dem Rohextrakt der Firma Codexis erhalten, weshalb der Zusatz in der anderen Charge keinen Einfluss auf die Ergebnisse hatte.

4.3.2 Polykondensation von Glucose und Citronensäure

Der Mechanismus der lipasen-katalysierten Veresterungs- bzw. Hydrolyse-reaktion ist in der Literatur bereits beschrieben [90, 172, 198]. Es handelt sich um einen **Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus** mit kompetitiver Inhibierung durch sowohl den Alkohol als auch die Säure. Allgemein gilt beim Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus folgender Ablauf der Reaktion (Abb. 4-21).

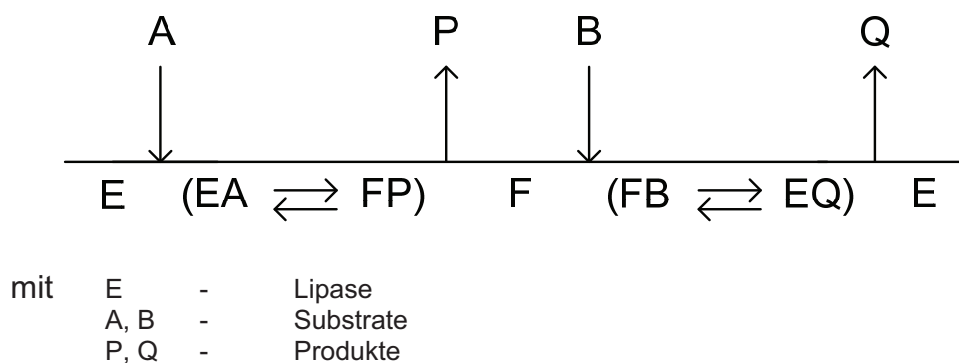


Abb. 4-21: Ablauf der lipasen-katalysierten Reaktion nach dem Ping-Pong-Bi-Bi-Mechanismus

Zuerst bindet Substrat 1 an das Enzym und bildet den Acyl-Enzym-Komplex. Es folgt die Freisetzung des ersten Produktes, welches im Falle der Veresterung das entstehende Wasser ist. In einem zweiten Schritt bindet das Substrat 2 an das Enzym mit dem verbleibenden Säurerest. In diesem Schritt fungiert die Alkoholkomponente als Nukleophil, wobei es nach der katalytischen Umsetzung zur Freisetzung des zweiten Produktes, des Esters, kommt. Der genauere Mechanismus wurde bereits im Kapitel 3.2 ausreichend erläutert, weshalb an dieser Stelle auf weitere Ausführungen verzichtet werden kann. Die kompetitive Inhibierung durch sowohl die alkoholische Komponente wie auch die Säurekomponente wurde von Paiva et al. und Zaidi et al. gefunden [199, 200]. Laut Zaidi et al. steigt die inhibierende Wirkung des Alkohols mit dessen Kettenlänge. Sie stellten z.B. für n-Butanol eine Inhibierungskonstante von $0,015 \text{ mol L}^{-1}$ fest. Langkettige Säuren wie Laurinsäure (gesättigte C_{12} -Säure) wirken weniger inhibierend und besitzen deshalb Inhibierungskonstanten von $0,09 \text{ mol L}^{-1}$ [199]. Die Autoren beschreiben die zunehmende Inhibierung der Lipaseaktivität mit steigender Konzentration der Substrate mit folgender Gleichung, welche auf der Michaelis-Menten-Kinetik basiert.

4. Ergebnisse

$$V = \frac{V_m [R_1COOH][R_2OH]}{K_{m(COOH)}[R_2OH] \left(1 + \frac{[R_2OH]}{K_{i(OH)}}\right) + K_{m(OH)}[R_1COOH] \left(1 + \frac{[R_1COOH]}{K_{i(COOH)}}\right) + [R_1COOH][R_2OH]} \quad \text{Gl. 4-1}$$

- mit V_m – maximale Reaktionsgeschwindigkeit
 K_m – Michaelis-Menten-Konstanten für Säure und Alkohol
 K_i – Inhibitor konstanten für Säure und Alkohol
 $[X]$ – Konzentrationen von Säure und Alkohol

Diese beiden inhibierenden Effekte konnten bei der Kondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol (Modell 1) wie auch bei der Kondensation von Glucose und Citronensäure ermittelt werden.

Für **Modell 1** gilt, dass die Inhibierung durch den Alkohol stärker zum Tragen kommt als die Inhibierung durch die Säure. Dieser Effekt ist sowohl beim nativen als auch beim immobilisierten Enzym auf die höhere Konzentration des 1,4-Butandiols in der Wasserphase zurückzuführen. Sebacinsäure als schlecht wasserlösliches Substrat (1 g L^{-1}) besitzt einen größeren Verteilungskoeffizienten und somit ist die Konzentration der Säure in der direkten Umgebung der CaLB gering. Darüber hinaus ist aus der Literatur bereits bekannt, dass langkettige Säuren einen gering inhibierenden Effekt zeigen[98, 178]. Die immobilisierte CaLB, das Novozym® 435, zeigt eine geringere Inhibierung durch die Substrate. Durch die Bindung an einen Träger ist die Enzymkonformation der CaLB stabilisiert und die Erhöhung der Inhibitor konzentration von 1,4-Butandiol und Sebacinsäure zeigt nur geringe Auswirkungen. Da die Aktivitätsbestimmung für Novozym® 435 und die freie CaLB unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt werden mussten, ist ein direkter Vergleich der Resultate schwierig. Hinsichtlich der Tendenz ist zu vermerken, dass die Substratinhibierung durch die adsorbtive Immobilisierung verringert werden kann. Für technische Anwendungen scheint daher die immobilisierte Form die bessere Wahl zu sein, da für die effektive Produktion meist hohe Substratkonzentrationen zum Einsatz kommen. Im Rahmen dieser Arbeit wird weiterhin die freie Lipase Verwendung finden, da die Ergebnisse aufgrund der höheren Reaktionsgeschwindigkeit schneller zugänglich sind. Da die Ergebnisse für das Novozym® 435 die gleichen Tendenzen zeigen, ist diese Vereinfachung zulässig und die Resultate können auf das Immobilisat übertragen werden. Des Weiteren bietet hier die immobilisierte Lipase nicht den entscheidenden Vorteil, da bereits festgestellt wurde, dass das Immobilisat keine signifikant höhere Stabilität besitzt und damit nicht rezykliert werden kann.

Ähnliche Schlüsse sind für das **Modell 2**, die Polykondensation von Glucose und Citronensäure, zu ziehen, denn auch hier zeigen das Novozym® 435 und die freie CaLB die gleichen Tendenzen. Bei der Reaktion wurde beobachtet, dass die Citronensäure eine stark deaktivierende Wirkung auf das Enzym hat (Abb. 4-22 A). Bei hohen Citronensäurekonzentrationen von mehr als $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ Citronensäure im System wurde ein pH-Abfall verzeichnet, welcher auf die zu geringe Pufferkapazität der Wasserphase zurückgeführt werden konnte. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf den gewünschten Wert verringert sich die Aktivität nochmals, verglichen mit dem

4. Ergebnisse

System ohne Substrate und dem nicht eingestellten System. Dies kann auf die höhere Ionenstärke in der Lösung zurückgeführt werden, denn hohe Ionenstärken können sich negativ auf die Lipaseaktivität auswirken[181, 201]. Van Königsvelt et al. berichteten, dass schon Ionenstärken von 200 mM ausreichen, um signifikante Effekte auf die Aktivität von Kartoffelproteinen wie Patatin zu haben[181, 187]. Im vorliegenden Fall müssen die Ionenstärken bis 400 mM erhöht werden, um den gewünschten pH-Wert zu erreichen.

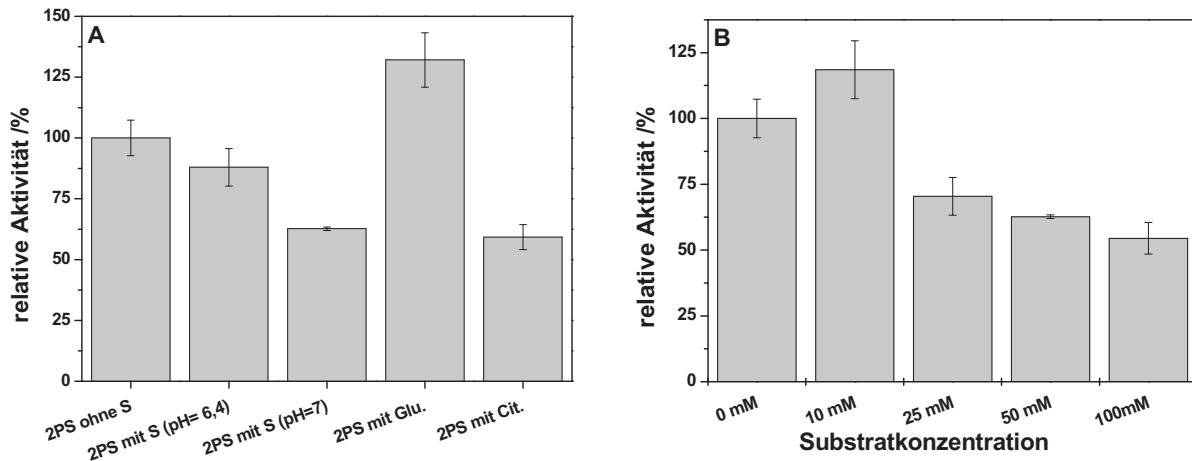


Abb. 4-22: Relative Aktivität der CaLB in Abhängigkeit vom Substrat (A) und der Substratkonzentration (B) (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL MTBE/Puffer, 0,0 - 0,1 mol L⁻¹ Substrat (Glucose und Citronensäure), 50°C, $\alpha = 1$, $r_0 = 1$, p-NPP-Assay; zu A: 2PS- 2-Phasen System, S- Substrate, Glu.- Glucose, Cit.- Citronensäure)

In den Aktivitätsmessungen konnte keine Deaktivierung durch das Polyol Glucose festgestellt werden, wie in r_0 -Abschnitt des Kapitels 4.2.2 bereits angedeutet. Es wurde vielmehr eine Aktivierung der CaLB durch Glucose im Vergleich zum substratfreien System ermittelt. Für Alkoholdehydrogenasen wurden derartige aktivitätsverändernde Effekte von Zuckern bereits beschrieben[202]. So berichteten Ferloni et al. von einer Stabilitätssteigerung durch den Zusatz von Saccharose[203]. Ähnliches wurde auch für die Lipase aus *Burkholderia cepacia* gefunden. Secundo und Carrea stellten bei der Co-Lyophilisierung dieser Lipase mit verschiedenen Mono- und Disacchariden eine verminderte Konformationsänderung fest[204]. Sie führten dieses auf verringerte Proteininteraktionen zurück. Es wird im Falle der CaLB vermutet, dass der Zucker durch Wasserstoffbrückenbindungen die aktive Konformation der CaLB im binären System stabilisiert und damit eine erhöhte Aktivität hervorruft. In Kombination mit der Citronensäure ließ sich feststellen, dass sich der deaktivierende Effekt, welcher von der Citronensäure ausgeht, stärker als der aktivierende Effekt der Glucose auf die CaLB auswirkt.

In Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate lässt sich erkennen, dass bei kleineren Substratkonzentrationen um 10 mM (10 mM Substrat im System) der aktivierende Glucoseeffekt stärker ist als die Deaktivierung (Abb. 4-22 B). Mit steigender Substratkonzentration kehrt sich dieser Effekt um und die deaktivierende Wirkung der Citronensäure überlagert den aktivierenden Glucoseeffekt. Da mit dem p-NPP-Assay die Auswirkungen der Substrate einzeln gemessen werden konnten

4. Ergebnisse

(vergl. Kap. 7.1.1), konnte untersucht werden, in welchem Maße die Aktivität durch Glucosezusatz gesteigert werden kann. Ein Glucose-Zusatz führt bis 20 mM zu einer Aktivitätssteigerung um 30% verglichen mit dem binären System ohne Substrate. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf bis zu 200 mM hatte keinen weiteren Einfluss auf die Aktivität, weder aktivierend noch deaktivierend (Anhang Abb. 9-1 und 9-2).

Neben der Substratkonzentration und der Substratstruktur haben noch andere Parameter Auswirkungen auf die Aktivität und Stabilität der Lipase. Die Temperatur wie auch pH-Wert der Wasserphase und das organische Lösungsmittel, welche die Extraktionsphase bildet, wirken auf die Aktivität der CaLB, wie in Abschnitt 4.2 bereits angedeutet.

Um nicht wiederholt die Effekte der Parameter zu diskutieren, soll an dieser Stelle nur noch auf einige Besonderheiten, welche mittels der Aktivitätsuntersuchungen festgestellt wurden, eingegangen werden.

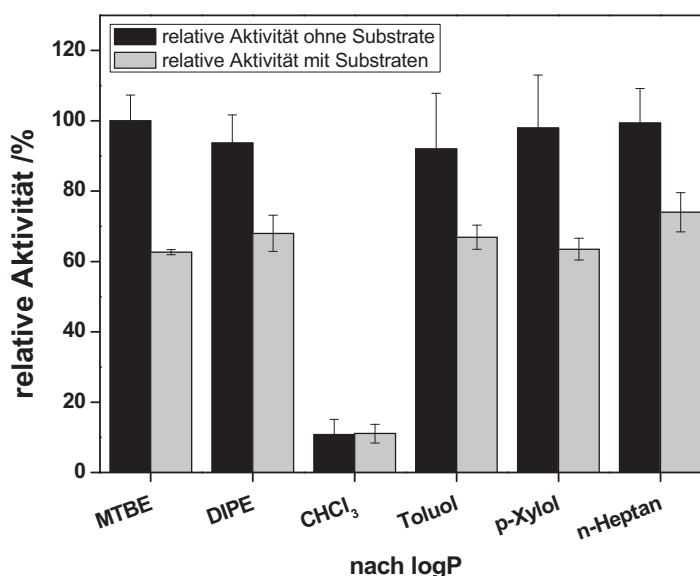


Abb. 4-23: Relative Aktivität in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL organisches Lösungsmittel/ Puffer, 0,05 mol Substrat (Glucose und Citronensäure), 50°C, $\alpha = 1$, $r_0 = 1$, p-NPP-Assay)

Die **Wahl des Lösungsmittels** ist für die Polykondensation von entscheidender Bedeutung, was in Abschnitt 4.2.2 bereits diskutiert wurde. Unerwartet war die sehr geringe Aktivität der CaLB im binären System aus Chloroform und Puffer (Abb. 4-23). Bei der Betrachtung der Umsetzung von Glucose und Citronensäure zum Polyester ist ein Umsatzanstieg bis ca. 72 h feststellbar gewesen, was auf Aktivität hindeutet (vergl. Abb. 4-10). Zwar wurde anhand des Reaktionsverlaufes bereits eine schnelle Deaktivierung vermutet, aber der Aktivitätsverlust zeigt sich extremer als erwartet. Da es sich bei der Messung mittels des p-Nitrophenolpalmitat-Assays um eine indirekte Aktivitätsmessung handelt (vergl. 7.1.1), sollen die Ergebnisse mit Aktivitätsbestimmungen aus dem Reaktionsverlauf verglichen werden.

4. Ergebnisse

Tab. 4-8: Relative Aktivität der CaLB in Abhängigkeit vom organischen Lösungsmittel

Organische Lösungsmittel (Extraktionsphase)	Relative Aktivität /% (p-NPP-Assay)	Relative Aktivität /U mL (aus Rkt.verlauf)
MTBE	62	200
DIPE	68	187
CHCl ₃	11	176
Toluol	67	185
p-Xylol	64	191
n-Heptan	74	196

Wie zu sehen ist, verhalten sich im Anfangsbereich der Reaktion alle Lösungsmittel recht ähnlich (Tab. 4-8). Die starke Deaktivierung der CaLB, welche mittels des p-NPP-Assays ermittelt wurde, konnte anhand des Reaktionsverlaufes nicht nachgewiesen werden. Diese Diskrepanz kommt durch die Messmethode des p-NPP-Assays zustande. Die Methode berücksichtigt lediglich die Inkubation des Enzyms mit den Ausgangsstoffen und deren Auswirkungen auf die Aktivität. In den p-NPP-Messungen wurde darüber hinaus eine starke Denaturierung an der Phasengrenze festgestellt, welche sich in einem weißen Niederschlag zeigte. Trotz wiederholter Versuche konnte diese Denaturierung bei der Aufnahme des Reaktionsverlaufes erst nach mehreren Tagen festgestellt werden. Die Gründe für diese Diskrepanz konnten nicht eindeutig geklärt werden. Da die Untersuchung mit einem anderen Puffer durchgeführt wurde, ist zu vermuten, dass dies ein Grund für die Denaturierung ist. Der in den Reaktionsverläufen verwendete Citrat-Puffer (pH = 6,0) scheint einen weniger deaktivierenden Effekt auf die CaLB zu haben als der Phosphatpuffer, welcher in den p-NPP-Messungen verwendet wurde. Negativ im Falle des Chloroform/ Puffer Systems ist die starke Emulsionsbildung, welche die Probenahme aus der wässrigen Phase erschwert. Es ist wahrscheinlich, dass die organische Phase bzw. die Emulsion in die Küvette überführt wurde und somit die Abweichung in Tabelle 4-8 verursacht hat.

Neben der Wahl des Extraktionsmittels ist auch der **pH-Wert der Wasserphase** wichtig. Buthe et al. berichteten, dass die pH-Optima der Lipasen aus *Candida rugosa* (CRL) und aus *Thermomyces lanuginosa* (TLL) für die Veresterung von Propionsäure mit n-Butanol bei 3,5 und 4,25 liegen. Im Falle der Polykondensation durch die CaLB zeigt sich, dass neben den pK_A-Werten der Säuregruppen besonders die Gesamtladung des aktiven Zentrums der CaLB entscheidend ist. Neves-Petersen et al. fanden in ihren Untersuchungen, dass die CaLB erst ab pH > 6 eine negative Ladung besitzt [101, 169].

Im Unterschied zu den von Buthe et al. gefundenen Ergebnissen lassen sich aus den Aktivitätsmessungen der CaLB im binären Reaktionssystem keine höheren Aktivitäten bei sauren pH-Werten feststellen (Abb. 4-24 A). Hingegen ist bei den über die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten bestimmten Aktivitäten eine Verschiebung des Aktivitätsoptimums zu schwach sauren pH-Werten zu verzeichnen (Abb. 4-24 B). Die Ergebnisse, welche aus dem Reaktionsverlauf gewonnen wurden, sind in diesem Falle besser zur Interpretation geeignet, da es sich bei der Reaktion, welche dem

4. Ergebnisse

photometrischen Assay zugrunde liegt, um eine Hydrolyse handelt. Dieser Assay beinhaltet somit eine Überlagerung von Veresterungs- und Hydrolyseoptimum bezüglich des pH und führt somit zu ungenauen Ergebnissen. Für die Polykondensation von Glucose und Citronensäure kann daher aus dem Reaktionsverlauf ermittelt werden, dass das pH-Optimum der Aktivität im schwach sauren Bereich liegt. Hiermit korrelierende Ergebnisse wurden bereits im Kapitel 4.2.2 beschrieben, wo die Anhängigkeit des Umsatzes vom pH-Wert diskutiert wurde.

An dieser Stelle soll noch kurz auf den Einfluss der Puffersalze eingegangen werden. Im pH-Bereich zwischen 6-8 konnte der Einfluss der Puffersalze untersucht werden. Es zeigte sich, dass der Phosphatpuffer einen schwach deaktivierenden Einfluss auf die CaLB hat, was ebenfalls von Ratzka gefunden wurde[205]. In Systemen mit Phthalat-Puffer und Citrat-Puffer bei einem pH-Wert von 6 konnten die höchsten Aktivitäten ermittelt werden.

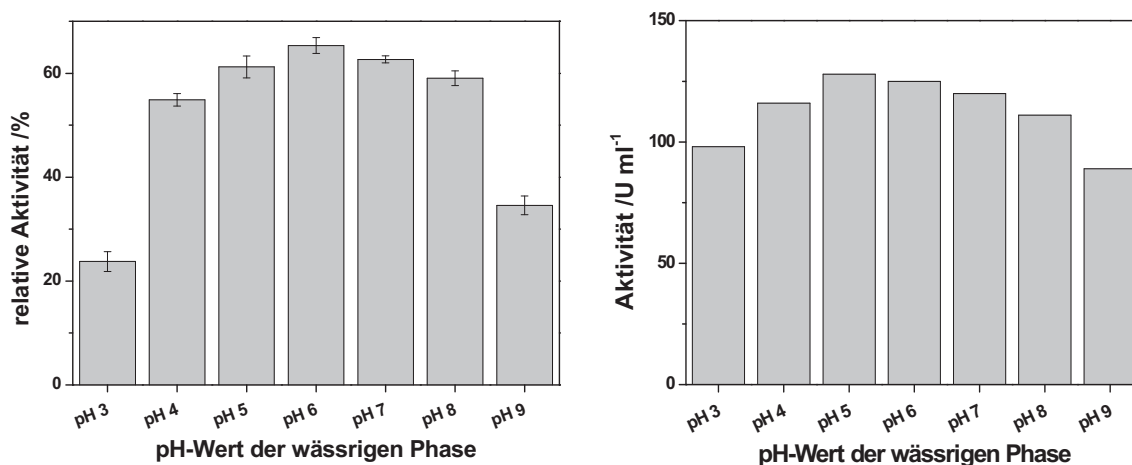


Abb. 4-24: Aktivität der CaLB bei verschiedenen pH-Werten (A: p-NPP-Assay; B: Aus Reaktionsverlauf) (Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL MTBE/Puffer, 0,05 mol Substrat (Glucose und Citronensäure), 50°C, $\alpha = 1$, $r_0 = 1$, p-NPP-Assay und Reaktionsverlauf)

Besonderheiten konnten bei der **Temperaturabhängigkeit** der Aktivität nicht festgestellt werden, dennoch kommen sie an dieser Stelle zur Diskussion, um die Möglichkeiten, die sich aus dem in dieser Arbeit etablierten p-NPP-Assay ergeben, zu verdeutlichen. Bei pH-Messungen wie auch beim Lösungsmiteleinfluss haben sich die Grenzen des indirekten Aktivitätsassays gezeigt. Die Beeinflussung der pH-abhängigen Farbreaktion durch Lösungsmittel und den pH-Wert der Probe sowie auch die Tatsache, dass man nicht die eigentliche Veresterung, sondern eine Hydrolyse beobachtet, können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.

Die **Besonderheit des p-NPP-Assays** ist die Trennung der Aktivitätsmessung in zwei Teile (vergl. Abb. 7-4). Im ersten Teil wird die Lipase mit dem Substrat bzw. den Substraten inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung der Aktivität in einem zweiten System über die bereits erwähnte Hydrolyse und die damit verbundene Freisetzung des Farbstoffes. Bis auf die bereits diskutierten Ausnahmen stimmen die Tendenzen der Ergebnisse mit den Ergebnissen aus dem Reaktionsverlauf überein. Ein direkter Vergleich der Messungen ist nicht möglich, da es sich bei der photometrischen Bestimmung um relative Messungen bezogen auf gewählte Standardbedingungen

4. Ergebnisse

handelt, wohingegen der Reaktionsverlauf die Angabe von Absolutwerten ermöglicht. Dennoch bietet der p-NPP-Assay einige Vorteile, die in der Folge erläutert werden.

Die Temperaturmessung (Abb. 4-25) zeigt, dass der Einfluss der Temperatur auf die CaLB sowohl aus den Absolutwerten des Reaktionsverlaufs wie auch aus dem p-NPP-Assay abzulesen ist. Sie führen zu dem Ergebnis, dass die CaLB die höchste Aktivität bei 40°C zeigt. Dies stimmt mit den Literaturdaten über die CaLB nahezu überein. Anderson et al. verzeichneten bei Temperaturen ab 50 °C erste Denaturierungsanzeichen, was zu einer Absenkung der Aktivität führt[98]. In den meisten Untersuchungen der Parametereinflüsse ist die Übereinstimmung zwischen den Aktivitätsmessungen ausreichend, um Informationen über den Einfluss der jeweiligen Reaktionsbedingungen zu erhalten.

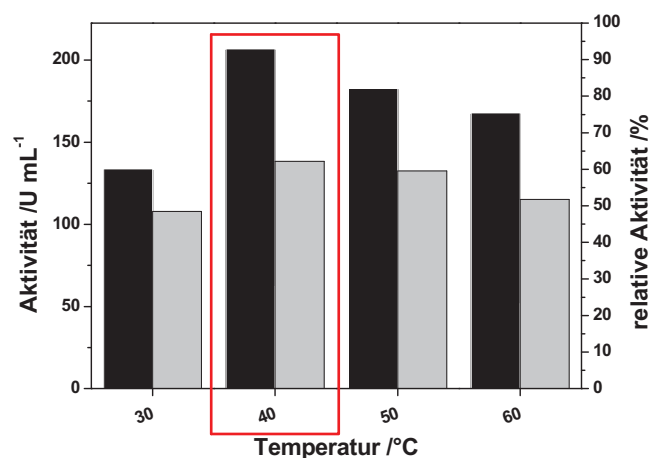


Abb. 4-25: Aktivitätsmessungen in Abhängigkeit von der Temperatur (schwarze Balken: Reaktionsverlauf; graue Balken: p-NPP-Assay) Bedingungen: Gesamtvolumen 5 mL MTBE/Puffer, 0,05 mol Substrat (Glucose und Citronensäure), 50°C, $\alpha = 1$, $r_0 = 1$

Hierbei weist der p-NPP-Assay einige Vorteile auf. Da Inkubation und Messung separiert sind, kann der Assay sehr leicht auf andere Substrate übertragen werden, was den Arbeitsaufwand für die Analytik und somit den zeitlichen Aufwand auf ein Mindestmaß reduziert. Darüber hinaus ist bei der Veresterung der Einfluss der Substrate auf die Lipase separat zu bestimmen. Dies ermöglichte es, im Rahmen dieser Arbeit den aktivierenden Effekt der Glucose zu ermitteln.

Die eindeutigen Vorteile des Assays sind also:

- die kürzere Messzeit,
- die leichte Anpassung des Assays an andere Substrate,
- die Verfolgung des separaten Einflusses der Monomer und
- die Vereinfachung des Messprinzips durch Teilung in Inkubations- und Messabschnitt.

Somit stellt der p-NPP-Assay eine interessante Alternative zur Aktivitätsbestimmung aus dem Reaktionsverlauf dar. Er liefert zur Abschätzung der Reaktionsbedingungen gute und verlässliche Ergebnisse und ist darüber hinaus leicht auf andere Reaktionsbedingungen übertragbar. Dennoch sollten die

4. Ergebnisse

Ergebnisse nur als Anhaltspunkt genommen werden, da die Verfolgung eines Reaktionsverlaufes zur substratspezifischen Aktivitätsbestimmung nicht ersetzen kann.

Mittels dieses Assays ist aber nicht nur die Aktivität im Anfangsbereich der Reaktion zugänglich, sondern auch deren Abnahme über die Zeit. Diese Abnahme liefert eine weitere für enzym-katalysierte Reaktionen wichtige Größe, die Halbwertszeit. Meist folgen enzymatische Reaktionen einem Zerfall erster Ordnung, ähnlich dem radioaktiven Zerfall. Hierbei wird davon ausgegangen, dass das Enzym von seinem aktiven in den inaktiven/ denaturierten Zustand übergeht.

Tab. 4-9: Halbwertszeit der CaLB in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen

Bedingungen		Halbwertszeit $t_{1/2}$ / h
Extraktionsmittel (50°C, 50mM Substrat)	MTBE/Puffer	53
	DIPE/Puffer	55
Temperatur (MTBE/Puffer, 50mM Substrat)	30°C	87
	60°C	23
Substratkonzentration (MTBE/Puffer, 50°C)	10 mM	64
	100 mM	33

Die Stabilität der CaLB wurde bei verschiedenen Randbedingungen untersucht, welche in Tabelle 4-9 aufgelistet sind. Exemplarisch soll an dieser Stelle die Stabilität der CaLB bei 30°C und 60°C diskutiert werden. Die Daten aus Tabelle 4-9 weisen auf eine geringere Stabilität der nativen CaLB bei 60 °C hin. Hieraus kann geschlossen werden, dass, wie bereits erwähnt, eine Denaturierung der CaLB bei Temperaturen oberhalb von 50°C erfolgt. Für eine technische Anwendung müssen die Halbwertszeiten noch erhöht werden, da die Katalysatorkosten für diesen enzymatischen Prozess sonst sehr hoch sind. Hierbei ist immer zu berücksichtigen, welcher Einsatzbereich mit dem Produkt fokussiert wird. Im Bereich der Verpackungsindustrie müssen die Kosten so gering wie möglich sein, damit das Produkt mit den petrochemischen Produkten konkurrieren kann. Für die Anwendung in medizinischen Bereich können höhere Investitionskosten in Kauf genommen werden, da der Marktpreis solcher Polymere um ein Vielfaches höher liegt.

