

# Einschlussimmobilisierungen von Enzymen in Polyurethan-basierten Polymermaterialien und ihre Anwendung in biokatalytischen Reaktionen



## Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von:

Diana Uhrich, geb. am 01.03.1990 in Waren (Müritz)

Rostock, 2018

**Gutachter:**

Prof. Dr. Udo Kragl, Universität Rostock, Institut für Chemie, Abteilung Technische und Analytische Chemie

Prof. Dr. Harald Gröger, Universität Bielefeld, Institut für Chemie, Abteilung Organische Chemie und Biotechnologie

**Jahr der Einreichung:** 2018

**Jahr der Verteidigung:** 2019

## **Danksagung**

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Udo Kragl für das interessante Thema und die Möglichkeit, die Arbeit in der Arbeitsgruppe anzufertigen, bedanken.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Jan von Langermann für die tolle Betreuung und guten Ratschläge und Anregung, sowie für die vielen hilfreichen Gespräche, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Technische Chemie, für die herzliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft, bedanken. Die Arbeitsatmosphäre war stets gut und von Zusammenarbeit geprägt, wodurch mir ein angenehmer Laboralltag ermöglicht wurde. Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Hubert Bahl und seinem Arbeitskreis für die Möglichkeit mikrobielle Arbeiten durchzuführen, sowie die tolle Betreuung und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Danken möchte ich außerdem Prof. Dr. Jin-Byung Park für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe an der Ewha Womans University in Korea. Vielen Dank für die lehrreichen Gespräche und Ihr offenes Ohr bei all meinen Fragen. Besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jin-Byung Park, insbesondere Hyun-Young für die tolle Zeit und Zusammenarbeit während meiner Zeit in Korea. Mein Dank gilt zudem dem DAAD, welcher mir mit dem Doktoranden Stipendium für ein Jahr meinen Aufenthalt in Korea ermöglichte.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden und meinem Freund, die mir stets zur Seite stehen und unterstützen, bedanken.

Besonderer Dank gilt aber meiner Familie, die mich über das gesamte Studium und die Doktorarbeit begleitet haben. Danke für die stetige Motivation und tatkräftige Unterstützung.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Diana Urich, dass die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter der Verwendung angegebener Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde.

Rostock, den 24.08.2018

---

Diana Urich

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	VI
1. Einleitung .....	1
2. Zielsetzung.....	4
3. Theoretische Grundlagen.....	6
3.1 Grundlagen der Proteinexpression.....	6
3.1.2 Plasmide .....	8
3.2 Biokatalysatoren .....	9
3.2.1 Vor- und Nachteile von Biokatalysatoren .....	11
3.2.2 Ganze Zellen und isolierte Enzyme.....	11
3.3 Oxidoreduktasen.....	12
3.3.1 Alkoholdehydrogenasen.....	13
3.3.2 Baeyer-Villiger-Monooxygenasen .....	18
3.4 Hydrolasen.....	19
3.4.1 Lipasen .....	20
3.4.2 Esterasen .....	22
3.5 Enzymimmobilisierung .....	23
3.5.1 Einschlussimmobilisierung .....	25
3.6 Enzymatische Kaskadenreaktionen .....	28
4. Methoden .....	31
4.1 Photometrische Messungen.....	31
4.1.1 ADH Assay.....	31
4.1.2 CalB Assay.....	31
4.1.3 Aktivitätsbestimmung .....	32

4.2	Mikroskopie.....	33
4.2.1	Konfokal- und Lichtmikroskopie .....	33
4.2.2	Rasterelektronenmikroskop.....	33
4.3	Zug- und Druckversuche.....	34
4.4	Bestimmung des Wassergehaltes von PUR mit Karl-Fischer-Titration .....	34
4.5	Gelektrophorese .....	34
4.6	Einschlussimmobilisierung von Enzymen in PUR .....	35
4.7	Standardreaktion von Enzym-PUR Immobilisierungen .....	35
4.8	Standardkopplungsreaktion der Immobilisierten <i>LkADH</i> mit CalB.....	35
4.9	Zellkultivierung .....	36
4.9.1	Herstellung von CaCl <sub>2</sub> -kompetenten Zellen .....	36
4.9.2	Plasmidtransformation und Isolierung .....	37
4.9.3	Vor- und Hauptzellkultur.....	38
4.10	Biotransformation mit immobilisierten ganzen Zellen .....	38
4.11	Analytik.....	39
4.11.1	GC-Analyse.....	39
4.11.2	GC-MS-Analyse .....	40
5.	Ergebnisse und Diskussion.....	42
5.1	Charakterisierung der Polyurethan-basierten Kompartimenten (PUR).....	42
5.1.1	Herstellung der Kompartimente.....	42
5.1.2	Beladung und Größenverteilung der Kompartimente .....	43
5.1.3	Visualisierung der Kompartimente .....	47
5.1.4	Leachingverhalten der Kompartimente.....	48
5.1.5	Chemische und physikalische Stabilität der Kompartimente .....	50
5.2	Reaktionen mit immobilisierter Alkoholdehydrogenase.....	54
5.2.1	Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von <i>LkADH</i> .....	54
5.2.2	Einflussgrößen auf die Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von <i>LkADH</i> .	55

5.2.3 Stabilität und Recyclbarkeit der <i>LkADH</i> -PUR Kompartimente der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol.....	58
5.2.4 Unterschiedliche Cofaktorregenerierungssysteme der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von <i>LkADH</i> .....	63
5.2.5 Reaktionen der Brom- und Chloride von Acetophenon .....	67
5.2.6 Reaktionen von prochiralen Ketonen mit <i>LkADH</i> und <i>LbADH</i> .....	68
5.3 <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion .....	73
5.3.1 <i>CalB</i> katalysierte Teilreaktion von Heptanol.....	73
5.3.2 <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion in verschiedenen Lösemitteln .....	75
5.3.3 <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren .....	78
5.4 Immobilisierung ganzer Zellen .....	80
5.4.1 Ganzzellbiotransformation von Ricinolsäure .....	80
5.4.1 Ganzzellbiotransformation von <i>n</i> -Octylacetat.....	90
6. Zusammenfassung und Ausblick .....	94
Literaturverzeichnis .....	99
Anhang.....	107
Publikationen, Vorträge und Posterbeiträge.....	109
Wissenschaftlicher Lebenslauf.....	110

**Abkürzungsverzeichnis**

MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
Da	Dalton
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
THF	Tetrahydrofuran
GC	Gaschromatograph
HCl	Salzsäure
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
TMS	N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamid
eV	Elektronenvolt
mW	Milliwatt
OD	Optische Dichte
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
ng	Nanogramm
rpm	Revolutions per minute
ETBr	Ethidiumbromid
TMS	Trace metal solution
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
REM	Rasterelektronenmikroskop
LSCM	Konfokalmikroskop
UV	Ultraviolett



MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
IPB	Isopropylbutyrat
IPO	Isopropyloctanoat
IPD	Isopropyldecanoat
IPP	Isopropylpalmitat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>LkADH</i>	<i>Alkoholdehydrogenase aus Lactobacillus kefir</i>
<i>LbADH</i>	<i>Alkoholdehydrogenase aus Lactobacillus brevis</i>
<i>CalB</i>	<i>Lipase B aus Candida Antarctica</i>
<i>BVMO</i>	<i>Baeyer-Villiger-Monooxygenase</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Umsetzung von Benzaldehyd mit Cyanwasserstoff und Emulsin zu (R)-Mandelonitril.....	2
Abbildung 2: Wachstum des Enzymmarktes seit 2000 <sup>14</sup> .....	3
Abbildung 3: Umsetzung von Ketonen zu Alkoholen mit Hilfe kompartimentierter ADH in unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen .....	4
Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Bakterien- und Tierischen Zelle <sup>27</sup> .....	6
Abbildung 6: Aufbau der DNA <sup>29</sup> .....	7
Abbildung 7: Herstellung von rekombinantem Insulin <sup>30</sup> .....	9
Abbildung 8: Reduktion von NADP <sup>+</sup> zu NADPH; Rest R = Adenindinucleotidphosphat.....	13
Abbildung 9: Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung von ADH's .....	14
Abbildung 10: Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit NADPH .....	15
Abbildung 11: Reaktionsmechanismus kurzkettiger Alkoholdehydrogenasen <sup>48</sup> .....	16
Abbildung 13: Die $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung von CalB; die acht $\beta$ -Faltblätter (1-8, blau) beidseitig umgeben von $\alpha$ -Helices (A-F, rot) und der katalytischen Triade (Ser-Asp-His) <sup>70</sup> .....	21
Abbildung 14: Mechanismus der Katalyse durch CalB mit Hilfe der katalytischen Triade <sup>71</sup> .....	21
Abbildung 15: Verschiedene Immobilisierungsmethoden von Enzymen <sup>35</sup> .....	25
Abbildung 16: Schematische Darstellung einer radikalischen Polymerisierungs-reaktion zur Synthese von Polyurethan-basierten Kompartimenten .....	27
Abbildung 17: Querschnitt durch eine exemplarische Polyurethan-Sphäre (links), in der die Wasserreservoirs schematisch verteilt sind und durch Diffusion das Substrat umgesetzt werden kann	28
Abbildung 18: verschiedene Arten von Kaskadenreaktionen <sup>36</sup> .....	29
Abbildung 19: Umsetzung von Acetophenon nach ADH Assay .....	31
Abbildung 20: Umsetzung von <i>p</i> -Nitrophenylpalmitat nach Lipase Assay.....	32
Abbildung 22: Karl-Fischer Titration über die zeitabhängige Wasserabgabe von PUR ohne Enzym (nicht immobilisiert): ( $\Delta$ ) 9,1% Beladung (1 g Precursor + 0,1 g Wasser), ( $\circ$ ) 16,7% Beladung (1 g Precursor + 0,2 g Wasser) und ( $\square$ ) 23,1% Beladung (1 g Precursor + 0,3 g Wasser) .....	45
Abbildung 23: Größenverteilung der wässrigen Einschlüsse innerhalb der PUR-Kompartimente über eine Fläche von ca. 0,1 mm <sup>2</sup> .....	46
Abbildung 24: Typische Lichtmikroskopaufnahme der wässrigen Sphären (grün), welche in der Polyurethan Matrix (lila-blau) statistisch verteilt sind.....	47
Abbildung 25: Exemplarische REM und LSCM Aufnahmen eines Querschnitts durch die Polyurethan Matrix .....	48

Abbildung 26: Gelelektrophorese von <i>LkADH</i> in Phosphatpuffer; (L) DNA-Leiter, (E) <i>LkADH</i> , (1-5) Probenreihen nach 0, 10, 30, 60 und 180 min .....	49
Abbildung 27: (a) Druck- und (b) Zugverhalten der PUR-Kompartimente in immobilisierter (1 g NOA 81 mit 400 $\mu$ L Puffer) und reiner Form (1 g NOA 81 ohne Puffer) .....	52
Abbildung 28: Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe immobilisierter <i>LkADH</i> .....	54
Abbildung 29: Umsatz von Acetophenon zu Phenylethanol mit immobilisierter <i>LkADH</i> bei 30 °C; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	55
Abbildung 30: Einfluss der Katalysatormenge auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	56
Abbildung 31: Auswirkung der UV-Bestrahlung auf die Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; 5 mg/mL <i>LkADH</i> gelöst in 400 $\mu$ L Phosphatpuffer (nicht kompartmentiert), 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol .....	57
Abbildung 32: Untersuchungen zur Stabilität der PUR-Kompartimente nach 0, 1, 7 und 28 Tagen Lagerzeit bei unterschiedlichen Temperaturen; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	60
Abbildung 33: Rezyklierbarkeit der <i>LkADH</i> -PUR Kompartimente bei 30 °C in vier Zyklen; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	62
Abbildung 34: Umsetzung von Ketonen zu Alkoholen mit Hilfe kompartmentierter <i>LkADH</i> und unterschiedlicher Cofaktorregenerierungssysteme .....	63
Abbildung 35: Umsatzkurven von Acetophenon zu Phenylethanol mittels Enzym-gekoppelter Cofaktorregenerierung bei 30 °C; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose; 10 mM Acetophenon.....	65
Abbildung 36: Umsatzkurven der Enzym- und Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung der Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; Enzym-gekoppelt: 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose, 100 mM Calciumcarbonat, 10 mM Acetophenon; Substrat-gekoppelt: 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	66
Abbildung 37: Umsatz verschiedener prochiraler Ketone mit immobilisierter <i>LkADH</i> (oben) und <i>LbADH</i> (unten) in MTBE bei 30 °C; 5 mg/mL ADH, 10 mM Substrat, 100 mM <i>iso</i> -Propanol .....	69
Abbildung 39: Umsatz verschiedener prochiraler Ketone mit immobilisierter <i>LkADH</i> in <i>n</i> -Heptan und nicht immobilisierter <i>LkADH</i> im Zweiphasensystem bei 30 °C;(■) 2-Pentanon im Zweiphasensystem, (□) 2-Pentanon immobilisiert, (▼) 2-Heptanon im Zweiphasensystem, (▽) 2-Heptanon immobilisiert, (▲) 2-Nonanon im Zweiphasensystem, (△) 2-Nonanon immobilisiert; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Substrat, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	72
Abbildung 40: Reaktionsschema der <i>LkADH</i> -CalB gekoppelten Kaskadenreaktion .....	73

Abbildung 41: <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion mit IPO in verschiedenen organischen Lösemitteln bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 2 mg/mL <i>CalB</i> , 50 mM IPO, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	75
Abbildung 42: <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion mit IPO in <i>n</i> -Dodecan und in einem Zweiphasensystem bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 2 mg/mL <i>CalB</i> , 50 mM IPO, 100 mM <i>iso</i> -Propanol...	77
Abbildung 43: <i>LkADH</i> - <i>CalB</i> Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren in <i>n</i> -Hexan bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 2 mg/mL <i>CalB</i> , 50 mM Acyldonor, 100 mM <i>iso</i> -Propanol .....	78
Abbildung 44: Schematische Darstellung der Immobilisierung ganzer Zellen in NOA 81 .....	80
Abbildung 45: Biotransformation von Ricinolsäure zu <i>n</i> -Heptansäure und $\omega$ -Hydroxyundec-9-ensäure	81
Abbildung 46: Gelelektrophorese der Alkoholdehydrogenase pACYC.....	82
Abbildung 47: Mikroskopaufnahme der immobilisierten Zellen in den wässrigen Einschlüssen.....	83
Abbildung 48: Umsatz von Ricinolsäure zur Keto-Verbindung mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase bei 35 °C; 3 g/L <i>MIADH</i> Zellen, 8 mM Ricinolsäure .....	84
Abbildung 49: Umsätze von Ricinolsäure zur Keto-Verbindung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei 35 °C; 3 g/L <i>MIADH</i> Zellen, 5, 10 und 30 mM Ricinolsäure .....	85
Abbildung 50: Umsatz von Ricinolsäure zum Ester mit kombiniertem <i>MIADH</i> - <i>BVMO</i> Strang; (A) Reaktion in Riesenberg Medium ohne Immobilisierung bei 35 °C, (B) Reaktion in <i>n</i> -Heptan mit Immobilisierung bei 35 °C; 3 g/L <i>MIADH</i> - <i>BVMOH</i> Zellen, 5 mM Ricinolsäure .....	87
Abbildung 51: Ganzzellbiotransformation der Hydrolyse von <i>n</i> -Octylacetat mit der Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> SIK WI.....	90
Abbildung 52: Umsatz von Octanol in MTBE und Aceton mit immobilisierter Esterase bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10 mM <i>n</i> -Octylacetat .....	91
Abbildung 53: Recyclbarkeit der Reaktion von <i>n</i> -Octylacetat mit immobilisierter Esterase in Aceton bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10 mM <i>n</i> -Octylacetat .....	93

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifizierung von Enzymen.....	10
Tabelle 2: Auszug aus dem Substratspektrum der Esterase aus <i>Pseudomonas fluorescens</i> <sup>75</sup> .....	23
Tabelle 3: Methoden zur GC-Analyse .....	40
Tabelle 3: Einfluss der Wasser- und Proteinkonzentration auf das Aushärten des Polymers .....	44
Tabelle 4: Lösemittel-, Basen- und Säurenscreening der PUR-Kompartimente bei 22 °C nach 48 h; 200 mg PUR-Kompartimente in 5 mL Lösemittel.....	50
Tabelle 5: Untersuchungen zur Stabilität von <i>LkADH</i> -PUR-Kompartimente und nicht immobilisierter <i>LkADH</i> nach jeweils 0, 1, 7 und 28 Tagen Lagerzeit bei unterschiedlichen Temperaturen; 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Acetophenon, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	61
Tabelle 6: Endumsätze der Brom- und Chlorderivate des Acetophenons mit unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen bei 30 °C; Enzym-gekoppelt: 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose, 100 mM Calciumcarbonat, 10 mM Substrat; Substrat-gekoppelt: 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 10 mM Substrat, 100 mM <i>iso</i> -Propanol.....	67
Tabelle 7: Umsätze von 2-Heptanol mit CalB bei 30 °C in verschiedenen trockenen Lösemitteln; 10 mM 2-Heptanol, 2 mg/mL CalB, 50 mM Acyldonor .....	74
Tabelle 8: Endumsätze der <i>LkADH</i> -CalB Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren in <i>n</i> -Hexan mit Acetophenon als Substrat bei 30 °C; 10 mM Acetophenon, 5 mg/mL <i>LkADH</i> , 2 mg/mL CalB, 50 mM Acyldonor, 100 mM <i>iso</i> -Propanol .....	79
Tabelle 9: Einfluss verschiedener Lösemittel auf die Umsetzung von Ricinolsäure zum Ester mit Hilfe immobilisierter <i>MIADH</i> -BVMO bei 35 °C; 3 g/L <i>MIADH</i> -BVMOH Zellen, 5 mM Ricinolsäure .....	88
Tabelle 10: Umsatz von <i>n</i> -Octylacetat zu Octanol in MTBE bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10, 50, 100 und 200 mM <i>n</i> -Octylacetat.....	92

## 1. Einleitung

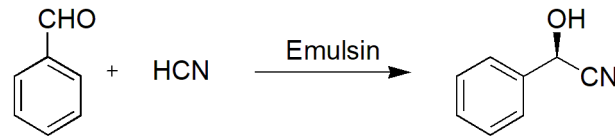
Biokatalyse beschreibt die Anwendung von Enzymen und ganzen Zellen als Katalysatoren in der synthetischen Chemie.<sup>1</sup> Die Verwendung von Enzymen für die Katalyse von Reaktionen wird jedoch schon seit Jahrtausenden, wenn zunächst auch unbewusst, von Menschen genutzt.<sup>2</sup> Die verwendeten Biokatalysatoren weisen hierbei eine Vielzahl von Vorteilen gegenüber herkömmlichen chemischen Reaktionen auf und sind deshalb bis in die Gegenwart Gegenstand umfangreicher Forschungen und haben sich in industriellen Prozessen etabliert.<sup>3</sup>

Ihren Ursprung findet die Biokatalyse im alten Mesopotamien, China und Japan. Durch den Einsatz von Bakterien, Hefen oder Pilzen wurden schon früh Wein, Bier, Käse oder andere Nahrungsmittel gewonnen.<sup>2</sup> Anfang des 19ten Jahrhunderts konnten Payen und Persoz eine Substanz aus Malzextrakt gewinnen, die die Eigenschaft besaß, Stärke in Glukose umzuwandeln ( $\alpha$ -Amylase). Damit war das erste Enzym entdeckt, welches ursprünglich als Diastase bezeichnet wurde.<sup>4</sup> In den 1830ern wurde Diastase vor allem in Frankreich zur Produktion von Dextrin genutzt und so für die Wein- und Bierherstellung und in Bäckereien verwendet.<sup>5</sup>

Das erste Unternehmen, welches Enzyme industriell nutzte wurde 1874 von Christian Hansen gegründet. Die dänische Firma beschäftigte sich vor allem mit der Produktion von Käse durch Chymosin, gewonnen aus Kälbermägen.<sup>6</sup> Nachdem weitere Enzyme in den nächsten Jahren gefunden wurden, fasste schließlich Kühne 1878 die Substanzen als „Enzyme“ zusammen. In den folgenden Jahren brachten vor allem Emil Fischers Arbeiten neue Erkenntnisse in der Biokatalyse. Er etablierte das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ und bezeichnete Enzyme als Proteine.<sup>2,7</sup> Das Aufschließen und Verstehen der Proteinstruktur und die Strukturaufklärung der Nukleinsäuren als Träger erblicher Information, brachten wichtige Fortschritte zum Verstehen der Wirkungsweise von Biokatalysatoren.<sup>5</sup> Dadurch konnten Enzyme bzw. ganze Zellen vermehrt in industriellen Prozessen eingesetzt werden.<sup>8,9</sup>

Ein bedeutendes Beispiel ist das von Rosenthaler 1908 synthetisierte (R)-Mandelonitril ausgehend von Benzaldehyd und Cyanwasserstoff mit Hilfe von Emulsin. Emulsin beschreibt ein Enzymgemisch, welches unter anderem die

Oxynitrilase enthält und aus Bittermandeln extrahiert wird (Abbildung 1).<sup>2,10</sup> Die Reaktion beschreibt die erste gezielte enantioselektive Reaktion im Labor.



**Abbildung 1: Umsetzung von Benzaldehyd mit Cyanwasserstoff und Emulsin zu (R)-Mandelonitril**

Zwischen 1980-1990 erlaubten neue Kenntnisse im Protein-Engineering die Veränderung und damit Optimierung der Struktur von Proteinen.<sup>11</sup> Dadurch konnte das Substratspektrum deutlich erweitert und biokatalytische Anwendungen auf Feinchemikalien und pharmazeutische Zwischenprodukte erweitert werden.<sup>1,12,13</sup>

1992 lag der Umsatz von biokatalysierten Prozessen in der Lebensmittel-, Feinchemikalien- und Waschmittel-Industrie bereits bei 700 Millionen US\$.<sup>6</sup> Bis heute sind die Trends der Umsätze für den Enzymmarkt steigend (Abbildung 2).<sup>5,14</sup> Durch die Vorteile gegenüber der Chemokatalyse werden Enzyme in der Pharmazie, Lebensmittelindustrie, Waschmittelindustrie (überwiegend Proteasen und Lipasen), Abwasserbehandlung (Lipasen) oder auch Textilindustrie (Catalasen, Laccasen, Cellulasen) heute vielseitig eingesetzt.<sup>1,12</sup> Hierbei werden am meisten Hydrolasen (Lipasen, Esterasen und Proteasen) für die Synthese von Estern, Säuren, Peptiden und Amiden, Dehydrogenasen für die Oxidation von Alkoholen und Reduktion von Carbonylen, Aldolasen für die stereoselektive Kondensation von Carbonylverbindungen und Oxynitrilasen für die Synthese von chiralen Hydroxynitrilen verwendet.<sup>15</sup>

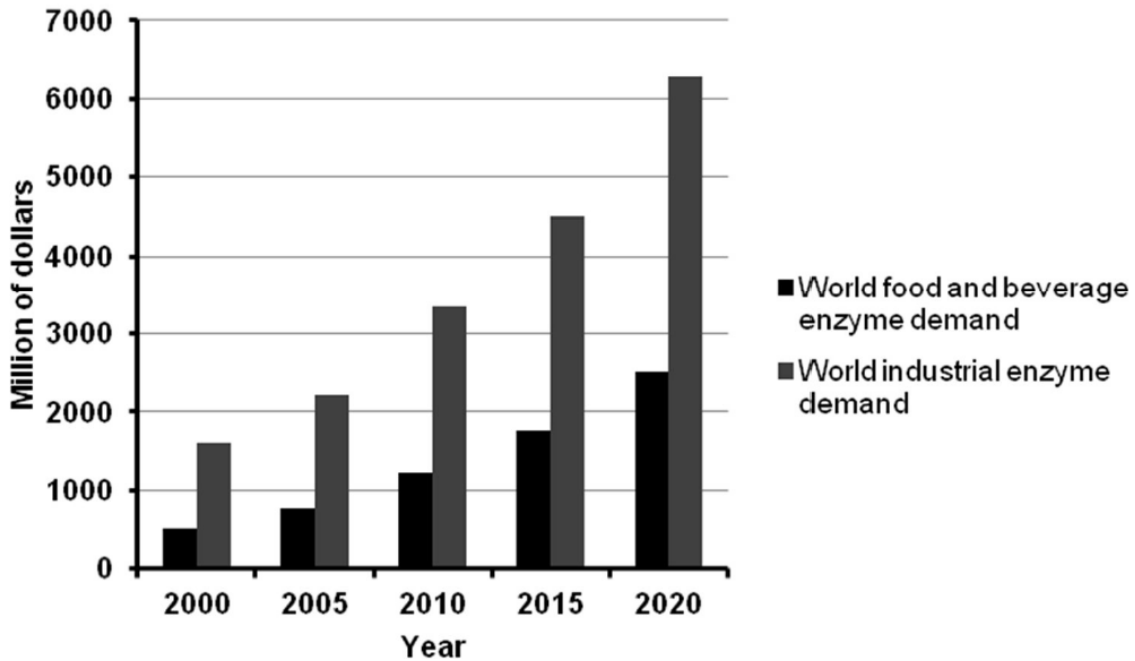


Abbildung 2: Wachstum des Enzymmarktes seit 2000<sup>14</sup>

Ein neues Konzept und entscheidender Durchbruch in der Biokatalyse war die Idee der Immobilisierung von Enzymen.<sup>1,8,9,16–20</sup> Es beschreibt ein Verfahren zur festen räumlichen Fixierung von Enzymen in oder auf einer bestimmten Matrix. Dabei behält das Enzym seine katalytische Aktivität bei und kann wiederholt oder kontinuierlich eingesetzt werden.<sup>6</sup> Nach ersten erfolgreichen Immobilisierungsversuchen konnte sich das Prinzip erfolgreich in der Biokatalyse etablieren.<sup>15,21,22</sup>

Die stetige Weiterentwicklung neuer Immobilisierungstechniken und Fortschritte im Protein-Engineering, Gensynthese, Sequenzanalyse und im Computer-Modelling verbessern Proteine soweit, dass sie heute beispielsweise in organischen Lösemitteln noch bei 60 °C stabil sind, ein erweitertes Substratspektrum besitzen und damit nicht-natürliche Reaktionen katalysieren.<sup>15,23–26</sup> Auch in Bezug auf eine „modernere, grünere Chemie“ bleibt die Biokatalyse Gegenstand gegenwärtiger und zukünftiger Forschungen.<sup>3</sup>



## 2. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen neue Varianten von Einschlussimmobilisierungen (Kompartimentierungen) in dem Polyurethan-basierten Polymer NOA 81 von Norland Products für biokatalytische Reaktionen untersucht werden. Dazu soll zunächst das Polymer vollständig charakterisiert (physische und chemische Stabilität, Ladungsvermögen etc.) werden.

Anschließend soll die Eignung der Kompartimente für verschiedene biokatalytische Reaktionen getestet werden.

Als Beispielreaktion soll zunächst die *Lk*ADH katalysierte Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol untersucht werden (Abbildung 3). Hierbei soll nach erfolgreicher Immobilisierung vor allem der Einfluss der Cofaktorregenerierung (substratgekoppelt/enzymgekoppelt) auf die Umsetzung untersucht werden. Zusätzlich sollen verschiedene Substrate genutzt, sowie die Parameter der Reaktion für maximale Endumsätze optimiert werden. Hierbei sollen die Reaktionen auch mit der *Lb*ADH durchgeführt werden. Des Weiteren sollen Stabilitätsuntersuchungen und Studien zum wiederholten Einsatz angefertigt werden.

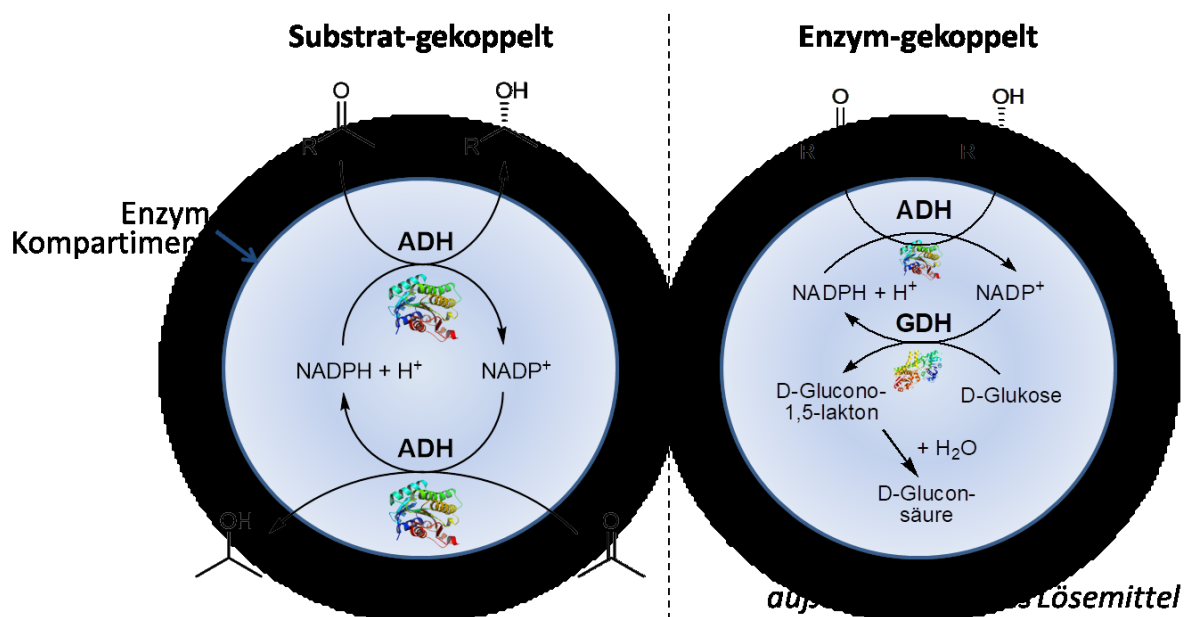
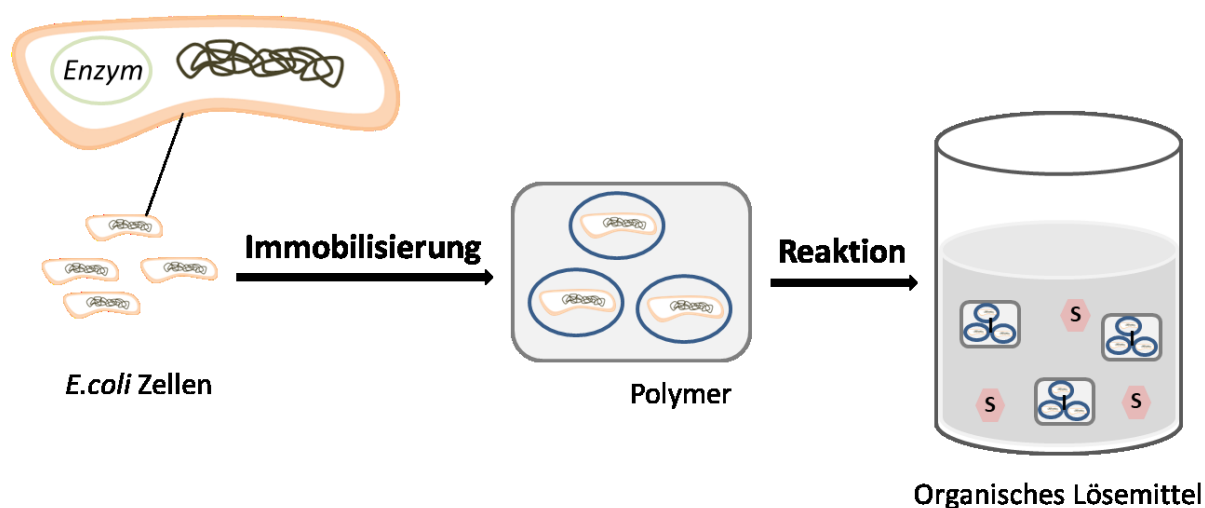


Abbildung 3: Umsetzung von Ketonen zu Alkoholen mit Hilfe kompartimentierter ADH in unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen

Weiterhin sollen die Kompartimente in Kaskadenreaktionen eingesetzt werden. Hierbei soll die *LkADH* katalysierte Reaktion mit einer Lipase CalB katalysierten linearen Kaskadenreaktion gekoppelt werden. Dazu soll die Reaktion zunächst in Teilreaktionen durchgeführt und anschließend die gesamte Kaskade optimiert werden. Es soll der Einfluss des Lösemittels und verschiedener Acyldonoren untersucht werden.

Zuletzt soll das System auf Ganzzellbiotransformationen erweitert werden. Hierzu sollen ganze Zellen in das Polyurethanpolymer immobilisiert und anschließend in Biotransformationen eingesetzt werden (Abbildung 4). Es soll die Umsetzung von Ricinolsäure in einer mehrstufigen Kaskade und eine Esterase-katalysierte Reaktion von Octylacetat zu Octanol untersucht werden. Die Reaktionsparameter sollen optimiert und die zweite Reaktion auf Recyclbarkeit untersucht werden.

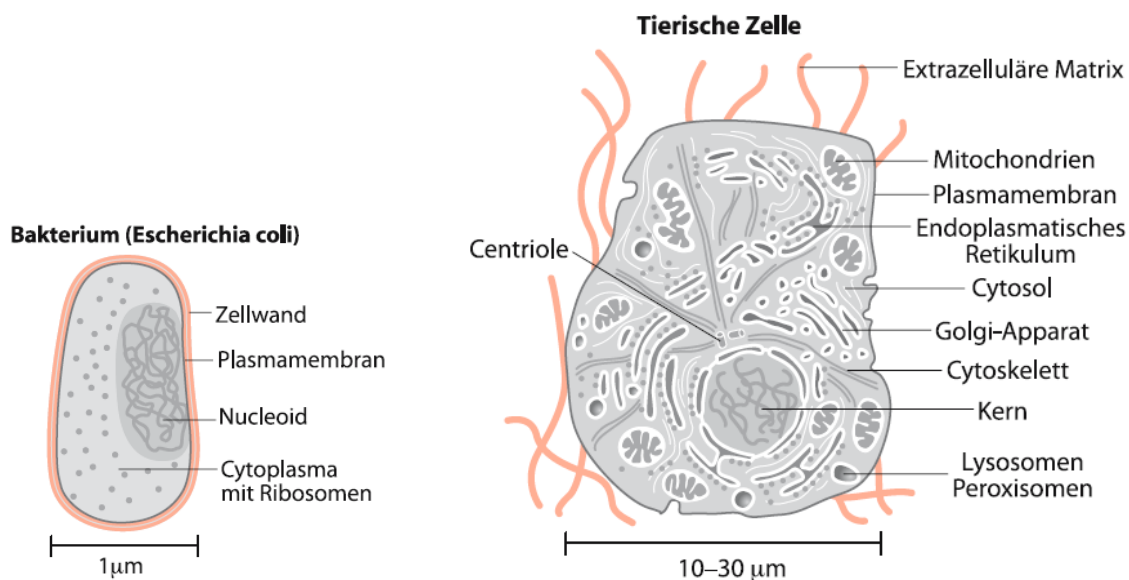


**Abbildung 4: Immobilisierung ganzer Zellen in das Polyurethan-basierte Polymer NOA**

### 3. Theoretische Grundlagen

#### 3.1 Grundlagen der Proteinexpression

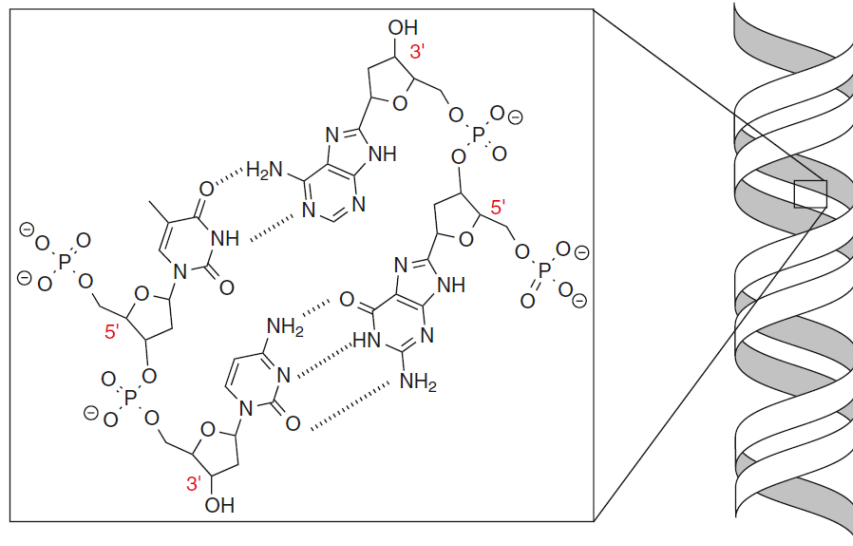
Alle Lebewesen sind aus Zellen aufgebaut, welche man grundsätzlich in die kleineren, einfachen Prokaryonten (z.B. Bakterien) und die größeren, komplexeren Eukaryonten (z.B. Pflanzen und Tiere) unterteilt.<sup>27</sup> Innerhalb der Zelle, bei Prokaryonten im Zellkern und bei Eukaryonten im Zytoplasma, befindet sich die DNA (Desoxyribonukleinsäure) als Träger der Erbinformation und dementsprechend zuständig für die Entwicklung und Funktion aller Lebewesen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung einer Bakterien- und Tierischen Zelle<sup>27</sup>**

Die dreidimensionale Struktur der DNA wurde 1953 von Watson und Crick aufgeschlüsselt. Demnach besteht sie aus einer linearen Aneinanderreihung von Nukleotiden (Polynukleotidkette), welche durch Phosphatgruppen miteinander verknüpft sind. Die Nukleotide bestehen aus einem Basen-, Zucker und einem Phosphatteil, wobei der Zuckerbestandteil (Desoxyribose) mit einer der vier möglichen Basen (Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin) verknüpft ist. Die Basen können entlang des DNA Stranges in jeder beliebigen Reihenfolge angeordnet sein.

Bei den meisten Organismen besteht die DNA jedoch nicht nur aus einem Strang, sondern zwei in einer Doppelhelix um sich gewundenen, sodass das Zucker-Phosphat-Rückgrat jeweils außen und die Basenpaare nach innen zeigen (Abbildung 6).<sup>28</sup>



**Abbildung 6: Aufbau der DNA**<sup>29</sup>

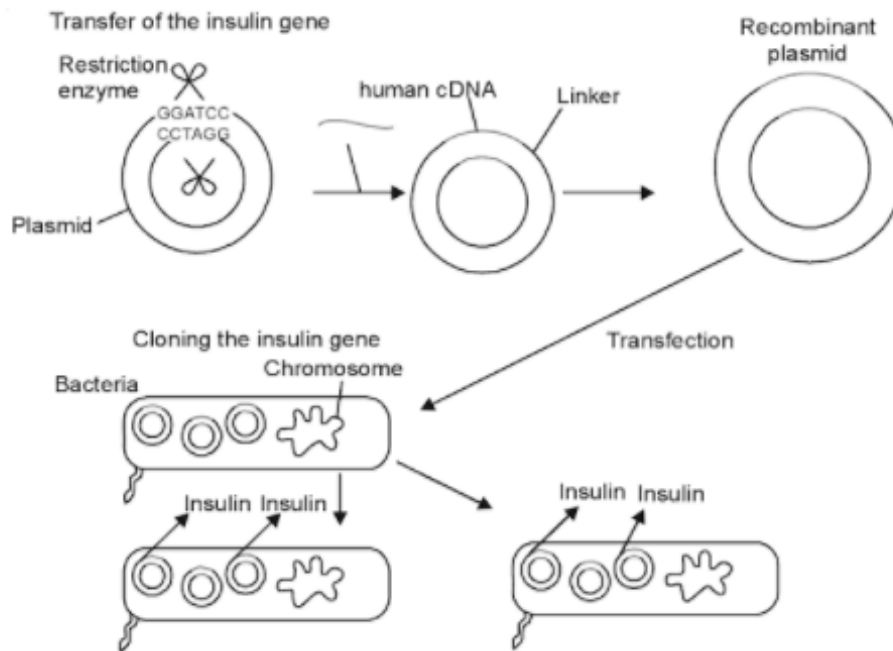
Im Gegensatz zur DNA enthält die RNA (Ribonukleinsäure) als Zucker Ribose und statt der Base Thymin Uracil. Adenin bindet an Thymin (bzw. Uracil), und Guanin bildet mit Cytosin ein Basenpaar. Damit ist die genetische Information durch die Basensequenz auf dem Strang festgelegt, sodass ein Strang der Doppelhelix zu dem anderen komplementär ist.