4.4 Strukturen und Eigenschaften der Polyester

Im Vorfeld wurden das Potential und die Möglichkeiten diskutiert, welche sich bei der Polykondensation im binären Reaktionssystem ergeben. Es wurden die Stärken und Schwächen dieses Ansatzes anhand zweier Modellreaktionen untersucht. Während die Kondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol zu nur einem Polymer führen kann, ergeben sich für die Monomere Glucose und Citronensäure mehrere Kopplungsmöglichkeiten. Dieses wiederum macht deutlich, dass die Produkte sehr unterschiedliche Eigenschaften besitzen werden. Im Folgenden werden anhand experimenteller Daten die Polyester miteinander verglichen.

4.4.1 Poly(butylsebacat)

Die Kondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol führt zu einem linearen Polymer, da es außer den endständigen Gruppen in den Monomeren keine weiteren Anbindungsmöglichkeiten gibt. Einzig die Zyklisierung muss an dieser Stelle berücksichtigt werden, was aber als unwahrscheinlich eingestuft werden kann. Da die Molekulargewichte auf mehr als 8 Repeating Units (RU) hinweisen, ist eine Zyklisierung unwahrscheinlich.

NMR

Die NMR-Untersuchungen des Poly(butylsebacates) (PBS) zeigen, dass es sich eindeutig um ein lineares AABB-Polymer handelt. Es werden abwechselnd 1,4-Butandiol und Sebacinsäure in die Kette eingebunden. Eine Zyklisierung kann ausgeschlossen werden, da erstens die zyklische Verknüpfung von 8 (MTBE) bzw. 10 (DIPE) Repeating Units (RU) ($M_{\text{Polyester}} = 2000\text{-}2500 \text{ g mol}^{-1}$, $-\text{OOC}-(\text{CH}_2)_8-\text{COO}-(\text{CH}_2)_4-$) unwahrscheinlich ist und sich zweitens die chemische Umgebung für die Wasserstoffatome ändern würde. Folglich würde ein anderes NMR-Spektrum resultieren. Die chemischen Verschiebungen, welche im Kapitel 7.3.2 den speziellen Gruppen zugeordnet wurden, sind in Abbildung 4-26 durch Pfeile in der Struktur kenntlich gemacht.

Im $^1\text{H-NMR}$ zeigen die chemischen Verschiebungen, wie zu erwarten, 5 Signale, welche durch die Wasserstoffatome der Positionen A-E hervorgerufen werden (Abb. 4-26, oben). Die stärkste chemische Verschiebung erfahren die Wasserstoffatome in Nachbarschaft des alkoholischen Sauerstoffs (A, 4 H-Atome), während die Verschiebung der H-Atome in Nachbarschaft des Carbonylsauerstoffes schwächer ist (B, 4 H-Atome). Die schwächste chemische Verschiebung zeigen die Wasserstoffatome innerhalb der Sebacinsäurekette, da dort die Auswirkung der Sauerstoffe am geringsten ist. Da die Auflösung des Gerätes nicht ausreicht, die in ihrer chemischen Umgebung sehr ähnlichen Wasserstoffatome in der Kette aufzutrennen, verschmelzen die Signale von 8 H-Atomen zu einem Multiplett. Beim $^1\text{H-NMR}$ kommt es bei allen Kopplungen zu einem Multiplett, was zum einen durch die chemische Äquivalenz vieler Wasserstoffatome in der Kette hervorgerufen wird. Zum anderen kann aber auch die chemische Verteilung der Molekülmasse (kein definierte Molekülmasse bei Polymeren) zu einer Überlagerung mehrerer Kopplungen führen.

4. Ergebnisse

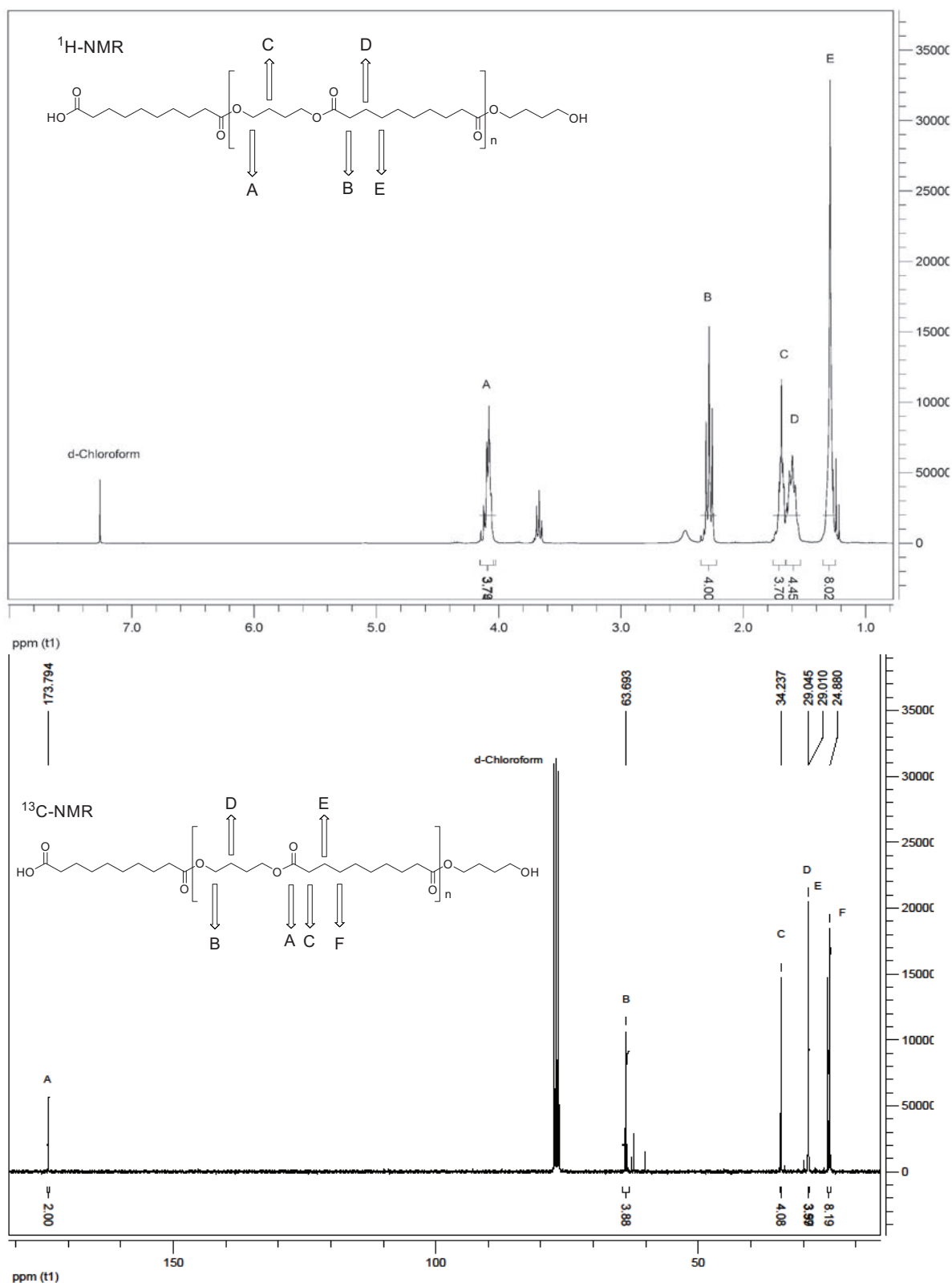


Abb. 4-26: NMR-Messungen des Poly(butylsebacates) (oberes Bild ^1H ; unteres Bild ^{13}C)

Das $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigt die aus dem $^1\text{H-NMR}$ gewonnenen Informationen. Die stärkste chemische Verschiebung ist beim ^{13}C für den Carbonylkohlenstoff zu verzeichnen, was ebenfalls von Witt et al. gefunden wurde[160]. Die Zuordnung der übrigen Gruppen erfolgt so, wie es in Abbildung 4-26 (unten) zu sehen ist.

4. Ergebnisse

MS

Die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigen die bereits aus dem NMR gewonnenen Informationen. Es handelt sich um ein regelmäßiges AABB-Polymer, welches abwechselnd aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol aufgebaut ist. Im Fragmentierungsmuster des Massenspektrums konnten die folgenden Bruchstücke gefunden werden (Tab. 4-10).

Tab. 4-10: Fragmentierung im MS für Poly(butylsebacat)

Fragment	m/z
COO ⁺	44
C ₄ H ₈ ⁺	56
CH ₂ COO ⁺	58
C ₇ H ₁₄ ⁺	98
C ₄ H ₈ OC(O)CH ₂ ⁺	114
OC(O)C ₈ H ₁₆ ⁺	156

Die starke Esterbindung, welche während der Polykondensation gebildet wird, ist stabiler als die anderen Bindungen im Polymer, weshalb keine Bruchstücke von Sebacinsäure (m/z = 188; -C(O)(CH₂)₈C(O)-) und 1,4-Butandiol (m/z = 96; -O(CH₂)₄O-) gefunden wurden. Dennoch geht aus der Fragmentierung die abwechselnde Anbindung von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol hervor. Darüber hinaus sind aus dem Massenspektrum die Molekülmassenverteilung des Polyesters und seine Regelmäßigkeit zu erkennen. Das Fragmentierungsmuster reicht bis zu 2000 g mol⁻¹, was mit den Ergebnissen der GPC-Untersuchung korreliert. Aufgrund der symmetrischen Verteilung des Fragmentierungsmusters kann man auf eine hohe Regelmäßigkeit innerhalb der Kette schließen, was bei dem vorliegenden Polymer zu erwarten war. Die Wiederholung derselben Fragmente über den gesamten Massenbereich ist hierfür signifikant. An dieser Stelle soll schon einmal darauf hingewiesen werden, dass Abbildung 4-27 das Massenspektrum eines symmetrischen Polymers zeigt.

4. Ergebnisse

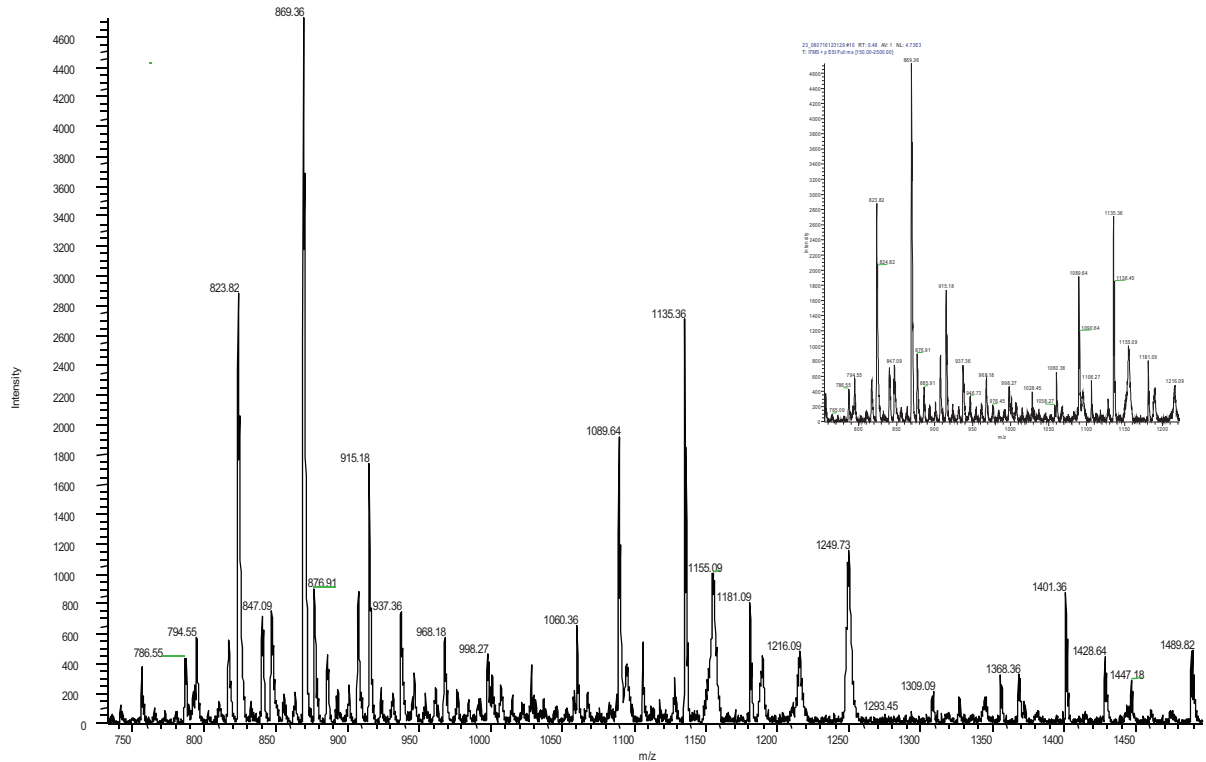
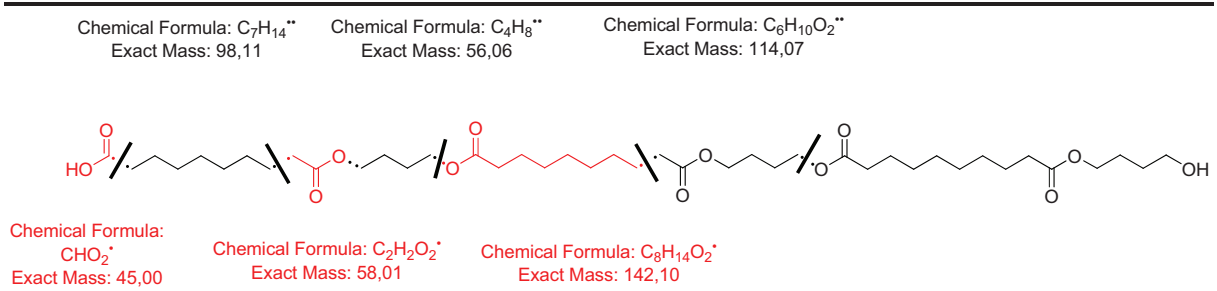


Abb. 4-27: Massenspektrum des Polyesters aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol

Es wurden ebenfalls bekannte, kommerziell erhältliche Polymere zur Verifizierung der Ergebnisse untersucht. Tween 60 (Polyethylenglycolсорbitanmonostearat, wie auch PEG 6000 (Polyethylenglycol) stellen regelmäßige Polymere dar und wurden als Beispiele zum Spektrenvergleich herangezogen.

Die Spektren zeigen eine hohe Symmetrie, welche für Polymere ohne Quervernetzungen typisch ist. Zu erkennen ist die wiederholte Abnahme der Molekülmasse um 44 amu, was auf die Ausschleusung einer Monomereinheit hindeutet. Darüber hinaus soll an dieser Stelle auf die zwei Gauß-Verteilungen der Molekülmassen bei Tween 60 hingewiesen werden. Dieses impliziert eine Häufung der Fragmente in einem Bereich zwischen 700 g mol⁻¹ und 1400 g mol⁻¹. Die Glockenkurve mit einem Maximum um 1600 g mol⁻¹ (M_n (Herstellerangabe)= 1600 g mol⁻¹) repräsentiert die Molekülmassenverteilung der Ausgangssubstanz.

4. Ergebnisse

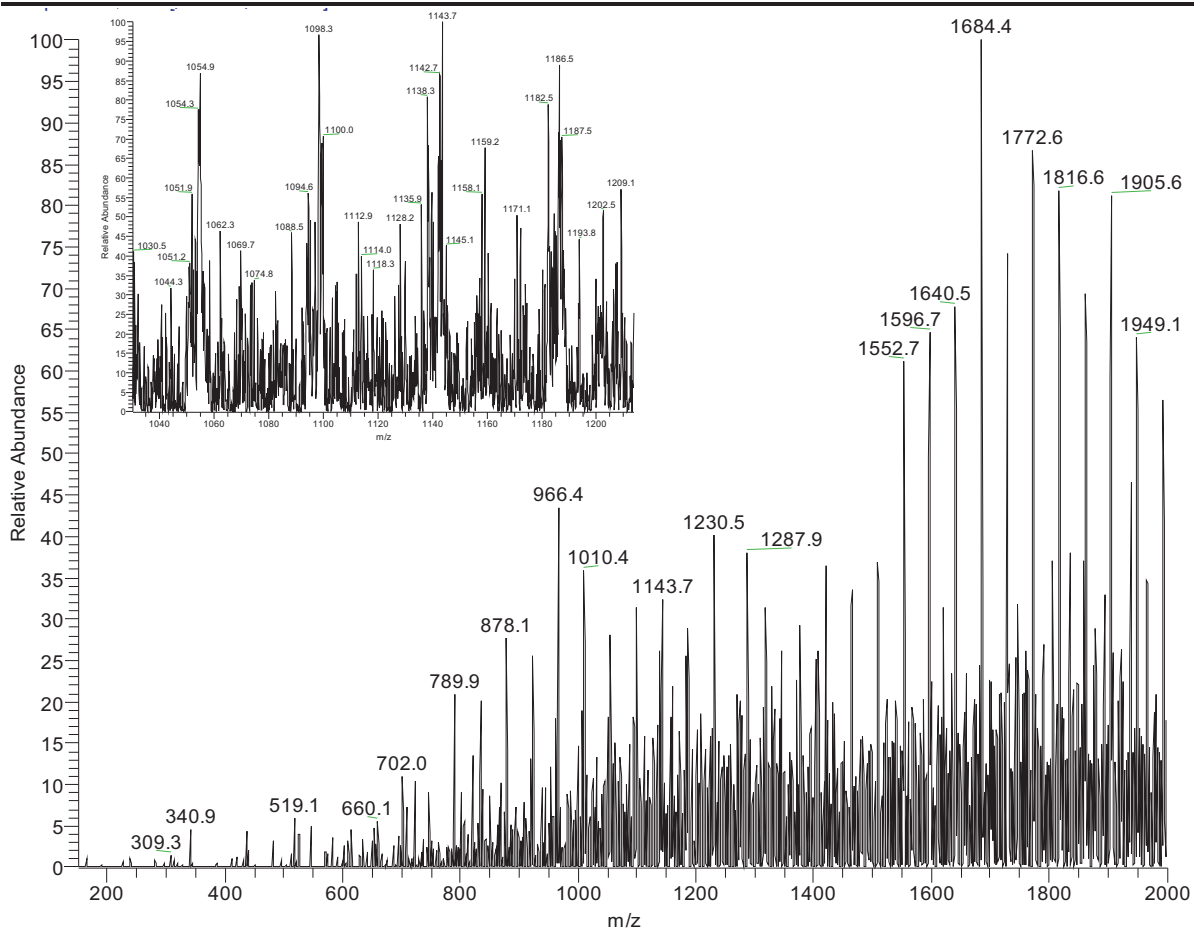


Abb. 4-28: Massenspektrum des Tween 60

TG/DSC

Die Thermogravimetrie, mit welcher der Gewichtsverlust und der Wärmestrom einer Verbindung in Abhängigkeit von der Temperatur aufgezeichnet werden, ermöglicht die Feststellung des Schmelzpunktes einer Verbindung. Darüber hinaus gibt sie Informationen über mögliches Kristallwasser oder Lösungsmittelrückstände sowie über Zersetzungsprozesse.

Der betrachtete Polyester zeigt einen niedrigen Schmelzpunkt, was typisch für aliphatische Polyester mit niedrigen Molekulmassen ist. Die wachsartige Konsistenz des Polymers deutete bereits im Vorfeld der Untersuchung auf einen Schmelzpunkt unterhalb von 100°C hin (Bild Anhang). Ähnlich niedrige Schmelzpunkte wurden auch von Umare et al. für den Polyester aus Sebacinsäure und 1,3-Propandiol gefunden[206].

Anhand des Wärmestromes konnte der Schmelzpunkt bei 60°C festgestellt werden, wobei die Kristallisation unterkühlt stattfindet (Abb. 4-28). Da bei der Verfolgung der Gewichtsveränderung eine Abnahme der Einwaage von 18,2 g auf 14,8 g (entspricht ca. 20 %) ermittelt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass sich noch Lösungsmittel in der Probe befand. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die wachsartige Substanz keine definierten Kristalle bildet, sondern amorph vorliegt.

DSC-Messungen wurden ebenfalls durchgeführt, da diese den genauen Wärmestrom liefern, welcher für thermodynamische Berechnungen benötigt wird. Die Daten, welche für thermodynamische Berechnungen genutzt wurden, sowie die

4. Ergebnisse

Ergebnisse dieser Berechnungen sind in der Publikation von Verevkin et al. beschrieben[207].

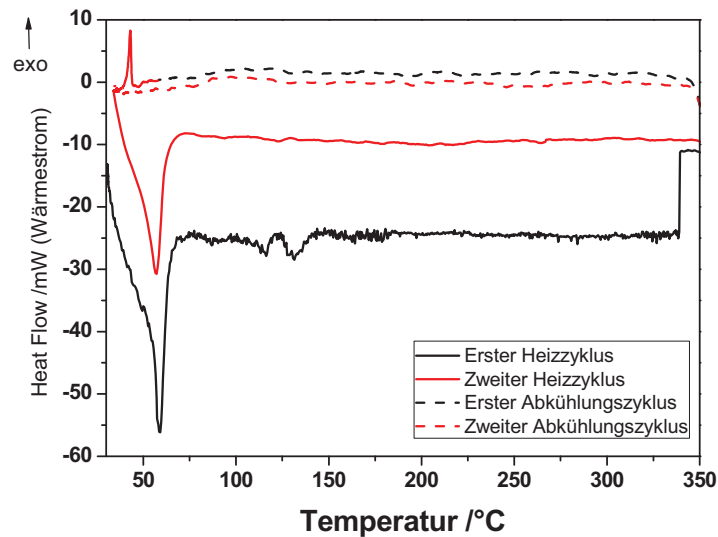


Abb. 4-29: Thermogravimetrische Untersuchung des Polyesters aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol in einem Temperaturbereich zwischen 30 und 350°C

Anhand der Berechnungen zeigt sich, dass die Polykondensation in einem geeigneten Reaktionssystem mit dem entsprechenden Katalysator freiwillig abläuft. Die Addition eines Monomers an die Kette ist dabei eine reversible Reaktion. Die Gleichgewichtskonstante K_{pol} ist eine Funktion der freien Gibbs Energie, welche nach der folgenden Gleichung zugänglich ist.

$$\Delta G_{\text{pol}} = \Delta H_{\text{pol}} - T\Delta S_{\text{pol}} = -RT \cdot \ln K_{\text{pol}}$$

Gl. 4-2

Für die meisten Polymerisationen werden sowohl negative Werte für die Enthalpie wie auch für die Entropie gefunden. Die Enthalpie gibt hierbei den Unterschied in den Bindungsenergien zwischen Monomer und Polymer an. Sie wurde calorimetrisch bestimmt. Die Veränderungen in der Entropie setzen sich zusammen aus den Translations-, Rotations- und Vibrationsentropien.

Für die Polykondensation von Sebacinsäure mit 1,4-Butandiol ergab sich eine Polymerisationsenthalpie von $-85,5 \text{ kJ mol}^{-1}$, welche aus den Bildungsenthalpien berechnet wurde. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Polymerisationsenthalpie der Reaktion von 1,4-Butandiol und 1,4-Dicyanobutan von $-125,3 \text{ kJ mol}^{-1}$, erkennt man, dass sie sich in derselben Größenordnung befinden.

Nimmt man für ΔS_{pol} einen typischen Wert von $-80 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ an, so erhält man für $\Delta G_{\text{pol}} = -101,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ and $K_{\text{pol}} = 6,2 \cdot 10^{17}$. Die stark negative Gibbs-Energie sowie die Größenordnung der Gleichgewichtskonstanten deuten auf eine effiziente Verschiebung zugunsten der Polyestersynthese hin. Die Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol ist folglich thermodynamisch bevorzugt und das Polymer kann in hohen Ausbeuten unter kinetischer Kontrolle und mit einem geeigneten Katalysator hergestellt werden.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Größen für das Poly(butylsebacat):

- symmetrisches AABB-Polymer
 - 8-10 Repeating Units
 - $M_w = 3200 \text{ g mol}^{-1}$
 - $M_n = 2000 \text{ g mol}^{-1}$
 - $PD = 1,6$ (GPC)
 - linear
 - Schmelzpunkt: 60°C
 - amorph (Abb. 4-29)
-

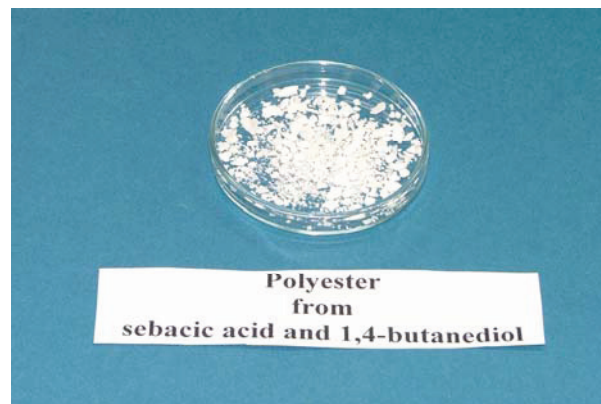


Abb. 4-30: Polyester aus Sebacinsäure und Butandiol

Diese Daten sind bereits bekannt und dienen im Rahmen der Arbeit zur Verifizierung der Ergebnisse, welche im Anschluss für das neuartige Polymer aus Glucose und Citronensäure diskutiert werden. Die Kettenlänge des Polyesters ist im binären Reaktionssystem begrenzt, weshalb auch, wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, Molekulargewichte über 5000 g mol^{-1} nicht erreicht werden konnten. In weiterführenden Arbeiten sollte diese Grenze des binären Reaktionssystems weiter untersucht werden. Doch auch für Poly- bzw. „Oligo“ester mit einer geringen Molekularmasse gibt es Einsatzbereiche, z.B. als Weichmacherzusatz, ähnlich dem Triethylcitrat.

4.4.2 Poly(glucosylcitrat)

Die Polykondensation von Glucose und Citronensäure kann zu sehr unterschiedlichen Polymeren führen, was in Abbildung 4-8 bereits skizziert wurde. Aufgrund der vielen funktionellen Gruppen im entstehenden Polyester gestaltet sich die Isolierung des Produktes schwierig. In Lösung konnte der Polyester über mehrere Wochen gelagert werden, ohne dass eine Zersetzung zu beobachten war. Hieraus kann geschlossen werden, dass das Polymer in Lösung stabil ist. Während der Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer war eine Zersetzung des Polyesters zu beobachten. Es wird vermutet, dass eine intramolekulare Hydrolyse, oder ein Hydrolyse durch Wasserreste in der organischen Phase erfolgt, welche die

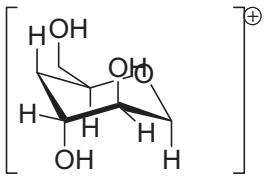
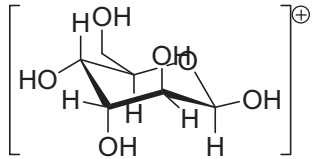
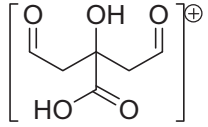
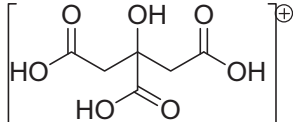
4. Ergebnisse

Monomere wieder freisetzt. Aus diesem Grund war es bisher nicht möglich, das Produkt als reinen Feststoff zu isolieren und für NMR-Untersuchungen zugänglich zu machen.

MS

Die massenspektrometrischen Untersuchungen bestätigen die vermutete Anbindung der Monomere. Es handelt sich um ein regelmäßiges AABB-Polymer (vergl. MS PBS), welches abwechselnd aus Citronensäure und Glucose aufgebaut ist, wobei nur jeweils zwei funktionelle Gruppen beteiligt sind. Im Fragmentierungsmuster des MS konnten die folgenden Bruchstücke gefunden werden (Tab. 4-11).