In einer Zelle führt der Fluss genetischer Information von der DNA über die RNA zum Protein. Um die DNA im Zellkern zunächst zu replizieren müssen die zwei Stränge voneinander getrennt und anschließend ein neuer, komplementärer Strang synthetisiert werden, wobei die Nukleinbasen der DNA in die Nukleinbasen der RNA umgeschrieben werden. An diesem komplexen Prozess, genannt Transkription, sind viele Proteine beteiligt, unter anderem auch die RNA Polymerase.<sup>28</sup> Der neu synthetisierte RNA Strang (mRNA, messenger RNA) wird anschließend aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert. In den im Zytoplasma enthaltenen Ribosomen findet die Proteinbiosynthese, auch Translation genannt, statt.<sup>29</sup> Je drei aufeinanderfolgende Nukleinbasen auf der mRNA werden als Codon bezeichnet und

stehen genau für eine bestimmte Aminosäure. Die Basensequenz wird dementsprechend in die codierte Aminosäuresequenz eines Polypeptids übersetzt und so abschließend ein Protein gebildet. Mit dem Translationsende löst sich das synthetisierte Peptid vom Ribosom und die Polypeptidkette faltet sich zum finalen Protein, sodass eine komplexe räumliche Struktur entsteht (Sekundär- und Tertiärstruktur).

### 3.1.2 Plasmide

Plasmide sind ringförmige DNA Moleküle, die natürlich in Bakterien vorkommen und als zusätzliche Chromosomen fungieren.<sup>27</sup> Sie sind ein wichtiges Werkzeug für die Synthese von neuen DNA-Molekülen im Labor (vor allem in *E.coli*), da sie verschiedene Gene enthalten und sich autonom replizieren können. In der Gentechnik werden sie auch als Vektoren bezeichnet und werden für die Vervielfältigung und Exprimierung (Genexpression) als Transportvehikel benutzt. In dem sogenannten Vektordesign können gezielt Vektoren angepasst werden, um so DNA-Moleküle im Labor zu konstruieren. Das Plasmid wird mit einem Restriktionsenzym an einer einzelnen, spezifischen Stelle geschnitten und so für die Aufnahme von fremder DNA vorbereitet. Das gewünschte Gen kann nun in das Plasmid eingebaut und anschließend in Bakterien (z.B. *E.coli*) eingebracht werden. Wird das Bakterium auf dem entsprechenden Nährboden kultiviert, können so die Gene über die Zellteilung vervielfältigt werden. Diese Vorgehensweise erlaubt heute beispielsweise die Herstellung von rekombinantem Insulin (Abbildung 7).<sup>30</sup>



**Abbildung 7: Herstellung von rekombinantem Insulin<sup>30</sup>**

### 3.2 Biokatalysatoren

Enzyme sind Proteine und setzen sich, wie bereits beschrieben, aus kondensierten Aminosäuren zusammen, die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind. Sie kommen in der Natur vielseitig vor und regulieren effektiv und präzise eine beeindruckende Anzahl von wichtigen Prozessen in lebenden Organismen.<sup>31</sup> Enzyme wirken auf diese Weise als Biokatalysatoren. Ein Katalysator beschreibt einen Stoff, der die Aktivierungsenergie einer chemischen Reaktion senkt und damit die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion erhöht bzw. die Reaktion ermöglicht. Dies geschieht durch das Herabsetzen der Aktivierungsenergie. Kriterium dabei ist, dass der Katalysator am Ende der Reaktion wieder unverbraucht vorliegt und in einen neuen Katalysatorzyklus eingehen kann.<sup>32</sup>

Traditionell wurden Enzyme aus ihrem natürlichen Organismus, wie z.B. aus Pilzen, Insekten, Pflanzen oder Säugetieren, gewonnen, was jedoch aufgrund der nur gering isolierbar möglichen Menge, umständlich und kostspielig ist.<sup>2</sup> Der Durchbruch konnte durch die Arbeiten von Paul Berg, Herbert Boyer und Stanley Cohen erzielt werden, welche herausfanden, dass Enzyme mit Hilfe von rekombinanter DNA auch in

anderen Mikroorganismen, sogenannten „Hosts“ wie *Escherichia coli* kultiviert und gewonnen werden können.

Nachdem bis Mitte des 20ten Jahrhunderts viele verschiedene Enzyme isoliert und charakterisiert wurden, legte die International Union for Pure and Applied Chemistry (IUPAC) und die International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) 1961 eine systematisch einheitliche Nomenklatur fest. Sie orientiert sich dabei an der Reaktionsart, die das Enzym katalysiert. Man unterscheidet seitdem alle Enzyme in sechs Hauptklassen und diverse Unterklassen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Klassifizierung von Enzymen**

<b>EC-Klasse</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Katalysierte Reaktion</b>	<b>Beispiel</b>
<b>(1)</b>	Oxidoreduktasen	Redoxreaktionen	Alkohol-Dehydrogenase
<b>(2)</b>	Transferasen	Übertragung funktioneller Gruppen	Transaminase
<b>(3)</b>	Hydrolasen	Bindungsspaltung über Wasserverbrauch	Esterase
<b>(4)</b>	Lyasen	Bildung von Mehrfachbindungen	Hydroxynitrillyase
<b>(5)</b>	Isomerasen	Isomerisierungsreaktionen	Glukoseisomerase
<b>(6)</b>	Ligasen	Bindungsbildung unter ATP-Verbrauch	Ligase B

Die Enzyme werden in ein vierstelliges EC (Enzyme Commission)–Zahlencodesystem eingeteilt (E.C. X.X.X.X), bei dem die erste Nummer die Enzymklasse, also den Reaktionstyp, definiert. Die zweite Zahl beschreibt die Unterklasse, welche entweder den Substrattyp, Art der funktionell übertragenen Gruppen oder spezifische Bindungen beschreibt. Danach folgt die Unter-Unterklasse, welche die Art des Substrates oder Cosubstrates beschreibt, gefolgt von einer fortlaufenden Nummer an vierter Stelle.

### 3.2.1 Vor- und Nachteile von Biokatalysatoren

Enzyme können eine Reaktion im Vergleich zur nicht-katalysierten Reaktion in der Regel um Faktor  $10^8$ - $10^{12}$  beschleunigen. Diese Werte liegen meist über denen eines herkömmlichen chemischen Katalysators. Sie weisen hierbei eine sehr hohe Regio-, Enantio- und Chemoselektivität auf und katalysieren Reaktionen die oft chemisch nicht zugänglich oder impraktikabel sind.<sup>31,33</sup> Ein weiterer Vorteil ist, dass Enzyme im Allgemeinen unter sehr milden Reaktionsbedingungen wirksam sind. Typischerweise arbeiten sie bei einem pH-Wert von 5-8 und in einem Temperaturbereich von 20-40 °C.<sup>13,31</sup> Unter diesen Bedingungen können unerwünschte Nebenreaktionen wie Zersetzung, Isomerisierung oder Racemisierung der Produkte verhindert werden. Weiterhin sind Biokatalysatoren oft bioverträglich und abbaubar. Dies ist vor allem in Bezug auf eine „grünere Chemie“ wichtig.<sup>3,34-36</sup>

Trotz der vielen Vorteile, weisen Biokatalysatoren auch einige Nachteile auf. Beispielsweise sind Enzyme oft nur schwer zugänglich. Ihre Isolation ist zum Teil sehr aufwendig und je nach Reinheit und ob das Enzym rekombinant gewonnen werden kann, variieren die Preise enorm.<sup>33</sup> Ein weiterer Nachteil ist, dass Enzyme sehr empfindlich vor allem auf Temperaturschwankungen reagieren und oft nur in ihrer natürlichen wässrigen Umgebung arbeiten. Dementsprechend haben sie ihre höchste katalytische Aktivität in Wasser, daher kann es problematisch werden, wenn keine organischen Lösemittel eingesetzt werden können.<sup>34</sup> Auch die fehlende Stabilität macht der Industrie, gerade bei zeitaufwendigen Prozessen, Probleme. Eine schwierige Rückgewinnung und Wiedernutzung des Katalysators, da sich dieser im Reaktionsmedium lösen kann, erschwert die Nutzung zusätzlich.<sup>35,37</sup> Viele dieser Nachteile können aber durch eine sinnvolle Enzymimmobilisierung überwunden werden.

### 3.2.2 Ganze Zellen und isolierte Enzyme

Heutzutage werden Biokatalysatoren sowohl in ihrer natürlichen Form als ganze Zellen, als auch in ihrer (teil-)aufgereinigten Form (Isolierte Enzyme) eingesetzt.<sup>13,38</sup> Die Entscheidung, in welcher Form der Katalysator verwendet werden sollte, hängt



dabei von vielen Faktoren, wie beispielsweise Reaktionsart, Nebenreaktionen, Cofaktorrecycling oder Größenordnung der Reaktion ab.<sup>34</sup>

Die Verwendung von ganzen Zellen bietet viele Vorteile. Beispielsweise müssen die Enzyme nicht aufgereinigt oder abgetrennt werden, wodurch die Anwendung deutlich günstiger ist.<sup>13</sup> Durch die in den Zellen bereits vorhandenen Cofaktoren müssen diese, im Gegensatz zu isolierten Enzymen, auch nicht extern regeneriert werden.<sup>39,40</sup> Ganze Zellen zeigen zudem hohe Aktivitäten in wässrigen Lösemitteln bzw. in ihrem Kulturmedium auf.<sup>34</sup> Die Kultivierung erfordert jedoch eine zusätzliche Ausrüstung und dementsprechend weiteren Aufwand. Zudem zeigen ganze Zellen häufig eine geringe Toleranz gegenüber organischen Lösemitteln und Nebenreaktionen können durch Stoffwechselreaktionen innerhalb der Zelle auftreten.<sup>34</sup>

Isolierte Enzyme haben den Vorteil, nicht mit anderen Enzymen in der Zelle zu konkurrieren und zu wechselwirken, wodurch weniger Nebenprodukte entstehen können.<sup>13</sup> Weiterhin zeigen sie eine sehr gute spezifische Aktivität und Selektivität auf.<sup>40</sup> Die Arbeit mit isolierten Enzymen zeichnet sich zudem durch einen simplen Aufbau, Aufarbeitung und gute Rückgewinnung des Katalysators aus. Einer der größten Nachteile ist jedoch die nötige Cofaktorrekycling bei manchen Enzymen und Isolierung des Enzyms, wodurch Reaktionen sehr kostspielig werden können.<sup>34</sup>

Letztendlich ausschlaggebend, vor allem bei Großindustriellen Prozessen, sind jedoch meistens die produktspezifischen Katalysatorkosten, welche die Wahl des Biokatalysators beeinflussen.

### **3.3 Oxidoreduktasen**

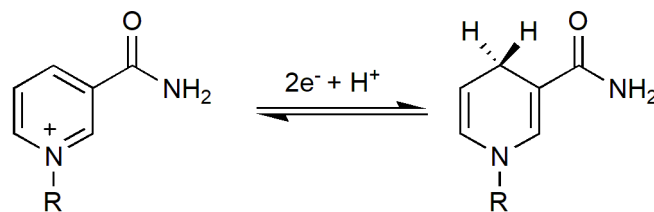
Oxidoreduktasen gehören zur ersten Enzymklasse und katalysieren im Allgemeinen Oxidations- und Reduktionsreaktionen bei denen Elektronen, Wasserstoffatome oder Sauerstoffatome übertragen werden.<sup>28</sup> In der Natur sind sie an zentralen Stoffwechselwegen der Zelle beteiligt, benötigen Cofaktoren für die Katalyse und sind meist intrazellulär vorhanden. Es gibt insgesamt 22 Unterklassen unter denen sich viele Enzyme befinden, wie beispielsweise die Dehydrogenasen, welche

technologisch bedeutsam sind.<sup>41</sup> Bis heute sind über 2000 Enzyme dieser Art charakterisiert, aber nur ca. 100 davon kommerziell erhältlich.<sup>9</sup>

### 3.3.1 Alkoholdehydrogenasen

Alkoholdehydrogenasen (ADH's) katalysieren die Synthese von (chiralen) Alkoholen ausgehend von prochiralen Carbonylverbindungen und gehören zur Familie der Oxidoreduktasen. Viele ADH's sind heute bekannt und werden zur Synthese eingesetzt.<sup>42</sup>

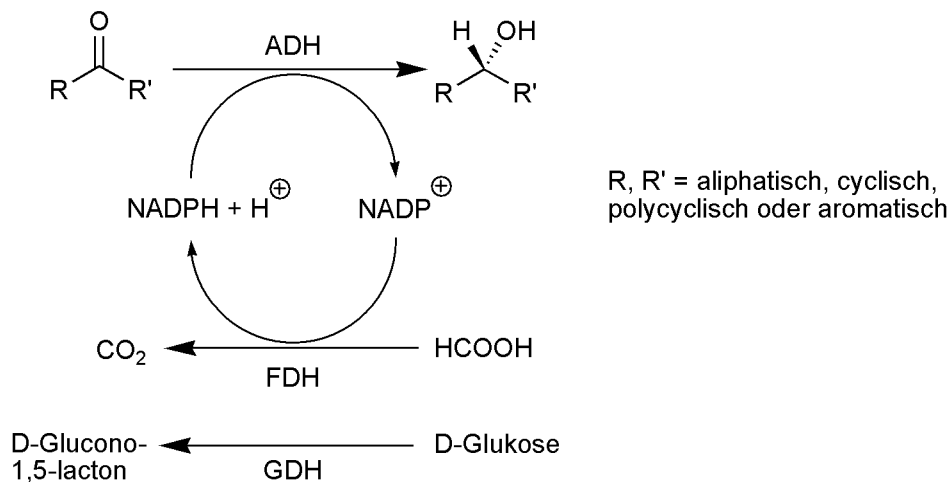
Alkoholdehydrogenasen sind cofaktorabhängig. Im Allgemeinen versteht man unter Cofaktoren nichtproteinogene Stoffe, die entweder kovalent (prosthetische Gruppe, kann nicht dissoziieren) oder nicht kovalent (Coenzym, dissoziiert nach Katalyse) an das Enzym gebunden sind. Cofaktoren fungieren bei den ADH's als Redoxäquivalente und verändern sich somit während der Reaktion und müssen deshalb regeneriert werden, da die Zugabe in stöchiometrischer Menge zu teuer ist.<sup>43</sup> Weiterhin gehören auch gebundene Metall-Ionen, die unerlässlich für ein Enzym sind, zu den Cofaktoren. Viele ADH's, wie beispielsweise die *Lk*ADH und *Lb*ADH, benötigen als Cofaktor  $\text{NADP}^+$  (Nikotinsäureamid-adeninucleotidphosphat), wobei das Hydridion von der Nicotinsäureamidgruppe des  $\text{NADPH}$ s übertragen wird (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Reduktion von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH}$ ; Rest R = Adeninucleotidphosphat**

Die Cofaktorregenerierung kann auf verschiedene Weise erfolgen. Zu den wichtigsten gehören die Enzym-gekoppelte und die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung.

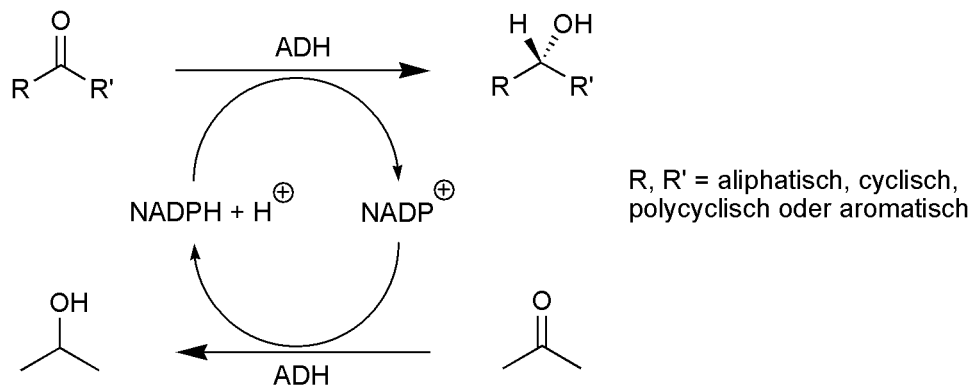
Bei einer Enzym-gekoppelten Regenerierung ist ein zusätzliches Enzym an der Reaktion beteiligt. Der oxidierte Cofaktor wird mit Hilfe des zweiten Enzyms durch Oxidation wieder in seine reduzierte Form NADPH überführt (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung von ADH's**

Für diese Anwendung haben sich Formiatdehydrogenasen (FDH's) bewährt, wobei Formiat irreversibel zu Kohlendioxid oxidiert wird, welches einfach aus der Lösung ausgegast werden kann. Ähnlich funktioniert die Glukosedehydrogenase (GDH), welche D-Glukose irreversibel zu D-Glucono-1,5-lacton umsetzt, welches dabei spontan zu D-Gluconsäure hydrolysiert.<sup>7</sup> Auch hier ist es wichtig, das gebildete Produkt dem Gleichgewicht zu entziehen, da somit das thermodynamische Gleichgewicht auf die Produktseite verschoben werden kann, um so Umsätze der Gesamtreaktion zu steigern. Durch das Entstehen von D-Gluconsäure sinkt der pH Wert, weshalb gegentitriert werden muss. Die Rückgewinnung des Cofaktors ist meist möglich, jedoch gewinnt das System, durch die zusätzliche Verwendung eines weiteren Enzyms, zusätzlich an Komplexität.

Bei der Substrat-gekoppelten Regenerierung erfolgt die Rückgewinnung des Cofaktors durch das gleiche Enzym (Abbildung 10). Dabei ist natürlich wichtig, dass das Enzym das Cosubstrat umsetzen kann und gleichzeitig dabei NAD(P)H zurückgewinnt.



**Abbildung 10: Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit NADPH**

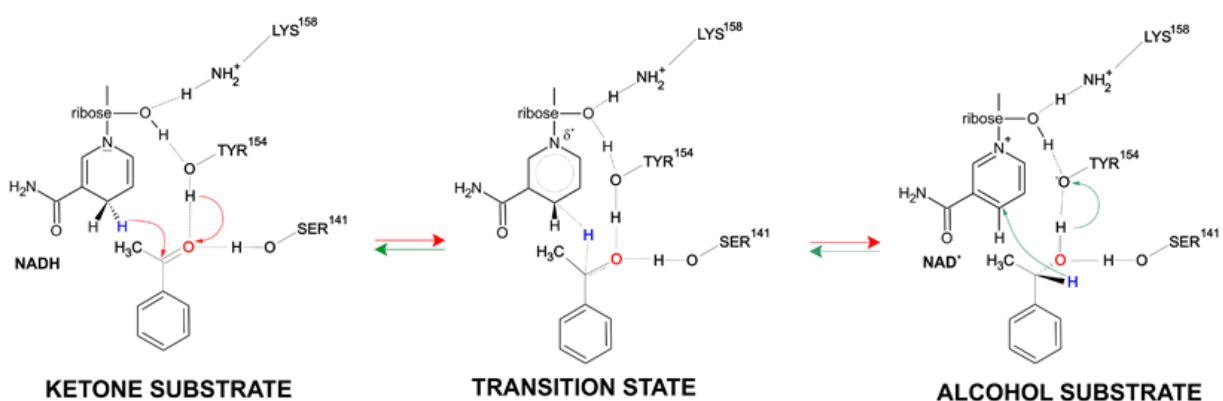
Das Cosubstrat ist im Allgemeinen ein kostengünstiger Alkohol (z.B. *iso*-Propanol), der vom Enzym zum entsprechenden Aldehyd bzw. Keton oxidiert wird.<sup>44</sup> Um das thermodynamische Gleichgewicht auf die Produktseite zu schieben, muss der Alkohol im großen Überschuss eingesetzt werden. Tut man dies nicht, erhält man sonst durch die Kopplung beider Gleichgewichte ein spezifisches Verhältnis von Alkohol und Keton, was dazu führt, dass die Hin- und Rückreaktion im Gleichgewicht gleich schnell verlaufen. Weiterhin ist zu beachten, dass sowohl die hohe Cosubstratkonzentration als auch das entstehende Keton, wie zum Beispiel Aceton, einen schädigenden Einfluss auf das Enzym haben kann und dadurch die Reaktion inhibiert. Entzieht man das Keton permanent dem Gleichgewicht (z.B. durch einen Gasstrom im kleineren Maßstab), können diese Nachteile umgangen werden. Das Vermeiden zusätzlicher Kosten, durch die Verwendung des gleichen Enzyms, ist ein großer Vorteil der Substrat-gekoppelten Regenerierung.

#### **3.4.1.1 Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* (E.C. 1.1.1.2)**

Die ADH aus *Lactobacillus kefir* (LkADH) ist ein NADP-abhängiges und (*R*)-spezifisches Enzym und katalysiert die Reduktion von Ketonen. Strukturell verwandt mit der ADH aus *Lactobacillus brevis* (ca. 92% Ähnlichkeit) gehört das Enzym zur Familie der der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen.<sup>42</sup> Es zeigt die charakteristische Coenzym-bindende Tasche und weist ein Molekulargewicht von ca. 100 kDA auf, was einem Homotetramer entspricht. Die vier Untereinheiten bestehen jeweils aus

251 Aminosäureresten.<sup>45</sup> Essentiell wichtig für die katalytische Aktivität der *LkADH* ist die Bindung von  $Mg^{2+}$  Ionen im Enzym, welche deshalb in geringen Mengen in Form von gelösten  $MgCl_2$  zur Reaktion hinzugegeben werden. Ohne Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  ist das Enzym komplett deaktiviert.<sup>45</sup> Jedes Monomer hat zwei Magnesiumionen gebunden, die jedoch nicht direkt an der Reaktion teilnehmen. Die katalytisch höchste Aktivität zeigt die *LkADH* bei einem pH-Wert von 7. Die ADH zeichnet sich besonders durch ein breites Spektrum an zugänglichen Substraten (aromatische, cyclische, polycyclische und aliphatische Verbindungen) und eine hohe Enantioselektivität aus.<sup>46</sup> Daher wird sie vielfältig zur Reduktion von Ketonen genutzt.<sup>45,47</sup>

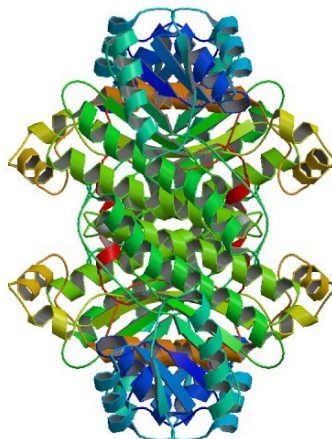
Der katalytische Mechanismus der ADH wurde hinreichend untersucht und beinhaltet die Triade bestehend aus Ser142, Tyr155 und Lys159. Die Bindung des Substrates erfolgt über elektrostatische Wechselwirkungen am aktiven Zentrum des Enzyms. Die Tyrosin Seitenkette ist im Mechanismus dabei für die Übertragung eines Protons auf den Sauerstoff der Carbonylgruppe des Substrates zuständig.<sup>45</sup> Nur bei einer ganz bestimmten Ausrichtung der Reaktanden findet der Hydridtransfer statt und ist deshalb auch enantiospezifisch („induced fit“). Der exemplarische Reaktionsmechanismus für kurzkettige Alkoholdehydrogenasen kann aus Abbildung 11 entnommen werden.



**Abbildung 11: Reaktionsmechanismus kurzkettiger Alkoholdehydrogenasen<sup>48</sup>**

### 3.4.1.2 Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus brevis* (E.C. 1.1.1.2)

Wie bereits beschrieben katalysieren viele ADH's und so auch die *LbADH* aus *Lactobacillus brevis* die Synthese chiraler Alkohole ausgehend von prochiralen Carbonylverbindungen. Wie auch die *LkADH* ist die *LbADH* ein NADP-abhängiges und (*R*)-spezifisches Enzym und katalysiert die Umsetzung von Ketonen. Die *LbADH* gehört heute zu den am umfangreichsten studierten Enzymen. Mit der *LkADH* besteht eine ca. 92% strukturelle Ähnlichkeit und sie gehört zur Familie der kurzkettigen Alkoholdehydrogenasen.<sup>42</sup> Die *LbADH* bildet ein Homotetramer (4 x 26,6 kDa) mit je 251 Aminosäuren pro Untereinheit und ist wie die *LkADH*  $Mg^{2+}$  abhängig (Abbildung 12).<sup>45,49,50</sup>



**Abbildung 12: Kristallstruktur der *LbADH*<sup>45</sup>**

Die *LbADH* zeichnet sich durch eine sehr hohe Temperaturstabilität, und ein breites Substratspektrum aus. So katalysiert sie die stereoselektive Reduktion von Substraten, wie aromatische Ketone oder Keto-Ester, mit einer hohen Enantiomerenreinheit (e.e. >99%).<sup>49,51</sup> Die katalytische Triade besteht wie bei der *LkADH* aus Ser142, Tyr155 und Lys159.

### 3.4.1.3 Alkoholdehydrogenase aus *Micrococcus luteus* (E.C. 1.1.1.X)

Die Alkoholdehydrogenase aus *Micrococcus luteus* NCTC2665 (MIADH) ist eine langkettige sekundäre ADH und NAD<sup>+</sup>-abhängig.<sup>52,53</sup> Der Adenosin-Anteil des NAD bindet an die hydrophobe Tasche der NADH-Bindungsstelle am Enzym, welche aus vier  $\alpha$ -Helices und sechs  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen besteht und fungiert so als Wasserstoff-Akzeptor. Da in dieser Arbeit die Alkoholdehydrogenase als ganze Zelle kultiviert wurde, waren die Cofaktoren intrazellulär vorhanden und mussten nicht extern regeneriert werden.

Die ADH ist in der Lage langkettige sekundäre Alkohole zu oxidieren und kann mit BVMO's, wie der BVMO aus *Pseudomonas putida*, gekoppelt werden um industriell relevante Carboxylverbindungen zu synthetisieren.<sup>54,55</sup> So können beispielsweise langkettige Fettsäuren umgesetzt werden.<sup>56</sup>

Die MIADH zeigt ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 8.<sup>57</sup>

### 3.3.2 Baeyer-Villiger-Monooxygenasen

Baeyer-Villiger-Monooxygenasen (BVMO's) gehören zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen und wandeln aliphatische, cyclische und aromatische Ketone in ihre korrespondierenden Ester und Lactone um, indem Sauerstoff neben die Carbonylverbindung eingefügt wird (Baeyer-Villiger Oxidation).<sup>58,59</sup> Sie weisen dabei eine hohe Chemo-, Regio- und Enantioselektivität auf und benötigen für die Katalyse molekularen Sauerstoff O<sub>2</sub>.<sup>56</sup> Die meisten BVMO's sind FAD-abhängig und brauchen NAD(P)H für Reaktionen. Sie haben daher eine zwei-Domänen Struktur, bei der das aktive Zentrum in einer Spalte zwischen diesen Domänen sitzt.<sup>58</sup> Die am besten untersuchte Baeyer-Villiger-Monooxygenase ist die BVMO aus *Acinetobacter calcoaceticus* NCIMB 9871, welche Mono- und Bicyclische Ketone umwandelt und von Donoghue et al. 1976 beschrieben wurde.<sup>60,61</sup>

### 3.3.2.1 Baeyer-Villiger-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* (E.C. 1.14.13.X)

Die Baeyer-Villiger-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* KT2440 wurde erstmalig von Bornscheuer et al. 2007 charakterisiert. Die Strukturanalyse zeigte, dass das Enzym interessanterweise nur eine 25% Ähnlichkeit mit der BVMO DSM50106 aus dem gleichen Organismus aufweist.<sup>61</sup> Diese BVMO weist eine ähnliche Substratspezifität auf und katalysiert wie die Baeyer-Villiger-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* KT2440 hauptsächlich die Umsetzung kurz- und langkettiger aliphatische Ketone.<sup>62,63</sup> Cyclische und aromatische Ketone hingegen können nur schlecht oder gar nicht umgesetzt werden.<sup>61</sup> BVMO's, die FAD und NADPH Cofaktor-abhängig sind (wie die Baeyer-Villiger-Monooxygenase aus *Pseudomonas putida* KT2440) sind bekannt für eine sehr geringe Stabilität, weil sie während der Katalyse viele Konformationsänderungen eingehen. Daher werden viele BVMO's genetisch verändert, um ihre Stabilität zu verbessern.<sup>57</sup>

Das Temperaturoptimum der BVMO liegt bei 35 °C und sie zeigt ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH Wert von 7,5.<sup>57</sup>

## 3.4 Hydrolasen

Hydrolasen gehören zur dritten Enzymklasse und katalysieren Hydrolysereaktionen, also die Spaltung einer chemischen Bindung unter Verbrauch von Wasser.<sup>9</sup> Die Enzymklasse wird in 12 Untergruppen unterteilt, wobei sie nach Empfindlichkeit der Bindung bei der Hydrolyse klassifiziert werden.<sup>41</sup> Hydrolasen spielen im Katabolismus (Abbau von Stoffwechselprodukten) eine große Rolle, indem sie assimilierbare Nährstoffe der Zelle zuführen. Die meisten Enzyme, die von technischer Relevanz sind, gehören zu dieser Familie. Bekannte Vertreter sind vor allem Esterasen, Proteasen und Glykosidasen. Die meisten Hydrolasen benötigen keine Cofaktoren, sind extrazellulär vorhanden und robust genug harschen Prozessbedingungen standzuhalten.<sup>41</sup>



### 3.4.1 Lipasen

Lipasen sind Enzyme, die als natürliche Reaktion die Hydrolyse von Lipiden katalysieren und dabei Fettsäuren und Glycerol abspalten. Sie regulieren im menschlichen Körper u.a. die Fettverdauung und stellen dem Körper Fettreserven zur Verfügung. Lipasen können aber auch technologisch genutzt werden, da Lipide, Zucker, Alkohole, Säuren und Ester als Substrate zugänglich sind. Eine Besonderheit gegenüber anderen Enzymen ist, dass sie ihre Aktivität und Selektivität häufig auch in organischen Lösemitteln beibehalten und somit speziell für industrielle Synthesen bedeutsam sind.

#### 3.5.1.1 Lipase B aus *Candida antarctica* (E.C. 3.1.1.1)

Die Hefe-Spezies *Candida antarctica* produziert zwei verschiedene Lipasen (Lipase A und Lipase B). Beide Enzyme wurden 1993 von Patkar und Mitarbeitern entdeckt und charakterisiert.<sup>64</sup> Lipase A ist Calciumabhängig, Lipase B hingegen braucht kein Calcium für die Katalyse. Auch die Substratspezifität unterscheidet sich bei beiden Lipasen.

Die Lipase B aus *Candida antarctica* (CalB) ist einer der meist genutzten Biokatalysatoren. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Stabilität und hohe Enantioselektivität für viele Substrate aus und wird deshalb für Umesterungen, Polymerisierungsreaktionen und Racematspaltungen vielseitig genutzt.<sup>65-67</sup>

Die Struktur des Enzyms wurde 1994 von Uppenberg und Mitarbeitern aufgeklärt. CalB ist ein Monomer und verfügt über die typische  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung, wie die meisten Lipasen. Die Kernstruktur besitzt acht parallele  $\beta$ -Faltblätter, welche beidseitig von  $\alpha$ -Helices umgeben sind (Abbildung 13).<sup>65,66</sup> Die Polypeptidkette besteht aus 317 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33 kDa. Die Struktur dient als festes Baugerüst für die am aktiven Zentrum sitzende katalytische Triade aus Ser105, His224 und Asp187.<sup>68,69</sup>

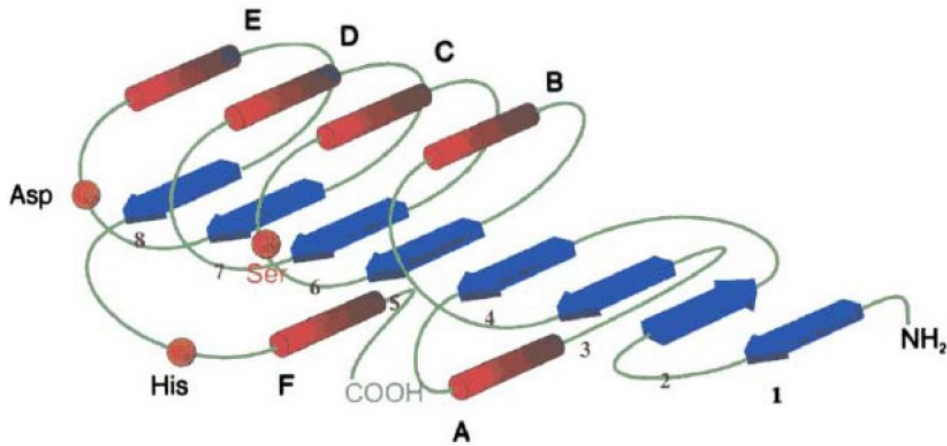


Abbildung 13: Die  $\alpha/\beta$ -Hydrolase-Faltung von CalB; die acht  $\beta$ -Faltblätter (1-8, blau) beidseitig umgeben von  $\alpha$ -Helices (A-F, rot) und der katalytischen Triade (Ser-Asp-His)<sup>70</sup>

Die „Tasche“ für das Substrat im aktiven Zentrum ist im Vergleich zu anderen Lipasen sehr klein. Deshalb ist die Umsetzung sekundärer Alkohole durch CalB durch eine besonders hohe Enatio- und Stereoselektivität ausgezeichnet. Die aktive Seitentasche beinhaltet zwei Kanäle, wobei einer den Acyl-Rest und der andere den Alkohol-Rest des Substrates bindet (Abbildung 14).<sup>68</sup>

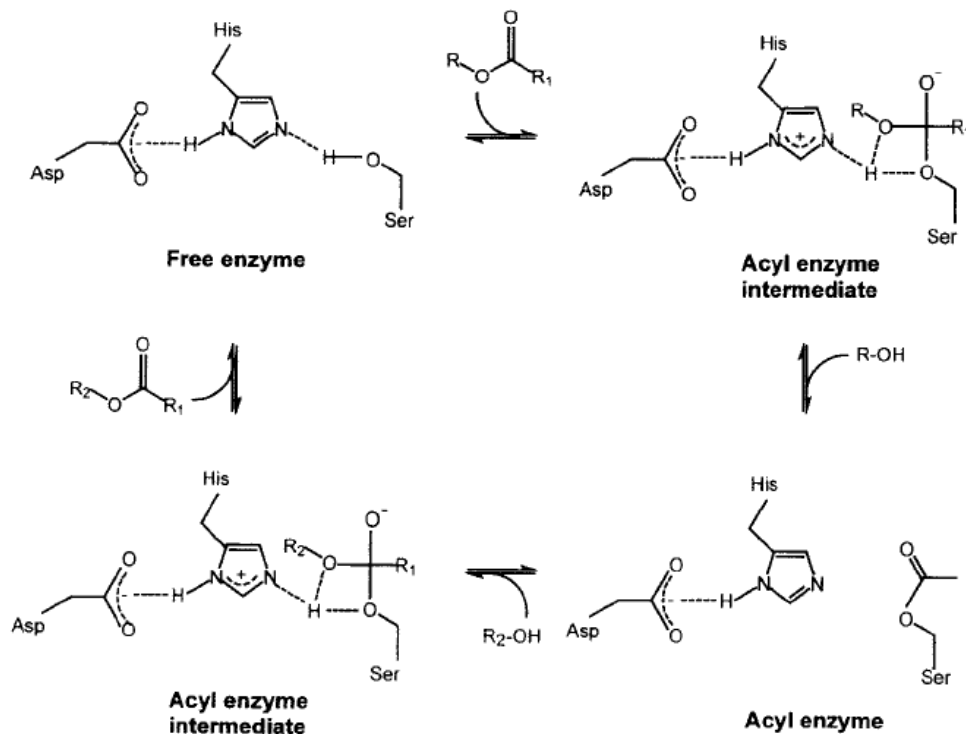


Abbildung 14: Mechanismus der Katalyse durch CalB mit Hilfe der katalytischen Triade<sup>71</sup>

Im Gegensatz zu anderen Lipasen, zeigt CalB keine Grenzflächenaktivität (normalerweise sind Lipasen an einer Öl-Wasser Phasengrenze aktiv), wodurch sich der Einsatz in organischen Lösemitteln vereinfacht.<sup>72</sup>

Das Enzym ist über den pH-Bereich von 3,5-9,5 stabil, hat aber ein Optimum bei pH 7. Bei Temperaturen über 50 °C setzt die Denaturierung ein.

CalB wird heute meist immobilisiert, vor allem wegen der erhöhten Stabilität, zur Synthese eingesetzt. In dieser Arbeit wurde das kommerziell erhältliche Novozym 435 benutzt, welches adsorptiv auf einem makroporösen Polyacrylharz immobilisiert ist.

### **3.4.2 Esterasen**

Esterasen gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und katalysieren die Spaltung oder Bildung von Esterverbindungen.<sup>73,74</sup> Sie kommen unter anderem in der menschlichen Leber vor und katalysieren dort viele Stoffwechselwege. Im allgemeinen sind Esterasen sehr pH-Wert und temperaturstabil und sogar in einigen organischen Lösemitteln katalytisch aktiv.<sup>75</sup> Industriell von Bedeutung ist vor allem die Schweineleberesterase (PLE).

#### **3.4.2.1 Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* (E.C. 3.1.1.2)**

Die Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* SIK WI wurde 1998 erstmalig von Bornscheuer et al. charakterisiert.<sup>75</sup> Die Esterase ist über ein breites pH Spektrum von 5-10 aktiv, weist aber ihr Aktivitätsmaximum bei pH 7,5-8 auf. Zudem ist sie bis zu 50 °C aktiv und kann bei bis zu 40 °C gelagert werden, ohne Aktivität zu verlieren. In organischen Lösemitteln (z.B. Toluol) konnte jedoch keine Aktivität festgestellt werden. Die Esterase katalysiert die Hydrolyse von vielen Substraten, wobei die Aktivität je nach Kettenlänge des Substrates variiert (Tabelle 2), jedoch konnte auch die Hydrolyse von langkettigen, linearen Fettsäuren beobachtet werden.<sup>52,63,76</sup>

**Tabelle 2: Auszug aus dem Substratspektrum der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens*<sup>75</sup>**

Substrat	relative Aktivität
<b>Ethylacetat</b>	100%
<b>Ethylbutyrat</b>	157%
<b>Ethyldecanoat</b>	14%
<b>Methylmethacrylat</b>	67%
<b>Methyldecanoat</b>	17%
<b>Methylaurat</b>	5%
<b>Propylbutyrat</b>	134%

Der hydrolytische Mechanismus von Esterasen ähnelt sehr dem von Lipasen. Sie besitzen eine katalytische Triade, bestehend aus Serin, Histidin und Asparaginsäure. Durch einen nucleophilen Angriff des aktivierten Serins auf die Carbonylverbindung (Substrat) kann der Ester gespalten werden.<sup>77</sup>

### 3.5 Enzymimmobilisierung

Die im Zytoplasma enthaltenen Zellorganellen (z.B. Zellkern, Mitochondrien) sind von einer Membran abgeschlossene, intrazelluläre Komponenten innerhalb jeder Zelle, die hauptsächlich Enzyme enthalten, welche spezielle Funktionen erfüllen.<sup>78–81</sup> Diese Mikrokompimente können durch ihre einzigartige Struktur und biochemische Umgebung Intermediate von einem Enzym zum nächsten Enzym transportieren und somit verschiedene wichtige zelluläre Aktivitäten genau und effektiv steuern und regulieren.<sup>81,82</sup> Einer der größten Herausforderungen moderner Biotechnologie ist deshalb das Verstehen des Aufbaus und der Funktionsweise dieser Zellkompartimente.<sup>83</sup> Der Natur nachempfunden versucht man daher in der Biomimikry Lösungen auch für biotechnologische Anwendungen zu finden.<sup>31,84–89</sup> Ein solches Beispiel ist die Enzymimmobilisierung von Biokatalysatoren. Da das Arbeiten mit reinen Enzymen einige Nachteile (Stabilität, Lösemittel etc.) mit sich bringt, wurde Mitte des 20. Jahrhunderts ein Konzept zur Immobilisierung der Enzyme vorgestellt, welches sich heute fest in der Biokatalyse etabliert hat. Die Immobilisierung

beschreibt im Allgemeinen ein Verfahren zur festen räumlichen Fixierung von Enzymen in oder auf einer bestimmten Matrix. Dabei können mit der richtigen Immobilisierungsmethode die Eigenschaften des Enzyms stark verbessert werden.<sup>90</sup>

Ein wichtiger Vorteil der Immobilisierung ist die angestrebte Stabilitätssteigerung des Enzyms durch eine feste Verankerung im Trägermaterial, sodass eine Interaktion nach außen über die Phasengrenze hinaus nicht möglich ist. Somit ist das Enzym weniger anfällig beispielsweise gegenüber Denaturierung durch Hitze, organische Lösemittel oder Autolyse. Ist eine gute Stabilität gegeben, kann der Katalysator ebenso wiederholt oder kontinuierlich eingesetzt werden. Die feste Form des Immobilisats erlaubt zudem eine vereinfachte Produktaufreinigung und eine generell bessere Kontrolle der Reaktion, da das Risiko einer Produktverunreinigung durch das Enzym verringert werden kann.<sup>31,90</sup> Typischerweise sind Enzyme nur in rein wässrigem Medium katalytisch aktiv und verlieren ihre Aktivität in organischen Lösemitteln. Durch eine Kompartimentierung ist das Arbeiten in organischen Lösemitteln möglich.<sup>91</sup> Weiterhin können durch eine richtige Immobilisierung die Eigenschaften des Enzyms (z.B. Substratspezifität) verbessert und inhibierende Effekte verringert werden.<sup>31</sup>

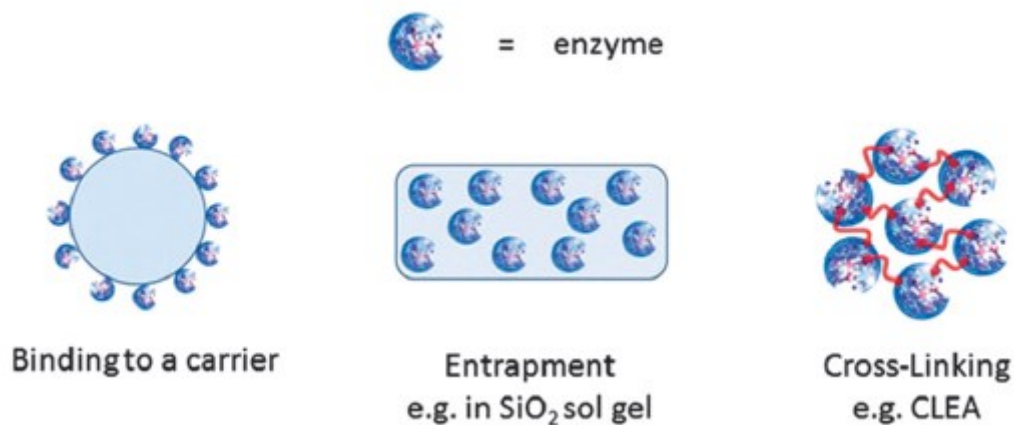
Um alle Vorteile einer Immobilisierung zu nutzen, ist es wichtig, dass das Enzym richtig immobilisiert wird, da eine falsche Immobilisierung auch gegenteilige Effekte hervorrufen kann.<sup>92</sup> So können beispielsweise strukturelle Veränderung am Enzym zu einer Deaktivierung führen.<sup>31,90</sup> Daher sind sowohl die Eigenschaften des Trägers, als auch des Enzyms von entscheidender Bedeutung.<sup>93</sup>

Allgemeine Kriterien für eine erfolgreiche Immobilisierung sind<sup>93-99</sup>:

- Geeignetes Trägermaterial („Carrier“)
- Geringe/ keine Deaktivierung des Enzyms während des Immobilisierungsprozesses
- Geringe Kosten und eine einfache Immobilisierung
- Gute Stabilität des immobilisierten Enzyms und ein geringes Auswaschen („Leaching“) während der Reaktion
- Geringe Diffusionsprobleme
- Kompatibilität mit dem Reaktor

Man kann die heute verwendeten Immobilisierungsmethoden allgemein in drei Hauptkategorien unterscheiden (Abbildung 15):

- (1) Immobilisierung auf einem Träger (kovalent, ionisch, Adsorption)
- (2) Quervernetzung („Cross-Linking“)
- (3) Einschlussimmobilisierung



**Abbildung 15: Verschiedene Immobilisierungsmethoden von Enzymen<sup>35</sup>**

Alle Methoden haben ihre Vor- und Nachteile und werden enzymspezifisch angewendet.<sup>22</sup> Es ist auch möglich die Immobilisierungsmethoden untereinander zu kombinieren. So kann ein Enzym beispielsweise erst über Crosslinking untereinander quervernetzt werden und für mehr Stabilität anschließend noch adsorptiv an einen Träger gebunden werden.<sup>100</sup> Werden Polymere für eine Immobilisierung verwendet, können diese auf Grund der großen Auswahl an Polymermaterialien und bekannter Polymerisierungstechniken maßgeschneiderte Eigenschaften wie Länge, Zusammensetzung oder Funktionalität aufweisen.<sup>101</sup> Der Fokus dieser Doktorarbeit liegt auf Einschlussimmobilisierungen.

### 3.5.1 Einschlussimmobilisierung

Bei einer Einschlussimmobilisierung, oder auch Kompartimentierung, handelt es sich um eine Immobilisierung des Enzyms innerhalb einer Matrix und nicht auf deren

Oberfläche (wie bei einer kovalenten, ionischen oder adsorptiven Immobilisierung).<sup>102</sup> Das Enzym wird dabei chemisch nicht modifiziert und behält seine katalytische Aktivität bei.<sup>35</sup> Über eine feste Verankerung innerhalb der Matrix wird über Diffusion der An- und Abtransport von Substrat und Produkt geregelt.

Typischerweise erfolgt der Einschluss in einem Polymer.<sup>35</sup> Das Polymer kann dabei organisch oder anorganisch wie beispielsweise ein Silica Sol-Gel sein, oder aber in Membranen wie Hohlfasern oder Mikrokapseln eingeschlossen werden.<sup>31</sup> Natürliche Polymere wie Alginat, Pektinat oder Cellulose sind besonders schonend, haben aber häufig den Nachteil der geringen Stabilität und biologischen Abbaubarkeit. Synthetische Polymere wie Polyacrylamid, Polyvinylalkohol, Silikon oder Polyurethan sind mechanisch stabiler, jedoch ist eventuell aufgrund eines zu groben Netzwerkes eine zusätzlich kovalente Verankerung von Vorteil.<sup>22,35</sup> Für hochmolekulare Substrate bzw. Produkte ist diese Art der Einschlussimmobilisierung allerdings nicht geeignet, da die Größe der diffundierenden Moleküle entscheidend von der Porengröße und Vernetzungsgrad des Polymers beeinflusst und limitiert wird.

Bekanntere Vertreter von Einschlussimmobilisierungen sind Silica Sol-Gele, Polymersome und PICsomes.

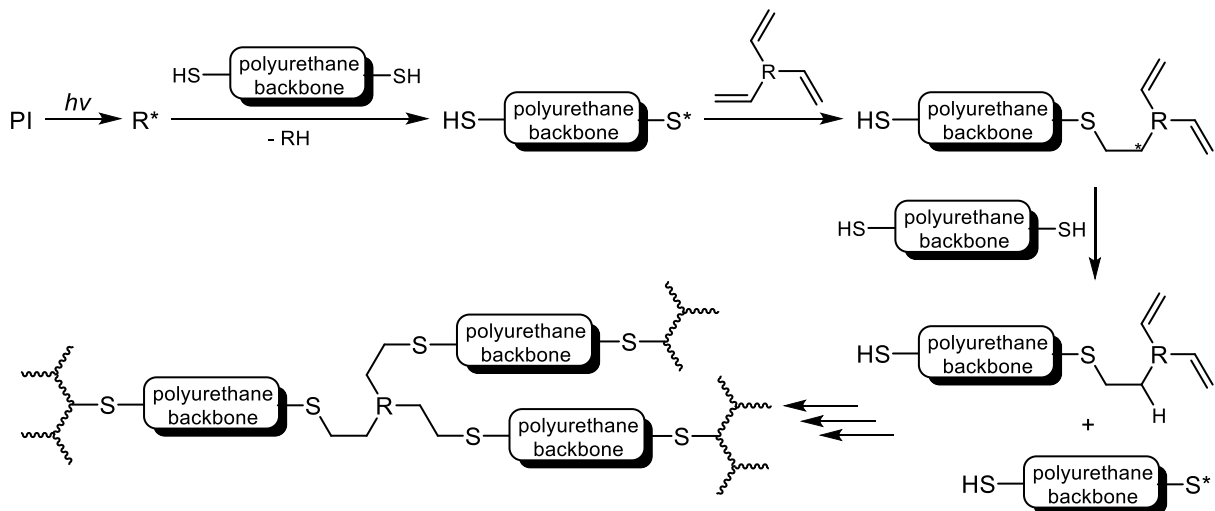
Silica Sol-Gele finden speziell für Biosensoren eine breite Anwendung. Sol-Gele sind Silica Materialien, die leicht handhabbar und schnell herstellbar sind. Dabei kann das chemisch inerte „Glas“ in jeder beliebigen Form dargestellt werden. Die Standardform ist porös und spröde, kann aber thermisch oder mechanisch stabiler geformt werden.<sup>25</sup> Sol-Gele werden hergestellt, indem man ein Tetraalkoxysilan (z.B. Tetramethoxysilan, TMOS) über Säurekatalyse hydrolysiert. Über anschließende Polykondensation wird das Gel geformt.<sup>22,103–108</sup> Silica Sol-Gele können einfach hergestellt werden, zeigen jedoch oft Diffusionsprobleme und haben ein schlechtes Enzym-Loading-Verhältnis.<sup>32</sup>

Polymersome sind Polymervesikel, welche in Anlehnung an Liposomen aus amphiphilen Blockcopolymeren hergestellt werden, aber aus länger-kettigen Polymeren wie Biokunststoffen bestehen. Liposomen bestehen im Gegensatz dazu aus Phosphorlipiden. Polymersome sind daher stabiler, aber weniger permeabel als Liposomen.<sup>85,109–114</sup> Sie sind bis heute einer der am meist studierten Carrier für die Entwicklung von künstlichen Zellorganellen.<sup>85,93</sup>

Polyion Complex Vesicles (PICsomes) sind Polymerkapseln, welche durch Selbstorganisation aus gegensätzlich geladenen Blockcopolypeptiden geformt werden.<sup>115–117</sup> PICsomes finden ähnlich wie Polymersome Interesse bei der Herstellung von künstlichen Zellorganellen, sowie auf Grund ihrer Semipermeabilität als Nanoreaktoren für enzymatische Kaskadenreaktionen.<sup>118,119</sup>

In dieser Arbeit wurden dagegen verschiedene Biokatalysatoren in dem Polyurethan-basierten Polymer NOA 81 immobilisiert. Zusätzlich wurde CalB immobilisiert als Novozym 435 käuflich erworben und musste deshalb nicht zusätzlich immobilisiert werden.

NOA 81 ist ein farbloser, thermostabiler und hydrophober Kleber auf Polyurethanbasis. Das Besondere ist, dass es im Gegensatz zu silikonbasierten Polymeren wie PDMS unter UV Licht (366 nm) innerhalb von wenigen Minuten aushärtet (Abbildung 16).<sup>120</sup>

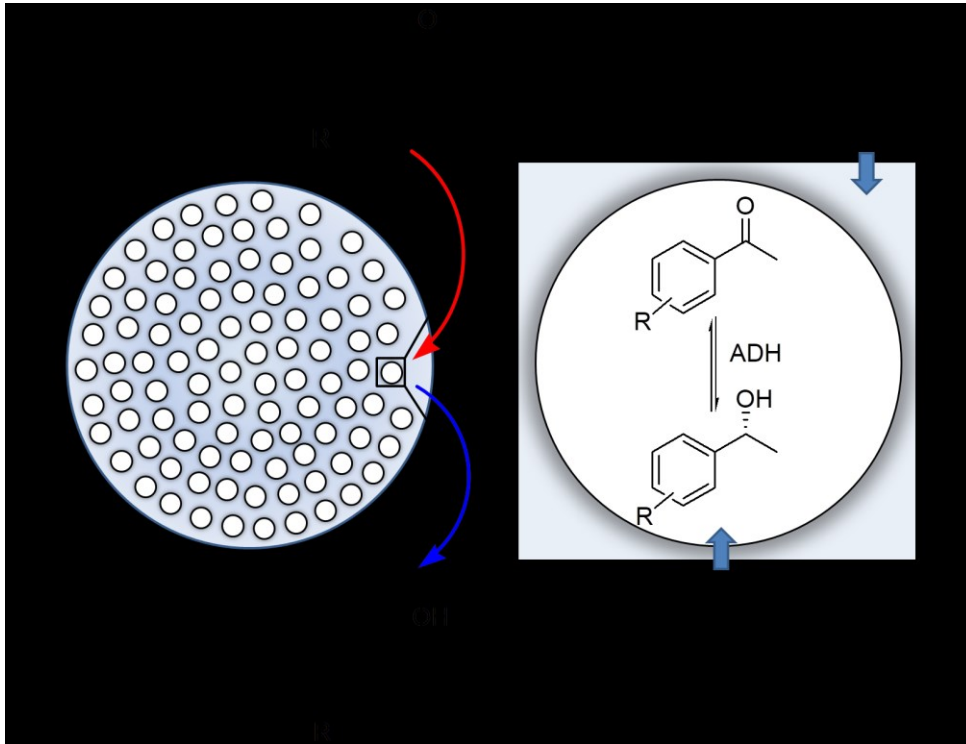


**Abbildung 16: Schematische Darstellung einer radikalischen Polymerisationsreaktion zur Synthese von Polyurethan-basierten Kompartimenten**

Zur Herstellung des Kompartiments wird das Enzym in einem Puffer zum flüssigen Kleber gegeben. Die so erhaltene Emulsion wird bei UV Licht ausgehärtet und man erhält ein Polyurethan (PUR) in dem ungleichmäßig verteilt das Enzym in Wasserreservoirs eingeschlossen ist (Abbildung 17). Das Enzym behält nach der



Immobilisierung seine katalytische Aktivität bei, der Puffer und pH-Wert können dabei frei gewählt werden. Durch die hydrophobe Matrix können Substrat (in Abbildung 15 Acetophenon) und Produkt (in Abbildung 15 Phenylethanol) später bei der Reaktion entlang eines Konzentrationsgradienten hinein und heraus diffundieren.<sup>121</sup>



**Abbildung 17: Querschnitt durch eine exemplarische Polyurethan-Sphäre (links), in der die Wasserreservoirs schematisch verteilt sind und durch Diffusion das Substrat umgesetzt werden kann**

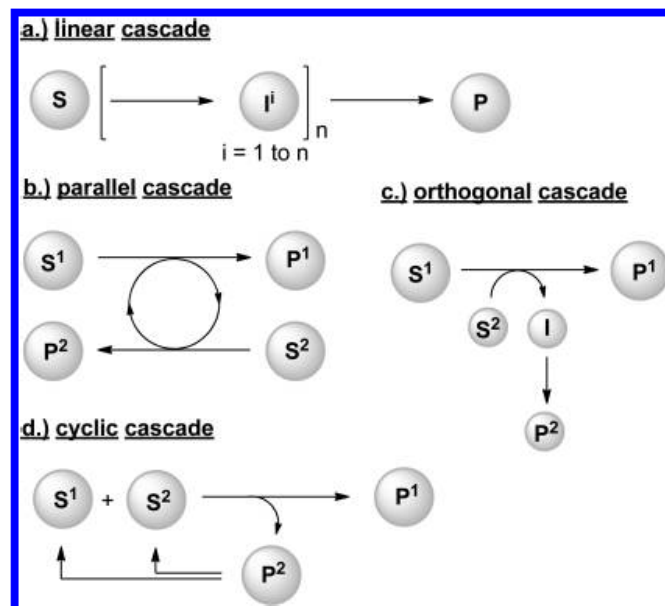
### 3.6 Enzymatische Kaskadenreaktionen

In der Natur finden enzymatische Kaskaden in Form verschiedenster Stoffwechselwege eine breite Anwendung. Unter der Verwendung unterschiedlicher Enzyme und ohne Isolierung von Intermediaten werden aufeinanderfolgend komplizierte Moleküle synthetisiert. Der Natur nachahmend versucht man auch in der Biokatalyse einzelne katalytische Schritte zu solchen Kaskadenreaktion zusammenzufassen.<sup>122</sup> Kaskadenreaktionen sind hierbei synthetisch weniger aufwendig und kostengünstiger. Zudem muss weniger Lösemittel eingesetzt und das Entstehen zusätzlichen Abfalls kann vermieden werden. Weiterhin kann durch das

Koppeln von Reaktionen das Gleichgewicht auf die Produktseite geschoben werden, was den Einsatz weiterer Reaktanden unter Umständen verhindert.<sup>122,123</sup>

Der Versuch, verschiedene enzymatische Schritte zu koppeln, gestaltet sich jedoch oft als sehr schwierig. Enzyme haben ihre Aktivitätsmaxima bei verschiedenen Temperaturen und pH Werten und bevorzugen unterschiedliche Lösemittel, daher ist es schwer ein Optimum für die Gesamtreaktion zu finden. Wenn die genutzten Enzyme ähnliche Reaktionen katalysieren, kann außerdem die Selektivität der Gesamtreaktion sinken.<sup>124</sup> Eine Immobilisierung der verschiedenen Katalysatoren kann jedoch diese Probleme umgehen, indem abgegrenzte Bereiche für das jeweilige Enzym geschaffen werden, in denen es optimal arbeiten kann.

Kaskadenreaktionen werden in vier Gruppen eingeteilt: lineare, parallele, orthogonale und cyclische Kaskadenreaktionen (Abbildung 18).



<sup>a</sup> $S$  = starting material;  $I$  = intermediate,  $P$  = product.

**Abbildung 18: verschiedene Arten von Kaskadenreaktionen<sup>36</sup>**

Der bekannteste Vertreter ist die lineare Kaskade. Die aufeinanderfolgende Umsetzung von Substrat zu Produkt kann rein enzymatisch (jeder Schritt wird durch ein Enzym katalysiert), spontan (die aufeinanderfolgenden Schritte werden durch

spontane Reaktionen ausgelöst) oder enzymatisch-chemisch kombiniert erfolgen. Die Intermediate werden bei der Reaktion nicht isoliert, sondern stets weiter umgesetzt.<sup>125</sup> Lineare Kaskadenreaktionen mit zwei gekoppelten Reaktionssystemen können als 1-Topf 1-Stufenkaskade oder 1-Topf 2-Stufenkaskade durchgeführt werden. Bei der 1-Topf 1-Stufenkaskade werden alle Verbindungen (Enzyme, Substrate, Cosubstrate etc.) zu Beginn und zeitgleich zur Reaktionslösung gegeben und die Reaktion katalysiert. Bei der 1-Topf 2-Stufenkaskade wird die Reaktion in zwei Teilschritten katalysiert. So wird nach Zugabe und Katalyse der ersten Reaktion erst nach Reaktionsende die Reaktanden für die zweite Reaktion hinzugeben und die zweite Teilreaktion durchgeführt.

In der Katalyse von Redoxreaktionen werden parallele Kaskaden am häufigsten angewendet. Die Umsetzung zum gewünschten Produkt ist mit einer zweiten parallel geschalteten Reaktion gekoppelt, die zum Beispiel die Reduktionsäquivalente liefert. Ein Beispiel ist die Cofaktorregenerierung von NADPH für Alkoholdehydrogenasen.

In Anlehnung dazu wird bei den orthogonalen Kaskaden ein Cosubstrat  $S_2$  in ein Intermediat überführt, welches weiter zum Coprodukt  $P_2$  reagiert. Dieses System dient beispielweise dazu, das Gleichgewicht der Gesamtreaktion zur Produktseite zu verschieben.<sup>125</sup>

Bei einer cyclischen Kaskade reagieren zwei Substrate (separate Verbindungen oder auch zwei Enantiomere) zum Produkt  $P_1$  unter der Bildung eines Coproduktes  $P_2$ . Das Coprodukt  $P_2$  kann während der Reaktion wiederholt zu einem oder mehreren Substraten zurückkonvertiert werden. Das Konzept wird beispielsweise für Stereoinversionen genutzt.<sup>125</sup>

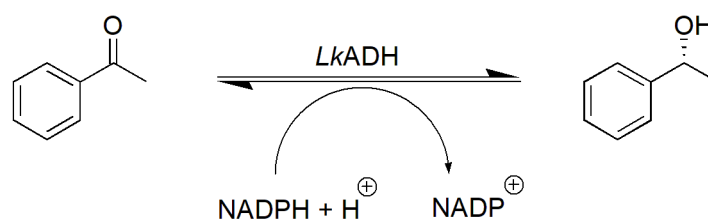
In dieser Dissertation wurde eine lineare Kaskade, bestehend aus einer *LkADH*- und einer *CalB*-katalysierten Reaktion aufgebaut und analysiert.

## 4. Methoden

### 4.1 Photometrische Messungen

#### 4.1.1 ADH Assay

Die Aktivität von ADH wurde über den Verbrauch von NADPH bei der Reduktion von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol durch das Enzym bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit steht somit im direkten Zusammenhang zum Verbrauch von NADPH, welche bei 340 nm (Photometer Specord 50, Analytik Jena) und 30 °C über einen Zeitraum von 3 min bestimmt wurde (Abbildung 19).



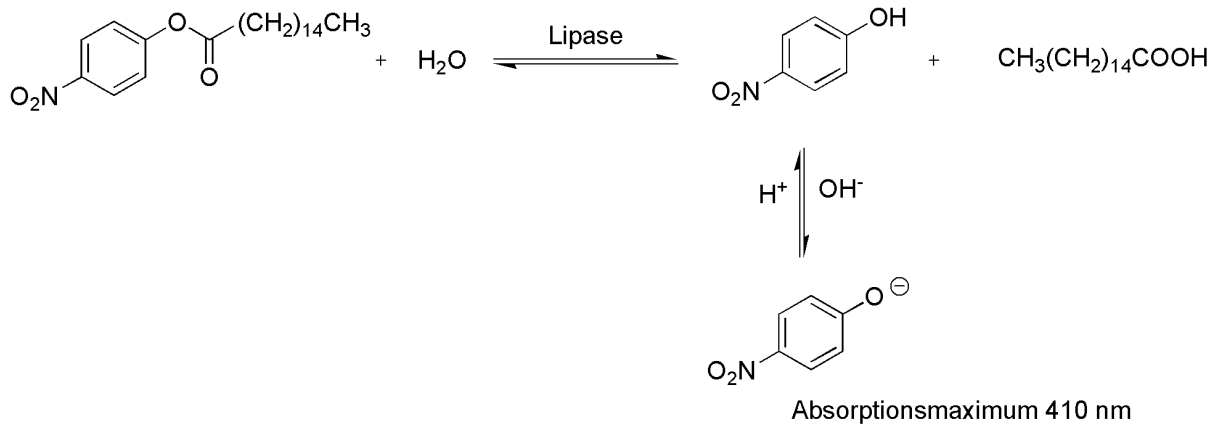
**Abbildung 19: Umsetzung von Acetophenon nach ADH Assay**

Die Standardreaktionslösung enthielt 10 mM Acetophenon in 50 mM Phosphatpuffer (pH 7), versetzt mit 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,2 mM NADPH. 20 µL Enzymlösung (1 mg in 1 mL Puffer) wurde 50-fach verdünnt und zur Lösung hinzugegeben, sodass das Gesamtvolumen der Lösung 1 mL betrug.

#### 4.1.2 CalB Assay

Die Aktivität der CalB wurde über die Spaltung von *p*-Nitrophenylpalmitat unter Wasser zu *p*-Nitrophenol durchgeführt (Abbildung 20). Das Produkt, welches gelblich

erscheint, wurde bei 410 nm (Photometer Specord 50, Analytik Jena) bei 30 °C über einen Zeitraum von 3 min spektrometrisch bestimmt.



**Abbildung 20: Umsetzung von *p*-Nitrophenylpalmitat nach Lipase Assay**

Die Standardreaktionslösung enthielt 10 mM *p*-Nitrophenylpalmitat in 10 mL Aceton. 20  $\mu$ L Enzymlösung (1 mg in 1 mL Glycinpuffer, pH 9) wurde zur Lösung hinzugegeben, sodass das Gesamtvolumen der Lösung 1 mL betrug.

#### 4.1.3 Aktivitätsbestimmung

Über die Steigung der Geraden wurde die Aktivität des Enzyms folgendermaßen berechnet:

$$\text{Aktivität } A = \frac{\text{Steigung} \cdot 60 \cdot V_{\text{gesamt}} \cdot f}{\varepsilon \cdot V_{\text{Probe}} \cdot d}$$

Dabei ist  $V_{\text{gesamt}}$  das Gesamtvolumen in der Küvette (1 mL),  $V_{\text{Probe}}$  das Volumen der zugegeben Enzymlösung,  $f$  der Verdünnungsfaktor,  $\varepsilon$  der Extinktionskoeffizient (ADH 6,22 1/mM·cm, Lipase 1,78 1/mM·cm) und  $d$  die Schichtdicke der Küvette (1 cm).

## 4.2 Mikroskopie

### 4.2.1 Konfokal- und Lichtmikroskopie

Die Verteilung der wässrigen Einschlüsse innerhalb der Polyurethanmatrix wurde mikroskopisch analysiert.

Für Analysen mit LSCM wurde das Polymer vor der Aushärtung mit Fluorescein eingefärbt. Mehrere Bilder innerhalb einer Zeitserie wurden mit einem Leica TCS SP2 AOBS Konfokalmikroskop der Firma Microsystems, ausgestattet mit einer 405 nm 10 mW Laser Diode, gemacht. Die Bilder wurden mit dem 488 nm Filter des 20 mW Argon-Ionen-Lasers aufgenommen und mit Hilfe der Leica Lite Software analysiert.

Weiterhin wurden Bilder mit dem Lichtmikroskop Olympus BX 41 TF, ausgestattet mit einer Digitalkamera und einem 5-fach Objektivrevolver der Firma Olympus, aufgenommen. Die Probe wurde mit Bromphenolblau für eine verbesserte Darstellung der wässrigen Inklusionen vor der Aushärtung eingefärbt und anschließend unter 100-facher Vergrößerung analysiert.

### 4.2.2 Rasterelektronenmikroskop

Die Größenverteilung innerhalb des Polymers wurde außerdem mit einem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Dazu wurde frisch geschnittenes Polymermaterial zunächst auf einem Wafer positioniert und mit einer Palladium/Platin Schicht (ca. 5 nm) überzogen. Anschließend wurde die Probe mit einem Supra-25 Rasterelektronenmikroskop der Firma Carl Zeiss AG untersucht. Das Mikroskop war mit einer Feldemissionsquelle und InLens, SE, 4QBSD, EDX Detektoren ausgestattet. Die Analyse wurde bei 10 kV durchgeführt und die Partikelgrößenverteilung mit Hilfe der Alicona MeX Stereoscopic Image Analysis Software analysiert.

### 4.3 Zug- und Druckversuche

Messungen zum Zug- und Druckverhalten des Polymers wurden mit der Z.2.5/TN Maschine von Zwick/Roell durchgeführt. Alle Proben wurden mit der Software testXpert II analysiert. Für die Druckversuche wurden Polymerimmobilisierungen mit einem Durchmesser von je 1 cm zwischen zwei Platten fixiert und langsam mit einer Kraft von 500 N und einer Geschwindigkeit von 1 mm/min komprimiert. Zugversuche wurden mit Kompartimenten einer Länge von 6 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm durchgeführt. Die Proben wurden zwischen zwei Klemmen fixiert und langsam mit einer Kraft von 0,01 N und einer Geschwindigkeit von 10 mm/min auseinander gezogen.

### 4.4 Bestimmung des Wassergehaltes von PUR mit Karl-Fischer-Titration

Mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration wurde der Wassergehalt von verschiedenen Proben bestimmt. Um den Wasserfluss von PUR in die umgebende organische Phase zu untersuchen, wurde zunächst 1 g des zuvor gehärteten Immobilisats in ca. 5 mL trockenem MTBE gegeben. Zur Analyse wurde ein Karl Fischer Coulometer (831 KF Coulometer) der Firma Metrohm genutzt.

### 4.5 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Größe eines Plasmids wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym NED1, welches die DNA Sequenz des Plasmids genau an einer Stelle schneidet, versetzt. Dazu wurden 12,5 µL Wasser, 1,5 µL Puffer, 0,5 µL Plasmid und 0,5 µL NED1 in ein Eppendorfgefäß gegeben, kurz zentrifugiert und bei 37 °C 3 h erhitzt. Anschließend wurde die Lösung, 2 µL Farbstoff (SeeBlue® Pre-Stained Standard) und ein 1kb DNA Leiter in die entsprechenden Taschen eines 4-12% Bis-Tris polyacrylamidgels von novex life technologies der Firma Thermo Fisher Scientific gefüllt und die Gelelektrophorese bei 100 Volt durchgeführt.

#### 4.6 Einschlussimmobilisierung von Enzymen in PUR

1 g NOA 81 und 400  $\mu$ L Enzymlösung wurden in einem geeigneten Gefäß gut durchmischt. Die Enzymlösung bestand dabei aus 5 mg/mL Enzym und Cofaktor (z.B. 1mM NADP), falls benötigt, gelöst in einem 50 mM Phosphat Puffer. Die Emulsion wurde bei 366 nm unter einer UV-Lampe (4 W NU-4 UV Handlampe von Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) für 5 min in einem verschlossenen Behälter (23 x 18 x 11 cm) mit einem Abstand von 12 cm ausgehärtet.

#### 4.7 Standardreaktion von Enzym-PUR Immobilisierungen

Das feste Immobilisat wurde nach dem Aushärten in kleine Blöcke (2–5 mm) zerschnitten und anschließend zu einer Lösung aus Substrat (z.B. Acetophenon) und Co-substrat (z.B. *iso*-Propanol) in 5 mL organischen Lösemittel, meist MTBE, gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30 °C in einem Schüttler durchmischt. Die Umsetzung zum Produkt wurde mittels GC-Analyse über 48 h verfolgt.

#### 4.8 Standardkopplungsreaktion der Immobilisierten *LkADH* mit CalB

In einem 8 mL Vial wurden CalB (2 mg/mL) und kleingeschnittene, immobilisierte *LkADH* gegeben und mit 5 mL Hexan versetzt. Zur Reaktionslösung wurden anschließend 10 mM Heptanon, 100 mM *iso*-Propanol und 50 mM Acyldonor gegeben und die Mischung für 48 h in einem Schüttler gut durchmischt.



## 4.9 Zellkultivierung

### 4.9.1 Herstellung von $\text{CaCl}_2$ -kompetenten Zellen

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wurden zunächst mehrere Agar-Platten vorbereitet. Dazu wurden in 1 l Wasser 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid (LB-Medium) gelöst und anschließend 1,5% (w/v) Agar-Agar hinzugegeben. Die Lösung wurde für 2 h autoklaviert, anschließend heruntergekühlt und auf ca. 40 Petrischalen gleichmäßig verteilt, wobei ca. die Hälfte der Lösung zusätzlich mit 100  $\mu\text{L}$  Ampicillin versetzt wurde.

Nachdem die Platten vollständig abgekühlt und fest waren, wurde auf einer Platte *E.coli* BL21DE3 in einer Verdünnungsreihe verstrichen. Nach dem Ausplattieren wurde die Probe für die Inkubation über Nacht bei 37 °C gelagert. Vom gewachsenen Stamm wurde am nächsten Tag eine Kolonie in 5 mL LB-Medium übergeimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde 1 mL der Vorkultur in 50 mL LB-Medium, versetzt mit 34 mg/l Chloramphenicol, übergeimpft, bei 37 °C geschüttelt und die OD beobachtet. Bei einem OD von 0,5-0,6 wurde die Kultur für 5 min auf Eis heruntergekühlt und anschließend für weitere 5 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und vorsichtig in 15 mL TFB1 Puffer (40 mL Wasser versetzt mit 0,48 g Rubidiumchlorid; 0,39 g Mangan(II)-chlorid; 0,12 g Kaliumacetat; 0,059 g Calciumchlorid und 7 mL 86%ige Glycerinlösung; pH Wert 5,8) suspendiert. Die Lösung wurde anschließend für 90 min auf Eis inkubiert und nochmals für 5 min bei 4 °C und 4000 g zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 2 mL TBF2 Puffer (40 mL Wasser versetzt mit 0,084 g 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure; 0,048 g Rubidiumchlorid; 0,44 g Calciumchlorid und 7 mL 86%ige Glycerinlösung; pH Wert 8) suspendiert und je 100  $\mu\text{L}$  der kompetenten Zelllösung wurden in 20 Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -70 °C gelagert.

#### 4.9.2 Plasmidtransformation und Isolierung

Nach der Bestimmung der Plasmidkonzentration mit Nanodrop wurden die Plasmide entsprechend ihrer Konzentrationen hinreichend verdünnt (100 ng und 33 ng) und zu den je 100  $\mu\text{L}$  der kompetenten Zellen gegeben. Die Proben wurden anschließend für 1 h auf Eis gelagert und danach für 90 s bei 42 °C einem Hitzeschock unterzogen, um die Plasmidtransformation zu gewährleisten. Nach dem Hitzeschock wurden die Proben mit je 800  $\mu\text{L}$  LB-Medium verdünnt und 1 h bei 37 °C und 400 Upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten, je nach Plasmid versehen mit dem entsprechenden Antibiotikum, ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

Nach erfolgreichem Zellwachstum wurden zur Isolierung des Plasmids je eine Kolonie in 5 mL LB-Medium, versetzt mit den entsprechenden Antibiotika (34 mg/mL Chloramphenicol, 100 mg/mL Ampicillin), übergeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Aus den Röhrchen wurde am nächsten Tag 2 mL entnommen, in Eppendorfgefäße überführt und für 5 min bei 3000-4000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und je 250  $\mu\text{L}$  Resuspensionspuffer zu den Pellets gegeben und gründlich gevortext. Anschließend wurden 250  $\mu\text{L}$  Lysis Puffer hinzugegeben und gut vermischt. Die klare Flüssigkeit wurde für 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend mit 350  $\mu\text{L}$  Neutralisationspuffer versetzt, vorsichtig durchmischt und für 10 min bei 15000-21000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit, welche das Plasmid enthält, wurde vorsichtig in eine Reinigungssäule mit Auffangbehälter gegeben und für 1 min bei 11000-15000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und die Membran mit Plasmid mit 600  $\mu\text{L}$  Waschpuffer versetzt und für 30 s bei 11000-15000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und anschließend das Plasmid nochmals mit dem Puffer gewaschen und zentrifugiert. Die Membran wurde mit 30-50  $\mu\text{L}$  Elutionspuffer versetzt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Plasmid wurde abschließend bei -20 °C gelagert.

### 4.9.3 Vor- und Hauptzellkultur

In 5 mL LB-Medium, versetzt mit 0,1 mM Chloramphenicol (oder anderes Antibiotikum), wurden Kolonien des gewünschten E.coli BL21(DE3) Stammes über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden 2 mL der Vorkultur in 40 mL Riesenberg Medium (4 g/L Diammoniumhydrogenphosphat, 13,5 g/L Kaliumdihydrogenphosphat, 1,7 g/L Citronensäure, 1,4 g/L Magnesiumsulfat, und 10 mL/L TMS (10 g/L Eisen(II)-sulfat, 2,25 g/L Zinksulfat, 1 g/L Kupfersulfat, 0,5 g/L Mangan(II)-sulfat, 0,23 g/L Natriumtetraborat, 2 g/L Calciumchlorid, und 0,1 g/L Ammoniumheptamolybdat) überführt, mit 0,1 mM Chloramphenicol versetzt und bei 37 °C bis zu einem OD von 0,5-0,6 (ca. 5 h) geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Induktor (IPTG; 0,1 mM oder Rhamnose; 2 g/L) für die Genexpression versetzt und über Nacht bei 20 °C geschüttelt. Nach dem vollständigen Verbrauch von Glukose (stationäre Wachstumsphase), meist 8 h nach der Induktion, konnte die Biotransformation stattfinden.

### 4.10 Biotransformation mit immobilisierten ganzen Zellen

Die frisch kultivierten Zellen (ca. 3 g/L) wurden nach vollständigem Verbrauch von Glukose in geeignete Gefäße aufteilt und bei 3500 rpm für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellpallets wurden anschließend in ca. 200 µL Zellmedium vorsichtig wieder gelöst, mit 1 g NOA 81 versetzt, gut durchmischt und bei 266 nm für 5 min ausgehärtet. Das feste Polymer wurde danach in kleine Stücke zerschnitten und der jeweiligen Reaktionslösung zugesetzt. Die Reaktionslösung bestand dabei aus der benötigten Menge an Substrat, gelöst in 18 mL organische Lösemittel (meist MTBE) und 2 mL Zellmedium. Die Lösung wurde anschließend bei 35 °C geschüttelt und die Umsetzung zum Produkt mit einer GC-MS-Analyse verfolgt.

## 4.11 Analytik

### 4.11.1 GC-Analyse

Die Umsetzung aller Reaktionen wurde gaschromatographisch überprüft. In bestimmten Zeitintervallen wurden dazu 200 µL Probe aus der Reaktionslösung entnommen. Zur Analyse wurde der Gaschromatograph TRACE 1310 der Firma Thermo Scientific, ausgestattet mit einem Flammenionisationsdetektor (FID), einer Chirasil-Dex-CB-Säule (30 x 0,25 x 0,25) und einem Autosampler verwendet. 1 µL Probe wurde bei einem Split von 35 injiziert. Der Heliumträgergasstrom betrug dabei 1,2 mL/min. Injektor und Detektor wurden bei 250 °C betrieben. Je nach Reaktion variierten die Ofentemperaturen und Heizraten der jeweiligen Methode und sind im Folgenden in Tabelle 3 zusammengefasst. Dabei war die Standard Methode „Acetophenon“, welche für alle ADH katalysierten Reaktionen mit Acetophenon, Heptanon, Nonanon und Dodecanon als Substrat genutzt wurde. Ausnahme war die ADH katalysierte Reaktion mit Pentanon, bei der die Methode „Pentanon“ verwendet wurde. Für die Derivate von Acetophenon wurde die Methode „Derivate“ genutzt. Bei der *Lk*ADH-CalB Kaskadenreaktion mit Heptanon als Substrat wurde je nach Cosubstrat die Methoden „IPB“ (Isopropylbutyrat als Cosubstrat), „IPO“ (Isopropyloctanoat als Cosubstrat) oder „IPD + IPP“ (Isopropyldecanoat oder Isopropylpalmitat als Cosubstrat) verwendet. Die Methoden „IPB + IPO Acetophenon“ und „IPD + IPP Acetophenon“ wurden bei der Verwendung von Acetophenon als Substrat, unter der Berücksichtigung des jeweiligen Cosubstrates, genutzt.