Tab. 4-11: Fragmentierung im MS für Poly(glucosylcitrat)

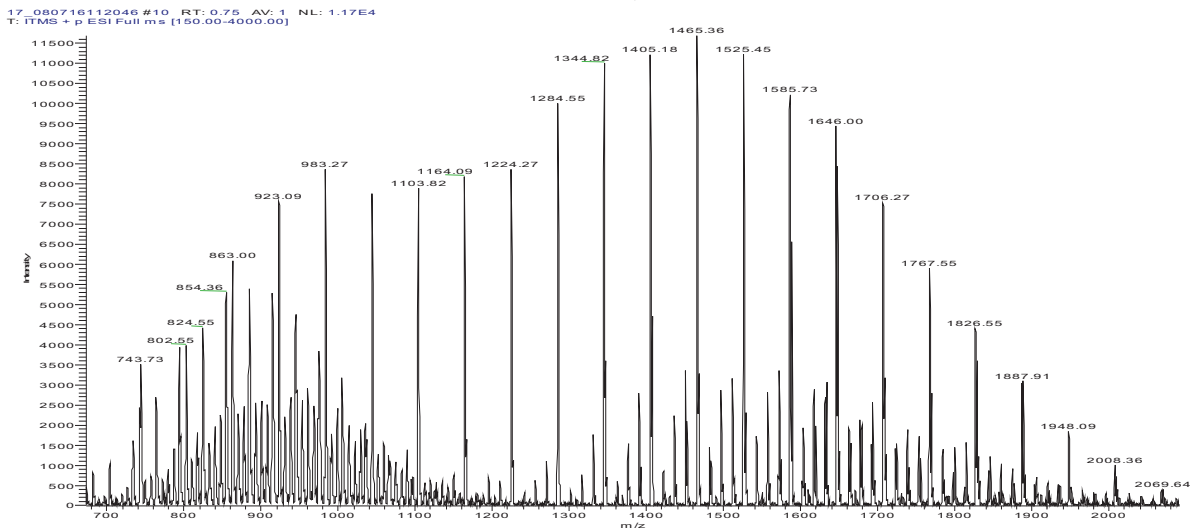
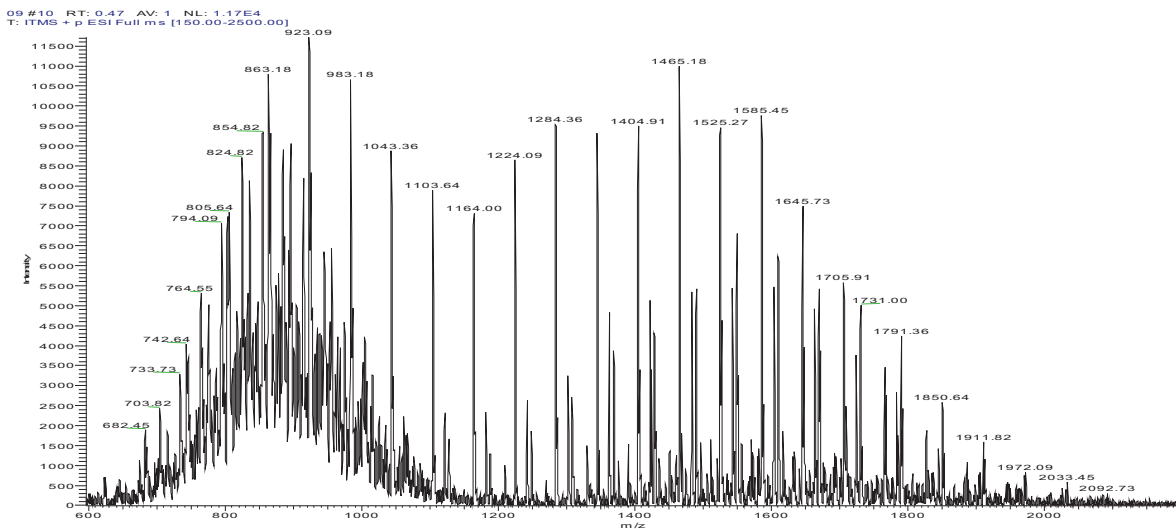
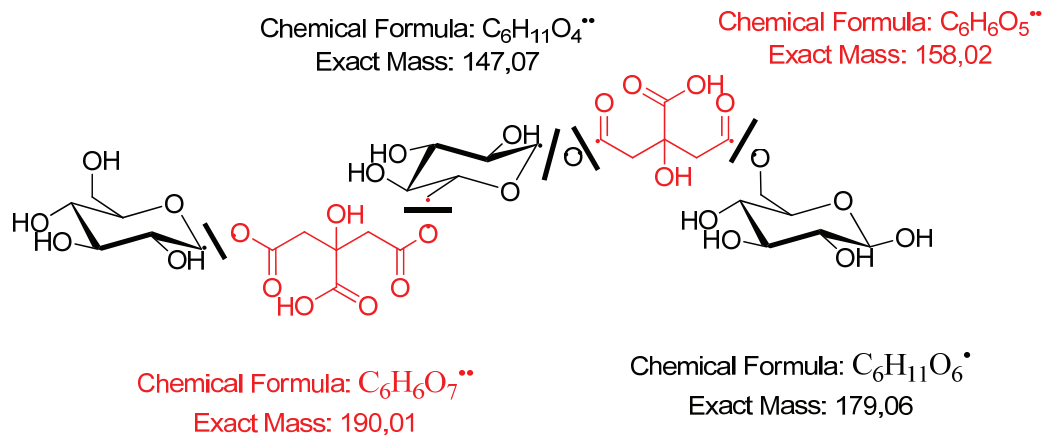
Fragment	m/z
	146
	178
	158
	190

Aus dem Fragmentierungsmuster ist ersichtlich, dass im Falle der Citronensäure lediglich die endständigen Säuregruppen an der Polykondensation beteiligt sind. Die sekundäre Säuregruppe wie auch die OH-Funktion liegen nach der Kondensation unverändert vor, was vermutlich durch die sterische Hinderung hervorgerufen wird. Ebenfalls können der pK_A -Wert dieser Säurefunktion und die Ausrichtung der wachsenden Kette im binären System für diese Art der Verknüpfung verantwortlich sein. Diese erhaltenen Ergebnisse werden durch die Ergebnisse von Tsutsumi et al. bestätigt[208]. Diese Autoren stellten bei der Polymerisation von Gluconolacton und Citronensäure eine Präferenz der CaLB für die endständigen OH-Gruppen fest.

Die Glucose beteiligt sich ebenfalls nur mit zwei Hydroxygruppen an der Kondensation, was sowohl aus der verfolgten Konzentrationsabnahme (Verhältnis 1:1) hervorgeht, sowie auch aus den MS-Messungen. Die massenspektrometrische Untersuchung erlaubt aber keine eindeutige Zuordnung, welche zwei OH-Gruppen

4. Ergebnisse

der Glucose an der Polykondensation beteiligt sind, da das Fragmentierungsmuster eine solche Information nicht enthält. Aus sterischen Gründen sind die OH-Gruppen am C₁ und C₆ die wahrscheinlichsten Verknüpfungsstellen. In den Arbeiten von Park et al. sowie in denen von Otto et al. konnten selektive Veresterungsreaktionen an der OH-Gruppe des C₁- und C₆-Atom der Glucose unter Verwendung der CaLB beobachten werden[209, 210].

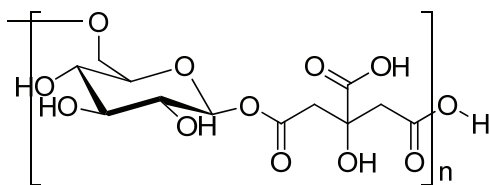


4. Ergebnisse

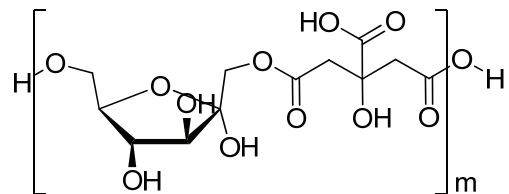
Abb. 4-31: MS-Spektren von Poly(glucosylcitrats) (PGC oben) und Poly(fructosylcitrats) (PFC unten)

Aus den MS-Untersuchungen von sowohl PGC wie auch PFC geht hervor, dass die Molekularmassen, welche mit der MS bestimmt wurden, mit den Ergebnissen der GPC korrelieren. Zwar wurden mit dem MS-Gerät auch Spektren bis 4000 amu aufgenommen; diese lieferten aber keine weiteren Ergebnisse. Das Polymer zeigt weiter ein ähnliches Spektrum wie Tween 60, was durch eine zweite Gaußverteilung der Fragmente hervorgerufen wird. Aufgrund der Struktur des Spektrums, welche nur von hochregelmäßigen Polymeren hervorgerufen werden kann, kann eine Quervernetzung ausgeschlossen werden[211].

Bei einem Vergleich der Spektren des Poly(glucosylcitrats) (PGC) mit denen des Poly(fructosylcitrats) (PFC) ergibt sich das gleiche Fragmentierungsmuster (Tab.5-9). Hieraus kann geschlussfolgert werden, dass die Repeating Unit des hergestellten Polyesters ähnlich sein muss. Folgende Strukturen werden für Poly(glucosylcitrat) und Poly(fructosylcitrat) aufgrund der verfügbaren Informationen angenommen.



Poly(glucosylcitrat)



Poly(fructosylcitrat)

4.5 Verteilung der Monomere in binären Reaktionssystemen

In den vorhergehenden Kapiteln wurde bereits darauf hingewiesen, dass für die erfolgreiche bzw. effektive Polykondensation von Disäure und Diol nicht nur das Reaktionsgleichgewicht eine Rolle spielt. In binären Reaktionssystemen ist zu beachten, dass sich alle vorhandenen Substanzen zwischen der wässrigen und der organischen Phase in charakteristischer Weise verteilen (Abb. 4-3). Die Triebkraft dieser Verteilung ist eine Differenz im chemischen Potential, welche vereinfacht mit dem **Nernst'schen Verteilungssatz** wiedergegeben werden kann.

Für die Verteilung einer Komponente B zwischen den Phasen α und β gilt (Gleichgewichtszustand):

$$\mu_B^\alpha = \mu_B^\beta \quad \text{Gl. 4-3}$$

Bei der Betrachtung des Potentialunterschiedes bei konstanter Temperatur und konstantem Druck können die chemischen Potentiale über die folgende Gleichung berechnet werden. Betrachtet man das Verhältnis der Aktivitäten des Stoffes B in den beiden Phasen α und β , ergibt sich eine Konstante (Gl. 4-5).

$$\mu_B^{0\alpha} + RT \cdot \ln(a_B^\alpha) = \mu_B^{0\beta} + RT \cdot \ln(a_B^\beta) \quad \text{Gl. 4-4}$$

$$\frac{a_B^\alpha}{a_B^\beta} = e^{\frac{\mu_B^{0\beta} - \mu_B^{0\alpha}}{RT}} = \text{const.} \quad \text{Gl. 4-5}$$

In Gleichung 4-5 und 4-6 stehen $\mu_B^{0\alpha}$ und $\mu_B^{0\beta}$ für die chemischen Standardpotentiale des Stoffes B bei unendlicher Verdünnung in Phase α bzw. β . a_B^α und a_B^β sind die Aktivitäten des Stoffes B bezogen auf diesen Standardzustand.

Handelt es sich um ideal verdünnte Lösungen können die Aktivitäten näherungsweise durch die Molenbrüche ersetzt werden, womit man den **Nernst'schen Verteilungssatz** erhält (Gl. 4-6).

$$\frac{x_B^\alpha}{x_B^\beta} = \text{const.} = k \quad \text{Gl. 4-6}$$

Eine weitere Vereinfachung, die meist genutzt wird, wenn Aktivitäten nicht oder mit nur großem Aufwand zugänglich sind, ist die Annahme, dass die Verteilung in ideal verdünnten Lösungen bei gegebenen äußeren Bedingungen unabhängig von der Absolutmenge des Stoffes ist. Hieraus folgt, dass näherungsweise auch Konzentrationen an Stelle der Molenbrüche eingesetzt werden können (Gl. 4-7).

$$\frac{c_B^\alpha}{c_B^\beta} = k = P_B \quad \text{Gl. 4-7}$$

Dieses Konzentrationsverhältnis der Komponente B kann auch als Verteilungskoeffizient P_B bezeichnet werden. Die Tatsache, dass sich ein Stoff in charakteristischer Weise zwischen zwei Phasen verteilt, findet in der Praxis häufig Anwendung bei der Trennung von Stoffgemischen (Extraktion, Chromatographie).

4. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Polykondensationen Modell 1 und Modell 2 sollen in der Folge anhand dieser Verteilungskoeffizienten diskutiert werden, da sie bei der untersuchten Polykondensation wichtig für Umsatz und Molekülmasse sind. In diesem Kapitel werden experimentell bestimmte Verteilungskoeffizienten mit über COSMO-RS berechneten verglichen.

Ziel der Anwendung quantenchemischer Berechnungen zur Ermittlung der Verteilungskoeffizienten ist eine schnelle Einschätzung von Reaktionsbedingungen (vergl. Tab. 4-7). Könnten die Verteilungskoeffizienten in ausreichender Genauigkeit berechnet werden, wäre es möglich, ein geeignetes Reaktionssystem bzw. Extraktionsmittel mit wenigen Versuchen zu finden. Dies würde zur Reduktion von Versuchen und damit zur Zeit- und Kostenverringerung beitragen.

Anzumerken ist hierbei, dass die experimentell ermittelten P_B im Rahmen dieser Arbeit aus Konzentrationen berechnet wurden. Da die Konzentrationen im Experiment nicht einer ideal verdünnten Lösung entsprechen, sind die Verteilungskoeffizienten fehlerbehaftet. Da die Ermittlung von Aktivitäten sehr zeitintensiv ist, wurde diese fehlerbehaftete Vereinfachung in Kauf genommen, um den Zeitaufwand so gering wie möglich zu halten[212, 213].

Die berechneten Werte wurden über das **conductor-like screening model for real solvents** (COSMO-RS) ermittelt. Das quantenmechanische Rechenmodell, welches in Kapitel 3-4 näher erläutert wurde, dient zur Berechnung von Löslichkeiten, Verteilungskoeffizienten, Aktivitätskoeffizienten und anderen Größen auf der Grundlage von physikalischen Gesetzmäßigkeiten[153, 154].

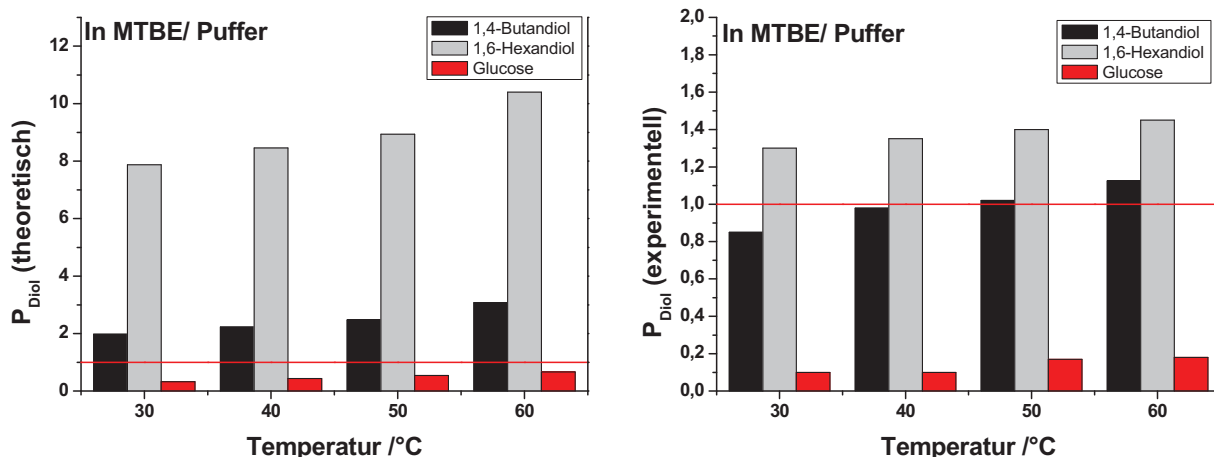


Abb. 4-32: Übereinstimmung der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten der Dirole in MTBE /Puffer und n-Heptan/ Puffer

Anhand von Abbildung 4-32 kann festgestellt werden, für welche untersuchten Substanzen und Systeme die Verteilungskoeffizienten in ausreichender Genauigkeit berechnet werden konnten. Es wurden 2-Phasen Systeme mit eher polarer und unpolarer organischer Phase ($\log P$ zwischen 1,0 für MTBE und 4,66 für n-Heptan) untersucht sowie polare und eher unpolare Dirole und Disäuren.

Auffällig an Abb. 4-32 ist die Tatsache, dass Glucose eher in der Wasserphase vorliegt, wohingegen 1,4-Butandiol und 1,6-Hexandiol zu einem größeren

4. Ergebnisse

Prozentsatz in die organische Phase übergehen. Dieses deckt sich nicht ganz mit den experimentellen Daten.

Glucose liegt sowohl nach den theoretischen wie auch nach den experimentellen Daten zu über 90 % in der Wasserphase vor, was aus den kleinen Verteilungskoeffizienten hervorgeht. Hingegen geht 1,6-Hexandiol als eher unpolare Verbindung bevorzugt in die organische Phase über ($P_x > 1$). 1,4-Butandiol liegt von der Polarität her zwischen Glucose und 1,6-Hexandiol und geht mit steigender Temperatur mehr in die organische Phase über. Die Tendenzen, welche sich in den berechneten Verteilungskoeffizienten zeigen, stimmen mit den experimentellen Daten überein. Hingegen gibt es deutliche Diskrepanzen in den reinen Zahlenwerten der Verteilungskoeffizienten. Dies zeigt sich besonders deutlich für 1,4-Butandiol, da nach den theoretischen Werten das Butandiol bei Temperaturen zwischen 30°C und 60°C immer zu mindestens als 75 % in die organische Phase übergeht. Anhand der experimentell bestimmten Daten verteilt sich das Butandiol aber mehr oder weniger 1:1 zwischen den Phasen. Hieraus kann geschlossen werden, dass COSMO zwar geeignet ist, Tendenzen in der Verteilung sichtbar zu machen, dass die Zahlenwerte aber stark von den experimentell bestimmten abweichen können. Dies führt vor allem für Substanzen moderater Polarität, welche sich mehr oder weniger im Verhältnis 1:1 zwischen den Phasen verteilen, zu Fehlinterpretationen.

Dieses gilt nicht nur für MTBE als Extraktionsphase, sondern auch für n-Heptan. Da aliphatische Dirole, wie Butandiol und Hexandiol, unpolarer als Glucose sind, weisen sie in n-Heptan/ Puffer einen großen Verteilungskoeffizienten auf (Abb. 4-33). Je extremer die Polarität einer Substanz ist, desto extremer ist auch ihre Verteilung im binären System. Das COSMO-RS liefert gute Übereinstimmungen für Substanzen mit sehr kleinen bzw. sehr großen Verteilungskoeffizienten.

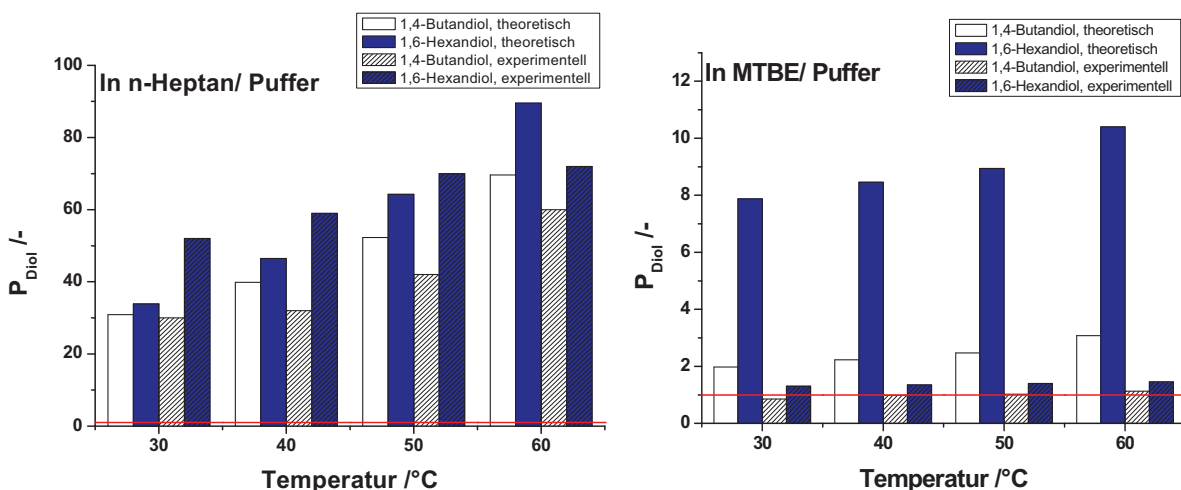


Abb. 4-33: Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten von 1,4-Butandiol und 1,6-Hexandiol in MTBE/ Puffer und n-Heptan/ Puffer

Die Verteilungskoeffizienten von polaren Substanzen, wie Glucose, in „eher“ polaren Lösungsmitteln (MTBE), lassen sich via COSMO-RS berechnen (Abb. 4-34). Dabei zeigt sich wiederum eine große Diskrepanz in den Zahlenwerten. Die berechneten Werte indizieren einen stärkeren Übergang in die organische Phase, als

4. Ergebnisse

experimentell ermittelt werden konnte. Da aber sowohl die Berechnungen wie auch die experimentellen Werte durch Vereinfachungen fehlerbehaftet sind, lassen sich die exakten Verhältnisse im binären System nicht eindeutig bestimmen. Es sollte für die einzelne Anwendung ermittelt werden, in welcher Genauigkeit die Verteilungskoeffizienten vorliegen müssen, um die Reaktionsbedingungen abschätzen zu können.

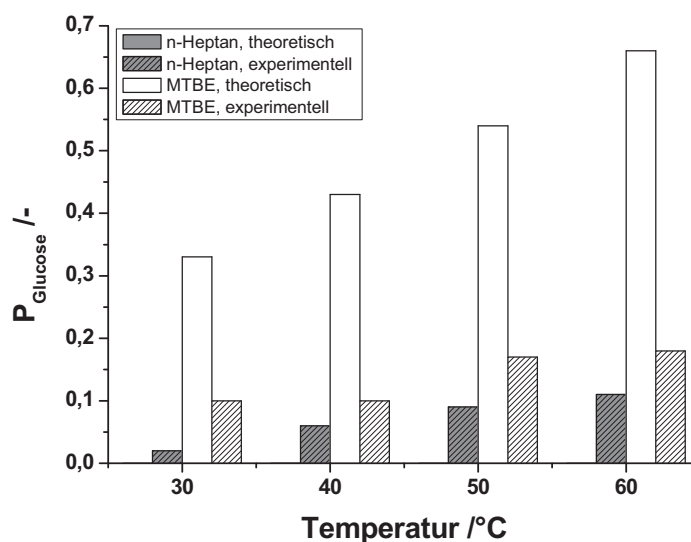


Abb. 4-34: Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten von Glucose in MTBE/ Puffer und n-Heptan/ Puffer (vergl. Tab. 9-5/6)

Zur Verschiebung der Gleichgewichtslage der betrachteten Polykondensation ist die Verteilung der Komponenten wichtig, sowohl der Substrate wie auch des Produktes. Eine zu geringe Konzentration der Monomere in der wässrigen Phase könnte eine Massentransferlimitierung der Reaktion durch den Transport der Monomere in die Reaktionsphase zur Folge haben. Folglich sind für Polykondensationen im binären Reaktionssystemen Verteilungskoeffizienten von $P_{\text{Substrat}} < 1$ vor Vorteil. Da aber eine Inhibierung der Lipase durch die Säure, wie auch durch das alkoholische Monomer, bekannt ist, ist ein Kompromiss anzustreben. Die Konzentration in der Wasserphase sollte folglich so groß wie nötig sein (keine Massentransferlimitierung), dabei aber so klein wie möglich, um die Inhibierung gering zu halten. Welche Koeffizienten günstig sind und wie man sie im Einzelnen beeinflussen kann, muss dabei für die jeweilige Reaktion bestimmt werden. Da es im Falle der beobachteten Polykondensation darum geht, mit Hilfe der Verteilungskoeffizienten die Stärke der Inhibierung abzuschätzen und eine Massentransferlimitierung auszuschließen, reichen die obigen Angaben aus.

Das Produkt, welches aus dem Gleichgewicht extrahiert werden soll, muss hingegen eine $P_{\text{Produkt}} > 1$ besitzen, damit eine Extraktion und damit eine Erhöhung des Umsatzes erfolgen kann. Aufgrund der Komplexität und Größe von Polymeren können diese nicht oder nur stark fehlerbehaftet mittels COSMO-RS berechnet werden, da der kombinatorische Term bei COSMO-RS für so große Molekülmassen nicht gefittet ist (vergl. Kap. 3-3). Vereinfacht sollen hier daher die Ergebnisse einfacher Diester diskutiert werden (Tab. 4-12).

4. Ergebnisse

Tab. 4-12: Direkter Vergleich der berechneten und experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten P_x verschiedener Säuren und Ester bei 50 °C in MTBE/ Puffer

Substanz	P_x (experimentell)	P_x (theoretisch)
Citronensäure	0,16	n.b. ¹
Triethylcitrat	34	379
Adipinsäure	2,6	6,34
Sebacinsäure	99	243
Adipinsäuredihexylester	n.m. ²	290000
Sebacinsäuredibutylester	n.m. ²	275000

¹n.b.-nicht berechnet, ²n.m.- nicht messbar ($P_x > 10.000$)

Wie die Diole zeigen auch die Disäuren nur mäßige Übereinstimmungen zwischen Theorie und Experiment. Sowohl die Disäuren wie auch das Triethylcitrat liegen nach den berechneten Werten zum größten Teil in der organischen Phase vor. Bei der Betrachtung der experimentellen Daten ist die Tendenz wiederum nicht so stark wie in den Berechnungen. Die Adipinsäure- und Sebacinsäureester weisen experimentell so hohe Verteilungskoeffizienten auf, dass diese nicht mehr bestimmbar sind. Die Konzentration der Stoffe in der Wasserphase ist unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb der Verteilungskoeffizient nur noch mit größer als 10.000 angegeben werden kann. Hierbei decken sich experimentelle Daten und die Berechnungen. Aus dieser Tatsache kann abgelesen werden, warum im binären System die Herstellung des Poly(butylsebacat) in hohen Ausbeuten möglich ist. Die Verteilungskoeffizienten von Sebacinsäure und dem Diester sind so unterschiedlich, dass die Gleichgewichtsreaktion verschoben werden kann. Aus den P_x der Ester kann man schließen, dass der Polyester sich in ähnlicher Weise verhalten wird und zu > 99 % in die organische Phase übergeht.

Die Gründe für die teils erheblichen Unterschiede zwischen den berechneten und den experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten sind vielfältig und sollten bei der Betrachtung der Daten berücksichtigt werden.

Sie werden durch folgende Faktoren verursacht:

- *Elektrolyte*: Für die Berechnung wurde Wasser als reine Phase angenommen, wohingegen im Experiment immer eine gepufferte Phase verwendet wurde.
- *Verdünnung*: Da die Experimente nicht, wie bei der Berechnung zugrunde gelegt, bei unendlicher Verdünnung durchgeführt werden konnten, stellt dies ebenfalls eine Fehlerquelle dar. Um diesen Fehler auszuschließen sollte besser mit einem Dreikomponenten-Mehrphasensystem bei den Berechnungen gearbeitet werden, um den „realen“ Verteilungskoeffizienten zu finden. Dieses ist mit COSMO-RS nicht mehr berechenbar.
- *Aktivitäten*: Bei den experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten wurden Konzentrationen an Stelle von Aktivitäten verwendet. Da diese

4. Ergebnisse

Näherung über die Konzentrationen nur in unendlicher Verdünnung gilt, stellte diese Herangehensweise einen Fehler dar (Gl. 5-5).