Tabelle 3: Methoden zur GC-Analyse

Name der Methode	Rate (°C/min)	Temperatur (°C)	Verweilzeit (min)
<b>Acetophenon</b>		60	4
	10	110	4
	10	140	2
<b>Derivate</b>		60	4
	10	110	8
	10	140	6
<b>Pentanon</b>	10	40	5
		110	1
<b>IPB</b>		70	10
<b>IPO</b>		90	0
	10	130	26
<b>IPD + IPP</b>		60	9
	20	230	20
<b>IPB + IPO</b>		60	9
<b>Acetophenon</b>	20	230	3
<b>IPD + IPP</b>		60	9
<b>Acetophenon</b>	20	230	5

Der Umsatz konnte nach der GC-Messung über das Verhältnis der integrierten Flächen von Substrat und Produkt ermittelt werden.

$$\text{Umsatz } U_{\text{Produkt}} [\%] = \frac{A_{\text{Produkt}}}{A_{\text{Produkt}} + A_{\text{Substrat}}} \cdot 100$$

#### 4.11.2 GC-MS-Analyse

Alle Reaktionen mit immobilisierten ganzen Zellen wurden mit Hilfe einer GC-MS Anlage analysiert. 500 µL Probe wurde mit 70 µL Palmitinsäure als interner Standard, 1400 µL Ethylacetat und 900 µL Heptan versetzt, gut durchmischt und zentrifugiert. Anschließend wurden aus der organischen Schicht 25 µL entnommen und mit 25 µL

MSTFA und 75  $\mu\text{L}$  Pyridin für 1 h bei 60 °C derivatisiert. Die Derivate wurden anschließend mit einem Gaschromatographen Thermo Ultra Trace GC, gekoppelt mit einem Ionenfallenmassenspektrometer (Thermo ITQ1100GC-ion Trap MS) der Firma Thermo Scientific analysiert. Das GC-MS war mit einer nicht-polaren HP-5MS Säule (30 x 0,25 x 0,25) ausgestattet und Injektor und Detektor bei 230 °C betrieben. Mit Hilfe von Elektronenstoßionisation bei 70 eV und einem linearer Temperaturgradient von 90 °C, 5 °C/min Heizrate bis 280 °C wurden die Proben analysiert.

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der Polyurethan-basierten Kompartimenten (PUR)

#### 5.1.1 Herstellung der Kompartimente

Die Herstellung der Polyurethan-basierten Kompartimente basiert auf einem simplen zwei-Stufen Prozess. Zuerst wird der noch flüssige Polyurethan Kleber gut mit einer wässrigen Enzymlösung, bestehend aus Puffer und dem Biokatalysator, sowie falls nötig auch Cofaktoren bzw. Cosubstrate, durchmischt. Anschließend wird die viskose Wasser-in-Öl Emulsion bei 320 nm für ca. 5 min ausgehärtet, sodass ein festes, gummiartiges Polymer entsteht, welches schlussendlich zerkleinert und somit für Reaktionen als Katalysatormischung genutzt werden kann (Abbildung 21 ). Ein Emulgator ist auf Grund der hohen Viskosität nicht von Nöten. Zudem benötigt die Methode keinerlei zusätzliche Lösemittel oder Chemikalien, was einen Vorteil gegenüber herkömmlichen Sol-Gelen oder kovalenten Immobilisierungsverfahren darstellt.

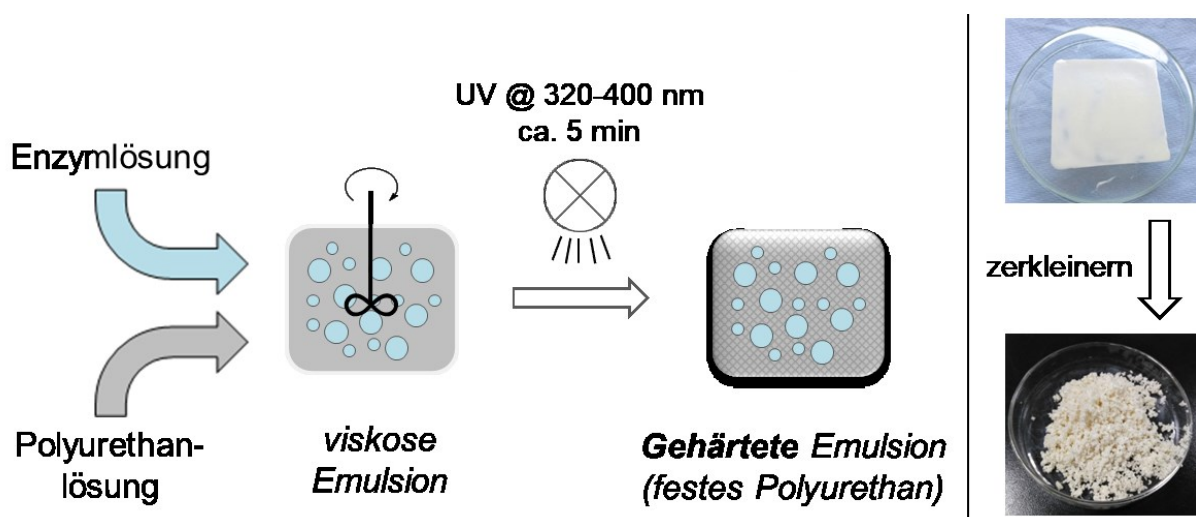


Abbildung 21: Herstellung der festen Polyurethan-basierten Kompartimente

Die wässrigen Einschlüsse werden bei der Polymerisation nicht beeinträchtigt und bleiben als vollständige Sphären innerhalb des Polymers fixiert. In den wässrigen

Sphären befinden sich alle gelösten Verbindungen wie beispielweise Enzyme oder Cofaktoren. Vom Polyurethan umgeben, formt dieses eine Art Barriere/ Membran um die Inklusionen und verhindert somit ein Verschmelzen der wässrigen Tröpfchen mit der äußeren Phase und formt ein zwei-Phasen System. Dieses wird durch die Verwendung eines äußeren Lösemittels bei Reaktionen zu einem drei-Phasen System ergänzt (1: wässrige Einschlüsse, 2: festes Polymer, 3: äußeres Lösemittel).

### 5.1.2 Beladung und Größenverteilung der Kompartimente

Bei der Herstellung der Kompartimente können bis zu 37,5 Gew% einer wässrigen Phase, ohne signifikante Beeinflussung der Aushärtung, immobilisiert werden (Tabelle 3, Eintrag 1-3). Wird die Wasserkonzentration weiter erhöht, härtet das Polymer nur zu einem Gel aus und kann nicht für biokatalytische Reaktionen eingesetzt werden (Einträge 4-5). Erfreulicherweise hat die Proteinkonzentration, im Gegensatz zur Wasserkonzentration, keinen Einfluss auf die Aushärtung. Vom Modellprotein BSA (Bovine Serum Albumin) wurden bis zu 20 mg/mL immobilisiert, ohne einen Einfluss auf die Kompartimentierung festzustellen (Einträge 6-8).<sup>[1]</sup>

---

<sup>[1]</sup> **Uhrich, D.**; Jang H.-Y.; Park, J.-B.; von Langermann, J. Characterization and application of chemical-resistant polyurethane-based enzyme and whole cell compartments. *Journal of Biotechnology* **2018**, eingereicht

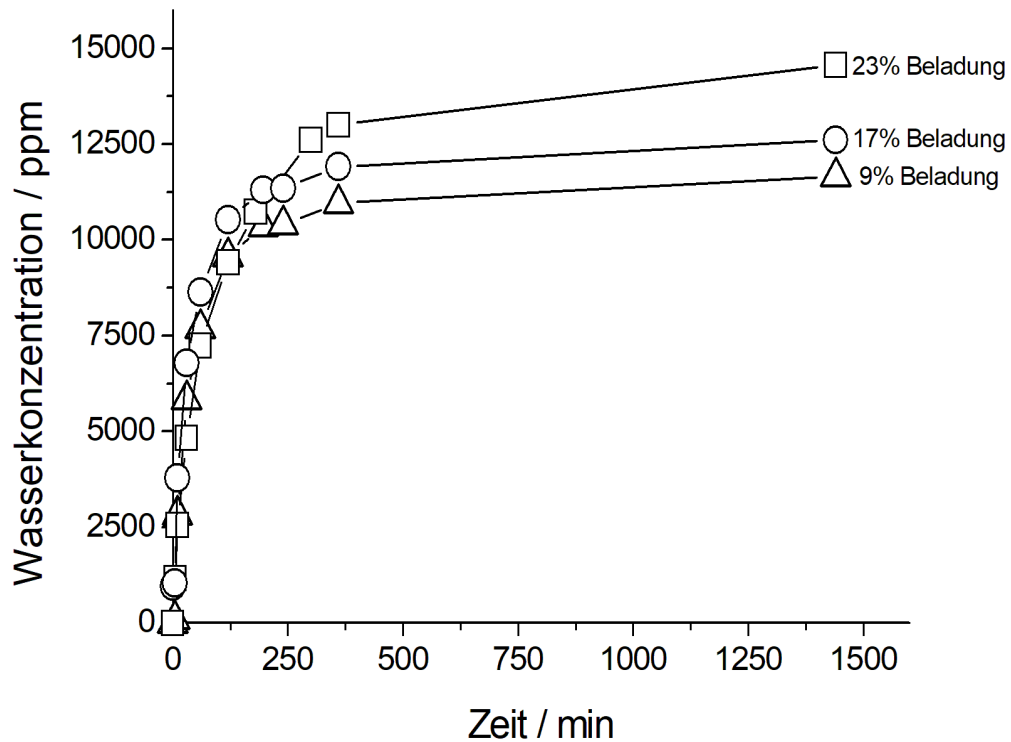


**Tabelle 3: Einfluss der Wasser- und Proteinkonzentration auf das Aushärten des Polymers**

<b>Eintrag</b>	<b>M<sub>Precursor</sub> [g]</b>	<b>M<sub>Puffer</sub> [g]<sup>a</sup></b>	<b>C<sub>Protein</sub> [mg/mL]<sup>b</sup></b>	<b>Aushärtung</b>	<b>Aushärtungs- zeit [min]</b>
<b>1</b>	0,5	0,05	0	Ja	5
<b>2</b>	0,5	0,2	0	Ja	5
<b>3</b>	0,5	0,3	0	Ja	5
<b>4</b>	0,5	0,4	0	Ungenügend	≥ 15
<b>5</b>	0,5	0,5	0	Nein	-
<b>6</b>	0,5	0,3	0,5	Ja	5
<b>7</b>	0,5	0,3	2	Ja	5
<b>8</b>	0,5	0,3	20	Ja	5

[a] 50 mM TRIS-Puffer, [b] Konzentration von Bovine Serum Albumin als Modellprotein

Auf Grund seiner Struktur ist das auf polyurethan-basierte Polymer NOA 81 relativ hydrophob. Dies limitiert den Wasserfluss aus den Einschlüssen in das umgebene Medium. Mit Hilfe der Karl-Fischer Titration konnte dies, anhand von trockenem MTBE, als relativ polares Lösemittel, gezeigt werden.



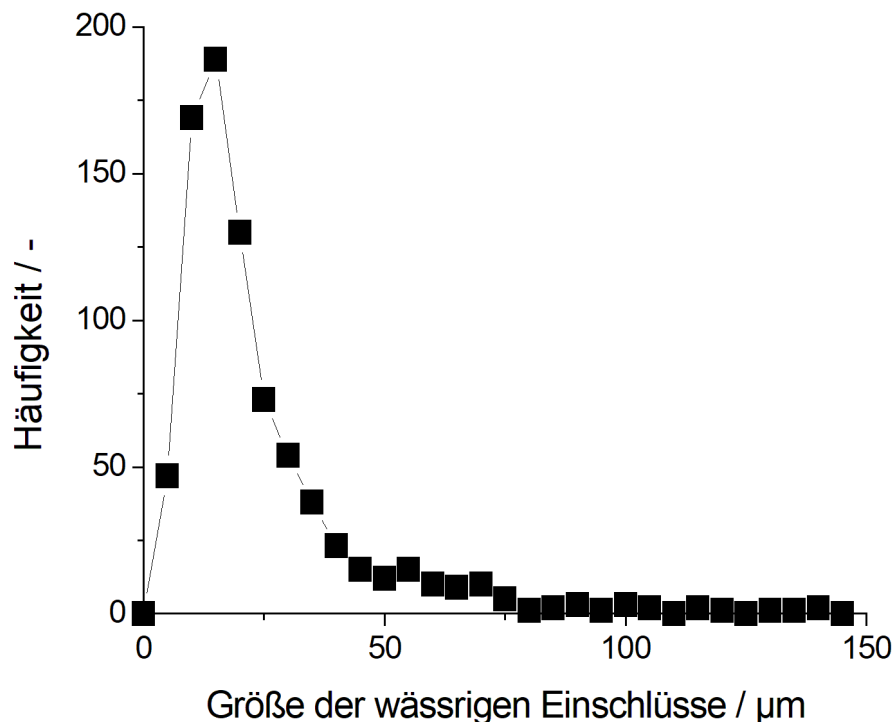
**Abbildung 22: Karl-Fischer Titration über die zeitabhängige Wasserabgabe von PUR ohne Enzym (nicht immobilisiert): ( $\Delta$ ) 9,1% Beladung (1 g Precursor + 0,1 g Wasser), ( $\circ$ ) 16,7% Beladung (1 g Precursor + 0,2 g Wasser) und ( $\square$ ) 23,1% Beladung (1 g Precursor + 0,3 g Wasser)**

Abbildung 22 zeigt, dass ein Großteil des Wassers innerhalb von 375 min (6,25 h) von PUR in das trockene MTBE diffundiert. Wird Wasser mit trockenem MTBE direkt vereint, erfolgt eine Sättigung innerhalb von wenigen Sekunden. Die Abbildung zeigt zudem, dass die Diffusion von Wasser von der Polymermasse und der spezifischen Beladung der Kompartimente mit Wasser abhängt. So zeigen Beladungen von 9,1, 16,7 und 23,1% einen Verlust von ca. 12000, 13000 und 14500 ppm Wasser nach 24 h, welches gleichzeitig die Sättigung von Wasser in MTBE aufzeigt.<sup>[1]</sup> Diesem Ergebnis zu Folge, ist es daher wichtig, dass hydrophobe Lösemittel bevorzugt genutzt werden, wenn der Wasserfluss gering gehalten werden soll. Zusätzlich wurde

<sup>[1]</sup> Uhrich, D.; Jang H.-Y.; Park, J.-B.; von Langermann, J. Characterization and Application of Chemical-resistant Polyurethane-based Enzyme and Whole Cell Compartments. *Journal of Biotechnology* **2018**, eingereicht

in dieser Arbeit auch das äußere Lösemittel vor der Reaktion mit Wasser gesättigt, um einen Konzentrationsgradienten zu vermeiden.

Die Größenverteilung der wässrigen Einschlüsse wird durch die Dauer und Stärke der Durchmischung der Precursor/Wasser-Emulsion direkt beeinflusst. In dieser Arbeit erstrecken sich die Einschlüsse überwiegend zwischen 5-75  $\mu\text{m}$ , mit einigen wenigen größeren Einschlüssen über 100  $\mu\text{m}$  (Abbildung 23).<sup>[2]</sup>



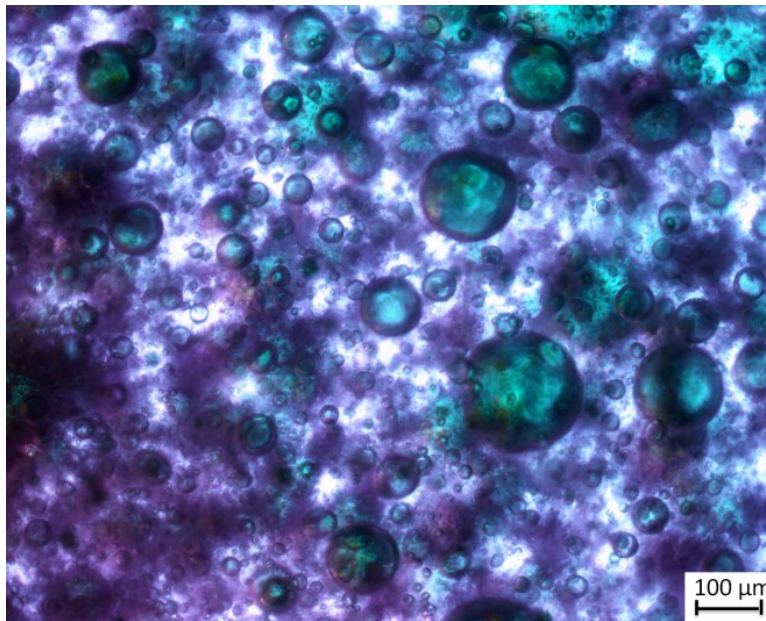
**Abbildung 23: Größenverteilung der wässrigen Einschlüsse innerhalb der PUR-Kompartimente über eine Fläche von ca. 0,1  $\text{mm}^2$**

Größere Einschlüsse beinhalten mehr Enzym und haben somit eine größere katalytische Aktivität, wohingegen die kleineren Domänen eine größere Oberfläche bieten und damit für einen schnellen und effizienten Stoffaustausch sorgen.

<sup>[2]</sup> **Uhrich, D.**; von Langermann J. Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions. *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 2111

### 5.1.3 Visualisierung der Kompartimente

Zur Veranschaulichung der Größenverteilung wurde die wässrige Lösung vor der Polymerisierung mit Bromphenolblau angefärbt und nach der Aushärtung unter einem Lichtmikroskop untersucht. Innerhalb des Polymers befinden sich die wässrigen Sphären zerstreut und willkürlich verteilt (Abbildung 24).



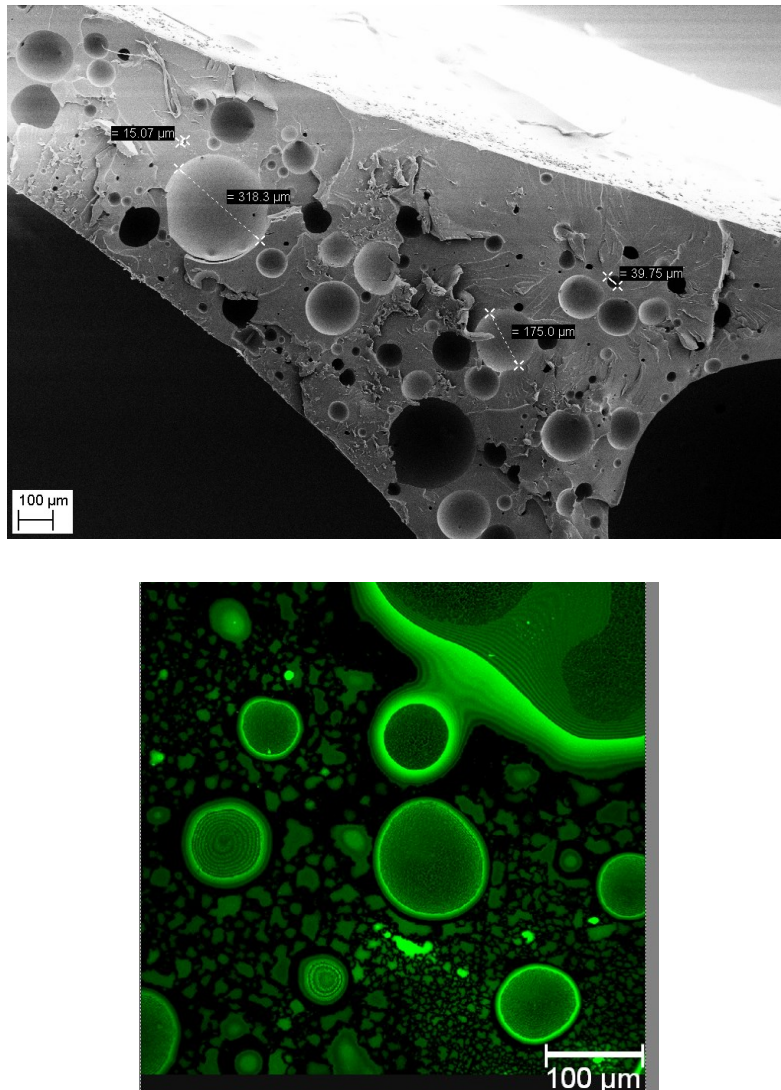
**Abbildung 24: Typische Lichtmikroskopaufnahme der wässrigen Sphären (grün), welche in der Polyurethan Matrix (lila-blau) statistisch verteilt sind**

Zudem finden sich gelegentlich Lufteinschlüsse ohne jegliche katalytische Aktivität, bedingt durch das Durchmischen beim Herstellungsprozess.

Zusätzlich zu den Lichtmikroskopaufnahmen wurden REM und Fluoreszenzaufnahmen der Polymer Matrix angefertigt (Abbildung 25).<sup>[2]</sup>

---

<sup>[2]</sup> **Uhrich, D.**; von Langermann J. Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions. *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 2111



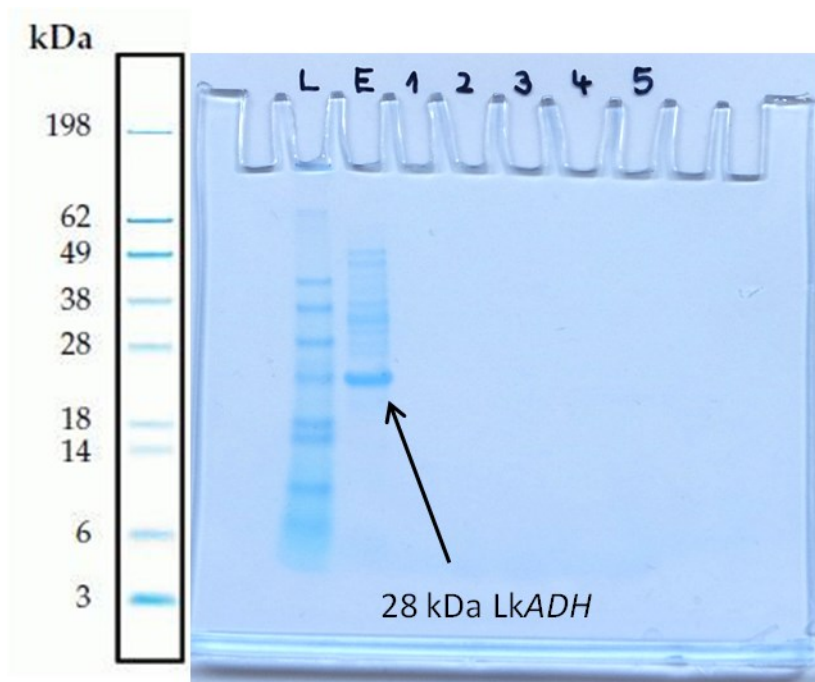
**Abbildung 25: Exemplarische REM und LSCM Aufnahmen eines Querschnitts durch die Polyurethan Matrix**

Beide Aufnahmen zeigen deutlich die kugelartige Form der wässrigen Einschlüsse. Dieses Verhalten geht auf die ursprüngliche (flüssige) Emulsionsmischung zurück, da die Grenzflächenspannung durch ein minimales Oberflächen zu Volumen Verhältnis in dieser Form minimiert wird.

#### **5.1.4 Leachingverhalten der Kompartimente**

Ein wichtiger Parameter für eine erfolgreiche Immobilisierung ist die vollständige Zurückhaltung des Katalysators in dem Polymer, um einen Verlust der katalytischen

Aktivität während der Reaktion zu vermeiden. Zudem kann bei vollständiger Retention der Katalysator wiederholt eingesetzt werden. Der Abbildung 26 zu entnehmen, zeigen die Kompartimente kein Leaching. Die Gelelektrophorese wurde mit dem Modellprotein *LkADH* durchgeführt, wobei über die Zeit Proben aus einer Lösung von Phosphatpuffer mit *LkADH*-PUR Kompartimenten bzw. einer Lösung aus MTBE mit *LkADH*-PUR Kompartimenten entnommen wurden. Bei beiden Experimenten konnte auch nach 3 h kein Leaching des Katalysators beobachtet werden, da das Gel keinerlei Markierung für die Probenreihen 1-5 zeigte.



**Abbildung 26: Gelelektrophorese von *LkADH* in Phosphatpuffer; (L) DNA-Leiter, (E) *LkADH*, (1-5) Probenreihen nach 0, 10, 30, 60 und 180 min**

Der Proteintransport wird vor allem durch das relativ dichte und hydrophobe Polymernetzwerk, im Vergleich zur Größe und Polarität des Enzyms, verhindert. Jedoch ist zu beachten, dass bei den Experimenten durchgeführt in MTBE eine Anreicherung des Proteins im Lösemittel nahezu ausgeschlossen ist, da die Löslichkeit des Proteins in MTBE nur sehr gering ist.

### 5.1.5 Chemische und physikalische Stabilität der Kompartimente

Die Polyurethan-Kompartimente sind dafür ausgelegt, Reaktionen in organischen Lösemitteln zu katalysieren, um eine hohe Löslichkeit für hydrophobe Verbindungen zu garantieren. Zudem müssen sie über einen längeren Zeitraum in diesen Lösemitteln stabil bleiben und wenn möglich wiederholt eingesetzt werden. Daher wurde ein Lösemittelscreening von unterschiedlichen organischen Lösemitteln unterschiedlicher Polarität durchgeführt und die Kompartimente auf ihre Säure- und Basenbeständigkeit getestet (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Lösemittel-, Basen- und Säurenscreening der PUR-Kompartimente bei 22 °C nach 48 h; 200 mg PUR-Kompartimente in 5 mL Lösemittel**

Lösemittel	PUR-Kompartimente	
	Quellen	Auflösen
<b>Ethanol</b>	nein	nein
<b><i>n</i>-Butanol</b>	nein	nein
<b>Aceton</b>	nein	nein
<b>Wasser</b>	nein	nein
<b>MTBE</b>	nein	nein
<b>Diethylether</b>	gering	nein
<b>Toluol</b>	gering	nein
<b>Dimethylsulfoxid</b>	stark	nein
<b>Tetrahydrofuran</b>	stark	nein
<b>1 M HCl</b>	nein	nein
<b>5 M HCl</b>	nein	nein
<b>1 M NaOH</b>	nein	ja
<b>5 M NaOH</b>	nein	ja

Die PUR-Kompartimente lösen sich in keinem der getesteten organischen Lösemittel auf. Einige Lösemittel können dagegen während der Anwendung in das Polymernetzwerk hineindiffundieren und ein Quellen verursachen. Das

Quellverhalten spielt gerade im Hinblick auf den Stofftransport eine wichtige Rolle. Quillt das Polymer sehr stark, werden die Sphären, in denen das Enzym eingeschlossen ist, größer und können aufbrechen. Dagegen ermöglicht ein Quellen eine schnellere Diffusion von Substrat und Produkt und demzufolge eine schnellere Einstellung des Endumsatzes. Jedoch können große Poren auch das Auswaschen von Verbindungen aus dem Immobilisat herbeiführen. Soll dies vermieden werden, wird ein Lösemittel, bei dem das Polymer weniger quillt, bevorzugt. Die PUR-Kompartimente zeigen generell ein geringeres Quellverhalten und quellen nur in den polar-aprotischen Lösemitteln Dimethylsulfoxid und Tetrahydrofuran und zeigen keinerlei Quellen in Lösemitteln wie MTBE, *n*-Butanol, Ethanol oder Aceton. Weiterhin weisen die Kompartimente eine große Toleranz gegenüber Säuren auf, hydrolysieren jedoch in starken Basen, was auf die grundlegende Polymerstruktur des Polyurethans zurückzuführen ist.

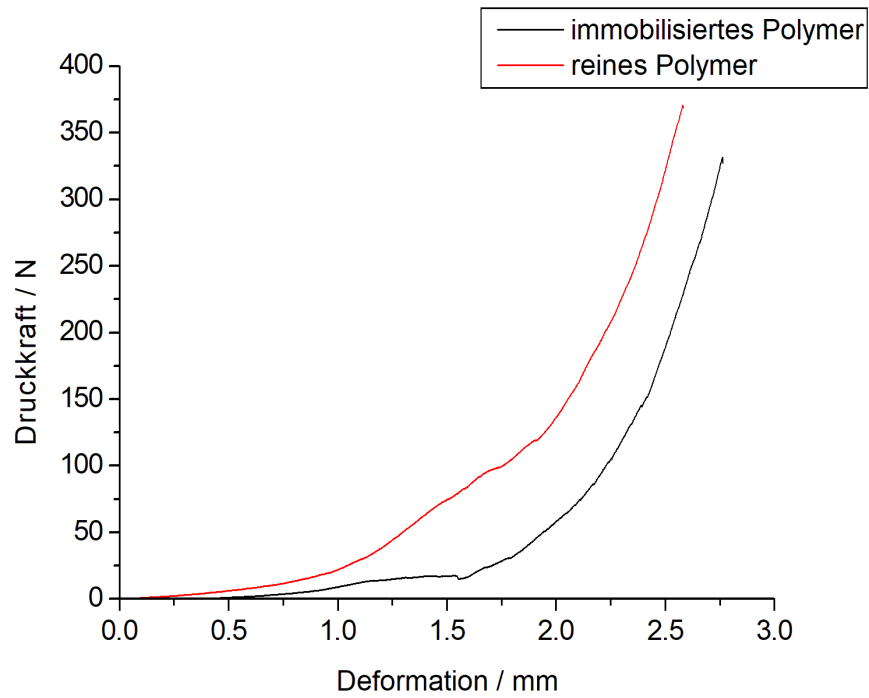
Neben der chemischen Resistenz sind auch die mechanischen Eigenschaften, insbesondere bei präparativen Anwendungen, von Bedeutung. Hierzu wurde das Druck- und Zugverhalten der Kompartimente analysiert, welche sich auf das Rührverhalten und die Flexibilität der Kompartimente auswirkt.<sup>[1]</sup> Speziell ein starker Abrieb des Polymers sollte vermieden werden, um dieses über einen längeren Zeitraum einsetzen zu können. Abbildung 27 zeigt das unterschiedliche Druck- und Zugverhalten von immobilisierten Polymer, also NOA 81 in dem 400 µL Puffer immobilisiert wurden, (schwarze Kurven) und reinem, unkompartimentierten Polymer (rote Kurven). Hierbei ist auffällig, dass durch eine Immobilisierung die mechanischen Eigenschaften nur geringfügig verändert werden. Die maximale Druckkraft wurde um 12,5 % von 400 N (reines Polymer) auf ca. 350 N (immobilisiertes Polymer) verringert. Die Werte entsprechen 24 MPa für beladene und 20 MPa für unbeladene Kompartimente und ähneln Werten von herkömmlichen Polyurethanschäumen.<sup>126</sup> Geringe Unregelmäßigkeiten in der Kurve können beobachtet werden, welche durch die wässrigen Einschlüsse entstehen, die unter der Belastung aufbrechen.

---

<sup>[1]</sup> **Uhrich, D.**; Jang H.-Y.; Park, J.-B.; von Langermann, J. Characterization and Application of Chemical-resistant Polyurethane-based Enzyme and Whole Cell Compartments. *Journal of Biotechnology* **2018**, eingereicht



(a)



(b)

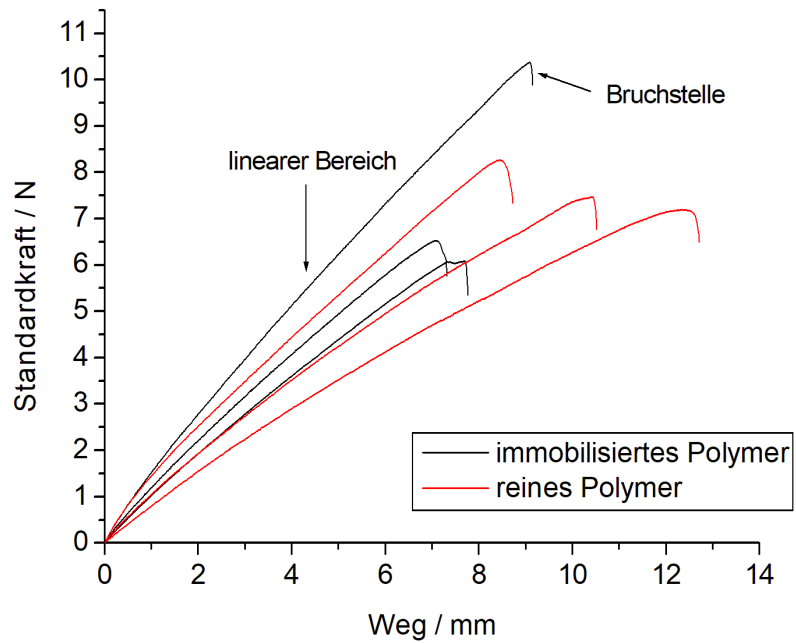


Abbildung 27: (a) Druck- und (b) Zugverhalten der PUR-Kompartimente in immobilisierter (1 g NOA 81 mit 400  $\mu$ L Puffer) und reiner Form (1 g NOA 81 ohne Puffer)

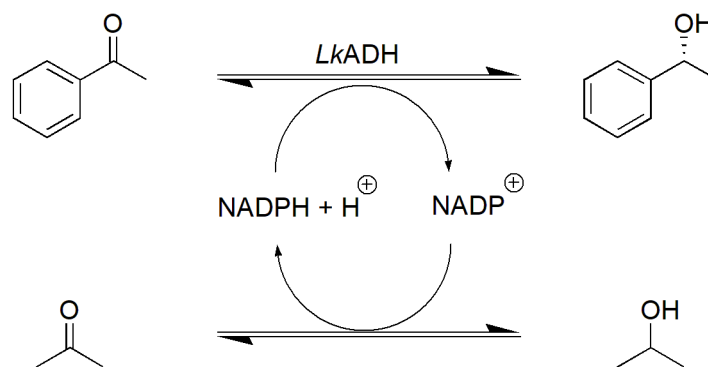
Ähnlich zu den Druckversuchen ist bei den Zugversuchen der Unterschied zwischen den beladenen und unbeladenen Kompartimenten gering. Die Polymere wurden bei einer ähnlichen Kraft auseinandergerissen und zeigen vergleichbare Zugtragfähigkeiten. Die immobilisierten Kompartimente reißen bei 3,4 MPa ( $\pm 0,9$ ) und das unbeladene Polymer bei 3,5 MPa ( $\pm 1,4$ ). Die Werte sind deutlich höher als vergleichbare Werte von beispielsweise Hydrogelen, weshalb die Polyurethanpräparationen eine höhere Stabilität aufweisen.<sup>127</sup>

Zusammenfassend zeigt sich, dass eine Immobilisierung nur eine geringe Auswirkung auf die mechanischen Eigenschaften des Polymers hat. Im Gegensatz zu konventionellen Silikon-basierten Kompartimenten oder Sol-Gelen, sind PUR-Kompartimente stabiler und flexibler und eignen sich daher besser für präparative Anwendungen.

## 5.2 Reaktionen mit immobilisierter Alkoholdehydrogenase

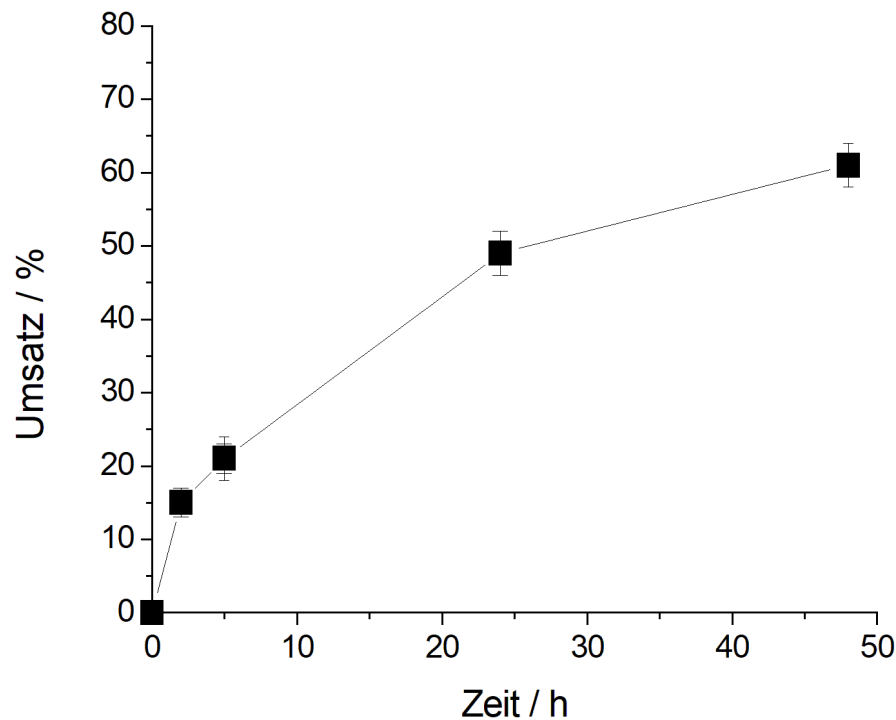
### 5.2.1 Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von *LkADH*

Die Anwendbarkeit der immobilisierten PUR-Kompartimente wurde im Detail für die Reduktion von prochiralen Ketonen mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase *Lactobacillus kefir*, *LkADH* überprüft. Dazu wurde zunächst die Modellreaktion von Acetophenon zu (*R*)-1-Phenylethanol, in einer Alkoholdehydrogenase-katalysierten Reaktion, gewählt (Abbildung 28). Die Cofaktorregenerierung erfolgt über *iso*-Propanol, welches durch die Umsetzung von  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  zu Aceton oxidiert wird.



**Abbildung 28: Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe immobilisierter *LkADH***

Für die Immobilisierung wurde bei Raumtemperatur 400  $\mu\text{L}$  Enzymlösung, bestehend aus 5 mg/mL *LkADH* und 1 mM NADP gelöst in 50 mM Puffer, in 1g NOA 81 gut vermischt und unter UV Licht ausgehärtet. Die geschnittenen PUR-Kompartimente wurden anschließend in 5 mL MTBE gegeben und mit 10 mM Acetophenon und 100 mM *iso*-Propanol versetzt. Die Reaktion wurde bei 30 °C für 48 h gut gerührt (Abbildung 29).



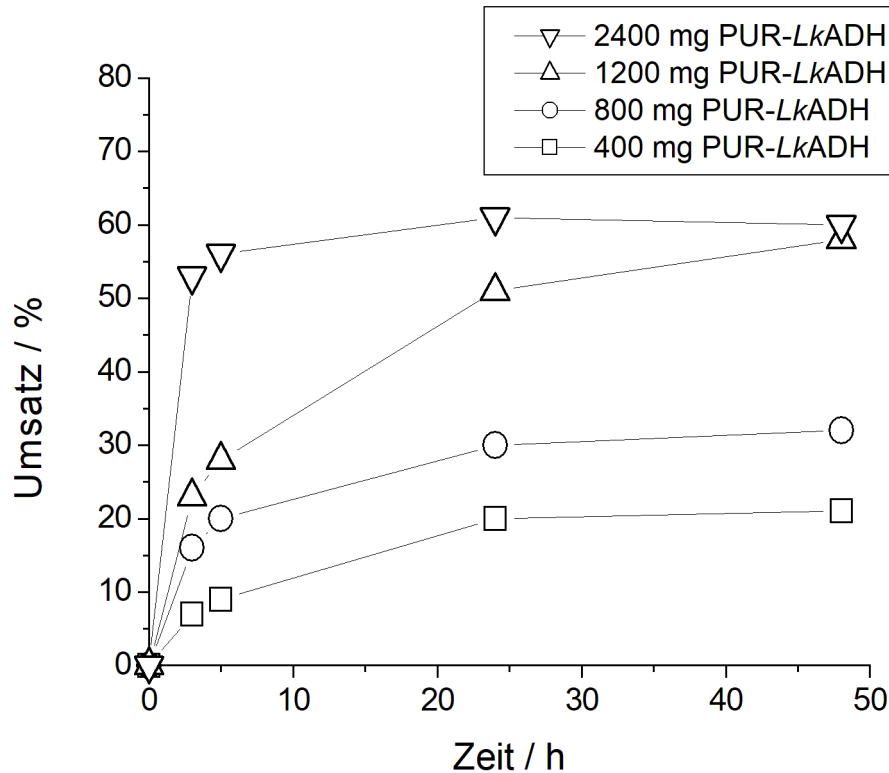
**Abbildung 29: Umsatz von Acetophenon zu Phenylethanol mit immobilisierter *LkADH* bei 30 °C; 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

Nach dem Aushärten der Enzym-Polymerlösung erfolgt der Transport der Reaktanden über Diffusion, wobei Acetophenon erfolgreich zu Phenylethanol umgesetzt werden konnte und sich in der äußeren MTBE Phase anreichert. Die Endumsätze der Reaktion belaufen sich entsprechend des Gleichgewichtsumsatzes nach 48 h bei ca. 61%.