- *Temperatur*: Temperaturschwankungen im Experiment führten zu Abweichungen.
- *Statistisch-thermodynamische Methode*: Das Modell berechnet ausgehend von quantenchemisch berechneten Größen (Energien und Oberflächenladungen in den COSMO-files) Gleichgewichtseigenschaften. Die Vorhersage von Mischungen oder Verteilungen basiert ausschließlich auf den Wechselwirkungen der Oberflächendeskriptoren. COSMO-RS selbst hat keine molekül-, gruppen- oder funktionalitätsabhängigen Parameter.
- *LLE (liquid-liquid-equilibrium)*: Die Löslichkeiten, welche die Grundlage für die Verteilungskoeffizienten bilden, sind ebenfalls mittels des Programms berechnet worden und basieren nicht auf experimentellen Daten.
- *Volumenquotient*: Da Verteilungskoeffizienten auf molarer Basis definiert sind, geht in diese der Dichte- oder Volumenquotient der beiden Lösungsmittel ein (inklusive Excess-/ Mischungsdichte). Dieser Dichtequotient kann sich vom idealen Dichtequotient deutlich unterscheiden.
- *Konformeranalyse*: Da die COSMO-files nicht im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden, können keine Aussagen zu den Übereinstimmungen zwischen den realen elektronischen Verhältnissen und den berechneten getroffen werden.

Aus den genannten Punkten ist zu schlussfolgern, dass COSMO-RS nur bedingt für das vorliegende Problem geeignet ist. Der Ansatz, über ein Mehrkomponenten-Mehrphasensystem den **realen Verteilungskoeffizienten** zu berechnen, erscheint für die vorliegende Problematik vielversprechend, verkompliziert aber gleichzeitig die Berechnung. Es ist an dieser Stelle nicht ersichtlich, ob die Berechnung der Verteilungskoeffizienten auf diesem Weg zur angestrebten Zeit- und Kostenersparnis führen würde. Es bleibt festzuhalten, dass die Weiterentwicklung des COSMO-RS-Modells auch in den Bereichen, welche zurzeit noch Fehler aufweisen, verbessert werden kann. Dichtekorrekturen der Lösungsmittel werden als Möglichkeit zur Verbesserung der Ergebnisse gesehen, da die Volumenquotienten großen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Generell ist die Berechnung von Polykondensationen schwierig, da die Berechnung für derartige Molekülmassen nicht angepasst ist und damit ungenaue Ergebnisse resultieren.

Die **Tendenzen der Verteilungskoeffizienten** sind mit Hilfe von COSMO-RS für unterschiedliche binäre Systeme schnell und einfach zugänglich, wobei die Genauigkeit der Werte im Einzelfall variieren kann.

Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, dass mittels COSMO-RS die Verteilungskoeffizienten abgeschätzt werden konnten. Sowohl für die Diole wie auch für die Säuren und einfache Diester war es möglich, Verteilungskoeffizienten zu berechnen, die in ihrer Tendenz mit den experimentellen Daten korrelieren. Bei den

4. Ergebnisse

Zahlenwerten zeigen sich teilweise erhebliche Abweichungen, die bei Verteilungskoeffizienten um 1 zu Fehlinterpretationen führen können. Unter Berücksichtigung dessen und angesichts der kontinuierlichen Weiterentwicklung dieser Herangehensweise ergeben sich neue Perspektiven für die Industrie. Bei der Anwendung kann im Einzelfall über die benötigte Genauigkeit entschieden werden, wobei die von COSMO-RS vielleicht nicht für alle Problemlösungen ausreicht. Für die hier diskutierten Probleme zeigen sich die erwarteten Tendenzen und eine Anpassung des Reaktionssystems auf andere Substrate kann nun schnell und kostengünstig erreicht werden.

Die quantenmechanische Berechnung von LLEs, Verteilungskoeffizienten und freien Energien bis hin zur Vorausberechnung von maximalen Endumsätzen stellt ein vielversprechendes und zukunftssträchtiges Feld der modernen Chemie dar. Auch wenn es momentan schwierig ist, mit Berechnungsalgorithmen alle Wechselwirkungen und Beeinflussungen nachzuvollziehen und zu verstehen, so kann die Physikalische Chemie, genauer: die Quantenchemie, einen großen Beitrag zur Aufklärung von Reaktionsmechanismen und molekularen Vorgängen leisten.

5. Zusammenfassung

Die Polykondensation von hydrophilen Monomeren stand im Mittelpunkt des Interesses bei der Anfertigung der vorgelegten Arbeit. Diese wurde zur Erhöhung der Monomerkonzentration in der Umgebung des Enzyms im binären Reaktionssystem mit integrierter Produktentfernung (IPR) durchgeführt. Es konnten durch die Ermittlung kinetischer und thermodynamischer Limitierungen sowie durch die Bestimmung der Polyesterstruktur Informationen über den Mechanismus der Polykondensation in diesem System gewonnen werden.

Im Falle der Polykondensation von Sebacinsäure und 1,4-Butandiol (**Modell 1**) verläuft die Reaktion im binären Reaktionssystem mit Umsätzen von $> 90\%$ und Molekülmassen von $> 2000 \text{ g mol}^{-1}$ zufriedenstellend, wobei die Reaktionszeit mit 48 h moderat ist. Limitierend auf die Reaktion wirken sich neben der Temperatur ($> 50^\circ\text{C}$) der pH-Wert und die Wahl des Extraktionsmittels aus. Besonders die Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte beeinflussen die Molekülmasse und den Umsatz (vergl. Kap. 4.2.1).

Der Polyester aus Glucose und Citronensäure (**Modell 2**) lässt sich ebenfalls im binären Reaktionssystem herstellen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist aufgrund der Hydrophilie der Monomere und deren voluminöser Struktur geringer, als es bei Modell 1 festgestellt wurde. Hieraus und aus dem geringen Endumsatz kann geschlossen werden, dass die CaLB hydrophile Substrate mit voluminösen funktionellen Gruppen nicht gut als Substrat akzeptiert. Eine besonders stark inhibierende Wirkung, welche für kurzkettige Säuren bereits von Romero et al. festgestellt wurde, konnte für die Citronensäure ermittelt werden[178]. Limitierend auf die Reaktion wirkt sich neben der Temperatur ($> 50^\circ\text{C}$) ein extremer pH-Wert und die Wahl des Extraktionsmittels aus. Besonders die Verteilungskoeffizienten der Substrate und Produkte steuern die Molekülmasse, die Polydispersität und den Umsatz (vergl. Kap. 4.2.2). Eine Verschiebung des Monomerenverhältnisses r_0 zu hohen Glucosekonzentrationen bewirkte einen gleichbleibenden Umsatz. Da besonders die alkoholische Komponente für die kompetitive Inhibierung der Lipasen verantwortlich ist, wurde dieser Punkt näher beleuchtet[127]. Durch die Verwendung eines neuartigen Aktivitätsassays, welcher die separate Betrachtung der Substrate ermöglichte, konnte der aktivierende Effekt der Glucose bestimmt werden. Dieses Phänomen wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Bei der Betrachtung der **Polymerstruktur** fällt auf, dass sowohl das Poly(butylsebacat) wie auch das Poly(glucosylcitrat) als AABB-Polymer vorliegen. Genau ein Molekül Disäure wird mit einem Molekül Diol verknüpft und bildet so die Repeating Unit. Dieses ist im Falle von Glucose und Citronensäure ein interessantes Ergebnis, denn bei der Vielzahl von Verknüpfungsmöglichkeiten erfolgt die Kondensation immer an den endständigen Gruppen der Citronensäure und zwei OH-Gruppen der Glucose. Hiermit bleiben viele funktionelle Gruppen für weitere Reaktionen erhalten.

5. Zusammenfassung

Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit **COSMO-RS**, ein quantenchemisches Berechnungsprogramm, genutzt werden, um Verteilungskoeffizienten verschiedener Dirole und Disäuren zu berechnen. In der Tendenz korrelieren die Ergebnisse mit den experimentellen Daten. Hiermit konnte COSMO-RS erfolgreich etabliert werden, um Verteilungskoeffizienten vorherzuberechnen. Der experimentelle Aufwand für die Übertragung der Modellsystem-Ergebnisse auf andere Monomere kann so verringert werden, denn anhand der berechneten Verteilungskoeffizienten können die Systemparameter abgeschätzt werden.

6. Ausblick und Diskussion

Ziel der Arbeit war die Synthese eines neuartigen Polyesters auf Basis hydrophiler Monomere. Dies erfolgte durch lipasen-katalysierte Polykondensation in einem binären Reaktionssystem. Sowohl kinetische als auch thermodynamische Effekte sollten zur Umsatz- und Molekülmassenmaximierung untersucht werden. Das Verständnis der ablaufenden Prozesse ist nicht nur für die Steuerung der Reaktion von Vorteil, sondern auch für die Übertragung der generierten Ergebnisse und Schlussfolgerungen auf andere Substrate und alternative Veresterungsreaktionen.

In dieser Arbeit war es möglich die kinetischen und thermodynamischen Limitierungen von lipasen-katalysierten Polykondensationen im binären System anhand zweier Modellreaktionen zu untersuchen.

Wichtig für einen hohen **Umsatz** sowie für eine maximale **Molekülmasse** des Polyesters sind folgende Parameter:

1. Reaktionsgeschwindigkeit
 - Inhibierung durch die Monomere (P_{Monomer})
 - Inhibierung durch das Extraktionsmittel
 - pH-Wert der Wasserphase
 - Substratstruktur und Hydrophilie

2. Effektive Verschiebung der Gleichgewichtslage
 - Polyesterlöslichkeit ($P_{\text{Polyester}}$)
 - Reaktionstemperatur
 - Substratstruktur und Hydrophilie
 - Enzympräparation
 - Enzymstabilität

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Polyester aus Sebacinsäure und 1,4-Butandiol sowie ein Polyester aus D-Glucose und Citronensäure im binären Reaktionssystem hergestellt werden. Die Strukturaufklärung beider Polyester mittels MS und NMR ergab, dass es sich um ein symmetrisches **AABB-Polymer** handelt. Die mittleren Molekülmassen bewegten sich bei beiden Produkten im Bereich der Oligomere mit 8-12 Repeating Units.

Die Synthese von Polyestern im binären Reaktionssystem konnte demzufolge erfolgreich durchgeführt werden, wobei die Produktisolierung des Poly(glucosylcitrats) sich als schwierig herausstellte. Der Grund hierfür ist die Vielzahl von freien funktionellen Gruppen in der Polymerkette, welche bei der Aufarbeitung zu einer spontanen Hydrolyse führten.

Trotz der langsamen Reaktionsgeschwindigkeit der Polykondensation von hydrophilen Monomeren ist diese Umsetzung vor allem für die Medizintechnik interessant. Eine Weiterentwicklung in dieser Richtung ist von Interesse, da mit der vorgelegten Arbeit nur der Grundstein für eine Anwendung geschaffen werden

konnte. In weiterführenden Arbeiten sollten Enzymmodifikationen und alternative sowie Folgereaktionen, wie z.B. die Kopplung der Oligomere in einem nachfolgenden Schritt, miteinbezogen werden.

Darüber hinaus wurde die Berechnung von Verteilungskoeffizienten mittels des quantenchemischen Berechnungsprogramms **COSMO-RS** angestrebt. Es hat sich gezeigt, dass sich die Produkte der Polykondensation nur mit unzureichender Genauigkeit über das Conductor-like screening model for real solvents berechnen lassen. Für derartige Molekülgrößen ist das Programm nicht ausgelegt, was zu Fehlern führt. Im Bereich der Monomere sind die Ergebnisse in ihrer Tendenz richtig. Monomere, welche einen sehr kleinen bzw. sehr großen Verteilungskoeffizienten ausweisen, lassen sich in guter Übereinstimmung mit den experimentellen Daten berechnen. Die Verteilung von Monomeren mit einer moderaten Polarität und damit einem Verteilungskoeffizienten um 1, ist nur mit geringer Übereinstimmung zu berechnen. Trotz allem sind die Tendenzen in allen untersuchten Fällen durch die Berechnungen richtig wiedergegeben worden. Davon abgesehen liefert das COSMO-RS zufriedenstellende Ergebnisse auch für andere Bereiche [81, 82], ist aber vielleicht aufgrund der Herangehensweise des Modells nur mäßig für die Berechnung von Polymerverteilungskoeffizienten geeignet.

Alles in allem liefert diese Arbeit wichtige Informationen über die lipasen-katalysierte Polykondensation von hydrophilen Monomeren im binären Reaktionssystem, die als Grundvoraussetzungen für effektive Synthesen vorhanden sein müssen. Ein tieferes Verständnis, wie die Reaktionsbedingungen zu wählen sind, um maximalen Umsatz bzw. maximale Molekülmassen zu erhalten, konnte mit dieser Arbeit geliefert werden.

Für die Zukunft ergeben sich verschiedene Anknüpfungspunkte, um die vorgelegten Ergebnisse weiterzuentwickeln und hierdurch neuartige Polyester zugänglich zu machen.

Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung sind:

1. Optimierung der Produktisolierung
2. Verknüpfung der Oligomere zu Polymeren mittels Homogen-, Hetrogen- oder Biokatalyse
3. Biokompatibilitätsuntersuchungen der Produkte
4. Modifizierung des aktiven Zentrums der CaLB (oder einer anderen Lipase) durch gen-shuffling oder directed evolution
5. Anwendung alternativer Lösungsmittel, wie z.B. Ionische Flüssigkeiten, organische Carbonate oder wässrige 2-Phasen Systeme, als Reaktions- und Extraktionsphase

Sollte in der zukünftigen Entwicklung die Synthese von hochmolekularen, filmbildenden Polyestern gelingen, wären die praktischen Anwendungen vor allem auf dem medizinischen Sektor zu sehen. Derartige Stoffe könnten als

Beschichtungsmaterial von Implantaten oder als Trägermaterial von Medikamenten für die gezielte Freisetzung dieser Verwendung finden.

Kurzfristig ist eine Verwendung der Oligomere als Weichmacher für kommerziell verwendete Polymere zu sehen. Da das bisher eingesetzte Triethylcitrat zur Verdampfung neigt, würde ein neuartiger Zusatzstoff mit geringerem Dampfdruck viele Vorteile bieten.

Fazit der vorgelegten Arbeit ist:

Kunststoffe aus nachwachsenden Rohstoffen können in der Zukunft eine vielversprechende Alternative zu den Polymeren auf petrochemischer Basis sein. Es gilt daher die Entwicklung weiter voranzutreiben. Das Ziel der Arbeit, einen kleinen Betrag hierzu zu leisten, konnte erreicht werden.

7. Material und Methoden

7.1 Aktivitätsbestimmungen

7.1.1 Photometrischer Assay für die freie CaLB

Zur Aktivitätsbestimmung der freien Lipase B aus *Candida antarctica* wurde die Hydrolyse von *para*-Nitrophenylpalmitat (p-NPP) untersucht (Abb.7-1). Bei dieser Hydrolyse handelt es sich um eine etablierte Standardreaktion zur Bestimmung der Aktivität freier Lipasen [214-217]. Wie Abb.4-1 zeigt, ist das Phenolat-Ion mit seiner gelblichen Färbung die photometrisch detektierbare Größe. Hieraus folgt, dass die Reaktion vom p-Nitrophenol (p-NP) zum Phenolat ausreichend schnell ablaufen muss, um eine zeitliche Verfolgung der lipasen-katalysierten Hydrolyse des Palmitates zu gewährleisten. Dazu ist ein basischer pH-Wert der Lösung erforderlich, denn p-NP, als Säure-Base-Indikator, liegt bei einem pH-Wert > 9 nahezu vollständig als Phenolat vor[218].

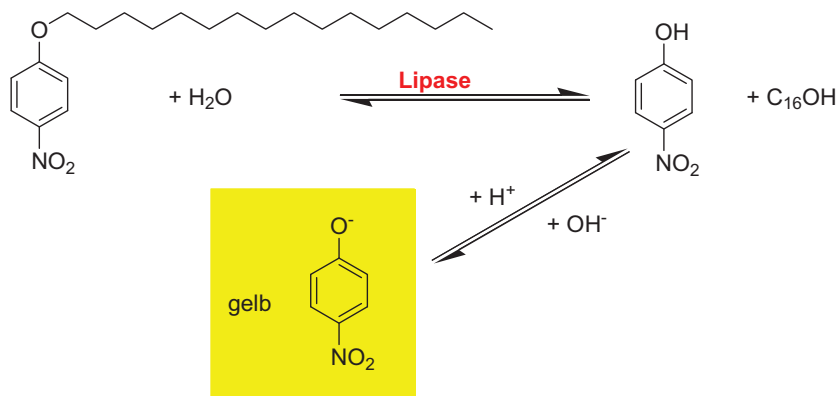


Abb. 7-1: Standardreaktion zur Bestimmung der Aktivität der freien Lipase (p-NPP zu p-NP, Phenolat absorbiert bei 400nm)

Um den Einfluss der Monomere auf die Aktivität der Lipase zu untersuchen, wurden Reaktionssysteme mit den Monomeren und der freien Lipase hergestellt. Periodisch wurden Proben entnommen, in denen die Aktivität der freien Lipase zu bestimmen ist. Das Reaktionssystem setzt sich wie folgt zusammen:

<u>Reaktionsansatz:</u>		
5000 μl (V_{gesamt}):	125	μl 1M Glucose-Lsg.
	125	μl 1M Citronensäure-Lsg.
	15	μl CaLB-Verd. (1:10)
	2235	μl Puffer
	2500	μl org. Lösungsmittel

7. Material & Methoden

Für die Aktivitätsmessung mittels des photometrischen Assays war es notwendig, den Extinktionskoeffizienten des p-Nitrophenols zu bestimmen. Hierzu wurde die Extinktion einer p-Nitrophenollösung unterschiedlicher Konzentration untersucht. Der Extinktionskoeffizient ergibt sich dann aus der Steigung der Geraden, welche durch die Messpunkte gelegt werden kann (Abb. 7-2).

Temperatur /°C	Extinktionskoeffizient ϵ / l mol ⁻¹ cm ⁻¹
30	22113
40	22517
50	23458
60	24307

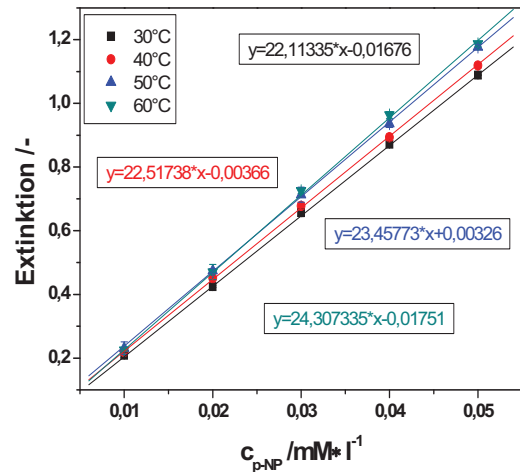


Abb. 7-2: Temperaturabhängigkeit des Extinktionskoeffizienten vom p-Nitrophenol

Für die experimentelle Bestimmung der Aktivitäten wurden periodisch Proben von 10 bis 100 μ l, je nach Enzymkonzentration im Reaktionssystem, aus dem System entnommen und in eine Küvette mit der folgenden Zusammensetzung pipettiert.

<u>Küvettenzusammensetzung</u>		
1000	μ l (V_{gesamt}):	890-980 μ l Glycin-Puffer (pH 9,0)
		10 μ l 10 mM p-NPP
		10-100 μ l Probe

Durch die Zugabe des p-NPPs wurde die Reaktion gestartet und der Konzentrationsverlauf des Phenolats mit der Zeit über 2 min aufgenommen. Dies erfolgte mittels eines Photometers der Firma Jena Analytik (Specord 50) bei 400 nm. Die Aktivität lässt sich aus dem Anstieg der Geraden mittels der Kinetikfunktion der Software Winaspect nach Gleichung 7-1 berechnen.

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{Steigung} \cdot 60 \cdot V_{\text{tot}}}{\epsilon \cdot V_{\text{Probe}} \cdot d} \cdot f \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}] \quad \text{Gl. 7-1}$$

V_{tot} :	1000 μ l
V_{Probe} :	10-100 μ l
ϵ :	22113 -24307 l mol ⁻¹ cm ⁻¹
d:	1 cm
f:	Verdünnungsfaktor (z.B. 1:10)

Abb. 7-3: Berechnung der Aktivität auf Grundlage des p-NPP-Assays

7. Material & Methoden

Die erhaltenen Aktivitäten werden auf den Rohextrakt hochgerechnet, um eine bessere Vergleichbarkeit der Chargen untereinander zu ermöglichen.

Die Entkopplung von Inkubation und verfolgter Reaktion ermöglicht im Falle der freien Lipase eine leichte Variation der Monomere. Da nicht der direkte Reaktionsverlauf verfolgt wird, sondern nur der deaktivierende bzw. aktivierende Einfluss der Monomere auf das Enzym im Mittelpunkt steht, eröffnet diese Methodik eine schnelle Anpassung an andere Ausgangsstoffe. Zur Veranschaulichung des Messprinzips dient die folgende schematische Darstellung (Abb. 7-4).

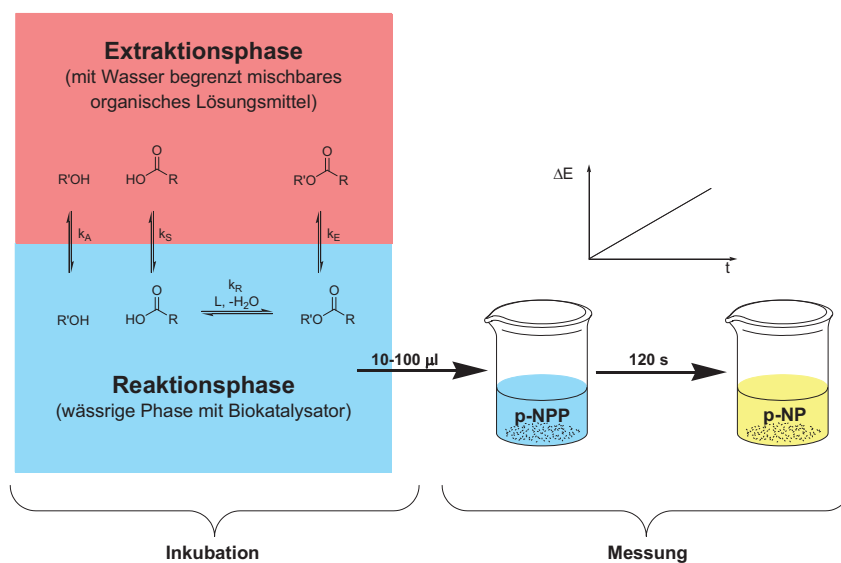


Abb. 7-4: Bestandteile des Aktivitätsassays für die native CaLB (Inkubationsphase: 20 min, Messungsphase: 2 min)

Stabilitätsuntersuchungen:

Ebenfalls konnte photometrisch untersucht werden, wie das freie Enzym durch Lösungsmittel oder andere Faktoren in seiner Aktivität beeinflusst wird. Die Untersuchungen wurden in analogen Reaktionssystemen durchgeführt, wie bereits die Aktivitätsmessungen. Die allgemeine Zusammensetzung des Reaktionssystems wird in der Folge skizziert:

Reaktionsansatz:	
5000 μl (V_{gesamt}):	125 μl 1M Glucose-Lsg.
	125 μl 1M Citronensäure-Lsg.
	15 μl CaLB-Verd. (1:10)
	2235 μl Puffer
	2500 μl org. Lösungsmittel

<u>Küvettenzusammensetzung</u>			
1000	μl (V _{gesamt}):	940-970	μl Glycin-Puffer (pH 9,0)
		10	μl 10mM p-NPP
		20-50	μl Probe

Das Enzym, welches in der wässrigen Phase vorgelegt wird, wurde bei unterschiedlichen Temperaturen in Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel gebracht. Durch regelmäßige Probenahme aus der wässrigen Phase konnte die Aktivität (gemessen über p-NPP-Aktivitätsassay) über die Zeit verfolgt werden.

Die exponentielle Abnahme der Aktivität sollte mindestens solange verfolgt werden, bis die Lipase nur noch die Hälfte der Anfangsaktivität zeigte. An diesem Punkt ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Lipase erreicht. Die jeweiligen Zeitintervalle der Probenahme richteten sich hierbei nach der Geschwindigkeit der Deaktivierung.

Die Methode zur Ermittlung der Halbwertszeit wurde in vorherigen Arbeiten bereits angewendet[35, 83].

$$\text{relative Aktivität} = e^{-kt} \quad \text{Gl. 7-2}$$

$$-\ln(\text{relative Aktivität}) = k \cdot t \quad \text{Gl. 7-3}$$

k - Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls

t - Zeit [h]

$t_{1/2}$ - Halbwertszeit des Enzyms [h]

Abb. 7-5: Halbwertszeit eines Enzyms nach einem Zerfallsgesetz erster Ordnung

Die Abnahme der Aktivität eines Enzyms folgt in der Regel einem exponentiellen Verlauf. Es lässt sich annehmen, dass sich dieser Verlauf durch eine Exponentialfunktion erster Ordnung wiedergeben lässt. Durch die Linearisierung dieser Funktion (Gl. 7-3) erhält man die Geschwindigkeitskonstante k, anhand derer sich die Halbwertszeit berechnen lässt.

4.1.2 Gaschromatographischer Assay für die immobilisierte CaLB

Die Aktivitätsbestimmung des Novozyms® 435 war mittels der oben erläuterten Methodik nicht möglich. In der Literatur wird ein Assay beschrieben, welcher auf der Veresterung von Laurinsäure mit 1-Propanol beruht [161, 166, 168, 173]. Diese Umsetzung wurde für die Aktivitätsermittlung der immobilisierten CaLB herangezogen und wie folgt durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz:</u>		
5000 μl (V_{gesamt}):		50 mg Laurinsäure (100mM)
		30 mg 1-Propanol (200mM)
		8 mg Novozym 435 (10 %(w/w))
		2500 μl org. LM
		2500 μl Puffer

Die Messung der Aktivität erfolgt über die Abnahme der Laurinsäurekonzentration. Die Veresterungsreaktion wird bis zu 1h verfolgt. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine GC der Firma Carlo Erba mit FID und einer Fused-Silica Kapillarsäule von CS (Chromatographie Service, FS-SE-52-CB) bzw. eine GC der Firma Varian mit einer Kapillarsäule der Firma Thermo DB-5 verwendet. Detektiert wurden die Substanzen mittels FID (Flamen-Ionisations-Detektor). Der Kalibrierbereich lag zwischen 0,1 mM bis 1,5 mM Laurinsäure bezogen auf die GC-Verdünnung, welche unten beschrieben ist. Als interner Standard wird eine 100 mM Lösung von n-Dodecan in Chloroform verwendet.

<u>GC-Probe</u>		
1000 μl (V_{gesamt}):		980 μl Dichlormethan bzw. Oktan
		10 μl 100mM int. Standard
		10 μl Probe

Temperaturprogramm (Carlo Erba): 60°C (2 min) – 8 °C/min – 180°C (5 min) – 20°C/min – 250 °C (2 min), Int. Standard: 100 mM n-Dodecan in Dichlormethan

Temperaturprogramm (Varian): 80°C (2 min) – 8 °C/min – 180°C (5 min) – 20°C/min – 250 °C (2 min), Int. Standard: 100 mM n-Dodecan in Oktan

Vergleichende Daten:

CaLB Cognis: 130 U mL⁻¹

CaLB Codexis: 200 U mL⁻¹

Novozym® 435: 10 U mg⁻¹

4.1.3 Gelelektrophorese und Proteingehalt

Die gelelektrophoretische Trennung wurde in einer Kammer der Firma Invitrogen bei 75 V durchgeführt. Es wurde ein fertig gegossenes Acrylamidgradientengel NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Mini-Gel der Firma Invitrogen verwendet mit einem Gradienten von 4% auf 12 % Acryamid und einem Laufpuffer NuPAGE® LDS Sample Buffer. Zwei Standards Seebblue® Prestained Standard und Seebblue® unstained Standard von Invitrogen wurden verwendet, um eine Zuordnung der Molekülmassen zu den Banden zu erhalten. Die Taschen des Gels wurden mit 15 μg einer präparierten Proteinlösung (Entfaltung mit SDS bei 70°C) gefüllt. Dann wird das Gel durch Anlegen des Stroms gestartet.

Nach ca. 2 h wird das Gel gewaschen, in 100 mL destilliertes Wasser überführt und in der Mikrowelle bei 980 Watt für 45 s erhitzt. Diese Prozedur ist 3-mal zu

7. Material & Methoden

wiederholen. Danach wurden 20 mL SimplyBlue Stained Reagenz, welches das Coomassie Brilliant Blue enthält, zugesetzt. Abschließend wurde das Gel in 100 mL destilliertes Wasser, welchem 20 mL 20%(w/w) NaCl-Lösung zugesetzt werden, überführt, um die Lagerfähigkeit des Gels zu .

Der Proteingehalt des Rohextraktes konnte mittels des Bradford-Protein-Assays bestimmt werden. Hierzu wird zu Beginn eine Kalibrierung mittels des Standardproteins BSA (Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin) in einem Bereich zwischen 1 und 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ aufgenommen. Die zugrunde liegende Reaktion des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue (Invitrogen) mit dem Protein, welches auch bei der Gelelektrophorese genutzt wird, ist von Bradford et al. Beschrieben worden[219]. Sie beruht auf der veränderten Absorption des Farbstoffes bei 595 nm, welches durch eine Komplexbildung hervorgerufen wird. Der ungebundene Farbstoff absorbiert bei 410 nm, wohingegen die anionische (gebundene) Form bei 595 nm absorbiert.

Die Messung des Proteingehaltes verläuft nach dem folgenden Muster. Zuerst wird die Zusammensetzung in einer Plastikkuvette präpariert. Hierbei können die Volumina können je nach Hersteller variieren, weshalb die Anleitung zu beachten ist.

<u>Küvette</u>	
2000 μl (V_{gesamt}):	1000 μl Bradford-Reagenz
	1000 μl Probe (Verdünnung)

Anschließend muss die Farbreaktion für 5-45 min (bei allen Proben die gleiche Zeit) in Ruhe ablaufen, wobei die Küvetten bei 30 °C im Photometer inkubiert werden. Abschließend erfolgt die Messung bei 595 nm.

7.2 Reaktionsverfolgung

7.2.1 Verteilungskoeffizienten

Um die Verteilung der Substanzen zwischen den Phasen bestimmen zu können, wurden Proben aus der wässrigen Phase des Systems entnommen, die auf ihre Konzentrationen an Substrat und Produkt vermessen wurden [91, 124, 220]. Die organische Phase konnte aufgrund der verwendeten Analytik nicht im Hinblick auf die Monomere untersucht werden. Als Bezugspunkt gilt die Konzentration in der Wasserphase vor Kontakt mit der organischen Phase, folglich zum Zeitpunkt t_0 .

Hierzu wurde das 2-Phasen System in einem 8 ml Vial angesetzt, wobei die Volumina der beiden Phasen jeweils 4 ml betragen. Das Volumenverhältnis der beiden Phasen, welches mit α bezeichnet wird, wurde gleich eins gewählt [221]. Für das System Diol und Disäure wurden im Rahmen dieser Arbeit die Verteilungskoeffizienten für unterschiedliche 2-Phasen Systeme ermittelt. Zur statistischen Auswertung war es unerlässlich, diese Untersuchung mehrmals (min. 3 Wiederholungen) durchzuführen, um mittels der Standardabweichung die Reproduzierbarkeit zu überprüfen.

Die Konzentrationen für Glucose und Citronensäure von je 50 mM wurden in MTBE, n-Hexan, n-Heptan, Diisopropylether, Toluol, p-Xylol und Chloroform in einem Temperaturbereich zwischen 30°C bis 60°C untersucht. Für die übrigen Diole und Dicarbonsäure wurden lediglich die interessanten Systeme untersucht.

Nachdem das binäre System aus wässriger und organischer Phase (mit Substraten) hergestellt wurde, erfolgte eine kurze Durchmischung am Vortex-Schüttler. Anschließend wurden die Gefäße auf die jeweilige Temperatur gebracht und für 1 h bei 200 rpm auf einem Vertikalschüttler geschüttelt. Zur vollständigen Phasentrennung lagerten die Gefäße anschließend 3 Tage im Wasserbad bei entsprechender Temperatur. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich die Phasen bei den Probenahmen vollständig getrennt haben, da sonst fehlerhafte Werte resultieren. Die Probenahme erfolgte mittels einer 100 μ l HPLC-Spritze, wobei aus der wässrigen Phase 50 μ l Proben entnommen wurden. Zur Vorbereitung für die HPLC wurden die 50 μ l Proben mit dem entsprechenden Eluenten 1:20 verdünnt. Anschließend erfolgte die Messung mittels HPLC.

$$P_x^+ = \frac{a_x^{\text{org}}}{a_x^{\text{aq}}} = \text{const.} \quad [-] \quad T, p = \text{const.} \quad \text{Gl. 7-5}$$

$$P_x = \frac{[X]^{\text{org}}}{[X]^{\text{aq}}} = \frac{[X]^{\text{Start}} - [X]^{\text{aq}}}{[X]^{\text{aq}}} \quad [-] \quad T, p = \text{const.} \quad \text{Gl. 7-6}$$

a_x^{org} :	Aktivität der Substanz X in der organischen Phase
a_x^{aq} :	Aktivität der Substanz X in der wässrigen Phase
$[X]^{\text{aq}}$:	Konzentration der Substanz X in der organischen Phase [mol l^{-1}]
$[X]^{\text{org}}$:	Konzentration der Substanz X in der wässrigen Phase [mol l^{-1}]
$[X]^{\text{Start}}$:	Konzentration von Substanz X vor Kontakt mit der org. Phase [mol l^{-1}]

Abb. 7-6: Gleichungen für Verteilungskoeffizienten für Diol und Dicarbonsäure

Die Verteilungskoeffizienten wurden mittels Gleichung 7-6 berechnet, da die Aktivitäten (Gl. 7-5) nicht zugänglich waren. Infolgedessen musste auf die Berechnung über Konzentrationen zurückgegriffen werden [126, 212]. Es ist bei der Diskussion der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass diese Vereinfachung zu Fehlern führt.

7.2.2 HPLC-Analytik zur Konzentrationsbestimmung der Monomere

Alle Untersuchungen bezüglich der Monomerenkonzentration wurden mittels HPLC mit Dioden Array und Brechungsindex-Detektor (RI-Detektor) durchgeführt. Bei dem Gerät handelt es sich um ein System der Firma Knauer bestehend aus Degasser, Pumpe, Autosampler, Säulenofen und Dioden Array-, sowie RI-Detektor. Für die chromatographische Trennung der Stoffe wurden 3 unterschiedliche Säulen verwendet. Es wurde eine Aminex HDK-87 H Ion Exclusion-Säule (300 mm x 7,8 mm) der Firma BIORAD und eine Größenausschluss-Säule MetaCarb von Varian Inc. (300 mm x 6,5 mm) sowie eine RHM-Monosaccharid-Säule (Rezex) der Firma Phenomenex (H-Säule, 300 mm x 7,8 mm) eingesetzt. Als Eluent wurden verschiedene Lösungsmittelzusammensetzungen genutzt mit einem Fluss zwischen 0,8 ml/min und 0,5 ml/min. Zur Auswertung der Chromatogramme diente das Programm Eurochrom 2000 bzw. Chromgate. Da mittels dieser HPLC-Analytik keine Konzentrationsbestimmung des Produktes, also des Polyesters, möglich war, wurde der Umsatz nur mittels der Konzentrationsabnahme der Monomere bestimmt bzw. bei den linearen Disäuren ebenfalls über die Masse des entstandenen Produktes. Hierzu ist es notwendig, vor Beginn der Reaktion, folglich vor Zugabe des Enzyms, eine Probe aus der wässrigen Phase zu entnehmen und die Anfangskonzentration des Substrates zu bestimmen. Der Umsatz berechnet sich dann wie folgt:

$$C = \frac{C_{\text{Produkt}}}{C_{\text{Substrat}}} = \frac{C_{t_0} - C_t}{C_{t_0}} \quad \text{Gl. 7-7}$$

Abb. 7-7: Berechnung des Umsatzes aus den HPLC-Untersuchungen

Zur statistischen Absicherung der Messergebnisse wurden die Proben 3-fach injiziert und nach jeder 10ten Probe wurde ein QC-Lauf (Lauf zur Qualitätssicherung) durchgeführt, welcher zur Überwachung der HPLC diente. Als Standard für die QC-Messung wurde eine 10 mM Standardlösung des jeweiligen Analyten gewählt, um den Fehler der Konzentrationsbestimmung (fehlerhaftes Injektionsvolumen) und die Verschiebung der Retentionszeit zu überwachen.

Bedingungen der HPLC-Messungen:

- **Flussrate:** 0,8 ml/ml 0,006 M H₂SO₄ (BIORAD); 0,6 ml/min H₂O (Phenomenex); 0,5 ml/min 0,005 M H₂SO₄/Acetonitril (90/10) (MetaCarb)
- **Säulentemperatur:** 65°C (BIORAD); 50°C (Phenomenex/ MetaCarb)
- **Detektor:** RI und Dioden Array

7. Material & Methoden

Die Retentionszeiten der Monomere variierten je nach verwendeter Säule und deren Trennprinzip (Tab. 7-1).

Tab. 7-1: Retentionszeit der Monomere

Substanz	Retentionszeit /min (BIORAD)	Retentionszeit /min (MetaCarb)	Retentionszeit /min (Phenomenex)
1,4-Butandiol	16,383	-	-
1,3-Propandiol	13,642	-	-
Glycerol	10,408	-	-
Adipinsäure	11,400	-	-
Sebacinsäure	15,120	-	-
Glucose	7,074	8,133	10,415
Citronensäure	6,099	6,933	7,133
Ribose	8,492	-	-
Xylose	7,575	-	-
Sorbitol	8,025	-	-
Saccharose	6,926	-	-
Fructose	7,608	-	11,033

Die Auswertung erfolgte über die Peakfläche der Monomere, mittels einer Kalibrierung im Konzentrationsbereich zwischen 1 mM und 20 mM. Die Messzeiten für die einzelnen Untersuchungen wurden den Retentionszeiten der Monomere angepasst. In den untersuchten 2-Phasen Systemen mit MTBE und DIPE als Lösungsmittel waren längere Messzeiten notwendig, da geringe Mengen der Ether in der Wasserphase einen langgezogenen Peak bei späten Retentionszeiten verursachten.

Generell sei an dieser Stelle bemerkt, dass Blindversuche ohne Enzym für jedes beschriebene Experiment durchgeführt wurden. In keinem dieser Experimente war eine Reaktion ohne den Biokatalysator detektierbar.

7.3 Polymeranalytik

7.3.1 GPC-Analytik zur Molekülmassenbestimmung der Polyester

Für die Molekülmassenbestimmung der Polyester war es erforderlich, eine Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography SEC, gel permeations chromatographie GPC) zu verwenden, um die Polyester hinsichtlich ihrer Molekülmasse aufzutrennen [18, 60, 206, 222]. Hierzu wurde eine HPLC-Anlage der Firma Knauer mit der ResiPore®-Säule (Polymer Laboratories, Spezifikationen: 400.000-580 g/mol, 25°C, 0,6 ml/min THF) und einem Lichtstredetektor (PL-ELS 2100 von Polymer Laboratories, Evaporator: 70°C, Nebuliser: 50°C, Gasfluss N₂: 1,6 SLM (Standardliter pro Minute)) ausgestattet. Für die Aufnahme der Chromatogramme wurde die Eurochrom 2000-Software verwendet. Die Auswertung erfolgte über das Cirrus®-Programm (Polymer Laboratories), welches mittels mathematischer Integration die Molekülmasse der entsprechenden Kettenlängen berechnet (vergl. Abb. 3-2). Die Zuordnung der Molekülmassen erfolgte über Kalibrierung mit Polystyrolstandards in einem Bereich zwischen 400.000 g/mol bis 580 g/mol (Tab. 7-2; Abb. 9-5).

Tab: 7-2: Polystyrol-Standard zur 10 Punkt-Kalibrierung der GPC für die Molekülmassenbestimmung

Standard		Molekülmasse /g mol ⁻¹
EasiCal A	1	377.400
	2	96.000
	3	20.650
	4	5.460
	5	1.300
EasiCal B	6	210.500
	7	50.400
	8	10.850
	9	2.930
	10	580

Hieraus folgt, dass es sich bei der verwendeten Molekülmassenbestimmung lediglich um eine Relativmessung handelt, welche bei einer anderen räumlichen Ausdehnung der Polyester im Vergleich zum Polystyrol (PS) zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann. Da die via GPC bestimmten Molekülmassen mit den Ergebnissen aus MS- und NMR-Messungen für Poly(butylsebacat) und Poly(glucosylcitrat) innerhalb des Fehlerbereiches der Messung übereinstimmen, kann davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Polyester eine ähnliche räumliche Ausdehnung wie PS besitzen.

Generell sei an dieser Stelle bemerkt, dass die Polydispersität der Polyester im binären System bei allen Messungen zwischen 1,2 und 1,6 lag. Dies weist auf eine sehr enge Molekulargewichtsverteilung hin.

7.3.2 NMR-Analytik

Für die NMR-Untersuchungen wurden zwischen 20 und 50 mg der zu untersuchenden Substanz in CDCl_3 bzw. d_8 -THF gelöst. Die ^1H - und ^{13}C -Spektren wurden mit einem Gerät der Firma Bruker AC 250 F Aspect 3000-Datensystem mit Probenkopf: QNP (^1H , ^{13}C , ^{29}Si , ^{31}P) 5 mm mit Probenwechsler und Temperiereinheit mit 250 MHz aufgenommen. Ebenfalls wurde einem Gerät von Bruker ARX 300 UNIX-Datensystem mit den Probenköpfen: QNP (^1H , ^{13}C , ^{29}Si , ^{31}P) 5 mm mit Probenwechsler und Temperiereinheit bei 300 MHz verwendet. Zur Auswertung der Daten diente das NMR-Programm Mestrec. Zur Verifizierung sind die Untersuchungen mehrmals an unterschiedlichen Chargen des Polyesters durchgeführt worden. Spektren hierzu sind in Kapitel 4.4.1 dargestellt.

Poly(butylsebacat)

^1H -NMR(300 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 1,25-1,35 (m, 8H, E); 1,53-1,65 (m, 4H, D); 1,65-1,75 (m, 4H, C); 2,22-2,35 (m, 4H, B); 4,02-4,15 (m, 4H, A)

^{13}C (75 MHz, CDCl_3): δ [ppm] = 24,9 (8C, F); 29,0 (4C, E); 29,1 (4C, D); 34,2 (4C, C); 63,7 (4C, B); 173,8 (2C, A)

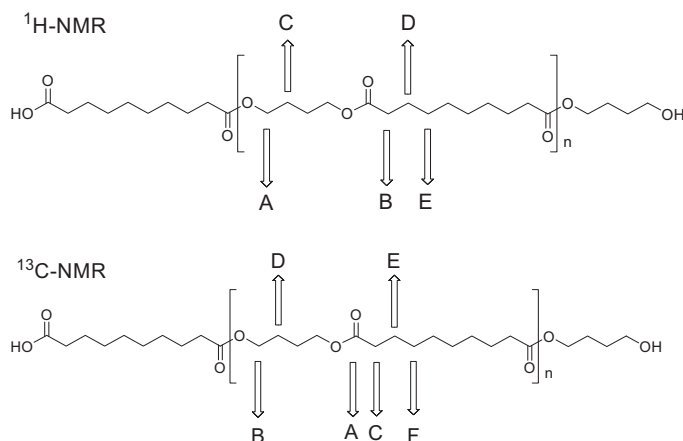


Abb. 7-8: Zuordnung der chemischen Verschiebung im NMR (A: ^1H ; B: ^{13}C) zu den Gruppen des Polyesters

7.3.3 Massenspektrometrische Untersuchung

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Polyester wurden mittels Direkteinspritzung über eine Spritzenpumpe (5 $\mu\text{l}/\text{min}$) durchgeführt. Die Substanzen wurden dafür in Methanol mit 0,1 % Ameisensäure gelöst. Für die Untersuchung der labilen Polyester wurde die organische Phase von Monomerresten mittels Festphasenextraktion befreit (SPE: Phenomenex STRATA CN; 55 mm, 70Å) und bis fast zur Trockne eingengt. Der eingengte Extrakt wurde mit Methanol mit 0,1 %

Ameisensäure aufgenommen und untersucht. Die Ionisierung der Probe erfolgte über „Electrospray Ionisation“ (ESI-mode 4,5 kV, positiv full MS), wobei ein Messbereich von 150-2000 amu abgedeckt wurde (Transferkapillartemperatur: 270°C, sheat gas (N₂): 10, sweep gas (He): 5).

7.3.4 Thermogravimetrie und DSC

Die Thermogravimetrie (TG) wurde in einem Temperaturbereich von 30°C bis 350°C für den Polyester und von 30°C bis 200°C für die Monomere durchgeführt. Gleichzeitig fanden DSC-Messungen (Differential scanning calorimetry) für Sebacinsäure und Dodecandisäure statt, welche für die Berechnungen der Schmelz- und Verdampfungsenthalpie benötigt wurden. Aus den TG-Messungen sind zum einen Masseverluste, die auf Kristallwasserausschleusung, Lösungsmittelrückstände etc. hindeuten, ersichtlich. Des Weiteren kann aus der TG der Schmelzpunkt des Sebacinsäure-Butandiol-Polyesters bestimmt werden. Die Daten wurden in das Programm Origin übertragen und ausgewertet.

Das Temperaturverhalten von Disäuren sowie die Enthalpie wurden mittels eines computerkontrollierten Perkin-Elmer Pyris Diamond DSC gemessen. Bei allen Messungen wurde eine leere Pfanne als Referenz genutzt. Die Temperatur- und die Wärmestromskala des DSC wurden durch ein hochreines Indium ($T_0 = 429.8$ K and $\Delta H_{\text{ref}} = 28.4$ J·g⁻¹) kalibriert. Das thermische Verhalten der Probe wurde bei einer Ausheizrate von 10 K·min⁻¹ untersucht. Die Unsicherheit für die Temperatur beträgt bei der Messung $\pm 0,5$ K und für die Enthalpie ± 1 J·g⁻¹. Doppelbestimmungen der Messungen ergaben dabei Unsicherheiten von $\pm 0,2$ kJ·mol⁻¹ für die Enthalpie und $\pm 0,5$ K für die Schmelztemperatur.

Standard *ab initio* Molekülorbitalberechnungen wurden mittels des Programms Gaussian 03 Rev.04 durchgeführt. Die Energien wurden durch die DFT B3LYP/6-311+G(d,p) Methode für Disäuren und das G3MP2 Theorielevel für 1,4-Butandiol erhalten, wobei kein interner Rotor miteinbezogen wurde. Die Enthalpie-Werte bei 298 K wurden nach gängiger thermodynamischer Prozedur ausgewertet.

7.4 COSMO-RS

In dieser Arbeit wurde ein Datensatz von bereits generierten COSMO-files der Firma COSMOlogic GmbH & Co. KG (Leverkusen) verwendet. Sowohl SVP als auch TZVP-Basissätze wurden für die Kalkulation der LLEs und Verteilungskoeffizienten verwendet. Als Berechnungsprogramm kam die Version COSMOtherm-C21-0107 zum Einsatz[154].

7.4.1 Flüssig-Flüssig-Gleichgewicht

Aufgrund fehlender experimenteller Daten mussten die liquid-liquid-equilibria ebenfalls mittels COSMOtherm kalkuliert werden, obwohl die sich daraus ergebenden Werte Ungenauigkeiten beinhalten. Die LLEs wurden isotherm bei unterschiedlichen Temperaturen (vergl. 7.4.2) berechnet, wobei einzustellen war, dass der LLE-Punkt gesucht werden sollte.

7.4.2 Verteilungskoeffizienten

Die Verteilungskoeffizienten basieren auf dem erworbenen Datensatz und den vorher berechneten LLEs. Mittels COSMOtherm wurden die $\log_{10}P$ unter Variation von:

- Temperatur (30°C, 40°C, 50°C, 60°C),
- Organischer Phase (MTBE, n-Hexan, n-Heptan, Chloroform, DIPE und Toluol)
- Komponente i (Diole, Disäuren, Diester)

berechnet. Ein Berechnungsbeispiel findet sich im Anhang. Aufgrund fehlender Daten für die binären Systeme mussten die Dichte- bzw. Volumenunterschiede anhand der von COSMO abgeschätzten Volumina berechnet werden.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Brahm, M., *Polymerchemie kompakt*, Hirzel, Stuttgart, **2005**.
- [2] Peacock, A., Calhoun, A., *Polymer Chemistry - Properties and Applications*, Hanser Gardner Publications, München, **2006**.
- [3] Lörks, J., Wenig, B., Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e. V., Pflanzen Rohstoffe Produkte: Biokunststoffe.
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/index.php?id=1252&idtitel=224&idkat=0&pflanzen=0&verarbeitung=0&gruppen=0&titelsuche=> **2006**.
- [4] Berufsschule_Winsen, in <http://www.bs-wiki.de/mediawiki/index.php/Cellulose>, **2008**.
- [5] McCabe, R. W., Taylor, A., Synthesis of novel polyurethane polyesters using the enzyme *Candida antarctica* lipase B. *Green Chemistry* **2004**, 6, (2): 151-155.
- [6] Edlund, U., Albertsson, A. C., Polyesters based on diacid monomers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, 55, (4): 585-609.
- [7] Doi, Y., Steinbüchel, A., *Polyesters I : biological systems and biotechnological production, Vol. 3a*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [8] Steinbüchel, A., Marchessault, R. H., in *Biopolymers for medical and pharmaceutical applications Vol. 1* (Eds.: Steinbüchel, A., Marchessault, R.H.), Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [9] Doi, Y., Steinbüchel, A., *Polyesters II : properties and chemical synthesis, Vol. 3b*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [10] Doi, Y., Steinbüchel, A., *Polyesters III : applications and commercial products, Vol. 4*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.
- [11] Mark, H. F., Bikales, N., Overberger, C. G., Menges, G., *Polyesters to polypeptide synthesis, Vol. 12*, 2ed ed., John Wiley & Sons Inc, New York, **1988**.
- [12] Freier, T., Sternberg, K., Peseke, K., Schmitz, K.-P., in *Moderne Polymere - Kohlenhydrate und Pflanzenöle als innovative Rohstoffe, Vol. 16* (Ed.: Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e.V.),
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/index.php?id=1252&idtitel=68&idkat=0&pflanzen=0&verarbeitung=0&gruppen=0&titelsuche=>, Gülzower Fachgespräche, **2001**.
- [13] Peters, D., Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e. V., Nachwachsende Rohstoffe in der Industrie.
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/index.php?id=1252&idtitel=228&idkat=0&pflanzen=0&verarbeitung=0&gruppen=0&titelsuche=> **2006**.
- [14] méo consulting team, IE Leipzig, Faserinstitut Bremen, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e. V., Marktanalyse Nachwachsende Rohstoffe.
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/index.php?id=1252&idtitel=254&idkat=0&pflanzen=0&verarbeitung=0&gruppen=0&titelsuche=> **2006**.
- [15] nova-Institut GmbH, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e. V., Marktanalyse Nachwachsende Rohstoffe Teil II.
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/Literatur.798+M5c328d3976e.0.html> **2007**.
- [16] Deimling, S., Goymann, M., Baitz, M., Rehl, T., Auswertung von Studien zur ökologischen Betrachtung von nachwachsenden Rohstoffen bei einer stofflichen Nutzung.

8. Literaturverzeichnis

-
- <http://www.biowerkstoffe.info/cms35/Literatur.798+M5c328d3976e.0.html>
2008.
- [17] Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe, e. V., Daten und Fakten zu nachwachsenden Rohstoffen.
<http://www.biowerkstoffe.info/cms35/index.php?id=1252&idtitel=303&idkat=0&pflanzen=0&verarbeitung=0&gruppen=0&titelsuche=> **2007.**
- [18] Sternberg, K., Kramer, S., Nischan, C., Grabow, N., Langer, T., Hennighausen, G., Schmitz, K. P., In vitro study of drug-eluting stent coatings based on poly(L-lactide) incorporating cyclosporine A-drug release, polymer degradation and mechanical integrity. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* **2007**, 18, (7): 1423-1432.
- [19] Saling, P., Kicherer, A., Dittrich-Kramer, B., Wittlinger, R., Zombik, W., Schmidt, I., Schrott, W., Schmidt, S., Eco-efficiency analysis by BASF: The method. *International Journal of Life Cycle Assessment* **2002**, 7, (4): 203-218.
- [20] Elias, H.-G., *An Introduction to Polymer Science*, VCH, Weinheim, **1997**.
- [21] Haas, C., (Ed.: Arbeitsmedizin, B.f.A.u.), Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin **2007**.
- [22] Elias, H.-G., *Macromolecules, Vol. 1*, Wiley VCH, Weinheim, **2005**.
- [23] Vieweg, R., Goerden, L., *Polyester - Herstellung, Eigenschaften, Verarbeitung und Anwendung*, Carl Hanser Verlag, München, **1973**.
- [24] Dewald, U., in
<http://www.wissenschaft.de/wissenschaft/hintergrund/173036.html>,
wissenschaft.de, **2000**.
- [25] Hammond, T., Liggat, J. J., Montador, J. H., Webb, A., *WO/1994/028061*, **1994**.
- [26] Albertsson, A. C., Varma, I. K., in *Degradable Aliphatic Polyesters*, **2002**, pp. 1-40.
- [27] Ladmiral, V., Monaghan, L., Mantovani, G., Haddleton, D. M., α -Functional glycopolymers: New materials for (poly)peptide conjugation. *Polymer* **2005**, 46, (19 SPEC. ISS.): 8536-8545.
- [28] Clacens, J. M., Pouilloux, Y., Barrault, J., Selective etherification of glycerol to polyglycerols over impregnated basic MCM-41 type mesoporous catalysts. *Applied Catalysis a-General* **2002**, 227, (1-2): 181-190.
- [29] Clacens, J. M., Pouilloux, Y., Barrault, J., in *Scientific Bases for the Preparation of Heterogeneous Catalysts, Vol. 143*, **2002**, pp. 687-695.
- [30] Freemantle, M., Biocatalysis in Polymer Science. *Science & Technology* **2004**, 82, (6): 25-29.
- [31] Uyama, H., Kobayashi, S., in *Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*, **2006**, pp. 133-158.
- [32] Kim, Y.-J., Uyama, H., Kobayashi, S., Enzymatic Template Polymerization of Phenol in the Presence of Water-soluble Polymers in an Aqueous Medium. *Polymer Journal* **2004**, 36, (12): 992-998.
- [33] Kalra, B., Gross, R. A., Other Examples of Polymer biocatalysis - 24 Peroxidase-mediated free radical Polymerization of vinyl monomers. *American Chemical Society* **2003**, 840: 297-308.
- [34] Uyama, H., Kobayashi, S., Enzym-catalyzed polymerization to funktional Polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2002**, 19-20: 117-127.
- [35] Eckstein, M. F., Alcohol dehydrogenase catalysed reductions in non-conventional media, PhD thesis, University of Rostock (Rostock), **2004**.
- [36] Wallace, J. S., Morrow, C. J., Biocatalytic synthesis of polymers. Synthesis of an optically active, epoxy-substituted polyester by lipase-catalyzed
-