### 5.2.2 Einflussgrößen auf die Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von *LkADH*

Einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit und den Umsatz einer Reaktion hat selbstverständlich die Menge an eingesetztem Katalysator. Bei der standardmäßigen Herstellung der Kompartimente (siehe Kapitel 5.2.1) entstehen nach dem Aushärten ca. 1200 mg PUR-*LkADH* Polymermasse. Werden diese 1200 mg in der Reaktion

von Acetophenon zu Phenylethanol eingesetzt, werden nach 48 h die bereits beschriebenen Umsätze von ca. 60 -65% erreicht. Abbildung 30 zeigt Umsatzkurven bei der gleichen Reaktion, aber mit unterschiedlicher Katalysatormenge.

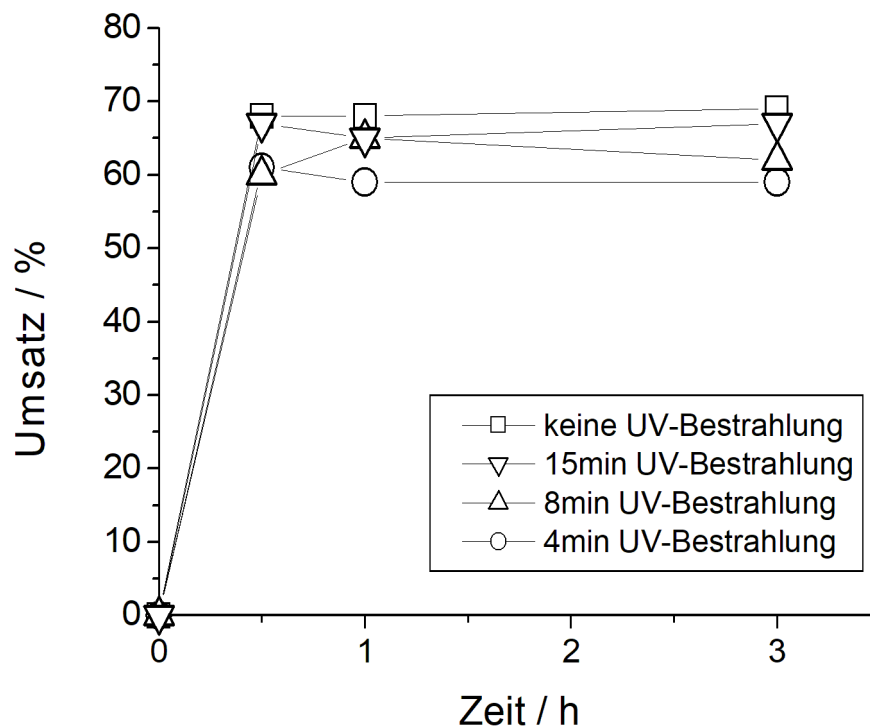


**Abbildung 30: Einfluss der Katalysatormenge auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

Wie erwartet nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion zu je mehr PUR-LkADH Katalysator verwendet wird. So kann bei 1200 mg PUR-LkADH bereits nach 3 h ca. 30% Acetophenon umgesetzt werden, wohingegen bei nur 400 mg 7% und bei 800 mg ca. 16% umgesetzt werden kann. Werden die 1200 mg nochmals verdoppelt, ist bereits nach 3 h der Umsatz vollständig. Weiterhin wird deutlich, dass sowohl bei 1200 mg Katalysator, als auch bei 2400 mg PUR-LkADH die Umsätze für die Gesamtreaktion identisch sind und nur die Reaktionsgeschwindigkeit steigt. Für die Reaktionen mit 800 und 400 mg PUR-LkADH wird deutlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten rasch abnehmen und kein vollständiger Umsatz erzeugt

werden konnte. Dies lässt sich vermutlich auf Diffusionslimitierungen und die rasche Deaktivierung des Enzyms zurückführen (siehe auch Kapitel 5.2.6).

Während der Kompartimentierung wird das Enzym, bedingt durch den Aushärtungsprozess, über einen Zeitraum von ca. 5 min mit UV-Licht ausgesetzt. Die Bestrahlung mit UV-Licht ist eine umweltfreundliche, nicht thermische Technologie, die vielseitig vor allem in der Lebensmittelindustrie zur Desinfektion oder Entgiftung eingesetzt wird.<sup>128</sup> Jedoch kann UV-Bestrahlung sich negativ auf die Enzymaktivität auswirken, oder das Enzym sogar ganz deaktivieren, weshalb diese Methode auch zur Sterilisierung von Mikroorganismen in Laboren eingesetzt wird. Durch die Oxidation des Proteins während der Bestrahlung kann die dreidimensionale Struktur des Enzyms so weit verändert werden, dass das Enzym katalytisch deaktiviert wird.<sup>128</sup>



**Abbildung 31: Auswirkung der UV-Bestrahlung auf die Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; 5 mg/mL LkADH gelöst in 400 µL Phosphatpuffer (nicht kompartimentiert), 10 mM Acetophenon, 100 mM iso-Propanol**

Exemplarisch wurde die Auswirkung der UV Bestrahlung auf die *LkADH* katalysierte Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol getestet. Hierzu wurde das Enzym nicht immobilisiert, sondern in Phosphatpuffer gelöst und anschließend mit allen anderen Reaktanden (siehe Kapitel 5.2.1) zu 5 mL MTBE gegeben und nach Zugabe des Substrates für 3 h geschüttelt. Die Reaktion wurde viermal durchgeführt, wobei die Reaktionslösung vor Zugabe des Substrates für eine unterschiedlich lange Zeit mit UV-Licht bestrahlt wurde. Abbildung 31 zeigt die verschiedenen Umsatzkurven für die vier Reaktionen, wobei die Lösung gar nicht, für 4, 8 und 15 min bestrahlt wurde. Es wird schnell ersichtlich, dass die UV-Bestrahlung keinen Einfluss und damit keine Deaktivierung des Enzyms hervorruft, da alle Endumsätze ähnlich sind. Bei keiner UV-Bestrahlung konnte ein maximaler Umsatz von 69%, bei 4 min 59%, bei 8 min 62% und bei 15 min Bestrahlung 67% erzeugt werden. Die Aussage kann natürlich nicht auf alle Enzyme bezogen werden, da diese unterschiedlich aufgebaut und robust gegen UV-Bestrahlung sind. Es dient jedoch der Verallgemeinerung, dass die Polyurethan-basierte Immobilisierungsmethode mit NOA 81 durchaus mild ist. Erwähnenswert ist weiterhin, dass im Vergleich zur Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit immobilisierter *LkADH* bei der gleichen Reaktion ohne immobilisierte *LkADH* die Umsätze der Reaktion um ca. 10% gesteigert werden können (vgl. Abbildung 29). Ursache dafür sind Diffusionslimitierungen, die durch die Kompartimentierung des Enzyms entstehen. Dies wird im Kapitel 5.2.6 genauer erläutert.

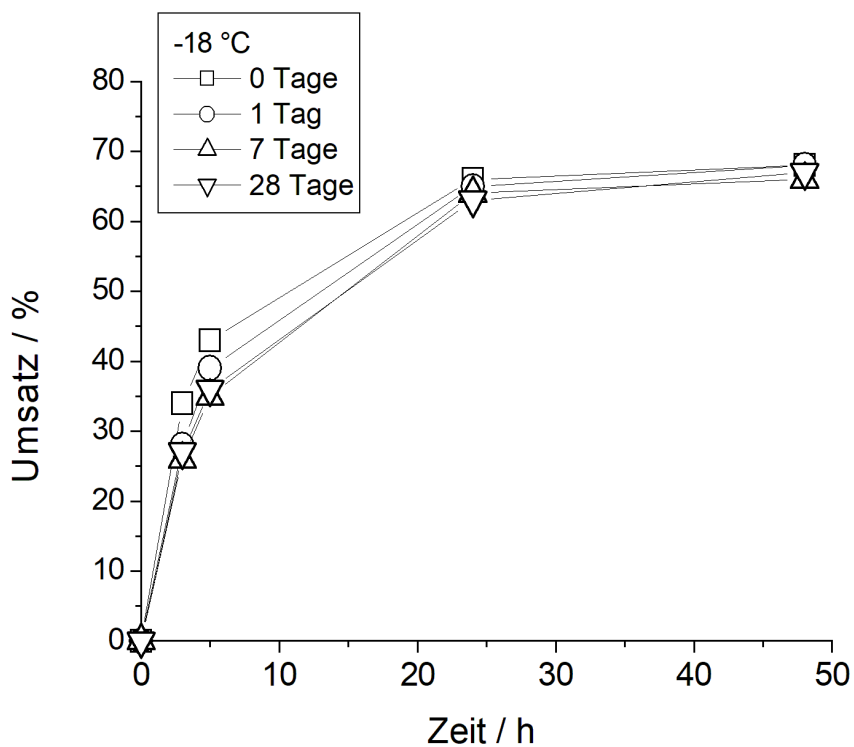
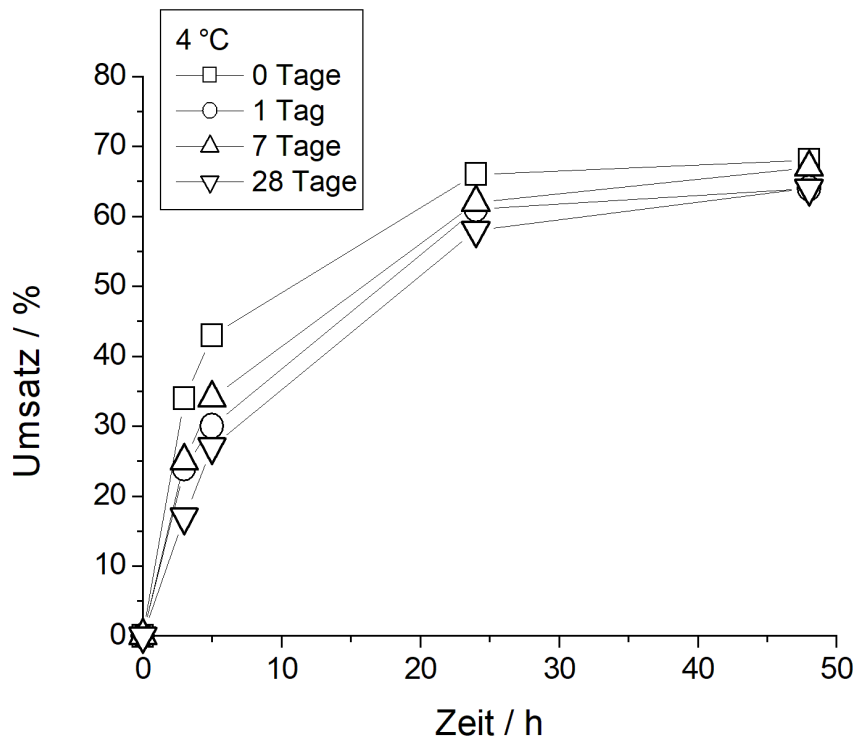
### **5.2.3 Stabilität und Recyclbarkeit der *LkADH*-PUR Kompartimente der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol**

Um die ausreichende Eignung der Immobilisate auch nach längerer Lagerzeit zu gewährleisten, wurde die Stabilität der PUR-Enzym-Kompartimente untersucht.<sup>[2]</sup> Für die Messungen wurden die Kompartimente, nach einer bestimmten Lagerzeit, für die Katalyse der Reaktion von Acetophenon mit *LkADH* (siehe Kapitel 5.2.1) eingesetzt. Die Kompartimente wurden dazu jeweils bei 22 °C, 4 °C und bei -18 °C gelagert und

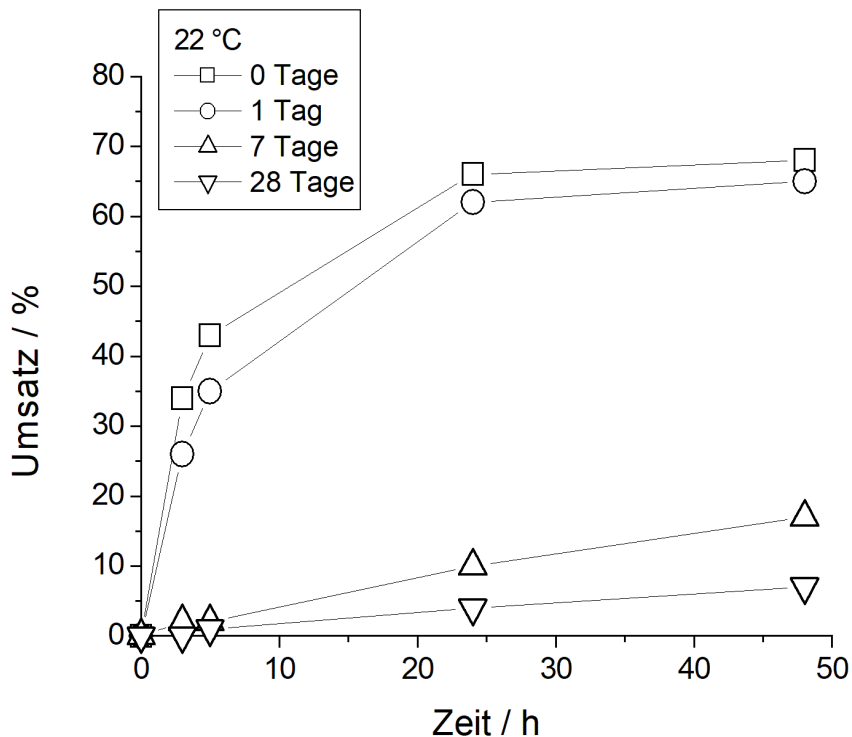
---

<sup>[2]</sup> **Uhrich, D.**; von Langermann J. Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions. *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 2111

in anschließenden festgelegten Zeitintervallen (0 Tage, 1 Tag, 7 Tage und 28 Tage) für die Reaktionen eingesetzt. Klassische spektrometrische Messungen waren nicht möglich, da keine Proben aus den festen Kompartimenten entnommen werden konnten.







**Abbildung 32: Untersuchungen zur Stabilität der PUR-Kompartimente nach 0, 1, 7 und 28 Tagen Lagerzeit bei unterschiedlichen Temperaturen; 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

Wie in Abbildung 32 (Graph 1 bei 4 °C) zu erkennen, ist bei einer Lagerung bei 4 °C nur wenig Aktivitätsverlust erkennbar (<20% nach 14 Tagen). Dies ist an der etwas geringeren Anfangsgeschwindigkeit der Kurven sichtbar. Allerdings ist die Aktivität ausreichend, um auch mit 28 Tage alten Proben die Reaktion bis zur Gleichgewichtseinstellung zu katalysieren. Noch niedrigere Lagertemperaturen von -18 °C verbessern die Enzymstabilität noch weiter, sodass nur geringfügig die Enzymaktivität für 1, 7 und 28 Tage alte Proben sank (Abbildung 32, Graph 2 bei -18 °C). Anders ist dies bei einer Lagerung bei Raumtemperatur (Abbildung 32, Graph 3 bei 22 °C). Während eine 1 Tag alte Probe noch ähnliche Enzymaktivitäten aufwies, sank diese nach 7 bzw. 28 Tagen drastisch, sodass auch die Endumsätze stark sanken. Die Probe wies zudem nach einigen Tagen einen fauligen Geruch auf, der weitere Anhaltspunkte auf ein Keimwachstum gibt. Zusammenfassend ist erkennbar, dass die kompartimentierte *LkADH* bei niedrigen Temperaturen gut

gelagert werden konnte und keine bzw. geringe Aktivität verloren ging. Bei Lagerung bei Raumtemperatur verliert die ADH schnell ihre Aktivität.

Die Ergebnisse gehen einher, für eine nicht immobilisierte Puffer-*LkADH* Lösung, welche unter den gleichen Bedingungen gelagert wurde (Tabelle 5). Auch hier sanken die Enzymaktivitäten bei einer kühlen Lagerung kaum, währenddessen bei einer Lagerung bei Raumtemperatur das Enzym langsam denaturierte.

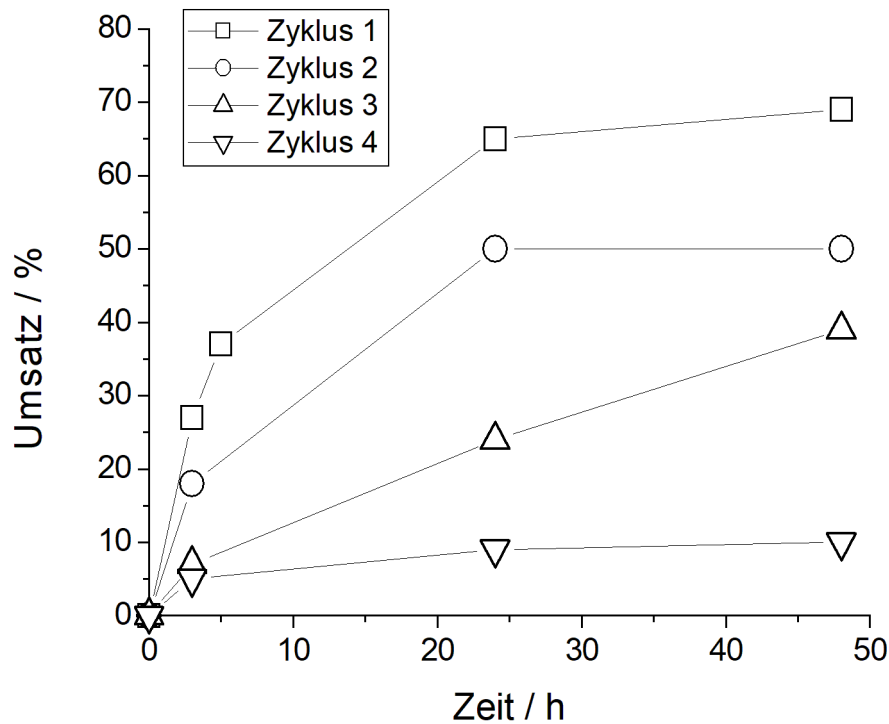
**Tabelle 5: Untersuchungen zur Stabilität von *LkADH*-PUR-Kompartimente und nicht immobilisierter *LkADH* nach jeweils 0, 1, 7 und 28 Tagen Lagerzeit bei unterschiedlichen Temperaturen; 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

Lagerzeit	Temperatur	Umsatz [%] <i>LkADH</i> -PUR Kompartimente	Umsatz [%] nicht immobilisierte <i>LkADH</i>
<b>0 Tage</b>	22 °C	68	84
<b>1 Tag</b>	4 °C	67	84
	-18 °C	67	84
	22 °C	65	81
<b>7 Tage</b>	4 °C	64	86
	-18 °C	68	84
	22 °C	7	13
<b>28 Tage</b>	4 °C	64	87
	-18 °C	66	87
	22 °C	17	0

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass durch eine Immobilisierung das Enzym nicht negativ beeinflusst wird und durch das Aushärten kaum bzw. keine störenden Nebenprodukte gebildet werden.

Für praktische und größere Anwendungen ist neben der gewährleisteten Stabilität des Katalysators aber auch eine wiederholte Nutzung von Interesse. Um die

Rezyklierbarkeit der *LkADH*-PUR Kompartimente zu untersuchen, wurden die Kompartimente unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie in Kapitel 5.2.1 beschrieben hergestellt und in einem ersten Katalyse Zyklus eingesetzt (Abbildung 33).



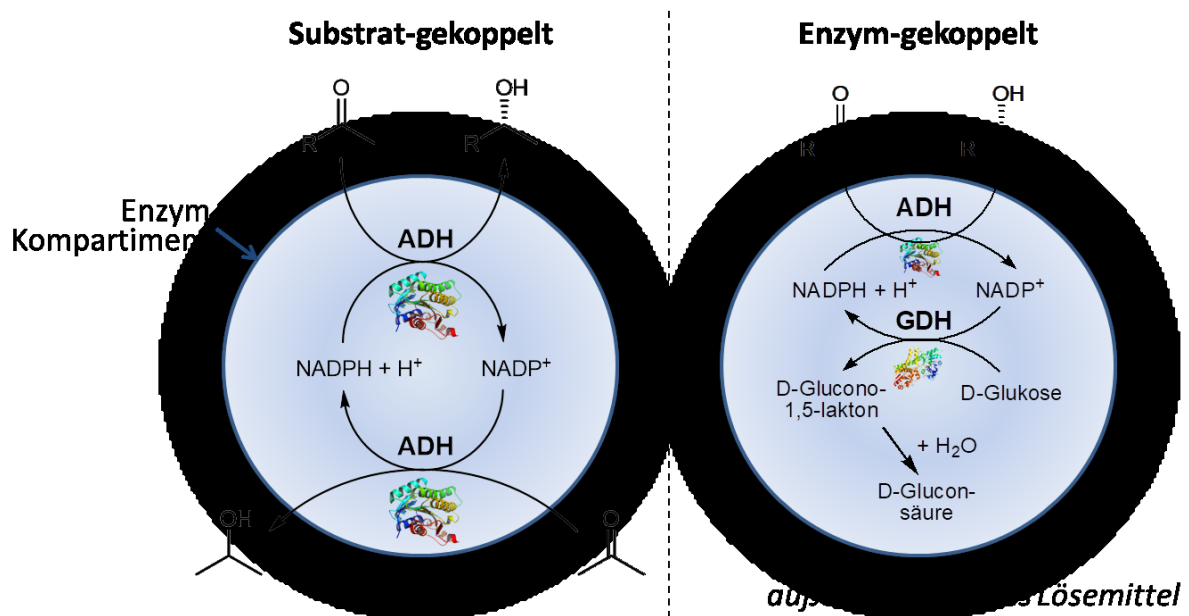
**Abbildung 33: Rezyklierbarkeit der *LkADH*-PUR Kompartimente bei 30 °C in vier Zyklen; 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

Nach einem ersten Katalysezyklus wurden die Kompartimente nach 48 h aus der Reaktionslösung gefiltert und anschließend in frisches MTBE zusammen mit Acetophenon und *iso*-Propanol gegeben und in einem neuen Katalysezyklus eingesetzt. Das gleiche Verfahren wurde so insgesamt für vier Zyklen durchgeführt. Aus den Reaktionskurven wird ersichtlich, dass eine wiederholte Nutzung des kompartimentierten Katalysators möglich ist, aber die Enzymaktivität und somit auch Endumsätze zu Phenylethanol sinken. So sinkt nach vier Zyklen der Umsatz der Reaktion von 69% auf 10%. Die Werte konnten in Wiederholungsexperimenten bestätigt werden. Es wird deutlich, dass die Ergebnisse mit den Ergebnissen aus den Stabilitätstests korrelieren. Da jeder Zyklus 48 h dauert wurden die Kompartimente

nach vier Zyklen für insgesamt 192 h bei 30 °C genutzt und verloren somit einen Großteil der Aktivität. Bei Reaktionen mit kürzerer Reaktionszeit, sollte daher der wiederholte Einsatz der *LkADH*-Kompartimente besser geeignet sein. Außerdem wären, thermostabilere Enzyme wie beispielsweise Lipasen oder Esterasen für eine wiederholte Nutzung besser geeignet.

#### 5.2.4 Unterschiedliche Cofaktorregenerierungssysteme der Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit Hilfe von *LkADH*

Da Alkoholdehydrogenasen cofaktorabhängig sind, muss NADPH/NADP<sup>+</sup> zurückgewonnen werden. Die Rückgewinnung kann hierbei über eine Substratgekoppelte oder eine Enzymgekoppelte Cofaktorregenerierung erfolgen (Abbildung 34).



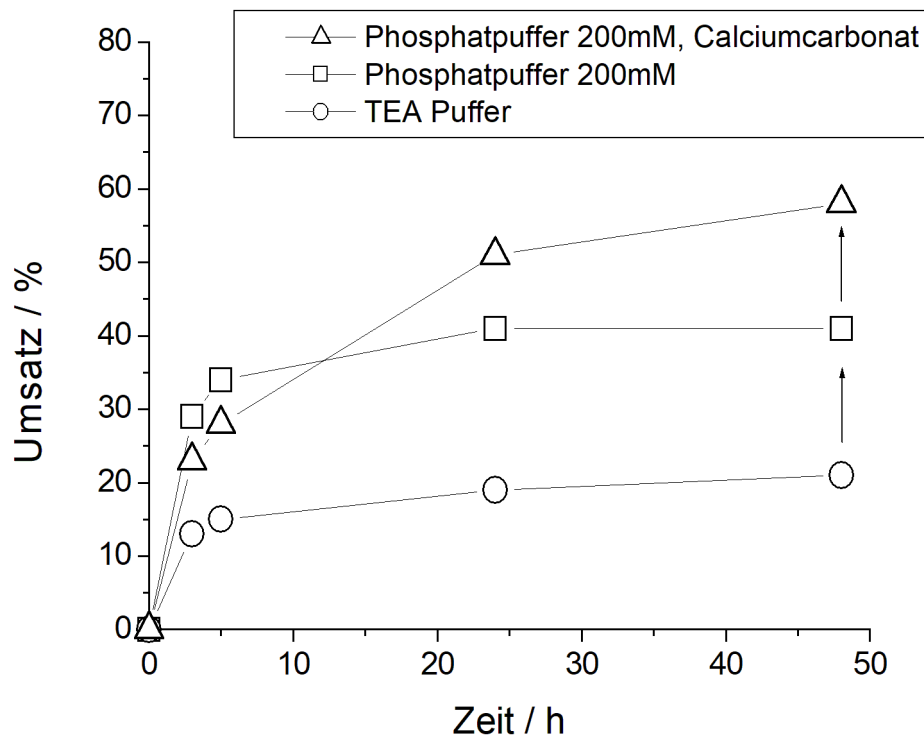
**Abbildung 34: Umsetzung von Ketonen zu Alkoholen mit Hilfe kompartimentierter *LkADH* und unterschiedlicher Cofaktorregenerierungssysteme**

Die Substratgekoppelte Cofaktorregenerierung erfolgt über *iso*-Propanol, welches durch die Umsetzung von NADP<sup>+</sup> zu NADPH + H<sup>+</sup> zu Aceton oxidiert wird (siehe

Kapitel 5.2.1). Bei der Enzym-gekoppelten Cofaktorregenerierung wird mit Hilfe der Glukosedehydrogenase (GDH), welche D-Glukose irreversibel zu D-Glucono-1,5-lacton bzw. D-Gluconsäure umsetzt, der Cofaktor regeneriert.<sup>39,129</sup> Die Cofaktorregenerierung findet bei beiden Systemen innerhalb der wässrigen Einschlüsse statt, während sich außen im Lösemittel das Endprodukt (chiraler Alkohol) anreichert. Bei der Substrat-gekoppelten Alternative sammelt sich auch Aceton in der äußeren Phase an und kann ohne Negativeinflüsse auf das Enzym entfernt werden (z.B. Verdampfen). Im Gegensatz dazu verbleibt D-Glukose, D-Glucono-1,5-lacton bzw. D-Gluconsäure kompartimentiert im Polymer.

#### ***5.2.4.1 Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit GDH für die Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit LkADH***

Bei der Cofaktorregenerierung mit GDH wurden in 400 µL 50 mM TEA Puffer 5 mg/mL LkADH, 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose und 1 mM NADP gelöst, mit 1 g NOA 81 gut vermischt und ausgehärtet. Die geschnittenen PUR-Kompartimente wurden anschließend in 5 mL MTBE gegeben, mit 10 mM Acetophenon versetzt und bei 30 °C für 48 h geschüttelt. Da nach 48 h der Endumsatz von Phenylethanol nur bei ca. 21% lag, wurden verschiedene Einflussgrößen der Reaktion analysiert (Abbildung 35). Glukose wird während der Reaktion in Glukonsäure überführt und dementsprechend besteht die Möglichkeit, dass der pH Wert innerhalb der Kompartimente zu sauer wird, was wiederum eine mögliche Deaktivierung der ADH mit sich ziehen kann. Daher wurde anstatt eines 50 mM TEA Puffers ein höher konzentrierter 200 mM Phosphatpuffer für die Immobilisierung verwendet.



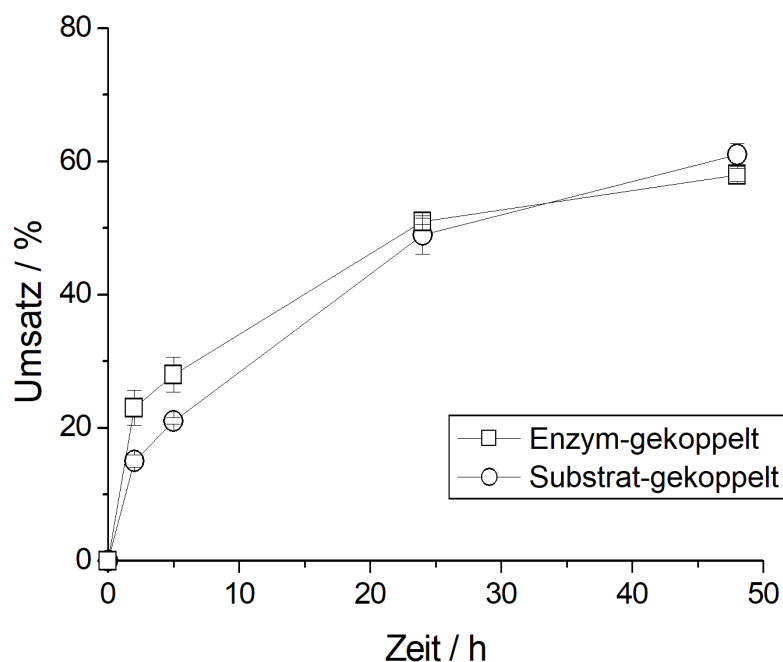
**Abbildung 35: Umsatzkurven von Acetophenon zu Phenylethanol mittels Enzymgekoppelter Cofaktorregenerierung bei 30 °C; 5 mg/mL LkADH, 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose; 10 mM Acetophenon**

Wie aus Abbildung 35 zu entnehmen, konnte der Umsatz der Reaktion auf diese Weise um 20% gesteigert werden (Endumsatz 41%). Bei zusätzlicher Verwendung von 100 mM Calciumcarbonat, welches ebenfalls mit immobilisiert wird, kann der Umsatz sogar noch um weitere 17% und somit bis auf 58% gesteigert werden. Durch den Einsatz von einer höheren Pufferkonzentration und Calciumcarbonat als Säurefänger kann somit die Deaktivierung der Alkoholdehydrogenase verhindert werden. Zusätzlich konnte die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion deutlich angehoben werden. Ein weiteres Erhöhen der Pufferkonzentration auf 500 mM verschlechtert die Umsätze wiederum. Hierbei ist die Ionenstärke des Puffers vermutlich so hoch, sodass innerhalb der Kompartimente negative Interaktionen mit dem Biokatalysator stattfinden.

Vergleicht man nun beide Cofaktorregenerierungssysteme wird ersichtlich, dass beide Konzepte ähnliche Reaktionsgeschwindigkeiten und Umsätze erzeugen

(Abbildung 36).<sup>[2]</sup> Das macht deutlich, dass sowohl das Enzym, als auch stattfindende Reaktionen bei der Cofaktorregenerierung nicht durch die Polymerisierungsreaktion beeinflusst werden und vollständig kompartimentiert in den Einschlüssen vorliegen. Nach dem Aushärten erfolgt der Stofftransport ausschließlich über Diffusion in die wässrigen Einschlüsse und wieder hinaus. Somit ist die ADH-Reaktivität nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion, sondern viel mehr die Diffusion der Reaktanden. Höhere Konzentration von Acetophenon wurden nicht getestet, weshalb nicht festgestellt werden konnte, ab welcher Konzentration die Cofaktorregenerierung im Falle der Enzym-gekoppelten Regenerierung stoppt (Glukose Vorrat erschöpft) und somit die ganze Reaktion zum Erliegen kommt.

Auf Grund der Einfachheit und Rezyklierbarkeit ist die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit *iso*-Propanol zu bevorzugen.



**Abbildung 36: Umsatzkurven der Enzym- und Substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung der Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol bei 30 °C; Enzym-gekoppelt: 5 mg/mL *LkADH*, 5 mg/mL *GDH*, 100 mM Glukose, 100 mM Calciumcarbonat, 10 mM Acetophenon; Substrat-gekoppelt: 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Acetophenon, 100 mM *iso*-Propanol**

<sup>[2]</sup> **Uhrich, D.;** von Langermann J. Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions. *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 2111

### 5.2.5 Reaktionen der Brom- und Chlorderivate von Acetophenon

Die *LkADH* katalysiert nicht nur die Umsetzung von Acetophenon zu Phenylethanol, sondern hat ein weitaus größeres Substratspektrum. Dazu gehören aromatische, cyclische, polycyclische sowie aliphatische Ketone. In dieser Arbeit wurden die monosubstituierten Brom- und Chlorderivate in *ortho*-, *meta*- und *para*-Position mit immobilisierter *LkADH* in MTBE umgesetzt. Für die Cofaktorregenerierung wurde sowohl die Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit *iso*-Propanol, als auch die Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung mit GDH getestet. Tabelle 6 zeigt die Endumsätze der Zielverbindungen.

**Tabelle 6: Endumsätze der Brom- und Chlorderivate des Acetophenons mit unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen bei 30 °C; Enzym-gekoppelt: 5 mg/mL *LkADH*, 5 mg/mL GDH, 100 mM Glukose, 100 mM Calciumcarbonat, 10 mM Substrat; Substrat-gekoppelt: 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Substrat, 100 mM *iso*-Propanol**

Derivat	Umsatz [%]	Umsatz [%]
	Substrat-gekoppelte Cofaktorregenerierung	Enzym-gekoppelte Cofaktorregenerierung
<i>ortho</i> -Bromacetophenon	0	0
<i>meta</i> -Bromacetophenon	9 (±0,6)	9 (±2,3)
<i>para</i> -Bromacetophenon	43 (±2)	40 (±2,3)
<i>ortho</i> -Chloracetophenon	0	0
<i>meta</i> -Chloracetophenon	18 (±2,3)	19 (±1,5)
<i>para</i> -Chloracetophenon	46 (±0,8)	47 (±0,6)

Die Umsätze bei beiden Cofaktorregenerierungssysteme ähneln sich wie beim Substrat Acetophenon sehr. Sowohl die Brom- also auch Chlor-substituierten Derivate in *ortho*-Position konnten bei beiden Reaktionen nicht umgesetzt werden. Substitutionen in alpha-Position machen die Bindung im aktiven Zentrum unmöglich



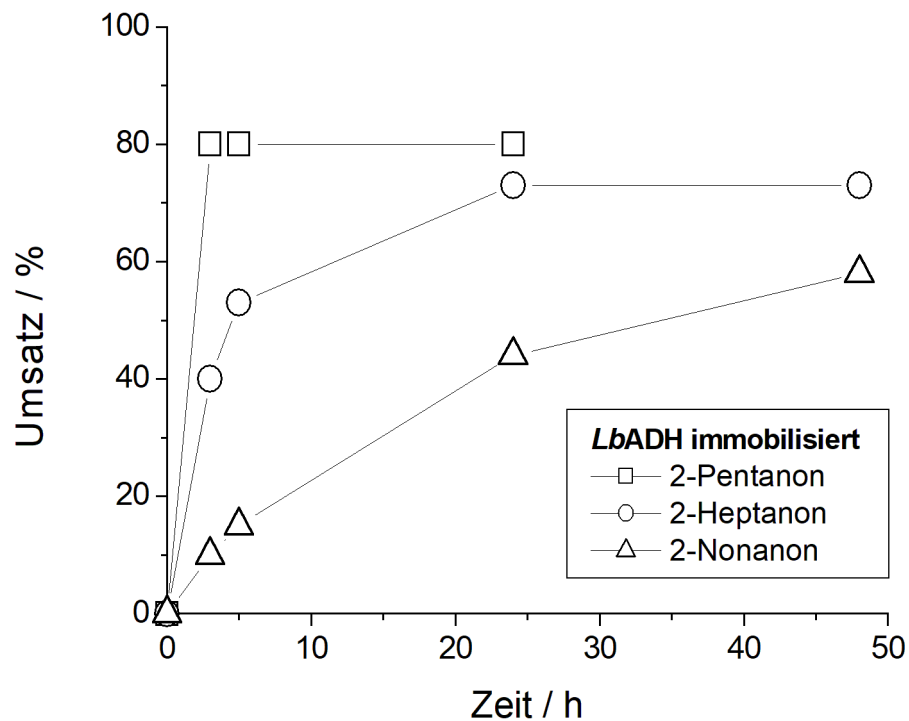
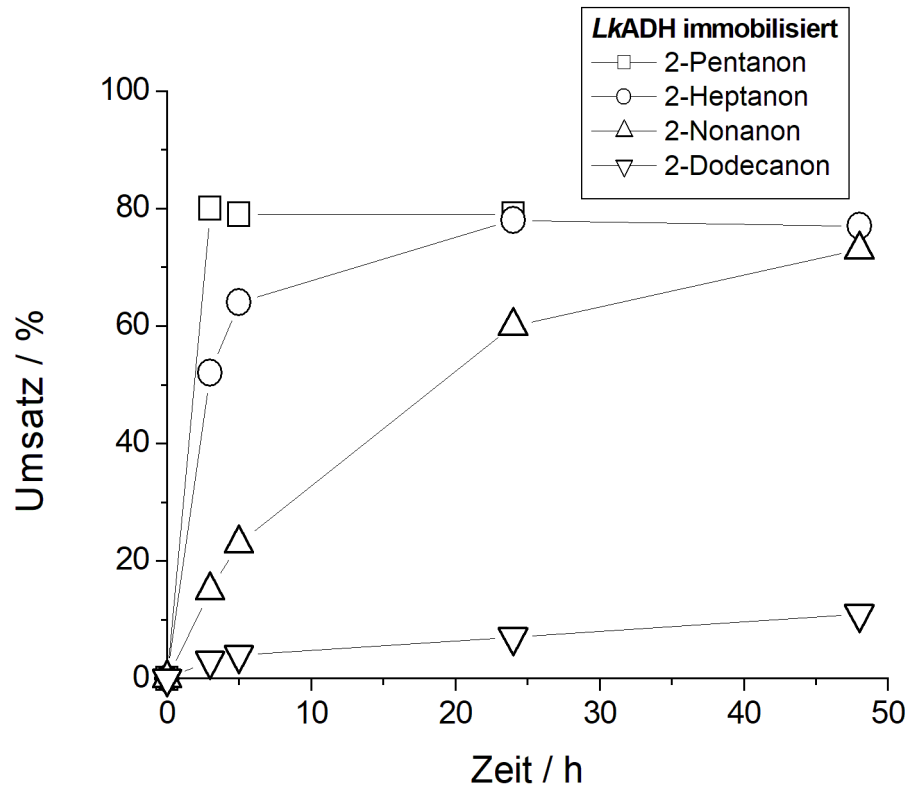
und können daher nicht durch das Enzym ermöglicht werden.<sup>130</sup> Je größer die Entfernung zur prochiralen Carbonylgruppe jedoch wird, können die Derivate besser umgesetzt werden. Zudem ist Brom größer als Chlor, daher ist der Umsatz des Brom-substituierten Derivats in meta-Position auch kleiner (9%) als dessen Chlor Pendant (18% und 19%). Bei den Derivaten, die in *para*-Position substituiert sind, ist der Effekt der sterischen Hinderung so gering, dass annähernd gleiche Umsätze zum Acetophenon erreicht werden können.

### 5.2.6 Reaktionen von prochiralen Ketonen mit *LkADH* und *LbADH*

Ähnlich wie Acetophenon und seine Derivate können auch andere prochirale Ketone einfach durch immobilisierte Alkoholdehydrogenase umgesetzt werden. Hierzu wurden 2-Pentanon, 2-Heptanon, 2-Nonanon und 2-Dodecanon von einer kompartmentierten *LkADH* und *LbADH* zu ihren korrespondierenden Alkoholen umgewandelt (Abbildung 37).<sup>[2]</sup> Die Reaktionen wurden mit der substrat-gekoppelten Cofaktorregenerierung durchgeführt. Dazu wurden die kompartmentierten *LkADH* und *LbADH* in 5 mL MTBE gegeben und mit 100 mM *iso*-Propanol und 10 mM des jeweiligen Substrates versetzt. Als Vergleich wurden die gleichen Substrate (gleiche Konzentration) auch mit den nicht immobilisierten Alkoholdehydrogenasen (gleiche Konzentration) in einem Zweiphasensystem (1 mL Puffer und 4 mL MTBE) umgesetzt (Abbildung 37).

---

<sup>[2]</sup> **Uhrich, D.**; von Langermann J. Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions. *Frontiers in Microbiology* **2017**, 8, 2111



**Abbildung 37:** Umsatz verschiedener prochiraler Ketone mit immobilisierter *LkADH* (oben) und *LbADH* (unten) in MTBE bei 30 °C; 5 mg/mL ADH, 10 mM Substrat, 100 mM *iso*-Propanol

Speziell kleine und polare Substrate wie 2-Pentanon und 2-Heptanon konnten sehr schnell durch beide kompartimentierten Alkoholdehydrogenasen reduziert werden. So konnte beispielsweise der Gleichgewichtsumsatz für 2-Pentanon innerhalb weniger Stunden erreicht werden, wohingegen größere Substrate wie 2-Nonanon und 2-Dodecanon längere Reaktionszeiten benötigten. Die Beobachtungen lassen sich hauptsächlich durch Diffusionslimitierungen erklären. Auch bei Wiederholungsexperimenten konnten die Ergebnisse bestätigt werden. Es wird deutlich, dass kleine, polare Alkohole wie *iso*-Propanol oder (*R*)-2-Pentanol, im Gegensatz zu großen, unpolaren Alkoholen, schnell durch die Polyurethanmembran diffundieren können. Zudem reichern sich unpolare Verbindungen wie 2-Dodecanon hauptsächlich in dem organischen, unpolaren Lösemittel an. Sie sind daher nur zu geringen Konzentrationen in den wässrigen Einschlüssen vorhanden, was wiederum die geringeren Aktivitäten gegenüber diesen Substraten erklärt.

Bei den Reaktionen in den Zweiphasensystemen können die Substrate innerhalb kurzer Zeit zu den jeweiligen Alkoholen umgesetzt werden, wobei aber auch hier geringere Reaktionsgeschwindigkeiten mit zunehmender Kettenlänge zu beobachten waren (Abbildung 38). Deutlich wird dies auch hier am Beispiel des 2-Dodecanons welches mit der *LkADH* nur schlecht umgesetzt werden konnte. Eine mögliche Erklärung sind sterische Einflüsse, die eine Bindung am aktiven Zentrum des Enzyms verschlechtern und damit die Umsetzung des Substrates erschweren. Auch hier konnten in Wiederholungsexperimenten die Ergebnisse reproduziert werden.

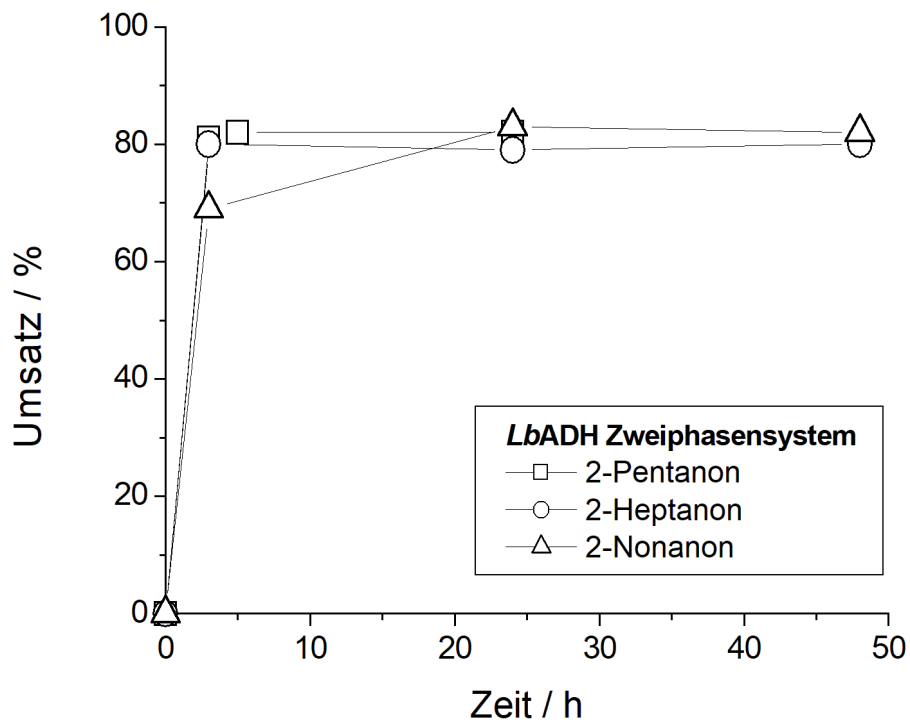
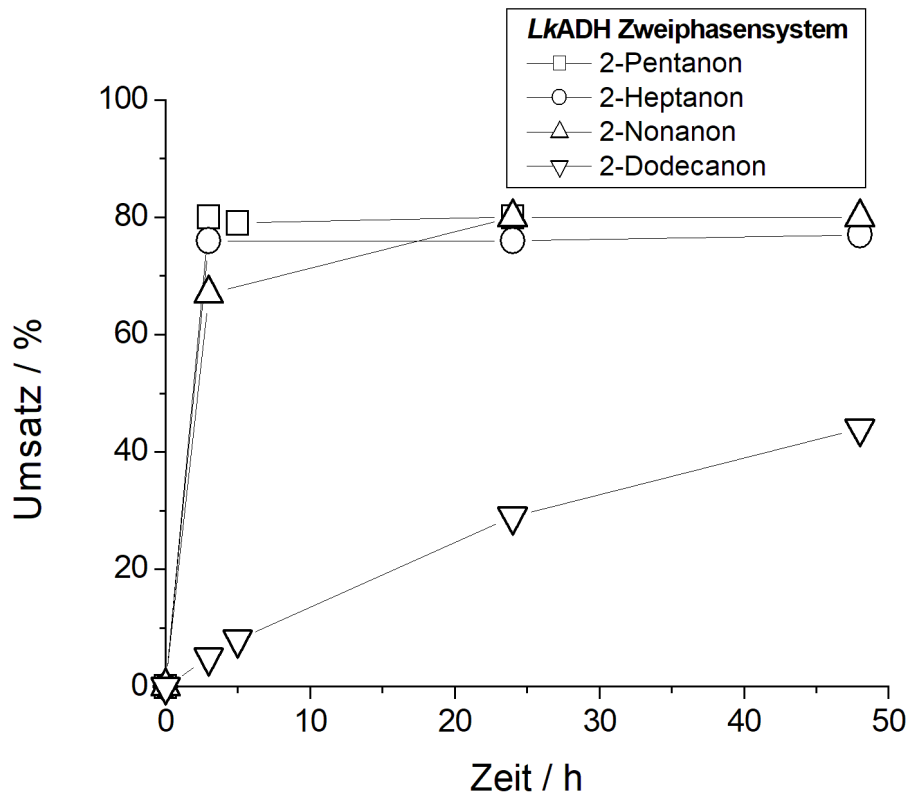
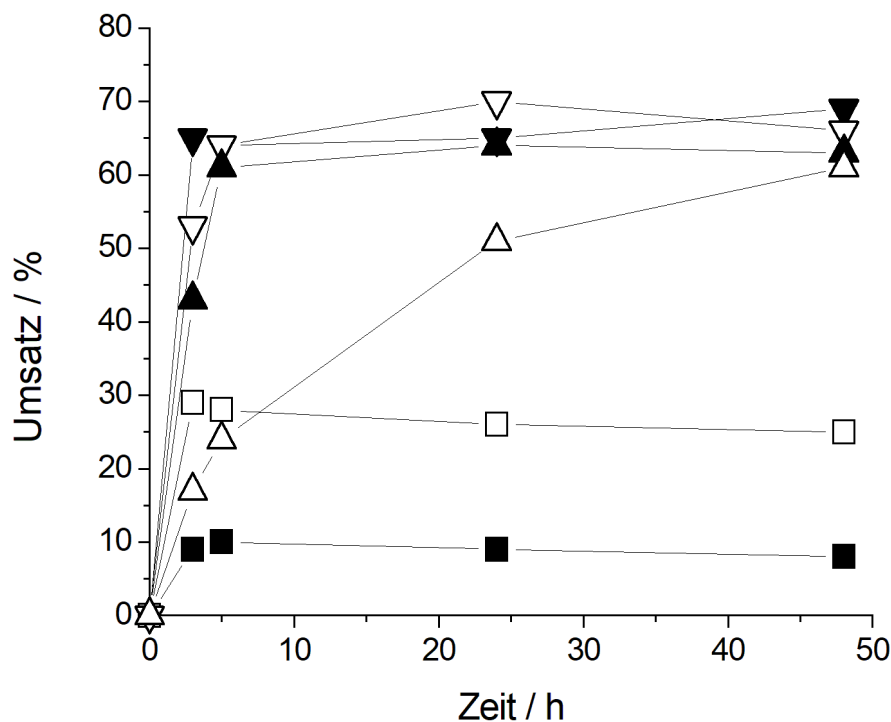


Abbildung 38: Umsatz verschiedener prochiraler Ketone im Zweiphasensystem mit *LkADH* (oben) und *LbADH* (unten) in MTBE bei 30 °C; 5 mg/mL ADH, 10 mM Substrat, 100 mM *iso*-Propanol

Die Beobachtungen lassen sich auch in anderen organischen Lösemitteln wie *n*-Heptan und *n*-Hexan verdeutlichen. Auch hier konnten die kleineren Substrate schneller als die langkettigen Verbindungen umgesetzt werden, welches auch in Wiederholungsexperimenten reproduziert werden konnte. Eine Ausnahme stellt hierbei die Reaktion von 2-Pentanon in *n*-Heptan dar (Abbildung 39). Sowohl in dem Zweiphasensystem, als auch bei der Reaktion mit kompartimentierter Alkoholdehydrogenase sanken die Umsätze deutlich. Es konnten nur ca. 30% ( $\pm 1,5$ ) des Substrates für immobilisierte *LkADH* und ca. 10% ( $\pm 4,5$ ) für die Reaktion in dem Zweiphasensystem umgesetzt werden. Eine mögliche Ursache hierfür sind die unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten für 2-Pentanon und 2-Pentanol in *n*-Heptan im Gegensatz zu MTBE. Beide Verbindungen reichern sich hauptsächlich in der wässrigen Phase an.



**Abbildung 39:** Umsatz verschiedener prochiraler Ketone mit immobilisierter *LkADH* in *n*-Heptan und nicht immobilisierter *LkADH* im Zweiphasensystem bei 30 °C; (■) 2-Pentanon im Zweiphasensystem, (□) 2-Pentanon immobilisiert, (▼) 2-Heptanon im Zweiphasensystem, (▽) 2-Heptanon immobilisiert, (▲) 2-Nonanon im Zweiphasensystem, (△) 2-Nonanon immobilisiert; 5 mg/mL *LkADH*, 10 mM Substrat, 100 mM *iso*-Propanol

### 5.3 *LkADH*-CalB Kaskadenreaktion

Ziel dieser Doktorarbeit war unter anderem auch die Entwicklung von Kaskadenreaktionen unter Katalyse von kompartimentierten Enzymen. Hierzu wurde die *LkADH* katalysierte Reaktion von 2-Heptanon zu 2-Heptanol mit einer CalB-katalysierten Reaktion (in immobilisierter Form Novozym 435) kombiniert. Gebildetes 2-Heptanol wird dabei in einem zweiten Schritt sofort zu dem entsprechenden Ester umgesetzt (Abbildung 40).

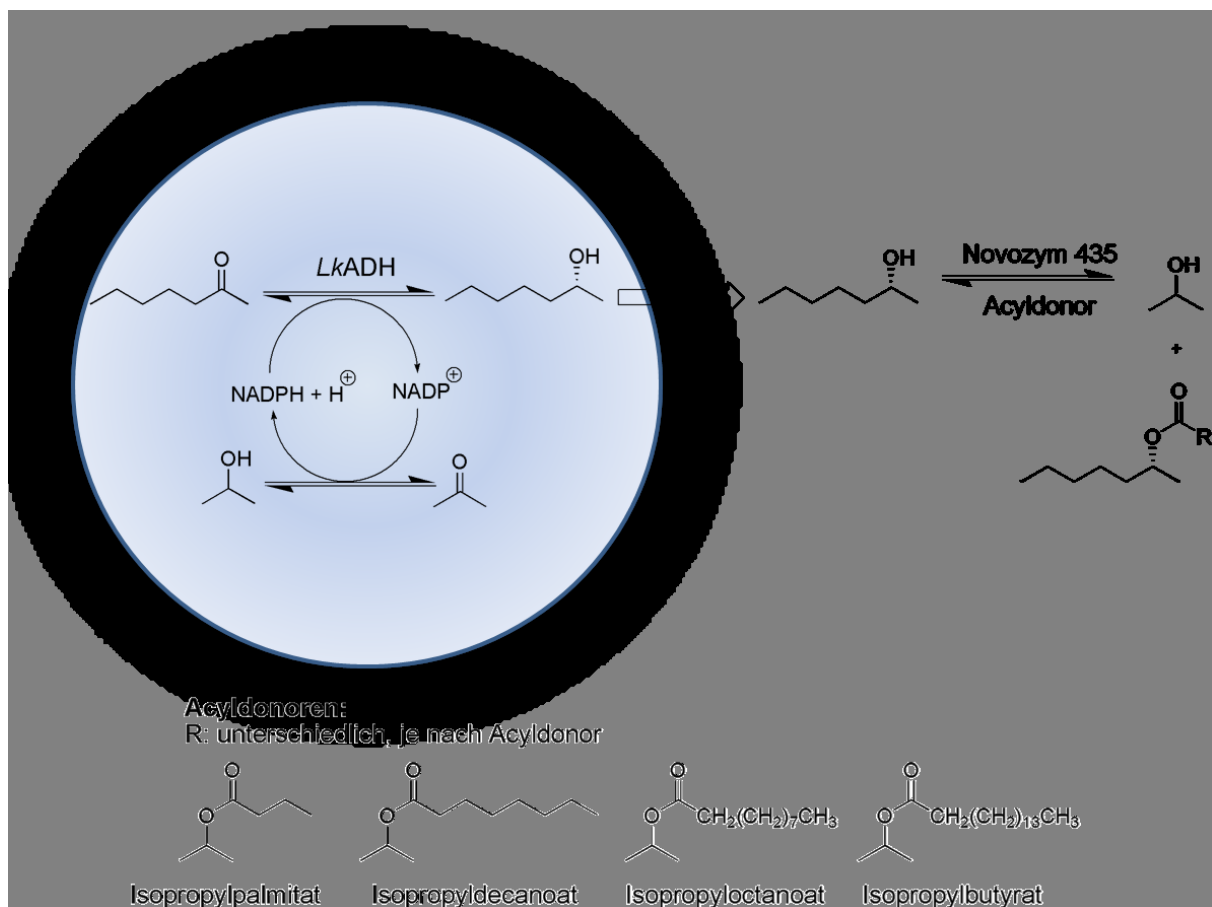


Abbildung 40: Reaktionsschema der *LkADH*-CalB gekoppelten Kaskadenreaktion

#### 5.3.1 CalB katalysierte Teilreaktion von Heptanol

Für den systematischen Aufbau der Kaskadenreaktion wurde zunächst die zweite, durch CalB katalysierte, Teilreaktion in verschiedenen Lösemitteln auf ihre Funktionalität getestet. Dazu wurden 10 mM 2-Heptanol (Racemat) in 5 mL

Lösemittel gelöst und mit 2 mg/mL CalB versetzt. Als Acetylierungsmittel wurden die verschiedenen Acyldonoren Isopropylbutyrat, Isopropyloctanoat, Isopropyldecanoat und Isopropylpalmitat, mit einer Konzentration von 50 mM, verwendet. In Tabelle 7 sind die Umsätze der Reaktion aufgelistet, wobei 50 % Umsatz den Maximalumsatz definiert. Als Lösemittel wurden MTBE, *n*-Dodecan und *n*-Hexan ausgewählt um eine mögliche Hydrolysereaktion zu vermeiden.

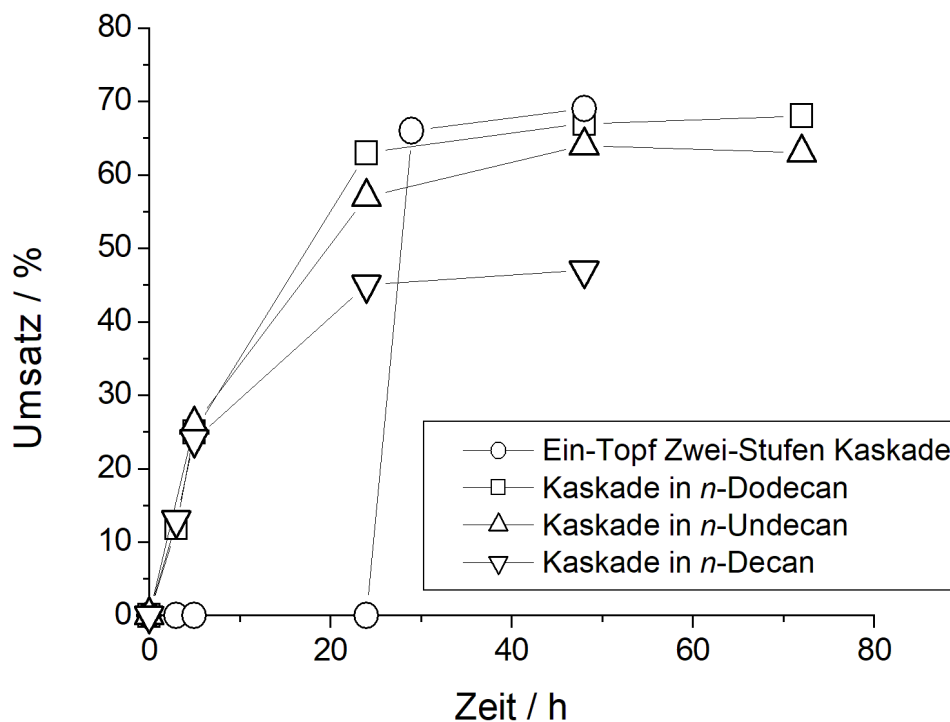
**Tabelle 7: Umsätze von 2-Heptanol mit CalB bei 30 °C in verschiedenen trockenen Lösemitteln; 10 mM 2-Heptanol, 2 mg/mL CalB, 50 mM Acyldonor**

Acyldonor	Produkt	Lösemittel	Umsatz [%] zum Produkt
Isopropylbutyrat (IPB)	<i>(R)</i> -2-Heptylbutyrat	MTBE	46 ( $\pm 0,3$ )
		<i>n</i> -Dodecan	-
		<i>n</i> -Hexan	50
Isopropyloctanoat (IPO)	<i>(R)</i> -2-Heptyloctanoat	MTBE	48 ( $\pm 1$ )
		<i>n</i> -Dodecan	50
		<i>n</i> -Hexan	50
Isopropyldecanoat (IPD)	<i>(R)</i> -2-Heptyldecanoat	MTBE	49 ( $\pm 0,5$ )
		<i>n</i> -Dodecan	50
		<i>n</i> -Hexan	50
Isopropylpalmitat (IPP)	<i>(R)</i> -2-Heptylpalmitat	MTBE	48 ( $\pm 1,7$ )
		<i>n</i> -Dodecan	50
		<i>n</i> -Hexan	50

Da die Reaktion eine klassische Racematspaltung darstellt, ist der maximal mögliche Umsatz mit 50% limitiert. 50% Umsatz konnte vor allem in den hydrophoben Lösemitteln *n*-Dodecan und *n*-Hexan erzeugt werden, wobei bei der Reaktion mit IPB eine Detektion von *(R)*-2-Heptylbutyrat nicht möglich war, da sich die Lösemittelsignale mit denen des Produktes überlagerten.

### 5.3.2 *LkADH*-*CalB* Kaskadenreaktion in verschiedenen Lösemitteln

Um den Einfluss des Lösemittels genau zu untersuchen, wurde die *LkADH*-*CalB* Kaskadenreaktion in den Lösemitteln *n*-Decan, *n*-Undecan und *n*-Dodecan durchgeführt. Als Acyldonor wurde IPO gewählt. Außerdem wurde die Kaskade als Ein-Topf Zwei-Stufen Kaskade durchgeführt, indem nach vollständigem Umsatz von 2-Heptanon zu 2-Heptanol erst nach 24 h IPO und *CalB* hinzugegeben wurden. Hierbei sollte untersucht werden, ob die zwei Teilreaktionen sich eventuell gegenseitig negativ beeinflussen. Diese Reaktion wurde in *n*-Dodecan durchgeführt.



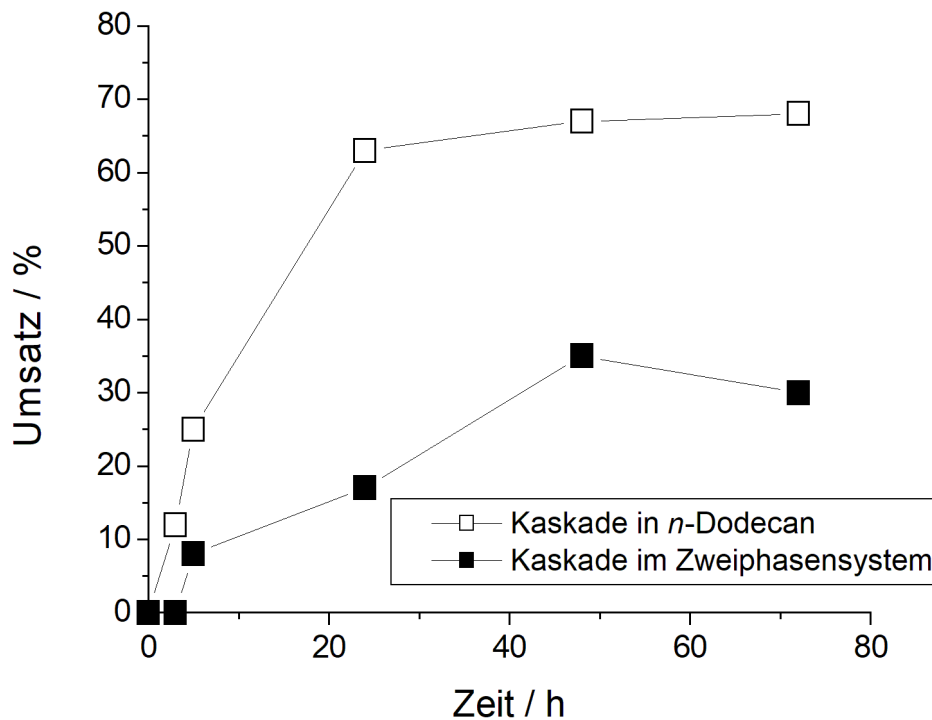
**Abbildung 41:** *LkADH*-*CalB* Kaskadenreaktion mit IPO in verschiedenen organischen Lösemitteln bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL *LkADH*, 2 mg/mL *CalB*, 50 mM IPO, 100 mM *iso*-Propanol

In Abbildung 41 sind die Endumsätze der Reaktionen vermerkt. In allen Reaktionen konnte das Substrat 2-Heptanon erfolgreich zum Produkt (*R*)-2-Heptyloctanoat umgesetzt werden. Bei der Ein-Topf Zwei-Stufen Kaskade erfolgt die Produktbildung erst nach 24h (nach Zugabe von *CalB* und IPO). Die Kurve verzeichnet eine höhere



Reaktionsgeschwindigkeit im Vergleich zur Eintopfreaktion, die Endumsätze ähneln aber der von der Gesamtkaskade in *n*-Dodecan. Auf Grund dieser Erkenntnis sind die Eintopfreaktionen wegen ihrer einfacheren Handhabung daher zu favorisieren. Vergleicht man die Kaskaden in den drei unterschiedlichen Lösemitteln ist zu erkennen, dass in *n*-Dodecan die besten Endumsätze von 68% ( $\pm 2$ ) erzielt wurden. Im Vergleich dazu konnten mit der Kaskade in *n*-Undecan 63% ( $\pm 1,5$ ) und der Kaskade in *n*-Decan nur 47% ( $\pm 0,3$ ) zum Produkt umgesetzt werden. Bei den Kaskadenreaktionen sind daher deutlich hydrophobe Lösemittel zu bevorzugen. Ein vollständiger Umsatz konnte nicht erreicht werden. Auf Grund der Komplexität des Systems sind viele Nebenreaktionen möglich, die einen Vollumsatz verhindern. So kann beispielsweise der Acyldonor als Substrat für die zweite Teilreaktion wirken. Des Weiteren wirkt die erhöhte *iso*-Propanol Konzentration im Reaktionssystem deaktivierend auf die *LkADH*, weshalb der erste Teilschritt der Reaktion inhibiert wird. Des Weiteren kann es außerdem zur Hydrolyse des Acyldonors kommen, wenn Wasser aus den Kompartimenten herausdiffundiert.

Wie im Kapitel 3.2.1 beschrieben, bietet der Einsatz von Biokatalysatoren viele Vorteile. Ein großer Nachteil gegenüber herkömmlicher chemischer Katalyse ist aber die Deaktivierung vieler Enzyme in organischen Lösemitteln. Durch die Kompartimentierung des Biokatalysators in PUR, kann dieser Nachteil allerdings umgangen werden, was Abbildung 42 verdeutlicht.

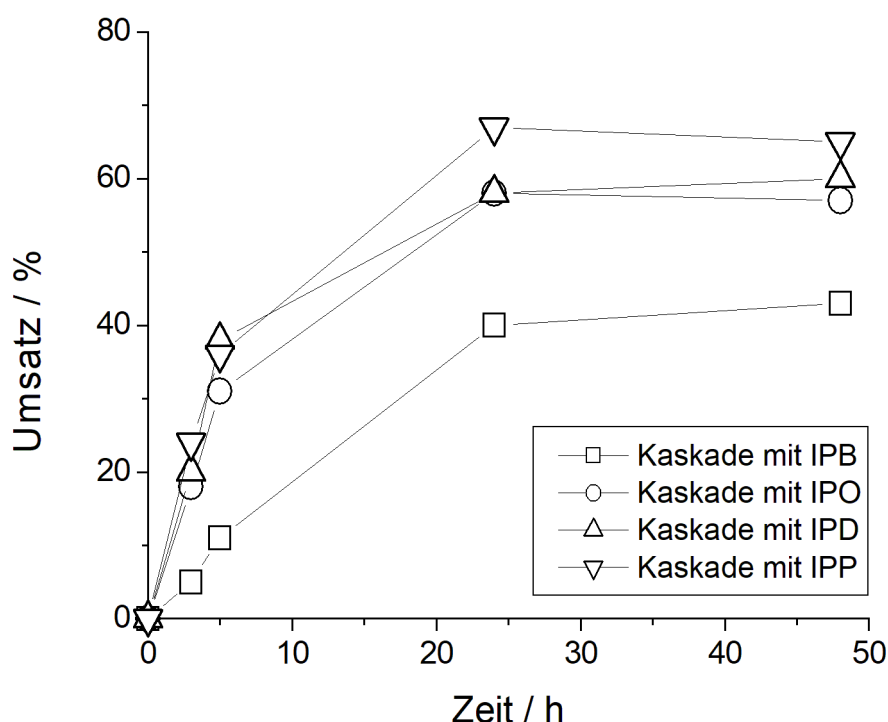


**Abbildung 42: *LkADH*-*CaIB* Kaskadenreaktion mit IPO in *n*-Dodecan und in einem Zweiphasensystem bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL *LkADH*, 2 mg/mL *CaIB*, 50 mM IPO, 100 mM *iso*-Propanol**

Wie bereits aus Abbildung 41 hervorging, ermöglicht die *LkADH*-*CaIB* Kaskade mit IPO einen Umsatz von 68% in *n*-Dodecan. Wird die gleiche Reaktion in einem Zweiphasensystem (2,5 mL *n*-Dodecan und 2,5 mL Phosphatpuffer) katalysiert sind die Umsätze deutlich schlechter (35%). Durch das vorhandene Wasser in dem Zweiphasensystem wird die Hydrolyse des Esters möglich, was die geringere Produktausbeute erklärt. Durch die Immobilisierung kann dies umgangen werden. Dieses Ergebnis unterstreicht einmal mehr die vollständige Kompartimentierung des Katalysators, welche den Einsatz von organischen Lösemitteln ermöglicht.

### 5.3.3 *LkADH*-CalB Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren

Weiterhin wurde die *LkADH*-CalB Kaskade mit den anderen Acyldonoren (Isopropylbutyrat, Isopropyldecanoat und Isopropylpalmitat) durchgeführt (Abbildung 43). Als Lösungsmittel wurde *n*-Hexan gewählt, um eine Überlagerung der Signale in der Gaschromatographie zu vermeiden.



**Abbildung 43:** *LkADH*-CalB Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren in *n*-Hexan bei 30 °C; 10 mM 2-Heptanon, 5 mg/mL *LkADH*, 2 mg/mL CalB, 50 mM Acyldonor, 100 mM *iso*-Propanol

Die Abbildung zeigt die Umsatzkurven für alle Acyldonoren. Bei der Katalyse mit IPB konnten 43% ( $\pm 2,3$ ), mit IPO 57% ( $\pm 1$ ), mit IPD 60% ( $\pm 0,7$ ) und mit IPP 65% ( $\pm 1,5$ ) des Substrates umgesetzt werden. Es wird deutlich, dass mit zunehmender Kohlenstoffatomanzahl des Acyldonors die Reaktionsgeschwindigkeit und auch der Umsatz der Reaktion steigt. So konnte mit Isopropylpalmitat im Vergleich zu Isopropylbutyrat der Umsatz um über 20% gesteigert werden. Wird 2-Heptanon gegen Acetophenon substituiert können ähnliche Beobachtungen gemacht werden

(Tabelle 8). Auch hier stiegen die Endumsätze mit zunehmender Kettenlänge des Acyldonors. So konnte mit IPB 13%, mit IPO 18% und mit IPD 60% umgesetzt werden. Eine Ausnahme bildete hier IPP. Bei der Katalyse mit diesem Acyldonor konnten nur 25% des Acetophenon umgesetzt werden. An Hand dieser Ergebnisse kann darauf geschlossen werden, dass Heptanon auf Grund seiner Größe und Polarität sich am besten als Substrat für diese Reaktion eignet. Weiterhin können länger-kettige Acylierungsreagenzien wie IPD und IPP das Gleichgewicht der Reaktion besser auf die Produktseite verschieben, wodurch die Umsätze steigen. Wird das Produkt jedoch zu groß wie bei 1-Phenylpalmitat entstehen vermutlich Diffusionslimitierung, was einen Rückgang der Effektivität der Reaktion mit sich bringt.

**Tabelle 8: Endumsätze der *LkADH*-*CalB* Kaskadenreaktion mit verschiedenen Acyldonoren in *n*-Hexan mit Acetophenon als Substrat bei 30 °C; 10 mM Acetophenon, 5 mg/mL *LkADH*, 2 mg/mL *CalB*, 50 mM Acyldonor, 100 mM *iso*-Propanol**

<b>Acyldonor</b>	<b>Produkt</b>	<b>Umsatz [%] zum Produkt</b>
IPB	1-Phenylethylbutanoat	13 ( $\pm 1,5$ )
IPO	1-Phenylethyl-octanoat	18 ( $\pm 4,5$ )
IPD	1-Phenylethyl-decanoat	60 ( $\pm 0,7$ )
IPP	1-Phenylethyl-palmitat	27 ( $\pm 3$ )

## 5.4 Immobilisierung ganzer Zellen

Die entwickelte Immobilisierungstechnik mit NOA 81 sollte des Weiteren auf die Immobilisierung von ganzen Zellen übertragen werden. Dazu wurden die Zellen nach der Kultivierung abzentrifugiert, in wenig Reaktionsmedium wieder aufgenommen und mit 1 g NOA 81 gut vermischt. Die Emulsion wurde anschließend für 5 min unter UV Licht ausgehärtet. Die erhaltene Polymerpräparation wurde in einem letzten Schritt zerkleinert und konnte anschließend für Biotransformationen eingesetzt werden (Abbildung 44).

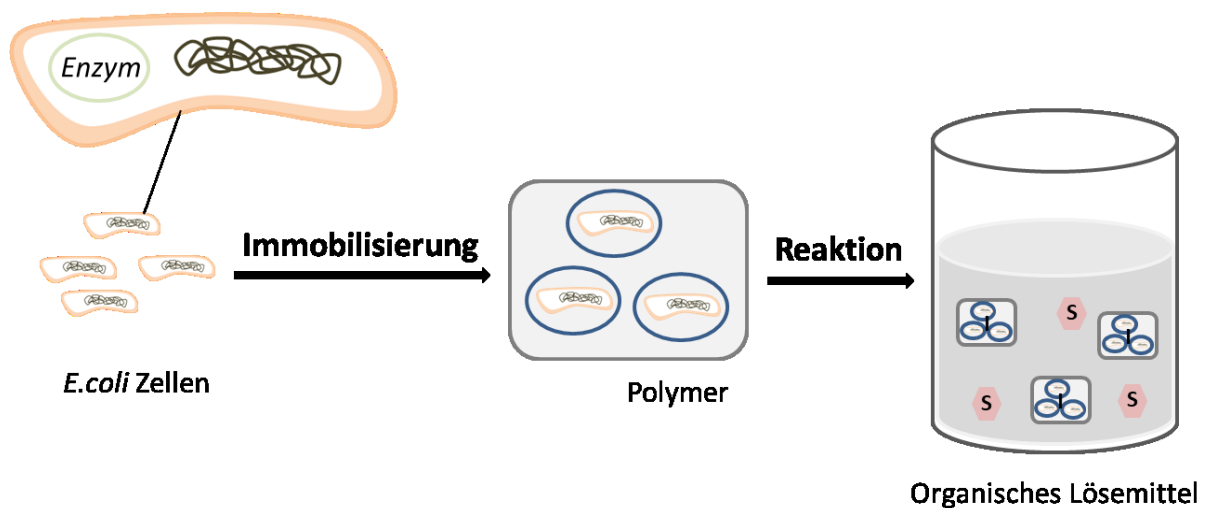
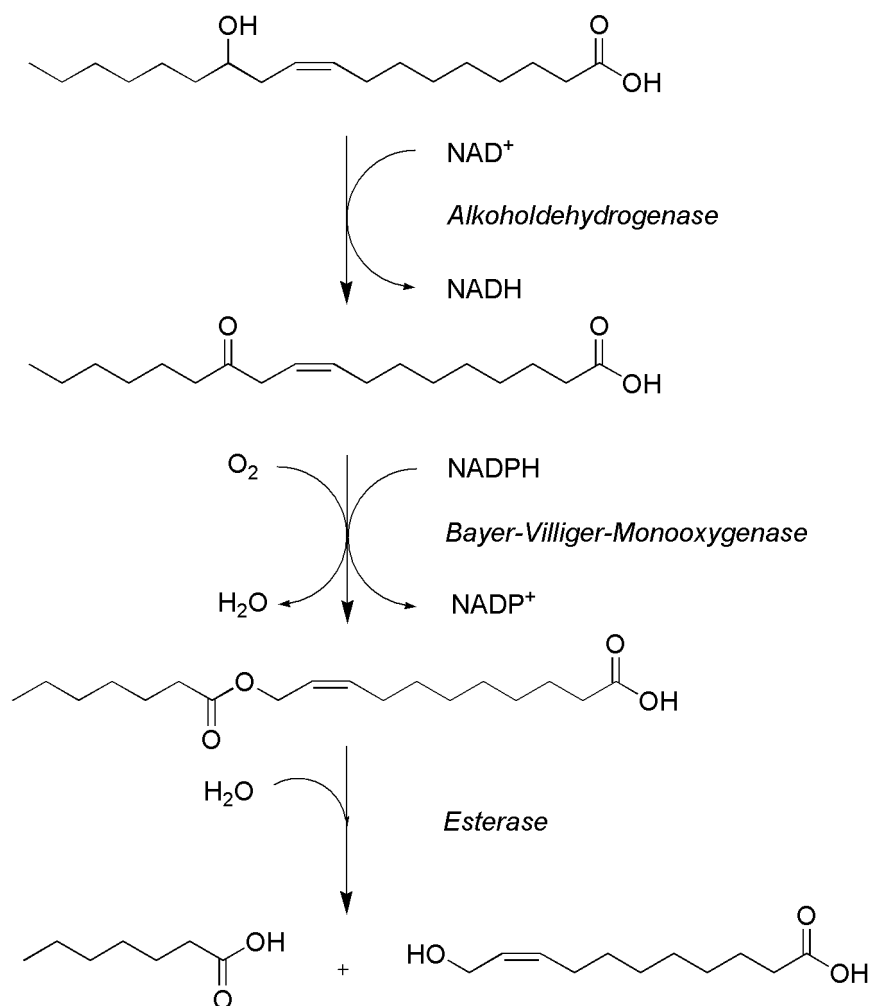


Abbildung 44: Schematische Darstellung der Immobilisierung ganzer Zellen in NOA 81

### 5.4.1 Ganzzellbiotransformation von Ricinolsäure

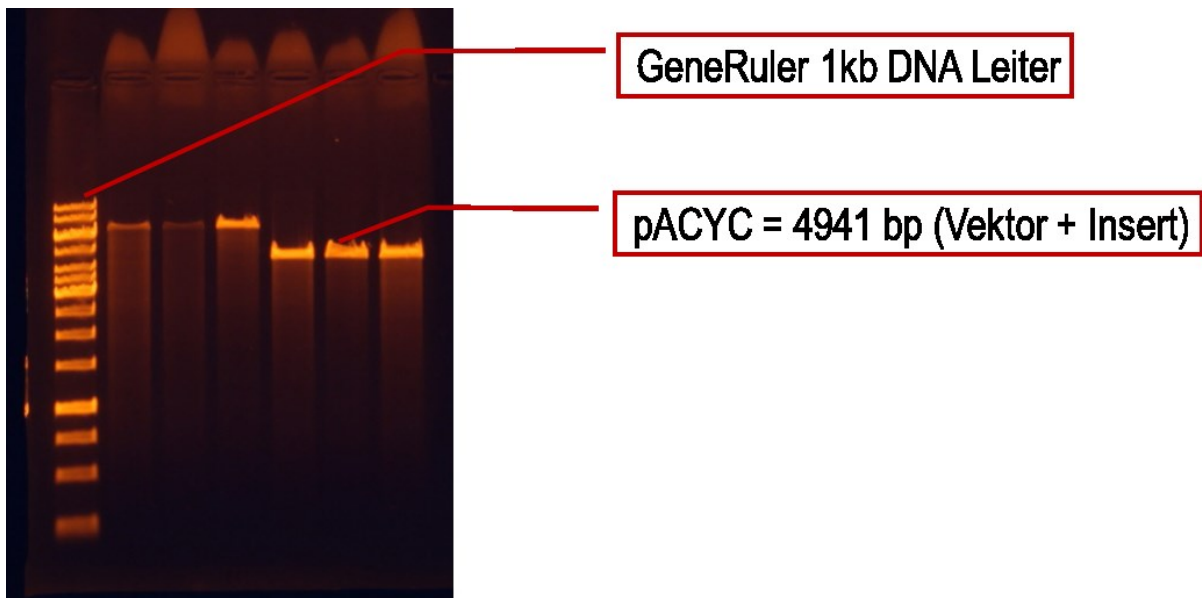
Mittelkettige Fettsäuren (10-14 Kohlenstoff Atome) werden klassisch unter harschen Bedingungen (Ozonolyse) gewonnen. Die Produktion aus erneuerbarer Biomasse ist daher interessant und von großer Bedeutung. In dieser Doktorarbeit sollte eine mehrstufige Enzymkaskade im Rahmen einer Ganzzellbiotransformation aufgebaut werden (Abbildung 45). Innerhalb der gezeigten Reaktionskaskade wird Ricinolsäure an der C<sub>12</sub>-Hydroxylgruppe durch eine Alkoholdehydrogenase (MIADH) von *Micrococcus luteus* und eine Bayer-Villiger-Monooxygenase (BVMO) von

*Pseudomonas putida* KT2440 zu einem Ester oxidiert. Anschließend wird die Estergruppe durch eine Esterase von *Pseudomonas fluorescens* SIK WI zu den gewünschten Produkten hydrolysiert. Die zu synthetisierenden Produkte *n*-Heptansäure und  $\omega$ -Hydroxyundec-9-ensäure sind wichtige Bausteine in chemischen Synthesen und dienen des Weiteren als Fungizid ( $\omega$ -Hydroxyundec-9-ensäure) oder Säurekomponente zur Haltbarkeitssteigerung in Arzneimitteln (*n*-Heptansäure). Die ganze Reaktionskaskade erfolgt hier als Ganzzellbiotransformation in *E. coli*, wobei die Enzyme als ganze Zellen in NOA 81 immobilisiert wurden.