8. Literaturverzeichnis

- polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **1989**, 27, (8): 2553-2567.
- [37] Wallace, J. S., Morrow, C. J., Biocatalytic Synthesis of Polymers - Synthesis of an Optically-Active, Epoxy-Substituted Polyester by Lipase-Catalyzed Polymerization. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1989**, 27, (8): 2553-2567.
- [38] Wu, X. Y., Seppala, J., Linko, Y. Y., Lipase-catalyzed polyester synthesis. *Biotechnology Techniques* **1996**, 10, (10): 793-798.
- [39] Linko, Y. Y., Lamsa, M., Wu, X. Y., Uosukainen, E., Seppala, J., Linko, P., Biodegradable products by lipase biocatalysis. *Journal of Biotechnology* **1998**, 66, (1): 41-50.
- [40] Matsumura, S., Okamoto, T., Tsukada, K., Toshima, K., Novel lipase-catalyzed ring-opening copolymerization of oxiranes and succinic anhydride forming polyesters bearing functional groups. *Macromolecular Rapid Communications* **1998**, 19, (6): 295-298.
- [41] Wu, X. Y., Linko, Y. Y., Seppala, J., Leisola, M., Linko, P., Lipase-catalyzed synthesis of aromatic polyesters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **1998**, 20, (6): 328-332.
- [42] Schimper, C. B., Ibanescu, C., Keckeis, R., Bechtold, T., Advantages of a two-step enzymatic process for cotton-polyester blends. *Biotechnology Letters* **2008**, 30, (3): 455-459.
- [43] Nordblad, M., Adlercreutz, P., Efficient enzymatic acrylation through transesterification at controlled water activity. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 99, (6): 1518-1524.
- [44] Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P., Mattiasson, B., A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, 97, (2): 235-241.
- [45] Gubitz, G. M., Paulo, A. C., New substrates for reliable enzymes: enzymatic modification of polymers. *Current Opinion in Biotechnology* **2003**, 14, (6): 577-582.
- [46] Piccolo, A., Cozzolino, A., Conte, P., Spaccini, R., Polymerization of humic substances by an enzyme-catalysed oxidative coupling. *Naturwissenschaften* **2000**, 87: 391-394.
- [47] Matsumura, S., Kihara, N., Takata, T., Properties of a few aromatic Poly(thioether ketones) as sulfur-containing High-Performance Polymers. *Journal of Applied Polymer Science* **2004**, 92: 1869-1874.
- [48] Wu, X. Y., Linko, Y. Y., Seppala, J., in *Enzyme Engineering Xiv*, **1998**, pp. 399-404.
- [49] Kamitsuji, H., Watanabe, T., Honda, Y., Kuwahara, M., Direct oxidation of polymeric substrates by multifunctional manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus* without redox mediators. *Biochemical Journal* **2005**, 386, (2): 387-393.
- [50] Masuda, M., Sakurai, A., Sakakibara, M., Effect of enzyme impurities on phenol removal by the method of polymerization and precipitation catalyzed by *Coprinus cinereus* peroxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2001**, 57, (4): 494-499.
- [51] Xu, P., Uyama, H., Whitten, J. E., Kobayashi, S., Kaplan, D. L., Peroxidase-catalyzed in situ polymerization of surface orientated caffeic acid. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (33): 11745-11753.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [52] Tanaka, T., Yamamoto, M., Takahashi, M., Fujii, T., Taniguchi, M., Enzymatic oxidative polymerization of 4-chloroguaiacol by laccase. *Journal of Chemical Engineering of Japan* **2003**, 36, (9): 1101-1106.
- [53] Tsujimoto, T., Uyama, H., Kobayashi, S., Polymerization of vinyl monomers using oxidase catalysts. *Macromolecular Bioscience* **2001**, 1, (6): 228-232.
- [54] Efe, C., Straathof, A. I. J., van der Wielen, L. A. M., Options for biochemical production of 4-hydroxybutyrate and its lactone as a substitute for petrochemical production. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 99, (6): 1392-1406.
- [55] Li, J. C., Fukuoka, T., He, Y., Uyama, H., Kobayashi, S., Inoue, Y., Thermal and crystallization behavior of hydrogen-bonded miscible blend of poly(3-hydroxybutyrate) and enzymatically polymerized polyphenol. *Journal of Applied Polymer Science* **2005**, 97, (6): 2439-2449.
- [56] Suzuki, Y., Ohura, T., Kasuya, K.-I., Toshima, K., Doi, Y., Matsumura, S., Enzym-catalyzed ring-opening of β -butyrolactone using PHB Depolymerase. *Chemistry Letters* **2000**, (4): 318-319.
- [57] Zhu, B., Li, J., He, Y., Osanai, Y., Matsumura, S., Inoue, Y., Thermal and infrared spectroscopic studies on hydrogen-bond interaction of biodegradable Poly(3-hydroxybutyrate)s with natural polyphenol catechin. *Green Chemistry* **2003**, 5: 580-586.
- [58] Distel, K. A., Zhu, G. Y., Wang, P., Biocatalysis using an organic-soluble enzyme for the preparation of poly(lactic acid) in organic solvents. *Bioresource Technology* **2005**, 96, (5): 617-623.
- [59] Jia, H., Wang, P., Enzymatic synthesis of galactosyl lactic ethyl ester and its polymer for use as biomaterials. *Journal of Biotechnology* **2007**, 132, (3): 314-317.
- [60] Modi, S., Jain, J. P., Domb, A. J., Kumar, N., Copolymers of pharmaceutical grade lactic acid and sebacic acid: Drug release behavior and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2006**, 64, (3): 277-286.
- [61] Vink, E. T. H., Rabago, K. L., Glassner, D. A., Gruber, P. R., Applications of life cycle assessment to NatureWorksTM polylactide (PLA) production. *Polymer Degradation and Stability* **2003**, 80: 403-419.
- [62] Henderson, L. A., Svirkin, Y. Y., Gross, R. A., Kaplan, D. L., Swift, G., Enzyme-catalyzed polymerizations of ϵ -caprolactone: Effects of initiator on product structure, propagation kinetics, and mechanism. *Macromolecules* **1996**, 29, (24): 7759-7766.
- [63] Namekawa, S., Uyama, H., Kobayashi, S., Lipase-catalysed ring-opening Polymerization of Lactones in the presence of aliphatic polyesters to ester copolymers. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2001**, 202, (6): 801-806.
- [64] Mahapatro, A., Kumar, A., Gross, R. A., Mild, solvent-free omega-hydroxy acid polycondensations catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *Biomacromolecules* **2004**, 5, (1): 62-68.
- [65] Villarroya, S., Zhou, J. X., Duxbury, C. J., Heise, A., Howdle, S. M., Synthesis of semifluorinated block copolymers containing, poly(ϵ -caprolactone) by the combination of ATRP and enzymatic ROP in ScCO₂. *Macromolecules* **2006**, 39, (2): 633-640.
- [66] Li, D. S., Sha, K., Li, Y. P., Liu, X. T., Wang, W., Wang, S. W., Xu, Y. X., Ai, P., Wu, M. Z., Wang, J. Y., Synthesis of diblock copolymer poly(10-hydroxydecanoic acid)/polystyrene by combining enzymatic condensation polymerization and ATRP. *Polymer Bulletin* **2006**, 56, (2-3): 111-117.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [67] Soeda, Y., Okamoto, T., Toshima, K., Matsumura, S., Enzymatic ring-opening polymerization of oxiranes and dicarboxylic anhydrides. *Macromolecular Bioscience* **2002**, 2, (9): 429-436.
- [68] Kulshrestha, A. S., Sahoo, B., Gao, W., Fu, H. Y., Gross, R. A., Lipase catalysis. A direct route to linear aliphatic copolyesters of bis(hydroxymethyl)butyric acid with pendant carboxylic acid groups. *Macromolecules* **2005**, 38, (8): 3205-3213.
- [69] Kumar, A., Gross, R. A., *Candida antarctica* lipase B-catalyzed transesterification: New synthetic routes to copolyesters. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, (48): 11767-11770.
- [70] Ohagan, D., Zaidi, N. A., Enzyme-Catalyzed Condensation Polymerization of 11-Hydroxyundecanoic acid with Lipase from *Candida cylindracea*. *Polymer* **1994**, 35, (16): 3576-3578.
- [71] Uyama, H., Inada, K., Kobayashi, S., Lipase-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters by polycondensation of dicarboxylic acids and glycols in solvent-free system. *Polymer Journal* **2000**, 32, (5): 440-443.
- [72] Chen, B., Hu, J., Miller, E. M., Xie, W. C., Cai, M. M., Gross, R. A., *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* **2008**, 9, (2): 463-471.
- [73] Yan, Y. C., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D., Efficient water removal in lipase-catalyzed esterifications using a low-boiling-point azeotrope. *Biotechnology and Bioengineering* **2002**, 78, (1): 31-34.
- [74] Chang, C. S., Wu, P. L., Synthesis of triglycerides of phenylalkanoic acids by lipase-catalyzed esterification in a solvent-free system. *Journal of Biotechnology* **2007**, 127, (4): 694-702.
- [75] Stevenson, D. E., Wibisono, R., Jensen, D. J., Stanley, R. A., Cooney, J. M., Direct acylation of flavonoid glycosides with phenolic acids catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435 (R)). *Enzyme and Microbial Technology* **2006**, 39, (6): 1236-1241.
- [76] Khamessan, A., Kermasha, S., Marsot, P., Effects of Polar Organic-Solvents on the Biocatalysis of Chlorophyllase in a Biphasic Organic-System. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **1994**, 58, (11): 1947-1952.
- [77] Carrea, G., Ottolina, G., Pasta, P., Riva, S., in *Enzyme Engineering Xiii, Vol. 799*, **1996**, pp. 642-649.
- [78] Andersson, M., Holmberg, H., Adlercreutz, P., Evaluation of *Alcaligenes eutrophus* cells as an NADH regenerating catalyst in organic-aqueous two-phase system. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, 57, (1): 79-86.
- [79] Pfründer, H., Amidjojo, M., Kragl, U., Weuster-Botz, D., Effiziente Ganzzell-Biotransformation im zweiphasigen System ionische Flüssigkeit/Wasser. *Angew. Chem.* **2004**, 116: 4629-4631.
- [80] Lozano, P., Daz, M., de Diego, T., Iborra, J. L., Ester synthesis from trimethylammonium alcohols in dry organic media catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, 82, (3): 352-358.
- [81] Eckstein, M. F., Lembrecht, J., Schumacher, J., Eberhard, W., Spiess, A. C., Peters, M., Roosen, C., Greiner, L., Leitner, W., Kragl, U., Maximise equilibrium conversion in biphasic catalysed reactions: How to obtain reliable data for equilibrium constants? *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, 348, (12-13): 1597-1604.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [82] Eckstein, M. F., Peters, M., Lembrecht, J., Spiess, A. C., Greiner, L., Maximise equilibrium conversion in biphasic catalysed reactions: Mathematical description and practical guideline. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, 348, (12-13): 1591-1596.
- [83] Lembrecht, J., Enzymkatalysierte Reduktion prochiraler Ketone zu (R)-Alkoholen mittels der Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis*, Universität Rostock (Rostock), **2005**.
- [84] Schumacher, J., Eckstein, M., Kragl, U., Influence of water-miscible organic solvents on kinetics and enantioselectivity of the (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnology Journal* **2006**, 1, (5): 574-581.
- [85] Reetz, M. T., Wiesenhofer, W., Liquid poly(ethylene glycol) and supercritical carbon dioxide as a biphasic solvent system for lipase-catalyzed esterification. *Chemical Communications* **2004**, (23): 2750-2751.
- [86] Lozano, P., De Diego, T., Sauer, T., Vaultier, M., Gmouh, S., Iborra, J. L., On the importance of the supporting *Candida antarctica* lipase B in material for activity of immobilized ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media. *Journal of Supercritical Fluids* **2007**, 40, (1): 93-100.
- [87] Foresti, M. L., Pedemera, A., Ferreira, M. L., Bucala, V., Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. *Applied Catalysis a-General* **2008**, 334, (1-2): 65-72.
- [88] Feher, E., Illeova, V., Kelemen-Horvath, I., Belafi-Bako, K., Polakovic, M., Gubicza, L., Enzymatic production of isoamyl acetate in an ionic liquid-alcohol biphasic system. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2008**, 50, (1): 28-32.
- [89] Ganske, F., Bornscheuer, U. T., Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and t-BuOH. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2005**, 36, (1-6): 40-42.
- [90] Swarts, J. W., Vossenbergh, P., Meerman, M. H., Janssen, A. E. M., Boom, R. M., Comparison of two-phase lipase-catalyzed esterification on micro and bench scale. *Biotechnology and Bioengineering* **2008**, 99, (4): 855-861.
- [91] Molinari, F., Gandolfi, R., Aragozzini, F., Leon, R., Prazeres, D. M. F., Biotransformations in two-phase systems
Production of phenylacetaldehyde by oxidation of 2-phenylethanol with acetic acid bacteria. *Enzyme and Mikrobial Technology* **1999**, 25: 729-735.
- [92] Chmiel, H., *Bioprozesstechnik - Einführung in der Bioverfahrenstechnik*, 2nd ed., Spektrum Akademischer Verlag (Elsevier), München, **2006**.
- [93] Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C., *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
- [94] Bommarius, A. S., Riebel, B. R., *Biocatalysis- Fundamentals and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [95] Syldatk, C., Hauer, B., May, O., Biokatalyse in der chemischen Industrie. *Biospektrum- VAAM-Nachrichten* **2001**, 2.01: 145-147.
- [96] Saxena, R. K., Ghosh, P. K., Gupta, R., Davidson, W. S., Bradoo, S., Gulati, R., Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry. *Current Science* **1999**, 77, (1): 101-115.
- [97] Straathof, A. J. J., Panke, S., Schmid, A., The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13, (6): 548-556.
- [98] Anderson, E. M., Karin, M., Kirk, O., One biocatalyst - Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* **1998**, 16, (3): 181-204.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [99] Pfeffer, J. C., The Lipases from *Candida antarctica*: Cloning. Expression and their Application in Synthesis of Structured Lipids, Universität Stuttgart (Stuttgart), **2008**.
- [100] Azim, H., Dekhterman, A., Jiang, Z. Z., Gross, R. A., *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of poly(butylene succinate): Shorter chain building blocks also work. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (11): 3093-3097.
- [101] Neves Petersen, M. T., Fojan, P., Petersen, S. B., How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotechnol* **2001**, 85, (2): 115-147.
- [102] Gotor, V., Pharmaceuticals through enzymatic transesterification and enzymatic aminolysis reactions. *Biocatalysis and Biotransformation* **2000**, 18, (2): 87-103.
- [103] Gotor-Fernandez, V., Busto, E., Gotor, V., *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, 348, (7-8): 797-812.
- [104] Lavandera, I. W., Fernandez, S., Magdalena, J., Ferrero, M., Kazlauskas, R. J., Gotor, V., An inverse substrate orientation for the regioselective acylation of 3',5'-diaminonucleosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B? *Chembiochem* **2005**, 6, (8): 1381-1390.
- [105] Quiros, M., Rebbollo, F., Gotor, V., *Candida antarctica* Lipase-Catalyzed Monoaminolysis of Diesters with Amino-Alcohols - Chemoenzymatic Synthesis of Macrocycles and Amino Diols. *Journal of Chemical Research-S* **1994**, (9): 339-339.
- [106] Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z. S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J. P., Christiansen, L., Hugejensen, B., Norskov, L., Thim, L., Menge, U., A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Center of a Triacylglycerol Lipase. *Nature* **1990**, 343, (6260): 767-770.
- [107] Nury, S., Pieroni, G., Riviere, C., Gargouri, Y., Bois, A., Verger, R., Lipase Kinetics at the Triacylglycerol-Water Interface Using Surface-Tension Measurements. *Chemistry and Physics of Lipids* **1987**, 45, (1): 27-37.
- [108] Wenda, S., in *Belegarbeit*, Rostock, **2008**.
- [109] Vasel, B., Hecht, H. J., Schmid, R. D., Schomburg, D., 3D-Structures of the Lipase from *Rhizomucor miehei* at Different Temperatures and Computer Modeling of a Complex of the Lipase with Tri-laurylglycerol. *Journal of Biotechnology* **1993**, 28, (1): 99-115.
- [110] Patkar, S. A., Svendsen, A., Kirk, O., Clausen, I. G., Borch, K., Effect of mutation in non-consensus sequence Thr-X-Ser-X-Gly of *Candida antarctica* lipase B on lipase specificity, specific activity and thermostability. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **1997**, 3, (1-4): 51-54.
- [111] Adam, G., Läuger, P., Stark, G., *Physikalische Chemie und Biophysik*, 4th ed., Springer-Verlag, Berlin, **2003**.
- [112] Kobayashi, T., Furutani, W., Adachi, S., Matsuno, R., Equilibrium constant for the lipase-catalyzed synthesis of fatty acid butyl ester in various organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2003**, 24-5: 61-66.
- [113] Guthrie, J. P., Pike, D. C., Lee, Y.-C., Equilibrium constants and heats of formation of methylesters and N,N-dimethyl amides of substituted benzoic acids. *Can. J. Chem.* **1991**, 70: 1671-1683.
- [114] Zhang, X. M., Adachi, S. J., Watanabe, Y., Kobayashi, T., Matsuno, R., Prediction of the equilibrium conversion for the synthesis of acyl hexose through lipase-catalyzed condensation in water-miscible solvent in the presence of molecular sieve. *Biotechnology Progress* **2003**, 19, (2): 293-297.
-

8. Literaturverzeichnis

- [115] Castillo, B., Bansal, V., Ganesan, A., Halling, P., Secundo, F., Ferrer, A., Griebenow, K., Barletta, G., On the activity loss of hydrolases in organic solvents: II. a mechanistic study of subtilisin Carlsberg. *Bmc Biotechnology* **2006**, 6.
- [116] Tan, Z. Y., Wu, H., Zong, M. H., Novozym 435-catalyzed regioselective benzylation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in a co-solvent mixture of C₄MIm PF₆ and pyridine. *Biocatalysis and Biotransformation* **2007**, 25, (5): 408-413.
- [117] Zaks, A., Klibanov, A. M., Enzyme-Catalyzed Processes in Organic-Solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, 82, (10): 3192-3196.
- [118] Schmid, R. D., Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **1998**, 37, (12): 1609-1633.
- [119] Dreyer, S., Lembrecht, J., Schumacher, J., Kragl, U., in *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries* (Ed.: Patel, R.), CRC-Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, **2006**, pp. 791-828.
- [120] Parmar, V. S., Bisht, K. S., Pati, H. N., Sharma, N. K., Kumar, A., Kumar, N., Malhotra, S., Singh, A., Prasad, A. K., Wengel, J., Novel biotransformations on peracylated polyphenolics by lipases immobilized in microemulsion-based gels and on carbohydrates by *Candida antarctica* lipase. *Pure and Applied Chemistry* **1996**, 68, (6): 1309-1314.
- [121] Carrea, G., Riva, S., Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, 39, (13): 2226-2254.
- [122] Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., Mukesh, D., Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis Reviews-Science and Engineering* **2000**, 42, (4): 439-480.
- [123] Krishna, S. H., Karanth, N. G., Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews-Science and Engineering* **2002**, 44, (4): 499-591.
- [124] Halling, P. J., Biocatalysis in Multiphase Reaction Mixtures Containing Organic Liquids. *Biotechnology Advances* **1987**, 5, (1): 47-84.
- [125] Koops, B. C., Papadimou, E., Verheij, H. M., Slotboom, A. J., Egmond, M. R., Activity and stability of chemically modified *Candida antarctica* lipase B adsorbed on solid supports. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, 52, (6): 791-796.
- [126] Kvittingen, L., Sjursnes, B., Anthonsen, T., Halling, P., Use of Salt Hydrates to Buffer Optimal Water Level During Lipase Catalyzed Synthesis in Organic Media - a Practical Procedure for Organic Chemists. *Tetrahedron* **1992**, 48, (13): 2793-2802.
- [127] Garcia-Alles, L. F., Gotor, V., Alcohol inhibition and specificity studies of lipase B from *Candida antarctica* in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, 59, (2): 163-170.
- [128] Martinek, K., Klibanov, A. M., Samokhin, G. P., Semenov, A. N., Berezin, I. V., Preparative Enzymatic Synthesis in a Two-Phase Aqueous-Organic System. *Bioorganicheskaya Khimiya* **1977**, 3, (5): 696-702.
- [129] Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T., Jones, T. A., Crystallization and Preliminary-X-Ray Studies of Lipase-B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology* **1994**, 235, (2): 790-792.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [130] Uppenberg, J., Hansen, M. T., Patkar, S., Jones, T. A., Sequence, Crystal-Structure Determination and Refinement of 2 Crystal Forms of Lipase-B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, 2, (4): 293-308.
- [131] Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T., Jones, T. A., Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* **1995**, 34, (51): 16838-16851.
- [132] Trodler, P., Pleiss, J., Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *Bmc Structural Biology* **2008**, 8.
- [133] Raza, S., Fransson, L., Hult, K., Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study. *Protein Science* **2001**, 10, (2): 329-338.
- [134] Kirk, O., Christensen, M. W., Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research & Development* **2002**, 6, (4): 446-451.
- [135] Veeraragavan, K., Gibbs, B. F., Detection and partial purification of 2 Lipases from *Candida rugosa*. *Biotechnology Letters* **1989**, 11, (5): 345-348.
- [136] RCSB PDB, www.rcsb.de **2008**.
- [137] Hilker, I., Rabani, G., Verzijl, G. K. M., Palmans, A. R. A., Heise, A., Chiral polyesters by dynamic kinetic resolution polymerization. *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, 45, (13): 2130-2132.
- [138] Neuner, I. T., Ursu, M., Frey, H., in *Polymer Biocatalysis and Biomaterials*, **2005**, pp. 354-365.
- [139] Hedfors, C., Hult, K., Martinelle, M., Östmark, E., Malmström, E., Thiol end-functionalization of poly(ϵ -caprolactone), catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Macromolecules* **2005**, 38, (3): 647-649.
- [140] Pfeffer, J., Richter, S., Nieveler, J., Hansen, C. E., Rhlid, R. B., Schmid, R. D., Rusnak, M., High yield expression of Lipase A from *Candida antarctica* in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and its purification and characterisation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, 72, (5): 931-938.
- [141] Leonard, V., Lamare, S., Legoy, M. D., Graber, M., Enantio selective acylation of R-2-pentanol in a solid/gas reactor catalysed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2004**, 32, (1-2): 53-59.
- [142] Hansen, T. V., Waagen, V., Partali, V., Anthonsen, H. W., Anthonsen, T., Cosolvent Enhancement of Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Racemic Esters - a Process for Production of Homochiral C-3 Building-Blocks Using Lipase-B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron-Asymmetry* **1995**, 6, (2): 499-504.
- [143] Waagen, V., Hollingsaeter, I., Partali, V., Thorstad, O., Anthonsen, T., Enzymatic Resolution of Butanoic Esters of 1-Phenyl, 1-Phenylmethyl, 1-[2-Phenylethyl] and 1-[2-Phenoxyethyl] Ethers of 3-Methoxy-1,2-Propanediol. *Tetrahedron-Asymmetry* **1993**, 4, (10): 2265-2274.
- [144] Hacking, M., Akkus, H., van Rantwijk, F., Sheldon, R. A., Lipase and esterase-catalyzed acylation of hetero-substituted nitrogen nucleophiles in water and organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, 68, (1): 84-91.
- [145] Klamt, A., Leonhard, K., Validation of the COSMO-RS electrostatics by Monte-Carlo simulations. *Fluid Phase Equilibria* **2007**, 261, (1-2): 162-167.
- [146] Binder, K., Horbach, J., Kob, W., Paul, W., Varnik, F., Molecular dynamics simulations. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2004**, 16, (5): S429-S453.
- [147] Sprik, M., Ab initio molecular dynamics simulation of liquids and solutions. *Journal of Physics-Condensed Matter* **1996**, 8, (47): 9405-9409.
-

8. Literaturverzeichnis

- [148] Hafner, J., Ab-initio simulations of materials using VASP: Density-functional theory and beyond. *J Comput Chem* **2008**, 29, (13): 2044-2078.
- [149] Piersall, S. D., Anderson, J. B., Direct Monte-Carlo Simulation of Chemical-Reaction Systems - Simple Biomolecular Reactions. *Journal of Chemical Physics* **1991**, 95, (2): 971-978.
- [150] Mokrushina, L., Buggert, M., Smirnova, I., Arlt, W., Schomacker, R., COSMO-RS and UNIFAC in prediction of micelle/water partition coefficients. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2007**, 46, (20): 6501-6509.
- [151] Abbas, R., Gmehling, J., Vapour-liquid equilibria, azeotropic data, excess enthalpies, activity coefficients at infinite dilution and solid-liquid equilibria for binary alcohol-ketone systems. *Fluid Phase Equilibria* **2008**, 267, (2): 119-126.
- [152] Klamt, A., Eckert, F., Hornig, M., COSMO-RS: A novel view to physiological solvation and partition questions. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* **2001**, 15, (4): 355-365.
- [153] Eckert, F., COSMOtherm users manual. *Cosmologic GmbH and CO KG* **2003**.
- [154] Klamt, A., *COSMO-RS From Quantum Chemistry to Fluid Phase Thermodynamics and Drug Design*, 1st ed., Elsevier, Leverkusen, **2005**.
- [155] Klamt, A., Conductor-Like Screening Model for Real Solvents - a New Approach to the Quantitative Calculation of Solvation Phenomena. *Journal of Physical Chemistry* **1995**, 99, (7): 2224-2235.
- [156] Wichmann, K., Diedenhofen, M., Klamt, A., Prediction of blood-brain partitioning and human serum albumin binding based on COSMO-RS sigma-moments. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2007**, 47, (1): 228-233.
- [157] Shimoyama, Y., Iwai, Y., Yoda, S., Furuya, T., Prediction of partition coefficients of benzothiophene and benzothiophene 1,1-dioxide in octane/acetonitrile system using COSMO theory. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2008**, 47, (9): 3247-3252.
- [158] Kato, M., Toshima, K., Matsumura, S., Enzyme-catalyzed preparation of aliphatic polythioester by direct polycondensation of diacid diester and dithiol. *Macromolecular Rapid Communications* **2006**, 27, (8): 605-610.
- [159] Kim, S. C., Kim, Y. H., Lee, H., Yoon, D. Y., Song, B. K., Lipase-catalyzed synthesis of glycerol carbonate from renewable glycerol and dimethyl carbonate through transesterification. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2007**, 49, (1-4): 75-78.
- [160] Witt, U., Muller, R. J., Augusta, J., Widdecke, H., Deckwer, W. D., Synthesis, Properties and Biodegradability of Polyesters Based on 1,3-Propanediol. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1994**, 195, (2): 793-802.
- [161] Mahapatro, A., Kalra, B., Kumar, A., Gross, R. A., Lipase-catalyzed polycondensations: Effect of substrates and solvent on chain formation, dispersity, and end-group structure. *Biomacromolecules* **2003**, 4, (3): 544-551.
- [162] Kumar, A., Gross, R. A., *Candida antartica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: effects of organic media and temperature. *Biomacromolecules* **2000**, 1, (1): 133-138.
- [163] Mahapatro, A., Kumar, A., Kalra, B., Gross, R. A., Solvent-free adipic acid/1,8-octanediol condensation polymerizations catalyzed by *Candida antartica* lipase B. *Macromolecules* **2004**, 37, (1): 35-40.
- [164] Kulshrestha, A. S., Gao, W., Gross, R. A., Glycerol copolyesters: Control of branching and molecular weight using a lipase catalyst. *Macromolecules* **2005**, 38, (8): 3193-3204.
-

8. Literaturverzeichnis

- [165] Rejasse, B., Maugard, T., Legoy, M. D., Enzymatic procedures for the synthesis of water-soluble retinol derivatives in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, 32, (2): 312-320.
- [166] Chang, H. M., Liao, H. F., Lee, C. C., Shieh, C. J., Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2005**, 80, (3): 307-312.
- [167] Lou, W. Y., Zong, M. H., Liu, Y. Y., Wang, J. F., Efficient enantioselective hydrolysis of D,L-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. *Journal of Biotechnology* **2006**, 125, (1): 64-74.
- [168] Yadav, G. D., Devi, K. M., Kinetics of hydrolysis of tetrahydrofurfuryl butyrate in a three phase system containing immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Biochemical Engineering Journal* **2004**, 17, (1): 57-63.
- [169] Buthe, A., Recker, T., Heinemann, M., Hartmeier, W., Buchs, J., Ansorge-Schumacher, M. B., pH-optima in lipase-catalysed esterification. *Biocatalysis and Biotransformation* **2005**, 23, (5): 307-314.
- [170] Virto, C., Svensson, I., Adlercreutz, P., *Candida antarctica* lipase B-catalysed synthesis of dihydroxyacetone fatty acid esters. *Biocatalysis and Biotransformation* **2000**, 18, (1): 13-29.
- [171] Warwel, S., Demes, C., Steinke, G., Polyesters by lipase-catalyzed polycondensation of unsaturated and epoxidized long-chain dicarboxylic acid methyl esters with diols. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* **2001**, 39, (10): 1601-1609.
- [172] Pilarek, M., Szewczyk, K. W., Kinetic model of 1,3-specific triacylglycerols alcoholysis catalyzed by lipases. *Journal of Biotechnology* **2007**, 127, (4): 736-744.
- [173] Yadav, G. D., Trivedi, A. H., Kinetic modeling of immobilized-lipase catalyzed transesterification of n-octanol with vinyl acetate in non-aqueous media. *Enzyme and Microbial Technology* **2003**, 32, (7): 783-789.
- [174] Uyama, H., Ikeda, R., Yaguchi, S., Kobayashi, S., in *ACS Symposium Series, Vol. 764*, **2000**, pp. 113-127.
- [175] Uyama, H., Klegraf, E., Wada, S., Kobayashi, S., Regioselective polymerization of sorbitol and divinyl sebacate using lipase catalyst. *Chemistry Letters* **2000**, (7): 800-801.
- [176] Yoshida, Y., Kimura, Y., Kadota, M., Tsuno, T., Adachi, S., Continuous synthesis of alkyl ferulate by immobilized *Candida antarctica* lipase at high temperature. *Biotechnology Letters* **2006**, 28, (18): 1471-1474.
- [177] Janssen, A. E. M., Sjursnes, B. J., Vakurov, A. V., Halling, P. J., Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, 24, (8-9): 463-470.
- [178] Romero, M. D., Calvo, L., Alba, C., Daneshfar, A., A kinetic study of isoamyl acetate synthesis by immobilized lipase-catalyzed acetylation in n-hexane. *Journal of Biotechnology* **2007**, 127, (2): 269-277.
- [179] Nordblad, M., Adlercreutz, P., Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Biotechnology* **2008**, 133, (1): 127-133.
- [180] Buthe, A., Charakterisierung und rationale Immobilisierung von Lipasen in biphasischen Reaktionssystemen, Rheinisch-Westphälische Technische Hochschule Aachen (Aachen), **2006**.
-