**Abbildung 45: Biotransformation von Ricinolsäure zu *n*-Heptansäure und  $\omega$ -Hydroxyundec-9-ensäure**

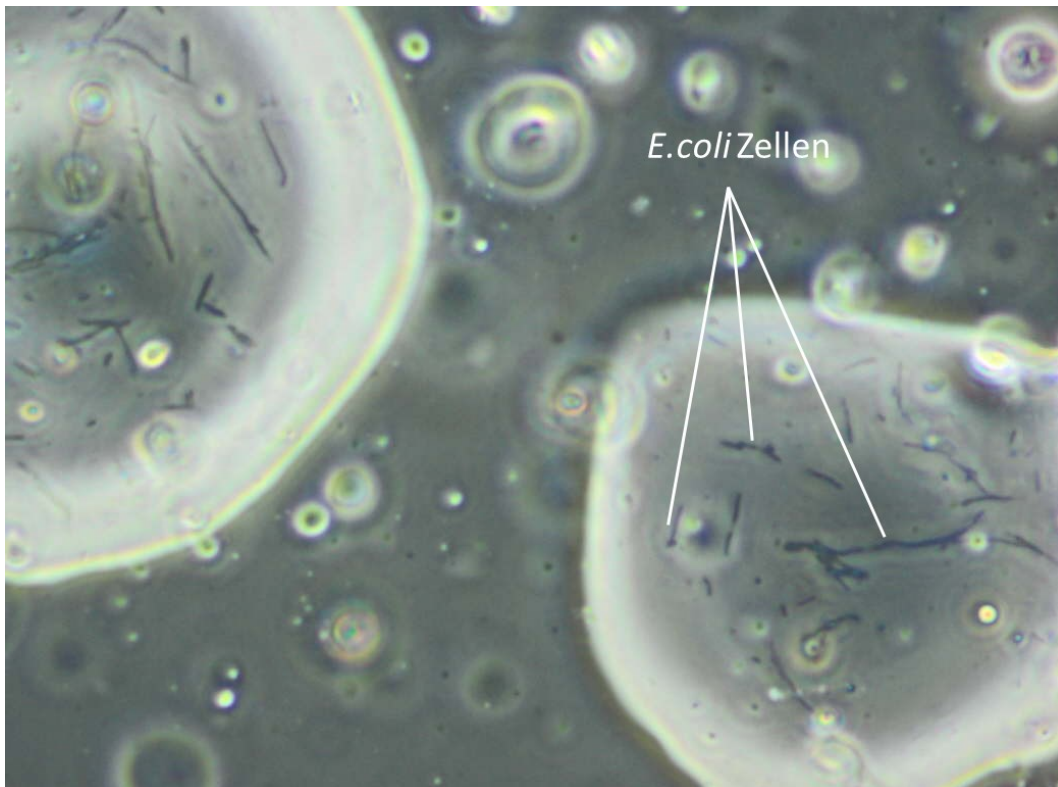
Für die Immobilisierung der ganzen Zellen in NOA 81 mussten zunächst die Zellen mit dem entsprechenden Plasmid (Alkoholdehydrogenase pACYC, Bayer-Villiger-Moniixygenase KT2440), exprimiert in *E. coli* BL21(DE3), kultiviert werden. Dazu wurden zunächst  $\text{CaCl}_2$  kompetenten Zellen hergestellt (Kapitel 4.9.1), welche anschließend die rekombinanten Plasmide aufnehmen konnten. Nach der Plasmidaufnahme wurden die Zellen ausplattiert und nach Lagerung über Nacht bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  konnte ein Koloniewachstum beobachtet werden. Um sicher zu sein, dass die Plasmide erfolgreich transformiert wurden, wurden diese isoliert (Kapitel 4.9.2) und anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese analysiert. Am Beispiel der Alkoholdehydrogenase pACYC ist dies in der Abbildung 46 verdeutlicht.



**Abbildung 46: Gelelektrophorese der Alkoholdehydrogenase pACYC**

Mit Hilfe des Restriktionsenzym NED 1 wurde die DNA Sequenz des pACYC Plasmids genau an einer Stelle geschnitten. Nach der Gelelektrophorese konnte so das Plasmid mit dem Duet-Vektor von 4008 Basenpaaren (bp) und dem ADH Insert von 933 Basenpaare genau der Alkoholdehydrogenase zugeordnet werden. Dies wurde auch für alle anderen Plasmide durchgeführt um die erfolgreiche Plasmidtransformation sicherzustellen. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 4.9.3 beschrieben, kultiviert.

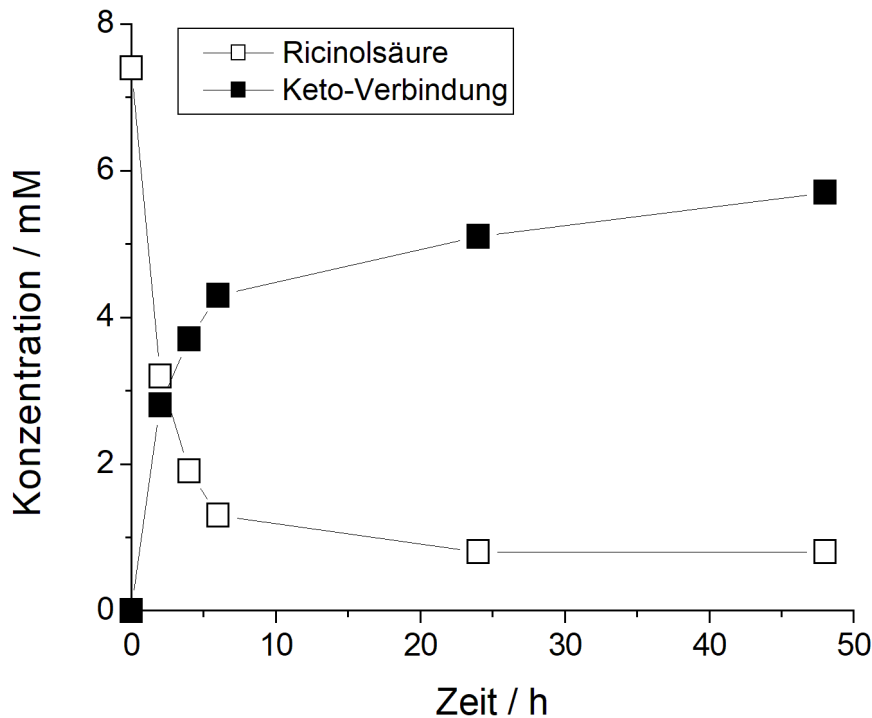
Die Immobilisierung der *E.coli* Zellen gestaltete sich als einfach und keine weiteren Anpassungen der Immobilisierungsmethode mussten vorgenommen werden. So bleiben die Zellen als Ganzes nach der Kompartimentierung voll intakt und ein Herauswaschen der wässrigen Einschlüsse oder eine Adsorption an der Polymeroberfläche konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Mikroskopaufnahme der immobilisierten Zellen in den wässrigen Einschlüssen**

Nach der Kultivierung der Zellen, konnten diese für die Biotransformation eingesetzt werden. Zunächst wurde die Alkoholdehydrogenase katalysierte Reaktion von Ricinolsäure untersucht. Dazu wurden die *MIADH* Zellen (ca. 3 g/L) in 1 g NOA 81 immobilisiert. Zu 18 mL *n*-Heptan wurden anschließend 8 mM des Substrates und die zerkleinerten *MIADH*-PUR Kompartimente gegeben und die Reaktion über 48 h geschüttelt.

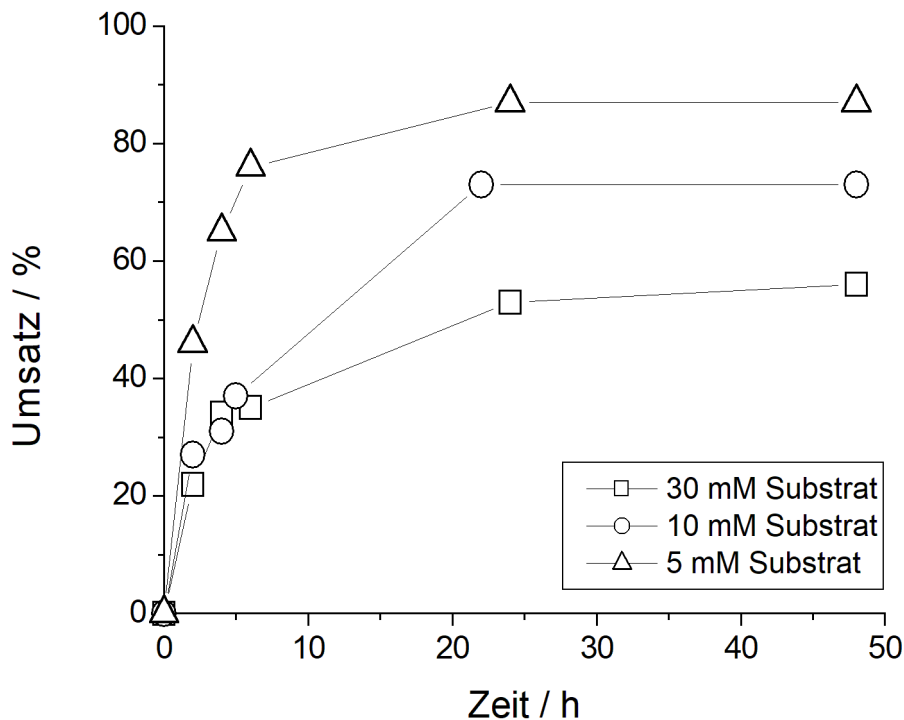




**Abbildung 48: Umsatz von Ricinolsäure zur Keto-Verbindung mit Hilfe der Alkoholdehydrogenase bei 35 °C; 3 g/L *MIADH* Zellen, 8 mM Ricinolsäure**

Wie aus der Abbildung hervorgeht, konnte Ricinolsäure erfolgreich zum gewünschten Produkt umgesetzt werden. Bei einer Substratkonzentration von 7,4 mM konnte nach ca. 48 h 5,7 mM der Keto-Verbindung generiert werden. Weiterhin kann beobachtet werden, dass die Substratkonzentration mit zunehmendem Reaktionsverlauf stetig abnimmt. Ein voller Umsatz des Substrates war nicht möglich, nach 48 h verblieben 0,8 mM der Ausgangsverbindung. Wird die gleiche Reaktion mit nicht kompartimentierter *MIADH* durchgeführt wurden geringfügig bessere Umsätze erzeugt (ca. 85%)

Die gleiche Reaktion wurde anschließend mit kompartimentierter *MIADH* bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt (Abbildung 49).



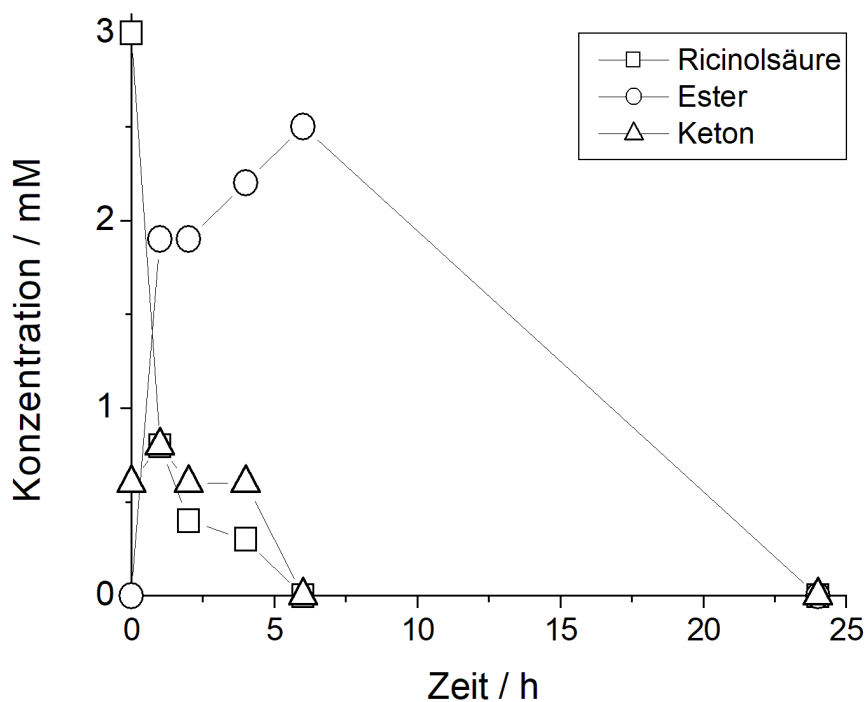
**Abbildung 49: Umsätze von Ricinolsäure zur Keto-Verbindung bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei 35 °C; 3 g/L *MIADH* Zellen, 5, 10 und 30 mM Ricinolsäure**

Die Abbildung zeigt, dass auch bei höheren Substratkonzentrationen ein Umsatz zur Zielverbindung möglich ist. Bei gleich bleibender Enzymkonzentration, aber unterschiedlicher Konzentration an Ricinolsäure konnten jeweils 87% umgesetzt werden, bei 5 mM Substrat, 73% bei 10 mM Substratkonzentration und 56% bei 30 mM Substratkonzentration. Bei Veränderung der Katalysatorkonzentration sind auch höhere Umsätze bei höheren Substratkonzentrationen möglich. Die erhoffte Umsatzsteigerung in organischen Lösemitteln, auf Grund der verbesserten Löslichkeit des Substrates blieb leider aus, denn bei der Katalyse in Riesenberg Medium ohne Immobilisierung und unter gleiche Bedingungen wurden wie schon erwähnt ähnliche Umsätze erzielt. Die Cofaktorregenerierung erfolgt trotz Immobilisierung intrazellulär, da die Zellen durch die Immobilisierung nicht beeinflusst werden. Dies konnte unter Mikroskop Aufnahmen festgestellt werden. Außerdem kann ein negativer Effekt des UV Lichts auf die Zellen ausgeschlossen werden, da die Zellen selbst nach langer UV Bestrahlung ihre Aktivität behielten und das Substrat zum Produkt umsetzen. Weiterhin ist positiv hervorzuheben, dass die durch

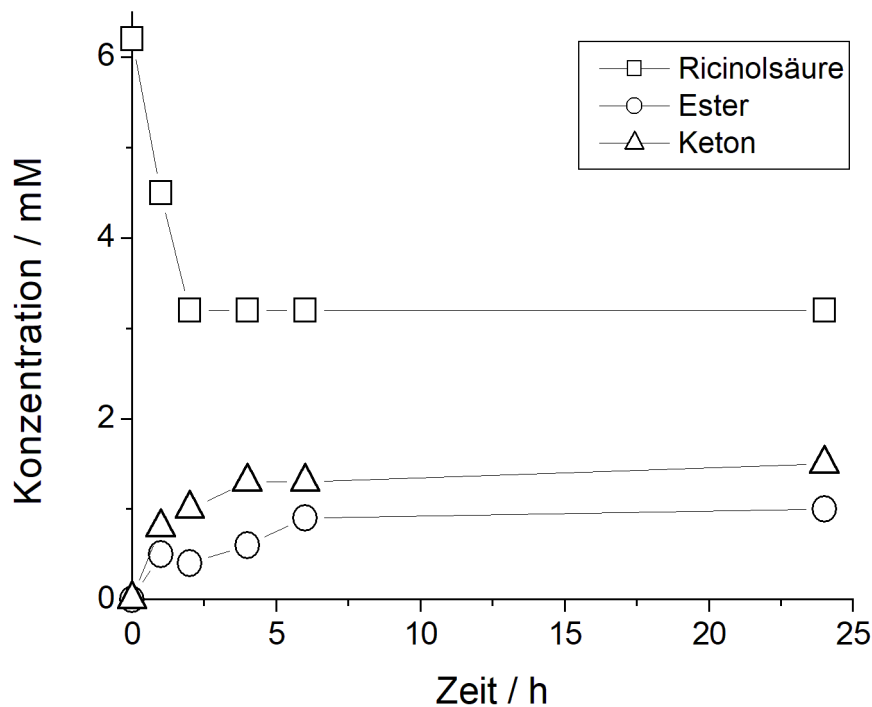
die Immobilisierung entstandene Polymermembran die *MIADH* schützt, und so ein Einsatz in organischen Lösemitteln möglich ist.

Im zweiten Schritt der Kaskade, sollte die entstandene Keto-Verbindung durch eine *BVMO* zu einem Ester oxidiert werden. Hierbei wurde ein kombinierter DNA Strang aus *MIADH* und *BVMO* verwendet, welcher beide Enzyme exprimiert. Die Reaktion kann somit als Eintopfreaktion durchgeführt werden und das Zwischenprodukt muss nicht isoliert werden. Die Reaktion wurde einmal im Riesenberg Medium (Abbildung 50, (A)) und einmal in *n*-Heptan (Abbildung 50, (B)) durchgeführt. Die Abbildung zeigt die jeweiligen Umsatzkurven zur gewünschten Esterverbindung, wobei der erste Graph (A) eine Reaktion ohne Immobilisierung und Graph (B) eine Reaktion mit kompartimentierter *MIADH-BVMO-PUR* darstellt. Bei beiden Reaktionen wurde 5 mM Substrat hinzugegeben, wobei auf Grund der hohen Viskosität von Ricinolsäure das genaue Abmessen der Konzentration mit einer Pipette schwierig war. In Reaktion (A) wurde das Substrat in 20 mL Riesenberg Medium gelöst, welches auch die kultivierten Zellen enthielt. In Reaktion (B) wurden die *MIADH-BVMO-PUR* Kompartimente zum Substrat, gelöst in 20 mL *n*-Heptan gegeben. Die Reaktion wurde für 24 h geschüttelt.

(A)



(B)



**Abbildung 50: Umsatz von Ricinolsäure zum Ester mit kombiniertem *MIADH-BVMO* Strang; (A) Reaktion in Riesenberg Medium ohne Immobilisierung bei 35 °C, (B) Reaktion in *n*-Heptan mit Immobilisierung bei 35 °C; 3 g/L *MIADH-BVMOH* Zellen, 5 mM Ricinolsäure**

Beide Kurven zeigen eine Umsetzung zur gewünschten Esterverbindung, jedoch mit unterschiedlichen Ausbeuten. Während bei (B) nach 6 h nur 17% ( $\pm 4,75$ ) umgesetzt werden konnten, konnte bei (A) nach 6 h 82% ( $\pm 3,75$ ) umgesetzt werden. Der deutliche Umsatzunterschied zeigt, dass die BVMO-Reaktion der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, welcher bei Reaktion mit kompartimentierter *MIADH-BVMO* inhibiert wird. Zu beachten ist allerdings, dass auf Grund von Pipettierfehlern nicht die gleichen Ausgangskonzentrationen verwendet wurden (bei Graph (A) 3 mM Ricinolsäure, bei Graph (B) 6 mM Ricinolsäure). Zudem stimmt die Massenbilanz nicht vollständig bei der zweiten Reaktion mit *MIADH-BVMO-PUR* Kompartimenten, da sich das Produkt in den Kompartimenten anreichern kann und so bei der

Probenentnahme im äußeren Medium nicht detektiert wird. Trotzdem ist ein deutlicher Umsatzunterschied zwischen den beiden Reaktionen zu erkennen.

Um den Umsatz der Reaktion mit kompartmentierter *MIADH*-*BVMO* zu steigern, wurde der Einfluss des Lösungsmittels untersucht (Tabelle 9). Das Lösemittel beeinflusst die Substratlöslichkeit und damit auch die Diffusionsgeschwindigkeit aller Reaktanden und ist damit von Interesse.

**Tabelle 9: Einfluss verschiedener Lösemittel auf die Umsetzung von Ricinolsäure zum Ester mit Hilfe immobilisierter *MIADH*-*BVMO* bei 35 °C; 3 g/L *MIADH*-*BVMOH* Zellen, 5 mM Ricinolsäure**

Lösungsmittel	Umsatz zum Keton	Umsatz zum Ester
<b>DMSO</b>	36% ( $\pm 3,3$ )	-
<b>Heptanol</b>	-	-
<b>MTBE</b>	-	-
<b><i>n</i>-Heptan</b>	40% ( $\pm 2,7$ )	26% ( $\pm 4$ )
<b><i>n</i>-Hexan</b>	21% ( $\pm 3$ )	16% ( $\pm 3$ )
<b><i>n</i>-Octan</b>	37% ( $\pm 2,3$ )	21% ( $\pm 2,7$ )
<b><i>n</i>-Decan</b>	41% ( $\pm 1,5$ )	27% ( $\pm 3,3$ )

Die untersuchten Lösemittel beschränken sich auf unpolare Lösemittel. Da die Polymeroberfläche von NOA 81 hydrophob ist, soll so ein Eindringen des Lösemittels in das Polymer und damit mögliche eine Deaktivierung des Katalysators vermieden werden. Bei allen Lösemitteln wurde darauf geachtet, dass sich das Substrat sehr gut löst. Die untersuchten Lösemittel zeigen ähnlich zu dem Experiment in *n*-Heptan schlechte Ausbeuten der gewünschten Zielverbindung. Die Kaskade in *n*-Decan zeigt im Vergleich zu den anderen Lösemitteln die besten Ergebnisse, weshalb alle folgenden Experimente in *n*-Decan durchgeführt wurden.

Darüber hinaus ist die Wasserkonzentration in den Einschlussimmobilisierungen entscheidend, da die Enzyme nur unter wässrigen Bedingungen ausreichend gut katalysieren. Daher wurde die Pufferkonzentration in den Kompartimenten von 200  $\mu$ L auf 400  $\mu$ L und 800  $\mu$ L erhöht. Es konnten 26% der Zielverbindung bei einer

Wassermenge von 400  $\mu\text{L}$  und 23% bei einer Wassermenge von 800  $\mu\text{L}$  zum Ester umgesetzt werden. An Hand dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die davor gewählten 200  $\mu\text{L}$  bereits eine ausreichende Menge an Wasser darstellen.

Im Folgenden wurden weitere Einflussfaktoren der Reaktion untersucht, um die Produktivität der Reaktion zu steigern. So wurde beispielsweise das organische Lösemittel mit Wasser gesättigt um ein Herausdiffundieren des Wassers aus dem Polymer einzuschränken. Weiterhin wurde das Polymer vor der Zugabe der Reaktanden in Puffer oder *n*-Decan gewaschen, um eventuelle Substanzen, die sich aus dem Polymer herauslösen könnten und einen deaktivierenden Einfluss auf die Reaktion haben, heraus zu spülen. Zudem wurde anstatt des Riesenberg Mediums, welches für die Immobilisierung genutzt wurde andere Puffer wie Beispielsweise Tris-HCl Puffer oder Phosphatpuffer ausprobiert. Außerdem wurden die Zellen vor der Immobilisierung Tris-HCl Puffer oder Phosphatpuffer gewaschen. Alle diese Modifizierungsversuche hatten jedoch keinen oder kaum Einfluss auf die Gesamtreaktion und es konnten nur Umsätze bis zu 30% erzielt werden. Auch die Erhöhung der Zellkonzentration brachte keine zufriedenstellenden Ergebnisse.

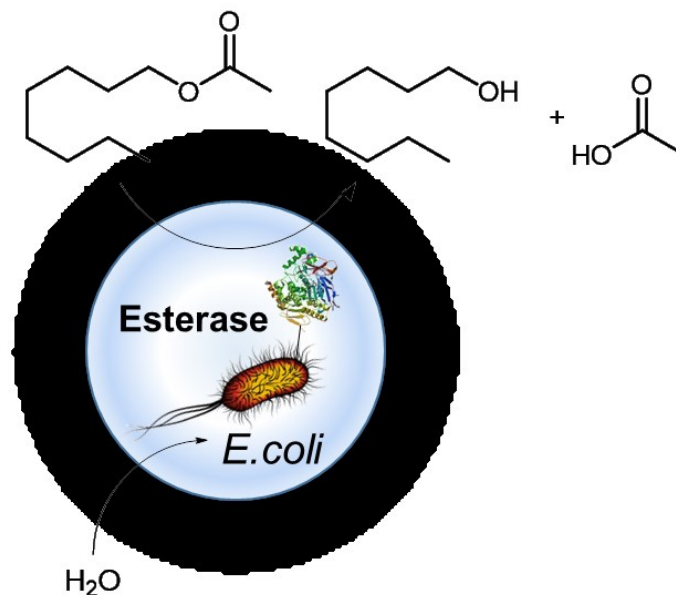
An dieser Stelle ist weiterhin hervorzuheben, dass der Teilschritt der Bayer-Villiger-Monooxygenase durch die Zulieferung von molekularem Sauerstoff in den üblichen wässrigen Medien der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Durch die sehr hohe Oberfläche der der Kompartimente im Zusammenspiel mit der deutlich höheren Sauerstofflöslichkeit in organischen Lösemitteln sollte eine ausreichend hohe Konzentration an Sauerstoff gewährleistet sein.<sup>131</sup> Um die Produktivität der Reaktionskaskade jedoch zu steigern, wurde bei jeder Probenentnahme zusätzlicher Sauerstoff in das organische Lösemittel eingeleitet und damit gesättigt. Jedoch konnte auch mit dieser Methode keine Umsatzsteigerung erreicht werden.

In der Gesamtheit gelang leider keiner der unternommenen Versuche die Umsätze der Reaktion zu steigern. Mögliche Erklärung hierfür sind schwer zu finden, da zum einen mögliche Transportmechanismen der Zellen teilweise unbekannt und zum anderen viele der gedachten inhibierenden Faktoren verändert wurden, aber keine Wirkung zeigten. Zudem wirkt sich die entstandene Keto-Verbindung toxisch auf die BVMO Zellen aus, was wiederum die Gesamtreaktion inhibiert.<sup>132</sup> Die BVMO scheint daher ungeeignet für eine Immobilisierung in dem Polyurethan-basierten Polymermaterial zu sein. Auf Grund dieser Erkenntnis konnte die Kaskade nach

Abbildung 45 nicht weiter verfolgt werden, da zu geringe Ausbeuten des Esters gewonnen und damit eine weiter Umsetzung unmöglich machten. An dieser Stelle ist jedoch positiv zu vermerken, dass zwar eine Immobilisierung die zweite Teilreaktion inhibiert, jedoch kann das Produkt, wenn auch in geringen Ausbeuten, nach längerer Lagerung gut extrahiert werden. In Abbildung 50 (A) ist deutlich zu erkennen, dass ohne Immobilisierung die Produkte nach circa 6 h „verschwinden“. Dies ist dadurch zu erklären, dass die Zelle alle Reaktanden als Kohlenstoffquelle benutzt um zu überleben, wodurch sowohl Substrat als auch Produkt abgebaut werden. Bei einer Immobilisierung hingegen (Abbildung 50 (B)) bleiben die Verbindungen bestehen und können selbst nach langer Reaktionszeit aus der Lösung gewonnen werden.

#### 5.4.1 Ganzzellbiotransformation von *n*-Octylacetat

In weiteren Experimenten wurde die Ganzzellbiotransformation von *n*-Octylacetat mit immobilisierter Esterase untersucht (Abbildung 51).<sup>[1]</sup>

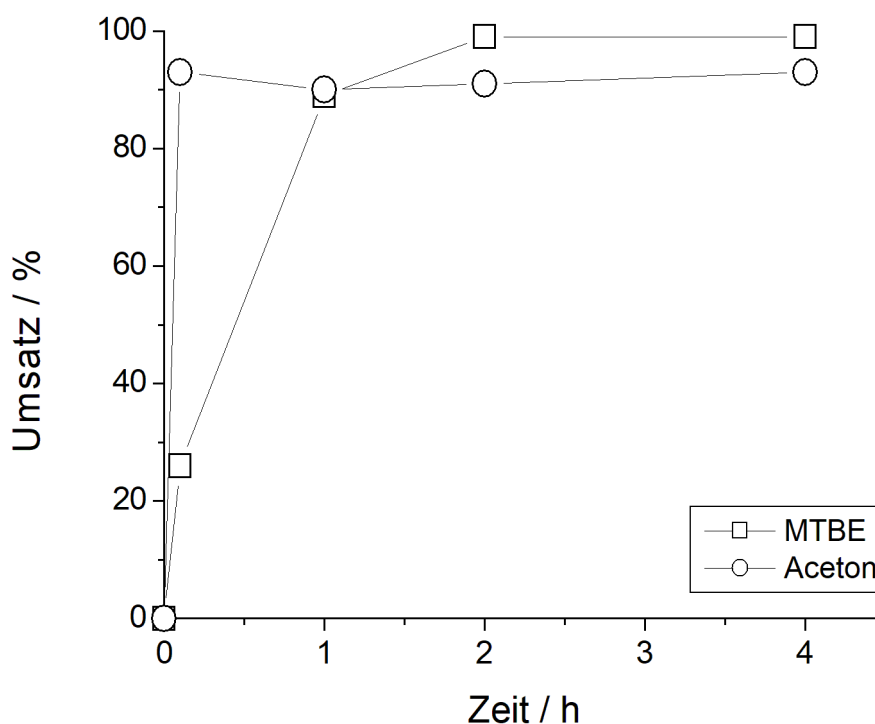


**Abbildung 51: Ganzzellbiotransformation der Hydrolyse von *n*-Octylacetat mit der Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* SIK WI**

<sup>[1]</sup> Uhrich, D.; Jang H.-Y.; Park, J.-B.; von Langermann, J. Characterization and Application of Chemical-resistant Polyurethane-based Enzyme and Whole Cell Compartments. *Journal of Biotechnology* **2018**, eingereicht

Bei der durch die Esterase aus *Pseudomonas fluorescens* SIK WI katalysierten Hydrolysereaktion von *n*-Octylacetat entstehen Octanol und Essigsäure als Endprodukte. Hierbei wurde der Katalysator als ganze Zelle, exprimiert in *E. coli* BL21(DE3), mit der bereits beschriebenen Immobilisierungsmethode (Kapitel 4.10) kompartimentiert, während *n*-Octylacetat im organischen Lösemittel gelöst ist und so durch Diffusion zum Produkt umgesetzt werden konnte.

Die Reaktion wurde zunächst in den zwei Lösemitteln MTBE und Aceton getestet. Für die Reaktion wurde die Esterase exprimiert, immobilisiert und zerkleinert und anschließend in 20 mL Aceton oder MTBE gegeben. Die Reaktionsmischung wurde mit 10 mM Substrat versetzt und für 6 h geschüttelt. Der Reaktionsverlauf kann in Abbildung 52 beobachtet werden.



**Abbildung 52: Umsatz von Octanol in MTBE und Aceton mit immobilisierter Esterase bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10 mM *n*-Octylacetat**

In beiden Lösemitteln konnte *n*-Octylacetat erfolgreich zu Octanol umgesetzt werden. Die Reaktion verläuft in MTBE und Aceton sehr schnell und in sehr guten Ausbeuten. In MTBE konnte nach 2 h 98% ( $\pm 0,7$ ) und in Aceton nach 1 h 93% ( $\pm 1$ ) zu Octanol



umgesetzt werden. Da die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit in Aceton schneller ist, als die in MTBE wurden alle Folgereaktionen in Aceton durchgeführt. Die Reaktion ist ein weiteres Beispiel dafür, dass kleine Substrate sehr schnell durch die Polymermembran diffundieren können, sodass keinerlei Diffusionslimitierung beobachtet werden konnte.

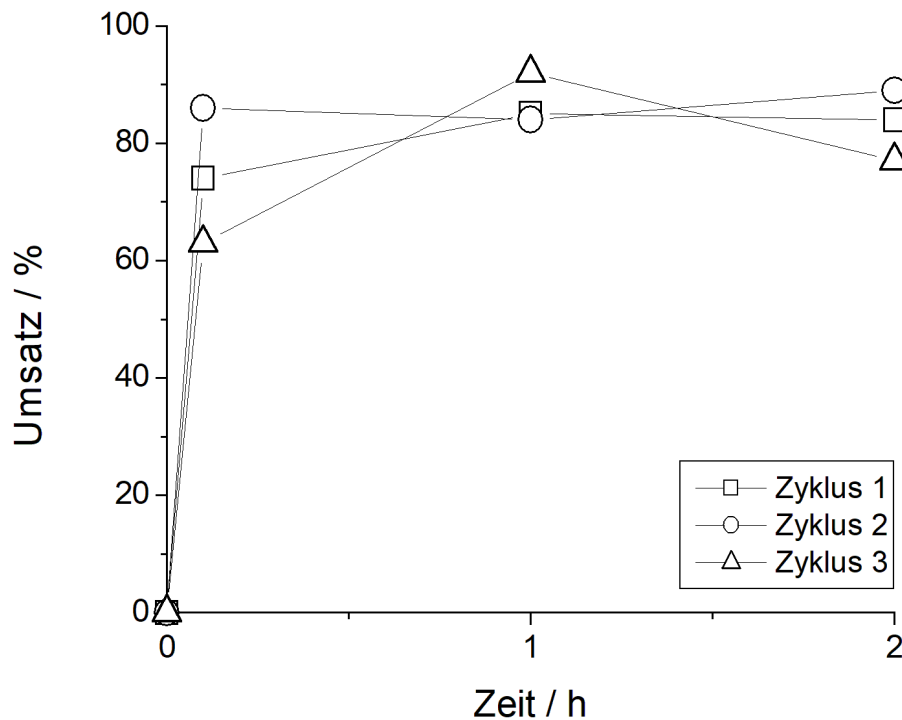
Anschließend wurde eine Maßstabsvergrößerung durchgeführt und die Substratkonzentration von *n*-Octylacetat auf 50, 100 und 200 mM erhöht (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Umsatz von *n*-Octylacetat zu Octanol in MTBE bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10, 50, 100 und 200 mM *n*-Octylacetat**

<b>Substratkonzentration</b>	<b>Umsatz</b>
<b>10 mM</b>	93%
<b>50 mM</b>	90%
<b>100 mM</b>	81%
<b>200 mM</b>	58%

Auch bei höheren Konzentrationen konnte *n*-Octylacetat erfolgreich zu Octanol umgesetzt werden. So wurde bei 10 mM Substratkonzentration 93% und bei 50 mM Substratkonzentration 90% konvertiert. Noch höhere Konzentrationen von *n*-Octylacetat konnten auch umgesetzt werden, bedürfen aber höherer Enzymkonzentration oder längere Reaktionszeiten. Bei gleichbleibender Katalysatormenge (3 g/L Esterase Zellen) und Reaktionszeit (2 h) konnten 100 mM und 200 mM Substratkonzentration zu 81% bzw. 58% Octanol umgesetzt werden. Bei Verlängerung der Reaktionszeit sollte auch ein vollständiger Umsatz möglich sein. Zudem ist weiter positiv hervorzuheben, dass die Kompartimente das Enzym bzw. die Zelle vor einem inhibierenden Einfluss von Aceton schützen.

Abschließend, wurde die Rezyklierbarkeit des Katalysators untersucht (Abbildung 53).



**Abbildung 53: Recyclbarkeit der Reaktion von *n*-Octylacetat mit immobilisierter Esterase in Aceton bei 35 °C; 3 g/L Esterase Zellen, 10 mM *n*-Octylacetat**

Die Kompartimente wurde dazu zu 10 mM Substrat, gelöst in 20 mL Aceton, gegeben. Durch die Kompartimentierung konnte das Polymer nach 2 h (Reaktionsende) durch einfache Filtration aus der Reaktionslösung gewonnen werden. Anschließend wurde es wieder in frische 20 mL Aceton mit 10 mM Substrat gegeben (Zyklus 2). Auf diese Weise wurde die Biotransformation drei Mal durchgeführt. Bei allen drei Zyklen konnten ähnlich gute Umsätze von bis zu 92% Octanol erzielt werden. Zudem wurde keinerlei Verlust von katalytischer Aktivität und Stabilität beobachtet. Auf Grund von Zeitmangel konnten weitere Zyklen leider nicht durchgeführt werden, weshalb die Rezyklierungsexperimente Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurde das auf Polyurethan-basierte Polymer NOA 81 auf seine Tauglichkeit für Einschlussimmobilisierungen untersucht. Dafür wurde das Polymer zunächst hinreichend charakterisiert. Die durch die Immobilisierung entstandenen wässrigen Einschlüsse bleiben als vollständige Sphären innerhalb des Polymers während der Reaktion fixiert. Die Sphären sind dabei zerstreut und statistisch im Polymer verteilt. In den wässrigen Einschlüssen befinden sich alle gelösten Verbindungen wie beispielweise Enzyme oder Cofaktoren. Sie bilden zusammen mit dem Polymer und dem umgebenen Lösemittel bei Reaktionen ein 3-Phasen System. Der Proteintransport wurde vor allem durch das relativ dichte und hydrophobe Polymernetzwerk, im Vergleich zur Größe und Polarität des Enzyms, verhindert, weshalb keinerlei Leaching des Proteins zu beobachten war. Detaillierte Untersuchungen zum Stofftransport konnten leider auf Grund von Zeitmangel nicht durchgeführt werden und bleiben daher Gegenstand für Folgearbeiten.

Hinsichtlich der Beladung der Kompartimente konnten bis zu 37,5 Gew% einer wässrigen Phase, ohne Beeinflussung der Aushärtung, immobilisiert werden. Die Proteinkonzentration hatte hingegen keinen Einfluss auf die Aushärtung. Mit Hilfe der Karl-Fischer-Titration wurde ein Wasserverlust nach 24 h von ca. 15% detektiert, welcher hinreichend niedrig für eine Enzymkatalyse ist. Die Größenverteilung der wässrigen Einschlüsse erstreckten sich überwiegend zwischen 5-75  $\mu\text{m}$ , mit einigen wenigen größeren Einschlüssen über 100  $\mu\text{m}$ .

Des Weiteren wurde die Stabilität gegenüber Säuren und Basen, sowie Lösemitteln untersucht. NOA 81 ist in Säuren stabil, löst sich in Basen durch eine Verseifungsreaktion jedoch auf. Das Lösemittelscreening brachte die Erkenntnisse, dass sich das Polymer in keinem der untersuchten Lösemittel auflöste und auch ein geringes Quellverhalten zu beobachten war.

Neben der chemischen Resistenz wurden auch die mechanischen Eigenschaften des Polymers untersucht. Hierzu wurde das Druck- und Zugverhalten der Kompartimente analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass durch eine Immobilisierung die mechanischen Eigenschaften nur geringfügig verändert wurden.

Im Gegensatz zu konventionellen Silikon-basierten Kompartimenten oder Sol-Gelen, sind PUR-Kompartimente stabiler und flexibler und eignen sich daher besser für präparative Anwendungen.

In weiteren Arbeiten wurde die *LkADH* katalysierte Reaktion von Acetophenon zu Phenylethanol mit zwei unterschiedlichen Cofaktorregenerierungssystemen (enzym- und substratgekoppelt) untersucht. Die Reaktionen konnten mit beiden Cofaktorregenerierungssystemen erfolgreich durchgeführt werden und erzielten ähnliche Umsätze von ca. 60-65%. Außerdem wurde der Einfluss der Katalysatormenge und die UV-Bestrahlung auf die Reaktion untersucht. Es wurde ersichtlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion zunimmt je mehr PUR-*LkADH* Katalysator verwendet wurde. Eine Beeinträchtigung der UV-Bestrahlung auf die Aktivität des Enzyms konnte nicht festgestellt werden. Um die ausreichende Eignung der Immobilisate auch nach längerer Lagerzeit zu gewährleisten, wurde die Stabilität der PUR-Enzym-Kompartimente untersucht. Bei einer Lagerung bei tiefen Temperaturen war kein bzw. wenig Aktivitätsverlust erkennbar. Anders war dies bei einer Lagerung bei Raumtemperatur, wobei bereits nach 7 Tagen Lagerzeit die Aktivitäten drastisch sanken. Für industrielle Anwendungen ist auch eine wiederholte Nutzung des Katalysators von Interesse. Die Kompartimente wiesen eine gute Recyclbarkeit auf, wobei jedoch nach mehreren Reaktionszyklen der Umsatz der Reaktion sank, welches den langen Reaktionszeiten zu Grunde lag. In weiteren Arbeiten wurden verschiedene Brom- und Chlorderivate des Acetophenons durch immobilisierte *LkADH* mit beiden Cofaktor-regenerierungssystemen umgesetzt, wobei die besten Umsätze jeweils mit den para-substituierten Derivate erzielt wurden. Abschließend wurden die prochiralen Ketone 2-Pentanon, 2-Heptanon, 2-Nonanon und 2-Dodecanon von einer kompartimentierten *LkADH* und *LbADH* zu ihren korrespondierenden Alkoholen umgewandelt. Speziell kleine und polare Substrate wie 2-Pentanon und 2-Heptanon konnten sehr schnell durch beide kompartimentierten Alkoholdehydrogenasen reduziert werden.

Ziel dieser Doktorarbeit war unter anderem auch der Aufbau von Kaskadenreaktionen unter Katalyse von kompartimentierten Enzymen. Hierzu wurde die *LkADH* katalysierte Reaktion von 2-Heptanon zu 2-Heptanol mit einer CalB katalysierten Reaktion kombiniert. Als Acyldonoren wurden IPB, IPO, IPD und IPP verwendet. Nach erfolgreicher Umsetzung der einzelnen Teilreaktionen wurde die

Kaskade in verschiedenen Lösemitteln untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass hydrophobe Lösemittel wie *n*-Dodecan die besten Umsätze generierte (Endumsatz 68%). Es wurde außerdem deutlich, dass mit zunehmender Kohlenstoffatomanzahl des Acyldonors die Reaktionsgeschwindigkeit und auch der Umsatz der Reaktion steigen. Des Weiteren wurde ersichtlich, dass die gleiche Reaktion in einem Zweiphasensystem ohne Kompartimentierung die Hydrolyse des Esters favorisiert. Die Kompartimentierung ermöglicht daher den Einsatz von organischen Lösemitteln und die Bildung des gewünschten Produktes.

Als letzter Teil dieser Doktorarbeit wurde die Kompartimentierung ganzer Zellen untersucht. Die ganzen Zellen konnten ohne Anpassung der Immobilisierungsmethode erfolgreich kompartimentiert werden. Zunächst wurde eine mehrstufige Enzymkaskade ausgehend von Ricinolsäure im Rahmen einer Ganzzellbiotransformation aufgebaut. Ricinolsäure konnte in der ersten Teilreaktion mit kompartimentierter *MIADH* erfolgreich bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen zum gewünschten Produkt umgesetzt werden. Im zweiten Schritt der Kaskade, sollte die entstandene Keto-Verbindung durch eine *BVMO* zu einem Ester oxidiert werden. Hierbei wurde ein kombinierter Strang aus *MIADH* und *BVMO*, welcher beide Enzyme exprimiert, kompartimentiert. Bei der Reaktion konnten jedoch nur 17% des Substrates zur Zielverbindung umgesetzt werden. Um den Umsatz der Reaktion zu steigern, wurde anschließend verschiedene Einflussfaktoren der Reaktion wie beispielsweise das Lösemittel, die Wasserkonzentration in den Kompartimenten oder die Sauerstoffzugabe untersucht. Alle Modifizierungsversuche hatten jedoch keinen, oder kaum Einfluss auf die Gesamtreaktion und es konnten nur Umsätze bis zu 30% erzielt werden. Auf Grund dieser Ergebnisse konnte die Kaskade nicht weiter verfolgt werden weshalb in anschließenden Experimenten die Ganzzellbiotransformation von *n*-Octylacetat zu Octanol mit immobilisierter Esterase untersucht wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion verläuft sehr schnell und es konnten bei einer Substratkonzentration von 10 mM Umsätze von bis zu 98% in MTBE und 93% in Aceton generiert werden. In abschließenden Experimenten wurde die Reaktion mit höheren Substratkonzentrationen durchgeführt und auch die Recyclbarkeit untersucht. Auch bei höheren Konzentrationen konnte *n*-Octylacetat erfolgreich zu Octanol umgesetzt werden. Bei den Untersuchungen zur Recyclbarkeit konnten bei allen drei Zyklen ähnlich gute Umsätze von bis zu 92%

Octanol erzielt werden. Zudem wurde keinerlei Verlust von katalytischer Aktivität und Stabilität beobachtet.

Das in dieser Doktorarbeit beschriebene Konzept der Einschlussimmobilisierungen von Biokatalysatoren in NOA 81 stellt eine einfache Möglichkeit Enzyme zu immobilisieren und in biokatalytischen Reaktionen einzusetzen dar. Die UV-basierte Möglichkeit der Einschlussimmobilisierung mit NOA 81 ist bis zum heutigen Stand neu und noch nicht in der Literatur beschrieben. Die Methode bietet viele Vorteile wie beispielsweise Rezyklierbarkeit und lässt sich einfach auch auf andere Reaktionssysteme übertragen. Zudem ist der Aushärtungsprozess einfach, schnell und kostensparend. Dies bietet vor allem Vorteile gegenüber herkömmlichen Kompartimenten wie beispielsweise Sol-Gelen, oder einer kovalenten Immobilisierung.<sup>31</sup> Zudem müssen keine weiteren Chemikalien für die Immobilisierung verwendet werden, welche einen negativen Einfluss auf die Enzymaktivität haben können, wie beispielsweise bei CLEAs (crosslinked enzyme aggregates).<sup>32</sup> Ein weiterer Vorteil ist die gute Lösemittel- und Säurestabilität der Matrix. Ein Nachteil besteht jedoch bei der Verwendung von Basen. Die GC-Analysen wiesen außerdem darauf hin, dass während Reaktionen sich Teile aus den Kompartimenten herauslösen. Ein negativer Einfluss dieser Verbindungen auf die Reaktionen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Trotzdem wären für Folgeexperimente eine Strukturaufklärung und die Untersuchung von NOA 81 als möglicher Katalysator von Interesse. Zudem sollten detaillierte Untersuchungen zum Stofftransport angefertigt werden, da bei vielen Reaktionen Diffusionslimitierungen beobachtet werden konnten und dementsprechend die Reaktionen sehr langsam verliefen. Eine mögliche Stabilitätssteigerung bei höheren Temperaturen auf Grund von Kompartimentierung konnte nicht festgestellt werden. Dies wurde jedoch auch nur in Ansätzen untersucht und sollte daher auch Gegenstand weiterer Experimente sein. Bezüglich weiterer Experimente wären außerdem neue Kaskadenreaktion mit anderen Enzymen interessant. Hierbei könnten Transaminase oder Lipase katalysierte Reaktionen, zu synthetisch wichtigen Produkten, von Interesse sein. Einer der größten Vorteile der Immobilisierungsmethode, ist die Schaffung von abgetrennten Reaktionsräumen. Interessant sind daher vor allem Reaktionen, die unterschiedliche Reaktionsbedingungen benötigen, da durch eine Kompartimentierung diese an die einzelnen Enzyme angepasst werden können. Es ist jedoch zu beachten, dass Enzym-katalysierte Kaskadenreaktionen durchaus

ähnlich Reaktionen katalysieren, wodurch die Selektivität stark sinken kann und das System sehr komplex wird. Es wäre auch denkbar anstelle von Enzymen andere Stoffe oder sogar organische Lösemittel zu immobilisieren um Kaskadenreaktionen zu katalysieren, welche abgetrennte Reaktionsräume benötigen. Weiterhin können andere Polymere, wie beispielsweise Polyester oder Polystyrol zur Immobilisierung genutzt werden. Sie weisen andere Polymernetzwerke und Porengrößen auf, was sich auf die Reaktion und Umsätze auswirken kann. Zudem sollte versucht werden erfolgversprechende (Kaskaden)reaktionen in einem größeren Maßstab durchzuführen, um eine Produktisolierung zu ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- (1) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185–194.
- (2) Reetz, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 12480–12496.
- (3) Wohlgemuth, R. Biocatalysis: key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* **2010**, *21*, 713–724.
- (4) Payen, A.; Persoz, J. F. *Annales de Chimie et de Physique* **1833**, *53*, 73–92.
- (5) Bornscheuer, U. T.; Buchholz, K. Highlights in Biocatalysis: Historical Landmarks and Current Trends. *Engineering in Life Sciences* **2005**, *5*, 309–323.
- (6) Katchalski-Katzir, E. Immobilized enzymes: learning from past successes and failures. *TibTech* **1993**, *11*, 471–478.
- (7) Fischer, E. Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*, 2985–2993.
- (8) Drauz, K.; Gröger, H.; May, O. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3rd ed.; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2012**.
- (9) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th ed.; Springer: Heidelberg, **2011**.
- (10) Rosenthaler, L. Durch Enzyme bewirkte asymmetrische Synthese. *Biochemische Zeitschrift* **1908**, *14*, 238–253.
- (11) Glick, B. R.; Pasternack, J. J.; Patten, C. L. *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, 4th ed.; John Wiley & Sons: Washington, **2010**.
- (12) Guterl, J.-K.; Sieber, V. Biosynthesis “debugged”: Novel bioproduction strategies. *Engineering in Life Sciences* **2013**, *13*, 4–18.
- (13) Sheldon, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 1437–1451.
- (14) Muzzalupo, I. *Food Industry*; InTech: Rijeka, **2013**.
- (15) García-Junceda, E.; García-García, J. F.; Bastida, A.; Fernández-Mayoralas, A. Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 1817–1834.
- (16) Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C. *Industrial Biotransformations*; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**.
- (17) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. Dispelling the Myths—Biocatalysis in industrial Synthesis. *Science* **2003**, *299*, 1694–1697.
- (18) Gotor, V.; Alfonso, I.; Garcia-Urdiales, E. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2008**.
- (19) Tao, J.; Lin, G.-Q.; Liese, A. *Biocatalysis for the Pharmaceutical Industry*; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Singapur, **2009**.
- (20) Tufvesson, P.; Lima-Ramos, J.; Nordblad, M.; Woodley, J. M. Guidelines and Cost Analysis for Catalyst Production in Biocatalytic Processes. *Organic Process Research & Development* **2011**, *15*, 266–274.
- (21) Muñoz Solano, D.; Hoyos, P.; Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; Sánchez-Montero, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresource Technology* **2012**, *115*, 196–207.
- (22) Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews* **2009**, *38*, 453–468.



- (23) Turner, N. J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 567–573.
- (24) Lutz, S.; Bornscheuer, U. T. *Protein Engineering Handbook*, 3rd ed.; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2009**.
- (25) Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T. Finding better protein engineering strategies. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 526–529.
- (26) Behrens, G. A.; Hummel, A.; Padhi, S. K.; Schätzle, S.; Bornscheuer, U. T. Discovery and Protein Engineering of Biocatalysts for Organic Synthesis. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2011**, *353*, 2191–2215.
- (27) Christen, P.; Jaussi, R. *Biochemie: Eine Einführung mit 40 Lerneinheiten*; Springer: Heidelberg, **2004**.
- (28) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Gatto jr., G. J. *Biochemie*, 8th ed.; Springer Spektrum: Heidelberg, **2017**.
- (29) Ebner, F.; Gehre, L. A. M.; Tallian, C. *Naturstoffe und Biochemie*; Springer Spektrum: Heidelberg, **2017**.
- (30) Sivakumar, P. K.; Joe, M. M.; Suresh, K. *An Introduction to Industrial Microbiology*; S. Chad & Company Ltd: New Delhi, **2010**.
- (31) Betancor, L.; Luckarift, H. R. Bioinspired enzyme encapsulation for biocatalysis. *Trends in Biotechnology* **2008**, *26*, 566–572.
- (32) Schoffelen, S.; van Hest, J. C. M. Multi-enzyme systems: Bringing enzymes together in vitro. *Soft Matter* **2012**, *8*, 1736–1746.
- (33) Mustacchi, R.; Knowles, C. J.; Li, H.; Dalrymple, I.; Sunderland, G.; Skibar, W.; Jackman, S. A. The effect of whole cell immobilisation on the biotransformation of benzonitrile and the use of direct electric current for enhanced product removal. *Biotechnology and Bioengineering* **2005**, *91*, 436–440.
- (34) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 6th ed.; Springer: Heidelberg, **2011**.
- (35) Sheldon, R. A.; van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42*, 6223–6235.
- (36) Sheldon, R. A. E factors, green chemistry and catalysis: An odyssey. *Chemical Communications* **2008**, 3352–3365.
- (37) Zeikus, J. G.; Jain, M. K.; Elankovan, P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1999**, *51*, 545–552.
- (38) Davies, H. G.; Green, R.; Kelly, D. R.; Roberts, S. M. *Biotransformations in Preparative Organic Chemistry: The Use of Isolated Enzymes and Whole Cell Systems in Synthesis*; Academic Press: London, **2012**.
- (39) Kara, S.; Schrittwieser, J. H.; Hollmann, F.; Ansorge-Schumacher, M. B. Recent trends and novel concepts in cofactor-dependent biotransformations. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2014**, *98*, 1517–1529.
- (40) Weckbecker, A.; Gröger, H.; Hummel, W. *Regeneration of Nicotinamide Coenzymes: Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compounds*; Springer: Heidelberg, **2010**.
- (41) Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*; Springer: Chile, **2008**.
- (42) Weckbecker, A.; Hummel, W. Cloning, expression, and characterization of an (R)-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. *Biocatalysis and Biotransformation* **2009**, *24*, 380–389.
- (43) Kragl, U.; Kruse, W.; Hummel, W.; Wandrey, C. Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example. *Biotechnology and Bioengineering* **1996**, *52*, 309–319.

- (44) Temiño, D. M.-R. D.; Hartmeier, W.; Ansorge-Schumacher, M. B. Entrapment of the alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir* in polyvinyl alcohol for the synthesis of chiral hydrophobic alcohols in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* **2005**, *36*, 3–9.
- (45) Niefind, K.; Müller, J.; Riebel, B.; Hummel, W.; Schomburg, D. The Crystal Structure of R-specific Alcohol Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* Suggests the Structural Basis of its Metal Dependency. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *327*, 317–328.
- (46) Bradshaw, C. W.; Hummel, W.; Wong, C.-H. *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis. *Journal of Organic Chemistry* **1992**, *57*, 1533–1536.
- (47) Hummel, W. Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments. *TibTech* **1999**, *17*, 487–492.
- (48) Stawoska, I.; Dudzik, A.; Wasylewski, M.; Jemiola-Rzemińska, M.; Skoczowski, A.; Strzałka, K.; Szaleniec, M. DFT-based prediction of reactivity of short-chain alcohol dehydrogenase. *Journal of Computer-aided Molecular Design* **2017**, *31*, 587–602.
- (49) Halloum, I.; Thompson, B.; Pugh, S.; Nielsen, D. Activity of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase on Primary and Secondary Alcohol Biofuel Precursors. *Fermentation* **2015**, *1*, 24–37.
- (50) Machiels, R.; Looger, L. L.; Raedts, J.; Dijkhuizen, S.; Hummel, W.; Hennemann, H.-G.; Daussmann, T.; van der Oost, J. Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design. *Engineering in Life Sciences* **2009**, *9*, 38–44.
- (51) 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*, 574–581.
- (52) Jang, H.-Y.; Jeon, E.-Y.; Baek, A.-H.; Lee, S.-M.; Park, J.-B. Production of  $\omega$ -hydroxyundec-9-enoic acid and n-heptanoic acid from ricinoleic acid by recombinant *Escherichia coli*-based biocatalyst. *Process Biochemistry* **2014**, *49*, 617–622.
- (53) Cho, Y.-H.; Kim, S.-J.; Kim, H.-W.; Kim, J. Y.; Gwak, J. S.; Chung, D.; Kim, K. H.; Park, K.; Park, Y.-C. Continuous supply of glucose and glycerol enhances biotransformation of ricinoleic acid to (E)-11-(heptanoyloxy) undec-9-enoic acid in recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **2017**, *253*, 34–39.
- (54) Jeon, E.-Y.; Seo, J.-H.; Kang, W.-R.; Kim, M.-J.; Lee, J.-H.; Oh, D.-K.; Park, J.-B. Simultaneous Enzyme/Whole-Cell Biotransformation of Plant Oils into C9 Carboxylic Acids. *ACS Catalysis* **2016**, *6*, 7547–7553.
- (55) Song, J.-W.; Jeon, E.-Y.; Song, D.-H.; Jang, H.-Y.; Bornscheuer, U. T.; Oh, D.-K.; Park, J.-B. Multistep enzymatic synthesis of long-chain  $\alpha,\omega$ -dicarboxylic and  $\omega$ -hydroxycarboxylic acids from renewable fatty acids and plant oils. *Angewandte Chemie* **2013**, *52*, 2534–2537.
- (56) Jeon, E.-Y.; Baek, A.-H.; Bornscheuer, U. T.; Park, J.-B. Enzyme fusion for whole-cell biotransformation of long-chain sec-alcohols into esters. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2015**, *99*, 6267–6275.
- (57) Lee, J. H.; Choi, S. H.; Hwang, I. Y.; Park, J. B.; Han, S.; Lee, H.; Park, C.-H.; Lee, E. Y. Preparation of 11-hexyloxy-9-undecenoic acid from crude castor oil hydrolysates by recombinant *Escherichia coli* expressing alcohol dehydrogenase and Baeyer–Villiger monooxygenase. *Process Biochemistry* **2016**, *51*, 362–368.
- (58) Baek, A.-H.; Jeon, E.-Y.; Lee, S.-M.; Park, J.-B. Expression levels of chaperones influence biotransformation activity of recombinant *Escherichia coli* expressing *Micrococcus luteus* alcohol dehydrogenase and *Pseudomonas putida* Baeyer–Villiger monooxygenase. *Biotechnology and Bioengineering* **2015**, *112*, 889–895.
- (59) Seo, J.-H.; Kim, H.-H.; Jeon, E.-Y.; Song, Y.-H.; Shin, C.-S.; Park, J.-B. Engineering of Baeyer–Villiger monooxygenase-based *Escherichia coli* biocatalyst for large scale biotransformation of ricinoleic acid into (Z)-11-(heptanoyloxy)undec-9-enoic acid. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 1–9.

- (60) Donoghue, N. A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. The Purification and Properties of Cyclohexanone Oxygenase from *Nocardia globberula* CL1 and *Acinetobacter* NCIB 9871. *European Journal of Biochemistry* **1976**, *63*, 175–192.
- (61) Rehdorf, J.; Kirschner, A.; Bornscheuer, U. T. Cloning, expression and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Pseudomonas putida* KT2440. *Biotechnology Letters* **2007**, *29*, 1393–1398.
- (62) Kim, H.; Park, S.; Cho, S.; Yang, J.; Jeong, K.; Park, J.; Lee, J. Bioprocess engineering to produce 9-(nonanoyloxy) nonanoic acid by a recombinant *Corynebacterium glutamicum*-based biocatalyst. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2017**, *44*, 1301–1311.
- (63) Cha, H.-J.; Seo, E.-J.; Song, J.-W.; Jo, H.-J.; Kumar, A. R.; Park, J.-B. Simultaneous Enzyme/Whole-Cell Biotransformation of C18 Ricinoleic Acid into (R)-3-Hydroxynonanoic Acid, 9-Hydroxynonanoic Acid, and 1,9-Nonanedioic Acid. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2018**, *360*, 696–703.
- (64) Uppenberg, J.; Jones, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, *2*, 293–308.
- (65) Qian, Z.; Fields, C. J.; Lutz, S. Investigating the structural and functional consequences of circular permutation on lipase B from *Candida antarctica*. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* **2007**, *8*, 1989–1996.
- (66) Qian, Z.; Horton, J. R.; Cheng, X.; Lutz, S. Structural redesign of lipase B from *Candida antarctica* by circular permutation and incremental truncation. *Journal of Molecular Biology* **2009**, *393*, 191–201.
- (67) Arroyo, M.; Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of wateractivity on enzymatic activity inorganic media. *Enzyme and Microbial Technology* **1999**, *24*, 3–12.
- (68) Uppenberg, J.; Jones, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* **1994**, *2*, 293–308.
- (69) Uppenberg, J.; Oehrner, 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*, 16838–16851.
- (70) Pfeiffer, J. C. *The Lipases from Candida Antarctica*. Universität Stuttgart **2008**.
- (71) Anderson, E. M.; Larsson, K. L.; Kirk, O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* **1997**, *16*, 181–204.
- (72) Blank, K.; Morfill, J.; Gump, H.; Gaub, H. E. Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **2006**, *125*, 474–483.
- (73) Hong, K. H.; Jang, W. H.; Choi, K. D.; Yoo, O. J. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Carboxylesterase: Cloning and Expression of the Esterase Gene in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry* **2014**, *55*, 2839–2845.
- (74) Choi, K. D.; Jeohn, G. H.; Rhee, J. S.; Yoo, O. J. Cloning and Nucleotide Sequence of an Esterase Gene from *Pseudomonas fluorescens* and Expression of the Gene in *Escherichia coli*. *Agricultural and Biological Chemistry* **2014**, *54*, 2039–2045.
- (75) Krebsfänger, N.; Zocher, F.; Altenbuchner, J.; Bornscheuer, U. T. Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Enzyme and Microbial Technology* **1998**, *22*, 641–646.
- (76) Lee, Y.-A.; Jeon, E.-Y.; Lee, S.-M.; Bornscheuer, U. T.; Park, J.-B. Engineering the substrate-binding domain of an esterase enhances its hydrolytic activity toward fatty acid esters. *Process Biochemistry* **2014**, *49*, 2101–2106.

- (77) Khalameyzer, V.; Fischer, I.; Bornscheuer, U. T.; Altenbuchner, J. Screening, Nucleotide Sequence and Biochemical Characterization of an Esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards Lactones. *Applied and Environmental Microbiology* **1999**, 477–482.
- (78) Gaitzsch, J.; Huang, X.; Voit, B. Engineering Functional Polymer Capsules toward Smart Nanoreactors. *Chemical Reviews* **2016**, 116, 1053–1093.
- (79) Tanner, P.; Baumann, P.; Enea, R.; Onaca, O.; Palivan, C.; Meier, W. Polymeric vesicles: From drug carriers to nanoreactors and artificial organelles. *Accounts of Chemical Research* **2011**, 44, 1039–1049.
- (80) Tanner, P.; Egli, S.; Balasubramanian, V.; Onaca, O.; Palivan, C. G.; Meier, W. Can polymeric vesicles that confine enzymatic reactions act as simplified organelles? *FEBS Letters* **2011**, 585, 1699–1706.
- (81) Ovádi, J.; Saks, V. On the origin of intracellular compartmentation and organized metabolic systems. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2004**, 256, 5–12.
- (82) Lu, A. X.; Oh, H.; Terrell, J. L.; Bentley, W. E.; Raghavan, S. R. A new design for an artificial cell: Polymer microcapsules with addressable inner compartments that can harbor biomolecules, colloids or microbial species. *Chemical Science* **2017**, 8, 6893–6903.
- (83) Barabási, A.-L.; Oltvai, Z. N. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nature Reviews Genetics* **2004**, 5, 101–113.
- (84) Balasubramanian, V.; Poillucci, A.; Correia, A.; Zhang, H.; Celia, C.; Santos, H. A. Cell Membrane-Based Nanoreactor To Mimic the Bio-Compartmentalization Strategy of a Cell. *ACS Biomaterials Science & Engineering* **2017**, 4, 1471–1478.
- (85) Gräfe, D.; Gaitzsch, J.; Appelhans, D.; Voit, B. Cross-linked polymersomes as nanoreactors for controlled and stabilized single and cascade enzymatic reactions. *Nanoscale* **2014**, 6, 10752–10761.
- (86) Szostak, J. W.; Bartel, D. P.; Luisi, P. L. Synthesizing life. *Nature* **2001**, 409, 387–390.
- (87) Malinova, V.; Nallani, M.; Meier, W. P.; Sinner, E. K. Synthetic biology, inspired by synthetic chemistry. *FEBS Letters* **2012**, 586, 2146–2156.
- (88) Ruder, W. C.; Lu, T.; Collins, J. J. Synthetic biology moving into the clinic. *Science* **2011**, 333, 1248–1252.
- (89) Zecchin, A.; Stapor, P. C.; Goveia, J.; Carmeliet, P. Metabolic pathway compartmentalization: an underappreciated opportunity? *Current Opinion in Biotechnology* **2015**, 34, 73–81.
- (90) Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* **2007**, 40, 1451–1463.
- (91) Jesionowski, T.; Zdarta, J.; Krajewska, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption* **2014**, 20, 801–821.
- (92) Cui, J.; Feng, Y.; Yue, S.; Zhao, Y.; Li, L.; Liu, R.; Lin, T. Magnetic mesoporous enzyme-silica composites with high activity and enhanced stability. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **2016**, 91, 1905–1913.
- (93) Godoy-Gallardo, M.; York-Duran, M. J.; Hosta-Rigau, L. Recent Progress in Micro/Nanoreactors toward the Creation of Artificial Organelles. *Advanced Healthcare Materials* **2017**, 1–35.
- (94) Marguet, M.; Bonduelle, C.; Lecommandoux, S. Multicompartmentalized polymeric systems: Towards biomimetic cellular structure and function. *Chemical Society Reviews* **2013**, 42, 512–529.
- (95) Roodbeen, R.; van Hest, Jan C. M. Synthetic cells and organelles: Compartmentalization strategies. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* **2009**, 31, 1299–1308.

- (96) Yan, Q.; Wang, J.; Yin, Y.; Yuan, J. Breathing polymersomes: CO<sub>2</sub>-tuning membrane permeability for size-selective release, separation, and reaction. *Angewandte Chemie* **2013**, *52*, 5070–5073.
- (97) Cui, J.; van Koeverden, M. P.; Müllner, M.; Kempe, K.; Caruso, F. Emerging methods for the fabrication of polymer capsules. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *207*, 14–31.
- (98) Kim, K. T.; Meeuwissen, S. A.; Nolte, R. J. M.; van Hest, Jan C. M. Smart nanocontainers and nanoreactors. *Nanoscale* **2010**, *2*, 844–858.
- (99) Palivan, C. G.; Fischer-Onaca, O.; Delcea, M.; Itel, F.; Meier, W. Protein-polymer nanoreactors for medical applications. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 2800–2823.
- (100) Hartmeier, W. *Immobilisierte Biokatalysatoren*; Springer: Berlin, 1996.
- (101) Cui, J.; van Koeverden, M. P.; Müllner, M.; Kempe, K.; Caruso, F. Emerging methods for the fabrication of polymer capsules. *Advances in Colloid and Interface Science* **2014**, *207*, 14–31.
- (102) Mytnyk, S.; Olive, A. G. L.; Versluis, F.; Poolman, J. M.; Mendes, E.; Eelkema, R.; van Esch, J. H. Compartmentalizing Supramolecular Hydrogels Using Aqueous Multi-phase Systems. *Angewandte Chemie* **2017**, *56*, 14923–14927.
- (103) Pierre, A. C. The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation* **2009**, *22*, 145–170.
- (104) Gelman, F.; Blum, J.; Schumann, H.; Avnir, D. One-Pot Reactions with Sol-Gel Entrapped Catalysts, Acids and Bases. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2003**, *26*, 43–46.
- (105) Gelman, F.; Blum, J.; Avnir, D. One-Pot Reactions with Opposing Reagents: Sol-Gel Entrapped Catalyst and Base. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 11999–12000.
- (106) Badjić, J. D.; Kadnikova, E. N.; Kostić, N. M. Enantioselective Aminolysis of an  $\alpha$ -Chloroester Catalyzed by *Candida cylindracea* Lipase Encapsulated in Sol-Gel Silica Glass. *Organic Letters* **2001**, *3*, 2025–2028.
- (107) Koszelewski, D.; Müller, N.; Schrittwieser, J. H.; Faber, K.; Kroutil, W. Immobilization of  $\omega$ -transaminases by encapsulation in a sol-gel/celite matrix. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, *63*, 39–44.
- (108) Cabirol, F. L.; Hanefeld, U.; Sheldon, R. A. Immobilized Hydroxynitrile Lyases for Enantioselective Synthesis of Cyanohydrins: Sol-Gels and Cross-Linked Enzyme Aggregates. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348*, 1645–1654.
- (109) Discher, B. M.; Won, Y.-Y.; Ege, D. S.; Lee, J. C.-M.; Bates, F. S.; Discher, D. E.; Hammer, D. A. Polymersomes: Tough Vesicles Made from Diblock Copolymers. *Science* **1999**, *284*, 1143–1146.
- (110) Blanazs, A.; Armes, S. P.; Ryan, A. J. Self-Assembled Block Copolymer Aggregates: From Micelles to Vesicles and their Biological Applications. *Macromolecular Rapid Communications* **2009**, *30*, 267–277.
- (111) Letchford, K.; Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: Micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *65*, 259–269.
- (112) Klermund, L.; Poschenrieder, S. T.; Castiglione, K. Biocatalysis in Polymersomes: Improving Multienzyme Cascades with Incompatible Reaction Steps by Compartmentalization. *ACS Catalysis* **2017**, *7*, 3900–3904.
- (113) Peters, R. J. R. W.; Marguet, M.; Marais, S.; Fraaije, M. W.; van Hest, J. C. M.; Lecommandoux, S. Cascade reactions in multicompartmentalized polymersomes. *Angewandte Chemie* **2014**, *53*, 146–150.
- (114) Vriezema, D. M.; Garcia, P. M. L.; Sancho Oltra, N.; Hatzakis, N. S.; Kuiper, S. M.; Nolte, R. J. M.; Rowan, A. E.; van Hest, Jan C. M. Positional assembly of enzymes in polymersome nanoreactors for cascade reactions. *Angewandte Chemie* **2007**, *46*, 7378–7382.

- (115) Anraku, Y.; Kishimura, A.; Kamiya, M.; Tanaka, S.; Nomoto, T.; Toh, K.; Matsumoto, Y.; Fukushima, S.; Sueyoshi, D.; Kano, M. R. *et al.* Systemically Injectable Enzyme-Loaded Polyion Complex Vesicles as In Vivo Nanoreactors Functioning in Tumors. *Angewandte Chemie* **2016**, *55*, 560–565.
- (116) Sueyoshi, D.; Anraku, Y.; Komatsu, T.; Urano, Y.; Kataoka, K. Enzyme-Loaded Polyion Complex Vesicles as in Vivo Nanoreactors Working Sustainably under the Blood Circulation: Characterization and Functional Evaluation. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1189–1196.
- (117) Anraku, Y.; Kishimura, A.; Oba, M.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. Spontaneous formation of nanosized unilamellar polyion complex vesicles with tunable size and properties. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 1631–1636.
- (118) Tang, H.; Sakamura, Y.; Mori, T.; Katayama, Y.; Kishimura, A. Development of Enzyme Loaded Polyion Complex Vesicle (PICsome): Thermal Stability of Enzyme in PICsome Compartment and Effect of Coencapsulation of Dextran on Enzyme Activity. *Macromolecular Bioscience* **2017**, *17*, 1–7.
- (119) Chuanoi, S.; Anraku, Y.; Hori, M.; Kishimura, A.; Kataoka, K. Fabrication of polyion complex vesicles with enhanced salt and temperature resistance and their potential applications as enzymatic nanoreactors. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 2389–2397.
- (120) Sollier, E.; Murray, C.; Maoddi, P.; Di Carlo, D. Rapid prototyping polymers for microfluidic devices and high pressure injections. *Lab on a Chip* **2011**, *11*, 3752–3765.
- (121) von Langermann, J.; Wapenhensch, S. Hydroxynitrile Lyase-Catalyzed Synthesis of Enantiopure Cyanohydrins in Biocatalytic Active Static Emulsions (BASE) with Suppression of the Non-Enzymatic Side Reaction. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2014**, *356*, 2989–2997.
- (122) Garcia-Junceda, E. *Multi-Step Enzyme Catalysis*, 1st ed.; Wiley-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008.
- (123) Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. Enzyme-initiated domino (cascade) reactions. *Chemical Society Reviews* **2001**, *30*, 332–339.
- (124) Sirtunga, D.; Arias-Garzon, D.; White, W.; Sayre, R. T. Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification. *Plant Biotechnology Journal* **2004**, *2*, 37–43.
- (125) Simon, R. C.; Richter, N.; Busto, E.; Kroutil, W. Recent Developments of Cascade Reactions Involving  $\omega$ -Transaminases. *ACS Catalysis* **2013**, *4*, 129–143.
- (126) Patel, P. S. D.; Shepherd, D. E. T.; Hukins, D. W. L. Compressive properties of commercially available polyurethane foams as mechanical models for osteoporotic human cancellous bone. *BMC Musculoskeletal Disorders* **2008**, *9*, 137.
- (127) Bandomir, J.; Schulz, A.; Taguchi, S.; Schmitt, L.; Ohno, H.; Sternberg, K.; Schmitz, K.-P.; Kragl, U. Synthesis and Characterization of Polymerized Ionic Liquids: Mechanical and Thermal Properties of a Novel Type of Hydrogels. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2014**, *215*, 716–724.
- (128) Lante, A.; Tinello, F.; Lomolino, G. Effect of UV light on microbial proteases: From enzyme inactivation to antioxidant mitigation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2013**, *17*, 130–134.
- (129) Eckstein, M.; Daubmann, T.; Kragl, U. Recent Developments in NAD(P)H Regeneration for Enzymatic Reductions in One- and Two-Phase Systems. *Biocatalysis and Biotransformation* **2009**, *22*, 89–96.
- (130) Kindl, H. *Biochemie: Ein Einstieg*; Springer: Braunschweig, **1981**.
- (131) Kretschmer, C. B.; Nowakowski, J.; Wiebe, R. Solubility of Oxygen and Nitrogen in Organic Solvents from -25 to 50 °C. *Industrial and Engineering Chemistry* **1946**, *38*, 506–509.
- (132) Woo, J.-M.; Jeon, E.-Y.; Seo, E.-J.; Seo, J.-H.; Lee, D.-Y.; Yeon, Y. J.; Park, J. P. Improving catalytic activity of the Baeyer–Villiger monooxygenase-based *Escherichia coli* biocatalysts for

the overproduction of (Z)-11-(heptanoyloxy)undec-9-enoic acid from ricinoleic acid. *Nature* **2018**, 8, 1-11.

## Anhang

### Chemikalien

Alle aufgeführten Chemikalien wurden ohne weitere Aufreinigung direkt verwendet.

*Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland:*

Acetophenon, 2-Bromacetophenon, 3-Bromacetophenon, 4-Bromacetophenon, 2-Chloracetophenon, 3-Chloracetophenon, 4-Chloracetophenon, *iso*-Propanol, TEA, MTBE, Dikaliumhydrogenphosphat, Zitronensäure, Chloramphenicol, Ampicillin, alle Chemikalien für die Zellkultivierung, IPTG, Palmitinsäure, Pyridin, Hexan, Ethylacetat, Octylacetat, Heptan, Octanylchlorid, Undecan, 2-Heptanol, 2-Nonanol, 2-Nonanon, 1-Phenylethanol, (S)-1-Phenylethanol, Isopropyldecanoat, Isopropyloctanoat, Isopropylpalmitat

*Merck, Darmstadt, Deutschland:*

Magnesiumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Salzsäure, Glukose

*Tokyo Chemical Co., Tokyo, Japan:*

TMS, Rhamnose, Isopropylbutyra

*Thermo Scientific, Waltham, USA:*

Bovin Serum Albumin

*Evocatal, Monheim, Deutschland:*

LkADH evo 270, Glukosedehydrogenase

*Boimol, Hamburg, Deutschland:*

NADPH

*Norland Products, Cranbury, USA:*

NOA 81



*Novozymes, North Carolina, USA:*

Novozym 435

*VWR International, Darmstadt, Deutschland:*

Natriumhydroxid

*Fisher Scientific, Loughborough, Großbritannien:*

Calciumcarbonat, 1-Butanol, Ethanol

*Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland:*

Bromphenolblau

*Thermo Fischer (Kandel) GmbH (Alfa Aesar), Karlsruhe, Deutschland:*

2-Dodecanon, 2-Heptanon

## Publikationen, Vorträge und Posterbeiträge

- Publikationen in Fachzeitschriften
- (1) V. H. Gessner, F. Meier, **D. Uhrich**, M. Kaupp: „*Synthesis and Bonding in Carbene Complexes of an Unsymmetrical Dithio Methandiide: A combined Experimental and Theoretical Study*“, Chem. Eur. J. 2013, 19, 16729-16739
  - (2) **D. Uhrich**, J. von Langermann: „*Preparation and Characterization of Enzyme Compartments in UV-cured Polyurethane-based Materials and their Application in Enzymatic Reactions*“, Front. Microbiol. 2017, 8, 2111
  - (3) **D. Uhrich**, H.-Y. Jang, J.-B. Park, J. von Langermann: „*Characterization and Application of Chemical-resistant Polyurethane-based Enzyme and Whole Cell Compartments*“, J. Biotechnol. 2018, eingereicht
- Vorträge
- (1) **D. Uhrich**, J. von Langermann: „*Polymerbasierte Einschlussimmobilisierungen für den Einsatz in Enzymreaktionen*“, 3. Treffen des Graduiertennetzwerkes Life, Light and Matter 2016, Rostock, Deutschland; 22.01.2016
- Poster
- (1) **D. Uhrich**, J. C. Peinemann, S. Wapenhensch, J. von Langermann: „*A compartmented biocatalytic cascade reaction with contrary reaction conditions*“, Biotrans 2015, Wien, Österreich; 26.-30.07.2015
  - (2) **D. Uhrich**, J. C. Peinemann, S. Wapenhensch, J. von Langermann: „*Artificial cell like compartments for enzyme catalysis*“, 12th Japanese-German Frontiers of Science Symposium, Kyoto, Japan; 01.-04.10.2015
  - (3) **D. Uhrich**, H.-Y. Jang, J.-B. Park, J. von Langermann: „*Preparation and characterization of biocatalyst compartments in UV-cured polyurethane-based materials and their application in biotransformation*“, Biotrans 2017, Budapest, Ungarn; 21.-22.09.2017

## Wissenschaftlicher Lebenslauf

### Bildungsweg

---

Seit 03/2015	Doktorandin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Udo Kragl Universität Rostock (Rostock, DE) <ul style="list-style-type: none"><li>• Thema: Immobilisierungen von Enzymen in Polymeren</li><li>• Forschungsaufenthalt (Ewha Womans University, Seoul, KR); Thema: Immobilisierung ganzer Zellen und ihr Einsatz in Biotransformationen</li></ul>
10/2012 – 11/2014	Master of Science in Chemie Universität Rostock (Rostock, DE) <ul style="list-style-type: none"><li>• Abschlussarbeit: Neuartige Kompartimentierungstechniken für Biokatalytische Reaktionen</li><li>• Auslandssemester (Kyung Hee University, Seoul, KR)</li></ul>
10/2008 – 07/2012	Bachelor of Science in Chemie Julius-Maximilians-Universität (Würzburg, DE)

### Auslandserfahrung

---

03/2016 – 02/2017	Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Jin-Byung Park Ewha Womans University (Seoul, KR)
09/2013 – 03/2014	Auslandssemester und Forschungsaufenthalt Kyung Hee University, Ewha Womans University (Seoul, KR)

### Stipendien

---

DAAD Stipendium	DAAD Stipendium für Doktoranden über ein Jahr für den Forschungsaufenthalt an der Ewha Womans University; KR
-----------------	--