8. Literaturverzeichnis

- [181] Ghazali, H. M., Lai, C. S., Hydrolytic activity of *Candida rugosa* lipase entrapped in aerosol-OT/isooctane reversed micelles: Effect of temperature, pH, ionic strength, substrate concentrations and cations. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **1996**, 4, (2): 67-73.
- [182] Hermansyah, H., Kubo, M., Shibasaki-Kitakawa, N., Yonemoto, T., Mathematical model for stepwise hydrolysis of triolein using *Candida rugosa* lipase in biphasic oil-water system. *Biochemical Engineering Journal* **2006**, 31, (2): 125-132.
- [183] Camacho, F., Robles, A., Gonzalez, P. A., Camacho, B., Esteban, L., Molina, E., Mechanistic model for the lipase-catalyzed alcoholysis of triacylglycerols. *Applied Catalysis a-General* **2006**, 301, (2): 158-168.
- [184] Khmel'nitsky, Y. L., Mozhaev, V. V., Belova, A. B., Sergeeva, M. V., Martinek, K., Denaturation Capacity - a New Quantitative Criterion for Selection of Organic-Solvents as Reaction Media in Biocatalysis. *European Journal of Biochemistry* **1991**, 198, (1): 31-41.
- [185] Azevedo, A. M., Cabral, J. M. S., Gibson, T. D., Fonseca, L. P., Operation and performance of analytical packed-bed reactors with an immobilised alcohol oxidase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2004**, 28, (2-3): 45-53.
- [186] Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S., Fonseca, L. P., Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2001**, 15, (4-6): 147-153.
- [187] van K nigsveld, G. A., Gruppen, H., de Jongh, H. H. J., Wijngaards, G., van Boekel, M. A. J. S., Walstra, P., Voragen, A. G. J., Effects of pH and heat treatments on the structure and solubility of potato proteins in different preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, 49, (10): 4889-4897.
- [188] Hyvonen, L., Varo, P., Koivistoinen, P., Tautomeric Equilibria of D-Glucose and D-Fructose - NMR Spectrometric Measurements. *Journal of Food Science* **1977**, 42, (3): 657-659.
- [189] Hyvonen, L., Varo, P., Koivistoinen, P., Tautomeric Equilibria of D-Glucose and D-Fructose - Gas-Liquid-Chromatographic Measurements. *Journal of Food Science* **1977**, 42, (3): 654-656.
- [190] Hyvonen, L., Varo, P., Koivistoinen, P., Tautomeric Equilibria of D-Glucose and D-Fructose - Polarimetric Measurements. *Journal of Food Science* **1977**, 42, (3): 652-653.
- [191] Merck KGaA, chemdat Chemical Database, http://www.merck-chemicals.com/chemdat/en_US/Merck-International-Site/USD/ViewWelcome-Start, **2008**.
- [192] Secundo, F., Carrea, G., Soregaroli, C., Varinelli, D., Morrone, R., Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, 73, (2): 157-163.
- [193] Dreyer, S., Kragl, U., Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes. *Biotechnology AND BIOENGINEERING* **2008**, 99, (6): 1416-1424.
- [194] Sahoo, B., Bhattacharya, A., Fu, H. Y., Gao, W., Gross, R. A., Influence of PEG endgroup and molecular weight on its reactivity for lipase-catalyzed polyester synthesis. *Biomacromolecules* **2006**, 7, (4): 1042-1048.
- [195] Kumar, R., Tyagi, R., Parmar, V. S., Samuelson, L. A., Kumar, J., Watterson, A. C., Biocatalytic "green" synthesis of PEG-based aromatic polyesters: optimization of the substrate and reaction conditions. *Green Chemistry* **2004**, 6, (10): 516-520.
-

8. Literaturverzeichnis

-
- [196] Kumar, R., Tyagi, R., Parmar, V. S., Samuelson, L. A., Watterson, A. C., Kumar, J., *Candida antarctica* lipase B catalyzed copolymerizations of non-proteinogenic amino acids and poly(ethylene glycol) to generate novel functionalized polyesters. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **2003**, A40, (12): 1283-1293.
- [197] Kumar, R., Tyagi, R., Shakil, N. A., Parmar, V. S., Kumar, J., Watterson, A. C., Self-assembly of PEG and diester copolymers: Effect of PEG length, linker, concentration and temperature. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* **2005**, A42, (11): 1523-1528.
- [198] Kobayashi, T., Adachi, S., Matsuno, R., Kinetic analysis of the immobilized-lipase-catalyzed synthesis of octanoyl octyl glucoside in acetonitrile. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, 16, (3): 323-328.
- [199] Zaidi, A., Gainer, J. L., Carta, G., Mrani, A., Kadiri, T., Belarbi, Y., Mir, A., Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in n-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. *Journal of Biotechnology* **2002**, 93, (3): 209-216.
- [200] Paiva, A. L., Balcao, V. M., Malcata, F. X., Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, 27: 187-204.
- [201] Brady, D., Steenkamp, L., Skein, E., Chaplin, J. A., Reddy, S., Optimisation of the enantioselective biocatalytic hydrolysis of naproxen ethyl ester using ChiroCLEC-CR. *Enzyme and Microbial Technology* **2004**, 34, (3-4): 283-291.
- [202] Matsue, S., Miyawaki, O., Influence of water activity and aqueous solvent ordering on enzyme kinetics of alcohol dehydrogenase, lysozyme, and beta-galactosidase. *Enzyme and Microbial Technology* **2000**, 26, (5-6): 342-347.
- [203] Ferloni, C., Heinemann, M., Hummel, W., Dausmann, T., Buchs, J., Optimization of enzymatic gas-phase reactions by increasing the long-term stability of the catalyst. *Biotechnology Progress* **2004**, 20, (3): 975-978.
- [204] Secundo, F., Carrea, G., Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, 92, (4): 438-446.
- [205] Ratzka, J., Einflussgrößen auf die Aktivität der Lipase B aus *Candida antarctica* in binären Systemen, Diploma thesis, Universität Rostock (Rostock), **2008**.
- [206] Umare, S. S., Chandure, A. S., Pandey, R. A., Synthesis, characterization and biodegradable studies of 1,3-propanediol based polyesters. *Polymer Degradation and Stability* **2007**, 92, (3): 464-479.
- [207] Verevkin, S. P., Emel'yanenko, V. N., Toktonov, A. V., Duwensee, J., Kragl, U., Schick, C., Thermodynamics of Sebacic Acid and 1,4-Butanediol and their Biocatalytic Polymerisation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2008**: in preparation.
- [208] Tsutsumi, N., Oya, M., Sakai, W., Biodegradable network polyesters from gluconolactone and citric acid. *Macromolecules* **2004**, 37, (16): 5971-5976.
- [209] Park, O. J., Kim, D. Y., Dordick, J. S., Enzyme-catalyzed synthesis of sugar-containing monomers and linear polymers. *Biotechnology and Bioengineering* **2000**, 70, (2): 208-216.
- [210] Otto, R. T., Scheib, H., Bornscheuer, U. T., Pleiss, J., Syldatk, C., Schmid, R. D., Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2000**, 8, (4-6): 201-211.
-

8. Literaturverzeichnis

- [211] Köhling, R., Selectiv adduct formation in electrospray ionisation with alkali citrates. *Analytix (by Sigma-Aldrich)* **2008**, (4): 4-5.
- [212] Straathof, A. J. J., Enzymatic Catalysis Via Liquid-Liquid Interfaces. *Biotechnology and Bioengineering*, **2003**, 83, (4): 371-375.
- [213] Heinemann, M., Kummel, A., Giesen, R., Ansorge-Schumacher, M. B., Buchs, J., Experimental and theoretical analysis of phase equilibria in a two-phase system used for biocatalytic esterifications. *Biocatalysis and Biotransformation* **2003**, 21, (3): 115-121.
- [214] Hara, P., Hanefeld, U., Kanerva, L. T., Sol-gels and cross-linked aggregates of lipase PS from *Burkholderia cepacia* and their application in dry organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2008**, 50, (2-4): 80-86.
- [215] Schultz, N., Hobley, T. J., Sylđatk, C., Spectrophotometric assay for online measurement of the activity of lipase immobilised on micro-magnetic particles. *Biotechnology Letters* **2007**, 29, (3): 365-371.
- [216] Laszlo, J. A., Evans, K. O., Influence of self-assembled monolayer surface chemistry on *Candida antarctica* lipase B adsorption and specific activity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **2007**, 48, (3-4): 84-89.
- [217] Secundo, F., Barletta, G. L., Dumitriu, E., Carrea, G., Can an inactivating agent increase enzyme activity in organic solvent? Effects of 18-crown-6 on lipase activity, enantioselectivity, and conformation. *Biotechnology and Bioengineering* **2007**, 97, (1): 12-18.
- [218] Blank, K., Morfill, J., Gump, H., Gaub, H. E., Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **2006**, 125, (4): 474-483.
- [219] Bradford, M. M., Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, 72, (1-2): 248-254.
- [220] Kvittingen, L., Some Aspects of Biocatalysis in Organic-Solvents. *Tetrahedron* **1994**, 50, (28): 8253-8274.
- [221] de Bruijn, J., Busser, F., Seinen, W., Hermens, J., Determination of Octanol/Water Partition Coefficients for Hydrophobic Organic Chemicals with the "slow-stirring" method. *Environmental Toxicological Chemistry* **1989**, 8: 499-512.
- [222] Kim, D.-Y., Wu, X., Dordick, J. S., Development of novel methodologies - 2 Generation of environmentally compatible polymers libraries via combinatorial biocatalysis. *American Chemical Society* **2003**, 840: 34-49.

9. Anhang

9.1 Chemikalienliste

Tab. 9-1: Liste der Chemikalien

Chemikalie	Hersteller (Reinheit [%])	Chemikalie	Hersteller (Reinheit [%])
Organische Lösungsmittel:		Enzyme	
n-Hexan	J.T.Baker (>95)	Novozym 435 (Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>)	Novozymes
n-Heptan	J.T. Baker (>98)	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	Codexis
Toluol	Laboratory Research (>99)	Lipase B aus <i>Candida antarctica</i>	Cognis
Disopropylether	Merck (>99)	Lipozym (Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>)	Fluka
Methyl-tert.-butylether	Merck (>99,5)	Amano PS (Lipase aus <i>Pseudomonas</i> sp.)	Amano
Chloroform	J.T.Baker (>99)	Lipase aus <i>Rhizomucor miehei</i>	Fluka
p-Xylol	Merck (99,5)	Lipase aus <i>Pseudomonas fluorescences</i>	Fluka
Tetrahydrofuran	Merck (99,5)	Lipase aus Weizenkeimen	Fluka
Acetonitril	J.T.Baker (99,6)	Lipase aus <i>Penecillium roqueforti</i>	Fluka
Methanol mit 0,1 % Ameisensäure	Riedel-de-Häen (MS)	Lipase aus <i>Candida lipolytica</i>	Fluka
iso-Propanol	Merck (99,9)	Lipase aus <i>Aspergillus oryzae</i>	Fluka
Dichlormethan	J.T. Baker (>99,8)	Lipase aus <i>Mucor javanicus</i>	Fluka
Oktan	Chemikalienlager		
Monomere:		Feststoffe:	
Sebacinsäure	Fluka (>99)	K ₂ HPO ₄	J.T.Baker (>99)
Korksäure	Merck (>99)	KH ₂ PO ₄	Merck (>99)
Adipinsäure	Riedel-de-Häen (>99)	Borsäure	Fluka (>99)
Bernsteinsäure	Fluka (>99,5)	Glycin	Merck (99,7)
Oxalsäure	Chemikalienlager	Kaliumhydrogenphthalat	J.T. Baker
Citronensäure	KMF (>99)	p-Nitrophenol	VEB Jenapharm
1,10-Decandiol	Merck (>98)	p-Nitrophenolpalmitat	Fluka (>99)
1,8-Octandiol	Merck (>98)	Laurinsäure	Merck (>98)
1,6-Hexandiol	Merck (>97)	1-Propanol	Chemikalienlager
1,4-Butandiol	Chemikalienlager	d-Chloroform	Aldrich (>99,9 D)
1,3-Propandiol	Chemikalienlager	Triethylcitrat	Merck (>98)
Glucose	Merck (>99)	BSA	Sigma (>96)
Fructose	Fluka (>99)		
Saccharose	Fluka (>99,5)		
Lactose	Fischer		
Sorbitol	Fluka (>99,5)		
Diglycerol	Fluka (>85)		

9.2 Geräteliste

Tab. 9-2: Liste der Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer comfort (1,5 ml Aufsatz)	Eppendorf
pH-Elektrode	WTW pH 340i mit pH-Elektrode IJ44/DIN	WTW
Gaschromatograph (GC-FID)	Varian CP-3800 Gas Chromatograph Autosampler: Varian CP-8410 Autoinjector Säule: Thermo DB-5 Programm: Star Chromatography Workstation	Varian
Gaschromatograph (GC-FID)	Carlo Erba Instruments HRGC 5300 mit EL 580 Detektorsteuerung und MFC 500 Kontrolleinheit Säule: Thermo DB-5 Programm: Brucker Starlet ^{glp}	Carlo Erba Instruments
GPC-Anlage	Knauer K-501 HPLC-Pumpe Lichtstreuendetektor PL-ELS 2100(Polymer Laboratories) Säule: BIORAD Aminex HDK-87 H Ion Exclusion column (300 mm x 7,8 mm), MetaCarb Varian Inc. (300 mm x 6,5 mm), RHM-Monosaccharid-Säule (Rezex) Phenomenex (H-Säule, 300 mm x 7,8 mm) Programm: Eurochrom 2000/ Chromgate	Knauer
HPLC-Anlage	Knauer K-501/ Smartline 1000 HPLC-Pumpe RI-Detektor K-2301, Säule: BIORAD Aminex HDK-87 H Ion Exclusion column (300 mm x 7,8 mm), MetaCarb Varian Inc. (300 mm x 6,5 mm), RHM-Monosaccharid-Säule (Rezex) Phenomenex (H-Säule, 300 mm x 7,8 mm) Programm: Eurochrom 2000/ Chromgate	Knauer
Vortex	Vortex-Genie 2 Scientific Industries	Scientific Industries
Pipette	Eppendorf (1-5 ml)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf (100-1000 µl)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf (20-200 µl)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf (10-200 µl)	Eppendorf
Pipette	Eppendorf (2-10 µl)	Eppendorf
Thermostat	Julabo 26 (Verteilungskoeffizienten)	Julabo
Vertikalschüttler	IKA HS260 controll; vertikaler Schüttler, temperierbar, 14 Plätze für 8mL-Vials	IKA
Thermostat	Huber CC1	Huber
Photometer	Specord 200 und 50 von Analytik Jena Programm: WinAspect	Analytik Jena
Waage	Feinwaage: Santorius BP 121 S	Santorius

9.3 Messdaten

9.3.1 Verteilungskoeffizienten Diöle

Tab. 9-3: Verteilungskoeffizienten Diöle (experimentell)

Temperatur /°C	P _{1,4-Butandiol} (n-Heptan)	P _{1,6-Hexandiol} (n-Heptan)	P _{Glucose} (n-Heptan)
30	30	52	0,02
40	32	59	0,06
50	42	70	0,09
60	60	72	0,11

Tab. 9-4: Verteilungskoeffizienten Diöle (experimentell)

Temperatur /°C	P _{1,4-Butandiol} (MTBE)	P _{1,6-Hexandiol} (MTBE)	P _{Glucose} (MTBE)
30	0,85	1,3	0,1
40	0,98	1,35	0,1
50	1,02	1,4	0,17
60	1,125	1,45	0,18

Tab. 9-5: Verteilungskoeffizienten Diöle (theoretisch)

Temperatur /°C	P _{1,4-Butandiol} (n-Heptan)	P _{1,6-Hexandiol} (n-Heptan)	P _{Glucose} (n-Heptan)
30	30,9	33,86	1,3398E-6
40	39,9	46,44	2,9539E-6
50	52,24	64,27	2,6745E-6
60	69,63	89,51	5,3055E-6

Tab. 9-6: Verteilungskoeffizienten Diöle (theoretisch)

Temperatur /°C	P _{1,4-Butandiol} (MTBE)	P _{1,6-Hexandiol} (MTBE)	P _{Glucose} (MTBE)
30	1,98	7,87	0,33
40	2,23	8,46	0,43
50	2,47	8,94	0,54
60	3,07	10,4	0,66

9.3.2 Verteilungskoeffizienten Disäuren und Ester

Tab. 9-7: Verteilungskoeffizienten Diöle (experimentell)

Temperatur /°C	P _{Sebacinsäure} (n-Heptan)	P _{Adipinsäure} (n-Heptan)	P _{Citronensäure} (n-Heptan)
30	163	6,2	0,03
40	176	6,8	0,08
50	198	8,3	0,13
60	207	8,6	0,17

Tab. 9-8: Verteilungskoeffizienten Diöle (experimentell)

Temperatur /°C	P _{Sebacinsäure} (MTBE)	P _{Adipinsäure} (MTBE)	P _{Citronensäure} (MTBE)
30	71	2,2	0,09
40	83	2,3	0,09
50	100	2,6	0,16
60	113	2,8	0,19

9.3.3 Raum-Zeit-Ausbeute Polyester

Tab. 9-9: Raum-Zeit-Ausbeuten von Modell 1 und 2

Lösungsmittel	RZA (Modell 1) / g L ⁻¹ d ⁻¹	RZA (Modell 2) / g L ⁻¹ d ⁻¹
Chloroform	25	0,75
n-Hexan	19	0,79
MTBE	28	0,52
DIPE	26	0,42

9.3.4 Flüssig-Flüssig-Gleichgewichte

Tab. 9-10: LLE n-Heptan/ Wasser nach COSMO-RS

Temperatur /°C	x ^α _{n-Heptan}	x ^α _{Wasser}	x ^β _{n-Heptan}	x ^β _{Wasser}
30	0,985	0,015	0,9945	0,0055
40	0,985	0,015	0,9945	0,0055
50	0,925	0,075	0,9945	0,0055
60	0,925	0,075	0,9945	0,0055

Tab. 9-11: LLE MTBE/ Wasser nach COSMO-RS

Temperatur /°C	x ^α _{MTBE}	x ^α _{Wasser}	x ^β _{MTBE}	x ^β _{Wasser}
30	0,985	0,015	0,375	0,625
40	0,985	0,015	0,375	0,625
50	0,985	0,015	0,375	0,625
60	0,985	0,015	0,325	0,675

9.3.5 Effekt der Monomer Glucose und Citronensäure

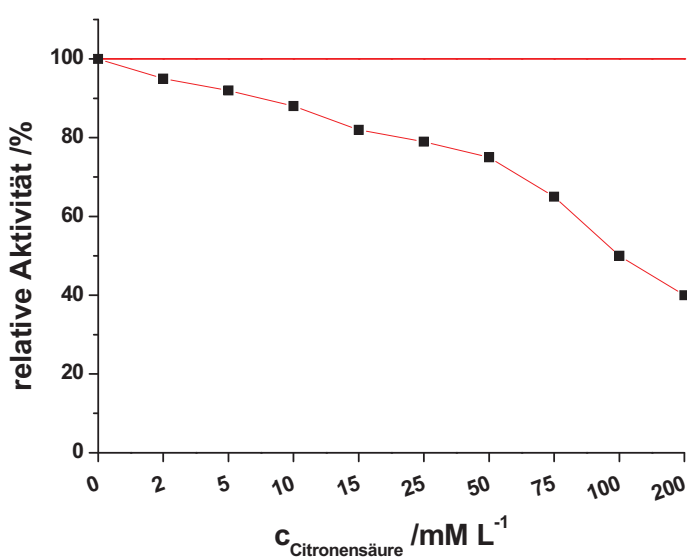


Abb. 9-1: Deaktivierender Effekt der Citronensäure auf die CaLB

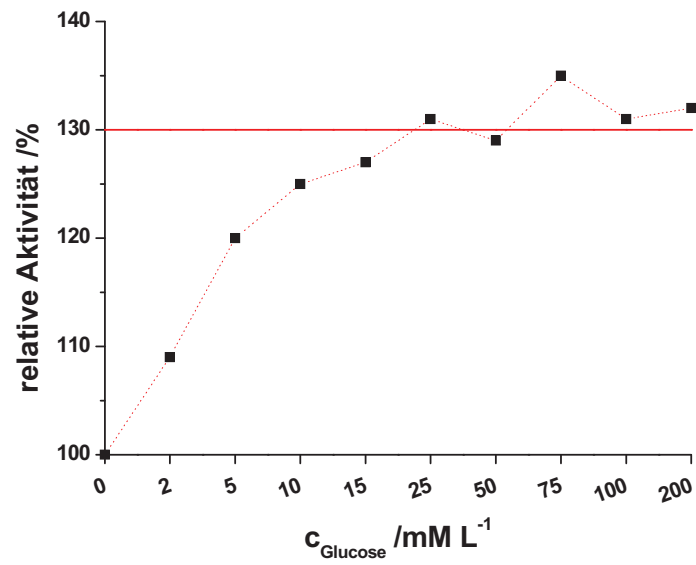


Abb. 9-2: Aktivierender Effekt der Glucose auf die CaLB

9.4 Messanordnung

9.4.1 Messanordnung

Schüttler, Heizblock und Thermostat

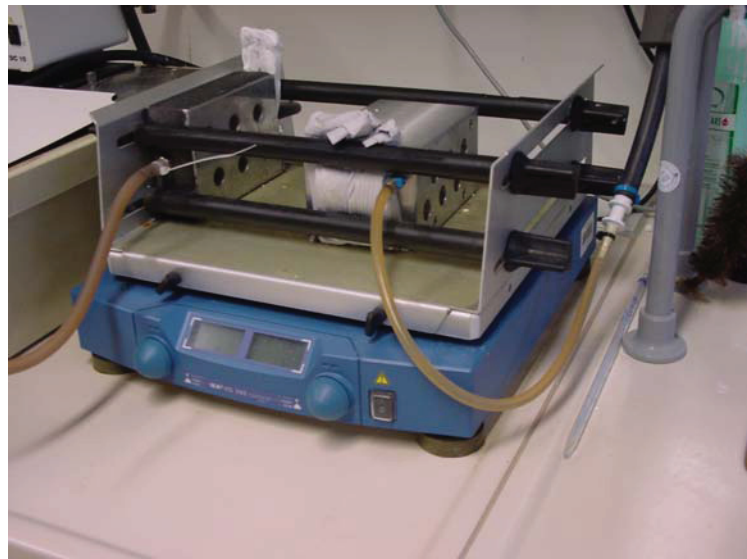


Abb. 9-3: Schüttler mit Thermostat (links) und Schüttler mit Heizblock aus Aluminium (rechts)

Gefäß (Gesamtvolumen 8 ml)



Abb. 9-4: Gefäß mit 2-Phasensystem ($\alpha = 1$)

9.5 GPC-Chromatogramme

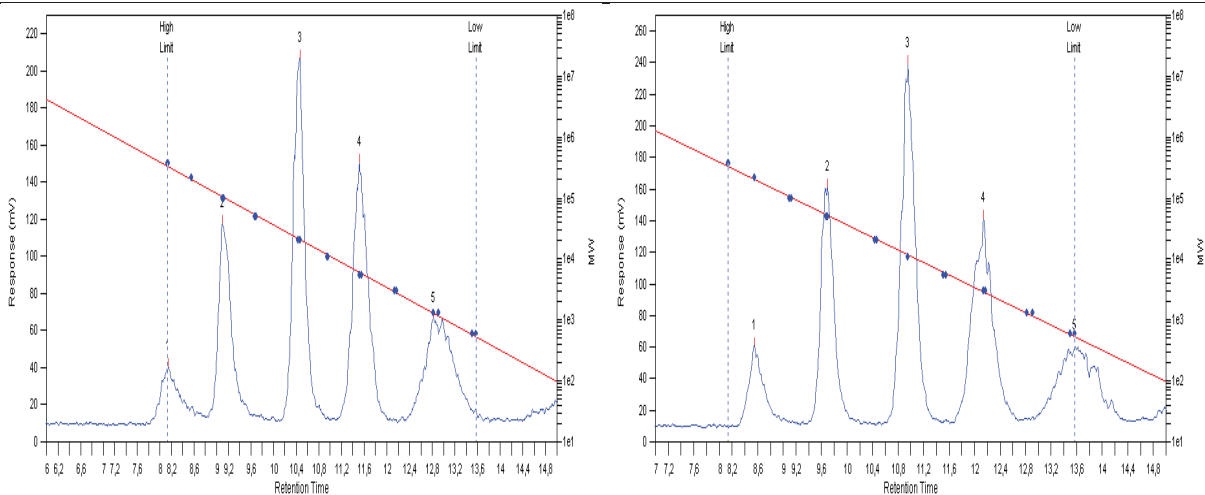


Abb. 9-5: 10-Punkt-Kalibrierung mit Polystyrol

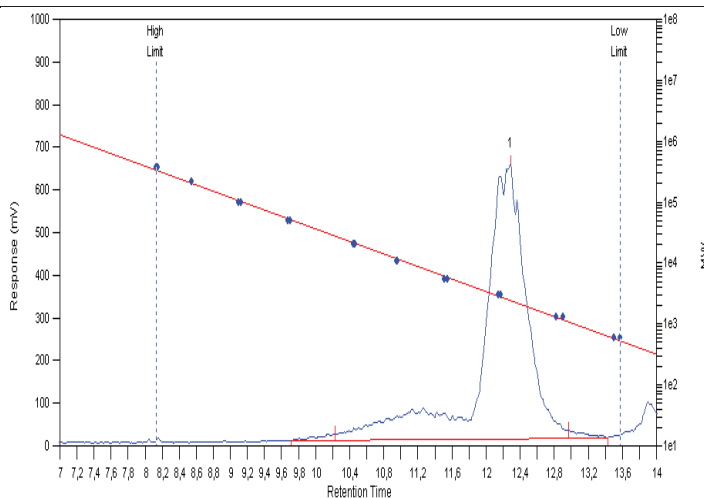


Abb. 9-6: GPC-Chromatogramm von Poly(butylsebacat)

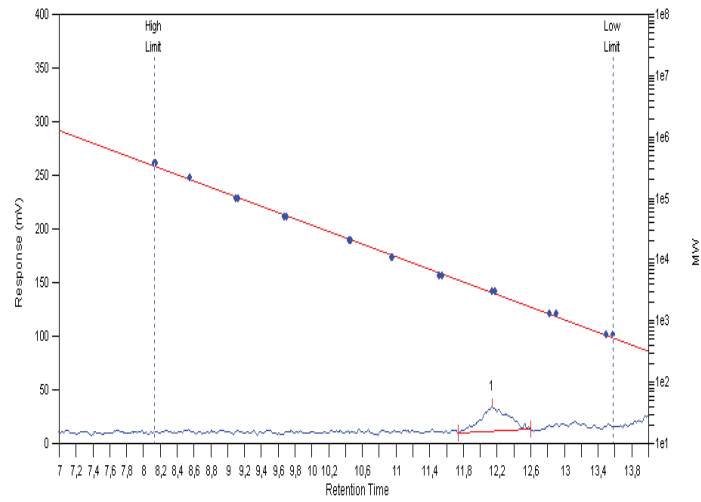


Abb. 9-7: GPC-Chromatogramm von Poly(glucosylcitrat)

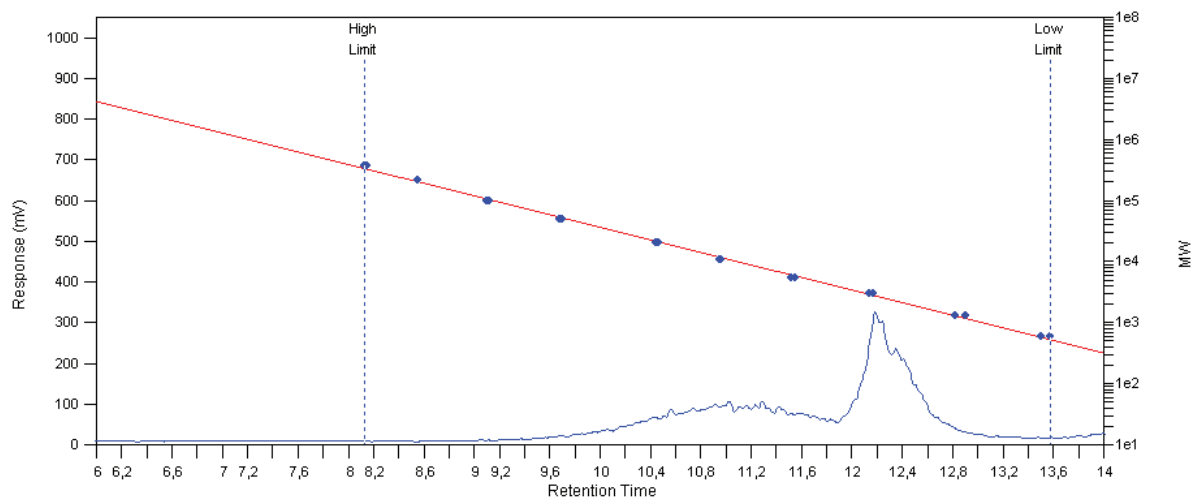


Abb. 9-8: GPC-Chromatogramm des Cognis-Rohextraktes

9.6 Massenspektren

21 #1 RT: 0.02 AV: 1 NL: 1.13E5
T: + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

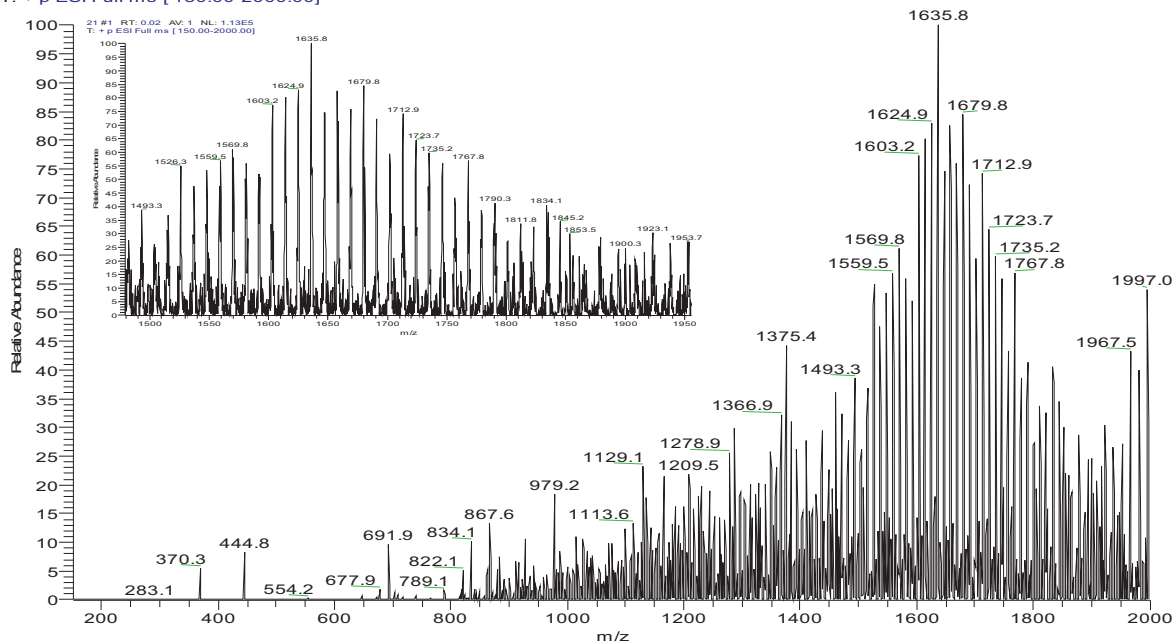


Abb. 9-9: Massenspektrum PEG 6000

29 #1 RT: 0.03 AV: 1 NL: 4.34E3
T: + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

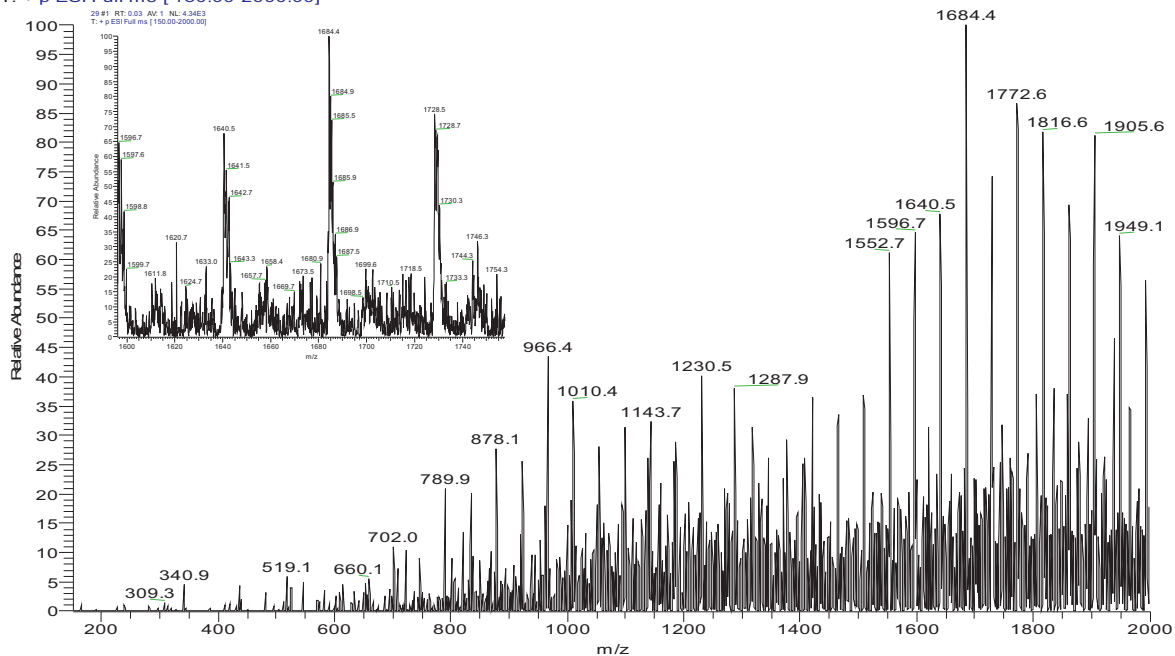


Abb. 9-10: Massenspektrum Tween 60

9. Anhang

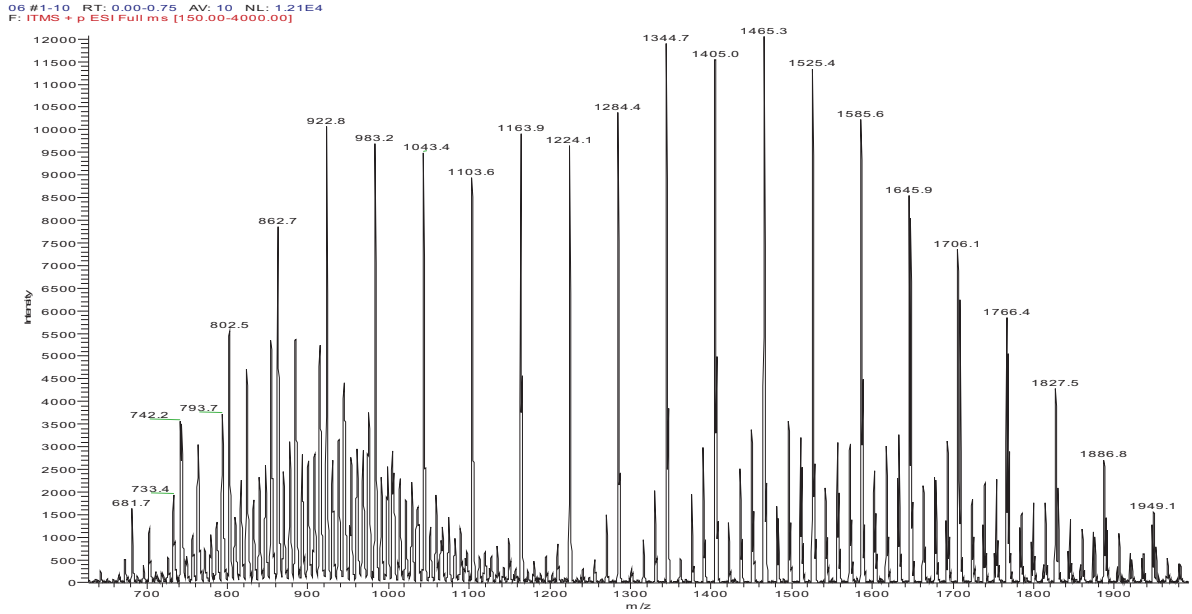
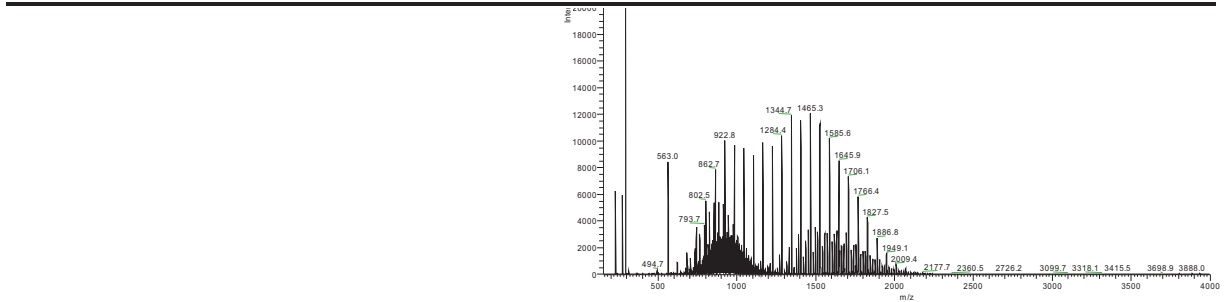


Abb. 9-11: Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE

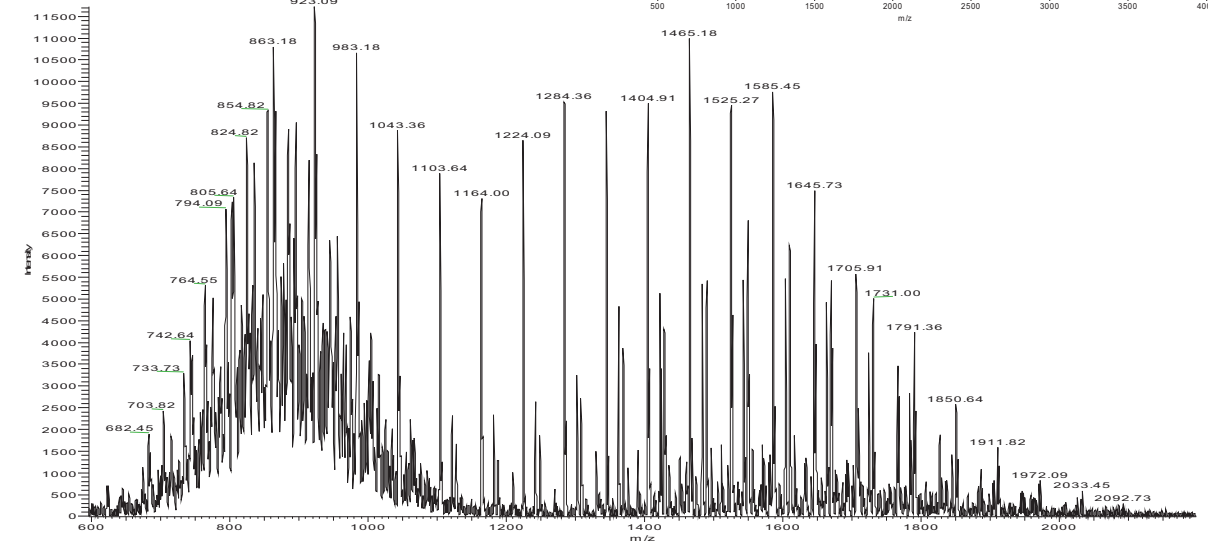
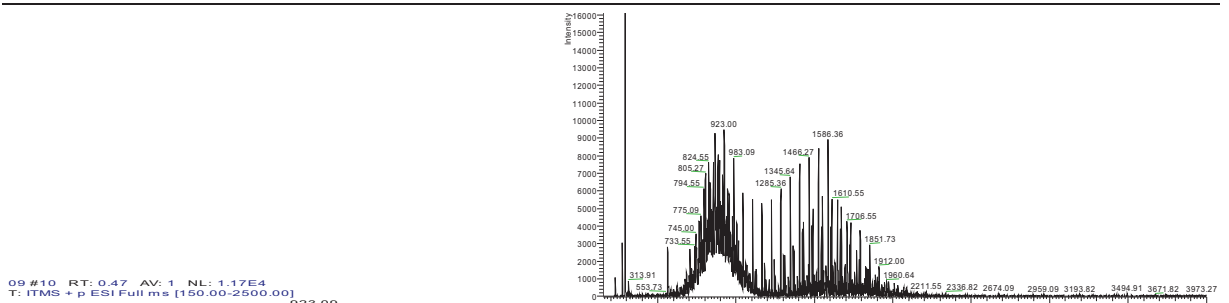


Abb. 9-12: Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in DIPE

9. Anhang

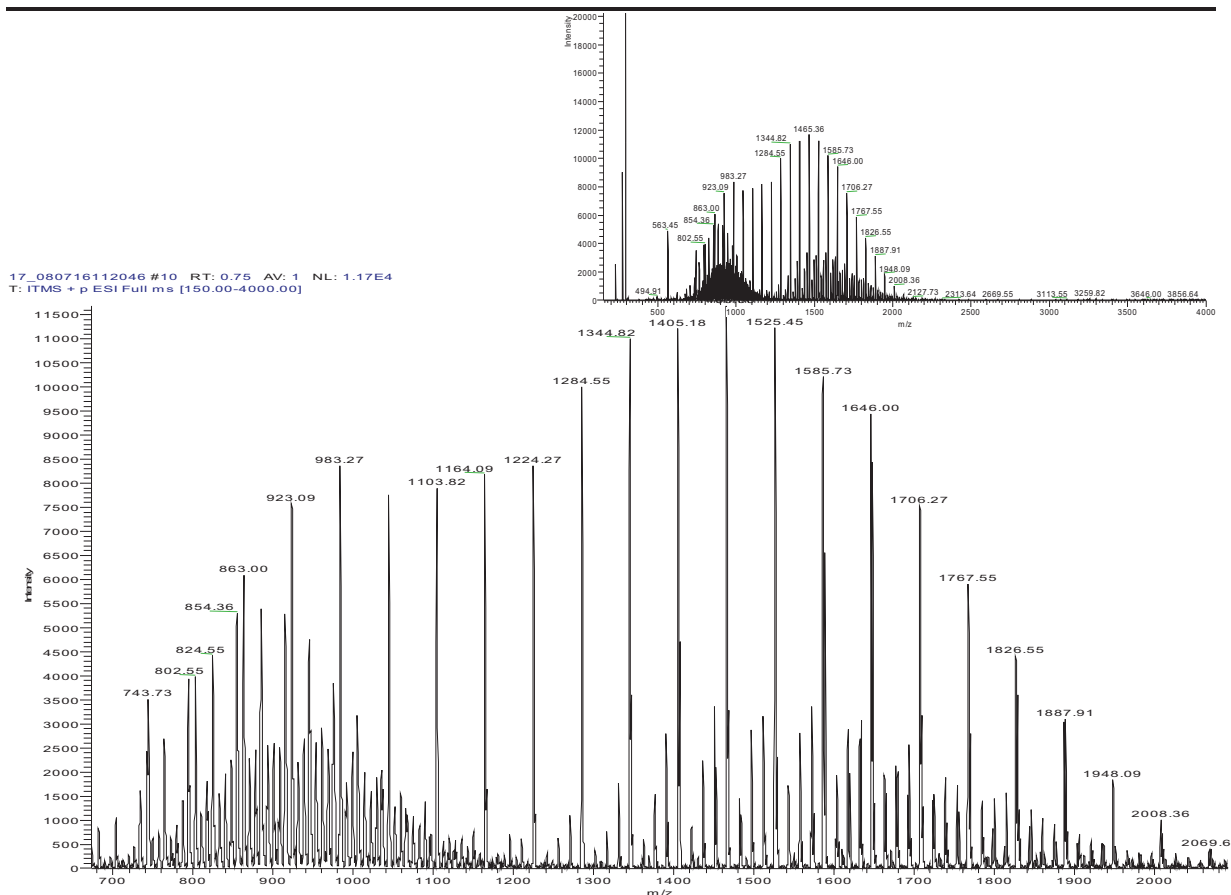


Abb. 9-13: Massenspektrum Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE

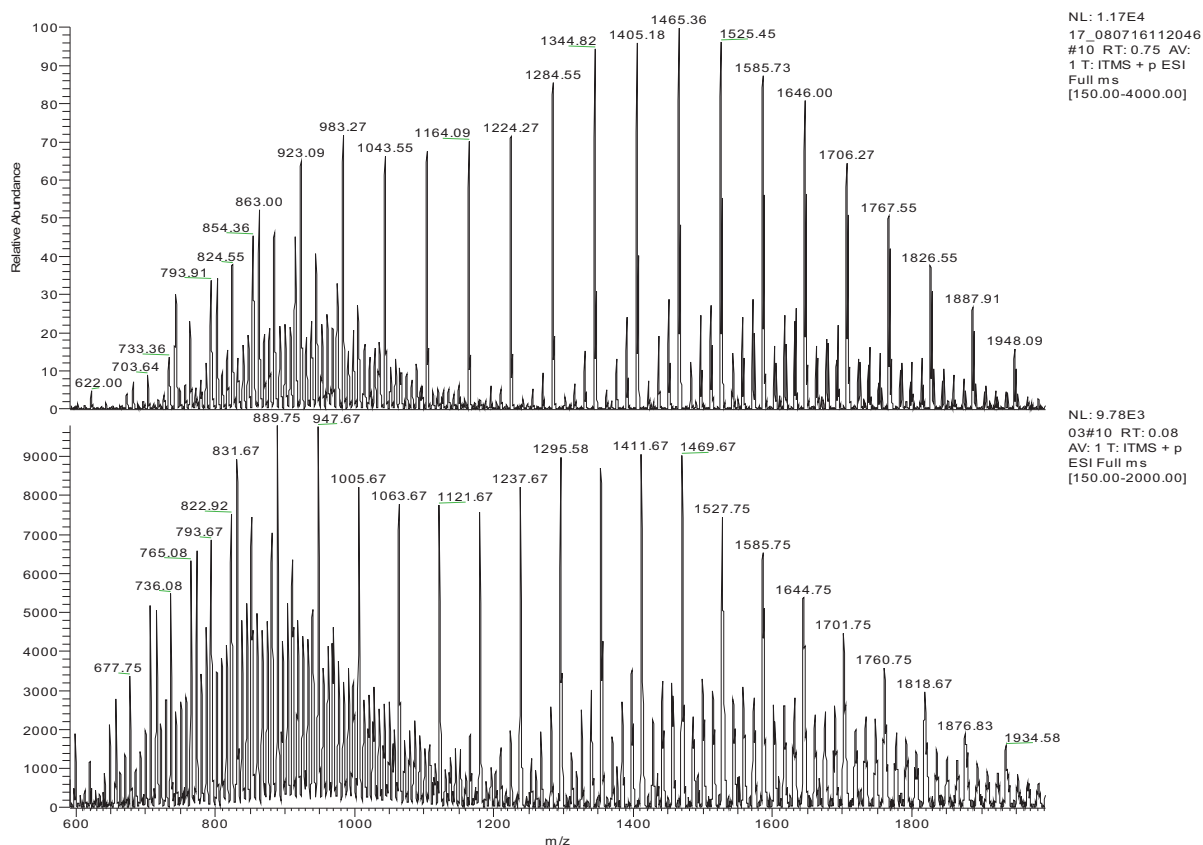


Abb. 9-14: Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) und Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in MTBE

9. Anhang

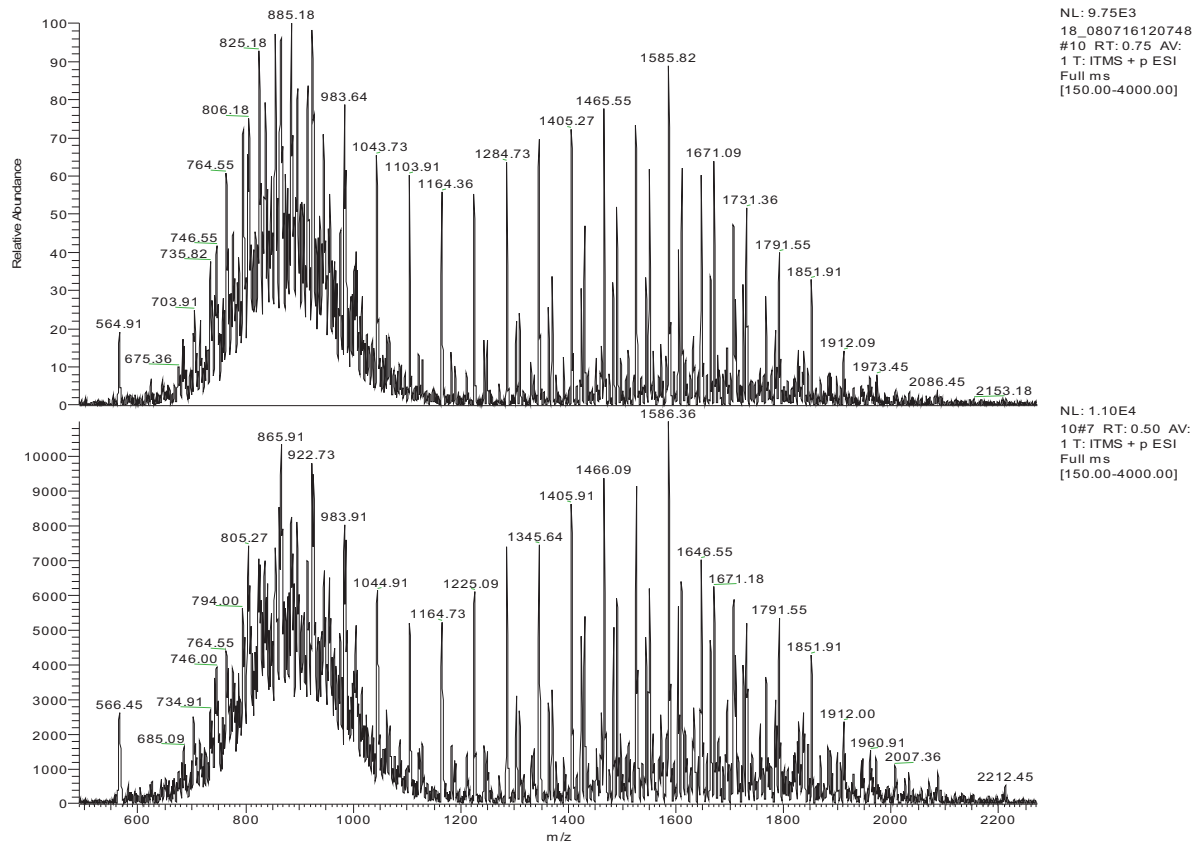


Abb. 9-15: Massenspektrum Poly(glucosylcitrat) und Poly(fructosylcitrat) bis 4000amu, Synthese in DIPE

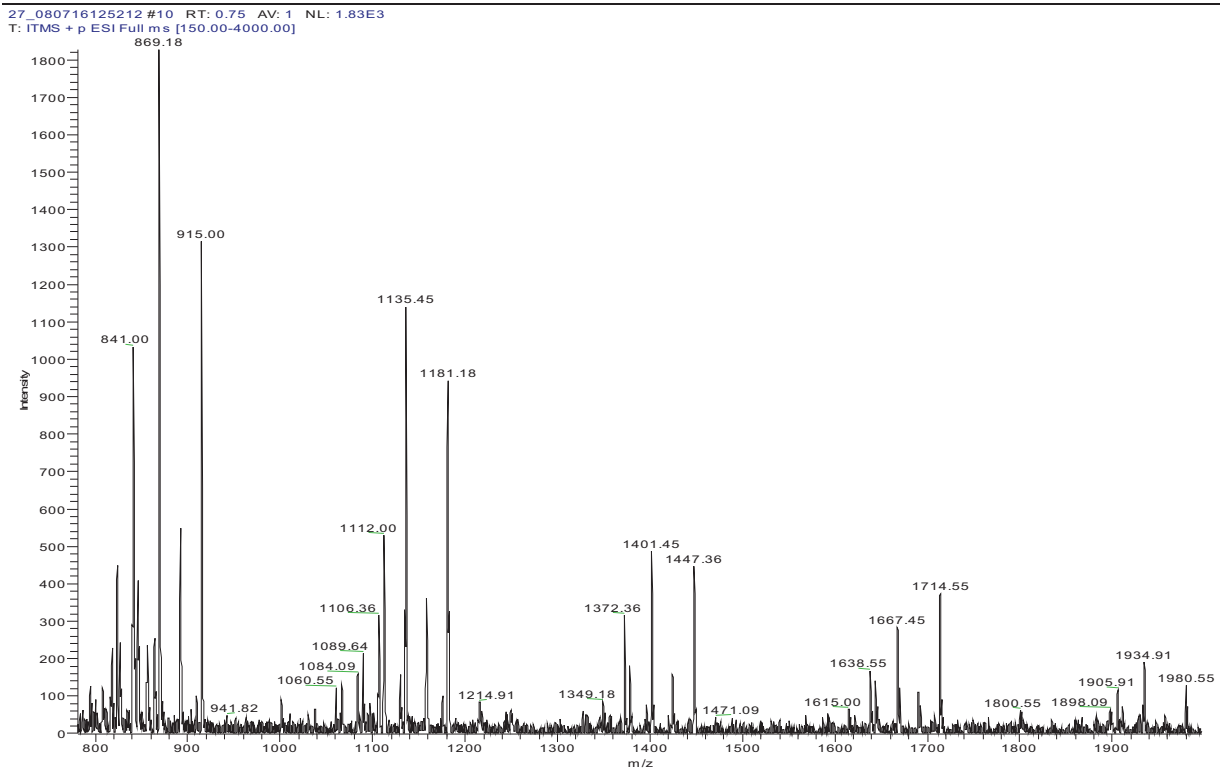


Abb. 9-16: Massenspektrum Poly(butylsebacat), Synthese in DIPE

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits vorgetragen und veröffentlicht:

1. Poster presentation at International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2006: Julia Lembrecht, Udo Kragl
Enzymatic polycondensation of dicarboxylic acids and diols
 2. Poster presentation at Bioraffinica (DECHEMA), Frankfurt a.M., 2008: Julia Lembrecht, Udo Kragl
Enzymatic polycondensation of dicarboxylic acids and diols
 3. Poster presentation at International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2008: Julia Duwensee, Stefanie Wenda, Udo Kragl
Polycondensation in water – a new approach for polyester synthesis
 4. Poster presentation at International Congress on Biocatalysis, Hamburg, 2008: Juliane Ratzka, Julia Duwensee, Udo Kragl
Kinetic limitations of lipase-catalysed esterification in biphasic media
 5. Oral Presentation 2nd Symposium of the research training group 1213, Rostock 2006: Julia Lembrecht, Udo Kragl
Enzymatic polycondensation of dicarboxylic acids and diols
 6. Oral Presentation 3rd Symposium of the research training group 1213, Rostock 2006: Julia Lembrecht, Udo Kragl
Enzymatic polycondensation of dicarboxylic acids and diols
 7. Verevkin, S.P.; Emel'yanenko, V.N.; Toktonov, A.V.; Duwensee, J.; Kragl, U.; Schick, C.
Thermodynamics of sebacic acid and 1,4-butanediol and their biocatalytic polymerisation. in preparation
 8. Duwensee, J.; Kragl, U.
Polycondensation in water – a new approach for polyester synthesis, in preparation
-